

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.81049

富集多酚青稞红曲米发酵工艺优化 及抗氧化活性研究

吴海毓^{1,2} 何冰桃^{1,2} 杨 静³ 樊梅香³ 党 斌^{1,2}

(1. 青海大学青藏高原种质资源研究与利用实验室, 青海 西宁 810000; 2. 青海大学农林科学院青海省
青藏高原农产品加工重点实验室, 青海 西宁 810000; 3. 青海华实青稞生物科技开发有限公司
青海省青稞资源综合利用工程技术研究中心, 青海 西宁 810000)

摘要: [目的] 开发青稞红曲食品提供依据。[方法] 以青稞为原料, 筛选出富集多酚的适宜红曲霉菌菌种, 优化青稞红曲米的发酵工艺, 并采用 LC-MS/MS 测定红曲霉发酵后青稞多酚组成、含量及其抗氧化活性的变化。[结果] 以多酚和黄酮含量作为评价指标, 筛选出青稞红曲米发酵富集多酚的适宜红曲霉菌为 ACCC30352; 青稞红曲米富集多酚的最优发酵工艺为红曲霉菌接种量 10%、浸泡蒸馏水 pH 5、发酵温度 25 °C、发酵时间 18 d。总多酚和总黄酮含量比未发酵青稞分别提高了 124.03% 和 196.58%。发酵后, 青稞红曲米中含量增加的酚类物质主要为游离型酚酸和游离型黄酮, 分别为发酵前的 2.28、1.12 倍。其中苯甲酸、丁香酸、香草酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸为青稞红曲米的主要特征性酚酸类物质, 芦丁和儿茶素为青稞红曲米的主要特征性黄酮类物质。青稞红曲米的 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和 FRAP 还原能力分别为未发酵青稞的 1.39、12.48、2.65 倍。红曲霉菌分泌的内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和酸性蛋白酶对提高青稞红曲米的多酚类物质含量和组成起重要作用。[结论] 红曲霉发酵可显著提高青稞中多酚物质含量和抗氧化活性。

关键词: 青稞; 红曲霉菌; 富集多酚; 发酵; 抗氧化活性

Optimization of fermentation process conditions of polyphenol-enriched highland barley monascus rice and its antioxidant activity research

WU Haiyu^{1,2} HE Bingtao^{1,2} YANG Jing³ FAN Meixiang³ DANG Bin^{1,2}

(1. Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Germplasm Resources Research and Utilization, Qinghai University, Xining, Qinghai 810000, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Product Processing on Qinghai-Tibetan Plateau, College of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810000, China; 3. Qinghai Huashi Highland Barley Biotechnology Development Co., Ltd., Qinghai Highland Barley Resources Comprehensive Utilization Engineering Technology Research Center, Xining, Qinghai 810000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to provide the basis for the development of highland barley monascus food. [Methods] Using highland barley as raw material, the suitable monascus strains with rich polyphenols were screened out, and the fermentation process of highland barley and monascus rice was optimized. The composition, content and antioxidant activity of polyphenols in highland barley after fermentation with monascus were determined by LC-MS/MS. [Results] Based on the contents of polyphenols and flavonoids, the suitable monascus species ACCC30352 for the enrichment of polyphenols in highland barley monascus rice fermentation was screened. The optimal fermentation process for polyphenol enrichment of highland barley was determined by orthogonal experiment as follows: 10% inoculation amount, pH 5 of soaking water, fermentation at 25 °C for 18 d. The contents of total polyphenols and flavonoids were 124.03% and 196.58% higher than those of unfermented highland barley, respectively. Compared with unfermented highland barley, the

基金项目: 国家重点研发项目(编号: 2022YFD2301300)

通信作者: 党斌(1980—), 男, 青海大学副研究员, 博士。E-mail: 156044168@qq.com

收稿日期: 2023-10-20 改回日期: 2024-04-18

increase of phenolic substances in highland barley was mainly free phenolic acid and free flavonol, which were 2.28 times and 1.12 times, respectively. Among them, benzoic acid, syringic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid and ferulic acid are the main characteristic phenolic acids in highland barley monascus rice, and rutin and catechin are the main characteristic flavonoids in highland barley monascus rice. The DPPH, ABTS free radical scavenging capacity and FRAP reducing capacity of the highland barley were 1.39 times, 12.48 times and 2.65 times of the unfermented highland barley, respectively. Endoglucanase, β -glucosidase and acid protease secreted by monascus play an important role in increasing the content and composition of phenolic substances in highland barley. [Conclusion] Monascus fermentation can significantly increase the polyphenol content and antioxidant activity in highland barley.

Keywords: highland barley; monascus; polyphenol enrichment; fermentation; antioxidant activity

青稞中富含多种营养物质及植物多酚、黄酮和 β -葡聚糖等功能性成分^[1-2],具有抗氧化、调节糖脂代谢等多种生物活性^[3-4]。酚类物质属于植物次生代谢产物,具有抗氧化、抗炎等多种生理活性^[5-6]。研究^[7-8]发现,青稞中的植物酚类化合物少部分以可溶性形式存在,绝大部分以不溶性形式与细胞壁通过共价键、酯键、醚苷键等结合,严重影响了其生理活性功能的发挥。目前,常用于释放谷物中酚类物质的方法有热加工、萌发、酸碱处理、盐胁迫、酶处理、超声、微波、红外技术辅助处理和固态发酵等^[9-10]。其中,固态发酵具有发酵基质多样性和功能代谢产物产量高等优点。江慧斌等^[11]研究发现,固态发酵有利于富集藜麦和黑大麦复合谷物的多酚和黄酮,并在一定程度上提高了发酵谷物中酚类物质的生物有效性及抗氧化活性。Hur等^[12]研究发现,固态发酵不仅能促进结合型酚类化合物转化为可利用的酚类化合物,还能促进谷物中酚类物质的合成,提高谷物多酚的生物利用度。

红曲霉菌作为一种公认的安全性食用菌,通过固态发酵可以对植物基质实现生物转化及合成,促进多酚类物质的释放。目前,红曲霉菌固态发酵大豆、燕麦、薏米、大麦等谷物已被报道^[13-16],但关于红曲霉菌固态发酵青稞及对青稞酚类物质组成和含量的影响尚不明确。研究拟以青稞为原料,采用 ACCC30352、CICC40937、CICC40940、CICC41649 4种红曲霉菌对青稞进行发酵,筛选出发酵青稞的适宜红曲霉菌,在此基础上通过正交试验优化青稞红曲米发酵工艺,并利用 LC-MS/MS 明确经红曲霉发酵前后青稞多酚组成及其抗氧化活性的变化,探讨其多酚释放机制,旨在为青稞红曲食品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

紫红曲霉 (ACCC30352): 上海瑞楚生物科技有限公司;

红色红曲霉 (CICC41649)、紫色红曲霉 (CICC40937)、紫色红曲霉 (CICC40940): 中国工业微生物菌种保藏管理中心;

青稞: 昆仑 20 号青稞, 水分含量 11.02%, 灰分含量

1.16%, 脂肪含量 2.50%, 粗纤维含量 3.99%, 蛋白质含量 12.11%, 总淀粉含量 64.82%, 直链淀粉含量 26.78%, 游离酚含量 1 572.22 $\mu\text{g/g}$, 结合酚含量 4 378.15 $\mu\text{g/g}$, 游离黄酮含量 606.66 $\mu\text{g/g}$, 结合黄酮含量 815.34 $\mu\text{g/g}$, 青海省农林科学院作物所;

乙酸乙酯、过硫酸钾、葡萄糖、甲醇、乙酸钠、碳酸氢钠、草酸、盐酸、三氯化铁、碳酸钠、苯酚: 国产分析纯;

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、氯化三苯四氮唑 (TPTZ)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS): 分析纯, 美国 Sigma 公司;

福林酚: 分析纯, 北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

蒸汽灭菌器: SX-500 型, 日本 TOMY KOGYO 公司;

双人单面净化工作台: SW-CJ-2FD 型, 苏州净化设备有限公司;

冷冻干燥机: ALPHA1-4 LD plus 型, 德国 Christ 公司;

恒温数控超声波清洗器: KQ-500GDV 型, 昆山市超声仪器有限公司;

紫外线可见分光光度计: N4S 型, 上海仪电分析仪器有限公司;

恒温振荡器: THZ-98AB 型, 上海一恒科学仪器有限公司;

生化培养箱: LRH-150 型, 上海齐欣科学仪器有限公司;

高速万能粉碎机: FW 100 型, 上海科恒实业发展有限公司;

低速冷冻离心机: DL-5M 型, 湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司;

旋转蒸发仪: R-210 型, 瑞士 BUCHI 公司。

1.2 方法

1.2.1 青稞红曲米发酵工艺流程

菌种活化 → 种子液制备

↓

青稞 → 清洗 → 浸泡 → 蒸煮灭菌 → 冷却 → 接种 → 发酵 → 干制 → 成品

(1) 种子液配方: 磷酸二氢钾 0.25 g, 葡萄糖 6.0 g, 硫酸镁 0.1 g, 硝酸钠 0.3 g, 蛋白胨 0.5 g, 蒸馏水 100 mL。

(2) 菌悬液制备:自培养平板中勾取5环菌丝接入50 mL 无菌生理盐水中,于适宜温度下以180 r/min 恒温震荡1.5 h,在显微镜下用血球计数法对4种菌悬液进行计数,利用无菌生理盐水调整4种菌悬液浓度,使其最终浓度为 10^6 CFU/mL。

(3) 种子液培养:将种子液(20 mL)装于150 mL 锥形瓶中,高压灭菌(121 °C, 20 min),冷却,用移液枪吸取菌悬液(1 mL)移入种子液培养基中,在恒温振荡器(180 r/min, 28 °C)中培养63 h, 4 °C 冷藏备用。

1.2.2 青稞红曲米中多酚、黄酮的提取与测定 参照杨希娟等^[17-18]的方法。

1.2.3 富集多酚青稞红曲米发酵菌种的筛选 选取饱满、成熟的青稞,洗净,用蒸馏水浸泡36 h,沥干,121 °C 高压灭菌25 min,于超净工作台中冷却,以8%的接种量拌入4种纯种红曲霉菌种子液,搅拌均匀,分别于适宜温度下培养16 d,每隔2 d 摇瓶打散,发酵结束后冷冻干燥至含水量低于10%。取20 g 干燥的青稞红曲粉碎并过40目筛,室温下贮藏。测定4种红曲霉菌发酵后青稞红曲米及未发酵青稞的多酚和黄酮含量,筛选出富集多酚青稞红曲米发酵的最佳红曲霉菌。

1.2.4 单因素试验

(1) 发酵时间:固定浸泡蒸馏水pH为3,红曲霉菌接种量为8%,发酵温度为22 °C,考察发酵时间(0, 4, 8, 12, 16 d)对青稞红曲米中多酚和黄酮含量的影响。

(2) 红曲霉菌接种量:固定浸泡蒸馏水pH为3,发酵温度为22 °C,发酵时间为16 d,考察红曲霉菌接种量(4%, 6%, 8%, 10%, 12%)对青稞红曲米中多酚和黄酮含量的影响。

(3) 浸泡蒸馏水pH:固定红曲霉菌接种量为10%,发酵温度为22 °C,发酵时间为16 d,考察浸泡蒸馏水pH(3, 4, 5, 6, 7)对青稞红曲米中多酚和黄酮含量的影响。

(4) 发酵温度:固定浸泡蒸馏水pH为5,红曲霉菌接种量为10%,发酵时间为16 d,考察发酵温度(22, 25, 28, 31, 34 °C)对青稞红曲米中多酚和黄酮含量的影响。

1.2.5 正交试验 根据单因素试验结果,选取 $L_9(4^3)$ 正交表进行试验设计,优化青稞红曲米发酵工艺。

1.2.6 富集多酚青稞红曲米体外抗氧化活性测定 参照杨希娟等^[18]的方法。

1.2.7 富集多酚青稞红曲米酚类物质组成分析

(1) 色谱条件:色谱柱为Hypersil GOLD a Q (100 mm×2.1 mm),柱温30 °C,样品盘温度(4.0±0.5) °C;流动相:0.9% 乙酸-水溶液(A相),甲醇(B相);梯度洗脱,洗脱程序:−0.5~0 min, 20% B; 0~9 min, 20%~100% B; 9~10 min, 100% B; 10~11 min, 100%~20% B; 11~14 min, 20% B; 流速0.3 mL/min;进样量1 μL。

(2) 质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),扫描模式为Full MS(扫描范围10~850),正/负离子扫描模式,载气采用高纯氮气(纯度>99.5%),鞘气流速40 AU,辅气流速10 AU,吹扫气流速0,喷雾电压2.80 kV,离子透镜电压频率55,毛细管温度300 °C,辅气热源温度300 °C。

1.2.8 富集多酚青稞红曲米水解酶活性测定 参照贝琦^[19]的方法。

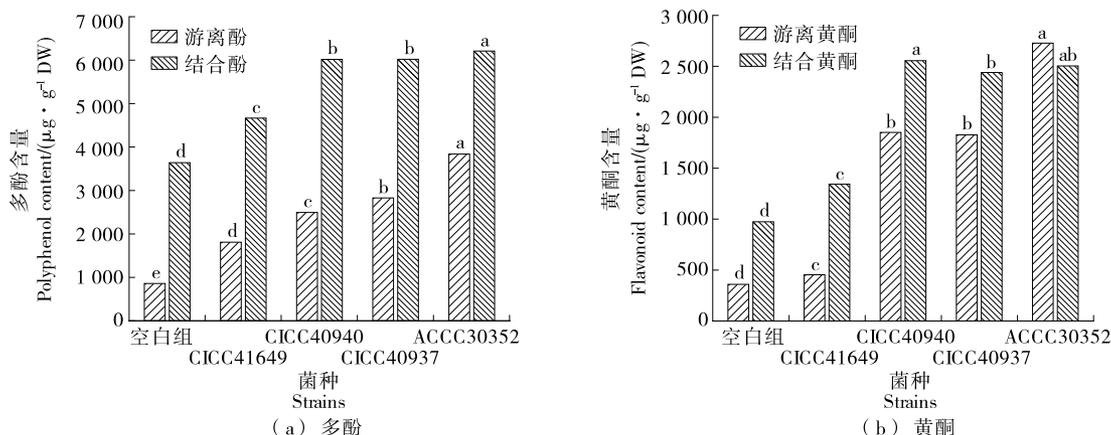
1.3 数据处理

采用Excel和SPSS 26.0软件进行数据整理及分析,采用Origin 2018软件绘图。

2 结果与分析

2.1 富集多酚青稞红曲米发酵菌种的筛选

由图1可知,不同红曲霉菌发酵释放青稞多酚和黄酮的能力差异显著($P<0.05$),其中ACCC30352红曲霉菌发酵青稞释放的游离酚、结合酚和游离黄酮含量显著高于其他3种红曲霉菌($P<0.05$);同等发酵条件下,



字母不同表示不同菌种间差异显著($P<0.05$)

图1 4种红曲霉菌对青稞中多酚和黄酮含量的影响

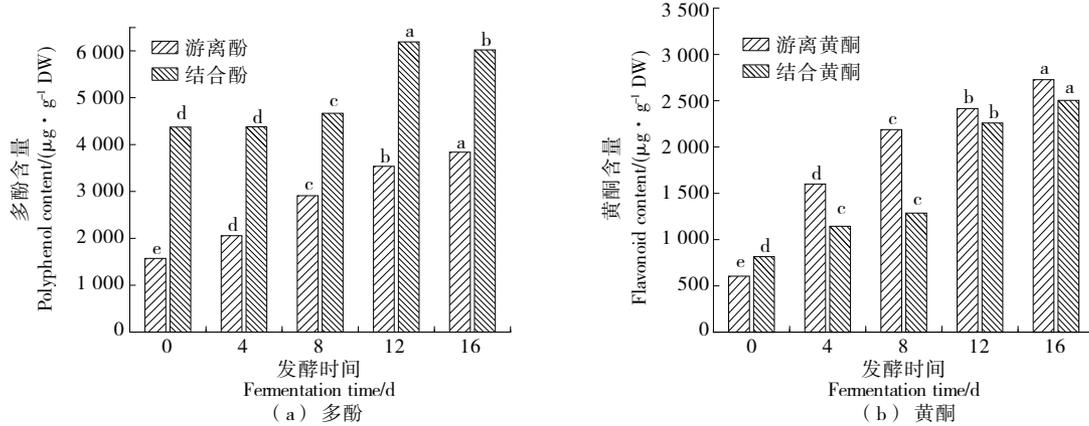
Figure 1 Effects of four species of monascus on polyphenol and flavonoid contents in highland barley

CICC41649 红曲霉菌释放青稞多酚和黄酮的能力最差。CICC30352 红曲霉发酵青稞游离酚、结合酚、游离黄酮和结合黄酮含量分别为 3 838.96, 6 210.48, 2 727.90, 2 503.79 $\mu\text{g/g DW}$ 。综合考虑, ACCC30352 菌株释放青稞多酚及黄酮含量的能力最佳, 故以此菌株为发酵青稞的适宜红曲霉菌进行后续试验。

2.2 富集多酚青稞红曲米发酵工艺优化

2.2.1 发酵时间 由图 2 可知, 结合酚是青稞中主要的酚类物质, 游离酚仅占总酚类含量的 1/3。随着发酵时间的延长, 青稞红曲米总酚和总黄酮含量显著增加 ($P <$

0.05), 游离酚和游离黄酮被大量释放。发酵第 16 天, 青稞红曲米的游离酚、游离黄酮和结合黄酮含量达到最大值, 此时总酚含量达到最大值 (9 858.8 $\mu\text{g/g DW}$), 为未发酵青稞多酚的 1.66 倍。这可能是红曲霉菌随发酵时间的延长产生了大量水解酶, 水解酶能断裂酚类物质与其他物质相互作用的化学键, 使谷类中多酚类物质含量升高^[20-21]。表明红曲霉菌发酵能极大地促进青稞中酚类物质的生成和释放, 且发酵时间为 16 d 时青稞红曲米总酚含量最高, 产品色泽鲜红艳丽, 故确定适宜的发酵时间为 16 d。



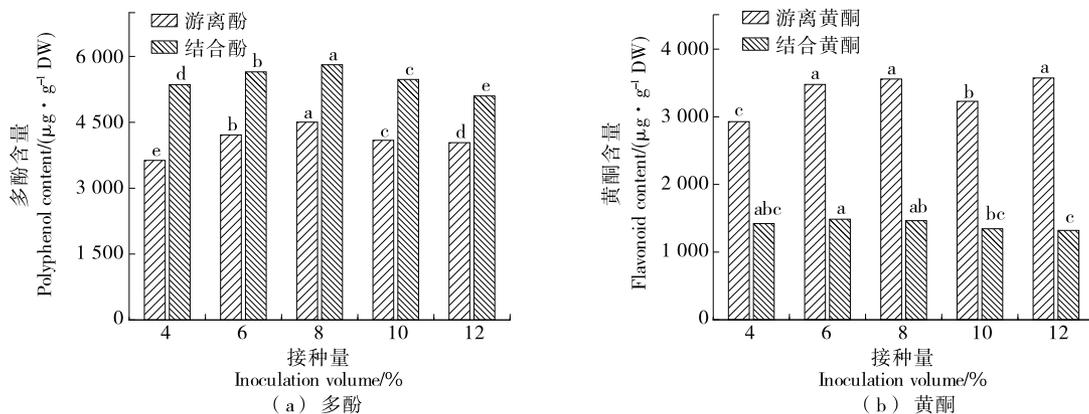
字母不同表示不同发酵时间之间差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 发酵时间对青稞红曲米多酚和黄酮含量的影响

Figure 2 Effects of fermentation time on polyphenol and flavonoid content of highland barley monascus rice

2.2.2 红曲霉菌接种量 由图 3 可知, 随着红曲霉菌接种量的增大, 青稞红曲米中总酚和总黄酮含量均呈先增加后减小趋势。当红曲霉菌接种量为 8% 时, 青稞红曲米中游离酚、结合酚和游离黄酮含量均显著高于其他处理组, 此时总酚和总黄酮含量最高。这可能是红曲霉菌接种量较低时, 菌体的繁殖速度慢, 代谢产物形成的速度也慢, 发酵后期发酵热的产生以及基质水分的散失使菌体的生

长代谢进一步受到限制, 发酵结束后总酚和黄酮含量均较低; 红曲霉菌接种量过大时, 发酵基质中菌体在发酵前期过度生长, 发酵后期会降解酚类物质以供生长需求, 此外, 红曲霉菌接种量过大还会使发酵物中的含水量过高, 透氧率下降, 影响红曲霉菌的正常生长代谢, 不利于酚类物质的积累转化^[22-23]。综上, 适宜的红曲霉菌接种量为 8%。



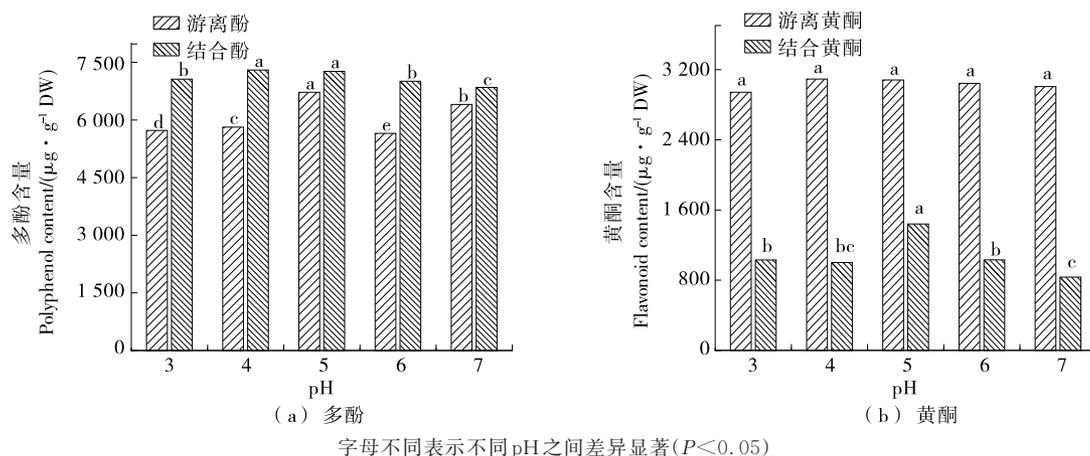
字母不同表示不同接种量之间差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 红曲霉菌接种量对青稞红曲米多酚和黄酮含量的影响

Figure 3 Effects of monascus inoculum amount on polyphenol and flavonoid content of highland barley monascus rice

2.2.3 浸泡蒸馏水pH 由图4可知,青稞发酵过程中,随着浸泡蒸馏水pH的增加,游离酚、结合酚、游离黄酮和结合黄酮含量均呈先增加后降低趋势。这主要是pH通过改变细胞膜的电荷,影响营养物质离子化程度,使得生物活性物质的活性以及微生物对营养物的吸收发生改变;同时pH还可以影响微生物

代谢过程中各种酶活性,进而影响菌体的生长和产物的合成^[14]。当浸泡蒸馏水pH为5时,青稞红曲米中多酚含量最高,此时结合黄酮含量显著高于其他处理组,与蒋汶^[24]的研究结果相似,但与卢颖^[14]的研究结果不同,这可能与红曲霉发酵的原料有关。综上,浸泡蒸馏水的适宜pH为5。



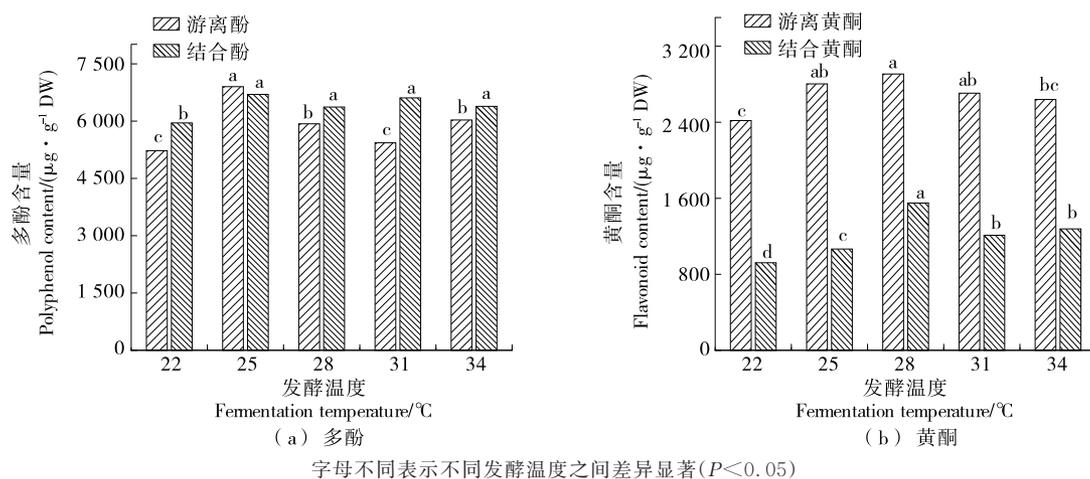
字母不同表示不同pH之间差异显著($P < 0.05$)

图4 浸泡蒸馏水pH对青稞红曲米多酚和黄酮含量的影响

Figure 4 Effects of pH of soaking water on polyphenol and flavonoid content of highland barley monascus rice

2.2.4 发酵温度 由图5可知,随着发酵温度的增大,青稞红曲米中多酚和黄酮含量整体呈先增加后减小趋势。这可能是发酵温度较低时,菌体生长缓慢,红曲颜色较浅,青稞中的酚类物质无法被充分释放;发酵温度较高时,发酵前期菌丝生长过快,发酵后期产生较多的游离水

沉积于容器底部,导致底部缺氧,出现腐败现象,影响黄酮含量^[21]。当发酵温度为25℃时,青稞红曲米中总多酚含量最高,且此时青稞红曲米中酚类物质含量显著高于其他发酵温度的($P < 0.05$)。因此,选择25℃为青稞红曲米的适宜发酵温度。



字母不同表示不同发酵温度之间差异显著($P < 0.05$)

图5 发酵温度对青稞红曲米多酚和黄酮含量的影响

Figure 5 Effects of fermentation temperature on polyphenol and flavonoid content of highland barley monascus rice

2.3 正交试验

在单因素试验基础上,选取发酵时间、红曲霉菌接种量、浸泡蒸馏水pH和发酵温度为影响因素,以多酚和黄酮含量为指标进行四因素三水平正交试验。试验因素水

平表见表1,试验设计及结果见表2。

由表2可知,影响青稞红曲米中总酚含量的因素主次顺序为B>A>D>C,其中浸泡蒸馏水pH对青稞红曲米的总酚含量影响极显著($P < 0.01$)。此时,红曲霉菌发酵

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Table of factors in orthogonal test

水平	A 发酵时间/d	B 红曲霉菌接种量/%	C 浸泡蒸馏水 pH	D 发酵温度/℃
1	14	6	4	23
2	16	8	5	25
3	18	10	6	27

青稞的最优工艺条件为 A₃B₂C₂D₃, 即红曲霉菌接种量 10%、浸泡蒸馏水 pH 5、发酵温度 25℃、发酵时间 18 d。影响青稞红曲米中总黄酮含量的因素主次顺序为 C>D>A>B, 各因素对青稞红曲米的总黄酮含量影响均不显著。

2.4 验证实验

由表 3 可知, A₃B₂C₂D₃ 的青稞红曲米中酚类物质含量

显著高于 A₂B₂C₂D₁ 的 (P<0.05), 总酚和总黄酮含量分别为青稞原料的 2.24, 2.96 倍, 极大地释放了青稞中的酚类物质。这可能是红曲霉发酵时产生了水解酶, 水解酶能断裂酚类物质与其他物质相互作用的化学键, 促进谷类中多酚类物质的释放, 从而使酚类物质含量升高^[25]。因此, 确定红曲霉发酵青稞的最佳工艺条件为红曲霉菌接种量 10%、浸泡蒸馏水 pH 5、发酵温度 25℃、发酵时间 18 d。

2.5 富集多酚青稞红曲米的体外抗氧化活性

由图 6 可知, 青稞红曲米中游离酚和结合酚的 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和 FRAP 还原能力均显著高于未发酵青稞 (P<0.05), 且分别为未发酵青稞的 3.00, 1.31, 11.75, 25.34, 6.21, 1.91 倍, 与卢颖^[14]的研究结果一致。这可能是红曲霉中的各种酶类促进了青稞中酚类物质的释放, 进而提高了青稞红曲米的抗氧化活性。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal experimental design and results

试验号	A	B	C	D	总酚/ (μg·g ⁻¹ DW)	总黄酮/ (μg·g ⁻¹ DW)
1	1	1	1	1	10 730.0	2 767.66
2	1	2	2	2	12 563.4	2 916.79
3	1	3	3	3	11 871.4	2 027.65
4	2	1	2	3	11 216.5	4 099.56
5	2	2	3	1	12 660.7	3 608.51
6	2	3	1	2	11 636.2	2 343.82
7	3	1	3	2	11 187.5	1 821.60
8	3	2	1	3	13 060.4	2 405.78
9	3	3	2	1	12 027.5	3 488.34
总酚	k ₁	11 721.58	11 044.68	11 808.88	11 806.07	
	k ₂	11 837.79	12 761.50	11 935.78	11 795.69	
	k ₃	12 091.82	11 845.01	11 906.54	12 049.43	
	R	370.24	1 716.82	126.90	253.73	
总黄酮	k ₁	2 570.70	2 896.27	2 505.75	3 288.17	
	k ₂	3 350.63	2 977.03	3 501.56	2 360.73	
	k ₃	2 571.91	2 619.94	2 485.92	2 844.33	
	R	779.93	357.09	1 015.64	927.44	

表 3 验证实验结果

Table 3 Verification test results μg/g DW

组别	总酚	总黄酮	总多酚
A ₃ B ₂ C ₂ D ₃	13 330.60±677.32	4 211.45±169.50	17 542.05±554.21
A ₂ B ₂ C ₂ D ₁	12 755.63±347.83	4 355.31±132.53	17 110.94±276.49

2.6 富集多酚青稞红曲米的酚类物质组成

由表 4 可知, 青稞红曲米中酚类物质总量及游离型酚类物质总量显著高于未发酵青稞 (P<0.05), 其含量分别

为未发酵青稞的 1.23, 1.50 倍, 其中游离型酚酸和游离型黄酮是其主要增加的酚类物质, 分别为未发酵青稞的 2.28, 1.12 倍。这可能是发酵过程中微生物代谢产生了新的多酚化合物, 同时, 经发酵后相关酶活力恢复或相关酶的合成使得被细胞壁束缚的酚类物质得以释放, 促进了游离型酚类物质含量的提高^[26-27]。

青稞红曲米酚酸类物质中丁香酸(游离型)、邻香豆酸(游离型和结合型)、藜芦酸(游离型)、水杨酸(游离型)和对羟基苯甲酸(游离型)含量增加较为显著 (P<0.05),

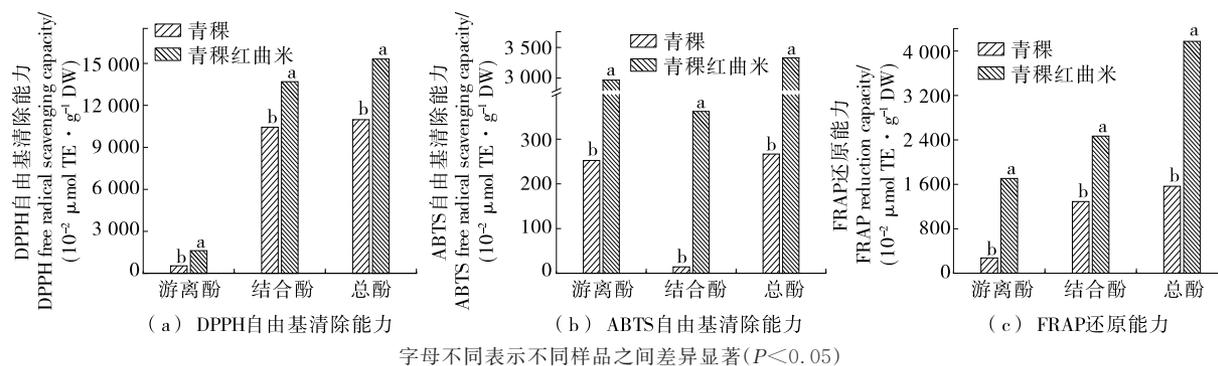
字母不同表示不同样品之间差异显著($P < 0.05$)

图6 青稞及富集多酚青稞红曲米的体外抗氧化活性

Figure 6 *In vitro* antioxidant activity of highland barley and polyphenol-enriched highland barley monascus rice

分别为未发酵青稞的16.52, 10.75, 3.80, 7.33, 3.26, 2.02倍,说明红曲霉菌发酵对青稞中酚类物质含量的提高具有一定选择性,主要提高了羟基苯甲酸类及羟基肉桂酸类物质。其中苯甲酸、丁香酸、香草酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸为青稞红曲米的主要特征性酚类物质。

青稞红曲米黄酮类物质中芦丁(游离型和结合型)和槲皮素(游离型和结合型)含量增加较为显著($P < 0.05$),

分别为未发酵青稞的90.60, 4.19, 2.10, 1.50倍。其中芦丁和儿茶素为青稞红曲米的主要特征性黄酮类物质,但青稞红曲米中儿茶素(游离型)含量显著低于未发酵青稞($P < 0.05$)。此外,与未发酵青稞相比,青稞红曲米中儿茶素(结合型)未检出,可能是一些酚类物质单体在红曲霉菌发酵期间发生了氧化降解,也可能是与酚类化合物之间存在相互作用或发生络合反应有关^[28]。

表4 未发酵青稞和富集多酚青稞红曲米的酚类物质组成[†]

Table 4 Phenolic composition of unfermented highland barley and polyphenol-enriched highland barley monascus rice

种类	化合物	未发酵青稞		青稞红曲米	
		游离型	结合型	游离型	结合型
酚酸	没食子酸	0.68±0.05 ^c	0.57±0.02 ^d	1.29±0.16 ^a	0.99±0.06 ^b
	原儿茶酸	3.82±0.15 ^b	1.06±0.01 ^d	6.58±0.07 ^a	1.18±0.00 ^c
	香草酸	7.40±0.33 ^b	0.98±0.01 ^c	13.91±0.77 ^a	1.05±0.05 ^c
	丁香酸	1.44±0.05 ^b	0.36±0.01 ^d	23.79±0.32 ^a	0.64±0.01 ^c
	苯甲酸	6.52±0.41 ^b	4.49±0.34 ^c	8.95±0.21 ^a	3.98±0.43 ^d
	邻香豆酸	0.04±0.00 ^{bc}	0.10±0.01 ^b	0.43±0.08 ^a	0.38±0.02 ^a
	水杨酸	0.19±0.02 ^c	0.22±0.01 ^c	0.62±0.04 ^a	0.35±0.02 ^b
	藜芦酸	0.09±0.01 ^b	0.12±0.06 ^b	0.66±0.07 ^a	0.22±0.02 ^b
	对羟基苯甲酸	4.07±0.26 ^c	7.48±0.58 ^b	8.21±0.39 ^a	3.65±0.20 ^c
	阿魏酸	8.55±0.11 ^d	27.62±0.64 ^a	10.79±0.07 ^c	13.31±0.50 ^b
	黄酮	儿茶素	64.49±3.21 ^a	0.08±0.00 ^c	24.78±0.13 ^b
芦丁		0.52±0.02 ^b	0.16±0.01 ^d	47.11±1.63 ^a	0.67±0.02 ^b
槲皮素		0.49±0.01 ^d	0.60±0.00 ^c	1.03±0.02 ^a	0.90±0.01 ^b
木犀草素		1.96±0.09 ^a	0.26±0.03 ^b	1.98±0.08 ^a	0.25±0.01 ^b
总酚酸		32.80±1.16 ^c	42.54±2.14 ^b	74.90±2.17 ^a	26.03±0.83 ^d
总黄酮		67.46±2.05 ^b	1.09±0.04 ^c	75.23±1.09 ^a	1.49±0.05 ^c

[†] 同行字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.7 青稞红曲米释放酚类物质的酶促机理

为确定促进青稞多酚成分释放酶的种类,利用最佳工艺发酵青稞并对其发酵过程中8种酶活力变化进行测定,包括内切葡聚糖酶、 α -淀粉酶、 β -葡萄糖苷酶、外切葡

聚糖酶、木聚糖酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶和中性蛋白酶,其中中性蛋白酶和碱性蛋白酶的酶活基本未检出。由图7可知,随着发酵时间的延长,青稞发酵过程中木聚糖酶、外切葡聚糖酶和 α -淀粉酶活性整体呈先增加后减

小趋势,并在发酵第4天达到峰值。总纤维素酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和酸性蛋白酶活性随发酵时间的延长整体呈上升趋势,与青稞红曲米中多酚和黄酮含量变化趋势一致,表明总纤维素酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和酸性蛋白酶与青稞红曲米酚类物质释放密切相关。纤维素、半纤维素、木质素和果胶是植物细胞壁的主要成分,其共同形成一种化学海绵,通过化学键交联和吸附酚类物质,阻碍其释放^[29]。内切葡聚糖酶和酸性蛋白酶能分解破坏植物细胞壁,软化植物基质内部结构,暴露出与不溶性酚类物质结合的化学键; β -葡萄糖苷酶可切开酚类物质与其他物质之间的糖苷键,释放出植物基质内部与细

胞壁成分相结合的酚类物质,从而提高多酚含量^[30-31]。此外, β -D-葡萄糖苷酶可通过裂解 β -(1,4;1,6;1,2)糖苷键和 α -(1,3;1,4;1,6)糖苷键,将黄酮苷转化为黄酮苷元。因此,在红曲霉发酵过程中,青稞红曲米释放酚类物质的酶促机制可分为3类:①纤维素酶和蛋白酶破坏了青稞细胞壁结构,促进了植物细胞中游离型酚类物质的释放;②纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶破坏了酚类物质与青稞细胞壁结构成分之间的化学键,促进了与植物基质交联的酚类物质的释放;③ β -D-葡萄糖苷酶破坏了黄酮苷的鼠李糖苷键和葡萄糖苷键,并将其转化为小分子黄酮苷醛酸,促进其释放。

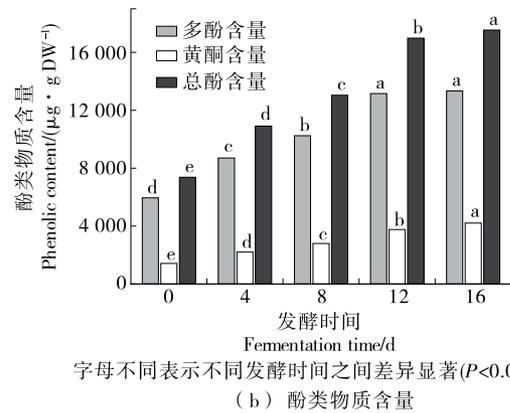
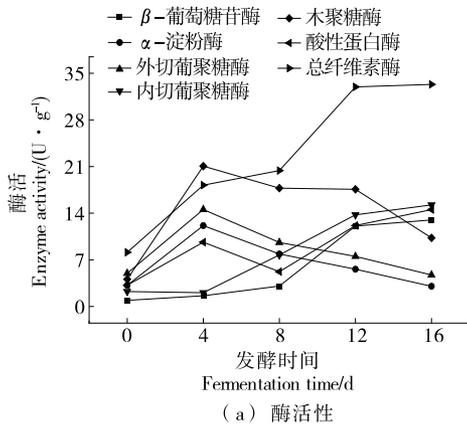


图7 青稞发酵过程中酚类物质含量和各类水解酶活性变化

Figure 7 Changes in the activity of various hydrolytic enzymes during highland barley fermentation

3 结论

研究筛选出 ACCC30352 红曲霉菌为发酵青稞的适宜菌株。红曲霉发酵青稞的最优工艺条件为红曲霉菌接种量 10%、浸泡蒸馏水 pH 5、发酵温度 25 °C、发酵时间 18 d,此条件下的青稞总酚和总黄酮含量比未发酵青稞分别提高了 124.03%,196.58%,极大地释放了青稞中的酚类物质。其中青稞红曲米中游离型酚酸和游离型黄酮是其主要增加的酚类物质;藜芦酸、丁香酸、水杨酸、邻香豆酸和槲皮素、芦丁及对羟基苯甲酸含量提高最为显著。此外,青稞红曲米中酚类物质的体外抗氧化能力显著高于未发酵青稞($P<0.05$),其 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和铁离子还原能力分别为未发酵青稞的 1.39,12.48,2.65 倍。同时,酸性蛋白酶、 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶对青稞红曲米中酚类物质的释放起重要作用。后续需进一步深入研究青稞红曲米酚类物质功能活性以及基于青稞红曲米其他活性成分产品的开发。

参考文献

[1] ZHANG B, ZHANG Y, LI H, et al. A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their

contribution to human health with future perspectives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 347-362.

[2] ROASA J, DE VILLA R, MINE Y, et al. Phenolics of cereal, pulse and oilseed processing by-products and potential effects of solid-state fermentation on their bioaccessibility, bioavailability and health benefits: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 116: 954-974.

[3] 白婷, 靳玉龙, 朱明霞, 等. 青稞淀粉研究现状[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(4): 141-146.

BAI T, JIN Y L, ZHU M X, et al. Current status of barley starch research[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2019, 34(4): 141-146.

[4] ZHU F, DU B, XU B. Superfine grinding improves functional properties and antioxidant capacities of bran dietary fibre from Qingke (hull-less highland barley) grown in Qinghai-Tibet Plateau, China[J]. Journal of Cereal Science, 2015, 65: 43-47.

[5] GÜNDEŞLİ M A, KORKMAZ N, OKATAN V. Polyphenol content and antioxidant capacity of berries: a review[J]. International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences, 2019, 3(2): 350-361.

[6] 易翠平, 刘爽, 林本平, 等. 谷物中多酚与多糖之间相互作用的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(4): 187-193.

- YI C P, LIU S, LIN B P, et al. Research progress on the interaction between polyphenols and polysaccharides in cereals [J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2022, 37(4): 187-193.
- [7] ANNE-LAURE C B, ORDAZ-ORTIZ J J, CAMILLE A, et al. Developing pericarp of maize: a model to study arabinoxylan synthesis and feruloylation[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1 476.
- [8] 杜艳, 梁锋, 李婷玉, 等. 发芽青稞的营养品质及降血压效果[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(7): 44-52.
- DU Y, LIANG F, LI T Y, et al. Nutritional quality and antihypertensive effect of sprouted highland barley[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(7): 44-52.
- [9] XIANG X, TAN C, SUN X, et al. Effects of fermentation on structural characteristics and in vitro physiological activities of highland barley β -glucan[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 231: 1-10.
- [10] 崔梦情. 真菌固态发酵释放葡萄籽多酚及其机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2021: 38-49.
- CUI M Q. Release of grape seed polyphenols by solid-state fermentation of fungi and its mechanism[D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2021: 38-49.
- [11] 江慧斌, 聂攀, 吕玮, 等. 藜麦与黑大麦复合谷物发酵富集多酚和黄酮工艺优化及其生物有效性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 150-160.
- JIANG H B, NIE P, LU W, et al. Optimization of polyphenol and flavonoid enrichment process by fermentation of quinoa and black barley composite grains and its bioefficacy[J]. Food Industry Science and Technology, 2024, 45(6): 150-160.
- [12] HUR S J, LEE S Y, KIM Y C, et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods[J]. Food Chemistry, 2014, 160: 346-356.
- [13] LEE Y L, YANG J H, MAU J L. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1 128-1 137.
- [14] 卢颖. 红曲霉固态发酵燕麦功能成分的生物转化[D]. 广州: 华南理工大学, 2016: 56-67.
- LU Y. Biotransformation of functional components of solid-state fermented oats by *Aspergillus oryzae*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016: 56-67.
- [15] 孙聪聪, 李兴江, 穆冬冬, 等. 安卡红曲霉液态发酵豆渣、麦麸、梨渣制备可溶性膳食纤维[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 205-210.
- SUN C C, LI X J, MU D D, et al. Preparation of soluble dietary fiber from okara, wheat bran and pear residue by liquid fermentation with *Monascus anka*[J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 205-210.
- [16] 姚青. 以麦麸为基质的红曲霉的固态发酵及抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015: 16-25.
- YAO Q. Solid-state fermentation and antioxidant activity of *Aspergillus erythrospolis* using wheat bran as substrate[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015: 16-25.
- [17] 杨希娟, 党斌, 徐菲, 等. 不同粒色青稞酚类化合物含量与抗氧化活性的差异及评价[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(9): 34-42.
- YANG X J, DANG B, XU F, et al. Differences and evaluation of phenolic compounds content and antioxidant activity of barley with different grain color[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2017, 32(9): 34-42.
- [18] 杨希娟, 党斌, 樊明涛. 溶剂提取对青稞中不同形态多酚组成及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 239-248.
- YANG X J, DANG B, FAN M T. Effect of solvent extraction on the composition and antioxidant activity of different forms of polyphenols in barley[J]. Food Science, 2018, 39(24): 239-248.
- [19] 贝琦. 燕麦发酵多酚释放与转化及生物活性增强的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 31-33.
- BEI Q. Study on the release and conversion of polyphenols and bioactivity enhancement in oat fermentation[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018: 31-33.
- [21] 何冰桃, 党斌, 郑万财, 等. 红曲霉固态发酵青稞酒工艺优化研究[J]. 农产品加工, 2023(6): 63-69.
- HE B T, DANG B, ZHENG W C, et al. Optimization of solid-state fermentation of barley wine by *Aspergillus oryzae*[J]. Agricultural Product Processing, 2023(6): 63-69.
- [22] WANG L, LUO Y, WU Y, et al. Impact of fermentation degree on phenolic compositions and bioactivities during the fermentation of guava leaves with *Monascus anka* and *Bacillus* sp.[J]. Journal of Functional Foods, 2017(12): 183-190.
- [23] 杨华, 刘亚娜, 郭德军. 红豆越橘果酒发酵过程总酚及总黄酮含量的变化[J]. 酿酒科技, 2015(11): 22-25.
- YANG H, LIU Y N, GUO D J. Changes of total phenol and total flavonoid contents during fermentation of red bean lingonberry fruit wine[J]. Winemaking Science and Technology, 2015(11): 22-25.
- [24] 蒋汶. 红曲霉发酵产多糖及其性质的初步研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2016: 11-15.
- JIANG W. Preliminary study on polysaccharide production by fermentation of *Aspergillus erythrospolis* and its properties [D]. Wuhu: Anhui University of Engineering, 2016: 11-15.
- [25] 蒲立柠, 陈光静, 阚建全. 响应面优化青稞麸皮薏仁红曲霉发酵工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 264-270.
- PU L N, CHEN G J, KAN J Q. Response surface test to optimize the fermentation process of barley bran barley red curd fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(2): 264-270.
- [26] 王富盈. 发酵对燕麦和青稞的成分及功能性质的影响研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2022: 55-65.
- WANG F Y. Study on the effect of fermentation on the composition and functional properties of oats and barley[D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2022: 55-65.

(下转第151页)

- [6] 韩成云, 赵志刚, 邹磊. 响应面法优化徽州大黄菊总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(13): 35-39.
HAN C Y, ZHAO Z G, ZOU L. Optimization of extraction for flavonoids from Huizhou chrysanthemum by response surface method[J]. Food Research and Development, 2016, 37(13): 35-39.
- [7] 王薇, 蔡健. 桂花总黄酮的提取工艺[J]. 广州食品工业科技, 2004(2): 53-54.
WANG W, CAI J. Extraction technology of total flavones from osmanthus flower[J]. Modern Food Science and Technology, 2004(2): 53-54.
- [8] 黄磊磊, 刘佳怡, 王天怡, 等. 纤维素酶辅助超声提取丁香叶黄酮工艺优化及抗氧化性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 161-170.
HANG L L, LIU J Y, WANG T Y, et al. Optimization of cellulase-assisted ultrasound extraction and antioxidant analysis of flavonoids from syringa oblata leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 161-170.
- [9] 范艳丽, 韩丽娜, 孟雪梅, 等. 枸杞叶黄酮提取物的组成及初步结构表征[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 46-50.
FAN Y L, HAN L N, MENG X M, et al. Composition analysis and preliminary structural characterization of the flavonoids from *Lycium barbarum* leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 46-50.
- [10] 段志航, 赵彩云, 代博, 等. 紫色姜总黄酮提取工艺优化及其抗氧化作用研究[J]. 食品工业, 2023, 44(10): 30-36.
DUAN Z H, ZHAO C Y, DAI B, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Zingiber montanum* and study on its antioxidant effect[J]. The Food Industry, 2023, 44(10): 30-36.
- [11] 谭志坚. 双水相萃取体系在分离纯化芦荟活性成分中的应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2013: 33-35.
TAN Z J. Separation and purification of the active ingredients in *Aloe Vera* L. using aqueous two-phase system[D]. Changsha: Central South University, 2013: 32-35.
- [12] 廖家乐, 方甜, 范艳丽. 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 43-53.
LIAO J L, FANG T, FAN Y L. Inhibitory effects of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 43-53.
- [13] MARCO G V, RAJAURIA G, TIWARI B, et al. Extraction and yield optimisation of fucose, glucans and associated antioxidant activities from *Laminaria digitata* by applying response surface methodology to high intensity ultrasound-assisted extraction[J]. Marine Drugs, 2018, 16(8): 67-91.
- [14] 高畅, 胡利, 迟原龙, 等. 桑叶黄酮对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 194-198.
GAO C, HU L, CHI Y L, et al. Inhibitory effect of flavonoids from mulberry leaves on pancreatic lipase[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(5): 194-198.
- [15] 费子璇, 周慧宁, 张萌, 等. 刺玫果总黄酮提取工艺优化及抑制脂肪酶活性研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(7): 64-70.
FEI Z X, ZHOU H N, ZHANG M, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Rosa davurica* Pall. and its inhibition of lipase activity[J]. China Condiment, 2022, 47(7): 64-70.
- [16] 王远, 郑雯, 蔡珺珺, 等. 辣木叶黄酮结构分析及其对胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 31-37.
WANG Y, ZHENG W, CAI J J, et al. Structural analysis and anti-pancreatic lipase activity of flavonoids from *Moringa oleifera* Lam. leaves[J]. Food Science, 2018, 39(2): 31-37.
- [17] 范金波, 丁瑞文, 葛春辉, 等. 三种天然来源黄酮物质抗氧化活性和抑制胰脂肪酶活性的研究[J]. 包装与食品机械, 2017, 35(5): 15-20.
FAN J B, DING R W, GE C H, et al. Antioxidant activity and inhibition pancreatic lipase activity of three kinds of natural flavonoids[J]. Packaging and Food Machinery, 2017, 35(5): 15-20.
- [18] 关媛, 王雪盈, 孙媛媛, 等. 鸡血藤提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 126-132.
GUAN Y, WANG X Y, SUN Y Y, et al. α -Amylase and α -glycosidase inhibitory activities of the extracts from *spatholobus suberectus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(7): 126-132.

(上接第 143 页)

- [27] ABD RAZAK D L, ABD RASHID N Y, JAMALUDDIN A, et al. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015, 4(1): 33-38.
- [28] GE X, SALEHAS M, JING L, et al. Germination and drying induced changes in the composition and content of phenolic compounds in naked barley[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 95: 103594.
- [29] WANG H, CHEN G, FU X, et al. Effects of aging on the phytochemical profile and antioxidative activity of *Pericarpium Citri Reticulatae* 'Chachiensis'[J]. RSC Advances, 2016(107): 105272.
- [30] BEI Q, LIU Y, WANG L, et al. Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 185-194.
- [31] 徐艳平. 复合酶解法与固态发酵法研制新型牛蒡茶[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 35-43.
XU Y P. Development of a new type of burdock tea by combining enzymatic digestion and solid-state fermentation [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022: 35-43.