

茶多酚对谷氨酸脱氢酶和纳豆氨含量的影响

肖雅丽¹, 张建华^{2*}, 钟耀广^{1*}

(¹上海海洋大学食品学院 上海 201306

²上海交通大学农业与生物学院 上海 200240)

摘要 纳豆中含有纳豆激酶等功能性成分,能够有效预防心血管疾病,然而,发酵过程中产生的氨味大大降低了其在我国的可接受度。为降低纳豆氨含量,本研究比较 4 种物质对纳豆芽孢杆菌产氨的关键酶——谷氨酸脱氢酶的抑制效果,结果显示茶多酚作用效果最佳。研究表明茶多酚是一种底物竞争型抑制剂,IC₅₀ 为 20.60 μg/mL,且它能够进入纳豆芽孢杆菌细胞,有望作为添加剂来抑制后者胞内的谷氨酸脱氢酶活性,减少纳豆发酵过程中氨的产生。通过分析纳豆芽孢杆菌的生长规律、纳豆发酵过程中氨含量的变化趋势及茶多酚抑制产氨的效果,确定最佳工艺条件为:在发酵第 11 小时添加 4.16 mg/g 茶多酚。该条件下,纳豆中氨含量下降了 63.90%,而纳豆激酶活性没有显著性变化。经感官评定证实,添加茶多酚能够有效降低纳豆的氨味,提高产品的可接受度,具有极大的应用价值。

关键词 纳豆; 茶多酚; 谷氨酸脱氢酶; 氨含量

文章编号 1009-7848(2022)11-0268-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.11.028

我国现有心血管疾病患者约 3.3 亿人,40% 的患者存在死亡风险^[1]。近年来,通过食疗“治未病”的思想越来越受到人们的认可。纳豆是一种由纳豆芽孢杆菌发酵而成的传统豆制品,因富含能溶解血栓的纳豆激酶(Nattokinase, NK)而具有预防心血管疾病的功效^[2-5],一直备受营养学界的推崇,在我国推广纳豆具有深远意义。然而,在纳豆发酵过程中,谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH)能够催化谷氨酸经脱氨基作用产氨^[6-7],使纳豆带有强烈的氨味,极大地降低了我国消费者对其的接受度。

为了降低纳豆的氨味,目前大部分研究主要从菌种改良、原料调整和调味料添加等方面进行尝试^[8]。郑丹妮等^[9]筛选出两株优良纳豆芽孢杆菌,用其混合发酵纳豆,氨含量降低了 42.30%。耿晓然等^[10]和高沛汝^[11]利用纳豆芽孢杆菌和酿酒酵母混合发酵,分别使纳豆的氨含量降低了 40.10% 和 11.64%。谭周进等^[12]在纳豆发酵原料中加入 10% 的糯米,得到氨味较淡的产品。耿晓然^[13]根据我国

消费者的口味偏好和需求设计了纳豆调味包,有效掩盖了纳豆的氨味。这些方法虽行之有效,但仍存在诸如工艺繁琐、成本较高、发酵控制难度增加等不足。本研究旨在通过抑制 GDH 酶活来减少纳豆中氨的产生,从根本上改善纳豆的风味。

目前已有多种 GDH 抑制剂的相关报道。Jin 等^[14]和 Yu 等^[15]发现依布硒啉(Ebselen)是大肠杆菌和人源 GDH 的可逆活性位点抑制剂。王丹^[16]研究发现,Zn²⁺、Cu²⁺、Ag⁺、Ca²⁺、Pb²⁺、尿素、甲醇、异丙醇等均对牛肝 GDH 酶活有抑制作用。Li 等^[17]通过高通量筛选发现多种牛源 GDH 抑制剂,包括表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)、氨三乙酸、六氯苯等。随后又证明茶多酚(Tea polyphenols, TPP)中的 EGCG 和 ECG 是人源 GDH 的可逆抑制剂^[18]。Hou 等^[19]合成了丙烷硒啉(Propylselen)并证明其可有效抑制大肠杆菌和人源 GDH 酶活。Domith 等^[20]发现绿原酸(Chlorogenic acid, CGA)以剂量依赖的方式抑制鸡胚视网膜细胞 GDH 酶活。本研究从中选取可在食品中添加的 TPP、CGA、Zn²⁺和 Ca²⁺进行抑制效果比较,拟将 GDH 抑制剂添加到纳豆中,降低纳豆中氨的含量,改善纳豆的风味,为纳豆这一食疗佳品在我国消费市场的推广提供技术支持。

收稿日期: 2021-11-13

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目
(2017YFD0400205-04)

第一作者: 肖雅丽,女,硕士生

通信作者: 张建华 E-mail: zhangjh@sytu.edu.cn

钟耀广 E-mail: ygzong@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试剂与菌种

谷氨酸脱氢酶标准品、尿激酶、葡萄糖酸锌, 上海麦克林生化科技有限公司; 茶多酚、*L*-谷氨酸、纤维蛋白原, 侨怡生物科技(上海)有限公司; 绿原酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; NAD^+ 、 NADH 、凝血酶, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。纳豆芽孢杆菌, 实验室保藏。

1.2 仪器与设备

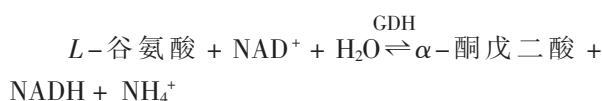
UV-9000S 紫外-可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; ES-315 型高压蒸汽灭菌锅, 日本 Tomy 公司; 超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; Sunrise 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; ZQZY-CF 型全温恒温培养摇床, 上海知楚仪器有限公司; Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; FOSS 自动凯氏定氮仪, 上海瑞玢国际贸易有限公司; TCS SP8 STED 3X 活细胞超高分辨率多光子激光共聚焦显微镜, 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司。

1.3 方法

1.3.1 GDH 抑制剂的筛选

1.3.1.1 GDH 酶活测定原理

GDH 能催化如下反应:



本试验以 *L*-谷氨酸为底物, NAD^+ 为辅酶, 反应朝 *L*-谷氨酸分解的方向进行。反应中的生成物 NADH 在波长 340 nm 处有一强吸收峰, 通过测定反应液的 $\text{OD}_{340\text{nm}}$ 即可根据 NADH 标准曲线计算出 GDH 酶活。 NADH 标准曲线的制作参考尚原冰等^[21]的方法, NADH 标准溶液用 80 mmol/L 甘氨酸缓冲液 (pH 9.0) 配制。

1.3.1.2 试剂的配制

1) GDH 酶液 用 1 mL 20% 甘油溶解 1 kU GDH 标准品。

2) 酶活测定反应液^[16] 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4), 含 15 mmol/L *L*-谷氨酸和 2 mmol/L NAD^+ 。

3) 抑制剂 用超纯水配制 5.00 mg/mL TPP

溶液、11.10 mg/mL CaCl_2 溶液和 9.11 mg/mL 葡萄糖酸锌溶液; 用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 配制 0.35 mg/mL CGA 溶液。

1.3.1.3 抑制效果的比较

1) TPP 的抑制效果 取酶活测定反应液 480 μL , 加入 TPP 溶液 5 μL 、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 9 μL 和 GDH 酶液 6 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 反应 1 min 后测定酶活。以未添加抑制剂的酶活为 100%, 计算相对酶活。

2) Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 CGA 的抑制效果 分别取 10 μL 3 种抑制剂与 10 μL GDH 酶液混合, 于 4 $^\circ\text{C}$ 放置 30 min 后加入 480 μL 酶活测定反应液, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 1 min, 测定相对酶活。

1.3.1.4 TPP 进入细菌胞内能力的检测

1) 菌体培养 挑取典型的纳豆芽孢杆菌单菌落于无菌 LB 培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 6 h 后加入 5 mg/mL TPP, 继续培养 3 h。取同等条件下培养 9 h 但未添加 TPP 的菌液做对照。

2) 制片 将菌液 5 000 \times g 离心 2 min, 菌体用 PBS 缓冲液清洗 5 遍后重悬, 吸取 5 μL 滴于洁净干燥的盖玻片上, 另取一片盖玻片覆盖于菌液上。

3) 激光共聚焦显微镜检测 在 100X STED 油镜下找到物象, 然后切换到荧光光路。设置激发波长为 430~494 nm, 检测波长为 500~600 nm, 开启 xyz 扫描和 LIGHTNING 模式采集共聚焦荧光图像。

1.3.2 TPP 对 GDH 的抑制类型以及 IC_{50}

1.3.2.1 抑制类型的判定

1) 底物竞争型抑制 将底物谷氨酸与 GDH 酶液提前混合, 4 $^\circ\text{C}$ 放置 30 min 后测定酶活并将其定为 100%, 测定添加不同质量浓度 TPP 后的相对酶活; 以谷氨酸不与 GDH 酶液预先混合的相对酶活为对照。

2) 酶竞争型抑制 将辅酶 NAD^+ 与 GDH 酶液提前混合, 用与 1) 同样的方法测定 NAD^+ 与 GDH 酶液预先混合对 TPP 抑制效果的影响。

1.3.2.2 IC_{50} 的测定 在酶活测定反应液中分别加入 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g/mL}$ 和 70 $\mu\text{g/mL}$ TPP 并测定酶活, 通过软件 SPSS 22.0 回归分析

求得 IC_{50} (即抑制 50%酶活时的 TPP 质量浓度)。

1.3.3 TPP 对纳豆氨含量的影响

1.3.3.1 发酵液的制备 挑取典型的纳豆芽孢杆菌单菌落接种至液体 LB 培养基培养至 OD_{600nm} 达到 1.23 ± 0.05 。

1.3.3.2 纳豆发酵过程中氨含量的变化 挑取颗粒完整饱满的极小粒黄豆,加入 3 倍体积的水于室温浸泡 16 h,沥干水分后于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸煮 25 min,冷却后按 10%的接种量接种发酵液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温发酵 24 h 后转移至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏 24 h。在发酵和冷藏期间定时取样,按 1.3.3.4 节测定氨含量。

1.3.3.3 TPP 添加量的确定 在大豆发酵 11 h 后分别加入 0.56, 0.96, 1.36, 1.76, 2.16, 2.56, 2.96, 3.36, 3.76, 4.16 mg/g 和 4.56 mg/g TPP 后混匀,继续发酵 13 h 后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏 24 h。空白对照组用同等体积的水代替 TPP。

1.3.3.4 纳豆中氨含量的测定 纳豆氨含量的测定参考挥发性盐基氮的测定方法^[22]。

1.3.3.5 NK 活性的测定 参考 Kim 等^[23]和 Astrup 等^[24]的方法,制备琼脂糖-纤维蛋白平板及尿激酶标准曲线。

称取 5.0 g 纳豆,加入 15 mL 生理盐水振荡摇匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, $8\ 000\times g$ 离心 10 min,取上清液即为 NK 粗提液。取 NK 粗提液 $7\ \mu\text{L}$ 点样于琼脂糖-纤维蛋白平板, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 后测量溶解圈的两垂直直径。参照尿激酶标准曲线的线性方程计算样品酶活。

1.3.4 纳豆的感官评定 在纳豆样品制备好的第 2 天按表 1 的标准对其进行感官分析,采用加权评分法^[25],气味、质地和风味、外观的加权系数分别为 0.5, 0.25 和 0.25。由 10 人组成评定小组(5 名男性和 5 名女性),采取盲评模式,随机提供样品,所有评定人员独立完成样品的评分。将各个指标的得分乘以相对应的权重系数,然后去掉一个最高分和一个最低分,计算平均值即为样品所得综合评分。

表 1 纳豆感官评定标准

Table 1 Criteria for sensory evaluation of natto

分值/分	感官指标		
	气味	质地和风味	外观
1~3	有强烈氨味	不软糯,很干,很苦	豆粒分明,无粉末附着物
3~5	氨味较重	微软微糯,较干,较苦	豆粒松散,粉末附着物极少
5~7	有氨味	微软微糯,较湿润,微苦	豆粒不易分开,粉末附着物少,分布不均匀
7~9	有轻微氨味	较软糯,较湿润,微涩不苦	豆粒紧密,有粉末附着物,分布较均匀,表面有光泽
9~10	无氨味,略带茶香	很软糯,很湿润,不涩不苦	豆粒紧密,粉末附着物多且分布均匀,表面有光泽

1.3.5 数据处理 每组试验重复 3 次,利用 Excel 2010、SPSS Statistics 22.0 对试验所得数据进行处理和作图。

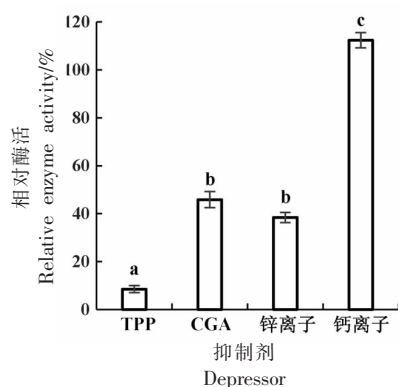
2 结果与分析

2.1 GDH 抑制剂的比较

NADH 标准曲线为 $y = 4.7943x + 0.0314$ ($R^2 = 0.9979$), TPP、CGA、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 对 GDH 酶活的抑制效果如图 1 所示。结果表明, Ca^{2+} 表现出轻微的促进作用,而 Zn^{2+} 、TPP 和 CGA 对 GDH 酶活均有抑制作用。大部分被鉴定的 GDH 都以六聚体的结构形式存在,分为两大家族^[26]。家族 I 由细菌和低等真核生物的 GDH 组成,家族 II 主要由古细

菌和高等真核生物(包括植物)的 GDH 组成^[27]。本研究的结果不同于王丹^[16]得出的 40 mmol/L Ca^{2+} 即能抑制约 20%牛肝 GDH 酶活的结论,原因可能是本试验所用细菌 GDH(家族 I)与牛肝 GDH(家族 II)属于不同的家族,保守结构域不同, Ca^{2+} 虽能破坏牛肝 GDH 活性中心的构象而使酶失活,但却不能作用于细菌 GDH。

图 1 中, TPP 的抑制效果显著优于 CGA ($P < 0.001$) 和 Zn^{2+} ($P < 0.001$)。虽然,试验中 TPP 质量浓度高于 CGA,但其在该质量浓度下的应用成本远远低于 CGA。此外, TPP 还具有降血脂、降血糖、抗癌、抗氧化、抗放射损伤等药理活性^[28-34], 和纳豆一样具有预防心血管疾病的功效^[33], 被广泛应用于



注:对照组 GDH 酶活为 100%;不同字母表示差异显著($P < 0.001$)。

图 1 4 种抑制剂对 GDH 酶活的影响

Fig.1 The effects of four kinds of inhibitors on GDH enzyme activity

保健品的开发^[35-37]、食品的保鲜及品质的改良^[38-41]。Wang 等^[42]研究发现 TPP 以剂量依赖性方式降低高脂肪饮食小鼠的血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、葡萄糖和胰岛素水平。TPP 中抑制 GDH 的主要活性物质是 EGCG^[43-44],Liu 等^[45]认为 EGCG 通过抑制线粒体凋亡来防止人脐静脉内皮细胞的凋亡,从而预防动脉粥样硬化,减少心血管疾病的发生。还有研究证明,TPP 能够通过诱导细胞周期阻滞和线粒体凋亡抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖^[28]。综上,本研究选用 TPP 作为纳豆固态发酵的添加剂,期望既能降低纳豆的氨含量,又能提高纳豆的保健功效。

2.2 检测 TPP 进入细菌胞内的能力

TPP 水溶液在胞外对 GDH 酶活有较强的抑制作用,而 GDH 是纳豆芽孢杆菌的胞内酶。为了确定 TPP 是否能进入纳豆芽孢杆菌体内抑制 GDH 酶活进而抑制氨的产生,本研究用含 TPP 的

LB 培养基培养纳豆芽孢杆菌并测定其体内 GDH 酶活。然而,纳豆芽孢杆菌在含 TPP 的 LB 培养基中培养后,菌体表面附着的 TPP 即使用水、DMSF 和乙醇等不同溶剂多次清洗也无法将其完全去除。细菌超声破碎液中 GDH 酶活均为零(数据未显示),无法判断是否存在胞内的 TPP 发挥了抑制作用。

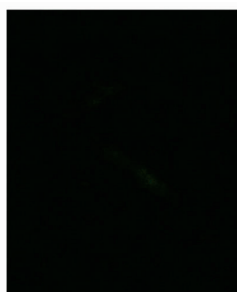
本研究利用 TPP 在波长 430~494 nm 的光激发下可产生绿色荧光这一特性^[46],通过激光共聚焦显微镜观察菌体并检测荧光强度的变化来探究 TPP 是否能进入纳豆芽孢杆菌细胞,结果如图 2 所示。将共聚焦平面锁定在菌体的中心横剖面处,选取 ROI1、ROI2 和 ROI3 3 处观察荧光强度的变化。图 2d 横坐标上的值代表荧光测定点距 ROI 线条左端点的距离;纵坐标为灰度值,反应了 TPP 的量。结合图 2c 可以看出,菌体细胞膜发出强烈荧光;虽然在大部分区域,越靠近菌体中心荧光越弱,但 3 条 ROI 中的最低灰度值仍高达 763.22;阴性对照组(图 2b)则几乎不发荧光。说明经 TPP 培养后,菌体表面的确吸附有较多的 TPP,并且有一部分 TPP 进入了胞内。结合 TPP 的体外抑制效果,可以推断 TPP 能进入纳豆芽孢杆菌体内并抑制 GDH 酶活。如果在纳豆发酵过程中加入 TPP,有望减少纳豆的氨含量,改善纳豆风味。

2.3 TPP 对 GDH 的抑制类型以及 IC₅₀ 值

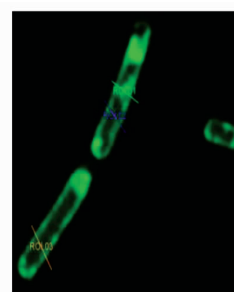
2.3.1 IC₅₀ 值的测定 文献报道,TPP 对蜡样芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 0.96 mg/mL^[47]。为确定 TPP 抑制 GDH 酶活的有效质量浓度是否远低于其最小抑菌浓度,本研究探究了 TPP 质量浓度对 GDH 酶活的影响并测定了 IC₅₀,结果如图 3 所示。在 0-



(a)明视场下,不含 TPP 的 LB 培养基培养的纳豆芽孢杆菌



(b)暗视场下,不含 TPP 的 LB 培养基培养的纳豆芽孢杆菌



(c)含 5 mg/mL TPP 的 LB 培养基培养的纳豆芽孢杆菌

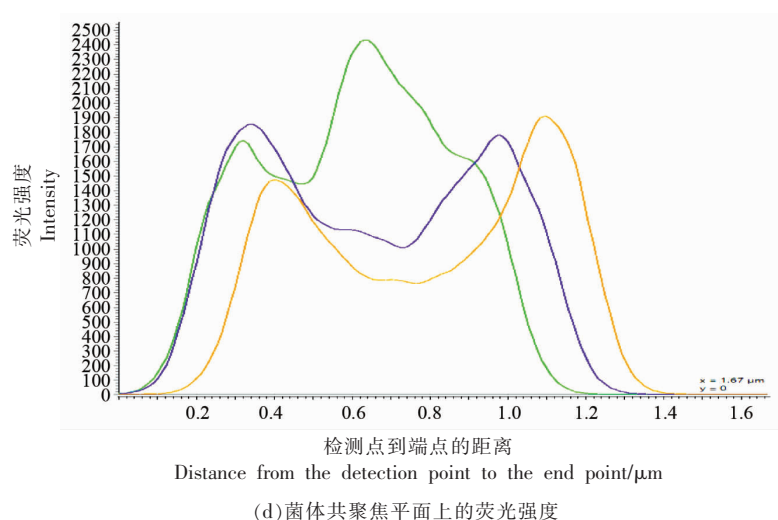


图2 在含及不含 TPP 的 LB 培养基中培养的纳豆芽孢杆菌的荧光图像和荧光强度变化

Fig.2 Fluorescence image and intensity of *Bacillus subtilis* var. natto cells cultured in LB broth with and without TPP

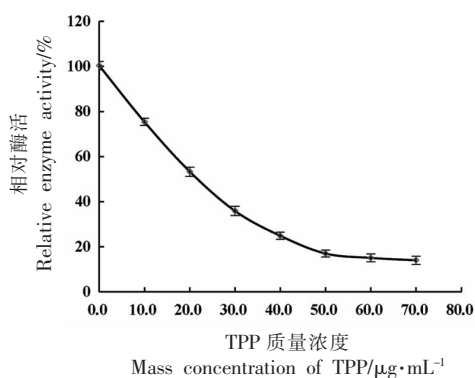


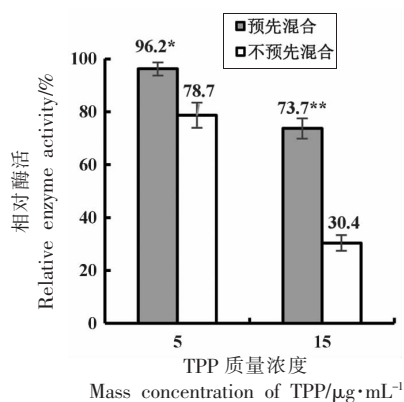
图3 不同质量浓度 TPP 对 GDH 酶活的影响

Fig.3 Effects of tea polyphenols with different mass concentrations on GDH activity

40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, GDH 活性随着 TPP 质量浓度的升高而快速下降; 在 40~70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 随着 TPP 质量浓度的升高, GDH 活性的下降速率逐渐变得缓慢。TPP 的 IC_{50} 为 20.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 低于其最小抑菌浓度, 说明有望通过添加适量 TPP 抑制纳豆芽孢杆菌胞内 GDH 酶活并且不影响细菌生长。

Li 等^[7]测定了 EGCG 和 ECG 对牛 GDH 的 IC_{50} 值, 均为 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 即 0.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。可能因为 TPP 是混合物, 除了含有 EGCG 和 ECG 外, 还含有对 GDH 酶活没有抑制作用的物质, 所以其 IC_{50} 高于 EGCG 和 ECG。

2.3.2 抑制类型 在 TPP 质量浓度分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的反应体系中, 将底物 L-谷氨酸与 GDH 酶液预先处理 30 min 能使相对酶活分别提高 17.52% ($P<0.01$) 和 43.28% ($P<0.001$) (图 4), 说明在 4 $^{\circ}\text{C}$ 混合静置的 30 min 里, L-谷氨酸率先与 GDH 结合, 可能减少了催化反应过程中 TPP 与底物结合位点的结合^[48]; 用同样的方法将辅酶 NAD^{+} 与 GDH 预先处理 30 min, 相对酶活没有提高 (图 5), 说明 TPP 对 GDH 存在底物竞争型抑制而不存在辅酶竞争型抑制。



注: * 表示与不预先混合差异显著 ($P<0.01$); ** 表示与不预先混合差异极显著 ($P<0.001$)。

图4 底物与 GDH 预先混合对酶活的影响

Fig.4 Effects of pre-mixing glutamic acid with GDH on enzyme activity

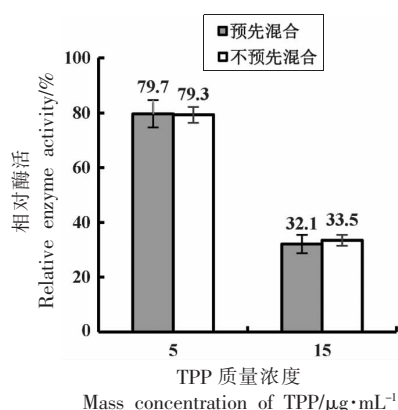
图 5 NAD⁺与 GDH 预先混合对酶活的影响

Fig.5 Effects of pre-mixing NAD⁺ with GDH on enzyme activity

2.4 纳豆发酵过程中氨含量的变化

TPP 具有抑菌作用,高浓度下会抑制细菌的生长^[47],影响发酵效果。为了使添加到纳豆中的 TPP 既能抑制氨的产生,又不影响发酵效果,本试验分析了纳豆在发酵和后熟过程中氨含量的变化趋势和纳豆芽孢杆菌的生长曲线,结果如图 6 和图 7 所示。在发酵的前 12 h,纳豆中的氨含量未出现明显增长,保持在 8 mg/100 g 以下;发酵 12 h 后,氨含量急剧上升,直到 24 h 发酵结束,达到了 109.5 mg/100 g 左右;在 24~48 h 的冷藏期间,纳豆中的氨含量只出现极小幅度的增长,最终为 118.0 mg/100 g,说明产氨主要发生在发酵 12 h 后,而纳豆芽孢杆菌的生长曲线表明在第 12 h 细菌已处于对数生长末期。考虑到不同发酵批次间有一定的差异,TPP 进入胞内也需要一定的时间,因此确定 TPP 的添加时间为发酵的第 11 小时,以期最大程度抑制氨的产生并尽可能地减少对发酵的不利影响。

2.5 TPP 对纳豆氨含量和 NK 活性的影响

2.5.1 TPP 对纳豆中氨含量的影响 发酵过程中添加 TPP 对纳豆氨含量的影响如图 8 所示。在 2.16~4.16 mg/g 范围内,随着 TPP 含量的升高,纳豆的氨含量下降率稳步上升;当 TPP 含量从 4.16 mg/g 上升到 4.56 mg/g 时,下降率从 63.90% 上升到 64.86%,下降不明显。综合考虑下,将 TPP 添加量定为 4.16 mg/g。在该条件下,纳豆氨含量为 45.5 mg/100 g,下降率可达 63.90%,高于文献所报道结果^[9-11,49],说明在纳豆发酵过程中适量添加

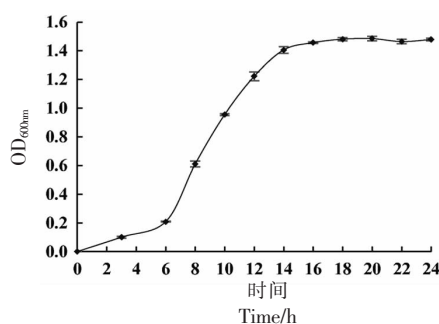


图 6 纳豆芽孢杆菌生长曲线

Fig.6 The growth curve of *Bacillus subtilis* var. natto

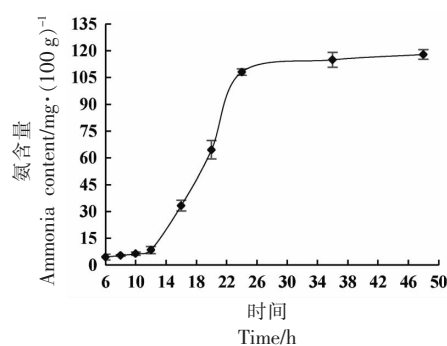


图 7 纳豆发酵过程中氨含量的变化

Fig.7 Changes of ammonia content during natto fermentation

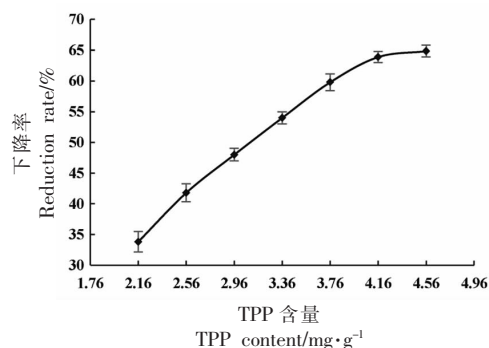
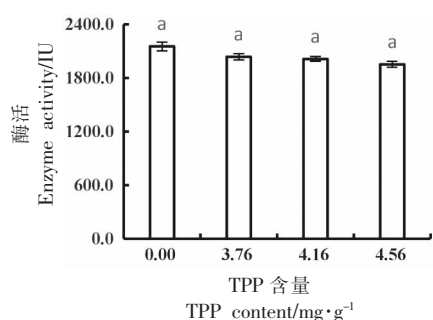


图 8 不同含量 TPP 对纳豆氨含量的影响

Fig.8 Effects of TPP with different content on ammonia content of natto

TPP 的确可以显著减少氨的产生,改善纳豆的风味。

2.5.2 纳豆中 NK 活性的测定 纳豆中最关键的功能性物质是 NK^[50],因此选取添加了 3.76, 4.16 mg/g 和 4.56 mg/g TPP 的纳豆测定 NK 活性。尿激酶标准曲线方程为 $y = 1.5696x + 36.926 (R^2 = 0.9959)$, NK 活性测定结果如图 9 所示。未添加 TPP 的纳



注:a 表示没有显著性差异($P>0.05$)。

图9 添加不同含量 TPP 的纳豆中 NK 的活性
Fig.9 Nattokinase activity of natto samples with different TPP content

豆中 NK 活性为(2 153.0±48.6) U, 与市售纳豆相当^[51];添加了 4.16 mg/g TPP 的纳豆, 氨含量下降了 63.90%, 而 NK 活性未见显著下降($P>0.05$), 说

明 TPP 不仅降低了纳豆的氨含量, 还保留了纳豆的保健功效。

2.6 纳豆的感官评定

感官评分是评估消费者对产品接受度的重要参数。纳豆的感官评定结果如表 2 所示。添加 TPP 后纳豆的味道更接近于豆豉, 软糯湿润。不仅纳豆的气味得到极大改善, 风味和质地评分有所提高, 而且我国消费者不易接受的拉丝现象也得到了改善。由于 TPP 自带褐色, 所以使纳豆呈现浅褐色且有少许分布地不均匀, 外观评分稍有下降。在不添加任何调味料的情况下, 添加 TPP 的纳豆综合评分为(8.07±0.36)分, 远高于未添加 TPP 的纳豆。说明在纳豆发酵过程中添加适量 TPP 的确能改良纳豆的风味, 提高我国消费者对纳豆的接受度, 并使纳豆兼备了 TPP 的保健功效。

表 2 纳豆感官评分结果

Table 2 Sensory evaluation of natto samples

样品	感官指标			
	气味/分	风味和质地/分	外观/分	综合评分/分
添加 TPP 的纳豆	8.56 ± 0.42*	7.53 ± 0.43*	7.63 ± 0.35*	8.07 ± 0.36*
未加 TPP 的纳豆	1.63 ± 0.68	5.92 ± 0.28	9.55 ± 0.27	4.68 ± 0.22

注:* 表示与未添加 TPP 的纳豆相比在 $P<0.001$ 水平上差异显著。

3 结论

对 4 种可应用于食品的 GDH 抑制剂进行了比较, 发现 TPP 的抑制效果最佳, IC_{50} 为 20.60 μ g/mL, 是底物竞争型抑制剂, 且可进入纳豆芽孢杆菌体内发挥作用。纳豆发酵前 12 h 基本不产氨, 且此时细菌的生长进入了对数末期, 因此确定 TPP 添加时间为发酵的第 11 小时。添加 TPP 可抑制产氨, 而当质量浓度超过 4.16 mg/g 时, 抑制效果增强不显著。综上, 确定最终生产工艺为 37 $^{\circ}$ C 发酵 11 h 后添加 4.16 mg/g TPP。该工艺可使氨含量降低 63.90%, 而且 NK 活性没有显著下降, 发酵产品感官综合评分为(8.07±0.36)分, 优于未添加 TPP 的纳豆。本研究通过添加 TPP 不仅改良了纳豆风味, 而且使纳豆兼备 TPP 的保健功效, 为纳豆在我国的推广提供了技术支持。

参 考 文 献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健

康与疾病报告 2019 概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854.

The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2019: An updated summary [J]. Chinese Circulation Journal, 2020, 35(9): 833-854.

[2] 刘彦敏, 沈璐, 王康, 等. 传统大豆发酵食品中纳豆芽孢杆菌的分离及纳豆发酵[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 208-214.

LIU Y M, SHEN L, WANG K, et al. Isolation of *Bacillus subtilis* natto from Chinese traditional fermented soybean foods and their use in fermentation of natto[J]. Food Science, 2020, 41(2): 208-214.

[3] NAGATA C, WADA K, TAMURA T, et al. Dietary soy and natto intake and cardiovascular disease mortality in Japanese adults: The Takayama study[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2017, 105(2): 426-431.

[4] NOZUE M, SHIMAZU T, SASAZUKI S, et al. Fermented soy product intake is inversely associated with

- the development of high blood pressure: The Japan Public Health Center-based prospective study[J]. *Journal of Nutrition*, 2017, 147(9): 1749-1756.
- [5] YOO H J, KIM M, KIM M, et al. The effects of natto kinase supplementation on collagen-epinephrine closure time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in nondiabetic and hypercholesterolemic subjects[J]. *Food & Function*, 2019, 10(7): 4454-4454.
- [6] COMMICHAU F M, GUNKA K, LANDMANN J J, et al. Glutamate metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(10): 3557-3564.
- [7] 屈玉玲, 孟永宏, 张宸, 等. 纳豆芽孢杆菌谷氨酸脱氢酶基因的克隆表达及其生物信息学分析[J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(1): 82-86.
- QU Y L, MENG Y H, ZHANG C, et al. Cloning, expression and bioinformatics analysis of glutamate dehydrogenase cDNA from *Bacillus subtilis* natto[J]. *Journal of Shaanxi Normal University*, 2017, 45(1): 82-86.
- [8] 高雅鑫, 张蒙冉, 侯丽真, 等. 纳豆不良风味的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1): 1-8.
- GAO Y X, ZHANG M R, HOU L Z, et al. Research progress on the undesirable flavor in natto[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(1): 1-8.
- [9] 郑丹妮, 王梦颖, 胡艺涵, 等. 双菌混合发酵纳豆工艺优化[J]. *食品与机械*, 2020, 36(12): 183-188.
- ZHENG D N, WANG M Y, HU Y H, et al. Optimization of natto with double-bacteria mixed fermentation[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(12): 183-188.
- [10] 耿晓然, 徐慧, 卢鑫, 等. 响应面法优化纳豆混合发酵工艺的研究[J]. *河北农业大学学报*, 2020, 43(1): 96-103.
- GEN X R, XU H, LU X, et al. Optimization of mixed fermentation of natto with response surface methodology[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2020, 43(1): 96-103.
- [11] 高沛汝. 高活性纳豆复合菌种固态发酵技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- GAO P R. Study on fermentation of high-activity natto with multi-strains[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [12] 谭周进, 周传云, 廖兴华, 等. 原料对纳豆制品的影响[J]. *食品科学*, 2003, 24(1): 87-90.
- TAN Z J, ZHOU C Y, LIAO X H, et al. The effect of raw materials on the quality of natto[J]. *Food Science*, 2003, 24(1): 87-90.
- [13] 耿晓然. 纳豆菌种选育及新型风味纳豆食品的开发[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- GENG X R. Screening of natto strain and the developing of a new flavor natto food[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.
- [14] JIN Y, LI D, LU S, et al. Ebselen reversibly inhibits human glutamate dehydrogenase at the catalytic site[J]. *Assay and Drug Development Technologies*, 2018, 16(2): 115-122.
- [15] YU Y, JIN Y, ZHOU J, et al. Ebselen: Mechanisms of glutamate dehydrogenase and glutaminase enzyme inhibition[J]. *Acs Chemical Biology*, 2017, 12(12): 3003-3011.
- [16] 王丹. 牛肝谷氨酸脱氢酶的分离纯化及酶学性质和功能基因研究[D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- WANG D. Isolation, purification, properties and modification of groups of the glutamate dehydrogenase from bovine liver[D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [17] LI M, ALLEN A, SMITH T J. High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(51): 15089-15102.
- [18] LI C H, ALLEN A, KWAGH J, et al. Green tea polyphenols modulate insulin secretion by inhibiting glutamate dehydrogenase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(15): 10214-10221.
- [19] HOU W, LU S, ZHAO H, et al. Propylselen inhibits cancer cell growth by targeting glutamate dehydrogenase at the NADP (+) binding site[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 509(1): 262-267.
- [20] DOMITH I, DUARTE-SILVA A T, GARCIA C G, et al. Chlorogenic acids inhibit glutamate dehydrogenase and decrease intracellular ATP levels in cultures of chick embryo retina cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2018, 155: 393-402.
- [21] 尚原冰, 祁晶晶, 王宇, 等. 鸡滑液支原体磷酸甘油酸激酶的克隆表达及酶学活性测定[J]. *中国动物*

- 传染病学报, 2021, 29(3): 71-79.
- SHANG Y B, QI J J, WANG Y, et al. Cloning, expression and enzymatic activity of mycoplasma synoviae phosphoglycerate kinase[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2021, 29(3): 71-79.
- [22] 方靖, 徐清霞, 洗灿标. 半自动凯氏定氮仪法测定挥发性盐基氮含量[J]. 广州化工, 2019, 47(7): 108-109, 156.
- FANG J, XU Q X, XIAN C B. Determination of volatile base nitrogen in pork by semi-automatic kjeldahl method[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2019, 47(7): 108-109, 156.
- [23] KIM W, CHOI K, KIM Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2482-2488.
- [24] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2): 346-351.
- [25] 吕艳春, 姜丹, 肖通. 加权评分法和 Friedman 检验法在食醋感官评价中的应用[J]. 中国调味品, 2018, 43(1): 147-150.
- LÜ Y C, JIANG D, XIAO T. The application of weighted scoring method and friedman test method in vinegar's sensory evaluation[J]. China Condiment, 2018, 43(1): 147-150.
- [26] 田光明. 地衣芽孢杆菌谷氨酸脱氢酶和聚 γ -谷氨酸降解酶的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- TIAN G M. Study of glutamate dehydrogenase and poly- γ -glutamic acid hydrolase in *Bacillus licheniformis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [27] RAHMAN R, FUJIWARA S, TAKAGI M, et al. Sequence analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and comparison of the enzymatic characteristics of native and recombinant GDHs[J]. Molecular and General Genetics, 1998, 257(3): 338-347.
- [28] LIU S M, OU S Y, HUANG H H. Green tea polyphenols induce cell death in breast cancer MCF-7 cells through induction of cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis[J]. Journal of Zhejiang University -Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2017, 18(2): 89-98.
- [29] RASHIDI B, MALEKZADEH M, GOODARZI M, et al. Green tea and its anti-angiogenesis effects[J]. Biomed Pharmacother, 2017, (89): 949-956.
- [30] PULIGUNDLA P, MOK C, KO S, et al. Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of green tea polyphenols[J]. Journal of Functional Food, 2017, 34: 139-151.
- [31] 陈刚, 贾萍. 茶多酚对果糖诱导的高尿酸血症大鼠血尿酸水平的影响及机制[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 219-223.
- CHEN G, JIA P. Effect and mechanism of green tea polyphenols on serum level of uric acid in rats with fructose-induced hyperuricemia[J]. Food Science, 2017, 38(23): 219-223.
- [32] 余春燕, 朱坤, 黄建安, 等. 茶多酚对心肌保护作用的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 43(3): 1-14.
- YU C Y, ZHU K, HUANG J A, et al. Advances in the study of cardioprotective effects of tea polyphenols on myocardium[J]. Food Science, 2021, 43(3): 1-14.
- [33] 李秀平, 欧阳建, 周方, 等. 茶叶功能成分预防心血管疾病研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 311-320.
- LI X P, OUYANG J, ZHOU F, et al. Recent advances in research on functional components in tea that can prevent cardiovascular disease[J]. Food Science, 2020, 41(21): 311-320.
- [34] OZ H S. Chronic inflammatory diseases and green tea polyphenols[J]. Nutrients, 2017, 9(6): 561.
- [35] 周小生, 黄皓, 王斌, 等. 茶制品的发展现状及趋势[J]. 中国茶叶加工, 2013, 1: 30-34.
- ZHOU X S, HUANG H, WANG B, et al. Current situation and tendency of the development for tea products[J]. Chinese Tea Processing, 2013, 1: 30-34.
- [36] 郭明, 项鹏程, 王瑞, 等. 一种缓释抗氧化微胶囊的制备方法及应用: CN111418818A[P]. 2020-07-17 [2021-07-10].
- GUO M, XIANG P C, WANG R, et al. Preparation method and application of slow-release antioxidant microcapsules: CN111418818A[P]. 2020-07-17 [2021-07-10].
- [37] 宋丹, 张鑫, 阴春燕. 一种茶多酚保健软糖及其制备方法: CN111728073A[P]. 2020-10-02 [2021-07-10].
- SONG D, ZHANG X, YIN C Y, et al. Preparation

- method of tea polyphenol health-care soft sweets: CN111728073A[P]. 2020-10-02 [2021-07-10].
- [38] 杜密英, 王敬涵, 孙卉, 等. 茶多酚在预制调理食品中的应用进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(14): 289-294.
- DU M Y, WANG J H, SUN H, et al. Research progress on the application of tea polyphenol in prepared food[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(14): 289-294.
- [39] 蓝蔚青, 杜金涛, 梅俊, 等. 茶多酚抑菌机理及在水产品保鲜中的应用进展[J]. 包装工程, 2021, 42(5): 7379.
- LAN W Q, DU J T, MEI J, et al. Research progress on antibacterial mechanism of tea polyphenol and its application in preservation of aquatic products[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(5): 7379.
- [40] 姚月华, 王亚琴, 贾鑫, 等. 茶多酚对生鲜面品质及抗氧化特性的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(10): 2261-2270.
- YAO Y H, WANG Y Q, JIA X, et al. Effects of tea polyphenols on the quality and antioxidant properties of fresh noodles[J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2020, 34(10): 2261-2270.
- [41] 陈南, 陈龙, 何强, 等. 茶多酚对小麦淀粉理化特性和面包品质的影响及机理[J]. 食品科学, 42(21): 1-15.
- CHEN N, CHEN L, HE Q, et al. Effects of tea polyphenols on physicochemical properties of wheat starch and bread quality and its mechanism[J]. Food Science, 42(21): 1-15.
- [42] WANG L, ZENG B H, LIU Z W, et al. Green tea polyphenols modulate colonic microbiota diversity and lipid metabolism in high-fat diet treated HFA mice[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(3): 864-873.
- [43] LI C H, LI M, CHEN P, et al. Green tea polyphenols control dysregulated glutamate dehydrogenase in transgenic mice by hijacking the ADP activation site [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(39): 34164-34174.
- [44] POURNOURMOHAMMADI S, GRIMALDI M, STRIDH M H, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) activates AMPK through the inhibition of glutamate dehydrogenase in muscle and pancreatic beta-cells: A potential beneficial effect in the pre-diabetic state?[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2017, 88: 220-225.
- [45] LIU S M, SUN Z W, CHU P, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways [J]. Apoptosis, 2017, 22(5): 672-680.
- [46] 张丽霞, 贾明, 夏文娟, 等. 茶多酚绿色荧光特性研究[J]. 茶叶科学, 2004, 4: 288-294.
- ZHANG L X, JIA M, XIA W J, et al. Studies on the green fluorescence of tea polyphenols[J]. Journal of Tea Science, 2004, 4: 288-294.
- [47] 夏俊芳, 王苹, 马瑶, 等. 茶多酚、柠檬醛、肉桂醛对四种接触表面蜡样芽孢杆菌菌膜的影响研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(12): 27-32, 37.
- XIA J F, WANG P, MA R, et al. Effects of tea polyphenols, citral and cinnamaldehyde on formation of *Bacillus cereus* biofilm on four kinds of contact surfaces[J]. China Condiment, 2020, 45(12): 27-32, 37.
- [48] 周爱儒, 查锡良. 生物化学: 第6版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 62.
- ZHOU A R, ZHA X L. Biochemistry: 6th ed[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 62.
- [49] 张捷, 牟建楼, 张伟, 等. 传统纳豆发酵条件的优化[J]. 食品工业, 2019, 40(6): 118-122.
- ZHANG J, MOU J L, ZHANG W, et al. Optimization of traditional natto fermentation condition [J]. Food Industry, 2019, 40(6): 118-122.
- [50] 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.
- [51] 李宏梁, 尉璐杰, 王欢, 等. 国产与进口鲜纳豆活菌数、感官品质及酶活的分析比较[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 26-29.
- LI H L, WEI L J, WANG H, et al. Analysis and comparison of viable count, sensory quality and nattokinase activity of domestic and imported fresh natto[J]. China Brewing, 2018, 37(11): 26-29.

The Inhibitory of Tea Polyphenols on Glutamate Dehydrogenase Activity and Its Effect on Ammonia Content during Natto Fermentation

Xiao Yali¹, Zhang Jianhua^{2*}, Zhong Yaoguang^{1*}

¹College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

²School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract Natto, which contains several functional components such as nattokinase, can prevent cardiovascular disease, but its ammonia odor greatly reduces its acceptance by Chinese people. In order to decrease the ammonia production during natto fermentation, this study compared the inhibitory effect of four reagents on glutamate dehydrogenase, a key enzyme for ammonia production by *Bacillus subtilis* var. natto, and found that tea polyphenols (TPP) had the highest inhibitory activity. TPP acted as a substrate-competitive inhibitor, the IC₅₀ value was 20.60 μg/mL and it could enter the cells of *Bacillus subtilis* var. natto. Therefore, it was expected to be used as an additive to reduce the production of ammonia during the fermentation of natto. Then, the optimal process, which was adding 4.16 mg/g TPP at 11th hour of fermentation, was determined by analyzing the bacteria growth curve, the ammonia production during the fermentation of natto with and without addition of TPP. The results showed that the ammonia production was reduced by 63.90% under the optimal condition, while there was no significant negative effect on nattokinase activity. Finally, the sensory evaluation results showed that the ammonia smell and flavour of natto was significantly reduced by adding TPP, and therefore the acceptance was increased. All these results showed that TPP had great application potential in natto production.

Keywords natto; tea polyphenol; glutamate dehydrogenase; ammonia content