姬松茸固态发酵对小麦多酚的影响

马茹男 濯飞红 刘红艳 韩建荣^{*} (山西大学生命科学学院 山西太原 030006)

摘 要: 为研究姬松茸固态发酵对小麦多酚的影响并初步探索其代谢机理 对姬松茸固态发酵后小麦的多酚物质(游离态多酚、结合态多酚和总酚) 含量和 3 种碳水化合物水解酶(纤维素酶、 α -淀粉酶和 β -葡萄糖苷酶) 酶活性进行了测定 ,并对它们之间的关系进行了研究。结果表明,游离态多酚和总酚含量随发酵时间的延长而增加,均在发酵 30 d 时达到最大,分别为 3.121 mg/g 和 3.207 mg/g。结合态多酚含量随发酵时间的延长而降低。纤维素酶和 α —淀粉酶的酶活性随发酵时间的延长而增加,在发酵第 20 d 达到最大,之后逐渐降低。 β —葡萄糖苷酶的酶活在 $5\sim30$ d 的发酵时间内一直随发酵时间延长而增加。3 种酶对结合态多酚从细胞壁释放出来起重要作用。

关键词: 姬松茸 小麦 多酚 碳水化合物水解酶

Effect of solid-state fermentation with Agaricus blazei on polyphenols of wheat

MA Ru-nan ZHAI Fei-hong LIU Hong-yan HAN Jian-rong

(School of Life Science Shanxi University Taiyuan 030006 China)

Abstract: To investigate the effect of solid state fermentation with *Agaricus blazei* on polyphenol of wheat and explore the mechanism of polyphenol metabolism ,the contents of free polyphenols ,bound polyphenols and total polyphenols after solid–state fermentation (SSF) by *Agaricus blazei* and the carbohydrates hydrolases enzymes activities of fermented products were determined. As well as the correlations between these enzyme activities and polyphenols contents in fermented products were analyzed. This study indicated that the contents of free and total polyphenols increased with the prolonging of fermentation time. In contrast ,the contents of bound polyphenols decreased. The activities of cellulase and α – amylase increased as the time increase initially and decreased afterwards and reached the maximum at 20 d. The activities of β –Glucosidase kept growing in 5~30 days. The carbohydrates hydrolases plays an important role in releasing of bound polyphenols from cell wall.

Key words: Agaricus blazei; wheat; polyphenols; carbohydrates hydrolases

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A

文章编号:1002-0306(2017)03-0156-04

doi: 10. 13386/j. issn1002 - 0306. 2017. 03. 021

近年来,全谷物作为一种新的养生概念愈来愈受到关注。全谷物的摄入有助于降低心脏病,胃肠道癌症,糖尿病的风险,防止虚胖,增强抵抗力。全谷物之所以具备这些保健功能,与其含有丰富的酚类化合物密切相关[1]。有研究表明,全谷物中含有大量的多酚类化合物。包括酚酸、黄酮类化合物和原花青素等,具有很强的抗氧化活性[2-3]。根据其与蛋白质、糖类等的结合程度分为结合型多酚和游离型多酚[4]。这些酚类化合物多集中在胚芽、麸、糠部位,而在胚乳部含量较少不利于人体消化吸收利用[1-5]。传统的食用习惯是对谷物精制脱皮,使得大部分多酚化合物在加工过程中随种皮分离损失掉。有报道称[6-9] 利用碳水化合物水解酶的水解作用,使谷物细胞壁分解,各种活性物质释放或合成,能提高多酚的得率。

小麦是人们日常生活中最重要的谷物之一,它的 麸、糠部位不仅是膳食纤维的重要来源 更是富含酚酸 类化合物,包括香草酸、香豆酸、阿魏酸等[47]。

姬松茸(Agaricus blazei Murrill) 又名巴西蘑菇 ,是一种珍稀的食药兼用真菌 $^{[10]}$ 。因其含有甾醇 ,多糖等功效成分 在防癌、抗肿瘤、降低血糖等方面具有显著效果 $^{[11]}$ 。目前 利用食用菌菌丝体在谷物上发酵的研究尚少 $^{[12]}$ 。本实验利用姬松茸对小麦进行固态发酵 ,研究姬松茸固态发酵对小麦游离态多酚、结合态多酚、总酚含量的影响 ,并对发酵产物的 α - 淀粉酶、纤维素酶和 β - 葡萄糖苷酶酶活进行测定 ,探索这 3 种碳水化合物水解酶与结合态多酚的关系。旨在研究姬松茸固态发酵对小麦多酚的影响并初步探索其代谢机理 ,为开发新的食药兼用的粗粮发酵食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

姬松茸(Agaricus blazei) SH26 菌株由本实验室

收稿日期:2016-08-01

作者简介: 马茹男(1993-) ,女 .硕士研究生 .研究方向: 微生物资源与生态 .E-mail: 15735175948@163.com。

^{*} 通讯作者: 韩建荣(1959-) 男 博士 教授 研究方向: 微生物资源开发利用 Æ-mail: hjr@ sxu.edu.cn.

Vol.38, No.03, 2017

提供 小麦从市场上购买。

没食子酸 Sigma 公司; 福林酚 北京索莱宝科技有限公司; 石油醚; 甲醇; 乙酸乙酯; 氢氧化钠; 3,5-二硝基水杨酸(DNS); 酒石酸钾钠; 结晶酚; 亚硫酸钠; 可溶性淀粉; 对硝基苯酚; 对硝基苯基- β -D- 吡喃葡萄糖苷(pNPG) 。

生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 电热鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 水浴锅 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 低速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 谷物培养基的制备及固态发酵

准确称取 400 g (干重)除去谷壳和石子等杂质的小麦,在沸水中煮至无白心,沥干水分,摊开晾干至不沾手(水分含量约 40%),然后加 6 g 石膏,混匀 平均分装至 6 个罐头瓶,塑料膜封口,121 % 灭菌 30 min。

待培养基冷却后,将活化后的姬松茸葡萄糖马铃薯琼脂培养基(PDA)斜面菌种切成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的小块接种至小麦培养基中(不接种的作为对照),每瓶接入3块,置于25°C下培养。在菌丝长满后的第 $5 \times 10 \times 15 \times 20 \times 30$ d 时分别取出。

1.3 多酚含量的测定

样品中游离态多酚与结合态多酚类化合物的提取采用文献[13 3]的方法。

1.3.2 游离态多酚的提取 准确称取 5 g 干燥粉碎的样品,石油醚索氏抽提去脂。以 1:8(g/mL) 加入 1% HCl-甲醇溶液,于摇床中 25 % ,130 r/min 振荡提取 24 h,然后 4000 r/min 离心 8 min,收集上清,残渣复提。二次提取完成后,合并上清。测定游离态多酚的含量。

1.3.3 结合态多酚的提取 将游离态多酚提取后所得的残渣 40 ℃烘干后称重。加入 20 mL 2 mol/L NaOH ,置于摇床中于 25 ℃ ,130 r/min 振荡 1 h 进行消化处理 ,然后用浓 HCl 将其 pH 调至 2 加入 10 mL 乙酸乙酯 静置 10 min 后 4000 r/min 离心 8 min ,收集乙酸乙酯部分。将收集到的溶液 40 ℃旋转蒸发至干 ,甲醇定容至 10 mL。测定结合态多酚的含量。1.3.4 多酚含量的测定 多酚含量测定根据 Folin—Cioncalteu 比色法[14]。采用没食子(0~0.1 mg/mL) 为标准品绘制标准曲线。所得标准曲线的线性回归方程为: y = 7.1671x - 0.0035 ,相关系数 $R^2 = 0.9998$ 。所得多酚含量结果为干基含量。

1.4 酶活性测定

1.4.1 酶的提取 取 1 g 的小麦固态发酵产物 放置于冰预冷的研钵中 加入 $5\sim10$ mL 蒸馏水 迅速将其研磨成匀浆 ,然后将匀浆转入离心管中 ,4 $^{\circ}$ C 下 12000 r/min 离心 10 min ,取上清液作为 α -淀粉酶 ,纤维素酶的提取液。 β -葡萄糖苷酶的提取是以

pH4.6 ρ.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液作为提取剂 ,方法 同 α– 淀粉酶 纤维素酶的提取。

1.4.2 纤维素酶酶活性测定 取1 cm×6 cm 滤纸条1 个置于试管中,加入 0.5 mL 粗酶液,再加 1.5 mL 0.1 mol/L pH4.4 柠檬酸缓冲液,于 50 ℃水浴准确保温1 h 取出后立即加入1 mL DNS,置于沸水中显色5 min。迅速冷却后,加入9 mL 蒸馏水,于 540 nm 处测吸光度值^[15]。每小时每克发酵产物(湿重)水解产生1 微摩尔葡萄糖的酶量为1单位。DNS 试剂具体制备方法及缓冲液配制方法参照文献。

1.4.3 α -淀粉酶酶活性测定 α -淀粉酶酶活性测定 参照陈钧辉等的方法 [16] 进行。取 1% 可溶性淀粉溶液 0.5 mL (用 pH6.9 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液配制内含 6.7 mmol/L NaCl) ,加入 0.5 mL 酶的粗提液 , 25 °C 准确保温 3 min ,立即加入 3 5 – 二硝基水杨酸显色剂 1 mL ,于 100 °C 水浴沸腾 5 min 后冷却 ,加蒸馏水定容到 10 mL ,于 540 nm 处测吸光度值。每小时每克发酵产物(湿重) 水解产生 1 微摩尔麦芽糖的酶量为 1 单位。

1.4.4 β -葡萄糖苷酶酶活性测定 采用 pNPG 法测定 β -葡萄糖苷酶酶活性^[17]。采用对硝基苯酚为标准品($0.01\sim0.1~\mu mol/mL$) 绘制标准曲线。所得标准曲线的线性回归方程为: y=13.707x-0.0455~相关系数 $R^2=0.9773$ 。每小时每克发酵产物(湿重) 水解产生 1 微摩尔对硝基苯酚的酶量为 1 单位。

1.5 统计学分析

实验数据均为 3 次重复所得,数据图中用误差棒表示标准差,数据经 Microsoft Excel 处理并作图,采用 Spss17.0 统计软件对数据进行差异显著性检验 (p < 0.05)。

2 结果与分析

2.1 发酵对小麦多酚含量的影响

由图 1 可知 小麦经姬松茸固态发酵后 ,其游离态多酚含量 结合态多酚含量 ,总酚含量都随发酵时间的变化而变化。所测未发酵小麦提取物中的游离态多 酚含量为 1.093 mg/g ,结合态多酚含量为 0.572 mg/g ,总酚含量为 1.665 mg/g ,这与 Bhanja 等[7] 测得的多酚含量结果一致。之后 随着发酵时间的延长 结合态多酚的含量逐渐降低 ,而游离态多酚的含量逐渐增加 ,总酚含量在发酵第 5 d 时略有降低 ,之后也随着发酵时间的延长而增加。在发酵时间达到 30 d 时 ,小麦提取物的总酚含量和游离态多酚含量达到最高 ,分别为 3.207 mg/g ,3.121 mg/g ,为对照的 1.926 倍和 2.855 倍。而结合态多酚含量在发酵 30 d 时最低 ,为 0.087 mg/g ,降低了 85%。在发酵过程中 结合态多酚含量一直低于游离态多酚含量。

图 1 的结果表明,小麦经姬松茸发酵后游离态多酚和总酚含量显著提高(p < 0.05),而结合态多酚随发酵时间延长逐渐减少(p < 0.05)。结合态多酚是谷物中主要的多酚存在形式[$^{[8-19]}$],可通过碱、酸或酶处理使其释放出来。本实验由于姬松茸在发酵过程中的代谢活动使得小麦细胞壁分解,使得与蛋白质、纤维素、果胶等共价结合的多酚释放出来,导致了游

Science and Technology of Food Industry

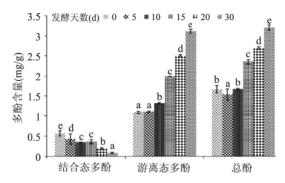


图 1 姬松茸固态发酵后小麦的多酚含量测定结果

Fig.1 The contents of free polyphenols bound polyphenols and total polyphenols of wheat fermented by *Agaricus blazei*

注: 带有不同字母的每组数据 之间差异显著(p<0.05) 图 2 同。

离态多酚和总酚含量的显著提高。

2.2 发酵对酶活性的影响

由图 2 可知 ,发酵产物的纤维素酶酶活、 α -淀粉酶酶活和 β -葡萄糖苷酶酶活均随发酵时间的变化而变化。 β -葡萄糖苷酶酶活随着发酵时间的延长 ,酶活性增强(p<0.05) ,且一直低于同水平的纤维素酶和 α -淀粉酶的酶活。纤维素酶酶活随发酵时间的延长而增加(p<0.05) ,在发酵第 20 d 时达到最大 ,为 150.900 U/g ,之后开始降低 ,在发酵 30 d 时酶活为 59.502 U/g。同样 , α -淀粉酶酶活也在发酵第 20 d 时达到最大 ,为 80.100 U/g。

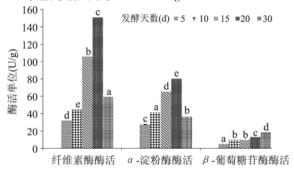


图 2 姬松茸固态发酵后小麦的酶活

 ${\bf Fig. 2} \quad {\bf Enzymes \ activities \ of \ wheat \ fermented \ by \ } {\it Agaricus \ blazei}$

经计算得出姬松茸固态发酵后小麦的游离态多酚含量在 $0\sim5$ d 增长了 1.13% ,在 $5\sim10$ d 增长了 1.15% ,在 $10\sim15$ d 增长了 50.97% 在 $15\sim20$ d 增长了 52.01% 在 $20\sim30$ d 增长了 24.42%。可以看出,发酵时间从 $0\sim20$ d ,游离态多酚含量的增长量都在增加,而 $20\sim30$ d 增长量降低为 24.42% ,同纤维素酶活、 α —淀粉酶的酶活性变化一致,在酶活性较高时增长量增加,反之,亦然。图 2 的结果表明 3 种碳水化合物水解酶在姬松茸固态发酵过程中产生且随发酵时间而变化 α —淀粉酶、纤维素酶、 β —葡萄糖苷酶作用于小麦释放多酚,使得游离态多酚含量增加。据报道 β —葡糖糖苷酶能催化连接在烷基和苯基— β —0—葡萄糖苷之间的糖苷键释放酚苷部分(20)0。

3 结论

姬松茸固态发酵能显著提高小麦的总酚含量和游离态多含量,最高可达 3.207、3.121 mg/g。在发酵

过程中,纤维素酶、 α -淀粉酶和 β -葡萄糖苷酶降解 小麦细胞壁上的化学成分,导致与细胞壁结合的多酚酯键的水解和木质素的氧化降解,从而使结合态多酚释放转变为易于被人体吸收利用的游离态多酚。

然而,发酵过程并不只是促进结合态多酚释放,还存在若干种多酚代谢途径,如甲基化、糖基化、去糖基化、硫酸盐共轭、糖酯化等,这些途径均可获得多酚^[20-21]。另外,植物中苯丙烷代谢途径是多酚合成的重要途径^[22-23],发酵过程是否会对谷物的苯丙烷代谢途径产生影响,从而影响多酚含量值得更进一步的研究。

参考文献

- [1]李富华 郭晓晖 夏春燕 等.全谷物酚类化合物抗氧化活性研究进展[J].食品科学 2012 33(13):299-304.
- [2]张慧芸 陈俊亮 康怀彬 .发酵对几种谷物提取物总酚及 抗氧化活性的影响 [J].食品科学 2014 35(11):195-199.
- [3]翟玮玮、侯会绒、孙兆远、四种谷物中多酚含量的测定及抗氧化特性研究[J]、食品工业科技 2012 33(24):150-153.
- [4] Masisi K Beta T Moghadasian M H.Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Food Chemistry 2016, 196: 90–97.
- [5] Liyana Pathirana C M ,Shahidi F. Importance of insoluble bound phenolics to antioxidant properties of wheat [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry 2006 54(4):1256–1264.
- [6] Hwang I W Chung S K.Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes [J]. Journal of Zhejiang Universityence B 2009, 10(12):912-919.
- [7]Bhanja T ,Kumari A ,Banerjee R.Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi [J]. Bioresource Technology ,2009 ,100 (11): 2861–2866.
- [8] Lafiandra D ,Riccardi G ,Shewry P R. Improving cereal grain carbohydrates for diet and health [J]. Journal of Cereal Science , 2014 59(3):312–326.
- [9] Yadav G Singh A Bhattacharya P et al. Comparative analysis of solid state bioprocessing and enzymatic treatment of finger millet for mobilization of bound phenolics [J]. Bioprocess & Biosystems Engineering 2013 36(11):1563–1569.
- [10]张卉,刘长江.姬松茸(*Agaricus blazei* Murill) 生理活性物质的研究进展[J].沈阳农业大学学报 2003 34(1):59-62.
- [11]林戎斌 林陈强 涨慧 ,等 .姬松茸食药用价值研究进展 [J].食用菌学报 2012 ,19(2):117-122.
- [12]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.
- [13] Chethan S, Malleshi N G. Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability [J].Food Chemistry 2007, 105(2):862-870.
- [14]翟飞红 汪琪 ,刘艺 ,等 .姬松茸固态发酵对谷物主要营 (下转第 165 页)

Vol.38,No.03,2017

说明模型预测效果良好。

3 结论

本文以海水中分离出的 5 株创伤弧菌为实验菌株 基于 MKB 培养基,筛选出其中铁载体活性单位最高的 V.vulnificus Y8 菌株进行响应面优化并得到最佳诱导条件,同时结合实际优化条件,得到优化条件:分别以乳糖和酵母浸出粉作为碳氮源且碳氮比3、初始 pH8 及装液量 82 mL。对于 MKB 培养基,优化前的参数:以甘油和蛋白胨作为碳氮源且碳氮比为 1、初始 pH6.8~7.0 及装液量 100 mL,得出的平均铁载体活性单位为 69.95%。经过优化后的实验验证 V.vulnificus Y8 的 平均铁载体活性单位为89.676% 较优化前提高了23.73%。利用响应面法优化创伤弧菌产铁载体诱导条件,实现了铁载体的高效诱导,解决了传统培养基诱导率不高,联铁物质毒性大,不利于广泛使用等问题,为日后的铁载体进一步研究奠定基础。

参考文献

- [1]武静 浏晓斐 胡成进 等 创伤弧菌流行病学调查及致病机制研究现状[J].医学研究杂志 2015 ,14(3):166-168.
- [2] Tan W Z, Verma V k, Jeong K J, et al.Molecular characterization of vulnibactin biosynthesis in *Vibrio vulnificus* indicates the existence of an alternative siderophore [J]. Frontiers in Microbiology 2014 5(1):1-11.
- [3] Kim S M Park J H Lee H S et al.LuxR Homologue SmcR is Essential for *Vibrio vulnificus* Pathogenesis and Biofilm Detachment and its Expression is induced by Host Cells [J]. Infection and Immunity 2013 β 1(10):3721–3730.
- [4] Ledala N ,Pearson S L ,Wilkinson Brian J ,et al.Molecular characterization of the Fur protein of *Listeria monocytogenes* [J]. Microbiology 2007, 153(4):1103-1111.
- [5] Maurice P A ,Haack EA ,Mishra B.Siderophore sorption to clays [J].Biometals 2009 22(4):649-658.
- [6]李梅青 涨瑜 代蕾莉 筹.Plackett-Burman 实验设计及响应面法优化超声辅助提取明绿豆 SOD 工艺[J].食品科学, 2015 36(2):69-74.
- [7] Scher F M, Baker R.Effect of Pseudomonas putida and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens [J]. Phytopathology, 1982, 72 (7): 1567

-1573.

- [9] Rachid D ,Ahmed B.Effect of iron and growth inhibitors on sidorophores production by *Pseudomonas fluorescens* [J]. African Journal of Biotochnology 2005 A(7): 697–702.
- [10] Lin Y ,Du D L ,Si C C ,et al. Potential biocontrol Bacillus sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers [J]. Biological Control 2014 71:7-15.
- [11] Kawano H, Miyamoto K, Sakaguchi I, et al. Role of periplasmic binding proteins ,FatB and VatD ,in the vulnibactin utilization system of Vibrio vulnificus M2799 [J]. Microbial Pathogenesis 2013 65:73–81.
- [12] Kim I H, Wen Y C, Son J S, et al. The Fur-Iron Complex Modulates Expression of the Quorum-Sensing Master Regulator, SmcR, To Control Expression of Virulence Factors in Vibrio vulnificus [J]. Infection and Immunity, 2013, \$1(8):2888-2898.
- [13] Tanabe T, Kato A, Shiuchi K, et al.Regulation of the Expression of the Vibrio parahaemolyticus peuA Gene Encoding an Alternative Ferric Enterobactin Receptor [J].PLOS ONE, 2014 9(8):1-13.
- [14]朱慧明 涨彦 杨洪江.高产铁载体假单胞菌的筛选及其对铁氧化物的利用[J].生物技术通报 2015 31(9):177-182. [15]陈绍兴.细菌铁载体检测方法[J].红河学院学报 2005 3 (6):16-18.
- [16]王卫星 周晓伦,李忠玲,等.CAS 平板覆盖法检测氢氧化细菌铁载体[J].微生物学通报 2014 41(8):1692-1697.
- [17] Lee J Postmaster A Soon H P et al. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia [J]. Biometals 2012 25(2):285-296.
- [18]赵翔,陈绍兴,谢志雄,等.高产铁载体荧光假单胞菌 Pseudomonas fluorescens sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究 [J].微生物学 2006 46(5):691-695.
- [19]郭磊 吴鹤云,张成林,等.利用响应面法优化枯草芽孢杆菌产尿苷发酵培养基[J].食品与发酵工业,2015,41(6):94-98.
- [20] 邓曦 唐书泽 ,周鹏飞 ,等 .创伤弧菌的优化培养及快速检测 [J].食品工业科技 2014 35(6):197-201.

(上接第158页)

养成分的影响[J].食品工业科技 2015 36(6):212-215.

- [15] 周慧敏 李亚鹏 起妍 ,等 .草菇纤维素酶活力测定条件确定及应用分析 [J].上海农业学报 2014 30(4):89-92.
- [16]陈钧辉 李俊 张太平 等.生物化学实验[M].北京:科学出版社 2014.
- [17] 张卓 陈晓平 . 荞麦中 β 葡萄糖苷酶提取条件的研究 [J]. 食品与发酵科技 2010 A6(6): 19-21.
- [18] Vaher M Matso K Levandi T et al. Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran flour and whole grain of different wheat varieties [J]. Procedia Chemistry ,2010 ,2 (1): 76–82.
- [19] Acosta-Estrada B A "Gutiérrez-Uribe J A "Serna-Saldívar S O.Bound phenolics in foods "a review [J]. Food Chemistry 2014,

152(6):46-55.

- [20] Huynh N T ,Van C J ,Smagghe G ,et al.Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: A review [J]. International Journal of Molecular Sciences ,2014 ,15 (11): 19369–19388.
- [21] Cho K M ,Su Y H ,Math R K ,et al. Biotransformation of phenolics (isoflavones ,flavanols and phenolic acids) during the fermentation of cheonggukjang by *Bacillus pumilus* HY1 [J]. Food Chemistry 2009, 114(2):413–419.
- [22]欧阳光察 薜应龙 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J].植物生理学报 ,1988 24(3):9-16.
- [23] 翟玮玮. 萌发谷物中多酚类物质与苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品工业科技 2010 31(8): 370-372.