

## 米糠固态发酵工艺优化及其酚类物质和抗氧化活性的影响

董丽红<sup>1</sup>, 陈甜妹<sup>2</sup>, 曾 荣<sup>2</sup>, 张名位<sup>1</sup>, 王 旭<sup>3</sup>, 张瑞芬<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/农业农村部功能食品重点实验室/

广东省农产品加工重点实验室 广州 510610

<sup>2</sup>佛山科学技术学院食品科学与工程学院 广东佛山 528225

<sup>3</sup>广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所 广州 510640)

**摘要** 以脱脂米糠为原料,通过比较微生物种类、发酵时间、发酵温度、接种量等因素对米糠中游离态酚类物质含量的影响,优化建立米糠固体发酵工艺条件,分析发酵前、后米糠中游离态和结合态总酚、总黄酮含量以及单体酚的组成及含量的变化,并评价其体外抗氧化活性的差异。结果表明:米根霉固态发酵米糠增加游离态酚类物质含量的能力最强,最高为 612.29 mg GAE/100 g dw;优化确定的最佳发酵工艺为:发酵时间 5 d、发酵温度 30 ℃、接种量 1%。在该工艺条件下,与发酵前相比,发酵后米糠中游离态总酚和总黄酮含量分别提高了 162.2%和 58.4%,而结合态总酚和总黄酮含量无明显差异;游离态和结合态单体酚含量均有所改变,其中没食子酸含量均增加最多,分别增加了 2.44 和 8.11 倍;米糠游离态酚类物质的 ABTS、FRAP 和 ORAC 抗氧化能力分别显著提高了 100.7%、71.3%和 67.0%。结论:米根霉固态发酵能促进米糠中结合态酚类物质的释放,增加米糠总酚含量,同时提高其总抗氧化活性。

**关键词** 脱脂米糠; 米根霉固态发酵; 酚类物质; 抗氧化活性

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0333-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.031

米糠是稻谷加工过程产生的一种主要副产物,由果皮、种皮、珠心层、糊粉层及少量胚芽等组成,约占稻谷质量的 6%,据统计,我国米糠的年产量在 1 000 万 t 以上,目前大部分被用作动物饲料和肥料,利用率低,与发达国家相比差距明显<sup>[1]</sup>。米糠不仅富含蛋白质、油脂、膳食纤维以及维生素等营养成分,还含有较多的  $\gamma$ -谷维素、多酚和多糖等植物活性物质,是一种亟待高值化开发利用的可再生原料<sup>[2]</sup>。研究发现,米糠层中含有的酚类物质含量占谷物糙米中的 57%,是全谷物膳食中酚类物质的重要来源,具有抗氧化、抗炎、降血脂、降血糖等多种生物活性<sup>[3-5]</sup>。然而,米糠酚类物质大多以酯键或醚键与纤维素、半纤维素等细胞壁成分呈共价结合态存在,由于人体缺少能够水解释放结合态酚类物质的消化酶,导致生物利用度较低,从而影响其生物活性<sup>[6]</sup>。通过物理和生物等加工手段促进结合态多酚释放为游离态,进而提高其生物利用度,成为提高米糠健康功效的有效途径<sup>[7-8]</sup>。

有研究表明微生物发酵技术是改善米糠营养成分品质的重要手段<sup>[9-10]</sup>。Jamaluddin 等<sup>[11]</sup>利用黑曲霉固态发酵米糠,提高米糠酪氨酸酶和弹性蛋白酶抑制活性,同时促进阿魏酸和丁香酸等酚类物质的释放。Janarny 等<sup>[12]</sup>发现米根霉固态发酵不仅可以增加米糠总酚、总黄酮含量和抗氧化能力,而且能够增强酚类物质的生物可及性和利用率。值得注意的是,不同类型微生物因生长特性和产酶能力等差异,对发酵底物的影响也会有明显的不同<sup>[13-14]</sup>。除了常用的霉菌外,芽孢杆菌和乳酸菌也被应用于米糠发酵的研究中。用枯草芽孢杆菌发酵处理米糠能改变纤维素结构,促进阿魏酸、 $\gamma$ -谷维醇等活性物质的释放<sup>[15]</sup>。植物乳杆菌发酵不仅改善米糠整体风味,而且能增加其抗氧化活性<sup>[16]</sup>。此外,研究发现复合菌发酵更有助于增加米糠活性成分,提高米糠抗氧化活性<sup>[17-18]</sup>。目前以释放结合态酚类物质能力为指标,进行不同微生物固态发酵米糠的菌种筛选及工艺优化的研究鲜有报道。涉及米糠结合态酚类物质释放的研究也甚少。

基于此,本文比较米根霉、黑曲霉和枯草芽孢杆菌单一菌种及其与植物乳杆菌复合菌固态发酵

收稿日期: 2023-09-19

基金项目: 广东特支计划项目(2019BT02N112)

第一作者: 董丽红,女,硕士,助理研究员

通信作者: 张瑞芬 E-mail: ruifenzhang@163.com

对米糠中结合态酚类物质的释放作用的差异,筛选出米糠最适固态发酵菌种,优化其最佳发酵条件,并分析发酵前、后米糠的酚类构成谱及其抗氧化活性变化,旨在为开发米糠营养功能性配料提供技术依据,对推动米糠高值化利用,提高其附加值具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

新鲜米糠购自广东乡意浓农业科技有限公司,经超临界 CO<sub>2</sub> 萃取脱脂处理后,制得脱脂米糠,用塑料自封袋密封保存于 4℃ 冷库储藏备用。黑曲霉 (*Aspergillus niger* GIM3.576)、米根霉 (*Rhizopus oryzae* AS3.866)、枯草芽孢杆菌枯草亚种 (*Bacillus subtilis subsp. subtilis* GIM1.372)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* GIM 1.380),广东省微生物菌种保藏中心;MRS 肉汤、LB 肉汤、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),广东环凯微生物科技有限公司;福林酚试剂、水溶性维生素 E (Trolox)、荧光素二钠盐、ABAP (2, 2-azobis-2-amidinopropane-dihydrochloride),美国 Sigma 公司;没食子酸、原儿茶酸、香草酸、绿原酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸标准品,上海 Aladdin 试剂公司;总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法、FRAP 法),上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

旋转蒸发仪 (EYELA N-1100),东京理化器械株式会社;酶标仪 (Infinite M200pro),奥地利 TECAN 公司;高效液相色谱仪 (Agilent1260),美国 Agilent 公司;高速冷冻离心机 (Biofuge Stratos),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;高压灭菌锅 (LS-75HD),江阴滨江公司;超净工作台,江苏安泰空气技术有限公司;恒温恒湿培养箱,上海跃进医疗器械有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种活化

1) 植物乳杆菌 将保藏的植物乳杆菌按 1% 接种到 MRS 肉汤培养基中,30℃ 静止培养 14 h,再接种 1% 活化的菌液到新的 MRS 肉汤培养基中,培养 24 h 后制成菌种发酵培养液。

2) 枯草芽孢杆菌 将保藏的枯草芽孢杆菌按 1% 接种到 LB 肉汤培养基中,37℃ 振荡培养 24 h,再接种 1% 活化的菌液到新的 LB 肉汤培养基中,培养 24 h 后制成菌种发酵培养液。

3) 米根霉和黑曲霉 将保藏的米根霉和黑曲霉菌丝分别挑取一环接种到 PDA 平板上,30℃ 培养 5~7 d 至长满菌丝,加入 10 mL 无菌水,小心洗涤琼脂表面的菌丝,将液体吸入已灭菌的离心管中振荡,混合均匀后移入装有灭菌脱脂棉的核酸纯化柱过滤,收集孢子悬液备用。

1.3.2 米糠固态发酵条件优化 取 20 g 脱脂米糠装入 250 mL 锥形瓶,加入 10 mL 的蒸馏水,玻璃棒搅拌均匀成蓬松状,经 121℃、15 min 高压灭菌后,将菌种以一定比例接种到米糠中,搅拌均匀,在试验条件下恒温培养箱静置发酵,以未接种的脱脂米糠为对照,发酵结束后于 60℃ 烘箱烘干,完全粉碎过 80 目筛网,样品置于干燥器中保存待测。以发酵后米糠中游离酚含量变化为评价指标,分别探究发酵菌种、发酵时间、接种量、发酵温度对发酵米糠的影响。

1) 发酵菌种 分别接入单一菌种 (米根霉、黑曲霉、枯草芽孢杆菌),接种量 1% (菌浓度约  $1 \times 10^6$  CFU/mL),于 25℃ 恒温培养箱中静置发酵 0, 2, 4, 6, 8 d; 接入复合菌种 (米根霉+植物乳酸杆菌,黑曲霉+植物乳酸杆菌,枯草芽孢杆菌+植物乳酸杆菌),两种菌各接种量 1% (菌浓度约  $1 \times 10^6$  CFU/mL),于 25℃ 恒温培养箱中静置发酵时间 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 h。考察不同菌种发酵过程中对米糠游离酚含量的影响。

2) 发酵时间 接种上述 1) 中筛选的最佳发酵菌种,在发酵温度 25℃、接种量 1% 的条件下,考察不同发酵时间 (1, 2, 3, 4, 5, 6 d) 对米糠游离酚含量的影响。

3) 发酵温度 接种上述 1) 中筛选的最佳发酵菌种,在上述 2) 中确定的最佳发酵时间、接种量 1% 的条件下,考察不同发酵温度 (20, 25, 30, 35, 40℃) 对米糠游离酚含量的影响。

4) 接种量 在上述 1) 至 3) 中确定的最佳发酵菌种、发酵时间和发酵温度的条件下,考察不同接种量 (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%) 对米糠游离酚含量的影响。

1.3.3 最优条件固态发酵米糠 按上述 1.2.2 节中优化的最佳固态发酵工艺条件发酵脱脂米糠 20 g, 以未接种发酵的脱脂米糠 (defatted rice bran, DRB) 为对照, 发酵结束后于 60 °C 烘箱烘干, 完全粉碎过 80 目筛网, 得到发酵脱脂米糠 (Fermented defatted rice bran, FDRB)。测定发酵前后米糠多酚组成和含量及抗氧化活性。

1.3.4 酚类物质的提取 参照 Ti 等<sup>[19]</sup>的方法并稍加改动。准确称取 1.0 g 米糠样品, 加入 25 mL 预冷的 80% 丙酮超声 30 min, 离心后收集上清液, 重复提取 2 次, 合并上清液, 45 °C 下旋转蒸发浓缩至干, 加入 10 mL 甲醇复溶, 得到游离态酚类物质的提取液。向剩余的米糠残渣中加入 20 mL 氢氧化钠 (2 mol/L) 溶液振荡 2 h, 再用盐酸 (6 mol/L) 调 pH 值至 1.0, 离心取上清液。上清液用 50 mL 乙酸乙酯萃取 5 次, 合并萃取液, 浓缩至干, 加入 10 mL 甲醇复溶, 得到结合态酚类物质提取液。样品分装后, -20 °C 保存待测。所有提取重复操作 3 次。

#### 1.3.5 总酚、总黄酮的测定

1) 总酚含量的测定采用福林酚试剂法<sup>[20]</sup> 以没食子酸为标准品制作标准曲线, 其线性回归方程为  $y = 0.0022x + 0.0397$ ,  $R^2 = 0.9936$ , 式中:  $x$  为没食子酸质量浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $y$  为吸光度值, 检测波长为 760 nm。样品中的总酚含量以每 100 g 米糠干基中所含没食子酸当量 (GAE) 表示, 单位为 mg GAE/100 g DW。

2) 总黄酮含量的测定采用硼氢化钠/氯醌比色法<sup>[20]</sup> 以儿茶素为标准品制作标准曲线, 其线性回归方程为  $y = 0.0761x + 0.0228$ ,  $R^2 = 0.9968$ , 式中:  $x$  为儿茶素质量浓度,  $\text{mg/mL}$ ;  $y$  为吸光度值, 检测波长为 490 nm。样品中的总黄酮含量以每 100 g 米糠干基中所含儿茶素当量 (CE) 表示, 单位为 mg CE/100g DW。

1.3.6 单体酚组成及含量的测定 采用 HPLC-DAD 分析法<sup>[10]</sup>。色谱条件: 色谱柱 Zorbax SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent 公司); 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL/min; 进样体积 20  $\mu\text{L}$ ; 流动相: 流动相 A 为 0.4% (V/V) 的冰乙酸, 流动相 B 为乙腈; 洗脱梯度: 0~40 min B 5%~25%, 40~45 min B 25%~35%, 45~50 min B 35%~50%; 检测波长 280 nm。通过标准品吸收峰保留时间对比定性, 峰

面积外标法定量。

1.3.7 ABST 抗氧化能力的测定 采用 ABTS 试剂盒测定。于 96 孔板各孔中加入 200  $\mu\text{L}$  ABTS 工作液与 10  $\mu\text{L}$  样品溶液, 摇匀, 室温孵育 5 min, 734 nm 处测定吸光值。以 Trolox 为标准品, 根据标准曲线计算样品的 ABTS 值, 以每 100 g 米糠干基中所含 Trolox 当量 (TEAC) 表示, 单位为 mmol TEAC/100 g DW。

1.3.8 FRAP 抗氧化能力的测定 采用 FRAP 试剂盒测定。于 96 孔板各孔中加入 180  $\mu\text{L}$  FRAP 工作液与 5  $\mu\text{L}$  样品溶液, 混匀, 37 °C 孵育 5 min, 593 nm 处测定吸光值。以  $\text{FeSO}_4$  为标准品, 根据标准曲线计算样品的 FRAP 值, 以每 100 g 米糠干基中所含  $\text{FeSO}_4$  当量表示, 单位为 mmol  $\text{FeSO}_4$ /100 g DW。

1.3.9 ORAC 抗氧化能力的测定 参考 Zhang 等<sup>[21]</sup>的方法测定。于黑色 96 孔板各孔中加入 20  $\mu\text{L}$  样品溶液、Trolox 标准溶液、没食子酸溶液 (17.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 以及磷酸缓冲液, 37 °C 孵育 10 min; 再每孔加入 200  $\mu\text{L}$  荧光素钠溶液 (0.96  $\mu\text{mol/L}$ ), 37 °C 孵育 20 min 后, 加入 20  $\mu\text{L}$  ABAP 溶液 (119 mmol/L), 荧光酶标仪在激发波长 485 nm, 发射波长 520 nm 条件下连续测定每孔的荧光值, 35 个循环, 每个循环 4.5 min。根据标准曲线计算样品的 ORAC 值, 以每 100 g 米糠样品干重中所含 Trolox 当量表示, 单位为  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g DW}$ 。

## 1.4 数据统计与分析

所有测定重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析和 Duncan's 检验, 米糠发酵前后酚类物质含量及其抗氧化活性比较采用双侧 t 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 米糠固态发酵工艺优化

#### 2.1.1 不同菌种发酵对米糠游离酚含量的影响

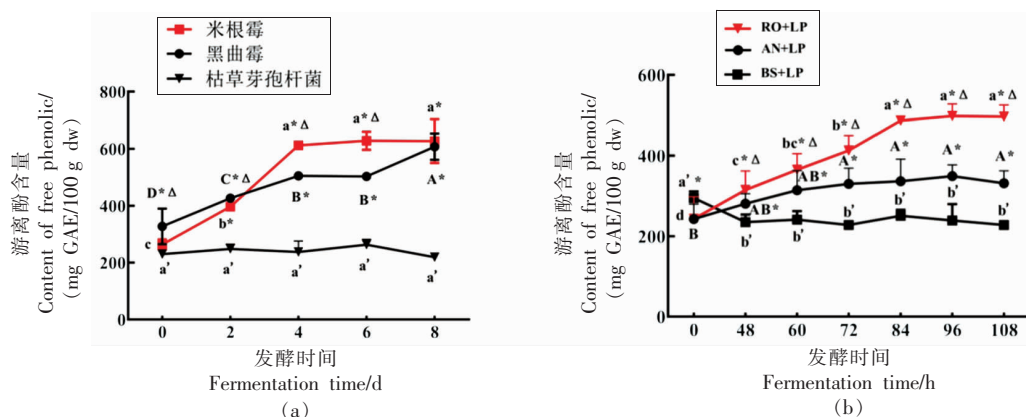
由图 1a 可知, 米糠经米根霉或黑曲霉发酵后游离酚含量显著增加, 而枯草芽孢杆菌发酵对米糠游离酚含量无明显影响。0~8 d 发酵过程中, 米根霉发酵在第 4 天时米糠游离酚含量已达到最高为

612.29 mg GAE/100 g DW,与发酵前相比增加了138.4% ( $P<0.05$ ),后续发酵游离酚含量无显著变化;黑曲霉发酵在第4天时游离酚含量仅增加了55.8% ( $P<0.05$ ),在第8天时增加到最大为607.18 mg GAE/100 g DW,与发酵前相比增加了85.4% ( $P<0.05$ )。表明米根霉和黑曲霉发酵能显著提高米糠游离酚含量,但相比于黑曲霉,米根霉更合适作为米糠发酵菌种。

由图1b可知,米糠经米根霉和植物乳杆菌(RO+LP)、黑曲霉和植物乳杆菌(AN+LP)混合发酵后,游离酚含量亦显著增加;而枯草芽孢杆菌+植物乳杆菌(BS+LP)混合发酵对米糠游离酚含量

仍无明显影响。0~108 h发酵过程中,RO+LP和AN+LP混合菌发酵分别在84 h和72 h时米糠游离酚含量达到最高,分别为486.88 mg GAE/100 g DW和329.72 mg GAE/100 g DW,与发酵前相比增加了104.7%和43.5% ( $P<0.05$ );后续发酵含量均趋于稳定。表明RO+LP发酵增加米糠游离酚含量的效果优于其它两个复合菌种。

对比单一菌种及其与植物乳杆菌混合发酵对米糠中游离酚含量的影响,发现米根霉单独发酵比其与植物乳杆菌混合发酵更有利于米糠中游离酚的增加,因此本研究选择以米根霉单一菌种的发酵方式。



注:RO+LP:米根霉+植物乳杆菌;AN+LP:黑曲霉+植物乳杆菌;BS+LP:枯草芽孢杆菌+植物乳杆菌;不同字母表示同一菌种不同时间具有显著性差异( $P<0.05$ );\*和 $\Delta$ 表示同一时间点不同菌种相比有显著性差异( $P<0.05$ )。

图1 不同单一菌种(a)和复合菌种(b)发酵过程中米糠游离酚含量的影响

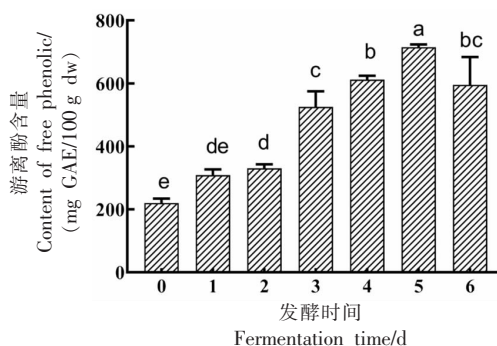
Fig.1 Effect of different single bacteria (a) and complex bacteria (b) fermentation on the content of free phenolics in rice bran

### 2.1.2 不同发酵时间对米糠游离酚含量的影响

在温度为25℃、接种量1%的条件下,考察米根霉不同发酵时间对米糠游离酚含量的影响。如图2所示,米糠游离酚含量随发酵时间的延长呈先增加后减少的趋势。发酵5 d时,米糠游离酚的含量达到最高为715.19 mg GAE/100 g DW,较发酵前增加了225.8% ( $P<0.05$ );发酵6 d时,米糠游离酚含量比发酵5 d时显著降低( $P<0.05$ )。因此最佳发酵时间为5 d。

### 2.1.3 不同发酵温度对米糠游离酚含量的影响

在发酵时间为5 d、接种量1%的条件下,考察米根霉不同发酵温度对米糠游离酚含量的影响。如图3所示,随着发酵温度的升高,发酵米糠中游离酚含



注:不同字母表示各组具有显著性差异( $P<0.05$ ),下同。

图2 发酵时间对米糠游离酚含量的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on the content of free phenolics in rice bran

量呈现先增加后降低的趋势。发酵温度为 30 ℃ 时,游离酚的含量达到最高为 744.88 mg GAE/100 g DW, 与发酵前相比增加了 239.3% ( $P < 0.05$ ), 但与 25 ℃ 和 35 ℃ 发酵米糠中游离酚含量无显著性差异。因此最佳发酵温度为 30 ℃。

**2.1.4 不同接种量对米糠游离酚含量的影响** 在发酵时间为 5 d、发酵温度为 30 ℃ 的条件下, 考察米根霉不同接种量对米糠游离酚含量的影响。如图 4 所示, 随着米根霉接种量的增大, 米糠游离酚的含量呈现先增加后降低的趋势。当接种量为 1% 时, 发酵米糠游离酚含量达到最高为 715.19 mg GAE/100 g DW, 与发酵前相比增加了 131.9%, 显著高于其它接种浓度 ( $P < 0.05$ )。因此最佳接种量为 1%。

## 2.2 最优条件下米根霉固态发酵对米糠酚类物质含量和组成的影响

**2.2.1 发酵对米糠总酚和总黄酮含量的影响** 由图 5 可知, 与 DRB 相比, FDRB 中游离酚和游离黄酮含量均显著增加, 游离酚含量由 287.11 mg GAE/100 g DW 增加到 752.81 mg GAE/100 g DW, 增加了 162.2% ( $P < 0.01$ ); 游离黄酮含量由 734.77 mg CE/100 g DW 增加到 1 163.88 mg CE/100 g DW, 增加了 58.4% ( $P < 0.01$ ); 而两者的结合酚和结合黄酮含量均无显著性差异。FDRB 的总酚含量 (1 067.13 mg GAE/100 g DW) 和总黄酮含量 (1 575.87 mg CE/100 g DW) 均显著高于 DRB 的总酚含量 (667.37 mg GAE/100 g DW) 和总黄酮含量 (1 109.77 mg CE/100 g DW), 发酵后分别提

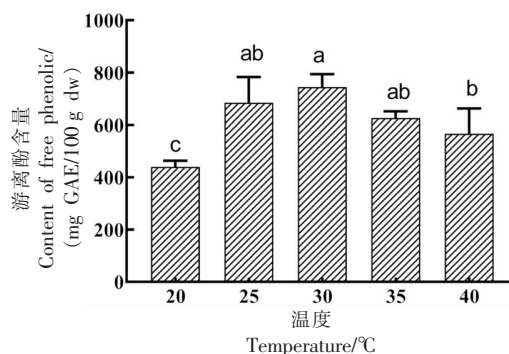


图 3 发酵温度对米糠游离酚含量的影响

Fig.3 Effect of fermentation temperature on the content of free phenolics in rice bran

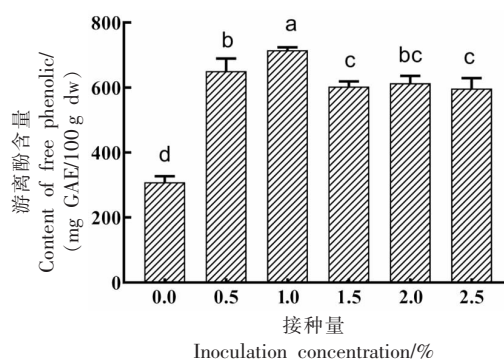
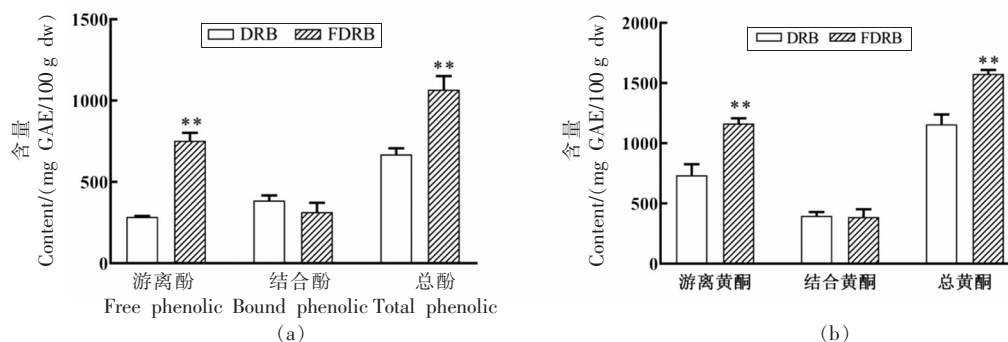


图 4 接种量对米糠游离酚含量的影响

Fig.4 Effect of inoculation concentrations on the content of free phenolics in rice bran

高了 59.9% 和 42.0% ( $P < 0.01$ )。表明米根霉固态发酵能显著促进米糠不可提取的结合态酚类物质的水解与释放。



注: \*\* 表示发酵前后具有极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 下同。

图 5 米根霉固态发酵对米糠总酚(a)和总黄酮(b)含量的影响

Fig.5 Effects of solid fermentation by *Rhizopus oryzae* on the contents of total phenolics (a) and flavonoids (b) in rice bran

2.2.2 发酵对米糠单体酚类化合物含量与组成的影响 从表1中可以看出,与DRB相比,FDRB中游离态没食子酸、原儿茶酸、香草酸、丁香酸和芥子酸含量显著增加( $P<0.05$ ),结合态没食子酸、对羟基苯甲酸、绿原酸和丁香酸含量显著增加( $P<0.05$ ),其中没食子酸含量均增加最多,分别增加了2.44和8.11倍。然而,与DRB相比,FDRB中游离态和结合态阿魏酸含量均显著降低( $P<0.05$ ),

分别下降了55.9%和53.9%。从10种单体酚酸类化合物的总含量来看,发酵后的米糠中没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸及丁香酸的总含量显著增加( $P<0.05$ ),较未发酵米糠分别增加了480.5%,47.1%,87.1%,63.1%,74.7%,咖啡酸、绿原酸、对香豆酸及芥子酸的总含量无显著变化( $P>0.05$ ),而仅阿魏酸总含量显著降低( $P<0.05$ ),较未发酵米糠降低了54.1%。

表1 米根霉固态发酵对米糠单体酚类化合物含量与组成的影响 ( $\mu\text{g/g dw}$ )

Table 1 Effects of solid fermentation by *Rhizopus oryzae* on the composition and contents of individual phenolic compounds in rice bran samples before and after solid fermentation ( $\mu\text{g/g dw}$ )

	游离态		结合态		总量	
	DRB	FDRB	DRB	FDRB	DRB	FDRB
没食子酸	94.43 ± 5.09	325.25 ± 22.63*	67.43 ± 7.45	614.40 ± 63.94*	161.86 ± 11.61	939.65 ± 86.56*
原儿茶酸	77.73 ± 4.67	160.83 ± 13.67*	107.66 ± 4.42	110.31 ± 3.97	185.39 ± 8.89	272.72 ± 17.73*
对羟基苯甲酸	12.13 ± 1.18	10.13 ± 0.97	47.49 ± 7.53	99.66 ± 7.50*	59.62 ± 7.84	111.53 ± 8.75*
香草酸	32.25 ± 2.30	52.59 ± 10.17*	nd	nd	32.25 ± 9.68	52.59 ± 10.17*
咖啡酸	11.46 ± 4.31	7.58 ± 0.48	14.57 ± 7.84	18.38 ± 6.09	26.03 ± 3.78	28.75 ± 2.90
绿原酸	13.00 ± 3.62	13.02 ± 1.70	5.74 ± 0.25	8.75 ± 1.23*	20.83 ± 0.40	21.13 ± 0.18
丁香酸	30.29 ± 2.81	53.90 ± 3.72*	11.79 ± 1.87	19.29 ± 0.99*	42.08 ± 9.81	73.51 ± 2.56*
对香豆酸	117.02 ± 27.33	106.49 ± 9.49	1 101.60 ± 58.68	1 229.15 ± 77.34	1 218.62 ± 31.35	1 322.87 ± 95.31
阿魏酸	94.34 ± 18.13	41.57 ± 1.66*	2 813.47 ± 192.16	1 297.12 ± 126.22*	2 918.25 ± 189.98	1 338.69 ± 124.55*
芥子酸	10.87 ± 0.17	29.51 ± 1.43*	108.00 ± 8.98	113.49 ± 11.95	118.86 ± 9.16	138.50 ± 14.24

注:nd:未检出;\*表示米糠发酵前后具有显著性差异( $P<0.05$ ),下同。

### 2.3 最优条件下米根霉固态发酵对米糠酚类物质抗氧化活性的影响

米根霉固态发酵对米糠酚类物质 ABTS、FRAP 和 ORAC 抗氧化能力影响如图6所示。与DRB相比,FDRB游离态 ABTS、FRAP 和 ORAC 抗氧化能力均显著提高( $P<0.01$ ),分别提高了100.7%,71.3%和67.0%,而两者结合态 ABTS、FRAP 和 ORAC 值无显著性差异( $P>0.05$ ),则FDRB的总 ABTS、FRAP 和 ORAC 抗氧化能力较DRB分别提高了31.0%,20.6%和30.7%。

## 3 讨论

### 3.1 不同菌种发酵对米糠游离态酚类物质含量的影响

米糠中富含具有多种生理活性的酚类物质,但只有少部分以可溶性形式存在,绝大部分以不

溶性形式结合在细胞壁结构中,难以被机体吸收利用<sup>[3-6]</sup>。研究表明,微生物发酵能够提高底物中酚类物质含量,主要是通过分泌胞外酶的酶促作用促使结合态酚类物质被释放,或者通过次级代谢途径产生一些可溶性酚类物质<sup>[22]</sup>。霉菌可分泌纤维素酶、木聚糖酶和蛋白酶等多种降解底物细胞壁的酶,是固态发酵米糠和麸皮等农副产品的优选菌种,如米根霉和黑曲霉<sup>[23-24]</sup>。枯草芽孢杆菌是一种高产纤维素酶的细菌,亦多被用于固态发酵改善农副产品的功能成分和营养品质<sup>[25]</sup>。本研究比较了米根霉、黑曲霉和枯草芽孢杆菌固态发酵过程中米糠游离酚含量的变化,发现米根霉和黑曲霉均能显著增加米糠游离酚含量,与前人研究结果一致<sup>[11-13]</sup>。然而,枯草芽孢杆菌固态发酵对米糠中游离酚含量无影响,其原因可能与枯草芽孢杆菌的适宜生长碳源和产酶动力学特征有关<sup>[26]</sup>。

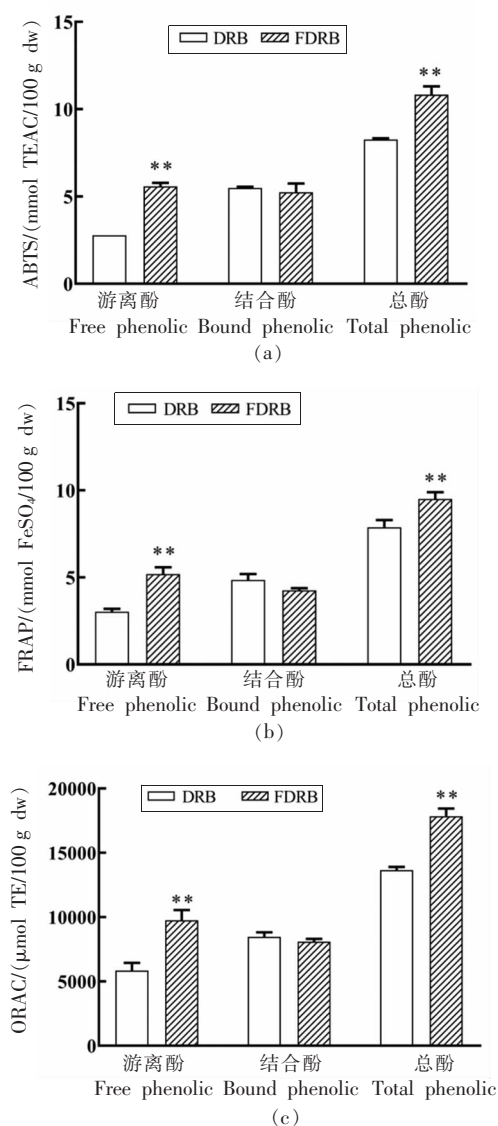


图6 米根霉固态发酵对米糠酚类物质 ABTS(a)、FRAP(b)和 ORAC(c)抗氧化能力的影响

Fig.6 The effects of solid fermentation by *Rhizopus oryzae* on the ABTS (a), FRAP (b) and ORAC (c) antioxidant capacity of phenolics from rice bran

有研究表明, 枯草芽孢杆菌在葡萄糖为碳源的情况下有助于其分泌纤维素酶, 且其分泌纤维素酶的能力在接种 15 h 内较高, 之后酶活力明显降低<sup>[27]</sup>。因此, 本研究以几乎不含还原糖的米糠为底物发酵条件下, 枯草芽孢杆菌的增殖和产酶能力受到了限制, 导致其不能发挥分解米糠膳食纤维来促进结合酚释放的作用。

乳酸菌是一类能利用可发酵碳水化合物产生

大量乳酸的细菌, 在发酵过程中形成多种新的风味物质, 改善产品风味及品质<sup>[28]</sup>。考虑到乳酸菌不具有降解纤维素和淀粉的能力, 本研究分别利用米根霉、黑曲霉和枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌复合发酵米糠, 发现复合发酵降低了米根霉或黑曲霉单菌发酵释放结合酚的能力。推测其原因可能是由于植物乳杆菌竞争消耗米根霉或黑曲霉产生的小分子糖类和氨基酸等营养物质, 导致产生相关降解酶活力下降, 使得结合酚释放量减少。Wu 等<sup>[29]</sup>利用植物乳杆菌与米根霉复合发酵米糠, 发现植物乳杆菌的生长代谢活动依赖于米根霉的存在, 且米根霉菌丝体生长受到抑制, 与本研究一致, 但并未比较米根霉单独发酵及其与植物乳杆菌复合发酵对米糠结合酚释放的影响。另外, 本研究发现米根霉固态发酵释放米糠结合酚的能力显著优于黑曲霉。因此, 本研究选取米根霉作为米糠固态发酵的最佳菌种。

目前, 关于米糠固态发酵工艺优化的研究较少。本研究以米糠游离酚含量为指标, 对米根霉固态发酵时间、温度和接种量进行单因素优化, 确定最优条件为: 时间 5 d, 温度 30 ℃, 接种量 1%。发酵时间是影响发酵效果的重要因素, 本研究发现, 随着时间的延长, 米糠游离酚含量呈先增加后降低的趋势, 这说明微生物发酵并非时间越久越好, 可能是由于发酵后期营养物质的缺乏酚类物质被微生物自身代谢转化成非酚类物质<sup>[30]</sup>。温度亦会影响发酵效率, 低于或高于最适温度均不利于微生物生长, 同时直接影响产酶活性。本研究发现, 米根霉在 30 ℃ 发酵时米糠游离酚含量最高。Ezeilo 等<sup>[31]</sup>研究发现此最适温度下米根霉产纤维素酶、木聚糖酶等活性最高, 可能有助于细胞壁降解而释放出更多的酚类物质。本研究还发现, 超过最佳接种量其游离酚含量却显著降低, 可能是接种量过多导致孢子过度拥挤, 从而限制了产酶能力<sup>[32]</sup>。

### 3.2 米根霉固态发酵对米糠酚类物质含量和抗氧化活性的影响

米根霉发酵后米糠中游离酚含量显著增加, 主要是由于米根霉在发酵中产生多种酶使细胞壁中纤维素和半纤维素有效降解, 进而释放出与其结合的酚类物质<sup>[22]</sup>。然而, 本研究发现, 发酵前后

米糠中结合酚含量无显著性变化,其原因可能在于发酵后米糠的基质结构改变,膳食纤维与结合酚之间的共价键被破坏,使得结合酚被释放或更容易被强碱离子水解提取,而结合酚被释放后降低的负影响与结合酚提取效率增加的正影响相互抵消,导致本研究发酵前后结合酚含量的测定结果无差异<sup>[33]</sup>。因此,米根霉发酵后米糠总酚含量呈显著增加。

米糠中酚类物质以阿魏酸、对香豆酸、原儿茶酸为主要化合物,且大部分以结合态形式存在<sup>[10]</sup>。本研究结果表明,米根霉发酵对米糠中游离态和结合态的单体酚组成及含量均有影响,其中游离态和结合态的没食子酸、原儿茶酸、丁香酸均有所增加。Schmidt等<sup>[23]</sup>亦研究发现米根霉发酵能显著增加米糠中游离态没食子酸、原儿茶酸、丁香酸含量,但该研究未考察结合态酚类化合物的变化情况。然而,值得注意的是,本研究发现发酵后米糠结合态阿魏酸含量大幅减少,而游离态阿魏酸却并未增加,推测其原因可能是因为大量释放的阿魏酸被米根霉代谢转化生成新的未知化合物。Shanker等<sup>[34]</sup>研究表明,米根霉具有很强的阿魏酸代谢转化能力,能够将其代谢为二氢阿魏酸、4-乙烯基-愈创木酚等中间产物,进而转化为香草酸、香草醛和香草乙酮等多种代谢产物。Xie等<sup>[33]</sup>研究也表明,米糠膳食纤维发酵产物中存在二氢阿魏酸、脱氢阿魏酸三聚体等形式。然而,关于米糠发酵产物中这些新生成的化合物的推测有待进一步探究。

酚类物质因其邻苯二酚或邻苯三酚等酚羟基结构而具有较强的自由基清除能力,是植物中天然有效的抗氧化剂<sup>[35]</sup>。研究表明,植物提取物的抗氧化活性与其总酚含量呈正相关<sup>[36]</sup>。本研究采用ABTS、FRAP和ORAC的方法较为全面地评价了米根霉固态发酵前后米糠的抗氧化活性,结果表明,发酵后米糠游离酚的ABTS、FRAP和ORAC抗氧化能力均显著增加,而结合酚的抗氧化活性无明显变化,这与两者游离酚和结合酚含量变化趋势一致。此外,研究表明,不同的单体酚抗氧化活性有所不同,如阿魏酸和对香豆酸与抗氧化活性的相关系数是高于没食子酸、香草酸、咖啡酸和丁香酸的<sup>[37]</sup>。本研究发现,发酵后米糠游离态没食

子酸、原儿茶酸、香草酸、丁香酸、芥子酸含量显著增加,但阿魏酸含量显著降低,这可能是导致发酵后酚类物质抗氧化能力提高幅度远不及其含量增加幅度的原因。因此,在米根霉固态发酵米糠的实际应用中,不仅需要关注酚类物质含量和抗氧化活性变化,还应该兼顾阿魏酸、对香豆酸等高活性物质的释放效率,避免其代谢转化成一些低活性物质,以期实现米糠营养成分的高效利用。

## 4 结论

本研究比较不同菌种固态发酵对米糠游离态酚类物质含量的影响,发现米根霉发酵增加米糠游离态酚类物质含量最为明显,已达到612.29 mg GAE/100 g dw,并通过优化确定出米根霉固态发酵米糠最佳发酵工艺为:发酵时间5 d、发酵温度30℃、接种量1%。在该工艺条件下,发酵后米糠中游离态总酚和总黄酮含量以及ABTS、FRAP和ORAC抗氧化能力分别显著提高了100.7%、71.3%和67.0%,但结合态总酚和总黄酮含量及抗氧化活性无明显影响。因此,米根霉固态发酵不仅能促进米糠中结合态酚类物质的释放,增加米糠总酚含量,同时提高其总抗氧化活性,为开发米糠功能性配料、实现米糠的高值化利用提供新途径。

## 参 考 文 献

- [1] 周显青,杨继红,张玉荣.国内外米糠资源利用现状与发展[J].粮食加工,2014,39(5):24-29.  
ZHOU X Q, YANG J H, ZHANG Y H. Status and prospect of utilization of rice bran resource at home and abroad[J]. Grain Processing, 2014, 39(5): 24-29.
- [2] SHARIF M K, BUTT M S, ANJUM F M, et al. Rice bran: A novel functional ingredient[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2014, 54(6): 807-816.
- [3] LIU L, GUO J J, ZHANG R F, et al. Effect of degree of milling on phenolic profiles and cellular antioxidant activity of whole brown rice [J]. Food Chemistry, 2015, 185: 318-325.
- [4] XIAO J, ZHANG R F, WU Y J, et al. Rice bran phenolic extract protects against alcoholic liver injury in mice by alleviating intestinal microbiota dysbio-



- sis, barrier dysfunction, and liver inflammation mediated by the endotoxin-TLR4-NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(5): 1237-1247.
- [5] ZHANG R F, MA Q, TONG X, et al. Rice bran phenolic extract supplementation ameliorates impaired lipid metabolism in high-fat-diet fed mice through AMPK activation in liver[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 73: 104131.
- [6] ACOSTA-ESTRADA B A, GUTIÉRREZ-URIBE J A, SERNA-SALDÍVAR S O. Bound phenolics in foods, a review[J]. *Food Chemistry*, 2014, 152: 46-55.
- [7] MARTINS S, MUSSATTO S I, MARTÍNEZ-AVILA G, et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(3): 365-373.
- [8] VERNI M, RIZZELLO C G, CODA R. Fermentation biotechnology applied to cereal industry by-products: Nutritional and functional insights[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2019, 6: 42.
- [9] SHIN H Y, KIM S M, LEE J H, et al. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 235-241.
- [10] CHEN Y X, MA Y X, DONG L H, et al. Extrusion and fungal fermentation change the profile and antioxidant activity of free and bound phenolics in rice bran together with the phenolic bioaccessibility [J]. *LWT*, 2019, 115: 108461.
- [11] JAMALUDDIN A, RASHID N Y A, RAZAK D L A, et al. Effect of fungal fermentation on tyrosinase and elastase inhibition activity in rice bran[J]. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2014, 2: 252-256.
- [12] JANARNY G, GUNATHILAKE K D P P. Changes in rice bran bioactives, their bioactivity, bioaccessibility and bioavailability with solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae* [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 23: 101510.
- [13] YIN Z, WU W, SUN C, et al. Comparison of releasing bound phenolic acids from wheat bran by fermentation of three *Aspergillus species* [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(5): 1120-1130.
- [14] 闫星月, 王艳, 王悦, 等. 微生物发酵农副产物特性及其应用研究[J]. *农产品加工*, 2022(2): 62-67. YAN X Y, WANG Y, WANG Y, et al. Characteristics and application of agricultural by-products by microbial fermentation[J]. *Farm Products Processing*, 2022(2): 62-67.
- [15] 冯海燕. 枯草芽孢杆菌 XZI125 改善米糠的功能活性成分并提高其营养价值研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012. FENG H Y. Using bacillus subtilis to improve functional components and nutritional value of rice bran [D]. Nanjin: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [16] WANG M, LEI M, SAMINA N, et al. Impact of *Lactobacillus plantarum* 423 fermentation on the antioxidant activity and flavor properties of rice bran and wheat bran [J]. *Food Chemistry*, 2020, 330: 127156.
- [17] ABD RAZAK D L, ABD RASHID N Y, JAMALUDDIN A, et al. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* [J]. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2017, 16(2): 127-134.
- [18] LIU N, WANG Y, AN X, et al. Study on the enhancement of antioxidant properties of rice bran using mixed-bacteria solid-state fermentation[J]. *Fermentation*, 2022, 8(5): 212.
- [19] TI H H, GUO J J, ZHANG R F, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity in four tissue fractions of whole brown rice[J]. *RSC Advances*, 2015, 5: 101507-101518.
- [20] 卢琦, 贾栩超, 邓梅, 等. 不同干制方式对沙田柚果渣粉活性物质的影响[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(14): 2825-2836. LU Q, JIA X C, DENG M, et al. Effects of different drying methods on bioactive components of shatianyou (*Citrus grandis* L. Osbeck) pomace powder[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(14): 2825-2836.
- [21] ZHANG M W, ZHANG R F, ZHANG F X, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 7580-7587.
- [22] DEY T B, CHAKRABORTY S, JAIN K K, et al. Antioxidant phenolics and their microbial production

- by submerged and solid state fermentation process: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 53: 60–74.
- [23] SCHMIDT C G, GONÇALVES L M, PRIETTO L, et al. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae* [J]. Food Chemistry, 2014, 146: 371–377.
- [24] YIN Z N, WU W J, SUN C Z, et al. Antioxidant and anti-inflammatory capacity of ferulic acid released from wheat bran by solid-state fermentation of *Aspergillus niger*[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2019, 32(1): 11–21.
- [25] MOK W K, TAN Y X, LEE J, et al. A metabolomic approach to understand the solid-state fermentation of okara using *Bacillus subtilis* WX-17 for enhanced nutritional profile [J]. AMB Express, 2019, 9(1): 1–12.
- [26] ONG A, LEE C L K. Cooperative metabolism in mixed culture solid-state fermentation[J]. LWT, 2021, 152: 112300.
- [27] BUFFING M F, LINK H, CHRISTODOULOU D, et al. Capacity for instantaneous catabolism of preferred and non-preferred carbon sources in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1–10.
- [28] 刘磊, 冉玉兵, 张名位, 等. 乳酸菌发酵对脱脂米糠营养成分的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 118–126.
- LIU L, RAN Y B, ZHANG M W, et al. Effect of lactic acid bacteria fermentation on nutritional component of defatted rice bran[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 118–126.
- [29] WU H, LIU H N, MA A M, et al. Synergetic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Rhizopus oryzae* on physicochemical, nutritional and antioxidant properties of whole-grain oats (*Avena sativa* L.) during solid-state fermentation[J]. LWT, 2022, 154: 112687.
- [30] KUPSKI L, CIPOLATTI E, ROCHA M, et al. Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2012, 55: 937–942.
- [31] EZEILO U R, WAHAB R A, MAHAT N A. Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopus oryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation[J]. Renewable Energy, 2020, 156: 1301–1312.
- [32] BENABDA O, MHIR S, KASMI M, et al. Optimization of protease and amylase production by *Rhizopus oryzae* cultivated on bread waste using solid-state fermentation [J]. Journal of Chemistry, 2019, 2019: 3738181.
- [33] XIE J, LIU S, DONG R, et al. Bound polyphenols from insoluble dietary fiber of defatted rice bran by solid-state fermentation with *Trichoderma viride*: Profile, activity, and release mechanism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(17): 5026–5039.
- [34] SHANKER K S, KISHORE K H, KANJILAL S, et al. Biotransformation of ferulic acid to acetovanillone using *Rhizopus oryzae*[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2007, 25(1): 109–112.
- [35] DUDONNE S, VITRAC X, COUTIERE P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(5): 1768–1774.
- [36] SONG F L, GAN R Y, ZHANG Y, et al. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(6): 2362–2372.
- [37] VAN HUNG P. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(1): 25–35.

## Optimization of Solid-State Fermentation Technology and Effect on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Rice Bran

Dong Lihong<sup>1</sup>, Chen Tianmei<sup>2</sup>, Zeng Rong<sup>2</sup>, Zhang Mingwei<sup>1</sup>, Wang Xu<sup>3</sup>, Zhang Ruifen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Sericultural and Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/

Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/

Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610

<sup>2</sup>School of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong

<sup>3</sup>Institute of Quality Standard and Monitoring Technology for Agro-products of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

**Abstract** Defatted rice bran was used as medium materials. By comparing the effects of microbial species, fermentation time, fermentation temperature and inoculation amount on the content of free phenolics in rice bran, the solid state fermentation conditions of rice bran were optimized. The contents of free and bound phenolics and flavonoids in rice bran before and after fermentation were determined, as well as the compositions and contents of individual phenolics and their antioxidant activity were also analyzed. Result: The *Rhizopus oryzae* strain had the strongest fermentation ability of increasing the content of free phenolics to a maximum of 612.29 mg GAE/100 g dw in rice bran. The optimum solid state fermentation conditions of rice bran with *Rhizopus oryzae* were as follows: the fermentation time was 5 days, the fermentation temperature was 30 °C, and the inoculation amount was 1%. Under this condition, the contents of free phenolics and flavonoids in fermented rice bran were 162.2% and 58.4% higher than those in unfermented rice bran, respectively, but there was no significant difference in the contents of bound phenolics and flavonoids in rice bran before and after fermentation. Compared with the unfermented rice bran, the contents of free and bound phenolics changed significantly; Among them, the content of gallic acid had the most increased by 2.44 times and 8.11 times, respectively; The ABTS, FRAP, and ORAC antioxidant capacities of free phenolic in rice bran were significantly increased by 100.7%, 71.3%, and 67.0%, respectively. Conclusion: Solid-state fermentation of rice bran with *Rhizopus oryzae* could significantly improve the release of bound phenolic, increase the content of total phenolics, and enhance the total antioxidant activity.

**Keywords** defatted rice bran; solid-state fermentation of *Rhizopus oryzae*; phenolics; antioxidant activity