

# 纳豆微胶囊的制备及其稳定性

张 杰<sup>1,2,3</sup>, 葛武鹏<sup>4,\*</sup>, 杨希娟<sup>1,2,3</sup>, 党 斌<sup>1,2,3</sup>

(1.青海大学农林科学院, 青海西宁 810016;

2.青海省农林科学院, 青海西宁 810016;

3.青海省青藏高原农产品加工重点实验室, 青海西宁 810016;

4.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西咸阳 712100)

**摘 要:**研究以纳豆为对象,通过单因素实验,考察明胶质量分数、阿拉伯胶质量分数、混合壁材溶液配比、壁材芯材配比对微胶囊包埋率的影响,优化出纳豆微胶囊制备的最优工艺,并对制备得到的微胶囊产品稳定性进行分析。结果表明,阿拉伯胶质量分数为 5%,明胶质量分数为 5%,明胶/阿拉伯胶比为 1:3,壁芯比为 10:1,此时,微胶囊包埋率最高为 93.91% ± 0.21%。扫描电镜图像结果表明微胶囊表面呈现不规则形状,而内部为疏松的、不规则的孔网状结构。微胶囊产品的 pH、温度稳定性均得到了提高,本研究为纳豆及纳豆激酶新产品的开发奠定基础。

**关键词:**纳豆激酶,微胶囊,工艺优化,稳定性

## Preparation and stability of the natto microcapsules

ZHANG Jie<sup>1,2,3</sup>, GE Wu-peng<sup>4,\*</sup>, YANG Xi-juan<sup>1,2,3</sup>, DANG Bin<sup>1,2,3</sup>

(1. Academy of Agriculture and Forestry, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining 810016, China;

3. Tibetan Plateau Key Laboratory of Agric-Product Processing in Qinghai, Xining 810016, China;

4. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Xianyang 712100, China)

**Abstract:** This study was based on natto as main material. Single factor experiments were used to examine the influence of proportions of gelatin, arabic gum to coating wall, the ratio of the mixed wall materials and the ratio of the wall-cord materials on microencapsulation efficiency. Then the optimal process of natto microcapsules was optimized, and the stability of the microcapsules was analyzed. The results showed that the optimal process parameters were as follows: arabic gum of 5%, gelatin of 5%, the ratio of gelatin/arabic gum of 1:3, the ratio of wall-cord materials of 10:1. Under these conditions, the highest rate of microencapsulated was 93.91% ± 0.21%. The irregular surface and the porous and loose inner structure of microcapsules were observed by scanning electron microscopy (SEM). The microcapsules were more stable than the native nattokinase by the pH and temperature. It would lay the foundation for the development of new products of natto and nattokinase.

**Key words:** nattokinase; microcapsule; process optimization; stability

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2017)22-0157-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.031

纳豆是一种有着几千年历史的传统发酵食品<sup>[1]</sup>, 具有很多保健功能如抗肿瘤、溶血栓、抗氧化、抗菌、防治骨质疏松、降血压、美容等<sup>[2]</sup>。纳豆枯草芽孢杆菌是纳豆的生产菌种<sup>[3]</sup>, 具有分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质的能力<sup>[4-5]</sup>, 其代谢产物纳豆激酶(Nattokinase, NK)为发酵食品纳豆中提取出的一种单链多肽酶<sup>[6]</sup>, 由 275 个氨基酸残基组成, 分子质量约为 28 kDa, 在 pH6~12 条件下稳定存在, 在酸性条件下无活性<sup>[7]</sup>。其功能特性已得到大量文献证

实, 其溶栓及抑制血栓形成效果较为突出<sup>[8-11]</sup>, 不但能直接作用于纤溶蛋白, 还能激活体内纤溶酶原, 加强内源性纤溶酶的作用效果, 从而更有效地发挥溶栓性能。同时兼具安全性好、成本低、作用迅速、经口服后可迅速入血<sup>[12]</sup>及在胃肠的稳定性好等优点<sup>[13-16]</sup>。纳豆激酶作为一种微生物代谢产物具有广阔的开发应用前景<sup>[17-19]</sup>。

近几年, 世界很多国家也都加入到纳豆的研究工作中, 而国内的研究重点主要集中在对发酵条件

收稿日期: 2017-04-21

作者简介: 张杰(1989-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 发酵及生物技术, E-mail: zjzj89zjzj@163.com。

\* 通讯作者: 葛武鹏(1965-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 乳品科学及生物技术, E-mail: josephge@sina.com。

基金项目: 青海省农林科学院创新基金项目(2016-NKY-01); 青海省科技厅创新平台建设专项项目(2017-ZJ-Y31); 咸阳市重大科技计划项目(K332015121)。

的优化<sup>[20-21]</sup>、生产菌株的诱变处理<sup>[22-23]</sup>、基因改良<sup>[24-26]</sup>等方面的研究,对于功能成分—纳豆激酶的提取利用方面的研究较少<sup>[27-28]</sup>。在实际生产利用中,由于纳豆激酶的特殊性,在酸性条件无活性、碱性条件下较稳定,高温处理易丧失其活力,大大减弱了纳豆激酶在加工方面的优势。当前,已有部分学者为保持纳豆激酶活力对其进行微胶囊化研究<sup>[29-32]</sup>,不仅达到了提高其稳定性的目的,而且将制剂添加到各种食品、药品等中扩大其应用范围<sup>[33-34]</sup>。但目前,加工利用途径仅限于对纳豆激酶的提取、包埋,对于利用纳豆中其他营养成分、活菌来说都是极大的损失,对其整体的研究尚未见报道。因此,本研究在传统发酵技术上,以保持纳豆激酶活性为目标,提高纳豆利用率、减少经济损失为宗旨,以微胶囊包埋率为测定指标,对壁材溶液质量浓度(明胶溶液、阿拉伯胶溶液)、两种壁材溶液配比、壁材芯材配比进行研究,优化出纳豆微胶囊制备的最优工艺,并对制备得到的微胶囊产品进行稳定性分析,旨在得到包埋率较高的纳豆微胶囊制品,为相关产品开发提供支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

纳豆枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*) BSCZ-4 实验室分离菌株;尿激酶(5 kU) 购自北京雅安达生物技术有限公司;凝血酶(1000 U/支)、牛纤维蛋白原 购自 Sigma 公司;明胶 食品级,山东梁山万达生物科技有限公司;阿拉伯胶(食品级) 康达食品工程有限公司;牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等 均为国产分析纯;黄豆 购自杨凌超市;菌种培养基:液体培养基 蛋白胨 5.0 g,牛肉膏 3.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1.0 L,pH7.0;斜面培养基 蛋白胨 5.0 g,牛肉膏 3.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水 1.0 L,pH7.0。

DRP-9162 型电热恒温培养箱 上海森信实验仪器有限公司;SW-CJ-2D 型(实用垂直新颖)双人净化工作台 苏州净化设备有限公司;ES-315 型高压蒸汽杀菌锅 上海博迅实业有限公司;FA2004 型电子天平 长沙湘平科技发展有限公司;精密 pH 仪 德国赛多利斯股份公司;SPH-200B 型摇床 西安禾普生物科技有限公司;HC-3018 型高速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;LGJ-25C 型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司;JYL-C051 型榨汁机 九阳股份有限公司;S-3400 型电子扫描显微镜 深圳市方特科技有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 种子液的制备 用接种环挑取斜面菌种两环,接种于装有 100 mL 液体种子培养基的 250 mL 三角瓶中,37 ℃、150 r/min 摇床培养 15 h。

1.2.2 纳豆传统发酵工艺流程<sup>[35]</sup> 黄豆→筛选、清洗→浸泡(24 h)→分装入三角瓶→高压蒸汽蒸煮(121 ℃、20 min)→冷却→接菌(接种量为 8%)→37 ℃恒温培养 24 h→放入冰箱中后熟(24 h)→成熟纳豆。

1.2.3 微胶囊的制备 采用明胶和阿拉伯胶为复合壁材,对纳豆浆进行包埋。将两种壁材物质分别加

入一定量的超纯水,配制成一定的质量分数溶液,并在 60 ℃水浴中溶胀,使其完全溶解后将两种壁材溶液在 60 ℃下按一定比例充分混合均匀。继续搅拌,并加入一定量的芯材溶液(纳豆以 1:1 的比例加入超纯水,用榨汁机将其打浆),待其混和均匀后,继续搅拌 1 h。搅拌结束后将混合物倒入培养皿中冷冻干燥,经粉碎、过 100 目筛,得到微胶囊制品。

1.2.4 微胶囊制备单因素实验 在明胶溶液质量分数为 3%、阿拉伯胶溶液质量分数为 3%、壁材溶液配比(明胶与阿拉伯胶体积比 v/v)为 1:1、壁芯比(壁材与芯材体积比 v/v)为 5:1 的恒定条件下,分别考察明胶溶液质量分数为 2%、3%、4%、5%、6%,阿拉伯胶溶液质量分数为 2%、3%、4%、5%、6%,壁材溶液配比(明胶与阿拉伯胶体积比 v/v)为 1:5、1:3、1:1、3:1、5:1,壁芯比(壁材与芯材体积比 v/v)为 2:1、5:1、10:1、15:1 对微胶囊包埋率的影响。

1.2.5 正交实验 在单因素实验的基础上,为了研究不同因素之间的综合效应,选择明胶溶液质量分数、阿拉伯胶质量分数、壁材配比、壁芯比为因素,包埋率为评价指标,优化微胶囊制备工艺,正交实验的各因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

| 水平 | 因素                    |                     |                |              |
|----|-----------------------|---------------------|----------------|--------------|
|    | A 阿拉伯胶<br>质量分数<br>(%) | B 明胶<br>质量分数<br>(%) | C 明胶/<br>阿拉伯胶比 | D 壁材/<br>芯材比 |
| 1  | 4                     | 3                   | 1:3            | 5:1          |
| 2  | 5                     | 4                   | 1:1            | 10:1         |
| 3  | 6                     | 5                   | 3:1            | 15:1         |

1.2.6 微胶囊微观结构的测定 采用扫描电子显微镜(SEM)对纳豆微胶囊的微观结构进行分析。将少许微胶囊粉末撒于贴了双面胶的样品台上,吹去多余的粉末。对微胶囊进行喷金处理,再利用扫描电镜进行扫描,观察微胶囊的表面形态结构特征。

取一定量的微胶囊产品置于研钵中进行适当研磨后,用导电胶将研磨的微胶囊样品粉末黏在 SEM 载物台上,样品表面喷金,30 min 后将载物台置于 SEM 中,加速电压为 15 kV。

### 1.2.7 微胶囊稳定性研究

1.2.7.1 pH 对微胶囊稳定性的影响 分别称取微胶囊产品及纳豆粉末样品各 1.0 g 溶于 10 mL 无水乙醇中,制得溶液,分别调节溶液 pH 分别为 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0,于室温放置 5 h 后测定纳豆激酶保留率。

1.2.7.2 温度对微胶囊稳定性的影响 将制备得到的微胶囊产品及纳豆粉末样品用锡箔袋真空包装,分别置于 20、40、60、80、100 ℃水浴中,放置 4 h 后测定纳豆激酶保留率。

1.2.7.3 贮藏期对微胶囊稳定性的影响 将微胶囊产品及纳豆粉末样品用锡箔袋真空包装,分别置于冷冻条件(-20 ℃),冷藏条件(4 ℃),常温条件(25 ℃)与高温条件(42 ℃)放置 45 d,定期分别取

样,考察不同温度和时间对微胶囊稳定性的影响。

1.2.8 微胶囊产品指标测定

1.2.8.1 纳豆激酶活力测定 采用纤维蛋白平板法测定酶活力值。以尿激酶为标准品制作标准曲线。根据标准曲线可得回归方程:  $y = 0.003x + 0.3937$ , 相关系数  $R^2 = 0.9976$ 。式中:  $y$  为溶解圈面积,  $x$  为酶活力值。

1.2.8.2 微胶囊包埋率的测定 a. 表面芯材酶活力的测定<sup>[36]</sup>: 称取 1.0 g 制备好的微胶囊, 将其放入布氏漏斗中抽滤, 并且用注射器在微胶囊表面滴加超纯水 1 mL 以冲洗表面, 同时冲洗漏斗通道, 最后定容至 5 mL, 并采用琼脂糖-纤维蛋白法测定其酶活。

b. 产品芯材总酶活力的测定: 称取 1.0 g 制备好的微胶囊, 边搅拌边加入超纯水 50 mL, 使之完全溶解, 并测定其酶活力值。

包埋率(%) =  $\left(1 - \frac{\text{微胶囊表面芯材酶活}}{\text{微胶囊中芯材总酶活}}\right) \times 100$

1.2.8.3 微胶囊中纳豆激酶保留率的测定 选择微胶囊中纳豆激酶保留率为指标, 其计算公式如下:

纳豆激酶保留率(%) =  $\frac{\text{处理后纳豆激酶酶活力}}{\text{处理前纳豆激酶酶活力}} \times 100$

1.3 数据处理

数据以三次独立样品测定的平均值表示; 采用 DPS 6.55 软件进行分析, 统计分析采用 F 检验, 多重比较采用 LSD 法;  $p < 0.05$  被认定为存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 不同质量分数的明胶溶液和阿拉伯胶溶液对包埋率的影响 为了提高微胶囊的包埋率, 本研究以明胶溶液和阿拉伯胶溶液为壁材, 研究二者质量分数对其包埋率的影响, 结果如图 1 和图 2。从图 1 可以看出, 明胶溶液质量分数对微胶囊包埋率影响显著, 当明胶溶液质量分数为 4% 时, 其包埋率达到最大为  $93.78\% \pm 0.35\%$ 。由图 2 可知, 随着阿拉伯胶溶液质量分数的增加, 其微胶囊包埋率呈现先增加后降低的趋势, 基本趋于平稳, 阿拉伯胶溶液质量分数为 5% 时, 包埋率最大为  $93.39\% \pm 1.74\%$ 。这可能是由于当壁材溶液质量分数过低时, 不足以将芯材溶液包埋在壁材溶液之中, 经冷冻干燥后有大量芯材处于微胶囊表面, 使得包埋率较低; 而当壁材溶液质量分数过大, 所形成的混合物较为粘稠, 同样的搅拌制备方法不能将其充分混合, 导致包埋率下降<sup>[37]</sup>。

2.1.2 壁材溶液配比对包埋率的影响 在实际生产应用中, 选择单一的壁材并不能达到较高的包埋效果, 因此, 通常选择两种或两种以上的壁材复配, 同时由于壁材的组成及比例决定了微胶囊制品的某些特性指标, 所以探究其壁材溶液的配比显得尤为重要。本研究以明胶和阿拉伯胶溶液为壁材溶液, 研究二者的比例对包埋率的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 当二者复配比例为 1:1 时, 其包埋率最大为  $90.09\% \pm 0.76\%$ , 且明显高于其他配比。在壁材的

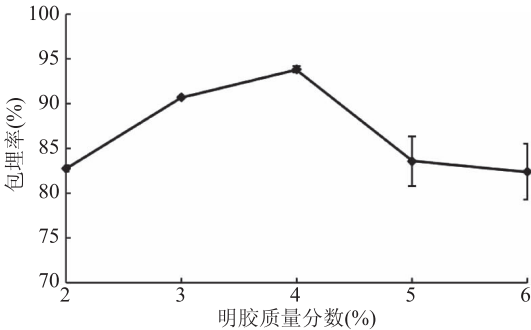


图 1 明胶质量分数对包埋率影响  
Fig.1 Effect of the concentration of gelatin on encapsulation rate

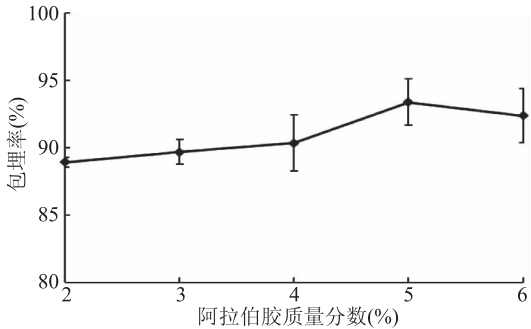


图 2 阿拉伯胶质量分数对包埋率的影响  
Fig.2 Effect of the concentration of arabic gum on encapsulation rate

选择上, 明胶具有良好的成膜性和乳化性, 阿拉伯胶本身为增稠剂, 添加到整个体系中使得其黏度增大。当阿拉伯胶含量过多, 会导致物料黏度过大<sup>[38]</sup>, 不利于芯材的分散, 致使包埋率下降。而当明胶过高、阿拉伯胶少时, 形成微胶囊表面较为松散, 包埋效果差。

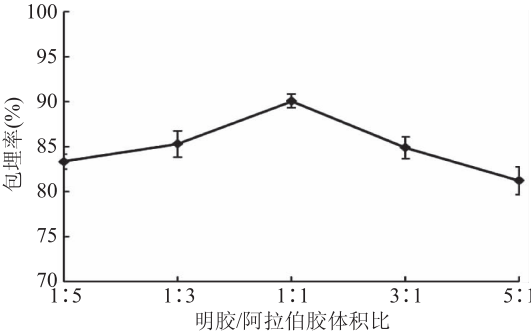


图 3 明胶与阿拉伯胶比对包埋率的影响  
Fig.3 Effect of the ratio of gelatin and arabic gum on encapsulation rate

2.1.3 壁材芯材比对包埋率的影响 壁芯比对微胶囊包埋率的影响如图 4 所示。由图 4 可知, 随着壁芯材比例从 2:1 变化到 15:1 时, 微胶囊的包埋率呈现上升趋势。当壁芯比为 10:1 时, 微胶囊的包埋率达到最大为  $93.73\% \pm 0.78\%$ 。其原因可能是随着壁材比例的逐渐增加, 形成的微胶囊囊壁致密, 有利于微胶囊包埋率升高; 而当壁材比例继续增加, 芯材流动性变差, 出现黏着现象; 同时壁材比例过高, 芯材较少, 壁材没有充分利用, 致使包埋率较低<sup>[37]</sup>。

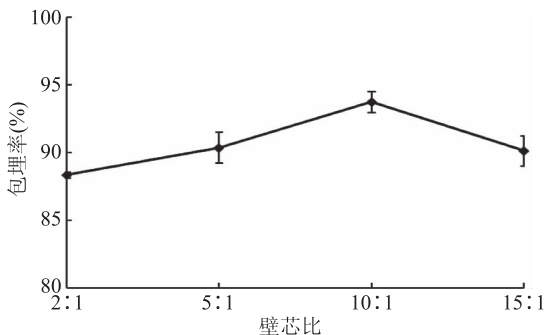


图4 壁芯比对包埋率的影响

Fig.4 Effect of the wall-core ratio on encapsulation rate

2.2 正交实验结果

在单因素实验的基础上,选取阿拉伯胶质量分数、明胶溶液质量分数、壁材配比、壁芯比因素,使用正交设计对微胶囊包埋条件进行优化,结果分析见表2与表3。

表2 正交实验设计及结果

Table 2 Results and analysis of orthogonal experiment

| 实验号            | A     | B     | C     | D     | 包埋率(%)       |
|----------------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 1              | 1     | 1     | 1     | 1     | 84.88 ± 1.38 |
| 2              | 1     | 2     | 2     | 2     | 86.95 ± 1.54 |
| 3              | 1     | 3     | 3     | 3     | 89.49 ± 0.27 |
| 4              | 2     | 1     | 2     | 3     | 90.76 ± 0.55 |
| 5              | 2     | 2     | 3     | 1     | 85.89 ± 1.65 |
| 6              | 2     | 3     | 1     | 2     | 92.64 ± 0.58 |
| 7              | 3     | 1     | 3     | 2     | 86.25 ± 1.78 |
| 8              | 3     | 2     | 1     | 3     | 91.61 ± 1.37 |
| 9              | 3     | 3     | 2     | 1     | 86.18 ± 0.64 |
| k <sub>1</sub> | 87.11 | 87.30 | 89.71 | 85.65 |              |
| k <sub>2</sub> | 89.76 | 88.15 | 87.96 | 88.62 |              |
| k <sub>3</sub> | 88.01 | 89.44 | 87.21 | 90.62 |              |
| R              | 2.66  | 2.14  | 2.50  | 4.97  |              |

表3 正交实验方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

| 方差来源 | 偏差平方和  | 自由度 | 均方    | F值    | 显著性 |
|------|--------|-----|-------|-------|-----|
| A    | 21.89  | 2   | 10.95 | 7.48  | *   |
| B    | 13.94  | 2   | 6.97  | 4.76  | *   |
| C    | 19.75  | 2   | 9.88  | 6.75  | *   |
| D    | 75.13  | 2   | 37.56 | 25.68 | **  |
| 误差   | 13.17  | 9   | 1.46  |       |     |
| 总变异  | 143.88 | 17  |       |       |     |

注: \* 表示差异显著( $p < 0.05$ ); \*\* 表示差异极显著( $p < 0.01$ )。

由正交实验结果和方差分析表可以看出,阿拉伯胶质量分数(A)、明胶质量分数(B)、明胶/阿拉伯胶比(C)与壁材芯材比(D)此四个因素对纳豆激酶活力的影响主次顺序为壁材芯材比 > 阿拉伯胶质量分数 > 明胶/阿拉伯胶比 > 明胶质量分数。即壁芯比对微胶囊包埋率影响最大,达到极显著水平,其次为阿拉伯胶质量分数、明胶/阿拉伯胶比,而明胶质

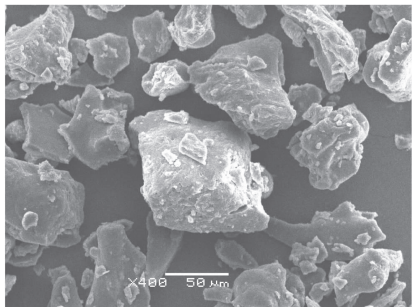
量分数的影响最小。微胶囊包埋最佳条件为  $A_2B_3C_1D_3$ ,即阿拉伯胶质量分数为5%,明胶质量分数为5%,明胶/阿拉伯胶比为1:3,壁芯比为15:1。

2.3 验证实验

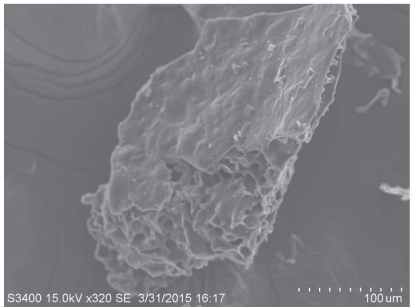
根据正交实验结果得到其最优组合为  $A_2B_3C_1D_3$ ,进行多次重复性( $n = 3$ )验证性实验,测得微胶囊包埋率为  $90.49\% \pm 0.62\%$ 。其所得到的验证实验结果低于正交实验第6组合,同时对正交实验第6组进行验证实验,测得其微胶囊包埋率为  $93.91\% \pm 0.21\%$ 。因此选择  $A_2B_3C_1D_2$  为最优组合,在实际生产中具有一定的应用价值。

2.4 微胶囊的显微结构

图5为正交实验得到最优微胶囊制备工艺所得的纳豆微胶囊颗粒在扫描电镜下所得到的微胶囊微观结构。由图5(a)可知,以阿拉伯胶、明胶为壁材制备出的微胶囊颗粒呈现不规则形状,组织分布较为均匀,有较少量芯材物质暴露于外壁表面。图5(b)、图5(c)为微胶囊内部结构的SEM图,微胶囊内部呈现疏松的、不规则的孔网状结构,其中图5(c)为枯草芽孢杆菌在微胶囊内部包埋情况,大部分枯草芽孢杆菌其杆状菌体结构被明胶和阿拉伯胶壁材包覆,且共同位于微胶囊内部疏松的网



(a)微胶囊表面结构的SEM图(400×)



(b)微胶囊内部结构的SEM图(320×)



(c)微胶囊中纳豆枯草芽孢杆菌的SEM图(1400×)

图5 微胶囊结构的SEM图

Fig.5 The SEM of microcapsule structure

状结构中,包埋效果较好。在实际应用过程中,微胶囊对其能起到一定的保护作用,避免环境等因素降低其活性。

2.5 微胶囊稳定性结果

2.5.1 pH对微胶囊稳定性的影响 在实际加工生产中,外界因素对原料加工性能存在显著影响,因此研究微胶囊的稳定性是势在必行的。pH对微胶囊稳定性的影响,结果见图6。由图6可知,pH在4~7范围内,微胶囊化前后,纳豆激酶保留率随着pH的增加呈现上升的趋势;在pH7~8范围内,纳豆激酶受pH影响相对较小,符合纳豆激酶在碱性条件下相对稳定存在,在酸性条件下无活性的性质。但总体变化趋势上表现为微胶囊产品的纳豆激酶保留率明显高于纳豆粉末样品。结果表明,微胶囊化能够减轻pH对纳豆激酶的影响,提高纳豆激酶的稳定性。

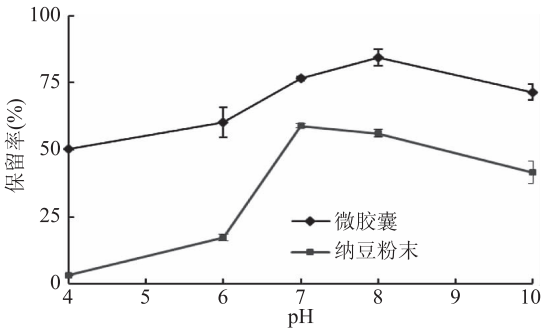


图6 pH对纳豆微胶囊化前后稳定性的影响  
Fig.6 Effect of pH on the stability of native and microencapsulated natto

2.5.2 温度对微胶囊稳定性的影响 温度对微胶囊稳定性的影响见图7。由图7可知,随着处理温度的不断升高,纳豆微胶囊化前后其保留率均呈现下降的趋势,在40℃时,微胶囊中纳豆激酶保留率为92.06%,纳豆粉末中其保留率仅为50.27%;在80℃时,微胶囊中纳豆激酶保留率为69.84%,纳豆粉末中其保留率为44.96%。从结果中可以明显看出,微胶囊化的纳豆激酶在同等条件下具有更高的稳定性,更利于实际生产加工利用。

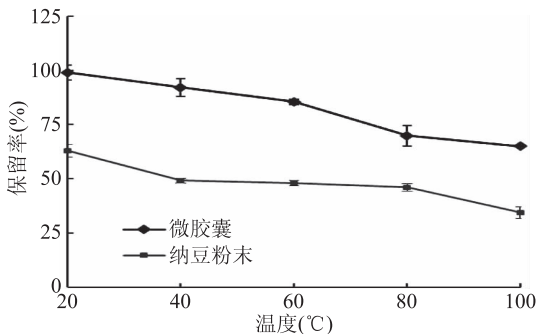


图7 温度对纳豆微胶囊化前后稳定性的影响  
Fig.7 Effect of temperature on the stability of native and microencapsulated natto

2.5.3 贮藏期及贮藏温度对微胶囊稳定性的影响 贮藏期及贮藏温度对微胶囊稳定性的影响结果如图8。从图8可知,随着贮藏时间的延长,纳豆激

酶保留率均呈现下降的趋势,且当贮藏温度较高时,纳豆激酶保留率下降较为迅速;当贮藏温度处于低温状态(4℃、-20℃)时,微胶囊较为稳定,且在4℃与-20℃处纳豆激酶保留率较为接近。在贮藏30d,-20℃下,纳豆激酶保留率为76.13%。与此同时,纳豆粉末在4℃下随着贮藏时间的增加,纳豆激酶的保留率迅速下降,当贮藏25d后4℃贮藏的纳豆激酶保留率最低,下降速率最快。综合而言,微胶囊包埋效果较好,纳豆激酶损失相对较小,可为实际贮藏应用提供依据。

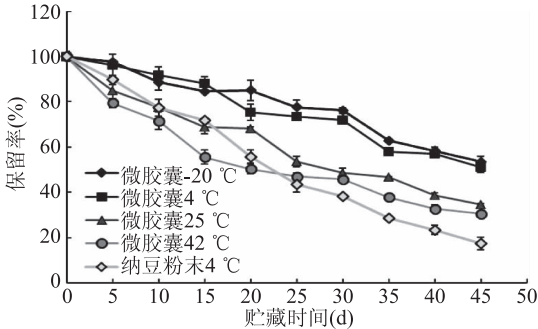


图8 贮藏期及温度对纳豆微胶囊稳定性的影响  
Fig.8 Effect of storage time and temperature on the stability of microencapsulated natto

3 结论

以纳豆微胶囊为研究对象,旨在确定微胶囊制备最佳参数。最佳参数为:阿拉伯胶质量分数为5%,明胶质量分数为5%,明胶/阿拉伯胶比为1:3,壁芯比为10:1时,制备得到的微胶囊包埋率达到最高为93.91%±0.21%。

根据正交实验的最佳参数制备出微胶囊制品,通过电子扫描显微镜得到其微观结构,微胶囊表面呈现不规则形状,而内部为疏松的、不规则的孔网状结构。

经过微胶囊化处理,纳豆激酶在实际生产加工中对pH、温度的稳定性均得到了显著地提高,有了明显的改善;并确定出适宜贮藏期及贮藏温度(30d,-20℃,纳豆激酶保留率为76.13%),为开发纳豆及纳豆激酶新产品提供理论依据。

参考文献

[1] Xu J P, Du M, Yang X L, et al. Thrombolytic effects *in vivo* of nattokinase in a carrageenan-induced rat model of thrombosis [J]. *Acta Haematologica*, 2014, 132 (2) : 247-253.  
[2] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; atypical and popular soy-bean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987, 43 (10) : 1110-1111.  
[3] Kwon E Y, Kim K M, Kim M K, et al. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis* [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34 (7) : 789-793.  
[4] 王雪妍, 孙玉飞, 冯菲, 等. 一株高产纳豆激酶菌株的鉴定与分析 [J]. *生物技术通报*, 2016 (1) : 187-194.

- [5] 张杰, 葛武鹏, 张静, 等. 高产纳豆激酶的枯草芽孢杆菌优选及发酵工艺条件优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 202-205, 209.
- [6] 李淑英, 赵仲麟, 聂莹, 等. 纳豆激酶研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(4): 139-143.
- [7] Fujita M, Ohnishi K, Takaoka S. Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously hypertensive rats [J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34(11): 1696-1701.
- [8] Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(10): 1387-1391.
- [9] 平谷一, 中西晃一郎, 须见洋行. 血栓溶解剂[P]. 日本公开特许 89 180834, 1989.
- [10] Kamiya S, Hagl mori M, Ogasawara M, et al. *In vivo* evaluation method of the effect of nattokinase on carrageenan induced tail thrombosis in a rat model[J]. Acta Haematologica, 2010, 124(4): 218-224.
- [11] Pylaev T E, Khanadeev V A, Khlebtsov B N, et al. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanospheres: a comparative study with gold nanorods[J]. Nanotechnology, 2011, 22(28): 285501.
- [12] Essam Kotb. Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity[M]. Springer Briefs in Microbiology, 2012: 35-43.
- [13] 王常苏, 孙晓彤, 余洁, 等. 纳豆激酶高活性菌株 BN-05 鉴定及发酵工艺优化[J]. 中国酿造, 2014, 33(1): 91-95.
- [14] Ero M P, Ng C M, Mihailovski T, et al. A pilot study on the serum pharmacokinetics of nattokinase in humans following a single, oral, daily dose[J]. Altern Ther Health Med, 2013, 19(3): 16-19.
- [15] 马国兴, 潘峰, 王庆波, 等. 纳豆激酶分子结构与潜在应用价值分析[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(4): 342-349.
- [16] 张杰, 葛武鹏, 陈瑛, 等. 纳豆激酶高产菌株的选育及固态发酵技术[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 151-156.
- [17] 郭颖, 孔繁东, 祖国仁, 等. 纳豆激酶溶栓功效及开发应用前景[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 225-228.
- [18] Murakami K, Yamanaka N, Ohnishi K, et al. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin nat (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food[J]. Food & Function, 2012, 3(6): 674-678.
- [19] Liu J G, Xing J M, Chang T S, et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2757-2762.
- [20] 谭铭胜, 历大伟, 邓元元, 等. 纳豆芽孢杆菌固体发酵条件及其优化研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(35): 84-90.
- [21] 吴婷婷, 丁玉勇. 纳豆芽孢杆菌最适发酵条件的研究进展[J]. 农产品加工, 2016, 409(11): 59-61.
- [22] 夏丽, 沙维, 张丽萍. 紫外线诱变选育高产纳豆激酶菌株的研究[J]. 农产品加工: 创新版, 2010, 206(4): 29-31, 34.
- [23] 刘新梅, 高宇, 董明盛. 原生质体紫外诱变选育纳豆激酶高产菌株[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 49-52.
- [24] Nakamura T K, Yamagata Y H, Ichishima E J. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, apr N, of *Bacillus subtilis* (natto) [J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(11): 1869-1871.
- [25] Ai H X, Zhang L, Zhang X G, et al. Prokaryotic expression, purification and characterization of nattokinase [J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(1): 20-27.
- [26] 韩慧明, 李咏梅. 纳豆激酶基因在大肠杆菌中的表达及活性分析[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(10): 49-54.
- [27] 关海琳. 药食两用纳豆激酶的研究进展[J]. 生物技术世界, 2014(2): 88-89.
- [28] 徐慧, 吴晖, 尹志娜, 等. 层析法分离纯化纳豆激酶[J]. 食品科技, 2013, 38(4): 241-244.
- [29] 孙建华, 曲晓军, 王金英, 等. 纳豆激酶微胶囊的研制初探[J]. 黑龙江科学, 2016, 7(19): 13-15.
- [30] 程云. 纳豆激酶的酶学特性及其微胶囊的制备研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015.
- [31] 陈景鑫. 纳豆激酶微胶囊的制备及其稳定性研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2010.
- [32] Hsieh C W, Lu W C, Hsieh W C, et al. Improvement of the stability of nattokinase using  $\gamma$ -polyglutamic acid as a coating material for microcapsulation [J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(1): 144-149.
- [33] Wei X T, Luo M F, Xie Y C, et al. Strain screening, fermentation, separation, and encapsulation for production of nattokinase functional food [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 168: 1753-1764.
- [34] Dong X Y, Kong F P, Yuan G Y, et al. Optimisation of preparation conditions and properties of phytosterol liposome-encapsulating nattokinase [J]. Nat Prod Res, 2012, 26(6): 548-556.
- [35] 甘露, 崔松松, 倪敬田, 等. 纳豆固态发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 210-213.
- [36] 张娜, 赵新淮. 蛋白酶微胶囊制备工艺及在干酪成熟中的应用[J]. 农业机械学报, 2010, 41(2): 151-156.
- [37] 王丽, 蒋美娟, 任丹丹, 等. 海带类胡萝卜素微胶囊的制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(7): 219-223.
- [38] 高薇薇, 张泽生, 钱俊, 等. 山楂果原花青素的微胶囊化研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(1): 68-72.

(上接第 144 页)

- reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(42): 17939-17944.
- [21] Warriner K, Aldsworth TG, Kaur S, et al. Cross-contamination of carcasses and equipment during pork processing

- [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(1): 169-177.
- [22] 张辉, 杨振泉, 赵隽, 等. 大肠杆菌 ERIC-PCR 分子分型方法的建立及其初步应用[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 1098-1103.
- [23] 钟召兵, 侯磊, 王宁, 等. 生鲜乳中大肠杆菌的分离及其 ERIC-PCR 指纹分析[J]. 中国奶牛, 2017(3): 36-39.