

纳豆芽孢杆菌发酵米糠上清液的 抗氧化功能研究

祁红兵^{1,2}, 陈 钧^{1,*}, 何 佳¹, 徐 骅¹, 熊郁云¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013 2. 信阳师范学院生命科学学院, 河南 信阳 464000)

摘 要: 设计单因素和正交试验, 以羟自由基清除率为衡量指标, 筛选出纳豆菌发酵米糠的最佳条件: 5% 的米糠, 1% 的酵母粉, 初始 pH 7.0, 接种量 4%, 装瓶量 25ml, 温度为 27℃, 140r/min 培养 48h。在此条件下纳豆菌发酵米糠的羟自由基清除活性最高。体外方法测定米糠发酵上清液和米糠水提液清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 及抑制猪油氧化的能力。结果显示两者均具有抗氧化活性, 但前者具有更大的活性, 其中米糠发酵上清液对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除率 IC_{50} 分别为 3.55mg/ml 和 23.5mg/ml, 比米糠水提液分别增加 0.3、10 倍; 在抑制猪油氧化实验中, 发酵米糠上清液的活力略强于米糠水提液, 效果于 VE 相近。实验证明纳豆菌发酵米糠能产生更强的抗氧化活力, 在保健食品方面有开发潜力。

关键词: 纳豆芽孢杆菌; 米糠; 羟自由基; 清除活性; 抗氧化

Supernatant Antioxidative Activities of Fermented Rice Bran Extract by *Bacillus Natto*

QI Hong-bing^{1,2}, CHEN Jun^{1,*}, HE Jia¹, XU Hua¹, XIONG Yu-yun¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract: With single-factor research and orthogonal test as principle, the scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$ was determined. The scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$ was highest when main parameters are found as follows: 5% rice bran, 1% yeast powder, initial pH 7.0, inoculum size 4%, medium content 25ml, temperature 27℃ and 140 r/min for 48 h. The scavenging capacities of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ and inhibitory effects were found to highly oxidate axunge *in vitro*. Both supernatant fermented rice bran by *Bacillus natto* and water extract of rice bran have shown antioxidant activity *in vitro*, but the former is 0.3 fold and 10 fold higher than the same concentration of the latter, with IC_{50} of $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ 3.55 mg/ml and 23.5 mg/ml respectively. In inhibiting oxidation to axunge, the former is of higher antioxidative activities than the latter. Antioxidative activities of supernatant fermented rice bran is similar to those of VE. This is a perfect natural healthy food of higher antioxidant activity in fermented rice bran by *Bacillus natto*.

Key words *Bacillus natto*; rice bran; hydroxyl radicals; scavenging capacity; antioxidation

中图分类号: TS201.3 TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0293-05

米糠(rice bran)是大米加工的主要副产物, 是稻谷脱壳后依附在糙米上的表面层, 它是由外果皮、中果皮、交联层、种皮及糊粉层组成, 占稻谷重量的 5%~7%, 富含优质蛋白、纤维素、矿物元素、VB 族、大量食物纤维素等营养素及多糖、VE、生育三烯酚、 γ -谷维醇、28 碳烷醇、角鲨烯、神经酰胺等活性物质, 蛋白质及氨基酸种类较齐全, 具有非常高的保健开发价值^[1-3]。但米糠不易保存, 营养成分容易损失, 主要的

抗氧化成分生育三烯酚、生育酚、 γ -谷维醇和多种不饱和脂肪酸等成分多以结合态存在于米糠中, 不容易为人体吸收, 加之口感较差, 因此目前国内米糠健康食品很少。

纳豆(natto)是以大豆为原料经纳豆菌发酵而成的食品, 含有增强大脑活力的卵磷脂、溶解血栓防止老化的纳豆激酶、防止痴呆症的维生素及保持肠胃活力的低聚糖。纳豆的发酵菌株纳豆芽孢杆菌具有溶血栓、抗

收稿日期: 2006-11-08

作者简介: 祁红兵(1971-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事天然产物研究。E-mail: qhbing2006@mail2.xyt.c.edu.cn

* 通讯作者: 陈钧(1947-), 男, 教授, 主要从事生物活性成分提取研究。E-mail: shchen@ujs.edu.cn

肿瘤、抗菌、预防骨质疏松症、抗氧化及调节肠功能等作用^[4]。纳豆芽孢杆菌还是我国农业部规定的12种可直接饲喂微生物之一。但目前国内对纳豆芽孢杆菌的应用往往局限在纳豆及纳豆激酶^[5-7]，在其他方面的应用却涉及较少。

本研究以益生菌纳豆芽孢杆菌作为发酵菌株，利用价廉、营养丰富的米糠作为基本基质进行发酵优化，采用离体实验系统检测发酵米糠上清液的抗氧化功能，为开发米糠保健食品或天然抗氧化剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与材料

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)由江苏大学药学院保存。

新鲜米糠(高压蒸气处理) 镇江市上党乡薛村米厂；猪油为新鲜猪板油，实验室熬制，过滤后置冰箱内备用。

1.2 试剂

番红、过氧化氢、氯化钙、硫酸镁、乙二胺四乙酸二钠、硫酸亚铁、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、葡萄糖、硝酸钾、硫酸铵、硝酸铵、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、VE、叔丁基羟基茴香醚(BHA)等均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器

SPX-250B型生化培养箱 上海跃进医疗器械厂；QYC 211型恒温振荡器 江苏金坛医疗仪器厂；HH-S数显恒温水浴锅 江苏金坛医疗仪器厂；UV-2120 PCS型紫外可见分光光度计 上海尤尼柯仪器公司；Allegra X-22型台式高速冷冻离心机 德国贝克曼公司。

1.5 培养基

1.5.1 基本培养基

蛋白胨1%，牛肉膏0.5%，氯化钠0.5%，pH7.0~7.2。

1.5.2 斜面培养基

蛋白胨1%，牛肉膏0.5%，氯化钠0.5%，琼脂1.5%。

1.5.3 发酵基础培养基

米糠2%，蛋白胨1%，无机盐溶液(磷酸氢二钾0.25%、磷酸二氢钾0.05%、氯化钙0.02%、硫酸镁0.05%)，pH7.2~7.4。

1.6 方法

1.6.1 抗氧化培养条件的优化

1.6.1.1 菌种活化及培养

保存菌种接种于装有30ml基本培养基中，37℃160r/min振荡培养12h活化；取1ml活化种子液加入装有

25ml发酵培养基中，37℃160r/min振荡培养。

1.6.1.2 供试材料的制备

发酵液于8000r/min、4℃离心20min，收集上清液，冷冻干燥后配制成一定浓度备用；以同样处理的未发酵米糠水提液冻干物作为对照。

1.6.1.3 发酵条件的优化

添加2%的米糠、1%的含氮化合物、无机盐溶液为基本基质，以羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率为衡量指标，平行三次测定，取平均值，研究纳豆芽孢杆菌发酵米糠上清液的高抗氧化活性的最佳发酵条件。

根据单因素的试验结果，综合考虑主要因素之间以及它们在不同水平上的相互作用对清除羟自由基的影响，选择相应因素在250ml三角瓶中进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，确定各主要参数的最佳值及组合，进行发酵反应条件的优化选择，具体的试验方案见表1。

表1 因素和水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A温度(℃)	B米糠加入量(%)	C接种量(%)	D pH
1	27	3	2	6
2	32	4	4	7
3	37	5	6	8

1.6.2 抗氧化活性研究

1.6.2.1 对 $\cdot\text{OH}$ 清除的测定

$\cdot\text{OH}$ 由 $\text{EDTANa}_2\text{-Fe(II)-H}_2\text{O}_2$ 体系产生，由于 $\cdot\text{OH}$ 可特异地使番红褪色，根据褪色程度用比色法来衡量 $\cdot\text{OH}$ 的含量。反应体系为^[8]：在10ml具塞试管中，依次加入1.0ml pH7.4的磷酸缓冲液，0.2ml番红溶液(520μg/ml)，1.0ml 3.8mmol/L EDTANa₂-Fe(II)溶液，再加入不同浓度的样品溶液0.1ml，最后加入0.5ml 0.075% H₂O₂溶液，双蒸水补足至10ml，混合均匀后于40℃水浴保温30min，在519nm波长处测吸光度(A)。空白组以等体积的重蒸水代替样品溶液；对照组以等体积的重蒸水代替样品溶液和EDTA-Na₂-Fe(II)溶液。实验结果以清除率IC表示：

$$\text{IC}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100$$

IC₅₀表示清除率为50%时的样品浓度。

1.6.2.2 对O₂ $\cdot$ 清除的测定

采用邻苯三酚的自氧化体系^[9]：取pH8.2 50mmol/L的Tris-HCl缓冲液4.5ml(含2mmol/L的EDTDNa₂)，加0.1ml不同浓度的样液，于25℃保温10min，然后加入25℃预温的5mmol/L的邻苯三酚0.2ml，混匀后迅速于干燥的比色皿中，在320nm下每隔半分钟测定一次吸光

度,以等体积10mmol/L的HCl代替邻苯三酚溶液为空白调零,对照组以等体积去离子水代替样品,作吸光度随时间变化曲线的回归方程,其斜率为邻苯三酚的自氧化速率 V ,按下式计算样品对氧自由基的抑制率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{V_{\text{对照}} - V_{\text{样品}}}{V_{\text{对照}}} \times 100$$

式中, $V_{\text{对照}}$ 为对照组邻苯三酚自氧化速率($\Delta A/\text{min}$); $V_{\text{样品}}$ 为样品组邻苯三酚自氧化速率($\Delta A/\text{min}$)。

1.6.2.3 抑制猪油的氧化的测定

参照GB/T5538—1995的方法。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 米糠加入量的选择

在基本发酵培养基中改变米糠加入量,其他条件不变进行试验。结果如图1所示。由图1可以看出,当加入4%的米糠时,发酵上清液对羟自由基的清除率最

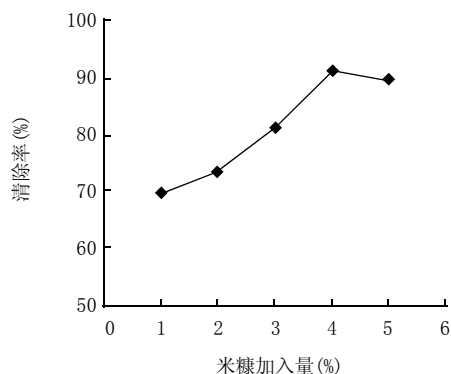


图1 米糠加入量对羟自由基清除的影响
Fig.1 Effects of concentration of rice bran on scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$

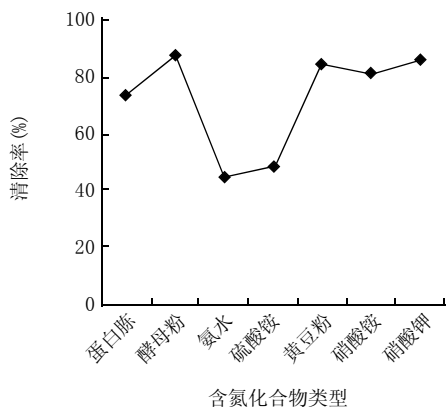


图2 含氮化合物对羟自由基清除的影响
Fig.2 Effects of nitrogen compound on scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$

高,为91.45%。

2.1.2 含氮化合物的选择

分别添加1%的不同含氮化合物进行发酵试验,结果如图2所示。当添加物为酵母粉时,米糠发酵上清液对羟自由基的清除率最高,为87.53%。

2.1.3 培养基初始pH的选择

调整培养基pH进行发酵试验,结果如图3所示。由图3可以看出,pH值为7时,米糠发酵上清液对羟自由基的清除率最高,为73.28%。

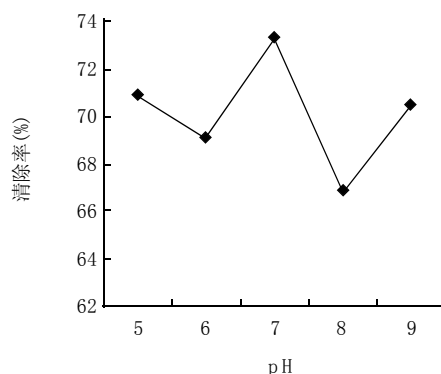


图3 培养基初始pH对羟自由基清除的影响
Fig.3 Effects of initial pH on scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$

2.1.4 培养温度的选择

选择不同温度进行发酵试验,结果如图4所示。不同温度下米糠发酵上清液达到最大清除率的发酵时间不同。其中27℃ 48h的清除率最高,为85.74%。

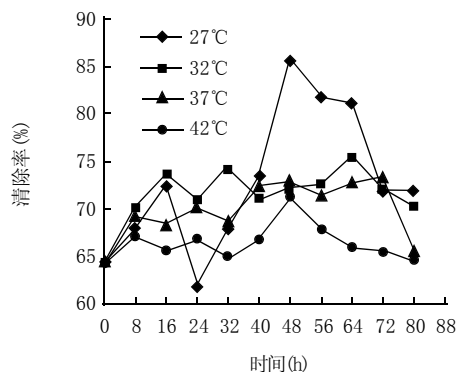


图4 培养温度对羟自由基清除的影响
Fig.4 Effects of incubation temperature on scavenging capacity of $\cdot\text{OH}$

2.1.5 接种量的选择

其他条件不变,改变接种量进行发酵试验,结果如图5所示。接种量1.5ml时清除羟自由基活力最高,达到80.73%。

2.1.6 培养装量的选择

在250ml三角瓶中改变培养基的装量,羟自由基清

除的效果见图6。可见，在25ml培养基装量时清除率最大，为73.28%。

2.1.7 摇床转速的选择

其他条件不变，改变摇床转速，检测发酵上清液的羟自由基清除率，如图7所示，在140r/min转速下，清除率最大，为81.05%。

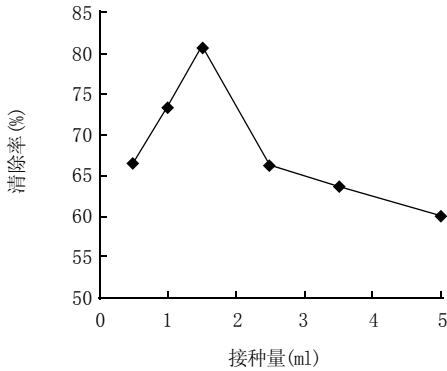


图5 接种量对羟自由基清除的影响

Fig.5 Effects of inoculum size on scavenging capacity of ·OH

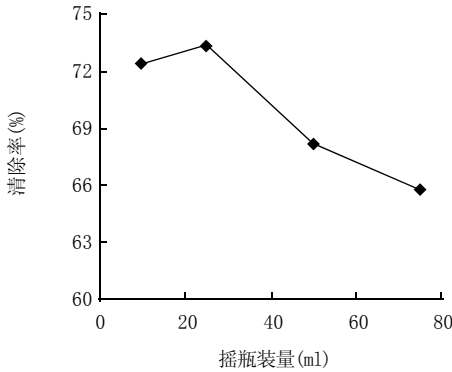


图6 摇瓶装量对羟自由基清除的影响

Fig.6 Effects of medium volume on scavenging capacity of ·OH

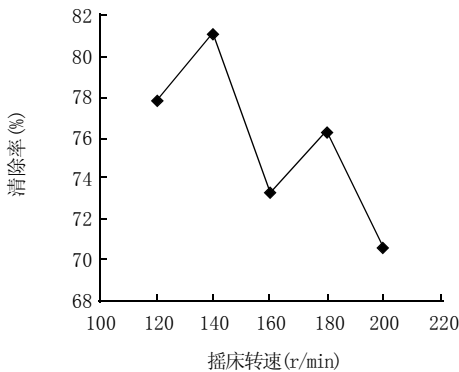


图7 摇床转速对羟自由基清除的影响

Fig.7 Effects of shaking speed on scavenging capacity of ·OH

2.2 正交试验结果

选择温度、米糠加入量、接种量、pH四个因素进行三水平正交试验，测定样品稀释为合适浓度，结

表2 正交试验结果 $L_9(3^4)$

Table 2 Results of orthogonal test $L_9(3^4)$

试验号	A	B	C	D	·OH 清除率(%)
1	27	3	2	6	58.01
2	27	4	4	7	66.46
3	27	5	6	8	69.77
4	32	3	4	8	57.88
5	32	4	6	6	63.65
6	32	5	2	7	67.70
7	37	3	6	7	47.48
8	37	4	2	8	53.45
9	37	5	4	6	56.52
K_1	64.747	54.457	59.720	59.227	
K_2	62.910	61.020	60.287	60.547	
K_3	52.483	64.663	60.133	60.367	
极差 R	12.264	10.206	0.567	1.320	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
温度	262.478	2	509.666	19.000	显著
米糠加入量	160.572	2	311.703	19.000	显著
接种量	0.515	2	1.000	19.000	
pH	3.074	2	5.969	19.000	

果如表2、3所示。

由表2中的K值可以看出，对于温度， K_1 最大，故取水平1即27℃最好；依此其他三个因素：米糠加入量以水平3(5%)最好，接种量以水平2(4%)最好，pH以水平2(pH7)最好，综合四因素得到最佳配比 $A_1B_3C_2D_2$ 。从极差R值来看，分别为 $A(12.264) > B(10.206) > D(1.320) > C(0.567)$ ，影响因素由大到小依次为温度>米糠加入量，pH>接种量。结合表3方差分析可知，温度和米糠加入量是主要的影响因素。

表4 验证实验结果

Table 4 Results of confirmatory experiment

	理论值	实验值	误差(%)
·OH 清除率(%)	70.28	69.77	0.73

验证实验结果见表4。由表4可以看出，理论与实验值差别不显著，说明用正交试验设计优选出的最佳组合符合实际情况。即各因素的最适宜配比为 $A_1B_3C_2D_2$ 。在此条件下的清除羟自由基的活性最高，为69.77%。

2.3 抗氧化活性

2.3.1 优化的发酵米糠的上清液自由基清除活性

机体新陈代谢会产生多种自由基，是代谢过程中的副产物，带有未成对电子的分子或离子，具有很高的活性，主要损害细胞膜包括血管内皮细胞膜及亚微结构，并引发一系列有害的生化反应，导致细胞死亡。其中，羟自由基和超氧阴离子自由基为最常见的两种自由基^[10]。

2.3.1.1 清除·OH能力的结果

·OH是一种氧化能力很强的自由基，可使糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类发生氧化，使他们遭受损伤

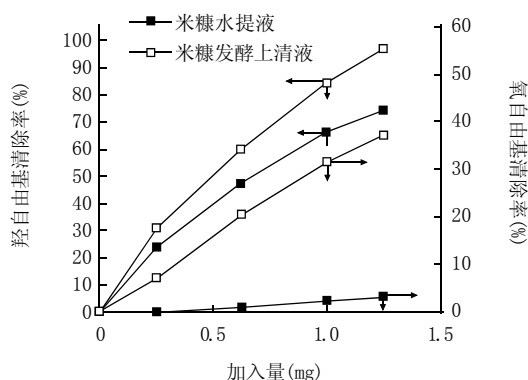


图8 米糠提取液清除自由基的能力

Fig.8 Scavenging abilities on $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ at different density of rice bran extract

和破坏。羟自由基与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关,因此迫切需加强对羟自由基作用的研究^[11]。

实验研究显示(图8),在体外实验中发酵米糠上清液和米糠水提液对 $\cdot\text{OH}$ 均显示很强的清除能力,并呈现明显的剂量效应关系,但前者明显比后者的活性要高,其中发酵米糠上清液的 IC_{50} 为3.55mg/ml,比米糠水提液的活性增加0.3倍。

2.3.1.2 清除 $\text{O}_2\cdot^-$ 能力的结果

虽然 $\text{O}_2\cdot^-$ 本身不能直接诱导生物和食品中的脂类氧化,但经过酶或一些非酶途径会转变为高活性 $\cdot\text{OH}$,从而对细胞造成损伤^[12]。

由图8可知,不同浓度的样品对邻苯三酚的自氧化都有抑制作用,说明在体外发酵米糠上清液和米糠水提液对 $\text{O}_2\cdot^-$ 均有一定的清除能力,并随着浓度的上升, $\text{O}_2\cdot^-$ 的清除率也增大,呈现明显的剂量效应关系。但前者的活性明显比后者高,发酵米糠上清液的 IC_{50} 为23.5mg/ml,比米糠水提液高出10倍。

由于本实验中的样品均为粗提液,故 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除率比文献报道略低^[13]。

2.3.2 对猪油氧化稳定性的影响

实验以不加样品的猪油为空白对照,添加不同的抗氧化剂,在60℃下高温诱导,每隔24h测定其过氧化值。图9显示,发酵米糠上清液乙醇提取物与米糠水提液乙醇提

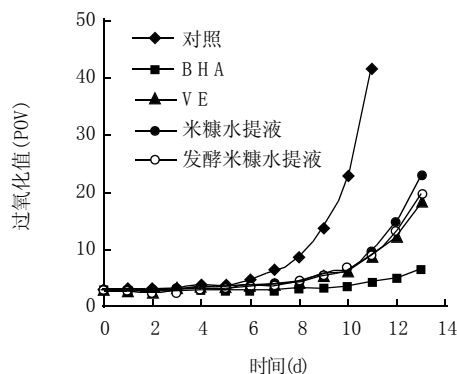


图9 抑制猪油氧化的测定

Fig.9 Antioxidation to axunge by different antioxidants

取物都可延缓猪油的酸败,使猪油的氧化诱导期延长;前者的抑制能力略强于后者,其抗氧化效果与VE相当。

3 结论

3.1 通过单因素试验和正交试验,确定纳豆芽孢杆菌发酵米糠最佳条件为:5%的米糠,1%的酵母粉,初始pH7.0,接种量4%,装量25ml,温度为27℃,140r/min培养48h。在此条件下纳豆菌发酵米糠的羟自由基清除活性最高。

3.2 纳豆芽孢杆菌发酵米糠的上清液显示出更强的抗氧化活性。体外研究表明,发酵米糠上清液 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除率比米糠水提液的活性高, IC_{50} 分别为3.55、23.5mg/ml,比米糠水提液分别增加0.3、10倍。通过抑制猪油氧化实验,表明发酵米糠上清液和米糠水提液均有较强的抗氧化活性,而前者略强于后者,于VE相近。

实验证明,纳豆芽孢杆菌发酵米糠能产生更强的抗氧化活性,因而利用纳豆芽孢杆菌开发具有高抗氧化的米糠健康食品,是一条切实可行的途径。

参考文献:

- [1] SLAUDERS R M. The properties of rice bran as a food stuff[J]. Cereal Foods World, 1990, 35(7): 632-636.
- [2] QURESHI A A, SAMI S A, KHAN F A. Effect of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus types I and II[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13: 175-187.
- [3] SEETHARAMALAH G S, Chandrashekhara N. Characteristics of gamma-oryzanol[J]. J Food Sci Technol, 1993, 30: 249.
- [4] 陈丽花, 陈有容, 齐凤兰. 纳豆芽孢杆菌的功能及其应用[J]. 食品工业, 2001(4): 39-41.
- [5] 梅乐和, 胡升, 许静, 等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J]. 浙江大学学报, 2004, 38(10): 1355-1360.
- [6] 刘新梅, 高宇, 董明盛. 原生质体紫外诱变选育纳豆激酶高产菌株[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 69-72.
- [7] 王萍, 杜连祥, 路福平, 等. 溶栓纳豆芽孢杆菌的筛选鉴定及产纳豆激酶条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 74-77.
- [8] 吴慧平, 孔令东, 吴美娟, 等. 当归不同炮制品清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(10): 599-601.
- [9] 王关林, 田兵, 方宏筠, 等. 芦荟抗氧化物质活性及对红细胞的保护作用[J]. 营养学报, 2002, 24(4): 380-384.
- [10] MARX J L. Oxygen free radicals linked to many diseases[J]. Science, 1987, 235(4788): 529-531.
- [11] SCOTT G. Antioxidants[J]. Bull Chem Soc Jpn, 1998, 61: 165-170.
- [12] WYLLIE S, LIEHR J G. Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 346(2): 180-186.
- [13] SEOK H N, SUN P C, MI Y K, et al. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars[J]. Food Chemistry, 2006, 94: 613-620.