

# 米曲霉发酵大米中抗氧化物质对酪氨酸酶的抑制作用

金一琼, 赖富饶, 陈周潭, Anupam GIRI, 吴晖

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本实验采用两种不同米曲霉菌种 (*Aspergillus soji*, *A. oryzae*) 在 35 °C 和湿度 > 90% 的条件下对大米进行固态发酵 6 d, 比较发酵大米在发酵过程中活性物质的金属螯合、多酚氧化酶抑制、氧自由基吸收能力及总酚含量的变化。*A. oryzae* 发酵的大米在金属螯合、多酚氧化酶抑制和氧自由基吸收能力上优于 *A. soji*, 两者在总酚含量上没有较大差别, 且在发酵第 4 d 时大米的上述四项活性都趋于稳定, 故选取 *A. oryzae* 发酵 4 d 的大米探讨其所含活性物质对酪氨酸酶的抑制作用。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法探讨 *A. oryzae* 发酵大米中活性物质对蘑菇酪氨酸酶催化 L-多巴氧化的抑制作用并推测其抑制机理。同时, 虾血淋巴和虾黑变的抑制实验也证明了米曲霉发酵大米对酪氨酸酶的有效抑制作用。

**关键词:** 米曲霉; 固态发酵; 大米; 酪氨酸酶抑制; 虾

**文章编号:** 1673-9078(2012)7-796-800

## Tyrosinase Inhibitory Activity of Antioxidants in Fermented Rice by *Aspergillus*

JIN Yi-qiong, LAI Fu-rao, CHEN Zhou-tan, Anupam GIRI, WU Hui

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Two *Aspergillus* strains (*Aspergillus soji*, *A. oryzae*) were used in this study for 6-day solid-state fermentation of rice at 35 °C and humidity > 90%. The metal chelating, polyphenol oxidase inhibitory activity, oxygen radical absorbance capacity, and total phenolic contents of fermented rice during fermentation were analyzed. The rice fermented by *A. oryzae* had higher metal chelating, polyphenol oxidase (PPO) inhibitory activity and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) than that fermented by *A. soji*. In terms of total phenol content, a similar fermentative effect was observed for both of the strains. In addition, these four properties of fermented rice tended to be stable at the fourth day of fermentation. Therefore, rice fermented by *A. oryzae* for four days was selected for the evaluation on anti-tyrosinase activity. Lineweaver-Burk Plot was adopted to investigate the inhibitory effects of bioactive compounds in fermented rice by *A. oryzae* on the oxidation of L-DOPA catalyzed by mushroom tyrosinase (M-PPO). The potential mechanism of the anti-tyrosinase activity was estimated based on the results of Lineweaver-Burk Plot. Moreover, the experiments on anti-melanosis of shrimp hemolymph and shrimp further supported the effective anti-tyrosinase activity of fermented rice by *Aspergillus*.

**Key words:** *Aspergillus*; solid-state fermentation; rice; anti-tyrosinase; shrimp

酪氨酸酶 (tyrosinase, EC 1.14.18.1) 是黑色素形成反应的关键酶<sup>[1]</sup>。在食品工业中, 酪氨酸酶的影响主要体现在新鲜水果、蔬菜的褐变以及甲壳类水产品的黑变, 导致食物感官品质的下降, 甚至产生不良风味<sup>[2]</sup>。所以在食品加工与保鲜行业, 使用有效的酪氨酸酶抑制剂是减少或抑制食品酶促褐变的重要手段。近年来, 国内外对酪氨酸酶抑制剂的研究主要是由三种方法获得有效抑制成分: 从动植物中提取、由微生物发酵产生和化学合成<sup>[3]</sup>。在食品应用中, 天然产物因其安全性一直备受青睐。

米曲霉能够分泌多种酶类, 是一种重要的工业用菌。其胞外代谢物曲酸在食品发酵中易于产生, 故米

曲霉被广泛用于曲酸的工业发酵<sup>[4]</sup>。曲酸是一种有效的酪氨酸酶抑制剂, 在食品的护色保鲜上有显著的效果<sup>[2]</sup>。另外, 研究表明大米中天然存在的游离态和结合态的多酚类物质也具有酪氨酸酶的抑制作用, 如香草酸、香豆酸、阿魏酸、紫丁香酸<sup>[5-8]</sup>。米曲霉发酵过程中分泌的酶可使结合态的多酚类物质转变为游离态, 从而增加抑制酪氨酸酶的有效成分。故本实验选取大米作为原料进行米曲霉发酵, 利用大米中天然存在的多酚类物质和米曲霉发酵产生的曲酸抑制酪氨酸酶作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

收稿日期: 2012-03-02

大米与新鲜活虾购于广州好当家超级市场；米曲霉 (*Aspergillus sojae*, *A. oryzae*) 购自日本酿造工业株式会社。

蘑菇酪氨酸酶 ( $\geq 1000$  unit/mg)、荧光素钠, 美国 Sigma; L-多巴 (99%), 上海源聚生物科技有限公司; L-脯氨酸 (99%)、菲洛素 (99%)、曲酸 ( $\geq 99\%$ )、没食子酸, 上海阿拉丁试剂有限公司; 邻苯二酚 (化学纯)、福林酚试剂, 上海润捷试剂有限公司; 肝素钠 (150 unit/mg), 上海源聚生物科技有限公司。甲醇、乙醇、EDTA、氯化铁, 市售分析纯。

## 1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计 UV-2550 型, 日本岛津; 荧光免疫分析仪 1420, 芬兰 PerkinElmer; FJ-200 高速分散均质仪, 上海标本模型厂; 旋转蒸发器 RE-52, 上海亚荣生化仪器厂; 5804R 台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 大米发酵

大米浸泡过夜之后, 倒入电饭煲内, 加水到正好没过大米, 煮熟。按 2% 接种量称取曲种, 与大米混合均匀后置于 35 °C、湿度 > 90% 的无菌恒温箱内培育 6 d。分别在 0、1、2、3、4、5、6 d 取样。

### 1.3.2 两种米曲霉 (*A. sojae*, *A. oryzae*) 发酵活性物质的比较

待测样品前处理: 称取 2 g 发酵大米, 加入 10 mL 磷酸缓冲溶液 (100 mM, pH 7.0), 均质 3 min, 4200 r/min 离心分离 5 min, 取上清液测定其金属螯合能力、多酚氧化酶的抑制作用、总酚含量和氧自由基吸收能力。

#### 1.3.2.1 金属螯合能力

$Fe^{2+}$  螯合能力的测定是根据发酵大米中活性物质与菲洛素竞争结合  $Fe^{2+}$ , 减少  $Fe^{2+}$ -菲洛素螯合物形成, 从而使反应溶液在 562 nm 处的吸收值降低。具体操作参照 Decker 和 Welch 的方法<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2.2 多酚氧化酶的抑制作用

于 10 mL 试管中加入 1 mL 待测上清液、3 mL L-多巴溶液 (0.5 mM, 溶于 pH 6.8 的 50 mM 磷酸缓冲液)、最后加入 0.1 mL 蘑菇酪氨酸酶 (0.2 mg/mL, 溶于 pH 6.8 的 50 mM 磷酸缓冲液), 混合均匀。待反应 5 min 后于 475 nm 测定吸光值。用蒸馏水代替待测液做空白对照。计算公式如下:

$$\text{多酚氧化酶抑制作用}(\%) = [(A_0 - A_x) / A_0] \times 100\%$$

注:  $A_0$  为空白组吸光值,  $A_x$  为待测样品吸光值。

#### 1.3.2.3 总酚含量

于 10 mL 试管中加入 3.9 mL 蒸馏水、0.1 mL 待

测上清液、0.25 mL 福林酚试剂混合均匀后再加入 0.75 mL 0.2 g/mL 的碳酸氢钠, 反应 30 min 后测定溶液在 760 nm 下的吸光值。用标准没食子酸作标准曲线, 样品总酚含量用没食子酸的当量表示。

#### 1.3.2.4 氧自由基吸收能力

氧自由基吸收能力的测定是基于待测样品与荧光素钠竞争氧化剂从而抑制自由基引起的荧光变化, 保护荧光素。实验以  $V_E$  水溶性类似物 Trolox 为定量标准, 结果用 Trolox 当量表示。具体实验操作参考 Huang 的方法<sup>[10]</sup>。

### 1.3.3 米曲霉发酵大米中活性物质的酪氨酸酶抑制作用

本实验的设计是基于酪氨酸酶催化 L-多巴氧化生成有色物质的反应。当酪氨酸酶抑制剂加入时, 酶的活性被抑制, L-多巴的氧化反应减弱, 从而生成的有色物质也相应地减少。在测定发酵大米提取物对蘑菇酪氨酸酶抑制的同时, 本实验选曲酸与其进行对比。

#### 1.3.3.1 活性物质的提取

根据 1.3.2 的实验结果选取第 4 d *A. oryzae* 发酵大米进行酪氨酸酶的抑制实验。称 10 g 发酵大米, 加入 100 mL 蒸馏水匀质 3 min, 1300 rpm 离心取上清液; 加入与上清液相同体积的乙醚进行液液萃取, 将混合液置于摇床 150 rpm 萃取 18 h; 1300 rpm 离心取上层液 (乙醚), 旋转蒸发全部乙醚, 加入 10 mL 甲醇溶液溶解萃取物。

#### 1.3.3.2 对蘑菇酪氨酸酶抑制的 $IC_{50}$ 测定

根据 1.3.2.3 总酚含量测定的结果, 用没食子酸当量表示发酵大米提取物的抗氧化物质浓度。方法参考文献<sup>[11,12]</sup>。

#### 1.3.3.3 对蘑菇酪氨酸酶的抑制动力学

采用 Lineweaver-Burk 双倒数法制得酶动力学曲线, 决定发酵大米提取物对酪氨酸酶抑制作用类型。方法参考文献<sup>[12,13]</sup>。

### 1.3.4 米曲霉发酵大米对虾黑变的抑制作用

#### 1.3.4.1 提取活性物质对虾血淋巴中酪氨酸酶的抑制

虾血淋巴中的酚氧化酶是引起虾在保藏过程中黑变的关键酶。酚氧化酶是一种酪氨酸酶, 能氧化酚类生成醌类物质, 再进一步生成黑色素<sup>[14]</sup>。方法参考文献<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.4.2 米曲霉发酵大米在虾类保藏上的应用

称取 5 g *A. oryzae* 发酵 4 d 的大米于 500 mL 水中 (自来水即可), 均质。将 10 只虾浸泡其中, 同时准备另外 10 只做为对照组浸泡自来水中 (浸泡前将虾处死); 30 min 后从浸泡液中取出, 于室温 (35 °C) 放置 5 h 后沸水煮 15 min 捞出, 比较对照组和实验组的

色泽差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种米曲霉发酵活性物质的比较

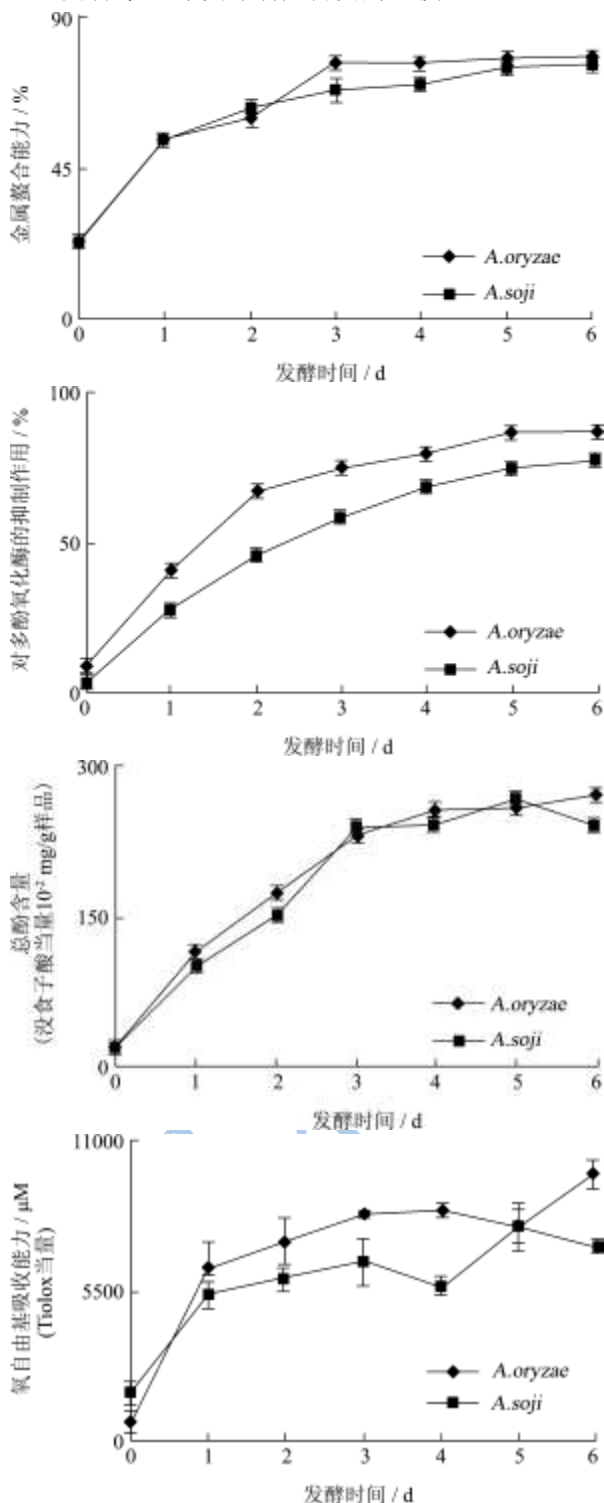


图1 米曲霉发酵过程中大米的金属螯合、多酚氧化酶抑制、氧自由基吸收能力及总酚含量的变化

Fig.1 Changes of metal chelating, inhibition of PPO activity, ORAC, and total phenolic contents of fermented rice by *Aspergillus*

随着发酵时间的延长,两种米曲霉发酵大米的金属螯合能力、多酚氧化酶的抑制作用、总酚含量和氧自由基吸收能力呈上升趋势,但是当第4 d时各项活性基本接近稳定没有较大的增幅,如图1所示。在发酵过程中,米曲霉分泌不同类型的酶分解大米中的营养成分,从而释放结合态多酚类物质,增强发酵大米的生物活性。同时,米曲霉发酵能产生曲酸,曲酸是米曲霉的次级代谢产物。所以,发酵大米的各项活性随着时间的增加而增强。

酪氨酸酶的活性中心含两个铜离子,若发酵大米中的活性物质具有金属螯合能力,络合酪氨酸酶中的铜离子,则酶活就会被影响,从而减弱酪氨酸酶引起的不良感官现象。从图1可知,A.oryzae发酵大米的金属螯合能力从第3 d开始略高于A.soji所发酵的大米。在整个发酵过程中,A.oryzae发酵大米的多酚氧化酶抑制作用明显优于A.soji。因为发酵大米中的活性物质基本上为抗氧化物质,如曲酸、阿魏酸、香草酸、香豆酸、紫丁香酸<sup>[5-8]</sup>,所以采用总酚含量与氧自由基吸收能力实验评价发酵大米中活性物质的含量及其抗氧化性。两种米曲霉发酵大米的总酚含量没有较大差异,但在氧自由基吸收能力上采用A.oryzae发酵明显优于A.soji。因此,选取A.oryzae发酵4 d的大米进行蘑菇酪氨酸酶和虾黑变抑制实验。

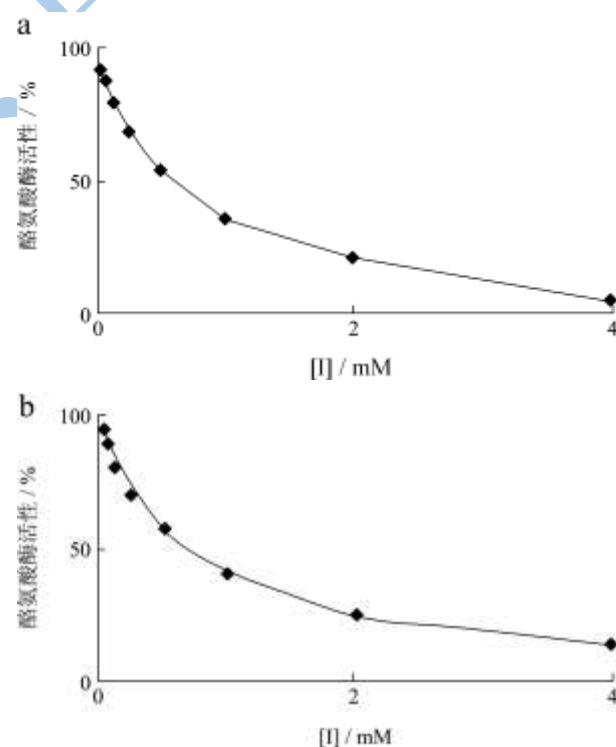


图2 不同浓度米曲霉发酵提取物(a)及曲酸(b)对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用

Fig.2 Tyrosinase inhibitory activity of fermented rice extract (a) and kojic acid (b) with different concentrations



2.2 米曲霉发酵大米中活性物质的酪氨酸酶抑制作用

曲酸能有效地抑制酪氨酸酶的氧化作用，可用于新鲜水果、蔬菜和甲壳类产品的保色护鲜<sup>[2,12]</sup>，故选取曲酸与米曲霉发酵大米进行对比实验。由图 2 可知，*A. Oryzae* 发酵大米提取物与曲酸都具有抑制蘑菇酪氨酸酶活性的作用，并呈剂量依赖关系。发酵大米提取物与曲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.622 mM 和 0.711 mM，见表 1。根据两者 IC<sub>50</sub> 的比较可以看出发酵大米提取物的抑制作用优于曲酸。

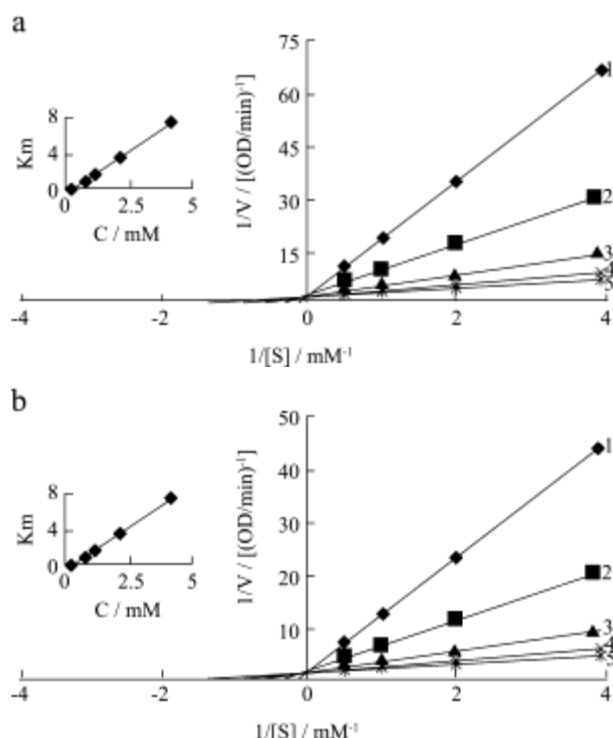


图 3 米曲霉发酵提取物 (a) 及曲酸 (b) 对蘑菇酪氨酸酶抑制作用

Fig.3 Lineweaver-Burk plots for inhibitory activity of fermented rice extract and kojic acid on M-PPO

注：(a)与(b)中直线 1~5 依次为 4 mM、2 mM、1 mM、0.5 mM 和 0 mM 米曲霉发酵提取物或曲酸所对应的双倒数图。

图 3 中不同浓度的发酵大米提取物/曲酸所对应的曲线交于 1/V 轴的同一点，故判断发酵大米提取物与曲酸在此酶促反应中属于竞争性抑制物，说明发酵大米提取物与曲酸只是与游离的酶结合，而不是与酶-底物复合物结合。因此，发酵大米提取物与曲酸可能是通过与底物 L-多巴竞争结合酪氨酸酶活性位点的铜原子来实现其对酪氨酸酶催化 L-多巴氧化反应的抑制作用。

根据图 3 和米氏方程  $V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$  计算得出：蘑菇酪氨酸酶催化 L-多巴氧化反应的米氏常数  $K_m$  为 0.145 mM，酶被底物饱和时的反应速度  $V_{max}$

为 524 U/min，见表 1。

表 1 米曲霉发酵提取物及曲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of fermented rice extract and kojic acid inhibition on M-PPO

项目	米曲霉发酵提取物	曲酸
IC <sub>50</sub> /mM	0.622	0.711
K <sub>m</sub> /mM	0.145	
V <sub>max</sub> /(U/min)	524	
抑制类型	竞争性	
K <sub>i</sub> /mM	0.03	0.104

由不同浓度发酵大米提取物（曲酸）所对应曲线的表现米氏常数（ $K_{mapp}$ ）对浓度作图并根据  $K_{mapp} = K_m(1 + [I]/K_i)$  计算得出发酵大米提取物（曲酸）的抑制常数  $K_i$ ，见表 1。 $K_i$  值代表抑制物达到抑制作用的浓度。发酵大米提取物（曲酸）的  $K_i$  值为 0.03 mM，小于曲酸的 0.104 mM，即 0.03 mM 的发酵大米提取物就能达到 0.104 mM 曲酸具有的蘑菇酪氨酸酶抑制作用。由此可见，发酵大米提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用强于曲酸，与 IC<sub>50</sub> 值的结论相符。

2.3 米曲霉发酵大米对虾黑变的抑制作用

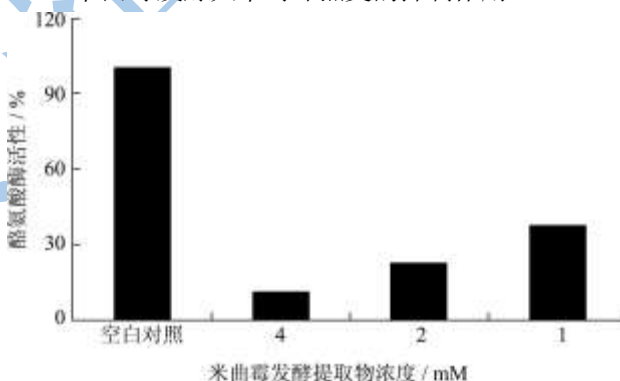


图 4 米曲霉发酵提取物对虾血淋巴中酪氨酸酶的抑制作用

Fig.4 Inhibitory activity of fermented rice extract on tyrosinase in shrimp hemolymph

在虾血淋巴中酪氨酸酶的抑制实验中，空白对照组采用甲醇代替发酵大米提取溶液，并以它反应后的吸光值作为 100% 酶活所能达到的反应程度，所以将空白对照组在 490 nm 下的吸光值所对应的酶活视为 100%。由图 4 可知，发酵大米提取物能有效地抑制虾血淋巴褐变。其抑制作用呈浓度依赖关系，1、2、4 mM（没食子当量）发酵大米提取物将虾血淋巴中酪氨酸酶酶活分别抑制至 37.2%、22.2% 和 10.8%。

米曲霉发酵大米直接应用于虾类保藏的结果见图 5。对照组（自来水浸泡）的虾不论是虾头和虾尾都出现黑变现象；而实验组（米曲霉发酵大米浸泡）的虾色泽鲜嫩，无黑变现象。由图 5 可知，米曲霉发

酵大米对虾在保藏过程中的黑变具有很好的抑制作用。

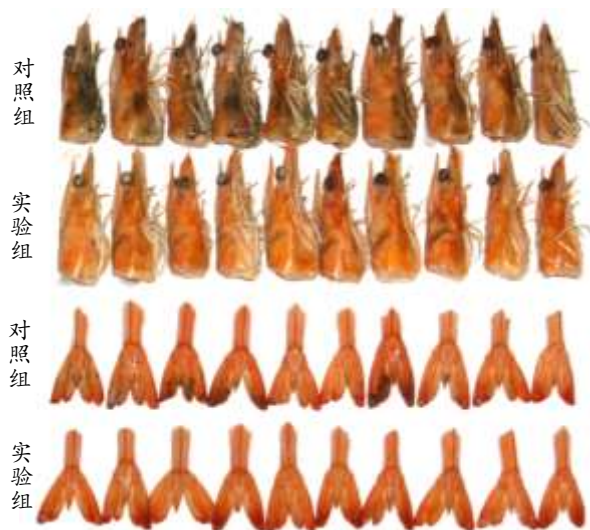


图5 米曲霉发酵提取物对虾黑变的抑制作用

Fig.5 Inhibitory effect of the fermented rice extract on melanosis of shrimp

### 3 结论

3.1 通过对不同发酵天数不同米曲霉菌种发酵大米的金属螯合能力、多酚氧化酶的抑制作用、总酚含量和氧自由基吸收能力的比较,得出最佳的发酵天数为4 d, *A. oryzae* 发酵效果优于 *A. soji*。由 Lineweaver-Burk 双倒数法结果可知,米曲霉发酵大米提取物对酪氨酸酶的抑制作用为竞争性抑制,其可能的抑制机理为与底物 L-多巴竞争结合酪氨酸酶活性位点的铜原子,从而抑制 L-多巴的氧化反应。另外,米曲霉发酵大米提取物对虾血淋巴中酪氨酸酶的抑制作用以及发酵大米抑制虾黑变的直接应用都证明了米曲霉发酵大米中含有抑制酪氨酸酶的有效成分。

3.2 对于酪氨酸酶抑制剂在食品中的应用,抑制剂的安全性是首要考虑的因素。从天然产物中获得有效的酪氨酸酶抑制剂一直备受青睐。因此,由米曲霉发酵大米获得活性物质并应用于甲壳类海产的保藏具有很大的发展前景。除大米之外,还可将米曲霉用于发酵农业残余,如米糠、麸皮等。这类原料中含有更高的活性物质,并且原料成本低,从而大大提高生产的经济效益。

### 参考文献

- [1] Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López J N, García-Cánovas F, et al. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, 1247(1): 1-11
- [2] 朱秀容,康建平.曲酸的生产现状及其在食品与日化工业的应用[J].*四川食品与发酵*,2002,38(112):26-29
- [3] 李娜,鲁晓翔.酪氨酸酶抑制剂的进展[J].*食品工业科技*,2010,31(7):406-409
- [4] 聂丽娟.米曲霉菌次生代谢产物研究[D].武汉:华中科技大学药物化学,2009
- [5] Gong S, Cheng J, Yang Z. Inhibitory effect of ferulic acid on oxidation of L-DOPA catalyzed by mushroom tyrosinase [J]. *Chinese J. Chem. Eng.*, 2005, 13(6): 771-775
- [6] Miyazawa M, Oshima T, Koshio K, et al. Tyrosinase inhibitor from black rice bran [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 6953-6956
- [7] Haghbeen K, Tan E W. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates [J]. *Anal. Biochem.*, 2003, 312: 23-32
- [8] Wang H, Chou Y, Hong Z. et al. Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties [J]. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, 2011, 42: 204-211
- [9] Decker E, Welch A B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38: 674-677
- [10] Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(16): 4437-4444
- [11] Chen Q, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 4108-4112
- [12] 金一琼,陈周谭,赖富饶,等.曲酸与阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用研究[J].*现代食品科技*,2012,,28(4):378-381
- [13] Xie L, Chen Q, Huang H, et al. Inhibitory effects of cupferron on the monophenolase and diphenolase activity of mushroom tyrosinase [J]. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003, 35: 1658-1666