

黑曲霉发酵豆粕制备抗氧化肽研究

秦卫东, 陈学红, 马利华, 吕洁
(徐州工程学院食品工程学院, 江苏 徐州 221008)

摘要: 研究黑曲霉发酵豆粕制备大豆多肽的工艺条件及多肽的抗氧化性能, 并考察多肽的分子质量。结果表明: 在接种量为 2%、发酵液 pH6.0、底物质量浓度 9g/100mL、发酵时间 34h 的条件下, 所得发酵液中豆粕多肽的质量浓度最高, 为 3.38mg/mL。经凝胶层析分离后得到两个组分的大豆多肽(组分 I 和组分 II)。大豆多肽清除 DPPH 自由基和羟自由基活性及对脂质过氧化反应产物的抑制作用与其质量浓度均呈现良好的线性关系, 且组分 I 优于组分 II。大豆多肽组分 I 和组分 II 的分子质量分别为 675.58D 和 1625.54D。

关键词: 大豆多肽; 黑曲霉; 发酵; 抗氧化

Preparation of Antioxidant Peptides from Soybean Meal by *Aspergillus niger* Fermentation

QIN Wei-dong, CHEN Xue-hong, MA Li-hua, LÜ Jie
(School of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: The optimal processing conditions and antioxidant activity of soybean peptides prepared by *Aspergillus niger* fermentation were investigated and the molecular weights of soybean peptides were determined. The highest concentration of soybean peptides in the fermentation broth, 3.38 mg/mL, was achieved under the optimal preparation conditions, which were the inoculation amount of 2%, fermentation pH of 6.0, substrate concentration of 9 g/100 mL and fermentation time of 34 h. Fractions I and II were obtained from the fermentation supernatant of soybean meal through Sephadex G-15 gel permeation chromatographic separation. Both of them exhibited DPPH and hydroxyl free radical scavenging activities and inhibitory effect on lipid peroxidation, which were all linearly dependent on concentration, and fraction I was superior to fraction II. Moreover, it was found that the molecular weights of fractions I and II were 675.58D and 1625.54 D, respectively.

Key words: soybean peptide; *Aspergillus niger*; fermentation; antioxidation

中图分类号: TQ922.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0289-05

早在 1980 年, Yee 等^[1]就报道了大豆蛋白水解产物具有抗氧化性, 1991 年 Prokomy 提出^[2], 蛋白水解产物能降低自动氧化速率和脂肪的过氧化物含量。目前, 以蛋白质特别是提取油脂后的油料粕为原料采用酶法水解是制备活性肽工业化生产的主要方法。但是, 酶法制备肽时往往会产生一些苦味肽, 碱性蛋白酶水解物苦味最强, 木瓜蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶水解物苦味较低^[3]。利用微生物发酵制备多肽的方法引起了许多研究人员的兴趣。万琦等^[4-5]研究了大豆多肽生产菌株的筛选, 得到了一株能在发酵过程中产蛋白酶的枯草芽孢杆菌, 并研究了其发酵大豆多肽的条件优化。邵伟等^[6]报道了以豆粕粉为原料添加枯草杆菌将大豆蛋白水解为大豆多肽。陈学红等^[7]以芝麻粕为原料接种枯草芽孢杆菌发

酵, 结果发现发酵时间为 48h 所得发酵液中芝麻多肽的质量浓度达到 3.585mg/mL。李理等^[8]用毛霉发酵大豆蛋白制备多肽, 经 24~30h 发酵水解度达到 25%~30%, 多肽得率高达 75%。本实验以黑曲霉(*Aspergillus niger*)为菌种, 研究制备大豆多肽的工艺条件, 同时测定多肽的抗氧化性能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆粕由新沂明帝食品有限公司提供。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)由本院食品与生物工程实验中心提供。

1,1-二苯基-2-苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,

收稿日期: 2010-09-15

基金项目: 徐州市科技创新基金项目(XJ08057)

作者简介: 秦卫东(1961—), 男, 教授, 本科, 研究方向为食品活性成分及功能性。E-mail: wdqin@xzit.edu.cn

DPPH) 美国 Sigma 公司; 标准品牛血清白蛋白(M_w 67000D)、溶菌酶(M_w 14400D)、短菌肽(M_w 1422.7D)、L-精氨酸(M_w 174.2D) 国药集团化学试剂有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 豆粕多肽发酵实验

1.2.1.1 接种量的影响

准确称取 5 份 5.00g 豆粕置于 250mL 三角瓶中, 再称取 5 份 0.50g 蔗糖分别加入上述三角瓶中, 再各加蒸馏水 100mL, 调节发酵液培养基 pH7.0, 灭菌。向灭菌的发酵液中分别加入 1、2、3、4、5mL(3.2×10^7 CFU/mL) 菌液, 29℃、120r/min 培养 32h 后将这些发酵液离心, 上清液在 80℃的水浴中灭活 10min, 测此发酵上清液的多肽含量。

1.2.1.2 pH 值的影响

准确称取 5 份 5.00g 豆粕置于 250mL 三角瓶中, 再称取 5 份 0.50g 蔗糖分别加入上述三角瓶中, 再各加蒸馏水 100mL。调节发酵液培养基 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 灭菌。向灭过菌的发酵液加 3.2×10^7 CFU/mL 菌液 3mL, 29℃、150r/min 培养 32h。取出发酵液离心, 上清液在 80℃的水浴中灭活 10min, 测此发酵上清液的多肽含量。

1.2.1.3 豆粕质量浓度的影响

分别称取 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0g 豆粕于 250mL 三角瓶中, 再称取 5 份 0.50g 蔗糖分别加入上述三角瓶中, 各加蒸馏水 100mL 制备成底物质量浓度分别为 3、5、7、9、11g/100mL 的发酵培养基, 向灭过菌的发酵液中加 3.2×10^7 CFU/mL 菌液 3mL, 29℃、150r/min 培养 32h。取出发酵液离心, 上清液在 80℃的水浴中灭活 10min, 测此发酵上清液的多肽含量。

1.2.1.4 发酵时间的影响

准确称取 5 份 5.0g 豆粕置于 250mL 三角瓶中, 再称取 5 份 0.50g 蔗糖分别加入上述三角瓶中, 各加蒸馏水 100mL, 调节发酵液培养基 pH 值为 7.0, 灭菌。向灭完菌的发酵液中加入 2.4×10^7 CFU/mL 菌液 3mL, 在 29℃、150r/min 条件下分别考察发酵时间为 28、30、32、34、36h 时发酵液中多肽含量, 到发酵时间后, 分别取出发酵液离心, 上清液在 80℃的水浴中灭活 10min, 测此发酵上清液的多肽含量。

1.2.1.5 正交试验

根据上述单因素试验结果, 以接种量、pH 值、豆粕质量浓度、发酵时间作四因素三水平的正交试验。

1.2.2 多肽含量的测定

参照鲁伟等^[9]的方法, 多肽含量以酸可溶性多肽

计, 将等体积的 10% 三氯乙酸加入到豆粕多肽混合液中, 4000r/min 离心 15min, 去除酸不溶性的蛋白和长链肽沉淀。向上清液中分别加入 3mL 待测多肽液。再加入 2mL 双缩脲试剂, 充分混匀, 静置片刻, 以蒸馏水为空白, 用可见分光光度计于 540nm 波长处测各管吸光度。以牛血清白蛋白为标准品, 通过标准曲线计算处理液中的肽含量。

1.2.3 Sephadex G-15 凝胶层析法分离大豆多肽

取 150mL G-15 胶, 用漏斗慢慢装入 90cm 层析柱中, 并用蒸馏水保持湿润, 保持上面水平, 同时开动真空泵, 把胶抽实。当蒸馏水下降到与胶液面相切的时候, 加入样品, 进行检测。上样量为 0.5mL, 用蒸馏水作洗脱剂, 流速为 15mL/min。在出现波峰时收集各个组分, 经过多次分离收集样品。

1.2.4 蛋白肽分子质量测定

SDS-PAGE 电泳法。电泳条件: 加样量 20μL、电流为 32mA、电泳时间 2h。采用考马斯亮蓝 R-250 染色法测定电泳迁移率。以不同分子质量蛋白质标准品的迁移率为横坐标, 以其对应的分子质量对数为纵坐标作图, 线性回归得到标准曲线方程。根据未知样品的迁移率用回归方程计算其分子质量。

1.2.5 多肽抗氧化活性的测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除活性

按照 Brand-Williams 等^[10]的方法测定 DPPH 自由基清除活性。将 100μL 大豆多肽溶液与 400μL 100mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 和 500μL 新制备的 80mmol/L DPPH 乙醇溶液混合, 暗处放置 20min 后测定波长 517nm 处的吸光度 (A_1)。以蒸馏水为对照 (A_2)。由式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$I\% = (1 - \frac{A_1}{A_2}) \times 100 \quad (1)$$

1.2.5.2 羟自由基清除活性

根据 Zhang 等^[11]的方法测定。

1.2.5.3 脂质过氧化反应的抑制作用

根据 Pena-Ramos 等^[12]的方法稍作改进。用 pH7.4、0.1mol/L 磷酸缓冲液(PBS)配制 0.04mg/mL 的卵磷脂悬浊液, 取卵磷脂悬浊液 0.2mL, 分别加入不同质量浓度的大豆多肽溶液、0.2mL 25mmol/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液, 用上述 PBS 补足至 2mL, 在 37℃水浴振荡 15min 取出后, 加入 20% 三氯乙酸 0.5mL, 静置 10min, 于 3500r/min 离心 10min, 取上清液 2mL, 分别加入 0.8% 硫代巴比妥酸(TBA)1mL, 混匀, 置 100℃水浴 15min, 取出冷却, 以分光光度计测定其在波长 532nm 处的吸光度 A_1 。以不

加大豆多肽溶液为对照, 其吸光度记为 A_0 。则样品对脂质过氧化反应的抑制率可表示为:

$$I/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 豆粕多肽的制备

2.1.1 接种量对提取多肽的影响

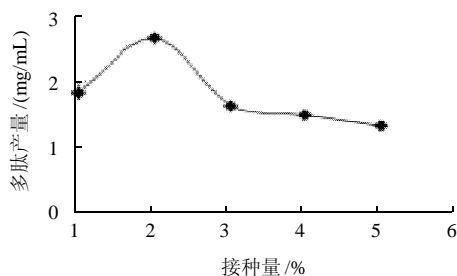


图1 接种量对多肽产量的影响

Fig.1 Effect of inoculation amount on the yield of soybean peptide

从图1可见, 随着接种量的增加, 多肽的产量在一定范围内是上升的。当接种量为2%时, 多肽的产量最大, 为2.69mg/mL。此后, 随着接种量增加, 多肽产量下降。因此, 黑曲霉在此发酵过程中接种量以2%为最佳。

2.1.2 pH值对提取多肽的影响

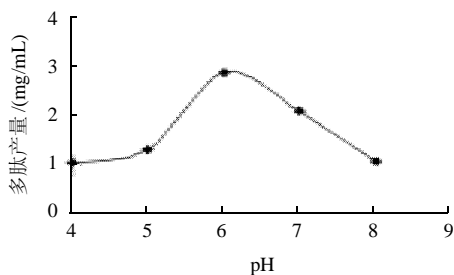


图2 pH值对多肽产量的影响

Fig.2 Effect of pH on the yield of soybean peptide

由图2可知, 随着pH值的增大多肽产量也随之增大, 但当到达pH7.0时, 多肽的产量达最大值2.93mg/mL。但当pH值继续增大时, 多肽的产量随之下降。这是由黑曲霉产蛋白酶性能决定的。罗跃中等^[13]指出, 培养基初始pH值对酶的合成有重大影响, 在培养基初始pH7, 即接近于中性时最为理想。本实验结果与此一致, 即

pH7.0时多肽产量最高, pH值增大后则不利于蛋白酶的合成, 分解蛋白质的能力降低, 多肽产量下降。

2.1.3 底物质量浓度对提取多肽的影响

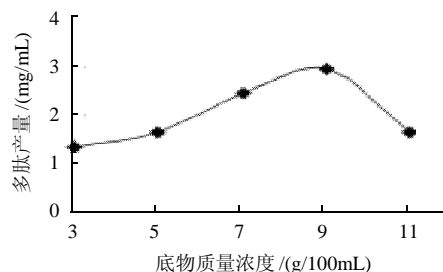


图3 底物质量浓度对多肽产量的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on the yield of soybean peptide

从图3可以看到, 随着底物质量浓度的增大多肽产量也随之增大, 当底物质量浓度为9g/100mL时, 多肽的产量达最大值2.94mg/mL。底物质量浓度过高, 多肽的产量反而下降。这可能是由于大豆粕含丰富的蛋白质, 当其质量浓度过高时会造成氮源过多的环境, 使菌体生长过于旺盛, 容易导致溶氧不足, 不利于水解酶类的积累, 从而导致多肽质量浓度下降。

2.1.4 发酵时间对提取多肽的影响

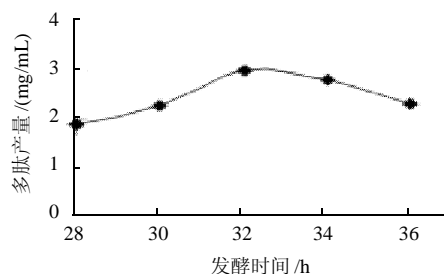


图4 发酵时间对多肽产量的影响

Fig.4 Effect of fermentation time on the yield of soybean peptide

从图4可以看到, 随着时间的延长, 多肽产量在一定范围内上升, 在32h达到最大值3.00mg/mL, 但此后多肽的产量随着时间延长而降低。这可能是因为继续发酵会产生一些能够降解肽的酶类, 从而导致多肽产量降低。因此, 黑曲霉在此发酵过程中最佳发酵时间为32h。

2.1.5 正交试验工艺优化

由表1可以看到, 因素主次顺序为发酵时间>接种量>底物质量浓度>起始pH值, 理论最佳组合为 $A_1B_2C_3D_3$, 即发酵时间34h、底物质量浓度9g/100mL、接种量2%、pH6.0, 与试验最佳组合 $A_1B_3C_3D_3$ 有差异,

以此理论最佳组合进一步实验, 得到多肽质量浓度为 3.38mg/mL。故 $A_1B_2C_3D_3$ 为最佳组合。

表 1 正交试验工艺优化结果

Table 1 Results of orthogonal experiments for optimizing fermentation conditions of soybean meal

试验号	A 接种量/%	B 起始 pH	C 底物质量浓度/(g/100mL)	D 发酵时间/h	多肽产量/(mg/mL)
1	1(2)	1(5)	1(5)	1(30)	0.76
2	1	2(6)	2(7)	2(32)	2.49
3	1	3(7)	3(9)	3(34)	2.60
4	2(3)	1	2	3	2.12
5	2	2	3	1	1.80
6	2	3	1	2	1.10
7	3(4)	1	3	2	1.19
8	3	2	1	3	1.40
9	3	3	2	1	0.92
K_1	5.85	4.07	3.26	3.48	
K_2	5.02	5.69	5.53	4.78	
K_3	3.51	4.62	5.59	6.12	
k_1	1.95	1.36	1.09	1.16	
k_2	1.67	1.90	1.84	1.59	
k_3	1.17	1.54	1.86	2.04	
R	0.78	0.54	0.77	0.88	

将上述条件下得到的 3000mL 大豆多肽发酵液在 4000r/min 离心 15min, 取上清液, 在 0.08MPa、料液温度为室温、膜面积为 0.1m²、膜截留分子质量为 5kD 的条件下, 对豆粕多肽提取液进行超滤纯化。收集所得样品 2500mL, 测得其多肽含量为 3.75mg/mL。

2.2 Sephadex G-15 凝胶层析法分离豆粕多肽

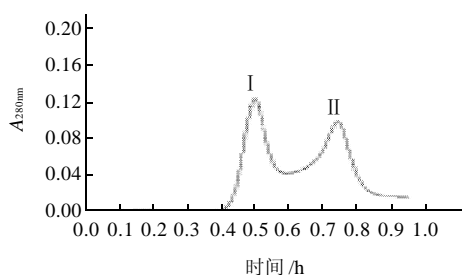


图 5 豆粕多肽 Sephadex G-15 凝胶层析结果

Fig.5 Sephadex G-15 gel permeation chromatographic separation of soybean peptides

如图 5 所示, 多肽液经过层析柱分离后得到两种主要成分, 在 0.4~0.5h 之间出现第一个峰(组分 I), 在 0.7~0.8h 之间出现第二个峰(组分 II)。多次分离收集组分 I 和组分 II, 分别浓缩备用。

2.3 豆粕多肽的抗氧化活性

2.3.1 DPPH 自由基清除活性

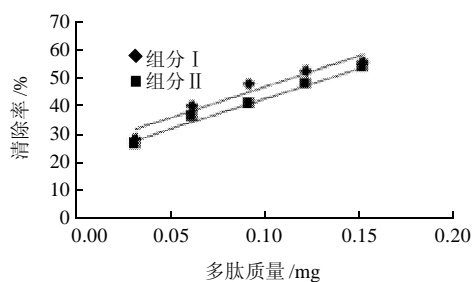


图 6 豆粕多肽清除 DPPH 自由基活性

Fig.6 Concentration-dependent scavenging activity of soybean peptides on DPPH free radicals

两个豆粕多肽组分清除 DPPH 自由基活性与其质量均呈良好的线性关系, 拟合方程分别为:

$$I_1/\% = 225.13x + 25.476 \quad (R^2 = 0.9284) \text{ 和 } I_2/\% = 221.97x +$$

21.805 ($R^2 = 0.9896$), 且组分 I 对清除 DPPH 自由基活性强于组分 II。

2.3.2 羟自由基的清除活性

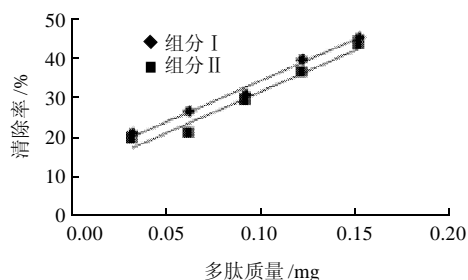


图 7 豆粕多肽清除羟自由基的活性

Fig.7 Concentration-dependent scavenging activity of soybean peptides on hydroxyl free radicals

两个豆粕多肽组分清除羟自由基活性与其质量均呈良好的线性关系, 拟合方程分别为:

$$I_1/\% = 209.87x + 14.162 \quad (R^2 = 0.9873) \text{ 和 } I_2/\% = 211x + 11.328$$

($R^2 = 0.9679$), 且组分 I 清除羟自由基活性强于组分 II。

2.3.3 脂质过氧化反应的抑制作用

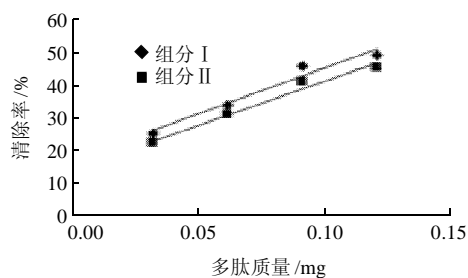


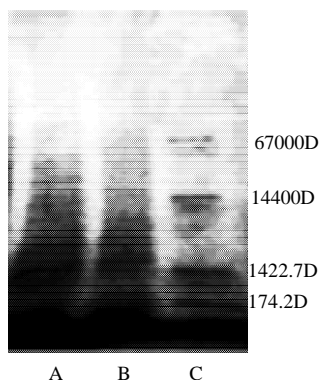
图 8 豆粕多肽对脂质过氧化反应的抑制作用

Fig.8 Concentration-dependent inhibitory effect of soybean peptides on lipid peroxidation

两个豆粕多肽组分对脂质过氧化反应的抑制与其质量均呈良好的线性关系, 拟合方程分别为:

$I_1/\% = 277.9x + 18.245 (R^2 = 0.9506)$ 和 $I_2/\% = 213.33x + 22.67 (R^2 = 0.9729)$, 且组分 I 对脂质过氧化反应的抑制能力强于组分 II。

2.4 豆粕多肽的分子质量



A. 组分 II; B. 组分 I; C. 标准蛋白。

图9 豆粕多肽 SDS-PAGE 电泳图

Fig.9 SDS-PAGE electrophoresis of soybean peptides

豆粕多肽 SDS-PAGE 电泳结果如图 9 所示。以标准蛋白质分子质量的对数为纵坐标, 相对迁移距离(相对迁移距离 = 蛋白质分子迁移距离 / 染料迁移距离)为横坐标作图, 得到标准曲线, 经回归计算得回归方程为: $y = -1.2705x + 4.9897 (R^2 = 0.9902)$ 。由此, 得到豆粕多肽组分 I 和组分 II 的分子质量分别为 675.58D 和 1625.54D。Chen 等^[14-16]提出具有抗氧化性多肽片段应由 5~16 个氨基酸残基组成, 分子质量在 600~1700D 之间。何荣等^[17]在研究菜籽肽清除自由基能力时发现, 分子质量越小的菜籽肽对 DPPH 自由基的清除能力越强。余勃^[18]在研究枯草芽孢杆菌发酵豆粕时发现, 经 36h 发酵主要得到分子质量在 300~1000D 范围内的短肽。庞宗文等^[19]用毛霉发酵豆粕后所产大豆肽分子质量主要集中在 10 kD 以下。本研究得到的两个主要组分的分子质量在 670~1630D 之间, 且分子质量较小的组分 I 的抗氧化能力强于分子质量较大的组分 II, 这些结果与上述报道基本一致。

3 结 论

本实验以脱脂豆粕为原料, 采用黑曲霉发酵制备抗氧化肽。正交试验法确定的最适发酵条件为: 发酵时间 34h、底物质量浓度 9g/100mL、接种量 2%、pH 6.0, 得到的多肽质量浓度为 3.38mg/mL。该最适条件下制备的大豆多肽发酵液经离心、超滤纯化后用 Sephadex G-15 凝胶层析分离, 得到两个主要多肽组分, 两个多肽

组分的分子质量分别为 675.58D 和 1625.54D。

以清除 DPPH 自由基和羟自由基活性及对脂质过氧化反应产物的抑制作用等方法测定黑曲霉发酵大豆多肽的抗氧化活性。结果表明: 大豆多肽的 3 种抗氧化活性与其质量均呈现良好的线性关系, 且组分 I 优于组分 II。

参考文献:

- [1] YEE J J, SHIPE W F, KINSELLA J E. Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation[J]. Journal of Food Science, 1980, 45(4): 1082-1083.
- [2] PROKOMY R. Natural antioxidants for food use[J]. Trends in Food Science & Technology, 1991, 2(1): 223-227.
- [3] HUMISKI L M, ALUKO R E. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(8): S605-S611.
- [4] 万琦, 陆兆新, 高宏. 脱苦大豆多肽产生菌的筛选及其水解条件的优化[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 29-32.
- [5] 万琦, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 枯草芽孢杆菌生产大豆多肽溶液的加工功能特性研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 99-102.
- [6] 邵伟, 熊泽, 何晓文. 发酵大豆多肽及其功能研究[J]. 中国酿造, 2005 (6): 23-25.
- [7] 陈学红, 秦卫东, 马利华, 等. 微生物发酵法制备芝麻蛋白肽的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 237-238; 241.
- [8] 李理, 潘进权, 杨晓泉, 等. 液体发酵法制备风味良好的大豆多肽[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 23-26.
- [9] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
- [10] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1995, 28(1): 25-30.
- [11] ZHANG Liangshuan, WANG Xuan, DONG Lulu. Antioxidation and antiglycation of polysaccharides from *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 183-187.
- [12] PEÑA-RAMOS E A, XIONG Y L. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(12): 2577-2583.
- [13] 罗跃中, 李忠英, 温拥军, 等. 黑曲霉固体发酵产酸性蛋白酶条件优化[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(1): 59-62.
- [14] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 574-578.
- [15] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.
- [16] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 49-53.
- [17] 何荣, 鞠兴荣, 袁建, 等. 固态发酵生产菜籽肽及其清除自由基能力的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 259-262.
- [18] 余勃. 枯草芽孢杆菌发酵豆粕生产大豆活性多肽的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [19] 庞宗文, 李敏, 李树波, 等. 产蛋白酶毛霉的分离筛选及发酵豆粕产大豆肽的初步研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(9): 956-961.