

红曲霉发酵对罗布麻多酚物质含量及种类的影响

周心怡¹ 李晓春² 周映君² 谢纯良² 陈金军¹

(1. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410208; 2. 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205)

摘要: [目的] 分析红曲霉调控相关基因对罗布麻多酚物质释放的影响。[方法] 采用红曲霉发酵罗布麻, 测定多酚物质含量, 并进行转录组分析。[结果] 以总多酚、可溶性多酚、不可溶性—结合态多酚、绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量为评价指标, 发酵第 8 天可显著提升罗布麻中多酚物质的释放。根据转录组分析显示, *1,3-β-GT*、*XTH23* 等碳水化合物活性酶基因的调控表达为红曲霉释放罗布麻内多酚物质的主要因素。[结论] 红曲霉发酵可显著提升罗布麻中多酚物质含量。

关键词: 罗布麻; 红曲霉; 多酚; 转录组学

Influence of *Monascus* on polyphenol content and species in fermented *Apocynum venetum* L.

ZHOU Xinyi¹ LIU Xiaochun² ZHOU Yingjun² XIE Chunliang² CHEN Jinjun¹

(1. Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Institute of Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China)

Abstract: [Objective] To explore the influence of *Monascus* fermentation on the release of polyphenols from *Apocynum venetum* L. leaves. [Methods] *Apocynum venetum* L. was fermented with *Monascus*, and the content of polyphenols was measured, followed by transcriptome analysis. [Results] Total polyphenols, soluble polyphenols, insoluble-bound polyphenols, as well as the content of chlorogenic acid, luteolin, vitexin, and quercetin were taken as evaluation indicators. The results indicated that fermentation on the 8th day significantly increased the release of polyphenols from *Apocynum venetum* L. leaves. Transcriptome analysis showed that the regulated expression of carbohydrate-active enzymes such as *1,3-β-GT* and *XTH23*, was the main factor contributing to the release of polyphenols from *Apocynum venetum* L. by *Monascus*. [Conclusion] *Monascus* fermentation can significantly increase the content of polyphenols in *Apocynum venetum* L., providing a theoretical foundation and technical support for the continued development of high-quality *Apocynum venetum* L. tea products.

Keywords: *Apocynum venetum* L.; *Monascus*; polyphenols; transcriptomics

罗布麻(*Apocynum venetum* L.), 又名茶花麻、野茶, 是夹竹桃科罗布麻属多年生草本或半灌木植物, 分布于中国新疆、青海、内蒙古等地^[1]。罗布麻是一种集药用、饲用等为一体的经济作物^[2]。董正钧等^[3]研究表明, 罗布麻为明代《救荒本草》中记载的泽漆。罗布麻中含有黄酮类、有机酸类、苯丙素类及多种氨基酸和矿物质, 具有降血压、降胆固醇、抗衰老、提高免疫力及抗抑郁等功效^[4]。多酚是一类具有多种生物活性的植物次生代谢产物, 由植

物在恶劣的气候环境或病原体存在下合成, 具有多种生物活性功能^[5]。多酚类化合物通常以可溶性多酚和不可溶性—结合态多酚两种形式存在于植物中^[6]。其中, 可溶性多酚类化合物较容易被提取出来, 而不可溶性—结合态多酚类化合物通常与植物细胞壁中的纤维素、蛋白质或多糖相互作用形成共价化合物而难以提取^[7]。多酚为罗布麻中主要的活性成分, 包含绿原酸、槲皮素、木犀草苷、紫云英苷等, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、保护神经系

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(编号: CARS-16); 中国农业科学院麻类研究所科技创新工程重大任务专项(编号: CAAS-ASTIP-2023-IBFC); 湖南省科技创新计划项目(编号: 2022RC1151); 长沙市杰出创新青年培养计划项目(编号: kq2305010)

通信作者: 陈金军(1975—), 女, 湖南农业大学教授, 博士。E-mail: chhncjj@126.com

收稿日期: 2024-11-14 **改回日期:** 2025-02-08

统、治疗代谢类疾病等多种活性^[8-10]。

可溶性多酚易于被人体吸收利用,但大多数多酚与植物基质细胞壁组分,如纤维素、半纤维素、木质素、果胶和蛋白质等,交联结合以不可溶性—结合态多酚形式存在^[11],生物利用度较低。目前,有关不可溶性—结合态多酚物质的提取方法常采用甲醇、乙醇、丙酮水溶液进行提取^[12],为了提高提取率,多采用延长提取时间或对其进行超微粉碎处理。但延长提取时间易破坏活性物质结构,超微粉碎对设备要求高。微生物发酵是一种温和、无污染的加工方式,发酵过程中微生物利用中药中的纤维素、糖类、蛋白等营养成分生长的同时,产生的酶可以分解中药材的细胞壁,达到促进有效物质溶出的目的,进而提高其产品生物活性^[13]。此外,真菌对中药成分的发酵转化具有效率高、条件温和、选择性强、不污染环境、反应类型多等优势,可用于黄酮、生物碱、甾体、萜类、醌类、苯丙素等多种类型化合物的转化、生成^[14]。红曲霉(*Monascus purpureus* Went.)是中国最早应用于食品加工的有益真菌之一^[15]。曾海英^[16]、姚青^[17]分别采用红曲霉对薏米、豆粕和麦麸进行发酵代谢转化。结果表明,红曲霉发酵能促进薏米、豆粕和麦麸中多酚的释放。王露^[18]研究表明,通过红曲霉与芽孢菌 BS2 共发酵可极大地促进番石榴叶中可溶性多酚的释放。但未见红曲霉发酵应用于罗布麻茶生产中的研究。

研究拟深入探讨红曲霉发酵对罗布麻多酚物质释放的影响及其分子机制,通过罗布麻培养红曲霉,测定不同发酵时间的多酚物质含量,并进行转录组分析,以期获得最佳发酵时间,在此基础上分析红曲霉调控相关基因对罗布麻多酚物质释放的影响,旨在开发高品质罗布麻茶产品。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及设备

1.1.1 材料与试剂

罗布麻:采摘后晒干至含水量<5%,福建省南安市罗浮山;

红曲霉(*Monascus purpureus*):CGMCC3.15548,中国普通微生物菌种保藏中心;

福林酚:生物技术级,上海麦克林生化科技有限公司;

PDA培养基:杭州百思生物技术有限公司;

碳酸钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

总RNA提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;

逆转录试剂盒:南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子天平:AL104型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

酶标仪:MK3型,赛默飞世尔科技公司;

超声波清洗机:JP-060S型,深圳洁盟清洗设备有限公司;

超净工作台:BCM-1000型,苏州净化设备有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:XFH-200CA型,浙江新丰医疗器械有限公司;

冷冻干燥机:FD80AD型,上海比朗仪器制造有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株活化及培养 红曲霉从-80℃冰箱取出并复苏,接种于PDA培养基中,28℃培养5d。用纯水冲洗孢子,调整浓度为 1×10^6 个/mL,制成悬液备用。将红曲霉菌株接种至PDA培养基上,28℃恒温培养10d,用纯水冲洗孢子制备成孢子悬浮液,用于发酵罗布麻。

1.2.2 罗布麻固态发酵 将罗布麻干叶粉碎,过40目筛,121℃灭菌20min,称取3.00g罗布麻粉末至无菌培养皿中。缓慢加入5mL灭菌纯水,轻轻摇动混匀。加入2mL孢子悬浮液,混匀,于28℃培养12d,至菌丝体铺满平板。以红曲霉在PDA培养基上发酵作为对照。

1.2.3 罗布麻醇提取物的制备及分离纯化 发酵后的罗布麻混合物(含菌种、罗布麻)冷冻干燥,研磨成粉。称取1.50g粉末,按料液比1:20(g/mL)加入体积分数70%乙醇,50℃、500W超声提取30min,8000r/min离心10min,取上清。重复提取2次,合并滤液,即为罗布麻醇提液^[19]。

1.2.4 多酚含量测定 参考刘仙俊等^[20]的方法。

(1) 总多酚含量:以0.02~0.20mg/mL没食子酸作为标准多酚化合物。

(2) 可溶性多酚含量:根据文献^[21]的方法提取可溶性多酚,并稍作修改。准确称取1.00~1.01g样品粉末,按料液比1:25(g/mL)加入80%乙醇提取两次,用0.45μm滤纸过滤。50℃下真空旋转蒸发,除去乙醇,用乙酸乙酯萃取3次,真空旋转蒸发至无液体,将浓缩物重新溶解于5mL甲醇溶液,得罗布麻可溶性多酚提取液。

(3) 不可溶性—结合态多酚含量:将可溶性提取物过滤的残渣于60℃干燥10h。称取0.50~0.51g干渣,加入50mL浓度为4mol/L的NaOH溶液水解4h,用浓盐酸调pH至2.0。水解液用乙酸乙酯液液萃取3次。50℃下真空旋转蒸发,除去乙酸乙酯。将浓缩物重新溶解于5mL体积分数50%甲醇溶液中,得不可溶性—结合态多酚。

1.2.5 绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量测定

采用高效液相色谱仪—紫外检测器对样品中的绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量进行测定。色谱柱选用依利特C₁₈柱(4.6mm×250mm,5μm),柱温35℃。流动相A为乙腈,流动相B为0.2%磷酸—水,梯度洗脱,流速0.8mL/min,进样量10μL,检测波长256nm^[22]。

1.2.6 红曲霉转录组学分析

(1) 总 RNA 提取:将红曲霉接种至 PDA 培养基和罗布麻上,28 ℃培养 8 d,用灭菌的镊子小心夹起菌丝,于液氮中冷冻保藏。采用总 RNA 提取试剂盒提取菌丝总 RNA,通过 NanoDrop 2000 测定 RNA 浓度和纯度,采用琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性,Agilent2100 测定 RNA 完整值(RIN),挑选满足测序要求的 RNA 样本进行转录组测序。在 Illumina HiSeq 6000 测序平台上进行 cDNA 文库构建和高通量测序。

(2) 转录组组装、定位:采用 Fastp 软件删除原始数据中包含适配器、ployp-N、低质量的 reads,获得干净序列,每个样本大约获得 45.56 raw reads。使用 HISAT2 软件参考红曲霉基因组(NCBI_ASM2599979v1)基因组比,组装获得单个注释基因,并计算测序结果的 Q30、Q25 和 GC 含量,以衡量测序结果的质量,使用 FPKM 测定基因表达水平。

(3) 序列分析和功能注释:通过 DESeq R 软件包进行

两组之间的差异基因表达分析,采用 Benjamini-Hochberg 方法控制错误发现率,DESeq 检测到 q 值 <0.05 且 $\text{foldchange}>2$ 或 $\text{foldchange}<0.5$ 的基因被认为是差异表达基因(DEGs)。KEGG 数据库 Swiss-Port、Nr 数据库用于基因的功能注释和富集分析。

(4) qRT-PCR 验证:分别提取 2 组处理后红曲霉菌株 RNA,逆转录成 cDNA。使用 Primer3Plus 软件设计引物,并由北京擎科生物科技股份有限公司合成。以 1 μg 总 RNA 为模板进行逆转录合成 cDNA。qRT-PCR 反应体系 20 μL ,含 10.0 μL 的 $2\times\text{ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix}$,8.6 μL ddH₂O,正反向引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$,cDNA 模板 0.1 μL 。扩增反应条件:95 ℃预变性 30 s;95 ℃ 10 s,60 ℃延伸 30 s,40 个循环。每个样本重复 3 次。利用 Primer3Plus 软件设计在 100~250 bp 的特异性引物,内参基因为 actin,引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因的相对表达量^[23]。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因编号	引物序列(5'-3')	引物序列(3'-5')
ChIADR1	CCGGTGGAGATTCGGGAATC	GCAACGGCATTGACACGAAT
SBT6.1	GGTATGGAATGGGCCGTCAA	TGGAAGTAACCGTTGCCGTT
CHS	TTCTGAACCTGGTGGGAACG	GGGCTTGTCCTCTTCTCGA
At2g20280	TCACACCAGAGACATTCGCC	ATACACAGCCACAGGAAGCC
AO	CAACCCGTCAGAGTCAACCA	GTGCCAGGCGTGATTCTACT
SODCC	CAAGGCTGTTGCTGTTCTCC	GCGTTACCGGTCTTCTTGGA
CYSK	TCGATCCAGTCCATCAGCCT	CCGTCCATCCATATGACCCG
actin(内参)	CGAGTGACATCGGCATGAGA	CCAACCAAGAACCAGCAGC

1.2.7 数据分析 所有试验重复 3 次,以平均值±标准差表示。采用 GraphpadPrism 数据统计学分析软件处理、分析试验数据。采用 t -test 统计方法对数据进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表明两组样本之间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 红曲霉菌丝在罗布麻中的生长情况

由图 1 可知,发酵第 1 天未观察到红曲霉菌菌丝体,从第 2 天开始,红曲霉菌菌丝体逐渐增多,颜色逐渐加深,直到第 8 天,菌丝体覆盖了大部分的培养基表面,表明红曲霉菌在罗布麻纤维上具有良好的适应性和强大的生长能力。

加入红曲霉孢子悬浮液后,发酵第 2 天红曲霉菌菌丝体开始逐渐增多,各培养皿中的红曲霉菌开始呈现不同的生长趋势,由于红曲色素及其他次生代谢物的含量变化,颜色呈显著差异。发酵第 8 天,罗布麻培养基和 PDA 培养基中的红曲霉菌均呈现旺盛的生长状态,与发酵 1~

7 d 的相比,不仅菌丝体覆盖了培养基表面 90% 以上,颜色也变得更加深邃。发酵第 9~12 天,红曲霉菌的生长速度逐渐放缓,但菌落的整体形态无显著变化,颜色逐渐加深,推测是红曲霉菌在罗布麻纤维上的发酵已趋于稳定,形成了稳定的菌落生态系统。

2.2 红曲霉发酵罗布麻对多酚含量的影响

2.2.1 对总多酚、可溶性多酚、不可溶性—结合态多酚含量的影响 由表 2 可知,红曲霉发酵罗布麻过程中,总多酚、可溶性多酚、不可溶性—结合态多酚含量呈显著的动态变化。相比发酵第 0 天,发酵第 4、8 天的总多酚含量显著升高,相比发酵第 4 天,发酵第 8、12 天的不可溶性—结合态多酚含量显著降低,可溶性多酚含量显著增加,可能是一些不溶性结合的酚类化合物通过 β -糖苷键或其他氢和离子键与草药植物细胞壁中的蛋白质或多糖相连,通过特定的微生物衍生酶释放并转化为游离形式的多酚^[24]。

发酵第 12 天,总多酚和可溶性多酚含量降低明显,可

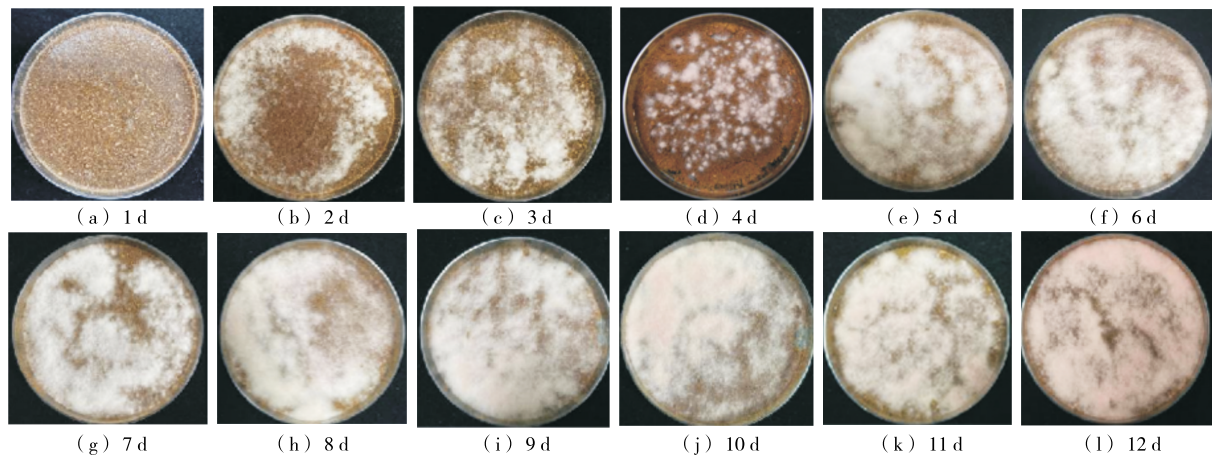


图1 红曲霉发酵罗布麻1~12 d的菌丝生长情况

Figure 1 Mycelial growth of *Apocynum venetum* L. during 1~12 days of *Monascus* fermentation表2 红曲霉发酵对罗布麻中多酚含量的影响[†]Table 2 Determination of polyphenol content in *Apocynum venetum* L. fermented by *Monascus* at different days

发酵时间/d	总多酚/ (mg·g ⁻¹)	可溶性多酚/ (mg·g ⁻¹)	不可溶性—结合态 多酚/(mg·g ⁻¹)
0	17.2±0.00 ^b	3.15±0.11 ^a	8.53±0.78 ^a
4	18.8±0.01 ^a	2.75±0.08 ^b	9.47±0.47 ^a
8	18.8±0.01 ^a	3.30±0.07 ^a	9.67±0.75 ^a
12	16.8±0.01 ^b	3.00±0.07 ^a	4.03±0.54 ^b

[†] 字母不同表示不同组之间存在显著性差异($P<0.05$)。

能是氧化酶氧化了部分多酚化合物,使多酚含量降低^[25]。发酵第4天,可溶性多酚含量显著降低,第8天后又显著增长,可能是由于发酵0~4 d的红曲霉处于增殖生长期,对多酚等碳源的利用较高,随着发酵的深入,发酵4~8,8~12 d后罗布麻中的碳源进一步释放,红曲霉对多酚类碳源的依赖性降低^[26-27]。由于发酵第8天的总多酚、可溶性多酚、不可溶性—结合态多酚均达到了较高水平,因此认为发酵第8天适宜总多酚、可溶性多酚的释放和提升。

2.2.2 对绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量的影响 由表3可知,红曲霉发酵罗布麻后,绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量均发生显著变化。其中,木犀草苷、紫云英苷含量均显著高于未发酵前的。绿原酸含量呈先增加后降低趋势,槲皮素含量呈先降低后增加再降低趋势。绿原酸、紫云英苷、槲皮素含量在发酵第8天达最大值,木犀草苷在发酵第8,12天无显著差异。因此,发酵第8天适宜绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素等多种多酚类物质的释放。

2.3 红曲霉的转录组测序与转录分析

红曲霉在罗布麻上生长8 d后的样品(D8)和红曲霉在PDA上生长8 d后样品(PDA)2个处理组,6个样本共

表3 红曲霉发酵对罗布麻中绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量的影响[†]Table 3 Influence of *Monascus* fermentation on chlorogenic acid, luteolin, isoquercitrin, and quercetin content in *Apocynum venetum* L.

发酵时间/d	绿原酸/ (mg·g ⁻¹)	木犀草苷/ (mg·g ⁻¹)	紫云英苷/ (mg·g ⁻¹)	槲皮素/ (mg·g ⁻¹)
0	2.71±0.51 ^b	4.42±0.90 ^b	0.22±0.00 ^c	0.22±0.00 ^a
4	3.06±0.23 ^a	5.10±0.56 ^a	0.31±0.00 ^a	0.09±0.00 ^b
8	3.17±0.22 ^a	4.98±0.04 ^a	0.30±0.00 ^a	0.22±0.00 ^a
12	2.21±0.10 ^c	5.00±0.10 ^a	0.27±0.00 ^b	0.09±0.00 ^b

[†] 字母不同表示不同组之间存在显著性差异($P<0.05$)。

产生了39.64 Gb的干净数据,各样本的有效数据量分布在6.16~6.98 G, Q30碱基分布在95.65%~96.00%,平均GC含量为52.34%,表明数据合格,可以进行后续分析。基于基因组组装结果进行数据库比对,获得9 061个基因,其中Nr注释6 919个,KEGG注释2 418个,Swiss-Prot注释2 418个。单基因的表达水平以FPKM值表示。由图2可知,两个样本之间显示出高的组内相关性,表明样本具有良好的一致性,适宜于开展后续分析。

2.4 红曲霉样本间的差异基因分析

由两组间转录组比较分析,D8与PDA共有表达基因9 061个,D8特有表达基因8个,PDA组特有表达基因14个。上调DEGs和下调DEGs分别为foldchange>1和foldchange<1阈值且 q 值<0.05。由图3可知,两组样本间差异DEGs 9 245个,其中上调DEGs 4 441个,下调DEGs 4 804个。

通过KEGG数据库比较分析9 245个DEGs,涉及107个KEGG途径,主要分类包括碳水化合物代谢(14个)、氨基酸代谢(14个)、辅因子和维生素的代谢

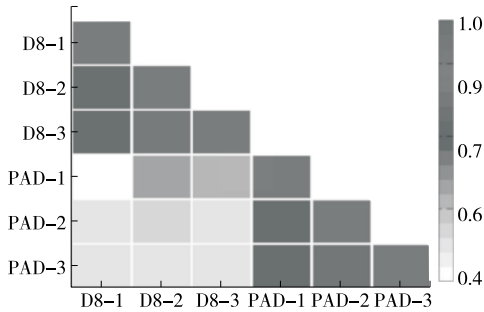
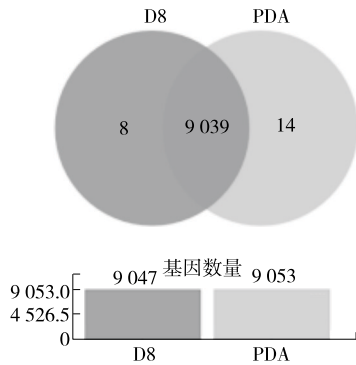


图 2 D8 和 PDA 组间转录组的相关性分析

Figure 2 Correlation analysis of transcriptomes between D8 and PDA groups

(11 个)、外源生物的生物降解和代谢(10 个)等。相对于 PDA 培养基,含有罗布麻的培养基成分更加复杂,需要参与到代谢过程的基因更加繁多,而红曲霉调控了涉及碳水化合物代谢众多基因的表达,参与到发酵罗布麻中,促进了多酚物质的释放。



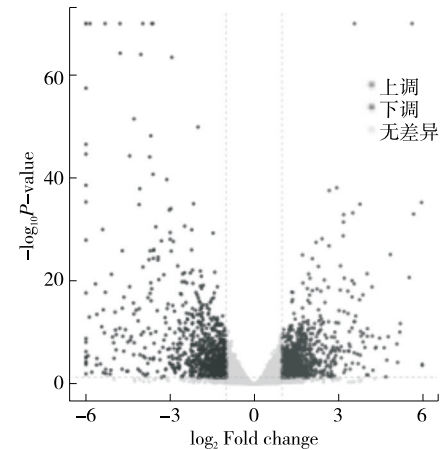
(a) 基因表达韦恩图

2.5 碳水化合物的活性酶(CAZy)注释

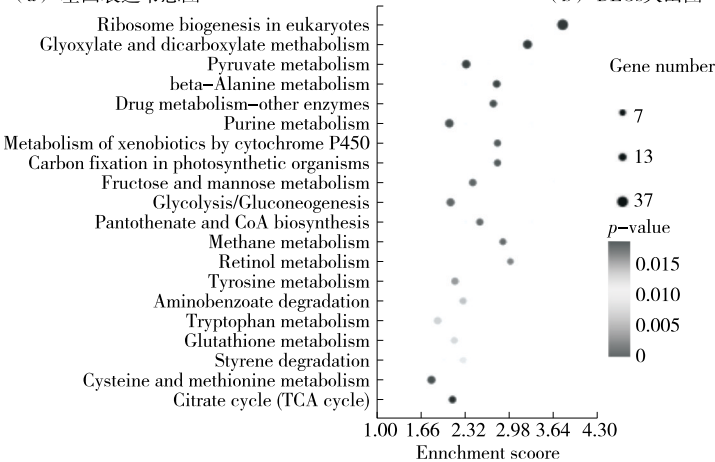
多酚的释放与碳水化合物活性酶(CAZy)有关。采用 CAZy 数据库(<http://www.cazy.org/>)注释碳水化合物活性酶(CAZy),相似度设置为 $>90\%$ 。碳水化合物活性酶涵盖六大功能类别,包括糖苷水解酶(GHs)、糖基转移酶(GTs)、多糖裂解酶(PLs)、碳水化合物酯酶(CEs)、碳水化合物结合模块(CBM)和辅助活性(AAs)^[28]。由表 4 可知,共注释到碳水化合物活性酶 121 个,包括 GHs 57 个,GTs 39 个,AAs 16 个,CEs 6 个,PLs 2 个,CBM 1 个。其中,上调基因 15 个,下调基因 9 个。表明红曲霉中含有丰富的碳水化合物活性酶,为罗布麻的多酚物质释放创造了有力条件。

2.6 碳水化合物活性酶(CAZy)活性分析

D8 和 PDA 两组样本间的差异碳水化合物活性酶基因中,1,3- β -GT、XTH23 及非碳水化合物活性酶中 HXK2 显著上调。1,3- β -GT 属于糖基转移酶,由于大部分植物细胞壁的主要成分为 β -葡聚糖,该酶可有效分解细胞壁,



(b) DEGs 火山图



(c) DEGs 的 KEGG 分析

图 3 D8 和 PDA 组表达基因韦恩图、DEGs 火山图

Figure 3 Expressed gene Venn diagram of D8 and PDA groups, DEGs volcano plot, and KEGG analysis of DEGs

表4 D8与PDA处理组的差异碳水化合物活性酶

Table 4 Differences in CAZy between D8 and PDA treatment groups

基因名称	基因简称	差异倍数	q 值	CAZy 类型	上调或下调
甘露聚糖内切-1,6- α -甘露糖苷酶	<i>Endo-1,6-α-man</i>	5.16	0.000 2	GH76	Up
1,3- β -葡聚糖基转移酶	<i>1,3-β-GT</i>	3.77	0.038 6	GH5	Up
海藻糖合酶	<i>CCG-9</i>	3.19	0.005 5	GT4	Up
甘露糖苷酶 α 类 1C	<i>MNS2</i>	3.07	0.023 8	GH47	Up
抗坏血酸氧化酶	<i>AAO</i>	2.85	0.004 5	AA1	Up
N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸脱乙酰酶	<i>NAGA</i>	2.78	0.034 7	CE9	Up
N,O-二乙酰胞壁酰胺酶	<i>DA0</i>	2.70	0.001 0	GH25	Up
脂肪酸光脱羧酶	<i>FAP</i>	2.56	0.010 4	AA3	Up
蛋白磷酸酶 1	<i>PP1</i>	1.77	0.043 7	CBM21	Up
磷酸甘露糖基转移酶亚基 1	<i>DPMS1</i>	1.73	0.014 0	GT2	Up
木葡聚糖 6-木糖基转移酶	<i>XXT1</i>	1.70	0.021 5	GT34	Up
β -1,2-木糖基转移酶	<i>XYLT</i>	1.60	0.013 3	GT61	Up
甘露糖转移酶	<i>PMTI</i>	1.53	0.018 4	GT39	Up
木葡聚糖内糖基转移酶	<i>XTH23</i>	1.65	0.027 3	PL23	Up
己糖激酶 2	<i>HXK2</i>	2.05	0.030 7	/	Up
异淀粉酶 1	<i>ISA1</i>	0.51	0.010 1	GH13	Down
内切-1,5- α -阿拉伯聚糖酶	<i>Endo-1,5-α</i>	0.45	0.000 5	GH43	Down
木葡聚糖糖基转移酶 2	<i>CSLC2</i>	0.37	0.004 4	GT2	Down
α -葡萄糖苷酶	α - <i>Glu</i>	0.35	0.011 2	GH31	Down
糖化酶	<i>AMY</i>	0.31	0.005 4	GH15	Down
漆酶	<i>LAC</i>	0.28	0.007 3	AA1	Down
4 α -葡萄糖基转移酶	<i>DPE2</i>	0.28	0.001 2	GH15	Down
内切-1,4- β -木聚糖酶 5	<i>Endo-1,4-β</i>	0.23	0.001 0	GH10	Down
特定的 α -淀粉酶	<i>AMY1.2</i>	0.15	0.000 6	GH13	Down

该基因的过表达更有利于多酚物质的释放^[29]。*XTH23*为水解木葡聚糖主链中 β -1,4-糖苷键的一类木葡聚糖特异性内切葡聚糖苷酶,能特异性降解木葡聚糖^[30]。由于木葡聚糖(XG)是双子叶植物初生细胞壁中最主要的半纤维素,该基因的上调预示着细胞壁被大量破坏^[31]。*HXK2*为糖酵解/葡萄糖生成途径的起始步骤,可将 α -D-葡萄糖、 β -D-葡萄糖等己糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,为后续的代谢反应提供底物^[32]。因此,推测*1,3- β -GT*、*XTH23*等碳水化合物活性酶基因的显著表达,促进了罗布麻内多酚物质的释放。

2.7 qRT-PCR 验证分析

随机挑选 5 个差异表达基因对转录组数据进行 qRT-PCR 验证。由图 4 可知,这些基因的相对表达量和转录数据的基因表达水平变化趋势基本一致,说明转录组数据具有良好的重复性和可靠性。

3 结论

研究了红曲霉发酵对罗布麻多酚物质的影响。结果表明,发酵时间对罗布麻多酚物质含量影响显著。根据

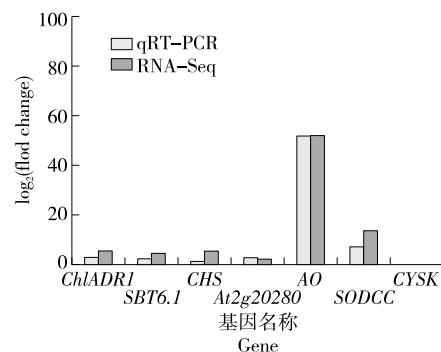


图4 未发酵样品与红曲霉发酵 8 d 的罗布麻样品差异基因的 qRT-PCR 验证分析

Figure 4 Validation analysis of differential gene expression by qRT-PCR between non-fermented samples and *Apocynum venetum* L. samples fermented with *Monascus* for 8 days

总多酚、可溶性多酚、不可溶性—结合态多酚、绿原酸、木犀草苷、紫云英苷、槲皮素含量变化可知,发酵 8 d 为最优的发酵时间,此时多酚物质的释放达到最优。通过对发

醇第 8 天转录组数据分析得出, *I, 3-β-GT, XTH23* 等碳水化合物活性酶基因的调控表达是红曲霉释放罗布麻内多酚物质的主要因素。该研究尚未验证红曲霉关键酶对罗布麻叶酚类物质释放的调控机制, 后续研究可通过基因工程技术结合代谢组学分析等手段, 进一步筛选候选基因功能或挖掘新型调控靶点。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第六十三卷[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 157.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China: volume 63[M]. Beijing: Science Press, 1977: 157.
- [2] 马浩, 吴倩, 隗亚军, 等. 种植密度对不同生育时期罗布白麻生长与叶片饲用品质的影响[J]. 中国麻业科学, 2024, 46(4): 229-236.
MA H, WU Q, WEI Y J, et al. Effect of planting density on growth and leaf feeding quality of *Apocynum hendersonii* at different growth stages[J]. Plant Fiber Sciences in China, 2024, 46(4): 229-236.
- [3] 董正钧, 刘寿山. 罗布麻的综合利用[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 125-35.
DONG Z J, LIU S S. Comprehensive utilization of *Apocynum venetum*[M]. Beijing: Science Press, 1978: 125-35.
- [4] 王丽莎, 胡雪敏, 青艳, 等. 罗布麻的主要化学成分与作用及其在纺织领域的应用[J]. 毛纺科技, 2024, 52(9): 137-143.
WANG L S, HU X M, QING Y, et al. The main chemical components and functions of *Apocynum venetum* and its application in textile field[J]. Wool Textile Journal, 2024, 52(9): 137-143.
- [5] PHAN A D T, NETZEL G, WANG D J, et al. Binding of dietary polyphenols to cellulose: structural and nutritional aspects[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 388-396.
- [6] FOGLIANO V, COROLLARO M L, VITAGLIONE P, et al. *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(Suppl 1): S44-S55.
- [7] LIU L, ZHANG R F, DENG Y Y, et al. Fermentation and complex enzyme hydrolysis enhance total phenolics and antioxidant activity of aqueous solution from rice bran pretreated by steaming with α -amylase[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 636-643.
- [8] 王继双, 何焱, 张文静, 等. 木犀草素的药理作用研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(6): 560-565.
WANG J S, HE Y, ZHANG W J, et al. Advances in studies on pharmacological effects of luteolin[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013, 25(6): 560-565.
- [9] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药学报, 2020, 55(10): 2 273-2 280.
WANG Q H, DU T T, ZHANG Z Z, et al. Advances in research on the pharmacological effects and mechanism of action of chlorogenic acid[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(10): 2 273-2 280.
- [10] 聂龙, 彭磊, 李钰芳, 等. 紫云英苷生物活性及其机制的研究进展[J]. 热带农业科学, 2020, 40(6): 64-70.
NIE L, PENG L, LI Y F, et al. Research advances in the biological activities and mechanism of astragalin[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2020, 40(6): 64-70.
- [11] 林登蕃, 郑志豪, 周映君, 等. 植物基食品中多酚的生物转化及生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(14): 319-327.
LIN D F, ZHENG Z H, ZHOU Y J, et al. Research progress in biotransformation and biological activity of polyphenols in plant-based foods[J]. Food Science, 2024, 45(14): 319-327.
- [12] AYOUB M, DE CAMARGO A C, SHAHIDI F. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 221-232.
- [13] 尹小庆, 文华英, 张玉红, 等. 食用植物酵素中多酚类物质的研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(7): 223-227.
YIN X Q, WEN H Y, ZHANG Y H, et al. Research progress of polyphenols in edible plant enzymes[J]. Food & Machinery, 2023, 39(7): 223-227.
- [14] 罗建伟, 武琪琪, 郭雨悦, 等. 中药活性成分的药用真菌生物转化研究进展[J]. 化学与生物工程, 2023, 40(6): 1-7.
LUO J W, WU Q Q, GUO Y Y, et al. Research progress in biotransformation of active ingredients in traditional chinese medicine by medicinal fungi[J]. Chemistry & Bioengineering, 2023, 40(6): 1-7.
- [15] 卓林霞. 红曲的研究概况及其产品的前景展望[J]. 轻工科技, 2012, 28(2): 8-9.
ZHUO L X. An overview of *Monascus* research and prospects for its products[J]. Light Industry Science and Technology, 2012, 28(2): 8-9, 29.
- [16] 曾海英. 红曲发酵薏米生理活性物质质量效变化及机理研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021: 68-70.
ZENG H Y. Study on the changes of physiological active substances and mechanism of Astragalus polyphenols during red Qu Meju fermentation [D]. Guiyang: Guizhou University, 2021: 68-70.
- [17] 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: 26-29.
YAO Q. Study on *Monascus* solid-state fermentation and antioxidant activity of matrix in wheat bran[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015: 26-29.
- [18] 王露. 番石榴叶活性多酚组分快速鉴别及发酵释放与转化机制[D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 88-90.
WANG L. Quick identification and the mechanism in the

- release and transformation by fermentation of active phenolics components in *Guava leaves*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018: 88-90.
- [19] 贾庆超. 超声辅助离子液体和酶解法提取鸡枞菌多酚及其抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2024, 40(12): 161-169.
- JIA Q C. Study on ultrasound assisted ionic liquid and cellulolytic enzyme extraction of *Collybia albuminosa* polyphenols and its antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2024, 40(12): 161-169.
- [20] 刘仙俊, 范向前, 史起鹏, 等. 燕麦总多酚的微波辅助提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(17): 55-59.
- LIU X J, FAN X Q, SHI Q P, et al. Study on microwave-assisted extraction of total polyphenols from oat[J]. Food Research and Development, 2016, 37(17): 55-59.
- [21] DE ARAÚJO M E M B, MOREIRA FRANCO Y E, ALBERTO T G, et al. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 266-273.
- [22] 王纪辉, 何佳丽, 耿阳阳, 等. 基于超声效应与 HPLC 分析核桃不同部位多酚含量及组成[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2022, 43(5): 55-64.
- WANG J H, HE J L, GENG Y Y, et al. Analyzing the change of polyphenol content and composition of different parts of walnut based on ultrasound effect combined with HPLC[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2022, 43(5): 55-64.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [24] WANG L, WEI W H, TIAN X F, et al. Improving bioactivities of polyphenol extracts from *Psidium guajava* L. leaves through co-fermentation of *Monascus anka* GIM 3.592 and *Saccharomyces cerevisiae* GIM 2.139[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 94: 206-215.
- [25] DUEÑAS M, FERNÁNDEZ D, HERNÁNDEZ T, et al. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(2): 297-304.
- [26] MCGIVERN B B, CRONIN D R, ELLENBOGEN J B, et al. Microbial polyphenol metabolism is part of the thawing permafrost carbon cycle[J]. Nature Microbiology, 2024, 9(6): 1454-1466.
- [27] 刁婵, 鲁显楷, 田静, 等. 长期氮添加对亚热带森林土壤微生物碳源代谢多样性的影响[J]. 生态学报, 2019, 39(18): 6622-6630.
- DIAO C, LU X K, TIAN J, et al. Effects of long-term nitrogen addition on the metabolic diversity of microbial carbon sources in subtropical forest soils[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(18): 6622-6630.
- [28] ZHENG T, ZHANG K K, ZHU X D, et al. Integrated metatranscriptome and transcriptome reveals the microbial community composition and physiological function of xylem sap on grapevine during bleeding period[J]. Genes & Genomics, 2019, 41(9): 1095-1111.
- [29] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807.
- PAN L H, LUO J P. Advance in research and application of β -D-glucosidase[J]. Food Science, 2006, 27(12): 803-807.
- [30] 王宝顺. 木葡聚糖酶产生菌株的筛选、发酵优化及酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 34-35.
- WANG B S. Screening of xyloglucanase production strains and studies of its fermentation process and enzymatic properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012: 34-35.
- [31] 张保才, 周奕华. 植物细胞壁形成机制的新进展[J]. 中国科学(生命科学), 2015, 45(6): 544-556.
- ZHANG B C, ZHOU Y H. Plant cell wall formation and regulation[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2015, 45(6): 544-556.
- [32] 刘丽娜, 刘春卯, 曹倩荣, 等. 己糖激酶冻干粉的制备工艺及其酶学性质[J]. 科学技术与工程, 2019, 19(15): 77-82.
- LIU L N, LIU C M, CAO Q R, et al. Preparation of hexokinase freeze-dried powder and its enzymatic properties[J]. Science Technology and Engineering, 2019, 19(15): 77-82.