

泡盛曲霉发酵麦麸过程中酚类物质含量的变化与三种酶活性的相关性

杜小燕¹, 吴晖¹, 赵超敏², 闵甜¹, 唐语谦¹, 李晓凤¹, 赖富饶¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: 本研究以小麦麦麸为原料, 分别采用 3 株泡盛曲霉 (分别为 GIM3.266, GIM3.4, GIM3.5) 进行连续 8 天的固态发酵, 每天分别提取发酵过程中小麦麦麸中不同存在形态酚类物质并测定其含量, 同时, 每天测定 3 株泡盛曲霉在发酵过程中木聚糖酶、纤维素酶以及阿魏酸酯酶的活性变化。结果表明, 与未经发酵的麦麸相比, 经泡盛曲霉发酵后的麦麸游离型酚类物质的含量显著增加, 总酚含量可高达 11561.30 $\mu\text{g/g}$ 麸皮, 比发酵前的麸皮总酚提高了 169%; 另外, 酶活力的结果表明: 纤维素酶活力在发酵前三天显著增大, 其活力最高可达 156.70 U, 木聚糖酶活力随总酚释放量的增加而增加, 最高可达 34123.00 U, 阿魏酸酯酶活力在发酵中后期达到顶峰, 最高可达 2642.60 U。总体而言, 麦麸发酵过程中酚类物质的释放量与木聚糖酶和阿魏酸酯酶的酶活力呈正相关, 说明发酵后麦麸中酚类物质提取量的显著增加与这两种酶密切相关, 这两种酶活力高的泡盛曲霉菌株, 更有利于释放麦麸中的酚类物质。

关键词: 泡盛曲霉; 小麦麦麸; 酚类物质; 木聚糖酶; 纤维素酶; 阿魏酸酯酶

文章编号: 1673-9078(2015)4-69-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.012

Correlations between Phenolic Compounds Contents in Wheat Bran Fermented by *Aspergillus Awamori* and Three Types of Enzyme Activities

DU Xiao-yan¹, WU Hui¹, ZHAO Chao-min², MIN Tian¹, TANG Yu-qian¹, LI Xiao-feng¹, LAI Fu-rao¹

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

(2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: In the present study, solid state fermentation of wheat bran was performed by three *Aspergillus awamori* strains (GIM3.266, GIM3.4, GIM3.5, respectively) at 28°C for 8 days consecutively. Different forms of phenols in wheat bran were extracted and analyzed using the Folin-Ciocaltey method on a daily basis. The activities of xylanase, cellulase, and feruloyl esterase were also investigated during the fermentation process. It was showed that the contents of free phenolic compounds increased sharply after fermentation. The total phenolic content could reach 11561.30 $\mu\text{g/g}$ wheat bran, increasing by 169% than the unfermented wheat bran. Besides, it was found that the activity of cellulose and xylanase increased during the early stage of fermentation, peaking at 156.70 U and 34123.00 U respectively. The activity of feruloyl esterase could reach a peak of 2642.60 U in the middle and later periods. In general, positive correlations were found between the contents of phenolic compounds and the activities of xylanase and feruloyl esterase, revealing that synergistic effects of these two enzymes during fermentation can lead to higher contents of phenolic compounds.

Key words: *Aspergillus awamori*; wheat bran; phenolic compounds; xylanase; cellulose; feruloyl esterase

小麦是世界上种植面积最广的作物之一, 产量约

收稿日期: 2014-09-22

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资助项目 (2013ZM0065); 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室开放基金资助项目 (201304) 广东省高等学校科技创新重点项目 (2012GXZD0009); 国家自然科学基金项目 (31201330); 广州市科技攻关项目 (201300000202)

作者简介: 杜小燕 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与天然产物化学

通讯作者: 赖富饶 (1981-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物化学;

吴晖 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与天然产物化学

占粮食总产量的 22%^[1]。小麦麸皮是小麦加工制粉过程中提取胚芽和胚乳后的残留部分, 因其粗纤维含量高, 食感较差而作为面粉加工的主要副产物。由于我国小麦年产量高, 小麦麸皮的年产量可达 2000 万 t 以上, 但是一直以来对于麸皮的开发利用较少, 基本上仅作为饲料原料而加以利用^[2]。

小麦麸皮中含有一定数量的酚酸类物质, 如阿魏酸、p-香豆酸、咖啡酸、芥子酸和丁香酸等成分, 其中阿魏酸为主要成分, 约为麸皮质量的 0.4~0.7%^[3-5]。目前研究表明, 酚类物质主要以游离型, 结合型和束

缚型等几种形式存在于植物体内^[6-8]。一般来说,游离型和结合型酚类物质为可溶性酚类;束缚型则为不溶性酚类物质,以酯键、糖苷键和醚苷键等形式与其他物质(包括蛋白质、糖类、有机酸等)相结合。近年来,对酚类物质存在形式的研究逐渐成为新的研究热点。目前已有的一些对游离型、酯化型、糖苷型、束缚型酚类物质的提取、测定及抗氧化活性等方面的报道^[9-11]。酚类物质的存在形式与其含量及抗氧化活性有重要关系,束缚型酚类物质不仅其含量远高于游离型和结合型,且其抗氧化活性和抑制 DNA 损伤方面亦要高于其他两种类型。

目前常用于提取植物来源的酚类物质的方法一般有酸碱水解法、超声辅助提取法、微波辅助提取法、酶解法、发酵法。主要目的都是破坏细胞壁纤维成分致密的结构,以使束缚型酚类物质释放出来。然而化学法操作简单、效率高,但后续需要处理提取废液,不利于可持续性发展。

目前已有研究^[12]表明,采用发酵法可以有效释放出植物中的束缚型酚类物质,从而提高总酚的提取率,但对于麦麸中各种酚类物质在发酵过程中的释放情况,以及多种酶的酶活变化规律报道较少。

因此,本研究以小麦麦麸为原料,采用3株泡盛曲霉(分别为 GIM3.266, GIM3.4, GIM3.5)进行连续8天的固态发酵,每天采用 Folin-Ciocalteu 法分别测定发酵过程中小麦麦麸的游离型、酯苷结合型、糖苷共价结合型、碱解束缚型以及酸解束缚型酚类物质的释放量,同时,每天测定3株泡盛曲霉在发酵过程中木聚糖酶、纤维素酶以及阿魏酸酯酶的活力变化情况,从而研究发酵过程中酚类物质的释放量与酶活的相关性。

1 材料与设备

1.1 材料与试剂

小麦麦麸,南方面粉厂;3株泡盛曲霉(分别为 GIM3.266, GIM3.4, GIM3.5),均购自广东省微生物菌种保藏中心;采用 PDA 培养基保藏,青岛高科园海博生物技术有限公司;福林酚试剂(Folin-Ciocalteu)、木聚糖、木糖,分析纯,上海源聚生物科技有限公司;阿魏酸,色谱纯,阿拉丁;甲醇、乙酸乙酯、乙醇、冰乙酸,分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;丙酮、乙醚、盐酸,分析纯,广州化学试剂厂;氢氧化钠、无水亚硫酸钠、无水乙酸钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、酒石酸钾钠,分析纯,天津市福晨化学试剂厂;没食子酸、无水碳酸钠、苯酚、羧甲基

纤维素钠、无水葡萄糖,分析纯,天津市大茂化学试剂厂;DNS(3,5-二硝基水杨酸),分析纯,上海科丰化学试剂有限公司;硫酸铵,分析纯,台山市粤侨试剂塑料有限公司;硫酸铜,分析纯,天津市百世化工有限公司;阿魏酸甲酯,色谱纯,阿法埃莎(天津)化学有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F 洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;LRH-150-S 恒温恒湿培养箱,广东省医疗器械厂;超声细胞破碎机,宁波生物科技有限公司;FA2204B 电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;XW-80A 旋涡振荡器,上海精科实业有限公司;SHZ-D(III)型循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限公司;DLSB-5L125 低温冷却液循环泵,巩义市予华仪器有限公司;RE-52 型旋转蒸发器,上海亚荣系列化仪器厂;JW-3021HR 高速冷冻离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;HH-2 数显恒温水浴锅,金坛市富华仪器有限公司;SHZ-88A 往复式水浴恒温培养振荡器,太仓市实验设备厂;RQ-250DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Spectrumlab 752S 型紫外可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;美的多功能电磁炉,广东美的生活电器制造有限公司;6CE-60F-717P 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

2 实验方法

2.1 泡盛曲霉固体发酵^[13-14]

(1) 发酵培养基配方:斜面培养基为 PDA 培养基;固态培养基的组成为 5 g 麸皮、0.02 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.0115 g CuSO_4 、15 mL 水,混匀后 121 °C 灭菌 20 min,冷却。每株泡盛曲霉各需制备 8 瓶固态培养基。

(2) 接种和培养:无菌条件下,向斜面培养基加入无菌生理盐水,用接种环轻刮斜面,制成孢子悬液,分别向 8 瓶固态培养基中各加入 2 mL 孢子悬液,于 28 °C 静置培养连续 8 天,每天取一瓶固态培养基,观察记录培养基的发酵情况,并进行酚类物质的提取和酶活力的测定。

2.2 五种存在形态酚类物质的提取^[15-17]及测定

2.2.1 游离型酚类物质的提取

发酵好的固态培养基→加入 50 mL 甲醇/丙酮/水混合溶液

(7/7/6, V/V/V, 含 0.1 g 无水亚硫酸钠) → 室温下超声辅助提取 30 min → 4 °C 5000 g 离心 15 min → 重复一次 → 合并离心后的上清 → 35 °C 真空浓缩至 25 mL → 6 mol/L 盐酸调 pH 至 2 → 等体积乙酸乙酯/乙醚 (1/1, V/V) 重复萃取 3 次 → 合并有机相 → 30 °C 下真空浓缩至干 → 纯甲醇复溶 → 定容至 30 mL → 游离型酚类物质 → 4 °C 棕色瓶保存

2.2.2 酯苷结合型酚类物质的提取

萃取后的水相 → 加入 40 mL 4 mol/L 的氢氧化钠和乙醇混合溶液 (2:1, V/V, 含 0.1 g 无水亚硫酸钠) → 室温下避光密封碱解 4 h → 6 mol/L 盐酸调 pH 至 2 → 等体积乙酸乙酯/乙醚 (1/1, V/V) 重复萃取 3 次 → 合并有机相 → 30 °C 下真空浓缩至干 → 纯甲醇复溶 → 定容至 30 mL → 酯苷结合型酚类物质, 4 °C 棕色瓶保存

2.2.3 糖苷结合型酚类物质的提取

萃取后的水相 → 加入 40 mL 6 mol/L 的盐酸溶液 → 85 °C 水浴水解 30 min → 冷却 → 等体积乙酸乙酯/乙醚 (1/1, V/V) 重复萃取 3 次 → 合并有机相 → 30 °C 下真空浓缩至干 → 纯甲醇复溶 → 定容至 30 mL → 糖苷结合型酚类物质 → 4 °C 棕色瓶保存

2.2.4 碱解束缚型酚类物质的提取

离心后的沉淀 → 加入 40 mL 4 mol/L 的氢氧化钠和乙醇混合溶液 (2:1, V/V, 含 0.1 g 无水亚硫酸钠) → 室温下避光密封碱解 4 h → 4 °C 5000 g 离心 15 min → 上清液用 6 mol/L 盐酸调 pH 至 2 → 等体积乙酸乙酯/乙醚 (1/1, V/V) 重复萃取 3 次 → 合并有机相 → 30 °C 下真空浓缩至干 → 纯甲醇复溶 → 定容至 30 mL → 碱解束缚型酚类物质, 4 °C 棕色瓶保存

2.2.5 酸解束缚型酚类物质的提取

离心后的沉淀 → 加入 40 mL 6 mol/L 的盐酸溶液 → 85 °C 水浴水解 30 min → 冷却 → 4 °C 5000 g 离心 15 min → 上清液用等体积乙酸乙酯/乙醚 (1/1, V/V) 重复萃取 3 次 → 合并有机相 → 30 °C 下真空浓缩至干 → 纯甲醇复溶 → 定容至 30 mL → 酸解束缚型酚类物质 → 4 °C 棕色瓶保存

2.2.6 酚类物质含量的测定

各种存在形态酚类物质的含量采用 Foiln-Ciocalteu 法(用没食子酸作标准物)来测定。

(1) 总酚标准曲线的制作: 用甲醇配制一系列浓度梯度的没食子酸溶液 → 分别取 100 μL 上述标准液 → 各加入 300 μL 水 → 150 μL 的福林试剂 → 450 μL 质量分数 20% Na₂CO₃ 溶液 → 充分振荡 → 室温下避光静置 30 min → 在 760 nm 处测量吸光度

以没食子酸浓度为横坐标(μg/mL), 以吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 建立回归方程: $y=0.013x+0.020$, $R^2=0.998$ 。

(2) 样品的测定: 分别取 100 μL 经过适当稀释的酚类物质, 按上述方法测定各种存在形态酚类物质的含量, 每组平行测量三次。

2.3 酶液的制备

发酵好的固态培养基 → 加入 60 mL 去离子水 → 30 °C 180 r/min 水浴摇床浸提 1 h → 8 层纱布过滤 → 滤液于 4 °C 1000 r/min 离心 15 min → 上清液定容至 100 mL → 4 °C 储存

2.4 三种酶活力的测定

2.4.1 木聚糖酶活力

参考 GB/T 23874-2009^[18]的方法, 配制所需试剂和溶液, 制作木糖标准曲线, 以 100 mg/mL 木聚糖溶液为酶反应底物, 测定酶液的木聚糖酶活力。

(1) 酶活力单位的定义: 在 37 °C, pH 5.5 的条件下, 每小时从浓度为 100 mg/mL 木聚糖溶液中降解释放 1 μmol 木糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

(2) 木糖标准曲线的制作: 用 pH 5.5 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲溶液配制一系列浓度梯度的木糖标准溶液。以木糖浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $y=2.134x-0.161$, $R^2=0.999$ 。

(3) 木聚糖酶活力的计算: 试验管减去灭活对照管的吸光值, 其差值根据木糖标准曲线得到木糖含量, 并乘以稀释倍数, 除以木糖分子量和时间, 得木聚糖酶活力。每个样品同时作 2~3 个不同稀释倍数的梯度, 每个梯度同时作两支平行试管

2.4.2 纤维素酶活力

参考 NY/T 912-2004^[19]的方法, 配制所需试剂和溶液, 制作葡萄糖标准曲线, 以 4 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶液为酶反应底物, 测定酶液的纤维素酶活力。

(1) 纤维素酶活力单位的定义: 在 40 °C, pH 4.8 的条件下, 每小时从浓度为 4 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶液降解释放 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

(2) 葡萄糖标准曲线的制作: 用 pH 4.8 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液配制一系列浓度梯度的葡萄糖标准液, 以所得吸光值为纵坐标, 以对应的葡萄糖标准液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $y=0.003x-0.205$, $R^2=0.998$ 。

(3) 纤维素酶活力的计算: 试验管减去灭活对照管的吸光值, 其差值根据葡萄糖标准曲线得到葡萄糖含量, 并乘以稀释倍数, 除以葡萄糖分子量和时间, 得纤维素酶的酶活力。每个样品同时作 2~3 个不同稀释倍数的梯度, 每个梯度同时作两支平行试管。

2.4.3 阿魏酸酯酶活力

参考 Xie Chun-yan^[20]的方法, 配制所需试剂和溶液, 制作阿魏酸标准曲线, 以 50 mmol/L 的阿魏酸甲酯溶液为酶反应底物, 测定酶液的阿魏酸酯酶活力。

(1) 阿魏酸酯酶活力单位的定义: 在 pH 6.0, 40 °C 条件下, 每小时酶解阿魏酸甲酯生成 1 μmol 阿魏酸所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

(1) 阿魏酸标准曲线制作: 用纯甲醇配制一系列浓度梯度的阿魏酸标准溶液, 采用高效液相色谱法在 320 nm 测定阿魏酸的含量, 以峰面积为纵坐标, 阿魏酸标准溶液的浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $y=57953x+384.1$, $R^2=0.999$ 。

(2) 阿魏酸酯酶活力: 取经过适当稀释的酶液, 分别设置试验管和灭活对照管, 灭活对照管加入酶液后, 先加入冰乙酸震荡混匀使酶失活, 再分别于试验管和灭活对照管中加入反应底物液, 混匀后 40 °C 水浴反应 30 min, 结束后立即向试验管中加入 0.8 mL 冰乙酸终止反应, 冷却至室温后, 采用高效液相色谱法在 320 nm 测定阿魏酸的含量, 试验管减去对照管的峰面积, 其差值对照阿魏酸标准曲线, 查出阿魏酸含量, 并乘以稀释倍数, 除以阿魏酸分子量和时间, 得到阿魏酸酯酶的酶活力。

(3) 高效液相色谱条件^[21]: 色谱柱为 Venusil XBP C18(L) (4.6×250 mm), 流动相为乙腈: 体积分数 1% 冰乙酸 (20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长 320 nm, 柱温为室温, 进样量 10 μL。

2.4.4 数据分析

每个样品平行测定 3 次, 取平均值, 标准偏差以误差线表示。

3 结果与分析

3.1 麦麸发酵过程中菌种的生长形态

3.1.1 泡盛曲霉 GIM3.266

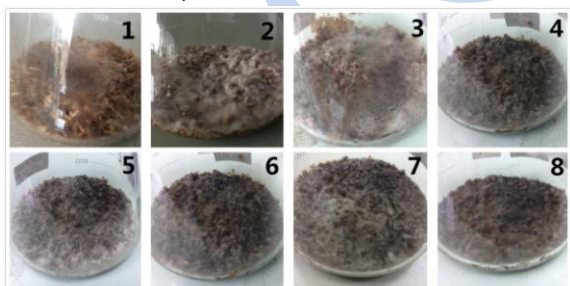


图 1 泡盛曲霉 GIM3.266 的菌丝生长形态

Fig.1 Mycelial propagation of *Aspergillus awamoni* strain GIM3.266

注: 图中右上角的数字表示发酵天数, 下同。

如图 1 所示, 接种泡盛曲霉 GIM3.266 的麦麸在培养 1 天后有细微变化但不明显, 可见少量白色菌丝; 2 天后可以明显观察到麦麸表面长出白色菌丝, 覆盖薄薄的一层, 呈疏松状; 3 天后麦麸表面全部长满了

白色菌丝; 4 天后, 麦麸表面出现深棕色的孢子, 同时依然能观察到稀疏的白色菌丝。随着培养时间的加长, 深棕色孢子越来越多, 麦麸培养基表面被完全覆盖, 底部以及间隙中有少量乳白色液体产生。

3.1.2 泡盛曲霉 GIM3.4

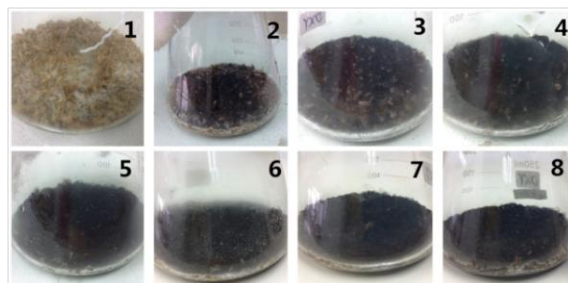


图 2 泡盛曲霉 GIM3.4 的菌丝形态

Fig.2 Mycelial propagation of *Aspergillus awamoni* strain GIM3.4

如图 2 所示, 接种泡盛曲霉 GIM3.4 的麦麸, 菌丝的生长速度很快, 培养 1 天后可明显看到少量白色菌丝覆盖于麦麸表面, 2 天后已产生黑色的孢子, 随着发酵时间的延长, 黑色的孢子越来越多, 逐渐渗透入麦麸培养基内, 泡盛曲霉 GIM3.4 分解麦麸的能力很强, 从第 5 天开始, 孢子已经完全覆盖麦麸的表面, 菌落颜色加深, 菌株把麦麸分解成细小的颗粒。

3.1.3 泡盛曲霉 GIM3.5

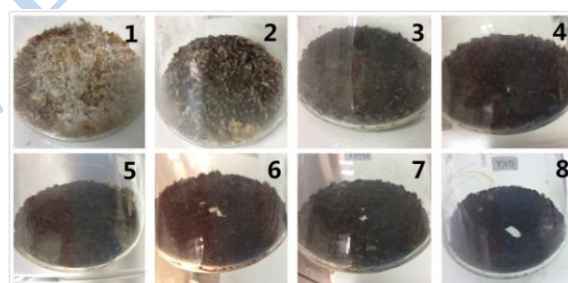


图 3 泡盛曲霉 GIM3.5 的菌丝生长形态

Fig.3 Mycelial propagation of *Aspergillus awamoni* strain GIM3.5

如图 3 所示, 接种泡盛曲霉 GIM3.5 的麦麸发酵情况与 GIM3.4 相似, 培养 1 天后, 能明显看到麦麸上出现很多白色菌丝, 2 天后, 培养基已经出现黑色的孢子, 3 天后, 随着发酵时间的延长, 黑色孢子越来越多, 覆盖整个培养基, 且 GIM3.5 分解麦麸的能力很强, 能把麦麸分解成细小的颗粒。

3.2 发酵前麦麸的 5 种存在形态的酚类物质含量

麦麸发酵前, 5 种存在形态的酚类物质的含量如图 4 所示, 总酚含量为 4298.00 μg/g 麦麸, 高于

Oufnac.D.S.^[22]于2007年报道的采用甲醇和微波辅助提取的总酚含量 467.5 μg/g 麸皮, 高于Jing Wang^[23]于2008年采用超声波辅助提取的总酚含量 3120 μg/g 麸皮, 高于赫杰^[24]于2010年报道的采用化学法释放的总酚含量 3687 μg/g 麸皮, 其中碱解束缚型酚类物质的含量最高, 为 2716.00 μg/mL, 占总酚的 63%, 游离型酚类物质含量为 419.00 μg/mL, 占总酚的 9.75%。

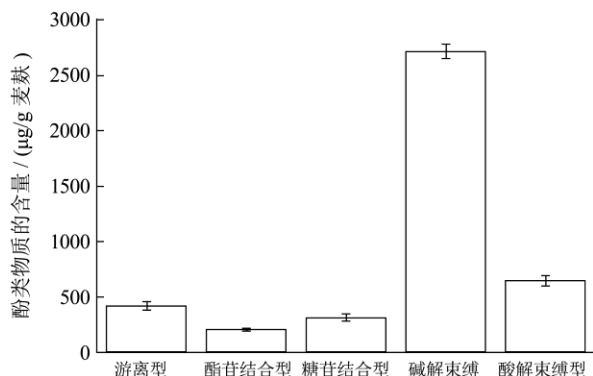


图4 发酵前麦麸的5种存在形态的酚类物质的含量

Fig.4 Contents of five different forms of phenolic components of unfermented wheat bran

3.3 发酵过程中总酚的变化情况

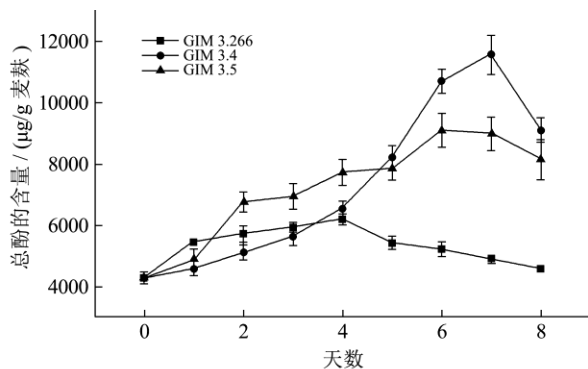


图5 发酵过程总酚含量的变化情况

Fig.5 The contents of total phenolics during the fermentation period

如图5所示, 随着发酵时间的延长, 总酚含量先增加, 再缓慢降低。其中, 泡盛曲霉 GIM3.266 总酚释放量在第四天达到顶峰, 为 6197.20 μg/g 麸皮, 比发酵前的麸皮总酚提高了 44.19%。泡盛曲霉 GIM3.4 总酚释放量在第7天达到顶峰, 为 11561.30 μg/g 麸皮, 比发酵前的麸皮总酚提高了 169%。泡盛曲霉 GIM3.5 总酚释放量在第6天达到顶峰, 为 9109.30 μg/g 麸皮, 比发酵前的麸皮总酚含量增加了 111.95%。综上所述, 总酚释放量最高的是泡盛曲霉 GIM3.4, 其次是泡盛曲霉 GIM3.5, 最低是泡盛曲霉 GIM3.266, 分别比发酵前麦麸的总酚含量增加了 169%、111.95%和 44.19%。

3.4 发酵过程中麦麸5种存在形态的酚类物质的变化情况

3.4.1 泡盛曲霉 GIM3.266

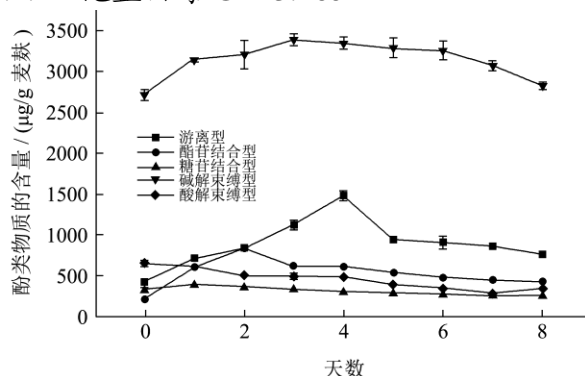


图6 经泡盛曲霉 GIM3.266 发酵后的麦麸中5种存在形态的酚类物质的变化情况

Fig.6 The contents of five different forms of phenolic components of wheat bran fermented by *Aspergillus awamori* strain GIM3.266

如图6所示, 在发酵初期, 游离型酚类物质释放量先逐渐升高, 到第四天达到顶峰, 为 1476.70 μg/g 麸皮, 且其在总酚中所占比例也有相似的变化趋势, 在第四天游离型酚类物质占总酚含量的 23.83%, 然后逐渐降低。束缚型酚类物质的释放量在第三天达到顶峰, 为 3390.00 μg/g 麸皮, 此后随着发酵时间的延长逐渐降低, 酯苷结合型酚类物质和糖苷结合型酚类物质的释放量在发酵的初期都略有增高, 随后缓慢下降。在整个发酵周期, 总酚中碱解束缚型酚类物质所占比例始终最大。

3.4.2 泡盛曲霉 GIM3.4

如图7所示, 随着发酵天数的延长, 游离型酚类物质的释放量迅速增加, 其在总酚中所占比例也有一样的趋势, 从第4.5天起游离型酚类物质的释放量高于束缚型酚类物质, 成为麸皮总酚释放量中所占比例最大的酚类物质, 在第7天游离型酚类物质释放量达到顶峰, 为 6938.50 μg/g 麸皮, 占总酚的 76.16%。酯苷结合型酚类物质释放量在整个发酵周期有略微上升的趋势, 糖苷结合型和酸解束缚型酚类物质释放量变化相对不大。

3.4.3 泡盛曲霉 GIM3.5

如图8所示, 随着麸皮不断发酵, 游离型酚类物质的释放量迅速增加, 其在总酚中所占比例也有类似的趋势, 从第3.5天起游离型酚类物质的释放量高于束缚型酚类物质, 成为麸皮总酚释放量中所占比例最大的酚类物质, 在第7天游离型酚类物质释放量达到

顶峰, 为 4307.70 $\mu\text{g/g}$ 麸皮, 占总酚的 47.93%。酯苷结合型酚类物质在第 2 天释放量最多, 糖苷结合型和酸解束缚型酚类物质释放量变化相对不大。

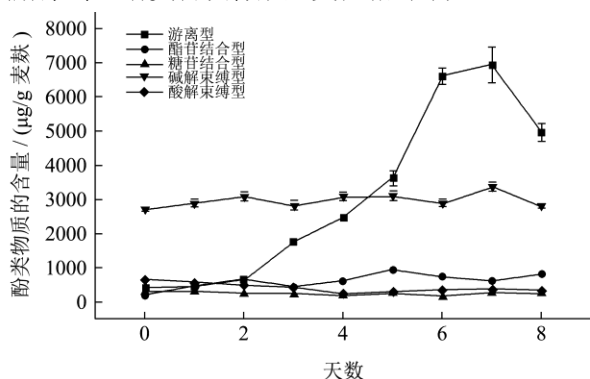


图 7 经泡盛曲霉 GIM3.4 发酵后的麦麸中 5 种存在形态的酚类物质的变化情况

Fig.7 The contents of five different forms of phenolic components of wheat bran fermented by *Aspergillus awamori*

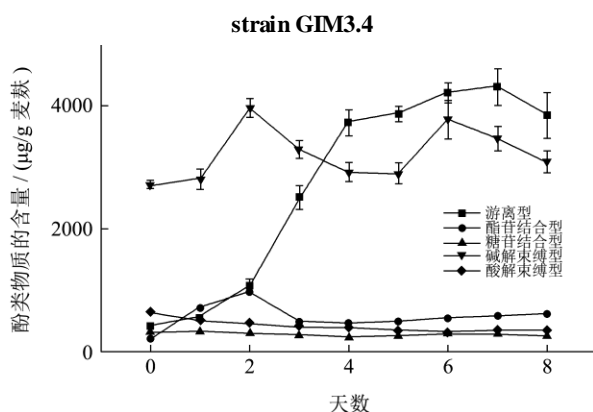


图 8 经泡盛曲霉 GIM3.5 发酵后的麦麸中 5 种存在形态的酚类物质的变化情况

Fig.8 The contents of five different forms of phenolic components of wheat bran fermented by *Aspergillus awamori* strain GIM3.5

3.5 发酵过程中三种酶活力的变化情况

3.5.1 纤维素酶活力

如图 9 所示, 纤维素酶活力的变化趋势都是先增加, 在发酵中期达到顶峰, 然后随着发酵时间的延长, 酶活逐渐降低。纤维素酶活力最高的是泡盛曲霉 GIM3.266, 最高值达 156.70 U, 其纤维素酶酶活力、游离型酚类物质和总酚的释放量都在发酵的第 4 天达到顶峰; 泡盛曲霉 GIM3.4 的纤维素酶活力低于 GIM3.266, 在第三天达到顶峰, 最高值为 137.10 U, 略高于泡盛曲霉 GIM3.5 的最高值 123.60 U。

3.5.2 木聚糖酶活力

如图 10 所示, 这三种泡盛曲霉中, 泡盛曲霉 GIM3.4 的木聚糖酶活力明显高于其余两个菌种, 在第

七天达到顶峰, 最高值为 34123.00 U; 其次是泡盛曲霉 GIM3.5, 其木聚糖酶活力在第三天达到顶峰, 最高值为 2563.30 U, 随后逐渐降低; 泡盛曲霉 GIM3.266 的木聚糖酶活力最低, 在第三天达到顶峰 1069.90 U 后缓慢降低。

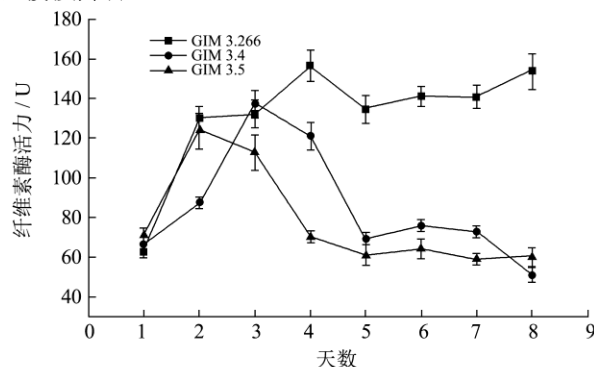


图 9 发酵过程中纤维素酶活力的变化情况

Fig.9 The activity of cellulase during the fermentation process

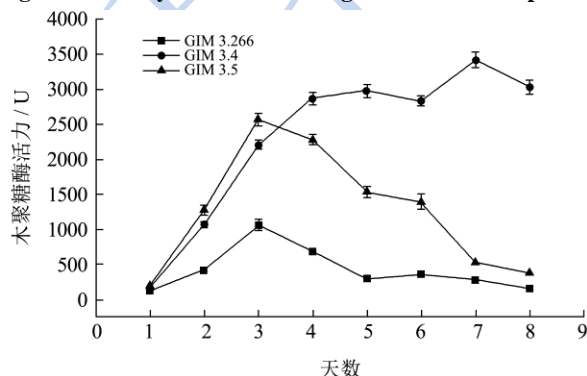


图 10 发酵过程中木聚糖酶活力的变化情况

Fig.10 The activity of xylanase during the fermentation process

3.5.3 阿魏酸酯酶活力

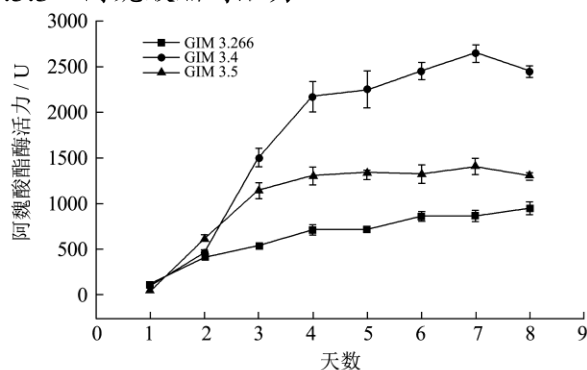


图 11 发酵过程中阿魏酸酯酶酶活的变化情况

Fig.11 The activity of feruloyl esterase during the fermentation process

如图 11 所示, 这三种泡盛曲霉的阿魏酸酯酶活力的变化趋势相似, 在发酵初期, 阿魏酸酯酶活力迅速增加, 从发酵第四天起, 酶活力缓慢增加, 渐趋稳定。泡盛曲霉 GIM3.4 的阿魏酸酯酶活力明显高于另外两个菌种, 在第七天达到顶峰, 最高值为 2642.60 U; 其

次是泡盛曲霉 GIM3.5, 在第七天达到顶峰, 最高值为 1407.40 U; 泡盛曲霉 GIM3.266 的阿魏酸酯酶活力最低, 最高值仅为 947.50 U。

综上所述, 在这三种酶中, 纤维素酶在发酵的第一、二天酶活力显著增大, 木聚糖酶则在第三天酶活力达到顶峰, 阿魏酸酯酶活力则在整个发酵周期都呈现稳定缓慢增大的趋势。因此推测在发酵过程中, 纤维素先分解破坏细胞壁, 有助于暴露出束缚型酚类物质与麦麸相结合的酯键和糖苷键, 然后木聚糖酶打开酚类物质与其他物质之间的糖苷键, 阿魏酸酯酶则打开酚类物质与其他成分之间的酯键^[16], 释放出麸皮内部和与细胞壁成分(如膳食纤维、蛋白质)相结合的酚类物质。

前人的研究也有类似的发现: Xie Chun-yan^[20]等人分别将 4 中食用菌菌丝(平菇、黑木耳、猴头菇、蛹虫草)接种于麦麸中发酵, 4 种食用菌都能产生阿魏酸, 猴头菌菌丝发酵 4 天后得到的阿魏酸含量最高(95.51 mg/L), 阿魏酸酯酶的活性达到 2.04 mM/mL, 同时发现猴头菌菌丝在发酵产阿魏酸酯酶的同时还能产生纤维素酶, 而其余三种食用菌只产生纤维素酶。这个结果表明麦麸中酚类物质的释放可能是多种酶系共同作用的结果, 相比于酶法键位作用的单一, 发酵法无疑会高效很多。而 Evangelos T^[25]的研究也表明, 阿魏酸酯酶和木聚糖酶能协同作用, 水解植物细胞壁与阿魏酸相连的酯键。

3.6 总酚释放量与酶活力变化的相关性分析

本研究的结果表明, 在三株泡盛曲霉中, 麦麸经泡盛曲霉 GIM3.4 发酵后, 酚类物质的释放量最高, 且木聚糖酶和阿魏酸酯酶的活力最强, 故以经泡盛曲霉 GIM3.4 发酵后的麦麸总酚含量为纵坐标, 分别以三种酶活力为横坐标, 检验总酚释放量与酶活力变化的相关性, 结果如图 12 所示。总体而言, 总酚释放量与纤维素酶活力的线性相关性不显著, 相关系数 R^2 为 0.179, 由于在发酵前三天, 纤维素酶活力不断增强, 迅速分解麦麸的细胞壁, 而从发酵的第三天后, 纤维素酶已经分解完麦麸的细胞壁了, 其酶活力开始不断下降。但这时候, 木聚糖酶和阿魏酸酯酶仍在发挥酶解作用, 总酚的释放量仍在快速上升, 直至第七天达到顶峰, 所以从第三天后, 总酚释放量与纤维素酶活力显示负相关。然而, 总酚释放量与木聚糖酶和阿魏酸酯酶的活力成显著的正相关, 其相关系数 R^2 分别为 0.644 和 0.729。说明木聚糖酶和阿魏酸酯酶的活力越强, 越有利于麦麸酚类物质的释放。

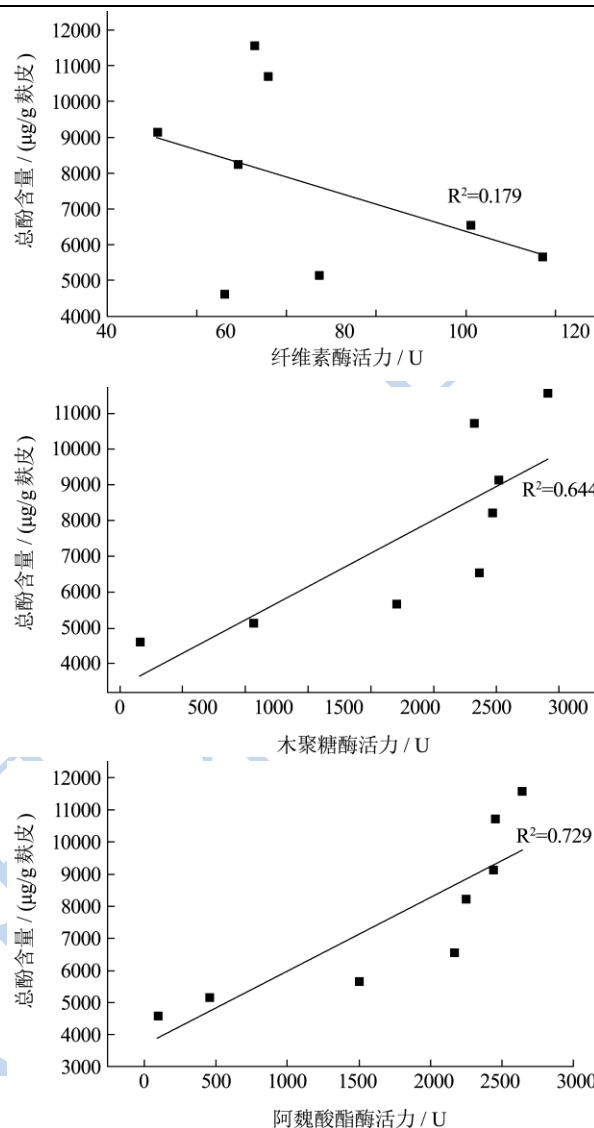


图 12 总酚含量与纤维素酶、木聚糖酶和阿魏酸酯酶活力的相关性(泡盛曲霉 GIM3.4)

Fig.12 The correlations between the content of phenolic compounds and the activities of cellulase, xylanase and feruloyl esterase (*Aspergillus awamori* strain GIM3.4)

总酚含量与三种酶活力的相关性分析进一步表明, 总酚含量与木聚糖酶和阿魏酸酯酶活力呈正相关。

4 结论

4.1 采用泡盛曲霉对小麦麦麸进行固态发酵, 能有效地提高小麦麦麸总酚的释放量, 在本研究中, 泡盛曲霉 GIM3.4 对麦麸总酚的释放量最高(11561.30 μg/g 麸皮), 其次是泡盛曲霉 GIM3.5 (9109.30 μg/g 麸皮), 最低是泡盛曲霉 GIM3.266 (6197.20 μg/g 麸皮), 分别比发酵前麦麸的总酚含量增加了 169%、111.95% 和 44.19%。

4.2 对发酵过程中麦麸的 5 种存在形态的酚类物质的

变化进行更进一步的研究发现, 发酵前的麦麸酚类物质中含量最高的是束缚型酚类物质, 而随着发酵天数的增加, 麦麸中以酯键、糖苷键、醚键与其他物质相结合的酚类物质逐渐被释放出来, 导致游离型酚类物质含量不断增大。本研究采用的三种泡盛曲霉对游离型酚类物质的释放量从大到小依次为: 泡盛曲霉 GIM3.4 释放的游离型酚类物质在第 7 天达到顶峰, 为 6938.5 $\mu\text{g/g}$ 麸皮, 占总酚的 76.16%。泡盛曲霉 GIM3.5 释放的游离型酚类物质也在第 7 天达到顶峰, 为 4307.7 $\mu\text{g/g}$ 麸皮, 占总酚的 47.93%, 而泡盛曲霉 GIM3.266 发酵的固态培养基则在第四天游离型酚类物质达到顶峰, 为 1476.70 $\mu\text{g/g}$ 麸皮, 占总酚含量的 23.83%, 在这三种泡盛曲霉中, 纤维素酶活力最强的是 GIM3.266, 其次是 GIM3.4, 最低是 GIM3.5; 木聚糖酶活力和阿魏酸酯酶活力最强的是 GIM3.4, 其次是 GIM3.5, 最低是 GIM3.266, 而前面酚类物质释放情况的实验结果表明, 总酚释放量最高的是泡盛曲霉 GIM3.4, 其次是 GIM3.5, 最低是 GIM3.266。

4.3 综合酚类物质和酶活力的测定结果可知, 菌种发酵麦麸释放酚类物质产量的高低, 与其木聚糖酶活力和阿魏酸酯酶活力密切相关, 这两种酶的活力高的菌种, 更有利于在麦麸发酵过程中释放酚类物质。

4.4 因此泡盛曲霉在植物材料的生物降解中起着重要作用, 在农业、食品和制药工业等具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 王蓓. 麦麸中阿魏酸提取及纯化技术的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2012
WANG Bei. Study on extraction and purification of ferulic acid in wheat bran [D]. Shanxi University of Science and Technology, 2012
- [2] Kulisic T, Radonic A, Katalinin V, et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil [J]. Food Chemistry, 2004, 85: 633-640
- [3] Mette F A, Paul A K, Gary W, et al. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals [J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49(11): 5679-5684
- [4] Mathew S, Abraham T E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2004, 24(2-3): 59-83
- [5] Adom K K, Sorrells M E, Liu R H. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties [J]. J. Agric. Food Chem., 2005, 53(6): 2297-2306
- [6] Liu R H. Whole grain phytochemical and health [J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46(3): 207-219
- [7] Frank S, Krzysztof K, Lawrence H. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in rapeseed flour and hulls [J]. J. Agric. Food Chem., 1982, 30(2): 334-336
- [8] Wang B N, Liu H F, Zheng J B, et al. Distribution of phenolic acids in different tissues of jujube and their antioxidant activity [J]. J. Agric. Food Chem., 2011, 59(4): 1288-1292
- [9] Sunan B, Natthida W, Sirthon S. Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development [J]. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(11): 4566-4571
- [10] Liyana-Pathirana C M., Shihidi F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat [J]. J. Agric. Food Chem., 2006, 54(4): 1256-1264
- [11] Li L, Shewry P R, Ward J L. Phenolic acids in wheat varieties in the healthgrain diversity screen [J]. J. Agric. Food Chem., 2008, 56(21): 9732-9739
- [12] I-Hsin Lee, Yu-Hsiang Hung, Cheng-Chun Chou. Total phenolic and anthocyanin contents, as well as antioxidant activity of black bean koji fermented by *Aspergillus awamori* under different culture conditions [J]. Food Chem., 2007, 104: 936-942
- [13] 刘子立, 欧仕益, 蒋笃孝, 等. 麦麸发酵产酶制备并提纯阿魏酸 [J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2006, 27(1): 117-122
LIU Zi-li, OU Shi-yi, JIANG Du-xiao, et al. Preparation and purification ferulic acid from wheat bran by solid fermentation [J]. Journal of Jinan University (Natural Science), 2006, 27(1): 117-122
- [14] 方园, 张宁, 欧仕益. 利用泡盛曲霉产阿魏酸酯酶的研究 [J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2011, 9: 103-106
FANG Yuan, ZHANG Ning, OU Shi-yi. Production of feruloyl esterases using three *Aspergillus awamori* strains [J]. Journal of Jinan University (Natural Science), 2011, 9: 103-106
- [15] 郝杰, 张长虹, 曹学丽. 七种谷物麸皮中的酚酸类成分分析 [J]. 食品科学, 2010, 31(10): 263-267
HAO Jie, ZHANG Chang-hong, CAO Xue-li. RP-HPLC analysis of phenolic acids in different varieties of cereal bran [J]. Food Science, 2010, 31(10): 263-267
- [16] 丁岩, 唐世云, 侯汉学. 小麦麸皮中酚酸提取方法的研究 [J]. 中国食物与营养, 2012, 18(6): 52-58
DING Yan, TANG Shi-yun, HOU Han-xue. Effects of hydrolysis conditions on the release of phenolic acids in wheat

- bran [J]. Food and Nutrition in China, 2012, 18(6): 52-58
- [17] 姚艳艳.小麦麸皮中阿魏酸提取与纯化工艺研究[D].雅安:四川农业大学,2011
- YAO Yan-yan. Extraction and purification of ferulic acid from wheat bran. Sichuan Agricultural University, 2011
- [18] GB/T 23874-2009,饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法[S]
- [19] NY/T 912-2004,饲料添加剂纤维素酶活力的测定分光光度法[S]
- [20] Xie Chun-yan, Gu Zhen-xin, You Xue-jiao, et al. Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, (46): 125-128
- [21] 夏荃,文惠玲,李土光,等.高效液相色谱法测定川芎不同炮制品中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量[J].广州中医药大学学报,2009,26(4):384-387
- XIA Quan, WEN Hui-ling, LI Tu-guang, et al. Determination of free ferulic acid and total ferulic acid in different processed products of rhizoma Chuanxiong by HPLC [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2009, 26(4): 384-387
- [22] Oufnac D S, XU Zhi-min, SUN Ting, et al. Extraction of antioxidants from wheat bran using conventional solvent and microwave-assisted methods [J]. Cereal Chemistry, 2007, 84(2): 125-129
- [23] WANG Jing, SUN Bao-guo, CAO Yan-ping. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 804 - 810
- [24] 郝杰,曹学丽.小麦麸皮中束缚型酚酸的化学法释放工艺[J].食品科学,2010,31(18):129-133
- HAO Jie, CAO Xue-li. Optimization of Chemical Release of Bound Phenolic Acids from Wheat Bran [J]. Food Science, 2010, 31(18): 129-133
- [25] Evangelos T, Christina V, Paul C. Microbial Production, characterization and applications of feruloyl esterases [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 497-509