

# 红曲菌固态发酵对燕麦多糖体外抗氧化及抑制淀粉酶活性的影响

刘燕, 罗游, 魏岱岳, 郭志鹏, 吴振强

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本研究以燕麦作为发酵基质, 采用酶预处理协同红曲霉后发酵技术, 探索燕麦多糖含量、组成及生物活性的变化规律。研究表明, 采用 $\beta$ -葡萄糖苷酶协同红曲霉发酵可以提高发酵燕麦的多糖含量至4.50% (W/W), 是常规发酵组的1.21倍, 是未发酵组的2.23倍。采用高效液相色谱测定发现发酵使燕麦多糖分子量增大, 发酵前10~100 ku分子量多糖占92.12%, 发酵后大于100 ku分子量多糖占83.91%, 最高分子量达到 $2.57 \times 10^3$  ku; 发酵后单糖组成发生显著变化, 甘露糖和半乳糖比例明显上升, 葡萄糖有所降低, 鼠李糖没有检测到, 单糖组分摩尔比例为甘露糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖=2.50:6.81:4.14:1.09:2.13。发酵后红曲燕麦多糖的生物活性有所提高, 清除羟自由基、ABTS+自由基的能力和抑制淀粉酶的能力均高于未发酵燕麦。研究可为燕麦深加工提供一条新途径。

**关键词:** 燕麦; 固态发酵; 红曲霉; 多糖; 生物活性

文章编号: 1673-9078(2019)05-95-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.014

## Effect of Solid-State Fermentation with *Monascus anka* on the Compositions, *in Vitro* Antioxidation and Amylase-inhibitory Activity of Oat Polysaccharides

LIU Yan, LUO You, WEI Dai-yue, GUO Zhi-peng, WU Zhen-qiang

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In this work, the changing trends of the amount, composition and bioactivities of oat polysaccharides were investigated using oat as the fermentation substrate and through the combined use of enzymatic pretreatment and *Monascus* fermentation technology. Results revealed that the yield of polysaccharides reached to 4.50% (W/W) after  $\beta$ -glucosidase hydrolysis followed by *Monascus* fermentation, which was 1.21 times as high as that for the conventional fermentation group, and 2.23 times as high as that for the unfermented group. HPLC analysis revealed that the fermentation process led to increased molecular weights: 91.12% for molecules in the range of 10~100 ku before fermentation whilst 83.91% with molecular weights greater than 100 ku after fermentation, with the highest molecular weight up to  $2.57 \times 10^3$  ku. The composition of monosaccharides changed significantly after fermentation, the proportions of mannose and galactose significantly increased, whilst the proportion of glucose decreased with rhamnose not detected. After fermentation, the oat polysaccharides were composed of mannose (Man), glucose (Glc), galactose (Gal), xylose (Xyl) and arabinose (Ara), at a molar ratio of 2.50 : 6.81 : 4.14 : 1.09 : 2.13, and had improved bioactivities. The polysaccharides from fermented oats exhibited a higher hydroxyl radical scavenging activity, ABTS+ radical scavenging ability and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity, compared to those from unfermented oats. The results of this research present a new approach for deep processing of oats.

**Key words:** oat; solid-state fermentation; *Monascus*; polysaccharides; bioactivity

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 广东省省级科技计划项目(公益研究与能力建设专项)(2017B020207003); 广州市科技计划项目-产学研协同创新重大专项(201604046011)

作者简介: 刘燕(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 吴振强(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程、生物工程、生物化工、生态环境, 大健康产业领域理论与应用

红曲霉菌(*Monascus*)是一种小型丝状腐生真菌, 在真菌分类学上属于囊菌亚门, 子囊菌纲, 真子囊菌亚纲, 曲霉科, 红曲霉属<sup>[1]</sup>。早在我国古代, 红曲霉及其发酵产物就已经被用于农业生产和中药制作中。红曲霉能代谢分泌多种功能活性产物, 如色素、洛伐他汀和多糖等<sup>[2]</sup>。同时, 红曲霉菌在发酵过程中还能代谢多种酶, 包括淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和糖苷酶

等,可以用于谷物发酵生物转化。

燕麦 (*Avenasativa* L.), 又名皮燕麦, 雀麦, 属于禾本科植物, 是一种重要的粮食和饲料作物, 被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 认定为功能性谷物食品, 具有改善胃肠道和血糖水平的功效<sup>[3]</sup>。燕麦富含蛋白质、脂肪、维生素、膳食纤维等营养物质, 是一种功能性谷物食品<sup>[4]</sup>。而目前市场上燕麦产品种类较少, 主要有燕麦片, 燕麦粉和燕麦油等, 制约了燕麦在食品领域的发展。

多糖是由 10 个以上的单糖, 通过糖苷键连接起来的高分子量聚合物, 具有免疫调节性、抗氧化性、清除自由基的功能<sup>[5]</sup>, 一直以来都是研究的热点。关于红曲的糖类成分研究目前大多局限于液态发酵<sup>[6]</sup>, 而关于固态发酵红曲中糖类物质的结构和活性研究鲜有报道。酶预处理结合固态发酵技术已被用于燕麦酚类物质的关联研究中, 发现常规固态发酵中加入酶预处理工艺可以大幅度提高发酵产品中多酚含量并缩短发酵周期<sup>[7]</sup>。本研究以燕麦作为主要原料, 采用酶预处理协同红曲霉发酵技术, 探讨酶预处理结合发酵技术对红曲燕麦多糖含量的影响, 发酵前后燕麦多糖成分及其生物活性的变化, 为燕麦的深加工提供一定的参考及应用指引。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

红曲霉菌株 *Monascus anka* (GIM 3.592), 保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC/GIMCC); “天地粮人”精品燕麦米购买于京东商城(产地: 辽宁省朝阳市)。

木聚糖苷酶 UTC-X50 (25000 U/g),  $\beta$ -葡萄糖苷酶 UTC-101 (8000 U/g), 纤维素酶(5000 U/g), 复配酶 UTC-801(木聚糖酶 5000 U/g, 纤维素酶 5000 U/g), 湖南尤特尔生化有限公司; 抗坏血酸 (Vc) ( $\geq 99.8\%$ ), DPPH ( $\geq 99\%$ ), ABTS ( $\geq 99\%$ ),  $\alpha$ -淀粉酶 ( $\geq 99\%$ , 13 U/mg), 阿卡波糖 ( $\geq 98\%$ ), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 标准葡聚糖, 索莱宝公司; 葡萄糖 ( $\geq 98\%$ ), 半乳糖 ( $\geq 98\%$ ), 甘露糖 ( $\geq 98\%$ ), 鼠李糖 ( $\geq 98\%$ ), 木糖 ( $\geq 98\%$ ), 阿拉伯糖 ( $\geq 98\%$ ), 阿拉丁; 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

台式超速大容量离心机 5804R, Eppendorf 公司; 水浴锅 HH-S, 巩义市予华仪器有限责任; 高效液相色谱仪 Waters2695, 折光示差检测器(RID)2414, 紫外

检测器 2475, 美国 Waters 公司; 酶标仪 SpectraMax M5, 美国赛默飞; 紫外分光光度计 UV-2802S, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 红曲菌液体种子培养

种子培养基 (1 L): 葡萄糖 20 g, 鱼粉蛋白胨 10 g, 酵母粉 3 g, KCl 0.50 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 搅拌至全部溶解, 分装, 121 °C 灭菌 20 min。

于在 PDA 平板中生长 7 d 的红曲霉种子平板中注入 6 mL 经灭菌的 0.10% (W/V) Tween 80 溶液, 洗脱红曲孢子, 取 4 mL 孢子悬液 (约  $10^6$  个孢子/mL), 接种至含有 50 mL 种子液的 250 mL 锥形瓶中。种子液于 180 r/min, 30 °C, 恒温摇床培养 28 h。

#### 1.3.2 酶预处理固态发酵

干燕麦米 20 g 于 250 mL 锥形瓶, 加入 50 mL 蒸馏水浸泡 6 h, 沥干, (1) 按 50 U/g 的添加量分别添加  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 纤维素酶, 复配酶液 5 mL (未发酵组及无酶组分别添加 5 mL 水), 控制含水量在 55%~65%, 50 °C 处理 12 h; (2) 补充添加碳源 (甘油 1.6 g)、氮源 (酵母粉 0.4 g) 后, 于 121 °C 灭菌 30 min。

(3) 待燕麦基质固态培养基冷却至 30 °C 左右, 接入 1.3.1 的种子液, 接种量为 10% (V/V), 维持温度 30 °C 发酵, 发酵周期 14 d, 根据培养情况定期翻曲。取样后于 60 °C 烘干, 称量干重直至恒重, 磨碎后过 40 目筛。

#### 1.3.3 多糖的提取及测定

##### 1.3.3.1 多糖的提取

按照李大军和白鑫等人的方法适当修改<sup>[8,9]</sup>。称取 5 g 红曲燕麦粉, 加 20 mL 的 95% 乙醇和 20 mL 石油醚, 摇床振摇 4 h, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。滤渣置于烧杯中, 加入 50 mL 蒸馏水, 70 °C 水浴 1 h, 8000 r/min 离心 10 min, 重复两次, 合并滤液。向滤液中加入 0.04 mL  $\alpha$ -淀粉酶, 90 °C 反应 10 min (用碘液检测直至无蓝色)。冷却后加入 0.04 mL 高温糖化酶, 60 °C 反应 30 min, 得到粗多糖提取液。将粗多糖提取液与 Sevag 试剂按体积比 5:1 混合, 置于锥形瓶中于摇床中振摇 15 min (90 r/min), 倒入分液漏斗中, 静置 30 min, 去掉下层有机试剂和蛋白层, 上清液继续除蛋白直至无蛋白层出现。45 °C 旋蒸 10 min 除去有机试剂。向多糖提取液加入 3 倍体积的 95% 乙醇 4 °C 静置过夜, 离心, 收集沉淀, 加少量水溶解, 冷冻干燥, 得粗多糖样品, 记录其质量  $m_2$ , -20 °C 密封保藏。

##### 1.3.3.2 样品多糖含量的测定

总糖含量的测定: 采用改良的苯酚硫酸法<sup>[10]</sup>, 配制 2 mg/mL 的粗多糖溶液, 取 0.05 mL 加蒸馏水至 2 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 充分混匀, 再加入 5.0 mL 浓硫酸摇匀, 室温静置 30 min 后在 490 nm 处测定吸光度。总糖含量的计算以无水葡萄糖作为标准物质, 总糖的结果表示为粗多糖中的百分含量。

还原糖含量的测定: 还原糖含量的测定采用 DNS 法<sup>[4]</sup>, 取 2 mg/mL 的粗多糖液 0.4 mL, 加入 0.8 mL DNS, 沸水浴 5 min, 立即用流水冷却至室温, 在 540 nm 处测定吸光度, 记录吸光值; 以无水葡萄糖作为标准物质绘制标准曲线, 吸光值代入葡萄糖标准曲线中计算还原糖含量, 结果表示为粗多糖中的百分含量。

粗多糖中多糖含量计算:

多糖含量  $\omega(\%) = \text{总糖含量}(\%) - \text{还原糖含量}(\%)$

发酵燕麦中多糖含量计算:

$Y = (\omega \times m_2) / m_1 \times 0.9$

式中: Y: 发酵燕麦多糖的含量(%);  $\omega$ : 粗多糖中多糖含量(%);  $m_1$ : 红曲燕麦干物质的质量(g);  $m_2$ : 粗多糖质量(g); 0.9: 葡萄糖换算成葡聚糖的校正系数。

### 1.3.4 发酵燕麦多糖的组成分析

#### 1.3.4.1 多糖分子量测定

根据 Liu 等人<sup>[11]</sup>的方法进行适当修改, 具体如下。采用高效液相色谱(HPLC)法、折光示差检测器(RID)检测多糖: 以葡聚糖 T-2000、T-500、T-70、T-40 和 T-10(分子量分别为 2,000,000、500,000、70,000、40,000 和 10,000) 为标准品, 准确称取各标准品及红曲燕麦多糖样品各 1 mg 溶于 1.0 mL 去离子水中, 用 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤后进行 HPLC 检测分析, 分析仪器和条件如下: HPLC 色谱系统包括 Waters 2695 分离系统和 Waters 2414 RID 检测系统; 色谱柱: TSK-GEL G4000PWxl; 流动相: 去离子水; 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测器温度: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。

测定各标准品的出峰时间, 以分子量的对数为纵坐标, 保留时间为横坐标, 绘制分子量标准曲线, 得到回归方程为:  $Y = -0.3054X + 6.3955$ ,  $R^2 = 0.9996$  ( $Y = \lg M_w$ ,  $X = R_t$ )。

#### 1.3.4.2 单糖组成成分分析

参考 Dai 等人<sup>[12]</sup>的方法并做适当修改。具体如下, 取 3 mg 多糖样品于小安瓿瓶中加入 1 mL 2 mol/L 的三氟乙酸 TFA, 在氮气下密封, 120  $^{\circ}\text{C}$  下水解 2 h, 冷却至室温, 加入 1 mL 甲醇, 通过吹氮气和热水浴加热蒸发至干, 重复 4 次, 除去 TFA, 将干燥的水解多糖样品溶于 1 mL 超纯水中备用。

PMP 衍生化: 将 100  $\mu\text{L}$  水解多糖样品溶液或单糖标准混合物的溶液与 100  $\mu\text{L}$  0.6 mol/L 氢氧化钠混

合, 取 50  $\mu\text{L}$  混合物加入 50  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L PMP 的甲醇溶液, 并通过涡旋混合器充分混合。将整个混合物加热至 70  $^{\circ}\text{C}$  并孵育 100 min。将反应混合物冷却至室温后, 用 50  $\mu\text{L}$  0.3 mol/L 盐酸中和, 将所得溶液蒸发至干。向残留物中加入水和氯仿(各 1.0 mL), 剧烈摇动混合物, 弃去氯仿层, 重复提取 3 次(去除甲醇)。得到水层通过 0.45  $\mu\text{m}$  的膜过滤器过滤, 用于 HPLC 分析。水解样品和标准样品的衍生化程序必须在相同条件下同时进行。

HPLC 条件: Sunfire C<sub>18</sub> 柱, DAD 检测器, 流动相: 83% 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.7), 17% 乙腈, 流速 1 mL/min, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 检测波长 245 nm。

#### 1.3.4.3 紫外光谱

用蒸馏水将红曲燕麦多糖冻干粉配成 1 mg/mL 溶液, 在 200~500 nm 处进行光谱扫描。

### 1.3.5 体外生物活性试验

#### 1.3.5.1 羟自由基清除活性

参考 Liu 等人<sup>[13]</sup>的方法并适当修改, 具体为将 0.1 L 不同浓度的多糖溶液(0.2、0.5、1、1.5、2、3 mg/mL) 与 0.1 mL FeSO<sub>4</sub>(6 mmol/L) 和 0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2.4 mmol/L) 混合。在室温下孵育 10 min 后, 将混合物与 0.1 mL 6 mmol/L 水杨酸在 30  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min, 于 510 nm 处测定吸光值。以不同浓度的 Vc(0.2、0.5、1、1.5、2、3 mg/mL) 作为阳性对照。羟自由基清除率的计算公式如下:

羟自由基清除率/% =  $[1 - (A_0 - A_1)] / A_2 \times 100$

式中:  $A_0$  为样品溶液参与的反应体系的吸光值;  $A_1$ : 不加显色剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的体系的吸光值;  $A_2$ : 空白对照的吸光值(蒸馏水代替样品溶液参与反应)。

#### 1.3.5.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除活性

采用 Meng 等人<sup>[14]</sup>的方法并做如下修改。取 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液以 1:1 的体积比混合室温下暗处反应 16 h 制得。将新鲜配制的 ABTS<sup>+</sup>溶液用蒸馏水稀释至在 734 nm 下吸光值为 0.70±0.02, 备用。取 200  $\mu\text{L}$  不同浓度的多糖溶液(0.05、0.1、0.2、0.5、1 mg/mL), 加入 300  $\mu\text{L}$  ABTS<sup>+</sup>溶液, 摇匀, 暗反应 10 min 后, 于 734 nm 下测吸光值。以不同浓度的 Vc(0.05、0.1、0.2、0.5、1 mg/mL) 作为阳性对照。ABTS<sup>+</sup>自由基清除率计算公式如下:

ABTS<sup>+</sup>自由基清除率/% =  $(1 - A_0) / A_1 \times 100\%$

式中:  $A_0$  为样品溶液或 Vc 标准液加 ABTS<sup>+</sup>液反应的吸光值;  $A_1$  为蒸馏水加 ABTS<sup>+</sup>液体系的吸光值。

#### 1.3.5.3 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性

采用 Wang 等<sup>[15]</sup>的方法并做适当修改, 具体如下:

取 200 μL 不同浓度的多糖溶液 (0.2、0.5、1、1.5、2、3 mg/mL)，加入 200 μL α-淀粉酶溶液 (8 U/mL, 0.1 mmol/L PBS 缓冲溶液, pH 6.9)，充分混合后，于 37 °C 水浴反应 10 min，添加 200 μL 2 mg/mL 的淀粉溶液，于 37 °C 水浴反应 10 min。加入 500 μL DNS 溶液终止，并置于沸水浴反应 5 min，冷却至室温后，于 540 nm 下测吸光值。以阿卡波糖作为阳性对照。

$$\alpha\text{ 淀粉酶抑制率}/\%=[1-(A_0-A_1)]/A_2\times 100\%$$

式中：A<sub>0</sub> 为样品溶液参与的反应体系的吸光值；A<sub>1</sub>：蒸馏水代替淀粉酶溶液的体系的吸光值；A<sub>2</sub>：空白对照的吸光值 (蒸馏水代替样品溶液参与反应)。

### 1.4 数据统计分析

所有实验均进行三组平行，结果采用 Origin 9.0 进行分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶预处理对红曲发酵燕麦粗多糖含量的影响

采用单纯固态发酵以及酶预处理后固态发酵进行比较，结果如图 1 所示。

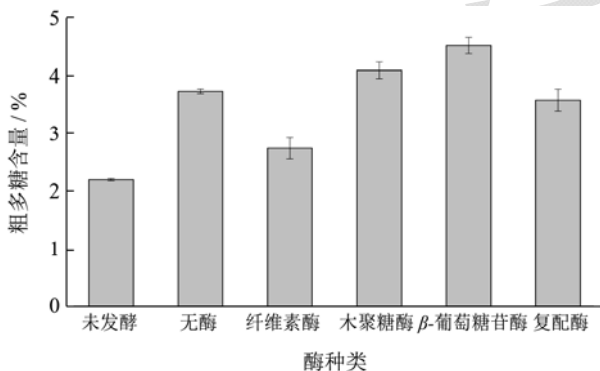


图 1 不同酶预处理后红曲发酵对燕麦多糖含量的影响

Fig.1 Effects of fermentation following different enzymatic hydrolysis on yield of polysaccharides

相比于未发酵组，常规固态发酵 (无酶预处理) 组相比于未发酵组多糖含量提高了 70.04%，因为发酵过程中红曲霉产生丰富的酶系，包括淀粉酶、β-葡萄糖苷酶、蛋白酶等水解酶<sup>[16]</sup>，破坏燕麦本身结构，增加多糖类物质的可提取性；另外，由于发酵过程红曲菌的生长，菌丝生物量增多，发酵产物中多糖含量也会增加<sup>[17]</sup>。伍健萍等<sup>[18]</sup>在研究红曲多糖的过程中也发现，红曲霉固态发酵杂粮具有产多糖能力。添加酶预处理后发酵，红曲燕麦产品中多糖含量与酶的品种有

很大关联，添加 β-葡聚糖苷酶预处理后红曲燕麦产品中多糖含量最高，达到 4.50%，是常规发酵组的 1.21 倍，是未发酵组的 2.23 倍，分析可能是由于 β-葡聚糖苷酶处理后燕麦基质中水溶性糖类物质含量增加，更易于转化为可发酵性糖供红曲霉生长和代谢，从而促进了红曲燕麦中多糖含量的提高。而添加纤维素酶预处理后发酵的多糖含量比常规发酵组低，可能是由于外加的纤维素酶对燕麦细胞结构造成了较大的破坏导致后期发酵过程中基质粘度过高不易于红曲霉的生长。添加木聚糖酶预处理发酵略优于常规发酵，添加复配酶预处理发酵则略低于常规发酵，因此，后续选用 β-葡聚糖苷酶预处理后进行红曲霉固态发酵进行深入研究。

### 2.2 发酵燕麦多糖的组成变化

红曲发酵燕麦多糖与非发酵燕麦多糖的组成相差较大，如图 2 所示。

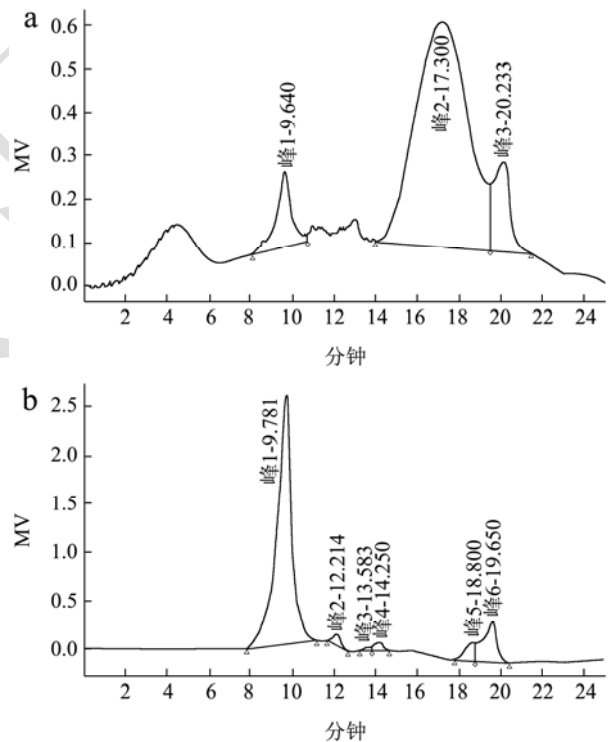


图 2 多糖分子量分布图

Fig.2 Molecular weight distribution

注：a：未发酵燕麦多糖；b：发酵后红曲燕麦多糖。

表 1 分子量分布

Table 1 Distribution of Mw

发酵时间/d	分子量分布/%	
	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup> u	>10 <sup>5</sup> u
0	92.12 ± 0.21	7.88 ± 0.10
14	16.09 ± 0.06	83.91 ± 0.19

表2 单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition

发酵时间/d	单糖组成
0	鼠李糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖=0.71:75.03:0.53:1.02:1.01
14	甘露糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖=2.50:6.81:4.14:1.09:2.13

发酵燕麦多糖分子量分为两部分,第一部分出峰时间为7.80~15 min,分子量>100 ku,占83.91%,第二部分出峰时间为16~21 min,分子量为10~100 ku,占16.09%。其中最大组分出峰时间为9.871 min,其分子量为 $2.57 \times 10^3$  ku,见图2b。结合图2及表1可以看出,发酵前燕麦多糖分子量主要分布于10~100 ku,发酵后燕麦多糖分子量主要在 $2.57 \times 10^3$  ku,说明红曲发酵导致小分子量的多糖减少而大分子量多糖含量增加,可能是发酵过程中产生的酶系使得燕麦中易被水解的小分子多糖被降解成分子量更小的寡糖和单糖供微生物生长和利用<sup>[13]</sup>,而大分子量多糖增加一方面可能是由于红曲霉自身代谢产生了分子量较大的菌丝体多糖和胞外多糖<sup>[18]</sup>,另一方面可能是发酵过程中随着菌丝体不断深入燕麦基质,其产生的酶系破坏燕麦中的蛋白淀粉纤维等物质,促进功能成分的释放与溶出,从而增加了大分子量多糖的可提取性<sup>[19]</sup>。

单糖组成测定结果显示,未经过发酵的燕麦中的多糖的单糖组成主要为鼠李糖,葡萄糖,半乳糖,木糖,阿拉伯糖,摩尔比为0.71:75.03:0.53:1.02:1.01,而发酵燕麦多糖单糖组分主要有甘露糖,葡萄糖,半乳糖,木糖和阿拉伯糖,且摩尔比为2.50:6.81:4.14:1.09:2.13(表2)。发酵后单糖组成发生显著变化,甘露糖和半乳糖比例明显上升,葡萄糖有所降低,鼠李糖没有检测到。Liu等<sup>[13]</sup>在研究发酵米糠多糖的过程中也发现,发酵过后提取的多糖其单糖组成中葡萄糖含量明显降低,认为可能是发酵过程产生的水解酶作用于多糖导致某些部位的糖苷键断裂,葡萄糖被游离出来。

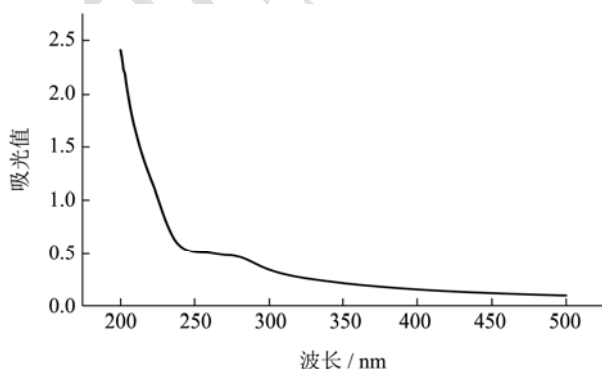


图3 红曲燕麦多糖紫外吸收光谱

Fig.3 UV scanning spectra (200~500 nm)

红曲霉在发酵过程中可以产生丰富的酶系,如纤

维素酶,淀粉酶,蛋白酶,木聚糖酶, $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[20]</sup>等,这些酶在发酵过程中会导致底物的分解转化和释放,同时合成和转化出自身代谢物质。田军等<sup>[21]</sup>发现,液态发酵的红曲多糖分子量为400 ku,单糖组成主要为半乳糖、葡萄糖和甘露糖,且半:葡:甘=4:2:1。张建峰等<sup>[22]</sup>测定红曲多糖分子量为316 ku,单糖组成主要为葡萄糖,半乳糖和甘露糖。可见,本研究红曲发酵燕麦的多糖的主要单糖组分(甘露糖,葡萄糖,半乳糖)与液态发酵红曲多糖组分基本一致,可推论发酵燕麦中含有红曲霉代谢生成的红曲多糖,其中单糖组分的比例差异可能与发酵方式、发酵底物、底物利用程度以及提取纯化的方式有一定的关联<sup>[23]</sup>,而且固态发酵形成的分子量比液态发酵的分子量大,达到 $2 \times 10^3$  ku以上。该多糖的紫外扫描结果表明,在260 nm和280 nm处无明显吸收峰(图3),表明红曲发酵燕麦多糖中基本不含蛋白质、核酸和多酚等物质。

### 2.3 发酵燕麦多糖的生物活性

#### 2.3.1 羟自由基清除活性

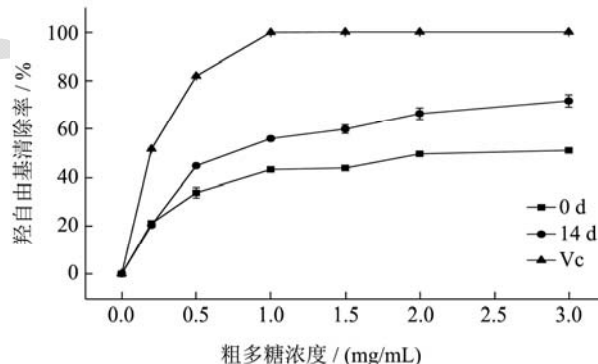


图4 红曲发酵燕麦多糖的羟自由基清除能力

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging activity

羟基自由基与生物大分子之间的反应会造成严重的细胞损伤或死亡<sup>[13]</sup>,因此,清除羟自由基对于机体健康具有很重要的意义。结果显示,未发酵(0 d)和发酵(14 d)燕麦多糖的羟基自由基清除活性都随着多糖浓度的增大而增大,发酵燕麦多糖的羟自由基清除率的增长速率高于非发酵燕麦多糖,但清除效果都低于Vc,如图4所示。低浓度(小于0.2 mg/mL)时,发酵前后多糖的羟自由基清除率相当,分别为 $20.88\% \pm 1.21\%$ 和 $20.17\% \pm 0.87\%$ ;当浓度提高至3 mg/mL时,发酵后红曲燕麦多糖的清除率达到71.67%

$\pm 2.52\%$ , 比发酵前提高了 20.64%。另外, 发酵红曲燕麦多糖的  $IC_{50}$  值为 0.84 mg/mL, 比未发酵燕麦多糖 ( $IC_{50}$  值为 2.27 mg/mL) 更低, 说明红曲燕麦多糖具有清除羟自由基的能力并且比未发酵的燕麦多糖清除能力强, 具有更高的抗氧化性, 因为羟自由基清除活性与抗氧化性直接相关<sup>[24]</sup>。

### 2.3.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除活性

ABTS<sup>+</sup>是食品和农产品测定抗氧化能力的常用指标<sup>[25]</sup>。发酵前后燕麦多糖的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率随着浓度的增加而不断增加, 在低浓度范围内增加较缓慢, 当浓度超过 0.2 mg/mL 时, 清除能力增加较为明显, 且发酵产品中的多糖清除率更高, 如图 5 所示。当浓度为 1 mg/mL 时, 发酵燕麦多糖清除率高达  $50.60\% \pm 2.31\%$ , 而未发酵燕麦中的多糖清除率为  $31.73\% \pm 2.11\%$ 。对于 ABTS<sup>+</sup>自由基清除活性, 发酵燕麦多糖  $IC_{50}$  为 0.97 mg/mL, 未发酵燕麦多糖为大于 1 mg/mL, Vc 为 8.32  $\mu\text{g/mL}$ , 表明红曲燕麦多糖的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除活性高于未发酵燕麦多糖, 但两者的清除能力都明显低于 Vc。

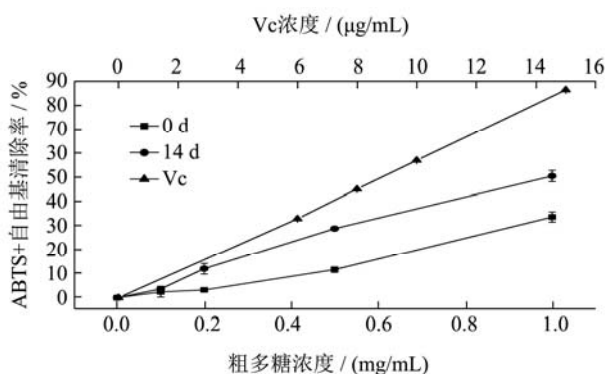


图5 红曲发酵燕麦多糖的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力

Fig.5 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity

### 2.3.3 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性

$\alpha$ -淀粉酶抑制活性通常被用于作为评价降血糖能力的指标之一<sup>[26]</sup>。发酵燕麦多糖对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制活性如图 6 所示, 在较低浓度 0.2 mg/mL 时, 发酵前后燕麦多糖的  $\alpha$ -淀粉酶抑制率高于阿卡波糖, 分别达到  $31.88\% \pm 0.14\%$  和  $34.09\% \pm 0.33\%$ , 但随着浓度的增加, 对照组阿卡波糖表现出较大的增长幅度, 当浓度达到 3 mg/mL 时, 其抑制率增加至  $91.69\% \pm 1.70\%$ , 而发酵前后燕麦多糖仅有  $47.46\% \pm 1.41\%$  和  $60.51\% \pm 1.20\%$ 。 $IC_{50}$  计算结果表明, 发酵燕麦多糖的半抑制浓度 (1.30 mg/mL) 低于未发酵燕麦多糖 (>3 mg/mL), 表明发酵后的红曲燕麦多糖呈现出更有效的  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性。

多糖的生物活性很大程度上依赖于它们的化学组成和结构特性如糖苷键的连接方式, 单糖的组成,

聚合程度等<sup>[27]</sup>。因此, 发酵前后多糖体外活性的差异可能是由于发酵过程中微生物代谢产生的酶作用于燕麦原有多糖对其结构进行了部分修饰<sup>[6,13]</sup>, 也与红曲霉代谢产生的红曲多糖有一定的关联。

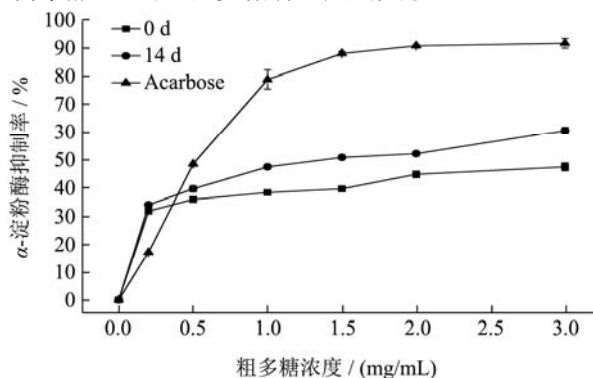


图6 红曲发酵燕麦多糖的  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性

Fig.6 Inhibition effect on  $\alpha$ -amylase activity

## 3 结论

采用  $\beta$ -葡萄糖苷酶协同红曲霉发酵可以显著提高发酵燕麦的多糖含量, 是常规发酵组的 1.21 倍, 是未发酵组的 2.23 倍, 达到 4.5% (W/W)。发酵后燕麦多糖组分的分子量增大, 其中发酵前分子量为 10~100 ku 的多糖占 92.12%, 而发酵后分子量大于 100 ku 多糖占 83.91%, 最高分子量达到  $2.57 \times 10^3$  ku; 发酵后多糖组分的单糖组成也发生显著变化, 其中甘露糖和半乳糖比例明显上升, 葡萄糖有所降低, 鼠李糖没有检测到, 单糖组分摩尔比例为甘露糖:葡萄糖:半乳糖:木糖:阿拉伯糖=2.50:6.81:4.14:1.09:2.13。同时, 发酵后燕麦多糖的生物活性有所提高, 清除羟自由基、ABTS<sup>+</sup>自由基的能力和抑制淀粉酶的能力均高于未发酵燕麦, 说明  $\beta$ -葡萄糖苷酶预处理协同红曲霉后发酵能够改善多糖的组成及生物活性, 结果将为燕麦功能食品的开发提供一种新的思路。

## 参考文献

- [1] Cheng M J, Wu M D, Chan H Y, et al. New metabolite from the Fungus *Monascus kaoliang* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2015, 51(6): 1091-1093
- [2] Patakova P. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(2): 169-181
- [3] Singh R, De S, Belkheir A. *Avena sativa* (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: an overview [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2013, 53(2): 126-144
- [4] Bei Q, Liu Y, Wang L, et al. Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.)

- with *Monascus anka* and their antioxidant activity [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 185-194
- [5] Wang P, Chen D, Jiang D, et al. Alkali extraction and *in vitro* antioxidant activity of *Monascus* mycelium polysaccharides [J]. Journal of Food Science & Technology, 2014, 51(7): 1251-1259
- [6] 汪鹏荣,陈攀攀,蓝丽精,等.红曲多糖液态发酵条件与抗氧化活性的研究[J].微生物学杂志,2011,31(4):19-24  
WANG Peng-rong, CHEN Pan-pan, LAN Li-jing, et al. Optimization of liquid-fermentation conditions of *Monascus* exopolysaccharides (MEP) and its antioxidant activity [J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(4): 19-24
- [7] Bei Q, Chen G, Liu Y, et al. Improving phenolic compositions and bioactivity of oats by enzymatic hydrolysis and microbial fermentation [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47: 512-520
- [8] 白鑫.燕麦多糖的理化性质及对小鼠生长发育的影响[D].天津:天津科技大学,2010  
BAI Xin. Physicochemical properties of oat polysaccharide and effect on growth of mice [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2010
- [9] 李大军,宋丹丹.曲霉多糖的提取及其抑菌活性研究[J].西南农业学报,2013,26(4):1479-1485  
LI Da-jun, SONG Dan-dan. *Aspergillus* polysaccharides extraction and antimicrobial activity [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(4): 1479-1485
- [10] Shi M, Yang Y, Guan D, et al. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes* [J]. Carbohydr Polymers, 2012, 89(4): 1268-1276.
- [11] Liu X C, Zhu Z Y, Tang Y L, et al. Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris* [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 142: 63-72
- [12] Dai J, Wu Y, Chen SW, et al. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 629-635
- [13] Liu Q, Cao X, Zhuang X, et al. Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: Antioxidant activities and effects on the production of NO [J]. Food Chemistry, 2017, 223: 49-53
- [14] Meng Q, Li Y, Xiao T, et al. Antioxidant and antibacterial activities of polysaccharides isolated and purified from *Diaphragma juglandis fructus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 431-437
- [15] Wang L, Liu F, Wang A, et al. Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 66: 357-364
- [16] Daroit DJ, Silveira ST, Hertz PF, et al. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 904-908
- [17] 张杉杉,涂传海,肖愈,等.蛹虫草固态发酵豆渣的功能性成分与抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,24:69-74  
ZAHNG Shan-shan, TU Chuan-hai, XIAO Yu, et al. Functional components and antioxidant activity of okara fermented by *Cordyceps militaris* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 24: 69-74
- [18] 伍健萍.红曲霉发酵多糖条件及抗氧化活性的初步研究[D].天津:天津科技大学,2012  
WU Jian-ping. Preliminary study on fermentation conditions of polysaccharide by *Monascus* and its antioxidative activity [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2012
- [19] Wu J, Jin S, Wu S, et al. Effect of filamentous fungi fermentation on the extractability and physicochemical properties of  $\beta$ -glucan in oat bran [J]. Food Chemistry, 2018, 254: 122-128
- [20] Bei Q, Chen G, Lu F, et al. Enzymatic action mechanism of phenolic mobilization in oats (*Avena sativa* L.) during solid-state fermentation with *Monascus anka* [J]. Food Chemistry, 2018, 245: 297-304
- [21] 田军,李兆兰,沈晓云,等.红曲多糖的化学结构分析[J].南京中医药大学学报,1998,4:217-218  
TIAN Jun, LI Zhao-lan, SHEN Xiao-yun, et al. Chemical structure of *Monascan* [J]. Journal of Nanjing University of TCM, 1998, 4 217-218
- [22] 张建峰.红曲多糖高产菌株的诱变筛选及其提取纯化免疫活性研究[D].吉林:吉林农业大学,2005  
ZHANG Jian-feng. Study on breeding of high-producing *Monascus* polysaccharide strains and extraction purification immune function of *Monascus* polysaccharide [D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2005

(下转第 130 页)