

响应面优化微波结合酶法制备米糠多肽过程中 黄曲霉毒素 B₁ 的降解工艺

林耀盛¹, 林奕云², 张惠娜¹, 钟晶晶¹, 刘学铭¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 中国广州分析测试中心, 广东省分析测试技术公共实验室, 广东广州 510070)

摘要: 研究微波结合酶解法组合技术对米糠多肽制备过程中黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 的影响, 为染毒米糠的脱毒提供新途径。在单因素试验的基础上, 将料液比 (X₁)、微波时间 (X₂)、碱性蛋白酶酶解时间 (X₃)、酶解 pH (X₄) 因素进行组合, 应用 Design Expert 软件和 Box-Behnken 中心组合试验方法对 AFB₁ 降解条件进行了优化, 测定米糠多肽 AFB₁ 的降解量。初始米糠中 AFB₁ 浓度为 100.14 µg/kg, 运用响应面分析确定了其最佳工艺条件: 微波功率 750 W、微波时间 9.56 min; 碱性蛋白酶酶解温度 50 °C、酶解 pH 10.74、酶解时间 1.57 h、加酶量 0.4%; 料液比 1:9.96, 在此条件下, 米糠中 AFB₁ 的降解率为 98.68%, 所制备的米糠多肽残留浓度为 1.85 µg/kg, 符合国家标准 (≤10 µg/kg)。通过响应面优化微波结合酶法制备多肽工艺发挥协同作用, 能有效降低米糠多肽 AFB₁ 含量满足国家标准限量要求。微波结合酶解处理条件温和, 降解效率高、操作方便, 可推广应用于受黄曲霉毒素的降解的粮油制备中。

关键词: 米糠多肽; 微波处理; 酶法; 黄曲霉毒素 B₁; 响应面脱除

文章编号: 1673-9078(2019)07-173-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.024

Study on Degradation of Aflatoxin B₁ during the Preparation of Rice Bran Polypeptide by Response Surface Methodology Microwave-assisted Enzyme Treatment

LIN Yao-sheng¹, LIN Yi-yun², ZHANG Hui-na¹, ZHONG Jing-jing¹, LIU Xue-ming¹

(1. Sericulture and Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (2. Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China)

Abstract: To provide new pathways for detoxification of rice bran, the effect of microwave combined with enzymatic hydrolysis on aflatoxin B₁ (AFB₁) were investigated in rice bran. On the basis of single factor experiment, the factors of material-liquid ratio (X₁), microwave time (X₂), alkaline protease hydrolysis time (X₃) and enzymatic hydrolysis pH (X₄) were combined. Design Expert software and Box-Behnken central combination test method were used to optimize the degradation conditions of AFB₁ and determine the removal amount of rice bran polypeptide AFB₁. The initial concentration of AFB₁ in rice bran was 100.14 µg/kg, and the optimum technological conditions were determined by response surface analysis: microwave power 750 W, microwave time 9.56 min; alkaline protease hydrolysis temperature 50 °C, enzymatic hydrolysis pH 10.74, enzymatic hydrolysis time 1.57 h, enzymatic dosage 0.4%; material-liquid ratio 1:9.96. Under these conditions, the degradation rate of AFB₁ in rice bran was 98.68%, and the residual concentration of rice bran polypeptide (1.85 µg/kg) was obtained, which was in agree with the national standard (<10 µg/kg). Compared with single factor treatment, microwave combined with enzymatic method can play a

收稿日期: 2019-05-14

基金项目: 公益性行业 (农业) 科技专项 (201203037-01-01); 国家重点研发计划项目 (2017YFD0401105); 广东省省级科技计划项目 (2017A030303041; 2015A030310466)

作者简介: 林耀盛 (1985-), 男, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工及安全

通讯作者: 刘学铭 (1967-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工

synergistic role and effectively reduce the content of rice bran AFB₁. For the process was under mind condition, simple and efficient, it could be used for the aflatoxin contaminated crops.

Key words: polypeptide of rice bran; bran microwave treatment; enzymatic pretreatment; AFB₁; response surface method for detoxification

我国作为世界上第一产稻大国,年产量约 17000 万 t,经加工可产米糠约 1100 万 t,米糠资源相当丰富。米糠多肽是米糠蛋白经蛋白酶水解获得的不同分子量的多肽混合物,其营养价值可与鸡蛋蛋白媲美^[1,2];具有低过敏性,良好的溶解性,酸、热稳定性,同时具有易吸收、降血压、抗氧化等多种生理活性,可用于婴幼儿营养配方食品、速溶饮品、功能食品等^[3-5]。南方气候由于常常高温高湿影响,各类微生物繁殖非常活跃,容易导致米糠霉变而失去使用价值^[6,7]。黄曲霉毒素主要是由黄曲霉、寄生曲霉等产生的代谢产物,对粮油食品的污染较为严重。容易天然污染的黄曲霉毒素主要有 4 种,分别为黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂),其中以 AFB₁ 致癌、致畸和诱变性最强^[8],我国规定米制品(如米糠多肽)中黄曲霉毒素含量应≤10.0 μg/kg^[9]。因此,以米糠为原料制备米糠多肽,对于提高米糠的附加值具有重要的现实意义。传统的多肽类物质制备多采用酶解法^[10],通常先采用“碱溶酸沉”工艺从米糠中提取蛋白质,再用蛋白酶对蛋白质进行水解制备多肽。由于米糠蛋白分子的聚合度较强,分子中存在较多的二硫键交联,很难溶解^[11],导致米糠蛋白和多肽的提取得率低,单独酶解法提取蛋白肽得率并不高,难以被利用。与传统提取工艺比较,因高温或高碱提取蛋白肽导致蛋白变性甚至产生有毒物质而带来的变化、损失及生理活性降低,微波技术具有不需要有机溶剂消耗,减少了对环境的污染,操作简单等优点,目前在粮油加工中正逐步推广应用^[12,13]。目前针对食品中黄曲霉毒素的脱毒方法有很多,基本分为物理、化学、生物酶解法,但这些脱毒方法都存在安全性及食品营养损失等问题^[2,14]。Perez 和 TRIPATHI 等^[15,16]研究证明微波能引起极性分子振动从而对食品物料中黄曲霉毒素的有效去除,而米糠多肽降解黄曲霉毒素的工艺尚缺乏研究。基于以上这些特点,本文采用微波结合酶法处理方法,在较为温和的碱性条件下更好地实现对 AFB₁ 的降解,获得安全无毒的米糠多肽制品。本实验通过研究微波辅助酶解法对 AFB₁ 的降解影响,重点研究染毒米糠多肽制备过程对中 AFB₁ 有效降解技术条件,阐述微波结合酶法降解过程中几个主要因素对降解效果的影响,通过响应面分析得出最优的降解工艺条件,制备无毒安全米糠多肽,为后续的工业化生产米糠多肽及

其制品提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米糠样品:收集于江门市粮油市场,研磨粉碎过 80~100 目,密封 4℃冷藏,经测定其 AFB₁ 浓度为 100.14 μg/kg;碱性蛋白酶(10000 U/g),购于广州市齐云生物技术有限公司;实验所用试剂均为分析纯。

Biofuge Stratos Sorvall 高速冷冻离心机,德国赛多利斯;PriboFast[®] 黄曲霉毒素 B₁ 免疫亲和柱,北京泰乐祺科技有限公司;Thermo/美国;Sartorius PB-10 型 pH 计;CW-2000 型超声-微波协同萃取仪,中国-上海新拓微波溶样测试技术有限公司;1200HPLC Agilent1260 系列高效液相色谱仪配荧光检测器,美国 Agilent 公司;K8400 型蛋白质分析仪,瑞典 FOSS 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微波辅助酶法制备无毒米糠多肽工艺

发毒米糠 10 g→加水(料水比约 1:10)→1 mol/L 的 NaOH 溶液(调节 pH 值至 8.2,45℃,60 min)→调节 pH 4.5→离心→过滤沉淀水洗复溶(料水比约 1:10)→加碱性蛋白酶(调 pH=8.0,温度 55℃,120 min)→水解→微波(750 W,10 min)→离心(3800 r/min,10 min)→洗涤沉淀→合并上清液→浓缩→干燥→米糠多肽

参考 GB/T 5009.22-2016 方法,测定以上米糠多肽制品中 AFB₁ 残留的浓度均符合国家标准的要求。

1.2.2 微波辅助酶法制备米糠多肽降解 AFB₁ 工艺优化

在酶法制备米糠蛋白基础上,以 AFB₁ 降解率为评价指标,分别考察不同微波功率与时间、酶解条件对米糠 AFB₁ 的降解率的影响,探索 AFB₁ 降解的最佳工艺条件。

1.2.3 样品提取及衍生化

配制 70%的甲醇水(含 4% NaCl),样品用 15 mL 70%的甲醇水于 50℃超声 20 min,10000 r/min、10℃离心 10 min 取上清液。提取 3 次,合并上清液并进行浓缩至 15 mL,取 4 mL 溶液加 2 mL 石油醚,漩涡振荡混匀,静置分层,取下层液 3 mL,洗脱液于 60℃

氮吹至近干,加 200 μL 正己烷和 100 μL 三氟乙酸,加盖盖紧,振荡 30 s,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴衍生 20 min,再于 60 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干,最后用 15% 乙腈水定容至 1 mL,过 0.22 μm 有机相滤膜, -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.4 色谱条件

液相色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 2.5 μm),流动相: A: 甲醇, B: 乙腈, C: 水(体积比 15:17:68)等度洗脱分离,荧光检测器检测($\lambda_{\text{激发}}=360\text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=440\text{ nm}$),流动相流速 0.20 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

1.2.5 单因素试验

分别考察微波功率(150、300、450、600、750、800 W)、微波时间(3、5、7、11、15 min)、料液比(1:4、1:6、1:8、1:10、1:12)、碱性蛋白酶酶解 pH(8、9、10、11、12)、酶解温度(35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$)、加酶量(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)、酶解时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)对米糠多肽制备过程中 AFB₁ 降解率的影响。

1.2.6 数据分析

每个试验处理均作 3 个平行,采用 OriginPro 软件进行制图及 Design Expert 软件和 Box-Behnken 中心组合试验方法设计响应面优化分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同微波功率和时间对 AFB₁ 降解率的影响

采用不同微波功率和时间处理,考察米糠多肽米糠 AFB₁ 降解率的变化。在 0~900 W 微波功率条件下,如图 1 可知,米糠 AFB₁ 降解率随微波功率的增加而提高,至 P=800 W 时降解幅度不明显。如图 2 可见,在 3~15 min 随着微波处理时间的延长,米糠 AFB₁ 降解率逐渐提高,处理时间 7 min 时,AFB₁ 降解率为 95.48%,随着超高压处理时间的进一步延长,其 AFB₁ 降解率呈平稳趋势。微波处理主要引起极性分子振动从而对食品物料产生影响,被广泛应用于某些食品物料中黄曲霉毒素的降解^[15,16]。微波功率和时间的延长,微波热效应使温度提高,对 AFB₁ 降解起促进效应,物料吸收热增多,微波处理对 AFB₁ 的量已经达到饱和和恒定状态,使得降解效果不再升高。吸收微波的能力反而降低,导致 7 min 后促进效应不显著。综合实际生产成本及效益考虑,选取功率为 750 W 时较为合适,同时选取 5、7、11 min 作为响应面分析的因素水平,得到最优的降解条件,具备合理性。微波处理工

艺,促进了米糠聚集物分散,白糖基化而具有亲水性,促进碱液与黄曲霉毒素 B₁ 的接触面积,加速黄曲霉的脱除作用,一方面可能与在该处理过程中形成的糖基化产物有关,即蛋白二白上糖链的引入,氢基的亲水特性有助于蛋白肽的溶解^[17]。

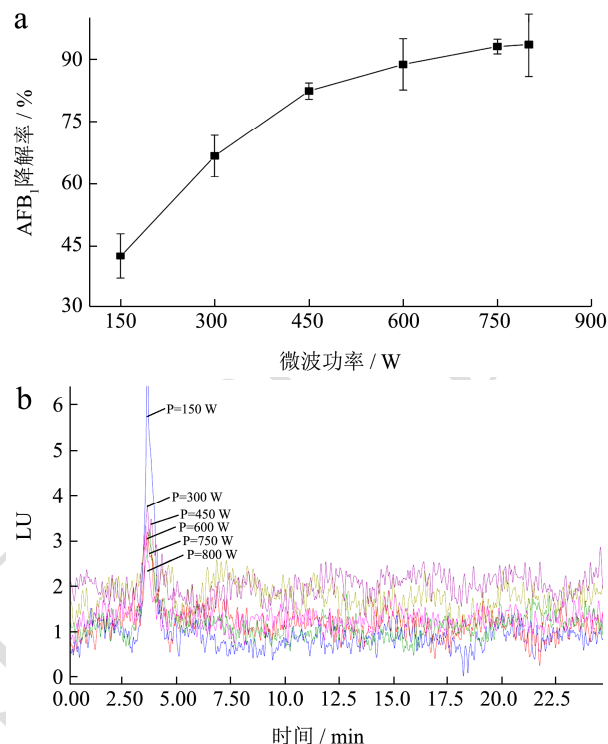


图 1 不同微波功率对 AFB₁ 降解率的影响

Fig.1 Effect of different microwave power on the degradation of AFB₁ (n=3)

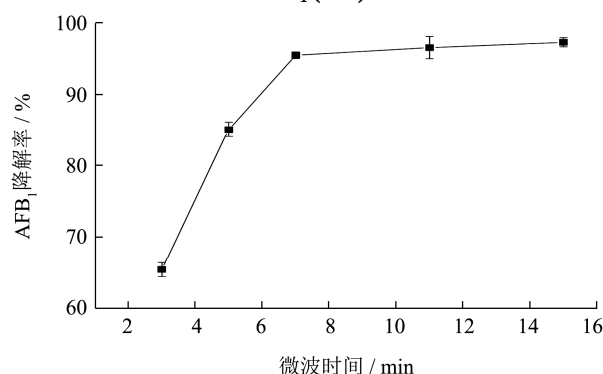


图 2 不同微波时间对 AFB₁ 降解率的影响

Fig.2 Effect of different microwave time on the degradation of AFB₁ (n=3)

2.1.2 料液比对 AFB₁ 降解率的影响

由图 3 可知,随着提取液使用量的增加,虽然降解率在降低,但从中可以看出,可能提取液的量少,提取不完全,料液比过大,可能相当于被稀释从而影响 AFB₁ 含量,而在 1:10 有较好的充分提取,AFB₁ 降解率为 88.68%,故试验选定料液比为 1:10。综合实际生产成本及效益考虑,选取料液比 1:8、1:10、1:12

作为响应面分析的因素水平,得到最优的降解条件,具备合理性。

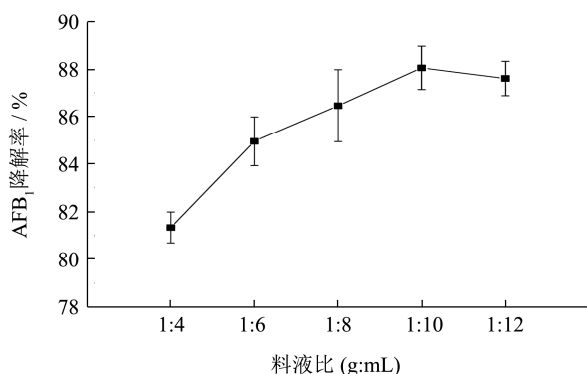


图3 料液比对 AFB₁ 降解影响

Fig.3 Effect of material-liquid ratio on the degradation of AFB₁ (n=3)

2.1.3 碱性蛋白酶酶解 pH 对 AFB₁ 降解率的影响

采用不同 pH 进行碱性蛋白酶酶解处理,考察米糠多肽米糠 AFB₁ 降解率的变化。由图 4 可见,在 $8 \leq \text{pH} \leq 12$, AFB₁ 降解率随着 pH 的递增先提高后下降,当 $\text{pH} < 11.0$ 时,米糠中 AFB₁ 的降解率随着 pH 值得升高而升高;当 $\text{pH} > 11.0$ 时,降解率随之降低。当 $\text{pH} = 11.0$ 时, AFB₁ 降解率达到 78.94%,可能 AFB₁ 本身在 pH 值为碱性环境中不稳定,内酯环容易被破坏形成香豆素钠盐,溶于水,达到某一平衡点最适 pH 为 11。综合实际生产成本及效益考虑,选取 pH 为 10、11、12 作为响应面分析的因素水平,得到最优的降解条件,具备合理性。

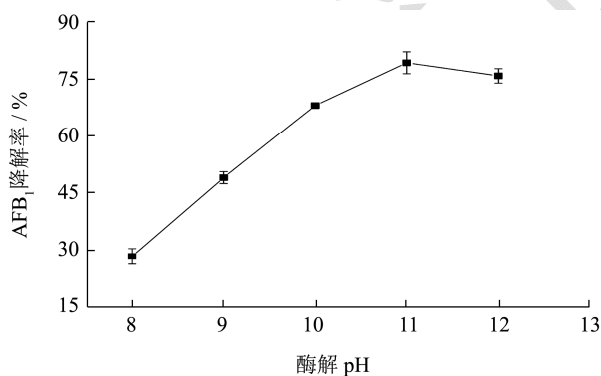


图4 酶解 pH 对 AFB₁ 降解影响

Fig.4 Effect of enzymolysis pH on the degradation of AFB₁ (n=3)

2.1.4 碱性蛋白酶酶解时间对 AFB₁ 降解率的影响

采用不同时间进行碱性蛋白酶酶解处理,考察米糠多肽米糠 AFB₁ 降解率的变化。由图 5 可知,随着碱性蛋白酶酶解时间的延长,米糠中 AFB₁ 的降解率随之增加。在 1.5 h 时,降解率达到 85.96%,但随着

碱性蛋白酶处理时间的进一步延长,其降解率呈平稳趋势。这一方面可能由于酶的活性作用,随着酶解时间的增长,碱性蛋白酶对米糠黄曲霉毒素的降解和修饰作用达到平衡状态。综合实际生产成本及效益考虑,选取 pH 为 1.5、2.0、2.5 作为响应面分析的因素水平,得到最优的降解条件,具备合理性。

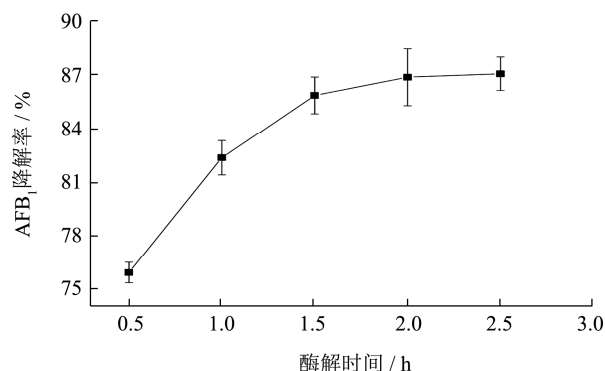


图5 酶解时间对 AFB₁ 降解影响

Fig.5 Effect of enzymolysis time on the degradation of AFB₁ (n=3)

2.1.5 碱性蛋白酶酶解温度对 AFB₁ 降解率的影响

采用不同温度进行碱性蛋白酶酶解处理,考察米糠多肽米糠 AFB₁ 降解率的变化。由图 6 可知,随酶解温度的增大,米糠中 AFB₁ 的降解率逐步提高;在温度为 50 °C 时,降解率达到 82.79%,但随着碱性蛋白酶处理温度的提高,其降解率反而下降。当温度大于 50 °C 后,随着温度增高降解率随之降低,这可能与酶的酶活下降有关,产生功能肽作用减少,从而对黄曲霉毒素降解能力也随之减弱^[18]。综合实际生产成本及效益考虑,选取碱性蛋白酶酶解温度 50 °C,得到最优的降解条件,具备合理性。

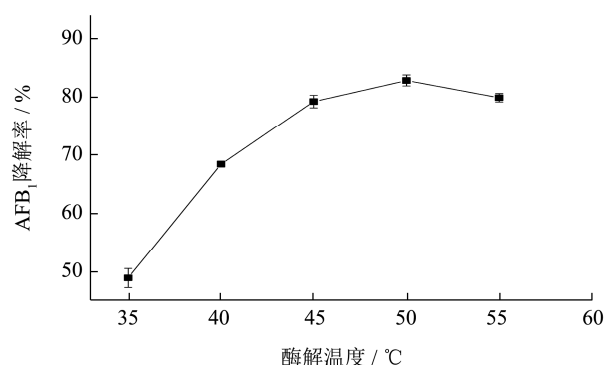


图6 碱性蛋白酶酶解温度对 AFB₁ 降解影响

Fig.6 Effect of enzymolysis temperature on the degradation of AFB₁ (n=3)

2.1.6 碱性蛋白酶加酶量对 AFB₁ 降解率的影响

采用添加不同酶量进行碱性蛋白酶酶解处理,考

察米糠多肽米糠 AFB₁ 降解率的变化。由图 7 可知, 随酶添加量的增大, 米糠中 AFB₁ 的降解率逐步提高; 增加酶添加量可以提高酶促反应速度, 由于底物与酶分子反应过程中, 存在某个平衡点, 当酶量较低时, 酶分子与底物可以充分结合; 当继续增加酶量, 底物结合酶的程度会加大, 当反应达到饱和后, 酶活性趋于稳定。添加适当酶量可以促进获得更多功能肽^[19], 具有高抗氧化性的多肽或其他功能性肽将原料中释放出来可使黄曲霉毒素有效降解, 在添加量为 0.4% 时, 此时降解率达到 83.84%。故试验选定碱性蛋白酶加酶量为 0.4%。

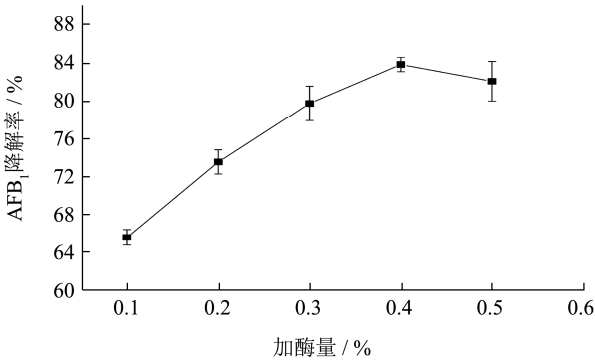


图 7 碱性蛋白酶加酶量对 AFB₁ 降解影响

Fig.7 Effect of the amount of enzyme adding on the degradation of AFB₁ (n=3)

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面四因素三水平设计方案及结果

综合单因素试验结果, 确定在微波功率 750 W、碱性蛋白酶酶解温度 50 °C、加酶量 0.4% 条件下, 选择料液比 (X₁)、微波时间 (X₂)、碱性蛋白酶酶解时间 (X₃)、酶解 pH (X₄) 为考察因素、以 AFB₁ 降解率 (Y) 为考察指标。借助 Design Expert 分析软件, 采用 Box-Behnken 设计法设计响应面优化降解条件。采用 4 因素 3 水平的响应面分析法, 试验及其结果见表 1 和表 2 所示。

在单因素试验基础上, 对料液比 (X₁)、微波时间 (X₂)、碱性蛋白酶酶解时间 (X₃)、酶解 pH (X₄) 进行四因素三水平响应面设计, 试验设计与结果见表 2。

表 1 试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of the experiment

水平 编码	因素			
	X ₁ 料液比 /(g:mL)	X ₂ 微波 时间/min	X ₃ 酶解 时间/h	X ₄ 酶解 pH
-1	1:8	5	1.5	10
0	1:10	7	2.0	11
1	1:12	11	2.5	12

表 2 响应面设计方案及实验结果

Table 2 Results of response surface design and experimental

试验号	X ₁ 料液比/(g:mL)	X ₂ 微波时间/min	X ₃ 酶解时间/h	X ₄ 酶解 pH	AFB ₁ 降解率/%
1	-1 (1:8)	0 (7)	-1 (1.5)	0 (11)	92.14±0.03
2	1 (1:12)	-1 (5)	0 (2.0)	0	78.60±0.02
3	0 (1:10)	0	-1	1 (12)	88.53±0.05
4	1	0	0	-1 (10)	85.26±0.02
5	1	0	1 (2.5)	0	86.91±0.01
6	0	-1	-1	0	87.19±0.03
7	-1	1 (11)	0	0	93.24±0.07
8	0	0	-1	-1	89.34±0.05
9	0	1	-1	0	96.86±0.04
10	0	1	0	-1	91.10±0.02
11	0	0	0	0	95.05±0.08
12	0	0	1	1	92.60±0.06
13	-1	-1	0	0	87.29±0.02
14	0	-1	0	-1	81.43±0.04
15	0	0	1	-1	84.19±0.02
16	1	1	0	0	93.33±0.01
17	-1	0	0	-1	89.60±0.04
18	-1	0	1	0	92.69±0.09

转下页

接上页

19	0	1	1	0	93.43±0.05
20	0	0	0	0	95.07±0.02
21	0	-1	1	0	87.93±0.03
22	0	-1	0	1	84.65±0.06
23	0	1	0	1	87.98±0.02
24	1	0	0	1	83.67±0.01
25	1	0	-1	0	88.86±0.07
26	-1	0	0	1	91.31±0.02

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted response surface regression model

Source of variance	Sum of squares	Freedom	mean square	F value	P value	significance
Model	562.34	14	40.17	22.30	< 0.0001	**
X ₁	41.92	1	41.92	23.28	0.0003	**
X ₂	198.86	1	198.86	110.42	< 0.0001	**
X ₃	4.64	1	4.64	2.58	0.1309	
X ₄	0.83	1	0.83	0.46	0.5083	
X ₁ ²	68.83	1	68.83	38.22	< 0.0001	**
X ₂ ²	129.38	1	129.38	71.84	< 0.0001	**
X ₃ ²	6.97	1	6.97	3.87	0.0694	
X ₄ ²	156.54	1	156.54	86.92	< 0.0001	**
X ₁ X ₂	19.73	1	19.73	10.95	0.0052	**
X ₁ X ₃	1.56	1	1.56	0.87	0.3674	
X ₁ X ₄	2.72	1	2.72	1.51	0.2392	
X ₂ X ₃	4.70	1	4.70	2.61	0.1286	
X ₂ X ₄	11.98	1	11.98	6.65	0.0218	*
X ₃ X ₄	21.25	1	21.25	11.80	0.0040	**
残差	25.21	14	1.80			
失拟项	23.07	10	2.31	4.31	0.0860	
纯误差	2.14	4	0.54			
总和	587.56	28				
Std. Dev.	1.34	R ²	0.9571			
Mean	89.75	R _{Adj}	0.9142			
C.V.	1.50	Pred R-Squared	0.7534			
PRESS	144.91	Adeq Precision	16.7930			

注: **.差异极显著 ($p<0.01$); *.差异显著 ($p<0.05$).

2.2.2 回归模型的有效性及显著性分析

利用 Design Expert 软件对表 2 数据进行回归拟合, 计算的出回归模型进行回归方程各项系数及方差分析, 见表 3。

利用 Design Expert 软件和 Box-Behnken 中心组合试验方法建立数学模型对表 2 数据进行多元回归拟合, 得到回归方程:

$$\text{AFB}_1 \text{ 降解率 (Y)} = -621.74893 + 18.22128X_1 + 14.50005X_2 - 23.62849X_3 + 107.71614X_4 - 0.81440X_1^2 - 0.57$$

$$478X_2^2 - 4.14533X_3^2 - 4.91258X_4^2 + 0.35716X_1X_2 - 0.62500X_1X_3 - 0.41250X_1X_4 - 0.69707X_2X_3 - 0.55672X_2X_4 + 4.61000X_3X_4$$

对上述回归模型进行方差分析(表 3), 结果表明, 模型高度显著 ($p<0.0001$), 失拟检验不显著, 因变量与考察自变量之间的线性关系良好 ($R^2=0.9571$), 回归模型的调整确定系数为 0.9142, 说明该模型能够解释 91.42%响应值的变化, 拟合程度较好, 因此, 可用此模型对米糠多肽制备过程中 AFB₁ 的降解效果进行

分析和预测。变异系数 $C.V.\% = 1.50$, 变异系数的大小是说明精确度的问题, 其越高实验的可靠性越低。一次项 X_1 、 X_2 及二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_4^2 、 X_1X_2 、 X_3X_4 表现为极显著, 说明它们对响应值影响极大, 且所考察因素对响应值影响不是简单的一次线性关系。根据表 3 中影响因素的 F 值, 影响 AFB_1 降解率的各因素主次顺序为: 微波时间 > 料液比 > 酶解时间 > 酶解 pH。

2.2.3 米糠多肽制备过程中 AFB_1 降解条件的响应面分析与优化

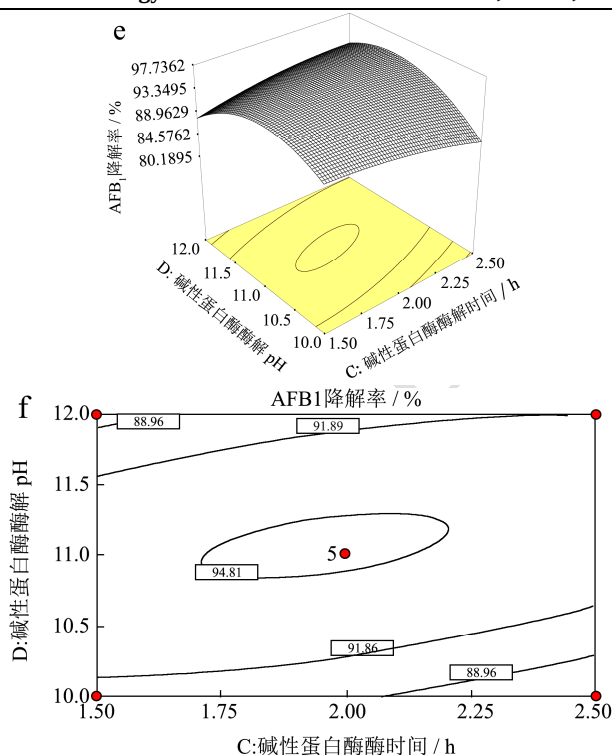
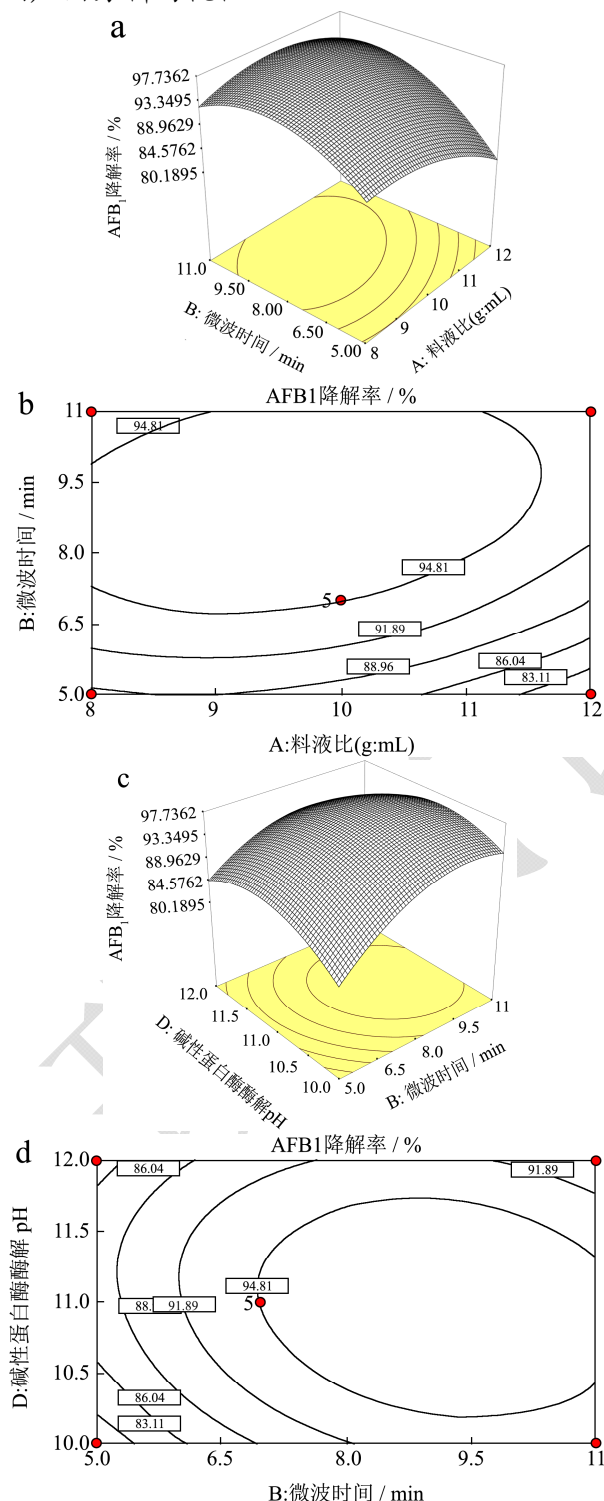


图 8 各因素对 AFB_1 降解率影响的响应面图和等高线图

Fig.8 The respective figure of response surface and contour map for the impact of various factors on degradation rate of AFB_1

注: a、b: 料液比与微波时间; c、d: 微波时间与酶解 pH; e、f: 酶解时间与酶解 pH。

经过 Design Expert 软件处理, 得到料液比 (X_1)、微波时间 (X_2)、碱性蛋白酶酶解时间 (X_3)、碱性蛋白酶酶解 pH (X_4) 交互作用的响应面及等高线图。各个因素交互作用对响应值的影响可通过 3D 曲面的陡峭程度及等高线直观地反映出来, 其形状可反映出交互效应的强弱, 陡峭与椭圆形表示两因素交互作用显著, 平滑及圆形则与之相反。见图 8。

响应面法在试验条件优化过程中可以连续地对试验因素的各个水平进行分析, 克服了正交试验只能对一个孤立的试验点进行分析及不能给出直观图形的缺陷。本实验采用 750 W 微波功率与碱性蛋白酶的组合能有效提高酶的活性作^[20], 碱性蛋白酶活性增强, 主要在于酰基-酶中间体的催化三联体在微波条件下不被破坏, 反而因微波产生热效应的作用使蛋白质内腔压缩导致酶作用部位堆积, 更有效地增强酶催化作用^[21]。蛋白质多肽链水解为多肽链, 蛋白的结构发生变化, 酶解过程可获得许多功能肽。某些具有高抗氧化性的多肽或其他功能性肽将原料中释放出来的黄曲霉毒素反应降解成无毒结构分子, 具体原因还有待进一步研究^[22,23]。酶活能力直接影响酶解效果, 而影响酶活的主要因素有加酶量、酶解 pH 值、酶解温度、

酶解时间, 本文通过上述因素进行响应面优化法确定其最佳工艺条件。采用微波辅助酶法制备米糠多肽工艺能有效地降低黄曲霉毒素 B₁, 经过处理的米糠多肽平均黄曲霉毒素 B₁ 的 1.85 $\mu\text{g/kg}$, 符合国家标准的要求 ($\leq 10 \mu\text{g/kg}$)。

2.2.4 验证试验

利用模型, 求出响应面优化条件最优为料液比 1:9.96、微波时间 9.56、酶解时间 1.57、酶解 pH=10.74 时米糠多肽制备过程中可以获得 AFB₁ 最大降解率, 理论上可达 98.15%。以初始浓度 100 $\mu\text{g/kg}$ 计, 则 AFB₁ 残留浓度 1.78 $\mu\text{g/kg}$ $< 10 \mu\text{g/kg}$, 符合国家标准。为了验证回归模型的有效性, 根据推断的最佳降解条件参数进行实际操作验证试验, 米糠中 AFB₁ 的降解率为 97.68%, 残留浓度为 1.85 $\mu\text{g/kg}$, 符合国家标准 ($\leq 10 \mu\text{g/kg}$)。与理论预测值相对误差为 0.48%, 说明回归方程与实际情况拟合较好^[19]。

3 结论

3.1 通过单因素试验研究了微波时间、微波功率、料液比、酶解 pH、酶解时间、酶解温度和加酶量对米糠多肽的制备及 AFB₁ 降解率的影响。应用 Design Expert 软件和 Box-Behnken 中心组合试验方法建立数学模型, 选取料液比、微波时间、碱性蛋白酶酶解时间、酶解 pH 为考察因素、以 AFB₁ 降解率为考察指标。研究制备米糠多肽过程中降解 AFB₁ 的最佳条件。

3.2 结果表明, 在料液比 1:9.96、微波功率 750 W、微波时间 9.56 min、碱性蛋白酶酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 pH=10.74、酶解时间 1.57 h、加酶量 0.4% 的条件下。米糠中 AFB₁ 的降解率为 98.68%, 残留浓度为 1.85 $\mu\text{g/kg}$, 符合国家标准 ($\leq 10 \mu\text{g/kg}$)。

参考文献

- [1] Revilla E, Maria C S, Miramontes E, et al. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran [J]. Food Research International, 2009, 42(3): 387-393
- [2] 林耀盛, 陈智毅, 张友胜, 等. 微波辅助酶法制备米糠蛋白工艺对黄曲霉毒素 B₁ 脱除及酶解效果的影响[J]. 热带作物学报, 2017, 38(4): 763-768
LIN Yao-sheng, CHEN Zhi-yi, ZHANG You-sheng, et al. Effect of microwave-assisted enzyme treatment on aflatoxin b₁ degradation and enzymatic hydrolysis during the preparation of rice bran protein [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(4): 763-768
- [3] 俞明伟, 张名位, 孙远明, 等. 双酶直接酶解米糠制备短肽的工艺优化[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1744-1750
YU Ming-wei, ZHANG Ming-wei, SUN Yuan-ming, et al. Study on optimal hydrolysis process for preparing rice bran short peptides with two enzymes [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(5): 1744-1750
- [4] Yuliana M, Truong C T, Huynh L H, et al. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: influence of pH and NaCl on solubility and functional properties [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 55(2): 621-626
- [5] Shih F F, Daigle K. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour [J]. Cereal Chemistry, 1997, 74(4): 437-441
- [6] Zhou Z, Robards K, Helliwell S, et al. Ageing of stored rice: Changes in chemical and physical attributes [J]. Journal of Cereal Science, 2002, 35(1): 65-78
- [7] 唐小俊, 魏振承, 张友胜, 等. 南方稻谷贮藏期间霉菌生长趋势研究[J]. 广东农业科学, 2013, 1: 89-91
TANG Xiao-jun, WEI Zhen-cheng, ZHANG You-sheng, et al. Growth trends of mould in paddy under storage conditions of Southern China climate [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 1: 89-91
- [8] Teixeira E M K, Frehse M S, Freire R L, et al. Safety of low and high cost dry feed intended for dogs in Brazil concerning fumonisins, zearalenone and aflatoxins [J]. World Mycotoxin Journal, 2017, 10(3): 273-283
- [9] GB 2761-2017, 食品中真菌毒素限量[S]
GB 2761-2017, Mycotoxin limit in food [S]
- [10] María C S, Revilla E, Morgado B R, et al. Effect of rice parboiling on the functional properties of an enzymatic extract from rice bran [J]. Journal of Cereal Science, 2016, 72(11) 54-59
- [11] Santa-Maria C, Revilla E, Miramontes E, et al. Protection against free radicals (UVB irradiation) of a water-soluble enzymatic extract from rice bran: study using human keratinocyte monolayer and reconstructed human epidermis [J]. Bioactive Dietary Factors and Plant Extracts in Dermatology, 2013: 215-225
- [12] ZHU S M, LIN S L, Ramaswamy H S, et al. Enhancement of functional properties of rice bran proteins by high pressure treatment and their correlation with surface hydrophobicity [J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10 (2): 317-327
- [13] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates [J]. Meat Science, 2005, 69: 653-661

- [14] 曹铭,樊明涛.黄曲霉素脱除技术研究进展[J].食品与机械,2015,31(1):260-264
CAO Ming, FAN Ming-tao. Progress on aflatoxin removing technique [J]. Food and Machinery, 2015, 31(1): 260-264
- [15] Perez Flores G C, Moreno Martinez E, Mendez Albores A. Effect of microwave heating during alkaline-cooking of aflatoxin contaminated maize [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(2): T48-T52
- [16] Tripathi S, Mishra H. N. Studies on the efficacy of physical chemical and biological aflatoxin B₁ detoxification approaches in red chilli powder [J]. International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health, 2009, 2(1): 69-77
- [17] Smita Tripathi, Mishra H N. Modeling and optimization of enzymatic degradation of aflatoxin B₁(AFB₁) in red chili powder using response surface methodology [J]. Food Bioprocess Technology, 2011, 5(4): 770-780
- [18] 王勇,王韧,王莉,等.碱法制备米蛋白过程中微波辅助降解黄曲霉素 B₁ 的研究[J].食品工业科技,2013,34(19):174-176,182
WANG Yong, WANG Ren, WANG Li, et al. Study on degradation of aflatoxin B₁ during the preparation of rice protein by microwave-assisted alkali treatment [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(19): 174-176, 182
- [19] 陈金海,徐怀德,李艳伏,等.碱性蛋白酶酶解核桃粕蛋白产物抗氧化特性研究[J].西北农业学报,2010,19(11):88-92
CHEN Jin-hai, XU Huai-de, LI Yan-fu, et al. Study on antioxidative activities of alcalase hydrolysate of walnut proteins [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2010, 19(11): 88-92
- [20] ZHANG H J, ZHANG H, WANG L, et al. Properties and functional proteins of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran [J]. Food Research International, 2012, 47(2): 359-363
- [21] Perez Flores G C, Moreno Martinez E, Mendez Albores A. Effect of microwave heating during alkaline-cooking of aflatoxin contaminated maize [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(2): 48-52
- [22] Aimez J, Fente C A, Vazquez B I, et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 882: 1-10
- [23] Uraipong C, ZHAO J. Identification and functional characterisation of bioactive peptides in rice bran albumin hydrolysates [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2016, 51(10): 2201-2208

(上接第 290 页)

- [13] 邹素敏,杜瑞英,文典,等.不同品种蔬菜重金属污染评价和富集特征研究[J].生态环境学报,2017,26(4):714-720
ZOU Su-min, DU Rui-ying, WEN Dian, et al. Enrichment characteristics analysis and assessment on heavy metal contamination of different vegetables [J]. Ecology and Environment Sciences, 2017, 26(4): 714-720
- [14] 徐连伟,刘庆武,吴昊,等.哈尔滨市农产品重金属污染风险评价[J].河南农业,2017,16(35):60-61
XU Lian-wei, LIU Qing-wu, WU Hao, et al. Risk assessment of heavy metal pollution in agricultural products of Harbin [J]. Agriculture, Henan, 2017, 16(35): 60-61
- [15] 李佳桐,李雪,俞花美,等.琼北土壤重金属高背景值区人群健康风险评价[J].热带作物学报,2018,11(1):78-80
LI Jia-tong, LI Xue, YU Hua-mei, et al. Health risk assessment of heavy metal in soils in the north of Hainan province with high background value [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 11(1): 78-80
- [16] Wang Y, Ding X Y, Yang H, et al. A study on heavy metals pollution in soil and fruits of *Rosa roxburghii* Tratt from the planting bases located in the karst areas of Guizhou province [J]. Advanced Materials Research, 2014
- [17] 沈文静,梅洁.泰州典型果园土壤重金属污染状况的调查研究[J].当代化工研究,2017,23(9):45-47
SHEN Wen-jing, MEI Jie. Investigation on heavy metal pollution in soil of typical orchard in Taizhou [J]. Contemporary Chemical Research, 2017, 23(9): 45-47
- [18] 王宏伟,李程程,华近.2015 年大连市部分市售水果重金属含量检测与分析[J].微量元素与健康研究,2017,34(1):42-43
WANG Hong-wei, LI Cheng-cheng, HUA Jin. Detection and analysis of heavy metals in some fruits sold in Dalian city in 2015 [J]. Studies of Trace Elements and Health, 2017, 34(1): 42-43