

微生物发酵法制备大豆小分子肽的工艺条件研究

许芳¹,高冰^{2*},高泽鑫³

(1. 武汉轻工大学,湖北武汉 430023;2. 湖北工业大学,湖北武汉 430068;3. 武汉生物工程学院,湖北武汉 430415)

摘要 [目的]探讨制备大豆小分子肽的最佳工艺条件。[方法]以脱脂大豆粉为原料,通过多种微生物菌种固态发酵产蛋白酶水解制备小分子肽,并应用正交试验优化制备条件。[结果]试验得出,微生物发酵法制备大豆小分子肽的最优发酵条件为:料液比 1:1.0 g/ml、0.2% 黑曲霉、0.2% 米曲霉、1% 酿酒酵母、发酵温度 32 ℃,湿度 80%、发酵时间 36 h 时,蛋白酶活力为 466.8 U/g;最优水解条件为:水解温度 55 ℃、水解时间 10 h、pH 6.5、料液比为 1:2.5 g/ml 时,水解度可达到 90.61%。[结论]此工艺方法提高了脱脂大豆粉的食用价值和产品附加值。
关键词 脱脂大豆粉;固态发酵;大豆小分子肽;正交试验
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)10-03060-02

Research on Technological Conditions for Preparation of Soybean Minor Peptides by Microbial Fermentation
XU Fang,GAO Bing et al (Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023; Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068)

Abstract [Objective] To investigate the optimum technology conditions for preparation of soybean micromolecule peptides. [Method] With defatted soy flour as raw material, soybean micromolecule peptides was prepared by hydrolysis reaction by protease, which was produced with solid-state fermentation by a variety of microorganisms. The optimum technology conditions were ascertained by the use of orthogonal test. [Result] Under the conditions of temperature 32 ℃, 0.2% *Aspergillus niger*, 0.2% *Aspergillus oryzae*, 1% *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation time 36 h, humidity 80%, liquid material ratio 1:1.0 g/ml, proteinase activity was 466.8 U/g. Under the conditions of temperature 55 ℃, hydrolysis time 10 h, pH 6.5, liquid material ratio 1:2.5 g/ml, enzymatic hydrolysis of peptide was 90.61%. [Conclusion] This processing method can improve the defatted soy flour edible value and the added value of the products.
Key words Defatted soybean flour; Solid-state fermentation; Soybean micromolecule peptides; Orthogonal test

人体从外界摄取的蛋白类营养物质被分解后大多以小分子肽的形式被消化吸收,大分子肽及游离氨基酸被吸收的比例很小,且小分子肽的吸收更为迅速^[1]。脱脂大豆粉在发酵及酶解过程中可以产生一些具有特殊生理活性的植物源生物功能小分子肽^[2]。这些生物活性小分子肽不仅能提供人体生长发育所需的营养物质,还具有独特的生物学功能,可以抗血栓、抗高血压、抗高血脂、延缓衰老、抵抗疲劳、抗氧化、提高机体免疫力等^[3-4]。

通过活性益生菌对发酵的脱脂大豆粉酶解发酵,可以产生具有生物活性的小分子肽。植物源生物活性肽由于资源丰富,又具有良好的生理功能和较高安全性,可作为功能型食品基料添加到各类食品中去,目前已有多种生物活性肽如降血压肽、促进钙质吸收肽获得了工业化生产^[5-6]。笔者以脱脂大豆粉为原料,通过黑曲霉、米曲霉和酿酒酵母制备其蛋白酶解液,用正交试验的方法确定菌酶水解制取大豆小分子肽的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料 供试脱脂大豆粉均为市售;黑曲菌、米曲菌、酿酒酵母由武汉轻工大学 409 试验室提供。主要试剂:37% 甲醛、氢氧化钠,国药集团有限公司;其他试剂均为分析纯。主要仪器:PYX-250S-A 生化培养箱,科力仪器;BME(BA/E3)双目生物显微镜,德国莱卡;BS224S 分析天平,杭州科博仪器有限公司;DSX-280B 不锈钢蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;SW-CJ-1FD 超净工作台,苏州苏洁净化设备公司;pHS-

3C 精密数字式酸度计,上海悦丰仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脱脂大豆粉的固态发酵方法。称取 100 g,将脱脂大豆粉加水拌匀后,放高压锅中于 115 ℃ 蒸煮 10~15 min,然后分别按不同组合接入米曲霉、黑曲霉和酿酒酵母。黑曲霉和米曲霉分别按原料比例的 0.2% 加入,酿酒酵母按 1% 加入,铺平盖好,于恒温恒湿培养箱中发酵,每隔 2 h 取样,检测一次蛋白酶的活力,到蛋白酶的活力不再变化时停止发酵。

1.2.2 固态发酵正交试验设计。根据初步试验分析,固态发酵过程中主要的影响因素有 5 个,即:发酵温度、湿度、菌种组合、加水量、发酵时间,以此 5 个因素设计了正交试验因素水平(表 1),并通过 L₁₆(4⁵) 正交试验,确定最佳固态发酵条件。

表 1 脱脂大豆粉固态发酵正交试验因素水平设计

水平	因素				
	温度 (A) ℃	湿度 (B) %	菌种 组合 (C)	料液比 (D) g/ml	发酵 时间 (E)//h
1	28	75	黑曲霉+米曲霉	1:0.8	24
2	30	80	黑曲霉+米曲霉+酿酒酵母	1:0.9	36
3	32	85	黑曲霉+酿酒酵母	1:1.0	48
4	34	90	米曲霉+酿酒酵母	1:1.1	60

1.2.3 菌、酶水解条件正交试验设计。经初步试验分析,菌、酶水解脱脂大豆粉的主要影响因素为 4 个,即:水解温度、溶液 pH、水解时间、料液比,以此 4 个因素设计了正交试验的因素水平(表 2),通过 L₁₆(4⁵) 正交试验确定菌、酶水解的最佳工艺条件。

1.3 分析项目及检测方法

1.3.1 蛋白酶活力检测方法。按福林酚法(QB/T 1803-

作者简介 许芳(1979-),女,湖北襄阳人,实验师,硕士,从事生物化工研究。* 通讯作者。
收稿日期 2014-02-28

1993)测定蛋白酶酶活。

表 2 菌、酶水解正交试验因素水平设计

水平	因素			
	温度 (A) /℃	pH (B)	料液比 (C) //g/ml	水解时间 (D) //h
1	40	6.0	1:2.5	10
2	45	6.5	1:3.5	12
3	50	7.0	1:4.5	14
4	55	7.5	1:5.5	16

1.3.2 水解度测定。采用甲醛滴定法^[7]测定。

2 结果与分析

2.1 固态发酵正交试验结果分析 微生物发酵法制备大豆小分子肽的固态发酵正交试验方案及结果见表 3。由表 3 数据分析可知,5 种因素对产酶效果影响次序为:温度(A) > 发酵时间(E) > 菌种组合(C) > 湿度(B) > 料液比(D)。脱脂大豆粉混合发酵产蛋白酶的最佳条件组合为 A₃E₂C₂B₂D₃,即料液比按 1:1.0 g/ml 混合后,在 115 ℃ 蒸煮锅内蒸煮 15 min,待降至适宜温度,按原料比例接入 0.2% 的黑曲霉、0.2% 的米曲霉和 1.0‰ 的酿酒酵母,在 32 ℃,80% 湿度的恒温恒湿培养箱中固态发酵 36 h(其中翻料 1 次,以免烧料),达到蛋白酶活力最高。以此工艺条件做验证试验,在最佳发酵条件下,蛋白酶活力为 466.8 U/g。

表 3 多菌种固态混合发酵脱脂大豆粉正交试验结果

试验号	因素					蛋白 酶活 U/g
	温度 (A) /℃	湿度 (B) //%	菌种 组合(C)	料液比 (D)	发酵时间 (E) //h	
1	1	1	1	1	1	287.4
2	1	2	2	2	2	440.6
3	1	3	3	3	3	373.3
4	1	4	4	4	4	289.7
5	2	1	2	3	4	362.4
6	2	2	1	4	3	440.6
7	2	3	4	1	2	367.7
8	2	4	3	2	1	428.5
9	3	1	3	4	2	462.8
10	3	2	4	3	1	437.5
11	3	3	1	2	4	361.2
12	3	4	2	1	3	451.5
13	4	1	4	2	3	394.3
14	4	2	3	1	4	373.4
15	4	3	2	4	1	430.4
16	4	4	1	3	2	462.3
k ₁	463.4	393.9	349.6	370.0	361.3	
k ₂	533.1	423.0	421.2	388.6	433.4	
k ₃	571.0	383.1	374.8	408.9	393.8	
k ₄	415.1	373.3	353.3	367.6	346.6	
R	155.9	49.7	71.6	41.3	86.8	

2.2 菌、酶水解正交试验结果 根据表 2 所设计菌、酶水解正交试验表进行正交试验,结果见表 4。分析表 4 数据可知,由极差 R 分析得出各因素影响水解的主次顺序是料液比(C) > pH(B) > 温度(A) > 水解时间(D)。经发酵后脱脂大

豆粉的最佳菌酶水解条件组合为:C₁B₂A₄D₁,即料液比为 1:2.5 g/ml,pH 6.5,55 ℃ 条件下,水解 10 h。在此最佳条件下,进行验证试验,水解度达到 90.61%。

表 4 菌、酶水解正交试验结果

试验号	因素				水解度 %
	温度 (A)	pH (B)	料液比 (C)	水解时间 (D) //h	
1	1	1	1	1	89.45
2	1	2	2	2	86.45
3	1	3	3	3	85.42
4	1	4	4	4	87.56
5	2	1	2	4	84.12
6	2	2	1	3	90.52
7	2	3	4	2	86.48
8	2	4	3	1	87.12
9	3	1	3	2	86.42
10	3	2	4	1	86.43
11	3	3	1	4	88.15
12	3	4	2	3	85.49
13	4	1	4	3	87.36
14	4	2	3	4	88.42
15	4	3	2	1	87.47
16	4	4	1	2	89.04
K ₁	348.88	345.76	357.16	350.47	
K ₂	348.24	350.76	343.53	348.39	
K ₃	346.69	347.52	347.38	348.79	
K ₄	352.29	349.07	347.83	348.25	
R	4.05	5.00	13.63	2.22	

3 结论

试验确定了脱脂大豆粉最佳固态发酵条件:料液比按 1:1.0 g/ml 混合后,在 115 ℃ 蒸煮锅内蒸煮 15 min,待降至适宜温度,按原料比例接入 0.2% 的黑曲霉、0.2% 的米曲霉和 1‰ 的酿酒酵母,在 32 ℃,80% 湿度的恒温恒湿培养箱中固态发酵 36 h。

生产功能型小分子肽的最佳工艺参数为:料液比为 1:2.5 g/ml,pH 6.5,55 ℃ 条件下,水解 10 h。

经上述菌酶水解工艺制备的大豆小分子肽的理化性、营养性、功能性等均优于大豆蛋白质。因此,将大豆小分子肽作为功能型食品基料添加到各类食品中去,具有广阔的市场前景和良好的社会效益。

参考文献

[1] 刘海军,乐超银,邵伟,等.生物活性肽研究进展[J].中国酿造,2010(5):5-8.

[2] 李书国.大豆多肽食品的开发[J].食品科学,1997(9):13-15.

[3] 姜曼,宋俊梅.大豆肽研究概况[J].中国酿造,2009(3):8-11.

[4] 黄骊虹.大豆多肽的生理功能及应用[J].食品科技,1997(4):51-52.

[5] 章少在,张少斌.植物源活性肽的研究进展及其吸收机制[J].中国酿造,2011(5):1-4.

[6] 李雄辉,过新胜,徐刚.大豆多肽提取工艺的研究[J].食品科学,1999(9):28-30.

[7] MOLLE D,LEONI L. Quantitative determination of bovine k-casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/Electrospray coupled to mass spectrometry(LC-ESI/MS) and Liquid chromatography/Electrospray coupled to tandem mass spectrometry(LC-ESI/MS/MS)[J]. International Dairy Journal,2005,15:419-428.