

不同条件对纳豆菌发酵蛤蜊产物中游离氨基酸态氮含量及纳豆激酶活性的影响

王文秀, 于佳, 李钊, 魏玉西*, 宋惠平, 许丽娜
(青岛大学生命科学学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用纳豆菌发酵蛤蜊, 研究发酵产物中游离氨基酸态氮的含量及纳豆激酶活性, 并以二者为评价指标, 探索其最佳发酵条件。经单因素和正交设计试验结果表明: 发酵温度为43℃、接种量为0.6%、发酵时间为48 h、料水比为1:2 (*m/V*) 时发酵产物中游离氨基酸态氮含量最高(转化率可达71.10%); 发酵温度为41℃、接种量为0.8%、发酵时间为48 h、料水比为1:3 (*m/V*) 时发酵产物中纳豆激酶活性最高。

关键词: 蛤蜊; 纳豆菌; 发酵; 游离氨基酸态氮; 纳豆激酶活性

Effects of Different Conditions on Free Amino Nitrogen Content and Nattokinase Activity in *Bacillus natto*-Fermented Clam

WANG Wenxiu, YU Jia, LI Shan, WEI Yuxi*, SONG Huiping, XU Lina
(College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: The optimization of conditions for clam fermentation with *Bacillus natto* for improved free amino nitrogen content and nattokinase activity was conducted by the combined use of single factor method and orthogonal array design. The maximum free amino nitrogen content, representing a conversion rate of 71.10%, was obtained when the fermentation was performed at 43℃ for 48 h with an inoculum amount of 0.6% and a solid-to-water ratio of 1:2 (*m/V*), while the maximum nattokinase activity was achieved after 48 h of fermentation at 41℃ with an inoculum amount of 0.8% and a solid-to-water ratio of 1:3 (*m/V*).

Key words: clam; *Bacillus natto*; fermentation; free amino nitrogen; nattokinase activity

中图分类号: TQ464

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)09-0113-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201509021

目前, 采用传统发酵法加工的水产品品种不多, 产品的附加值不高。例如, 传统的自然发酵法生产虾酱的工艺, 由于发酵周期长、条件不易控制、产品盐度高、缺点, 使其生产量、食用范围均受到一定限制。

纳豆菌属细菌科、芽孢杆菌属, 是纳豆的生产菌种, 同时又是人体有益菌群^[1]。纳豆菌能分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质, 因而纳豆类发酵产品中富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体吸收的营养成分。同时, 纳豆制品中纳豆激酶等活性物质尚具有诸如溶血栓、抗肿瘤、降血压等多种保健功能, 还可预防骨质疏松、提高蛋白质的消化率, 促进小肠黏膜细胞的增殖, 保证肠功能等^[2-6]。

近年来, 随着人们对纳豆菌保健功能认识的深入, 我国已有学者将纳豆菌用于发酵虾头虾壳^[7]、紫菜^[8], 与乳酸菌共同发酵制酸奶以及以果渣为底物发酵剩余豆渣

等研究报道^[9-10]。蛤蜊是沿海地区常见的营养丰富且价格相对低廉的贝类海产品, 本实验拟以蛤蜊为纳豆菌发酵原料, 探讨使发酵物中游离氨基酸及纳豆激酶含量最高的工艺方法, 以期为蛤蜊等贝类的高值化利用提供新思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

纳豆菌(活菌数为 1.0×10^9 CFU/g) 中山市纳豆微生物制品有限公司; 蛤蜊 青岛大润发超市。

1.2 仪器与设备

电子天平 奥豪斯仪器(上海)有限公司; 85-2型恒温磁力搅拌器 上海司乐仪器公司; Sartorius PB-10 pH计 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 721可见

收稿日期: 2014-07-27

基金项目: 青岛市科技计划项目(13-1-3-73-nsh); 山东省自然科学基金项目(ZR2012DM014)

作者简介: 王文秀(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物活性物质。E-mail: 624101589@qq.com

*通信作者: 魏玉西(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为海洋生物资源高值化利用。E-mail: yxwei@qdu.edu.cn

分光光度计 上海精密仪器有限公司; HH4数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅 上海博迅实业有限公司; GL-20G高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; SW-CJ-1FD洁净工作台 苏净集团·苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料处理

选取长度约为4 cm鲜活蛤蜊, 经清水吐沙后于蒸锅中微蒸, 待外壳张开后取肉、匀浆。

1.3.2 游离氨基酸态氮 (free ammonia nitrogen, FAN) 含量的测定

参照文献[11]进行, 准确称取混合均匀的样品1.0 g, 加入5 mL蒸馏水, 充分搅拌, 移入100 mL容量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。用干滤纸过滤, 弃去滤渣。吸取20.0 mL上述样品稀释液于200 mL烧杯中, 加水60 mL, 开动恒温磁力搅拌器, 用0.05 mol/L NaOH标准溶液滴至酸度计指示为pH 8.2。加入10.0 mL甲醛溶液, 混匀。再用0.05 mol/L NaOH标准溶液继续滴定至pH 9.2, 记录标准溶液消耗的体积 (V_1 , mL)。取80 mL水, 在同样的条件下做试剂的空白实验, 记录标准溶液消耗的体积 (V_0 , mL)。游离氨基酸态氮含量 (X) 计算见公式 (1)。

$$X/\% = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 0.014}{m \times 20/100} \times 100 \quad (1)$$

式中: c 为氢氧化钠标准溶液浓度/(mol/L); m 为测定样品质量/g。

1.3.3 纳豆激酶 (natto kinase, NK) 活性的测定

采用Folin-酚法^[12], 精确称取1.0 g干酪素, 用适量氢氧化钠溶解, 并加入pH 7.8的磷酸盐缓冲液配制1%酪蛋白溶液。取1.0 g发酵物, 用5 mL生理盐水浸提12 h后得NK粗提液^[13]。取2 mL酪蛋白溶液加入2 mL NK粗酶液, 于40 °C水浴酶解为1 h, 加入2 mL 10%的三氯乙酸使NK酶失活, 终止酶解反应。取反应液于5 000 r/min离心10 min, 取上清液按Folin-酚法测定其OD_{680 nm}值, 计算酶活力。酶活力单位定义为在40 °C, pH 7.2的条件下, 1 g固体发酵物水解酪蛋白每分钟产生1 μg酪氨酸为一个酶活力单位 (IU)。

1.3.4 发酵原料中总氮含量测定

总氮含量按照GB/T 5009.5—2003《食品中蛋白质的测定》方法测定^[14]。

$$\text{氨基酸态氮转化率}/\% = \frac{\text{氨基酸态氮含量}/\%}{\text{发酵原料总氮含量}/\%} \times 100 \quad (2)$$

1.3.5 纳豆菌发酵蛤蜊肉的单因素试验

各因素试验及后续正交试验均作3组平行, 结果取平均值。发酵完毕后熟24 h, 分别用甲醛滴定法、Folin-酚方法测定发酵液中游离氨基酸态氮含量和纳豆激酶活性, 以此评价发酵效果并确定单因素数值范围。

1.3.5.1 发酵时间的选择

取蛤蜊肉5 g, 水5 mL, 121 °C灭菌20 min, 接入质量分数为0.2%的纳豆菌固体粉末, 放入43 °C恒温培养箱中分别发酵16、24、32、40、48、56、64 h。

1.3.5.2 发酵温度的选择

取蛤蜊肉5 g, 水5 mL, 121 °C灭菌20 min, 接入质量分数为0.2%的纳豆菌固体粉末, 分别放入37、39、41、43、45、47 °C的恒温培养箱中发酵48 h。

1.3.5.3 接种量的选择

取蛤蜊肉5 g, 水5 mL, 121 °C灭菌20 min, 分别接入质量分数为0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%的纳豆菌固体粉末, 放入43 °C恒温培养箱中发酵48 h。

1.3.5.4 料水比 (m/V) 的选择

取蛤蜊肉5 g, 分别加水2.5、5、7.5、10、12.5、15 mL, 121 °C灭菌20 min, 接入质量分数为0.2%的纳豆菌固体粉末, 放入43 °C恒温培养箱中发酵48 h。以游离氨基酸态氮总量为考察指标, 即发酵后产物的总量乘以游离氨基酸态氮含量得来的, 由于值比较低, 故将其换算成g/100 g来表示。

1.3.6 正交试验方案设计

取蛤蜊肉5 g, 根据上述单因素试验结果, 按照L₁₆ (4⁵) 方案设计正交试验。

1.4 数据处理

实验数据采用SPSS 19.0软件分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 发酵时间的选择

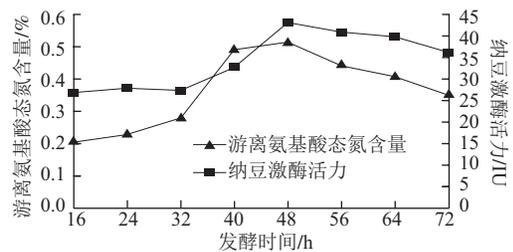


图1 发酵时间对游离氨基酸态氮含量及纳豆激酶活性的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on free amino nitrogen concentration and natto kinase activity

由图1可知, 在48 h发酵时间内, 随着发酵时间的延长, 游离氨基酸态氮含量呈上升趋势, 48 h达到最高值0.511%, 之后缓慢下降。这是因为发酵时间过短, 则蛤蜊发酵不完全, 发酵过程中产生的酶类不足以分解蛋白质产生游离氨基酸; 而发酵时间过长, 在发酵成熟过程中产生的脱羧酶将游离氨基酸降解为生物胺 (如亚精胺、精胺、腐胺和酪胺等)^[15], 不仅降低了游离氨基酸态氮的含量, 产生的生物胺对人体也极有害。在72 h

发酵时间内, 纳豆激酶活力的变化趋势同游离氨基酸态氮含量基本一致, 都是在发酵时间达48 h时最高, 为42.86 IU。

2.1.2 发酵温度的选择

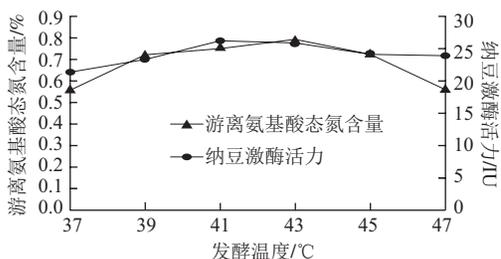


图2 发酵温度对游离氨基酸态氮含量及纳豆激酶活性的影响
Fig.2 Effect of fermentation temperature on free amino nitrogen concentration and natto kinase activity

由图2可知, 发酵温度为43 °C时最有利于纳豆菌发酵蛤蚧产生游离氨基酸态氮。这是因为, 温度过低纳豆菌代谢缓慢, 对蛤蚧的分解利用率低, 致使游离氨基酸态氮含量低; 若温度过高也不利于菌体生长^[16]。因此, 就指标FAN而言, 最佳发酵温度为43 °C, 游离氨基酸态氮含量可达0.791%; 就纳豆激酶活性而言, 发酵温度为41 °C时发酵产物的纳豆激酶活力最高, 为25.8 IU。

2.1.3 纳豆菌接种量的选择

接种量的大小是由生产菌种生长繁殖的速度决定的。一般说来, 采用较大的接种量可以缩短发酵时间, 使发酵产物的形成时间提前, 同时也可减少杂菌的生长机会。但纳豆菌是需氧菌^[17], 接种量过大对发酵会产生不良影响, 引起溶氧不足进而影响产物合成^[18]。此外, 接种量过大, 菌体繁殖过快, 菌体生长所需的养分不足, 游离出来的氨基酸会被菌体重新利用, 进而使游离氨基酸态氮的含量降低^[19-20], 另外, 接种量过大还会增加原料成本。纳豆菌接种量对蛤蚧发酵效果的影响见图3, 接种量的大小将直接影响纳豆菌对蛤蚧的发酵利用。当接种量为0.8%时, 发酵产生的游离氨基酸态氮含量、纳豆激酶活性均达最高(分别为0.651%和53.814 IU), 此后开始降低。

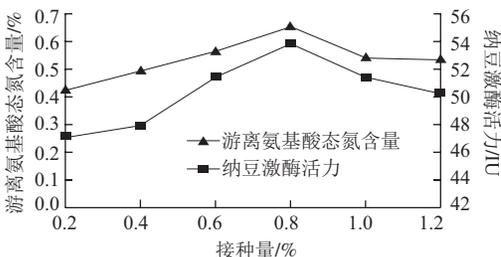


图3 纳豆菌接种量对游离氨基酸态氮含量及纳豆激酶活性的影响
Fig.3 Effect of inoculum quantity on free amino nitrogen concentration and natto kinase activity

2.1.4 料水比的选择

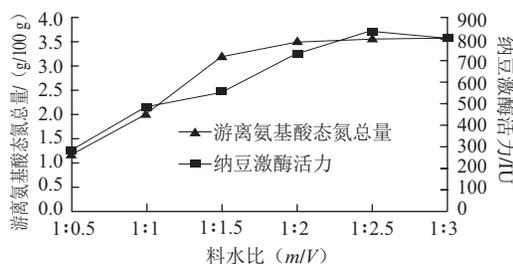


图4 料水比对游离氨基酸态氮总量及纳豆激酶活性的影响
Fig.4 Effect of solid-to-water ratio on free amino nitrogen concentration and natto kinase activity

由图4可知, 在原料用量一定的情况下, 随着用水量的增加, 发酵物中游离氨基酸态氮的总量、纳豆激酶活性均显著增加, 当料水比达到1:2以后, 游离氨基酸态氮的总量增加趋于平缓; 当料水比达到1:2.5时, 产物的纳豆激酶活性最高, 总酶活力为838.78 IU。

2.2 正交试验结果

2.2.1 以游离氨基酸态氮总量为评价指标

表1 以游离氨基酸态氮总量为评价指标的正交试验方案及结果
Table 1 Orthogonal array design with experimental values of free amino nitrogen concentration

试验号	A发酵温度/°C	B发酵时间/h	C接种量/%	D料水比 (m/V)	游离氨基酸态氮总量/(g/100g)
1	1 (39)	1 (32)	1 (0.4)	1 (1:1)	1.070
2	1	2 (40)	2 (0.6)	2 (1:1.5)	2.275
3	1	3 (48)	3 (0.8)	3 (1:2)	4.165
4	1	4 (56)	4 (1.2)	4 (1:2.5)	2.200
5	2 (41)	1	2	3	2.670
6	2	2	1	4	3.615
7	2	3	4	1	4.350
8	2	4	3	2	4.110
9	3 (43)	1	3	4	4.410
10	3	2	4	3	5.445
11	3	3	1	2	6.940
12	3	4	2	1	6.185
13	4 (45)	1	4	2	3.430
14	4	2	3	1	3.775
15	4	3	2	4	5.425
16	4	4	1	3	4.770
k ₁	2.428	2.895	4.099	3.845	
k ₂	3.686	3.778	4.139	4.189	
k ₃	5.745	5.220	4.115	4.263	
k ₄	4.350	4.316	3.856	3.913	
R	3.317	2.325	0.281	0.418	

正交试验方案与结果见表1。根据极差R分析可知, 影响其大小的因素顺序依次为A>B>D>C, 因此温度对发酵产生游离氨基酸态氮的影响最大, 其次依次为发酵时间、料水比和接种量; 根据均值结果k₁、k₂、k₃、k₄分析可知, 最优组合为: A₃B₃C₂D₃, 因此纳豆菌发酵蛤蚧产生游离氨基酸态氮的最适宜条件为: 发酵温度43 °C、

发酵时间48 h、接种量0.6%、料水比1:2 (m/V)。经凯氏定氮法测得样品总氮含量为9.76 g/100 g, 则游离氨基酸态氮转化率为71.10%。

2.2.2 以纳豆激酶活力为评价指标

正交试验方案与结果见表2。根据极差结果 R 分析可知, $D>B>A>C$, 因此料水比对发酵产物中纳豆激酶活力的影响最大, 其次依次为发酵时间、发酵温度和接种量; 根据均值结果 k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 分析可知, 最优组合为: $A_2B_3C_3D_4$, 因此纳豆菌发酵蛤蜊产高活力纳豆激酶的最适宜条件为: 发酵温度41 °C、发酵时间48 h、接种量0.8%、料水比1:3。

表 2 以纳豆激酶活力为评价指标的正交试验方案及结果
Table 2 Orthogonal array design with experimental values of nattokinase activity

试验号	A发酵温度/°C	B发酵时间/h	C接种量/%	D料水比	纳豆激酶活力/ IU
1	1 (39)	1 (32)	1 (0.4)	1 (1:1.5)	656.22
2	1	2 (40)	2 (0.6)	2 (1:2)	877.42
3	1	3 (48)	3 (0.8)	3 (1:2.5)	1 116.54
4	1	4 (56)	4 (1.2)	4 (1:3)	1 041.97
5	2 (41)	1	2	3	1 061.47
6	2	2	1	4	1 193.87
7	2	3	4	1	918.91
8	2	4	3	2	942.33
9	3 (43)	1	3	4	926.95
10	3	2	4	3	981.85
11	3	3	1	2	970.73
12	3	4	2	1	538.2
13	4 (45)	1	4	2	753.39
14	4	2	3	1	759.24
15	4	3	2	4	1 192.28
16	4	4	1	3	807.29
k_1	923.037	849.508	907.027	718.173	
k_2	1 029.145	953.095	917.372	885.967	
k_3	854.463	1 049.615	936.265	991.788	
k_4	878.050	832.478	924.030	1 088.767	
R	174.668	217.137	29.238	370.594	

3 结论

以纳豆菌发酵蛤蜊单因素试验和正交设计结果表明: 发酵温度为43 °C、接种量为0.6%、发酵时间为48 h、料水比为1:2时发酵产物中游离氨基酸态氮总量最高(转化率可达71.10%); 发酵温度为41 °C、接种量为0.8%、发酵时间为48 h、料水比为1:3时发酵产物的

纳豆激酶活性最高。本实验研究结果为以蛤蜊为原料通过纳豆菌发酵生产出富含游离氨基酸和纳豆激酶的调味品、保健食品, 从而实现蛤蜊资源的高值化利用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 布坎南R E, 吉布斯N E. 伯杰细菌学鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 735.
- [2] 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.
- [3] ESAKI H, ONOZAKI H, OSAWA T. Antioxidative activity of fermented soybean products[M]//HUANG M T. Food phytochemicals for cancer prevention I, fruits and vegetables. Washington D C: American Chemical Society, 1994: 353-360.
- [4] 钟青萍, 王斌, 石木标. 多功能保健食品: 纳豆[C]//2002年广州市微生物学会年会论文集. 广州: 2002: 12-16.
- [5] SUMI H. Antibacterial activity of *Bacillus natto*-growth inhibition against *Escherichia coli*-O157[J]. *Bioindustry*, 1997, 14: 47-49.
- [6] SUMI H. Accumulation of vitamin K (menaquinone-7) in plasma after indigestion of natto and natto bacilli (*B. subtilis natto*)[J]. *Food Science and Technology Research*, 1999, 5: 48-50.
- [7] 付刚, 武利刚, 段杉, 等. 纳豆菌发酵虾头、虾壳过程所产蛋白酶的活力影响因素研究[J]. *中国调味品*, 2013, 38(11): 9-13.
- [8] 罗克轩. 以体外分析模式探讨紫菜纳豆菌发酵产品之抗氧化及抗炎活性[D]. 基隆: 台湾海洋大学, 2012: 22-53.
- [9] 黎婉园, 陈中, 夏枫耿, 等. 利用纳豆菌种发酵奶液的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2011(1): 82-85.
- [10] ZHANG Hong, LUO Yongquan, HUANG Zhibing, et al. Optimization of solid state fermentation conditions using a mixture of bean curd residue and marc with *Bacillus natto*[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(4): 474-476; 519.
- [11] 王永华, 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 139-140.
- [12] 胡静. 纳豆激酶的活性测定[J]. *海峡药学*, 2013, 25(5): 47-48.
- [13] 鲍艳霞, 陈钧, 王萍, 等. 影响纳豆激酶酶促反应速度因素的研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2004, 26(3): 70-72.
- [14] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [15] 王永丽, 李锋, 陈肖, 等. 传统发酵肉制品中生物胺形成机理及检测控制技术[J]. *肉类研究*, 2013, 27(6): 39-43.
- [16] 黄占旺, 魏萍, 刘海林, 等. 纳豆菌生物学特性研究[J]. *江西农业大学学报*, 2004, 26(1): 83-85.
- [17] 满丽莉, 向殿军. 纳豆菌培养条件的初步研究[J]. *农产品加工: 学刊*, 2008(8): 51-53.
- [18] 王阳, 张景, 陈聪, 等. 纳豆菌液态发酵产低分子大豆蛋白肽的工艺优化[J]. *大连工业大学学报*, 2012, 31(3): 161-164.
- [19] 丛俊英, 张淑莲, 王阳, 等. 纳豆菌发酵鱼肉蛋白制备低分子肽的工艺研究[J]. *大连工业大学学报*, 2011, 30(6): 416-419.
- [20] KUBO Y, INAOKA T, HACHIYA T, et al. Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto fermentation showing enhanced exoenzyme production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 654-657.