

基于代谢调控优化高产 γ -谷维素的苦荞发酵体系

朱安然, 杨玉洁, 秦礼康, 曾海英

(贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 该研究采用紫红曲霉发酵苦荞, 在前期研究的基础上, 从细胞膜通透性、金属离子浓度与底物诱导三个方面调控其代谢过程, 通过响应面法优化高产 γ -谷维素的发酵体系。单因素试验表明, 超声处理不能促进发酵产物中 γ -谷维素的积累, 添加表面活性剂 (Triton X-100、Tween-80、SDS)、 Ca^{2+} 离子、 Mg^{2+} 离子、谷甾醇均对 γ -谷维素的富集有正向调节的作用。通过响应面分析得到的调控参数为: Triton X-100 添加量 3.2‰, Ca^{2+} 添加量 4.2‰, 阿魏酸与谷甾醇配比 (阿魏酸:谷甾醇=1:1, $W:W$) 添加 0.5‰, 此条件下 γ -谷维素含量达到 2.61 mg/mL, 提高至未发酵前的 31.62 倍、调控前的 1.64 倍。红曲发酵苦荞产物呈浅红色, 具有浓郁的红曲香味, 并且通过代谢调控后发酵产物中含有丰富的 γ -谷维素, 其具有较好的工业开发前景。

关键词: γ -谷维素; 紫红曲霉; 苦荞; 代谢调控; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2021)05-63-70

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.5.0967

Optimization of High-yield γ -Oryzanol Fermentation System Based on Metabolic Regulation

ZHU An-ran, YANG Yu-jie, QIN Li-kang, ZENG Hai-ying

(College of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In this study, *Monascus purpureus* was used to ferment Tartary buckwheat. Based on previous researches, the metabolic process was regulated from three aspects: cell membrane permeability, metal ion concentration and substrate induction. The fermentation system with high yield of γ -oryzanol was optimized by the response surface method. The single factor experiment results showed that the accumulation of γ -oryzanol in the fermentation product could not be promoted by ultrasonic treatment, and the addition of surfactants (Triton X-100, Tween-80, SDS), Ca^{2+} , Mg^{2+} , and sitosterol had a positive effect on the accumulation of γ -oryzanol. The control process parameters obtained through response surface optimization were: Triton X-100 was 3.2‰, Ca^{2+} was 4.2‰, ratio of ferulic acid to sitosterol (ferulic acid:sitosterol=1:1, $W:W$) was 0.5‰. The content of γ -oryzanol after regulation can reach 2.61 mg/mL, which was increased to 1.64 times of that before regulation, and 31.62 times higher than that of the unfermented blank group. The fermented tartary buckwheat product of *Monascus purpureus* was light red with strong red yeast flavor. Furthermore, the fermentation product was rich in γ -oryzanol after metabolic regulation, which has a good industrial development prospect.

Key words: γ -oryzanol; *Monascus purpureus*; Tartary buckwheat; metabolism regulation; response surface methodology

引文格式:

朱安然, 杨玉洁, 秦礼康, 等. 基于代谢调控优化高产 γ -谷维素的苦荞发酵体系[J]. 现代食品科技, 2021, 37(5): 63-70, +211

ZHU An-ran, YANG Yu-jie, QIN Li-kang, et al. Optimization of high-yield γ -Oryzanol fermentation system based on metabolic regulation [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(5): 63-70, +211

γ -谷维素 (γ -Oryzanol) 是三萜烯醇类、环木菠萝醇类阿魏酸酯和甾醇类阿魏酸酯组成的天然混合物^[1,2], 广泛存在于米糠油、玉米胚芽油、菜籽油等

收稿日期: 2020-10-22

基金项目: 贵州省食用豆工程技术研究中心 (黔科合平台人才[2018]5254号); 贵州省现代农业 (特色杂粮) 产业技术体系建设项目 (黔农财[2018]81号)

作者简介: 朱安然 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程

通讯作者: 曾海英 (1978-), 女, 副教授, 研究方向: 食品发酵与安全

多种植物油中, 尤其在米糠毛油中含量最高^[3,4], 大约占 1%~3%^[5], 它的含量根据植物品种、生长环境气候和提取工艺不同而略有差异^[6,7]。因其具有抗氧化^[8,9]、降血脂^[10]、降血糖^[11]、抗炎^[12]、抗糖尿病^[13]、改善更年期症状^[14]等生物活性, 在化妆品、食品、医学行业都有着广泛的应用^[15]。如今, γ -谷维素合成大多集中在化学合成法和提取技术层面^[16-18], 随着 γ -谷维素研究的不断深入以及人们对其认识的不断提高, 不论从功能作用, 还是从经济效益等角度来看,

γ -谷维素新的制备方法及生产工艺都迎来了更高的挑战。

利用益生菌发酵方法提高产品品质和生理活性一直是食品行业的研究热点,然而发酵过程中存在的产物反馈抑制或自我降解的现象会在一定程度上降低目标代谢产物的累积。代谢调控是通过改变生物体中已有的代谢网络和表达调控网络从而改善细胞的性能,并用于化学转化、能量转移及大分子装配的过程^[19],增加微生物细胞膜通透性^[20,21]、加入辅酶及辅因子和诱导剂类似物对酶的诱导作用等进行调控^[22,23],都能在一定程度上消除产物反馈抑制,进一步促进其积累目标产物。孙锡友^[24]在发酵赤藓糖醇的研究中提到表面活性剂能影响细胞膜通透性和流动性,这样有利于细胞摄取培养基中的营养物质和胞内物质的分泌,在一定程度上有利于目标代谢产物的积累。An^[25]通过研究不同诱导剂对平菇菌株发酵过程中漆酶活性的影响,得出诱导剂类型在木质素分解酶的表达中起重要作用的结论。

有研究已经表明杂粮中的 γ -谷维素的含量在发酵后明显提升^[26],本研究在红曲霉发酵苦荞的基础上,从细胞膜通透性、金属离子浓度与底物诱导三个方向调控其代谢过程,以期通过代谢调控的手段能提高苦荞发酵体系中 γ -谷维素的含量,为获得安全高效、产量富裕的 γ -谷维素生物合成方法及苦荞资源的开发利用提供思路及技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫红曲霉(*Monascus purpureus*),中国普通微生物菌种保藏管理中心;苦荞,贵州省威宁县东方神谷有限责任公司;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

主要试剂:Tween-80、Triton X-100、谷甾醇、阿魏酸、CaCl₂、MgCl₂、NaCl、正己烷、乙酸、乙酸乙酯,均为分析纯, γ -谷维素标品(99.9%):美国西格玛公司。

1.2 仪器与设备

安捷伦 1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;HH-8 数显恒温水浴锅,金坛市富华仪器有限公司;SHP-250 型智能生化培养箱,上海光都仪器设备有限公司;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;DHG-R40A 型热风恒温鼓风干燥箱,上海实验仪器总厂;TCL-16B 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;KQ3200E 超声波清洗器,昆山市超

声波仪器有限公司;RE52CS-2 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HN88-II L 超声波细胞粉碎机,上海汉诺仪器有限公司;HZ-1102C 电热恒温振荡箱,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵方法

霉菌种子液的配置参考杨玉洁^[27]。

接种发酵:在 250 mL 三角瓶中,分别加入 30 g 苦荞和 10 mL 蒸馏水,灭菌后接入 2.5 mL 红曲霉菌种子液,于 30 °C 的条件下静置发酵 9 d。

1.3.2 γ -谷维素检测

1.3.2.1 样品处理

在离心管中加入 1 g 发酵物和 5 mL 正己烷,放入温度设定为 60 °C 的水浴锅中加热 20 min 后 3000 r/min 离心 10 min,重复提取三次合并上清液,挥干溶液后再加入 1 mL 正己烷,3000 r/min 离心 10 min,取上清液过膜装入进样瓶。

1.3.2.2 高效液相色谱法的分析条件

色谱柱:硅胶柱(SUPELCOSILTM LC-SI,美国西格玛公司),25 cm×4.6 mm,5 μ m;流动相:含有 0.8% 乙酸乙酯与 0.8% 冰乙酸的正己烷溶液;进样量:80 μ L;流速:1.5 mL/min;柱温:22 °C;检测波长:290 nm;检测器:紫外检测器。

1.3.2.3 标准曲线的建立

用正己烷配制质量浓度分别为 0.20 mg/mL、0.40 mg/mL、0.80 mg/mL、1.20 mg/mL、1.60 mg/mL、2.00 mg/mL γ -谷维素标准溶液,以 γ -谷维素标准溶液质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,得到 γ -谷维素标准曲线线性回归方程为 $y=64957x+150.96$, $R^2=0.9998$,在 0~2.00 mg/mL 浓度范围内有良好的线性关系。

1.3.3 酶促反应

胞外全酶液:将制备好的紫红曲霉种子液直接过滤(菌浓度 $\geq 10^8$ cfu/mL),放入 4 °C 冰箱中保存。

胞内全酶液:利用超声波细胞粉碎机将紫红曲霉种子液破碎并过滤(菌浓度 $\geq 10^8$ cfu/mL),放入 4 °C 冰箱保存。

在两个装有苦荞基质的 250 mL 锥形瓶中分别加入 10 mL 上述两种酶液,于 37 °C 条件下进行培养。在 2 h、4 h、8 h、16 h、24 h 及 48 h 取出,测定 γ -谷维素含量。

1.3.4 代谢调控

1.3.4.1 细胞膜通透性调节

物理方法:分别设定超声波清洗器时间为 1 min、

2 min、3 min、5 min 和 10 min, 将培养 24 h 的苦荞发酵体系放入其中。超声处理后继续于 30 ℃ 条件下培养至 9 d。

化学方法: 将 Tween-80、Triton X-100 及 SDS 3 种表面活性剂分别加入苦荞发酵基质中, 添加量为 2‰、3‰、4‰、5‰ 和 6‰, 用玻璃棒搅拌均匀后在 30 ℃ 条件培养 9 d。

1.3.4.2 金属离子浓度调节

将 CaCl_2 、 MgCl_2 及 NaCl 三种金属离子调节剂分别加入苦荞发酵基质中, 添加量分别为 2‰、3‰、4‰、5‰ 和 6‰, 用玻璃棒搅拌均匀后在 30 ℃ 条件培养 9 d。

1.3.4.3 底物诱导

将阿魏酸、谷甾醇以及阿魏酸与谷甾醇混合物(阿魏酸:谷甾醇=1:1, $W:W$) 分别加入苦荞发酵基质中, 添加量为 0.2‰、0.3‰、0.4‰、0.5‰ 和 0.6‰。用玻璃棒搅拌均匀后在 30 ℃ 条件培养 9 d。

1.3.5 响应面实验设计

根据 Design-Expert 软件中 Box-Behnken 设计原理, 在单因素研究基础上以 γ -谷维素含量为响应值进行 3 因素 3 水平的试验设计及分析, 以获得 γ -谷维素最佳发酵工艺条件。试验因素与设计见表 1。

表 1 响应面分析因素水平表

Table 1 The factors and levels of response surface analysis

因素	代码	水平		
		-1	0	1
Triton X-100 添加量/‰	A	2	3	4
Ca^{2+} 添加量/‰	B	3	4	5
底物添加量/‰	C	0.4	0.5	0.6

1.3.6 数据处理与统计分析

以上试验每组均重复 3 次。使用 SPSS 22.0 进行统计学分析, ($p < 0.05$) 则为差异显著, 利用 origin 8.0 软件作图, 最后采用 design expert 8.06 软件进行响应面实验设计及结果分析。

2 结果与讨论

2.1 紫红曲霉高产 γ -谷维素发酵或转化代谢途径验证

如图 1 所示, 经过发酵的苦荞体系 γ -谷维素含量为 1.58 mg/g, 与其余三组相比含量增加十分显著 ($p < 0.05$), 而胞内酶组、胞外酶组与空白组 γ -谷维素含量均为 0.09 mg/g, 表明 γ -谷维素主要为紫红曲霉生长代谢中的产物, 后续可以采用发酵法进行试验。发酵法使用化学试剂少、生产成本低且操作简便材料容

易获得, 已经被越来越多的用于工业生产, 具有十分广阔的前景。

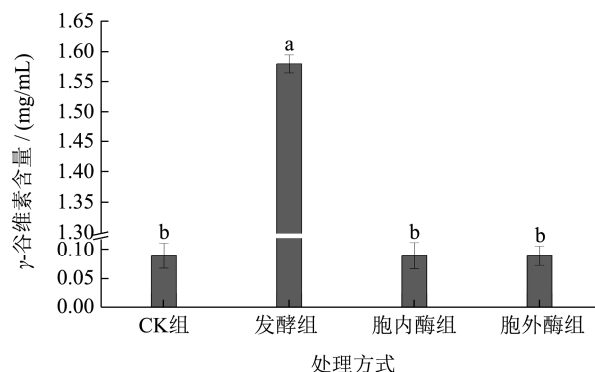


图 1 不同处理方式对发酵产物中 γ -谷维素含量的影响

Fig.1 Effects of different treatments on the content of γ -oryzanol in fermentation product

注: 不同字母表示水平间差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

2.2 基于代谢调控的高产 γ -谷维素发酵体系

构建

2.2.1 细胞膜通透性调节

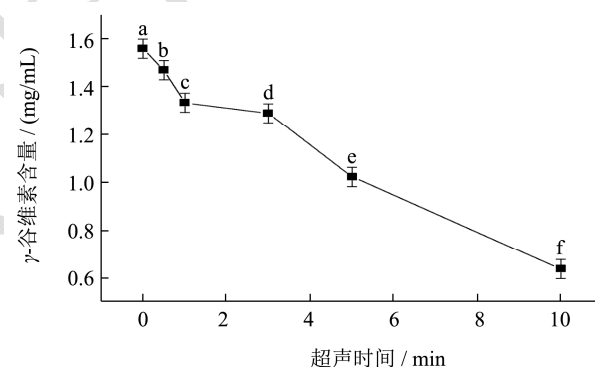


图 2 超声时间对 γ -谷维素含量的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on γ -oryzanol content

由图 2 可知, 随着超声时间增加 γ -谷维素的含量逐渐降低。经过超声处理 10 min 后, 苦荞发酵体系中的 γ -谷维素含量由最初未超声前的 1.57 mg/mL 降低至 0.64 mg/mL。超声处理在微生物发酵中有着广泛的应用, 它可以通过增加细胞膜通透性促进细胞的生长代谢, 从而达到提高发酵目标产物含量的目的。但在此次实验中超声处理反而降低了目标产物的含量, 分析是因为超声处理强度过高, 从而损伤了细胞致使产量明显降低。牛书操^[28]合成谷胱甘肽时采用超声处理后也出现了目标产物产量降低的情况, 这与本试验现象一致。

由图 3 可知, γ -谷维素含量先增加后下降, 这可能是由于表面活性剂与生物膜中的磷脂等结合后细胞膜通透性增大, 不仅使营养成分更易进入胞内, 也对

胞外产物量有着积极的影响,但当超过一定的浓度时,表面活性剂会对微生物有一定毒性作用,所以需要控制在适量范围内。Hu^[29]等就是利用 Triton X-100 促进红曲色素的转移而降低了胞内反馈抑制的发生从而促进红曲色素产量的增加。在本次试验中,添加 Triton X-100 和 SDS 的苦荞基质 γ -谷维素的产量在添加量为 3‰ 时达到最大峰值,超过 3‰ 后产量逐渐下降,添加 Tween-80 时最大峰值为 4‰。

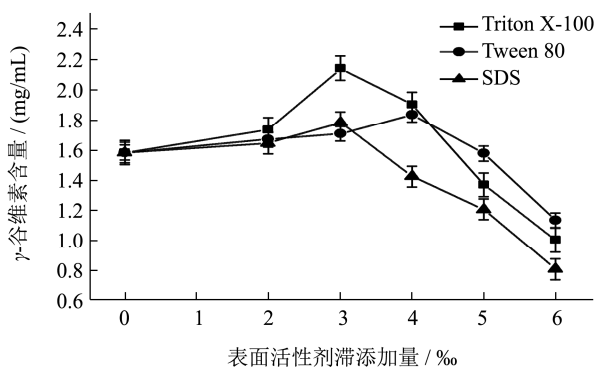


图3 表面活性剂添加量对 γ -谷维素产量的影响

Fig.3 Effect of surfactant addition on γ -oryzanol content

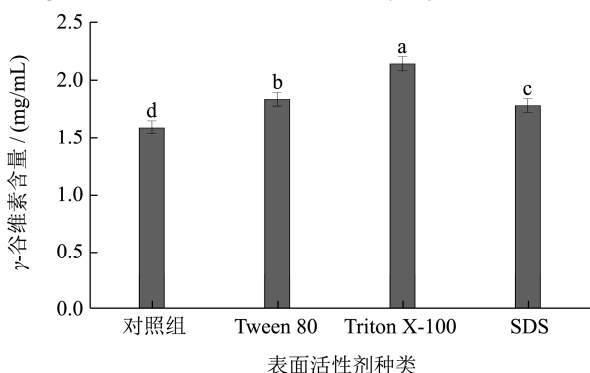


图4 最佳添加量下3种表面活性剂对 γ -谷维素产量的影响

Fig.4 Effects of three surfactants on the yield of γ -oryzanol at optimum addition

图4为三种表面活性剂最佳添加量下 γ -谷维素的产量对比。其中添加 3‰ Triton X-100 的苦荞发酵体系与添加其余 2 种表面活性剂的体系差异极显著 ($p<0.01$), γ -谷维素产量与未添加表面活性剂的体系相比增加了 34.59%, 达到 2.14 mg/mL, 表现出最强的促进作用。

2.2.2 金属离子浓度调节

由图5可得,添加 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 能够在一定范围内促进 γ -谷维素的增加,但添加量超过 4‰ 时 γ -谷维素含量下降。 Na^{+} 对 γ -谷维素的合成有抑制作用,随着添加量的增加 γ -谷维素含量不断降低。金属离子对红曲霉次生代谢物有着重要的调节作用,有研究已经表明丝状真菌的形态与代谢产物的形成息息相关,通过 Ca^{2+} 调节菌丝分支及尖端并提高菌丝聚集可以增强真

菌活力^[30]。 Mg^{2+} 是糖酵解酶类的辅因子,增加 Mg^{2+} 浓度一定程度上能有助于糖酵解的过程进行,从而增加菌体活力而达到增加目标产物含量的目的^[31]。但金属离子对次生代谢物的调节作用常存在剂量效应,不当的剂量则对次生代谢物合成产生抑制作用。而添加 Na^{+} 时 γ -谷维素合成受到抑制可能因为产生了盐胁迫现象损伤了细胞结构, Fonseca 等的研究中就提到了盐胁迫会导致胞内各种代谢紊乱甚至细胞死亡^[32]。在红曲霉发酵产多糖时,因为 Na^{+} 添加量过高而使得胞外多糖产量受到较严重的抑制^[33],这也和本试验有相似之处。

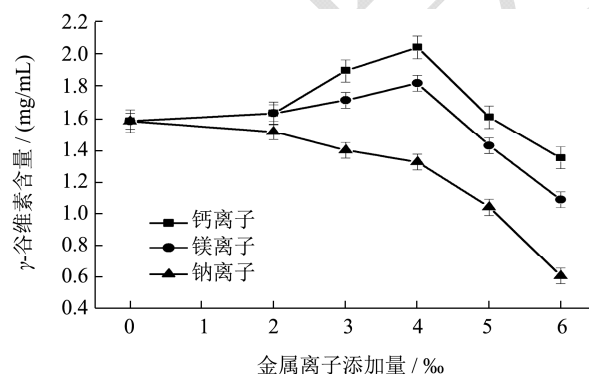


图5 金属离子添加量对 γ -谷维素含量的影响

Fig.5 Effect of metal ion addition on γ -oryzanol content

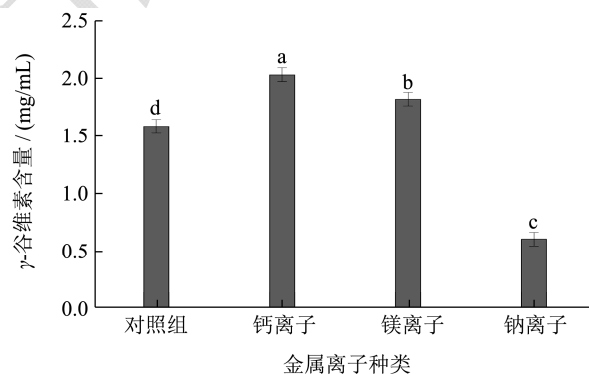


图6 最佳添加量下金属离子对 γ -谷维素产量的影响

Fig.6 Effects of metal ion on the yield of γ -oryzanol at optimum addition

图6为三种金属离子最佳添加量下 γ -谷维素的产量,添加 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 的发酵体系对 γ -谷维素的合成有极显著的促进作用 ($p<0.01$), 分别达到 2.04 mg/mL 和 1.82 mg/mL, 与对照组相比, 提高了 29.11% 和 15.19%, 这两者间, Ca^{2+} 的促进作用显著高于添加 Mg^{2+} 的体系 ($p<0.01$)。

2.2.3 底物诱导

由图7可知,单独添加谷甾醇及添加阿魏酸与谷甾醇混合物,都在一定范围内对 γ -谷维素的合成有促进作用,单独添加阿魏酸反而抑制了 γ -谷维素的合成。 γ -谷维素主要是一种三萜烯醇类为主体的

阿魏酸酯和甾醇类阿魏酸酯组成的天然混合物,在路瑞秋^[23]的研究中提到,加入效应物、前体物可以促进微生物目标产物的合成,有研究也已经表明紫红曲霉发酵杂粮基质时, γ -谷维素中谷甾醇阿魏酸酯的含量高于其他甾醇类阿魏酸酯^[26],因此阿魏酸谷甾醇混合物添加量为 5‰时体系中 γ -谷维素含量达到最大值,单独添加谷甾醇也对 γ -谷维素的富集起到了正向作用。苦荞麸皮中原本含有不溶性结合态的阿魏酸,微生物发酵过程中产生的阿魏酸酯酶能够打破植物细胞壁中的致密网状结构,释放出阿魏酸等抗氧化物质^[34],添加阿魏酸后 γ -谷维素合成降低可能是发生了反馈抑制,抑制了麸皮中阿魏酸的释放。

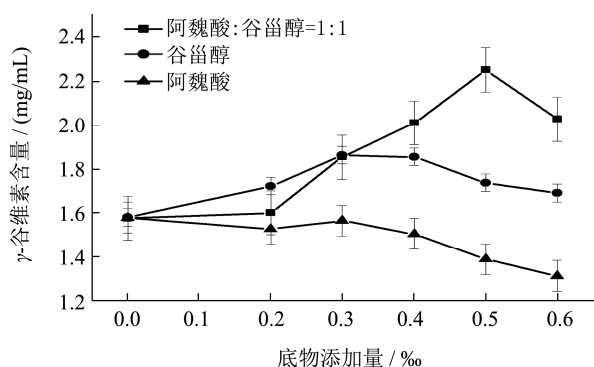


图 7 底物添加量对 γ -谷维素含量的影响

Fig.7 Effect of substrate addition on γ -oryzanol content

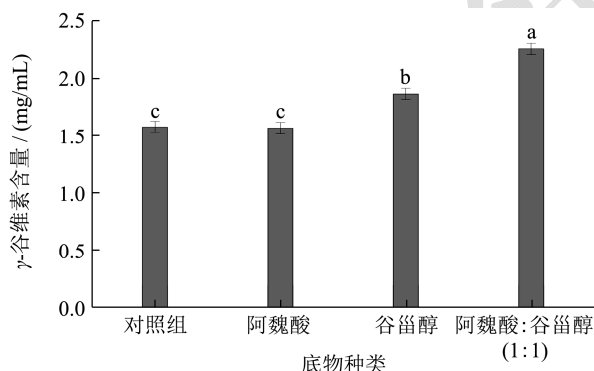
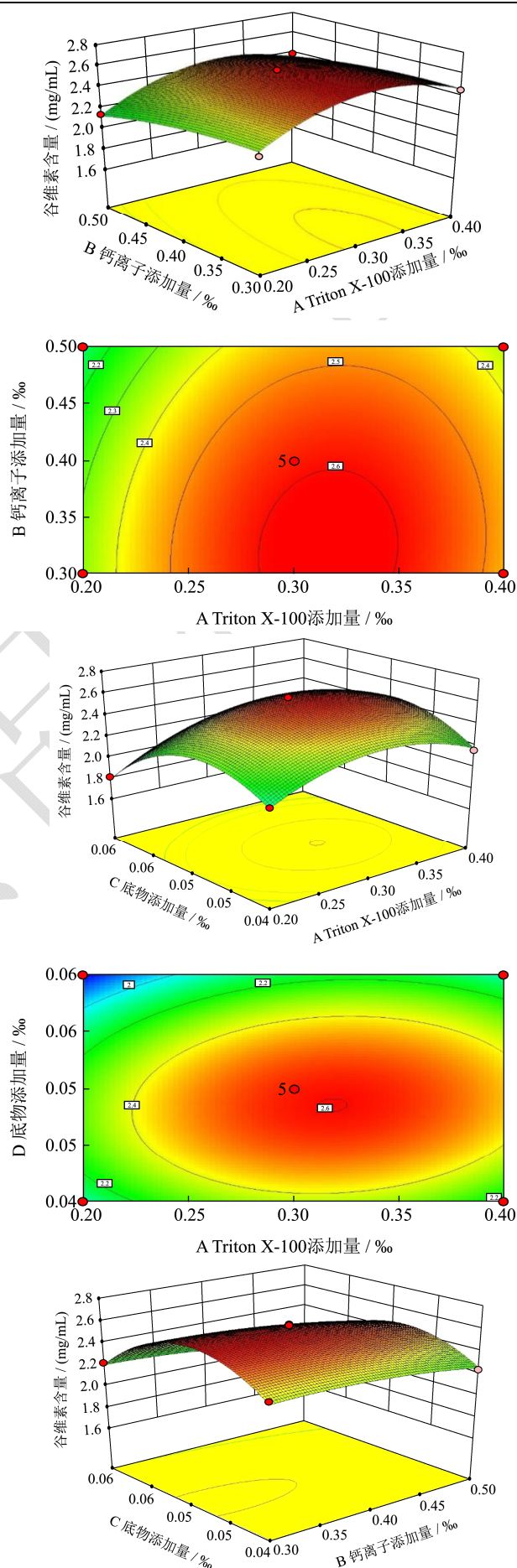


图 8 最佳添加量下底物种类对 γ -谷维素产量的影响

Fig.8 Effects of substrate on the yield of γ -oryzanol at optimum addition

图 8 表明,最佳添加量下,阿魏酸对于 γ -谷维素含量的累积与对照组无显著差异 ($p>0.05$)。单独添加谷甾醇时 γ -谷维素的含量达到 1.87 mg/mL。而添加阿魏酸与谷甾醇混合物时,苦荞发酵体系中 γ -谷维素产量达到 2.25 mg/mL,与未添加组相比较增加了 42.41%,与单独添加阿魏酸或单独添加谷甾醇试验组差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 响应面优化调控参数



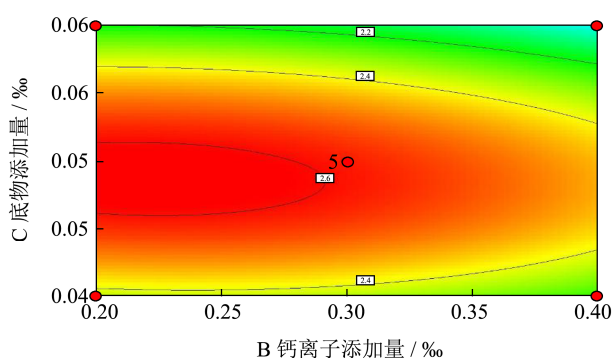


图9 各因素交互作用响应曲面及等高线图

Fig.9 Response surfaces and contour of the interaction of various factors

注: a-AB 交互作用响应面; b-AB 交互作用等高线; c-AC 交互作用响应面; d-AC 交互作用等高线; e-BC 交互作用响应面 f-BC 交互作用等高线。

依据 Design-Expert 软件中的 Box-Behnken 设计原理, 在单因素实验的基础上, 以 γ -谷维素含量为考察指标, 设计 3 因素 3 水平优化实验, 结果见表 2。

通过 Design-Expert 软件对试验数据进行多元回归方程拟合, 得到 Triton X-100 添加量 (A)、 Ca^{2+} 添加量 (B) 和底物添加量 (C) 的二次多项回归模型为: $Y=2.59+0.088A-0.079B-0.11C+0.018AB+0.046AC-0.23BC-0.22A^2-0.047B^2-0.33C^2$ 。由表 3 方差分析可得, 模型高度显著 ($p<0.01$), 失拟项不显著 ($p>0.05$)。 $R^2=0.9906$, $R_{\text{Adj}}^2=0.9786$ 表明该模型回归效果达到理想水平, 预测值与真实值有较好拟合性。一次项中

Triton X-100 添加量 (A)、 Ca^{2+} 添加量 (B) 和底物添加量 (C) 均对 γ -谷维素含量影响极显著 ($p<0.01$), 二次项中 A^2 与 C^2 差异极显著 ($p<0.01$), B^2 差异显著 ($p<0.05$), 交叉项只有 AC 影响显著 ($p<0.05$)。由 F 值大小可知:底物添加量 (C) > Triton X-100 添加量 (A) > Ca^{2+} 添加量 (B)。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface test

试验号	A	B	C	谷维素含量/(mg/mL)
1	-1	0	-1	2.10
2	1	0	1	2.05
3	0	1	1	1.97
4	0	1	-1	2.24
5	0	-1	-1	2.40
6	0	0	0	2.61
7	-1	0	1	1.81
8	-1	-1	0	2.29
9	0	0	0	2.58
10	1	1	0	2.38
11	1	-1	0	2.45
12	0	0	0	2.54
13	0	-1	1	2.22
14	0	0	0	2.60
15	1	0	-1	2.16
16	-1	1	0	2.14
17	0	0	0	2.60

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	0.95	9	0.11	82.19	<0.0001**
A	0.061	1	0.061	47.79	0.0002**
B	0.050	1	0.050	38.51	0.0004**
C	0.090	1	0.090	69.73	<0.0001**
AB	1.292×10^{-3}	1	1.292×10^{-3}	1.00	0.3495
AC	8.603×10^{-3}	1	8.603×10^{-3}	6.69	0.0361*
BC	2.057×10^{-3}	1	2.057×10^{-3}	1.60	0.2465
A^2	0.21	1	0.21	163.98	<0.0001**
B^2	9.338×10^{-3}	1	9.338×10^{-3}	7.26	0.0309*
C^2	0.47	1	0.47	363.16	<0.0001**
残差	9.002×10^{-3}	7	1.286×10^{-3}	-	-
失拟项	6.105×10^{-3}	3	2.035×10^{-3}	2.81	0.1719
纯误差	2.897×10^{-3}	4	7.243×10^{-4}	-	-
总离差	0.96	16	-	-	-
$R^2=0.9906$			$R_{\text{Adj}}^2=0.9786$		

注: “**”表示差异极显著 ($p<0.01$), “*”表示影响显著 ($p<0.05$)。

由图 9 可知, AC 交互作用响应曲面曲线走势最为陡峭, 等高线呈密集椭圆形, 而其他因素相比之下次之, 说明 Triton X-100 添加量与底物添加量间的交互影响对 γ -谷维素含量有显著影响, 而 Triton X-100 添加量与 Ca^{2+} 添加量的交互作用及 Ca^{2+} 添加量与底物添加量的交互作用, 对 γ -谷维素含量影响较小, 与方差分析结果一致。

根据方程拟合结果, 预测得出最佳累积 γ -谷维素含量最佳工艺条件为: Triton X-100 添加量 3.2%, Ca^{2+} 添加量 4.2%, 阿魏酸与谷甾醇混合底物 (阿魏酸:谷甾醇=1:1, *W:W*) 添加量 0.5%, 按照此条件进行验证试验, 得到对应 γ -谷维素含量为 2.61 mg/mL, 与预测结果 2.63 mg/mL 无显著性差异 ($p>0.05$), 表明响应面法确定的优化结果正确可靠。

3 结论

实验在紫红曲霉发酵苦荞的基础上, 通过加入金属离子、表面活性剂和底物诱导来调控发酵过程中的微生物代谢。结果表明 γ -谷维素主要为紫红曲霉生长代谢中的产物, 发酵法能显著促进 γ -谷维素的积累。超声处理对 γ -谷维素的合成有抑制作用, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和表面活性剂均对目标产物的富集有正向调节的作用, 当添加 0.5% 的阿魏酸与谷甾醇 1:1 混合物时, 结果比对照组增加了 42.41%, 达到 2.25 mg/mL。最后, 在单因素分析基础上, 使用 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平试验得到发酵工艺为: Triton X-100 添加量 3%、 Ca^{2+} 添加量 4% 及阿魏酸与谷甾醇 1:1 混合物添加量 0.5%。通过验证实验, 得到 γ -谷维素含量达 2.61 mg/mL, 与未发酵前相比提高了 31.62 倍、与未调控前相比提高了 1.64 倍, 证明该工艺极大促进发酵产物中 γ -谷维素的累积, 为贵州特色杂粮品质提升、功能活性成分富集研究提供新的思路及技术参数。

参考文献

- [1] Minatel I O, Francisqueti F V, Corrêa C R, et al. Antioxidant activity of γ -oryzanol: a complex network of interactions [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1107
- [2] 蒋维维, 易金娥, 谭柱良. γ -谷维素的生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(6): 253-258
JIANG Wei-wei, YI Jin-e, TAN Zhu-liang. Research progress on biological activities of γ -oryzanol and its mechanism [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(6): 253-258
- [3] 张江帅, 谷克仁, 潘丽, 等. 谷维素提取及纯化方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(8): 9-13
- [4] ZHANG Jiang-shuai, GU Ke-ren, PAN Li, et al. Research progress on extraction and purification methods of oryzanol [J]. Cereals & Oils, 2016, 29(8): 9-13
- [5] 李胜, 马传国, 殷俊俊, 等. γ -谷维素与 β -谷甾醇凝胶油研究进展[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(6): 4-8
- [6] LI Sheng, MA Chuan-guo, YIN Jun-jun, et al. Review of research on γ -oryzanol and β -sitosterol organogel [J]. Cereals & Oils, 2015, 28(6): 4-8
- [7] 徐冉, 薛雅琳. 米糠油中 γ -谷维素分析检测技术研究现状[J]. 中国油脂, 2014, 39(4): 96-99
- [8] XU Ran, XUE Ya-lin. Advance in analysis and detection techniques of γ -oryzanol in rice bran oil [J]. China Oils and Fats, 2014, 39(4): 96-99
- [9] Angelis A, Aurélie URbain, Halabalaki M, et al. One-step isolation of γ -oryzanol from rice bran oil by non-aqueous hydrostatic countercurrent chromatography [J]. Journal of Separation Science, 2015, 34(18): 2528-2537
- [10] Patel M, Naik S N. Gamma-oryzanol from rice bran oil-a review [J]. Journal of Scientific & Industrial Research, 2004, 63(7): 569-578
- [11] Erna P S, Andayana P G. Determination of γ -oryzanol, phenolic total content, and (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity in different varieties of rice (*Oryza sativa*) in Yogyakarta, Indonesia [J]. Setyowati, 2018, 23(2): 113-121
- [12] Lesma G, Lueaghi A, Bavaro T, et al. Phytosterol and γ -oryzanol conjugates: synthesis and evaluation of their antioxidant, antiproliferative, and anticholesterol activities [J]. Journal of Natural Products, 2018, 81(10): 2212-2221
- [13] Chandrashekar P, Kumar P K P, Ramesh H P, et al. Hypolipidemic effect of oryzanol concentrate and low temperature extracted crude rice bran oil in experimental male wistar rats [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(7): 1278-1285
- [14] Son M J, Rico C W, Nam S H, et al. Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(1): 7-10
- [15] Rungratanawanich W, Cenini G, Mastinu A, et al. γ -Oryzanol improves cognitive function and modulates hippocampal proteome in mice [J]. Nutrients, 2019, 11(4): 753
- [16] Wang O, Liu J, Cheng Q, et al. Effects of ferulic acid and γ -oryzanol on high-fat and high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats [J]. Plos One, 2015, 10(2): e0118135
- [17] 吴素慧. 不同剂型谷维素对更年期综合征患者疗效、性激

- 素水平及生存质量的影响对比[J].广西医学,2017,39(8): 1150-1153
- WU Su-hui. Effects of different dosage forms of oryzanol on efficacy, sex hormones levels and quality of life in patients with climacteric syndrome: a comparative study [J]. Guangxi Medical Journal, 2017, 39(8): 1150-1153
- [15] Angels A, Urbain A, Halabalaki M, et al. One-step isolation of γ -oryzanol from rice bran oil by nonaqueous hydrostatic countercurrent chromatography [J]. Journal of Separation Science, 2011, 34: 2528-2537
- [16] Kumar P, Yadav D, Kumar P, et al. Comparative study on conventional, ultrasonication and microwave assisted extraction of γ -oryzanol from rice bran [J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(4): 2047-2053
- [17] Esche R, Barnsteiner A, Scholz B, et al. Simultaneous analysis of free phytosterols/ phytostanols and intact phytosteryl/ phytostanyl fatty acid and phenolic acid esters in cereals [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(21): 5330-5339
- [18] 李翠苹,余燕影,曹树稳.根皮素乙酰阿魏酸酯的合成及抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2012,24:316-320
- LI Cui-ping, YU Yan-ying, CAO Shu-wen. Synthesis and antioxidant activity of phloretin acetylferulic acid esters [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 316-320
- [19] 张亚,周长林.代谢调控技术在放线菌生物合成抗生素的应用进展[J].中国药科大学学报,2015,46(4):393-399
- ZHANG Ya, ZHOU Chang-lin. Application of metabolic regulation in the antibiotic biosynthesis of *Actinomycetes* [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2015, 46(4): 393-399
- [20] 陈功.红曲霉高密度萃取发酵色素代谢与跨膜运输行为[D].广州:华南理工大学,2017
- CHEN Gong. Pigments metabolism and behavior of trans-membrane transport in high density extractive fermentation of *Monascus* spp. [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [21] 许艳俊,李静媛.pH 和 Ca^{2+} 协同作用对酵母代谢及细胞膜功能的影响[J].生物技术通报,2018,34(6):1-6
- XU Yan-jun, LI Jing-yuan. Synergetic effects of pH and Ca^{2+} on yeast metabolism and cell membrane function [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(6): 1-6
- [22] Cristina P T, Maria A S, Maria D H. Contribution of ferulic acid, γ -oryzanol and tocotrienols to the cardiometabolic protective effects of rice bran [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32(2017): 58-71
- [23] 路瑞秋.樟芝菌固态发酵产安卓奎诺尔及其提取纯化的研究[D].无锡:江南大学,2015
- LU Rui-qiu. Study on the production and purification of antroquinonol in solid-state fermentation of *Antrodia camphorate* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
- [24] 孙锡友.微生物发酵法生产赤藓糖醇的研究[D].石家庄:河北科技大学,2020
- SUN Xi-you. Study on metabolic regulation of microbial transformation of ginsenoside [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2020
- [25] Qi A, Hong-Fei M, Mei-Ling H, et al. Effects of different induction media as inducers on laccase activities of *Pleurotus ostreatus* strains in submerged fermentation [J]. Bioresources, 2017, 13(1): 1143-1156
- [26] 贺圣凌,曾海英,李勇,等.红曲发酵薏苡糠亲脂化合物量变规律探究[J].食品科技,2017,42(3):174-179
- HE Sheng-ling, ZENG Hai-ying, LI Yong, et al. Quantitative change rule of lipotropy compounds during *Monascus* fermentation of coix seed bran [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(3): 174-179
- [27] 杨玉洁,曾海英,顾其丽,等.高产 γ -谷维素的杂粮基质筛选及工艺优化[J].中国酿造,2019,38(5):80-85
- YANG Yu-jie, ZENG Hai-ying, GU Qi-li, et al. Selection and process optimization of high yield γ -oryzanol coarse cereals matrix [J]. China Brewing, 2019, 38(5): 80-85
- [28] 牛书操.酵母细胞的通透化及其谷胱甘肽合成能力研究[D].南昌:南昌大学,2016
- NIU Shu-cai. Study on the permeability and capability for GSH synthesis with yeast cells [D]. Nan Chang: Nanchang University, 2016
- [29] Hu Z Q, Zhang X H, Wu Z Q, et al. Perstraction of intracellular pigments by submerged cultivation of *Monascus* in nonionic surfactant micelle aqueous solution [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94: 81-89
- [30] 陈晓佩.米根霉发酵产富马酸的代谢基础研究[D].南京:南京林业大学,2015
- CHEN Xiao-pei. The metabolic profile of production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* [D]. Nan Jing: Nanjing Forestry University, 2015

(下转第 211 页)