

米曲霉大米发酵提取物抗氧化活性的比较研究

陈周潭, 金一琼, 吴晖, 赖富饶

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 用米曲霉发酵后的大米, 其提取物是一种非常有效的天然抗氧化剂, 具有清除自由基, 金属整合的效果。提取物中含有多种成分, 其中最具有生物活性的成分是酚类物质。本文通过测定大米发酵过程中的淀粉酶、纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶三种酶的活性和自由基清除能力、还原能力、金属整合能力、总酚含量, 比较购于日本的 *Aspergillus oryzae* M-1、*Aspergillus oryzae* MC-01、*Aspergillus oryzae* SP-01、*Aspergillus soji*。最后选取其发酵提取物总酚含量 9.60 mg/g 的 *Aspergillus soji* 用于进一步实验。

关键词: 米曲霉; 酶活性; 自由基清除; 还原能力; 金属整合能力; 总酚

文章编号: 1673-9078(2012)6-643-646

Comparative Antioxidant Activity of the Extracts from the Rice

Fermented by *Aspergillus Oryzae* Strains

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

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

Abstract: The extracts from *Aspergillus oryzae* (*A.oryzae*), a common commercial fungus, are considered as natural antioxidants. To comparing the bioactivity of the extracts from fermented rice by four kinds of *A.oryzae* strains (*A.oryzae* M-1, *A.oryzae* MC-01, *A.oryzae* SP-01 and *A. soji*), the enzymatic activities of α -Amylase, cellulase and β -Glucosidase in the extracts were analyzed and the DPPH radical scavenging abilities, reducing power, metal chelating activities, and total phenolic contents of the extracts were determined. *A.soji* was chosen as the best strain for further experiment, with which the fermented rice showed the highest phenolic compounds (9.60 mg/g).

Key words: *Aspergillus oryzae*; enzyme; radical scavenging; reducing power; metal chelating; total phenolic

人体内的氧化反应中形成的过量的活性氧和活性分子, 以及由人体内能量代谢, 蛋白质和脂类的分解产生的自由基可以破坏生物分子, 比如 DNA、蛋白质脂类和碳水化合物, 并可以导致各种疾病^[1]。而植物中的抗氧化物质具有还原能力, 自由基清除能力和金属整合能力^[2], 可以保持人体内的氧化物质和抗氧化物质的平衡。

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*), 半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 从梗孢科, 曲霉属真菌中的一种非常常见的商业用菌。在日本, 由于它能产生淀粉酶、纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶, 它被用于工业发酵生产各种产品, 包括日本清酒、酱油和味噌等。在清酒发酵中, 将米曲霉加入已经蒸熟的大米进行发酵, 发酵时间为 5~7 d。它的发酵产物中含有多酚, 其中最有效的可能是阿魏酸, 是非常有效果的天然抗氧化剂。大米发酵的关键点在于制曲, 其实质就是使米曲霉在原料上生

长繁殖, 以分泌大量的淀粉酶、纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶, 制曲的条件直接决定有效酚类物质的产量^[3-4]。

本论文以米曲霉发酵提取物的淀粉酶、纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶三种酶的活性和自由基清除能力、还原能力、金属整合能力、总酚含量为指标比较 4 种购于日本的米曲霉。以期选出最合适的菌种用于后期实验。

1 材料与方法

1.1 材料

市场购买新鲜大米; DPPH, 西格玛公司; 福林酚, 健阳生物科技有限公司; DNS, 天津富宇精细化工有限公司; 对硝基酚- β -葡萄糖苷, 菲洛泰购于阿拉丁公司。

1.2 菌种

Aspergillus oryzae M-1、*Aspergillus oryzae* MC-01、*Aspergillus oryzae* SP-01、*Aspergillus soji* 购于日本酿造工业株式会社。

1.3 仪器

XW-80A 漩涡混合器, 上海精科实业有限公司; KDC-40 离心机, 科大创新股份有限公司; FA2204B

收稿日期: 2011-07-18

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NECT-06-0746)

作者简介: 陈周潭 (1988-), 男, 硕士研究生, 从事食品质量与安全研究

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 从事食品质量与安全研究

电子天平,上海精科;Spectrumlab 752s 紫外分光光度计,上海分析仪器总厂;YJ308G 美的电饭锅。

1.4 试验方法

1.4.1 发酵大米酶提取液的制备

原材料预处理:将大米用水冲洗多次,加水浸泡48 h 至大米达到无硬芯。

煮熟:将浸泡好的大米放入电饭锅中煮至大米熟而不粘。

制曲:煮熟的大米平均分装至4个容器中,并放入相同重量的4种不同米曲霉并混匀。置于37℃,96%湿度下培养。培养6 d,并分别取0~6 d共7份样,取出的样放入-20℃的冰箱中保存。

制备酶提取液:将上述样品放入容器中,加入磷酸缓冲溶液(100 mM, pH 7.0) (1:10, *m/V*)。均质3 min后,4200 r/min 离心分离5 min,取上清液,用于酶活性测定。

1.4.2 酶活性的测定

α -淀粉酶活性的测定:取0.5 mL的酶提取液,加入0.5 mL溶于0.05 mM pH 4.8柠檬酸缓冲液中的可溶性淀粉(2%, *m/V*),50℃水浴加热20 min后,加入1 mL DNS终止反应,并沸水浴加热10 min。冷却后,加入5倍的蒸馏水稀释,于540 nm处测定其吸光度。酶活力单位是每分钟内生成1 μmol D-葡萄糖的所需的酶量为一个酶活力单位^[5]。

纤维素酶的测定:采用Mandels方法测定^[6],取0.5 mL的酶提取液,加入1 mL 0.05 M pH 4.8的柠檬酸缓冲溶液,并加入1 cm \times 6 cm的用玻璃棒卷成漩涡状的滤纸条,在50℃下存放60 min。加入1 mL DNS停止反应,并将上清液取出后沸水浴加热5 min,冷却后,加入5倍蒸馏水并用紫外分光光度计在540 nm下测定。酶活力单位是每分钟内生成1 μmol 葡萄糖的所需的酶量为一个酶活力单位。

β -葡萄糖苷酶的测定^[7]:取0.5 mL酶提取液,加入含有1 mL 5 mM对硝基酚- β -葡萄糖苷乙酸缓冲溶液(100 mM, pH 5.0)。在50℃下存放30 min。加入2 mL 1 M Na₂CO₃终止反应,于400 nm处测定其吸光值。酶活力单位是每分钟内生成1 μmol 对硝基苯酚的所需的酶量为一个酶活力单位。

1.4.3 大米发酵提取液的制备

按照Liyana-Pathirana and Shahidi^[8]的方法,将发酵后的大米放入60℃的烘箱中干燥,并在室温下用正己烷去除脂肪。室温中风干过夜后,用54%的乙醇抽提,过滤液即大米发酵提取液。

1.4.4 自由基清除、还原、金属螯合能力和总酚含量的测定

DPPH自由基去除能力的测定^[9]:取0.5 mL的发酵提取液,加入0.5 mL的100 μM DPPH甲醇溶液,0.5 mL的去离子水,混匀后,保存15 min,于517 nm处测定其吸光值。

还原能力的测定^[10]:取1 mL的发酵提取液,加入1 mL 1%铁氰化钾,混合物在50℃下保存20 min,再加入1 mL 10% (*m/V*)的三氯乙酸溶液,混合均匀。最后加入0.1%的三氯化铁溶液,并在700 nm下测定吸光度。

金属螯合能力的测定^[11]:取0.1 mL的发酵提取液,加入4.9 mL的乙醇、0.1 mL 2 mM FeCl₂和0.2 mL 5 mM 菲洛素。混合均匀后在室温下保存10 min,于562 nm处测定吸光值。

$$\text{抑制率}(\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

式中: A₀空白蒸馏水对照组的吸光度; A₁样品的吸光度。

总酚含量的测定^[12]:总酚含量的测定依照Emmons and Peterson的方法做了适当改变,在0.5 mL的上述提取液中加入0.2 mL的福林酚,并保存10 min。然后加入2 mL 7%的Na₂CO₃溶液,混合均匀后,室温下保存15 min,于750 nm处测定其吸光值。用标准没食子酸作标准曲线,结果以没食子酸的等效的微克数表示。

2 结果与分析

米曲霉是一种好氧的微生物,在生长的过程中能够分泌多种酶类,其中含有丰富的糖化酶和淀粉酶。在酿酒的过程中主要是利用米曲霉分解淀粉的能力,将原料中的淀粉转化为葡萄糖^[13],因此,原料分解很大程度上依赖于酶活力的高低,并可以依靠酶的活性比较,来判断米曲霉发酵的优劣。

自由基清除能力,金属螯合能力,还原能力这三种能力的比较,是其发酵提取物的主要生物学功能性比较。而酚类物质是其最主要的生物活性物质,因此,比较总酚含量尤其重要。

2.1 三种酶的活性比较

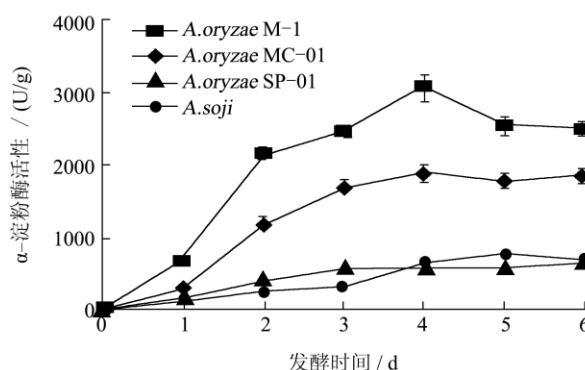


图1 大米发酵过程中 α -淀粉酶活性的变化

Fig.1 The α -amylase activity of the fermented rice

图1 是大米发酵过程中 α -淀粉酶随着发酵天数增

加的活性变化。由图中可以看出，前期酶提取液中的 α -淀粉酶活性随发酵天数增加而增强，到第4 d时几乎都达至最大活性。其中M-1的酶提取液 α -淀粉酶活性最高，SP-01其次，*A. soji*和MC-01的酶提取液 α -淀粉酶活性相近。

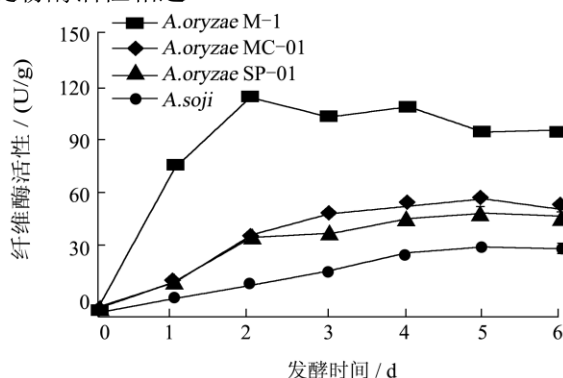


图2 大米发酵过程中纤维素酶活性的变化

Fig.2 The cellulase activity of fermented rice

图2中是大米发酵中纤维素酶随着发酵天数增加的活性变化。由图中可以看出，前期酶提取液中的纤维素酶活性随发酵天数增加而增强，到第4、5 d时达至最大活性。其中M-1的酶提取液纤维素酶活性最高，*A. soji*最低，SP-01和MC-01的酶提取液纤维素酶活性相近。

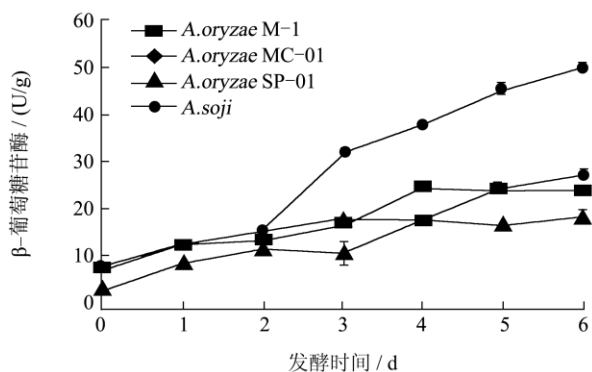


图3 大米发酵过程中 β -葡萄糖苷酶的活性变化

Fig.3 The β -Glucosidase activities of the fermented rice

图3是大米发酵中 β -葡萄糖苷酶随着发酵天数增加的活性变化。由图3可以看出，除了*A. soji*，其他3种米曲霉的酶提取液中的 β -葡萄糖苷酶活性随发酵天数增加而增强。其中*A. soji*酶提取液 β -葡萄糖苷酶活性最高，其他3种米曲霉 β -葡萄糖苷酶活性相近。

2.2 自由基清除能力的比较

图4是大米发酵过程中自由基清除能力随着发酵天数增加发生的变化。4种米曲霉的大米发酵提取物的自由基清除能力在前期都随着发酵天数的增加而增强，发酵4-5 d时达到最强。其中*A. soji*发酵提取物的自由基清除能力最强，MC-01和SP-01发酵提取物的自由基清除能力相近，而M-1发酵提取物自由基清

除能力最低。

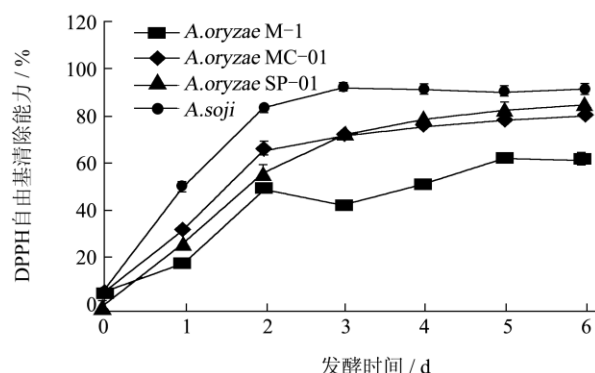


图4 大米发酵过程自由基清除能力的变化

Fig.4 The DPPH radical scavenging abilities of the fermented rice

2.3 还原能力比较

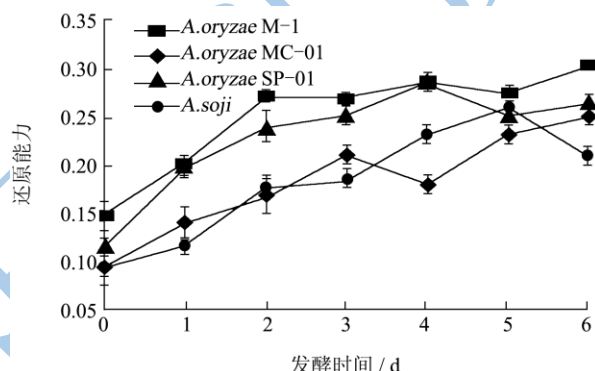


图5 是大米发酵过程中还原能力的变化

Fig.5 The reducing power of the fermented rice

图5是大米发酵过程中还原能力随着发酵天数增加发生的变化。除了*A. soji*的发酵提取物还原能力在第四天达到最强，并在后期减弱外，其他3种米曲霉在第6 d达到最强还原性。其中M-1的发酵提取物还原能力最强，*A. soji*次之，MC-01和SP-01发酵提取物的还原能力相近。

2.4 金属螯合能力比较

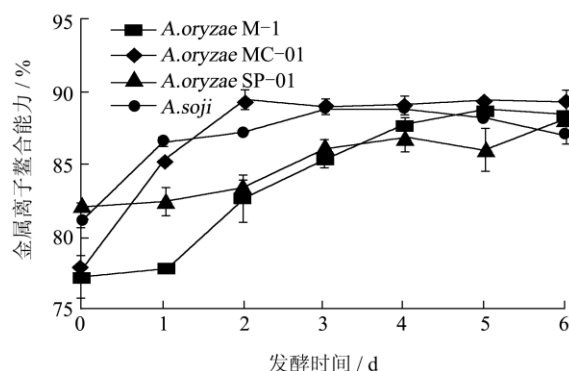


图6 是大米发酵过程中金属螯合能力的变化

Fig.6 The metal chelating abilities of the fermented rice

图6是大米发酵过程中金属螯合能力随着发酵天数增加发生的变化。4种米曲霉的大米发酵提取物的

金属螯合能力都在发酵 3、4 d 的时候, 达到最强的金属离子螯合能力, 各提取物的金属离子螯合能力相近。

2.5 总酚含量的比较

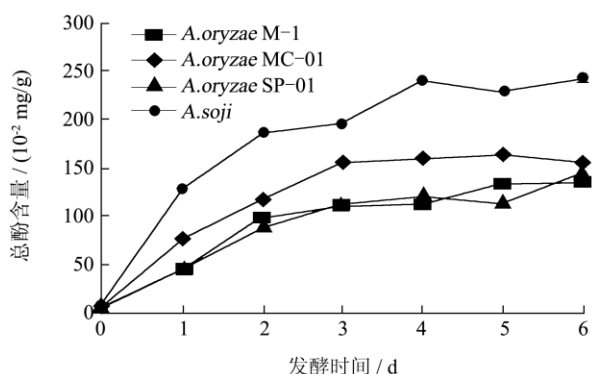


图 7 是大米发酵过程中总酚含量的变化

Fig.7 The total phenol contents of the fermentation rice

图 7 是大米发酵过程中总酚含量随着发酵天数增加发生的变化。4 种米曲霉的大米发酵提取物的总酚含量在前期都随着发酵天数的增加而增加, 发酵 4 d 时达到最强。其中 *A. soji* 发酵提取物的总酚含量远高于其他 3 种, MC-01、SP-01 和 M-1 的发酵提取物总酚含量相近。

3 讨论

大米固体发酵提取物中, 最具有生物活性功能的是酚类物质, 同时后期实验需要研究其提取物对自由基破坏 DNA 的抑制作用。因此, 米曲霉的自由基清除能力具有非常重要的意义, 选择自由基清除能力高达 91.3% 和总酚含量 9.60 mg/g *A. soji* 作为下阶段实验的发酵菌。同时, 由于各项指标基本能在发酵第 4 d 达到一个较高水平, 所以将发酵时间确定为 4 d。在下一阶段的实验中, 该项目将以阿魏酸和曲酸作为参照, 测定 *A. soji* 的大米发酵提取物的氧自由基吸收能力, 并深入研究其 β -胡萝卜素漂白抑制能力, 对虾体变黑的抑制作用, 以及对超螺旋质粒 DNA 的保护作用。

参考文献

[1] Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health.

Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans [J]. Free Rad. Res., 1996, 25: 57-74

[2] Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids [J]. Free Rad. Biol. Med., 1996, 20: 933-956

[3] Tomohide Uno, Atsushi Itoh, Tetsuya Miyamoto, Masaharu Kubo Ferulic Acid Production in the Brewing of Rice Wine [J]. J.Inst.Brew., 2009, 115(2): 116-121

[4] 刘颖,王佳瑞,刘婧美,等.米曲霉制备高蛋白酶活力酱曲工艺探讨[J].现代食品科技,2009,25(9):1049-1051

[5] 朱广廉,钟海文,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京大学出版社,1990

[6] 高培基.纤维素酶滤纸酶活测定方法的改进[J].植物生理学通讯,1986,14(2):46-48

[7] Shoseyov O, Bravdo B, Ikan, et al. Endo- β -glycosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glycol-side-containing medium [J]. Phytochemistry, 1988, 27: 1973-1976

[8] Liyana-Pathirana, Shahidi. Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice [J]. Food Chemistry, 2006, 1: 121-128

[9] 姚增玉.山杏种皮黑色素提取及其性质研究[D].西北农林科技大学博士学位论文,2007

[10] Isabel C F R Ferreira, Paula Baptista. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity [J]. Food Chemistry 2007, 100: 1511-1516

[11] Anup Srivastava, Shereen R Harish. Antioxidant activity of the roots of *Decalepis hamiltonii* [J]. LWT 2006, 39: 1059-1065

[12] 宋薇薇,焦士蓉,周佳,等.石榴皮多酚的微波辅助提取及提取物抗氧化与抑菌作用研究[J].现代食品科技,2008,24(1): 23-27

[13] 谢善慈.酿酒用米曲霉酶活特性研[J].中国酿造,2009,3: 132-134