

发酵对几种谷物提取物总酚及抗氧化活性的影响

张慧芸, 陈俊亮, 康怀彬

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 目的: 研究发酵对谷物提取物抗氧化活性的影响。方法: 采用德氏乳杆菌和啤酒酵母菌分别对小米、燕麦、黑米、高粱米4种谷物进行发酵, 福林-酚法测定未发酵及发酵后谷物乙醇提取物总酚含量、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH)法测定清除自由基能力、铁还原抗氧化能力(ferric reducing-antioxidant power, FRAP)法测定还原能力、硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法测定脂质过氧化抑制能力。结果: 4种谷物提取物具有显著的清除自由基能力、铁离子还原能力、抑制脂质过氧化能力和较高的总酚含量; 经两种微生物发酵后谷物提取物总酚含量增加, 具有更高抗氧化活性; 其中德氏乳杆菌发酵对总酚含量及抗氧化能力影响均显著($P<0.05$); 啤酒酵母发酵对总酚含量影响显著($P<0.05$), 但对抗氧化能力影响不显著($P>0.05$)。结论: 微生物发酵可提高谷物的总酚含量及抗氧化活性, 但提高的程度与发酵采用的微生物种类有关。

关键词: 发酵; 谷物提取物; 总酚; 抗氧化

Effect of Fermentation on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Cereal Extract

ZHANG Hui-yun, CHEN Jun-liang, KANG Huai-bin

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: The objective of this work was to assay the influence of different fermentation types (yeast fermentation and lactic acid fermentation) on antioxidant activity and total polyphenol content in selected cereals. After fermented by *Lactobacillus delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* or nothing, the cereals were extracted by ethanol. The content of total polyphenols in extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity was measured by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, ferric reducing-antioxidant power (FRAP) method and thiobarbituric acid (TBA) test. This study indicated that four cereals used widely for human consumption exhibited significant levels of free radical scavenging activity, ferric-reducing power, inhibitory activity against lipid peroxidation and total polyphenol content. These factors suggested that cereal-based foods alone could contain important dietary antioxidants, but further research is needed to determine whether or not these dietary antioxidants could be beneficial to human health. The total polyphenol content (TPC) increased upon fermentation. The presence of these microorganisms was more or less important for enhanced levels of antioxidant activity. Thus fermentation offers a tool to further increase the bioactive potential of cereal products. In conclusion, it seems advantageous to select microorganism starter culture for the fermentation of cereals based on their positive correlation with total antioxidant capacity.

Key words: fermentation; cereal extracts; total polyphenol; antioxidant

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)11-0195-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411039

近年来国内外研究发现, 谷物及谷物食品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, 这些多酚类化合物具有很强的抗氧化活性^[1-5], 开发潜力极大。小米、高粱中的酚类化合物具有很强的抗氧化能力, 尤其是清除自由基和螯合金属离子能力^[6-7]。黑米亦含有大量酚类化合物, 能有效地清除过氧自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl, DPPH) 自由基和羟自由基, 有效地控制低密度脂蛋白胆固醇的氧化, 在抗氧化保健品开发方面具有很大潜力^[8]。研究表明, 具有抗氧化活性的谷物食品有助于减少与衰老有关慢性疾病的发生率, 包括心脏病和某些癌症^[9]。另一方面, 已经发现谷物中含有一定的抗营养成分, 影响其生物可利用性,

收稿日期: 2013-05-29

作者简介: 张慧芸(1977—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物活性分析。E-mail: zhanghuiyun21@163.com

如不易溶解、消化的植酸盐类、阿拉伯木聚糖和 β -葡聚糖等抗营养因子^[10]。发酵长期以来被作为一种提高产品性能的方法,微生物发酵过程可以改性植物组分^[11];发酵过程中产生许多生物化学变化,从而可以改变植物中营养成分和抗营养组分的比例,提高产品的生物活性和消化性等^[12-13]。Juan等^[14]研究发现,黑豆在经过枯草芽孢杆菌固态发酵后总酚和总黄酮的含量都有增加。Moore等^[15]研究发现,麦麸经酵母菌固态发酵后抗氧化活性提高。本实验研究了酵母菌发酵和乳酸菌发酵对4种谷物提取物抗氧化活性和总酚含量的影响,以期开发谷物抗氧化食品提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)和德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*) ATCC7830 河南科技大学食品与生物工程学院实验室保存菌种。

MRS培养基和胰蛋白酶大豆肉汤培养基 北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 材料与试剂

小米、高粱米、燕麦 洛阳市吕昌谷业有限公司,产地河南省洛阳市伊川县;黑米 河南黑谷源土特产品开发有限公司,产地河南省洛阳市宜阳县。

大豆卵磷脂、 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪(tripyridyl-triazine, TPTZ)、DPPH 美国Sigma公司;氯仿、三氯乙酸、硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)、没食子酸、福林酚试剂 中国医药集团(上海)化学试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 微生物菌种的培养

*L. delbrueckii*和*S. cerevisiae*冻干粉分别接种于MRS肉汤培养基(37℃, 24h)和胰蛋白酶大豆肉汤培养基中(30℃, 24h)进行活化,活化3次后接种于谷物样品中。

1.3.2 谷物提取物的制备

谷物100g在室温下于蒸馏水中浸泡24h后过滤,加入400mL蒸馏水研磨得浆状物于高压锅中杀菌1h,然后冷却至室温。每种谷物样品分为3组:第1组接种5mL *L. delbrueckii*,第2组接种5mL *S. cerevisiae*,第3组不接种。3组谷物样品均于30℃发酵24h。发酵后加入700mL 70%乙醇磁力搅拌3h,4500r/min离心10min,残渣加入300mL 70%乙醇重提3h后,4500r/min离心10min。合并滤液在旋转蒸发仪(60℃)中浓缩,取出浓缩液在60℃烘箱中干燥,得到谷物提取物,避光保存于4℃冰箱中待用。

1.3.3 总酚含量的测定

参考Wu^[16]和Djeridane^[17]等方法,稍加改进。

100 μL 样品置10mL容量瓶中,加入福林酚试剂500 μL ,加蒸馏水至约6mL,于漩涡混合器中混合,在1~8min内加15g/100mL碳酸钠溶液2mL,用蒸馏水稀释至刻度,于漩涡混合器中混合,2h后在765nm波长处测定吸光度。以没食子酸作标准品代替样品作标准曲线,样品中的总酚含量以没食子酸的含量表示,单位为mg/g。

1.3.4 DPPH自由基清除能力的测定

参考Larrauri等^[18]的方法并进行改进。吸取0.1mL 200 $\mu\text{g/mL}$ 的谷物提取物,加入0.5mL 50g/L的DPPH-甲醇溶液,用甲醇定容至5mL。室温下避光静置1h后于517nm波长处测定吸光度。样品对DPPH自由基的清除率用下式表示。

$$\text{DPPH自由基清除率/\%} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: A 为样品溶液的吸光度; A_0 为空白溶液的吸光度。

1.3.5 铁还原抗氧化能力(ferric reducing-antioxidant power, FRAP)法测定抗氧化能力

参照Benzie等^[19]的方法,在反应管中加入0.1mL 200 $\mu\text{g/mL}$ 的谷物提取物,再准确加入3mL FRAP工作液,300 μL 双蒸水,混匀,准确反应8min,于593nm波长处读取吸光度,95%食用酒精调零。以100~1000 $\mu\text{mol/L}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 制作标准曲线。样品的抗氧化活性(FRAP值)以达到同样吸光度所需的 FeSO_4 毫摩尔数表示,每份试样重复测定3次。FRAP工作液现用现配,由pH3.6的100mL 30mmol/L醋酸盐缓冲液、10mL 10mmol/L TPTZ溶液和10mL 20mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液混合在一起组成。

1.3.6 抗脂质过氧化能力的测定

脂质体由大豆卵磷脂制得,采用Decker等^[20]的方法进行一些改进。将大豆卵磷脂溶解(200mg/L)在0.12mol/L KCl、5mmol/L组氨酸缓冲溶液(pH6.8)均质后,4℃条件下进行45min超声波处理,以促其溶解^[21]。

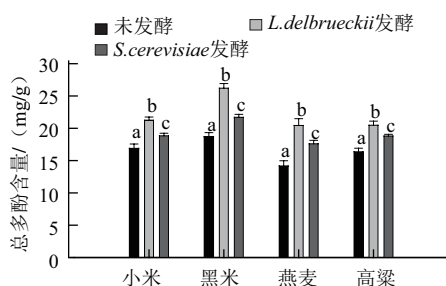
将5mL脂质体溶液和1mL 200 $\mu\text{g/mL}$ 的谷物提取物混合。对照为用1mL 70%乙醇代替1mL谷物提取物与5mL脂质混合。加入0.1mL 50mmol/L FeCl_3 和0.1mL 10mmol/L抗坏血酸钠引发脂质氧化,然后将样品放在37℃水浴中保温1h,其氧化程度由TBA法测定。样品溶液与0.02mol/L TBA反应后,与氯仿体积比1:1混合,漩涡振荡,1800 $\times\text{g}$ 离心10min。取上清测定在532nm波长处的吸光度。抗脂质氧化能力的计算公式同1.3.4节。

1.4 数据分析

所得数据均为3次重复的平均值,用Statistix 8(分析软件,St Paul, MN)进行数据分析,平均数之间显著性差异($P < 0.05$)通过最小显著差值进行,用Sigmaplot9.0作图。

2 结果与分析

2.1 发酵对谷物提取物总酚含量的影响



小写字母不同,表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图1 发酵对4种谷物提取物总酚含量的影响

Fig.1 Effect of fermentation on total polyphenolics of cereal extracts

如图1所示,所测未发酵谷物提取物中黑米中总酚含量最高为18.7 mg/g,小米和高粱中总酚含量较低分别为16.9 mg/g和16.4 mg/g,燕麦中总酚含量最低为14.2 mg/g。发酵可提高谷物中所含生物活性成分含量,经*S. cerevisiae*和*L. delbrueckii*发酵后,黑米提取物总酚含量分别提高了16%和40.6%,高粱提取物总酚含量分别提高了14.6%和25%,小米提取物总酚含量分别提高了11.2%和25.4%,燕麦提取物总酚含量分别提高了23.9%和43.7%。结合酚是谷物酚类化合物的主要存在形式^[22-23],谷物中结合酚类化合物可在提取之前通过碱、酸或酶处理使其释放出来^[24],这可能是发酵后谷物提取物总酚含量增加,具有更高抗氧化活性的主要原因。另外,由于发酵过程中微生物的代谢活动对植物中生物活性物质进行改性,且发酵可使谷物细胞壁分解,导致各种生物活性物质的释放或合成^[13,25]。

2.2 发酵对谷物提取物DPPH自由基清除能力的影响

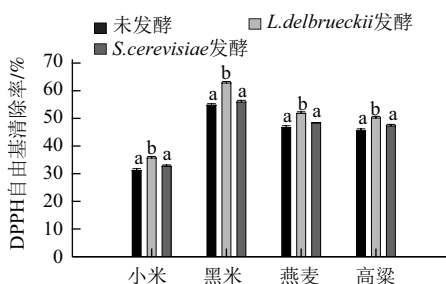


图2 发酵对4种谷物提取物DPPH自由基清除能力的影响

Fig.2 Effect of fermentation on DPPH radical scavenging activity of cereal extracts

由于此法简单方便,DPPH自由基已被广泛用于分析抗氧化活性成分的自由基清除能力。如图2所示,未发酵小米提取物自由基清除能力仅为31%。Linda等^[6]研究也表明,小米提取物DPPH自由基清除能力较弱。燕

麦和高粱具有较强的DPPH自由基清除能力分别为46.7%和46.6%。黑米提取物具有最强的DPPH自由基清除能力为54.7%。经*L. delbrueckii*发酵后谷物提取物DPPH自由基清除活性均有所提高,差异显著 ($P < 0.05$);而经*S. cerevisiae*发酵对谷物提取物的DPPH自由基清除活力影响不显著 ($P > 0.05$)。Moore等^[15]研究发现小麦经某种酵母菌发酵后DPPH自由基清除能力有所增加,但经其他类型酵母菌发酵后其清除能力反而降低,造成这种差别的原因可能是由于不同酵母菌本身具有不同的DPPH自由基清除能力。

2.3 发酵对谷物提取物还原能力的影响

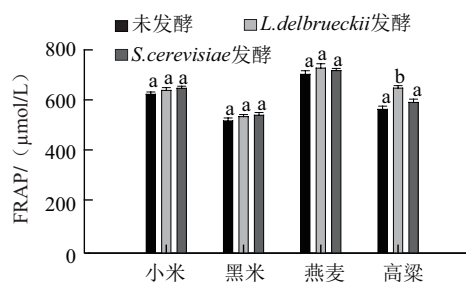


图3 发酵对4种谷物提取物还原能力的影响

Fig.3 Effect of fermentation on FRAP of cereal extracts

如图3所示,未发酵燕麦提取物FRAP值最高为714.6 μmol/L,其次是小米提取物和高粱提取物分别为634.9 μmol/L和574.5 μmol/L,黑米提取物最低为528.6 μmol/L。本研究中只有高粱经*L. delbrueckii*发酵后其提取物FRAP值显著增加 ($P < 0.05$),小米、黑米和燕麦经*L. delbrueckii*发酵前后其提取物FRAP值差异不显著 ($P > 0.05$);经*S. cerevisiae*发酵前后4种谷物提取物FRAP值亦差异均不显著 ($P > 0.05$),与Hubert等^[14]的报道相一致。

2.4 发酵对谷物提取物抗脂质过氧化能力的影响

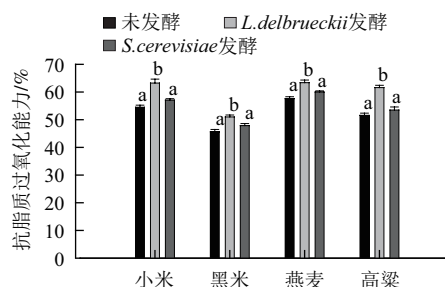


图4 发酵对4种谷物提取物抗脂质过氧化能力的影响

Fig.4 Effect of fermentation on lipid peroxidation inhibition activity of cereal extracts

如图4所示,未发酵燕麦提取物具有最大的抗脂质过氧化能力为57.6%,接下来依次为小米和高粱分别为54.5%和51.6%,黑米最低为45.6%。经*L. delbrueckii*发酵

后谷物提取物抗脂质过氧化能力显著提高 ($P<0.05$)，小米、黑米、燕麦和高粱提取物抗脂质过氧化能力分别提高了16.0%、11.8%、10.0%和19.4%，而经*S. cerevisiae*发酵后对其影响不显著 ($P>0.05$)。关于微生物发酵谷物提取物对脂质过氧化抑制效果影响的报道较少，同一种样品测定抗脂质过氧化活性使用的脂质体系不同所测得抗氧化活性相差也很大^[27]。

3 讨论

不同微生物发酵对被测谷物中多种生物活性化合物改性的影响不同，这可能由于不同微生物发酵产生的pH值不同，谷物内核细胞壁降解酶的释放程度不同^[28]。Kariluoto等^[29]研究亦表明，发酵通常情况下会提高谷物总多酚含量和谷物提取物的抗氧化活性，但提高的程度与发酵采用的微生物种类有关。对抗氧化活性与总酚含量之间的不确定关系有几种解释：1) 总酚含量不包括所有抗氧化物，如抗坏血酸、类胡萝卜素和生育酚；2) 不同抗氧化物的协同作用使其抗氧化活性不仅取决于抗氧化物的含量还要考虑抗氧化物的结构及之间的相互作用，这就是导致具有相似总多酚浓度的样品其抗氧化活性相差很大的原因；3) 不同测定抗氧化活性的方法基于不同的反应机制，可能会导致不同的结果^[30]。

本研究结果表明，谷物具有显著的清除自由基能力、铁离子还原能力、抑制脂质过氧化能力和较高的总酚含量，谷物食品本身可能包含重要的膳食抗氧化剂，因此，值得进一步研究，以确定这些膳食抗氧化剂是否利于人体健康。可通过微生物对谷物进行发酵提高其抗氧化活性，发酵可提高谷物中许多生物活性化合物的含量并可改变谷物中营养成分和抗营养成分的比例以提高产品特性；发酵类型对谷物生物活性组分具有潜在影响。然而，对谷物发酵过程中微生物菌群变化和相关酶活性的变化还需要进行更详细的研究，以便建立发酵谷物提高营养价值的明确机制。还需进一步研究发酵谷物提取物的组成，鉴定其中的抗氧化物质，分析谷物产品作为天然抗氧化剂和保健品的潜力；研究影响谷物抗氧化剂在人体中分布、稳定性和活性的生物和食品加工条件以便生产出具有最大产品功效的保健食品。

4 结论

通过研究两种不同微生物发酵对4种谷物提取物总酚含量及抗氧化活性的影响发现，未发酵4种谷物提取物具有较强的清除自由基能力、铁离子还原能力、抑制脂质过氧化能力和较高的总酚含量；经两种微生物发酵后谷物提取物总酚含量增加，具有更高抗氧化活性；其

中*L. delbrueckii*发酵对总酚含量及抗氧化活性影响均显著 ($P<0.05$)；*S. cerevisiae*发酵对总酚含量影响显著 ($P<0.05$)，但对抗氧化活性影响不显著 ($P>0.05$)。微生物发酵可提高谷物的总酚含量及抗氧化活性，但提高的程度与发酵采用的微生物种类有关。

参考文献：

- [1] BAUBLIS A, DECKER E A, CLYDESDALE F M. Antioxidant effects of aqueous extracts from wheat-based ready-to-eat breakfast cereals[J]. Food Chemistry, 2000, 68: 1-6.
- [2] ADOM K, LIU Ruihai. Antioxidant activity of grains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 6182-6187.
- [3] LIYANA-PATHIRANA C M, SHAHIDI F. Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86: 477-485.
- [4] 侯冬岩, 回瑞华, 刘晓媛, 等. 荞麦大麦和燕麦抗氧化性能的比较[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 54-56.
- [5] 姚亚平, 曹炜, 陈卫军, 等. 不同品种荞麦提取物抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 49-52.
- [6] LINDA D, LLOYD W R. Sorghum and millet phenols and antioxidants[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44: 236-251.
- [7] PRADEEP S R, GUHA M. Effect of processing methods on the nutraceutical and antioxidant properties of little millet (*Panicum sumatrense*) extracts[J]. Food Chemistry, 2011, 126: 1643-1647.
- [8] KONG S, LEE J. Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars[J]. Food Chemistry, 2010, 120: 278-281.
- [9] MILLER H E, RIGELHOF F, MARQUART L, et al. Whole-grain products and antioxidants[J]. Cereal Food World, 2000, 45: 59-63.
- [10] BEDFORD M R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes[J]. Animal Feed Science and Technology, 1995, 53: 145-155.
- [11] KATINA K, LIUKKONEN K H, KAUKOVIRTA-NORJA A, et al. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46: 348-355.
- [12] HEINIÖ R L, KATINA K, WILHELMSON A, et al. Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough fermented and native rye following the extrusion process[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 2003, 36: 533-545.
- [13] KATINA K, LAITILA A, JUVONEN R, et al. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye[J]. Food Microbiology, 2007, 24: 175-186.
- [14] JUAN M, CHOU C. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715[J]. Food Microbiol, 2010, 27: 586-591.
- [15] MOORE J, CHENG Z, HAO J, et al. Effects of solid-state yeast treatment on the antioxidant properties and protein and fiber compositions of common hard wheat bran[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 10173-10182.
- [16] WU Changqing, CHEN Feng, WANG Xi, et al. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification[J]. Food Chemistry, 2006, 96: 220-227.
- [17] DJERIDANE A, YOUSFI M, NADJEMI B, et al. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2006, 97(4): 654-660.

- [18] LARRAURIJA, SANCHEZ-MORENO C, SAURA-CALIXTO F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2694-2697.
- [19] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.
- [20] DECKER E A, HULTIN H O. Factors influencing catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of mackerel muscle[J]. *Journal of Food Science*, 1990, 55: 947-950; 953.
- [21] PENA-RAMOS E A, XIONG Y L. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system[J]. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84: 2577-2583.
- [22] DYKES L, ROONEY L W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits[J]. *Cereal Foods World*, 2007, 52(3): 105-111.
- [23] 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.
- [24] BARTOLOME B, GOMEZ-CORDOVES C. Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and *p*-coumaric acids) by commercial enzyme preparations[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79: 435-439.
- [25] LOPONEN J, MIKOLA M, KATINA K, et al. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations[J]. *Cereal Chemistry*, 2004, 81: 87-90.
- [26] HUBERT J, BERGER M, NEPVEU F, et al. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109: 709-721.
- [27] FRANKEL E N, HUANG S W, AESCHBACH R. Antioxidant activity of green teas in different lipid systems[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1997, 74: 1309-1315.
- [28] BOSKOV-HANSEN H, ANDERSEN M F, NIELSEN L M, et al. Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread making[J]. *European Food Research and Technology*, 2002, 214: 33-42.
- [29] KARILUOTO S, AITTAMAA M, KORHOLA M, et al. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106(2): 137-143.
- [30] SUN T, HO C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. *Food Chemistry*, 2005, 90: 743-749.