

基于非靶代谢组学方法分析米曲霉发酵米糠提取物生物活性成分

LCMS-QTOF-100

摘要：米糠作为大米加工的主要副产品，因含有多种生物活性成分而具有广阔的应用前景。本文采用米曲霉进行固态发酵米糠，通过 Q-TOF 高分辨质谱仪 LCMS-9050 正负极切换模式分析发酵前、后米糠提取物中生物活性成分的差异。结合多元统计分析筛选差异成分，共鉴定出 448 种不同生物活性成分（共 17 类）。其中，发酵米糠中主要差异成分如芥子酸、麦黄酮和 3- 香豆酸的含量分别增加了 23.62 倍、19.14 倍和 21.07 倍。这些生物活性成分在护肤领域具有潜在的应用价值，可以用于开发新型生物发酵护肤产品。本研究为此类产品的成分分析及功能评价提供了应用参考。

关键词：发酵 米糠 代谢组学 LCMS-QTOF

技术特点：

- ❖ 采用正负极性切换模式，比传统方法节省 1/2 样品量和时间，提升检测效率。
- ❖ 应用非靶代谢组学策略，综合使用多元统计分析展示 62 种差异代谢产物筛选流程。

大米是世界上第二大粮食作物，其加工副产品如米糠、稻壳和碎米等受到了食品行业越来越多的关注。米糠占大米总营养成分的 64%，含有许多生物活性成分和天然抗氧化剂，如稻米醇、生育三烯酚和阿魏酸。然而许多小分子化合物以结合形式存在，使其有效提取变得困难。

固态发酵是一种有效的生物转化过程，可以释放细胞壁基质中的结合化合物。该发酵过程利用微生物复杂的酶系统，这种生物转化不仅可以提高米糠的营养价值，还有助于功能性食品和生物活性化合物的开发。

米曲霉因其独特的生物学特性而被广泛用于固

态发酵过程。首先，米曲霉能够在固体基质上高效生长，并分泌大量分解固态发酵基质中复杂分子所必需的酶。其次，米曲霉在发酵过程中表现出的强代谢活性使其在不同环境条件下保持稳定的生产效率。此外，米曲霉已被广泛证明是一种安全的微生物菌株，这对于食品生产和生物医药领域尤为重要。

随着消费者越来越重视皮肤产品中成分的健康性和配方的安全性，基于植物和谷物提取物的产品不断创新和发展。本研究通过 Q-TOF 高分辨质谱仪 LCMS-9050 分析发酵前、后米糠提取物中生物活性成分的变化，为发酵米糠提取物的功能性评价提供了科学依据，为后续机制研究和产品开发奠定了基础。

■ 实验部分

1.1 发酵米糠提取物的制备

以米糠与水按 1:1.6 (w/w) 的比例在 121 °C 下高压灭菌 15 min，冷却至室温，接种 0.04 % 的米曲霉（米曲霉：米糠，1:250, w/w）。在 30°C 恒温箱中进行固态发酵，每 12 h 搅拌一次以防止结块。发酵 3 天后，加入 70% 乙醇，比例为 1:10，超声处理 1 h，4500 g 离心 10 min。收集上清液，在 40°C 下用旋转蒸发器浓缩至无乙醇。样品再用冻干机冻干，得到发酵米糠提取物（FRE）。将米糠与 0.04% 的米曲霉混合，立即用 70% 乙醇提取，按照上述步骤得到未发酵米糠提取物（URE）。

1.2 样品采集及处理

准确称取 URE（5 份）和 FRE（5 份）各 100 mg，溶解于 1 mL 80% 甲醇中。每份样品涡旋混合后，4°C 保存直至使用。12000 g 离心 5 min 后，上清液通过 0.22 μm 滤膜过滤，使用 LCMS-9050 进行分析。质量控制（QC）样品通过等体积混合每个样品制备。

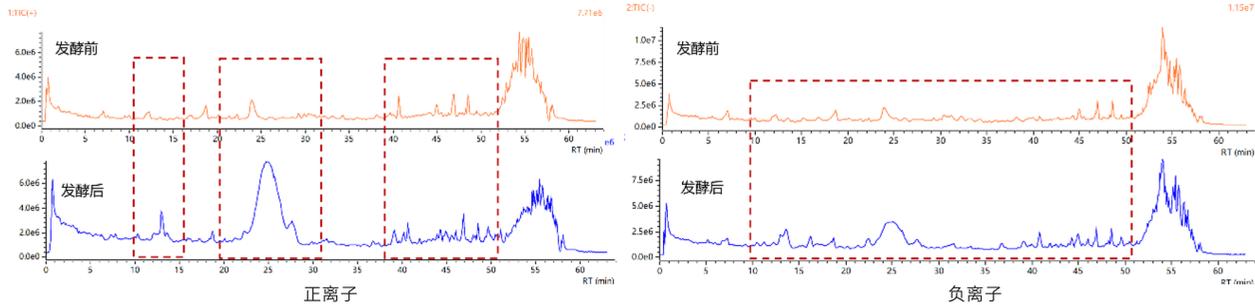


图 1 米曲霉发酵前、后两组样品总离子流 TIC 图

2.2 未发酵和发酵米糠中生物活性成分的多变量分析

2.2.1 主成分分析 (PCA)

将未发酵和发酵米糠样品以及 QC 数据进行 PCA 分析，结果显示：各组样本之间表现出明显的分离趋势，表明未发酵与米曲霉发酵米糠培养液代谢产物差异显著；QC 质控组中的平行样本聚集度高，表明仪器状态稳定，测定过程中未出现明显偏差，说明各组米糠培养液代谢产物数据的稳定性和重复性较好。

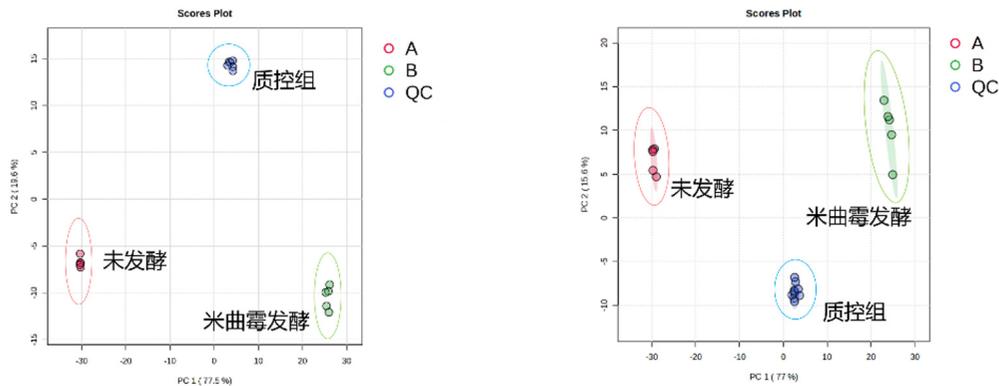


图 2 PCA 得分图 (左: 正离子, 右: 负离子, n=5)

2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 结果显示：未发酵与发酵米糠的 OPLS-DA 分析结果如下图所示，各组样品均位于 95% 置信区间内，2 组样本点间完全分离，无重叠区域，区分效果较好，表明未发酵与发酵米糠培养液代谢产物具有显著差异。正离子模式下模型验证 $R^2Y=1$, $Q^2=0.999$ ，负模式下 $R^2Y=1$, $Q^2=1$ ，表明模型稳健可靠。对模型进行置换检验，通过观察模型在 100 次随机置换检验，正模式和负模式下 P 值均小于 0.01，模型没有过拟合。

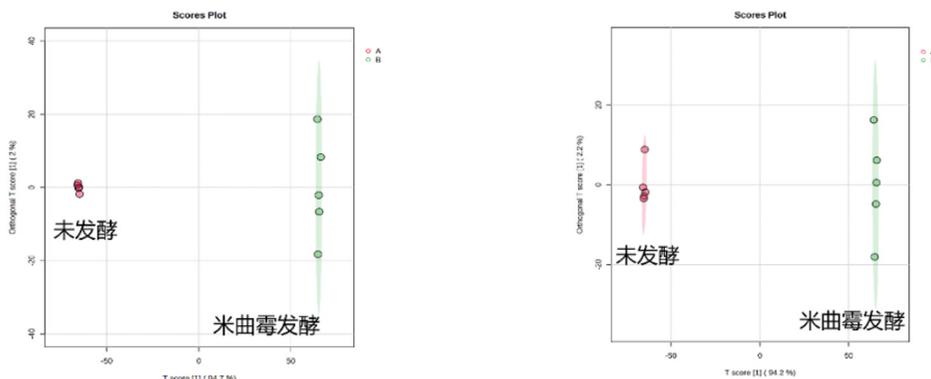


图 3 OPLS-DA 得分图 (左: 正离子, 右: 负离子, n=5)

2.3 未发酵和发酵米糠中生物活性成分的差异

使用 t 检验、变异系数 (FC) 方法和 OPLS-DA 模型所得变量的 VIP 值比较两组间生物活性成分的差异, 并建立了差异分析的筛选标准, 即 VIP 值大于 1 且 t 检验所得 p 值小于 0.05 且两组样本 FC 大于 2 或小于 0.5。未发酵和发酵米糠中共鉴定出 448 种差异代谢物, 其中 149 种上调, 185 种下调 (图 4A)。这些成分可分为 17 类, 主要包括氨基酸及其衍生物 (13.39%)、肽 (12.50%)、酚类化合物及其衍生物 (14.06%)、黄酮类化合物及其衍生物 (12.05%)、脂质 (6.92%) (图 4B)。

层次聚类分析 (HCA) 将具有不同特征的生物活性成分分类为不同的组, 并用颜色识别出这些组内成分的变化程度。结果显示, 未发酵和米曲霉发酵明显分为两个区域, 表明米曲霉发酵对米糠中生物活性成分具有明显影响 (图 4C)。

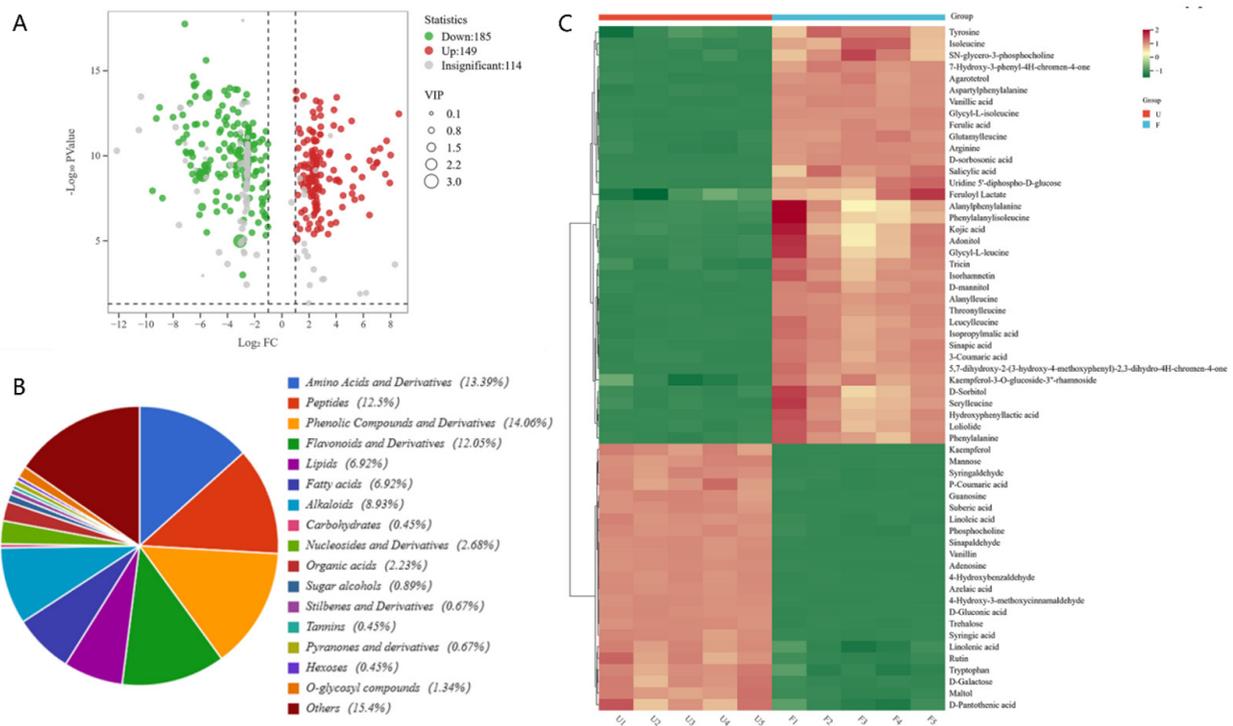


图 4 URE 和 FRE 中活性成分差异 (A) 火山图; (B) 活性成分分类; (C) 层次聚类分析 HCA

2.3.1 未发酵和发酵米糠中酚类化合物差异

米糠中约 70% 的酚类化合物以酯的形式与阿拉伯木聚糖部分结合在细胞壁残留物中。米曲霉的固态发酵对米糠中芥子酸的含量影响最大, 提高了 23.62 倍 (表 2)。此外, 香草酸、阿魏酸、3- 香豆酸和水杨酸的水平分别提高了 14.27 倍、16.39 倍、21.07 倍和 2.07 倍。羟基肉桂酸衍生物, 如阿魏酸、芥子酸和对香豆酸, 是谷物中主要的多酚类物质。阿魏酸、3- 香豆酸、芥子酸和香草酸是在米曲霉固态发酵过程中从米糠基质中合成或释放的主要酚类化合物。发酵刺激了水解酶的活性, 有助于将酚酸从不溶性细胞壁基质中释放出来。

2.3.2 未发酵和发酵米糠中黄酮类化合物差异

谷物中的黄酮类化合物主要存在于麸皮中, 其抗氧化功能广为人知。发酵后, 米糠中一种重要的黄酮类化合物——麦黄酮的含量增加了 19.14 倍 (表 2)。研究表明, 麦黄酮具有抗氧化、抗衰老、抗癌和心脏保护作用。异鼠李素的含量显著增加了 149.72 倍。异鼠李素具有多种药理作用, 如减轻氧化应激、抑制炎症和缓解神经退行性疾病。发酵过程中, 黄酮类苷元和酚酸之间的糖苷键发生转化。在米糠中, 山奈酚可以被生物转化为山奈酚-3-O- 葡萄糖苷-3"- 鼠李糖苷, 这有利于葡萄糖合成所需糖苷衍生物的代谢途径。

2.3.3 未发酵和发酵米糠中氨基酸和肽的差异

米糠富含必需氨基酸和蛋白质等生物活性物质。发酵使米糠中8种游离氨基酸的水平提高了2.10~4.43倍(表2)。酪氨酸和苯丙氨酸具有增强皮肤保湿的作用,可以作为对抗皮肤老化的功能性食品。部分二肽,如谷氨酰亮氨酸、亮氨酰亮氨酸、丙氨酰苯丙氨酸、丙氨酰亮氨酸和苏氨酰亮氨酸的水平分别提高了6.22~11.67倍。抗氧化肽因其清除自由基、抑制脂质过氧化和提供额外营养价值的能力而受到广泛关注。 γ -谷氨酰亮氨酸具有抗炎、减少氧化应激和改善葡萄糖代谢的作用。发酵引起的二肽上调有助于提高米糠提取物的抗氧化能力、营养价值和减少过敏性。

表2 通过LCMS-QTOF分析未发酵和发酵米糠提取物检测到的代表性差异活性成分

Compounds	Fold_Change	Type	Compounds	Fold_Change	Type
Isorhamnetin	149.720	up	Tricin	19.140	up
7-Hydroxy-3-phenyl-4H-chromen-4-one	4.963	up	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	4.908	up
Kojic acid	35.142	up	Sinapic acid	23.620	up
3-Coumaric acid	21.070	up	Ferulic acid	16.390	up
D-sorbosonic acid	18.709	up	Vanillic acid	14.271	up
Hydroxyphenyllactic acid	5.121	up	Isopropylmalic acid	4.782	up
Salicylic acid	2.069	up	Syringic acid	1.641	*
D-pantothenic acid	0.192	down	Suberic acid	0.181	down
Suberic acid	0.181	down	Linoleic acid	0.166	down
D-gluconic acid	0.098	down	Azelaic acid	0.040	down
P-Coumaric acid	0.012	down	Alanylphenylalanine	10.561	up
Leucylleucine	11.668	up	Alanylleucine	6.946	up
Glutamylleucine	6.538	up	Threonylleucine	6.221	up
Phenylalanylisoleucine	5.799	up	Glycyl-L-isoleucine	5.204	up
Serylleucine	4.431	up	Isoleucine	3.863	up
Glycyl-L-leucine	3.846	up	Aspartylphenylalanine	3.829	up
Phenylalanine	3.473	up	Tyrosine	2.105	up
Uridine 5'-diphospho-D-glucose	59.793	up	D-mannitol	5.902	up
Adonitol	4.253	up	D-Sorbitol	3.095	up
Kaempferol-3-O-glucoside-3"-rhamnoside	2.588	up	Kaempferol	0.174	down
SN-glycero-3-phosphocholine	12.158	up	Rutin	0.169	down
Arginine	4.153	up	Betaine	1.815	*
Phosphocholine	0.083	down	Guanosine	0.044	down
Adenosine	0.054	down	D-Galactose	0.074	down
Agarotetrol	7.276	up	Trehalose	0.073	down
D-Mannose	0.059	down	Vanillin	0.012	down

Feruloyl Lactate	2.535	up	Syringaldehyde	0.038	down
Sinapaldehyde	0.013	down	4-Hydroxybenzaldehyde	0.009	down
4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde	0.002	down	4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde	0.002	down
Tryptophan	0.218	down	Loliolide	2.365	up

注*：没有显著上 / 下调，但活性明确的重要物质。

2.4 差异活性成分的 KEGG 注释和富集分析

对 62 种主要差异活性成分进行了 KEGG 数据库的通路富集分析，以识别两组样本之间代谢途径的差异。最显著的代谢途径包括半乳糖代谢、磷脂代谢、果糖和甘露糖代谢、苯丙氨酸代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成（图 5）。例如，碳水化合物的摄入，尤其是葡萄糖和半乳糖，与皮肤老化有关。这些碳水化合物通过非酶促糖基化和随后的高级糖基化终产物（AGEs）的产生，可以损害皮肤的重要成分。通过调节半乳糖代谢途径或减少其摄入，可以在一定程度上减缓皮肤老化过程。

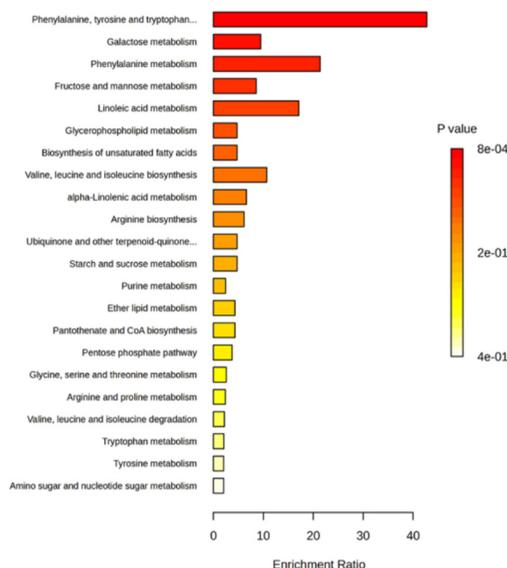


图 5 KEGG 通路富集分析

结论

本文使用 LCMS-QTOF 技术分析了未发酵和米曲霉发酵米糠提取物中的差异生物活性成分。通过 Q-TOF 质谱仪 LCMS-9050 正负极切换模式，比传统方法节省 50% 样品量和分析时间，提升了对植物发酵提取物的成分检测效率。结合多元统计分析筛选差异成分，共鉴定出 17 类包含 448 个不同生物活性成分。结果显示，米曲霉固态发酵显著提高了米糠中生物活性化合物的含量。本研究不仅为米糠这一谷物加工副产品的综合利用提供了科学依据，还为通过微生物发酵提高米糠中生物活性成分提供了见解。此外，本研究为开发新的生物发酵型护肤产品提供了活性成分分析参考。

岛津应用云

