

紫菜纳豆菌发酵物中醇提物和多糖生物活性的初步研究

黄莺莺, 董焕焕, 杨苗苗, 矫丽萍, 邵 霜, 岳 琪, 魏玉西

(青岛大学 生命科学学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 纳豆菌(*Bacillus natto*)发酵后的条斑紫菜经稀释、离心后上清液用一定浓度的乙醇处理获得醇沉物和醇溶液。将醇沉物去蛋白得到粗多糖, 进行抗氧化活性的研究; 将醇溶液旋转蒸发得到浸膏, 将浸膏按极性大小分相萃取分别得到石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相浸膏, 探讨分相浸膏对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、四联微球菌的抑菌效果。通过测定多糖和分相浸膏对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和 DPPH 自由基的清除能力评价其抗氧化能力。结果表明: 醇溶液对金黄色葡萄球菌具有抑制作用, 且随着浓度的升高各相浸膏对羟基自由基的清除率随之升高, 其中, 正丁醇相浸膏在质量浓度为 0.5 mg/mL 时对羟自由基的清除率达到 91.6%, 说明条斑紫菜经纳豆菌发酵可能产生了活性化合物; 与对照组相比, 利用纳豆菌发酵紫菜发酵物中多糖提取率增加了 0.24%, 发酵得到的多糖在质量浓度为 5.0 mg/mL 时对羟自由基的清除率达到了 95.7%。

关键词: 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*); 纳豆菌(*Bacillus natto*); 多糖; 醇提物; 抗氧化性; 抑菌活性
中图分类号: TS254.5+8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2016)06-0056-06
doi: 10.11759/hyxx20150915001

纳豆菌, 别名纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*), 是一种革兰氏阳性菌。既具有广谱抗菌活性和极强的抗逆能力, 又能产生多种抗菌素和酶, 而且纳豆菌分泌酶的能力比其他枯草芽孢杆菌高几十倍^[1-2]。纳豆激酶是在纳豆发酵过程中产生的一种丝氨酸蛋白酶, 具有溶解血栓、降低血黏度、改善血液循环、软化和增加血管弹性等作用^[3-4]。纳豆菌发酵技术于 2000 多年前起源于我国, 目前在日本纳豆作为一种传统发酵食品, 一直是日本国民膳食结构的主要组成部分^[5]。纳豆菌发酵原料除大豆外, 还被用来与乳酸菌共同发酵制备酸奶, 以果渣为底物发酵剩余豆渣等^[6], 发酵高档水产品加工废弃物和低值水产品, 并带来较好的经济效益^[7-8]。

紫菜属海洋红藻, 其中含丰富的蛋白质、碳水化合物、各种维生素和矿物质。同时紫菜还可以入药, 具有化痰软坚、清热利水、补肾养心之功效^[9]。紫菜在我国各地人工养殖产量大, 资源相当丰富, 其应用前景广阔。

国内已有学者研究以纳豆菌发酵紫菜, 再添加木瓜蛋白酶酶解的方法从中提取紫菜蛋白多肽以及研究该法对蛋白提取率的影响^[10]。但是, 关于纳豆菌发酵物中多糖和醇溶物的生物活性均未见报道。本文利用纳豆菌对条斑紫菜进行发酵, 以未发酵的条斑紫菜作对照, 研究条斑紫菜纳豆菌发酵物中多糖

和醇溶物的抗氧化和抑菌活性, 预期研究结果对充分利用紫菜资源提供重要基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 原料

条斑紫菜(干), 2014 年 12 月购自江苏连云港和润紫菜加工有限公司。

1.1.2 菌株

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)菌粉购自中山市纳豆微生物制品有限公司; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、四联微球菌(*Micrococcus tetragenus*), 由青岛大学生命科学学院微生物学实验室提供。

收稿日期: 2015-09-15; 修回日期: 2015-12-09

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2012DM014)

[Foundation: Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2012DM014]

作者简介: 黄莺莺(1994-), 女, 山东济南人, 本科生, 研究方向: 食品科学与工程, 电话: 15764235262, E-mail: jnhyy0209@126.com; 魏玉西(1964-), 通信作者, 男, 山东临沂人, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 海洋生物资源高值化利用, 电话: 0532-85953227, E-mail: yuxiw729@163.com

1.2 主要仪器与设备

DXF-10A 型多功能摇摆式粉碎机(广州市大祥电子机械设备有限公司); YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); CR21G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器有限公司); RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SW-OJ-IFD 洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); 721G 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 醇提物和多糖的制备

参考文献[11]并作适当改进。选取条斑紫菜(干)于 40℃ 恒温干燥箱中干燥 12 h, 研磨成粉末后称取两份等量的紫菜粉末, 一份为实验组, 另一份为对照组, 均按照料液比为 1 : 16 加入蒸馏水, 搅拌均匀后放入高压湿热灭菌锅中灭菌 20 min。实验组发酵条件为: 温度 43℃, 发酵时间 24 h, 接种量为每 3 g 条斑紫菜样品加 0.01 g 纳豆菌。对照组除不加纳豆菌外, 其余条件均与实验组相同。发酵结束, 两组同时按照料液比 1 : 40 加蒸馏水, 常温水提 5 h, 冷冻离心(8 000 r/min)10 min。上清液加入 95%乙醇并调至终浓度为 80%, 于 4℃ 的冰箱中静置过夜后再次离心, 收集醇不溶物。上清液即为醇提物, 经旋转蒸发后依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取 12 h, 相同溶剂萃取两次。合并萃取液经旋转蒸发得石油醚相浸膏(实验组 A, 对照组 A')、乙酸乙酯相浸膏(实验组 B, 对照组 B')和正丁醇相浸膏(实验组 C, 对照组 C')。第一次醇沉得到的醇不溶物冷冻干燥后研磨, 按照水料比 30 : 1 (w/w)加水于 80℃ 恒温水浴锅中放置 1 h, 取出后冷却至室温, 离心(8 000 r/min) 20 min, 沉淀即为杂蛋白(弃去), 上清液加 95%乙醇至体积分数为 80%, 在 4℃ 冰箱中静置过夜, 离心(5 000 r/min) 10 min, 取沉淀物冷冻干燥即得粗多糖。

1.3.2 多糖含量的分析方法

总糖含量测定: 选用苯酚—硫酸法, 以葡萄糖为标准物, 在 490 nm 处测定多糖含量^[12]。

紫菜多糖提取率(%)=紫菜多糖提取量/紫菜原料质量×100 %

1.3.3 蛋白质含量的分析方法

蛋白质的测定: 选用考马斯亮蓝比色法。

1.3.4 醇提物对三种菌的抑制作用

参考文献[13-15]并作适当改进。旋转蒸发后的

各相浸膏均用二甲基亚砷作溶剂溶解, 分别取实验组和对照组的石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相浸膏样品配制 20 g/L 的溶液, 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、四联微球菌进行抑菌实验。用生理盐水分别配制菌悬液。待培养皿湿热灭菌冷却后加入营养琼脂培养基 15 mL, 摇匀, 置水平位置待其凝固。将三种菌分别接入培养皿中, 用打孔器在培养基中等距离打 7 个孔, 向每个孔中加 20 μL 样品溶液, 分别为对照组和实验组不同相的 6 种溶液, 同时以二甲基亚砷作为空白对照。每种细菌设 3 个平行样, 于 37℃ 恒温培养 16~24 h 后, 测量抑菌圈直径, 找出抑菌效果最好的细菌作为后续实验的指示菌。

分别取实验组和对照组的石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相浸膏样品, 采用二倍稀释法配制浓度为 20, 10 和 5 g/L 溶液。采用稀释涂布平板法接种指示菌, 在每个培养皿上均匀地打 7 个孔, 每个孔中加样 20 μL, 以二甲基亚砷作为空白对照。于 37℃ 恒温培养 16~24 h 后, 测量、记录结果。每个浓度梯度做 3 次平行实验^[16], 结果取平均值。

1.3.5 醇提物和多糖抗氧化活性的研究

1.3.5.1 对羟自由基的清除率

参考文献[17]方法进行。多糖和旋转蒸发后的各相浸膏均用去离子水溶解, 在 Fenton 体系下, 进行清除羟基自由基作用的研究。取标记好空白管、对照管以及不同浓度的样品管, 先分别向试管中加入 0.15 mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液 0.5 mL, 6 mmol/L 的 EDTA 二钠亚铁溶液 0.5 mL, 520 μg/mL 的番红溶液 0.1 mL, 再分别向不同浓度的样品管中加入 3.5 mL 样品的去离子水溶液, 最后再加入 0.3%(V/V)的 H₂O₂ 0.4 mL。空白管将样品溶液用等体积去离子水代替, 对照管将样品溶液和 H₂O₂ 溶液用等体积去离子水代替。混匀后放置于 40℃ 恒温水浴中保温 30 min, 然后在 520 nm 处测其吸光度。每个样品重复操作 3 次, 取三次结果的平均值。实验中将 Vc 作为阳性对照进行试验。

清除率的计算公式: 清除率(%)=($A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}$) / ($A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$) × 100%

式中: $A_{\text{样品}}$ 为样品管吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为空白管吸光度; $A_{\text{对照}}$ 为对照管吸光度。

1.3.5.2 对 DPPH 自由基的清除率

参照文献[18]方法进行。多糖和旋转蒸发后的各相浸膏均用去离子水溶解, 分别向试管中加入不同

浓度的样品溶液 2.0 mL, 然后分别加入 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液 2.0 mL, 混匀后静置 30 min, 测定反应液在 517 nm 处的吸光度 A_i ; 以无水乙醇作参比, 测定 2.0 mL DPPH 溶液与 2.0 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_0 ; 测定 2.0 mL 的样品溶液与 2.0 mL 无水乙醇混合后的吸光度 A_j 。实验以 Vc 作为对照。

清除率的计算公式: 清除率 (%) = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$

式中: A_i -样品管吸光度; A_j -空白管吸光度; A_0 -背景吸收。

1.3.5.3 对超氧阴离子的清除率

参照文献[19]方法进行。用去离子水将紫菜多糖溶解, 采用邻苯三酚自氧化法测其对超氧阴离子清除率。取 4.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol/L, pH8.2)于 25 mL 试管中, 加入 4.2 mL 重蒸水混匀, 再放入 37°C 水浴中保温, 20 min 后取出并立即加入在 37°C 预热的 0.5 mL 3 mmol/L 邻苯三酚溶液(以 10 mmol/L HCl 配制), 空白管用 0.5 mL 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液, 迅速摇匀, 倒入比色皿, 于 325 nm 波长处每隔 30 s 测定吸光度(A_a)及空白管吸光度(A_b)。实验组先加入 2 mL 各质量浓度的紫菜多糖溶液, 再加入邻苯三酚溶液, 重蒸水相应减少, 再根据邻苯三酚自氧化测定的方法操作, 测各样品吸光度(A_i)。以 10 mmol/L HCl 溶液配制空白管作为空白, 测定其本底吸光度(A_j), 每个样品重复 3 次取平均值。以 Vc 做阳性对照。

清除率的计算公式: 清除率 (%) = $[(A_a - A_b) - (A_i - A_j)] / (A_a - A_b) \times 100$

2 结果与分析

2.1 两组提取物旋蒸后各相浸膏的质量

实验组和对照组均称取 150 g 紫菜粉末, 经浸提、醇沉、分相萃取、旋蒸后, 最终得到各相浸膏的质量如表 1 所示。实验组最终得到的各相浸膏质量均高于对照组, 推测紫菜经纳豆菌发酵后其乙醇可溶性物质组成及含量发生了变化。

表 1 紫菜纳豆菌发酵乙醇提取物浸膏质量

Tab. 1 The mass of the alcohol extract from *Porphyra yezoensis* fermented by *Bacillus natto*

组别	浸膏质量(g)		
	石油醚相	乙酸乙酯相	正丁醇相
实验组	0.802	1.419	1.963
对照组	0.086	0.868	1.352

2.2 紫菜多糖提取及含量测定结果

紫菜干粉经醇沉、去蛋白, 干燥后得到发酵的白色粉末状的多糖提取率为 2.40%, 未发酵的白色粉末状多糖提取率为 1.94%, 实验组的多糖提取率相对于对照组高出 0.46%(表 2)。根据张丽妍等^[20]纳豆菌糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究, 说明纳豆菌在本实验中也会产生糖苷酶对紫菜中的多糖进行降解, 从而提高了紫菜多糖的提取率。

表 2 多糖提取率及蛋白质去除率

Tab. 2 The extraction ratio of crude polysaccharides and the rate of protein removal

组别	多糖提取率(%)	蛋白质去除率(%)
第一次醇沉	实验组	5.26
	对照组	4.02
第二次醇沉	实验组	2.04
	对照组	1.94

2.3 醇提物的抑菌活性

2.3.1 醇提物对 3 种菌的抑制作用

通过前期实验, 发现发酵和未发酵的条斑紫菜对枯草芽孢杆菌、四联微球菌抑制效果均不明显, 而对金黄色葡萄球菌均有明显的抑制作用。

2.3.2 浓度对抑菌效果的影响

根据实验结果, 金黄色葡萄球菌被选择为指示菌, 测定实验组和对照组各相对其抑制效果。并测量有抑菌效果的萃取相的抑菌圈直径, 打孔器内径 5.00 mm, 测量的结果见图 1。

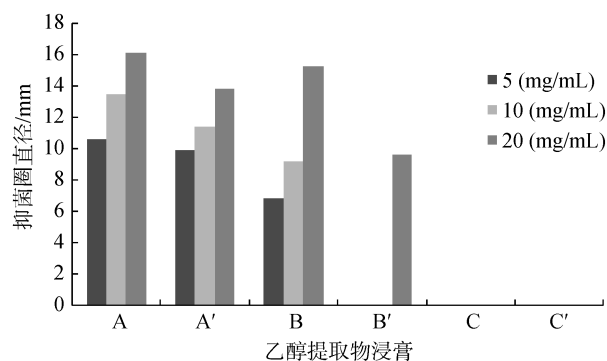


图 1 紫菜纳豆菌发酵乙醇提取物浸膏对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径

Fig. 1 The antibacterial ring diameter of the alcohol extract in the presence of *Staphylococcus aureus*

经过发酵之后, 对于石油醚相和乙酸乙酯相, 在一定程度范围内, 随着浓度的提高, 其抑菌的效果均有不同程度地提高; 浓度为 5 g/L 和 10 g/L 时,

各相的抑菌圈直径由大到小依次为：已发酵石油醚相，未发酵石油醚相，已发酵乙酸乙酯相，未发酵乙酸乙酯相。而对于正丁醇相，在这一浓度范围内，抑菌效果极不明显。紫菜经纳豆菌发酵后的醇提取物中，具有抑菌活性的物质大多是弱极性小分子物质，并且抑菌效果提高不明显，发酵对其影响较小。

2.4 醇提取物和多糖的抗氧化活性

2.4.1 对清除羟自由基($\cdot\text{OH}$) 能力

条斑紫菜醇提取物各相对羟自由基的清除效果见图 2。可见，发酵条斑紫菜醇提取物各相浸膏对羟自由基的清除率均高于 Vc，在 0.5 g/L 时，石油醚相、乙酸乙酯相和正丁醇相的清除率分别为 63.04%、80.12% 和 91.61%，而同浓度 Vc 的清除率仅为 60.09%。表明发酵条斑紫菜醇提取物在清除羟自由基时表现的抗氧化性能优于 Vc。对于实验组而言，在相同浓度下，其清除羟自由基的效果依次为：正丁醇相最高，乙酸乙酯相次之，石油醚相最低。紫菜经纳豆菌发酵后的醇提取物的抗氧化活性较未发酵时强，且浓度越高，清除羟自由基能力的的能力越强，其关系近似成线性。提示纳豆菌紫菜发酵物醇提取物可以作为一种预防性抗氧化剂加以开发。

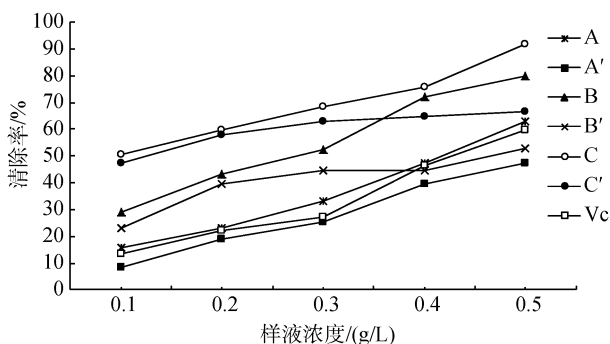


图 2 紫菜醇提取物各相对羟自由基的清除率

Fig. 2 The effect of various organic extracts on the scavenging of hydroxyl free radicals

紫菜多糖对羟自由基的清除效果见图 3。在质量浓度为 0.5~5.0 g/L 范围内，实验组和对照组对羟自由基的清除率随着紫菜多糖质量浓度的增大而增加。与对照组相比，实验组对羟自由基的清除作用更强，当质量浓度达到 5.0 g/L 时，清除率达到了 95.7%，说明紫菜发酵得到的多糖有较显著的羟自由基的清除能力。Vc 在质量浓度为 0.5~5.0 g/L 范围内对羟自由基的最大清除率达到 100.0%。因此，紫菜发酵得到的多糖对羟自由基的清除能力较强。说明纳豆菌在

发酵紫菜的过程中产生了不同于紫菜多糖的新多糖，从而提高了对羟自由基的清除率。

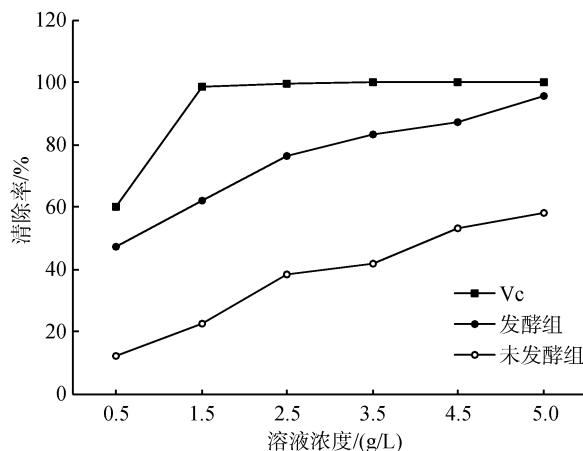


图 3 紫菜多糖对羟自由基的清除效果

Fig. 3 The effect of polysaccharides on the scavenging of hydroxyl free radicals

2.4.2 对 DPPH 自由基清除率的测定结果

紫菜醇提取物对 DPPH 自由基的清除效果见图 4。经试验 Vc 浓度为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 g/L 时，对 DPPH 自由基的清除率依次为 40.00%, 69.30%, 80.80%, 89.28%, 91.13%, 95.21%，远远超过发酵紫菜醇提取物各相浸膏的抗氧化能力。但是，实验组对 DPPH 自由基的清除率与对照组相比较还是有较大提高。对于实验组而言，在相同浓度下，其清除 DPPH 自由基的效果依次为：乙酸乙酯相最高，石油醚相次之，正丁醇相最低，且浓度越高，清除 DPPH 自由基能力的的能力越强。与对羟自由基的清除效果相比，发酵条斑紫菜醇提取物各相对于 DPPH 自由基的清除效果明显较弱。

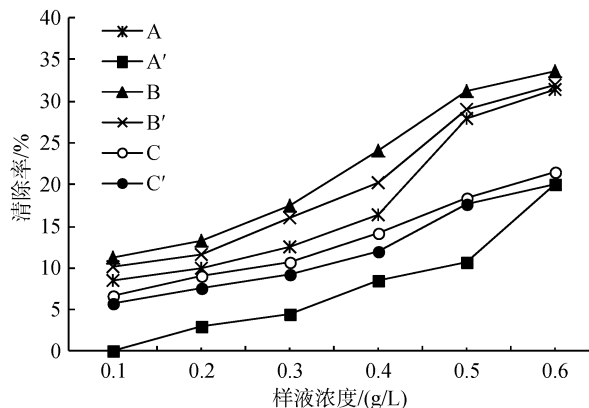


图 4 紫菜醇提取物各相对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 4 The effect of various organic extracts on the scavenging of DPPH free radicals

此外,经多次增大浓度反复试验,结果表明,发酵紫菜多糖溶液对 DPPH 自由基清除作用十分微弱。

2.4.3 对超氧阴离子自由基的清除率

紫菜多糖对超氧阴离子自由基的清除效果见图 5。在质量浓度为 0.5~5.0 g/L 范围内,实验组和对照组对超氧阴离子的清除率随着紫菜多糖质量浓度的增大而增加。与对照组相比,实验组对超氧阴离子的清除作用更强,当浓度达到 5.0 g/L 时,清除率达到了 64.0%,但仍弱于 Vc(最大清除率达 80.9%)。

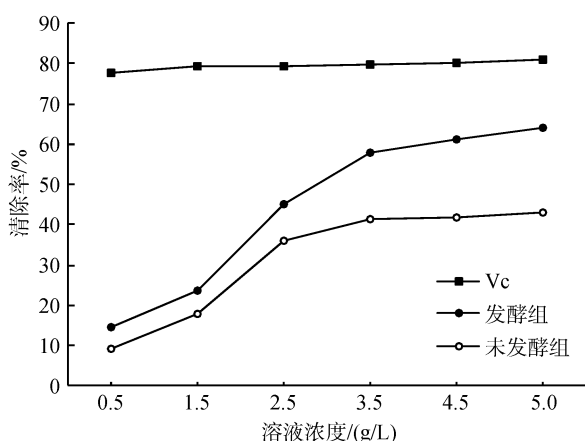


图 5 紫菜多糖对超氧阴离子的清除效果

Fig. 5 The effect of polysaccharides on the scavenging of superoxide anion free radicals

3 结论

本研究结果显示,纳豆芽孢杆菌发酵紫菜后的醇提取物对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用,对各相浸膏中抗菌活性物质尚有待进一步纯化和结构分析,希望能从中找到一些新的抗菌活性化合物,用于进行后续开发和利用。

利用纳豆菌发酵条斑紫菜并从中提取多糖,并通过醇沉法除蛋白,得到初步纯化的紫菜多糖,通过研究紫菜多糖的抗氧化活性,发现通过纳豆菌发酵紫菜的多糖提取率比未发酵紫菜的提取率高,且具有更强的抗氧化能力,当紫菜多糖质量浓度达到 5.0 g/L 时,对羟自由基的清除率达到 95.7%(与 Vc 接近),因而有望用于抗氧化功能食品开发。

参考文献:

[1] 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.

[2] Liang X, Zhang L, Zhong J, et al. Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(1): 95-101.

[3] Pais E, Alexy T, Holsworth RE Jr, et al. Effects of nattokinase, a pro-fibrinolytic enzyme on red blood cell aggregation and whole blood viscosity[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 35(1-2): 139-142.

[4] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase[J]. *Acta Haematol*, 1990, 84(3): 139-143.

[5] 杨郁, 张丽靖, 天知诚吾. 纳豆激酶高产菌株筛选及发酵条件优化[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(10): 22-25.

Yang Yu, Zhang Lijing, Seigo Amachi. Selection of high Nattokinase-producing Strains and Optimization of the Fermentation Conditions[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(10): 22-25.

[6] 明飞平, 赵培静, 廖春芳, 等. 纳豆芽孢杆菌液体发酵条件的优化研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 6(25): 625-628.

Ming Feiping, Zhao Peijing, Liao Chunfang, et al. Optimization of Liquid Fermentation of *Bacillus natto*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 6(25): 625-628.

[7] 丛俊英, 张淑莲, 王洋, 等. 纳豆菌发酵鱼肉蛋白制备低分子肽的工艺研究[J]. *大连工业大学学报*, 2011, 30(6): 416-419.

Cong Junying, Zhang Shulian, Wang Yang, et al. The degree of proteolysis from fish protein fermentation by *Bacillus natto*[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2011, 30(6): 416-419.

[8] 付博, 武利刚, 段杉. 纳豆菌发酵虾头、虾壳过程所产蛋白酶的活力影响因素研究[J]. *中国调味品*, 2013, 38(11): 9-13.

Fu Bo, Wu Ligang, Duan Shan, et al. Study on influencing factors of protease activity during the process of fermentation of shrimp head and shell with *Bacillus natto*[J]. *China Condiment*, 2013, 38(11): 9-13.

[9] Zhang Q, Li N, Liu X, et al. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity[J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(1): 1105-1106.

[10] 郑温翔, 郑惠彬, 王宝周, 等. 发酵酶解法提取紫菜蛋白多肽及其特性研究[J]. *食品与发酵工业*. 2013, 39(4): 130-134.

Zheng Wenxiang, Zheng Huibin, Wang Baozhou, et al. Characterization of protein extracted from *Porphyra haitanensis* by fermentation combined with enzymolysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(4): 130-134.

[11] 陈锡雄. 薤白抑菌作用的初步研究[J]. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 2004, 3(4): 337-340.

Cheng Xixiong. A preliminary study on the bacteriostasis of *Allium macrostemon*[J]. *Journal of Hangzhou Teachers College*, 2004, 3(4): 337-340.

- [12] 张青, 张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技, 2004, 7(17): 17-18.
Zhang Qing, Zhang Tianming. Determination of polysaccharide by phenol-sulfuric acid method[J]. Shandong Food Science and Technology, 2004, 7(17): 17-18.
- [13] STROBEL G A. Rainforest endophytes and bioactive products[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2002, 22(2): 315-333.
- [14] 王俊, 姚滢, 张建鹏, 等. 牡蛎多糖的制备和生物学活性研究[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(6): 217-220.
Wang Jun, Yao Ying, Zhang, Jianpeng, et al. Preparation and biological activity of polysaccharides from *Ostrea rivularis* in the east China sea[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2006, 19(6): 217-220.
- [15] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 283-289.
Zhou Deqing. Microbiology Laboratory Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986: 283-289.
- [16] 苏士彦. 食品微生物检验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 303-365.
Su Shiyan. Handbook of food microbiology testing[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 303-365.
- [17] 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 344.
Ling Guanting. Antioxidant food and health[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 344.
- [18] 刘蕾, 魏玉西, 王长云, 等. 侧扁软柳珊瑚(*Subergorgia suberosa*)乙醇提取物抗氧化和抑菌活性研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(9): 19-22.
Liu Lei, Wei Yuxi, Wang Changyun, et al. Study on the Anti-oxidation and Bacteriostasis Activities of the Ethanol Extract from *Subergorgia suberosa*[J]. Marine Sciences, 2010, 34(9): 19-22.
- [19] 陈义勇, 张天俊, 杨军, 等. 南通坛紫菜多糖的黏度性质及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(14): 77-80.
Chen Yiyong, Zhang Tianjun, Yang Jun, et al. Viscosity and Antioxidation Activity of Polysaccharides from *Porphyra Haitanensis* of Nantong[J]. Food Research and Development, 2013, 34(14): 77-80.
- [20] 张丽妍, 郝敏, 李秋莎. 纳豆菌糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 中国药物评价, 2013, 30(5): 265-268.
Zhang Liyan, Hao Min, Li Qiusha. Purification and Enzymological Properties of Natto Fungus Glycosidase [J]. Chinese Journal of Drug Evaluation, 2013, 30(5): 265-268.

Preliminary research on the biological activity of alcohol extract and polysaccharides from *Porphyra yezoensis* fermented by *Bacillus natto*

HUANG Ying-ying, DONG Huan-huan, YANG Miao-miao, JIAO Li-ping, SHAO Shuang, YUE Qi, WEI Yu-xi

(College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Received: Sep. 15, 2015

Key words: *Porphyra yezoensis*; *Bacillus natto*; polysaccharides; alcohol extract; antioxidant activity; antibacterial activity

Abstract: The fermentation product of *Porphyra yezoensis* by *Bacillus natto* was diluted and centrifuged, and the supernatant was treated with alcohol to obtain an alcohol-based precipitation extract. The fermentation product was also deproteinized to extract crude polysaccharides to study the antioxidant activity, while the extract was subjected to rotary evaporation and extracted with petroleum ether, ethyl acetate, and n-butanol, respectively, to evaluate the related extract for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus tetragenus*. The antioxidant activity was evaluated based on the scavenging rate to hydroxyl free radicals ($\cdot\text{OH}$) and 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radicals (DPPH \cdot). The results revealed that the alcohol soluble substances showed an inhibitory effect against *S. aureus*, and the scavenging rate to $\cdot\text{OH}$ presented a dose-response relationship. Among them, the scavenging rate to $\cdot\text{OH}$ by the n-butanol extract reached 91.6% at a concentration of 5.0 mg/mL. Compared with unfermented *P. yezoensis*, the extraction ratio of crude polysaccharides from fermented *P. yezoensis* increased by 0.24%, and the scavenging rate of polysaccharides to $\cdot\text{OH}$ at a concentration of 5.0 mg/mL increased up to 95.7%. These results demonstrated that the fermented product possesses both antibacterial and antioxidant properties.

(本文编辑: 康亦兼)