

郭元新, 郭宇, 朱凤, 等. 微波联合金属离子对麦胚中肽的富集研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 217–223. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030094

GUO Yuanxin, GUO Yu, ZHU Feng, et al. Study on the Enrichment of Peptides in Wheat Germ by Microwave Combined with Metal Ions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 217–223. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030094

· 工艺技术 ·

微波联合金属离子对麦胚中肽的富集研究

郭元新, 郭宇, 朱凤, 张瑶, 王东旭, 叶华, 俞玥

(江苏科技大学粮食学院, 江苏镇江 212000)

摘要: 为高效富集麦胚多肽, 采用微波联合金属离子处理麦胚, 考察微波功率、微波时间、 ZnSO_4 浓度、 MnSO_4 浓度、 CaCl_2 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响, 在单因素实验的基础上通过正交试验对工艺参数进行了优化。结果表明: 在微波功率 400 W, 微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 1.0 mmol/L, MnSO_4 浓度 1.6 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L 的条件下, 麦胚中的多肽含量可达 228.85 mg/g, 蛋白酶活力提高至 2268.40 U/g。微波联合金属离子处理对麦胚中肽的富集有显著促进作用。

关键词: 麦胚, 金属离子, 微波, 肽含量, 蛋白酶活力

中图分类号: TS213.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)01-0217-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030094

本文网刊:



Study on the Enrichment of Peptides in Wheat Germ by Microwave Combined with Metal Ions

GUO Yuanxin, GUO Yu, ZHU Feng, ZHANG Yao, WANG Dongxu, YE Hua, YU Yue

(School of Grain Science and Technology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212000, China)

Abstract: In order to efficiently enrich wheat germ polypeptide, microwave combined with metal ions were used to treat wheat germ, and the effects of microwave power, microwave time, ZnSO_4 concentration, MnSO_4 concentration, and CaCl_2 concentration on wheat germ peptide content and protease activity were investigated. The process parameters were optimized by orthogonal experiment on the basis of single factor. The results showed that under the conditions of microwave power 400 W, microwave time 10 s, ZnSO_4 concentration 1.0 mmol/L, MnSO_4 concentration 1.6 mmol/L and CaCl_2 concentration 1.4 mmol/L, the polypeptide content in wheat germ could reach 228.85 mg/g, and the protease activity increased to 2268.40 U/g. Microwave combined with metal ions can significantly promote the enrichment of peptides in wheat germ.

Key words: wheat germ; metal ion; microwave; peptide content; protease activity

麦胚是面粉加工的副产品^[1], 含有丰富的蛋白质、脂肪、糖类、维生素、谷胱甘肽、黄酮类物质、脂多糖及甾醇等多种营养物质^[2-4]。麦胚中蛋白含量高达 30% 左右, 麦胚蛋白多为完全蛋白, 含有人体必需的 8 种氨基酸, 被认为是一种优质的植物蛋白来源^[5-7]。但通常麦胚被当作饲料廉价出售, 得不到合理利用。研究人员发现, 麦胚水解产生多种功能肽^[8], 可降低胆固醇、调节血压、预防心血管疾病等^[9-12]。麦胚中的肽水溶性较好、热稳定性强、耐酸碱能力强, 通常可以作为抗氧化肽、降血糖肽、谷胱甘肽和血管紧张

素转化酶抑制肽等功能因子被添加到食品中^[13]。

国内外通常采用微生物发酵法、外源酶水解法和内源酶水解法等生物技术来富集麦胚蛋白中的肽, 以实现麦胚中肽的高值化利用^[10]。其中微生物发酵法制备的肽适口性较好, 但可用微生物菌种较少且不适用于所有肽的制备。利用外源蛋白酶水解麦胚蛋白, 产物得率较高, 但生产成本低, 水解产物含有多种疏水性苦味肽^[12, 14, 15], 影响产品的风味和口感。麦胚的主要内源蛋白酶有半胱氨酸、丝氨酸、天冬氨酸和金属蛋白酶等^[15, 8]。麦胚经过孵育, 内源蛋白酶被激

收稿日期: 2022-03-09

基金项目: 镇江市重点研发项目 (NY2020016)。

作者简介: 郭元新 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮油食品加工与营养健康, E-mail: guoyuanxin@just.edu.cn。

活,麦胚蛋白被降解成可溶性蛋白、氨基酸及具有生物活性的多肽类物质,且孵育法不产生毒副作用,用于富集麦胚中的肽安全、高效。崔新明^[16]采用孵育法富集麦胚多肽,发现经过孵育多肽含量显著提高,所配制的富肽麦胚营养粉感官评价较好。适度改变麦胚的孵育条件有利于提高麦胚蛋白酶活力,使生物活性物质被释放并得以富集。余南静等^[17]发现孵育时加入 ZnSO_4 、 MnSO_4 和 CaCl_2 等金属离子,麦胚蛋白酶活力呈显著促进效应,酶活力达到 385.44 U/g,多肽含量达到 49.35 mg/g。因此,将金属离子用于富集麦胚中的肽具有可行性。

微波处理能够改变蛋白酶分子的构象,改变酶的催化活性,进而加快蛋白的水解^[18-21]。研究表明,在合适的微波条件下,植物种子中的淀粉酶、蛋白酶和转氨酶的酶活更高,微波辐射对极性较强的底物更有优势^[22-23]。Cao 等^[24]采用同步升温法研究微波加热对谷氨酰胺酶(TGase)活性的影响,发现微波处理可改变它的构象及二级结构,使其分子更容易和底物结合,提高了酶的活性。Tian 等^[25]发现微波辅助酶解麦胚蛋白比传统的传导加热具有更高的水解度,可产生更多的生物活性物质。微波处理仍可保持麦胚的固有颜色,并提高麦胚的产品风味^[26]。但微波联合金属离子富集麦胚中的肽的研究尚未报道。

本研究以未经脱脂的离体麦胚为原料,选用 3 种金属离子(ZnSO_4 、 MnSO_4 和 CaCl_2)为孵育液添加物,处理麦胚微波辅助,研究不同浓度的金属离子及微波条件对麦胚蛋白酶活力和肽含量的影响。在单因素实验的基础上,通过正交试验对工艺参数进行优化,研究结果为高效利用麦胚与富集功能性肽提供了新的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

麦胚 丹阳市莲湖面粉有限公司;酪蛋白、还原型谷胱甘肽、 β -巯基乙醇 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;L-酪氨酸、三氯乙酸、硫酸锌、硫酸锰、氯化钙、氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、柠檬酸、柠檬酸三钠、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA) 均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

ZW-bp120 变频实验微波炉 芜湖众维教研仪器研发有限责任公司;U-T3 紫外可见分光光度计 上海屹谱仪器制造有限公司;Eppendorf 5804/R 大型高速冷冻离心机 德国艾本德股份公司;HWS-26 型电热恒温水浴锅、DHG-9240A 电热鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;PHS-25 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司;FSH-2B 可调高速匀浆机 方科仪器(常州)有限公司;YP5001N 型电子天平 上海舜宇恒平科学仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 麦胚孵育 参照余南静等^[17]孵育麦胚的方

法。称取 3 g/份麦胚,置于研钵中,按照料液比 1:10 加入孵育液(0.1 mol/L, pH 为 3.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液),在孵育液中加入适量浓度的 ZnSO_4 、 MnSO_4 、 CaCl_2 。研磨成匀浆后,转移至 50 mL 离心管中,经微波处理后,置于 49 °C 水浴锅中孵育富集 6 h 后得到麦胚孵育液。

1.2.2 单因素实验 针对微波功率、微波时间、 ZnSO_4 浓度、 MnSO_4 浓度、 CaCl_2 浓度进行单因素实验,考察各因素对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响。

1.2.2.1 微波功率对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响 在微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 0.6 mmol/L, MnSO_4 浓度 2.0 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L 条件下,研究微波功率(0、200、400、600、800、1000 W)对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响。

1.2.2.2 微波时间对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响 在微波功率 600 W, ZnSO_4 浓度 0.6 mmol/L, MnSO_4 浓度 2.0 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L 条件下,研究微波时间(0、2、4、6、8、10、12 s)对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响。

1.2.2.3 ZnSO_4 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响 在微波功率 600 W,微波时间 10 s, MnSO_4 浓度 2.0 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L 条件下,研究 ZnSO_4 浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响。

1.2.2.4 MnSO_4 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响 在微波功率 600 W,微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 0.6 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L 条件下,研究 MnSO_4 浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 mmol/L)对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响。

1.2.2.5 CaCl_2 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响 在微波功率 600 W,微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 0.6 mmol/L, MnSO_4 浓度 2.0 mmol/L 条件下,研究 MnSO_4 浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mmol/L)对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响。

1.2.3 正交试验 在单因素实验的基础上,以微波功率、微波时间、 ZnSO_4 浓度、 MnSO_4 浓度、 CaCl_2 浓度为考察对象,麦胚肽含量及蛋白酶活力为考察指标,进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,优化微波联合金属离子处理麦胚蛋白的工艺参数。因素与水平如表 1 所示。

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素水平表

Table 1 $L_{16}(4^5)$ orthogonal test factors and levels

水平	因素				
	A: 微波功率 (W)	B: 微波时间 (s)	C: ZnSO_4 浓度 (mmol/L)	D: MnSO_4 浓度 (mmol/L)	E: CaCl_2 浓度 (mmol/L)
1	200	6	0.4	1.6	1.2
2	400	8	0.6	1.8	1.4
3	600	10	0.8	2.0	1.6
4	800	12	1.0	2.2	1.8

1.2.4 指标测定

1.2.4.1 肽含量测定 参照鲁伟等^[27]测定多肽的方法并稍作修改,取 2.5 mL 麦胚孵育液置于 15 mL 离心管中,加入 2.5 mL 10%(w/v)的三氯乙酸溶液,混匀后静置 10 min,4 ℃ 4000 r/min 下离心 15 min,将上清液转移至 50 mL 容量瓶中,并用 5% 的三氯乙酸定容。取该溶液 6 mL 置于另一离心管中,加入双缩脲试剂 4 mL,混匀后静置 10 min,4 ℃ 2000 r/min 离心 10 min 以沉淀大分子蛋白质,540 nm 处测定上清液的 OD 值,对照标准曲线求得样品溶液多肽浓度 $C(\text{mg/mL})$,进而计算出麦胚样品中的肽含量。以还原型谷胱甘肽为样品制作标准曲线($y=0.0029x$, $R^2=0.9978$)。

1.2.4.2 蛋白酶活力测定 参照 Harvey 等^[28]的测定方法,取 2 mL 麦胚孵育液于 15 mL 离心管中,加入 6 mL pH 为 6.0,浓度为 0.02 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(5 mmol/L β -巯基乙醇及 2.5 mmol/L EDTA 配制而成)。冰浴静置 10 min,擦干水分后在 4 ℃ 4000 r/min 下离心 30 min,所得上清液即为蛋白酶粗提液。以 20 g/L 的酪蛋白溶液作为底物,1 mL 底物与 1 mL 粗酶液在 40 ℃ 条件下反应 10 min,置于沸水中灭酶 5 min,随后加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液,室温下静置 15 min 以沉淀剩余的蛋白质。4 ℃ 4000 r/min 离心 15 min 后,取上清液于 275 nm 波长处测定吸光度,对照标准曲线即可求得麦胚样品中的蛋白酶活力。以酪氨酸为样品制作标准曲线($y=0.0077x$, $R^2=0.9991$)。将 1 mL 麦胚粗酶液催化酪蛋白每分钟产生 1 μg 酪氨酸定义为 1 个酶活力单位(U),以反应前加入三氯乙酸溶液的体系为对照。

1.3 数据处理

实验设定 3 组平行,结果换算成干基质量,实验数据以平均值 $\pm$ 标准方差($\bar{X}\pm\text{SD}$)表示。采用 SPSS16.0 软件对实验数据进行显著性分析,统计分析采用 F 检验, $P<0.05$ 有显著差异, $P<0.01$ 有极显著差异。采用 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 微波功率对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

如图 1 可见,随着微波功率的增加,肽含量呈先上升后下降趋势,0~800 W 范围内,肽含量显著上升($P<0.05$),800 W 时,麦胚中多肽的富集效应最好,肽含量高达 172.24 mg/g,是对照的 1.46 倍,这是因为适当的微波处理可使麦胚蛋白质的结构变得疏松,蛋白质易于溶出形成更多的生物活性物质^[12]。继续增大功率,麦胚肽含量下降,这可能是因为麦胚内外温度进一步升高,部分麦胚焦化,蛋白质疏水残基相互作用形成网络结构,使蛋白质溶解度降低,无法形成更多的多肽。0~800 W 范围内,微波联合金属离子对麦胚中的肽具有富集作用。与单独使用金属离子相比,二者结合富集麦胚中的肽效果更好。

由图 1 可见,麦胚蛋白酶活力随微波功率的增

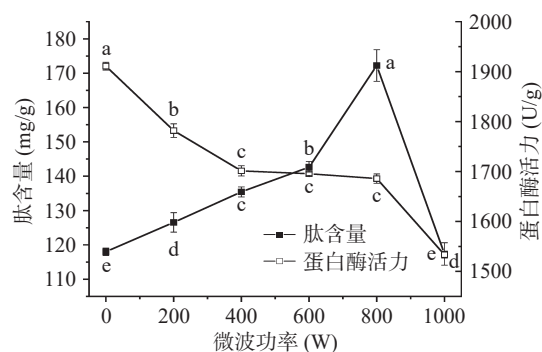


图 1 微波功率对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

Fig.1 Effect of microwave power on wheat germ peptide content and protease activity

注:同一指标不同小写字母表示差异性显著($P<0.05$),图 2~图 5 同。

加,整体呈下降趋势,微波 200 W 处理的蛋白酶活力显著低于对照($P<0.05$),微波功率 400~800 W 处理时,蛋白酶活力变化不明显。继续增大微波功率,蛋白酶活力显著降低($P<0.05$)。各处理蛋白酶活力均显著低于对照($P<0.05$),说明微波处理对蛋白酶活力影响较大。

微波处理使样品内外同时受热,降低了样品中的水分,迅速升高了温度,使酶失活。本研究结果与陈昊等^[29]用微波处理脲素酶的研究结果一致,电磁波产生的热效应改变了蛋白质分子结构,破坏了蛋白酶的空间结构,导致蛋白酶活力下降明显。综合实际生产成本及效益考虑,选取微波功率 200、400、600、800 W 作为正交试验分析的因素水平。

2.2 微波时间对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

由图 2 可见,麦胚肽含量随着微波时间的延长呈先上升后下降趋势,微波时间 0~4 s 时,肽含量变化不明显,4~6 s 内显著上升($P<0.05$),8 s 时肽含量达到最高值(136.9 mg/g)。继续延长微波处理时间至 10 s,肽含量有所降低,但仍高于对照。这可能是因为短时的微波处理能显著提高蛋白质的溶解性,产生更多的多肽,而微波时间延长至 10 s 后麦胚内外温度升高明显,致使蛋白质变性,影响了水解效果。

随着微波时间的延长,蛋白酶活力整体呈先上

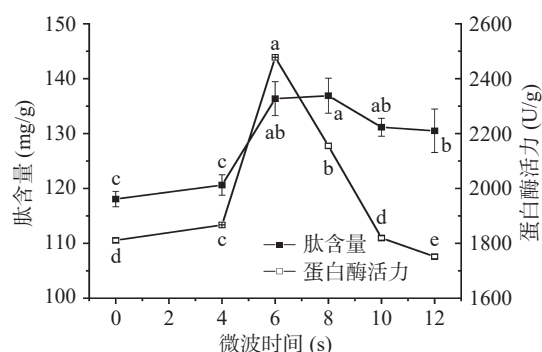


图 2 微波时间对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

Fig.2 Effect of microwave time on wheat germ peptide content and protease activity

升后下降趋势,6 s时达到最大值(2477.92 U/g),继续延长微波处理时间,酶活力显著下降($P<0.05$)。微波处理 0~10 s 范围内与对照相比,蛋白酶活力整体呈上升趋势,说明微波处理能够激活麦胚内源蛋白酶活力。微波处理 12 s 时相较于对照有所下降,说明蛋白质结构已经被破坏,酶失活。综合实际生产成本及效益考虑,选取微波时间 6、8、10、12 s 作为正交试验分析的因素水平。

2.3 ZnSO_4 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

从图 3 可见,麦胚肽含量随着 ZnSO_4 浓度的增加呈先上升后下降趋势,在浓度为 0~0.6 mmol/L 时,肽含量显著上升($P<0.05$),浓度为 0.6 mmol/L 时,达到最大值(135.14 mg/g),继续增大 ZnSO_4 浓度,麦胚肽含量显著下降($P<0.05$)。在 0.4~0.8 mmol/L 范围内麦胚肽含量显著高于对照($P<0.05$),说明不同的 ZnSO_4 添加量对于富集麦胚的作用效果具有明显差异。 ZnSO_4 浓度对麦胚内源蛋白酶活力的影响整体呈先上升后下降趋势, ZnSO_4 浓度在 0~0.6 mmol/L 时显著上升($P<0.05$),0.6 mmol/L 时蛋白酶活力最高(1617.92 U/g),继续增大 ZnSO_4 浓度,麦胚蛋白酶活力显著下降($P<0.05$)。表明适量的添加 ZnSO_4 有利于激活麦胚中的蛋白酶,从而促使其活性提高。有研究表明 Zn^{2+} 对于部分中性蛋白酶起激活作用,主要是因为该蛋白酶活性部位不含 Zn^{2+} , Zn^{2+} 能通过疏水键结合、离子相互作用和金属结合等方式提高中性蛋白酶的热稳定性,从而提高中性蛋白酶活性^[30-31]。有研究表明,孵育可有效增强酶促反应,提高生物活性物质的含量。因此,由于麦胚中蛋白酶活性的增强,更多蛋白质被水解,表现为肽含量的增加。综合实际生产成本及效益考虑,选取 ZnSO_4 浓度 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 作为正交试验分析的因素水平。

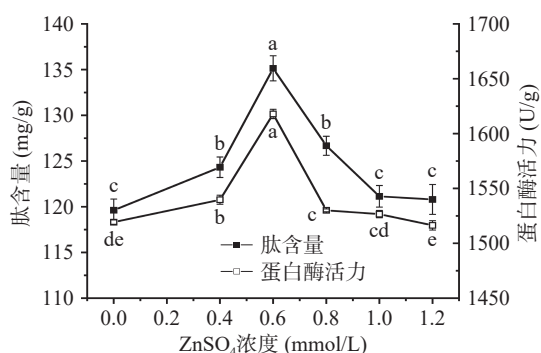


图3 ZnSO_4 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响
Fig.3 Effect of ZnSO_4 concentration on wheat germ peptide content and protease activity

2.4 MnSO_4 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

从图 4 可见,随着 MnSO_4 浓度的增加,麦胚中肽含量呈现先上升后下降趋势,在 MnSO_4 浓度为 2.0 mmol/L 时,多肽的富集效应达到最优,高达 134.60 mg/g,是对照的 1.08 倍。麦胚蛋白酶活力呈现先下降后上升趋势, MnSO_4 浓度 0~1.6 mmol/L 时,

蛋白酶活力呈显著下降趋势($P<0.05$),在 1.6 mmol/L 时蛋白酶活力最低(只有 1359.58 U/g)。继续增大 MnSO_4 浓度,酶活力显著上升($P<0.05$),尤其是浓度为 2.2 mmol/L 时,酶活力急剧上升。诸多研究表明 Mn^{2+} 可激活酸性蛋白酶。Lee 等^[32] 在米曲霉 LK-101 中添加 1 mmol/L 的 Mn^{2+} ,发现其酸性蛋白酶相对酶活可高达 197%。而杨润强等^[33] 在研究金属离子对蛋白酶活力的影响时,发现在 pH 为 5.5 和 7.5 时, Mn^{2+} 都表现出抑制作用。图 4 可以看出低浓度的 MnSO_4 可抑制麦胚蛋白酶活力,但肽含量持续增加,高浓度可促进蛋白酶活力,但会影响肽富集效应,适量地添加 MnSO_4 有利于生产更多的生物活性物质。综合实际生产成本及效益考虑,选取 MnSO_4 浓度 1.6、1.8、2.0、2.2 mmol/L 作为正交试验分析的因素水平。

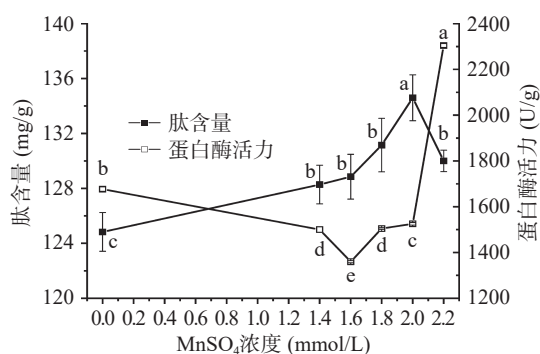


图4 MnSO_4 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响
Fig.4 Effect of MnSO_4 concentration on wheat germ peptide content and protease activity

2.5 CaCl_2 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响

从图 5 可见,随着 CaCl_2 浓度的增大,肽含量呈先上升后下降趋势, CaCl_2 浓度在 0~1.8 mmol/L 时,肽含量急剧上升,1.8 mmol/L 时达到最高值(148.39 mg/g),随后继续增大 CaCl_2 浓度至 2.0 mmol/L,肽含量显著下降,但仍显著高于对照,说明添加 CaCl_2 对麦胚肽富集效应有显著促进作用($P<0.05$)。蛋白酶活力有 CaCl_2 为 1.4、2.0 mmol/L 两个显著促进浓度,这与杨润强等^[34] 的研究结论 Ca^{2+} 能够显著促进麦胚内源蛋白酶活力一致。蛋白酶活力在 CaCl_2 为 1.4 mmol/L

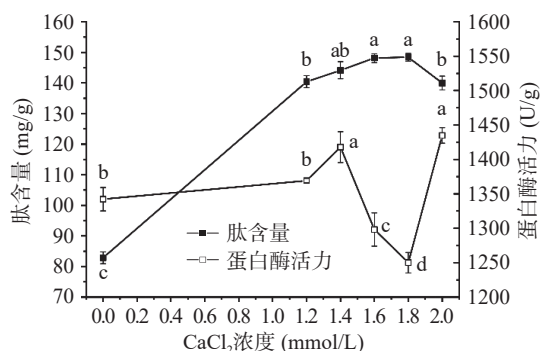


图5 CaCl_2 浓度对麦胚肽含量和蛋白酶活力的影响
Fig.5 Effect of CaCl_2 concentration on wheat germ peptide content and protease activity

之后显著下降($P<0.05$),但是肽的生成仍在发生,其原因有待进一步研究。肽含量随着 CaCl_2 浓度增加而动态累积,直到浓度为 1.8 mmol/L 无明显变化,达到平衡。麦胚中蛋白酶多为中性,有诸多研究表明 Ca^{2+} 能有效促进中性蛋白酶活力,主要是因为中性蛋白酶往往不耐高温, Ca^{2+} 能够维持中性蛋白酶的空间构象,提高其热稳定性,从而提高蛋白酶活性^[30]。综合实际生产成本及效益考虑,选取 CaCl_2 浓度 1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L 作为正交试验分析的因素水平。

2.6 正交试验结果

从表 2、表 3 可见,不同的影响因素对麦胚中肽的富集效应影响程度不同,其重要性依次为 ZnSO_4 浓度>微波时间> MnSO_4 浓度> CaCl_2 浓度>微波功率。该 5 种因素对肽含量的影响均极显著($P<0.01$)。由极差法得出最佳工艺条件为 $\text{A}_1\text{B}_3\text{C}_4\text{D}_1\text{E}_4$,经验证此组合处理时肽含量为 220.56 mg/g,低于正交试验最佳表现 7 号处理 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_4\text{D}_1\text{E}_2$ 时的肽含量(228.85 mg/g)。因此,7 号处理为最优配方,即微波联合金属离子对麦胚中肽的富集效应影响最优的工艺参数为微波功率 400 W,微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 1.0 mmol/L, MnSO_4 浓度 1.6 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L。因此,合理优化肽富集过程中这些

因素的工艺参数,能够显著提高肽的富集效应。

从表 2、表 4 可见,不同的影响因素对麦胚内源蛋白酶活力的影响程度不同。其影响重要性为微波时间> MnSO_4 浓度>微波功率> ZnSO_4 浓度> CaCl_2 浓度。该 5 种因素对麦胚内源蛋白酶活力的影响均极显著($P<0.01$)。由极差法得出最佳工艺条件为 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_4\text{D}_4\text{E}_3$,经验证此条件下蛋白酶活力为 2208.98 U/g,低于正交试验 7 号处理 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_4\text{D}_1\text{E}_2$ (2268.40 U/g)。因此,7 号处理为最佳处理条件,即激活麦胚内源蛋白酶活力最优工艺参数为微波功率 400 W,微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 1.0 mmol/L, MnSO_4 浓度 1.6 mmol/L, CaCl_2 浓度 1.4 mmol/L。

3 结论

微波功率、微波时间、 ZnSO_4 浓度、 MnSO_4 浓度、 CaCl_2 浓度五个因素对麦胚内源蛋白酶活力及肽含量的影响均显著。从肽富集效应来看,其重要性依次为 ZnSO_4 浓度>微波时间> MnSO_4 浓度> CaCl_2 浓度>微波功率。从蛋白酶活力来看,其影响重要性依次为微波时间> MnSO_4 浓度>微波功率> ZnSO_4 浓度> CaCl_2 浓度。经过正交优化试验得出麦胚多肽富集效应最优的工艺参数为微波功率 400 W,微波时间 10 s, ZnSO_4 浓度 1.0 mmol/L, MnSO_4 浓度 1.6 mmol/L,

表 2 $L_{16}(4^5)$ 麦胚肽含量及蛋白酶活力正交试验的设计结果

Table 2 $L_{16}(4^5)$ design results of orthogonal test of wheat germ peptide content and protease activity

试验号	因素					肽含量 (mg/g)	蛋白酶活力 (U/g)
	微波功率 (W)	微波时间 (s)	ZnSO_4 浓度 (mmol/L)	MnSO_4 浓度 (mmol/L)	CaCl_2 浓度 (mmol/L)		
1	1	1	1	1	1	188.62±2.82	2043.29±3.92
2	1	2	2	2	2	190.92±4.05	1880.52±1.70
3	1	3	3	3	3	184.02±4.13	2021.13±5.45
4	1	4	4	4	4	216.21±4.88	1985.80±4.27
5	2	1	2	3	4	194.37±1.63	2044.68±7.96
6	2	2	1	4	3	166.78±2.05	2206.75±1.60
7	2	3	4	1	2	228.85±1.38	2268.40±3.53
8	2	4	3	2	1	170.23±2.45	1846.58±8.54
9	3	1	3	4	2	167.93±0.45	1986.49±6.12
10	3	2	4	3	1	173.68±1.72	1913.07±5.18
11	3	3	1	2	4	192.07±2.82	1998.96±8.03
12	3	4	2	1	3	195.52±1.88	1939.39±2.04
13	4	1	4	2	3	208.16±260	2031.52±4.90
14	4	2	3	1	4	171.38±2.82	1999.65±2.73
15	4	3	2	4	1	174.83±2.82	2181.82±3.75
16	4	4	1	3	2	170.23±1.86	1749.61±8.48
肽含量	$\bar{K}_{1j}$	194.94	189.77	179.43	196.09	176.84	最优组合: $\text{A}_1\text{B}_3\text{C}_4\text{D}_1\text{E}_4$
	$\bar{K}_{2j}$	190.06	175.69	188.91	190.35	189.48	
	$\bar{K}_{3j}$	182.3	194.94	173.39	180.58	188.62	
	$\bar{K}_{4j}$	181.15	188.05	206.73	181.44	193.51	
蛋白酶活力	$\bar{K}_{1j}$	1982.69	2026.50	1999.65	2062.68	1996.19	最优组合: $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_4\text{D}_4\text{E}_3$
	$\bar{K}_{2j}$	2091.60	2000.00	2011.60	1939.40	1971.26	
	$\bar{K}_{3j}$	1959.48	2117.58	1963.46	1932.12	2049.70	
	$\bar{K}_{4j}$	1990.65	1880.35	2049.70	2090.22	2007.27	
极差 R_1	13.79	19.25	33.34	15.51	16.67		
极差 R_2	132.12	237.23	86.24	158.10	78.44		

表3 $L_{16}(4^5)$ 肽含量正交试验方差分析Table 3 $L_{16}(4^5)$ analysis of variance of orthogonal test for peptide content

源	平方和	自由度	均方	F	P值	显著性
校正模型	15407.996	15	1027.2	11.33	<0.001	**
截距	1680524.498	1	1680524.498	18535.362	<0.001	**
微波功率	1544.539	3	514.846	5.679	0.003	**
微波时间	2396.704	3	798.901	8.811	<0.001	**
ZnSO ₄ 浓度	7622.621	3	2540.874	28.025	<0.001	**
MnSO ₄ 浓度	1992.421	3	664.14	7.325	0.001	**
CaCl ₂ 浓度	1851.71	3	617.237	6.808	0.001	**
误差	2901.307	32	90.666			
总计	1698833.802	48				
校正的总计	18309.303	47				

注: **表示差异极显著, $P < 0.01$; *表示差异显著, $P < 0.05$; 表4同。

表4 $L_{16}(4^5)$ 蛋白酶活力正交试验方差分析Table 4 $L_{16}(4^5)$ analysis of variance of orthogonal test of protease activity

源	平方和	自由度	均方	F	P值	显著性
校正模型	794035.273	15	52935.685	234.922	<0.001	**
截距	193173736.4	1	193173736.4	857279.945	<0.001	**
微波功率	123251.432	3	41083.811	182.325	<0.001	**
微波时间	344327.235	3	114775.745	509.36	<0.001	**
ZnSO ₄ 浓度	45485.012	3	15161.671	67.286	<0.001	**
MnSO ₄ 浓度	242398.628	3	80799.543	358.578	<0.001	**
CaCl ₂ 浓度	38572.966	3	12857.655	57.061	<0.001	**
误差	7210.666	32	225.333			
总计	193974982.3	48				
校正的总计	801245.939	47				

CaCl₂ 浓度 1.4 mmol/L。杨润强等^[34]通过响应面优化得到最高的麦胚肽含量为 88.46 mg/g, 本实验经优化后肽含量高达 228.85 mg/g, 是其 2.59 倍, 而此时蛋白酶活力为 2268.40 U/g, 同样为最优水平。低功率短时间的微波处理联合适当浓度的 Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺富集麦胚中肽为麦胚资源的高值化利用提供了一个可行的方法。实验中, 麦胚内源蛋白酶活力的变化趋势和肽含量的变化趋势并不完全一致, 其具体原因还有待进一步研究。采用生物调控技术激活内源蛋白酶活力, 是一种高效的肽富集方法。

参考文献

- [1] BAYAT E, MOOSAVI-NASAB M, FAZAEI M, et al. Wheat germ fermentation with *saccharomyces cerevisiae* and *lactobacillus plantarum*: Process optimization for enhanced composition and antioxidant properties *in vitro* [J]. *Foods*, 2022, 11(8): 1125.
- [2] SULLIVAN B, BAILEY C. Additions and corrections-the lipids of the wheat embryo. I. the fatty acids [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1936, 58(3): 383-390.
- [3] 胡莉丽. 麦胚清蛋白的酶法水解及其产物的抗氧化性研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017. [HU Lili. Proteolysis of wheat germ albumin and antioxidant activity of the hydrolysate [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.]

[4] BOUKID F, FOLLONI S, RANIERI R, et al. A compendium of wheat germ: Separation, stabilization and food applications [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 78: 120-133.

[5] 黄继红, 陈文静, 廖爱美, 等. 麦胚活性成分研究进展 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2021, 42(1): 114-123. [HUANG Jihong, CHEN Wenjing, LIAO Aimei, et al. Review on active components of wheat-embryo [J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2021, 42(1): 114-123.]

[6] 丁媛媛, 王莉, 张新霞, 等. 麦胚多肽-钙螯合物制备工艺优化及其结构表征 [J]. *食品科学*, 2017, 38(10): 215-221. [DING Yuanyuan, WANG Li, ZHANG Xinxia, et al. Optimized preparation and structural characterization of calcium-chelating polypeptides from wheat germ protein hydrolysate [J]. *Food Science*, 2017, 38(10): 215-221.]

[7] DOMINIC A, ISHTIAQ A, ZAIN A, et al. Protein and peptide biopharmaceuticals: An overview [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2017, 24(2): 94-101.

[8] 王淑芳. 麦胚蛋白酶特性与 ACE 抑制肽制备及其面包研制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015. [WANG Shufang. Protease properties and ACE inhibitory peptide preparation from wheat germ and development of bread [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.]

[9] 林梦君, 宋晓艳, 韩江升, 等. 生物活性多肽产品开发及应用进展 [J]. *山东化工*, 2020, 49(20): 42-43. [LIN Mengjun, SONG Xiaoyan, HAN Jiangsheng, et al. Research and application of bioactive peptides [J]. *Shandong Chemical Industry*, 2020, 49(20): 42-43.]

[10] ZHANG Y, HE S D, BONNEIL É, et al. Generation of antioxidant peptides from atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin: *In vitro* activity, *de novo* sequencing, and *in silico* docking for *in vivo* function prediction [J]. *Food Chemistry*, 2020, 306(C): 125581.

[11] KARAMI Z, PEIGHAMBARDUST S H, HESARI J, et al. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates [J]. *Food Bioscience*, 2019, 32(C): 100450.

[12] 李永恒, 田双起, 赵仁勇. 麦胚多肽的制备及生物活性的研究进展 [J]. *食品工业*, 2018, 39(5): 266-270. [LI Yongheng, TIAN Shuangqi, ZHAO Renyong. Advances in studies on preparation and bioactivity of wheat germ peptides [J]. *Food Industry*, 2018, 39(5): 266-270.]

[13] 张瑶, 沈海炯, 杨天一, 等. 培育条件对麦胚中蛋白酶活力及蛋白质性质的影响 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(11): 192-199. [ZHANG Yao, SHEN Haijiong, YANG Tianyi, et al. Effect of incubation conditions on the protease activity and protein property of wheat germ [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(11): 192-199.]

[14] 朱海峰, 班玉凤, 周克仲. 大豆蛋白水解液脱苦的研究 [J]. *广州食品工业科技*, 2004(1): 32-35. [ZHU Haifeng, BAN Yufeng, ZHOU Kezhong. Study on debittering of soybean protein hydrolysate [J]. *Guangzhou Food Science and Technology*, 2004(1): 32-35.]

[15] 李子健, 刘秀丽, 裴乐, 等. 生物活性肽的研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2019, 40(12): 20-24. [LI Zijian, LIU Xiuli, PEI Le,

- etal. Research progress on bioactive peptides[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2019, 40(12): 20–24.]
- [16] 崔新明. 麦胚贮藏与孵育特性及其营养粉开发研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012. [CUI Xinming. Storage and incubation properties of wheat germ and the development of its nutritional powder[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.]
- [17] 余南静, 杨润强, 曹晓虹, 等. 孵育液组分对麦胚蛋白酶活力与 ACE 抑制率的影响[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12): 11–15. [YU Nanjing, YANG Runqiang, CAO Xiaohong, et al. Effect of incubation medium on protease activity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of incubated wheat germ[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 26(12): 11–15.]
- [18] 黄纪民, 李秉正, 师德强, 等. 微波技术在农产品加工领域的应用研究进展[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(3): 293–299. [HUANG Jimin, LI Bingzheng, SHI Deqiang, et al. Application of microwave technology in processing of agro-products: A review[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2020, 36(3): 293–299.]
- [19] HU A J, CHEN X L, WANG J, et al. Effects on the structure and properties of native corn starch modified by enzymatic debranching (ED), microwave assisted esterification with citric acid (MCAE) and by the dual ED/MCAE treatment[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 171: 123–129.
- [20] URBIZO-REYES U, MARTIN-GONZALEZ MF S, GARCIA-BRAVO J, et al. Physicochemical characteristics of chia seed (*Salvia hispanica*) protein hydrolysates produced using ultrasonication followed by microwave-assisted hydrolysis[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105187.
- [21] MERILES S P, PENCI M C, CURET S, et al. Effect of microwave and hot air treatment on enzyme activity, oil fraction quality and antioxidant activity of wheat germ[J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132760.
- [22] 郑丽娜, 辛嘉英, 王艳, 等. 微波对酶催化反应的影响及其微波效应的研究进展[J]. 分子催化, 2017, 31(6): 567–574. [ZHENG Lina, XIN Jiaying, WANG Yan, et al. Research progress on the influence of microwave on enzyme-catalyzed reactions and the microwave effect[J]. Journal of Molecular Catalysis (Chint), 2017, 31(6): 567–574.]
- [23] 胡蕾琪, 郭长凯, 潘志海, 等. 微波场对食品的非热效应研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 270–275. [HU Leiqi, GUO Changkai, PAN Zhihai, et al. Research progress of non-thermal effects of microwave fields on food[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(16): 270–275.]
- [24] CAO H W, FAN D M, JIAO X D, et al. Intervention of transglutaminase in surimi gel under microwave irradiation[Z]. 2018: 268: 378–385.
- [25] TIAN S Q, DU K, YAN F, et al. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis of wheat germ albumin to prepare polypeptides and influence on physical and chemical properties[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131707.
- [26] ZHANG Y K, TANG N, SHI L, et al. Characterization and comparison of predominant aroma compounds in microwave-treated wheat germ and evaluation of microwave radiation on stability[J]. *Journal of Cereal Science*, 2020, 93: 102942.
- [27] 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(7): 169–171. [LU Wei, REN Guopu, SONG Junmei. Determination of content of peptides in protein hydrolysates[J]. *Food Science*, 2005(7): 169–171.]
- [28] HARVEY B M, OAKS A. Characteristics of an acid protease from maize endosperm[J]. *Plant Physiology*, 1974, 53(3): 449–452.
- [29] 陈昊, 李婷婷, 王嘉熙, 等. 热加工对豆乳蛋白质溶解性和脲素酶活性的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(13): 90–94. [CHEN Hao, LI Tingting, WANG Jiayi, et al. Effect of different heating process on the protein solubility and urease activity of proteins in soymilk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(13): 90–94.]
- [30] 余茜, 张国丽, 敖晓琳. 金属离子对微生物蛋白酶活性的影响及机理[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 287–294. [YU Qian, ZHANG Guoli, AO Xiaolin. Effect and mechanism of metal ions on the activity of microbial protease[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(4): 287–294.]
- [31] ROSSMANN M G, BLOW D M. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit[J]. *Acta Cryst*, 1962, 15: 24–31.
- [32] LEE S K, HWANG J Y, CHOI S H, et al. Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19(2): 327–334.
- [33] 杨润强, 王淑芳, 顾振新. 麦胚内源蛋白酶主要特性研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9): 1–5. [YANG Runqiang, WANG Shufang, GU Zhenxin. Main properties of wheat germ endogenous protease[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(9): 1–5.]
- [34] 杨润强, 龚小峰, 顾振新, 等. 孵育法富集麦胚多肽工艺参数优化[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 22–25. [YANG Runqiang, GONG Xiaofeng, GU Zhenxin, et al. Optimization of incubation conditions for polypeptide-enriched wheat germ[J]. Food Science, 2010, 31(14): 22–25.]