

# 米糠固态发酵工艺优化及其氨基酸变化

## Effect of solid-state fermentation on the ingredients of rice bran

尹孝超 钱海峰 王立 张晖 齐希光

YIN Xiao-chao QIAN Hai-feng WANG Li ZHANG Hui QI Xi-guang

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**摘要:**对米糠进行固态发酵,研究其蛋白、脂肪、灰分和总糖含量的变化规律,以期找到一种有效深度开发米糠资源的方法。结果表明:蛋白和灰分含量相比于发酵前明显增加,脂肪和总糖含量随着发酵时间的延长逐渐降低。以真蛋白含量为响应值,对固态发酵条件进行响应面辅助优化,确定最佳发酵条件为温度 37℃,时间 102 h,水分含量 60%,初始 pH 5.5,接种量 20 mL/100 g,发酵米糠的真蛋白含量 19.65%,比原米糠提高了 41.88%。此外,对米糠的氨基酸组成进行分析,蛋氨酸和苏氨酸占总氨基酸含量分别提高了 73.92% 和 22.99%。

**关键词:**固态发酵;米糠;黑曲霉

**Abstract:** In this paper, the changes of protein, lipid, ash and total sugar of rice bran after solid-state fermentation were studied for deep development of rice bran resources. The results showed that the contents of protein and ash increased significantly after fermentation. Moreover, the contents of lipid and total sugar decreased gradually with fermentation time. The optimized fermentation condition was: 37℃, 102 h, moisture content of 60%, initial pH 5.5, inoculation amount of 20 mL/100 g, with the true protein content as the response value. In this condition, the true protein content of fermented rice bran was 19.65%, increased 41.88% compared with the raw rice bran. In addition, the results of amino acid analysis showed that the contents of methionine and threonine were increased by 73.92% and 22.99% respectively compared with the original rice bran.

**Keywords:** Solid-state fermentation; Rice bran; *Aspergillus niger*

米糠是稻谷在加工过程中产生的副产品,是由糙米经碾米获得的,包含种皮、果皮、胚乳和糊粉层等。中国年产稻米超过  $2.0 \times 10^8$  t,米糠产量在  $1.2 \times 10^7$  t 左右,因此米糠资源非常丰富<sup>[1]</sup>。米糠中含有丰富的营养物质,蛋白含量 12%~

16%,脂肪 16%~22%,纤维含量 8%~12%<sup>[2]</sup>,以及维生素、多糖等生理活性物质。其中米糠蛋白的营养价值可与动物蛋白相媲美,可溶性蛋白约占总米糠的 70%,具有低过敏性,其氨基酸组成与 FAO/WHO 的推荐模式相接近<sup>[3-6]</sup>。米糠蛋白虽然营养价值高,但是天然米糠中的蛋白质与纤维素、半纤维素、植酸钙等物质结合紧密,不易被利用<sup>[7]</sup>。而且米糠蛋白的提取和分离纯化难度大,限制了米糠蛋白的工业化生产和应用<sup>[8]</sup>。在中国,米糠利用还停留在初级阶段,被直接作为畜禽饲料,消化利用率低,导致米糠资源未能得到深度开发。近年来,随着对米糠资源的开发,米糠油、米糠多肽、米糠多糖等产品陆续出现,米糠资源的开发利用越来越受到研究者的重视。

固态发酵产品的优点突出,例如:①将植物蛋白转变成优质的菌体蛋白<sup>[9]</sup>;②生产效率高,不受自然条件限制<sup>[10]</sup>;③能够调节动物肠道菌群结构,有助于改善消化系统<sup>[11]</sup>;④包含多种酶系,有利于消化吸收<sup>[12]</sup>;⑤设备简单,投资少等<sup>[13]</sup>。黑曲霉菌株产生的酶系丰富且酶活高,如淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶等,且生长速度快,是公认的无毒无害菌株<sup>[14]</sup>。目前,国内外对于固态发酵米糠的研究主要集中在静态发酵米糠提取生理活性物质方面,对于发酵米糠中蛋白质的富集优化鲜有报道。试验中的翻料可以起到降低物料温度的作用,同时黑曲霉是好氧真菌,翻料可以促进体系中气体的交换,更加有利于发酵的进行。

本试验采用黑曲霉菌株固态发酵米糠,研究米糠成分在固态发酵过程的变化,并对发酵米糠中的蛋白富集进行响应面优化试验,旨在制得一种高蛋白发酵米糠产品,以及为今后米糠在固态发酵方面的深度开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑曲霉(*Aspergillus niger* F0045):江南大学微生物菌种保藏中心;

察氏培养基(活化培养基):蔗糖 30 g, NaNO<sub>3</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g,

**基金项目:**十二五 863 计划(编号:2013AA102203-07)

**作者简介:**尹孝超,男,江南大学在读硕士研究生。

**通信作者:**钱海峰(1973—),男,江南大学副教授,博士。

E-mail: qianhaifeng@jiangnan.edu.cn

**收稿日期:**2017-01-04

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL,调 pH 至 7.2;

稳定化未脱脂米糠:真蛋白含量 13.85%,脂肪含量 16.71%,灰分含量 7.01%,总糖含量 342.33 mg/g,益海嘉里粮油食品有限公司,过 40 目筛,贮藏于-20 ℃冰箱中;

试验所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

消解仪:HYP-1008 型,济南海能仪器股份有限公司;

全自动凯氏定氮仪:K9860 型,济南海能仪器股份有限公司;

霉菌培养箱:BMJ-160 型,上海博迅实业有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州安泰空气净化技术有限公司;

氨基酸专用高效液相色谱仪:Agilent1260 型,日本岛津公司;

立式压力蒸汽灭菌器:YXQ-LS-50 SII 型,上海博迅实业有限公司;

分析天平:BSA224S 型,梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司;

鼓风干燥箱:DHG-9055A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

pH 计:STARTER3100/F 型,梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵米糠菌种的制备 取保存的黑曲霉斜面菌种一环,接种到试管斜面培养基上,于 28 ℃下培养 6 d,待斜面长满黑色孢子后,用无菌蒸馏水洗涤斜面,用接种环轻轻刮下孢子,收集孢子悬液,用无菌纱布过滤。用血球计数板计数,至少计数 3 次,取相近的 3 个值的平均值作为孢子浓度。调整孢子悬液浓度在 4.0×10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>。

1.3.2 发酵米糠的方法 称取稳定化米糠 10 g 于 250 mL 三角瓶中,加入蒸馏水调整基质水分含量至 60%,瓶口用八层纱布覆盖。放入灭菌罐 121 ℃,20 min。灭菌完后取出,冷却。加入 5 mL 已灭菌的营养液(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L,MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L,NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> 5 g/L 溶于 0.4 mol/L 的 HCl 中<sup>[15]</sup>)和 2 mL 孢子悬液,搅拌均匀。放置于 34 ℃霉菌培养箱中,保持湿度 90%,每隔 24 h 翻料和补水 3 mL 一次。发酵 72 h 后,置于 60 ℃烘箱烘干至恒重,保存待测。

1.3.3 发酵米糠的成分测定方法 发酵米糠中的真蛋白含量测定参照胡艳丽<sup>[16]</sup>方法进行,用凯氏定氮法测定真蛋白含量(蛋白转换系数设为 6.25)。脂肪、灰分和总糖含量的测定分别按 GB/T 14772—2008、GB 5009.4—2016 和 GB/T 15672—2009 执行。

水解氨基酸含量测定:称量 100.0 mg 样品放入 50 mL 水解管中,加入 8 mL 6 mol/L HCl 溶液,充氮气封管,放入 120 ℃烘箱中水解 22 h,水解完全后冷却,加入 4.8 mL 10 mol/L NaOH 溶液中和并用蒸馏水定容至 25 mL,双层滤纸过滤后,取 1 mL 滤液 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 400 μL 上机进样。

1.3.4 固态发酵对米糠成分的影响 研究固态发酵对米糠中蛋白、脂肪、灰分和总糖含量的影响。选择在温度 34 ℃、

接种量 20 mL/100 g 米糠、初始 pH 5.5 和初始水分含量 60%的条件下进行米糠固态发酵,发酵结束后,将样品放入 60 ℃烘箱烘干至恒重,保存待测。测定方法见 1.3.3。

1.3.5 发酵条件的单因素试验设计

(1) 发酵温度:在接种量 1 mL,发酵时间 96 h,装料量 10 g,初始 pH 5.5,初始水分含量 50%的条件下,考察发酵温度(28,31,34,37,40 ℃)对发酵米糠真蛋白含量的影响。

(2) 接种量:在发酵温度 28 ℃,发酵时间 96 h,装料量 10 g,初始 pH 5.5,初始水分含量 50%的条件下,考察接种量(1,2,3,4,5 mL)对发酵米糠真蛋白含量的影响。

(3) 发酵时间:在发酵温度 28 ℃,接种量 1 mL,装料量 10 g,初始 pH 5.5,初始水分含量 50%的条件下,考察发酵时间(48,72,96,120,144 h)对发酵米糠真蛋白含量的影响。

(4) 装料量:在发酵温度 28 ℃,接种量 1 mL,发酵时间 96 h,初始 pH 5.5,初始水分含量 50%的条件下,考察装料量(10,15,20 g)对发酵米糠真蛋白含量的影响。

(5) 初始 pH:在发酵温度 28 ℃,接种量 1 mL,发酵时间 96 h,装料量 10 g,初始水分含量 50%的条件下,考察初始 pH(5.0,5.5,6.0,6.5,7.0)对发酵米糠真蛋白含量的影响。

(6) 初始水分含量:在发酵温度 28 ℃,接种量 1 mL,发酵时间 96 h,装料量 10 g,初始 pH 5.5 的条件下,考察初始水分含量(40,50,60,70,80%)对发酵米糠真蛋白含量的影响。

1.3.6 Plackett-Burman 试验设计 在单因素结果分析的基础上,利用 Design-Expert.8.0.5 软件,设计 Plackett-Burman (PB)试验,以初始 pH、装料量、初始水分含量、时间、温度和接种量为影响因素,设置高低两个水平,高水平为低水平的 1.25 倍。以发酵米糠中真蛋白含量为响应值,根据各因素的显著性,筛选出最主要的因素进行固态发酵条件的响应面优化试验。

1.3.7 响应面试验设计 由 PB 试验优化得到的 3 个最显著的因素(温度、时间、初始水分含量)设计响应面试验,利用 Design-Expert.8.0.5 软件进行 Box-Behnken 中心组合试验设计。得到二次回归方程,确定最佳固态发酵条件组合。

1.3.8 验证实验和数据分析 根据二次回归方程得出的最佳发酵条件组合,设计验证实验。以上试验均做 3 组平行。PB 试验和 Box-Behnken 中心组合试验数据分析及处理由 Design-Expert.8.0.5 软件和 SPASS 软件辅助完成。

2 结果与分析

2.1 固态发酵对米糠成分的影响

2.1.1 固态发酵对米糠中真蛋白含量的影响 由图 1 可知,真蛋白含量在发酵 72 h 时达到最大值,之后随着发酵时间的延长逐渐降低。发酵过程中真蛋白含量的增加主要由外加氮源的加入和蛋白质“浓缩效应”<sup>[17]</sup>共同完成。外加氮源的加入使得黑曲霉利用无机氮源合成自身的菌体蛋白,提高了发酵米糠的真蛋白含量。与此同时,在发酵过程中黑曲霉的生长呼吸作用,产生了二氧化碳和水,使得发酵产物的质量减少,出现了蛋白质的“浓缩效应”。

发酵前期,菌体生长代谢活动较旺盛,利用基质中无机

氮源和有机氮源进行自身菌体蛋白的合成,蛋白含量增加。此时基质中菌体的蛋白合成能力大于蛋白分解能力。发酵后期,菌体进入衰亡期,此时菌体的蛋白分解能力大于蛋白合成能力,所以蛋白含量会有所下降,此时蛋白含量的下降可能是真菌对蛋白分解作用和基质“浓缩作用”共同完成。Silveira 等<sup>[18]</sup>利用根霉固态发酵脱脂米糠,粗蛋白含量提高了 69%。Schmidt 等<sup>[15]</sup>利用米根霉半固态发酵米糠,粗蛋白含量较未发酵米糠提高了 53%。总之,固态发酵对真蛋白含量有积极的影响。

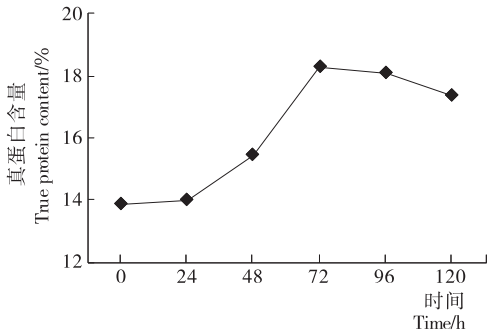


图 1 固态发酵米糠中真蛋白含量的变化  
Figure 1 Changes of true protein content in rice bran with solid-state fermentation

2.1.2 固态发酵对米糠中脂肪和灰分含量的影响 由图 2 可知,米糠未发酵之前的脂肪含量为 16.91%,脂肪含量随着发酵时间的延长逐渐降低,经过 96 h 的固态发酵之后,脂肪含量降到 11.48%,固态发酵过程中脂肪含量的降低可能是由于脂肪被真菌利用,用来合成自身的生物膜系统中的磷脂<sup>[19]</sup>。Larine 等<sup>[20]</sup>利用米根霉固态发酵米糠 120 h,脂肪含量从 15.2%降至 7.4%,降低了 51.32%,差异显著( $P < 0.05$ )。固态发酵可以降低米糠中的脂肪含量,而米糠的酸败问题主要是脂肪酶分解脂肪造成的。所以,固态发酵可以作为一种潜在的米糠保存方式。

由图 2 还可知,灰分含量随发酵时间的延长逐渐增加。发酵 120 h 后测定发酵米糠中灰分含量,其含量从原来的 7.01%增加到 8.91%,增加了 27.10%。主要是由于黑曲霉利用米糠中的营养物质进行生长代谢,真菌生物量增加,米糠中大分子物质被菌体利用分解,基质中小分子物质增加,无机物增多。Larine 等<sup>[20]</sup>利用米根霉固态发酵米糠 120 h

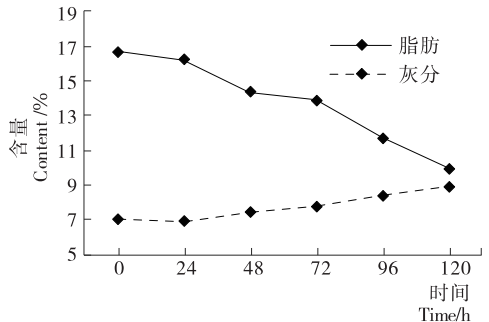


图 2 固态发酵米糠中脂肪和灰分含量的变化  
Figure 2 Changes of lipid and ash content in rice bran with solid-state fermentation

时,灰分含量从 9.4%增加到 13.9%,增加了 47.87%,表现出显著性差异( $P < 0.05$ )。与本研究结果趋势一致。

2.1.3 固态发酵对米糠中总糖含量的影响 由图 3 可知,发酵过程中总糖含量持续下降,发酵 96 h 后,米糠中的总糖含量从 342.33 mg/g 降至 221.67 mg/g,降低了 35.25%,差异显著( $P < 0.05$ )。表明基质中的糖类被菌体利用,分解产生能量和小分子物质供菌体进行生长代谢活动。发酵初期,菌体生长较快,在菌体生长过程中产生的纤维素酶、淀粉酶等对多糖的降解作用,导致总糖含量下降较快。发酵后期基质已不再适合菌体生长,菌体分解利用糖类变慢,总糖含量下降速度减缓。

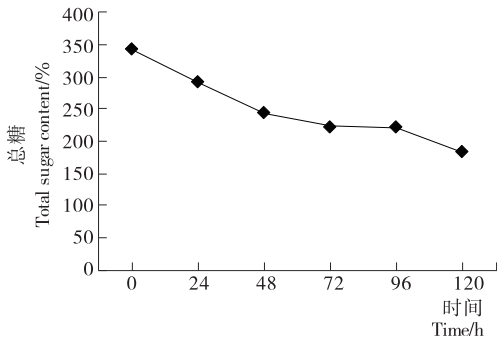


图 3 固态发酵米糠中总糖含量的变化  
Figure 3 Changes of total sugar content in rice bran with solid-state fermentation

## 2.2 响应面优化试验结果与分析

2.2.1 Plackett-Burman 试验设计及结果分析 以真蛋白含量为响应值,设计米糠固态发酵条件的响应面优化试验。由单因素试验结果分析得出 Plackett-Burman(PB)试验设计方案见表 1,对初始 pH、装料量、初始水分含量、时间、温度和接种量进行显著性分析,设置高水平为低水平的 1.25 倍。利用 Design-Expert.8.0.5 软件辅助分析 PB 试验结果。由表 2 可知,6 个因素对固态发酵米糠中真蛋白含量的影响顺序为:温度>时间>初始水分含量>装料量=接种量>初始 pH。根据 ANOVA 分析,得出该模型显著( $P = 0.0036 < 0.05$ ), $R^2 = 0.9526$ ,说明该模型有 95.26%的数据可信。

2.2.2 响应面设计试验结果及分析 由 PB 试验得出的影响固态发酵米糠中真蛋白含量的 3 个显著性因素,利用 Design-Expert.8.0.5 软件进行 Box-Behnken 的中心组合试验设计,以温度、时间和初始水分含量为因素,设计三因素三水平的试验方案,设计方案见表 3、4。试验结果分析由 Design-Expert.8.0.5 软件辅助完成。

根据响应面 ANOVA 结果分析得到因素 A、B、C 的二次回归方程:

$$Y = 19.7 - 0.14A + 0.69B - 0.53C + 0.29AB - 0.82AC + 0.7BC - 0.53A^2 - 1.05B^2 - 1.3C^2. \quad (1)$$

由表 5 可知, $P = 0.0009 < 0.01$ ,表明模型以真蛋白含量为响应值时,该模型极显著。失拟项  $P = 0.1914 > 0.1$ ,表明试验结果和模型方程拟合良好。相关系数  $R^2 = 0.9494$ ,表明有 94.94%的数据可以由模型方程解释。CV 越小,说明模

表 1 PB 试验设计<sup>†</sup>

Table 1 PB Test Design

| 序号 | 初始 pH | 装料量/g | 初始水分含量/% | 时间/h | 温度/℃ | 接种量/mL | 真蛋白含量/%                 |
|----|-------|-------|----------|------|------|--------|-------------------------|
| 1  | 5.50  | 12.5  | 62.5     | 120  | 28   | 1.25   | 14.27±0.09 <sup>f</sup> |
| 2  | 6.88  | 12.5  | 62.5     | 96   | 35   | 1.25   | 15.57±0.17 <sup>d</sup> |
| 3  | 6.88  | 10.0  | 62.5     | 96   | 28   | 1.00   | 12.66±0.38 <sup>g</sup> |
| 4  | 5.50  | 10.0  | 50.0     | 96   | 28   | 1.00   | 12.72±0.31 <sup>g</sup> |
| 5  | 6.88  | 12.5  | 50.0     | 120  | 28   | 1.00   | 14.93±0.20 <sup>e</sup> |
| 6  | 5.50  | 12.5  | 50.0     | 96   | 28   | 1.25   | 12.94±0.31 <sup>g</sup> |
| 7  | 5.50  | 10.0  | 50.0     | 120  | 35   | 1.25   | 19.11±0.17 <sup>a</sup> |
| 8  | 6.88  | 10.0  | 62.5     | 120  | 28   | 1.25   | 14.54±0.19 <sup>f</sup> |
| 9  | 5.50  | 10.0  | 62.5     | 120  | 35   | 1.00   | 16.90±0.28 <sup>c</sup> |
| 10 | 6.88  | 10.0  | 50.0     | 96   | 35   | 1.25   | 16.49±0.53 <sup>c</sup> |
| 11 | 6.88  | 12.5  | 50.0     | 120  | 35   | 1.00   | 18.37±0.16 <sup>b</sup> |
| 12 | 5.50  | 12.5  | 62.5     | 96   | 35   | 1.00   | 16.84±0.13 <sup>c</sup> |

† 同一列数据不同字母表示差异显著(P<0.05)。

表 2 PB 试验结果分析<sup>†</sup>

Table 2 PB test results analysis

| 方差来源   | 平方和     | 自由度 | 均方      | F 值     | Prob>F  | 重要性 |
|--------|---------|-----|---------|---------|---------|-----|
| 模型     | 48.66   | 6   | 8.11    | 16.76   | 0.003 6 |     |
| 初始 pH  | 0.004 0 | 1   | 0.004 0 | 0.008 0 | 0.930 8 | 5   |
| 装料量    | 0.021   | 1   | 0.021   | 0.043   | 0.843 8 | 4   |
| 初始水分含量 | 1.19    | 1   | 1.19    | 2.46    | 0.177 5 | 3   |
| 时间     | 9.90    | 1   | 9.90    | 20.46   | 0.006 3 | 2   |
| 温度     | 37.52   | 1   | 37.52   | 77.56   | 0.000 3 | 1   |
| 接种量    | 0.021   | 1   | 0.021   | 0.043   | 0.843 8 | 4   |
| 残差误差   | 2.42    | 5   | 0.48    |         |         |     |
| 合计     | 51.08   | 11  |         |         |         |     |

†  $R^2=0.952\ 6$ 。

表 3 响应面三因素三水平分布表

Table 3 Response surface three factor and three level distribution table

| 水平 | A 温度/℃ | B 时间/h | C 初始水分含量/% |
|----|--------|--------|------------|
| —1 | 34     | 72     | 50         |
| 0  | 37     | 96     | 60         |
| 1  | 40     | 120    | 70         |

型置信度越好。该模型变异系数 CV=2.4%，说明模型方程能够较好地反映真实的试验值。校正决定系数为 0.884 4，说明该模型可以解释 88.44%的数据变异。综上所述，该模型为固态发酵条件提供了一个很好的选择。

由回归方程得到的固态发酵最佳条件:温度 37.18℃，时间 102.86 h，初始水分含量 58.52%，得到真蛋白含量为 19.83%，比原米糠蛋白含量提高了 43.17%。验证实验选择条件发酵时间 37℃，时间 102 h，初始水分含量 60%，接种量 20 mL/100 g 米糠，初始 pH 5.5，装料量 150 g，固态发酵在

表 4 Box-Behnken 的中心组合设计和结果<sup>†</sup>

Table 4 Box-Behnken center combination design and results

| 序号 | A  | B  | C  | 真蛋白含量/%                  |
|----|----|----|----|--------------------------|
| 1  | 0  | 0  | 0  | 19.79±0.12 <sup>a</sup>  |
| 2  | —1 | —1 | 0  | 17.97±0.43 <sup>cd</sup> |
| 3  | 1  | 0  | —1 | 18.74±0.25 <sup>bc</sup> |
| 4  | 0  | 0  | 0  | 19.87±0.20 <sup>a</sup>  |
| 5  | 0  | 1  | —1 | 18.32±0.31 <sup>c</sup>  |
| 6  | 0  | 0  | 0  | 20.03±0.28 <sup>a</sup>  |
| 7  | 1  | —1 | 0  | 17.31±0.25 <sup>d</sup>  |
| 8  | 0  | 1  | 1  | 18.16±1.04 <sup>cd</sup> |
| 9  | 0  | —1 | —1 | 17.93±0.22 <sup>cd</sup> |
| 10 | 0  | 0  | 0  | 19.14±0.23 <sup>b</sup>  |
| 11 | 0  | —1 | 1  | 14.98±0.36 <sup>f</sup>  |
| 12 | 1  | 0  | 1  | 16.51±0.23 <sup>e</sup>  |
| 13 | —1 | 0  | —1 | 17.58±0.19 <sup>d</sup>  |
| 14 | —1 | 1  | 0  | 18.35±0.36 <sup>c</sup>  |
| 15 | 1  | 1  | 0  | 18.85±0.19 <sup>bc</sup> |
| 16 | —1 | 0  | 1  | 18.64±0.21 <sup>bc</sup> |
| 17 | 0  | 0  | 0  | 19.65±0.09 <sup>ab</sup> |

† 同一列数据不同字母表示差异显著(P<0.05)。

托盘中进行,得到发酵米糠的真蛋白含量为 19.65%。比原米糠蛋白含量提高了 41.88%。试验结果与预测试验结果相差不大,说明固态发酵优化工艺有效。

2.3 发酵米糠中 17 种常规水解氨基酸含量的变化

考虑到发酵米糠的适口性、外观性以及发酵成本等因素,根据实际情况选择缩短发酵时间,降低发酵温度来抑制孢子的形成并降低能耗,最终选择发酵温度 34℃,发酵时间 72 h,初始水分含量 60%，初始 pH 5.5,接种量 20 mL/100 g 米糠,得到的真蛋白含量为 18.15%，较原米糠提高了 31.05%。此条件下发酵米糠中黑曲霉孢子得到很好的抑制，

表 5 响应面的 ANOVA 结果及分析<sup>†</sup>

| Table 5        | Response surface ANOVA results and analysis |     |      |       |         |
|----------------|---------------------------------------------|-----|------|-------|---------|
| 方差来源           | 平方和                                         | 自由度 | 均方   | F     | Prob>F  |
| 模型             | 25.43                                       | 9   | 2.83 | 14.60 | 0.000 9 |
| A              | 0.16                                        | 1   | 0.16 | 0.82  | 0.394 0 |
| B              | 3.77                                        | 1   | 3.77 | 19.47 | 0.003 1 |
| C              | 2.29                                        | 1   | 2.29 | 11.83 | 0.010 8 |
| AB             | 0.34                                        | 1   | 0.34 | 1.74  | 0.228 9 |
| AC             | 2.71                                        | 1   | 2.71 | 13.98 | 0.007 3 |
| BC             | 1.95                                        | 1   | 1.95 | 10.06 | 0.015 7 |
| A <sup>2</sup> | 1.17                                        | 1   | 1.17 | 6.07  | 0.043 3 |
| B <sup>2</sup> | 4.62                                        | 1   | 4.62 | 23.90 | 0.001 8 |
| C <sup>2</sup> | 7.12                                        | 1   | 7.12 | 36.80 | 0.000 5 |
| 残差误差           | 1.35                                        | 7   | 0.19 |       |         |
| 失拟项            | 0.89                                        | 3   | 0.30 | 2.58  | 0.191 4 |
| 纯误差            | 0.46                                        | 4   | 0.12 |       |         |
| 合计             | 26.78                                       | 16  |      |       |         |

<sup>†</sup>  $R^2=0.949\ 4$ , Adj  $R^2=0.884\ 4$ , CV=2.40%, Adeq Precision=12.647。

表 6 固态发酵米糠中水解氨基酸含量的变化<sup>†</sup>

| Table 6 | Changes of Hydrolyzed Amino Acids in rice bran with solid-state fermentation % |                         |                         |                          |                         |                          |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 氨基酸     | 米糠                                                                             | 发酵 0 h                  | 发酵 24 h                 | 发酵 48 h                  | 发酵 72 h                 | 发酵 96 h                  |
| Asp     | 1.36±0.06 <sup>c</sup>                                                         | 1.46±0.02 <sup>c</sup>  | 1.58±0.01 <sup>bc</sup> | 1.63±0.02 <sup>b</sup>   | 1.81±0.01 <sup>a</sup>  | 1.73±0.03 <sup>ab</sup>  |
| Glu     | 2.03±0.01 <sup>ab</sup>                                                        | 2.13±0.01 <sup>ab</sup> | 2.29±0.00 <sup>a</sup>  | 2.21±0.12 <sup>ab</sup>  | 2.30±0.02 <sup>a</sup>  | 2.10±0.01 <sup>ab</sup>  |
| Ser     | 0.47±0.01 <sup>f</sup>                                                         | 0.51±0.01 <sup>e</sup>  | 0.57±0.00 <sup>d</sup>  | 0.63±0.01 <sup>c</sup>   | 0.74±0.01 <sup>a</sup>  | 0.64±0.00 <sup>c</sup>   |
| His     | 0.33±0.00 <sup>b</sup>                                                         | 0.35±0.01 <sup>b</sup>  | 0.41±0.01 <sup>ab</sup> | 0.40±0.00 <sup>ab</sup>  | 0.43±0.04 <sup>a</sup>  | 0.34±0.00 <sup>b</sup>   |
| Gly     | 0.71±0.01 <sup>d</sup>                                                         | 0.72±0.01 <sup>d</sup>  | 0.79±0.01 <sup>c</sup>  | 0.85±0.01 <sup>b</sup>   | 0.93±0.02 <sup>ab</sup> | 0.88±0.01 <sup>b</sup>   |
| Thr     | 0.49±0.01 <sup>c</sup>                                                         | 0.50±0.00 <sup>b</sup>  | 0.61±0.01 <sup>b</sup>  | 0.68±0.01 <sup>ab</sup>  | 0.78±0.01 <sup>a</sup>  | 0.73±0.01 <sup>a</sup>   |
| Arg     | 0.95±0.14 <sup>a</sup>                                                         | 0.92±0.00 <sup>b</sup>  | 0.91±0.00 <sup>bc</sup> | 0.85±0.00 <sup>d</sup>   | 0.89±0.01 <sup>c</sup>  | 0.81±0.01 <sup>e</sup>   |
| Ala     | 0.84±0.01 <sup>d</sup>                                                         | 0.82±0.00 <sup>d</sup>  | 0.92±0.01 <sup>c</sup>  | 0.95±0.01 <sup>bc</sup>  | 1.02±0.01 <sup>a</sup>  | 0.96±0.01 <sup>b</sup>   |
| Tyr     | 0.36±0.01 <sup>c</sup>                                                         | 0.45±0.01 <sup>b</sup>  | 0.45±0.01 <sup>b</sup>  | 0.47±0.01 <sup>b</sup>   | 0.56±0.01 <sup>a</sup>  | 0.47±0.00 <sup>b</sup>   |
| Cys-s   | 0.05±0.00 <sup>c</sup>                                                         | 0.06±0.00 <sup>bc</sup> | 0.07±0.01 <sup>b</sup>  | 0.06±0.00 <sup>bc</sup>  | 0.04±0.00 <sup>c</sup>  | 0.06±0.00 <sup>bc</sup>  |
| Val     | 0.72±0.01 <sup>f</sup>                                                         | 0.78±0.01 <sup>e</sup>  | 0.86±0.01 <sup>d</sup>  | 0.94±0.01 <sup>c</sup>   | 1.04±0.01 <sup>a</sup>  | 1.02±0.01 <sup>ab</sup>  |
| Met     | 0.12±0.02 <sup>c</sup>                                                         | 0.20±0.01 <sup>bc</sup> | 0.19±0.00 <sup>bc</sup> | 0.21±0.01 <sup>b</sup>   | 0.27±0.01 <sup>a</sup>  | 0.19±0.00 <sup>bc</sup>  |
| Phe     | 0.60±0.01 <sup>d</sup>                                                         | 0.61±0.00 <sup>d</sup>  | 0.69±0.00 <sup>c</sup>  | 0.73±0.01 <sup>b</sup>   | 0.82±0.01 <sup>a</sup>  | 0.79±0.00 <sup>a</sup>   |
| Ile     | 0.58±0.01 <sup>e</sup>                                                         | 0.58±0.00 <sup>e</sup>  | 0.71±0.01 <sup>c</sup>  | 0.78±0.01 <sup>b</sup>   | 0.85±0.01 <sup>a</sup>  | 0.82±0.01 <sup>ab</sup>  |
| Leu     | 0.88±0.02 <sup>c</sup>                                                         | 0.96±0.01 <sup>c</sup>  | 1.08±0.00 <sup>b</sup>  | 1.14±0.02 <sup>ab</sup>  | 1.24±0.01 <sup>a</sup>  | 1.18±0.01 <sup>ab</sup>  |
| Lys     | 0.61±0.01 <sup>c</sup>                                                         | 0.54±0.04 <sup>c</sup>  | 0.68±0.01 <sup>bc</sup> | 0.73±0.00 <sup>b</sup>   | 0.75±0.01 <sup>a</sup>  | 0.69±0.01 <sup>ab</sup>  |
| Pro     | 0.71±0.01 <sup>b</sup>                                                         | 0.73±0.00 <sup>b</sup>  | 0.68±0.01 <sup>b</sup>  | 0.68±0.01 <sup>b</sup>   | 0.81±0.01 <sup>ab</sup> | 0.78±0.01 <sup>b</sup>   |
| 合计      | 11.76±0.08 <sup>d</sup>                                                        | 12.26±0.04 <sup>d</sup> | 13.44±0.01 <sup>c</sup> | 13.91±0.18 <sup>bc</sup> | 15.22±0.19 <sup>a</sup> | 14.14±0.01 <sup>bc</sup> |

<sup>†</sup> 同一行数据不同字母表示差异显著(P<0.05)。

加,脂肪和总糖含量则逐渐降低。这为今后米糠在固态发酵方面的应用和发展提供了一定的理论基础。

(2) 固态发酵过程中真蛋白的富集优化试验表明,最佳发酵条件为:温度 37℃,时间 102 h,初始水分含量 60%,初始 pH 5.5,接种量 20 mL/100 g 米糠,此时发酵米糠的真蛋白含量 19.65%,比原米糠提高了 41.88%。因此,固态发酵米糠可以作为一种生产高蛋白发酵产品的潜在方式。

(3) 固态发酵过程中富集真蛋白的来源和性质还需进一步进行研究和分析。

发酵成本降低,品质达到很好的改善。在此条件下测定氨基酸含量的变化。

由表 6 可知,发酵过程中氨基酸含量在不断增加,原米糠中氨基酸含量为 11.76%,发酵 72 h 后氨基酸总量达到 15.22%,较原米糠增加了 29.42%,差异显著(P<0.05)。蛋白质的营养价值取决于氨基酸种类和含量,其中必需氨基酸的含量是评价蛋白质质量的一个重要指标。发酵 72 h 时,限制性氨基酸蛋氨酸、苏氨酸占总氨基酸含量显著增加(P<0.05),分别增加了 73.92%和 22.99%。发酵 96 h 时,总氨基酸含量略有下降,主要是基质中大部分营养物质被利用,此时发酵体系中菌体对蛋白的分解能力大于蛋白合成能力。总的来说,固态发酵能够有效改善氨基酸组成,使必需氨基酸和限制性氨基酸较发酵前都有所提高。因此,固态发酵对米糠中的氨基酸组成起到了很好的改善作用。

3 结论

(1) 固态发酵对米糠成分的改善有一定作用。在一定的发酵时间内,蛋白和灰分含量随着发酵时间的延长逐渐增

参考文献

[1] 秦微微,金婷,宋学东,等.米糠深加工产品的研究与应用[J].农产品加工: 学刊,2013(23): 61-63.  
[2] 韩秀丽,张如意,马晓建.米糠的综合利用及其前景[J].农产品加工: 学刊,2007(7): 62-65.  
[3] 邹小明,周群燕,谢骞,等.米糠蛋白复合提取法工艺研究[J].江苏农业科学,2006(6): 356-358.  
[4] 冯光.米糠蛋白的研究现状与展望[J].食品安全质量检测学报,2013(3): 863-867.

表 7 样品中有机硒的测定<sup>†</sup>

Table 7 Determination of organic selenium in samples

| 试样   | 测定结果/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 试样  | 测定结果/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|------|---------------------------------|-----|---------------------------------|
| 鸡肉   | 0.079±0.007                     | 纯净水 | N.D.                            |
| 猪肉   | 0.143±0.013                     | 矿泉水 | N.D.                            |
| 鱼肉   | 0.284±0.010                     | 丝苗米 | N.D.                            |
| 鹅肝   | 0.811±0.031                     | 油粘米 | N.D.                            |
| 鱿鱼   | 0.278±0.015                     | 菜心  | N.D.                            |
| 花螺   | 0.443±0.021                     | 大白菜 | N.D.                            |
| 小球藻粉 | 0.208±0.009                     | 苹果  | N.D.                            |
| 茶叶   | 0.054±0.005                     | 雪梨  | N.D.                            |
| 牛肝菌  | 6.021±0.056                     | 白醋  | N.D.                            |
| 鸡油菌  | 0.679±0.028                     | 食用油 | N.D.                            |
| 香菇   | 0.107±0.008                     | 酱油  | N.D.                            |

<sup>†</sup> “N.D.”表示未检出,定量限为 1.5 μg/kg。

高,线性范围广,操作简便,弥补了直接测定食品中有机硒的方法空缺,为客观评价食品的质量提供了科学方法。本试验方法只能够快速测定食品中有机硒总含量,但对有机硒价态的评定和种类的定性,还需要借助质谱联用等技术做进一步研究。

参考文献

[1] RAYMA M P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? [J]. Brit J Nutr, 2004, 92(4): 557-573.

[5] HAN S W, CHEE K M, CHO S J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein[J]. Food Chemistry, 2015,172(3): 766-769.

[6] 顾瑜萍,马理姣,黄娟,等. 米糠中蛋白质、植酸和膳食纤维的酶法增效及其活性评价[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 139-145.

[7] 王腾宇,周凤超,王玉,等. 米糠蛋白提取及其应用[J]. 粮油加工, 2010(8): 74-76.

[8] 吕飞,许宙,程云辉. 米糠蛋白提取及其应用研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 234-238.

[9] 李旋亮,吴长德,李建涛,等. 微生物发酵饲料的研究与应用[J]. 饲料博览, 2010(2): 27-28.

[10] 陈晓英. 微生物发酵饲料的研究与应用[J]. 中国畜禽种业, 2010(3): 77-78.

[11] 王子强. 微生物发酵饲料研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010(4): 34-36.

[12] 罗玲,韩奇鹏,曲湘勇. 微生物发酵饲料在动物生产上的应用研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2016(2): 45-50.

[13] 姚跃飞,曾柏全. 现代固态发酵技术在食品加工业中的应用[J]. 食品与机械, 2005, 21(6): 89-92.

[14] 刘金海. 黑曲霉菌在生物发酵饲料上的应用及其产品对动物抗

[2] MCKENZIE M J, HUNTER D A, PATHIRANA R, et al. Accumulation of an organic anticancer selenium compound in at-ransgenic Solanaceous species shows wider applicability of the selenocysteine methyltransferase transgene from selenium hyper-accumulators[J]. Transgenic Res, 2009, 18(3): 407-424.

[3] MIGUEL N A, CARMEN C V. Selenium in food and the human body: a review[J]. Sci Total Environ, 2008, 400(1): 115-141.

[4] 刘恒,马盼,王浩东,等. 氢化物发生—原子荧光光谱法测定富硒杂粮中的有机硒和无机硒[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 170-173.

[5] 张荣泉,吕方,王莲. 浅析硒化合物原料及硒测定方法的现行标准[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(8): 149-152.

[6] 鲁丹,俞 琰垒. 顺序注射—氢化物发生—原子荧光光谱法测定海产品中无机硒和有机硒[J]. 理化检验: 化学分册, 2016, 52(6): 639-642.

[7] 郝素娥,滕冰. 硒酵母中有机硒及硒代氨基酸含量的测定方法[J]. 分析测试学报, 1999, 18(3): 72-74.

[8] PEDRERO Z, MADRID Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review[J]. Analytica Chimica Acta, 2010(634): 135-152.

[9] SUSAN J F, RACHEL C. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011(91):1 484-1 491.

[10] SILVAE G. Speciation analysis of selenium in plank-ton,Brazil nut and human urine samples by HPLC — ICP — MS [J]. Talanta, 2013(110): 53-57.

[11] THIRY C, SCHNEIDER Y. Selenium bioaccessibility and bio-availability in se -enriched food supplements [J]. Biological Trace Element Research, 2013, 152(1): 152-160.

病力的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2012: 25-28.

[15] SCHMIDT C G, FURLONG E B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae* [J]. Bioresource Technology, 2012, 123: 36-41.

[16] 胡艳丽,王克然. 饲料中真蛋白的测定[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 28(10): 31-33.

[17] 汤江武,薛智勇,钱红,等. 酵母固体发酵对物料营养组分及生物活性的影响[J]. 浙江农业科学, 2003(5): 74-76.

[18] SILVEIRA C M D. Sperathe effects of solid-state fermentation in the functional properties of defatted rice bran and wheat bran [J]. Brazilian Archives of Biology & Technology, 2009, 52(6): 1 555-1 562.

[19] OLIVEIRA M D S, FEDDERN V, KUPSKI L, et al. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8 335-8 338.

[20] KUPSKI L, CIPOLATTI E, ROCHA M D, 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 & Technology, 2012, 55(6): 937-942.