

分类号：

学校代码：10363

密 级：公开

学 号：2210520115

红曲苦荞代用茶固态发酵关键控制技术
CONTROL TECHNOLOGY ON SOLID-STATE
FERMENTATION OF MONASCUS TARTARY
BUCKWHEAT TEA

学生姓名： 高晨

指导教师： 陈阿娜 教授

专 业： 生物工程（学硕）

研究方向： 微生物代谢与发酵工程

论文答辩日期： 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：高晨

日期：2024年6月4日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：高晨
日期：2024年6月4日

指导教师签名：陈阳娜
日期：2024年6月4日

红曲苦荞代用茶固态发酵关键控制技术

摘 要

黄酮多酚类化合物可以清除体内的自由基，减轻氧化应激反应，保护细胞免受氧化损伤。在食品、药品和保健品领域具有良好的开发前景。苦荞中含有多种黄酮多酚类化合物，并以自由和结合的两种形式存在。结合形式的黄酮多酚类化合物与脂肪酸、糖、蛋白质或其他大分子形成不溶状态的复合体，不易被人体吸收。促进苦荞中结合形式的黄酮多酚类化合物转变为可溶性或游离黄酮多酚类化合物具有一定的学术及应用价值。红曲霉发酵苦荞可使不溶性结合黄酮多酚类化合物转变为可溶性结合黄酮多酚类化合物或游离黄酮多酚类化合物，并产生具有降血脂作用的莫纳可林 K，从而有效提高发酵产物的生物活性，具有良好的开发前景。

研究拟通过筛选高产莫纳可林 K 红曲霉菌株，对苦荞固态发酵工艺进行优化，提高莫纳可林 K 产量和苦荞中黄酮多酚类活性物质的释放。通过单因素实验及响应面实验，以莫纳可林 K 产量为主要因素，发酵产物色价、抗氧化活性作为参考指标，对选定的红曲霉菌株 HQ-1 固态发酵苦荞条件进行优化。并且考察了该菌株在 23℃、25℃、28℃ 条件下，莫纳可林 K 产量、色价、发酵产物的抗氧化活性、黄酮提取量、多酚提取量、芦丁、槲皮素、山奈酚、阿魏酸、绿原酸提取量、淀粉含量以及苦荞结构随发酵时间的变化。最后，对红曲发酵苦荞的发酵产物进行烘焙加工制成红曲苦荞茶的加工条件进行优化，并考察其活性物质的变化。研究结果表明：

(1) 通过从市售苦荞中筛选出三株红曲霉菌株 HQ-1、HQ-0、HQ-QZ，并通过固态发酵对比三株菌株莫纳可林 K 产量，发现 HQ-1 莫纳可林 K 产量最高，到达了 140.36 mg/100g。后续选择 HQ-1 菌株进行单因素以及响应面优化，得到最优发酵条件为：25 g 苦荞添加 21 mL 营养液，营养液含 NH_4NO_3 2.77 g/L, ZnSO_4 1.82 g/L, MgSO_4 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, pH 调节到 2.58。并在此优化工艺下，莫纳可林 K 产量达 187.10 mg/100g。

(2) HQ-1 在 25℃ 条件下固态发酵，苦荞中芦丁、槲皮素、山奈酚、绿原酸、阿魏酸等黄酮多酚类物质的萃取量显著提高，分别提高了 68%、159%、688%、

244%、65%；DPPH 抗氧化活性和 ABTS 抗氧化活性分别提高了 202%和 80%，淀粉含量降低了 51%，抗性淀粉含量从 4.29 g/100g 提高到 7.10 g/100g。

(3) 通过对不同烘焙条件的摸索，我们发现通过高温短时间烘焙可以在保证红曲苦荞茶的口感品质下，最大程度保留了活性物质，在 190℃下烘焙 10 min，可以获得较高的品质评分，并且其莫纳卡林 K 含量、色价、DPPH 和 ABTS 抗氧化活性以及黄酮提取量、多酚提取量、芦丁提取量仍分别可达到 113.62 mg/100g、926.33 μ g/g、3029.77 μ g vc/gdw、2203.88 μ g vc/gdw、201.58 mg/g、32.63 mg/g、38.51 mg/g。

综上所述，HQ-1 发酵苦荞生产红曲苦荞茶具有较高的莫纳卡林 K 产量并提高了苦荞本身的活性物质含量，具有良好的市场应用前景。

关键词：红曲霉，莫纳可林 K，苦荞，黄酮，苦荞茶

KEY CONTROL TECHNOLOGY ON SOLID-STATE FERMENTATION OF *MONASCUS TARTARY* BUCKWHEAT TEA

ABSTRACT

Flavonoid polyphenolic compounds can eliminate free radicals in the body, reduce oxidative stress reactions, and protect cells from oxidative damage. They have great development prospects in the fields of food, pharmaceuticals, and health products. Buckwheat contains various flavonoid polyphenolic compounds, existing in two forms: free and bound. The bound form of flavonoid polyphenolic compounds forms insoluble complexes with fatty acids, sugars, proteins, or other large molecules, making them less easily absorbed by the human body. Promoting the transformation of bound flavonoid polyphenolic compounds in buckwheat into soluble or free forms has certain academic and practical value. Fermentation of buckwheat with *Monascus purpureus* can transform insoluble bound flavonoid polyphenolic compounds into soluble bound or free flavonoid polyphenolic compounds, producing monacolin K with lipid-lowering effects, thereby effectively enhancing the bioactivity of the fermented product and showing promising development prospects.

Research aims to screen high-yield monacolin K-producing strains

of *Monascus* spp. and optimize the solid-state fermentation process of buckwheat to increase the production of monacolin K and the release of flavonoid polyphenolic compounds in buckwheat. Through single-factor experiments and response surface experiments, with monacolin K production as the main factor and color value and antioxidant activity of the fermentation product as reference indicators, the solid-state fermentation conditions of the selected *Monascus* spp. strain HQ-1 for buckwheat are optimized. The study also examines the changes in monacolin K production, color value, antioxidant activity of fermentation products, flavonoid extraction yield, polyphenol extraction yield, rutin, quercetin, kaempferol, ferulic acid, chlorogenic acid extraction yield, starch content, and buckwheat structure over fermentation time at 23°C, 25°C, and 28°C. Finally, the processing conditions for making *Monascus* spp. buckwheat tea from the fermented buckwheat are optimized, and changes in the active ingredients are examined.

Research findings include:

(1) Three *Monascus* spp. strains, HQ-1, HQ-0, and HQ-QZ, were screened from commercially available buckwheat, with HQ-1 showing the highest monacolin K production at 140.36 mg/100g through solid-state fermentation. Further optimization with HQ-1 under single-factor and response surface conditions yielded the optimal fermentation conditions, resulting in a monacolin K production of 187.10

mg/100g.

(2) Under solid-state fermentation at 25°C by HQ-1, extracted amounts of rutin, quercetin, kaempferol, ferulic acid, and chlorogenic acid in buckwheat significantly increased by 68%, 159%, 688%, 244%, and 65% respectively; DPPH and ABTS antioxidant activities increased by 202% and 80% respectively; starch content decreased by 51%; resistant starch content increased from 4.29 g/100g to 7.10 g/100g.

(3) Through exploration of different baking conditions, it was found that high-temperature, short-time baking can preserve active ingredients to the maximum extent while ensuring the taste quality of *Monascus* spp. buckwheat tea. Baking at 190°C for 10 minutes resulted in high-quality ratings, with monacolin K content, color value, DPPH and ABTS antioxidant activities, flavonoid extraction yield, polyphenol extraction yield, and rutin extraction yield reaching 113.62 mg/100g, 926.33 µg/g, 3029.77 µg vc/gdw, 2203.88 µg vc/gdw, 201.58 mg/g, 32.63 mg/g, 38.51 mg/g.

In summary, the production of *Monascus* spp. buckwheat tea using HQ-1 fermented buckwheat has a high monacolin K yield and increased content of active substances in buckwheat itself, showing promising market application prospects.

KEY WORDS: *Monascus* spp., Monacolin K, tartary buckwheat, flavonoids, tartary buckwheat tea

目录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪论	1
1.1 苦荞研究概述	1
1.1.1 苦荞	1
1.1.2 营养价值	1
1.1.2.1 淀粉	1
1.1.3 苦荞生物活性	2
1.1.3.1 抗氧化活性	2
1.1.3.4 抗菌活性	3
1.1.3.5 对消化酶的活性抑制	4
1.1.3.6 抗基因毒性	4
1.2 红曲霉研究概述	5
1.2.1 红曲霉	5
1.2.2 莫纳可林 K	5
1.2.2 莫纳可林 K 发酵优化	6
1.2.2.1 温度	6
1.2.2.2 pH 值	6
1.2.2.3 含水量	7
1.2.2.4 发酵时间	7
1.2.2.5 发酵基质	7
1.2.2.6 添加营养添加剂	8
1.3 研究目的及意义	9
1.4 研究内容	10
第 2 章 红曲霉菌种筛选及发酵条件优化	11
2.1 引言	11
2.2 实验材料	11
2.2.1 实验菌种及苦荞	11

2.2.2 主要仪器及试剂	12
2.2.3 主要培养基	13
2.3 实验方法	13
2.3.1 红曲霉菌种筛选与鉴定	13
2.3.2 红曲苦荞发酵方法	14
2.3.3 发酵条件优化	14
2.4 结果与分析	18
2.4.1 红曲霉分离纯化	18
2.4.2 红曲霉菌株分子生物学鉴定	19
2.4.3 红曲霉菌种选定	20
2.4.4 单因素优化	21
2.4.5 响应面法优化发酵条件	27
2.5 本章小结	30
第 3 章 苦荞其营养物质随发酵时间变化	32
3.1 前言	32
3.2 实验材料	32
3.2.1 主要仪器及试剂	32
3.2.2 主要培养基	33
3.3 实验方法	33
3.3.1 红曲霉发酵方法	33
3.3.1 莫纳可林 K 含量检测	34
3.3.2 色价测量	34
3.3.3 抗氧化活性测量	34
3.3.4 总黄酮含量测量	34
3.3.5 总多酚含量测量	34
3.3.6 芦丁、槲皮素、山奈酚、阿魏酸、绿原酸含量测定	35
3.3.6.1 芦丁、阿魏酸、绿原酸测定	35
3.3.6.2 槲皮素、山奈酚测定	35
3.3.7 扫描电镜观察苦荞结构随发酵时间变化	35

3.3.8 淀粉及抗性淀粉检测	35
3.4 结果与分析	35
3.4.1 不同温度下莫纳可林 K 产量随时间变化	35
3.4.2 不同温度下色价随时间变化	36
3.4.3 不同温度下发酵苦荞抗氧化活性随时间变化	36
3.4.4 不同温度下发酵苦荞总黄酮提取量随时间变化	37
3.4.5 不同温度下总多酚提取量随时间变化	38
3.4.6 不同温度下芦丁提取量随时间变化	38
3.4.7 不同温度下槲皮素提取量随时间变化	39
3.4.8 不同温度下山奈酚提取量随时间变化	39
3.4.9 不同温度下绿原酸提取量随时间变化	40
3.4.10 不同温度下阿魏酸提取量随时间变化	40
3.4.11 苦荞结构随发酵时间增长的变化	41
3.4.12 苦荞淀粉、抗性淀粉含量随发酵时间增长的变化	41
3.5 本章小结	42
第 4 章 苦荞红曲代用茶加工工艺及营养价值评价	43
4.1 前言	43
4.2 实验材料	43
4.2.1 主要仪器及试剂	43
4.3 实验方法	44
4.3.1 苦荞烘焙	44
4.3.2 品质评价	44
4.3.3 莫纳可林 K 检测	46
4.3.4 色价检测	46
4.3.5 抗氧化活性检测	46
4.3.6 总黄酮提取量检测	46
4.3.7 总多酚提取量检测	46
4.3.8 芦丁取量检测	46
4.3.9 淀粉、抗性淀粉检测	46

4.3.10 脂肪含量检测	46
4.3.11 蛋白质含量检测	46
4.4 结果与分析	46
4.4.1 感官评价	46
4.4.2 莫纳可林 K 含量	48
4.4.3 色价检测	49
4.4.4 烘焙后抗氧化活性	49
4.4.5 烘焙后总黄酮提取量	50
4.4.6 烘焙后总多酚提取量	51
4.4.7 烘焙后芦丁含量	52
4.4.8 对选择最优烘焙条件后的红曲苦荞茶品质进行评价	52
4.5 本章小结	53
第 5 章 总结与展望	55
5.1 总结	55
5.2 创新点	56
5.3 展望	56
攻读学位期间发表的学术论文	57
致谢	58
参考文献	59

第 1 章 绪论

1.1 苦荞研究概述

1.1.1 苦荞

荞麦在我国具有悠久的种植历史，早在 1000 多年前，我国就开始大规模种植荞麦^[1]。在我国有两种有农业价值的荞麦种植物：甜荞麦和苦荞，二者的化学成分以及食品加工用途与谷物类似，但是其具有多酚黄酮类物质，具有较高的营养价值^[2]。其中苦荞，属蓼科双子叶植物，具有很强生长适应性，可以在恶劣气候生长^[3]，广泛分布在俄罗斯、中国、乌克兰、法国和波兰。我国苦荞产量世界第一，主要在我国西南地区种植，分布在云贵川高原、青藏高原、湖北省和秦巴山等地区^[4]。

1.1.2 营养价值

近年来，由于检验检测技术的进步，人们对荞麦的深度利用重新产生了兴趣^[5]。尤其是苦荞，由于其独特的化学成分，作为多种疾病的预防和治疗食品具有更好的疗效，正成为研究的热点^[6]。苦荞具有较高的产量且对严酷条件(如霜冻)的耐受性，中国苦荞栽培调查表明，苦荞可生长在其他主要作物可能歉收的高海拔地区。苦荞往往比普通荞麦含有更高浓度的具体生物活性的物质(如类黄酮类)，这也正是苦荞籽粒的味道比普通荞麦要苦得多的缘由^[7]。苦荞的独特成分有助于多种健康益处。例如，流行病学研究表明，在四川省凉山地区的中国山区，以苦荞为主的饮食中，糖尿病和高血压等慢性病的发病率相当低^[8]。因此，探究苦荞的化学成分的含量对于苦荞保健食品的开发应用有着至关重要的价值。苦荞中主要含有淀粉、膳食纤维、维生素、多酚类等营养物质。

1.1.2.1 淀粉

苦荞中的主要成分是淀粉，可占总干重的 70%以上，其中直链淀粉含量为 20-28%，淀粉粒呈多角形，大小在 2-15 μm 之间，并且其淀粉颗粒多为 A 型多晶型，支链淀粉具有超长的单位链($\text{DP}>100$)^[9]。Bonafaccia 等人^[10]分析了苦荞的膳食纤维组成，苦荞粒的总膳食纤维含量为 26%，其中可溶性纤维含量为 0.54%，不溶性纤维含量为 24%。抗性淀粉被认为是另一种具有多种健康益处的膳食纤维，

例如降低结肠癌和肥胖的风险，21 个苦荞品种中抗性淀粉含量占总淀粉含量为 13.1%~22.5%^[11]。

1.1.2.2 多酚类

众所周知，饮食中多酚的高摄入量与慢性疾病的低风险有关，如某些类型的癌症、神经退行性病变以及心血管疾病^[12]。多酚类物质是苦荞中研究最多的植物化学物质。

1.1.2.2.1 酚酸

研究人员通过高效液相色谱、质谱分析和核磁共振等方法，进行定性定量分析，发现苦荞中的酚酸包括对羟基苯甲酸、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、没食子酸、阿魏酸、p-香豆酸、丁香酸和香草酸等^[13-17]。游离态的酚酸在麸皮中最集中，苦荞籽粒中结合态存在酚酸较较多^[13]。有研究表明，苦荞麸皮中含量最丰富的酚酸是对羟基苯甲酸(高达 360 mg/100g)，其次是咖啡酸(38 mg/100g)、绿原酸(21 mg/100g)以及原儿茶酸(18 mg/100g)，并且还发现苦荞壳中原儿茶酸含量最高，达到了 54 mg/100g^[14]。

1.1.2.4.1 黄酮类物质

最近的研究中，由于苦荞中的富含的大量的的黄酮类化合物具有许多对人体有益的生物活性^[11]，因此引起了许多学者的关注。国内有学者对国内 21 种苦荞和 18 种甜荞麦中的总黄酮含量进行检测，发现了 21 种苦荞中的总黄酮含量为 6.65-22.74 mg/g，其均值为甜荞麦中的 10 倍，并且含量最高的为来自梅花山的苦荞，达到了 22.74 mg/g。苦荞中的主要多酚类物质为黄酮类物质，大量的实验表，其中最主要的黄酮类物质为芦丁，可以占到总黄酮的 70%-80%^[18]。通过液相-质谱联用，从苦荞中鉴定出异槲皮苷、山奈酚、槲皮素-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-半乳糖苷、山奈酚-3-半乳糖苷、山奈酚-3-葡萄糖苷、槲皮素-3-鼠李糖苷、槲皮素-3-半乳糖鼠李糖苷等。任强等人使用 HPLC-PDA/LTQ-FTICR-MS 首次从苦荞中检测出了槲皮素-3-O-[β -D-木糖苷-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-鼠李糖苷]^[19-20]。

1.1.3 苦荞生物活性

1.1.3.1 抗氧化活性

苦荞的体外抗氧化活性可以通过 DPPH、ABTS、ORAC、FRAP 等方法进行测定^[21-23]。许多研究表明苦荞及其制品的提取物，均有较高的抗氧化活性。因此

其提取物具有潜在成为天然的食品防腐剂的可能性。苦荞中的提取物中的抗氧化活性主要归咎于其高含量的黄酮类化合物，王等人的研究表明，苦荞醋的总黄酮含量与其抗氧化性呈正相关^[25]。另一项研究表明，某一品种苦荞麸皮的乙酸乙酯提取物同样具有很高抗氧化活性，归功于其较高的芦丁及槲皮素含量^[24]。通过研究表明，黄酮类化合物可以极大的促进植源性食品的抗氧化活性^[26]。

1.1.3.2 降血糖

糖尿病是现代社会的一个主要健康问题，影响着全球超过 3 亿人口。苦荞提取物以及异槲皮素均表现出可以降低 2 型糖尿病大鼠、小鼠的作用^[27-28]。通过使用苦荞喂养 2 型糖尿病小鼠实验中，姚等人发现小鼠中 C-肽、胰高血糖素、甘油三酯和血尿素氮等指标均有所降低^[29]。苦荞提取物中的多酚类化合物可能与淀粉酶或淀粉结合从而降低淀粉酶对于淀粉的催化作用，从而降低小鼠模型的血糖水平。尽管苦荞中的抗性淀粉含量较高，但是其淀粉颗粒较小，易于淀粉酶结合，因此其降低血糖的作用主要还是归功于其较高含量的多酚类物质^[30]。

1.1.3.3 降胆固醇

有研究表明，体内的高水平胆固醇与心血管疾病和动脉硬化等慢性病的高发病率有关^[31]。多种苦荞制品在动物模型及人体临床试验中均显示出了降胆固醇的作用。有学者实验发现，通过喂养大鼠苦荞可以降低其血清和血浆胆固醇水平，同时还可以增加其粪便的类固醇和胆汁酸的含量^[32]。另一项研究中，苦荞可以在仓鼠模型中同样起到降低血液中胆固醇的作用。还有学者发现，苦荞提取物可以降低大鼠血清中的总胆固醇和甘油三酯的水平^[33]。将苦荞制成饼干交由人们服用，研究者发现，饼干的摄入量和服用人的总胆固醇以及高密度脂蛋白胆固醇水平呈正相关。一些学者将苦荞与大米、小麦进行对比发现，苦荞可以更好的降低血清中的胆固醇水平，并推断认为是苦荞其独有的多酚、膳食纤维、蛋白质、植物甾醇等活性物质所导致的^[34]。当然，每种物质其对于降低胆固醇的机理可能不尽相同，需要更深一步探究其原理。

1.1.3.4 抗菌活性

许多研究表明，一些天然的植物材料如饮食香料等在体外实验中，对食源性病原体 and 腐败微生物展现出了良好的抗菌活性^[35]。同样的也有人研究发现，苦荞麸皮提取物以及纯酚类化合物（槲皮素、芦丁、异槲皮素）对于痤疮丙酸杆菌、

表皮葡萄球菌以及金黄色葡萄球菌显示出良好的抗菌活性^[36]。另一项研究中,研究者发现,在众多抗菌活性物质中,槲皮素具有最高的抗菌活性,表明黄酮苷元具有比糖苷更高的抗菌活性,槲皮素的抗菌活性可能有其可以抑制细菌细胞 DNA 及 RNA 的合成,因此苦荞麸皮其提取物在开发预防及缓解痤疮的新型护肤品中拥有巨大潜力^[37]。

1.1.3.5 对消化酶的活性抑制

大量的体外及动力学研究表明,苦荞中提取物以及纯酚类化合物(槲皮素、芦丁、异槲皮素)对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶以及胰腺脂肪酶等消化酶的活性具有抑制效果^[38-40]。其中,槲皮素对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性高于芦丁,而芦丁对胰腺脂肪酶的抑制活性高于,槲皮素和异槲皮素。还有人发现,槲皮素对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性要强于抗糖尿病药物阿卡波糖。每种黄酮类化合物的羟基数目、糖基化作用以及糖基化引起的空间位阻都会影响酶与类黄酮类化合物的相互作用。因此,黄酮类化合物与 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的相互作用明显不同于与胰腺脂肪酶的相互作用,其分子机制还有待更好的研究。苦荞对于消化酶的抑制活性,使得其可以作为减肥药等管理能量代谢类药物进行开发。秦等人研究发现,在苦荞加工过程中如烘烤、干燥等操作后,会降低黄酮类物质的含量,从而减少苦荞提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。

1.1.3.6 抗基因毒性

体外实验表明,苦荞提取物对于非部位特异性和部位特异性羟基自由基引起的 DNA 损伤有很强的保护作用。浓度为 0.2 mg/mL 的提取物对 DNA 损伤的抑制作用在 50%以上,其作用机理与其黄酮类化合物的抗氧化活性有关。曹等人通过对比苦荞与普通荞麦的对比实验发现,含有更高多酚类化合物含量的苦荞具有比普通荞麦更强的保护作用^[41]。Maja Vogrincic 等人^[42]的研究进一步证实了苦荞对于脱氧核糖核苷酸的保护作用。王等人对比了苦荞提取物与芦丁、槲皮素、小麦提取物对于 DNA 的保护作用,发现苦荞提取物表现出比单一的芦丁、槲皮素更好的保护效果,而小麦提取物则完全没有效果,因此说明苦荞提取物的不同组分之间在 DNA 保护方面具有协同作用。

1.2 红曲霉研究概述

1.2.1 红曲霉

红曲霉 (*Monascus spp.*) 是一种丝状真菌, 在我国拥有悠久的发酵历史, 主要用来发酵大米、酒、豆腐等, 广泛用于食品、保健品、医药和酿造行业^[43]。红曲霉可产生多种有益的次级代谢产物, 如莫纳可林 K (Monacolin K)、红曲色素、 γ -氨基丁酸、麦角甾醇等。其中, 莫纳可林 K、红曲霉色素为多酮类化合物^[44]。

1.2.2 莫纳可林 K

1979 年, 日本学者 Endo 从红曲霉发酵液中发现了一种降胆固醇的他汀类药物, 并将其命名为莫纳可林 K^[45]。研究发现, 莫纳可林 K 的空间结构与控制胆固醇合成的关键限速酶 HMG-CoA 还原酶 (羟甲基戊二酰辅酶 A) 非常相似, 可以与 HMG-CoA 还原酶产生竞争性抑制作用, 从而有效减少胆固醇的合成、降低血脂^[46]。莫纳可林 K 以酸式和内酯式两种形式存在 (如图 1-1), 在一定条件下可以相互转化^[47]。酸式莫纳可林 K 在人体内起到降低胆固醇的作用, 而内酯式需要在体内被羟基酯酶水解成酸性形式才能发挥作用^[48-49]。红曲霉发酵液中莫纳可林 K 主要以酸性形式存在, 对降低胆固醇有重要作用。

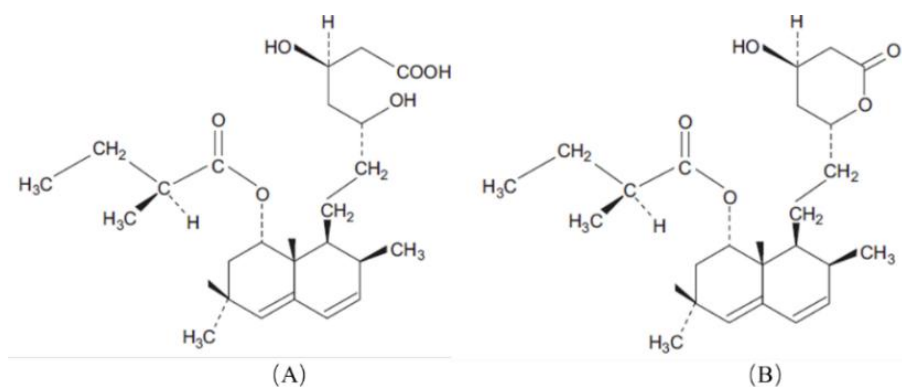


图 1-1 莫那可林 K 酸式 (A) 和内酯式 (B) 两种结构

Fig.1-1 Two structures of Monacolin K: acid (a) and lactone (b)

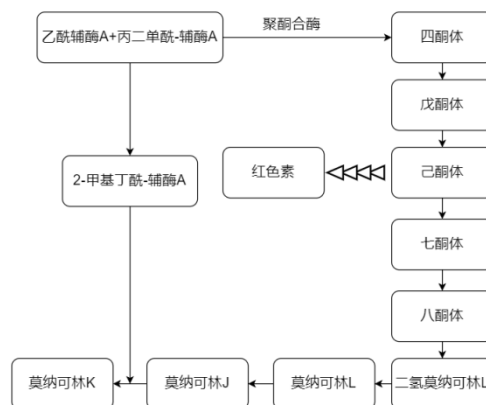


图 1-2 红曲霉中红色素和莫那可林 K 的合成代谢途径

Fig.1-2 Anabolic pathway of red pigment and Monacolin K in *Monascus* spp.

1.2.2 莫纳可林 K 发酵优化

1.2.2.1 温度

温度对于红曲霉的细胞生长和次级代谢产物产生的起着很重要的作用。红曲霉通常可以在 18-45°C 生长，其最适培养温度为 30-38°C^[50]。有学者通过对筛出的 *Monascus purpureus* MTCC369 和 *Monascus ruber* MTCC 1880 菌株进行不同的温度进行恒温培养，发现在 29.46°C 条件下，莫纳可林 K 产量最高^[51]。但是，Suraiya 等人使用 *Monascus purpureus* KCCM 60168 菌株进行发酵时，发现其莫纳可林 K 最高产量温度为 25.64°C^[52]。由于随着研究不断深入，发现变温培养会使红曲霉莫纳可林 K 产量变高。Tsukahara 等人^[53]将筛选出的 *Monascus pilosus* NBRC452 菌株放置在 30°C 下培养 4 天，让其快速增殖，然后再将其分别放在 30°C 和 25°C 下培养，发现 25°C 培养的莫纳可林 K 产量是 30°C 的 20 倍。Lin L 等人^[54]的研究发现，红曲霉在 25°C 下培养，莫纳可林 K 的合成基因簇的表达量要显著高于在 30°C 下培养的条件下，同时通过差异蛋白表达分析，发现变温培养会促进次级代谢产物途径中蛋白的表达，但是会抑制参与菌丝体生长的蛋白质表达。

1.2.2.2 pH 值

关于 pH 值对红曲霉的莫纳可林 K 产量的影响可能取决于不同菌株、不同底物或其他发酵条件的共同作用。Lee 等人^[55]使用山药作为红曲霉发酵的基质，并制备了不同 pH 值 (pH=3,6,9) 固态培养基。他们通过实验发现，其筛选的 *Monascus purpureus* NTU 301 菌株在 pH 值为 3 的情况下莫纳可林 K 产量最高，并且莫纳可林 K 产量随 pH 值降低而升高。而 Subsaendee T 等人^[56]使用大米作为 *Monascus*

spp. KB9 的发酵基质时，发现其最高莫纳可林 K 产量的 pH 值为 5-7 之间。并且 Panda BP^[57]等人用 *Monascus purpureus* MTCC 369 菌株发酵大米时，发酵基质的最适 pH 值为 6。

1.2.2.3 含水量

固态发酵基质的含水量同样会影响莫纳可林 K 的产量。Subsaendee T 等人^[58]使用大米作为 *Monascus* spp. KB9 的发酵基质时，其最适含水量为 50%。较低的含水量会影响红曲霉的生长间接影响莫纳可林 K 的产量^[59]而较高的含水量虽然更适合丝状真菌的生长，但是对于小颗粒的发酵基质来说，较高的含水量会使基质相互粘连进而影响红曲霉的定殖和氧的传递^[60]。

1.2.2.4 发酵时间

底物浓度和发酵条件会影响次生代谢物的高峰期。红曲霉发酵 12-18 天时莫纳可林 K 产量稳定，最适发酵时间通常为 14-15 天，并且随着发酵时间的延长，莫纳可林 K 含量将达到峰值，然后呈下降趋势，因此，建议红曲霉产莫纳可林 K 的发酵时间控制在 15d 左右^[61]。

1.2.2.5 发酵基质

发酵基质的种类是影响真菌生长和代谢产物产生的重要因素，而大米是红曲发酵的常用基质^[62-63]，随着研究的深入，研究人员为了生产更多的莫纳可林 K，尝试多种不同的发酵基质。Zhang 等人用大米、小米、小麦和大麦作为红曲发酵的固态基质进行固态发酵，结果显示使用小米作为固态发酵基质的样品莫纳可林 K 的产量最高达到了 7.25 mg/g，而小麦和大麦仅为 2.45 mg/g、2.69 mg/g^[61]。并且推断小米可能由于其粘度低、颗粒度小导致发酵时红曲霉供氧充足有利于其生长，而小麦大麦的吸水率低，不利于红曲霉生长，导致其莫纳可林 K 的产量低。不同水稻品种对红曲霉发酵莫纳可林 K 的产量也有显著影响。Pengnoi 等人以不同品种的紫米为基质进行红曲发酵，其结果表明以品种为 Doi Muser 的紫米为发酵基质的莫纳可林 K 的产量显著高于其他紫稻品种，达到了 13.48 mg/kg^[64]。发酵基质的粘度对莫纳可林 K 产量有很大影响。由于糯米的粘度较高，容易结块，不利于红曲霉的生长^[65]。然而，一些研究人员通过对水分的控制使用糯米为发酵基质进行红曲霉发酵研究，并获得了相当大的莫纳可林 K 产量。Yu 等人用大米和糯米为发酵基质，对两种基质的发酵条件(初始含水率、基质尺寸和发酵时间)

进行了正交设计优化,结果表明,初始含水率对两种底物发酵的莫纳可林 K 产量有较大影响,大米和糯米的莫纳可林 K 产量分别到达了 2.50 mg/g 和 2.71 mg/g^[66]。同时,水分含量也与发酵时间密切相关。在发酵过程中,水分会随着水分的蒸发和微生物的利用而逐渐降低。Kanpiengjai 等利用 X 射线诱变菌株 *Monascus Purpureus* CMU002UXX-32-44 发酵糯米,并对其发酵条件进行了优化,其结果表明,在初始含水率为 72.5%、发酵时间为 38d 的条件下,莫纳可林 K 产量可达 6428 mg/kg,因此,通过有效地控制糯米的含水量,糯米也可以被认为是红曲霉发酵生产莫纳可林 K 的优良基质^[67]。

其他研究使用非谷物材料作为红曲霉发酵的基质。例如,山药也可以用作发酵的基质,山药此前一直与降血脂作用有关,红曲发酵后的红曲山药比单独使用红曲米具有更显著的降血脂作用。Lee 等人^[68]用木薯、红薯、土豆、山药以大米为发酵基质,发现 *Monascus Purpureus* NTU301 发酵山药基质使莫纳可林 K 产量达到 2584 mg/kg,是以大米为发酵基质的样品中莫纳可林 K 产量(481 mg/kg)的 5.37 倍。

1.2.2.6 添加营养物质

在发酵基质中添加碳源(如葡萄糖、甘油和乳糖)、氮源(如豆粕、蛋白酵素和谷氨酸)、无机盐和其他添加剂是提高红曲霉莫纳可林 K 的有效方法。

葡萄糖可以促进红曲霉菌的生长,从而促进莫纳可林 K 的产生。Suraiya 等人^[69]通过响应面法进行了优化,发现红曲霉固体培养基的最佳葡萄糖添加量为 1.32%。Suh 等人^[70]在对突变菌株 *Monascus Purpureus* KU609 进行的培养条件优化实验中还发现,在 20g 大米中添加 0.4g 葡萄糖可以显著提高其莫纳可林 K 产量。Lee 等人^[71]将 2.2%的艾草和 3.8%的葡萄糖混合作为红曲霉发酵的基质,发现其莫纳可林 K 产量是以大米为基质的 6 倍。甘油也经常用作红曲霉发酵莫纳可林 K 的碳源^[72]。Lu 等人^[73]使用甘蔗渣作为发酵基质,并将不同浓度的甘油(18%-34%)作为单一碳源添加到 *Monascus Purpureus* 9901 菌株的固体和液体培养基中。研究人员发现,固态发酵下莫纳可林 K 产量在最适甘油浓度(高达 26%)显著高于液态发酵下莫纳可林 K 的产量,而液态发酵下莫纳可林 K 产量随着甘油浓度的增加而下降,并显著低于固态发酵下。这可能是由于固态发酵下红曲霉的细胞形态和生理特性与液体发酵下的不同,固态发酵下较低的代谢抑制更有利

于红曲霉的生长,从而提高了菌体对甘油的利用率。冯等人^[74]的研究表明,当甘油浓度大于 10%时,液态发酵下红曲细胞的代谢抑制增加,莫纳可林 K 产量受到不同程度的抑制。一些研究发现^[75],在培养基中添加乙醇作为碳源可以显著提高莫纳可林 K 产量。实验结果表明,添加体积分数为 0.5%的乙醇后,红曲霉的莫纳可林 K 显著高于对照组。

氮源是真菌菌丝生长所必需的营养物质。在较低浓度下,硝酸钠在提高莫纳可林 K 方面优于有机氮源^[76],但过高的硝酸钠浓度会对细胞产生毒性,导致莫纳可林 K 产量下降。豆粕也常作为氮源添加到培养基中,徐等人^[77]以大米和豆粕为发酵基质,当豆粕添加量为 20%时,莫纳可林 K 产量可达 4.02 mg/g,比不加豆粕的莫纳可林 K 产量(1.26 mg/g)提高近 2 倍。另一项研究是对 *Monascus Purpureus* MS-1 固态发酵产生莫纳可林 K 的培养基进行响应面优化,结果表明,当底物为 60%大米和 40%豆粕时,莫纳可林 K 的产量可达 17.66 mg/g^[78]。Dikstrt 等人^[79]还研究了以麦皮为发酵基质的红曲霉固态发酵中豆粕添加量,结果表明,添加 20 g/L 豆粕可显著提高莫纳可林 K 产量,最高可达 20.04 mg/g。添加谷氨酸、蛋氨酸等氨基酸可作为莫纳可林 K 代谢的氮源或前体,提高莫纳可林 K 产量。Kraboun 等人^[80]研究了不同浓度的谷氨酸钠和蛋白胨对红曲霉发酵过程中莫纳可林 K 产量的影响。研究人员发现,在相同的氮含量下,谷氨酸钠在增加莫纳可林 K 产量作用优于蛋白胨。

在许多丝状真菌中,金属离子对促进细胞生长和代谢产物的产生具有重要作用。Panda 等人^[81]以菌株 *Monascus Purpureus* MTCC369 进行固态发酵,并对其无机盐组成进行单因素优化。结果表明,氯化铵、硫酸镁和氯化钠均能显著提高莫纳可林 K 的产量。硫酸锰和氯化钙的影响次之,而磷酸氢二钾和硫酸铁的影响较差。Dikshit 等人^[82]对 *Monascus Purpureus* 固态发酵条件进行优化,发现硫酸镁可以显著提高莫纳可林 K 的产量,而加入氯化钙后莫纳可林 K 的产量显著下降。

1.3 研究目的及意义

随着经济的不断发展和人民生活水平的不断提升,人们逐渐对食物的营养和健康提出了更高的要求。利用“药食同源”中药材开发具有降血脂、降血压或降血糖的新型功能性食品,具有广阔的市场前景。苦荞是我国特有的、兼具“药食

同源”的一种粮食作物。苦荞含有多种功能性成分，包括多糖、黄酮（芦丁、槲皮素、异槲皮素、儿茶素等）、维生素（D-手性肌醇）、蛋白质和活性肽、抗性淀粉以及膳食纤维等，在降血脂、降血压、降血糖、改善肠道微生态和抗肿瘤等方面具有多重功效。通过红曲霉发酵，使得苦荞本身的功能性成分更容易被人吸收，并且红曲霉代谢产物莫纳可林 K 同样可以降血脂，从而提高红曲苦荞茶的市场竞争力。

本研究通过筛选高莫纳可林 K 产量的红曲霉菌株，进行固态发酵优化，烘焙条件优化，并检测各个环节中发酵产物的活性物质含量，为红曲苦荞茶的生产提供理论研究参考依据。

1.4 研究内容

本课题的研究内容主要分为以下三个方面：

（1）红曲霉菌种筛选及发酵条件优化

从市售红曲米中筛选高产莫纳可林 K 红曲霉菌株，并以莫纳可林 K 产量为主要因素，发酵产物色价、抗氧化活性作为参考指标，对选定的红曲霉菌株固态发酵苦荞条件进行优化。

（2）苦荞其营养物质随发酵时间变化

分别考察苦荞在 23℃、28℃和 33℃条件下发酵 0、3、5、7、9、11、13、15 天后莫纳可林 K、色价、抗氧化活性、总黄酮、总多酚、芦丁、槲皮素、山奈酚、绿原酸、阿魏酸、抗性淀粉的变化趋势，明确加工条件，为后续制茶工艺提供理论依据。

（3）苦荞红曲代用茶加工工艺及营养价值评价

以感官、莫纳可林 K、色价、抗氧化活性、总黄酮、总多酚、芦丁为指标，考察烘焙时间和烘焙温度对苦荞红曲茶品质的影响，并优化最佳加工工艺。

第2章 红曲霉菌种筛选及发酵条件优化

2.1 引言

固态发酵是指微生物在没有或几乎没有游离水的固态培养基中进行的发酵过程，其培养基成分大多数是不溶于水的固形物，它不仅为微生物生长提供所需要的碳源、氮源等营养物质，而且也是微生物生长的场所^[83]。固态发酵具有许多独特的优势^[84]：（1）固态发酵的培养基一般为天然的农副产品，比较简单。（2）发酵产物浓度高，提取相对比较简单，但提取的产物中含有底物成分。发酵结束后，发酵残渣含水量很低，因此不会产生大量废液，大大减少了废水排放量，减少对环境的污染。（3）工艺简单，投资少，能耗低，应用广泛。（4）固态发酵中微生物生长状态接近自然，有可能会产生一些液态发酵中不产生的酶和代谢产物。（5）所需通气压力等。本试验是以苦荞为发酵基质，用活化、扩培后的红曲菌种子液对其进行发酵，代谢产生更多莫纳可林 K 物质，同时苦荞中的活性成分，如黄酮类化合物等实现富集，从而生产富含多重生理活性物的转化物，为生产优质红曲苦荞茶提供功能性营养原料。而添加外源氮源、添加无机盐、初始搅拌水 pH 值、料液比等发酵条件的不同对红曲菌达到最佳的发酵效果具有十分重要的作用。因此，如何实现优化苦荞红曲固态发酵工艺条件具有非常重要的意义。

本章内容是以筛选高产莫纳可林 K 菌株为基础，以富集收获多重生理活性组分为目的，通过考察添加外源氮源、添加无机盐、初始搅拌水 pH 值、料液比条件对苦荞红曲固态发酵的影响，并利用响应面试验优化促进莫纳可林 K、色价、抗氧化活性等指标，确定最佳的发酵条件。

2.2 实验材料

2.2.1 实验菌种及苦荞

本研究中红曲霉菌种为从市售红曲米中筛选出的菌株，分别命名 HQ-1、HQ-0、HQ-QZ。红曲米购于古田县闵妃食品有限公司、古田帝元红曲厂以及安徽德昌药业股份有限公司。苦荞购于山东莘县睿翼食品有限公司。

2.2.2 主要仪器及试剂

表 2-1 主要仪器

Table 2-1 Main instruments

仪器	厂家
LC-2030 高效液相色谱仪	株式会社岛津制作所
LDZX-50KBS 高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
SW-CJ-2D 超净工作台	上海苏净实业有限公司
DHG-9070 恒温干燥箱	成都晟杰科技有限公司
日本日立 S-4800 扫描电子显微镜	日本日立
BHS-2 恒温水浴锅	金坛区西域新瑞仪器厂
L3 可见分光光度计	上海仪电集团有限公司
HZK-FA110S 电子天平	华志电子科技有限公司
0.22um 尼龙微孔滤膜	国药集团化学试剂有限公司
H1650-W 台式离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
RE-52AA 旋转蒸发仪	上海亚荣生化仪器厂
SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵	上海秋佐科学仪器有限公司
GHP-9080N 隔水式恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司
ZQZY-78BN 双层震荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
UV-5500PC 紫外可见分光光度计	上海元析仪器有限公司
FE-20 pH 计	梅特勒-多利多有限公司
XSP/2C 光学显微镜	上海长方光学仪器有限公司
1-14 Sigma 离心机	北京华威中仪科技有限公司
FA1004 精密电子天平	天津天马衡基仪器有限公司

表 2-2 主要试剂

Table 2-2 Main reagents

试剂	生产厂家	级别
土豆浸出粉	上海源叶生物科技有限公司	
葡萄糖	国药集团化学试剂有限公司	
蛋白胨	国药集团化学试剂有限公司	
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	AR
莫纳可林 K	东京化成工业株式会社	98%
戊二醛	上海源叶生物科技有限公司	AR
乙酸异戊脂	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	AR
1,1-二苯基-2 苦基肼 (DPPH)	上海麦克林生化科技有限公司	98%
2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑	上海麦克林生化科技有限公司	98%
啉-6-磺酸 (ABTS)		
磷酸氢二钠	国药集团化学试剂有限公司	AR
磷酸二氢钠	国药集团化学试剂有限公司	AR
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	

2.2.3 主要培养基

PDA 培养基 (g/L)：马铃薯浸出粉 6，葡萄糖 20，琼脂 18~20，pH 值自然，灭菌条件 121°C，15 min。

种子培养基 (g/L)：葡萄糖 60，蛋白胨 25，苦荞粉 20，NaNO₃ 2，MgSO₄ 1，KH₂PO₃ 1，ZnSO₄ 1，pH 值自然，分装至 250 mL 摇瓶，装液量 30mL，灭菌条件 121°C，15 min。

固态发酵培养基：市售苦荞 25.0 g，搅拌水 (NaNO₃ 2 g/L，MgSO₄ 1 g/L，KH₂PO₃ 1 g/L，ZnSO₄ 1 g/L，pH 自然) 20 mL，灭菌条件 121°C，15 min。

2.3 实验方法

2.3.1 红曲霉菌种筛选与鉴定

称取市售红曲米 5.0 g 于 250 mL 灭菌药瓶中，加入 45 mL 无菌生理盐水，放入温度 30°C，转速 200 rpm 摇床中，活化 40 min。吸取 1 mL 液体进行梯度稀

释，涂布 PDA 平板，30℃培养 3~5 天。观察菌落生长，选取具有红曲霉菌落特征的单菌落用接种环挑取，在 PDA 培养基上划线，如有杂菌需要再次进行分离纯化，4℃保藏。

取 PDA 平板培养 4 天菌种于 1 mL 离心管中，按照王琳等人^[85]方法进行戊二醇固定，冷冻干燥 24 小时进行扫描电镜检测。分子生物学鉴定参考文献^[86]，以红曲霉菌株 HQ-1、HQ-0、HQ-QZ 的 DNA 为模板，使用通用引物 ITS1 和 ITS4 作为引物进行 PCR 实验，测序后进行 BLAST 比对。

2.3.2 红曲苦荞发酵方法

取红曲霉菌株于 PDA 培养基中划线，用 5 mL 无菌水洗出孢子液。震荡混匀，取 1 mL 孢子悬浮液，接种于 30 mL 种子培养基中，37℃，200 rpm 培养 2 天。取培养过的种子液 5 mL（接种量按 10%计），加入至固体发酵培养基中，0 至 2 天，30℃静置培养，2 至 10 天 25℃静置培养，每天均匀充分摇晃一次，发酵结束置于 60℃烘箱，烘至恒重，打成粉过 40 目筛，-4℃备用。

2.3.3 发酵条件优化

2.3.3.1 单因素实验设计

分别以不同的 pH 值，不同温度，不同氮源，添加不同无机盐，不同料液比作为唯一变量进行发酵实验，以其发酵产物莫纳可林 K 作为主要评比指标，以黄酮类物质含量为次要指标，同时探究其色价和抗氧化活性的变化。

（1）添加不同外源氮源对红曲霉发酵的影响

选用 2.2.3 中的 PDA 培养基和种子培养基（2）添加不同外源氮源对红曲霉发酵的影响，其固态发酵培养基变为，市售苦荞 25 g，添加搅拌水 20 mL（MgSO₄ 1 g/L，KH₂PO₃ 1 g/L，ZnSO₄ 1 g/L，pH 自然）。在搅拌水中分别添加硫酸铵、硝酸钠、氯化铵、硝酸铵、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、黄豆饼粉作为外源添加氮源，浓度均为 2 g/L。发酵条件仍按照 2.3.2 中发酵方法进行发酵

（2）不同的硝酸铵添加量对发酵的影响

选用 1.1.2 中的 PDA 培养基和种子培养基，其固态发酵培养基变为，市售苦荞 25 g，添加搅拌水 20 mL（MgSO₄ 1 g/L，KH₂PO₃ 1 g/L，ZnSO₄ 1 g/L，pH4.0）。在搅拌水中分别添加浓度为 1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L 的 NH₄NO₃。

(3) 添加不同无机盐对发酵的影响

选用 1.1.2 中的 PDA 培养基和种子培养基，其固态发酵培养基变为，市售苦荞 25 g，添加搅拌水 20 mL (NaNO_3 2 g/L, pH 自然)。在搅拌水中分别添加 MgSO_4 、 KH_2PO_3 、 ZnSO_4 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 浓度均为 1 g/L，并做一组空白对照。发酵条件仍按照 2.3.2 中发酵方法进行发酵。

(4) 不同的硫酸锌添加量对发酵的影响

选用 1.1.2 中的 PDA 培养基和种子培养基，其固态发酵培养基变为，市售苦荞 25 g，添加搅拌水 20 mL (NH_4NO_3 3 g/L, MgSO_4 1 g/L, KH_2PO_3 1 g/L, pH4.0)。在搅拌水中分别添加浓度为 1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L 的 ZnSO_4 。

(5) 不同 pH 值对红曲霉发酵的影响

选用 1.1.2 中的培养基，仅对其固态发酵培养基的搅拌水 pH 值进行调节，分别设置为 2.5、4、5.5、6.5、8.0，按照 2.3.2 中发酵方法进行发酵。

(6) 不同料液比对发酵的影响

选用 1.1.2 中的培养基，仅对其固态发酵培养基的搅拌水添加量进行调节，添加量为 10 mL (含水率 30%)、15 mL (含水率 40%)、20 mL (含水率 50%)、25 mL (含水率 60%)、30 mL (含水率 70%)，按照 2.3.2 中发酵方法进行发酵。

2.3.3.2 响应面实验设计

以上述单因素结果为依据，采用 Box-Behnken 中心组合设计，设置 pH 值(X_1)、料液比(X_2)、 NH_4NO_3 含量(X_3)、 ZnSO_4 含量(X_4)为自变量，莫纳可林 K 产量(Y_1)为响应值，以此来设计四因素四水平实验，其他次要条件不变，具体数值如表 2-3 所示。

表 2-3 实验设计

Table 2-3 Experimental design

试验号	pH 值 X1	含水率 X2%	硝酸铵含量 X3 g/L	硫酸锌含量 X4 g/L
1	1	40	3	2
2	5	40	3	2
3	1	60	3	2
4	5	60	3	2
5	3	50	1	1
6	3	50	5	1
7	3	50	1	3
8	3	50	5	3
9	1	50	3	1
10	5	50	3	1
11	1	50	3	3
12	5	50	3	3
13	3	40	1	2
14	3	60	1	2
15	3	40	5	2
16	3	60	5	2
17	1	50	1	2
18	5	50	1	2
19	1	50	5	2
20	5	50	5	2
21	3	40	3	1
22	3	60	3	1
23	3	40	3	3
24	3	60	3	3
25	3	50	3	2
26	3	50	3	2
27	3	50	3	2
28	3	50	3	2
29	3	50	3	2

2.3.3.2 莫纳可林 K 含量检测

采用 HPLC 法进行莫纳可林 K 含量测量^[87]。

(1) 样品处理

精密称量 1.0 g 红曲苦荞粉，置于 50 mL 离心管中，添加 25 mL 甲醇，超声 30 min，过 0.22 μm 有机膜待测备用。

(2) 内酯型莫纳可林 K 标准品配置

精密称取 5.0 mg 内酯型莫纳可林 K 标准品，置于 50 mL 离心管中，用甲醇

溶解定容至 25 mL，得到 200 mg/L 内酯型莫纳可林 K 标准液，稀释得到 5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 的梯度样品，过 0.22 μm 膜。

（3）酸式莫纳可林 K 标准品配置

精密称取 5.0 mg 内酯型莫纳可林 K 标准品，置于 50 mL 离心管中，用 4 mL 甲醇溶解，加入 2 mL 2 mol/L NaOH 溶液超声 30 min，加入甲醇定容至 25 mL，得到 200 mg/L 酸型莫纳可林 K 标准液，稀释得到 5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 的梯度样品，过 0.22 μm 膜。

2.3.3.3 色价测量

参照国标 GB1886.19-2015《食品国家安全标准 食品添加剂 红曲米》。

2.3.3.4 抗氧化活性测量

取 1.0 g 红曲苦荞粉样品，加入 25 mL 甲醇，超声 30 min，得到待测液。

2.3.3.4.1 DPPH 抗氧化活性测量

(1)标准曲线绘制

称取 5 mg Vc 标准品与棕色瓶内，加入甲醇溶解，并定容至 100 mL，配置成 50 μg/mL Vc 母液。分别吸取 0.8、1.6、2.4、3.2、4.0、4.8 mL Vc 母液并定容至 10 mL，得到 4、8、12、16、20、24 μg/mL Vc 标准曲线工作液。称取 10mg DPPH，用甲醇定容至 100 mL，分别吸取 500 μL 工作液与 4 mL DPPH 甲醇溶液，混合均匀，避光反应 30 min，使用分光光度计在 517 nm 测量其吸收峰值，以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

DPPH 抗氧化活性测量

吸取 500 μL 稀释 40 倍的待测液，加入 4 mL DPPH 甲醇溶液，避光反应 30 min，使用分光光度计在 517 nm 测量其吸收峰值，代入标准曲线，计算出浓度 C 。代入下列公式：

$$Y = \frac{A \times C \times V}{m}$$

其中 A 为稀释倍数， C 为测出同浓度 Vc 等效 DPPH 抗氧化活性， V 为加入甲醇体积， m 为样品称量质量。最终试验结果 Y 以每 1g 干重（DW）样品中等量 Vc（μg）表示：μg vc/gdw。

2.3.3.4.2 ABTS 抗氧化活性测量

(1)标准曲线绘制

称取 5mg Vc 标准品与棕色瓶内，加入甲醇溶解，并定容至 100mL，配置成 50 µg/mL Vc 母液。分别吸取 0.8、1.6、2.4、3.2、4.0、4.8mL Vc 母液并定容至 10mL，得到 4、8、12、16、20、24 µg/mL Vc 标准曲线工作液。称取 31mg 过硫酸钾，用甲醇定容至 50 mL，称取 0.192 g ABTS 用甲醇定容至 50 mL，二者溶解后混匀，用棕色瓶避光保存 12~16 小时，得到 ABTS 甲醇溶液。分别吸取 500µL 工作液与 4 mL ABTS 甲醇溶液，混合均匀，避光反应 30 min，使用分光光度计在 517 nm 测量其吸收峰值，以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

ABTS 抗氧化活性测量

吸取 500 µL 稀释 40 倍的待测液，加入 4 mL ABTS 甲醇溶液，避光反应 30 min，使用分光光度计在 760 nm 测量其吸收峰值，代入标准曲线，计算出浓度 C。代入下列公式：

$$Y = \frac{A \times C \times V}{m}$$

其中 A 为稀释倍数，C 为测出同浓度 Vc 等效 ABTS 抗氧化活性，V 为加入甲醇体积，m 为样品称量质量。最终试验结果 Y 以每 1g 干重（DW）样品中等量 Vc（µg）表示：µg vc/gdw 。

2.4 结果与分析

2.4.1 红曲霉分离纯化

如图 2-1 所示，共筛选出三株红曲霉菌株，分别命名为 HQ-0、HQ-1、HQ-QZ。三株菌株颜色均为橙色或者偏棕红色，菌落中间凸起，气生菌丝被茸毛状至被卷棉毛状，菌丝具隔膜，多分枝，分生孢子连续分生呈链，6-8 µm。子囊孢子呈圆形，光滑，5-6 µm，符合紫色红曲霉的形态学特征^[88]。

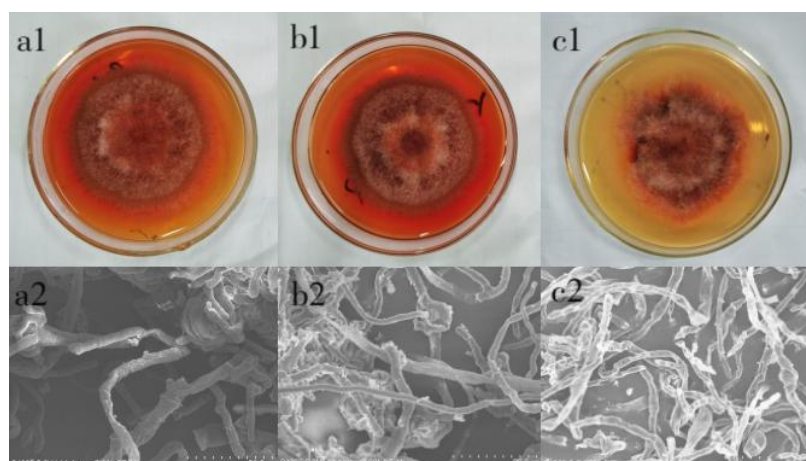


图 2-1 a.HQ-0 号菌株 b.HQ-1 号菌株 c.HQ-QZ 号菌株；1 菌落照片 2 菌丝体电镜照片

Fig.2-1 Figure 1 a. HQ-0 strain b. HQ-1 strain c. HQ-QZ strain; 1. Colony photo 2.

Electron microscopy photo of mycelium

2.4.2 红曲霉菌株分子生物学鉴定

通过对三株菌株进行 5.8s ITS rDNA 测序，并通过 NCBI 数据库进行比较，三株菌株和紫色红曲霉相似度均达到 99%，并通过与其近源菌株构建系统发育树，如图 2-2 所示。HQ-0 与 *Monascus purpureus* strain BHQ33.M03 (MW581232.1) 处于同一分支，HQ-1 与 *Monascus* spp. (MW527421.1) 处于同一分支，HQ-QZ 与 *Monascus purpureus* isolate 2010F16 (MT5583931.1) 处于同一分支因此，根据形态学特征、5.8s ITS rDNA 测序，可以初步确定，三株菌株均属于紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*)。

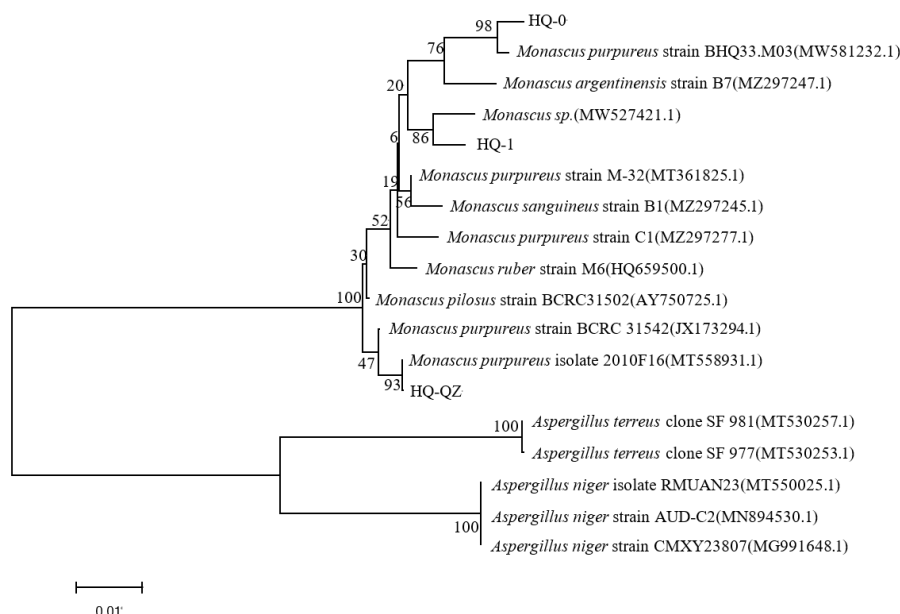


图 2-2 HQ-1、HQ-0、HQ-QZ 菌株基于 ITS 序列建立的系统发育树 Bootstrap 次数设置为 1000；邻接法构建系统发育树；括号内代表序列 Gen Bank 登录号；分支处的数字表示 bootstrap 支持率；标尺表示 1% 的序列进化差异

Fig.2-2 The phylogenetic trees of HQ-1, HQ-0, and HQ-QZ strains were established based on ITS sequences, with a Bootstrap count set to 1000; Constructing phylogenetic trees using adjacency method; The parentheses represent the Gen Bank login number of the sequence; The number at the branch represents the support rate of bootstrap; The ruler represents 1% of the evolutionary differences in sequences

2.4.3 红曲霉菌种选定

如图 2-3-a 所示，红曲霉 HQ-1 发酵莫纳可林 K 产量最高，达到了 140.36 mg/100g，比红曲霉 HQ-0 莫纳可林 K 产量（120.39 mg/100g）高了 16%，比红曲霉 HQ-QZ 莫纳可林 K 产量高了 208%。红曲霉 HQ-1、HQ-0 色价分别为 333.5 μ /g 和 330.95 μ /g，二者产量相似，显著高于 HQ-QZ 色价（202.2 μ /g）。如图 2-3-b 所示，红曲霉 HQ-QZ 其 DPPH 抗氧化活性是三株菌株最高，达到了 1487.39 μ g vc/gdw，显著高于红曲霉 HQ-1、HQ-0。而 ABTS 抗氧化活性最高的菌株为红曲霉 HQ-1，达到了 1655.80 μ g vc/gdw。以莫纳可林 K 产量为主要指标后续实验将选用红曲霉 HQ-1，作为后续工艺研究菌种。

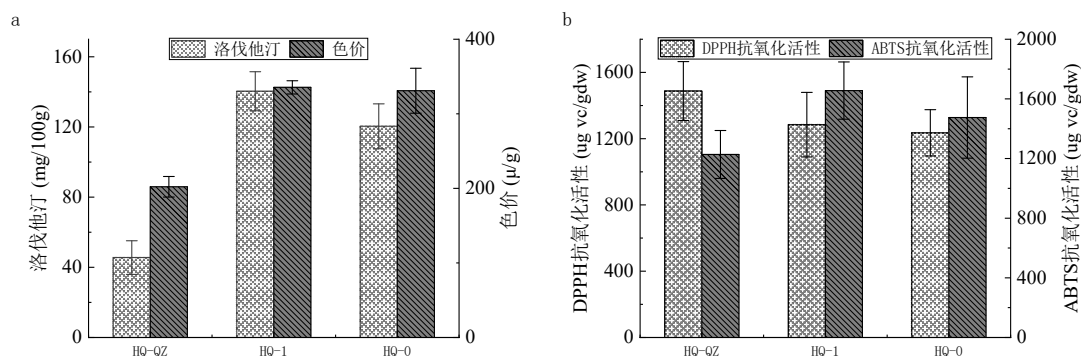


图 2-3 三株红曲霉菌株发酵产物的产量；其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价，图 b 中为 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性

Fig.2-3 The production of fermentation products from three strains of *Monascus purpureus*.

The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS from fermentation products.

2.4.4 单因素优化

2.4.4.1 添加不同外源氮源对红曲霉发酵的影响

如图 2-4-a 所示，添加硫酸铵、硝酸铵和酵母膏的添加显著的提高了莫纳可林 K 的产量，分别达到了 145.6 mg/100g、136.07 mg/100g、137.02 mg/100g。在添加的八种外源氮源中，硝酸铵的添加使得最后发酵物色价最高，达到了 630.33 μg。无机氮源成相对简单，可快速被红曲霉菌株利用，有助于红曲霉菌株的生长，从而提升莫纳可林 K 和色价的产量。如图 2-4-b 所示，添加牛肉膏、蛋白胨的样品的 DPPH 抗氧化活性较低，添加其他氮源的样品无显著变化。而添加的氯化铵、硝酸铵、牛肉膏、蛋白胨的样品 ABTS 抗氧化活性要明显低于添加其他氮源的样品。以莫纳可林 K 产量为主要指标后续实验将确定最佳的硝酸铵添加量。

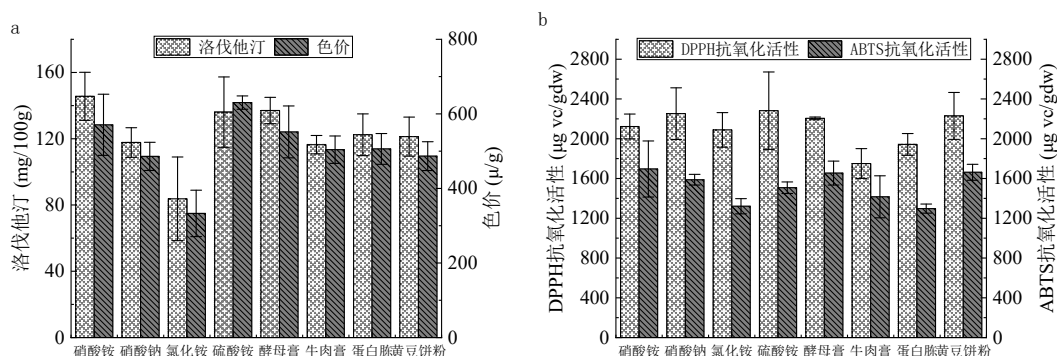


图 2-4 添加不同外源氮源对红曲霉发酵产物的影响；其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价，图 b 中为 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性以及发酵产物的黄酮提取量

Fig.2-4 Effect of adding different exogenous nitrogen sources on the fermentation products.

The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS from fermentation products.

2.4.4.2 不同的硝酸铵添加浓度对发酵的影响

如图 2-5-a 所示，当硝酸铵添加浓度达到 3 g/L 时，红曲霉发酵莫纳可林 K 产量最高，达到了 178.58 mg/100g，而硝酸浓度较低或较高时均对莫纳可林 K 产量产生抑制。样品色价最高可达 345.33 μg，其硝酸铵添浓度为 3 g/L。如图 2-5-b 所示，硝酸铵添加浓度为 3 g/L 的样品的 DPPH 抗氧化活性和 ABTS 抗氧化活性均最高，分别为 2059.20 μg vc/gdw、1687.43 μg vc/gdw。因此可以推测，添加适当浓度的硝酸铵，可以促进红曲霉菌株生长，而添加过多可能对其产生抑制,这与 Su YC 等人的研究相似^[89]。

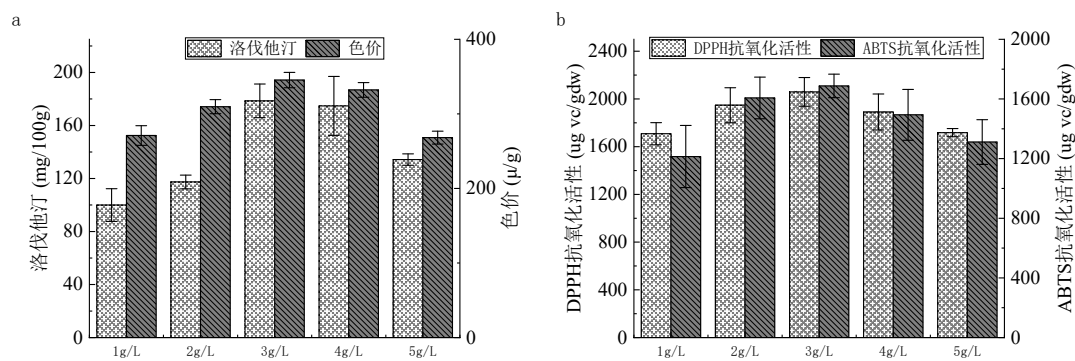


图 2-5 不同的硝酸铵添加浓度对红曲霉发酵产物的影响; 其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价, 图 b 中为 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性

Fig.2-5 Effect of different ammonium nitrate addition concentrations on the fermentation products. The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS from fermentation products.

2.4.4.3 添加不同无机盐对发酵的影响

红曲霉生长同样不可缺少无机盐的参与。如图 2-6-a 所示, 添加的四种无机盐中只有硫酸锌的添加使莫纳可林 K 的产量比空白对照有所提高, Seenivasan A 等人的研究表明^[90], 锌离子可以显著促进红曲霉产生莫纳可林 K。添加的无机盐的样品中, 仅有添加硫酸锌的样品色价高于空白对照组, 提高了 13%, 其他的样品色价基本与空白对照色价持平, 说明锌离子不仅能提高莫纳可林 K 的产量, 可能也对红曲霉色素的合成起到积极作用。如图 2-6-b 所示, 添加不同无机盐对 ABTS 抗氧化活性的影响不显著。添加硫酸氢二钾的样品中 DPPH 抗氧化活性最大, 达到了 $1328.32 \mu\text{g vc/gdw}$ 。因此后续实验将选取最佳的硫酸锌添加量。

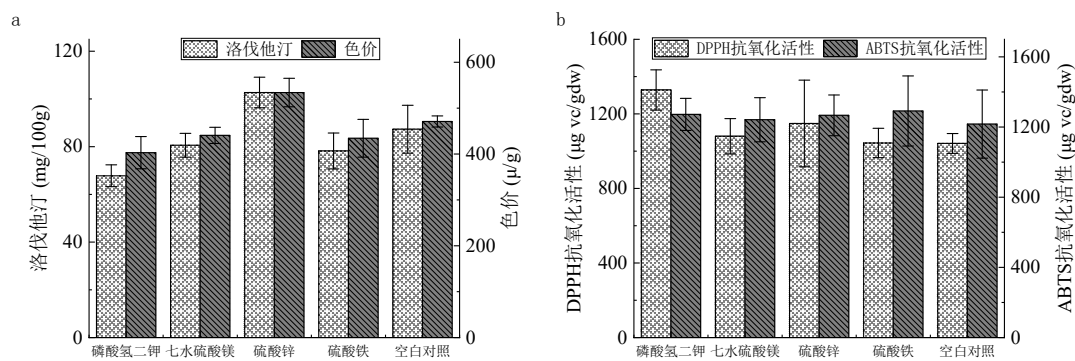


图 2-6 添加无机盐对发酵产物的影响；其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价，图 b 中为 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性

Fig.2-6 Effect of adding inorganic salts on the fermentation products. The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS, from fermentation products.

2.4.4.4 不同的硫酸锌添加浓度对发酵的影响

如图 2-7-a 显示，硫酸锌的添加浓度达到 2 g/L 时，其莫纳可林 K 产量最高，其产生总量达到了 72.63 mg/100g。当硫酸锌浓度较低时，莫纳可林 K 的产量明显降低，而随着硫酸锌浓度增大而增大，表明硫酸锌的添加对于莫纳可林 K 的产量有明显促进作用。硫酸锌的添加浓度达到 2 g/L 时，其样品色价最高，336.33 μg。如图 2-7-b 所示，添加硫酸锌浓度对抗氧化活性的影响不是很明显，没有显著的增高或者降低。

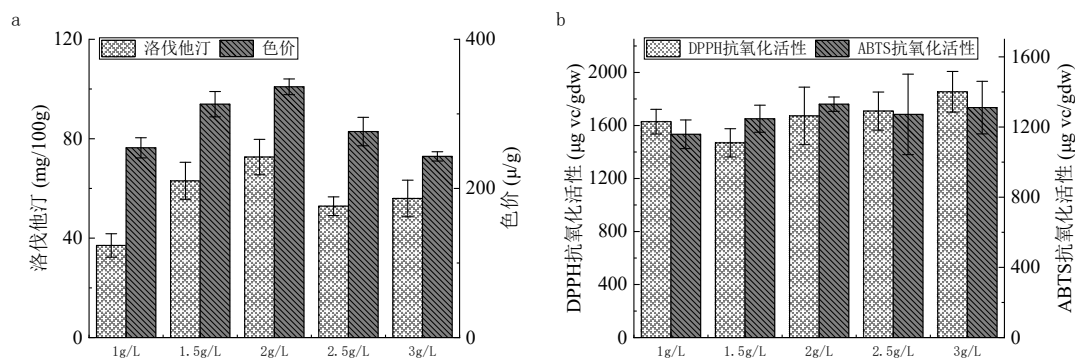


图 2-7 不同的硫酸锌添加浓度对发酵产物的影响；其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价，图 b 中为 DPPH 及 ABTS 抗氧化活性

Fig.2-7 Effect of different zinc sulfate addition concentrations on the fermentation products.

The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS from fermentation products.

2.4.4.5 不同 pH 值对红曲霉发酵的影响

在固体发酵中，不同的 pH 值的搅拌水对红曲霉的生长有很大的影响。如图 2-8-a 所示，红曲霉在偏酸性环境中莫纳可林 K 产量更高，pH 在 4 的条件下最高，达到了 95.31 mg/100g，这与^[91]等人的研究结果相类似，他们发现以山药做发酵基质时，pH 在 3 的条件下，莫纳可林 K 的产量更高，这与本实验的结果相类似，其推断有可能和酸性条件下更有利于红曲霉生长有关。添加的搅拌水 pH 值在 4.0 的时候，其色价最高，达到了 585.33 μg。Matej^[92]等人研究发现，摇瓶发酵时 pH 值为 2.5 的时候，色素产量最高。这个结果与本实验的结果基本一致。如图 2-8-b 所示，DPPH 抗氧化活性在不同 pH 值条件下变化并不显著，而 ABTS 抗氧化活性在 pH 值为 4.0 和 8.0 时（分别为 1535.16 μg vc/gdw、1319.21 μg vc/gdw）均显著比其 pH 他条件下更高。

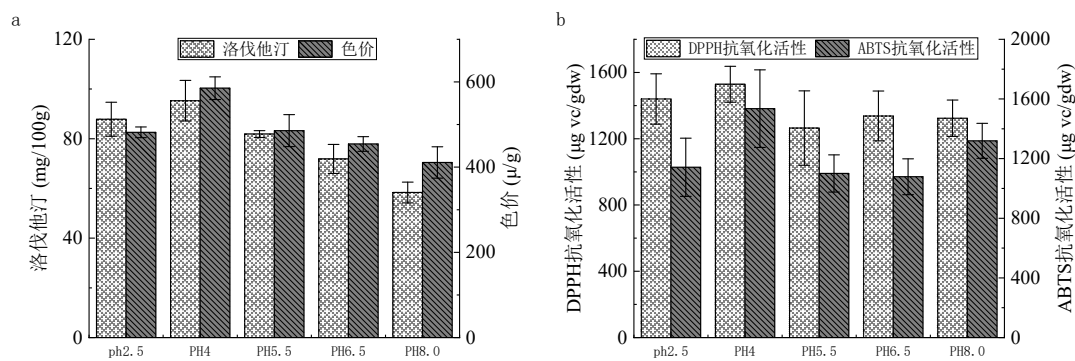


图 2-8 不同 pH 值条件下红曲发酵产物的产量；其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价，图 b 中为 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性

Fig.2-8 Effect different pH conditions different fermentation products under; Among them.

The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS from fermentation products.

2.4.4.6 不同料液比对发酵的影响

如图 2-9 所示，当发酵过程中的料液比达到 5:5 时，其莫纳可林 K 产量最高，达到 135.51 mg/100g，其色价同样最高，达到 521 μg，ABTS 抗氧化活性在料液比达到 5:5 时最高，DPPH 抗氧化活性在料液比达到 5:4 时最高，同样的其发酵产物黄酮提取量在料液比为 5:5 时最高。有研究推断^{[93][94]}，当料液比中液体比较低时，红曲霉由于没有充足的水分从而导致其定殖苦荞表面的难度增大，影响苦荞的发酵。而当液体比重较高时，由于高温灭菌的作用，导致苦荞颗粒之间的粘度增大，再加上苦荞本身的吸水涨大，导致整个发酵环境中的空隙变小，空气流动性降低，导致红曲霉在增殖过程中无法获得足够多的氧气，进而影响其生长发育。

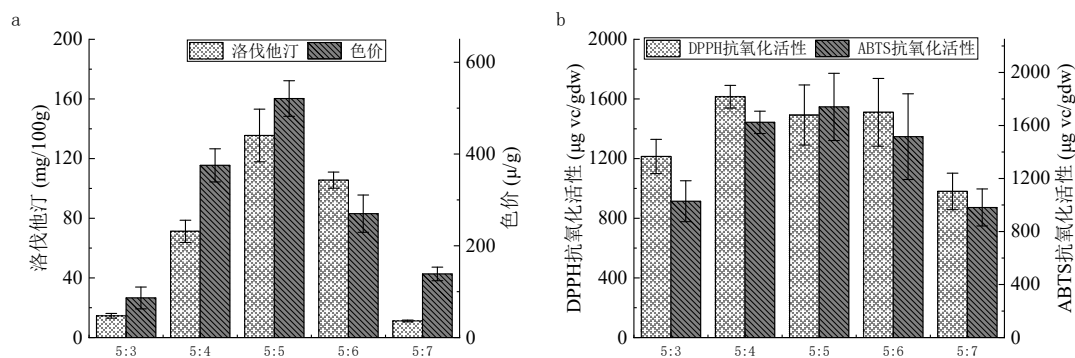


图 2-9 料液比对红曲霉发酵产物的影响；其中图 a 中为莫纳可林 K 产量和色价，图 b 中为 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性

Fig.2-9 Effect of material liquid ratio on the fermentation products. The yield of Monacolin K and its corresponding color value are presented in Figure a, whereas Figure b exhibits the antioxidant properties of DPPH and ABTS from fermentation products.

2.4.5 响应面法优化发酵条件

采用 Design Expert 12.0.3.0 软件对表数据进行回归分析，获得莫纳可林 K 含量 Y_1 与 pH 值 X_1 、添加搅拌水量 X_2 、硝酸铵含量 X_3 、硫酸锌含量 X_4 的三元二次方程：

$$Y_1 = 157.11 - 0.7096X_1 + 3.21X_2 + 0.3233X_3 + 3.26X_4 + 2.65X_1X_2 + 2.02X_1X_3 + 0.425X_1X_4 - 3.82X_2X_3 - 0.4675X_2X_4 + 5.05X_3X_4 - 17.9X_1^2 - 31.9X_2^2 - 16.84X_3^2 - 15.2X_4^2$$

方差分析(表 2-5)结果显示，含水率对莫纳可林 K 产量有显著性影响，其余因素影响均显著。通过各因素 F 值可知，各因素对莫纳可林 K 的产量影响大小顺序为：含水率 (X_2) > 硫酸锌添加浓度 (X_4) > 硝酸铵添加浓度 (X_3) > 搅拌水 pH 值 (X_1)。响应面结果表明红曲霉固态发酵苦荞的最优发酵工艺条件为：pH 值为 2.583，搅拌水添加量为每 25 g 苦荞添加 21 mL，搅拌水 NH_4NO_3 浓度为 2.766 g/L，搅拌水 ZnSO_4 浓度为 1.821 g/L (图 2-10)。采用上述优化后的发酵条件，红曲霉发酵莫纳可林 K 产量为 162.26 mg/100g，验证了实验莫纳可林 K 产量符合响应面实验模拟，并且测得发酵产物的黄酮提取量为 50.2 mg/g，色价为 724.33 μg，DPPH 抗氧化活性和 ABTS 抗氧化活性分别为 4259.12 μg vc/gdw 和 2391.86 μg vc/gdw。

表 2-4 实验设计及结果

Table 2-4 Experimental design and results

试验号	pH 值 X ₁	含水率 X ₂ %	硝酸铵含量 X ₃ g/L	硫酸锌含量 X ₄ g/L	莫纳可林 K 含量 Y ₁ mg/100g
1	1	40	3	2	104.45
2	5	40	3	2	101.43
3	1	60	3	2	107.36
4	5	60	3	2	109.94
5	3	50	1	1	120.30
6	3	50	5	1	117.80
7	3	50	1	3	121.73
8	3	50	5	3	139.42
9	1	50	3	1	117.88
10	5	50	3	1	123.86
11	1	50	3	3	124.79
12	5	50	3	3	132.46
13	3	40	1	2	95.88
14	3	60	1	2	116.16
15	3	40	5	2	104.68
16	3	60	5	2	110.68
17	1	50	1	2	131.98
18	5	50	1	2	119.59
19	1	50	5	2	120.13
20	5	50	5	2	115.81
21	3	40	3	1	102.18
22	3	60	3	1	113.54
23	3	40	3	3	102.40
24	3	60	3	3	112.89
25	3	50	3	2	157.18
26	3	50	3	2	150.62
27	3	50	3	2	161.54
28	3	50	3	2	163.81
29	3	50	3	2	152.40

表 2-5 回归方程 (Y_1) 的方差分析表Table 2-5 Analysis of variance table for regression equation (Y_1)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	9590.44	14	685.03	20.41	< 0.0001	significant
X ₁ -pH 值	1.03	1	1.03	0.0307	0.8635	
X ₂ -含水率	295.62	1	295.62	8.81	0.0102	
X ₃ -硫酸铵含量	0.6912	1	0.6912	0.0206	0.8879	
X ₄ -硫酸锌含量	121.13	1	121.13	3.61	0.0782	
X ₁ X ₂	7.83	1	7.83	0.2332	0.6366	
X ₁ X ₃	16.24	1	16.24	0.4840	0.4980	
X ₁ X ₄	0.7225	1	0.7225	0.0215	0.8854	
X ₂ X ₃	50.94	1	50.94	1.52	0.2382	
X ₂ X ₄	0.1892	1	0.1892	0.0056	0.9412	
X ₃ X ₄	101.86	1	101.86	3.04	0.1034	
X ₁ ²	2020.80	1	2020.80	60.22	< 0.0001	
X ₂ ²	7350.20	1	7350.20	219.04	< 0.0001	
X ₃ ²	1894.19	1	1894.19	56.45	< 0.0001	
X ₄ ²	1499.48	1	1499.48	44.68	< 0.0001	
Residual	469.80	14	33.56			
Lack of Fit	341.04	10	34.10	1.06	0.5222	not significant
Pure Error	128.76	4	32.19			
Cor Total	10060.24	28				

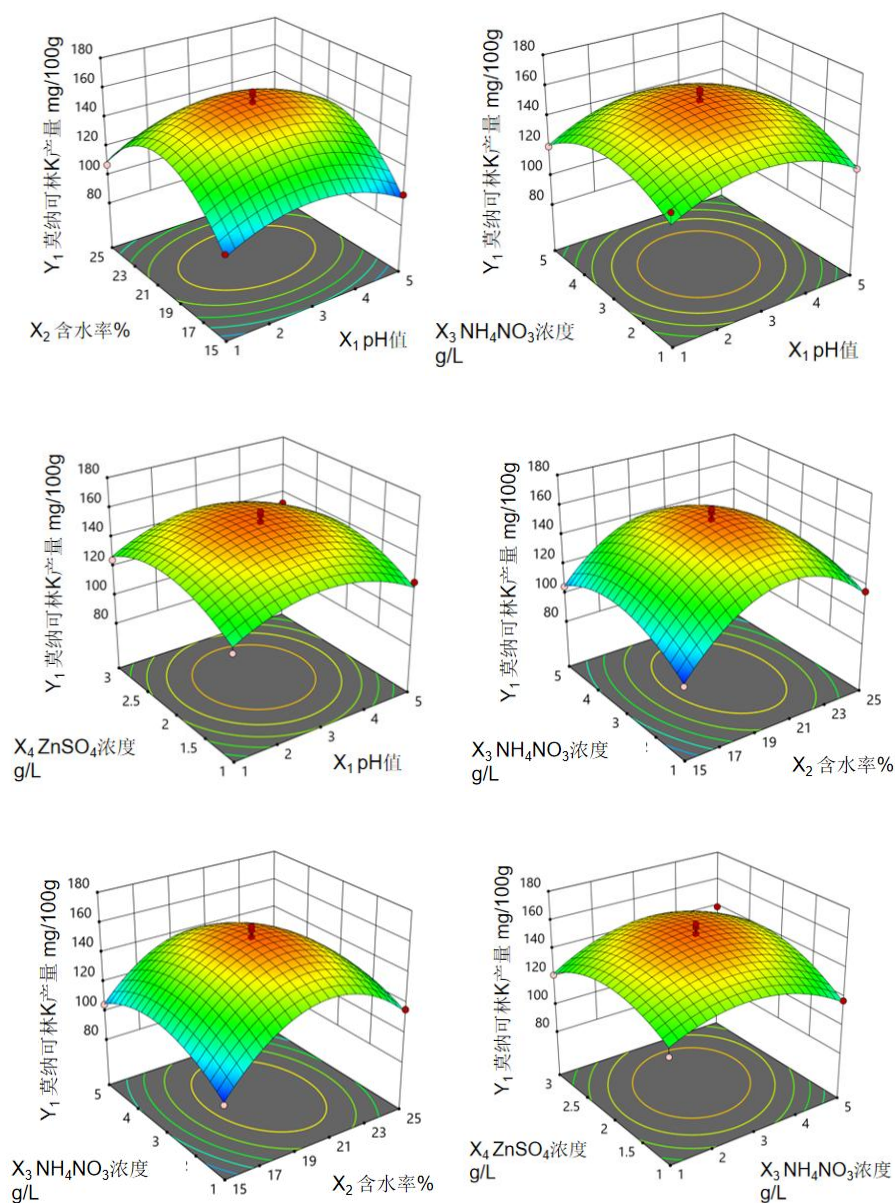


图 2-10 响应面分析莫纳可林 K 产量的最优条件
Fig.2-10 Effect of various factors on 莫纳可林 K yield

2.5 本章小结

通过筛选出三株红曲霉菌株 HQ-0、HQ-1、HQ-QZ。通过固态发酵莫纳可林 K 产量筛选出菌株 HQ-1，其莫纳可林 K 产量为 140.36 mg/100g，为三株菌株产量最高。

通过响应面实验优化出红曲霉 HQ-1 最佳发酵条件为，培养基配方：25 g 苦荞、添加搅拌水 21 mL，搅拌水配方为 NH_4NO_3 浓度为 2.766 g/L， ZnSO_4 浓度为

1.821 g/L, MgSO_4 浓度为 1 g/L, KH_2PO_3 浓度为 1 g/L, pH 调节到 2.583, 接种量为 10% (体积分数), 发酵 10 天, 30°C 培养 2 天, 25°C 培养 8 天, 每天充分摇瓶一次。

对红曲霉 HQ-1 发酵完产物进行测定, 发现样品中莫纳可林 K 产量为 162.26 mg/100g, 比优化前 (140.36 mg/100g) 提高了 15%。样品色价为 724.33 μg , 比优化前 (335.5 μg) 提高了 115%。样品 DPPH 抗氧化活性和 ABTS 抗氧化活性分别为 4259.12 $\mu\text{g vc/g dw}$ 和 2391.86 $\mu\text{g vc/g dw}$, 较之前 (DPPH 抗氧化活性 1284.40 $\mu\text{g vc/g dw}$ 、ABTS 抗氧化活性 1655.80 $\mu\text{g vc/g dw}$) 分别提高了 232%、44%。

第3章 苦荞其营养物质随发酵时间变化过程

3.1 前言

苦荞是一种中国传统农作物,含有多酚、蛋白质和多糖等多种生物活性物质,以黄酮含量高而出名^[95]。黄酮类物质可以清除体内的自由基,减轻氧化应激反应,保护细胞免受氧化损伤^[96]。在食品、药品和保健品领域具有良好的开发前景。苦荞中含有多种黄酮类物质,并以自由和结合的两种形式存在。结合形式的黄酮多酚类物质与脂肪酸、糖、蛋白质或其他大分子形成不溶状态的复合体,不易被人体吸收^[97]。促进苦荞中结合形式的黄酮多酚类物质转变为可溶性或游离黄酮多酚类物质具有一定的学术及应用价值。

微生物发酵可使不溶性结合黄酮多酚类物质变为可溶性结合黄酮多酚类物质或游离黄酮多酚类物质,从而有效提高天然产物的生物活性。如经黑曲霉发酵的豆荚、柑橘粉、经米曲霉发酵的黑米皮和经红曲霉发酵的番石榴均可提高酚类/黄酮类物质的提取率^[98-101]。红曲霉(*Monascus purpureus*)是一种丝状真菌,在我国的生产和使用已有1000多年历史。随着国内外学者对经红曲霉发酵产生的有效生理活性物质的深入研究,越来越多具有药用价值、营养价值的代谢产物被发现,研究较为热门的是具有降血脂作用的莫纳可林K类物质^[102-103]。有研究观察红曲霉固态发酵前后苦荞中酚类物质的变化,研究结果表明发酵后总酚和总黄酮含量分别增加约1.4和2.2倍,膳食添加发酵产物可改善小鼠血脂、糖耐量和抗氧化酶活性^[104]。

通过红曲霉发酵苦荞,提高生苦荞中黄酮类物质生物含量以及产生具有降血脂作用的莫纳可林K具有较好的研究和开发价值。

3.2 实验材料

3.2.1 主要仪器及试剂

仪器同2.2.2

表 3-1 主要试剂

Table 3-1 Main reagents

试剂	生产厂家	级别
芦丁	上海麦克林生化科技有限公司	97%
槲皮素	上海麦克林生化科技有限公司	97%
山奈酚	上海麦克林生化科技有限公司	97%
绿原酸	上海麦克林生化科技有限公司	98%
阿魏酸	上海麦克林生化科技有限公司	99%
莫纳可林 K	东京化成工业株式会社	98%
1,1-二苯基-2 苦基肼 (DPPH)	上海麦克林生化科技有限公司	98%
2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉 -6-磺酸 (ABTS)	上海麦克林生化科技有限公司	98%
抗性淀粉试剂盒 K-RSTAR	爱尔兰 megazyme	
抗坏血酸	Solarbio	99%

3.2.2 主要培养基

PDA 培养基、种子培养基同 2.2.3。

固态发酵培养基：25 g 原料，21 mL 拌料水。121℃灭菌 20 min。其中拌料水中的无机盐浓度为：NH₄NO₃ 2.76 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, KH₂PO₄·3H₂O 1 g/L, ZnSO₄ 1.82 g/L。

3.3 实验方法

3.3.1 红曲霉发酵方法

(1) 红曲霉培养，PDA 培养基划线，30℃生长 3-4 d。

(2) 种子液发酵：用接种环 PDA 培养基上 1/4 的菌落于 5mL 的无菌水中，接种 1 mL 至装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 的三角瓶中，在 37℃，200r/min 培养 2 天。

(3) 固态发酵：取过滤发酵过的种子培养液 5mL,加入固态培养基中，30℃静置培养 2 天，分别在 23℃、25℃、28℃、30℃条件下培养 13 天，每天扣瓶一次。在第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 9 天、第 11 天、第 13 天、第 15 天取出后，

60℃烘烤 24h。

(4) 样品制备：苦荞打粉，过筛（40 目），称取发酵过苦荞粉末 0.2000g，用甲醇定容至 5mL。加热 30min，超声 30min，补足缺失的甲醇至 5mL。

3.3.1 莫纳可林 K 含量检测

同 2.3.3.2。

3.3.2 色价测量

同 2.3.3.3。

3.3.3 抗氧化活性测量

同 2.3.3.4。

3.3.4 总黄酮含量测量

采用三氯化铝法测定苦荞发酵过程中的总黄酮含量。

精密吸取 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mL 浓度为 1 mg/mL 的芦丁标准溶液，定容至 5 mL，取 1mL 分别加入 3 mL 1 mol/L 乙酸钾和 2 mL 0.1 mol/L 三氯化铝溶液，用无水甲醇定容至刻度线后摇匀，在室温反应 30 min 后用分光光度计在 420 nm 处测定吸光度。以芦丁标准液浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线，得到芦丁标准品的回归方程。

取 1mL 稀释 40 倍的“3.2.1”中样品制备液于试管中，分别加入 3 mL 1 mol/L 乙酸钾和 2 mL 0.1 mol/L 三氯化铝溶液，无水甲醇定容后摇匀，于室温反应 30 min，用分光光度计在 420 nm 处检测吸光度，将其带入芦丁标准曲线方程中计算总黄酮的浓度。

3.3.5 总多酚含量测量

采用福林酚法测定苦荞发酵过程中的总多酚含量。

精密吸取 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mL 浓度为 0.2 mg/mL 没食子酸标准溶液定容至 5 mL，取 1mL 分别加入 2.5 mL 稀释 10 倍的福林酚溶液和 2.5 mL 15% NaCO₃ 溶液，用无水甲醇定容至刻度线后摇匀，在黑暗条件下反应 2 h 后用分光光度计在 760 nm 处检测吸光度。以没食子酸浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线。得到没食子酸标准品的回归方程。

取 1mL 稀释 40 倍的“3.2.1”中样品制备液于试管中，分别加入 2.5 mL 稀释 10 倍的福林酚溶液和 2.5 mL 15% NaCO₃ 溶液，在黑暗条件下反应 2 h 后用分光

度计 760 nm 处检测吸光度，将其带入没食子酸标准曲线方程中计算总多酚的浓度。

3.3.6 芦丁、槲皮素、山奈酚、阿魏酸、绿原酸含量测定

样品制备：称取发酵过苦荞粉末 1.000g，用甲醇定容至 25mL。超声 30min，补足缺失的甲醇至 25mL，用 0.22μm 超滤膜过滤。

3.3.6.1 芦丁、阿魏酸、绿原酸测定

标准品制备：称取 20 mg 芦丁、10 mg 阿魏酸、2 mg 绿原酸于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得 2 mg/mL 芦丁、1 mg/mL 阿魏酸、0.2 mg/mL 绿原酸母液。吸取 0.1 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL 母液，并用甲醇定容至 5 mL，得到标准液。

色谱条件：C₁₈ 色谱柱。流动相：乙腈：0.01 %磷酸水溶液=20:80。检测波长：329 nm；进样体积：20 μL；流速：1 ml/min；柱温：25℃。

3.3.6.2 槲皮素、山奈酚测定

标准品制备：称取 10 mg 槲皮素、10 mg 山奈酚于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容，得 1 mg/mL 槲皮素、1 mg/mL 山奈酚母液。稀释 10 倍后，吸取 0.1 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL 母液，并用甲醇定容至 5 mL，得到标准液。

色谱条件：C₁₈ 色谱柱。流动相：乙腈：0.01 %磷酸水溶液=40:60。检测波长：370 nm；进样体积：20 μL；流速：1 ml/min；柱温：25℃。

3.3.7 扫描电镜观察苦荞结构随发酵时间变化

同 2.3.1 中扫描电镜前处理。

3.3.8 淀粉及抗性淀粉检测

淀粉检测根据 GB 5009.9-2016《食品安全国家标准 食品中淀粉的测定》。

抗性淀粉检测使用抗性淀粉试剂盒 K-RSTAR 进行检测。

3.4 结果与分析

3.4.1 不同温度下莫纳可林 K 产量随时间变化

在 23℃、25℃以及 28℃条件下，红曲霉发酵产物莫纳可林 K 产量均随时间增加，如图 3-1 所示，前 9 天莫纳可林 K 产量增长迅速，第 11 天开始缓慢增加，最终在 23℃发酵条件下，莫纳可林 K 产量达到 142.31 mg/100g；在 25℃发酵条件下，莫纳可林 K 产量达到 187.10 mg/100g；在 28℃发酵条件下，莫纳可林 K

产量达到 115.46 mg/100g。在每个采样的时间点上，25℃发酵条件下的莫纳可林 K 产量均比 23℃、28℃的产量显著提高 ($p<0.05$)，在第 15 天，25℃发酵条件下的莫纳可林 K 产量比 23℃、28℃条件下分别提高了 31%以及 62%。

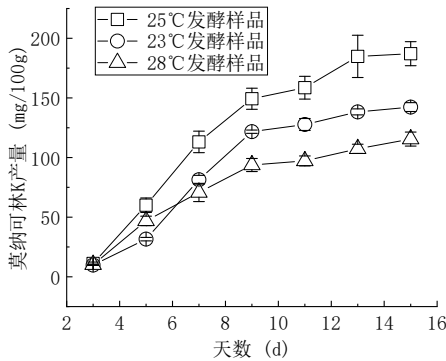


图 3-1 不同温度条件下莫纳可林 K 产量随时间变化

Fig.3-1 The yield of Monacolin K varied with time at different temperatures

3.4.2 不同温度下色价随时间变化

在 23℃、25℃以及 28℃条件下，发酵所得产物色价均随时间增加，如图 3-2 所示，前 9 天色价增长迅速，第 11 天开始缓慢增加，最终在 23℃发酵条件下，色价达到了 459.33 μ /g；在 25℃发酵条件下，色价达到 793.33 μ /g；在 28℃发酵条件下，色价达到 493.00 μ /g。在每个采样的时间点上，25℃发酵条件下的莫纳可林 K 产量均比 23℃、28℃条件下的产量显著提高 ($p<0.05$)，在第 15 天，25℃发酵条件下的色价比 23℃、28℃条件下分别提高了 60%以及 49%。

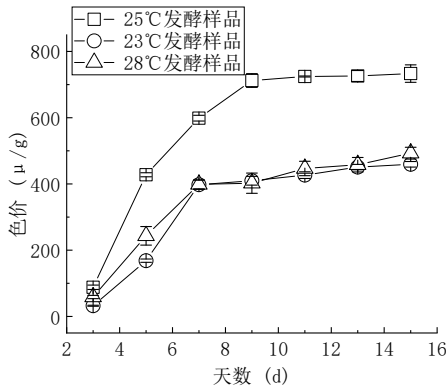


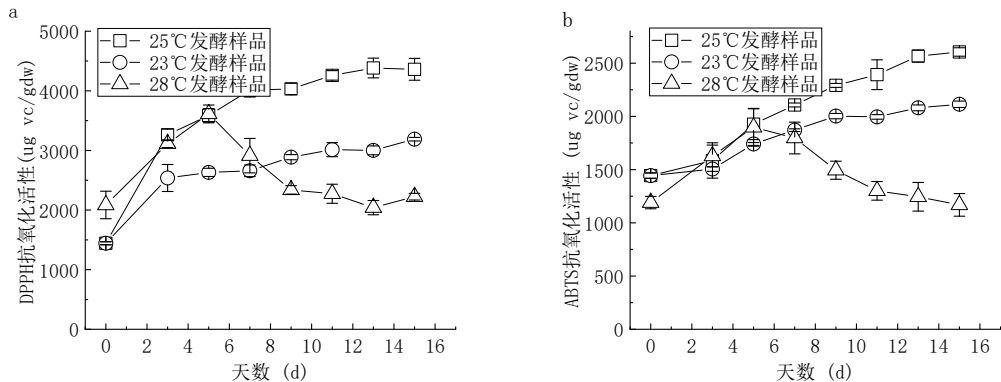
图 3-2 不同温度条件下色价随时间变化

Fig.3-2 The color value varied with time at different temperatures

3.4.3 不同温度下发酵苦荞抗氧化活性随时间变化

在 23℃和 25℃发酵条件下，发酵所得产物 DPPH 及 ABTS 抗氧化活性均随时间增加，而在 28℃发酵条件下，前 5 天 DPPH 及 ABTS 抗氧化活性增长迅速，

而从第七天开始其 DPPH 及 ABTS 抗氧化活性随时间减少（图 3-3）。在 23℃ 发酵条件下，DPPH 及 ABTS 抗氧化活性分别达到了 3188.79 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、2113.95 $\mu\text{g vc/gdw}$ ，较未发酵苦荞增长了 120%、46%；在 25℃ 发酵条件下，DPPH 及 ABTS 抗氧化活性分别达到了 4361.06 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、2605.04 $\mu\text{g vc/gdw}$ ，较未发酵苦荞增长了 202%、80%。25℃ 发酵条件下，第 15 天其发酵完苦荞的 DPPH 及 ABTS 抗氧化活性达到了 2224.46 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、1168.43 $\mu\text{g vc/gdw}$ 较未发酵苦荞未发现显著增长。



a-发酵苦荞 DPPH 抗氧化活性 b-发酵苦荞 ABTS 抗氧化活性

图 3-3 不同温度条件下色价随时间变化

Fig.3-3 The color value varied with time at different temperatures

3.4.4 不同温度下发酵苦荞总黄酮提取量随时间变化

在 23℃ 和 25℃ 条件下，发酵所得产物总黄酮提取量均随时间增加，如图 3-4 所示，在 23℃ 条件下第 3 天到第 9 天总黄酮含量增长迅速，第 9 天开始缓慢增加，最终总黄酮提取量达到了 179.45 mg/g ，较未发酵苦荞增长了 124%；在 25℃ 发酵条件下前 15 天总黄酮提取量增长迅速，总黄酮提取量达到了 214.26 mg/g ，较未发酵苦荞增长了 168%。而在 28℃ 发酵条件下，前 5 天发酵苦荞黄酮提取量增长迅速，而从第七天开始其黄酮提取量随时间减少，第 15 天其总黄酮提取量达到了 74.6 mg/g 较未发酵苦荞无显著变化。

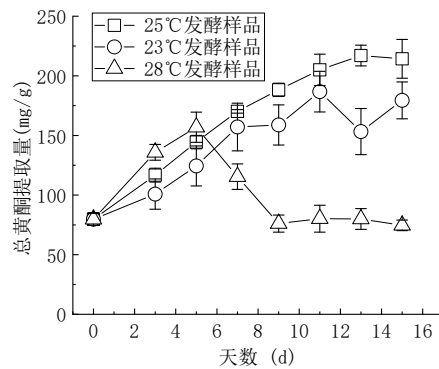


图 3-4 不同温度条件下黄酮含量随时间变化

Fig.3-4 The extraction quantity of flavonoid varied with time at different temperatures

3.4.5 不同温度下总多酚提取量随时间变化

在 23°C 和 25°C 条件下，发酵苦荞中总多酚提取量均随时间增加，如图 3-5 所示，其总多酚提取量分别达到了 28.93 mg/g、35.53 mg/g，较未发酵苦荞增长了 176%、239%。在 28°C 发酵条件下，发酵苦荞中总多酚提取量在前 5 天提取量增长迅速，达到了 27.60 mg/g，从第 7 天开始急速下降，并在第 15 天达到和未发酵苦荞齐平状态。

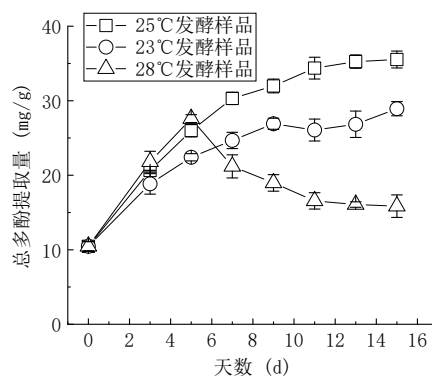


图 3-5 不同温度条件下多酚含量随时间变化

Fig.3-5 The extraction quantity of polyphenol varied with time at different temperatures

3.4.6 不同温度下芦丁提取量随时间变化

在 23°C 和 25°C 条件下，发酵苦荞中芦丁提取量均随时间增加，如图 3-6 所示，其芦丁提取量分别达到了 42.67 mg/g、47.06 mg/g，较未发酵苦荞增长了 53%、69%。在 28°C 发酵条件下，发酵苦荞中芦丁提取量在前 5 天含量增长迅速，达到了 39.21 mg/g，从第 7 天开始急速下降，并在第 15 天减少为 20.31 mg/g，减少了 27%。

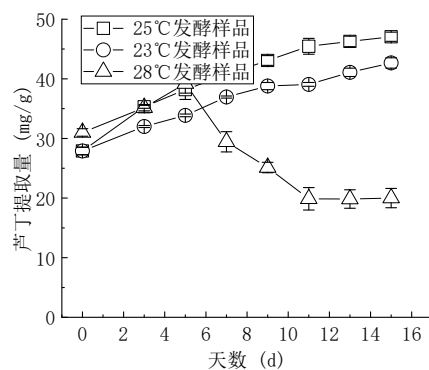


图 3-6 不同温度条件下芦丁提取量随时间变化

Fig.3-6 The extraction quantity of rutin varied with time at different temperatures

3.4.7 不同温度下槲皮素提取量随时间变化

在 23°C 和 25°C 条件下，发酵苦荞中槲皮素提取量均随时间增加，如图 3-7 所示，其槲皮素提取量分别达到了 324.10 $\mu\text{g/g}$ 、585.25 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞增长了 44%、160%。在 28°C 发酵条件下，发酵苦荞中槲皮素提取量在前 3 天含量增长迅速，达到了 457.14 $\mu\text{g/g}$ ，从第 5 天开始急速下降，并在第 15 天减少为 35.25 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞减少了 84%。

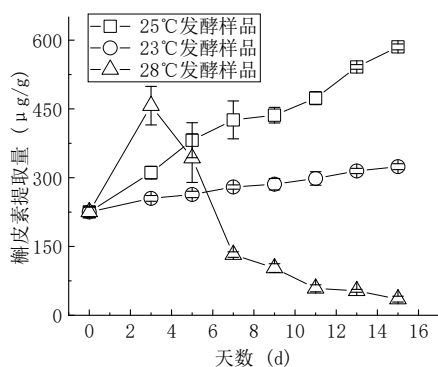


图 3-7 不同温度条件下槲皮素提取量随时间变化

Fig.3-7 The extraction quantity of quercetin varied with time at different temperatures

3.4.8 不同温度下山奈酚提取量随时间变化

在 23°C 和 25°C 条件下，发酵苦荞中山奈酚提取量均随时间增加，如图 3-8 所示，其山奈酚提取量分别达到了 54.52 $\mu\text{g/g}$ 、58.77 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞增长了 632%、689%。在 28°C 发酵条件下，发酵苦荞中山奈酚提取量随时间减少，在第 15 天山奈酚提取量减少到 1.19 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞减少了 84%。

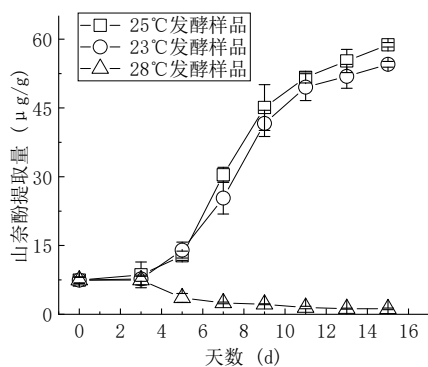


图 3-8 不同温度条件下山奈酚提取量随时间变化

Fig.3-8 The extraction quantity of kaempferol varied with time at different temperatures

3.4.9 不同温度下绿原酸提取量随时间变化

在 23°C 和 25°C 条件下，发酵苦荞中绿原酸提取量均随时间增加，如图 3-9 所示，其绿原酸提取量分别达到了 281.12 $\mu\text{g/g}$ 、316.13 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞增长了 207%、245%。在 28°C 发酵条件下，发酵苦荞中绿原酸提取量随时间减少，在第 15 天绿原酸提取量减少到 66.65 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞减少了 27%。

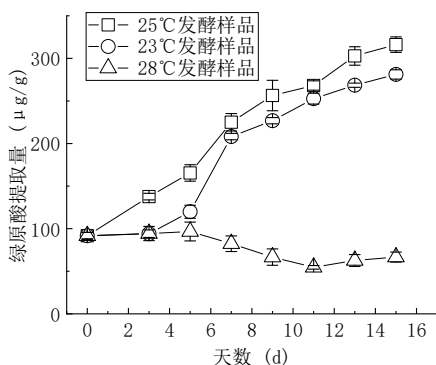


图 3-9 不同温度条件下绿原酸提取量随时间变化

Fig.3-9 The extraction quantity of chlorogenic acid varied with time at different temperatures

3.4.10 不同温度下阿魏酸提取量随时间变化

在 23°C 和 25°C 条件下，发酵苦荞中阿魏酸提取量均随时间增加，如图 3-10 所示，其阿魏酸提取量分别达到了 499.82 $\mu\text{g/g}$ 、501.95 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞增长了 64%、65%。在 28°C 发酵条件下，发酵苦荞中阿魏酸提取量随时间减少，在第 15 天阿魏酸提取量减少到 172.61 $\mu\text{g/g}$ ，较未发酵苦荞减少了 44%。

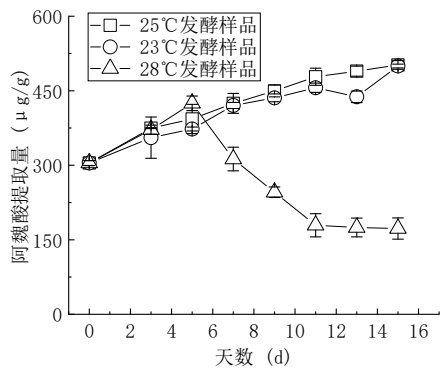
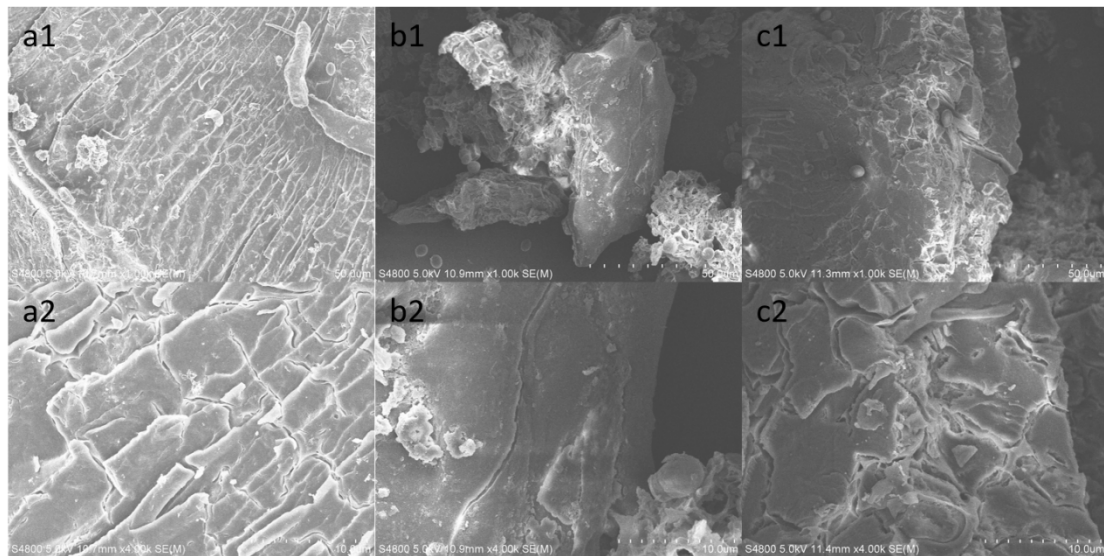


图 3-10 不同温度条件下阿魏酸提取量随时间变化

Fig.3-10 The extraction quantity of ferulic acid varied with time at different temperatures

3.4.11 苦荞结构随发酵时间增长的变化

如图 3-11 所示，通过扫描电镜观察到，随着发酵时间增加，其内部结构更加松散，内部产生更多的小孔洞，使得苦荞和萃取液接触的表面积增加，从而更加促进苦荞活性物质的释放。



a-未发酵苦荞 b-发酵 7 天苦荞 c-发酵 15 天苦荞

图 3-11 苦荞结构随发酵时间增长变化

Fig.3-11 The structure of tartary buckwheat changed with the increase of fermentation time

3.4.12 苦荞淀粉、抗性淀粉含量随发酵时间增长的变化

苦荞中淀粉含量约为 63.6%~72.5%，其中抗性淀粉含量为 7.5%~35%^[105]。如图 3-12 所示，所选苦荞中淀粉含量为 56.35 g/100g，其中抗性淀粉含量为 4.29 g/100g，约占苦荞淀粉含量 7.6%。随着发酵进程在第 15 天时，发酵苦荞中淀粉含量仅为 27.81 g/100g。等人通过自然发酵的方式发现，其青稞淀粉在发酵的 72 小时淀粉含量显著降低，这是因为苦荞中淀粉作为微生物的发酵主要碳源被消

耗^[106]。而苦荞中的抗性淀粉却没有被消耗，发酵结束时达到了 7.10 g/100g，其抗性淀粉含量从原本的 7.6%增长到 25.5%，同样的 Yuan Tu 等人的研究发现，通过酵母和乳酸菌共培养发酵大米，在低剂量接种时，可以提高大米的中抗性淀粉含量，这是由于微生物产生的 α -淀粉酶不能分解抗性淀粉，而总淀粉含量的降低导致抗性淀粉含量升高^[107]。

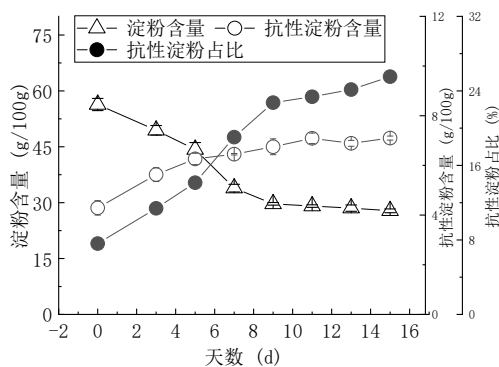


图 3-12 苦荞淀粉、抗性淀粉含量发酵时间增长变化

Fig.3-12 Changes of starch and resistant starch contents in Tartary buckwheat during fermentation

3.5 本章小结

HQ-1 在 25℃ 条件下固态发酵最优，其产物的莫纳卡林 K 含量、色价在第 15 天达到了 187.10 mg/100g、793.33 μ g。

苦荞中含有黄酮多酚类物质，红曲霉发酵可以有效地提高苦荞黄酮多酚类物质的萃取率。在 25℃ 条件下随着发酵进行，从苦荞中萃取的芦丁、槲皮素、山奈酚、绿原酸、阿魏酸含量从原本的 27.9 mg/g、225.26 μ g/g、7.45 μ g/g、91.66 μ g/g、304.52 μ g/g 提升至 47.06 mg/g、585.25 μ g/g、58.77 μ g/g、316.13 μ g/g、501.95 μ g/g，分别提升了 68%、159%、688%、244%、65%，其 DPPH 抗氧化活性和 ABTS 抗氧化活性分别提高了 202%和 80%。

发酵过后苦荞中的淀粉含量从原本的 56.35 g/100g 下降至 27.81 g/100g。其中抗性淀粉含量从 4.29 g/100g 提升至 7.10 g/100g，最终红曲苦荞中抗性淀粉的占比为 25.5%，提升了 235.5%。

第 4 章 苦荞红曲代用茶加工工艺及营养价值评价

4.1 前言

近年来，苦荞的保健功能已经引起人们的广泛重视，其不仅拥有平衡的氨基酸，丰富的脂类成分、膳食纤维和微量元素等，其中总黄酮具有降血脂、抗炎等功能。苦荞红曲茶是苦荞产品开发的一个重要方向，其加工利用从传统加工逐渐变化到多元化、功能性食品发展。在苦荞红曲茶的制备过程中，烘焙的工艺参数对苦荞品质影响较大，为研究烘焙温度和烘焙时间对苦荞红曲茶品质的影响，优化烘焙工艺，本研究将设置不同的烘焙时间和烘焙温度，对 25℃发酵 15 天的苦荞进行烘焙，测定了样品中莫纳可林 K、色价、总黄酮、总多酚、抗氧化活性、芦丁含量，研究烘焙时间和烘焙温度对苦荞红曲茶品质的影响，优化苦荞红曲茶烘焙工艺，丰富苦荞产品的多样性。

4.2 实验材料

4.2.1 主要仪器及试剂

仪器同 2.2.2

表 4-1 主要试剂

Table 3-1 Main reagents

试剂	厂家	级别
芦丁	上海麦克林生化科技有限公司	97%
槲皮素	上海麦克林生化科技有限公司	97%
山奈酚	上海麦克林生化科技有限公司	97%
绿原酸	上海麦克林生化科技有限公司	98%
阿魏酸	上海麦克林生化科技有限公司	99%
莫纳可林 K	东京化成工业株式会社	98%
1,1-二苯基-2-苦基肼（DPPH）	上海麦克林生化科技有限公司	98%
2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑 啉-6-磺酸（ABTS）	上海麦克林生化科技有限公司	98%
抗性淀粉试剂盒 K-RSTAR	爱尔兰 megazyme	
抗坏血酸	Solarbio	99%

4.3 实验方法

4.3.1 苦荞烘焙

取发酵完苦荞 10.0 g，平铺于锡箔纸上，放置于预热 20 min 的烘箱中，共设置 9 个培养条件（见表 4-3）来优化不同烘烤时间与温度对红曲苦荞茶的茶叶品相、营养价值进行评价。

表 4-2 烘烤条件与编号

Table 4-2 Baking condition and number

编号	温度（℃）	时间（min）
HK-1	150	10
HK-2	150	15
HK-3	150	20
HK-4	170	10
HK-5	170	15
HK-6	170	20
HK-7	190	10
HK-8	190	15
HK-9	190	20

4.3.2 品质评价

烘烤过苦荞通过茶汤色泽、气味、口味以及苦荞成品质感 4 个方面进行评价，具体评分通过表 4-4 进行评价，评定小组由 10 人组成。

表 4-3 红曲苦荞茶品相评价标准

Table 4-3 Evaluation standard of tartary buckwheat tea

指标	品质	评分	档次
茶汤	颜色为金黄色	90	优秀
	颜色接近金黄色	80	良好
	颜色较浅	70	中等
	颜色很浅	60	较差
香气	有浓郁的焦香味	90	优秀
	有较浓郁的焦香味	80	良好
	焦香味较淡	70	中等
	焦香味很淡	60	较差
口味	有浓郁的焦香味，回味悠长	90	优秀
	有较浓郁的焦香味，回味较长	80	良好
	焦香味较淡，略有异味	70	中等
	焦香味很淡，有异味	60	较差
成品质感	颜色为金黄色，有浓郁的焦香味	90	优秀
	颜色接近金黄色，有较浓郁的焦香味	80	良好
	颜色较浅或较深，焦香味较淡	70	中等
	颜色浅或深，焦香味很淡，有异味	60	较差

利用模糊数学综合评价方式评价红曲苦荞茶烘焙后的品质。步骤如下：

（1）以不同烘焙条件下的苦荞红曲茶作为确定对象集 A 。 $A=\{a_1, a_2, a_3, \dots, a_9\}$ ， $a_1 \sim a_9$ 分别对应本实验的烘焙红曲苦荞茶编号 HK-1~HK-9。

（2）以红曲苦荞茶的茶汤、香气、口味、成品质感最为评价指标，确定评价指标集 $X=\{x_1, x_2, x_3, x_4\}$ ，其中 $x_1 \sim x_4$ 分别上述指标一一对应。

（3）确定评分集 $U=\{60, 70, 80, 90\}$ 。

（4）采用强制确定法确定评价指标的权重，分别为茶汤（0.2）、香气（0.3）、口味（0.35）、成品质感（0.15），对应权重集 $Y=\{y_1, y_2, y_3, y_4\}$ ， $y_1 \sim y_4$ 分别对应上述指标，即 $Y=\{0.2, 0.3, 0.35, 0.15\}$ 。

4.3.3 莫纳卡林 K 检测

同 2.3.3.2。

4.3.4 色价检测

参照国标 GB1886.19-2015《食品国家安全标准 食品添加剂 红曲米》。

4.3.5 抗氧化活性检测

同 2.3.3.4。

4.3.6 总黄酮提取量检测

同 3.3.4。

4.3.7 总多酚提取量检测

同 3.3.5。

4.3.8 芦丁取量检测

同 3.3.6。

4.3.9 淀粉、抗性淀粉检测

同 3.3.8。

4.3.10 脂肪含量检测

参照国标 GB 5009.6-2016《食品国家安全标准 食品中脂肪的测定》。

4.3.11 蛋白质含量检测

参照国标 GB 5009.5-2016《食品国家安全标准 食品中蛋白质的测定》。

4.4 结果与分析

4.4.1 感官评价

根据表 4-4 评定小组给出的投票，运用模糊数学原理，确定模糊评价矩阵，将表 4-4 中的结构除以总人数，得到 R_j 的模型矩阵：

$$R_j = \begin{bmatrix} r_{11} & \cdots & r_{14} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{i1} & \cdots & r_{i4} \end{bmatrix}$$

其中 j 为样品编号对应 HK-1~HK-9， i 为感官评价因素，分别对应茶汤、香气、口味、成品质感四个指标。根据模糊变换原理，综合感官评价结果 $B_j = Y \times R_j$ ，得出结果见表 4-5。

表 4-4 感官评价结果

Table 4-4 Sensorv evaluation results

评价因素																
因素	成品质感				气味				口感				茶汤			
	差	中等	良好	优秀	差	中等	良好	优秀	差	中等	良好	优秀	差	中等	良好	优秀
HK-1	2	3	2	3	1	4	4	1	3	4	2	1	2	4	3	1
HK-2	2	2	2	4	1	1	4	3	2	4	2	2	0	3	5	2
HK-3	2	2	3	3	3	2	2	3	2	4	1	3	1	3	2	4
HK-4	1	1	4	4	1	1	4	4	0	1	2	7	0	2	2	6
HK-5	0	1	1	8	1	1	1	7	0	0	2	8	0	0	2	8
HK-6	0	0	4	6	0	0	3	7	1	2	2	5	0	2	2	6
HK-7	0	1	2	7	0	0	2	8	0	1	2	7	0	0	2	8
HK-8	2	1	3	4	0	2	4	4	0	1	4	5	1	1	3	5
HK-9	1	1	4	4	0	2	4	4	2	3	4	1	2	3	4	1

表 4-5 综合感官评价结果

Table 4-5 Comprehensive sensory evaluation results

编号	优秀	良好	中等	差
HK-1	0.1	0.305	0.37	0.21
HK-2	0.22	0.36	0.245	0.125
HK-3	0.32	0.185	0.295	0.215
HK-4	0.485	0.3	0.165	0.05
HK-5	0.66	0.255	0.05	0.05
HK-6	0.515	0.295	0.16	0.03
HK-7	0.65	0.275	0.06	0.015
HK-8	0.39	0.38	0.165	0.035
HK-9	0.19	0.4	0.28	0.115

根据给个评价指标结果乘以相应得分并进行加和，最后得出样品得分 D， $D_j = B_j \times U$ ，结果见表 4-7。

表 4-7 综合感官评价得分

Table 4-7 Comprehensive sensory evaluation score

编号	HK-1	HK-2	HK-3	HK-4	HK-5	HK-6	HK-7	HK-8	HK-9
得分	55.15	61	62.95	74.4	81.25	75.9	81.2	71	62.55

对 9 个样品进行评价发现，HK-5、HK-7 的评分较高，烘焙条件为温度 170℃ 和 190℃，时间分别为 15 min、10 min。

4.4.2 莫纳可林 K 含量

如图 4-1 所示，红曲苦荞茶中莫纳可林 K 含量在不同烘焙温度下均随时间增加而减少，在 150℃ 条件下，烘焙 20 min 后样品莫纳可林 K 含量仅为烘焙 10 min 样品的 51%，并且随着烘焙温度增加，其莫纳可林 K 含量减少量增加，170℃ 条件下烘焙 20 min 样品的仅为莫纳可林 K 含量烘焙 10 min 样品的 34%。在较短时间内（10min 左右）莫纳可林 K 的含量随烘焙温度变化不明显，HK-1、HK-4、HK-7 其莫纳可林 K 的含量均为有明显的变化。有研究表明，莫纳可林 K 在 110℃ 左右，加热 30 min 后其含量显著减少，因此为了考虑到红曲苦荞茶的莫纳可林 K 含量，可以适当采取较高温度短时间烘焙的方式，以保证莫纳可林 K 的含量。

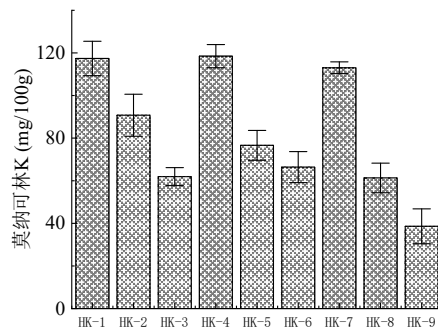


图 4-1 不同烘焙条件下莫纳可林 K 含量

Fig.4-1 Content of Monacolin K in different baking conditions

4.4.3 色价检测

对 9 个不同烘焙条件的红曲苦荞茶样品进行色价的测量,结果如图 4-2 所示。随着烘焙温度的增加,其色价随着温度增加而增加,并且在较高温度下,随着时间增长,其色价也随之增高,而在较低温度下(150℃),其随时间变化不明显。

这是由于红曲苦荞茶在高温烘焙下,发生了美拉德反应。苦荞中含有的丰富蛋白质和糖类,随着高温烘焙的进行,蛋白质会分解为氨基酸并且和还原糖反应生成黑褐色的物质,从而使得红曲苦荞茶中色价增加。并且,随着温度变高,时间边长,蛋白质分解和还原糖反应加快,使得色价变化的更快。

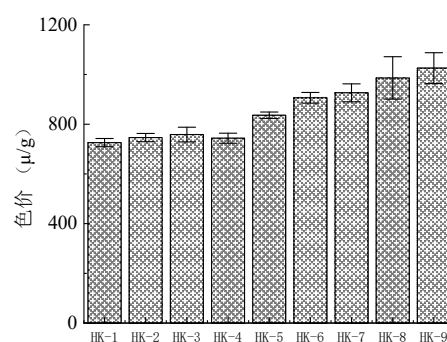


图 4-2 不同烘焙条件下色价

Fig.4-2 Color value in different baking conditions

4.4.4 烘焙后抗氧化活性

如图 4-3 所示,红曲苦荞代用茶的 DPPH 抗氧化活性随着烘焙时间增长而减少,在较低温度时,15 min 内 DPPH 抗氧化活性变化不明显,而 20 min 后其 DPPH

抗氧化活性减少了 16%。随着温度上升，其 DPPH 抗氧化活性减少量增加，在 190℃时条件下，烘焙 20 min 后其 DPPH 抗氧化活性仅为烘焙 10 min 的 77%。

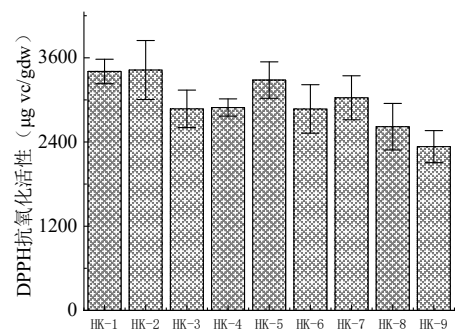


图 4-3 不同烘焙条件下 DPPH 抗氧化活性

Fig.4-3 Antioxidant activity of DPPH under different baking conditions

如图 4-4 所示，红曲苦荞代用茶的 ABTS 抗氧化活性随着烘焙时间增长而减少，在较低温度时，15 min 内 ABTS 抗氧化活性变化不明显，而 20 min 后其 ABTS 抗氧化活性减少了 12%。随着温度上升，其 ABTS 抗氧化活性减少量增加，在 190℃时条件下，烘焙 20 min 后其 ABTS 抗氧化活性仅为烘焙 10 min 的 59%。

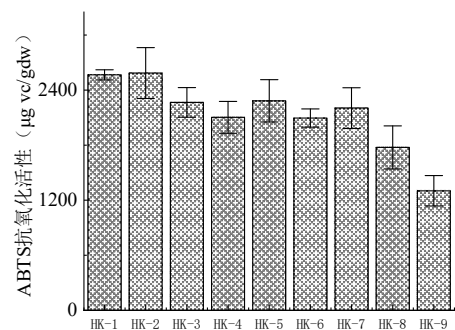


图 4-4 不同烘焙条件下 ABTS 抗氧化活性

Fig.4-4 Antioxidant activity of ABTS under different baking conditions

4.4.5 烘焙后总黄酮提取量

如图 4-5 所示，红曲苦荞代用茶的黄酮提取量随着烘焙时间增长而减少，在较低温度时，15 min 内黄酮提取量变化不明显，而 20 min 后其黄酮提取量减少了 12%。随着温度上升，其总黄酮提取量减少量增加，在 190℃时条件下，烘焙 20 min 后其总黄酮提取量仅为烘焙 10 min 的 66%。红曲苦荞代用茶黄酮含量在烘焙条件为 170℃下时，有小幅增加，后又急剧减少，这可能是因为更高的温度使得其水分蒸发的更多，造成其黄酮含量增加，而随着时间增长，黄酮类物质

在高温环境下分解成小分子物质。还有研究推断，高温会诱导植物产生抗氧化酶，从而促进总黄酮的积累。红曲苦荞代用茶烘焙后黄酮提取量变化趋势与其抗氧化活性变化趋势相似。

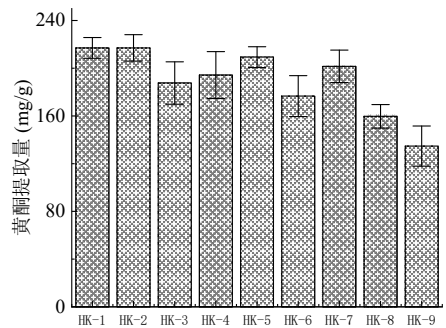


图 4-5 不同烘焙条件下黄酮提取量

Fig.4-5 Total flavonoids extraction under different baking conditions

4.4.6 烘焙后总多酚提取量

如图 4-6 所示，红曲苦荞代用茶的总多酚提取量随着烘焙时间增长而减少，在较低温度时，15 min 内总多酚取量变化不明显，而 20 min 后其总多酚提取量减少了 10%。随着温度上升，其总多酚提取量减少量增加，在 190℃时条件下，烘焙 20 min 后其总多酚提取量仅为烘焙 10 min 的 51%。红曲苦荞代用茶多酚含量在烘焙条件为 170℃下时，有小幅增加，后又急剧减少，这可能是由于更高的温度使得其水分蒸发的更多，造成其多酚含量增加，而随着时间增长，多酚类物质在高温环境下分解成小分子物质。

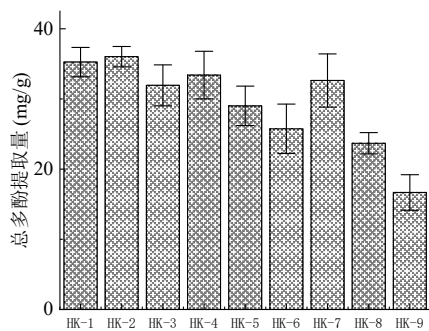


图 4-6 不同烘焙条件下总多酚提取量

Fig.4-6 Total polyphenol extraction under different baking conditions

4.6.7 烘焙后芦丁含量

如图 4-7 所示, 红曲苦荞代用茶的芦丁提取量随着烘焙时间增长而减少, 在较低温度时, 15 min 内芦丁取量变化不明显, 而 20 min 后其芦丁提取量减少了 20%。随着温度上升, 其芦丁提取量减少量增加, 在 190℃时条件下, 烘焙 20 min 后其总多酚提取量仅为烘焙 10 min 的 52%。红曲苦荞代用茶芦丁含量在烘焙条件为 170℃下时, 有小幅增加, 后又急剧减少, 这可能是因为更高的温度使得其水分蒸发的更多, 造成其多酚含量增加, 而随着时间的增长, 芦丁在较高温环境下被红曲霉降解。

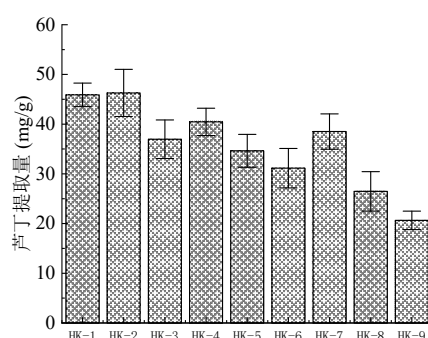


图 4-6 不同烘焙条件下芦丁提取量

Fig.4-6 Extraction of rutin under different baking conditions

4.4.8 对选择最优烘焙条件后的红曲苦荞茶品质进行评价

根据《食品安全国家标准 食品添加剂 红曲米》中要求, 对红曲苦荞茶进行理化指标进行检测。

4.4.8.1 理化指标

如表 4-7 所示, 按照国家标准中的要求, 进行了水分、黄曲霉毒素、色价、总砷、重金属检测, 除了色价未达到标准, 其他指标均符合《食品安全国家标准 食品添加剂 红曲米》中规定要求。

表 4-7 生理生化指标

Table 4-7 Physiological and biochemical indexes

检测项目	数值	标准限值	参考标准
水分/%	7.4	<10	GB 5009.3
黄曲霉毒素 B1/(μg/kg)	未检出	<5	GB/T 5009.22
色价/(μg)	837	>1000	GB 1886.19-2015
总砷(以 As 计)/(mg/kg)	未检出	<1	GB 5009.11
重金属(以 Pb 计)/(mg/kg)	未检出	<10	GB 5009.74

4.4.8.2 红曲苦荞茶营养物质含量

如表 4-8 所示,红曲苦荞茶较未发酵苦荞其营养物质含量发生很大程度的变化。其中红曲苦荞茶蛋白质含量较苦荞增长了 160%,并且淀粉含量显著下降,仅为苦荞中的 47%,而其中抗性淀粉含量增加了 69%。同时,红曲苦荞茶中黄酮、多酚含量均发生了增长,分别增长了 120%、220%。

表 4-8 红曲苦荞茶营养物质含量

Table 4-8 Nutrient content of *Monascus tartary* buckwheat tea

检测项目	苦荞	红曲苦荞茶
水分/(%)	2.7	7.4
蛋白质/(%)	11.3	29.4
脂肪/(%)	2.7	1.7
淀粉/(%)	58.8	27.8
抗性淀粉/(%)	4.2	7.1
总黄酮/(mg/g)	79.7	176.8
总多酚/(mg/g)	10.5	32.6
芦丁/(mg/g)	31	47.06
莫纳可林 K/(mg/100g)	未检出	113.62

4.5 本章小结

本章通过 9 个不同的烘焙温度和烘焙时间制作苦荞红曲茶,烘焙条件分别为 HK-1、HK-2、HK-3、HK-4、HK-5、HK-6、HK-7、HK-8、HK-9,以感官评

价、莫纳可林 K、抗氧化活性、色价、总黄酮、总多酚、芦丁为指标优化出最佳的烘焙条件。

通过以上综合指标确定 HK-5 为最佳烘焙工艺样品，烘焙条件为温度 190℃ 时间 10 min。其感官评价分、莫纳可林 K、DPPH 和 ABTS 抗氧化活性、色价、总黄酮、总多酚、芦丁分别为 81.2、113.04 mg/100g、3029.77 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、2203.88 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、926.33 μg 、201.58 mg/g、32.63 mg/g、38.51 mg/g。

第 5 章 总结与展望

5.1 总结

研究表明:

通过从市售苦荞中筛选出三株红曲霉菌株 HQ-1、HQ-0、HQ-QZ, 并通过固态发酵对比三株菌株莫纳可林 K 产量, 发现 HQ-1 莫纳可林 K 产量最高, 达到了 140.36 mg/100g。后续选择 HQ-1 菌株进行单因素以及响应面优化, 得到最优发酵条件为: 25 g 苦荞添加 21 mL 营养液, 营养液含 NH_4NO_3 2.77 g/L, ZnSO_4 1.82 g/L, MgSO_4 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, pH 调节到 2.58。并在此优化工艺下, 莫纳可林 K 产量达 187.10 mg/100g。

HQ-1 在 25℃ 条件下固态发酵产物的莫纳卡林 K 含量、色价、发酵产物的 DPPH 和 ABTS 抗氧化活性、黄酮提取量、多酚提取量、芦丁、槲皮素、山奈酚、绿原酸、阿魏酸提取量, 并在第 15 天, 分别达到了 187.10 mg/100g、793.33 $\mu\text{g/g}$ 、4361.06 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、2605.04 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、214.26 mg/g、35.53 mg/g、47.06 mg/g、585.25 $\mu\text{g/g}$ 、58.77 $\mu\text{g/g}$ 、316.13 $\mu\text{g/g}$ 、501.95 $\mu\text{g/g}$ 。苦荞中芦丁、槲皮素、山奈酚、绿原酸、阿魏酸等黄酮多酚类物质的萃取量显著提高, 分别提高了 68%、159%、688%、244%、65%; DPPH 抗氧化活性和 ABTS 抗氧化活性分别提高了 202% 和 80%, 淀粉含量降低了 51%, 抗性淀粉含量从 4.29 g/100g 提高到 7.10 g/100g。通过红曲霉发酵, 提高了苦荞中酚酸、黄酮类化合物的含量, 提高其抗性淀粉含量, 使得红曲苦荞茶具有更好的降血脂等功能性作用。

通过对不同烘焙条件的摸索, 我们发现通过高温短时间烘焙可以在保证红曲苦荞茶的口感品质下, 最大程度保留了活性物质, 在 190℃ 下烘焙 10 min, 可以获得较高的品质评分, 并且其莫纳卡林 K 含量、色价、DPPH 和 ABTS 抗氧化活性以及黄酮提取量、多酚提取量、芦丁提取量仍分别可达到 113.62 mg/100g、926.33 $\mu\text{g/g}$ 、3029.77 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、2203.88 $\mu\text{g vc/gdw}$ 、201.58 mg/g、32.63 mg/g、38.51 mg/g。

5.2 创新点

(1) 通过使用苦荞来替代传统大米作为红曲霉的发酵基质, 增强其保健功

效。

(2) 通过红曲霉发酵使得苦荞中黄酮多酚类物质很容易被提取出来，从而提高苦荞茶的营养价值。

5.3 展望

苦荞含有丰富的营养物质，本文优化了红曲苦荞发酵工艺，测定了苦荞发酵过程中部分营养物质的变化，研究了苦荞红曲茶的加工工艺，测定了苦荞红曲茶的多个指标，但是仍然存在许多不足之处。

(1) 对苦荞发酵过程的研究略有欠缺，尚未明确苦荞发酵过程中营养物质和活性物质变化的根本原因和机理。

(2) 尚未能通过动物实验进一步验证红曲苦荞茶的功效。

本文的试验结果为苦荞产品的加工和研究奠定了理论基础，以上不足之处还有待进一步考察和研究。

攻读学位期间发表的学术论文

- 1.高晨,葛晓丽,李松,陈阿娜*等.红曲霉发酵苦荞产莫纳可林 K 及可溶性黄酮类物质过程控制[J/OL].食品与发酵工业.

致谢

本论文是在导师陈阿娜教授和李松副教授的精心指导下完成的。从论文的选题、内容设计、实验过程到论文的写作、修改无不倾注着导师的心血和汗水。三年来，导师不仅给予我学习、工作、生活上的关怀，更教会了我们做人的风范。导师广博的知识、敏锐的洞察力和严谨的治学态度都使我获益匪浅，那种谦和、宽容、大度和超凡脱俗的风范将是我学习的楷模。在此谨向我的恩师表达最真诚的谢意！

此外，在论文的实施过程中，还得到了学院的葛飞、朱龙宝、张琴、张伟伟、宋平、戴清源、王军等各位老师的支持和帮助，他们在开题和中期检查过程中给我提出了诸多宝贵意见，为本论文的完善奠定了基础，在此向他(她)们表示衷心的感谢。

另外还要感谢我系所有同学以及我的室友，在三年的研究生学习和生活中给予我无私的帮助和支持，尤其是师兄姐妹们给予我顺利完成实验的配合与协助！

最后，特别感谢我的家人和朋友，是他们的无私奉献、宽容和理解支撑着我、激励着我，使我得以顺利完成学业。在此，谨向我的家人和朋友道一声：辛苦了，谢谢！

参考文献

- [1]肖杰,王曦,侯粲等.苦荞调控糖脂代谢作用及其生物学机制研究进展[J].食品科学,2019,40(21):343-349.
- [2]赵佐成,周明德,王中仁等.中国苦荞及其近缘种的遗传多样性研究[J].遗传学报,2002,29(08):723-734.
- [3]Cai Y Z, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer[J].Life Sciences,2004,74:2157-2184.
- [4]Ren Q, Wu C, Ren Y, et al. Characterization and identification of the hemical constituents from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) by high performance liquid chromatography photodiode array detector linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2013, 136(3):1377-1389.
- [5]Li S Q, Zhang Q H. Advances in the development of functional foods from buckwheat[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,2001, 41:451-464.
- [6]Wijngaard H H, Arendt E K. Buckwheat[J]. Cereal Chemistry,2006,83:391-401.
- [7]Fabjan N, Rode J, Kosir I. J, et al. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51:6452-6455.
- [8]Yao, Y, Shan, F, Bian, J, et al. D-chiro-inositolenriched tartary buckwheat bran extract lowers the blood glucose level in KKAY mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 10027-10031.
- [9]Zhu F. Buckwheat starch: Structures, properties, and applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 49:121-135.
- [10]Bonafaccia G, Marocchini M, Kreft I. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 9-15.
- [11]Qin P, Wang Q, Shan F, et al. Nutritional composition and flavonoids content of flour from different buckwheat cultivars[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45: 951-958.
- [12] Zhou X L, Yan B B, Xiao Y, et al. Tartary buckwheat protein reverted dyslipidemia in

- high-fat diet-fed mice associated with gut microbiota changes[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 119: 296-301.
- [13]Guo X D, Wang M, Gao J M, et al. Bioguided fraction of antioxidant activity of ethanol extract from tartary buckwheat bran[J]. Cereal Chemistry, 2012, 89: 311-315.
- [14]Guo X D, Wu C S, Ma Y J, et al. Comparison of milling fractions of tartary buckwheat for their phenolics and antioxidant properties[J]. Food Research International, 2012, 49: 53-59.
- [15]Kim Y B, Thwe A A, Kim Y J, et al. Characterization of genes for a putative hydroxycinnamoyl-coenzyme a quinate transferase and p-coumarate 3O-hydroxylase and chlorogenic acid accumulation in tartary buckwheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 4120-4126.
- [16]Matsui T, Kudo A, Tokuda S, et al. Identification of a new natural vasorelaxant compound, (+)-osbeckic acid, from rutin-free tartary buckwheat extract[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 10876-10879.
- [17]Ren Q, Wu C, Ren Y, et al. Characterization and identification of the chemical constituents from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) by high performance liquid chromatography/photodiode array detector/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2013, 136: 1377-1389.
- [18]Kim S J, Zaidul I S M, Suzuki T, et al. Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts[J]. Food Chemistry, 2008, 110: 814-820.
- [19]Eguchi K, Sato, T. Differences in the ratios of cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside to total anthocyanin under UV and non-UV conditions in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn)[J]. Plant Production Science, 2009, 12: 150-155.
- [20]Zhu F, Cai Y Z, Bao J S, et al. Effect of γ -irradiation on phenolic compounds in rice grain[J]. Food Chemistry, 2010, 120: 74-77.
- [21]Ma Y J, Guo X D, Liu H, et al. Cooking, textural, sensorial, and antioxidant properties of common and tartary buckwheat noodles[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22: 153-159.
- [22]Tsai H, Deng H, Tsai S, et al. Bioactivity comparison of extracts from various parts of common and tartary buckwheats: Evaluation of the antioxidant and angiotensin-converting

- enzyme inhibitory activities[J]. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6: 78-90.
- [23] Wang L, Yang X, Qin P, et al. Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 49: 312-317.
- [24] Li D, Li X, Ding X. Composition and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from tartary buckwheat grains[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19: 711-716.
- [25] Wang A, Zhang J, Li Z. Correlation of volatile and nonvolatile components with the total antioxidant capacity of tartary buckwheat vinegar: Influence of the thermal processing[J]. *Food Research International*, 2012, 49: 65-71.
- [26] Sunan Wang, Fan Zhu. Dietary antioxidant synergy in chemical and biological systems[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(11): 2343-2357.
- [27] Gong F, Li F, Zhang W, et al. Effects of crude flavonoids from tartary buckwheat on alloxan induced oxidative stress in mice[J]. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2012, 7: 124-130.
- [28] Zhang X, Yuan J M, Cui X D, et al. Molecular cloning, recombinant expression, and immunological characterization of a novel allergen from tartary buckwheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 10947-10953.
- [29] Singh J, Dartois A, Kaur L. Starch digestibility in food matrix: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21: 168-180.
- [30] Zhu F. Buckwheat starch: Structures, properties, and applications[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 49: 121-135.
- [31] Barter P, Gotto A M, LaRosa J C, et al. Treating to new targets investigators. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events[J]. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357: 1301-1310.
- [32] Kuwabara T, Han K H, Hashimoto N, et al. Tartary buckwheat sprout powder lowers plasma cholesterol level in rats[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2007, 53: 501-507.
- [33] Wieslander G, Fabjan N, Vogrincic M, et al. Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: A double blind crossover study in day-care centre staffs[J]. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2011, 225: 123-130.
- [34] Wieslander G, Fabjan N, Vogrincic M, et al. Effects of common and Tartary buckwheat

- consumption on mucosal symptoms, headache and tiredness: A double-blind crossover intervention study[J]. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2012, 10: 107-110.
- [35]Shan B, Cai Y Z, Brooks J D, et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117: 112-119.
- [36]Wang L, Yang X, Qin, P, et al. Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 49: 312-317.
- [37]Traoré L, Boua B B, Guessennd N K, et al. In Vitro antibacterial potential of glycosidic and aglyconic crude extracts of *Cassia Sieberiana* Dc. (Cesalpiniaceae) and *Khaya Grandifoliola* C.Dc. (Meliaceae): A comparative survey. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, 6: 2728-2733.
- [38]Li Y, Gao F, Shan F, et al. Study on the interaction between 3 flavonoid compounds and α -amylase by fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics[J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74, C199-C203.
- [39]Li Y Q, Yang P, Gao F, et al. Probing the interaction between 3 flavonoids and pancreatic lipase by methods of fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 233, 63-69.
- [40]Qin P, Wu L, Yao Y, et al. Changes in phytochemical compositions, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities during the processing of tartary buckwheat tea[J]. *Food Research International*, 2013, 50: 562-567.
- [41]Cao W, Chen W J, Suo Z R, et al. Protective effects of ethanolic extracts of buckwheat groats on DNA damage caused by hydroxyl radicals[J]. *Food Research International*, 2008, 41: 924-929.
- [42]Vogrincic M, Kreft I, Filipic M, et al. Antigenotoxic effect of Tartary (*Fagopyrum tataricum*) and common (*Fagopyrum esculentum*) buckwheat flour[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2013, 16, 944-952.
- [43]Nimnoi P, Lumyong S. Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment productionp[J]. *Food Bioprocess Technol* 2011,4(4): 1384-90.
- [44]胡久平,鄢平,戚珊珊等.发酵条件对青稞红曲中 Monacolin K 和 β -葡聚糖的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(03):134-139.

- [45]Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. Antibiot (Tokyo). 1979, 32(8): 852-4.
- [46]Li YG, Zhang F, Wang ZT, et al. Identification and chemical profiling of monacolins in *Monascus purpureus* rice using highperformance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry[J]. Pharm Biomed Anal, 2004, 35(5): 1101-12.
- [47]Stubbs R, Schwartz M, Bayne W. Determination of mevinolin and mevinolinic acid in plasma and bile by reversed-phase high-performance liquid chromatography[j]. Chromatogr, 1986, 383: 438-443.
- [48]Niknejad N, Morley M, Dimitroulakos J. Activation of the integrated stress response regulates lovastatin-induced apoptosis[J]. Biol. Chem, 2007, 282 (41): 29748-29756.
- [49]Kim J H, Kim H J, Park H W, et al. Development of inhibitors against lipase and α -glucosidase from derivatives of monascus pigment[J]. FEMS Microbiol. Lett, 2007, 276(1): 93-98.
- [50]Manandhar K L, Apinis A E. Temperature relations in *Monascus*[J]. Trans Br Mycol Soc. 1971, 57(3): 465-72.
- [51]Suraiya S, Kim J H, Tak J Y, et al. Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate[J]. Lebensm Wiss Technol, 2018, 92: 1-9.
- [52]Suraiya S, Kim J H, Tak J Y, et al. Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate[J]. Lebensm Wiss Technol, 2018, 92: 1-9.
- [53]Tsukahara M, Shinzato N, Tamaki Y, et al. *Monascus purpureus* rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 158(2): 476-82.
- [54]Lin L, Wang C, Li Z, et al. Effect of temperature-shift and temperature-constant cultivation on the monacolin K biosynthetic gene cluster expression in *Monascus* spp.[J]. Food Technol Biotechnol, 2017, 55(1): 40-47.
- [55]Lee C L, Hung H K, Wang J J, et al. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU568 under dioscorea medium through the mediation of pH value

- and ethanol addition[J]. Agric Food Chem, 2007, 55(16): 6493-502.
- [56]Subsaendee T, Kitpreechavanich V, Yongsmith B, et al. Pigments and monacolin K production on rice solid culture in flask and koji chamber using *Monascus* sp KB9[J]. Chiang Mai J. Sci, 2014, 41(5.1): 1044-1057.
- [57]Panda B P, Javed S, Ali M. Statistical analysis and validation of process parameters influencing lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC369 under solid-state fermentation[J]. Biotechnol. Bioproc. E, 2009, 14(1): 123-130.
- [58]Harijono S. *Monascus*-fermented sorghum: pigments and monacolin K produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrates[J]. Int Food Res J, 2015, 22(1): 377-82.
- [59]Pansuriya R C, Singhal R S. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation[J]. Braz J Microbiol, 2010 Jan, 41(1): 164-72.
- [60]Tsukahara M, Shinzato N, Tamaki Y, et al. *Monascus purpureus* rice fermentation by selected *Monascus* sp.with deep-red color,lovastatin production but no citrinin,and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production[J].Appl Biochem Biotechnol, 2009, 158(2): 476–82.
- [61]Zhang B B, Xing H B, Jiang B J, et al. Using millet as substrate for efficient production of monacolin K by solid-state fermentation of *Monascus ruber*[J]. Biosci Bioeng, 2018,125(3): 333-8.
- [62]Lee CL, Pan TM. Development of *Monascus* fermentation technology for high hypolipidemic effect[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94(6): 1449-59.
- [63]Priatni S, Damayanti S, Saraswaty V, et al. The Utilization of Solid Substrates on *Monascus* Fermentation for Anticholesterol Agent Production[J]. Procedia Chem, 2014, 9: 34-9.
- [64]Prodpran P, Rapeepun M, Chartchai K. Antioxidant properties and production of monacolin K, citrinin, and red pigments during solid state fermentation of purple rice (*Oryzae sativa*) varieties by *Monascus purpureus*[J]. Czech J Food Sci, 2017, 35(1): 32-9.
- [65]Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhon A. Review of angkak production (*Monascus purpureus*)[J]. Warasan Khana Witthayasat Maha Witthayalai Chiang Mai. 2007, 34(3): 319-28.
- [66]Yu L J, Zhang H X, Xie YH, et al. Optimization of Fermentation Conditions for Higher

- Monacolin K Production by *Monascus purpureus*[J]. Advanced Materials Research. Switzerland: Trans Tech Publications, 2013, pp: 1397-402.
- [67]Kanpiengjai A, Mahawan R, Pengnoi P, et al. Improving the monacolin K to citrinin production ratio in *Monascus purpureus* rice by an X-ray-induced mutant strain of *Monascus purpureus*[J]. Biotechnologia, 2018, 99(2): 109-18.
- [68]Lee CL, Hung HK, Wang JJ, et al. Red mold dioscorea has greater hypolipidemic and antiatherosclerotic effect than traditional red mold rice and unfermented dioscorea in hamsters[J]. Agric Food Chem, 2007, 55(17): 7162-9.
- [69]Suraiya S, Kim J H, Tak J Y, et al. Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate[J]. Lebensm Wiss Technol, 2018, 92: 1-9.
- [70]Suh S H, Rheem S, Mah J H, et al. Optimization of production of monacolin K from γ -irradiated *Monascus mutant* by use of response surface methodology[J]. Med Food, 2007, 10(3): 408-15.
- [71]Lee D S, Lee I. Development of monacolin K-enriched ganghwayakssuk (*Artemisia princeps* Pamp.) by fermentation with *Monascus pilosus*[J]. Microbiol Biotechnol, 2012, 22(7): 975-80.
- [72]Jirasatid S, Nopharatana M, Kitsubun P, et al. Statistical optimization for Monacolin K and yellow pigment production and citrinin reduction by *Monascus purpureus* in solid-state fermentation[J]. Microbiol Biotechnol, 2013, 23(3): 364-74.
- [73]Lu L P, Zhang B B, Xu G R. Efficient conversion of high concentration of glycerol to Monacolin K by solid-state fermentation of *Monascus purpureus* using bagasse as carrier[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2013, 36(3): 293-9.
- [74]Feng YL, Shao YC, Zhou YX, et al. Effects of glycerol on pigments and monacolin K production by the high-monacolin K-producing but citrinin-free strain, *Monascus pilosus* MS-1[J]. Eur Food Res Technol, 2015, 240(3): 635-43.
- [75]Wang J J, Lee C L, Pan T M. Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU601[J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(11): 669–76.
- [76]Su Y C, Wang J J, Lin T T, et al. Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid

- and monacolin K by *Monascus*[J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(1): 41-6.
- [77]Xu B J, Wang Q J, Jia X Q, et al. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2005, 10(1): 78-84.
- [78]Feng YL, Shao YC, Zhou YX, et al. Production and optimization of monacolin K by citrinin-free *Monascus pilosus* MS-1 in solid-state fermentation using non-glutinous rice and soybean flours as substrate[J]. Eur Food Res Technol, 2014, 239(4): 629-36.
- [79]Dikshit R, Tallapragada P. Statistical optimization of lovastatin and confirmation of nonexistence of citrinin under solid-state fermentation by *Monascus sanguineus*[J]. Yao Wu Shi Pin Fen Xi, 2016, 24(2): 433-40.
- [80]Kraboun K, Tochampa W, Chatdamrong W, et al. Effect of monosodium glutamate and peptone on antioxidant activity of monascus waxy corn[J]. Int Food Res J, 2013, 20(2): 623-31.
- [81]Panda B P, Javed S, Ali M. Engineering Rice Based Medium for Production of Lovastatin with *Monascus Species*[J]. Czech J Food Sci, 2009, 27(5): 352-60.
- [82]Dikshit R, Tallapragada P. Bio-synthesis and screening of nutrients for lovastatin by *Monascus* sp. under solid-state fermentation[J]. Food Sci Technol, 2015, 52(10): 6679-86.
- [83]Thomas L, Larroche C, Pandey A. Current developments in solid-state fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 81: 146-161.
- [84]闫亚婷. 固态发酵玉米条件的优化及营养物质变化的比较研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2010.
- [85]林琳, 王昌禄, 李贞景等. mok E 基因过表达对红曲霉 Monacolin K 产量、菌丝及孢子形态的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(8):45-49.
- [86]毛继龙, 张建辉, 王璨等. 一株高产莫纳可林 K 红曲霉的筛选与液态发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6):2221-2232.
- [87]陈景智, 王力超, 李亮, 叶秀云, 林娟. 红曲霉莫纳可林 K 的液态发酵及其分离纯化研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2):31-38.
- [88]李钟庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [89]SU YC, WANG JJ, LIN TT, et al. Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30(1):41-46.

- [90]Seenivasan A, Venkatesan S, Panda T. Cellular Localization and Production of Lovastatin from *Monascus purpureus*[J]. Indian J Pharm Sci, 2018, 80(1): 85-98.
- [91]Lee CL, Hung HK, Wang JJ, et al. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition[J]. Agric Food Chem. 2007, 55(16): 6493-502.
- [92]Matej P, Kristyna S, Barbora B, et al. Effect of initial pH, different nitrogen sources, and cultivation time on the production of yellow or orange *Monascus purpureus* pigments and the mycotoxin citrinin[J]. Food Sci Nutr, 2019, 10: 1192-1197.
- [93]Harijono S. *Monascus*-fermented sorghum: pigments and monacolin K produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrates[J]. Int Food Res J, 2015, 22(1): 377-82.
- [94]Pansuriya R C, Singhal R S. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation[J]. Braz J Microbiol, 2010, 41(1): 164-72.
- [95]赵钢.中国苦荞[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [96]赵佐成,周明德,王中仁,等.中国苦荞及其近缘种的遗传多样性研究[J]. 遗传学报,2002,29(08):723-734.
- [97]Ruan J J, Zhou Y X, Yan J, et al. Tartary Buckwheat:An Under-utilized Edible and Medicinal Herb for Food and Nutritional Security[J]. Food Reviews International,2020,1-15.
- [98]HYE YOUNG SHINA, SUNG MIN KIMB, JU HUN LEEC, et al. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts[J]. Food Chemistry, 2019, 272:35-241.
- [99]LÓPEZ-CÁRDENAS F, OCHOA-REYES E, BAEZA-JIMÉNEZ R, et al. Solid-state fermentation as a sustainable tool for extracting phenolic compounds from cascalote pods[J]. Fermentation, 2023, 9(9):823.
- [100]LU WANGA, WENHAO WEI A, XIAOFEI TIAN A, 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.
- [101]MAMY D, HUANG Y, AKPABLI-TSIGBE N D K, et al. Valorization of citrus *reticulata* peels for flavonoids and antioxidant enhancement by solid-state fermentation using

- Aspergillus niger* CGMCC 3.6189[J]. *Molecules*, 2022, 27(24):8949.
- [102]NIMNOI P, LUMYONG S. Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4(8):1384-1390.
- [103]LI YG, ZHANG F, WANG Z T, et al. Identification and chemical profiling of monacolins in *Monascus purpureus* rice using highperformance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 35(5):1101-1112.
- [104]胡久平,鄢平,戚珊珊等.发酵条件对青稞红曲中 Monacolin K 和 β -葡聚糖的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(03):134-139.
- [105]Yuan T, Shuangxia H, Chengdeng C, et al. Digestibility and structure changes of rice starch following co-fermentation of yeast and *Lactobacillus* strains[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184: 530-537.
- [106]Shengjie C, Lingfeng W, Huilan Z, et al. Effects of processing methods on phenolic compositions, anti-oxidant activities and α -glucosidase inhibitory ability of two buckwheat varieties[J]. *Chemical Papers*, 2021, 75: 1029-1039.
- [107]Suraiya S, Kim J H, Tak J Y, et al. Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate[J]. *Lebensm Wiss Technol*, 2018,92: 1-9.