

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.05.004

# 粗壮脉纹孢菌固态发酵豆渣产抗氧化多肽研究

Study on antioxidant peptides from bean dregs fermented by  
solid *Neurospora crassa*

魏长浩<sup>1</sup> 邓泽元<sup>1</sup> 范亚苇<sup>1</sup>

WEI Chang-hao<sup>1</sup> DENG Ze-yuan<sup>1</sup> FAN Ya-wei<sup>1</sup>

邹新华<sup>2</sup> 李 静<sup>1</sup> 李红艳<sup>1</sup>

ZOU Xin-hua<sup>2</sup> LI Jing<sup>1</sup> LI Hong-yan<sup>1</sup>

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2. 播恩生物技术股份有限公司, 江西 赣州 341000)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China; 2. Boen Biotechnology Co., Ltd., Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

**摘要:**以粗壮脉纹孢菌(*Neurospora crassa*)为试验菌株,豆渣为发酵底物,在最适产蛋白酶条件下进行发酵,并对不同发酵时间的豆渣多肽、总酚、总黄酮含量以及抗氧化能力进行研究。结果表明,豆渣中的多肽、总酚和总黄酮含量随发酵时间的延长而增加,且抗氧化能力逐渐升高。当发酵时间为 60 h 时,总酚、总黄酮含量达最大,分别为(2.513±0.032), (0.787±0.052) mg/g; 当发酵时间为 84 h 时,多肽含量、总抗氧化能力、超氧阴离子自由基清除率、DPPH 自由基清除率均达最大,分别为(75.602±3.599) mg/g, (31.651±0.191) μmol/g, (35.537±1.408)%, (70.131±0.552)%, 且豆渣的抗氧化能力与所产生的抗氧化多肽最为相关。

**关键词:**粗壮脉纹孢菌; 抗氧化多肽; 总酚; 总黄酮

**Abstract:** *Neurospora crassa* was used to ferment the bean dreg, and the fermentation was operated under the optimal conditions for protease production. The peptide, total phenol, total flavonoid and the antioxidant capacity of soybean dregs at different fermentation time were measured. Experiments results showed that the contents of peptide, total phenol and total flavone of soybean dregs increased with the progress of fermenta-

tion, as well as the antioxidant capacity. The maximum contents of total phenol (2.513±0.032) mg/g and total flavone (0.787±0.052) mg/g were detected at 60 h after fermentation; after fermentation for 84 h, the peptide reached (75.602±3.599) mg/g, and the total antioxidant capacity reached (31.651±0.191) μmol/g. Moreover, the superoxide anion radical scavenging rate was found to reach (35.537±1.408)%, and that of DPPH reached (70.131±0.552)%.

**Keywords:** *Neurospora crassa*; antioxidant peptide; total phenol; total flavone

研究<sup>[1]</sup>表明,从江西本土发酵豆渣食品中分离筛选得到的粗壮脉纹孢菌(*Neurospora crassa*)具有较强的产酶能力,且孢子中富含类胡萝卜素,利用粗壮脉纹孢菌对农副产品进行固态发酵,可以很大限度地降低其抗营养因子含量。此外,利用粗壮脉纹孢菌的产酶体系,还可以分解农副产品中的纤维和蛋白质等,产生糖类、肽段以及氨基酸等生物活性物质,提高副产品的营养价值<sup>[2-4]</sup>。

豆渣作为大豆加工的副产物,富含膳食纤维、蛋白质等营养物质,但口感不佳、豆腥味浓且易腐败变质等<sup>[5]</sup>。叶俊等<sup>[6]</sup>研究发现,利用粗壮脉纹孢菌发酵豆渣能有效降低豆渣中的粗纤维含量,并且发酵后的豆渣中粗蛋白、粗纤维、可溶性总糖等营养物质含量均有显著提高。Vong 等<sup>[7]</sup>发现,利用解脂耶罗威亚酵母发酵豆渣不仅能提高豆渣的营养水平,还可生成谷氨酸盐等鲜味物质。Vidiany 等<sup>[8]</sup>使用酿酒酵母对豆渣进行发酵能有效促进总酚含量的增加和异黄酮的生物转化,提高了豆渣的抗氧化性能。因此,利用微生物发酵豆渣不仅可以将底物

**基金项目:**食品科学与技术国家重点实验室(南昌大学)目标导向课题项目(编号:SKLF-ZZA-201610, SKLF-ZZA-201910);赣州市重点研发项目(编号:赣市财教字[2017]8号)

**作者简介:**魏长浩,男,南昌大学在读硕士研究生。

**通信作者:**邓泽元(1962—),男,南昌大学教授,博士。

E-mail:273736939@qq.com

**收稿日期:**2020-03-24

中大分子物质转化为小分子物质,还可通过微生物自身的生理生化反应产生新的营养成分和生物活性物质,提高豆渣的营养价值和保健功能。

试验拟在粗壮脉纹孢菌发酵豆渣的最佳产蛋白酶条件下,对不同发酵时间的豆渣多肽、总酚、总黄酮含量和抗氧化性进行研究,为粗壮脉纹孢菌发酵农副产品生产抗氧化肽提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

#### 1.1.1 菌种及原材料

粗壮脉纹孢菌 CGMCC NO.3088;实验室保藏;

豆渣:市售;

没食子酸、芦丁、谷胱甘肽(还原型)标准品:阿拉丁试剂(上海)有限公司;

DPPH 标准品、FRAP 试剂盒(BC1315);上海索莱宝生物科技有限公司;

福林酚:分析纯,上海索莱宝生物科技有限公司;

SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司;

6×上样缓冲液:北京全式金生物技术有限公司;

邻苯三酚标准品:美国 Sigma 公司;

硫酸亚铁、硫酸铜、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠:分析纯,西陇科学股份有限公司。

#### 1.1.2 仪器与amp;设备

恒温恒湿箱:HPX-160BSH 型,上海新苗医疗器械制造有限公司;

电热鼓风干燥器:DGG-9140A 型,上海精宏实验设备有限公司;

电子天平:FA1104 型,上海精天电子仪器厂;

桌上型超净工作台:HD-650 型,苏州安泰空气技术有限公司;

立式压力蒸汽灭菌锅:LDZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂;

全自动酶标仪:ELX800 型,美国 BioTek 公司;

pH 计:PHS-3C 型,上海仪电科学仪器股份有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 斜面培养 将粗壮脉纹孢菌接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)的固体斜面上,于 30℃,湿度 70%的恒温恒湿培养箱中,光照条件下培养 96 h,4℃冰箱保存。

1.2.2 孢子悬浮液的制备 将活化好的菌种转移到 PDA 固体培养基中,于 30℃,湿度 70%的恒温恒湿培养箱中,光照条件下培养 96 h,收集孢子制成孢子悬液。

1.2.3 固态发酵豆渣 称取 10 g 豆渣为固态发酵培养基的基质物质,参照于新颖<sup>[9]</sup>的方法进行固态发酵 108 h,

每间隔 12 h 取样,将样品冻干并粉碎备用。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳 称取样品 0.05 g,加入 1 mL 水,涡旋混匀,4℃,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,并与 6×上样缓冲液按比例混合,沸水浴 10 min,冷却,取 15 μL 样液进行上样。浓缩胶电泳输出电压 80 V,分离胶电泳输出电压 120 V。按表 1 的方法配置浓缩胶与分离胶。

表 1 SDS-PAGE 电泳制胶组成成分

Table1 Composition of SDS-PAGE electrophoresis gel

试剂	单位	12%分离胶	5%浓缩胶
水	mL	3.3	4.0
30% Acr-bis	mL	4.0	1.0
1.5 mol/L Tris-HCl	mL	2.5	—
1.0 mol/L Tris-HCl	mL	—	1.0
SDS	μL	100.0	80.0
AP	μL	100.0	60.0
TEMED	μL	100.0	8.0

1.2.5 多肽含量的测定 参照涂宗财等<sup>[10-11]</sup>的方法并修改。准确称取不同发酵时间的冻干豆渣样品 1 g,加入 10 mL 蒸馏水,涡旋提取,4 500 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液与 1 mL 10%三氯乙酸混合,充分摇匀后静置 1~2 min,4 500 r/min 离心 10 min。取 1.5 mL 上清液并加入 1.5 mL 5%三氯乙酸和 2 mL 双缩脲试剂,充分混匀后静置反应 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定 540 nm 处吸光值,以 3 mL 5%的三氯乙酸与 2 mL 双缩脲混合溶液为空白对照,按式(1)计算多肽含量。

$$C = \frac{X \times V \times N}{W}, \quad (1)$$

式中:

C——多肽含量,mg/g;

X——查标准曲线值,mg/mL;

V——提取所用蒸馏水体积,mL;

W——提取所用样品质量,g;

N——提取液稀释倍数。

1.2.6 多肽提取液的制备 参照陈洁梅等<sup>[12]</sup>的方法提取豆渣水溶性蛋白,并过 0.45 μm 微孔滤膜去除不溶物和细菌,4℃冷藏备用。

1.2.7 总酚含量的测定 采用福林酚试剂法<sup>[13]</sup>并修改。取一定量的发酵豆渣提取液,冻干后用等量的 70%乙醇复溶,4 500 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL,加入 2 mL 0.2 mol/L 福林酚溶液,混匀后静置 5 min,再加入 3 mL 10%的碳酸钠溶液,用蒸馏水定容至 25 mL,避光反应 60 min,测定 760 nm 处吸光值,按式(2)计算总酚含量。

$$C = \frac{X \times V}{W}, \quad (2)$$

式中:

- C——活性物质含量,mg/g;
- X——查标准曲线值,mg/mL;
- V——提取所用蒸馏水体积,mL;
- W——提取所用样品质量,g。

1.2.8 总黄酮含量的测定 采用亚硝酸钠—硝酸铝法<sup>[14]</sup>并修改。取一定量的发酵豆渣提取液,冻干后用等量的 70%乙醇复溶,4 500 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL,加入 0.4 mL 5%的亚硝酸钠溶液,混匀后静置 6 min,再加入 0.4 mL 10%的硝酸铝溶液,用 70%乙醇定容至 10 mL,避光反应 15 min,测定 510 nm 处吸光值,按式(2)计算总黄酮含量。

1.2.9 总抗氧化能力的测定 参照 FRAP 试剂盒说明书,通过测定铁离子还原能力评价不同发酵时间豆渣的总抗氧化能力。按式(3)计算总抗氧化能力。

$$C = \frac{X \times V_2 \times V_1}{V_3 \times W} \quad (3)$$

式中:

- C——总抗氧化能力, $\mu\text{mol/g}$ ;
- X——硫酸亚铁浓度, $\mu\text{mol/mL}$ ;
- $V_1$ ——提取所用蒸馏水体积,mL;
- W——提取所用样品质量,g;
- $V_2$ ——反应液总体积, $\mu\text{L}$ ;
- $V_3$ ——反应中样品体积, $\mu\text{L}$ 。

1.2.10 超氧阴离子自由基清除率的测定 参照文献<sup>[15]</sup>。

1.2.11 DPPH 自由基清除率的测定 参照 Torres-Fuentes 等<sup>[16]</sup>的方法并修改。取 2 mL 样品溶液,加入等量的 95%乙醇溶液(含 0.2 mmol/L DPPH),混匀;以 95%的乙醇与 DPPH 混合溶液为空白组;95%的乙醇溶液代替 DPPH 与样品混合为对照组,避光反应 30 min,测定 517 nm 处吸光值,按式(4)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

- C——DPPH 自由基清除率,%;
- $A_s$ ——样品吸光值;
- $A_b$ ——空白组吸光值;
- $A_c$ ——对照组吸光值。

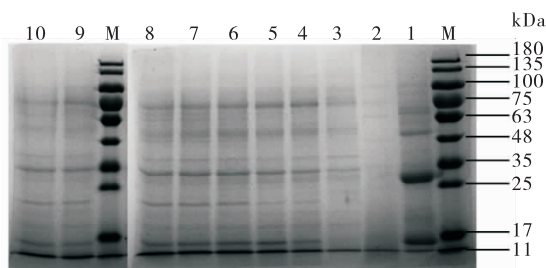
### 1.3 数据处理

使用 Origin 2017 软件制图,用 SPSS 19 软件进行显著性 ( $P < 0.05$ )及相关性分析,结果以(平均值 $\pm$ 标准差)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 SDS-PAGE 电泳

由图 1 可知,发酵后的豆渣存在许多原料豆渣中没有的蛋白条带,说明这些蛋白是粗壮脉纹孢菌菌体为满足自身代谢需求所合成的。随着发酵时间的延长,11 kDa



M. 标准蛋白 1. 豆渣原料 2. 发酵 12 h 3. 发酵 24 h 4. 发酵 36 h 5. 发酵 48 h 6. 发酵 60 h 7. 发酵 72 h 8. 发酵 84 h 9. 发酵 96 h 10. 发酵 108 h

图 1 发酵不同时间豆渣的 SDS-PAGE 图

Figure 1 SDS-PAGE profiles of soybean dregs at different fermentation time

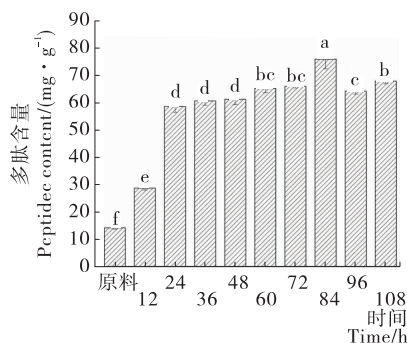
左右的条带颜色逐步加深,说明粗壮脉纹孢菌可以通过自身酶系生成小分子物质,并逐渐积累。刘慧菊等<sup>[17]</sup>研究发现,利用微生物发酵处理脱脂蚕豆能有效提高原料中粗蛋白、可溶性蛋白以及多肽含量。

### 2.2 豆渣的多肽含量

由图 2 可知,经粗壮脉纹孢菌发酵的豆渣多肽含量与未经发酵的豆渣存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ),且随发酵时间的增加而上升。当发酵时间为 84 h 时,豆渣中多肽含量达最大,为  $(75.602 \pm 3.599)$  mg/g,是未发酵豆渣的 5 倍,说明利用粗壮脉纹孢菌发酵处理豆渣能很好地降解豆渣中的大分子蛋白并将其转化为小分子多肽。孙林等<sup>[18]</sup>研究发现,发酵后的菜籽粕多肽含量是未经发酵的 7 倍左右。发酵 84 h 后多肽含量出现下降,可能是因为继续发酵会产生一些能降解肽的酶类<sup>[19]</sup>。

### 2.3 豆渣的总酚、总黄酮含量

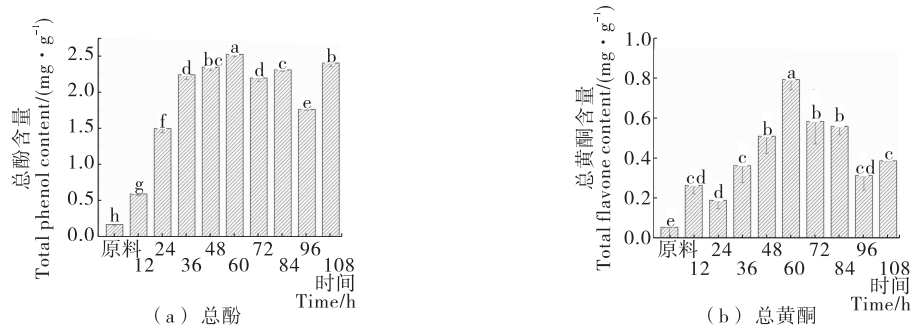
由图 3 可知,经粗壮脉纹孢菌发酵的豆渣总酚、总黄酮含量与未经发酵的豆渣存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。当发酵时间为 60 h 时,豆渣中总酚、总黄酮含量达最大,



字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

图 2 发酵不同时间豆渣的多肽含量

Figure 2 Peptide contents of soybean dregs at different fermentation time



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图3 发酵不同时间豆渣的总酚、总黄酮含量

Figure 3 Total phenol and total flavonoid contents of soybean dregs at different fermentation time

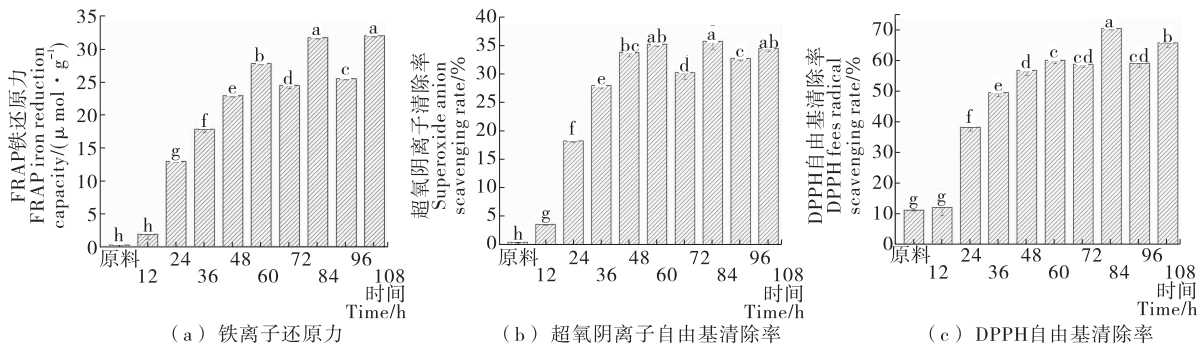
分别为(2.513±0.032), (0.787±0.052) mg/g, 是未发酵豆渣的 13, 15 倍。宋莹等<sup>[20]</sup>研究发现, 经过发酵的紫薯生粉其总酚和总黄酮含量均有显著提高。这可能是由于微生物发酵使得结合型酚类物质与黄酮物质被释放, 使得游离酚类化合物与黄酮类化合物含量显著提高<sup>[14, 21]</sup>。研究<sup>[22]</sup>表明, 微生物可通过自身酶系合成黄酮类物质或者改善合成途径的方式提高基质中的黄酮含量。

2.4 豆渣的抗氧化能力及其相关性

由图 4 可知, 经粗壮脉纹孢菌发酵的豆渣总抗氧化

能力、超氧阴离子自由基清除能力和 DPPH 自由基清除能力均显著高于未经发酵的豆渣(P<0.05), 三者的最高值均出现在发酵 84 h 时, 分别为 (31.651 ± 0.191) μmol/g, (35.537 ± 1.408)%, (70.131 ± 0.552)%, 说明发酵可以很好地提高底物的抗氧化活性。Lee 等<sup>[23]</sup>研究发现, 冻融豆腐在发酵 18 h 时最理想, 其还原糖、总肽、异黄酮含量、抗氧化活性均有较大提高。

由表 2 可知, 总酚、总黄酮以及多肽含量均与抗氧化能力极显著相关(P<0.01)。总抗氧化能力和 DPPH 自



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图4 发酵豆渣的抗氧化能力

Figure 4 Antioxidant capacity of fermented soybean dregs

表 2 发酵豆渣中多肽、总酚及总黄酮含量与抗氧化能力的相关性<sup>†</sup>

Table 2 Correlation between the content of peptides, total phenols, total flavone and antioxidant capacity of fermented soybean dregs

指标	多肽含量	总酚含量	总黄酮含量	总抗氧化能力	超氧阴离子自由基清除能力	DPPH 自由基清除能力
多肽含量	1.000					
总酚含量	0.952**	1.000				
总黄酮含量	0.762**	0.846**	1.000			
总抗氧化能力	0.947**	0.938**	0.794**	1.000		
超氧阴离子自由基清除能力	0.963**	0.974**	0.817**	0.976**	1.000	
DPPH 自由基清除能力	0.969**	0.956**	0.787**	0.991**	0.989**	1.000

<sup>†</sup> \*\* 表示差异极显著(P<0.01)。

由基清除能力中,相关性最高的为多肽含量,其次是总酚含量;超氧阴离子自由基清除能力中总酚含量的相关性最高,其次是多肽含量。Moayed 等<sup>[24]</sup>研究发现,氨基酸和多肽的浓度与抗氧化和抗菌活性之间呈良好的相关性。综上,多肽含量的升高是抗氧化能力提升的关键因素,粗壮脉纹孢菌发酵豆渣会产生抗氧化多肽,且最佳发酵时间为 84 h。

### 3 结论

以粗壮脉纹孢菌作为发酵菌种,对其固态发酵豆渣抗氧化性质进行了探索。结果表明,利用粗壮脉纹孢菌对豆渣进行发酵可以很好地利用豆渣中的大分子蛋白,并将其降解为多肽,发酵过程中可释放处于结合状态的多酚、黄酮等活性物质,提高豆渣的利用价值。多肽含量与抗氧化能力最为相关,且当发酵时间为 84 h 时,多肽含量、总抗氧化能力、超氧阴离子自由基清除率、DPPH 自由基清除率均达最高。试验仅对多肽混合液进行了研究,后续将在此基础上通过对抗氧化肽的分离纯化以及鉴定对抗氧化肽进行深入研究。

#### 参考文献

[1] 任志青, 邓泽元, 宋沥文, 等. 通过粗壮脉纹孢菌发酵改善豆粕营养结构的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 222-225.

[2] 于新颖, 魏长浩, 余诚玮, 等. 粗壮脉纹孢菌固态发酵对菜籽粕营养品质的改善[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 221-227.

[3] ZHENG Liu-feng, YU Xin-ying, WEI Chang-hao, et al. Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation[J]. LWT, 2020, DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108990.

[4] 吴丹, 邓泽元, 范亚苇, 等. 粗壮脉纹孢菌液体发酵产纤维素酶的条件优化[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 25-27.

[5] 马秀婷, 肖志刚, 孙旭, 等. 超声波辅助提取豆渣蛋白工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 108-112.

[6] 叶俊, 李静, 范亚苇, 等. 粗壮脉纹孢菌发酵豆渣过程中营养成分的变化研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 217-221.

[7] VONG W C, AU YANG K L C, LIU Shao-quan. Okara (soybean residue) biotransformation by yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 235: 1-9.

[8] QUEIROZ SANTOS V A, NASCIMENTO C G, SCHMIDT C A P, et al. Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 92: 509-515.

[9] 于新颖. 粗壮脉纹孢菌蛋白水解酶的分离纯化, 酶学性质和菌株应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2018: 29.

[10] 涂宗财, 谢欢, 钮培佩, 等. <sup>60</sup>Co 辐照对卵清蛋白结构和抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 135-138.

[11] 刘潇, 郭丽娜, 马海乐, 等. 枯草芽孢杆菌和黑曲霉固态发酵制备核桃多肽的工艺条件优化[J]. 现代食品科技, 2018, 34(8): 130-137.

[12] 陈洁梅, 徐聪聪, 常磊, 等. 响应面分析法优化豆粕固态发酵工艺生产大豆抗氧化肽的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(12): 59-65.

[13] KIM D S, KANG Y M, JIN Wen-yi, et al. Antioxidant activities and polyphenol content of *Morus alba* leaf extracts collected from varying regions[J]. Planta Medica, 2014, 2(5): 675-680.

[14] JUAN Ming-yen, CHOU Cheng-chun. 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): 586-591.

[15] 殷金莲, 孟祥敏, 陈鹏. 发酵生产甲鱼多肽及其抗氧化功能研究[J]. 食品工业, 2010(5): 9-11.

[16] TORRES-FUENTES C, CONTRERAS M D M, RECIO I, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 194-202.

[17] 刘慧菊, 韩丽娟, 乔杨波, 等. 不同微生物液态发酵对蚕豆蛋白营养价值及功能特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 65-71.

[18] 孙林, 刘平, 卓伟伟, 等. 微生物发酵生产高蛋白多肽菜籽粕的研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(12): 94-98.

[19] 秦卫东, 陈学红, 马利华, 等. 黑曲霉发酵豆粕制备抗氧化肽研究[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 289-293.

[20] 宋莹, 刘思含, 常霞, 等. 紫薯粉发酵工艺优化及抗氧化能力分析[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 216-221, 229.

[21] LIU Feng-ru, CHEN Zheng-xing, SHAO Juan-juan, et al. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ[J]. Food Bioscience, 2017, 20: 141-148.

[22] 刁欢, 孙方方, 朱华燕, 等. 微生物发酵提高油茶粕中黄酮类物质提取率的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(9): 1 363-1 366, 1 362.

[23] LEE M K, KIM J K, LEE S Y. Effects of fermentation on SDS-PAGE patterns, total peptide, isoflavone contents and antioxidant activity of freeze-thawed tofu fermented with *Bacillus subtilis* [J]. Food Chemistry, 2018, 249: 60-65.

[24] MOAVEDI A, HASHEMI M, SAFARI M. Valorization of tomato waste proteins through production of antioxidant and antibacterial hydrolysates by proteolytic *Bacillus subtilis*: Optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(1): 391-400.