

纳豆菌液态发酵谷物产纳豆激酶及发酵产物抗氧化活性研究

赵谋明¹, 邹颖¹, 林恋竹¹, 吴见²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 广州市赛健生物科技有限公司, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了纳豆菌液态发酵时间对纳豆菌生物量、蛋白酶酶活、纳豆激酶酶活的影响。在此基础上, 研究添加四种谷物(糙薏仁、玉米、荞麦和糙米)对纳豆菌液态发酵产蛋白酶酶活、纳豆激酶酶活、谷物总酚迁移率、总酚残留率以及发酵产物抗氧化活性的影响。结果表明: 添加糙米和荞麦可显著促进纳豆菌产蛋白酶(2444.19、1813.71 U/mL)、纳豆激酶(719.67、681.38 U/mL), 且以荞麦为底物所产发酵产物的谷物总酚迁移率最高(0.64 mg/g 干谷物)、抗氧化活性最强(30.37 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$); 采用浸泡蒸煮处理四种谷物、延长发酵时间可显著提高其发酵产物的蛋白酶酶活、纳豆激酶酶活、谷物总酚迁移率以及抗氧化活性。采用浸泡蒸煮处理荞麦, 利用纳豆菌液态发酵其 48 h, 可制备富含纳豆激酶、谷物多酚、肽类物质且具有强溶栓、抗氧化活性的功能性食品。

关键词: 纳豆激酶; 液态发酵; 谷物; 多酚; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2018)02-75-81

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.013

Study on the Nattokinase Produced by *Bacillus natto* Liquid Fermentation with Grains and Antioxidant Activity of Fermentation Products

ZHAO Mou-ming¹, ZOU Ying¹, LIN Lian-zhu¹, WU Jian²

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Guangzhou Saijian Bio-Technique Co. Ltd, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of *Bacillus natto* liquid fermentation time on biomass and enzyme activities of nattokinase and protease were studied. In addition, the effects of four grains (brown adlay, corn, buckwheat, brown rice) on enzyme activities of protease and nattokinase, migration ratios and residue ratios of grain total phenols, and antioxidant activities of fermentation products by *Bacillus natto* liquid fermentation were also evaluated. The results showed that buckwheat and brown rice could significantly promote the enzyme activities of protease (2444.19, 1813.71U/mL) and nattokinase (719.67, 681.38 U/mL). The fermentation products obtained by *Bacillus natto* liquid fermentation with buckwheat possessed the highest of migration ratio of total phenols (0.64 mg/g dry grain) and exhibited the strongest antioxidant activity (30.37 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$). The enzyme activities of protease and nattokinase, migration ratios and residue ratios of grain phenols and antioxidant activities of fermentation products could be significantly improved by soaking and cooking four grains and extending fermentation time. The functional food rich in nattokinase, grain phenolics, and peptides possessed strong thrombolytic and antioxidant activity could be obtained by *Bacillus natto* liquid fermentation for 48 h with buckwheat pretreated by soaking and cooking.

Key words: nattokinase; liquid fermentation; grain; phenols; antioxidant

血栓是由于血液中的纤维蛋白、血小板、红细胞、白细胞粘连而形成的一种疾病,可以形成于诸如大脑、心脏和静动脉血管等部位。血栓骨架由纤维蛋白所构成,目前治疗血栓的焦点在于分解纤维蛋白^[1,2]。纳豆菌是从纳豆中分离得到的对人体无病原性的安全菌

收稿日期: 2017-08-14

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030310494); 广州市科技计划项目(20160402172、201710010060)

作者简介: 赵谋明(1964-), 男, 教授, 主要从事食品生物技术研究

通讯作者: 林恋竹(1985-), 女, 副研究员, 主要从事天然产物研究

株。纳豆激酶(nattokinase 简称 NK)是一种在纳豆发酵过程中由纳豆菌(*Bacillus natto*)或纳豆枯草杆菌(*B. subtilis natto*)产生的丝氨酸蛋白酶^[3-5]。纳豆激酶具有高效溶血栓作用, 是国内外科研热点之一^[6-9]。与传统的溶栓药物相比纳豆激酶具有以下优势: 体内半衰期长; 分子量相对较小, 更易被人体吸收; 溶栓途径多元化, 溶栓能力较强^[10]。纳豆激酶作为新型治疗心脑血管疾病的药物, 兼具多种优势, 开发前景相当广阔^[11]。

自由基在细胞内的积累会对细胞造成损伤进一步

导致生物体逐渐衰老^[12]。谷物作为人们摄食的主要来源不仅提供能量、蛋白质还有营养成分,近年来国内外研究报道,谷物中含有大量多酚类化合物,包括酚酸、黄酮类化合物和原花青素等,这些多酚类化合物具有很强的抗氧化活性^[13-15]。据报道,肽类物质也具有很强的抗氧化活性可清除自由基从而延缓衰老^[16]。

微生物发酵长期以来被认为是一种提高产品营养价值的方法,谷物发酵也受到研究者的广泛青睐, Juan 等^[17]研究发现,黑豆在经过枯草芽孢杆菌固态发酵后总酚和总黄酮的含量都有提高; Wei 等^[18]研究了解淀粉芽孢杆菌固态发酵鹰嘴豆产纤溶酶,及抗氧化活性有所提高。然而,关于利用纳豆菌液态发酵谷物制备富含纳豆激酶、谷物多酚且具有强抗氧化活性的发酵产物的报道较少。

本文研究目的是:添加四种谷物(糙薏仁、玉米、荞麦和糙米)、三种预处理方式(打粉、浸泡蒸煮和打粉蒸煮)以及不同发酵时间(36 h 和 48 h)对纳豆菌液态发酵产纳豆激酶、蛋白酶酶活、谷物总酚迁移率、总酚残留率以及发酵产物抗氧化活性的影响,为利用纳豆菌开发具有显著溶栓、抗氧化活性的功能性食品提供理论和方法的指导。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

纳豆菌(*Bacillus subtilis natto*)由中国农业大学食品科学与营养工程学院赠送;糙薏仁、玉米、荞麦、糙米购自南沙旧镇天汇百货;凝血酶、纤维蛋白原购自广州博弋康贸易有限公司; AAPH、荧光素、Trolox 纯度为 99%, 购于美国 Sigma 公司;大豆蛋白胨,广东环凯微生物科技有限公司;麦芽糖,上海伯奥生物科技有限公司;实验所用其他试剂均为分析纯。

AL204 型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 101-3A 型烘箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司; Varioskan Flash 型酶标仪,美国 Thermo 公司; UV-721 型紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司; LRH-250A-II 生化培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司; SKY-211B 恒温培养振荡器,江苏苏昆仪器有限公司。

1.2 培养基

种子培养基:胰蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0~7.2。

发酵基础培养基:大豆蛋白胨 2%, 麦芽糖 1%, CaCl₂ 0.2%, MgSO₄ 0.05%, Na₂HPO₄ 0.2%, NaH₂PO₄

0.1%, pH 7.0~7.2。

1.3 实验方法

1.3.1 纳豆菌液态发酵时间曲线测定

纳豆菌利用基础培养基发酵 60 h 得到发酵上清液,每隔 6 h 取样测定其生物量、蛋白酶活及纳豆激酶酶活。

1.3.2 发酵产物的制备

在优化后的基础培养基及发酵条件下(种龄 20 h, 接种量 2%(V/V), 发酵温度 37 °C, 发酵时间 24 h, 装液量 25 mL/250 mL), 分别以 10% 的添加量在基础培养基中加入经打粉(粒径 0.9 mm)、浸泡蒸煮(打粉后浸泡 6 h 在蒸煮 20 min)、打粉蒸煮(打粉后蒸煮 20 min) 预处理后的四种谷物(糙薏仁、玉米、荞麦、糙米)分别发酵 36 h、48 h, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液即为发酵产物, 沉淀即为发酵残渣。

1.3.3 发酵产物多酚提取物的制备

将发酵产物中按 1:2 (V/V) 加入乙酸乙酯, 萃取三次, 收集乙酸乙酯相, 合并, 45 °C 减压蒸干, 溶于 1 mL DMSO, 即得到发酵产物多酚提取物。

1.3.4 发酵残渣多酚提取物的制备

于发酵残渣中加入 25 mL 无水乙醇, 60 °C 超声(800 W)提取 1 h, 4000 r/min 离心 10 min, 得到上清液即发酵残渣多酚提取物。

1.3.5 蛋白酶酶活的测定

根据 GB/T 23527-2009 进行, 测定步骤如下:

酪氨酸标准曲线的绘制: 分别取 0~50 g/mL 的酪氨酸溶液 1.0 mL 于试管中, 各加入 5.0 mL 0.4 mol/L Na₂CO₃ 溶液及 1.0 mL 福林酚试剂, 混合均匀后在 40 °C 水浴锅中显色 20 min, 用分光光度计测定 680 nm 波长下的吸光值。以样品与空白在 680 nm 下测定光密度值之差为横坐标, 酪氨酸浓度为纵坐标绘制标准曲线。

样品的测定: 将稀释后的样品与酪蛋白底物溶液分别放入 40 °C 恒温水浴中预热 2 min。在样品管与空白管中各加入 1.0 mL 样品溶液, 样品管中加入 1.0 mL 酪蛋白溶液, 混匀, 40 °C 准确反应 10 min, 加入 2.0 mL 4% 三氯乙酸(TCA)终止反应, 保温 20 min; 空白管则先加入 TCA 使样品失活, 再加酪蛋白溶液, 其他步骤同上; 保温结束后, 过滤取 1.0 mL 上清液, 加入 5.0 mL 0.4 mol/L Na₂CO₃ 溶液中, 再加入 1.0 mL 福林酚试剂, 充分混合后在 40 °C 显色 20 min, 用紫外分光光度计测定 680 nm 下的吸光值。空白、样品管各测定 3 个平行。将样品与空白在 680 nm 下测定光密度值之差代入标准曲线得到 y_s 。

样品的蛋白酶酶活(U/mL)= $ys*(4/10)*n$, 其中 n 为样品的稀释倍数。

1.3.6 纳豆激酶酶活的测定-纤维蛋白平板法

参照 Astrup^[19]的方法并加以改进。

纤维蛋白平板的制备: 磷酸盐缓冲溶液的配制:

将 13.35 mg 纤维蛋白原溶于 15 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液中, 制成 0.89 mg/mL 的纤维蛋白原缓冲溶液。将其放在 50 °C 水浴中恒温 5~10 min。将凝血酶溶于 1 mL 磷酸盐缓冲溶液中, 制得 7.5 U/mL 的凝血酶缓冲溶液。1%的琼脂糖溶液 20 mL, 用微波炉融化, 在 50 °C 水浴中恒温 10 min。待纤维蛋白溶液和琼脂糖温度一致时, 将凝血酶 1 mL 和纤维蛋白 15 mL 与琼脂糖溶液迅速混匀, 立即倒平板。

用塑料吸管进行打孔, 取 10 μ L 发酵产物加样于纤维蛋白原平板, 37 °C 温育 18 h, 用游标卡尺测量透明圈的直径, 并计算面积。定义: 1 min 内水解纤维蛋白产生 0.01 mm² 透明圈的酶量为 1 U, 根据透明圈的面积计算得到发酵液的纳豆激酶酶活(U)。

1.3.7 生物量的测定方法(细胞干重法)

采用万春艳^[20]的方法, 准确量取 25 mL 发酵液, 4 °C 条件下 8000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤两次后, 将菌体转移到干燥皿中, 于 105 °C 条件下烘干至恒重。

1.3.8 总酚含量的测定

采用 Lin 等^[21]的方法, 取样 0.5 mL, 加入蒸馏水至 6 mL, 摇匀, 加入 0.5 mL 福林酚试剂, 摇匀, 在 1~8 min 内加入 20% (m/m) 的 Na₂CO₃ 溶液 1.5 mL, 加入蒸馏水至 10 mL, 摇匀, 40 °C 保温 2 h, 迅速冷却后, 立即在 760 nm 处测定其吸光度。以没食子酸为标准品做标准曲线, 计算得总酚含量。

1.3.9 总酚迁移率和残留率的测定

总酚迁移率指的是发酵产物中总酚量占谷物的比率, 而总酚残留率指的是发酵残渣中总酚量占谷物的比率。

总酚迁移率=发酵产物多酚提取物总酚含量/谷物含量;

总酚残留率=发酵残渣多酚提取物总酚含量/谷物含量。

1.3.10 氧自由基吸收能力(ORAC)

参考 Lin 等^[22]的方法, 在微孔板中分别加入 25 μ L 样品溶液或 Trolox 溶液, 或缓冲液(75 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲液, pH=7.4), 然后加入 75 μ L 0.159 μ mol/L 荧光素钠溶液, 37 °C 孵育 10 min 后, 加入 100 μ L 38.25 mmol/L AAPH, 保持反应体系温度恒定为 37 °C, 设定激发波长为 485 nm, 发射波长为 530

nm, 开始计时反应并读数(f_0), 每分钟读一次数(f_1, f_2, \dots, f_{70}), 共读 71 次数(共计反应 70 min), 将每次读数连成曲线。计算公式如下:

$$AUC = 0.5 (f_0 + f_n) + (f_1 + f_2 + \dots + f_i + \dots + f_{n-1});$$

$$Net\ AUC = AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白}}$$

AUC: 曲线下的面积; Trolox 浓度与 Net AUC 成线性关系, 换算得到样品的 ORAC 值, 即达到每千克样品的氧自由基吸收能力所需 Trolox 的量(mmol/kg)。ORAC 值越高, 则样品抗氧化活性越强。

1.4 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件中的 ANOVA 方法对数据进行差异显著性检验分析, 以 $p < 0.05$ 为差异显著, 数据以平均值 \pm 标准差的形式来表示。

2 结果与讨论

2.1 纳豆菌液态发酵时间对纳豆菌生物量、蛋白酶酶活和纳豆激酶酶活的影响

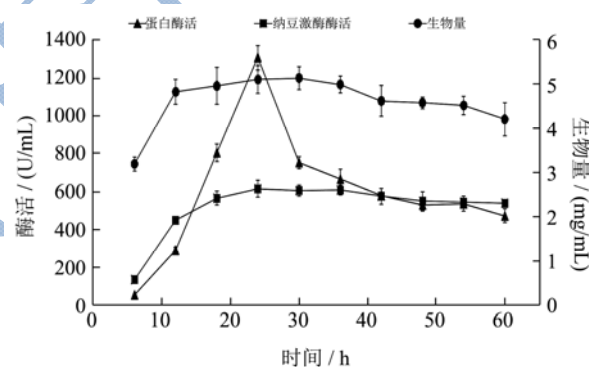


图1 纳豆菌液态发酵时间对纳豆菌生物量、纳豆激酶酶活、蛋白酶酶活的影响

Fig.1 Effects of *Bacillus natto* liquid fermentation time on the biomass and enzyme activities of nattokinase and protease

纳豆菌利用基础培养基发酵产纳豆激酶、蛋白酶以及其生物量随时间的变化规律如图 1 所示。实验结果表明: 在发酵前期, 纳豆菌生物量随发酵时间延长不断增加, 至 12 h, 达到最高值, 并在 30 h 内保持恒定, 但在发酵后期随发酵时间的延长, 其生物量逐渐减少; 在发酵前期, 纳豆菌所产蛋白酶酶活随发酵时间的延长不断增加, 至 24 h, 达到最高值, 但在发酵后期随发酵时间的延长, 纳豆菌所产蛋白酶酶活逐渐降低; 在发酵前期, 纳豆菌所产纳豆激酶酶活随发酵时间的延长不断增加, 至 24 h, 达到最高值, 并在 60 h 内保持恒定。对于基础培养基, 纳豆菌液态发酵产纳豆激酶以及蛋白酶最适发酵时间为 24 h。发酵时间

是影响微生物产酶的一个重要因素。在发酵过程中，生产菌在产酶总量达到峰值时就应当及时停止发酵，否则酶活力就可能会出现回落的现象^[23]。

2.2 添加谷物对纳豆菌液态发酵产蛋白酶酶活、纳豆激酶酶活的影响

活、纳豆激酶酶活的影响

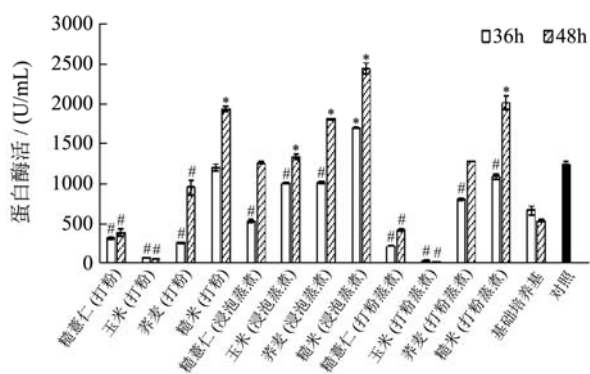


图2 添加谷物对纳豆菌液态发酵产蛋白酶酶活的影响

Fig.2 Effects of grains on protease activity produced by *Bacillus natto* liquid fermentation

注：*表示显著高于对照组($p < 0.05$)，#表示显著低于对照组($p < 0.05$)。

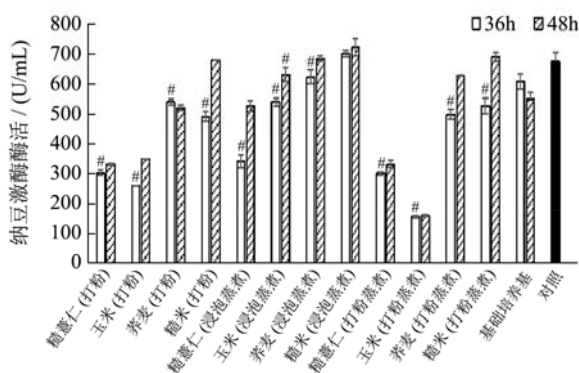


图3 添加谷物对纳豆菌液态发酵产纳豆激酶酶活的影响

Fig.3 Effects of grains on nattokinase activity produced by *Bacillus natto* liquid fermentation

注：*表示显著高于对照组($p < 0.05$)，#表示显著低于对照组($p < 0.05$)。

在基础培养基中添加经不同预处理方式(打粉、浸泡蒸煮、打粉蒸煮)处理后的四种谷物(糙薏仁、玉米、荞麦和糙米)，纳豆菌液态发酵 24 h，所得发酵产物过于粘稠、不易分离、得率低且所产纳豆激酶酶活、蛋白酶酶活均显著低于利用基础培养基发酵 24 h 所产纳豆激酶酶活、蛋白酶酶活。因此，本文考察发酵 36 h、48 h 对纳豆菌液态发酵产纳豆激酶、蛋白酶酶活的影响，其结果如图 2 和 3 所示。而对于基础培养基，纳豆菌液态发酵产纳豆激酶以及蛋白酶最适发酵时间为 24 h，故对照组为利用基础培养基发酵 24 h 所产纳豆

激酶酶活、蛋白酶酶活。

添加谷物可显著影响纳豆菌产蛋白酶酶活。采用直接打粉的方式处理谷物，以添加糙米发酵 48 h 所产蛋白酶活性最强，而添加糙薏仁、玉米、荞麦发酵 36 h 或 48 h 所产蛋白酶活性较弱；采用浸泡蒸煮的方式处理谷物，添加玉米、荞麦、糙米发酵 48 h 所产蛋白酶活性显著高于对照组($p < 0.05$)，以添加糙米发酵 48 h 所产蛋白酶活性最强(2444.19 U/mL，是对照组的 1.97 倍)；采用打粉蒸煮的方式处理谷物，添加糙米发酵 48 h 所产蛋白酶活性显著高于对照组，以添加糙米发酵 48 h 所产蛋白酶活性最强。另有李志江^[24]等研究表明糙米发酵过程能获得较高活性蛋白酶活。

此外，添加谷物可显著影响纳豆菌产纳豆激酶酶活。采用直接打粉的方式处理谷物，在基础培养基中添加四种谷物，经纳豆菌发酵，实验结果表明：添加糙薏仁、玉米、荞麦所得发酵产物中纳豆激酶酶活显著低于对照组，而添加糙米发酵 48 h 所得纳豆激酶酶活与对照组相比无显著性差异($p > 0.05$)；采用浸泡蒸煮的方式处理谷物，添加糙米发酵 48 h，所得发酵产物中纳豆激酶酶活显著高于对照组($p < 0.05$)，而添加玉米、荞麦发酵 36 h 或 48 h 所产纳豆激酶酶活略低于对照组；采用打粉蒸煮的方式处理谷物，添加糙薏仁、玉米和荞麦所得发酵产物中纳豆激酶酶活显著低于对照组，而添加糙米发酵 48 h 所得纳豆激酶酶活与对照组相比无显著性差异($p > 0.05$)。

总的说来，三种预处理方式中，以浸泡蒸煮的方式处理谷物，所得发酵产物中蛋白酶及纳豆激酶酶活最强，这可能归因于该方式处理谷物有利于其中淀粉糊化，便于纳豆菌利用；四种谷物中，以添加荞麦、糙米所得发酵产物中蛋白酶及纳豆激酶酶活最强；以发酵 48 h 所得发酵产物中蛋白酶及纳豆激酶酶活最强。尤其以添加经浸泡蒸煮的方式处理的糙米发酵 48 h 所得发酵产物中纳豆激酶酶活最强(719.67 U/mL)。

综上所述，添加糙米和荞麦可显著促进纳豆菌产纳豆激酶、蛋白酶。采用浸泡蒸煮处理四种谷物、延长发酵时间可显著提高其发酵产物的蛋白酶酶活、纳豆激酶酶活。

2.3 纳豆菌发酵对谷物总酚迁移率、总酚残留率的影响

糙薏仁、玉米、荞麦和糙米富含多酚类化合物，然而，植物中大部分多酚类化合物与细胞壁紧密结合，难以被有机溶剂提取。虽酸法与碱法可提取这部分结合型多酚，但往往会破坏多酚结构，影响其活性，并

对环境造成污染^[25]。因此,找寻一种高效、绿色提取结合型多酚的方法,是亟待解决的问题之一。近年来的研究表明:利用微生物发酵法,可显著提高多酚类物质的提取率^[17,18]。

采用浸泡蒸煮的方式处理谷物,添加四种谷物发酵 36 h,总酚迁移率从高到低排序依次是:糙薏仁>荞麦>糙米>玉米,发酵 48 h 时,总酚迁移率从高到低排序依次是:荞麦>糙薏仁>糙米>玉米,且随发酵时间的延长,总酚迁移率略有增加。就总酚残留率而言,添加四种谷物发酵 36 h 和 48 h 时,荞麦的总酚残留率(1.77±0.11, 1.96±0.11 mg/g 干谷物)最高,且显著高于其余三种谷物($p<0.05$),糙米的总酚残留率最低,

表 1 纳豆菌发酵对谷物总酚迁移率、总酚残留率的影响

Table 1 Effects of *Bacillus natto* fermentation on the migration ratio and residue ratio of grain polyphenol

样品	总酚迁移率 (mg/g 干谷物)		总酚残留率 (mg/g 干谷物)	
	36 h	48 h	36 h	48 h
糙薏仁 (浸泡蒸煮)	0.49±0.03 ^{ef}	0.52±0.04 ^f	1.13±0.06 ^b	1.02±0.07 ^{ab}
玉米 (浸泡蒸煮)	0.22±0.02 ^a	0.26±0.02 ^b	1.59±0.10 ^c	1.55±0.10 ^c
荞麦 (浸泡蒸煮)	0.48±0.05 ^{de}	0.64±0.04 ^{se}	1.77±0.11 ^d	1.96±0.11 ^e
糙米 (浸泡蒸煮)	0.43±0.04 ^c	0.45±0.03 ^{cd}	0.99±0.08 ^{ab}	0.96±0.09 ^a

注:同列中标注不同角标者具有显著性差异($p<0.05$)。

2.4 添加谷物对纳豆菌液态发酵产物、发酵产物多酚提取物抗氧化活性的影响

本文对比研究了添加谷物对纳豆菌液态发酵产物、发酵产物多酚提取物抗氧化活性的影响,其结果如表 2 所示。添加谷物发酵 36 h 时,发酵产物的 ORAC 值介于 13.32~23.84 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$ 之间,其抗氧化活性从高到低依次为:添加荞麦组>添加糙薏仁组>添加玉米组>添加糙米组;延长发酵时间至 48 h,发酵产物的 ORAC 值介于 18.19~30.37 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$ 之间,略高于发酵 36 h 所得发酵产物的抗氧化活性。另外地,对照组的 ORAC 值为 11.03 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$ 。实验结果表明:添加谷物发酵,可显著提高纳豆菌液态发酵产物抗氧化活性。

在此基础上,本文考察了不同谷物、不同发酵时间对发酵产物多酚提取物抗氧化活性,实验结果表明:添加谷物发酵 36 h 时所得多酚提取物的 ORAC 值介于 0.36~0.82 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$,以添加荞麦组所得多酚提取物的 ORAC 值最高;延长发酵时间至 48 h,所得多酚提取物的 ORAC 值介于 0.63~1.24 $\mu\text{mol trolox equiv/mL}$ 之间,以添加荞麦组所得多酚提取物

这与不同谷物本身总酚含量有所不同有关。总的说来,四种谷物中,以添加荞麦、糙薏仁所得发酵产物中总酚含量最高;以发酵 48 h 所得发酵产物中总酚含量最高。

因本文采用乙醇提取发酵残渣中多酚类化合物,所得多酚为游离型多酚,总酚残留率即为发酵残渣中多酚的提取率。发酵产物中多酚以及发酵残渣中可被提取的多酚都可作为功能性因子应用于功能性食品中。

随发酵时间的延长,或谷物前处理方式的改变,发酵残渣中可被乙醇提取的多酚有所增加,再次说明利用纳豆菌发酵,可显著提高多酚类物质的提取率。

的 ORAC 值最高,发酵 48 h 所得多酚提取物的抗氧化活性显著高于发酵 36 h 所得多酚提取物。这与前文的实验结果相符,多酚含量高,则其抗氧化活性强。然而,与发酵产物的 ORAC 值相比,发酵产物多酚提取物的 ORAC 值较低,说明发酵产物中,除谷物多酚外,还含有丰富多肽类物质、微生物代谢产物,这些物质具有较强的抗氧化活性。谷物多酚、肽类物质与微生物代谢产物是发酵产物发挥抗氧化活性重要的物质基础。

四种谷物富含蛋白质,尤其富含 Tyr 和 Trp 等强抗氧化活性的氨基酸,是抗氧化肽的优质来源,据报道^[16],肽的抗氧化活性与其氨基酸的组成及排列顺序、疏水性、空间体积大小及酸碱性等有关:(1)肽的抗氧化活性主要是由于其序列中 Tyr、Trp、Cys 或 Met 等具有供质子或供电子能力的氨基酸残基存在;(2)肽序列中的疏水性氨基酸如 Leu、Pro、Phe 及 Val 对肽的抗氧化活性具有重要贡献;(3)肽序列中的酸性氨基酸残基对肽的抗氧化活性起到关键作用。

在发酵过程中,纳豆菌所产蛋白酶会适度水解谷物蛋白,生成肽类物质。因此,采用纳豆菌液态发酵谷物,可制备富含纳豆激酶、谷物多酚、肽类物质且具有强溶栓、抗氧化活性的功能性食品。

表2 添加谷物对纳豆菌液态发酵产物抗氧化活性的影响

Table 2 Effects of grains on the antioxidant activity of *Bacillus natto* liquid fermentation products

样品	发酵产物 ORAC/($\mu\text{mol trolox equiv/mL}$)		发酵产物多酚提取物 ORAC/($\mu\text{mol trolox equiv/mL}$)	
	36 h	48 h	36 h	48 h
糙薏仁 (浸泡蒸煮)	23.08 \pm 1.27 ^d	29.55 \pm 1.68 ^e	0.68 \pm 0.04 ^c	0.88 \pm 0.02 ^d
玉米 (浸泡蒸煮)	19.35 \pm 1.12 ^c	19.01 \pm 0.98 ^c	0.49 \pm 0.06 ^b	0.69 \pm 0.03 ^c
荞麦 (浸泡蒸煮)	23.84 \pm 1.24 ^d	30.37 \pm 2.03 ^e	0.82 \pm 0.07 ^d	1.24 \pm 0.03 ^e
糙米 (浸泡蒸煮)	13.32 \pm 0.98 ^b	18.19 \pm 1.06 ^c	0.36 \pm 0.03 ^a	0.63 \pm 0.04 ^c
对照	11.03 \pm 0.87 ^a	11.03 \pm 0.87 ^a	-	-

注: 同列中标注不同角标者具有显著性差异($p < 0.05$)。

3 结论

3.1 添加糙米和荞麦可显著促进纳豆菌产纳豆激酶、蛋白酶。采用浸泡蒸煮处理四种谷物、延长发酵的时间可显著提高其发酵产物的蛋白酶酶活、纳豆激酶酶活。

3.2 添加谷物(尤其是荞麦)发酵, 可显著提高纳豆菌液态发酵产物抗氧化活性。谷物多酚、肽类物质与微生物代谢产物是发酵产物发挥抗氧化活性重要的物质基础。

3.3 采用纳豆菌液态发酵谷物, 可制备富含纳豆激酶、谷物多酚、肽类物质且具有强溶栓、抗氧化活性的功能性食品。

参考文献

- [1] Furie B, Furie B C. Mechanisms of thrombus formation [J]. *N Engl J Med.*, 2008, 359(9): 938-49
- [2] Berckmans R J, Nieuwland R, Böing A N, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation [J]. *Thrombosis & Haemostasis*, 2001, 85(4): 639
- [3] 刘振杰, 郭伟鹏, 张菊梅, 等. 纳豆的保健功效及开发应用[J]. *热带农业工程*, 2010, 34(3): 25-29
LIU Zhen-jie, GUO Wei-peng, ZHANG Ju-mei, et al. Health functions and development of natto [J]. *Tropical Agricultural Engineering*, 2010, 34(3): 25-29
- [4] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43(10): 1110-1111
- [5] HUANG S H, PAN S H, CHEN G G, et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62(11): 124-130
- [6] 王聪, 孔繁东, 祖国仁, 等. 纳豆激酶的研究现状与展望[J]. *食品与药品*, 2005, 7(6): 28-31
WANG Cong, KONG Fan-dong, ZU Guo-ren, et al. The research status and prospect of natto kinase [J]. *Journal of Food and Medicine*, 2005, 7(6): 28-31
- [7] 黎婉园. 纳豆激酶液体发酵的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011
LI Wan-yuan. Study on liquid fermentation technology of nattokinase [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [8] Murakami K, Yamanaka N, Ohnishi K, et al. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin nat (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food [J]. *Food & Function*, 2012, 3(6): 674-678
- [9] LIU Junguo, XING Jianmin, CHANG Tianshi, et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(8): 2757-2762
- [10] 高大海. 纳豆激酶的分离纯化和酶学性质的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005
GAO Da-hai. Purification and characterization of nattokinase produced by *Bacillus subtilis* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005
- [11] 葛春蕾. 高效分泌表达纳豆激酶的重组枯草芽孢杆菌的构建[D]. 无锡: 江南大学, 2016
- [12] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. *Journal of Gerontology*, 1956, 11(3): 298
- [13] Baublis A, Decker E A, Clydesdale F M. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals [J]. *Food Chemistry*, 2000, 68(1): 1-6
- [14] Yao H, Fang F, Jie J, et al. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents [J]. *Food Chemistry*, 2016

- [15] 申迎宾. 四种谷物多酚抗氧化、降血脂作用评价研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016
SHEN Ying-bin. Antioxidant activity and hypolipidemic effects of polyphenol extracted from four grains [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
- [16] 郑淋. 抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015
ZHENG Lin. Structure-activity relationship and directional preparation of antioxidant peptide [D]. South China University of Technology, 2016
- [17] Juan M Y, Chou C C. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(5): 586
- [18] Wei X, Luo M, Xu L, et al. Production of Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* by Fermentation of Chickpeas, with the evaluation of the anticoagulant and antioxidant properties of chickpeas [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(8): 3957-3963
- [19] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 40: 346-351
- [20] 万春艳. 大豆活性肽对酵母增殖代谢及啤酒发酵的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012
WAN Chun-yan. Effect of soy active peptides on the the proliferation and metabolism of yeast and beer brewing [D]. South China University of Technology, 2012
- [21] Lin L, Zhao H, Dong Y, et al. Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from *Rabdosia serra*, (MAXIM.) HARA leaf [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(2): 417-424
- [22] 林恋竹, 焦铭. 光果甘草叶中性多糖结构表征及抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 106-110
LIN Lian-zhu, JIAO Ming. Antioxidant activity study of *Glycyrrhiza glabra* leaves and neutral polysaccharide structure characterization [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(1): 106-110
- [23] 陈洪章, 徐健. 现代固态发酵原理及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
CHEN Hong-zhang, XU Jian. The principle and application of the modern solid-state fermentation [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004
- [24] 李志江, 戴凌燕, 鹿保鑫. 糙米发酵最佳条件及在乳酸发酵中的应用研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(6): 58-63
LI Zhi-jiang, DAI Ling-yan, LU Bao-xin. Studies on the optimum condition of brown rice fermentation and its application in lactic acid fermentation [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, 7(6): 58-63
- [25] Min W N, Jing Z, Min S L, et al. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae* [J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(3): 1718-1727