

# 混菌固态发酵米糠产谷维素的工艺 及抗氧化活性评估

Process study on mixed bacterial solid-state fermentation of rice bran for  
the preparation of oryzanol and evaluation of its antioxidant activity

夏欣欣<sup>1,2,3,4</sup> 林海<sup>1,2</sup> 杨谷良<sup>3</sup> 彭霞<sup>1,2</sup> 贺辛乐<sup>1,2</sup>

XIA Xinxin<sup>1,2,3,4</sup> LIN Hai<sup>1,2</sup> YANG Guliang<sup>3</sup> PENG Xia<sup>1,2</sup> HE Xinle<sup>1,2</sup>

(1. 国家黑茶产品质量检验检测中心〔湖南〕, 湖南 益阳 413000; 2. 益阳市产商品质量监督检验研究院, 湖南 益阳 413000; 3. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004; 4. 湖南省农产品加工研究所, 湖南 长沙 410125)

(1. National Center of Dark Tea Product Quality Inspection & Testing [Hunan], Yiyang, Hunan 413000, China; 2. Yiyang Testing Institute of Product and Commodity Quality Supervision, Yiyang, Hunan 413000, China; 3. School of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 4. Hunan Agricultural Product Processing Institute, Changsha, Hunan 410125, China)

**摘要:**目的:提高米糠谷维素的得率。方法:以米糠为研究对象,经单因素试验筛选出酿酒酵母和枯草芽孢杆菌作为固态发酵菌种,以谷维素含量为指标,通过单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法优化混菌固态发酵工艺,采用 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除试验对发酵提取物抗氧化活性进行评价,并通过扫描电镜(SEM)分析混菌固态发酵法富集谷维素的原理。结果:在酿酒酵母和枯草芽孢杆菌混菌处理下,米糠谷维素最优发酵工艺为发酵时间 44 h,发酵温度 34 ℃,接种量 10%,含水量 40%,在此条件下谷维素含量为(7.816±0.038) mg/g,是未发酵米糠谷维素含量的 1.9 倍。混菌固态发酵法制备的提取物具有较强的 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除活性,其 IC<sub>50</sub> 值分别为(0.220±0.007), (0.409±0.014) mg/mL,与未发酵米糠相比,其 IC<sub>50</sub> 值分别降低了 28.6% 和 39.7%。SEM 分析结果显示,混菌固态发酵后米糠组织表面油脂更少,结构疏松多孔,更加有利于米糠中谷维素的释放。结论:米糠经混菌固态发酵后,谷维素含量和抗氧化活性均得到显著提高。

**关键词:** 固态发酵; 米糠; 谷维素; 工艺优化; 抗氧化活性

**Abstract. Objective:** In order to improve the yield of oryzanol of rice bran. **Methods:** Rice bran was selected as the research subject, and *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* were selected as solid-state fermentation strains through single-factor experiments. The mixed bacterial solid-state fermentation process was optimized by Box-Behnken response surface method combined with the single factor experiments, based on the content of oryzanol. The antioxidant activity of the fermentation extracts was evaluated using DPPH and ABTS free radical scavenging assays. Scanning electron microscopy (SEM) was used to analyze the principle of oryzanol enrichment in mixed bacterial solid-state fermentation. **Results:** Under the of mixed bacterial treatment of *saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis*, the optimal fermentation conditions for rice bran oryzanol was determined to be a fermentation time of 44 h, a fermentation temperature of 34 ℃, an inoculum size of 10%, and a moisture content of 40%. Under these conditions, the oryzanol content was (7.816±0.038) mg/g, which was 1.9 times higher than that of unfermented rice bran. The extracts prepared by mixed bacterial solid-state fermentation exhibited strong DPPH and ABTS free radical scavenging activity, with IC<sub>50</sub> values of (0.220±0.007), (0.409±0.014) mg/mL, respectively. These values represented a reduction of 28.6% and 39.7% compared to unfermented rice bran. SEM observation revealed showed that the surface of rice bran tissue had less oil, a looser and more porous structure after mixed bacterial solid-state fermentation, which was more conducive to the release of rice bran oryzanol.

**基金项目:**湖南省自然科学基金(编号:2022JJ90017);湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:2022KJJH16);湖南省自然科学基金(编号:2023JJ60550)

**作者简介:**夏欣欣(1989—),女,益阳市产商品质量监督检验研究院工程师,博士。E-mail:1171454336@qq.com

**收稿日期:**2023-08-01 **改回日期:**2023-09-14

**Conclusion:** Mixed solid-state fermentation of bacteria significantly increases the oryzanol content and antioxidant activity of rice bran.

**Keywords:** mixed bacterial solid-state fermentation; rice bran; oryzanol; process optimization; antioxidant activity

米糠作为稻谷加工中的副产物,在中国年产量高达1 000万t。米糠营养丰富,是稻谷产业中的重要组成部分<sup>[1]</sup>。谷维素又叫米糠素,是一种阿魏酸酯混合物,在非皂化性米糠油中,谷维素的含量为0.9%~2.9%<sup>[2]</sup>。谷维素作为米糠中最重要的抗氧化活性物质之一,有着优越的热加工稳定性<sup>[3]</sup>。研究表明,谷维素具有多种生理功能,如降低血脂<sup>[4]</sup>、减少肝脏脂质水平<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、调节胃肠道功能<sup>[7]</sup>等。

目前制备米糠谷维素的方法有弱酸取代法、多溶剂浸提法、超临界流体萃取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法<sup>[8]</sup>等。其中,弱酸取代法具有操作简单、成本低、产品质量好的优点,但是甲醇损耗大,得率低<sup>[9]</sup>;多溶剂浸提法制备的谷维素得率和纯度较高,但是工艺复杂,成本较高<sup>[10]</sup>;超临界流体萃取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法具有提取效率高,纯度高的优点,但是存在操作复杂、设备成本高、能耗高等不足<sup>[11-12]</sup>。微生物可利用环境中的碳水化合物等产生纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等多种酶系,通过催化特定化学键的断裂,从而将活性成分从植物基质中释放出来<sup>[13]</sup>。微生物发酵能促进米糠中氨基酸<sup>[14]</sup>、活性多肽<sup>[15]24-25</sup>、 $\gamma$ -氨基丁酸<sup>[16]</sup>、可溶性膳食纤维<sup>[17]</sup>等功能成分的渗出,改善米糠功能活性和品质。已有研究<sup>[18]56-57[19]21-25</sup>表明,枯草芽孢杆菌、紫红曲霉通过发酵米糠、苦荞碎米富集谷维素含量为1.59~4.51 mg/g,用时48~216 h。糙米经酿酒酵母发酵后,其谷维素含量明显高于未发酵糙米<sup>[20]</sup>。说明微生物处理是富集米糠谷维素的一种现实可行的方法,但是现有技术制备提取米糠谷维素得率偏低,用时偏长。

固态发酵因成本低、操作简单、反应条件温和、适合规模化生产而受到青睐。研究拟先筛选适宜米糠固态发酵的菌株,再对其固态发酵工艺进行优化,对发酵提取物的抗氧化活性进行评价,并通过扫描电镜(SEM)分析混菌固态发酵对米糠结构的影响,旨在为米糠谷维素的高效、绿色富集工艺及产品开发提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

#### 1.1.1 材料与amp;试剂

新鲜米糠:2022年8月购于湖南益阳;

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus*

*plantarum*):湖南省微生物研究院;

黑曲霉(*Aspergillus niger*)、平菇曲霉(*Aspergillus hiratsukae*)、冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*):中南林业科技大学食品科学与工程学院保藏;

谷维素标准品:纯度为99.5%,日本TCI公司;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS):上海麦克林生化科技有限公司;

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、MRS培养基、LB培养基和酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(YEPD)培养基:广东环凯微生物有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

精密恒温培养箱:BPH-9162型,上海一恒科学仪器有限公司;

超净化工作台:SW-CJ-1F型,苏州安泰空气技术有限公司;

液相色谱仪:LC-20AB,日本岛津公司;

立式压力蒸汽灭菌锅:LDZX-50KBS型,上海申安医疗器械厂;

旋转蒸发仪:YRE-2000B型,巩义市予华仪器有限责任公司;

超声波清洗器:DS-2510DTH型,上海奥析科学仪器有限公司;

台式低速离心机:CFG-4.5D型,济南中天生物科技有限公司;

扫描电子显微镜:Hitachi Regulus8100型,日立科学仪器(北京)有限公司;

溅射镀膜仪:Quorum SC7620型,英国Quorum公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 固态发酵米糠

(1) 菌液制备:取保存的6株菌种各一环接种到相应的试管斜面培养基中,其中植物乳杆菌(MRS培养基)和枯草芽孢杆菌(LB培养基)于37℃培养24 h,酿酒酵母(YEPD培养基)于30℃培养24 h,黑曲霉、平菇曲霉和冠突散囊菌(PDA培养基)于30℃培养96 h,待各菌种长满斜面后,适量无菌水洗涤,用接种环轻轻将菌种刮下,收集菌悬液。其中,酿酒酵母、黑曲霉、平菇曲霉和冠突散囊菌用血球计数板计数,植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌用平板计数法计数,调整各菌悬液含菌数为 $1.0 \times 10^7$  CFU/mL。

(2) 发酵基质制备:将新鲜米糠过20目筛,称取适量新鲜米糠于发酵袋中,加入一定比例的水,充分润湿均匀,套好封口,121℃下灭菌30 min,冷却,备用。

(3) 固态发酵:将准备好的菌悬液分别接入发酵袋中,充分混匀,放入适宜温度的培养箱中,每隔24 h翻料和补水(3 mL)一次,发酵结束,放入60℃鼓风干燥箱中

烘干至恒重,备用。

1.2.2 菌种筛选 设定装料量 30 g,接种量 6%,含水量 50%,发酵温度 37 ℃,固定其他条件,分别考察植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌发酵时间(0,12,24,36,48,72 h)对米糠谷维生素含量的影响;设定装料量 30 g,接种量 6%,含水量 50%,发酵温度 30 ℃,固定其他条件,考察酿酒酵母发酵时间(0,12,24,36,48,72 h)对米糠谷维生素含量的影响;设定装料量 30 g,接种量 6%,含水量 50%,发酵温度 30 ℃,固定其他条件,考察黑曲霉、平菇曲霉和冠突散囊菌发酵时间(0,1,3,5,7,9 d)对米糠谷维生素含量的影响。

1.2.3 发酵条件单因素试验 设定酿酒酵母与枯草芽孢杆菌菌液体积比 1:1,发酵装料量 30 g,接种量 6%,含水量 50%,发酵时间 24 h,发酵温度 37 ℃,固定其他条件,分别考察发酵时间(12,24,36,48,72 h)、发酵温度(28,30,33,37,40 ℃)、接种量(3%,6%,9%,12%,15%)、含水量(35%,40%,45%,50%,55%)对米糠谷维生素含量的影响。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 设计响应面试验。

1.2.5 固态发酵提取物制备 准确称取发酵米糠 1 g,加入 5 mL 的甲醇,采用超声波进行提取,15 min/次,提取结束,5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,重复提取 3 次,减压浓缩,定容至 25 mL 后待测。

1.2.6 溶剂浸提法样品制备 在 Kumar 等<sup>[12]</sup>方法的基础上进行微小调整,准确称取干燥至恒重的米糠 1 g,加入 5 mL 的甲醇,于 38 ℃ 水浴锅中浸提 60 min,5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,重复提取 3 次,减压浓缩,定容后待测。

1.2.7 未发酵样品制备 准确称取干燥至恒重的米糠 1 g,加入 5 mL 的甲醇,后续提取方法参照 1.2.5。

1.2.8 HPLC 检测 根据 Zhang 等<sup>[20]</sup>的方法修改如下:色谱柱为 InertSustain C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相为乙酸—乙腈—甲醇(V<sub>乙酸</sub>:V<sub>乙腈</sub>:V<sub>甲醇</sub>=3:44:53),流速 1.0 min/mL,波长 326 nm,分析时间 50 min。

### 1.2.9 抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力:参照韦涛等<sup>[21]</sup>的方法。

(2) ABTS 自由基清除能力:参照伍蓉等<sup>[22]</sup>的方法。

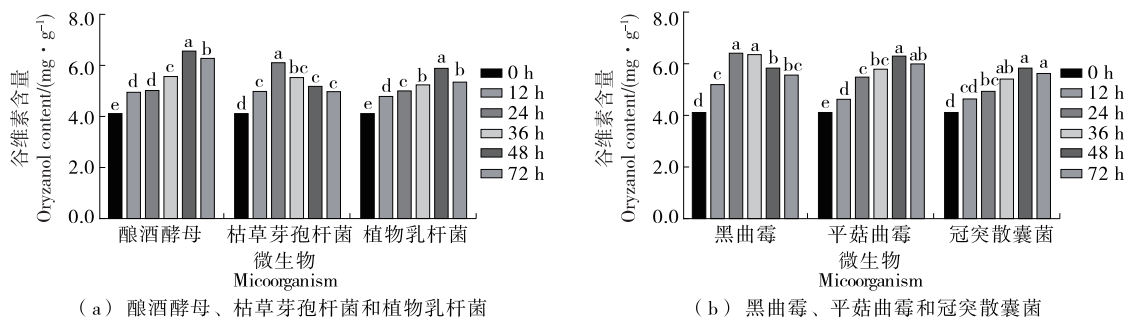
1.2.10 扫描电镜(SEM)分析 米糠经不同方法处理后烘干,取微量样品粘到导电胶上,使用溅射镀膜仪喷金,喷金为 10 mA,在加速电压为 3 000 V 下使用扫描电子显微镜拍摄样品形貌,放大 2 000 倍进行观察。

1.2.11 数据处理方法 通过 Design-Expert 11、SPSS 软件、Excel 软件和 GraphPad Prism 8.0.1 进行试验设计、数据分析及绘图,各试验均重复 3 次,结果表示为平均值±标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵菌种对米糠中谷维生素含量的影响

如图 1 所示,随着发酵时间的延长,米糠中谷维生素含量整体呈先升后降的趋势。其中,酿酒酵母和植物乳杆菌在发酵 48 h 时谷维生素含量达到最大值;枯草芽孢杆菌在发酵 24 h 时谷维生素含量达到最大值;黑曲霉在发酵 3 d 时谷维生素含量达到最大值;平菇曲霉和冠突散囊菌在发酵 7 d 时谷维生素含量达到最大值。在 3 种霉菌中,黑曲霉活性相对较强、繁殖较快,但研究发现黑曲霉在一定条件下可代谢产生阿魏酸酯酶,谷维生素在此酶作用下会发生降解<sup>[23]</sup>。冠突散囊菌能促进茶叶、豆类、谷物中多酚、总黄酮及多糖含量的增加<sup>[24]</sup>。但是冠突散囊菌和平菇曲霉发酵米糠制备谷维生素的研究鲜有报道,试验过程中发现,冠突散囊菌和平菇曲霉具有促进米糠中谷维生素释放的作用,但对谷维生素的富集用时相对偏长。以上结果可以看出,不同菌种处理对谷维生素的含量存在一定的差异,同一菌种不同发酵时间对谷维生素含量的影响差异显著,可能与其生长速度、所产酶系等因素有关。综合考虑谷维生素富集效果和发酵时间,选取酿酒酵母和枯草芽孢杆菌进行后续试验。枯草肠杆菌与产假假丝酵母混合发酵豆粕(菌液体积比 1:1)时,糖化酶、β-淀粉酶、蛋白酶活力最高值明显高于单一菌种<sup>[25]</sup>。因此,选取酿酒酵母(1.0×



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图 1 发酵菌种对米糠中谷维生素含量的影响

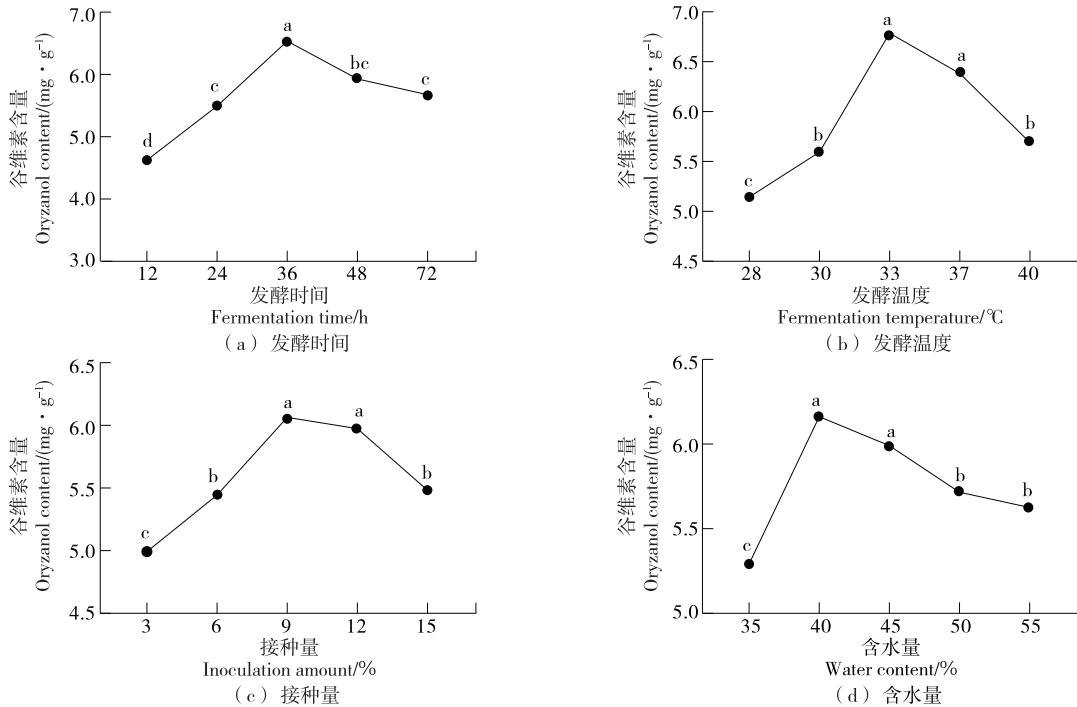
Figure 1 Effects of fermentation strains on the content of oryzanol in rice bran

$10^7$  CFU/mL)菌液和枯草芽孢杆菌( $1.0 \times 10^7$  CFU/mL)菌液体积比为 1:1,接种量 6%,含水量 50%,发酵时间 24 h,发酵温度 33 °C,谷维素含量为( $6.786 \pm 0.160$ ) mg/g,高于单一菌种发酵制备的谷维素含量。

## 2.2 发酵条件对米糠中谷维素含量影响的单因素试验

由图 2 可知,随着发酵时间、发酵温度、接种量和含水量的增加,米糠中谷维素含量均呈先升高后下降的趋势。这是因为酿酒酵母和枯草芽孢杆菌达到对数生长期需要一定的时间,当其充分生长繁殖时才能利用发酵基质分泌大量的代谢物,如纤维素酶等,从而作用于植物细胞壁,促进活性物质的释放<sup>[20,26]</sup>。当发酵时间过长时,发酵体系营养物质消耗,其他有害物质过度积累,细胞可能

出现缺氧现象,致使谷维素氧化或降解<sup>[27]</sup>。发酵温度直接影响微生物的生长速度,温度过低或过高都不利于菌种的繁殖和代谢。酿酒酵母和枯草芽孢杆菌的接种量越多,分泌的纤维素酶、果胶酶等越多,发酵效率越高,但是发酵基质是固定的,当接种量过多时,每个细胞所获得的营养物质会减少,细胞生长受到抑制,同时供氧不足也会导致好氧菌产酶下降。混菌固态发酵时,发酵基质中的含水量直接影响发酵效率,含水量偏低不能满足酿酒酵母和枯草芽孢杆菌自身代谢所需,含水量偏高时,发酵体系中通气性较差,枯草芽孢杆菌作为好氧菌生长受到抑制<sup>[18]</sup>。因此,选取发酵时间 36 h,发酵温度 33 °C,接种量 9%,含水量 40%进行后续试验。



字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

图 2 发酵条件对米糠中谷维素含量的影响

Figure 2 Effects of fermentation condition on the content of oryzanol in rice bran

## 2.3 响应面实验

2.3.1 试验设计 基于单因素试验结果,选择发酵时间、发酵温度和接种量进行三因素三水平响应面优化,各因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

表 1 试验设计因素与水平表

Table 1 Factors and levels of experiment

水平	A 发酵时间/h	B 发酵温度/°C	C 接种量/%
-1	24	30.0	6
0	36	33.5	9
1	48	37.0	12

2.3.2 响应面模型建立与方差分析 通过 Design-Expert 11 对响应面实验结果进行分析,得到谷维素含量与各因素的二次多项式方程:

$$Y = 7.77 + 0.21A + 0.30B + 0.15C - 0.02AB + 0.10AC + 0.03BC - 0.21A^2 - 1.07B^2 - 0.36C^2 \quad (1)$$

由表 3 可知,模型  $P = 0.0002 < 0.01$ ,极显著;失拟项  $P = 0.3983 > 0.05$ ,不显著,表明该回归方程拟合较好。模型中 A、B、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 的 P 值均小于 0.01,对谷维素含量的影响极显著;C 和 A<sup>2</sup> 的 P 值均小于 0.05,对谷维素含量的影响显著。各因素对谷维素含量的影响从大到小依次为发酵温度 > 发酵时间 > 接种量。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Design and test results of response surface

组合	A	B	C	Y 谷维素含量/(mg · g <sup>-1</sup> )
1	0	1	-1	6.561
2	1	1	0	6.913
3	0	0	0	7.782
4	1	-1	0	6.485
5	-1	0	1	7.081
6	0	0	0	7.864
7	-1	-1	0	6.015
8	0	1	1	6.832
9	1	0	1	7.693
10	-1	0	-1	6.891
11	-1	1	0	6.532
12	0	0	0	7.673
13	0	-1	1	6.054
14	1	0	-1	7.112
15	0	-1	-1	5.899

由图 3 可知,发酵温度和发酵时间、发酵温度和接种量、发酵时间和接种量均相互影响但交互作用不显著。

2.3.3 实验验证 根据响应面分析得到最优发酵工艺:发酵时间 43.8 h、发酵温度 33.9 °C、接种量 9.7%,此条件下谷维素含量预测值为 7.866 mg/g。为了方便操作,将最优发酵工艺调整为发酵时间 44 h,发酵温度 34 °C,接种量 10%,含水量 40%,在此条件下制备的发酵米糠中谷维素含量为(7.816±0.038) mg/g,与预测值接近,说明模型拟合较好,工艺可行。

苗圃<sup>[18]56-57</sup>采用枯草芽孢杆菌固态发酵米糠 120 h,经发酵条件优化后,谷维素含量由未发酵的 2.76 mg/g 提高到 4.51 mg/g。采用紫红曲霉固态发酵苦荞碎米 9 d,测得谷维素含量最高为 1.59 mg/g<sup>[19]24</sup>。冯海燕<sup>[28]</sup>利用

表 3 响应面二次模型方差分析结果<sup>†</sup>

Table 3 Results of variance analysis of quadratic model of response surface

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	5.870 0	9	0.652 8	51.07	0.000 2	极显著
A	0.354 5	1	0.354 5	27.73	0.003 3	极显著
B	0.711 0	1	0.711 0	55.63	0.000 7	极显著
C	0.179 1	1	0.179 1	14.01	0.013 4	显著
AB	0.002 0	1	0.002 0	0.15	0.710 1	
AC	0.038 2	1	0.038 2	2.99	0.144 3	
BC	0.003 4	1	0.003 4	0.26	0.629 8	
A <sup>2</sup>	0.169 9	1	0.169 9	13.29	0.014 8	显著
B <sup>2</sup>	4.250 0	1	4.250 0	332.12	<0.000 1	极显著
C <sup>2</sup>	0.489 9	1	0.489 9	38.33	0.001 6	极显著
残差	0.063 9	5	0.012 8			
失拟项	0.045 5	3	0.015 2	1.65	0.398 3	不显著
纯误差	0.018 4	2	0.009 2			
总差	5.940 0	14				

<sup>†</sup> R<sup>2</sup>=0.989 2;R<sub>adj</sub><sup>2</sup>=0.969 9。

枯草芽孢杆菌 XZ1125 改善米糠营养价值,通过固态发酵 72 h,测得其谷维素含量分别为 4.48 mg/g,而原米糠中谷维素仅为 2.38 mg/g。而采用酿酒酵母和枯草芽孢杆菌混合发酵,谷维素含量由未发酵米糠 4.152 mg/g 增加到 7.816 mg/g,增加了 1.9 倍,且用时更短。

2.4 固态发酵对抗氧化活性的影响

2.4.1 DPPH 自由基清除能力 为了评估混菌固态发酵法对抗氧化活性的影响,考察了溶剂浸提法、未发酵法和混菌固态发酵法对 DPPH 自由基清除能力的影响。从图 4 可以看出,在米糠提取物质量浓度为 0.015 6~1.000 0 mg/mL 时,随着提取物浓度的升高,提取物对 DPPH 自由基清除率逐渐上升,后趋于平缓。其中,混菌固态发酵样品制备的提取物清除 DPPH 自由基活性显著

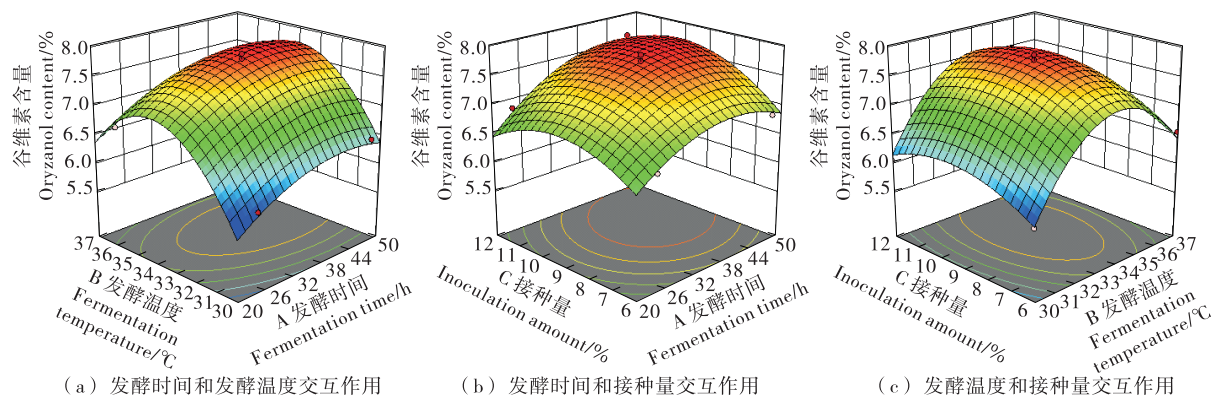


图 3 各因素交互作用对米糠中谷维素含量的影响

Figure 3 Effects of the interaction of various factors on the content of oryzanol in rice bran

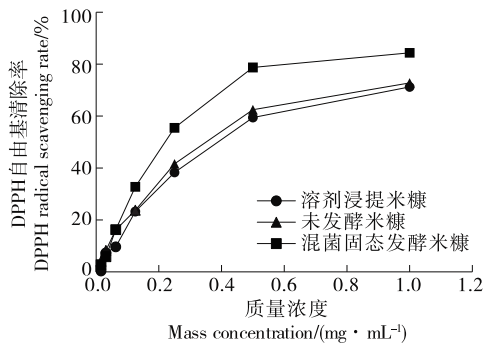


图4 混菌固态发酵对DPPH自由基清除率的影响

Figure 4 Effects of mixed bacterial solid-state fermentation on DPPH radical scavenging rate

强于溶剂浸提法和未发酵样品制备的提取物,其 $IC_{50}$ 值分别为 $(0.220 \pm 0.007)$ ,  $(0.389 \pm 0.013)$ ,  $(0.308 \pm 0.058)$  mg/mL。这可能与混菌固态发酵法制备的提取物中抗氧化活性成分尤其是谷维素含量更高紧密相关。郭利娜<sup>[15]</sup><sup>53-66</sup>采用枯草芽孢杆菌发酵小米糠,经体内抗氧化试验证明,发酵小米糠对DPPH自由基清除率显著高于谷胱甘肽,小鼠经发酵小米糠处理后,体内丙二醛含量明显下降,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶活力显著提高。Le等<sup>[29]</sup>研究发现,米糠经各乳酸菌发酵后,其发酵物(质量浓度为2 mg/mL)最高可清除88.64%的DPPH自由基,是未发酵米糠的1.2倍。说明混菌固态发酵法对促进抗氧化活性成分释放,增强抗氧化活性效果显著。

2.4.2 ABTS自由基清除能力 从图5可以看出,在米糠提取物质量浓度为0.015 6~1.000 0 mg/mL时,随着提取物浓度的升高,ABTS自由基清除率逐渐增强。其中,混菌固态发酵样品制备的提取物清除ABTS自由基活性要显著高于溶剂浸提法和未发酵样品制备的提取物,其 $IC_{50}$ 值分别为 $(0.409 \pm 0.014)$ ,  $(0.842 \pm 0.022)$ ,  $(0.678 \pm 0.032)$  mg/mL。发酵米糠提取物质量浓度为

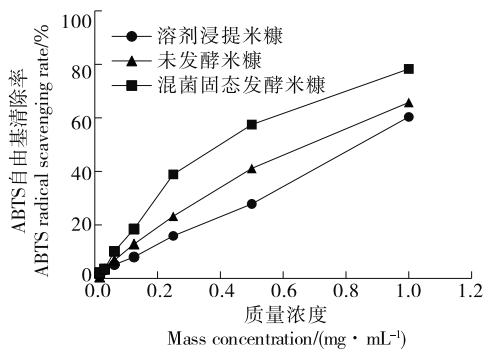


图5 混菌固态发酵对ABTS自由基清除率的影响

Figure 5 Effects of mixed bacterial solid-state fermentation on ABTS radical scavenging rate

0.500 0 mg/mL时,混菌固态发酵法、溶剂浸提法和未发酵样品制备的提取物对ABTS自由基清除率分别为57.50%,27.83%,41.13%。将红曲菌和枯草芽孢杆菌对燕麦进行连续发酵,发酵后的样品清除ABTS自由基活性也显著高于未发酵样品<sup>[30]</sup>。该试验结果与DPPH自由基清除结果趋势一致,进一步说明与溶剂浸提法和未发酵米糠相比,混菌固态发酵米糠抗氧化活性更强。

## 2.5 扫描电镜分析

为了从宏观上观察混菌固态发酵法对米糠的影响,研究采用扫描电镜分析对米糠形态进行观察。从图6可以看出,新鲜米糠组织结构致密,表面上附着一层泛有光泽的油脂。溶剂浸提后,米糠组织表面的油脂大大减少,但组织结构基本保持完整。未发酵米糠因超声波处理后,米糠组织表面的油脂大大减少,且组织结构出现了一定程度的破碎。而固态发酵米糠组织表面油脂几乎消失,且在超声波处理下组织结构出现严重的破碎,有利于米糠中活性成分的释放。

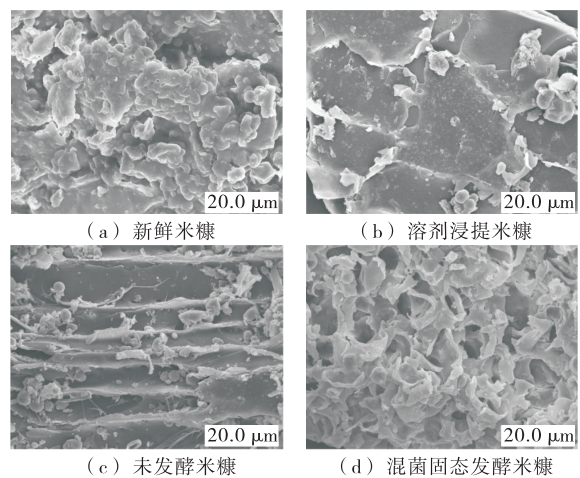


图6 不同处理方式下米糠的扫描电镜图

Figure 6 SEM images ( $2\ 000 \times$ ,  $2.0\ \mu\text{m}$ ,  $15.0\ \text{kV}$ ) of rice bran under different treatments

## 3 结论

枯草芽孢杆菌和酿酒酵母具有富集谷维素的能力,这与纤维素酶、果胶酶等的活性相关。因此,筛选高水平表达纤维素酶、果胶酶的菌株,是高产米糠谷维素的有效途径。试验表明,酿酒酵母与枯草芽孢杆菌固态发酵富集米糠谷维素的最优工艺为发酵时间44 h,发酵温度 $34\ ^\circ\text{C}$ ,接种量10%,含水量40%,此条件下谷维素含量为 $(7.816 \pm 0.038)$  mg/g,是未发酵米糠中谷维素含量的1.9倍。但是,研究还未阐明不同培养条件下,枯草芽孢杆菌和酿酒酵母中该酶的活性差异,在后续研究中,将聚焦这方面的研究。

## 参考文献

- [1] 魏林. 米糠综合应用研究进展[J]. 粮食加工, 2022, 47(3): 37-39.  
WEI L. Research progress on comprehensive application of rice bran[J]. Grain Processing, 2022, 47(3): 37-39.
- [2] GUL K, YOUSUF B, SINGH A K, et al. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food-a review[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015, 6(1): 24-30.
- [3] TSUZUKI W, MOGUSHI H, KAWAHARA S, et al. The content and distribution of steryl ferulates in wheat produced in Japan [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2017, 81(3): 573-580.
- [4] WANG L, LIN Q L, YANG T, et al. Oryzanol modifies high fat diet-induced obesity, liver gene expression profile, and inflammation response in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(38): 8 374-8 385.
- [5] YAN S S, CHEN J H, ZHU L F, et al. Oryzanol alleviates high fat and cholesterol diet-induced hypercholesterolemia associated with the modulation of the gut microbiota in hamsters[J]. Food Function, 2022, 13(8): 4 486-4 501.
- [6] XU Z, HUA N, GODBER J S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2, 2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(4): 2 077-2 081.
- [7] XIA X X, LIN H, LUO F J, et al. Oryzanol ameliorates DSS-stimulated gut barrier damage via targeting the gut microbiota accompanied by the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 cascade response in vivo [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70: 15 747-15 762.
- [8] 高琨, 姜平, 谭斌, 等. 稻米及其加工副产物米糠中  $\gamma$ -谷维素研究现状[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(5): 91-98.  
GAO K, JIANG P, TAN B, et al. Research progress on  $\gamma$ -oryzanol in rice and its processed by-product rice bran[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(5): 91-98.
- [9] 朱云. 弱酸取代法在谷维素提取中的应用[J]. 粮食与食品工业, 2019, 26(4): 41-43.  
ZHU Y. Application of weak acid substitution method in oryzanol extraction[J]. Cereal & Food Industry, 2019, 26(4): 41-43.
- [10] TRUONG H T, LUU P D, KIYOSHI I, et al. Binary solvent extraction of tocols, gamma-oryzanol, and ferulic acid from rice bran using alkaline treatment combined with ultrasonication [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(24): 4 897-4 904.
- [11] SOOKWONG P, SUTTIARPOM P, BOONTAKHAM P, et al. Simultaneous quantification of vitamin E,  $\gamma$ -oryzanols and xanthophylls from rice bran essences extracted by supercritical CO<sub>2</sub>[J]. Food Chemistry, 2016, 211: 140-147.
- [12] KUMAR P, YADAV D, KUMAR P, et al. Comparative study on conventional, ultrasonication and microwave assisted extraction of gamma-oryzanol from rice bran[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(4): 2 047-2 053.
- [13] 陈嘉序, 傅亚平, 高瑶, 等. 固态生物转化对植物性食品加工副产物生物活性影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 219-227.  
CHEN J X, FU Y P, GAO Y, et al. Research advance on effects of solid-state biotransformation on biological activity of plant food processing by-products [J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 219-227.
- [14] 尹孝超, 钱海峰, 王立, 等. 米糠固态发酵工艺优化及其氨基酸变化[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 42-46.  
YIN X C, QIAN H F, WANG L, et al. Effect of solid-state fermentation on the ingredients of rice bran[J]. Food & Machinery, 2017, 33(3): 42-46.
- [15] 郭利娜. 枯草芽孢杆菌发酵小米糠产抗氧化活性物质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.  
GUO L N. Study on antioxidant activity material by *Bacillus subtilis* fermented millet bran[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [16] 李伊昕. 基于米糠发酵的富  $\gamma$ -氨基丁酸黄酒的制备及品质分析研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2021: 10-22.  
LI Y X. Preparation and quality analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid-rich rice wine based on rice bran fermentation[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2021: 10-22.
- [17] 张夏秋, 刘丽娅, 王丽丽, 等. 米根霉发酵米糠工艺优化及其益生活性研究[J]. 核农学报, 2020, 34(10): 280-289.  
ZHANG X Q, LIU L Y, WANG L L, et al. Process optimization of rice bran fermentation and study on the probiotic activity of *Rhizopus oryzae* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(10): 280-289.
- [18] 苗圃. 枯草芽孢杆菌固态发酵米糠及其降甘油三酯功能的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.  
MIAO P. Research on *Bacillus subtilis* solid-fermentation of rice bran and its function of triglyceride-lowering[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [19] 杨玉洁. 基于微生物代谢调控的高产  $\gamma$ -谷维素体系构建[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.  
YANG Y J. Construction of high-yield  $\gamma$ -oryzanol system based on microbial metabolism regulation [D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.
- [20] ZHANG D Q, YE Y J, TAN B. Comparative study of solid-state fermentation with different microbial strains on the bioactive compounds and microstructure of brown rice[J]. Food Chemistry, 2022, 397: 133735.
- [21] 韦涛, 周启静, 陆兆新, 等. 纳豆芽孢杆菌固态发酵小米糠产抗氧化肽工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 66-73.  
WEI T, ZHOU Q J, LU Z X, et al. Optimization of solid state

- fermentation conditions for production of antioxidant peptides from millet bran by *Bacillus natto*[J]. Food Science, 2017, 38(10): 66-73.
- [22] 伍蓉, 黄小兰, 何旭峰, 等. 地参发酵酒的挥发性成分分析和体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2023, 14(6): 118-123.  
WU R, HUANG X L, HE X F, et al. Volatile components analysis and antioxidant activity in vitro of *Lycopus lucidus* var. *hirtus* regel fermented wine[J]. The Food Industry, 2023, 14(6): 118-123.
- [23] 孙晓明, 辛嘉英, 王艳, 等. 微生物发酵产阿魏酸酯酶及释放阿魏酸研究概述[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(1): 201-206.  
SUN X M, XIN J Y, WANG Y, et al. Summary on the conditions offerulic acid esterase and ferulic acid production by microorganism fermentation[J]. Food Research and Development, 2019, 40(1): 201-206.
- [24] 陈如扬, 樊子依, 潘一玲, 等. 冠突散囊菌对植物酚类物质的生物转化及生物活性的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(8): 193-201.  
CHEN R Y, PAN Z Y, PAN Y L, et al. *Eurotium cristatum* biotransformation plant phenolic compounds and affects their biological activities: A review[J]. Food Research and Development, 2022, 43(8): 193-201.
- [25] 曾亚桐, 张怡, 朱秋菊, 等. 枯草芽孢杆菌与产脲假丝酵母发酵豆粕的酶活力测定[J]. 天津科技, 2018, 45(6): 54-57, 62.  
ZENG Y T, ZHANG Y, ZHU Q J, et al. Determination of enzyme activities from *Bacillus subtilis* and *Candida* Nguyen fermentation soybean meal[J]. Tianjin Science & Technology, 2018, 45(6): 54-57, 62.
- [26] 郑自强, 卫春会, 邓杰, 等. 一株产纤维素酶枯草芽孢杆菌的麸曲制作及其产酶特性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(10): 12-17.  
ZHENG Z Q, WEI C H, DENG J, et al. Study on the production of Fuqu and the characteristics of enzyme about a cellulase producing *Bacillus subtilis*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(10): 12-17.
- [27] 金爽, 白雪, 任裕斌, 等. 固载微生物菌群发酵槐角对染料木素含量及抗氧化活性的影响[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(3): 370-376.  
JIN S, BAI X, REN Y B, et al. Effect of *Fructus Sophorae* fermentation by immobilized microbial flora on genistein content and antioxidant activity[J]. Journal of Shanxi Medical University, 2023, 54(3): 370-376.
- [28] 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的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 52.  
FENG H Y. Using *Bacillus subtilis* XZI125 to improve functional components and nutritional value of rice bran[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 52.
- [29] LE B, ANH P T N, KIM J E, et al. Rice bran fermentation by lactic acid bacteria to enhance antioxidant activities and increase the ferulic acid,  $p$ -coumaric acid, and  $\gamma$ -oryzanol content[J]. Journal of Applied Biological Chemistry, 2019, 62(3): 257-264.
- [30] 刘燕. 双菌发酵燕麦改善多酚抗氧化活性及其体外消化特性[D]. 广州: 华南理工大学, 2023: 51-55.  
LIU Y. Improving phenolic bioactivity in double-strain fermented oats and their characteristics in vitro digestion [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2023: 51-55.

---

(上接第 109 页)

- [11] 武春龙, 朱天明, 张鹏, 等. 基于功能模型和层次分析法的智能产品服务系统概念方案构建[J]. 中国机械工程, 2020, 31(7): 853-864, 870.  
WU C L, ZHU T M, ZHANG P, et al. Conceptual scheme construction of smart PSS based on functional model and AHP[J]. China Mechanical Engineering, 2020, 31(7): 853-864, 870.
- [12] 王俊平, 徐刚. 机器视觉和电子鼻融合的番茄成熟度检测方法[J]. 食品与机械, 2022, 38(2): 148-152.  
WANG J P, XU G. Research on tomato maturity detection method based on machine vision and electronic nose fusion[J]. Food & Machinery, 2022, 38(2): 148-152.
- [13] CHEN J L, ZHANG M, XU B G, et al. Artificial intelligence assisted technologies for controlling the drying of fruits and vegetables using physical fields: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 251-260.
- [14] FAN S X, LI J B, ZHANG Y H, et al. On line detection of defective apples using computer vision system combined with deep learning methods[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 286: 1-10.

---

(上接第 133 页)

- [16] 熊俊涛, 梁翠晓, 林忠凯, 等. 基于支持向量机的柑橘表征缺陷荧光检测[C]// 2018 粤港澳大湾区智能检测与协同创新青年论坛论文集. 广州: 中国仪器仪表学会, 2018: 294-300.  
XIONG J T, LIANG C X, LIN Z K, et al. Fluorescence detection of citrus characterization defects based on SVM[C]// Proceedings of 2018 Guangdong Hong Kong Macao Greater Bay Area Intelligent Detection and Collaborative Innovation Youth Forum. Guangzhou: China Instrument and Control Society, 2018: 294-300.
- [17] 赵玉清, 杨慧丽, 张悦, 等. 基于特征组合与 SVM 的小粒种咖啡缺陷生豆检测[J]. 农业工程学报, 2022, 38(14): 295-302.  
ZHAO Y Q, YANG H L, ZHANG Y, et al. Detection of defective Arabica green coffee beans based on feature combination and SVM[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2022, 38(14): 295-302.