

应用中国根霉 12 发酵制备高溶栓活性 淡豆豉的条件优化

温嘉敏¹ 蔡尤林² 黎攀¹ 蒋卓¹ 肖南¹ 梁钻好¹ 杜冰^{1,*}

(1.华南农业大学食品学院,广东广州 510642;

2.无限极(中国)有限公司,广东广州 510627)

摘要:为探究中国根霉 12 发酵淡豆豉生产高活力溶栓酶的最佳条件,以中国根霉 12 为发酵菌株,分别以 5 种豆类(黑豆、黄豆、红豆、绿豆、白芸豆)为原料,筛选淡豆豉加工最佳原料及预处理方式,以溶栓酶活力为指标,通过响应面试验优化淡豆豉发酵工艺,并对产品品质进行分析。结果表明:经过发芽处理的黑豆更适合作发酵原料,得到的最佳工艺条件:黑豆发芽 38 h,接种量 15%,发酵温度 31℃,发酵时长 7 d,在此工艺下得到的发酵淡豆豉溶栓酶活力为 (17122 ± 392.7) U/g。该淡豆豉氨态氮含量显著高于以传统发酵方式制作的市售淡豆豉($p < 0.05$),而其硬度、弹性和咀嚼性显著低于市售淡豆豉($p < 0.05$),口感更佳。另外,干燥后的淡豆豉粉溶栓酶活力为 16350 U/g,显著高出某品牌纳豆粉的溶栓酶活力 22% ($p < 0.05$)。研究发现,中国根霉 12 能显著提高淡豆豉溶栓酶活力($p < 0.05$),对进一步开发高溶栓活性的淡豆豉有重要意义。

关键词:淡豆豉;中国根霉 12;溶栓酶;响应面试验;质构分析

Optimization of Conditions for Using *Rhizopus Chinesis* 12 to Ferment and Produce Semen Sojae Praeparatum With High-activity Fibrinolytic Enzyme

WEN Jia-min¹, CAI You-lin², LI Pan¹, JIANG Zhuo¹, XIAO Nan¹, LIANG Zuan-hao¹, DU Bing^{1,*}

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2.Infinity (China) Company Ltd., Guangzhou 510627, China)

Abstract: To explore the optimal conditions for the production of high-activity thrombolytic enzymes by *Rhizopus chinesis* 12 fermented semen sojae praeparatum, the *Rhizopus Chinesis* 12 was used as fermentation strain, five kinds of beans (black beans, soybeans, red beans, mung beans, white kidney beans) were used as raw materials to screen the best raw materials and pretreatment methods for the processing of semen sojae praeparatum. Using the activity of fibrinolytic enzyme as the indicator, the fermentation process of semen sojae praeparatum was optimized by response surface test, and the product quality was analyzed. The results showed that the black soybean as raw materials and indicated the optimal formulations as follows: Black soybean after germination treatment for 38 h, inoculation rate was 15% (m/m), fermentation temperature was 31℃, and fermentation time was 7 d. Under these optimal fermentation conditions, the fibrinolytic activity of Semen sojae praeparatum reached to (17122 ± 392.7) U/g. Furthermore, the ammonia nitrogen of the prepared semen sojae praeparatum was significantly higher than that of a retail brand ($p < 0.05$), while its hardness, elasticity and chewiness were significant lower than those of the retail brand ($p < 0.05$). In addition, the fibrinolytic enzyme activity of semen sojae praeparatum powder after drying was 16350 U/g, which was significantly higher than that of a certain brand of natto (22%) ($p < 0.05$). These results indicated that *Rhizopus chinesis* 12 could significantly increased the fibrinolytic enzyme activity of semen sojae praeparatum ($p < 0.05$), which would have a great significance for further development of the semen sojae praeparatum with high activity fibrinolytic enzyme.

Key words: semen sojae praeparatum; *Rhizopus Chinesis* 12; fibrinolytic enzyme; response surface test; texture analysis

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)20-0098-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.20.017

引文格式: 温嘉敏, 蔡尤林, 黎攀, 等. 应用中国根霉 12 发酵制备高溶栓活性的淡豆豉条件优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 98-104, 111.

收稿日期: 2018-01-08

作者简介: 温嘉敏(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术与粮油加工, E-mail: charmingwen@stu.scau.edu.cn。

* 通讯作者: 杜冰(1973-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品新资源与生物技术, E-mail: dubing@scau.edu.cn。

血栓病对人类健康危害极大^[1],目前国内外正式批准临床使用的溶栓药物,虽然药效肯定,但会引起药物抗性、发热和变态反应,溶栓效果不理想,颅内出血率高,存在不能口服、副作用大、价格高等多方面缺陷^[2]。纳豆中提取的纳豆激酶是目前国外研究较多的新型溶栓剂,其研究已经达到了溶栓机理等分子水平^[3-4],我国传统发酵豆制品淡豆豉的加工工艺与日本纳豆相似,研究人员发现淡豆豉中也存在溶栓酶^[5],该酶能直接溶解血栓,同时还能激活体内的纤溶酶原,增加内源性纤溶酶的量与作用,使溶血栓效率较药物溶栓剂要高出很多^[6],而且更加安全。

国内对于淡豆豉中的异黄酮研究较为集中^[7-9],发酵研究较少,有研究人员对曲霉型、细菌型淡豆豉进行研究^[10-11],结果表明曲霉发酵淡豆豉对于提高豆豉中的蛋白酶活力具有积极作用,未见溶栓酶有关报道;而细菌型淡豆豉经过优化后,溶栓酶活性提高,但存在气味不佳难以应用的问题。纳豆以其高溶栓酶活力风靡全球,已经开发出多种大宗消费型保健品和医疗药品,而淡豆豉的产品开发落后较远^[12-14],溶栓酶活性明显低于日本纳豆,重要的原因之一是:中国淡豆豉的作用仍以普通调味料为主,制作工艺上仍然沿袭传统的自然接种制曲方式,得到的产品药用价值不突出、产品质量不统一^[15-16]。

中国本土的根霉 12 具有能产高活性溶栓酶的特点^[17],能使每克原料的溶栓酶产量达 791.81 U(尿激酶单位)^[18],但其能产高溶栓活性酶的优点未得到利用。因此,本文利用中国根霉 12 对 5 种豆类(黑豆、黄豆、红豆、绿豆、白芸豆)进行发酵,通过响应面试验优化发酵条件,开发出具有高溶栓活性的淡豆豉,并与市售豆豉、具有溶栓活性的日本纳豆进行品质对比。以期为中国根霉 12 的应用提供参考数据,并为日后开发高溶栓活性淡豆豉系列商品提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

黑豆、黄豆、红豆、绿豆、白芸豆 天地粮人有限公司;黑豆淡豆豉 散装,药店市售;纳豆粉 野口医学研究所;中国根霉(*Rhizopus Chinesis*) 12 本实验室保藏;牛纤维原蛋白(>98%)、凝血酶(150BP)、尿激酶(1.5 万 U/mg) 广州成硕生物科技有限公司均为生化纯;磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾 分析纯,广州裕立生物科技有限公司;PDA 培养基、MRS 液体培养基 广州环凯生物科技有限公司。

GL-G-II 型立式冷冻离心机 上海安亭科学仪器有限公司;BYSXT-06 型索氏脂肪提取器 上海秉越电子仪器有限公司;SKD-3000 型全自动凯氏定氮仪 上海沛欧分析仪器有限公司;DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器 郑州长城科工贸有限公司;EZ-SX 型质构仪 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 中国根霉 12 菌种的活化及扩大培养 取中国根霉 12 保藏菌种 1~2 环,接入斜面 PDA 培养基中,

32 ℃ 培养 3~5 d 后,接种培养好的斜面菌种 2 环到扩大培养 MRS 液体培养基中,32 ℃ 振荡培养 3~5 d,备用。

1.2.2 淡豆豉的制备工艺 豆子→挑选→浸泡→蒸煮灭菌→冷却→接种→发酵→干燥→成品

操作要点:选择成熟、颗粒饱满匀称、无发霉腐烂、无虫蚀的新鲜豆子为发酵原料,加入豆子质量 2 倍的蒸馏水,室温浸泡 2 h,121 ℃ 高压灭菌蒸煮 15 min,冷却至 35 ℃ 以下备用;取 1.2.1 中国根霉 12 液体培养基,按照一定的接种量(接种量指接入的液体培养基质量与豆子质量的百分比)接种到蒸煮灭菌冷却后的发酵原料中,在一定温度下发酵一定时间,进行自然晾干或人工干制,得到干燥后淡豆豉。

1.2.3 原料及原料处理方式选择

1.2.3.1 不同豆类对淡豆豉发酵的影响 分别选择充分成熟、颗粒饱满均匀、无虫蚀、无霉烂变质的新鲜黄豆、黑豆、红豆、绿豆、白芸豆作为发酵原料,按照 1.2.2 方法,接种量 15%,在 32 ℃ 下发酵 7 d 进行生产,研究不同豆类的淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力值。

1.2.3.2 不同原料处理方式对淡豆豉发酵的影响 将黑豆用清水冲洗干净后加入 2 倍质量的清水浸泡 12 h,取出黑豆沥干,平铺于泡沫箱中,盖上经润湿后的纱布,避光放置,每隔 6 h 后再次润湿纱布,分别将黑豆发芽处理 24、48、60 h,并以无发芽普通处理新鲜黑豆和 8 目粉碎处理的黑豆作为对照,按照淡豆豉生产工艺流程 1.2.2,接种量 15%,在 32 ℃ 下发酵 7 d 进行生产,研究不同原料处理方式的淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力值。

1.2.4 淡豆豉生物量的测定 取 200 g 发酵后的淡豆豉,用蒸馏水将淡豆豉外壁物质清洗下来,将清洗液 2000 r/min 离心 10 min 后,60 ℃ 恒温干燥至恒重,准确称量沉淀干重。

1.2.5 溶栓酶酶活力的测定 参照庞庆芳^[19]纤维蛋白平板法,以尿激酶的活力单位表示溶栓酶活性。

1.2.6 单因素实验 以黑豆为原料,经过发芽 48 h 预处理后,按照 1.2.2 的工艺流程进行发酵生产,控制单一变量,考察发酵时间(5、7、9、11 d)、发酵温度(28、32、36、40 ℃)以及接种量(5、10、15、20%)对淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力的影响。各因素固定水平值:发酵时间 7 d、发酵温度 32 ℃、接种量 15%。

1.2.7 响应面试验设计 在单因素实验的基础上,选取发芽时间(A)、发酵温度(B)和发酵时间(C)3 个影响因素为自变量,以溶栓酶活性为响应值,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,设计 3 因素 3 水平 17 个实验点的响应面分析实验,以确定淡豆豉发酵的最优工艺参数,实验因素与水平设计见表 1。

1.2.8 最优工艺发酵淡豆豉的综合评价及对比 将最优工艺发酵淡豆豉分别与原料黑豆、市售黑豆淡豆豉进行比对,研究黑豆发酵前后的理化指标变化以及最优工艺发酵淡豆豉与市售淡豆豉品质的差异,并对最优工艺发酵淡豆豉、市售淡豆豉以及原料黑豆进行质构分析。

表1 响应面实验的因素和水平编码值
Table 1 Coded variables and their coded levels
in response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 发芽时间(h)	24	42	60
B 发酵温度(℃)	28	31	34
C 发酵时间(d)	6	7	8

1.2.8.1 理化指标测定 蛋白质按照 GB 5009.5-2016 凯氏定氮法进行测定^[20]; 氨基酸态氮按照 GB5009.235-2016 进行测定^[21]; 脂肪按照 GB5009.6-2016《食品中脂肪的测定方法》索氏提取法测定^[22]; 还原糖、碳水化合物按照王俊丽等^[23] DNS 比色法进行测定; 粗纤维按照林晓华^[24] 酸碱法进行测定。

1.2.8.2 质构分析 参数条件取 10 g 样品进行多次测定 取平均值。探头: P50; 测试方式: 二次压缩模式; 触发类型 “Auto”; 触发力: 0.05 N; 采样间隔: 10 ms; 探头的向下压缩速度: 0.7 mm/s、向上速度为 0.7 mm/s、压缩程度为 60%。

1.2.9 干燥淡豆豉粉与市售纳豆激酶粉溶栓酶活力对比 将经过低温热泵干燥(40℃干燥 10 h)并常温粉碎过 80 目筛后得到的最优发酵淡豆豉粉, 与市售纳豆激酶粉按照 1.2.6 溶栓酶活力测定方法进行测定。

1.3 数据处理

取单因素实验结果的 3 次实验平均值和标准偏差, 响应面结果采用 Design Expert.V8.0.6 软件处理, 质构测定值由质构测试仪的专业软件 TRAPEZIUMX 1.4.0 版本自动读取硬度值、弹性和咀嚼性。

2 结果与分析

2.1 不同豆类对淡豆豉发酵的影响

2.1.1 中国根霉 12 在不同豆类上的长势 图 1 为发酵 3 d 后, 中国根霉 12 在不同豆类上的长势, 可以看出, 此时中国根霉 12 在以黑豆为原料发酵时长势最好, 黑豆的表面布满了菌丝, 黄豆和白芸豆次之, 出现发酵不均匀的情况, 可能是接种不均所致, 而绿豆和红豆的菌落长势最差。

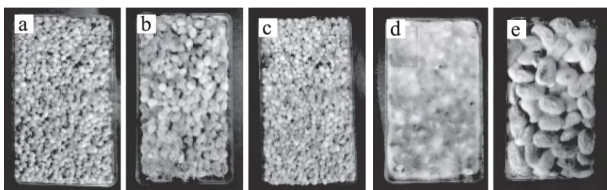


图1 绿豆(a)、黄豆(b)、红豆(c)、黑豆(d)和白芸豆(e)发酵淡豆豉菌落生长情况

Fig.1 Colony growth condition of mung bean(a), soybean(b), red bean(c), black soybean(d) and white kidney bean(e) fermented Semen sojae praeparatum

2.1.2 不同豆类对淡豆豉发酵生物量和溶栓酶活力的影响 尿激酶标准曲线: 以尿激酶活力单位为横坐标, 溶解圈面积为纵坐标, 绘制尿激酶溶解纤维蛋白标准曲线, 见图 1。尿激酶活力标准曲线为: $y =$

$0.7823x + 1.0782$ $R^2 = 0.9937$, 该标准曲线可信。

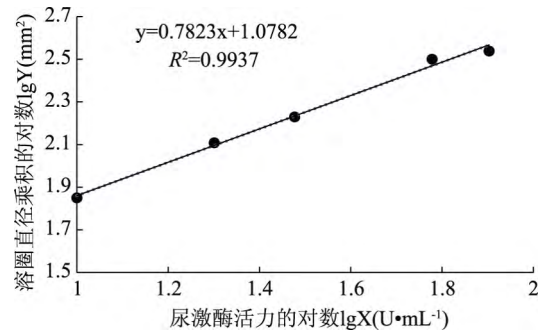


图2 尿激酶标准曲线

Fig.2 Standard curve of urokinase

由图 3 可知, 5 种不同豆类中, 黑豆发酵后所得淡豆豉生物量和溶栓酶活力均显著高于其他豆类 ($p < 0.05$), 进一步说明黑豆发酵菌种的长势最好, 发酵产生的溶栓酶活性更高, 故选择黑豆为发酵原料。

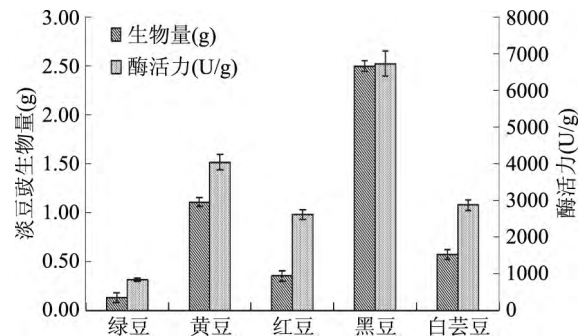


图3 不同豆类对淡豆豉发酵生物量和溶栓酶活力的影响

Fig.3 Effects of different legumes on the weight of outer wall material and the activity of fibrinolytic enzyme

据报道, 黑豆和黄豆的蛋白质和脂肪的含量相似, 且高于其他 3 种豆类, 而二者的碳水化合物含量都相对较低^[25], 推测黑豆中较高的蛋白质含量为中国根霉 12 的生长提供了充足的氮源, 而具有抑制溶栓酶产生效果的易代谢利用碳源^[26]含量较低, 可进一步促进溶栓酶的产生, 而与之具有相似营养成分的黄豆, 其较低溶栓酶活力或与其发酵过程中豆类的空隙大小有关。张敏等^[27]的研究也表明了, 黑豆淡豆豉的溶栓酶活力要比黄豆淡豆豉的溶栓酶活力高。此外, 中国根霉 12 的外部生长环境也与发酵过程中豆子之间的间隙有关, 相比黑豆, 黄豆颗粒较小, 颗粒间空隙小而密集, 使用黄豆作为发酵原料时, 发酵罐下层的中国根霉 12 利用水分和氧气的效率较低^[28]。绿豆、红豆和白芸豆含有较高的碳水化合物, 这些容易代谢利用的碳源会抑制中国根霉 12 的生长^[26], 因此这 3 种豆的生物量和溶栓酶活力低于黑豆和黄豆。

2.2 不同原料处理方式对淡豆豉发酵的影响

由图 4 可知, 淡豆豉生物量和淡豆豉酶活力均为: 发芽处理 > 普通处理 > 粉碎处理, 其中发芽 48 h 处理 > 发芽 24 h 处理 > 发芽 60 h 处理。

发芽 48 h 处理黑豆发酵后所得淡豆豉生物量和酶活力均高于其他处理方式, 原因可能是发芽后黑豆种皮发生破损, 营养物质更容易被中国根霉 12 发

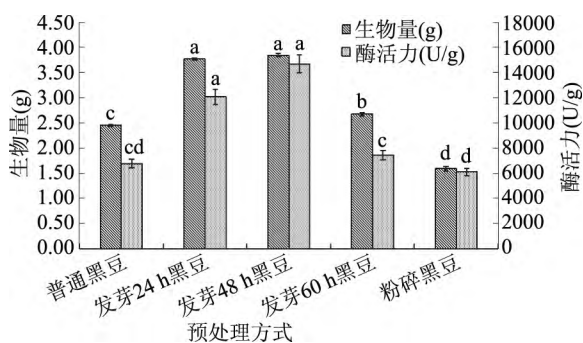


图4 不同原料处理方式
对淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力的影响
Fig.4 Effects of different treatment modes of raw material
on the weight of outer wall material
and the activity of fibrinolytic enzyme

注: 同一指标不同字母表示有显著差异($p < 0.05$)。

酵利用; 另外黑豆在发芽过程中, 部分蛋白质分解成更容易被中国根霉 12 发酵利用的游离氨基酸, 从而有利于中国根霉 12 生长发酵并产生溶栓酶, 发芽初期, 游离氨基酸和纤维素含量会逐渐升高, 并在 48 h 左右达到峰值, 之后发芽过程对营养物质的利用, 游离氨基酸含量开始下降^[29-31], 后续发酵过程中供给中国根霉 12 发酵的游离氨基酸含量降低, 产生溶栓酶效率下降。而粉碎后黑豆发酵产生的酶活力较其他处理方式低, 可能是由于粉碎黑豆间间隙变小, 影响中国根霉 12 的生长^[28]。

2.3 不同接种量对淡豆豉发酵的影响

由图 5 可知, 接种量为 15% 实验组发酵后所得淡豆豉生物量最高。随着接种量的增加, 发酵后所得淡豆豉生物量逐渐增加, 当接种量达到 15% 时趋于平稳。发酵后所得淡豆豉溶栓酶酶活力: 15% > 10% > 5% > 20%。随着接种量的增加, 溶栓酶酶活力逐渐增加, 在 15% 时酶活力达到最大, 但随着接种量的进一步增加, 导致产酶过快, 从而会引起“烧曲”现象, 导致酶活力下降^[32]。

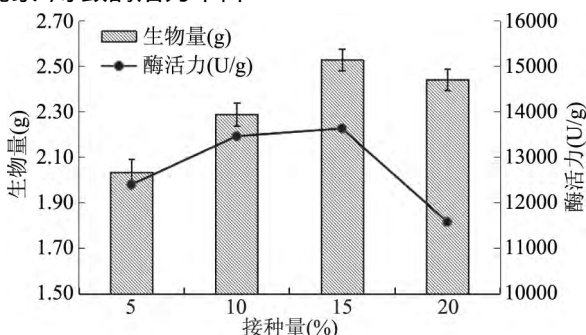


图5 不同接种量对淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力的影响
Fig.5 Effects of different inoculation rate of raw material
on the weight of outer wall material
and the activity of fibrinolytic enzyme

2.4 不同发酵温度对淡豆豉发酵的影响

由图 6 可知, 32 °C 发酵所得淡豆豉生物量及淡豆豉溶栓酶酶活力最高, 随着发酵温度的上升, 发酵所得淡豆豉生物量及淡豆豉溶栓酶酶活力均升高,

当发酵温度为 32 °C 时, 达到最高, 之后随着发酵温度的继续上升, 生物量及溶栓酶酶活力下降。当温度过高时, 不利于中国根霉 12 的生长及溶栓酶的产生。

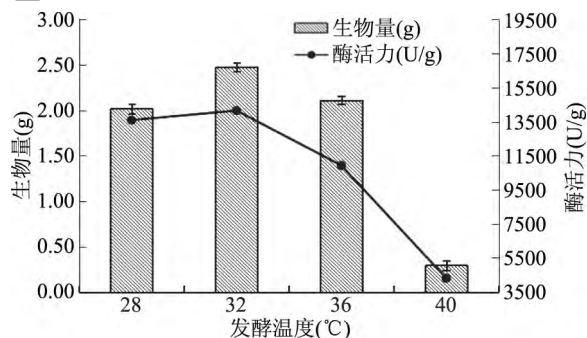


图6 不同发酵温度对淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力的影响
Fig.6 Effects of different fermentation temperature of
raw material on the weight of outer wall material
and the activity of fibrinolytic enzyme

2.5 不同发酵时间对淡豆豉发酵的影响

由图 7 可知, 随着发酵时间的增加, 发酵后所得淡豆豉生物量逐渐增加, 当发酵时间达到 7 d 时, 生物量逐渐趋于平稳, 当发酵时间为 11 d 时, 发酵所得淡豆豉生物量最高。另外, 随着发酵时间的增加, 淡豆豉酶活力逐渐升高, 当发酵时间为 7 d 时达到峰值, 之后随着发酵时间的增加, 淡豆豉酶活力开始下降。

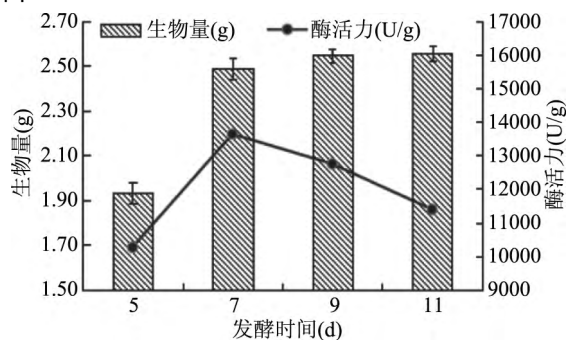


图7 不同发酵时间对淡豆豉生物量和溶栓酶酶活力的影响
Fig.7 Effects of different fermentation time of
raw material on the weight of outer wall material
and the activity of fibrinolytic enzyme

2.6 高溶栓活性淡豆豉生产条件优化

2.6.1 响应面实验结果 图 5 显示接种量为 5% ~ 15% 时, 溶栓酶活性没有显著差异, 即在该范围内接种量因素对酶活性影响不大, 因此只选取发芽时间 (A)、发酵温度 (B) 和发酵时间 (C) 3 个影响因素为自变量, 以溶栓酶活性为响应值, 实验结果见表 2。

2.6.2 模型的建立及其显著性检验 利用 Design-Expert Version 8.0.6 中的响应面设计法 (RSM) 对表 2 实验数据进行多元回归拟合, 得到自变量与溶栓酶活性 (Y) 二次多项回归模型为:

$$Y = 16822.74 - 1911.47A - 704.52B + 277.15C - 255.13AB - 372.49AC + 1232.95BC - 3974.34A^2 - 2331.48B^2 - 1142.59C^2$$

表2 响应面设计与实验结果

Table 2 Experimental design and corresponding results for response surface analysis

实验号	A	B	C	溶栓酶活性(U/g)
1	-1	-1	0	12915.1
2	1	-1	0	9660.8
3	-1	1	0	11883.3
4	1	1	0	7608.5
5	-1	0	-1	13187.3
6	1	0	-1	10050.9
7	-1	0	1	14105.7
8	1	0	1	9479.4
9	0	-1	-1	14752.0
10	0	1	-1	11010.2
11	0	-1	1	13221.3
12	0	1	1	14411.9
13	0	0	0	17087.9
14	0	0	0	16702.4
15	0	0	0	16362.2
16	0	0	0	16929.1
17	0	0	0	17031.2

从表3中回归方差分析显著性检验表明,该回归模型 $p < 0.0001$,方程模型达到极显著,失拟项 $p = 0.3997 > 0.05$ 不显著;该回归模型的总决定系数 $R^2 = 0.9953$,调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9892$,说明该模型的拟合程度较好,实验误差较小。因此该回归方程模型能较好的对淡豆豉溶栓酶活性进行分析及预测。生产淡豆豉溶栓酶的工艺参数中,影响溶栓酶活性的主次因素顺序:发芽时间>发酵温度>发酵时间。其中发芽时间(A)、发酵温度(B)达到极显著水平($p < 0.01$),发酵时间(C)达显著性水平($p < 0.05$),接种量没有发现显著影响($p > 0.05$)。这与国外研究报道的纳豆发酵产溶栓酶的影响因素显著性的结果相近^[33];AC的交互作用对溶栓酶活性的影响显著

($p < 0.05$)。BC的交互作用对其影响极显著($p < 0.01$)。2.6.3 因素交互作用 图7的响应面图可较直观地了解高溶栓活性淡豆豉生产工艺中发芽时间、发酵时间和发酵温度3个因素两两之间交互作用对溶栓酶活性的影响。

由图8可知,响应面的图形是凸起的曲面,溶栓酶活性分值得Y存在极值,该值为响应面的最高点。在发酵时间一定的情况下,随着发酵温度的增加、发芽时间的增加,溶栓酶活力呈现先上升后下降的趋势,可见适当的发芽和发酵温度可以提升溶栓酶活力。等高图可判定交互作用的显著性,等高图趋向椭圆,交互作用显著,反之,则不显著,AC、BC交互作用的等高图呈椭圆形,说明交互作用AC、BC对溶栓酶活力的影响显著($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$),AB的等高图趋于圆形,说明AB之间的交互作用不显著。等高线的疏密程度可判定各因素对溶栓酶活力的影响大小,等高线越密,影响越大,反之则越小,故A对溶栓酶活力的影响比B、C的影响大,这与方差分析的结果一致。

利用响应面对高溶栓活性淡豆豉的参数条件进行优化,得到最优产溶栓酶条件为:原料黑豆发芽37.58 h,发酵温度30.89℃,发酵时长7.19 d,接种量15%。在该条件下,溶栓酶活性的预测值为17105.3 U/g。考虑到实际操作将其工艺条件优化为:发芽38 h,发酵温度31℃,发酵时长7 d,接种量15%。为验证响应曲面法所得结果的可靠性,将上述优化生产条件重复3次实验,实际测得的酶活性为(17122 ± 392.7) U/g,预测值与实验值拟合良好。

2.7 最优工艺发酵淡豆豉的评价及其对比

2.7.1 理化指标分析及其对比 由表4可知,发酵后的淡豆豉与原料黑豆相比,蛋白质含量略微上升,脂肪、碳水化合物、粗纤维含量下降27.94%、37.18%、52.58%,还原糖含量上升95.74%。而发酵后淡豆豉与市售淡豆豉相比,主要差异为发酵后淡豆豉的还原糖含量较高,粗纤维含量较低,氨基酸态氮明显升高,而脂肪和碳水化合物含量略微低于市售淡豆豉。

表3 回归方程模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance of the developed regression model

方差来源	平均和	自由度	均方	F值	p值	显著性
回归模型	1.44×10^8	9	1.60×10^7	164.04	<0.0001	**
A	2.92×10^7	1	2.92×10^7	299.65	<0.0001	**
B	3.97×10^6	1	3.97×10^6	40.69	0.0004	**
C	6.15×10^5	1	6.15×10^5	6.40	0.0392	*
AB	2.60×10^5	1	2.60×10^5	2.70	0.1447	
AC	5.55×10^5	1	5.55×10^5	5.72	0.0480	*
BC	6.08×10^5	1	6.08×10^5	62.61	<0.0001	**
A ²	6.65×10^7	1	6.65×10^7	682.47	<0.0001	**
B ²	2.29×10^7	1	2.29×10^7	234.51	<0.0001	**
C ²	5.50×10^6	1	5.50×10^6	56.41	0.0001	**
残差	6.83×10^5	7	97576.5			
失拟项	3.32×10^5	3	1.11×10^5	1.26	0.3997	
纯误差	3.51	4	87687.3			
$R^2 = 0.9953$				$R^2_{Adj} = 0.9892$		

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

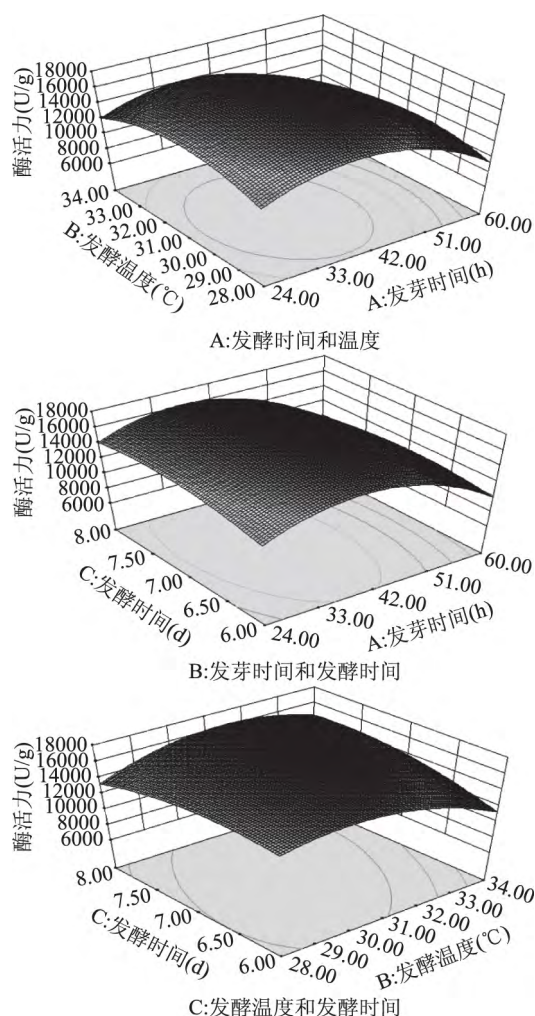


图8 发芽时间、发酵温度和发酵时间交互作用对溶栓酶活性影响的响应曲面

Fig.8 Effects of germination time, fermentation temperature and fermentation time on the activity of fibrinolytic enzyme

表4 两种淡豆豉及原料黑豆理化指标分析(%)

Table 4 Physicochemical index analysis of two semen sojae praeparatums and raw material black soybean (%)

理化参数	原料黑豆	发酵淡豆豉	市售淡豆豉
水分	9.48 ± 0.22	7.32 ± 0.42	7.58 ± 0.64
蛋白质 †	43.75 ± 0.31	46.23 ± 0.23	45.65 ± 0.22
脂肪 †	18.72 ± 0.57	13.49 ± 0.48	14.64 ± 0.63
碳水化合物 †	27.38 ± 0.36	17.20 ± 0.29	18.20 ± 0.33
还原糖 †	4.70 ± 0.13	9.20 ± 0.19	6.30 ± 0.09
粗纤维 †	12.23 ± 0.25	5.80 ± 0.21	10.30 ± 0.42
氨基酸态氮 †	0.32 ± 0.08	2.23 ± 0.11	0.82 ± 0.11

注: † g/100 g 干基。

最优发酵淡豆豉的脂肪和碳水化合物含量低于市售淡豆豉,其原因可能是:一方面黑豆在发芽过程中消耗,以及微生物发酵过程中自身生长发酵需求,且两者含量的下降速度与微生物生长速度正相关;另一方面最优发酵条件下,中国根霉 12 生长良好,速度较高,而传统自然发酵条件下,杂菌对优势菌的生长产生一定影响,发酵效率较低。此外在发酵过程中中国根霉 12 会产生脂肪酶,将部分脂肪

降解^[17]。

原料黑豆经过 38 h 发芽后,其营养成分物质更有利于中国根霉 12 生长的利用,脂肪和碳水化合物消耗较大,而对蛋白质的利用更多的表现为将其分解为多肽,这对凯氏定氮法测量粗蛋白含量的影响较小^[34],从而导致最优发酵淡豆豉蛋白质含量高于市售淡豆豉。

最优发酵淡豆豉还原糖的含量要高于市售淡豆豉,可能的原因是原料黑豆在发芽过程中还原糖的含量上升,另一方面可能是,中国根霉 12 在发酵过程中产生的糖化酶,其酶活相比混合菌种在发酵中产生的酶活较高。

氨基酸态氮是一项用来评价发酵程度和产品品质的常用指标。氨基酸态氮的产生是在发酵过程中由于发酵微生物的产溶栓酶作用,使黑豆中的蛋白质分解成多肽和氨基酸等可溶性含氮物。同时氨基酸态氮也是风味物质物质的重要组成,其含量越高,产品的口感风味越好^[35-36]。说明最佳发酵淡豆豉的生产工艺、发酵程度和产品品质均比市售淡豆豉要好。

2.7.2 最优工艺发酵淡豆豉质构分析及其对比 目前,对淡豆豉发酵过程中的营养物质成分动态分析较多,对纯种发酵后所得的淡豆豉评价较为单一^[37],未找到对淡豆豉口感和质构相关方面的研究,本文将研究所得的最优发酵淡豆豉与市售淡豆豉进行对比,结果如表 5 所示。

表5 淡豆豉质构分析结果

Table 5 Texture analysis of semen sojae praeparatum

	硬度(N)	弹性(mm)	咀嚼性(mJ)
黑豆	36.27 ± 1.56 ^a	1.82 ± 0.09 ^a	10.23 ± 0.57 ^a
最优工艺发酵淡豆豉	19.37 ± 1.03 ^c	0.39 ± 0.05 ^c	3.97 ± 0.34 ^c
市售淡豆豉	24.32 ± 1.46 ^b	0.79 ± 0.08 ^b	7.73 ± 0.42 ^b

注:同一指标不同字母表示有显著差异($p < 0.05$)。

在发酵过程中微生物会产生溶栓酶,而溶栓酶能够将纤维素降解,因而发酵后淡豆豉硬度、弹性和咀嚼性下降。由表 5 可以看出,最优工艺发酵淡豆豉较市售淡豆豉在硬度、弹性和咀嚼性等方面均有显著性降低($p < 0.05$),原因可能是,最优工艺发酵淡豆豉因其溶栓酶含量更高,并且经过豆子发芽过程,其本身纤维素含量下降、质地变软,故而最终成品表现为硬度、弹性和咀嚼性降低。

2.8 干燥淡豆豉粉与市售纳豆激酶粉溶栓酶活力对比

将经过干燥粉碎后得到的最优发酵淡豆豉粉与市售某品牌纳豆激酶粉,按照溶栓酶酶活力测定方法进行测定,平均溶栓酶酶活力分别为(16350 ± 667.1)、(13421 ± 961.2) U/g,最优工艺发酵淡豆豉粉的溶栓酶酶活力高出市售纳豆激酶粉的溶栓酶酶活力 22%。

3 结论

黑豆相比黄豆、红豆、绿豆、白芸豆更适合作为

淡豆豉的发酵原料,且经过发芽处理后,淡豆豉溶栓酶活力极显著提高;其他单因素中,发酵温度和发酵时间对溶栓酶活力影响显著($p < 0.05$);通过响应面试验优化淡豆豉的发酵条件,确定最优发酵工艺为:黑豆发芽 38 h,发酵温度 31 ℃,发酵时长 7 d,接种量 15%,该工艺生产得到的淡豆豉溶栓酶活力达 $(17122 \pm 392.7) \text{ U/g}$;与市售淡豆豉进行对比,发现最优发酵淡豆豉的蛋白质、氨基酸态氮、还原糖含量均明显增加,豆豉鲜味更明显,另外脂肪、碳水化合物和粗纤维含量有所降低;质构分析表明,中国根霉 12 发酵的淡豆豉硬度、弹性和咀嚼性都明显低于市售淡豆豉。应用中国根霉 12 经过最优工艺发酵淡豆豉,产品的发酵程度和发酵品质良好,可利用其进一步研发具有高效溶栓活性的淡豆豉系列产品。

参考文献

- [1] Bouras G, Burns E M, Howell A, et al. Risk of post-discharge venous thromboembolism and associated mortality in general surgery: A population-based cohort study using linked hospital and primary care data in England [J]. Plos One, 2015, 10 (e014575912).
- [2] 张彬, 孙晓江. 溶栓药物的基础和临床研究的新进展 [J]. 中国临床神经科学 2008(1): 108-111.
- [3] 李淑英, 赵仲麟, 聂莹, 等. 纳豆激酶研究进展 [J]. 中国农业科技导报 2013(4): 139-143.
- [4] 蔡尤林, 杜冰, 余飞, 等. 豆豉营养成分及研究进展 [J]. 中国调味品 2015(6): 119-123.
- [5] 阎家麒, 童岩, 臧莹安. 豆豉纤溶酶的纯化及其性质研究 [J]. 药物生物技术 2000(3): 149-152.
- [6] Wang C. Evaluation of thrombolytic efficacy and target to thrombus of RGDS-lipid nanoparticles carrying subtilisin FS33 *in vivo* [J]. New Biotechnology 2009 251: S30-S31.
- [7] 霍红, 田明, 王秀海, 等. 大豆与其生物发酵制品淡豆豉异黄酮含量研究 [J]. 中医药学报 2011(3): 74-76.
- [8] 毛峻琴, 徐超斗, 陈大贵, 等. 淡豆豉提取物对急性辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. 解放军药科学学报 2014(2): 110-113.
- [9] 赵丽军. 中药淡豆豉的质量及其抗骨质疏松的物质基础研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学 2013.
- [10] 吴满刚, 吴雪燕, 管泳宇, 等. 豆豉生产中高产蛋白酶的米曲霉诱变及产酶条件优化 [J]. 食品科技 2014(5): 10-14.
- [11] 张彬, 孙晓江. 溶栓药物的基础和临床研究的新进展 [J]. 中国临床神经科学 2008(1): 108-111.
- [12] 贾亭亭, 牛广财, 朱丹, 等. 香味休闲淡豆豉的研制 [J]. 中国调味品 2014(9): 98-101.
- [13] 贾亭亭, 牛广财, 朱丹, 等. 香辣淡豆豉的研制 [J]. 中国酿造 2014(7): 144-147.
- [14] 贾亭亭. 淡豆豉发酵工艺及其休闲食品开发 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学 2015.
- [15] 汤学明, 范丽君, 权兴沪. 食用水豆豉引起的 A 型肉毒毒素中毒 [J]. 预防医学情报杂志 2001(5): 406-407.
- [16] 赵洪奎, 林景珠, 李庆方, 等. 食用自制豆豉致肉毒杆菌食物中毒 7 例报道 [J]. 中国临床医生 2001(11): 40.
- [17] 杜冰, 潘力, 林炜铁, 等. 中国根霉 12 菌株溶栓酶产生条件和性质 [J]. 无锡轻工大学学报 1999(5): 149-152.
- [18] 刘晓兰, 杜连祥, 路福平, 等. 根霉 12 号固体发酵产生纤溶酶工艺条件的研究 [J]. 菌物系统 2003(3): 481-488.
- [19] 庞庆芳. 豆豉溶栓酶的分离纯化及酶学性质研究 [D]. 泰安: 山东农业大学 2006.
- [20] GB.5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社 2016.
- [21] GB.5009.235-2016 食品安全国家标准食品中氨基酸态氮的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社 2016.
- [22] GB.5009.6-2016 食品安全国家标准食品中脂肪的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社 2016.
- [23] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定 [J]. 河南农业科学 2010(4): 115-118.
- [24] 林晓华. 曲霉型豆豉的发酵条件及挥发性成分的研究 [D]. 南昌: 南昌大学 2013.
- [25] 丛建民. 黑豆的营养成分分析研究 [J]. 食品工业科技, 2008(4): 262-264.
- [26] Wenhua L, Yong G, Shuangyan H. High-level expression of douchi fibrinolytic enzyme (DFE) in *Bacillus subtilis* WB 800 [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(4): 565-569.
- [27] 张敏, 吴运莉, 王鹏娇, 等. 淡豆豉药材发酵前后活性成分的变化研究 [J]. 时珍国医国药 2015(2): 363-364.
- [28] Tsai Y, Kung H, Chang S, et al. Histamine formation by histamine-forming bacteria in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product [J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1305-1311.
- [29] 来吉祥, 魏少敏, 方云, 等. 黑豆萌发后主要成分变化及其生物活性研究进展 [J]. 大豆科学 2013(6): 840-844.
- [30] 汪洪涛, 陈成, 余芳, 等. 3 种大豆发芽过程中营养成分变化规律研究 [J]. 食品与机械 2015(1): 30-32.
- [31] 王慧. 大豆品种及发芽时间对豆芽营养成分与产量的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学 2014.
- [32] 许金光, 陈丽. 产豆豉纤溶酶高产菌株的筛选及诱变育种 [J]. 中国酿造 2008(9): 64-66.
- [33] Vijayaraghavan P, Vincent S G P. Statistical optimization of fibrinolytic enzyme production using agroresidues by *Bacillus cereus* IND1 and its thrombolytic activity *in vitro* [J]. Biomed Research International 2014 2014(3): 725064.
- [34] Ma Y L, Wang J H, Cheng Y Q, et al. Selected quality properties and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-salt sufu, a new type of Chinese fermented tofu [J]. International Journal of Food Properties, 2014, 17(9): 2025-2038.
- [35] Wang S H, Zhang C, Yang Y L, et al. Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* LD-8547 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2008 24(4): 475-482.
- [36] Fan J, Zhang Y, Chang X, et al. Changes in the radical scavenging activity of bacterial-type douchi, a traditional fermented soybean product, during the primary fermentation

(下转第 111 页)

因此这两方面的机制体现不显著。

斯晗^[21]研究表明谷氨酸棒杆菌催化 GABA 分解代谢的 γ -氨基丁酸转氨酶和 γ -氨基丁酸转氨酶-琥珀酸半醛脱氢酶偶联酶在 pH5.0 以上时已具有催化活性,当 pH 大于 6.0 时,酶活性快速升高。然而,图 4 显示在 pH4.2~5.8 范围内,不存在 GABA 被下游酶代谢的情况,可能测试的 pH 尚未达到 *E. faecium* GDMCC60203 代谢 GABA 的 γ -氨基丁酸转氨酶或 γ -氨基丁酸转氨酶-琥珀酸半醛脱氢酶偶联酶的活性依赖的 pH。基于 732 阳离子交换树脂可交换结合 GABA,减少游离 GABA,预期 732 阳离子交换树脂在防止 GABA 被下游酶代谢方面也将有很好的作用,有待进一步验证。

综合以上分析可见,732 阳离子交换树脂可以通过离子交换而释放 H^+ 、L-Glu 及结合 GABA,调节反应液 pH,并增加反应液中游离底物浓度和降低游离产物浓度,增大细胞内外浓度差,克服细胞传质障碍,加快细胞内外物质运送速度,从而提高细胞 GAD 的表现活力。

参考文献

- [1] Dhakal R, Bajpai VK, Baek K-H. Production of gaba (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review [J]. Brazilian Journal of Microbiology 2012, 43(4): 1230-1241.
- [2] Jorge J M P, Leggewie C, Wendisch V F. A new metabolic route for the production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* from glucose [J]. Amino Acids, 2016, 48(11): 2519-2531.
- [3] 杨成丽, 马子玉, 胡晓丽, 等. 化学-酶催化法制备 D-谷氨酸与 γ -氨基丁酸 [J]. 化学与生物工程 2013, 30(11): 55-56.
- [4] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 唾液链球菌嗜热亚种 Y-2 细胞转化法制备 γ -氨基丁酸 [J]. 食品科学, 2011, 32(1): 162-167.
- [5] 李云, 杨胜远, 陈郁娜, 等. 戊糖片球菌 HS2 细胞制备 γ -氨基丁酸的研究 [J]. 湖北农业科学 2010, 49(6): 1450-1453.
- [6] 李云, 杨胜远, 陈郁娜, 等. 屎肠球菌 HS3 细胞转化法生物合成 γ -氨基丁酸的研究 [J]. 广东农业科学, 2010, 37(6): 12-14.
- [7] Choi S I, Lee J W, Park S M, et al. Improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057 [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology 2006, 16(4): 562-568.
- [8] Plokhov A Y, Gussyatiner M M, Yampolskaya T A, et al. Preparation of γ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology 2000, 88: 257-265.

- [9] Ke C, Yang X, Rao H, et al. Whole-cell conversion of L-glutamic acid into gamma-aminobutyric acid by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Springer Plus 2016, 5: 591-598.
- [10] 时黎, 刘昭明, 黎娅, 等. 重组谷氨酸脱羧酶的分离纯化与酶学性质研究 [J]. 食品工业 2016, 37(2): 184-188.
- [11] 陈琳, 张充, 吕凤霞, 等. 重组谷氨酸脱羧酶大肠杆菌合成 γ -氨基丁酸条件的优化 [J]. 食品科学, 2015, 36(1): 158-163.
- [12] Yang S Y, Lin Q, Lu Z X, et al. Characterization of a novel glutamate decarboxylase from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Y2 [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 2008, 83(6): 855-861.
- [13] 赵伟睿, 柯丕余, 胡升, 等. 有机溶剂透性化处理谷氨酸脱羧酶工程菌制备 γ -氨基丁酸的研究 [J]. 高等化学工程学报 2015, 19(1): 138-144.
- [14] 杨胜远, 李云. 双向单因素与田口法优化屎肠球菌产谷氨酸脱羧酶培养基 [J]. 食品科学 2018, 39(4): 90-98.
- [15] 杨胜远, 江敏, 胡小军, 等. 一种富含天然 γ -氨基丁酸的新食材 [J]. 食品研究与开发 2017, 38(22): 153-157.
- [16] Christensen J E, Dudley E G, Pedersen J A, et al. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76(1): 217-246.
- [17] De B D, Tramonti A, Bossa F, et al. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: Role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system [J]. Molecular Microbiology, 1999, 32(6): 1198-1211.
- [18] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10(1-3): 67-79.
- [19] Foster J W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile [J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2: 898-907.
- [20] Yu K, Lin L, Hu S, et al. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH [J]. Enzyme and Microbial Technology 2012, 50(4-5): 263-269.
- [21] 斯晗. 产 γ -氨基丁酸重组谷氨酸棒杆菌的构建及其相关分解酶的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2016: 12.
- [22] 李占占, 王恬. GABA 的生物学功能及其在养鸡生产中的应用 [J]. 畜牧与兽医 2014, 46(1): 115-120.
- [23] 李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 431.
- [24] Dinh T H, Ho N A T, Kang T J, et al. Salt-free production of γ -aminobutyric acid from glutamate using glutamate decarboxylase separated from *Escherichia coli* [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 2014, 89: 1432-1436.

(上接第 104 页)

- process [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 2009, 73(12): 2749-2753.
- [37] Kotb E. Purification and partial characterization of serine

- fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from Kishk, a traditional Egyptian fermented food [J]. Applied Biochemistry and Microbiology 2015, 51(1): 34-43.