

苦荞对发酵豆乳纳豆激酶活力、风味及抗氧化活性的影响

王森霜², 仝艳军², 蒋雨桥², 杨瑞金^{*1,2}

(1. 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 相较于纳豆, 以纳豆芽孢杆菌发酵获得的发酵豆乳食用更方便, 但同样存在纳豆激酶活性低、风味不良等缺点。作者首先研究了苦荞、糙米、薏米、藜麦、燕麦粉对纳豆芽孢杆菌产纳豆激酶能力的影响。结果表明, 添加苦荞的效果最好, 当添加质量分数为 3% 时, 纳豆芽孢杆菌液体发酵的酶活力由原来的 5 803.12 U/mL 提高到 23 326.23 U/mL; 然后研究了苦荞粉对纳豆芽孢杆菌发酵豆乳的纳豆激酶活力、风味及抗氧化活性的影响。结果显示, 当添加的苦荞质量为大豆质量的 50% 时, 发酵豆乳的纳豆激酶活力、挥发性盐基氮质量浓度和总抗氧化能力分别为 4 460.28 U/mL、3.45 mg/dL 和 16.34 mmol/L, 分别为纯大豆发酵所得豆乳的 161.42%、79.84% 和 196.39%。添加苦荞能够明显提高发酵豆乳中纳豆激酶活力, 并且改善风味和抗氧化活性。该研究可为开发富含纳豆激酶、食用方便的纳豆食品提供借鉴。

关键词: 纳豆芽孢杆菌; 发酵豆乳; 苦荞; 纳豆激酶; 风味; 抗氧化能力

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2023)07-0062-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.07.008

Effects of Tartary Buckwheat on Nattokinase Activity, Flavor and Antioxidant Activity of Fermented Soybean Milk

WANG Miaoshuang², TONG Yanjun², JIANG Yuqiao², YANG Ruijin^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Compared to natto, the fermented soybean milk produced by *Bacillus natto* fermentation is convenient to consume. However, it suffers from disadvantages such as low nattokinase activity and poor flavor. In this study, we first investigated the effect of adding different grains (tartary buckwheat, brown rice, coix seed, quinoa, oat flour) to enhance the ability of *Bacillus natto* to produce nattokinase. Results showed that tartary buckwheat was the most effective additive, increasing liquid enzyme activity from 5 803.12 U/mL to 23 326.23 U/mL when added at a 3% mass fraction. Then we evaluated the effects of tartary buckwheat powder on nattokinase activity, flavor and antioxidant activity of fermented soybean milk by *Bacillus natto*. Results showed that when the

收稿日期: 2022-12-23

基金项目: 国家“食品科学与工程”一流学科建设项目(JUFSTR20180202); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

* 通信作者: 杨瑞金(1964—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术和功能性食品配料研究。

E-mail: yjrj@jiangnan.edu.cn

amount of tartary buckwheat was added at 50% mass of soybeans, the nattokinase activity, volatile base nitrogen mass concentration and total antioxidant capacity of the fermented soybean milk were 4 460.28 U/mL, 3.45 mg/dL and 16.34 mmol/L, respectively, and accounting for 161.42%, 79.84% and 196.39% of fermented soybean milk from pure soybean fermentation, respectively. Addition of tartary buckwheat significantly enhanced nattokinase activity, improved flavor, and increased antioxidant capacity of fermented soybean milk. This research provides valuable references for the development of nattokinase-enriched and convenient-to-consume natto products.

keywords: *Bacillus natto*, fermented soybean milk, tartary buckwheat, nattokinase, flavor, antioxidant capacity

心脑血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是造成我国居民死亡的首要病因之一^[1]。从病理上来看, 形成 CVD 的主要原因是纤维蛋白在循环系统的累积。外源性纤维蛋白溶解酶可有效溶解纤维蛋白并改善血流情况, 如尿激酶、链激酶、纳豆激酶 (nattokinase, NK) 等^[2]。其中, NK 是近几十年来的研究热点, 与其他纤维蛋白溶解酶相比, NK 不仅具有成本低、疗效好、有效时间长、安全性高的特点, 还具有多种 CVD 的预防和缓解作用, 如抗血栓、抗高血压、抗动脉粥样硬化、降脂和神经保护等^[3]。

目前市场上纳豆激酶的主要来源是纳豆、纳豆激酶胶囊、纳豆激酶片剂, 但这些产品存在成本高、有异味、吞咽困难等缺点。关于纳豆的制作分为固态发酵和液态发酵两大类。相比固态发酵, 液态发酵更适用于纳豆激酶的大量工业化生产及提取纯化^[4-5]。发酵豆乳是在液态豆乳中接种纳豆芽孢杆菌, 经发酵后获得的营养丰富的发酵豆制品, 但发酵豆乳产品刺鼻的“氨臭味”常常使消费者望而却步。

有研究表明“氨臭味”的主要来源为挥发性盐基氮和含硫化合物^[6], 纳豆产品的挥发性盐基氮未有国家标准规定, 但存在相关文献报道。郑丹妮利用多菌种复合发酵低“氨臭味”的纳豆, 最终产品中挥发性盐基氮质量分数为 198.66 mg/hg, 酶活力为 341.25 U/g^[7]。为了改善纳豆的“氨臭味”, 许多研究人员从发酵底物入手进行创新。陈乐乐等在以高蛋白质大豆为原料制备纳豆过程中加入超甜玉米, 结果发现随着超甜玉米质量分数的提高, 纳豆激酶活力呈现先上升后下降的趋势, 挥发性盐基氮呈现持续降低的趋势; 高蛋白质大豆和超甜玉米质量比为 8:2 时, 纳豆的挥发性盐基氮质量分数为 32.87 mg/g, 纳豆激酶活力达到 1 134.76 U/g^[8]。张杰等通过糯米与小黄豆复合发酵获得品质较好的纳豆, 结果表明

“氨臭味”显著降低, 挥发性盐基氮质量分数为 15.41 mg/hg, 纳豆激酶活力为 382.32 U/g^[9]。赵谋明等在纳豆菌液态基础培养基中添加不同谷物 (糙薏仁、玉米、荞麦、糙米) 并采用不同的谷物处理方式探究对纳豆激酶活力的影响, 结果表明采用浸泡蒸煮的方式处理谷物并添加糙米可显著促进纳豆菌产纳豆激酶^[10]。此外, 有文献报道以糙米作为发酵底物, 采用纳豆芽孢杆菌发酵, 总必需氨基酸和脂肪质量分数增加, 粗蛋白质质量分数减少, 2,2-二苯基-1-苦基肼 (DPPH) 自由基清除能力显著增加^[11]。由上述报道可见谷物对纳豆的纳豆激酶活力、挥发性盐基氮质量分数等方面存在积极影响, 在纳豆制作方面具有应用价值。

谷物通常具有良好的生物活性^[12-16], 比如: 苦荞具有降血脂、抗氧化、增强人体免疫力的作用; 燕麦经枯草芽孢杆菌发酵后可提升其蛋白质含量。作者以实验室前期研究中筛选出的一株高产纳豆激酶且产“氨臭味”少的纳豆芽孢杆菌 JNFE0127 作为发酵菌株。通过添加不同谷物 (苦荞、糙米、薏米、藜麦、燕麦粉) 探究纳豆芽孢杆菌 JNFE 0127 产纳豆激酶的能力, 确定使其产酶量高的谷物种类; 然后研究该谷物不同添加量对纳豆芽孢杆菌 JNFE 0127 发酵豆乳的纳豆激酶活力、风味及抗氧化活性的影响。该研究提高了液态发酵豆乳制品的酶活力并改善其风味, 为产业发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

纳豆芽孢杆菌 JNFE 0127 (*Bacillus natto* JNFE 0127, 简称为 JNFE 0127): 作者所在实验室前期筛选并保存; 大豆、苦荞、糙米、薏米、藜麦、燕麦: 购自京东商城; 牛凝血酶 (1 000 U/g)、牛纤维蛋白原: 沈

阳拜英生物技术有限公司产品;2,4,6-三吡啶基三嗪(纯度 98%)、2,2-二苯基-1-苦基肼(纯度 98%)、5,6-二苯基-3-(2-吡啶基)-1,2,4-三嗪-4,4'-二磺酸单钠盐(纯度 97%);北京沃凯生物科技有限公司产品;其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

LE2002E 型分析天平、FE28 型 pH 计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂产品;DRP-9082 型电热恒温培养箱:上海森信实验仪器有限公司产品;MQD-S3R 型振荡培养箱:上海旻泉仪器有限公司产品;HH-4 型数显恒温水浴锅:常州国华电器有限公司产品;UV-1800PC 型紫外可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司产品;Super Mini Dancer 桌面型迷你离心机:生工生物工程(上海)股份有限公司产品;高速冷冻离心机:赛默飞世尔科技(上海)有限公司产品;KQ52000DE 型数控超声波清洗机:昆山市超声仪器有限公司产品;破壁机:九阳股份有限公司产品;4500A 型多功能粉碎机:永昌市展帆工贸有限公司产品;快速气相色谱电子鼻:法国 Alpha MOS S.A.有限公司产品。

1.3 培养基的配制

LB 固体培养基:胰蛋白胨质量分数 1.0%、酵母提取物质量分数 0.5%、氯化钠质量分数 1.0%、琼脂质量分数 2.0%。

活化培养基:无水葡萄糖质量分数 0.5%、大豆蛋白胨质量分数 1.0%、氯化钠质量分数 0.5%。

基础发酵培养基:酵母粉质量分数 0.50%、葡萄糖质量分数 1.50%、CaCl₂ 质量分数 0.02%、NaCl 质量分数 0.20%、MgSO₄ 质量分数 0.05%、0.1 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄ 缓冲液调 pH 至 7.2。

发酵豆乳培养基:大豆粉质量分数 11.1%、水质量分数 89.9%。

1.4 方法

1.4.1 种子发酵液的制备 将保藏于-80℃甘油管中的 JNFE 0127 菌液划线接种到 LB 固体培养基上,37℃恒温培养 10 h;分别挑取 JNFE 0127 单菌落接种于活化培养基中,37℃、200 r/min 培养 12 h,即为种子发酵液。

1.4.2 样品的制备

1)基础发酵液的制备 取活化的 JNFE 0127

种子发酵液按照体积分数 2%接种于基础发酵培养基中,37℃、200 r/min 分别培养 24、36、48、60、72、96 h。

2)不同谷物发酵乳的制备 在基础发酵培养基中分别添加苦荞粉、薏米粉、糙米粉、藜麦粉、燕麦粉,添加质量分数分别为 1%、3%、6%,装液量 50 mL,115℃灭菌 30 min,冷却后按照体积分数 2%接入活化的种子发酵液,于 39℃、200 r/min 培养 24、36、48、60、72、96 h。

3)不同质量比的发酵豆乳制备 将大豆清洗并浸泡 12 h,沥干后加入湿豆质量 8 倍的水用破壁机打浆 5 min,再添加体积分数 9%的 42 型果葡糖浆,使用高速剪切分散机以 10 000 r/min 剪切 15 min。采用相同方法处理谷物。将不同质量比的大豆浆和谷物浆(3:1、2:1、1:1、1:2、1:3)以及纯豆乳和纯谷物浆装入 250 mL 三角瓶中,装液量 100 mL,105℃灭菌 25 min,冷却后接入体积分数 2%的种子发酵液,39℃、200 r/min 摇瓶发酵 12 h。

1.4.3 NK 活力的测定 参考 Astrup 等的方法测定 NK 活力^[7]。将灭菌生理盐水置于 37℃水浴锅中保温,取 0.15 g 纤维蛋白原溶于 15 mL 生理盐水中,37℃水浴溶解 10 min,制成纤维蛋白原溶液。将 100 μL 凝血酶(10 U/mL)溶于 400 μL 生理盐水中,制成 2 U/mL 的凝血酶溶液。将 1.25 g 琼脂粉加入 125 mL 去离子水中,加热至完全溶解。待琼脂溶液温度降低至 55℃左右时,与配好的纤维蛋白原溶液和凝血酶溶液快速混匀并立即倒平板,每个板 25~27 mL。待完全凝固后打孔。在纤维蛋白原平板孔内加入 10 μL 发酵液,37℃静置培养 18 h,用游标卡尺测量透明圈直径。1 min 转化 1 μmol 底物所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.4.4 pH 及酸度的测定

1)pH 的测定 使用 pH 计测定发酵液 pH。

2)酸度的测定 配置 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液并用邻苯二甲酸氢钾(KHP)进行标定,取 10 mL 发酵液加 20 mL 灭菌水,混匀,用氢氧化钠标准溶液滴定直至终点(pH 8.3)^[18]。记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积 V_1 ,按公式(1)计算:

$$X = \frac{c \times (V_1 - V_2) \times 100}{m \times 0.1} \quad (1)$$

式中: X 为样品的酸度,°T; c 为氢氧化钠标准溶液的浓度,mol/L; V_1 为滴定所消耗氢氧化钠标准溶液

的体积,mL; V_2 为空白组消耗氢氧化钠标准溶液的体积,mL; m 为样品的质量,g。

1.4.5 挥发性盐基氮的测定 参考 GB 5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》^[19]。取 10 mL 样品于消化管中,加入 75 mL 水,振荡均匀,浸渍 30 min。待浸渍结束后,加入 1 g 氧化镁,立刻连接到凯氏定氮仪上,设置加碱体积和加水体积均为 0,蒸馏时间 180 s。将 1 份甲基红乙醇溶液与 5 份溴甲酚绿乙醇溶液混合作为指示剂,量取 30 mL 硼酸接收液,滴加 10 滴混合指示剂,以指示剂颜色的变化来判断终点。挥发性盐基氮质量浓度的计算见公式(2):

$$\rho = \frac{(V_1 - V_2) \times c_1 \times 14}{V} \times 100 \quad (2)$$

式中: ρ 为样品挥发性盐基氮质量浓度,mg/dL; V_1 为消耗盐酸的体积,mL; V_2 为空白组消耗盐酸的体积,mL; c_1 为盐酸滴定液的浓度,mol/L; V 为样品的体积,mL。

1.4.6 抗氧化活性的测定

1)总抗氧化能力的测定 采用文献[20]的方法,将 0.3 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 3.6)、10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L FeCl_3 溶液按体积比 10:1:1 混合得到 FRAP 工作液。取发酵液 1 mL,5 000 g 离心 10 min,取离心后的上清液 100 μL ,加入 2.4 mL FRAP 工作液,空白组取去离子水 100 μL ,加入 2.4 mL FRAP 工作液,分别混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,在 593 nm 下用分光光度计测吸光度。依照 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准曲线计算总抗氧化能力。

2)DPPH 自由基清除能力的测定 参考 Ai 等的方法^[21]稍加改动。在 1 mL 发酵液中加入 4 mL 去离子水混匀,5 000 g 离心 10 min,取上清液 500 μL ,加入 500 μL 0.2 mmol/L DPPH 溶液(用体积分数 95%乙醇定容),空白组取 100 μL 体积分数 95%乙醇,加入 500 μL 0.2 mmol/L DPPH 溶液,分别混匀后 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 30 min,设定检测波长为 517 nm。DPPH 自由基清除能力按公式(3)计算:

$$Y = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\% \quad (3)$$

式中: Y 为样品的 DPPH 自由基清除能力,%; A_s 为样品组的吸光度; A_c 为空白组的吸光度。

3)亚铁离子螯合能力的测定 参照文献[22]的方法测定亚铁离子螯合能力。量取 10 mL 发酵液,5 000 g 离心 10 min,准确取 3 mL 上清液加入 50

μL 2 mmol/L FeCl_3 溶液、200 μL 5 mmol/L 菲洛嗪溶液和 750 μL 去离子水,空白组取 3.75 mL 去离子水加入 50 μL 2 mmol/L FeCl_3 溶液和 200 μL 5 mmol/L 菲洛嗪溶液,分别混匀后 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,在 562 nm 波长下测定吸光度。亚铁离子螯合能力按公式(4)计算:

$$Z = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: Z 为样品的亚铁离子螯合能力,%; A_1 为样品组的吸光度; A_0 为空白组的吸光度。

1.4.7 电子鼻测定 取 10 mL 发酵液于 20 mL 气相样品瓶中,旋紧瓶盖,按大豆含量递减的顺序摆放,重复两次,首尾各放一个空瓶作为空白样,采用 HeraclesII 系统进行自动测定,分析软件为该仪器配套软件。

1.4.8 数据处理 利用 SPSS 20.0 进行方差分析及 ANOVA 差异显著性分析($P < 0.05$ 为差异显著)。利用 Origin 9.0 软件处理数据并绘图。

2 结果与讨论

2.1 谷物对 JNFE 0127 发酵产 NK 能力及 pH 的影响

2.1.1 谷物对 JNFE 0127 发酵产 NK 能力的影响 近年来液态发酵制备 NK 产品已经成为趋势。选择特色的发酵底物,并对发酵条件进行优化可以实现底物的高效利用。赵谋明等以糙米为底物,通过优化纳豆芽孢杆菌液态发酵条件,制备具有高 NK 活力和富含谷物多酚的发酵产物^[23]。作者选择消费者普遍认可的苦荞、燕麦、藜麦等 5 种富含膳食纤维、蛋白质、多酚、矿物质等成分^[12-16]的健康谷物作为添加物展开研究。如图 1 所示,将 JNFE 0127 在不添加谷物的基础发酵培养基中发酵,48 h 时产酶量最高,可达到 6 000 U/mL 以上。在基础发酵培养基中添加不同谷物后,产酶量显著提高。值得注意的是,在发酵时间和谷物添加质量分数一致的条件下,不同谷物对 JNFE 0127 发酵产 NK 能力的影响不同。用同一种谷物进行发酵时,添加质量分数影响产酶量的大小,添加质量分数为 3% 时,产酶量普遍更高。添加质量分数 3% 的苦荞粉发酵 96 h 时,其产酶量为 23 326.23 U/mL,与基础发酵培养基相比提高 301.96%。目前文献报道的纳豆芽孢杆菌产酶量为 300~15 000 U/mL^[24-27]。比如,王艳平等利用纳

豆芽孢杆菌固态发酵花生粕制备 NK，经正交优化后产酶量为 3 162 U/mL^[28]。根据以上信息可以说明添加苦荞粉可以明显提升产酶能力。此外，当谷物添加质量分数一定时，随着发酵时间的延长，产酶量显示出达到峰值后回落的变化规律。因此发酵时间是产酶能力的重要影响因素。在发酵过程中，应及时终止发酵预防酶回落现象，刘文涛等也发现了该

现象^[29]。

2.1.2 谷物对 JNFE 0127 发酵过程 pH 的影响 pH 是评价微生物生长过程的一项重要指标。依据 pH 可以了解菌株的生长周期、对培养基的适应能力以及 NK 的稳定性等情况。由图 2 可知，在发酵过程中，发酵体系的 pH 呈现先减小后增加的趋势，在 24~60 h 发酵阶段，pH 基本逐渐降低，在发酵 60 h

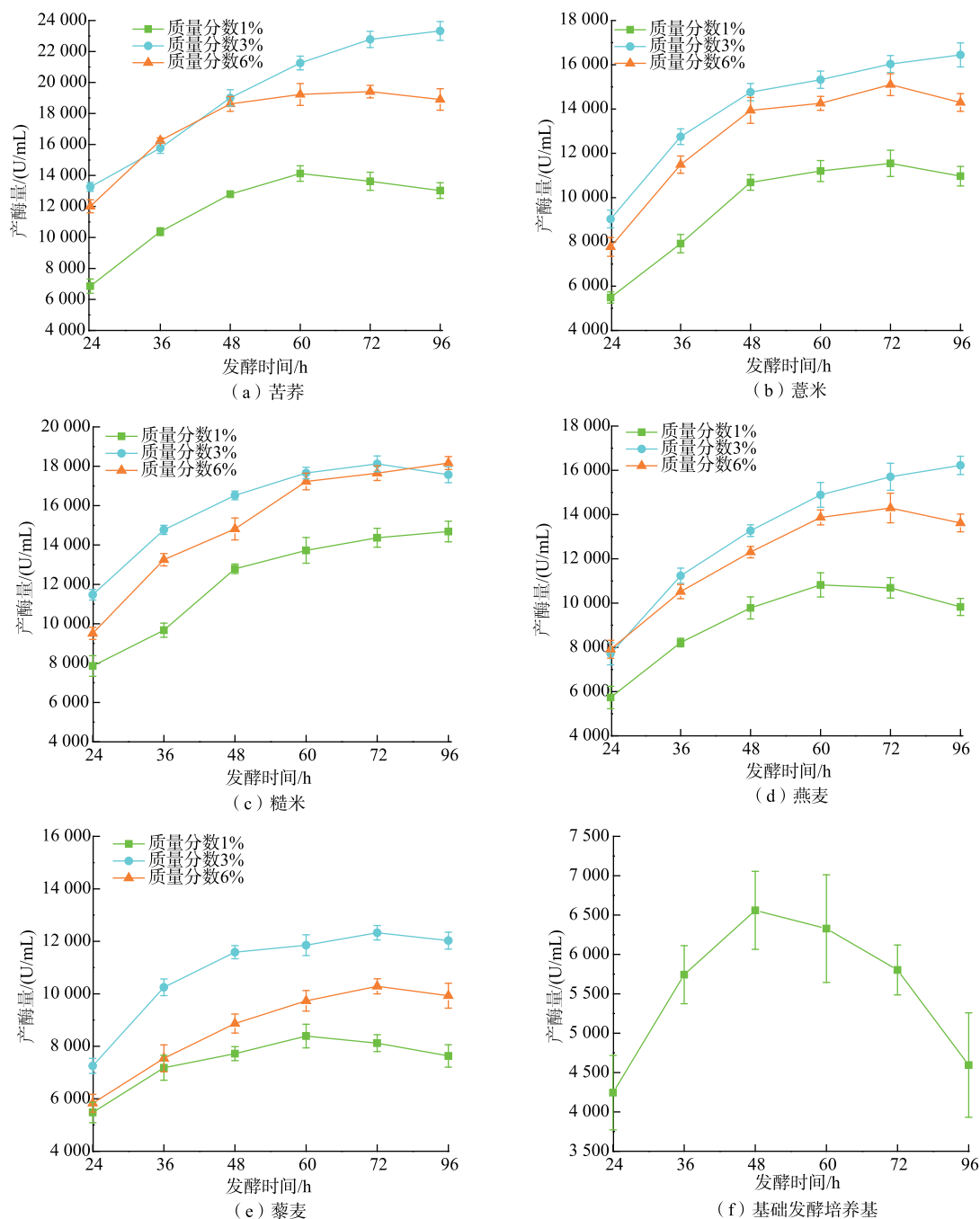


图 1 谷物对 JNFE 0127 发酵产 NK 的影响

Fig. 1 Effect of grains on NK production by fermentation of JNFE 0127

时 pH 为 5.6 左右;发酵 60~96 h, 体系 pH 逐渐升高, 在 96 h 发酵结束后, 体系 pH 基本均在 6.0 以上。当 JNFE 0127 处于对数生长期时, 快速消耗培养基中的碳源和氮源等营养物质, 同时会分泌酸性代谢产物, 如奎尼酸、琥珀酸等^[30], 使 pH 逐渐降低; 在进入稳定期后, 培养基中可供直接利用的碳源被逐步消耗完毕, JNFE 0127 会将有机酸作为碳源, 氮源中的碳元素也会被利用, 并以氨的形式释放氮元素, 导致培养基 pH 升高; 进入衰亡期后, 由于菌体自溶的原因, 培养基的 pH 会进一步升高。此处培养

基 pH 的变化规律与上述 JNFE 0127 的生长周期一致。

2.2 大豆和苦荞质量比对发酵豆乳 NK 活力的影响

大豆与苦荞按不同质量比复配后进行发酵, NK 活力的结果见图 3。随着苦荞添加量的增加, 发酵液中的酶活力出现峰值。当大豆与苦荞质量比为 2:1 时, 发酵液中 NK 活力最高, 可达到 4 460.28 U/mL; 与纯大豆发酵液相比, 酶活力提高了 61.42%。由此得出, 复配谷物有利于提高发酵豆乳酶活力, 与其

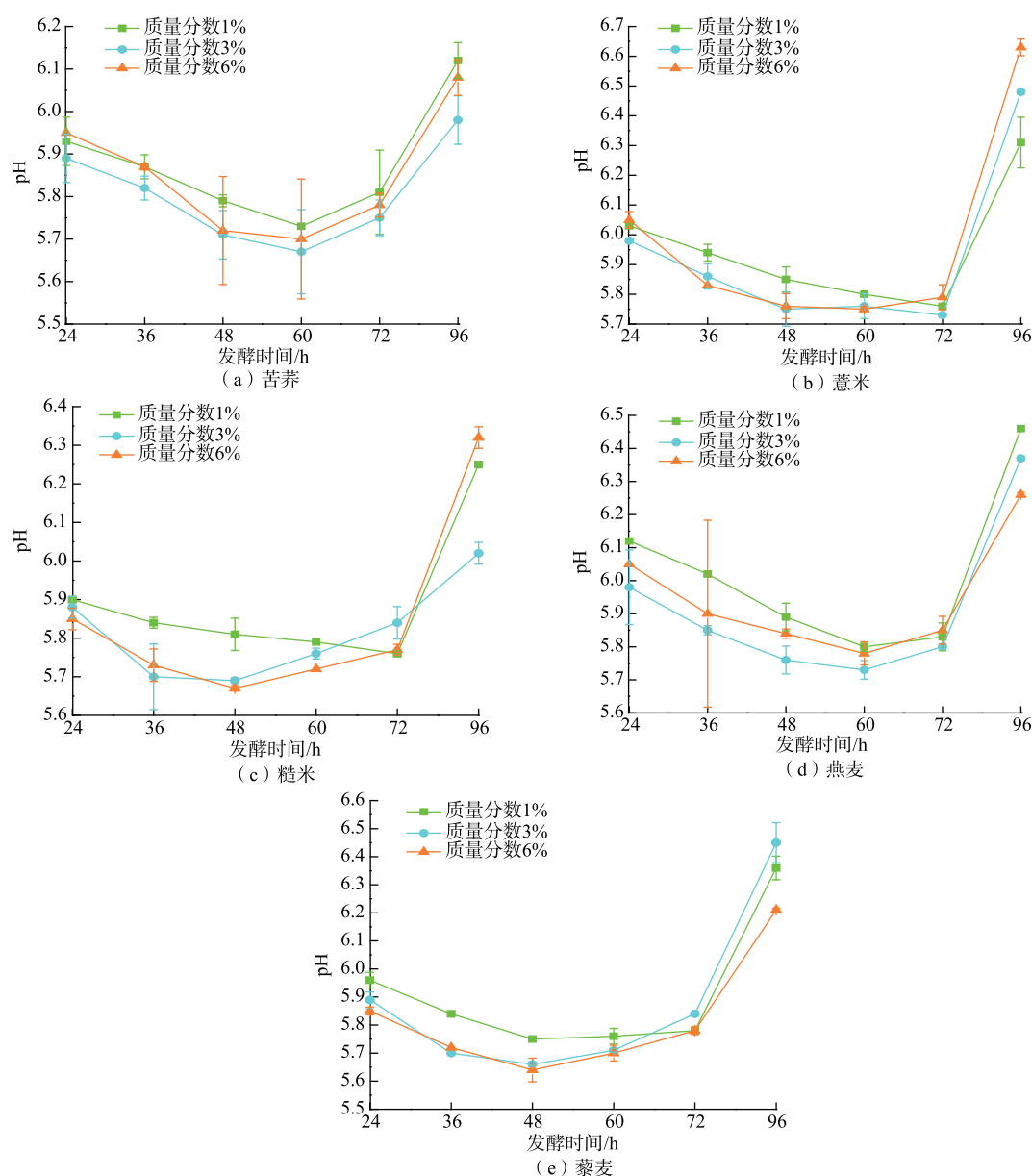


图 2 谷物对 JNFE 0127 发酵中 pH 的影响

Fig. 2 Effect of grains on pH in JNFE 0127 fermentation

他研究者的结论一致^[16]。然而随着苦荞添加量继续增加,发酵体系中酶活力逐渐降低,在纯苦荞发酵体系中NK活力只有2018.10 U/mL。根据前人的研究可知,苦荞本身含有单宁和芦丁成分^[31],单宁和芦丁具有一定的抗菌性,可抑制纳豆芽孢杆菌的生长,进而使产酶量降低^[32]。此外,酸性环境以及缺乏某些生长补充剂也会限制其生长速度^[33]。

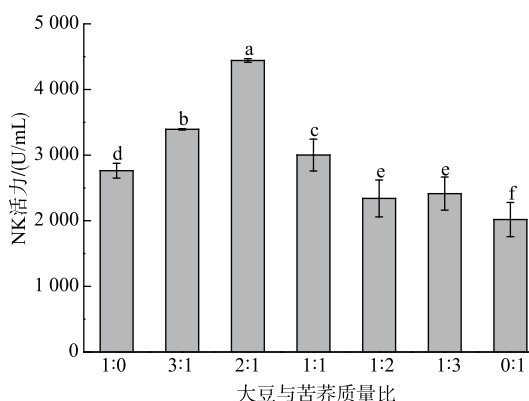


图3 谷物质量比对发酵豆乳酶活力的影响

Fig. 3 Effects of grain mass ratios on enzyme activity of fermented soybean milk

2.3 大豆和苦荞质量比对发酵豆乳 pH 及酸度的影响

由于发酵体系中氮源含量的不同以及 JNFE 0127 生长状态的差异,发酵前后的 pH 和酸度也会有所差异。如图 4(a)所示,发酵前各体系的 pH 无差异,均为 6.5~6.6,发酵后各体系的 pH 降至 5.6 左右,并且随着苦荞添加量的增加,发酵后体系的 pH 呈现下降的趋势,纯大豆和纯苦荞体系发酵后 pH 分别为 5.74 和 5.52。另外,由图 4(b)可知,纯苦荞发酵液的酸度最大(25.3 °T),与纯大豆的酸度相比较,提高了 27.78%。一方面,苦荞含有较多氨基酸类、多酚类等酸性物质,会使酸度升高^[34];另一方面,在发酵过程中微生物产生的酶(纤维素酶、蛋白酶等)能打破多酚和其他取代基之间的联系以释放可溶性及游离性酚类化合物,也会使发酵液酸度升高^[35]。

2.4 大豆和苦荞质量比对发酵豆乳风味物质的影响

2.4.1 大豆和苦荞质量比对发酵豆乳挥发性盐基氮质量浓度的影响 挥发性盐基氮包含氨类、甲胺、二甲胺、三甲胺等化合物,通常是判断纳豆芽孢杆菌发酵豆乳不良风味的一项重要指标。在 JNFE 0127 发酵过程中,产生的蛋白酶或微生物分解体系

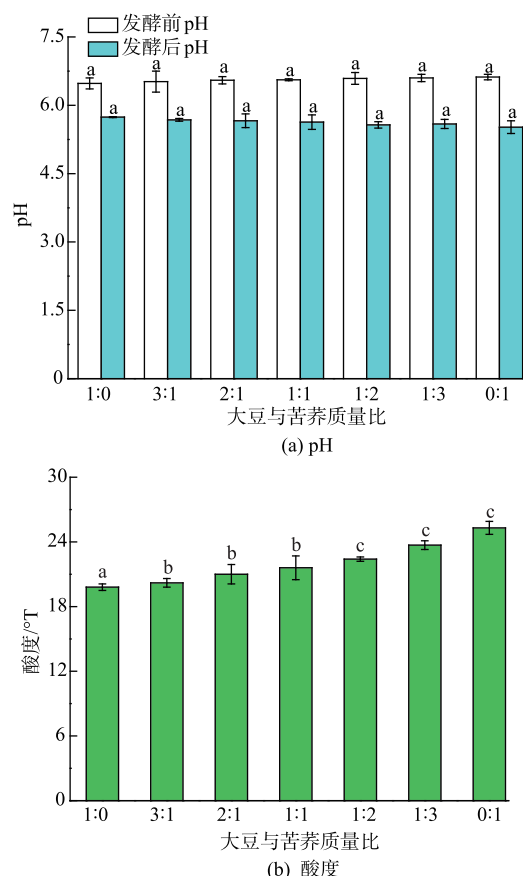


图4 谷物质量比对发酵豆乳 pH 及酸度的影响

Fig. 4 Effects of grain mass ratios on pH and acidity of fermented soybean milk

含有的蛋白质及发酵过程中产生的游离氨基酸,会释放挥发性氨类物质,产生不良气味^[36-37]。结果如图 5 所示,发酵液中挥发性盐基氮质量浓度随苦荞添加量增加先降低后稳定。在大豆与苦荞质量比为 1:3 时,发酵体系中挥发性盐基氮质量浓度最低,为 2.63 mg/dL,与纯大豆发酵体系相比,降低了 39.12%;另外,大豆与苦荞质量比为 2:1 的复配体系中,挥发性盐基氮质量浓度为 3.45 mg/dL,相比纯大豆发酵降低了 20.14%。这与董岳峰的研究结果类似^[12],其研究表明苦荞中淀粉糖含量较高,在纳豆芽孢杆菌发酵过程中添加苦荞,可以提高复配发酵体系中的碳氮比,从而减少游离氨形成,改善风味^[12]。

2.4.2 发酵豆乳的电子鼻分析结果 纳豆芽孢杆菌发酵的不良风味主要来自大豆本身的豆腥味和其发酵过程中产生的挥发性盐基氮、生物胺等不良风味物质,电子鼻可以快捷地测定其不良风味的主要来源,有助于进行针对性改良。结果如图 6 所示,

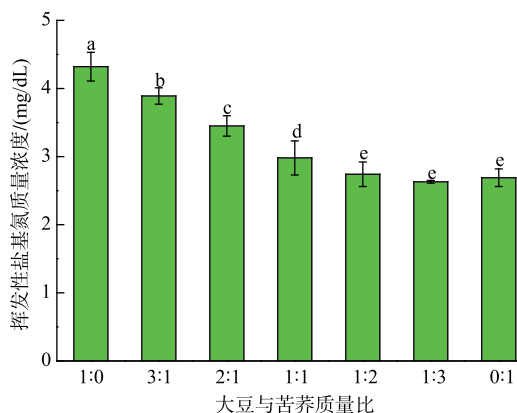


图5 谷物质量比对发酵豆乳挥发性盐基氮质量浓度的影响
Fig. 5 Effects of grain mass ratios on volatile base nitrogen mass concentration in fermented soybean milk

大豆与苦荞不同复配发酵体系的电子鼻测定数据主要有4个峰位,保留时间-色谱柱号分别为16.54-1、50.67-1、19.99-2、61.02-2。经过Alphasoft软件分析,16.54-1、19.99-2对应氨氮类化合物,是发酵豆乳中不良风味的主要来源;50.67-1、61.02-2对应己醛等豆腥味的来源物质。随着苦荞添加量的增加,4种主要物质的峰面积逐渐降低,即含量逐渐降低。该结果表明大豆与苦荞复配可以有效改善发酵豆乳的不良风味,与上述测定的挥发性盐基氮结果一致。

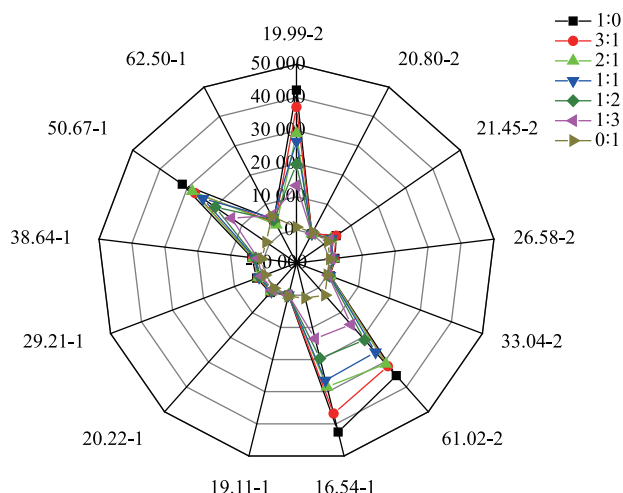


图6 不同复配发酵体系所产豆乳的电子鼻分析
Fig. 6 Electronic nose analysis of fermented soybean milk with different compound fermentation system

2.4.3 发酵豆乳的主成分分析结果 由图7可知,主成分1和主成分2累积贡献率高达99.690%。另外,如果两样品之间的距离越近,表示其整体的气味信息越接近,差异越小,反之则越大。各组在PCA分布图中空间相对独立,可以很好地区分不同复配发酵体系,也进一步说明不同发酵体系中风味特征存在差异。其中,纯大豆发酵体系和大豆与苦荞质量比1:3的复配发酵体系风味信息较为相近,大豆与苦荞质量比为2:1和3:1的复配发酵体系风味信息较为相近,纯苦荞发酵体系与其他发酵体系整体风味信息差异较大。此外,沿PC1轴自左向右分布的样品中,苦荞添加量依次增加。结合电子鼻及挥发性盐基氮测定结果可知,第一主成分为可接受的风味,第二主成分为异味。

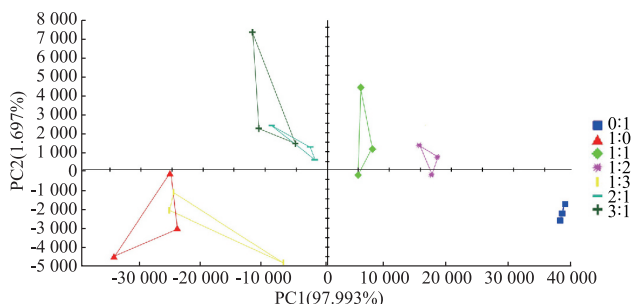


图7 不同组别发酵豆乳的信号强度主成分分析
Fig. 7 Principal component analysis of signal strength of fermented soybean milk in different groups

2.5 大豆和苦荞质量比对发酵豆乳抗氧化活性的影响

通过测定发酵液总抗氧化能力、DPPH 自由基清除能力以及亚铁离子螯合能力来评价不同组的抗氧化水平。结果如表1所示,大豆与苦荞质量比为2:1时,发酵豆乳的总抗氧化能力(16.34 mmol/L)、DPPH 自由基清除能力(93.02%)以及亚铁离子螯合能力(56.43%)均显著高于纯大豆及纯苦荞发酵体系,与纯大豆发酵体系相比分别提高96.39%、14.51%、34.17%。苦荞中含有大量的酚类物质,随着发酵体系中苦荞的增加,酚类物质含量增加^[38]。Liu等发现结合酚不能被人体内的酶系统直接消化,经过微生物发酵后可发挥更高的生物活性^[39]。Caizhi等进一步研究表明酚类物质是植物性食品中的主要抗氧化剂,主要以与纤维素、胺和脂质部分结合的共轭形式存在^[40];发酵过程能够将共轭酚类化合物转化为游离形式,从而增强抗氧化活性^[29]。

表 1 不同复配发酵体系所得豆乳的抗氧化活性
Table 1 Antioxidant properties of soybean milk with different compound fermentation system

大豆与苦荞 质量比	总抗氧化能力/(mmol/L)	DPPH 自由基 清除能力/%	亚铁离子螯 合能力/%
1:0	8.32±0.12 ^c	81.23±1.50 ^b	42.06±1.21 ^b
2:1	16.34±0.57 ^a	93.02±1.00 ^a	56.43±2.04 ^a
0:1	13.12±0.69 ^b	52.99±2.49 ^c	31.15±1.81 ^c

3 结 语

通过添加苦荞、糙米、薏米、藜麦、燕麦粉可明显提高 JNFE 0127 液体发酵的产酶能力,其中苦荞

效果最好,当添加质量分数为 3%时,产酶量由原来的 5 803.12 U/mL 提高到 23 326.23 U/mL。在发酵豆乳制备中,随着苦荞添加量的增加,酶活力出现峰值,挥发性盐基氮质量浓度呈现先降低后维持稳定的趋势,抗氧化活性呈现先升高再降低的趋势。当大豆与苦荞质量比为 2:1 时,挥发性盐基氮质量浓度可降低到 3.45 mg/dL,比纯大豆发酵得到的发酵豆乳降低 20.14%;总抗氧化能力、DPPH 自由基清除能力以及亚铁离子螯合能力分别提高到 16.34 mmol/L、93.02%和 56.43%,也均高于纯大豆发酵得到的发酵豆乳。该研究在确保 NK 活力足够的条件下,为开发产品风味更易被消费者接受、食用更方便的纳豆食品提供借鉴。

参考文献:

- [1] ZHAO D, LIU J, WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2019, 16(4): 203-212.
- [2] XIAO Z J, SHEN J, LI Y, et al. High and economical nattokinase production with acetoin as a useful byproduct from soybean milk and glucose[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2022, 14(5): 792-803.
- [3] CHEN H J, MCGOWAN E M, REN N N, et al. Nattokinase: a promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases[J]. *Biomarker Insights*, 2018, 13: 1-9.
- [4] 石晓丹, 王家林, 马骏. 纳豆的研究现状及展望[J]. *食品工业*, 2021, 42(7): 227-230.
- [5] 倪楠, 辛志宏, 许斌, 等. 纳豆激酶豆乳液体发酵条件优化[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(10): 212-219.
- [6] 汪立君, 李里特, 齐藤昌义, 等. 大豆发酵食品风味物质的研究[J]. *食品科学*, 2004, 25(1): 66-69.
- [7] 郑丹妮. 多菌种复合发酵低氨味纳豆工艺的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2020.
- [8] 陈乐乐, 吴隽恺, 王乙伊, 等. 超甜玉米对高蛋白纳豆加工工艺及风味的影响[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 275-282.
- [9] 张杰, 赵志峰, 靳岳, 等. 改善纳豆风味与营养特性工艺的对比研究[J]. *中国调味品*, 2019, 44(4): 11-15.
- [10] 赵谋明, 邹颖, 林恋竹, 等. 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[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(2): 75-81.
- [11] WANG H J, CHANG L, LIN Y S. Changes in functionality of germinated and non-germinated brown rice fermented by *Bacillus natto*[J]. *Foods*, 2021, 10(11): 1-9.
- [12] 董岳峰. 苦荞纳豆发酵工艺及其营养成分分析[J]. *中国调味品*, 2016, 41(7): 69-72.
- [13] 叶彦均, 谭斌, 乔聪聪, 等. 生物发酵对糙米品质影响研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(10): 466-474.
- [14] 高凤, 郭晓娜, 朱科学. 面粉特性对燕麦挂面品质的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(3): 46-54.
- [15] 杜晶晶, 白语嫣, 陆毅, 等. 藜麦功能性酸奶的制作工艺研究[J]. *现代食品*, 2022, 28(19): 68-72.
- [16] 董岳峰, 麻秀芳, 李晓艳, 等. 薏米纳豆发酵工艺及其营养成分分析[J]. *中国酿造*, 2014, 33(12): 142-145.
- [17] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 40(2): 346-351.
- [18] 石玉琴, 杨绍青, 李延啸, 等. 瓜尔豆胶对乳酸菌增殖及酸奶品质的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(1): 29-35.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [20] SHORI A B, ALJOHANI G S, AL-ZAHRANI A J, et al. Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2022, 153: 1-8.

- [21] AI S G, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003, 51(12): 3661-3667.
- [22] SOWNDHARARAJAN K, SIDDHURAJU P, MANIAN S. Antioxidant activity of the differentially processed seeds of Jack bean (*Canavalia ensiformis* L. DC)[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2011, 20(3): 585-591.
- [23] 赵谋明, 邹颖, 林恋竹, 等. 纳豆菌液态发酵荞麦产纳豆激酶及其代谢特性分析[J]. **食品科学**, 2019, 40(4): 178-185.
- [24] 周雪琴, 刘良忠. 枯草芽孢杆菌筛选及其产纳豆激酶的液态发酵条件优化[J]. **食品工业科技**, 2022, 43(7): 163-169.
- [25] 于江森, 王家林, 张海粟. 黑纳豆固态发酵工艺优化的研究[J]. **中国调味品**, 2020, 45(3): 101-106.
- [26] LI T, ZHAN C Y, GUO G G, et al. Tofu processing wastewater as a low-cost substrate for high activity nattokinase production using *Bacillus subtilis*[J]. **BMC Biotechnology**, 2021, 21(1): 1-12.
- [27] 张轩. 产纳豆激酶和凝乳酶枯草芽孢杆菌的筛选及其在发酵乳中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [28] 王艳平. 花生粕固态发酵制备纳豆激酶和生物活性肽的工艺研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [29] 刘文涛, 刘柏宏, 张娟, 等. 枯草芽孢杆菌产角蛋白酶的发酵过程优化[J]. **食品与生物技术学报**, 2014, 33(5): 466-471.
- [30] PEPELJNIAK S, KALODERA Z, ZOVKO M. Antimikrobna aktivnost flavonoida *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hérit [J]. **Acta Pharmaceutica**, 2005, 55(4): 431-435.
- [31] PEPELJNIAK S, MARIJANA Z, ZOVKO M. Investigation of antimicrobial activity of *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hérit[J]. **Acta Pharmaceutica**, 2005, 55(4): 409-415.
- [32] 孙坤坤. 苦荞麦酚类物质的鉴定、分布及其生物活性研究[D]. 荆州: 长江大学, 2020.
- [33] GANDHI A, DEY G. Fermentation responses and *in vitro* radical scavenging activities of *Fagopyrum esculentum* [J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2013, 64(1): 53-57.
- [34] SEDEJ I, SAKAC M, MANDIC A, et al. Quality assessment of gluten-free crackers based on buckwheat flour[J]. **LWT – Food Science and Technology**, 2011, 44(3): 694-699.
- [35] DULF F V, VODNAR D C, DULF E H, et al. Total phenolic contents, antioxidant activities, and lipid fractions from berry pomaces obtained by solid-state fermentation of two *Sambucus* species with *Aspergillus niger*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63(13): 3489-3500.
- [36] AKANNI G B, DE KOCK H L, NAUDÉ Y, et al. Volatile compounds produced by *Bacillus* species alkaline fermentation of bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc) into a dawadawa-type African food condiment using headspace solid-phase microextraction and GC×GC-TOFMS[J]. **International Journal of Food Properties**, 2018, 21(1): 930-942.
- [37] OWENS J D, ALLAGHENY N, KIPPING G, et al. Formation of volatile compounds during *Bacillus subtilis* fermentation of soya beans[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 1997, 74(1): 132-140.
- [38] 陈月, 朱勇, 秦礼康. 苦荞不同部位酚类化合物组成与抗氧化活性[J]. **食品与机械**, 2022, 38(11): 15-19.
- [39] LIU R H. Whole grain phytochemicals and health[J]. **Journal of Cereal Science**, 2007, 46(3): 207-219.
- [40] CAIZHI Y A N, FAYIN Y E, GUOHUA Z. A review of studies on free and bound polyphenols in foods[J]. **Food Science**, 2015, 36(15): 249-254.