

油料蛋白

响应面优化枯草芽孢杆菌发酵豆粕 制备 ACE 抑制肽条件

李 景¹, 陈定刚², 马 龙³

(1. 天津天狮学院 生物与食品工程学院, 天津 301700; 2. 金天源食品科技(天津)有限公司, 天津 300452;

3. 京粮(天津)粮油工业有限公司, 天津 300452)

摘要:以豆粕为原料,对枯草芽孢杆菌发酵制备血管紧张素转化酶(Angiotensin I-converting enzyme, ACE)抑制肽发酵条件进行研究。以多肽得率和 ACE 抑制率为指标,通过单因素试验研究起始物料含水率、接种量、发酵温度、发酵时间对枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽的影响,通过响应面试验对发酵条件进行优化。结果表明:最佳发酵条件为起始物料含水率 59.5%,接种量 4.7%,发酵温度 38℃,发酵时间 48 h。在此条件下,ACE 抑制率达到 61.43%。

关键词:枯草芽孢杆菌; ACE 抑制肽; 豆粕; 响应面

中图分类号: TS229; TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)06-0031-05

Optimization of fermentation conditions for preparation of ACE inhibitory peptides from soybean meal by *Bacillus subtilis* using response surface methodology

LI Jing¹, CHEN Dinggang², MA Long³

(1. Department of Biological and Food Engineering, Tianshi College, Tianjin 301700, China;

2. Sinarmas Natural Resources Foodstuff Technology(Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300452, China;

3. Jingliang(Tianjin) Grain and Oil Industry Co., Ltd., Tianjin 300452, China)

Abstract: The fermentation conditions for preparation of Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean meal by *Bacillus subtilis* were studied. The effects of initial material water content, inoculation amount, fermentation temperature and fermentation time on the preparation of ACE from soybean meal were studied by single factor experiment with peptide yield and ACE inhibition rate as evaluation indexes. The fermentation conditions were optimized by response surface methodology. The results showed that the optimal fermentation conditions were obtained as follows: initial material water content 59.5%, inoculation amount 4.7%, fermentation temperature 38℃ and fermentation time 48 h. Under these conditions, the ACE inhibition rate reached 61.43%.

Key words: *Bacillus subtilis*; ACE inhibitory peptide; soybean meal; response surface methodology

目前,国产大豆的自给能力已降至 20%,大豆生产的比较效益低是最主要因素^[1]。我国大豆主要用于制油,豆粕作为饲料^[2-3],大豆精深加工欠缺,很多工厂在加工大豆时未充分利用副产品,导致

蛋白、磷脂等功能产品没有很好地发挥功能性作用^[4]。可利用蛋白为原料,通过酶解、发酵或直接提取等方式获得对血管紧张素转化酶(ACE)具有抑制活性的肽类物质,而 ACE 是导致人类患高血压的主要因素之一^[5],食源性 ACE 抑制肽可通过抑制 ACE 活性达到降血压的作用, Kontani 等^[6]的研究表明从大米蛋白水解物中分离纯化得到的 ACE 抑制肽在体内具有抑制活性,且食源性 ACE 抑制肽只

收稿日期:2018-01-29;修回日期:2018-03-28

作者简介:李 景(1982),女,讲师,硕士,研究方向为发酵工程(E-mail)lijingtcu@163.com。

对高血压患者起降压作用,对血压正常者无降压作用,具有安全有效、无副作用等优点,可开发为保健食品,用于预防、缓解和辅助治疗高血压^[7]。

国内外研究制备食源性 ACE 抑制肽方法多为酶法^[8-11],酶法制备 ACE 抑制肽存在酶消耗量大、多肽产率低、工序烦琐等缺点^[12-13],且酶水解各种蛋白质经常表现为苦味;与酶法相比,微生物发酵法可利用自身在生长过程中分泌的蛋白酶水解大豆蛋白,获取 ACE 抑制肽,此法成本较低,且可脱除苦味,因而具有良好前景^[14]。

枯草芽孢杆菌分泌蛋白酶能力较强,生长速率快,发酵周期短,具有公认的安全特性^[15],是对人和动物安全有益的微生物。本研究以豆粕为原料,利用枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽,应用响应面法优化其发酵条件,为提高豆粕利用附加值和食源性 ACE 抑制肽制备生产提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),天津天狮学院生物与食品工程学院微生物学实验室保藏菌种;豆粕(蛋白质含量为 48.74%),金天源食品科技(天津)有限公司提供;营养琼脂,北京奥博星生物技术有限公司;马尿酸-组胺酰-亮氨酸(Hip-His-Leu,HHL)、血管紧张素转化酶和 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽,购自美国 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Allegra 64R 台式离心机:贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;FD-1A-5 真空冷冻干燥箱;XMTD-204 电热恒温水浴锅;MJ-78A 高压蒸汽灭菌锅;AR124CN 电子天平;SW-CJ-1G 超净工作台;HNY-2102C 全温振荡培养箱;BPX-52 电热恒温培养箱;UV1000 紫外可见分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化

无菌操作条件下,从保藏菌种斜面挑取 1 环于新鲜营养琼脂斜面培养基,恒温培养箱 37℃ 培养 48 h,转接 2~3 次,至其充分活化。

1.2.2 枯草芽孢杆菌生长曲线测定

无菌操作将枯草芽孢杆菌挑取 1 环接种于营养琼脂液体培养基中,37℃、120 r/min 振荡培养,培养过程中每隔 2 h 取样 5 mL,2 000 r/min 离心 20 min 沉淀菌体,加入无菌蒸馏水混匀后定容至 10 mL,置于 600 nm 波长处测定其 OD 值,绘制枯草芽孢杆菌

的生长曲线。

1.2.3 液体种子制备

无菌操作从活化菌种挑取 1 环接种于种子培养基(营养琼脂液体培养基),于全温振荡培养箱 37℃、120 r/min 培养 18 h,调整菌体浓度达到 10⁷ cfu/mL。

1.2.4 发酵培养

发酵培养基:豆粕 10 g,葡萄糖 0.5 g,调整含水率至一定比例。121℃ 灭菌 20 min,取一定量的液体种子液,接入已灭菌的发酵培养基恒温培养。取发酵培养物 5 g,加入 200 mL 蒸馏水,在 25℃、200 r/min 条件下水浴振荡 2 h,5 000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤即为样品液。

1.2.5 发酵液多肽得率的测定

(1) Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线^[16]

按要求绘制 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线,得到回归方程 $y = 0.1533x + 0.0032$ (y 表示吸光值; x 表示肽质量浓度,mg/mL), $R^2 = 0.9965$,呈现良好线性关系。

(2) 多肽得率

取样品液 2.5 mL,加入 2.5 mL 的 10% 三氯乙酸溶液,摇匀后静置 10 min,5 000 r/min 条件下离心 20 min 后,将上清液转移至 50 mL 容量瓶,用 5% 的三氯乙酸溶液定容至刻度。取 6.0 mL 上述溶液至另一试管,加入双缩脲试剂 4.0 mL,混匀后静置 10 min 后,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 540 nm 处测定吸光值,对照 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线,得到样品液中的多肽质量浓度,进而得到样品中的多肽得率。

$$\text{多肽得率} = (C \times V) / M \times 100\%$$

式中: C 为样品液多肽质量浓度,mg/mL; V 为样品液体积,mL; M 为豆粕中蛋白质质量,mg。

1.2.6 ACE 抑制率测定

ACE 抑制率采用紫外分光光度法,参照文献^[17]进行测定。

1.2.7 数据处理

数据采用 Excel 2010 和 Design-Expert 8.0.6 进行处理与分析。

2 结果与讨论

2.1 枯草芽孢杆菌生长曲线

枯草芽孢杆菌生长曲线见图 1。由图 1 可知,培养开始阶段(0~10 h)吸光值变化较小,菌体数目在此时间段增加不明显,菌体生长存在延滞期,分析其原因可能由于不同菌种具有不同生长特性,且接种量为 1 环,初始菌种数量较少。当培养时间在

10~18 h时,吸光值明显增大,菌体数目增长很快;在18~34 h时吸光值基本稳定,说明菌体数目保持稳定,至34 h以后吸光值呈现降低趋势,表明发酵液中菌体数量开始减少。因此可知,10~18 h为菌株对数期,其代谢旺盛,抗不良条件能力强,因而选取培养18 h菌株为种子液。

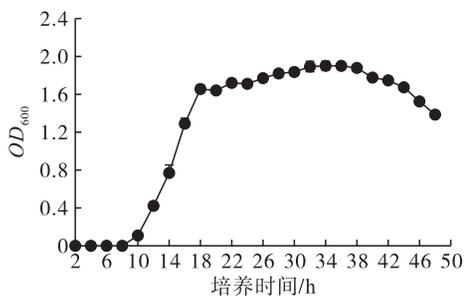


图1 枯草芽孢杆菌生长曲线

2.2 单因素试验

2.2.1 起始物料含水率对多肽得率及 ACE 抑制率的影响

发酵培养基起始物料含水率分别为30%、40%、50%、60%、70%,接种量为5%,37℃发酵培养48 h后,测定其发酵培养物的多肽得率和 ACE 抑制率,确定最佳起始物料含水率,结果见图2。

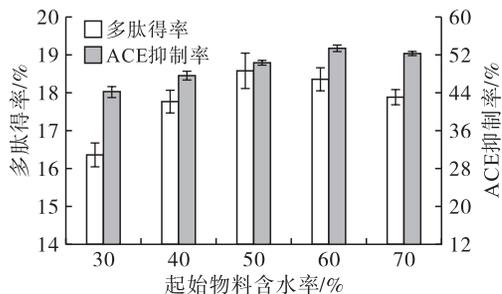


图2 起始物料含水率对多肽得率及 ACE 抑制率的影响

由图2可知,多肽得率和 ACE 抑制率随着起始物料含水率的增加呈先升后降的趋势,当起始物料含水率低于50%时,由于发酵过程中水分的散失以及发酵过程的影响,菌体生长代谢受限,所得多肽得率和 ACE 抑制率较低,当起始物料含水率为60%时,菌体生长较好,所得多肽得率和 ACE 抑制率较高,当起始物料含水量为70%时,菌体前期生长较好,后期由于营养消耗以及代谢产物的堆积,菌体生长受限,多肽得率和 ACE 抑制率开始降低。综合考虑,发酵培养基起始物料含水率选择60%。

2.2.2 接种量对多肽得率及 ACE 抑制率的影响

发酵培养基起始物料含水率为60%,接种量分别为1%、3%、5%、7%、9%,37℃发酵培养48 h后,测定其发酵培养物的多肽得率和 ACE 抑制率,确定最佳接种量,结果见图3。

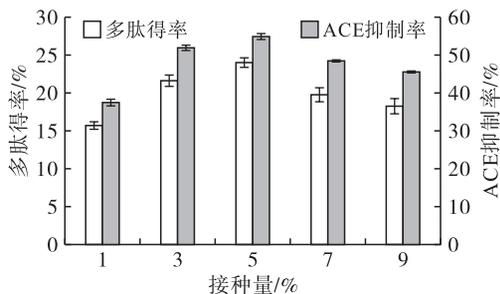


图3 接种量对多肽得率及 ACE 抑制率的影响

由图3可知,接种量在3%~7%之间时,多肽得率和 ACE 抑制率相对较高,当接种量5%时,多肽得率和 ACE 抑制率达到最高,分别为24.0%和55.50%。接种量的多少影响枯草芽孢杆菌生长速度,接种量过低,微生物生长缓慢;接种量过高,微生物生长速度过快,过早进入衰亡期,发酵能力下降。因此,选择接种量为5%。

2.2.3 发酵温度对多肽得率及 ACE 抑制率的影响

发酵培养基起始物料含水率为60%,接种量为5%,发酵温度分别为27、32、37、42、47℃,发酵培养48 h后,测定其发酵培养物的多肽得率和 ACE 抑制率,确定最佳发酵温度,结果见图4。

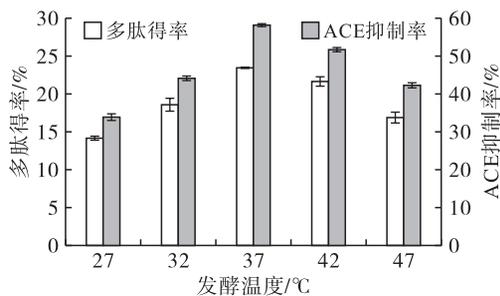


图4 发酵温度对多肽得率和 ACE 抑制率的影响

微生物发酵过程需维持适当的温度,才能使菌体生长和代谢产物的生产顺利进行。由图4可知,发酵温度对多肽得率和 ACE 抑制率产生了明显影响。当发酵温度低于37℃时,多肽得率和 ACE 抑制率随着发酵温度的升高而升高;当发酵温度高于37℃时,多肽得率和 ACE 抑制率随着发酵温度的升高而降低;当发酵温度为37℃时,多肽得率和 ACE 抑制率最高,分别为23.5%和58.31%。因此,选取发酵温度为37℃。

2.2.4 发酵时间对多肽得率及 ACE 抑制率的影响

发酵培养基起始物料含水率为60%,接种量为5%,发酵温度37℃,分别发酵培养24、36、48、60、72 h后,测定其发酵培养物的多肽得率和 ACE 抑制率,确定最佳发酵时间,结果见图5。

由图5可知,当培养时间短于48 h时,多肽得率和 ACE 抑制率随着发酵时间的延长而升高,48 h

时多肽得率和 ACE 抑制率达到最大值;当发酵时间超过 48 h 时,多肽得率和 ACE 抑制率随着发酵时间的延长略有下降,原因可能由于随着菌体的生长,营养的消耗,代谢产物的产生,菌体生长受到抑制导致。因此,确定发酵时间为 48 h。

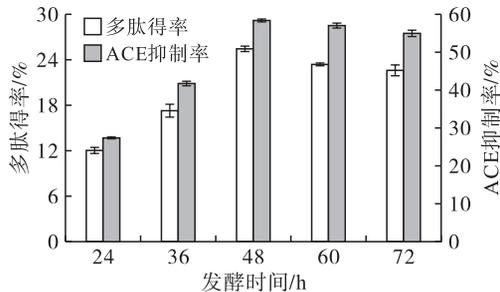


图5 发酵时间对多肽得率和 ACE 抑制率的影响

2.3 响应面优化试验

2.3.1 响应面试验设计及结果

依据单因素试验的结果,确定发酵时间为 48 h,选取起始物料含水率、接种量、发酵温度 3 个因素为响应变量,以 ACE 抑制率为响应值进行试验,优化枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽的发酵条件。依据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,设计 17 组试验。因素水平见表 1,响应面试验设计及结果见表 2。

表 1 因素水平

水平	A 起始物料含水率/%	B 接种量/%	C 发酵温度/℃
-1	50	3	32
0	60	5	37
1	70	7	42

表 2 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	ACE 抑制率/%
1	-1	0	1	56.78
2	1	0	1	57.34
3	0	0	0	60.27
4	0	0	0	60.44
5	0	0	0	61.52
6	-1	0	-1	48.65
7	0	1	-1	48.79
8	0	1	1	56.89
9	0	0	0	60.98
10	1	1	0	58.98
11	-1	1	0	58.29
12	0	-1	-1	48.97
13	-1	-1	0	58.35
14	1	0	-1	48.87
15	0	0	0	61.47
16	0	-1	1	57.71
17	1	-1	0	59.12

2.3.2 模型的建立与显著性分析

通过 Design - Expert 8.0.6 软件对表 2 进行回归拟合,获得 ACE 抑制率 (Y) 的二次多项回归方程: $Y = 60.94 + 0.28A - 0.15B + 4.18C - 0.020AB + 0.085AC - 0.16BC - 1.22A^2 - 1.04B^2 - 6.81C^2$ 。

对二次多项回归方程进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,模型 $P < 0.0001$,表明模型极显著;失拟项不显著 ($P = 0.9266 > 0.05$), $R^2 = 0.9877$, $R^2_{Adj} = 0.9906$,说明回归方程拟合度良好,该模型成立,可进行分析 and 预测。方程的一次项中 C 极显著 ($P < 0.01$),说明发酵温度对 ACE 抑制率影响极显著,根据 F 值大小,可以判断 3 个因素对 ACE 抑制率影响的主次顺序为发酵温度 (C) > 起始物料含水率 (A) > 接种量 (B);二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 影响极显著 ($P < 0.01$)。

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	355.77	9	39.53	189.17	<0.0001**
A	0.63	1	0.63	3.00	0.1268
B	0.18	1	0.18	0.86	0.3842
C	139.78	1	139.78	668.93	<0.0001**
AB	1.60E-003	1	1.60E-003	7.66E-003	0.9327
AC	0.03	1	0.03	0.14	0.7210
BC	0.10	1	0.10	0.49	0.5065
A^2	6.22	1	6.22	29.77	0.0009**
B^2	4.51	1	4.51	21.61	0.0023**
C^2	195.30	1	195.30	934.61	<0.0001**
残差	1.46	7	0.21		
失拟项	0.15	3	0.05	0.15	0.9266
纯误差	1.32	4	0.33		
总和	357.23	16			

注: ** 为差异极显著 ($P < 0.01$); * 为差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3.3 响应面优化与验证

对二次多项回归方程求导,得到发酵培养基起始物料含水率、接种量、发酵温度分别为 59.45%、4.71%、38.18℃ 时,ACE 抑制率最高为 61.54%。考虑实际操作的可能性,修正条件为起始物料含水率 59.5%、接种量 4.7%、发酵温度 38℃,为验证方程预测的准确性,在此条件下进行 3 次平行试验,测得平均 ACE 抑制率为 61.43%,与理论预测值基本吻合,说明此模型对枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽具有一定的指导意义。

3 结论

本研究以多肽得率和 ACE 抑制率为指标进行单因素试验,测定发酵培养基起始物料含水率、接种

量、发酵温度、发酵时间对枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽的影响,得出各因素较优值,确定了发酵时间为 48 h。通过 Box - Behnken 试验设计进行优化,得出各因素对 ACE 抑制率影响程度大小顺序为:发酵温度 > 起始物料含水率 > 接种量,确定枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽的最优发酵条件为起始物料含水率 59.5%、接种量 4.7%、发酵温度 38 ℃、发酵时间 48 h,在此条件下 ACE 抑制率达到 61.43%。因此,利用响应面法可对枯草芽孢杆菌发酵豆粕制备 ACE 抑制肽进行优化。

参考文献:

- [1] 董非非,刘爱民,封志明,等.大豆传统产区粮食作物种植结构变化特征及原因分析术——以黑龙江省嫩江县为例[J].中国农业资源与区划,2017,38(3):79-85.
- [2] 刘忠堂.关于中国大豆产业发展战略的思考[J].大豆科学,2013,32(3):283-285.
- [3] 张连慧,熊小辉,惠菊,等.发酵豆粕及其在动物养殖行业中的应用研究进展[J].中国油脂,2017,42(3):108-112.
- [4] 王威,吴领祖,盛林霞,等.国内大豆加工产业现状及对策[J].粮食流通技术,2017(1):55-57.
- [5] 于志鹏,樊玥,赵文竹,等.海洋蛋白源 ACE 抑制肽研究进展[J].食品工业科技,2017,38(1):395-399.
- [6] KONTANI N, OMAE R, KAGEBAYASHI T, et al. Characterization of Ile - His - Arg - Phe, a novel rice - derived vasorelaxing peptide with hypotensive and anorexigenic activities[J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(2): 359 - 364.
- [7] 王晓丹,薛璐,胡志和,等. ACE 抑制肽构效关系研究进展[J].食品科学,2017,38(5):305-310.
- [8] SAMARAKOON K W, O - NAM K, KO J Y, et al. Purification and identification of novel angiotensin - I converting

enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate [J]. J Appl Phycol, 2013, 25(5):1595-1606.

- [9] XU Y, BAO T, HAN W, et al. Purification and identification of an angiotensin I - converting enzyme inhibitory peptide from cauliflower by - products protein hydrolysate [J]. Process Biochem, 2016, 51(9):1299-1305.
- [10] HUANG D D, MA L, CAI L Y, et al. Effect of pretreatments on release of collagen - derived angiotensin - converting - enzyme inhibitory peptide in enzymatic hydrolysis [J]. Mod Food Sci Technol, 2016,32(7):85-90.
- [11] WANG F J, YIN X Y, REGENSTEIN J M, et al. Separation and purification of angiotensin - I - converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from walnuts (*Juglans regia* L.) meal [J]. Eur Food Res Technol, 2016,242(6):911-918.
- [12] 魏春燕.酪蛋白非磷肽酶膜耦合制备 ACE 抑制肽 [D].江苏无锡:江南大学,2011.
- [13] 崔洁,孔祥珍,周惠明,等.小麦面筋蛋白预处理及酶膜耦合连续反应研究 [J].食品工业科技,2011,32(6):188-191.
- [14] 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.
- [15] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production [J]. Can J Microbiol, 2004, 50(1):1-17.
- [16] 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.
- [17] BAO Z J, CHI Y J. In vitro and in vivo assessment of angiotensin - converting enzyme (ACE) inhibitory activity of fermented soybean milk by *Lactobacillus casei* strains [J]. Curr Microbiol, 2016, 73(2):214-219.

(上接第 18 页)

(2)因菜籽毛油中基本指标都在标准范围内,适当降低精炼条件可以增加菜籽油中有益成分,减少有害成分,而影响这些成分主要阶段在脱色和脱臭;现有的脱色工艺为油温 105 ℃、白土添加量 1.3%、反应时间约 60 min、真空度 11 kPa、直接蒸汽压力 0.05 MPa,建议减少白土添加量到 1.0%,缩短反应时间到 50 min。脱臭工艺为进油油温 249.3 ℃、反应时间 60 min 以上、真空度 0.26 kPa、直接蒸汽压力 0.05 MPa、出塔油温 253.6 ℃,建议缩短反应时间到 40 min。

参考文献:

- [1] 谢丹,金青哲,王兴国.精炼对菜籽油品质的影响 [J].中

国油脂,2012,37(1):1-5.

- [2] 陈萌.微波预处理油菜籽对压榨饼浸出油品质的影响 [D].武汉:华中农业大学,2013.
- [3] 朱晋莹,朱跃进,张士康,等.茶叶籽油的脂肪伴随物成分分析初报 [J].中国茶叶加工,2011(4):47-50.
- [4] 谢心美,郝海鑫,何剑斌.植物甾醇的生理功能及其应用 [J].草业科学,2013,30(12):2105-2109.
- [5] 王瑛瑶,魏翠平,段章群,等.精炼对大豆油和菜籽油中主要微量成分的影响研究 [J].中国粮油学报,2014,29(10):47-50.
- [6] 刘存存,方学智,姚小华,等.油茶籽油精炼过程中主要营养成分的变化 [J].中国油脂,2011,36(2):36-39.
- [7] 向晓玲,赵波,李春松,等.食用油中 3 - 氯丙醇酯的研究进展 [J].中国油脂,2017,42(7):59-64.