

李思楠,王萌,安宇,等.复合菌种发酵制备白芸豆多肽工艺优化及其抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2025,46(3):213-221.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010304

LI Sinan, WANG Meng, AN Yu, et al. Process Optimization and Antioxidant Activity Analysis of White Kidney Bean Polypeptides Prepared by Composite Strain Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(3): 213-221. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010304

· 工艺技术 ·

复合菌种发酵制备白芸豆多肽工艺优化 及其抗氧化活性分析

李思楠¹,王 萌²,安 宇¹,王 晴²,徐开媛¹,王 佳¹,张智慧¹,王 玺²,王 颖^{1,3,4,*},张 璐^{2,*}

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院,黑龙江大庆 163319;

2.中国食品发酵工业研究院有限公司,功能主食创制与慢病营养干预北京市

重点实验室,北京 100015;

3.国家杂粮工程技术中心,黑龙江大庆 163319;

4.厦门海洋职业技术学院,福建厦门 361100)

摘 要:为探究复合菌种发酵制备白芸豆多肽(White kidney bean polypeptides, WKBP)的最佳工艺条件及体外抗氧化活性,本研究以枯草芽孢杆菌和米曲霉为发酵剂,通过单因素和响应面法对制备 WKBP 的工艺进行优化,利用超滤膜进行分级分离,测定不同分子量 WKBP 体外抗氧化活性,筛选活性最好的组分,并结合体外模拟消化体系评价经胃肠消化后 WKBP 的体外抗氧化活性变化。结果表明:在发酵时间 48 h、温度 37 ℃、接种量 9%、米曲霉和枯草芽孢杆菌复配比例 1:1 条件下 WKBP 得率为 63.47%;超滤后分子量组分 WKBP-4 (Mw<3 kDa) 具有较好的抗氧化活性;在 WKBP-4 浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内呈剂量依赖性,抗氧化能力随 WKBP-4 浓度的增加而增加,DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、羟自由基清除率和 Fe³⁺还原力 IC₅₀ 值分别为 0.47、0.50、0.46 和 0.66 mg/mL;经胃肠消化后 WKBP-4 仍保持较高的抗氧化活性,在肠消化终点 240 min 时,其 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺自由基清除率分别为 84.29% 和 77.34%。本研究可为白芸豆高值利用及精深加工提供理论依据及数据支撑。

关键词:白芸豆多肽,复合菌种发酵,超滤,抗氧化活性,体外消化

中图分类号:TS201.4

文献标识码: B

文章编号:1002-0306(2025)03-0213-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010304

本文网刊:



Process Optimization and Antioxidant Activity Analysis of White Kidney Bean Polypeptides Prepared by Composite Strain Fermentation

LI Sinan¹, WANG Meng², AN Yu¹, WANG Qing², XU Kaiyuan¹, WANG Jia¹, ZHANG Zhihui¹,
WANG Xi², WANG Ying^{1,3,4,*}, ZHANG Lu^{2,*}

(1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2.China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co., Ltd., Beijing Key Laboratory
of the Innovative Development of Functional Staple and the Nutritional Intervention for Chronic Disease,
Beijing 100015, China;

3.National Coarse Cereals Engineering Center, Daqing 163319, China;

4.Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China)

收稿日期: 2024-01-29

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目“杂粮主食化食品生产关键技术与高附加值产品开发”(ZDZX202106)。

作者简介: 李思楠(1998-),女,硕士研究生,研究方向:粮食、油脂及植物蛋白工程,E-mail: lsn980521@163.com。

* 通信作者: 王颖(1979-),女,博士,教授,研究方向:农产品加工与贮藏工程及食品质量安全,E-mail: wychen156@163.com。

张璐(1987-),女,博士,高级工程师,研究方向:功能食品开发与精准营养及功效评价,E-mail: zhanglu8078@126.com。

Abstract: In order to investigate the optimal process conditions and *in vitro* antioxidant activity of white kidney bean polypeptides (WKBPs) from complex strain fermentation, this study used *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae* as starter culture, and optimized the process of preparing WKBPs through single factor and response surface experiments. The *in vitro* antioxidant activity of WKBPs with different molecular weights was determined by ultrafiltration membrane separation, and the most active components were screened. The changes in antioxidant activity of WKBPs after gastrointestinal digestion were evaluated in combination with the simulated digestive system *in vitro*. The results showed that the yield of WKBPs was 63.47% under the conditions of fermentation time 48 h, temperature 37 °C, inoculation amount 9% and the ratio of *Aspergillus aspergillus* and *Bacillus subtilis* 1:1. The molecular weight component WKBPs-4 (Mw<3 kDa) had good antioxidant activity after ultrafiltration. The concentration of WKBPs-4 was dose-dependent in the range of 0.2 to 1.0 mg/mL, and the antioxidant capacity increased with the increase of WKBPs-4 concentration. The IC₅₀ values of DPPH free radical clearance rate, ABTS⁺ free radical clearance rate, hydroxyl free radical clearance rate and Fe³⁺ reducing power were 0.47, 0.50, 0.46 and 0.66 mg/mL, respectively. After gastrointestinal digestion, WKBPs-4 still maintained high antioxidant activity. At the end point of intestinal digestion 240 min, the DPPH free radical clearance rate and ABTS⁺ free radical clearance rate were 84.29% and 77.34%, respectively. This study can provide theoretical basis and data support for high value utilization and deep processing of white kidney beans.

Key words: white kidney bean polypeptides; complex strain fermentation; ultrafiltration; antioxidant activity; *in vitro* digestion

芸豆(*Phaseolus vulgaris* L.)学名菜豆,又名四季豆^[1],是全球范围内普遍种植和消费的豆类之一^[2]。芸豆营养丰富,其钙含量是黄豆的2倍,蛋白质含量是小米的3倍^[3],同时含有较多的维生素(维生素A、维生素C、维生素E)、矿物质(钾、铁、镁)、膳食纤维和多种人体必需氨基酸,具有一定的食用及药用价值^[4]。芸豆中还富含多肽、多酚和多糖等生物活性物质,其中,多肽不仅具备抗氧化^[5]、降血压^[6]、抗肿瘤^[7]和改善心血管功能^[8]等生理活性,还因其分子量小、空间结构简单、稳定性高、副作用少、易于人体吸收等优势^[9],受到食品和医药行业的广泛关注。目前,芸豆主要以鲜食为主,市场上的深加工产品较少、综合利用率相对较低。

食源性多肽常采用酶解法和发酵法进行制备^[10],但酶制剂价格昂贵、生产成本低,同时酶解后容易产生苦味肽,影响产品口感^[11],而发酵是微生物驱动的过程,由于微生物蛋白酶的多样性,可大量水解底物蛋白富集生物活性肽,成本优势明显,此外,发酵生产过程中可以去除肽的苦味,使产品具有更好的口感^[12],因此,发酵法广泛用于多肽的制备。研究表明,枯草芽孢杆菌^[13]、乳酸菌^[14]、酵母菌^[15]和曲霉^[16]等菌种适用于水解蛋白制备多肽。其中,枯草芽孢杆菌发酵后主要以产内切蛋白酶为主,通过水解切断蛋白质中间肽链以产生小分子多肽^[17],米曲霉发酵后主要以产端肽酶为主,切除蛋白质分子的末端氨基酸,达到酶解与脱苦一步到位的目的^[18]。由于不同微生物产生蛋白酶的底物特异性,所制备的多肽功能活性也不同。Padhi等^[19]采用枯草芽孢杆菌发酵制备赤小豆肽,并鉴定赤小豆水解产物对血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)抑制活性为45.73%,通过质谱鉴定肽序列结合分子对接技术确定肽段PFPIPPPIPLPP和IPFPPIPLPPI在ACE结合位点表现出良好的结合力。尹乐斌等^[20]

利用枯草芽孢杆菌发酵豆渣制备大豆多肽,发现在接种量3%、发酵温度37 °C、发酵时间60 h条件时大豆多肽的得率达到88.12%,并指出大豆多肽具有一定的体外抗氧化性和抑菌性,能够抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的活性。龙久铃等^[21]以苏麻饼粕为原料利用米曲霉发酵制备多肽,在发酵时间48 h、发酵温度28 °C、接种量5.5%、料液比1:1条件下,多肽含量为59.97 mg/g,比发酵前增加了2.66倍,DPPH自由基清除率为83.65%,比发酵前增加了0.23倍。然而,目前国内外对于利用复合菌种发酵制备白芸豆多肽(White kidney bean polypeptides, WKBPs)的研究鲜有报道。

鉴于此,本研究采用枯草芽孢杆菌和米曲霉为发酵剂,通过单因素实验结合响应面法优化WKBPs的复合菌种发酵制备工艺条件,并结合体外模拟消化实验评估WKBPs消化过程中抗氧化活性的变化,以期芸豆高值化利用和功能食品开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白芸豆、黑芸豆、红芸豆、紫花芸豆、奶白花芸豆 黑龙江省齐齐哈尔市富民商贸有限公司;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*) 中国工业微生物菌种保藏中心;四肽(Gly-Gly-Tyr-Arg)、L-酪氨酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、胃蛋白酶(>250 U/mg)、胰脂肪酶(90 U/mg)、唾液淀粉酶(>5 U/mg)、胰酶(4×USP) 美国Sigma公司;3号胆盐 上海麦克林生化科技股份有限公司;三氯乙酸、双缩脲试剂(AB液)、盐酸 国产分析纯试剂。

BSA124S高精度精密分析电子天平 德国Sartorius科学仪器有限公司;PHS-25型pH计 青

岛明博环保科技有限公司; UV1902PC 紫外可见分光光度计 上海奥析科学仪器有限公司; HSX-250 恒温恒湿培养箱 上海航配仪器有限公司; Thermo Sorvall ST16 高速冷冻离心机 上海土森视觉科技有限公司; BKQ-Z75I 高压蒸汽灭菌锅 山东博科科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基本营养成分测定 5 种芸豆的蛋白质、淀粉、水分、灰分和脂肪含量分别依据 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》、GB 5009.9-2023《食品中淀粉的测定》、GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》、GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》和 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》进行测定。

1.2.2 菌种的活化 将甘油保存的枯草芽孢杆菌 1% 接种在 LB 液体培养基中, 于 37 ℃、200 r/min 的条件下培养 12 h, 平板划线后于 37 ℃ 培养 24 h, 刮取一环生长较好的单菌落转接至 LB 液体培养基中, 200 r/min、37 ℃ 培养 24 h 后得到放大倍数的菌悬液。米曲霉经斜面活化后刮取一环平板划线接种(30 ℃, 96 h)静置培养, 用无菌水洗下孢子制备成菌悬液, 其中, 米曲霉用血球计数板计数, 枯草芽孢杆菌用平板计算法计数, 调整各菌悬液含菌数为 1.0×10⁷ CFU/mL, 待用。

1.2.3 白芸豆粗肽的制备 挑取颗粒饱满的白芸豆洗净后烘干, 粉碎机粉碎, 100 目过筛, 用蒸馏水将芸豆粉按 1:10(m/V) 的比例混合, 装瓶量 30 mL, 121 ℃ 灭菌 20 min 后冷却, 在发酵培养基中接入 9% 的混合菌液(米曲霉: 枯草芽孢杆菌=1:1), 37 ℃、180 r/min 振荡培养 48 h, 收集发酵液, 1.0×10⁴ r/min -4 ℃ 低温离心 15 min, 收集上清液进行冷冻干燥, 得到 WKBP 粗提物。

1.2.4 单因素实验 固定其他条件, 评估不同发酵时间(24、36、48、60、72 h)、发酵温度(23、30、37、44、51 ℃)、复配比例(3:1、2:1、1:1、1:0、0:1、1:2、1:3)、接种量(3%、6%、9%、12%、15%)对 WKBP 得率和蛋白酶活力的影响。

1.2.5 响应面实验 依据单因素结果, 采用中心复合试验设计, 利用 Design-Expert 8.06 软件设计响应面实验, 以响应面因素 A 发酵时间(h); B 发酵温度(℃); C 接种量(%)为自变量, WKBP 得率(%)为响应值, 优化复合发酵工艺参数。试验因素设计与水平见表 1。

表 1 响应面实验因素与水平

水平	因素		
	A 发酵时间(h)	B 发酵温度(℃)	C 接种量(%)
-1	36	30	6
0	48	37	9
1	60	44	12

1.2.6 多肽得率和含量测定 参考姜东^[22] 的方法, 采用双缩脲法测定多肽浓度。以 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽为标准品, 多肽浓度为横坐标 x(mg/mL), OD 值为纵坐标 Y, 绘制标准曲线。回归方程为 y=0.1234x+0.0253, R²=0.9985。对照标准曲线求得样品溶液中的多肽含量, 并根据公式(1)计算 WKBP 的粗提取得率。

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

式 (1)

式中: C: 发酵液中多肽浓度(mg/mL); V: 发酵液总体积(mL); m: 白芸豆蛋白质质量(mg)。

1.2.7 蛋白酶活力测定 依据 GB/T 28715-2012《蛋白酶活力的测定》, 采用福林酚法测定 WKBP 蛋白酶活力。以 L-酪氨酸为标准品, 绘制标准曲线, 回归方程为 y=0.0101x+0.0094, R²=0.9998。

1.2.8 超滤 使用配有不同超滤膜(3、5、10 kDa)的超滤管对前期制备的白芸豆粗肽进行分级分离, 按照分子量大小分为 WKBP-1(Mw>10 kDa)、WKBP-2(5 kDa<Mw<10 kDa)、WKBP-3(3 kDa<Mw<5 kDa)、WKBP-4(Mw<3 kDa)四个组分, 将四个组分收集浓缩并冷冻干燥, 蒸馏水复溶不同组分 WKBP, 配制成 1 mg/mL, 通过测定体外抗氧化活性(DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除率)筛选最佳组分。

1.2.9 抗氧化活性测定

1.2.9.1 DPPH 自由基清除率 参考 Zhu 等^[23] 的方法略有修改。用无水乙醇制备 0.25 mmol/L DPPH 溶液, 蒸馏水复溶 WKBP-4, 配制成不同浓度样品溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)并与 DPPH 溶液按 1:1 的比例混合均匀, 室温下暗反应 30 min, 以 0.1 mg/mL V_C 为阳性对照, 测定混合溶液在 517 nm 波长处的 OD 值。计算如公式(2):

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式 (2)

式中: A₁ 为显色反应后样品溶液的 OD 值; A₂ 为不加显色剂的 OD 值; A₀ 为不加样品的 OD 值。

1.2.9.2 ABTS⁺自由基清除率 参考 Xiang 等^[24] 的方法略有修改。取 2.9 mL 稀释后的 ABTS 试剂与 0.1 mL 不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)的 WKBP-4 样品溶液混合, 室温下避光反应 6 min, 以 0.1 mg/mL V_C 为阳性对照, 在 734 nm 处测定溶液 OD 值。计算如公式(2)。

1.2.9.3 羟自由基清除率 参考 Hui 等^[25] 的方法略有修改。将不同浓度 WKBP-4 样品溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)与 9 mmol/L FeSO₄·7H₂O 溶液和 8.8 mmol/L H₂O₂ 溶液按 1:1:1 的比例混合, 在 37 ℃ 下孵育 10 min, 然后加入 1 mL 9 mmol/L 水杨酸溶液, 混合均匀, 在 37 ℃ 下孵育 30 min, 以 0.1 mg/mL V_C 为阳性对照, 在 510 nm 处测定溶液

OD 值。计算如公式(2)。

1.2.9.4 还原力测定 参考 Gu 等^[26]的方法略有修改。在 1 mL 不同浓度 WKBPs-4 样品溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL)中添加 2.5 mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 和 2.5 mL 0.2 mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液,混合均匀,于 50 °C 水浴中反应 20 min,然后加入 2.5 mL 10% TCA 终止反应,于 4000 r/min 离心 10 min 取上清液,以 0.1 mg/mL V_C 为阳性对照,测定混合溶液(2.5 mL 上清液+2.5 mL 蒸馏水+0.5 mL $FeCl_3$)在 700 nm 处的 OD 值。OD 值越大,样品的还原能力越强。

1.2.10 体外模拟消化 参照 Chen 等^[27]的方法稍作修改。模拟口腔液:将 7500 U 唾液淀粉酶加入到 100 mL 口腔电解质溶液(0.75 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、2 mol/L KCl 和 0.5 mol/L KH_2PO_4)中,室温搅拌 10 min,用 2 mol/L NaOH 将溶液 pH 调节至 7.0;模拟胃液:将 2×10^5 U 胃蛋白酶加入到 100 mL 胃电解质溶液(0.5 mol/L KCl、1 mol/L $NaHCO_3$ 、2 mol/L NaCl 和 0.15 mol/L $CaCl_2$)中,室温搅拌 10 min,用 2 mol/L HCl 将溶液 pH 调节至 2.0;模拟肠液:将 5×10^4 U 胰脂肪酶加入到 200 mL 肠电解质溶液(40 mmol/L 胆汁盐、0.5 mol/L KCl、1.5 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.8% 胰液)中,室温搅拌 10 min,用 2 mol/L NaOH 将溶液 pH 调节至 7.0。将 1 mg/mL WKBPs 样品溶液与口腔消化液 1:1(V/V)比例混合,于 37 °C、200 r/min 振荡 2 min,立即加入 2 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0 以停止口腔模拟消化。随后加入 10 mL 胃液,于 37 °C、200 r/min 振荡孵育 2 h,随后立即加入 2 mol/L NaOH 调节 pH7.0 以停止胃模拟消化。之后于消化体系中加入 10 mL 肠液,200 r/min、37 °C 振荡孵育 2 h。分别于胃消化时间为 0、30、60、90、120 min 以及肠消化时间为 0、30、60、90、120 min 时吸取适量样品,于沸水浴中加热 10 min 进行灭酶处理,5000 r/min 离心 10 min 后取上清液,测定胃肠道消化后 WKBPs 的抗氧化活性。

1.3 数据处理

每组实验重复 3 次,实验结果采用平均值±标准差($X \pm SD$)表示,使用 Graphpad Prism 8 和 Design-Expert.V8.0.6.1 软件作图,通过 SPSS 20 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 白芸豆营养成分含量

红芸豆、黑芸豆、白芸豆、紫花芸豆和奶白花芸豆 5 种不同品种的芸豆营养成分含量如表 2 所示,从中可以看出,与其它品种芸豆相比,白芸豆的蛋白质含量最高为 23.94%±0.19%;淀粉和脂肪含量最少,分别为 40.69%±0.34% 和 1.32%±0.06%;水分含量显著低于($P < 0.05$)黑芸豆、紫花芸豆、奶白花芸豆,为 8.44%±0.07%,灰分含量显著低于($P < 0.05$)黑芸豆,为 3.76%±0.02%。以上结果表明,白芸豆是

5 种芸豆中蛋白质含量最高的豆类,具有较高的营养价值,可用于后续发酵制备 WKBPs。

表 2 芸豆粉营养成分分析表(g/100 g)

Table 2 Analysis of nutritional components of kidney bean powder (g/100 g)

样品	淀粉	脂肪	灰分	蛋白质	水分
红芸豆	42.37±0.11 ^b	2.17±0.06 ^a	3.49±0.07 ^d	22.03±0.11 ^b	7.14±0.02 ^e
黑芸豆	41.28±0.10 ^c	1.75±0.05 ^c	4.13±0.05 ^a	22.13±0.15 ^b	10.54±0.05 ^b
白芸豆	40.69±0.34 ^d	1.32±0.06 ^e	3.76±0.02 ^b	23.94±0.19 ^a	8.44±0.07 ^d
紫花芸豆	42.96±0.88 ^b	1.91±0.04 ^b	3.84±0.07 ^b	20.17±0.12 ^c	9.16±0.04 ^c
奶白花芸豆	44.32±0.18 ^a	1.54±0.05 ^d	3.64±0.04 ^c	20.56±0.17 ^c	11.46±0.05 ^a

注:表中不同字母表示不同芸豆间相同的营养成分差异显著($P < 0.05$)。

2.2 单因素实验结果

发酵时间、发酵温度、接种量和复配(米曲霉:枯草芽孢杆菌)比例对 WKBPs 得率和蛋白酶活力的影响如图 1 所示。由图 1A 可知,WKBPs 得率和蛋白酶活力随时间的增加而升高,在 48 h 达到最大值,分别为 61.89% 和 499.10 U/mL,超过 48 h 后呈下降趋势,这可能是由于在发酵后期,枯草芽孢杆菌与米曲霉生长繁殖进入衰亡期,菌体死亡速度大于菌体繁殖速度,导致产酶能力下降,酶活降低,WKBPs 得率减少^[28]。因此,选择发酵时间为 48 h 进行后续实验。

由图 1B 可知,WKBPs 得率和蛋白酶活力随着发酵温度的增加呈先升后降的趋势,在 37 °C 时达到最大值,分别为 63.24% 和 511.56 U/mL。微生物生长繁殖与环境温度紧密相关,根据酶促反应动力学,温度升高直接影响微生物反应时间及新陈代谢水平,从而提高其生长速率,但温度过高会导致酶失活,影响蛋白质分解,导致 WKBPs 得率下降^[29]。因此,选择发酵温度为 37 °C 进行后续实验。

由图 1C 可知,WKBPs 得率和蛋白酶活力随着接种量增加而升高,接种量为 9% 时达到最大值,分别为 63.21% 和 518.99 U/mL,接种量超过 9% 后出现下降趋势。接种量过大导致养分匮乏、菌种无法生长繁殖导致衰退,进而引起产酶量减少,酶活降低,WKBPs 得率减少^[30]。因此,选择接种量为 9% 进行后续实验。

由图 1D 可知,混合菌种比例对米曲霉与枯草芽孢杆菌复合发酵芸豆制备多肽过程中 WKBPs 得率和蛋白酶活力的影响较为明显,且复合发酵结果优于枯草芽孢杆菌和米曲霉单独发酵。随着枯草芽孢杆菌比例的增加,WKBPs 得率和蛋白酶活力呈上升趋势,在米曲霉与枯草芽孢杆菌比例为 1:1 时达到最大值,分别为 62.64% 和 515.84 U/mL。进一步增加枯草芽孢杆菌的比例,WKBPs 得率和蛋白酶活力呈下降趋势,初步分析可能是枯草芽孢杆菌比米曲霉生长发育较快从而消耗了更多的养分,抑制了米曲霉的生长,导致米曲霉分泌蛋白酶的量减少,进而导致酶活降低,WKBPs 得率减少^[31]。因此,选择混合菌种比例为 1:1 进行后续实验。

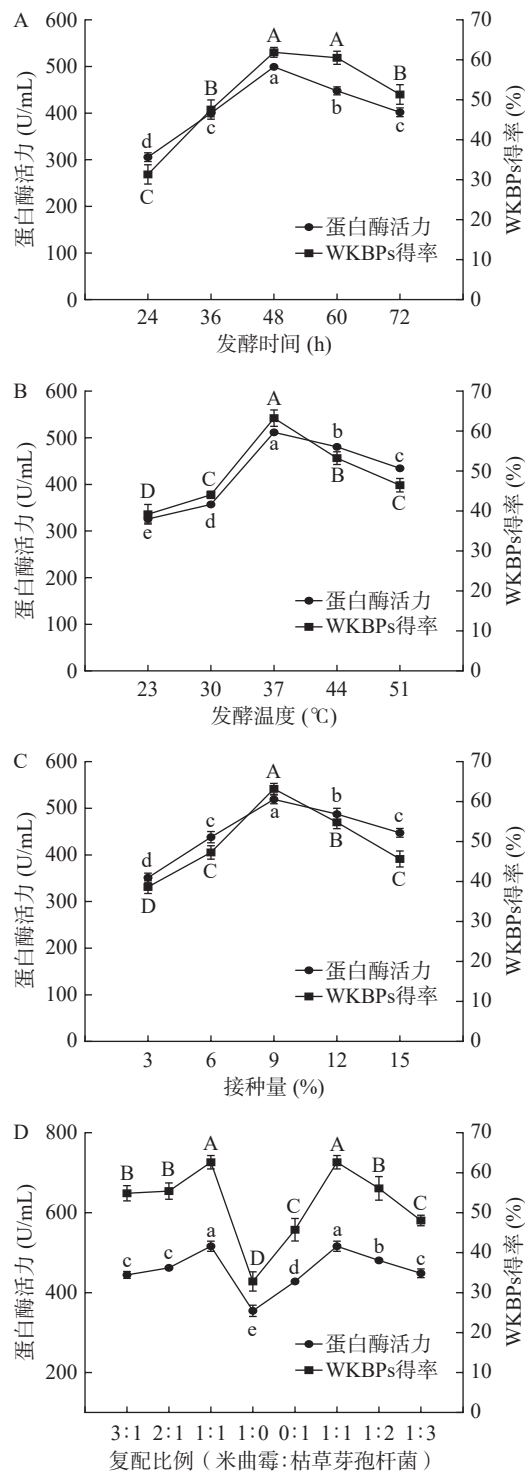


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Results of single factor experiment

注: 图中大写字母表示 WKBP 得率组内差异显著性 ($P<0.05$), 小写字母表示蛋白酶活力组内差异显著性 ($P<0.05$)。

2.3 响应面设计与结果分析

2.3.1 响应面试验结果 依据 Box-Behnken 的中心组合设计, 采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件设计 3 因素 3 水平共 17 个试验, 以 WKBP 得率为响应值 (Y, %), 试验设计与结果如表 3 所示。

对表 3 数据进行多元二次多项式回归拟合, 建立复合发酵制备 WKBP 的工艺参数回归模型。回

表 3 响应面试验设计及试验结果

Table 3 Response surface test design and test results				
试验号	A	B	C	Y: WKBP得率(%)
1	-1	-1	0	48.16
2	1	-1	0	52.23
3	-1	1	0	54.83
4	1	1	0	55.71
5	-1	0	-1	50.41
6	1	0	-1	52.73
7	-1	0	1	54.14
8	1	0	1	51.71
9	0	-1	-1	47.32
10	0	1	-1	52.83
11	0	-1	1	51.64
12	0	1	1	51.91
13	0	0	0	62.75
14	0	0	0	63.28
15	0	0	0	62.65
16	0	0	0	64.37
17	0	0	0	64.75

归方程为: $Y_{WKBP\text{得率}}=63.56+0.61A+1.99B+0.76C-0.80AB-1.19AC-1.31BC-4.75A^2-6.08B^2-6.56C^2$ 。

如表 4 所示, 对于拟合方程来说, F 值通常用于比较模型中的回归(模型拟合的部分)和残差(模型未能解释的部分)的方差, F 值越大, 说明回归项的方差相对较大, 模型的拟合相对较好。模型 F 值为 44.88 ($P<0.0001$), 证明该模型达到极显著水平; 失拟项是实际观测值与模型预测值之间的差异, 失拟项越小, 说明模型对数据的拟合越好, 失拟项 ($P=0.2467>0.05$) 表明差异不显著, 说明回归方程适宜; 其中, $R^2=0.9905$, 表明实验拟合度较好, 实验结果与预测值高度一致。校正系数 $R^2_{Adj}=0.9810$, 说明仅有 1.90% 的实验因素不能用该模型来表明, R^2 与 R^2_{Adj} 二者之差小于 0.2, 表明此方程与实际情况拟合良好。分析方差数据可以看出, A、AC、BC 对响应面值有显著

表 4 响应面回归模型及方差分析结果

Table 4 Response surface regression model and analysis of variance results						
方差来源	离差平方和	自由度	均方和	F值	P值	显著性
模型	535.60	9	59.51	44.88	<0.0001	***
发酵时间(A)	2.93	1	2.93	2.21	0.0409	*
发酵温度(B)	31.72	1	31.72	13.92	0.0018	**
接种量(C)	4.67	1	4.67	3.52	0.0028	**
AB	2.54	1	2.54	1.92	0.2085	
AC	5.64	1	5.64	4.25	0.0481	*
BC	6.86	1	6.86	5.18	0.0470	*
A ²	95.10	1	95.10	71.72	<0.0001	***
B ²	155.39	1	155.39	117.19	<0.0001	***
C ²	181.19	1	181.19	136.65	<0.0001	***
残差	9.28	7	1.33			
失拟项	5.65	3	1.88	2.07	0.2467	
误差项	3.63	4	0.91			
总和	544.88	16				

$R^2=0.9905$ $R^2_{Adj}=0.9810$

注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异高度显著($P<0.01$); ***表示差异极显著($P<0.0001$)。

的影响($P<0.05$), B、C 对响应面值有高度显著的影响($P<0.01$), A^2 、 B^2 、 C^2 对响应面值有极显著的影响($P<0.0001$), 其余各项均不显著。根据系数估计绝对值的大小, 3 个因素对 WKBP 得率的影响大小依次为: B(发酵温度)>C(接种量)>A(发酵时间)。可以用该模型分析并确定复合发酵制备 WKBP 的最佳工艺参数。

2.3.2 交互作用分析 发酵时间、发酵温度、接种量对复合发酵制备 WKBP 得率影响的响应图如图 2 所示。响应值随着自变量变化呈整体先增加后下降的趋势, 响应面曲线图中存在最大值。AC、BC 具有显著交互作用, 其曲面有极大值且坡面较陡峭, 另外从图中可看出 AB 也存在一定的交互作用, 但并不显著, 与表 4 中二项式回归模型方差分析的结论一致。

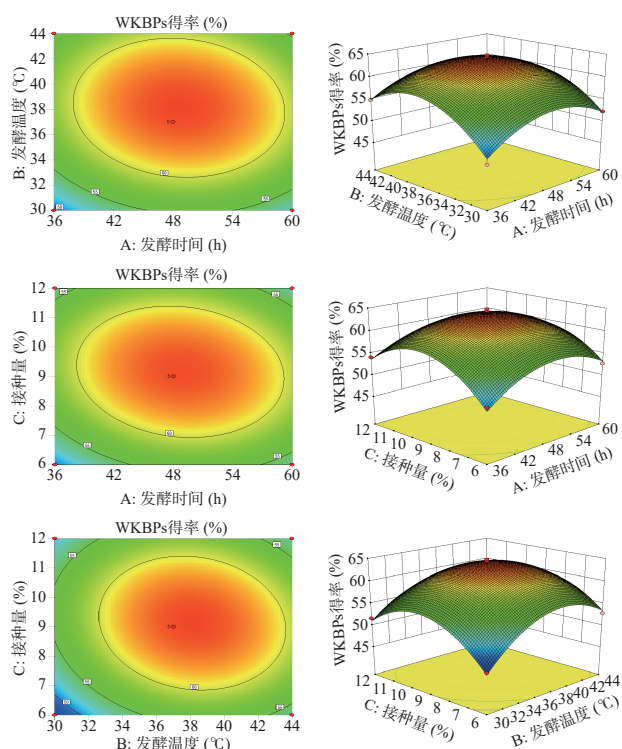


图2 各因素交互作用对芸豆 WKBP 得率的影响

Fig.2 Effects of interaction of various factors on WKBP yield of white kidney bean

2.3.3 最优条件的确定及验证 根据模型通过 Design Expert 8.0.6.1 软件得到最优条件为: 发酵时间 48.09 h、发酵温度 37.18 °C、接种量 9.13%, WKBP 得率预测值为 63.75%。结合实际应用, 将实验条件调整为: 发酵时间 48 h、发酵温度 37 °C、接种量 9%, 根据上述条件进行验证, 得到 WKBP 得率的实际值为 63.47%, 与预测值相近。

2.4 超滤组分分离及多肽含量

生物活性肽的分子量大小决定了所得到的活性肽是否具有所需的功能特性。超滤是一种压力驱动的膜分离技术, 可以将水解产物以分子量为基础分离成多种组分。本实验将 WKBP 经超滤后按分子量大小分为 4 个组分, WKBP-1($M_w>10$ kDa)、WKBP-2(5 kDa $<M_w<10$ kDa)、WKBP-3(3 kDa $<M_w<5$ kDa)、WKBP-4($M_w<3$ kDa), 测定其多肽含量和抗氧化活性, 结果如图 3 所示, 各组间存在显著差异($P<0.05$), WKBP-1 的肽段含量为 1.65%、WKBP-2 的肽段含量为 5.78%、WKBP-3 的肽段含量为 5.82%、WKBP-4 的肽段含量为 86.25%, 结果表明, WKBP 分子量主要集中在 3 kDa 以下。当 WKBP $M_w<3$ kDa 时, 抗氧化活性最高, 分别为 84.22% 和 82.20%, 因此, 选择 $M_w<3$ kDa 的 WKBP 进行后续实验探究。

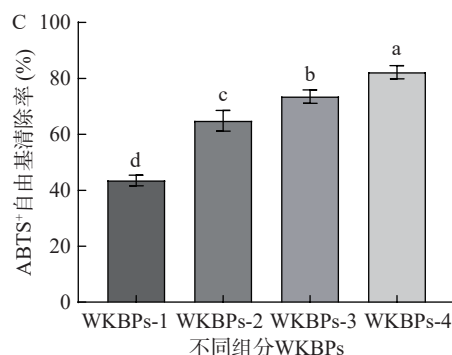
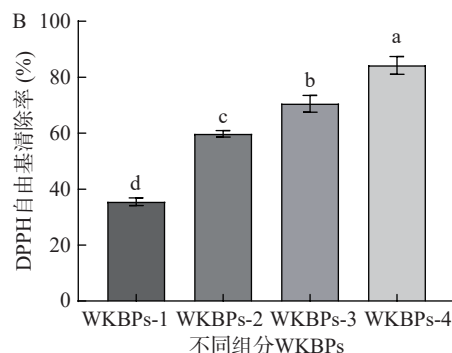
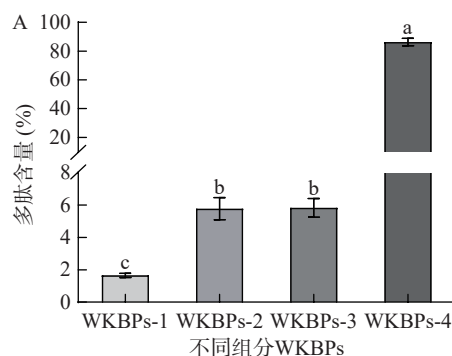


图3 超滤后 WKBP 各组分含量及抗氧化活性

Fig.3 Content and antioxidant activity of WKBP components after ultrafiltration

注: 图中不同字母表示差异显著($P<0.05$), 图 4、图 5 同。

2.5 体外抗氧化活性分析

人体正常生长代谢过程中活性氧的产生, 会导致自由基合成, 而高浓度的自由基会导致氧化应激产生, 减少 β 细胞胰岛素分泌, 损害胰岛素信号传导, 从而引起 2 型糖尿病及其并发症。研究表明, 抗氧化活性与自由基清除和还原能力呈正相关^[32]。本研究以 0.1 mg/mL V_C 为阳性对照, 通过 DPPH 自由基清

除、ABTS⁺自由基清除、羟自由基清除和铁离子还原力测定实验来评估 WKBP 的抗氧化能力。

图 4A~C 显示了 WKBP 的自由基清除率在 0.2~1.0 mg/mL 范围内呈一定的浓度依赖性, 随浓度的增加呈现上升趋势, 逐渐接近 V_C 的清除率, 表明 WKBP 具有良好的抗氧化活性。如表 5 所示, 羟自由基清除率、DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺自由基清除率半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.46、0.47 和

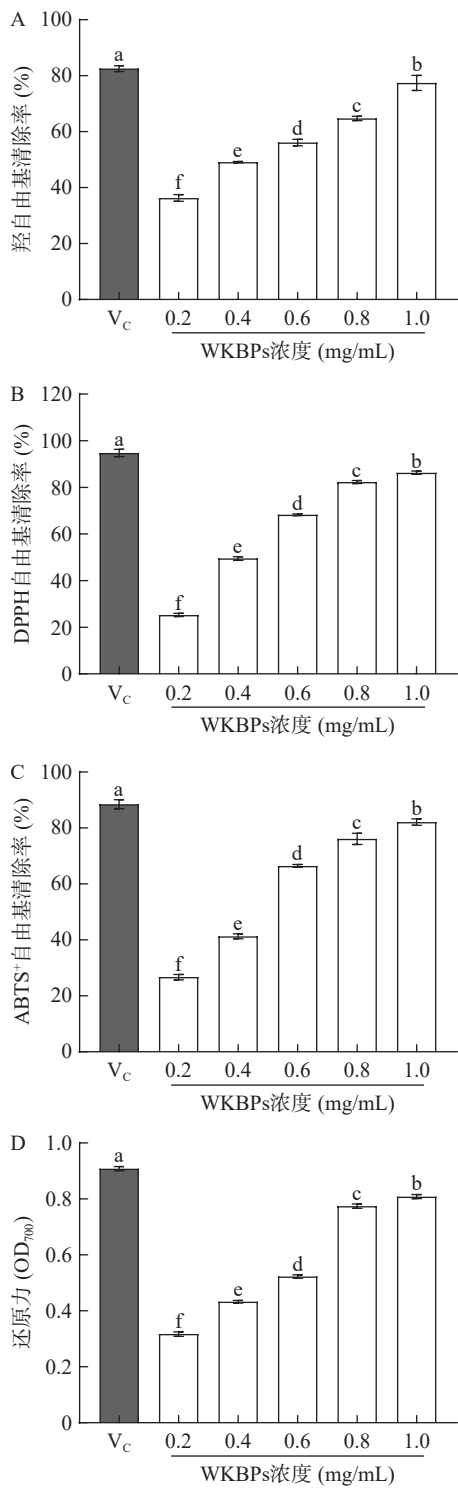


图 4 不同浓度 WKBP 的抗氧化能力

Fig.4 Antioxidant capacity of WKBP at different concentrations

表 5 抗氧化活性 IC₅₀ 值

Table 5 IC₅₀ value of antioxidant activity

类别	IC ₅₀ (mg/mL)
DPPH 自由基清除率	0.47
ABTS ⁺ 自由基清除率	0.50
羟自由基清除率	0.46
Fe ³⁺ 还原能力	0.66

0.50 mg/mL, 这一结果与之前报道的绿豆肽^[33] 和玉米肽^[34] 自由基清除能力接近。

Fe³⁺ 的还原反应通常用来确定供电子基团的强度, 其所反映的还原能力与许多抗氧化机制密切相关。图 4D 显示了 WKBP 和 V_C 对 Fe³⁺ 的还原能力, 结果表明 WKBP 的浓度与还原力呈正相关, 在 0.2~1.0 mg/mL 范围内, 还原力随浓度的增加呈现不断上升的趋势, 相比于 V_C 还原力较低, 其 IC₅₀ 为 0.66 mg/mL, 结果与 Zhu 等^[35] 从大豆渣中分离出的低分子量肽的还原能力保持一致。

2.6 模拟胃肠消化对 WKBP 抗氧化活性影响

以 WKBP 为研究对象, 通过体外模拟胃肠道消化, 评估 WKBP 在胃肠道消化过程中 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除活性的变化, 如图 5A~B 所示, 在胃消化阶段, DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除率随消化时间的增加而升高, 120 min 胃消化结束时 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除率分别为 78.10% 和 71.49%, 在 150 min 进入肠消化阶段

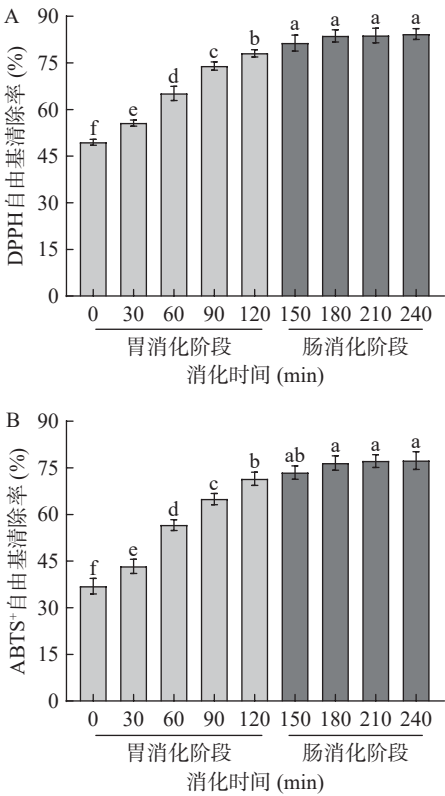


图 5 体外模拟胃肠消化过程中 WKBP 抗氧化活性变化

Fig.5 Changes of antioxidant activity of WKBP during in vitro simulated gastrointestinal digestion

后清除率逐渐趋于稳定,消化结束时清除率分别为 84.29% 和 77.34%。WKBP 胃消化过程中抗氧化活性逐渐增强可能是由于模拟胃消化过程中 WKBP 进一步水解成低分子量肽,暴露出更多的氨基酸侧链残基,保持了较高的氧化还原电位,为自由基提供更有效的电子供体^[36],增强了生物活性肽的释放,提高了抗氧化活性。进入肠消化阶段,更多小肽的存在,保持了抗氧化活性的稳定性。Zhan 等^[37]报道了类似的结果,从星油藤(*Plukenetia volubilis* L.)种子中提取的球蛋白和谷蛋白通过模拟胃肠道消化后释放较小的生物活性肽从而提高了抗氧化能力。

3 结论

本研究以白芸豆为原料,经米曲霉和枯草芽孢杆菌复合发酵的方法得到 WKBP 得率和蛋白酶活力较高的白芸豆粗肽。以 WKBP 得率为响应值,通过单因素结合响应面法得到复合发酵制备 WKBP 的最佳工艺参数为:发酵时间 48 h、接种量 9%、发酵温度 37℃,在此条件下,WKBP 得率可达到 63.47%。超滤结果表明,WKBP 分子量主要集中在 3 kDa 以下,且分子量<3 kDa 的 WKBP 抗氧化活性最高,DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、羟自由基清除率和 Fe³⁺还原力在 WKBP 浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内呈剂量依赖性,抗氧化能力随 WKBP 浓度的增加而增加,IC₅₀ 值分别为 0.47、0.50、0.46 和 0.66 mg/mL。在胃肠道消化过程中,WKBP 仍保持较高的抗氧化活性,胃肠消化结束时其 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除率分别为 84.29% 和 77.34%。本研究可为 WKBP 的后续工业化生产提供数据和理论支撑,对促进白芸豆产业的精深加工具有重要意义,同时也为抗氧化功能食品的开发提供新的思路。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] NAKAMURA A, OHBOSHI H, SAKAI M, et al. Extraction of water-soluble polysaccharides from kidney beans and examination of their protein dispersion and stabilization properties under acidic conditions[J]. *Food Research International*, 2021, 144: 110357.
- [2] WEN C, LIU G, REN J, et al. Current progress in the extraction, functional properties, interaction with polyphenols, and application of legume protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(4): 992–1002.
- [3] KAMBABAZI M R, OKOTH M, NGALA S, et al. Evaluation of nutrient content in red kidney beans, amaranth leaves, sweet potato roots and carrots cultivated in Rwanda[J]. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 2021, 21(4): 17801–17814.
- [4] 毛小雨. 体外模拟消化对芸豆蛋白结构特征及抗氧化活性的影响研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020. [MAO X Y. Effects of simulated digestion on structural characteristics and an-

- tiioxidant activity of kidney bean protein *in vitro*[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2020.]
- [5] CHEN B B, XIA Z, YE H D, et al. Response surface optimization of selenium-enriched *Moringa oleifera* seed peptides with antioxidant, ACEI and XOI activities[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2022, 17(2): 4625–4637.
- [6] 王奎, 包怡红, 康宁. 混菌固态发酵榛仁粕制备降血压肽工艺优化研究[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(12): 35–41. [WANG L, BAO Y H, KANG N. Optimization of preparation of blood pressure reducing peptide by solid fermentation of hazelnut meal with mixed bacteria[J]. *Chinese Journal of Grain and Oils*, 2018, 33(12): 35–41.]
- [7] 吴淑娟, 王锐, 董兆斌, 等. 红仁核桃多肽的制备工艺优化及降血脂功能研究[J]. *中国油脂*, 2023, 48(6): 54–60. [WU S J, WANG R, DONG Z B, et al. Optimization of the preparation process of red kernel walnut polypeptide and its hypolipidemic effect[J]. *China Oils and Fat*, 2023, 48(6): 54–60.]
- [8] ZHU X P, WANG W, CUI C. Hypoglycemic effect of hydrophobic BCAA peptides is associated with altered PI3K/Akt protein expression[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(15): 4446–4452.
- [9] 李凤洁. 藜麦、黑小麦降血糖肽在血糖调节面包的应用及其降糖活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022. [LI F J. Application of glucose-lowering peptides from quinoa and wheat in glucose regulating bread and their hypoglycemic activity[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2022.]
- [10] 王耀冉, 陈明杰, 李治平, 等. 生物活性肽制备、鉴定及其生物活性研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(12): 349–354. [WANG Y R, CHEN M J, LI Z P, et al. Progress in preparation, identification and bioactivity of bioactive peptides[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(12): 349–354.]
- [11] 黄磊, 周其洋. 大豆水解蛋白中苦味肽的研究进展[J]. *现代食品*, 2022, 28(21): 22–24. [HUANG L, ZHOU Q Y. Research progress of bitter peptides in soybean hydrolyzed protein[J]. *Modern Food*, 2022, 28(21): 22–24.]
- [12] 张树华. 发酵法制备绿豆多肽[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014. [ZHANG S H. Mung bean polypeptide was prepared by fermentation[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2014.]
- [13] 王芬, 赵腊梅. 枯草芽孢杆菌固态发酵花生粕的条件优化[J]. *饲料研究*, 2022, 45(2): 75–78. [WANG F, ZHAO L M. Optimization of solid fermentation conditions of peanut meal by *Bacillus subtilis*[J]. *Feed Study*, 2022, 45(2): 75–78.]
- [14] LEE S P, YOON W K, LEE J H, et al. Fermented milk product enriched with γ -P-GA, peptides and GABA by novel co-fermentation with *Bacillus subtilis* and *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. *Fermentation*, 2022, 8(8): 485–491.
- [15] ZHANG D D, LIU J L, JIANG T M, et al. Influence of *Kluyveromyces marxianus* on proteins, peptides and amino acids in *Lactobacillus*-fermented milk[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 26(3): 739–748.
- [16] NAKAMURA R, SAITO M, MARUYAMA M, et al. Reduction in the bitterness of protein hydrolysates by an aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *Food Science and Technology Research*, 2023, 29(1): 156–165.
- [17] 陈敏. 虎斑乌贼生殖腺多肽的制备、纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [CHEN M. Study on the preparation, purification and antioxidant activity of peptides from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) gonads[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]

- [18] 吴宝昌. 枯草芽孢杆菌混合发酵制备豆粕饲料的研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2010. [WU B C. Preparation of soybean meal feed by mixed fermentation of *Bacillus subtilis*[D]. Jinan: Shandong Polytechnic University, 2021.]
- [19] PADHI S, CHOURASIA R, KUMARI M, et al. Production and characterization of bioactive peptides from rice beans using *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 351: 126932.
- [20] 尹乐斌, 李乐乐, 何平, 等. 枯草芽孢杆菌发酵豆渣制备多肽及其活性研究[J]. *中国酿造*, 2022, 41(1): 75-79. [YIN L B, LI L L, HE P, et al. Preparation and activity of peptides from soybean dregs by fermentation with *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Brewing*, 2022, 41(1): 75-79.]
- [21] 龙久铃, 朱秋劲, 白晶, 等. 米曲霉固态发酵苏麻饼粕产抗氧化肽工艺优化[J]. *轻工学报*, 2021, 36(4): 18-28. [LONG J L, ZHU Q J, BAI J, et al. Optimization of production of antioxidant peptide by solid state fermentation of *Perilla* seed meal by *Aspergillus oryzae*[J]. *Journal of Light Industry*, 2021, 36(4): 18-28.]
- [22] 姜东. 茶籽多肽制备及其抗氧化活性研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2020. [JIANG D. Preparation and antioxidant activity of tea seed polypeptides[D]. Wuhu: Anhui Engineering University, 2020.]
- [23] ZHU Z, SONG X, JIANG Y, et al. Chemical structure and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from *Asteris Radix et Rhizoma*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 286: 119309.
- [24] XIANG G, SUN H, CHEN Y, et al. Antioxidant and hypoglycemic activity of tea polysaccharides with different degrees of fermentation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 228: 224-233.
- [25] HUI H, GAO W. Structure characterization, antioxidant and hypoglycemic activity of an arabinogalactoglucan from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 207: 346-357.
- [26] GU F, KIM J M, HAYAT K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(1): 48-54.
- [27] CHEN X, XU Y, DU X, et al. Effect of *Porphyra haitanensis* polyphenols from different harvest periods on hypoglycaemic activity based on *in vitro* digestion and widely targeted metabolomic analysis[J]. *Food Chemistry*, 2024, 437: 137793.
- [28] 刘杭, 李笑, 谢苗苗, 等. 混菌发酵玉米豆粕型饲料最佳菌种配比研究[J]. *安徽科技学院学报*, 2021, 35(1): 25-29. [LIU H, LI X, XIE M M, et al. Study on the optimum strain ratio of mixed bacteria fermented corn and soybean meal feed[J]. *Journal of Anhui Institute of Science and Technology*, 2021, 35(1): 25-29.]
- [29] 谢东宝. 茶籽蛋白源活性肽的制备及其功能性研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2022. [XIE D B. Preparation and functional study of active peptides derived from tea seed protein[D]. Wuhu: Anhui Engineering University, 2022.]
- [30] 徐素云, 王艳萍, 周聪, 等. 纯种混合发酵红茶菌工艺优化及品质分析[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(15): 138-145. [XU S Y, WANG Y P, ZHOU C, et al. Process optimization and quality analysis of pure mixed fermentation of Kombucha[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(15): 138-145.]
- [31] 江晨, 齐宏涛, 于丽娜, 等. 响应面优化花生蛋白抗菌肽制备工艺[J]. *山东农业科学*, 2021, 53(11): 111-119. [JIANG C, QI H T, YU L N, et al. Preparation of peanut protein antimicrobial peptides was optimized by response surface[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2021, 53(11): 111-119.]
- [32] TANG Y, HE X, LIU G, et al. Effects of different extraction methods on the structural, antioxidant and hypoglycemic properties of red pitaya stem polysaccharide[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134804.
- [33] YU X, CHEN Y, QI Z, et al. Preparation and identification of a novel peptide with high antioxidant activity from corn gluten meal[J]. *Food Chemistry*, 2023, 424: 136389.
- [34] LIU F F, LI Y Q, WANG C Y, et al. Physicochemical, functional and antioxidant properties of mung bean protein enzymatic hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2022, 393: 133397.
- [35] ZHU Z, SONG X, YAO J, et al. Structural characteristics, functional properties, antioxidant and hypoglycemic activities of pectins from feijoa (*Acca sellowiana*) peel[J]. *Food Chemistry*, 2023, 428: 136819.
- [36] LEE S Y, LEE D Y, HUR S J. Changes in the stability and antioxidant activities of different molecular weight bioactive peptide extracts obtained from beef during *in vitro* human digestion by gut microbiota[J]. *Food Research International*, 2021, 141: 110116.
- [37] ZHAN Q P, WANG Q, LIU Q, et al. The antioxidant activity of protein fractions from Sacha Inchi seeds after a simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Science & Technology*, 2021, 145: 111356.