

固态发酵苦荞制备多肽菌种的筛选

唐田园 陈旋 宋凤霞 王凤萍 李莉蓉*

(昆明理工大学云南省食品安全研究院 云南 昆明 650500)

摘要:【目的】筛选固态发酵苦荞高产多肽及发酵产物液具有抗菌、抗氧化活性的菌株。【方法】采用米曲霉、酱油曲霉、雅致放射毛霉和少孢根霉分别对苦荞进行固态发酵,以蛋白酶活力、水解度、可溶性肽得率、抑菌率和体外自由基清除率作为筛菌指标。【结果】米曲霉固态发酵苦荞的可溶性肽得率最高达 38.83%±1.18%,发酵产物液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为 96.62%±1.66%和 97.54%±0.54%,同时羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率和二苯基苦味酰基苯肼自由基(DPPH \cdot)清除率分别为 55.65%±1.25%和 10.84%±1.03%。对米曲霉发酵 2 d 发酵产物液的不同分子量分布及活性分析表明,分子量大小对抗菌及抗氧化活性有一定的影响。【结论】米曲霉可作为固态发酵苦荞制备多肽且发酵产物液具有抗菌及抗氧化活性的最佳菌株,并在多肽产量提升及抗菌、抗氧化活性的研究上具有巨大空间。

关键词: 苦荞, 固态发酵, 多肽, 抗菌, 抗氧化

Screening of strains producing peptides from tartary buckwheat by solid-state fermentation

TANG Tian-Yuan CHEN Xuan SONG Feng-Xia WANG Feng-Ping LI Li-Rong*

(Yunnan Province Food Safety Research Institute, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: [Objective] Strain of tartary buckwheat by solid-state fermentation was screened for high peptides and their fermentation product liquid had antimicrobial and antioxidant activity. [Methods] *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Actinomucor repens* and *Rhizopus oligosporus* were respectively applied in tartary buckwheat by solid-state fermentation. The protease activity, degree of hydrolysis, soluble peptide yield, inhibition rate, and radical scavenging rate *in vitro* were regarded as evaluation indexes to verify target strains. [Results] *Aspergillus oryzae* was the optimal fermentation strain, the highest soluble peptides rate was 38.83%±1.18%, the inhibition rate of *E. coli* and *S. aureus* were 96.62%±1.66% and 97.54%±0.54%, the fermentation product liquid prepared the hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) scavenging rate and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31460424); Natural Science Foundation of Yunnan Province (No. KKS201405050)

*Corresponding author: Tel: 86-871-65920216; E-mail: lilirong-lily@126.com

Received: March 21, 2016; Accepted: June 12, 2016; Published online (www.cnki.net): June 21, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31460424); 云南省自然科学基金项目(No. KKS201405050)

*通讯作者: Tel: 86-871-65920216; E-mail: lilirong-lily@126.com

收稿日期: 2016-03-21; 接受日期: 2016-06-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

(DPPH·) scavenging rate were $55.65\% \pm 1.25\%$ and $10.84\% \pm 1.03\%$, respectively. According to the different molecular weight distributions and activity analysis of liquid fermentation product of *Aspergillus oryzae* of 2 days demonstrated that different components molecular segments had an impact on antimicrobial and antioxidant activity. **[Conclusion]** Among these strains, *Aspergillus oryzae* was the most optimal strains which can be applied in tartary buckwheat by solid-state fermentation to produce peptides, and its fermentation product liquid had antimicrobial and antioxidant activity.

Keywords: Tartary buckwheat, Solid-state fermentation, Peptides, Antimicrobial, Antioxidant

食品微生物腐败变质、食品氧化变质影响食品品质和安全，并可造成经济损失和影响公众健康。随着人们消费方式的改变和对食品安全及自身健康的关注，追求更天然、更少化学残留和更少加工过程的健康食品是食品工业发展的一个新方向，这就需要更天然、更有效、更安全的生物防腐剂和抗氧化剂来防控由微生物及氧化引起的食品变质。

微生物液态发酵法制备多肽操作简单、成本低、化学物质使用少。但液态发酵法具有培养基组成复杂、发酵产物浓度低、能耗高等缺点。固态发酵法则有培养基简单、产率高、能耗低、环境污染较少、适合规模制备等优点^[1]。目前，国内外还未见采用固态发酵法制备苦荞多肽的相关研究报道。本文选取的4株真菌：米曲霉为我国传统酿造食品酱、酱油和酒类的生产菌种，已有一千多年的安全应用历史^[2]；酱油曲霉为酱油酿造过程中常用种曲^[3]；雅致放射毛霉和少孢根霉是我国传统腐乳制作中常用的优良菌种，也被广泛用于干酪的制作^[4-6]。采用这些用于固态发酵且高产蛋白酶的发酶食品源菌作为筛选固态发酵制备苦荞多肽的菌株，具有安全性高、应用范围广、接种方便灵活、真菌孢子易于保存且可维持较高活性等优点。在发酵过程中，由于使用的发酵菌株不同，菌株产生的蛋白酶种类和酶活也不同，从而导致酶解苦荞中蛋白质得到的多肽量和发酵产物液的抑菌及抗氧化活性也存在较大差异。因此为了尽可能多地获得苦荞多肽和具有抑菌及抗氧化活性的产物液，对固态发酵用菌株进行筛选具有非常重要的意义。

云南是特色粮食作物苦荞的起源中心之一，苦荞资源丰富^[7]。苦荞又名鞑靼荞麦，是粮药兼用的经济作物，其蛋白质含量约为10%–15%，且50%以上是清蛋白和球蛋白^[8]。但目前苦荞利用率不高、产品附加值低。研究表明荞麦肽具有抗菌、真菌等活性^[9]。本研究以资源丰富的苦荞为原料，以发酵食品源菌株：米曲霉、酱油曲霉、雅致放射毛霉和少孢根霉为固态发酵用菌株，研究可用于固态发酵苦荞制备多肽及发酵产物液具有抗菌、抗氧化活性的优良菌株，为苦荞多肽固态发酵制备、抗菌及抗氧化活性成分的进一步研究提供理论基础，对苦荞的深加工和高值化利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株：米曲霉、酱油曲霉、少孢根霉 (*Aspergillus oryzae* 41477, *Aspergillus sojae* 40364, *Rhizopus oligosporus* 3152) 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心；雅致放射毛霉 (*Actinomucor repens* GIM 3.3) 购于广东省微生物菌种保藏中心；大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 (*Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213) 购于上海鲁微科技有限公司。

1.1.2 主要材料与试剂：苦荞购于昆明市官渡区苏荣调味食品厂，其中粗蛋白为 $12.49\% \pm 0.04\%$ ，粗脂肪为 $3.31\% \pm 0.06\%$ ，灰分为 $2.15\% \pm 0.01\%$ ，水分为 $12.18\% \pm 0.07\%$ ；1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH) 购于Sigma公司产品；其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基：种子培养基(g/L)：切成 2 cm^2 小块

去皮马铃薯 200, 煮沸 30 min, 双层纱布过滤, 滤液中加入葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 自然。Luria-Bertani 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 琼脂 15, 调 pH 至 7.0。固态发酵培养基: 称取 10 g 苦荞粉于发酵瓶中, 加入 6 mL 蒸馏水, pH 自然。所有培养基 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.4 主要仪器: GSP-9050MBE 隔水式恒温培养箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; UV-1800PC 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 冷冻离心机, 美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 种子悬液制备: 取斜面真菌菌株涂布于种子培养基上, 28 °C、80%湿度条件下培养 5 d 后用无菌生理盐水洗下孢子, 双层纱布过滤, 用无菌生理盐水重悬浓度为 2×10^7 个/mL 的种子悬液。

1.2.2 苦荞固态发酵: 取 2.5 mL 种子孢子悬液加入固态发酵培养基, 搅拌均匀, 28 °C、80%湿度条件下, 于隔水式恒温培养箱培养 7 d, 每隔 1 d 取样测定各指标。不加种子孢子悬液的为空白对照组。

1.2.3 苦荞固态发酵产物液制备: 向发酵后苦荞固态基质加蒸馏水 30 mL, 在 18 °C、300 W 功率下超声 1 h, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 收集上清液并定容至 25 mL。取适量测定蛋白酶活, 剩余上清液煮沸 5 min 灭活酶, 10 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液, 即为苦荞固态发酵产物液。

1.2.4 苦荞固态发酵产物液的蛋白酶活力测定: 参照 SB/T 10317-1999 福林法进行^[10]。

1.2.5 苦荞固态发酵产物液的水解度测定: 参照 GB/T 5009.39-2003 甲醛值法测定氨基酸态氮, 按如下公式计算水解度^[11]:

$$\text{水解度}(\%) = \frac{\text{氨基酸态氮}}{\text{总氮含量}} \times 100。$$

1.2.6 苦荞固态发酵产物液可溶性肽得率测定: 采用三氯乙酸沉淀结合福林-酚法测定可溶性肽含量^[12]。取发酵产物液, 加入等体积 10% 的三氯乙酸, 涡漩振荡后静置 20 min, 10 000 r/min 离心

10 min, 取 1 mL 上清液, 加入 5 mL 碱性铜溶液, 混匀, 室温放置 10 min, 加入 0.5 mL 酚试剂并迅速摇匀, 30 °C 水浴孵育 30 min 显色, 测定 650 nm 处吸光值。以牛血清蛋白为标准品制作标准曲线, 从标准曲线求出可溶性肽含量。试验得到标准曲线回归方程为 $y=1.795x+0.129$ ($R^2=0.9997$)。按如下公式计算可溶性肽得率:

$$\text{可溶性肽得率}(\%) = \frac{\text{发酵产物液中多肽含量}}{\text{发酵固态基质苦荞蛋白含量}} \times 100。$$

1.2.7 苦荞固态发酵产物液抑菌率测定: 将细菌培养至对数期, 4 °C、10 000 r/min 离心 30 s 收集细菌细胞。以无菌生理盐水洗 2 遍后用新鲜 Luria-Bertani 培养基重悬为 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液。将 100 μ L 经 0.22 μ m 水系微孔滤膜过滤的发酵产物液加入 96 孔酶标板中, 再加入等体积的菌悬液作为试验组; 以 100 μ L 无菌生理盐水代替等体积发酵产物液作为对照组; 用 100 μ L 无菌生理盐水代替等体积的菌悬液用于扣除样品颜色; 37 °C 培养 12 h 后用酶标仪测定 620 nm 下吸光值^[13]。按如下公式计算发酵产物液的抑菌率:

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{\text{对照组OD值} - (\text{试验组OD值} - \text{样品颜色OD值})}{\text{对照组OD值}} \times 100。$$

1.2.8 苦荞固态发酵产物液·OH 清除率测定: 向离心管中加入 9 mmol/L FeSO₄、水杨酸-乙醇溶液和发酵产物液各 1 mL 混匀, 加入 6 mmol/L H₂O₂ 1 mL 再次混匀, 37 °C 水浴 30 min, 然后 10 000 r/min 离心 2 min。取上清液测定 510 nm 吸光值记为 A_1 ; 空白和对照分别用 1 mL 蒸馏水代替水杨酸-乙醇溶液和发酵产物液, 测定吸光值分别记为 A_{0i} 和 A_0 。以蒸馏水调零, 按如下公式计算·OH 清除率^[14]:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_{0i}}{A_0}\right) \times 100。$$

1.2.9 苦荞固态发酵产物液 DPPH·清除率测定: 在离心管中加入 0.1 mmol/L DPPH 甲醇溶液 2 mL 和发酵产物液 0.4 mL, 混匀后避光静置 30 min, 测定 517 nm 波长处吸光值记为 A_1 ; 2 mL 甲醇溶液

和 0.4 mL 发酵产物液的吸光值记为 A_2 ; 2 mL DPPH 甲醇溶液和 0.4 mL 蒸馏水的吸光值记为 A_0 。按如下公式计算 DPPH·清除率^[15]：

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100。$$

1.2.10 米曲霉固态发酵苦荞产物液分子量分布情况及活性特点：取米曲霉第 2 天发酵产物液 10 mL，用 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤，用截留分子量分别为 10、5、3 kD 的 Millipore 超滤离心管进行膜过滤，收集不同分子质量范围的发酵产物液定容至 10 mL，测定肽浓度、抑菌率和自由基清除率。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 对实验数据进行统计分析，结果以平均值 \pm 标准差表示。用单因素 ANOVA 分析的 Tukey HSD 检验对数据进行显著性分析， $P < 0.05$ 说明差异显著。

2 结果与分析

2.1 固态发酵苦荞产物液的蛋白酶活力分析

采用固态发酵制备苦荞多肽，主要利用发酵菌株所产的蛋白酶对苦荞蛋白进行酶解。不同菌株固态发酵苦荞产物液的蛋白酶活力如图 1 所示。由图 1 可知，4 株真菌在固态发酵苦荞过程中均可产生酸性、中性和碱性蛋白酶，且蛋白酶活力随发酵时间的延长先增加后降低，在发酵 2 d 或 3 d 达到最大值。米曲霉和酱油曲霉在发酵过程中主要产中性和碱性蛋白酶，同时产一定量的酸性蛋白酶。酱油曲霉发酵所产 3 种蛋白酶活力均显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)，分别为 348 ± 13 、 1998 ± 45 、 1949 ± 49 U/mL，其次为米曲霉，产 3 种蛋白酶活力分别为 199 ± 8 、 1426 ± 78 、 1706 ± 76 U/mL。雅致放射毛霉和少孢根霉在固态发酵过程中产蛋白酶的酶活力相对较低。固态发酵过程中蛋白酶活力的差异和变化可能是菌株生长状态和发酵基质成分对菌株产蛋白酶活力影响的结果。

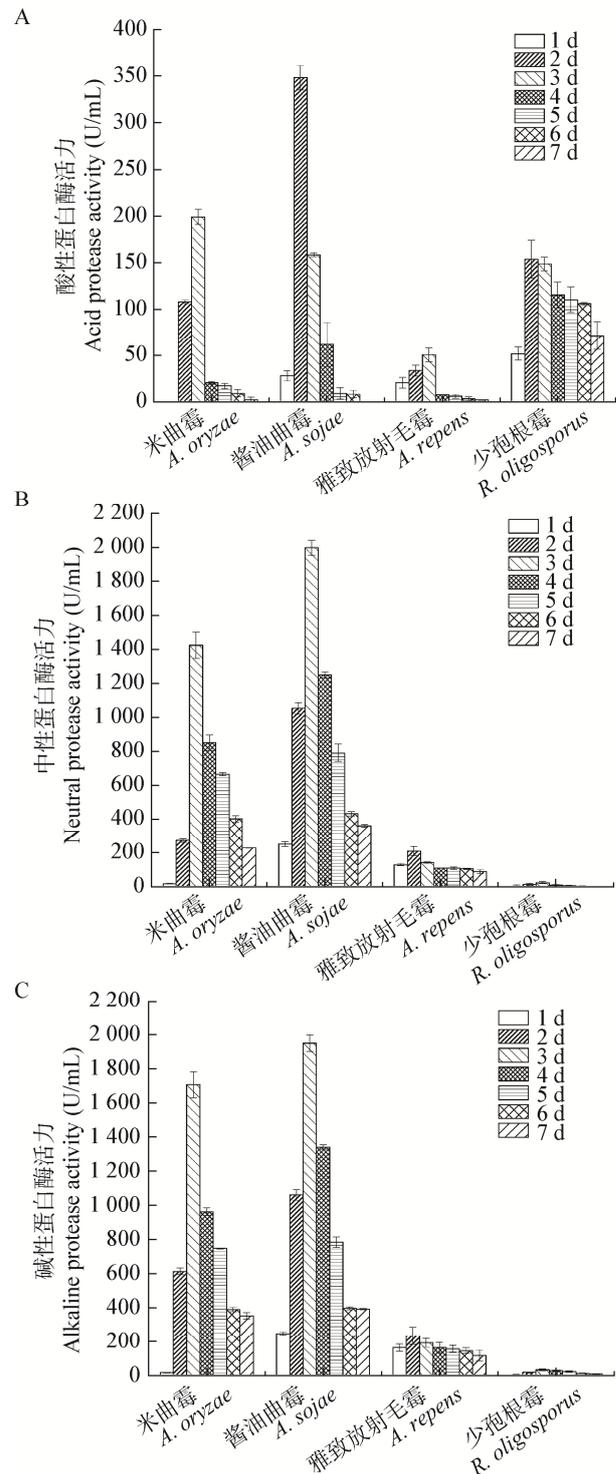


图 1 发酵产物液的酸性蛋白酶活力(A)、中性蛋白酶活力(B)、碱性蛋白酶活力(C)

Figure 1 Acid protease activity (A), neutral protease activity (B) and alkaline protease activity (C) of fermentation product liquid

2.2 固态发酵苦荞过程的水解度分析

发酵过程水解度的变化反映菌株在固态发酵过程中产生的蛋白酶水解苦荞蛋白肽键的效果。图 2 显示 4 株真菌固态发酵过程的水解度随发酵时间的延长逐渐增加；米曲霉和酱油曲霉固态发酵过程的水解度比较低，发酵 7 d 的水解度分别为 $3.78\% \pm 0.12\%$ 和 $7.24\% \pm 0.05\%$ ；而固态发酵产蛋白酶活力较低的雅致放射毛霉的水解度显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)，达 $9.98\% \pm 0.10\%$ ，同时少孢根霉产蛋白酶活力也较低，但其水解度为 $9.09\% \pm 0.06\%$ ；原因可能是 4 株真菌在固态发酵过程中产生的蛋白酶种类不同以及固态发酵基质环境对蛋白酶酶解作用的影响，使它们对苦荞蛋白的酶解效率不同。

2.3 固态发酵苦荞过程产物液的可溶性肽得率分析

肽得率反映真菌固态发酵产物液中多肽含量的高低。由图 3 可知，发酵产物液的肽得率随发酵时间的延长先上升后降低，原因可能是发酵前期蛋白酶逐渐增加因此水解度也逐渐增加，但在固态发酵中后期蛋白酶进一步将苦荞肽降解为氨基酸使肽得率降低。在整个发酵过程水解度低的米曲霉发酵 2 d 的肽得率为 $38.83\% \pm 1.18\%$ ，显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)，但发酵 3 d 则降至 $19.49\% \pm 2.12\%$ ，随后 4–7 d 的肽得率均低于其他菌株。原因可能是在发酵初期产生的蛋白酶酶解效率虽然不高，但外切位点较少，所以肽得率相对较高；在发酵后期产生的蛋白酶酶解效率降低以及蛋白酶外切作用，因此发酵后期肽得率降低。整个发酵过程水解度较高的雅致放射毛霉和少孢根霉固态发酵产物液的肽得率也较高，说明这两株菌发酵苦荞能较好地酶解苦荞蛋白产苦荞肽。

2.4 固态发酵苦荞产物液的抑菌率

以 *E. coli* 和 *S. aureus* 分析固态发酵产物液的抑菌率，抑菌率为 0 表示无抑菌活性，抑菌率为负值表示无抑菌活性且促进细菌生长。由图 4A 可知未加真菌种子孢子悬液的空白对照组对 *E. coli* 未显示抑菌活性，相反还促进 *E. coli* 的生长，原因可能是产物液中的成分不具有抗菌活性且被 *E. coli* 作为营

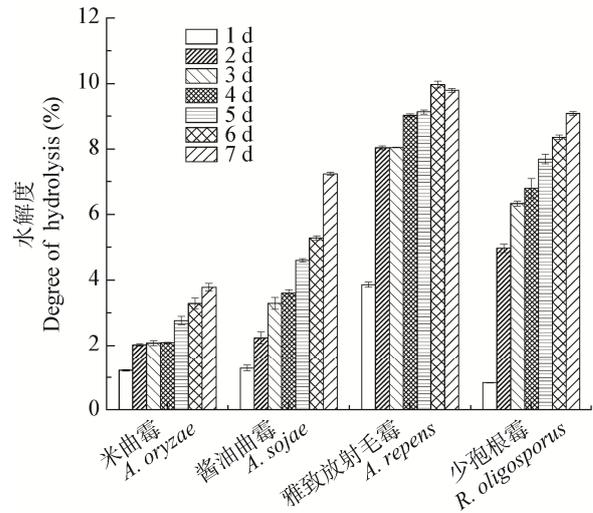


图 2 固态发酵过程的水解度

Figure 2 Degree of hydrolysis in the process of solid-state fermentation

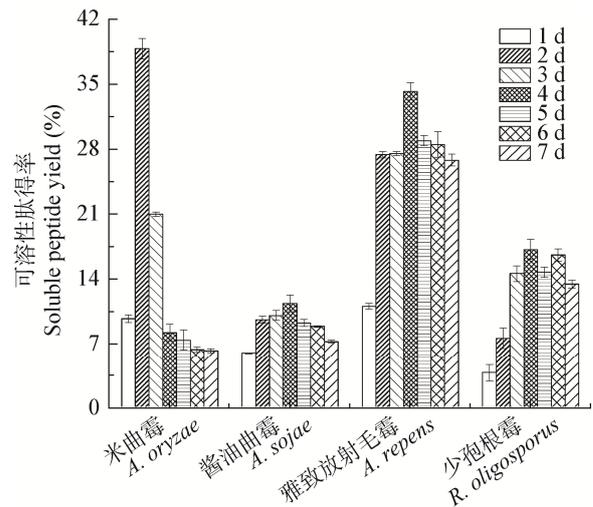


图 3 固态发酵过程的可溶性肽得率

Figure 3 Soluble peptide yield in the process of solid-state fermentation

养物质利用^[16]。除 1、4 d 外，米曲霉发酵产物液均显示对 *E. coli* 不同程度的抑菌活性，2 d 的发酵产物液对 *E. coli* 的抑菌率为 $96.62\% \pm 1.66\%$ ，显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)。酱油曲霉仅 2 d 的发酵产物液对 *E. coli* 显示 $22.74\% \pm 1.77\%$ 的抑菌率。雅致放射毛霉和少孢根霉整个发酵过程的产物液对 *E. coli* 无抑菌活性，与对照相似，均不同程度地促进 *E. coli* 生长。

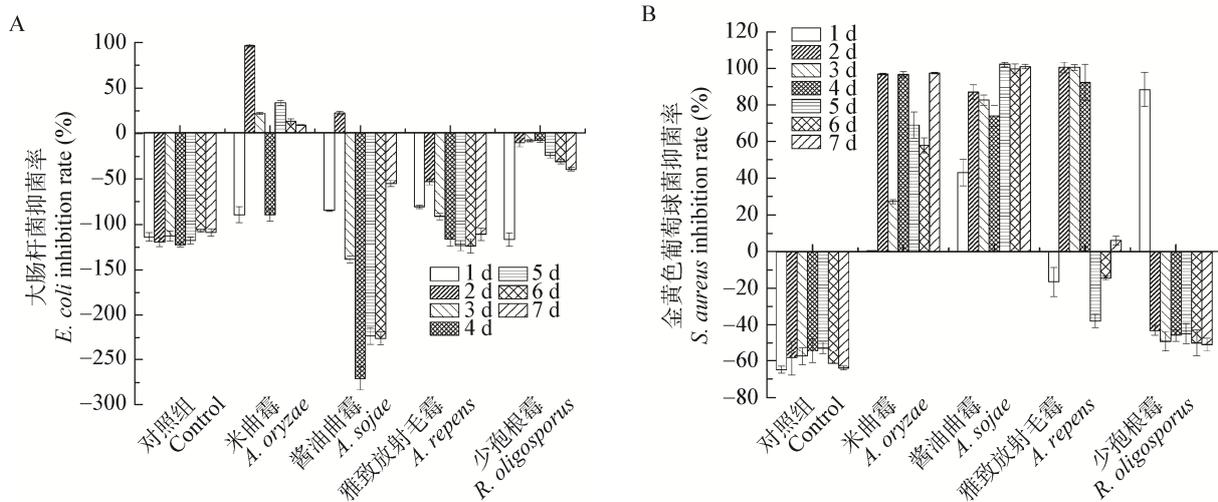


图 4 固态发酵产物液对 *E. coli* (A)和 *S. aureus* (B)的抑菌率
Figure 4 *E. coli* (A) and *S. aureus* (B) inhibition rate of fermentation product liquid

由图 4B 可以看出, 空白对照组产物液对 *S. aureus* 未显示抑菌活性, 而 4 株真菌的发酵产物液对 *S. aureus* 均具有不同程度的抑制作用。米曲霉 1 d 的发酵产物液对 *S. aureus* 抑菌率 < 1%, 但 2 d 的发酵产物液对 *S. aureus* 的抑菌率提高至 $97.06\% \pm 0.49\%$, 显著高于米曲霉其他发酵天数 ($P < 0.05$); 其中发酵 4、7 d 的抑菌率差异不显著 ($P > 0.05$), 抑菌率均在 96% 以上。酱油曲霉整个发酵过程的产物液对 *S. aureus* 显示良好的抑菌率 (抑菌率 > 40%), 且发酵 5 d 时的抑菌率为 100%, 显著高于酱油曲霉其他发酵天数 ($P < 0.05$)。雅致放射毛霉 2、3 d 的发酵产物液对 *S. aureus* 的抑菌率无显著差异 ($P > 0.05$), 均为 100%; 4 d 的发酵产物液对 *S. aureus* 的抑菌率也高达 $92.42\% \pm 9.84\%$, 其他天的发酵产物液对 *S. aureus* 抑菌率低或无抑菌活性。少孢根霉除 1 d 的产物液对 *S. aureus* 显示 $88.63\% \pm 9.47\%$ 的抑菌率外, 其他天的产物液对 *S. aureus* 均无抑菌活性且促进 *S. aureus* 生长。仅米曲霉和酱油曲霉的发酵产物液对 *E. coli* 和 *S. aureus* 都有抑制作用, 但抑菌率与肽得率无相关性。可能是 4 株真菌发酵苦荞产生的蛋白酶对苦荞蛋白的作用位点不同, 酶解得到的肽序列有差异, 因此会产

生无活性、活性差异和多样的苦荞多肽^[17]。

2.5 固态发酵苦荞产物液的自由基清除活性

食品中的油脂、蛋白等成分在加工和储藏过程中会发生自动、酶促等多种氧化, 氧化产生的自由基和氧化产物会影响食品品质, 缩短食品货架期, 部分氧化产物甚至会危害消费者的健康, 因此通过添加抗氧化剂可以防止或减缓食品的氧化变质^[18]。以清除 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH 来评价 4 株真菌固态发酵苦荞产物液的体外抗氧化活性。由图 5A 可知, 米曲霉整个发酵过程的产物液均显示不同程度的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力, 发酵 7 d 产物液的 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 $55.65\% \pm 1.25\%$, 显著高于其他菌株 ($P < 0.05$)。酱油曲霉 3–7 d 的发酵产物液显示 4%–36% 的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力。雅致放射毛霉仅发酵 1 d 的产物液有 $\cdot\text{OH}$ 清除能力, 但清除率仅为 $2.86\% \pm 0.10\%$ 。少孢根霉发酵产物液和对照组均不具有清除 $\cdot\text{OH}$ 能力。由图 5B 可知米曲霉除发酵 4 d 外的产物液均显示清除 DPPH 能力, 清除率在 6%–11% 之间。少孢根霉除发酵 6–7 d 外的产物液均显示清除 DPPH 的能力, 清除率在 5%–14% 之间。酱油曲霉、雅致放射毛霉发酵产物液和对照组均不具有清除 DPPH 的能力。

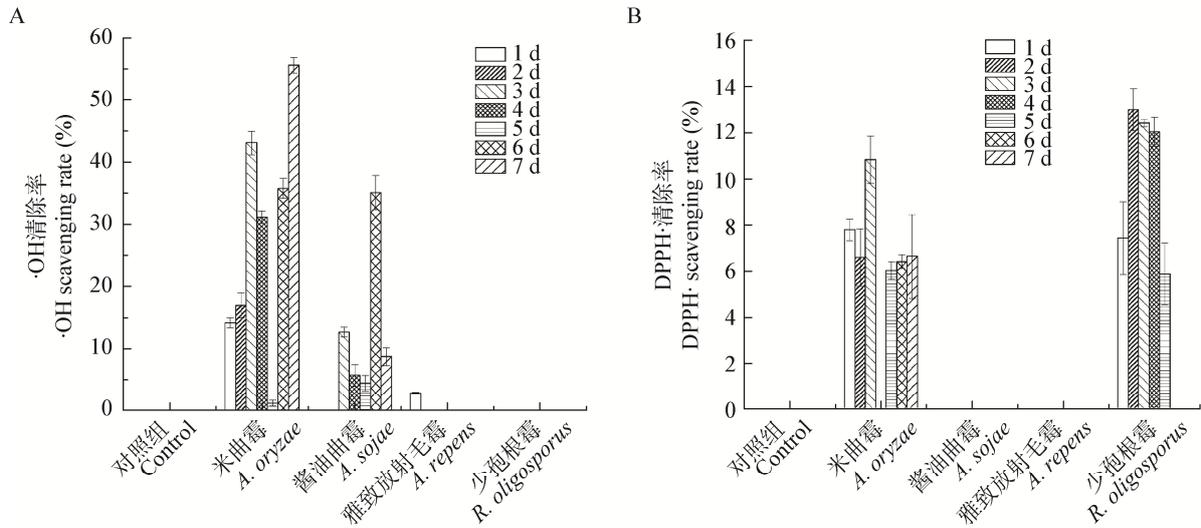


图5 发酵产物液对·OH (A)和 DPPH· (B)的清除率

Figure 5 ·OH (A) and DPPH· (B) scavenging rate of fermentation product liquid

丝状真菌如米曲霉和酱油曲霉在生产传统发酵食品上有着悠久的历史,除发酵产品相对安全以外,还在发酵产品中检测到抗氧化肽等活性肽^[19]。本研究选取的4株真菌在固态发酵苦荞过程中,发酵产物液均具有不同程度的抗菌及抗氧化活性。米曲霉固态发酵苦荞2 d的肽得率最高,且对*E. coli*和*S. aureus*显示较好的抑菌活性,同时具备·OH和DPPH·清除活性;酱油曲霉固态发酵苦荞肽得率较低,对*E. coli*有一定抑制作用,对*S. aureus*显示较好的抑菌活性,具有·OH清除活性,但无DPPH·清除活性;雅致放射毛霉肽得率较高,对*E. coli*无抑制作用,但对*S. aureus*显示一定的抑菌活性,具有低的·OH清除活性,无DPPH·清除活性;少孢根霉肽得率较高,对*E. coli*无抑制作用,仅发酵1 d的产物液对*S. aureus*显示抑菌活性,无·OH清除活性,具有DPPH·清除活性;综合考虑,米曲霉更适合作为固态发酵苦荞制备多肽,且发酵产物液具有抗菌及抗氧化活性的真菌菌株。

2.6 米曲霉发酵2 d产物液的分子量分布与活性

对米曲霉发酵2 d的产物液不同分子量组分分布及活性分析如表1所示。由表1可知,米曲霉发

酵2 d产物液苦荞肽主要集中在<3 kD分子段区域;3-5、5-10、>10 kD分子段的苦荞肽分布较均匀。超滤得到的4个不同分子量组分对*E. coli*的抑制率与发酵产物液相比差异不显著($P>0.05$),均高于96%;>10 kD的组分对*S. aureus*的抑制率最低(21.25 ± 2.03),其余3个不同分子量组分对*S. aureus*的抑制率与发酵产物液相比差异不显著($P>0.05$),均高于95%。小于3 kD的组分·OH清除率最低;5-10 kD的DPPH·清除率最低;3-5 kD的DPPH·清除率最高。

研究表明,可通过产蛋白酶的真菌固态发酵苦荞高产多肽,并且发酵产物液具有抗菌及抗氧化活性;对4株发酵食品源真菌固态发酵苦荞产物液蛋白酶活力、水解度、可溶性肽得率、抑菌率和清除自由基活性进行比较,米曲霉是固态发酵苦荞的最佳菌株,多肽得率达 $38.83\pm 1.18\%$,发酵产物液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为 $96.62\pm 1.66\%$ 和 $97.54\pm 0.54\%$,同时对·OH和DPPH·分别显示 $55.65\pm 1.25\%$ 和 $10.84\pm 1.03\%$ 的清除率。对米曲霉发酵2 d产物液的不同分子量分布及活性分析表明分子量大小对苦荞活性肽的生物活性有一定的影响。

表1 米曲霉2 d 发酵产物液不同分子量组分分布及活性

Table 1 Bioactivity and different molecular weights distribution of fermentation product liquid after fermentation with *Aspergillus oryzae* of 2 days

样品 Sample	肽浓度 Peptide concentration (g/L)	<i>E. coli</i> 抑制率 <i>E. coli</i> inhibition rates (%)	<i>S. aureus</i> 抑制率 <i>S. aureus</i> inhibition rates (%)	·OH 清除率 ·OH scavenging rate (%)	DPPH·清除率 DPPH· scavenging rate (%)
Fermentation product liquid	19.23±0.63 ^c	96.62±1.66 ^a	97.06±0.49 ^b	17.01±2.02 ^c	6.60±1.24 ^{ab}
>10 kD	4.25±0.33 ^a	96.30±0.56 ^a	21.25±2.03 ^a	16.70±0.46 ^c	6.87±0.57 ^{ab}
5-10 kD	3.51±0.36 ^a	97.44±0.32 ^a	95.41±1.02 ^b	17.29±0.40 ^c	5.46±0.28 ^a
3-5 kD	3.61±0.59 ^a	98.19±0.16 ^a	96.79±0.34 ^b	11.59±1.79 ^b	9.12±0.58 ^b
<3 kD	8.41±0.59 ^b	98.43±0.14 ^a	97.25±0.28 ^b	7.04±0.39 ^a	6.94±0.43 ^{ab}

注：标有不同字母的表示差异显著($P<0.05$)；标有相同字母的表示差异不显著($P>0.05$)。

Note: The lower-case letters above the bars indicate significant differences ($P<0.05$) between different letters or no significant differences ($P>0.05$) between the same letters.

3 讨论

苦荞活性肽是苦荞中蛋白质经特征酶或生物降解后产生的具有显著生理活性，且由数个至数十个氨基酸组成的肽类混合物。苦荞活性肽与苦荞蛋白相比，具有更好的理化性质：可直接被肠道吸收，吸收速度快，吸收率高；热稳定性好；溶解性好，在较宽的 pH 范围内仍保持溶解状态；黏度随温度变化不大，即使在 50% 的高浓度下仍具有流动性；无抗原性，不易引起免疫反应等^[20]。这些特点使得许多国内外研究者把注意力放在如何从苦荞蛋白中获得高生物效价、能调节人体生理功能的苦荞活性肽上。

2006 年崔霞等^[21]采用碱性蛋白酶水解苦荞蛋白制备得到具有显著清除超氧阴离子自由基的苦荞活性肽，其相对分子质量集中在 100-1 000 Da。2003 年 Fujimura 等^[9]采用醋酸钠、硫酸铵沉淀法从荞麦中分离得到两种荞麦抗菌肽 Fa-AMP1 和 Fa-AMP2，相对分子质量分别为 3 880 Da 和 3 907 Da，抗菌活性分析表明具有抑制革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌等植物致病菌的活性。2007 年 Leung 等^[22]采用醋酸铵沉淀法从荞麦中分离得到的一种荞麦抗真菌多肽，相对分子质量为 3 911 Da，经测定该抗真菌多肽还能抑制癌细胞、肿瘤细胞的生长。2010 年白承之等^[23]采用 Tris-HCl、

硫酸铵沉淀法从苦荞中分离出一种苦荞抗真菌肽，相对分子量为 3 909 Da。比较国内外对苦荞活性肽的研究发现：采用蛋白酶水解苦荞蛋白制备苦荞活性肽，需先对苦荞进行蛋白质提取；而采用溶剂提取法制备苦荞活性肽，难于实现大规模生产，无法满足消费市场对苦荞活性肽的需求；未见采用固态发酵法制备苦荞多肽的相关研究报道，而本文采用固态发酵法具有培养基简单、产率高、能耗低、环境污染较少、适合大规模工业化生产等优点。本文从 4 株发酵食品源菌株中筛选出米曲霉为高产多肽且发酵产物液具有抗菌及抗氧化活性的最佳菌株，为苦荞资源的开发利用提供新方向，为苦荞多肽的制备及其大规模生产提供理论依据和技术支持。今后，可进一步优化米曲霉固态发酵苦荞的工艺条件等来提高多肽产量，同时对其发酵产物液的抗菌及抗氧化活性成分进行深入研究，为苦荞多肽的应用提供理论依据，以获得更多的商业价值。

参 考 文 献

- [1] Huang DM, Wu QF, Lu JM, et al. Current research progress of solid state fermentation technology and equipment[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(6): 87-91 (in Chinese)
黄达明, 吴其飞, 陆建明, 等. 固态发酵技术及其设备的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 87-91
- [2] Liu LP, Liu LH. Study and application of *Aspergillus oryzae* in different domains[J]. China Condiment, 2008, 33(4): 28-32 (in Chinese)
刘丽萍, 刘丽华. 米曲霉研究进展与应用[J]. 中国调味品,

- 2008, 33(4): 28-32
- [3] Yang JH, Chen BY, Wu PQ, et al. Studies on increasing proteinase productivity from *Aspergillus sojae*[J]. Industrial Microbiology, 1994, 24(1): 1-6 (in Chinese)
杨俊豪, 陈宝英, 吴培群, 等. 酱油曲霉蛋白酶活力的提高[J]. 工业微生物, 1994, 24(1): 1-6
- [4] Lu F, Dou J, Liu P, et al. Research on protease produced by *Actinomucor elegans* AS 3.227[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(2): 18-21 (in Chinese)
鲁绯, 窦珺, 刘萍, 等. 雅致放射毛霉蛋白酶[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 18-21
- [5] Wang JM, Guo LH, Sun J, et al. Study on plastic curd cheese fermentation by *Lactobacillus casei* subsp. *casei*[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(11): 156-160 (in Chinese)
汪建明, 郭林海, 孙团, 等. 雅致放射毛霉在干酪中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 156-160
- [6] Chen CY, Wang JY, Zhang LY, et al. Study on flavor recipe and security testing of sufu fermented by *Rhizopus oligosporus* saito[J]. The Food Industry, 2015, 36(11): 140-142 (in Chinese)
陈春雨, 王婧瑶, 张刘运, 等. 少孢根霉发酵腐乳风味配方的研究及安全性检测[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 140-142
- [7] Morigengchaogetu, Wang PK, Gao JF, et al. Genetic diversity of tartary buckwheat germplasms[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(2): 255-261 (in Chinese)
莫日更朝格图, 王鹏科, 高金峰, 等. 苦荞地方种质资源的遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(2): 255-261
- [8] Christa K, Soral-Šmietana M. Buckwheat grains and buckwheat products nutritional and prophylactic value of their components-a review[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2008, 26(3): 153-162
- [9] Fujimura M, Minami Y, Watanabe K, et al. Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, *Fa-AMP1* and *Fa-AMP2*, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(8): 1636-1642
- [10] Ju XR, He R, Yuan J, et al. Screening of strains used for producing rapeseed peptide through solid-state fermentation[J]. Food Science, 2008, 29(12): 494-497 (in Chinese)
鞠兴荣, 何荣, 袁建, 等. 固态发酵生产菜籽肽菌种的筛选[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 494-497
- [11] Luo W, Duan ZH, Wan B, et al. Study on enzymatic hydrolysis technology of mussel boiled liquor[J]. Food Research and Development, 2014, 35(3): 39-43 (in Chinese)
罗伟, 段振华, 万斌, 等. 贻贝煮汁液酶解工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(3): 39-43
- [12] Hong Y, Tian H, Chen XM, et al. Comparative study on the bioactive polypeptides purified from the fresh and dry velvet antler of *Cervus elaphus Linnaeus* in Talim Xinjiang[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2011, 32(3): 176-179 (in Chinese)
洪勇, 田滋, 陈雪梅, 等. 新疆塔里木木鹿鹿茸干鲜品活性多肽的对比研究[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(3): 176-179
- [13] Tang WT, Zhang H, Wang L, et al. Antimicrobial peptide isolated from ovalbumin hydrolysate by immobilized liposome-binding extraction[J]. European Food Research & Technology, 2013, 237(4): 591-600
- [14] Liu HD, Gao JA, Wei MX. Membrane preparation of peanut peptides and research on their antioxidant activity[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2012, 44(12): 32-35 (in Chinese)
刘洪对, 高俊安, 魏明秀. 花生肽的膜分离制备及抗氧化活性研究[J]. 山东农业科学, 2012, 44(12): 32-35
- [15] He R, Ju XR, Yuan J, et al. Production by solid-state fermentation and free radical scavenging activities rapeseed peptides[J]. Food Science, 2009, 30(19): 259-262 (in Chinese)
何荣, 鞠兴荣, 袁建, 等. 固态发酵生产菜籽肽及其清除自由基能力的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 259-262
- [16] Mine Y, Ma FP, Lauriau S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(5): 1088-1094
- [17] Jamieson AG, Boutard N, Sabatino D, et al. Peptide scanning for studying structure-activity relationships in drug discovery[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2013, 81(1): 148-165
- [18] Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956
- [19] Giri A, Osako K, Okamoto A, et al. Antioxidative properties of aqueous and aroma extracts of squid *miso* prepared with *Aspergillus oryzae*-inoculated *kajji*[J]. Food Research International, 2011, 44(1): 317-325
- [20] Zhao G, Shan F. Chinese Tartary Buckwheat[M]. Beijing: Science Press, 2009: 5-6 (in Chinese)
赵钢, 陕方. 中国苦荞[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 5-6
- [21] Cui X, Zhou YM, Niu S, et al. Enzyme hydrolysis preparation of bioactive peptides from tartary buckwheat protein[J]. Cereal and Food Industry, 2006, 13(1): 39-41 (in Chinese)
崔霞, 周艳明, 牛森, 等. 酶法水解苦荞蛋白制备可溶性生物活性肽最佳条件的研究[J]. 粮食与食品工业, 2006, 13(1): 39-41
- [22] Leung EHW, Ng TB. A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells[J]. Journal of Peptide Science, 2007, 13(11): 762-767
- [23] Bai CZ, Wang ZH, Li YY. Purification and activity of an antifungal peptide from the seeds of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)[J]. Food Science, 2010, 31(15): 4-7 (in Chinese)
白承之, 王转花, 李玉英. 一种苦荞抗真菌肽的纯化及抑菌活性分析[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 4-7