

纳豆发酵和体外模拟消化中活性物质含量及抗氧化活性的变化研究

徐春明, 陈莹莹, 庞高阳

(北京工商大学食品学院, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048)

摘要: 本文研究了利用纳豆芽孢杆菌发酵纳豆过程中活性物质-总酚和异黄酮含量的变化, 通过体外模拟消化实验, 测定消化过程中总酚、异黄酮含量及抗氧化活性的变化规律。研究发现, 由于发酵细菌及高温的作用, 从干燥大豆到后熟 24 h 大豆, 总酚含量提高了 60.56%, 异黄酮含量降低了 63.30%。不同发酵阶段纳豆经过体外模拟消化处理, 总酚的释放率为 70.64%, 异黄酮的残余率为 21.79%。抗氧化活性测定采用了 DPPH、ABTS 和 ORAC 测定法。不同发酵阶段的纳豆经过体外模拟消化后, 其 DPPH 自由基清除能力下降, ABTS 和 ORAC 值有所提高; 模拟胃消化阶段, 后熟 24 h 大豆清除 ABST 自由基能力和 ORAC 值分别是干燥大豆的 1.80 和 2.22 倍; 模拟肠消化阶段, 后熟 24 h 大豆清除 ABST 自由基能力和 ORAC 值分别是干燥大豆的 1.70 和 1.41 倍。总体上来讲, 经过发酵的纳豆抗氧化活性得到加强; 在模拟消化过程中, 胃消化阶段的纳豆具有更高的抗氧化活性。

关键词: 纳豆; 总酚; 异黄酮; 模拟消化; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)11-78-84

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.012

Changes in the Bioactive Content and Antioxidant Activity of Natto during Fermentation and *In Vitro* Digestion

XU Chun-ming, CHEN Ying-ying, PANG Gao-yang

(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Engineering and Technology, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing 100048, China)

Abstract: Changes in the contents of active substances (including total phenols and isoflavones) during the fermentation of natto with *Bacillus subtilis natto* were studied. Levels of total phenols and isoflavones during the digestive process were measured in an *in vitro* digestion experiment, and the pattern of changes in antioxidant activity was studied. The results showed that after bacterial fermentation at high temperature, total phenolic content and isoflavone content in the after-ripening soybeans (24 h) were increased by 65.12% and decreased by 63.28%, respectively, compared with those of dry soybeans. The *in vitro* digestion experiments were conducted on the natto samples at different fermentation stages, and the release rate of total phenolics was 70.64% while the residual rate of isoflavones was 21.79%. Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot), and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) scavenging abilities and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) were used to determine antioxidant activity. After *in vitro* digestion, the scavenging ability of DPPH radicals was decreased in natto at different fermentation stages, and both ABTS scavenging ability and ORAC values were elevated. During the gastric digestion simulation stage, the scavenging ability of ABST radicals and the ORAC value in the after-ripening soybeans (24 h) were 1.80 and 2.22 times those of dry beans. During the intestinal digestion simulation stage, the scavenging ability of ABST radicals and the ORAC value of the after-ripening soybeans were 1.70 and 1.41 times those of dry beans. In summary, the antioxidant activity of the natto was increased after fermentation, and the natto from the gastric digestion stage showed higher antioxidant activity during the *in vitro* digestion process.

Key words: natto, total phenolics, isoflavone, *in vitro* digestion, antioxidant activity

大豆是一种高营养的食物, 它富含多种活性物

收稿日期: 2015-12-22

基金项目: 学科创新平台项目 (CXPT-2015-002-031)

作者简介: 徐春明 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物化工

质, 如大豆磷脂、大豆皂苷、大豆异黄酮和大豆多酚等。这些活性物质赋予大豆多种食疗保健功能, 如抗癌、抗氧化、增强机体免疫与防止血管硬化等^[1,2]。纳豆是一种以大豆为主要原料的发酵食品, 其制备过程

简单,取适量大豆,浸泡或者蒸煮后接种适量的纳豆芽孢杆菌,搅拌均匀;随后覆以纱布或者塑料薄膜,在37~42℃的无菌恒温环境中,发酵15~24 h;最后转移至4℃恒温环境中,后熟24 h即可食用^[3]。在大豆的发酵过程中,不仅其原有的活性成分如异黄酮和多酚等被保留,而且也生成了一些新的活性物质,如纳豆激酶、抗氧化肽和抗菌肽等^[1-4]。

体外模拟消化是一种简单与有效的模拟消化过程,主要有模拟胃消化阶段和模拟肠消化阶段。模拟消化过程中,在待测样品中依次加入唾液、胃蛋白酶与胰酶等模拟消化液,对待测样品进行模拟消化处理,从而在体外环境下模拟体内消化过程,使对食品在消化过程中的结构变化、消化率和活性物质释放的研究变得简单、快捷与高效^[5]。在生物体内,活性氧和抗氧化防御系统总是处在一个动态平衡的过程中,一旦这个平衡被破坏,那些具有高反应活性的活性氧基团将与细胞膜的结构发生反应,从而导致正常细胞的裂解死亡,抗氧化物质能保护生物机体免遭活性氧基团的破坏^[6]。

在纳豆芽孢杆菌发酵纳豆过程中,纳豆含有的活性物质发生了显著变化,本文通过研究不同发酵阶段的纳豆总酚和异黄酮含量的变化规律,以及在体外模拟消化过程中总酚、异黄酮含量与抗氧化活性的变化趋势,为大豆发酵纳豆的加工和消费提供了依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验所用纳豆芽孢杆菌分离自市售纳豆中,并经实验室分离复壮。菌株保存采用营养琼脂培养基,培养基成分如下:琼脂15 g/L,蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L、pH 7.0。菌株保存在4℃,并按时继代保存。培养基所用物质全部购自北京汇海科仪有限公司。

1.2 实验材料与设备

实验所用大豆为东北当年产优质大豆;二苯基苦基苯肼(DPPH),2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS),生育酚(Trolox),荧光素钠(FL),偶氮二异丁基脒盐酸盐(AAPH)购自北京拜尔迪科技有限公司;福林酚试剂, α -淀粉酶,胃蛋白酶,胰酶,牛胆盐购自西格玛公司。其他所有试剂均为分析纯试剂。

冷冻干燥机,美国 Labconco 公司;PHS-3D pH 计,上海三信仪表厂;粉碎机,北京中兴伟业仪器有

限公司;Spectra Max 190 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;DSHZ-300A 型水浴恒温振荡器,苏州培英实验设备有限公司;离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 纳豆制备

纳豆的发酵过程参考文献中的发酵方法^[7]:取出4℃保存的菌株,采用营养琼脂培养基在37℃活化菌种,然后接种种子培养基(蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L),37℃、180 r/min 震荡培养15 h,所得种子液用于接种大豆;取优质大豆,水浸泡至含水量约为65%,高温高压蒸煮至大豆松软,无菌降温至50℃,按照3%的接种量接种;接种完毕后,覆以纱布,于37.5℃发酵24 h,然后转移至4℃,后熟24 h。

在大豆蒸煮和发酵过程中,在下述时间点取样:干燥的大豆,蒸煮后的大豆,发酵12 h/18 h/24 h 的大豆,后熟12 h/24 h 的大豆。所有样品采用冷冻干燥干燥,粉碎机粉碎后,过60目筛网,4℃保存备用。

1.3.2 体外消化模拟^[8]

模拟唾液、胃液、肠液的制备如下:(1)模拟唾液,溶解2.38 g 磷酸氢二钠,0.19 g 磷酸二氢钾,8 g 氯化钠于1L去离子水,调节pH至6.75,然后加入 α -淀粉酶至终浓度为200 U/mL;(2)模拟胃液:制备0.03 mol/L, pH 为1.2的氯化钠溶液,加入胃蛋白酶至终浓度为300 U/mL;(3)模拟肠液:制备0.1 mol/L的碳酸氢钠溶液,取35 mL、0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液加入胰酶和牛胆盐,使胰酶终浓度为200 U/mL,牛胆盐终浓度为10 mg/mL。

体外模拟消化分为唾液消化、胃肠消化两个阶段。首先,取0.9 g 纳豆样品粉末,加入3 mL 模拟唾液和3 mL 去离子水,混合均匀,在37℃水浴恒温振荡器里消化10 min;然后采用5 mol/L 盐酸调节pH至1.2,加入9 mL 模拟胃液,混合均匀,在37℃水浴恒温振荡器里消化1 h;最后采用0.1 mol/L 碳酸氢钠调节pH至6,加入9 mL 模拟肠液,以1 mol/L 氢氧化钠调节pH至7,加入3 mL 生理盐水,混合均匀,在37℃水浴恒温振荡器里消化2 h,迅速从摇床中取出并放置在冷水槽内充分冷却,存放于-20℃冰箱内,备用。

1.3.3 总酚含量测定

纳豆中总酚的提取采用如下方法。取不同制备阶段纳豆样品0.3 g,溶解于9 mL、60%乙醇,振荡2 h,避光萃取过夜,然后5000 r/min 离心20 min,取上清。

萃取三次, 合并萃取液, 保存于 4 °C, 并在 2 d 内测定。

总酚含量采用福林酚法, 在试管中加入 0.15 mL 去离子水和 0.20 mL 待测样品, 加入 0.25 mL 福林酚和 0.75 mL、7% Na₂CO₃ 溶液, 用去离子水把反应体系定容至 5 mL, 室温静置 2 h 后, 使用酶标仪在 765 nm 下测定吸光度。以 0~20 μg/mL 的没食子酸标准溶液建立标准曲线, 所有测定进行三次重复, 取平均值。

测定模拟消化液中总酚含量前, 加入无水乙醇至终浓度 60% 以排除蛋白干扰, 采用福林酚法测定总酚含量, 计算得到初始模拟消化液中的总酚含量。

1.3.4 异黄酮含量测定

异黄酮的提取采用方法参考文献^[9]的方法, 并作修改。取 0.3 g 纳豆样品, 溶解于 9 mL、80% 乙醇, 70 °C 振荡 2 h 后, 避光萃取过夜, 然后 5000 r/min 离心 20 min, 取上清。萃取三次, 合并萃取液, 保存于 4 °C, 并在 2 d 内测定。

纳豆异黄酮含量的测定采用三波长紫外测定法, 取 0.2 mL 待测样品, 依次测定 240、260 和 280 nm 的吸光值, 计算 $\Delta A = A_{260} - (A_{240} + A_{280})/2$ 以染料木黄酮为标准品, 建立 0~10 μg/mL 的标准曲线, 所有测定进行三次重复, 取平均值。

测定模拟消化液中异黄酮含量前, 加入无水乙醇至终浓度 80%, 排除蛋白干扰, 测定异黄酮含量, 通过计算得到初始模拟消化液中的总酚含量。

1.3.5 抗氧化测定

1.3.5.1 DPPH 测定法

DPPH 自由基清除活性测定参考文献^[10]的方法, 并作修改。实验设样品组、空白组和对照组。取 0.05 mL 待测样品, 加入 0.15 mL、0.2 mmol/L DPPH 的乙醇溶液, 混合均匀, 室温避光反应 30 min, 立即在 517 nm 波长处测定吸光值。无水乙醇代替 DPPH 溶液作为空白组, 60% 乙醇代替待测样品作为对照组。所有测定做 3 个重复, 求平均值。DPPH 自由基清除能力按照下式计算:

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

式中, A_x 为样品吸光值; A_1 为空白组吸光值; A_2 为对照组吸光值。

1.3.5.2 ABTS 测定法

ABTS 自由基清除活性测定参考 Gawlik 等人的方法, 并作修改^[8]。等体积混合 7 mmol/L ABTS 和 2.45 mmol/L 过硫酸钾, 在室温避光条件下放置 12~16 h, 将生成的 ABTS⁺ 溶液用 0.2 mol/L pH 7.4 的 PBS 稀释至在 734 nm 波长处吸光值为 0.7 ± 0.05 , 即为 ABTS⁺

工作液。取 50 μL 样品, 加入 0.15 mL ABTS⁺ 工作液, 室温避光静置 6 min 后测定 734 nm 处的吸光值。每份样品重复操作 3 次。

以 0~80 μmol/L 的 Trolox 作为标准品, 按照上述程序测定吸光度, 建立标准曲线。样品的 ABTS 自由基清除能力以 Trolox 的当量浓度表示。所有测定进行三次, 取平均值。

1.3.5.3 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定法

ORAC 测定法参照文献^[10]的方法。在 96 孔板中, 首先加入 20 μL 待测样品和 120 μL/70 nmol/L 荧光素钠; 37 °C 避光温育 15 min, 再加入 80 μL、200 mmol/L AAPH, 振荡 30 s, 然后每两分钟测定吸光度, 持续测定 150 min, 激发和发射波长分别为 485 nm 和 520 nm。以 PBS 缓冲液代替待测样品作为空白对照, 以 0~20 μmol/L 的 Trolox 标准液建立标准曲线。

荧光衰变曲线下的面积 (AUC) 按照下式计算:

$$AUC = 1 + \sum_{i=0}^{i=90} \frac{f_i}{f_0}$$

式中, f_0 : 0 min 时的荧光度; f_i : i min 时的荧光度; 净 $AUC = AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白}}$ 。

1.4 数据处理

所有实验数据重复测定 3 次, 结果取平均值。采用 IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 数据处理软件对实验数据进行处理, 结果以 $X \pm SD$ 表示, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 发酵过程中活性物质的变化

2.1.1 总酚含量变化

不同发酵阶段纳豆中含有的总酚含量的变化如下图所示。

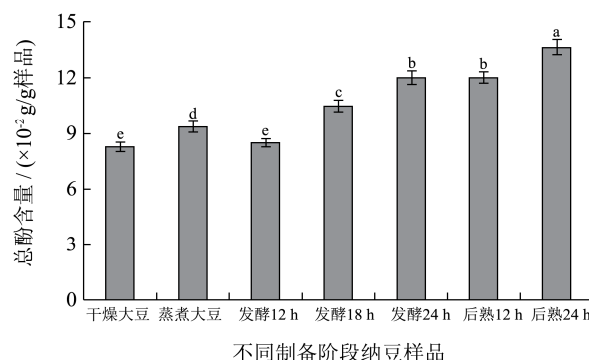


图1 纳豆发酵对总酚含量的影响

Fig.1 Effect of natto fermentation on total phenolic content

注: 图中数值中标注不同字母表示对应组别间差异显著

($p < 0.05$); 反之, 标注相同字母表示对应组别间差异不显著 ($p \geq 0.05$)。

从图 1 可观察大豆总酚含量在纳豆制备过程中的变化。其中干燥大豆、蒸煮大豆、发酵 12/18/24 h 和后熟 12/24 h 的总酚含量分别为 8.26×10^{-2} 、 9.38×10^{-2} 、 8.48×10^{-2} 、 10.51×10^{-2} 、 12.04×10^{-2} 、 11.99×10^{-2} 和 $13.64 \times 10^{-2} \text{ g/g}$ 样品。大豆经过蒸煮总酚含量有所提高, 在发酵初期出现一定程度的下降, 随后呈现上升趋势, 在后熟阶段又有所提高。总的来看, 干燥大豆到后熟完成大豆的总酚含量由 $8.26 \times 10^{-2} \text{ g/g}$ 样品增长到 $13.64 \times 10^{-2} \text{ g/g}$ 样品, 纳豆制备过程中总酚含量显著提高 ($p < 0.05$)。

对于整个发酵过程总酚含量的提高可以归因于那些与糖和苷处于共轭结合状态的酚类在发酵细菌产生的 β 葡萄糖苷酶和酯酶的作用下, 由结合态释放为游离态, 从而使总酚含量提高^[11]。对于本研究中蒸煮大豆的总酚含量提高 13.62%, 认为是高温处理破坏了大豆的细胞壁, 加速了游离酚类的释放, 从而导致蒸煮使大豆中的总酚含量提高^[12]。

2.1.2 异黄酮含量的变化

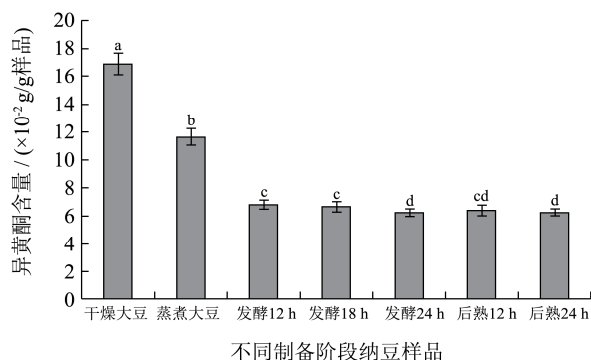


图 2 纳豆发酵对异黄酮含量的影响

Fig.2 Effect of natto fermentation on isoflavone content

注: 图中数值中标注不同字母表示对应组别间差异显著 ($p < 0.05$); 反之, 标注相同字母表示对应组别间差异不显著

表 1 模拟消化过程对总酚含量的影响 ($\times 10^{-2} \text{ g/g}$ 样品)

Table 1 Effect of simulated digestion on total phenolic content ($\times 10^{-2} \text{ g/g}$ sample)

处理方式	干燥大豆	蒸煮大豆	发酵 12 h	发酵 18 h	发酵 24 h	后熟 12 h	后熟 24 h
未处理	8.26 ± 0.46^d	9.38 ± 0.38^c	8.48 ± 0.29^d	10.51 ± 0.51^c	12.04 ± 0.43^b	11.99 ± 0.48^b	13.64 ± 0.64^a
胃消化	3.60 ± 0.18^d	3.38 ± 0.13^d	3.62 ± 0.15^d	4.16 ± 0.18^c	4.43 ± 0.16^b	4.43 ± 0.23^b	4.93 ± 0.21^a
肠消化	5.85 ± 0.34^{cd}	6.32 ± 0.30^c	6.05 ± 0.26^c	7.88 ± 0.28^b	8.23 ± 0.32^b	8.33 ± 0.38^b	9.11 ± 0.33^a

注: 表中的数值表示平均值 \pm 标注差 ($n=3$), 表中同一行标注不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

对于模拟消化过程中总酚释放率的提高, 认为是模拟消化液中的消化酶 (淀粉酶、胃蛋白酶与胰酶) 逐步破坏了食物基质的细胞壁, 促进了游离酚类的逐步释放^[14]。至于肠消化阶段的总酚含量仍然低于未处理的总酚含量, 有可能是由于部分酚类对消化酶或者

($p \geq 0.05$)。

纳豆制备过程对异黄酮的含量造成了显著的影响 ($p < 0.05$)。其中干燥大豆、蒸煮大豆、发酵 12/18/24 h、后熟 12/24 h 的异黄酮含量如图 2 所示。

如上图所示, 干燥大豆、蒸煮大豆、发酵 12/18/24 h 与后熟 12/24 h 的异黄酮含量分别为 16.81×10^{-2} 、 11.65×10^{-2} 、 6.78×10^{-2} 、 6.63×10^{-2} 、 6.17×10^{-2} 与 $6.17 \times 10^{-2} \text{ g/g}$ 样品。在整个发酵过程中, 异黄酮含量损失了 63.30%, 其中蒸煮过程损失了 30.70%, 早期发酵过程损失了 59.67%。在蒸煮过程中由于高温处理对异黄酮造成了破坏导致异黄酮含量降低。Chalida 在对大豆的研究中证实了处理温度越高 (130~70 $^{\circ}\text{C}$), 异黄酮破坏效果越显著^[13]。在早期发酵过程中, 异黄酮含量的下降可能是由于发酵细菌的生理活动引起的。

2.2 模拟消化过程中活性物质含量的变化

消化系统是生物体的营养摄入系统, 食物与消化液之间的相互作用极其复杂。从一方面来说, 消化液会破坏细胞结构, 促进食物中活性物质的释放; 从另一方面来讲, 消化液同时也会对活性物质本身造成一定程度的破坏。

2.2.1 总酚含量的变化

本实验对模拟胃肠道消化过程中不同发酵阶段的纳豆中总酚含量的变化进行了研究, 结果如表 1 所示。在胃消化和肠消化阶段总酚的释放率分别为 67.71%、71.19%, 样品经过体外模拟消化后熟 24 h 纳豆比干燥大豆的总酚含量显著提高 ($p < 0.05$)。与未处理的样品比较, 样品经过胃模拟消化、肠模拟消化后, 其总酚含量都有所降低。再进一步对比模拟消化阶段的总酚含量变化, 发现在整个模拟消化过程中, 总酚的释放率得到提高。

肠胃环境敏感, 从而酚类自身受到破坏^[15]。

2.2.2 异黄酮含量的变化

由于研究胃肠道消化吸收对食物的影响存在很多困难, 因此通过体外模拟胃肠道消化成为研究食品在胃肠消化吸收常用的手段之一。模拟胃肠消化过程

对纳豆中异黄酮含量的影响如下表所示。

表 2 模拟消化过程对异黄酮含量的影响($\times 10^{-2}$ g/g 样品)

Table 2 Effect of simulated digestion on isoflavone content ($\times 10^{-2}$ g/g sample)

处理方式	干燥大豆	蒸煮大豆	发酵 12 h	发酵 18 h	发酵 24 h	后熟 12 h	后熟 24 h
未处理	16.81±0.93 ^a	11.65±0.55 ^b	6.78±0.42 ^c	6.63±0.37 ^c	6.17±0.32 ^d	6.46±0.31 ^c	6.17±0.34 ^d
胃消化	9.35±0.32 ^a	8.44±0.28 ^b	6.28±0.23 ^c	4.84±0.15 ^d	4.46±0.19 ^d	4.46±0.23 ^d	4.86±0.16 ^d
肠消化	5.69±0.33 ^a	4.05±0.16 ^b	3.37±0.15 ^c	1.04±0.03 ^d	0.47±0.02 ^e	0.47±0.02 ^e	0.47±0.03 ^e

从表 2 可以明显看出,随着模拟消化过程的进行,异黄酮含量呈显著的下降趋势($p<0.05$),以干燥大豆为例,异黄酮含量由未处理的 16.81×10^{-2} g/g 样品下降到肠消化阶段的 5.69×10^{-2} g/g 样品。同时还可以发现,干燥大豆中的异黄酮损失小于后熟 24 h 纳豆中异黄酮的损失,其损失比例分别为 66.15%和 92.38%。模拟肠消化液中异黄酮含量低于未处理和模拟胃消化液中样品异黄酮的含量。有研究发现,胃消化阶段的酸性环境导致异黄酮含量降低^[16]。在研究体外模拟消化处理对豆浆异黄酮含量的影响时,发现肠消化液中总黄酮含量显著低于胃消化液或肠消化液^[17]。

2.3 模拟消化液的抗氧化活性

具有抗氧化活性的食物对生物体的健康有较大

表 3 DPPH 测定法不同发酵阶段和不同模拟消化阶段的抗氧化活性 (%)

Table 3 Effect of simulated digestion and fermentation on the DPPH radical-scavenging activity of natto (%)

处理方式	干燥大豆	蒸煮大豆	发酵 12 h	发酵 18 h	发酵 24 h	后熟 12 h	后熟 24 h
胃消化	47.12±3.14 ^a	44.69±1.65 ^b	43.96±1.91 ^b	36.62±1.47 ^c	37.77±2.26 ^c	36.58±1.48 ^c	35.03±1.64 ^c
肠消化	37.89±1.31 ^a	35.39±1.61 ^b	33.46±2.10 ^c	34.67±1.78 ^b	35.54±2.31 ^b	34.99±1.16 ^b	33.49±1.12 ^c

从上表可知:不同发酵阶段的纳豆,分别经过胃模拟消化、肠模拟消化过程,DPPH 自由基清除能力显著降低($p<0.05$),平均降低了 16%;干大豆在模拟胃消化、肠消化阶段中 DPPH 自由基清除率分别为 47.12%和 37.89%,后熟 24 h 大豆在模拟胃消化和肠消化阶段中 DPPH 自由基清除率分别为 35.03%和 33.49%。而且,不同发酵阶段的纳豆在模拟消化过程中,样品在模拟胃消化阶段清除 DPPH 自由基的能力高于肠消化阶段清除 DPPH 自由基的能力。

2.3.2 清除 ABTS 自由基能力

表 4 不同发酵阶段和不同模拟消化阶段的抗氧化活性测定 ABTS 测定法 (TE, μ M)

Table 4 Effect of simulated digestion and fermentation on the ABTS radical-scavenging activity of natto (TE, μ M)

处理方式	干燥大豆	蒸煮大豆	发酵 12 h	发酵 18 h	发酵 24 h	后熟 12 h	后熟 24 h
胃消化	15.39±0.61 ^e	17.67±0.91 ^d	21.40±0.79 ^c	22.73±1.35 ^c	25.00±0.89 ^b	27.33±1.39 ^a	28.67±1.01 ^a
肠消化	14.91±0.85 ^d	15.67±0.58 ^c	14.67±0.51 ^d	14.00±0.59 ^d	16.21±0.66 ^c	22.48±1.09 ^b	25.33±1.17 ^a

通过对比发酵过程和模拟消化过程中总酚含量的变化发现以下现象。在发酵过程中,总酚含量呈现显著($p<0.05$)的增加趋势,ABTS 自由基清除活性呈现良好的正相关趋势。样品中存在其他抗氧化成分,

的保护作用,此观点已经在先前的研究中成为众多科学家的共识。本文采用 DPPH、ABTS 和 ORAC 测定法评价不同发酵阶段纳豆对自由基清除能力,综合评价体外模拟消化过程中不同发酵阶段纳豆抗氧化活性的变化。

2.3.1 DPPH 自由基清除能力

在有机溶剂中 DPPH 是一种稳定的自由基,DPPH 自由基乙醇溶液在 517 nm 处具有最大光吸收,当有抗氧化剂存在时,DPPH 的单电子被捕捉使光吸收消失或者减弱,从而得到抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除效果,此方法已广泛的应用于天然抗氧化剂抗氧化能力的测定^[16]。纳豆发酵不同阶段 DPPH 自由基清除能力的变化规律如表 3 所示。

当抗氧化剂存在时,ABTS 被氧化成蓝绿色的阳离子自由基 $ABTS^+$,在抗氧化物存在时 $ABTS^+$ 会减少。下表 4 中显示,后熟 24 h 纳豆的 ABTS 自由基清除能力显著高于干燥大豆($p<0.05$),在模拟胃、肠消化阶段中,后熟 24 h 大豆的清除 ABTS 自由基能力分别是干燥大豆的 1.86 和 1.70 倍。整体而言,不同发酵阶段和不同模拟消化阶段的纳豆,ABTS 自由基清除能力平均增加了 78%;在模拟消化过程中,胃消化阶段清除 ABTS 自由基的能力总体上高于肠消化阶段清除 ABTS 自由基的能力。

例如抗氧化肽,PH 与温度等因素会影响抗氧化肽的抗氧化活性,由于 DPPH 和 ABST 两种方法对样品处理方式不同,这可能导致两种方法抗氧化活性变化趋势不同。

2.3.3 氧自由基吸收能力 (ORAC) 测定法

ORAC 是以抗氧化物对自由基的清除能力为基

础的方法, 且涉及氢原子的转移。不同发酵阶段纳豆 ORAC 值的变化如下表所示。

表 5 ORAC 法测定不同发酵阶段和不同模拟消化阶段的抗氧化活性 (TE, μM)

Table 5 Effect of simulated digestion and fermentation on the ORAC value of natto (TE, μM)

处理方法	干燥大豆	蒸煮大豆	发酵 12 h	发酵 18 h	发酵 24 h	后熟 12 h	后熟 24 h
胃消化	27.00 \pm 1.42 ^d	28.24 \pm 1.05 ^d	34.82 \pm 1.39 ^c	15.59 \pm 0.73 ^e	71.82 \pm 2.62 ^a	57.65 \pm 2.11 ^b	59.94 \pm 1.96 ^b
肠消化	35.88 \pm 1.31 ^e	42.35 \pm 2.24 ^d	47.35 \pm 1.94 ^c	24.24 \pm 1.45 ^f	61.65 \pm 2.17 ^a	51.43 \pm 2.63 ^b	50.35 \pm 2.37 ^b

由表 5 可知, 总体上 ORAC 值得到提高, 得出大豆在发酵成为纳豆的过程中抗氧化活性得到显著增强 ($p<0.05$), 但是发酵过程中有较大波动, 并分别在发酵的 18 h/24 h 达到最小和最大值; 模拟胃与肠消化阶段中后熟 24 h 大豆的 ORAC 值约是干大豆的 2.22、1.40 倍; 在模拟消化过程中, 胃消化阶段的清除氧自由基能力总体上高于肠消化阶段清除氧自由基能力。

抗氧化剂主要通过脂质氧化降解的抑制、清除自由基、抑制促氧化剂和还原能力等方面起到抗氧化作用。自由基是人体组织中许多生化反应的中间代谢产物, 当机体内自由基和活性氧的清除和形成失去平衡, 就会引发衰老和癌变等疾病。本研究通过 DPPH 自由基清除能力和 ABST 自由基清除能力和 ORAC 方法来评价纳豆制备过程中不同阶段样品清除自由基的能力。结果发现, 不同发酵阶段的纳豆经过体外模拟消化的样品, ABTS 自由基清除能力和 ORAC 值随着发酵过程显著增强, 而 DPPH 自由基清除能力下降。除了多酚和异黄酮影响不同发酵阶段纳豆在体外模拟消化过程的抗氧化性外, 还可能由于其他抗氧化活性成份, 例如, 纳豆经体外模拟消化蛋白质会发生水解, 产生具有抗氧化活性的多肽, 这些抗氧化肽的存在也会引起纳豆抗氧化活性的变化。总而言之, 不同发酵阶段纳豆的体外模拟消化的样品都能清除 DPPH 自由基, 说明纳豆具有降低羟自由基、烷自由基或过氧自由基的有效浓度; 且样品可作用于自由基阳离子和清除机体内的氧自由基。

3 结论

本研究系统性的测定了纳豆中的总酚和异黄酮含量在发酵过程和模拟消化过程中的变化趋势, 为工业生产富含易于消化吸收组分的功能性纳豆提供理论依据。研究结果显示, 在发酵过程中, 总酚含量提高了 65.12%, 然而, 异黄酮含量降低了 63.28%。经过模拟消化过程, 总酚的释放率为 70.64%, 异黄酮的残余率为 21.79%。抗氧化活性测定采用了 DPPH 测定法、ABTS 测定法和 ORAC 法, 结果相对复杂。总体上来讲, 经过发酵过程, 纳豆 DPPH 自由基清除能力下降, ABTS 自由基清除能力及 ORAC 值提高; 在模

拟消化过程中, 胃消化阶段比肠消化阶段的纳豆具有更高的抗氧化活性。

参考文献

- [1] Miguez A C, Francisco J C, Barberato S H, et al. The functional effect of soybean extract and isolated isoflavone on myocardial infarction and ventricular dysfunction [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012, 23(12): 1740-1748
- [2] Kang J, Han I M, Yoo H, et al. Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP [J]. *Cancer Letters*, 2008, 261(1): 84-92
- [3] Kim B, Bo Y B, Mah J H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Natto products [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 2005-2011
- [4] Mejia E D, Lumen B O D. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases [J]. *Sexuality Reproduction & Menopause*, 2006, 4(2): 91-95
- [5] Oomen A G, Alfons H, Mans M, et al. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(15): 3326-3334
- [6] Sindhi V, Gupta V, Sharma K, et al. Potential applications of antioxidants-A review [J]. *Journal of Pharmacy Research*, 2013, 7: 828-835
- [7] Wu F C, Chou S Z, Shih I L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis natto* in batch and fed-batch culture in fermenter [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2013, 44(6): 846-853
- [8] Gawlik U. Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds [J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(4): 872-882
- [9] Chaiyasut C, Kumar T, Tipduangta P, et al. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(26): 4120-4126
- [10] Xu B J, Chang S K C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by

- extraction solvents [J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(2): S159-S166
- [11] Chien Y L, Chi T H, Chiang B H, et al. Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid fermentation medium [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1586-1592
- [12] Cho K M, Jin H L, Han D Y, et al. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during cheonggukjang soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90 [J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2011, 24(3): 402-410
- [13] Chalida N, Mali N, Juckamas L, et al. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(3): 899-906
- [14] Ju H K, Chung H W, Hong S S, et al. Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) [J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(2):619-625
- [15] Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128(1): 14-21
- [16] Sanz T, Luyten H. Release, partitioning and stability of isoflavones from enriched custards during mouth, stomach and intestine *in vitro* simulations [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(6): 892-900
- [17] 马玉荣.加热及模拟胃肠道消化处理对豆浆活性成分和抗氧化能力的影响[D].华南理工大学,2014
MA Yu-rong. Effect of heat treatment and *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioactive compounds contents and antioxidant activity of soymilk [D]. South China University of Technology, 2014
- [18] 刘偲琪,方佳茂,刘红梅,等.水解度对蚕蛹蛋白酶解物的物化特性和抗氧化能力的影响[J].食品科学技术学报,2014, 32(2):32-38
LIU Si-qi, FANG Jia-mao, LIU Hong-mei, et al. Study on functional properties and antioxidant activity of different degree of hydrolysates of silkworm pupa polypeptide [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(2): 32-38