

红曲霉菌 5040 发酵产生红曲色素的工艺 及其色素特性研究*

孙菲菲, 岳田利, 袁亚宏, 高振鹏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 优化了红曲霉菌 5040 产生红曲色素的发酵工艺条件, 研究了红曲霉菌 5040 在液体深层发酵过程中的色价变化规律, 以及红曲色素中红色素和黄色素的胞内外分布情况。结果表明: 红曲霉菌 5040 发酵的最佳工艺条件为摇床转速 170 r/min, 温度 32℃, pH 5.4, 接种量 90 mL/L。整个发酵过程分为 3 个阶段: 0~32 h 是菌体大量合成阶段, 色素产量较低; 32~128 h 是色素生成期, 色素生成稳定且产量高; 128 h 以后菌体生成和产色素能力下降。整个发酵期在 0~128 h 色素增长较为均匀。胞外红色素含量高于胞内, 胞内外黄色素的分布不呈规律性, 黄色素总量高于红色素, 整个发酵液色调呈黄色。

[关键词] 红曲霉菌; 红曲色素; 色价; 红色素; 黄色素

[中图分类号] TS201.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0137-04

红曲霉属于真菌门(Enmycophyta)、子囊菌亚门(Ascomycetes)、不整囊菌纲(Plectomycetes)、散囊菌目(Eurotiales)、红曲科(Monascaceae)、红曲霉属(*Monascus*)^[1]。红曲色素是红曲霉产生的次级代谢产物, 其稳定性优良, pH 在 3~12 时色调变化不大。红曲色素中主要含 6 种不同成分, 其中红色素、黄色色素和紫色色素各两种, 这 6 种色素的物理化学性质互不相同。红曲色素中的黄色素成分约占 5%, 其性质较红色素稳定, 红色素和紫色素分离效果不好, 一般混合使用^[2]。由于红曲色素对 pH、温度、金属离子、氧化还原剂的稳定性较其他天然色素好, 且蛋白着色力强, 色调柔和纯正, 水溶、醇溶清亮透明, 已广泛应用于肉制品、糕团、糖果、饮料、医药、化妆品等行业, 特别是在发酵香肠中代替亚硝酸盐发色的应用取得了很好效果^[3-5]。

由于红曲色素发酵色价低, 提取效率差, 因此对红曲色素的研究主要集中在提高发酵色价方面。熊晓辉等^[6]研究了红曲色素液体深层发酵的相关工艺条件, 夏书华等^[7]研究了 NaCl 及 CaCl₂ 对红曲色素提取率的影响。而有关发酵过程中色价变化规律等方面的研究较少。傅亮等^[8]对实验室培育的 1 株红曲霉菌在发酵过程中的色价变化规律进行了初探。

本研究以玉米为主要原料, 采用液体深层发酵技术, 优化了红曲霉菌 5040 生长的最佳发酵工艺条件, 研究了发酵过程中色价的变化规律, 以及红曲色素中红色素与黄色素在细胞内外的分布情况, 以为红曲霉菌 5040 在生产中的使用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

红曲霉菌 5040, 购于北京菌种保藏中心。

1.2 培养基^[6]

斜面培养基: 1.036~1.043 g/cm³ 麦芽汁, 20 g/L 琼脂, 自然 pH, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

小米孢子培养基: 1 000 mL 三角瓶中加入 25 g 小米, 约 30 mL 水, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

液体种子培养基: 可溶性淀粉 30 g/L, 酵母膏 5 g/L, NaNO₃ 3 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, 自然 pH, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

发酵培养基: 玉米 12 g/L, 味精(GA) 3 g/L, 玉米浆 10 g/L, ZnSO₄ 0.5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, pH 5~5.5, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

1.3 发酵工艺流程及操作技术要点

1.3.1 工艺流程 红曲霉菌 5040 接入斜面培

* [收稿日期] 2005-12-16

[基金项目] 国家西部专项(2001BA901A19); 霍英东基金项目(81065); 国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A15-2-3)

[作者简介] 孙菲菲(1981-), 女, 上海市人, 在读硕士, 主要从事食品生物工程技术研究。

[通讯作者] 岳田利(1966-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物工程技术及食品安全研究。

培养基³²_(5~7 d) 小米孢子培养基³²_(7~10 d) 液体种子培养基³²_(30~32 h) 摇瓶发酵^{29~35}_(4~6 d) 测定色价。

1.3.2 操作技术要点 液体种子培养基装液量为 50 mL (250 mL 三角瓶), 接种量为 3 环, 培养方式采用摇床培养, 转速为 150 r/min; 根据正交试验设计方案, 发酵培养基装液量为 100 mL (500 mL 三角瓶), 接种量为 80~100 mL/L, 培养方式采用摇床培养, 转速为 130~170 r/min。

1.4 色价标准曲线的绘制

选取广东江门生物技术开发中心天然色素厂 OD_{510 nm} 80 的 1% 红曲色素作为标准品, 对其进行一系列的稀释后, 测定 OD 值, 计算色价值^[9]。分别以 OD 值、色价值为横、纵坐标绘制标准曲线, 结果见图 1。

1.5 测定方法

胞外色素的测定: 取 2 mL 发酵液, 用定性滤纸过滤, 以体积分数 75% 乙醇做空白对照, 分别在 410, 510 nm 处测定胞外黄色素和红色素 OD 值。以 510 nm 的 OD-色价标准曲线即得对应的色价 (U/mL)。

胞内色素的测定: 取 10 mL 发酵液, 用定性滤纸过滤, 用蒸馏水洗涤滤渣 2 次, 将滤渣移至 250 mL 三角瓶, 加 10 mL 体积分数 75% 乙醇, 30 保

温萃取 24 h 后过滤, 再用体积分数 75% 乙醇洗涤滤渣 2 次, 将滤液用体积分数 75% 乙醇定容至 50 mL 后, 分别在 410, 510 nm 处测定胞内黄色素和红色素 OD 值。以 510 nm 的 OD-色价标准曲线即得对应的色价 (U/mL)。

$$\text{红曲色素的色调} = \text{OD}_{410 \text{ nm}} / \text{OD}_{510 \text{ nm}}$$

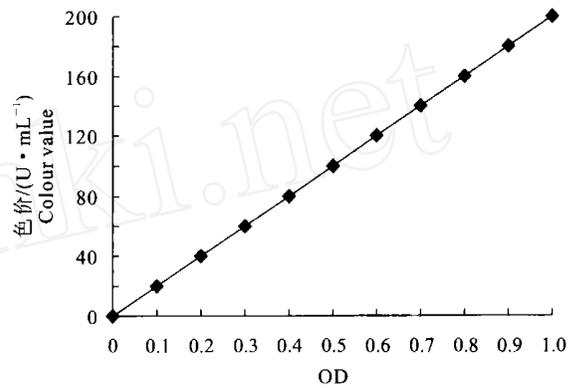


图 1 红曲色素的 OD-色价标准曲线

Fig 1 OD-colour values standard curve of monascus pigments

1.6 发酵工艺条件的优化

选择温度、pH、接种量、摇床转速, 按四因素三水平进行正交试验 (表 1), 每隔 8 h 取样测定 510 nm 色价, 以 510 nm 色价为指标, 确定红曲霉菌 5040 发酵的最佳工艺条件。

表 1 四因素三水平正交试验设计因素水平表

Table 1 Factors level

水平 Levels	温度(A)/ Temperature	pH (B)	接种量(C)/(mL · L ⁻¹) Load	摇床转速(D)/(r · min ⁻¹) Table rotational speed
1	29	5.4	80	130
2	32	5.8	90	150
3	35	6.2	100	170

2 结果与分析

2.1 红曲霉菌 5040 发酵工艺条件的优化

由极差分析可知, D 的极差最大, 其次是 A 和 B, C 的极差最小, 说明摇床转速对色价值的影响最大, 其次是温度和 pH, 而接种量在实验范围内影响不大。由表 2 可以看出, 红曲霉菌 5040 发酵的最佳因素水平为 D₃A₃B₁C₂, 即摇床转速 170 r/min, 温度 35, pH 5.4, 接种量 90 mL/L。

2.2 发酵过程中发酵液色价的变化规律

正交试验中各样品发酵液色价随时间的变化规律如图 2 所示。由图 2 可以看出, 整个发酵过程明显分为 3 个阶段: 0~32 h 为第 1 阶段, 32~128 h 为

第 2 阶段, 128 h 以后为第 3 阶段, 属于典型的真菌液体发酵过程。在第 1 阶段中, 色价值普遍较低, 最高的达到 69 U/mL。说明此阶段是快速耗糖期, 菌体大量合成, 所以各样品色素产量较低。在第 2 阶段中, 色价值普遍较高, 均在 100 U/mL 以上, 最高可达到 190 U/mL。说明这一阶段主要为色素生成期, 菌体生长及糖的消耗都较为缓慢, 所以各样品色素生成稳定且产量高。在 128 h 以后即第 3 阶段, 色价值普遍低于 100 U/mL。说明 128 h 以后, 菌体发生自溶, 菌体生成及产色素能力下降, 所以色素产量下降。因此, 发酵周期应定为 128 h。根据发酵液的色价变化规律来看, 整个发酵期在 0~128 h 色素增长较为均匀, 这与傅亮等^[8]的研究结果不太相符, 这可

能是菌种发酵特性及产色素能力上的差别

表 2 红曲霉菌 5040 发酵工艺条件优化的正交试验结果

Table 2 Orthogonal experiment results of fermentation conditions by *M. oryzae* anka 5040

试验号 No.	温度(A)/ Temperature	pH (B)	接种量(C)/ (mL · L ⁻¹) Load	摇床转速(D)/ (r · min ⁻¹) Table rotational speed	510 nm 色价/ (U · mL ⁻¹) Colour values
1	1(29)	1(5.4)	1(80)	1(130)	68.12
2	1(29)	2(5.8)	2(90)	2(150)	41.21
3	1(29)	3(6.2)	3(100)	3(170)	70.10
4	2(32)	1(5.4)	2(90)	3(170)	109.33
5	2(32)	2(5.8)	3(100)	1(130)	99.25
6	2(32)	3(6.2)	1(80)	2(150)	50.58
7	3(35)	1(5.4)	3(100)	2(150)	79.72
8	3(35)	2(5.8)	1(80)	3(170)	101.93
9	3(35)	3(6.2)	2(90)	1(130)	99.41
K ₁	179.43	257.17	220.63	266.78	
K ₂	259.16	242.39	249.95	171.51	
K ₃	281.06	220.09	249.07	281.36	
k ₁	59.81	85.72	73.54	88.93	
k ₂	86.39	80.80	83.32	57.17	
k ₃	93.69	73.36	83.02	93.79	
R	33.88	12.36	9.78	36.62	

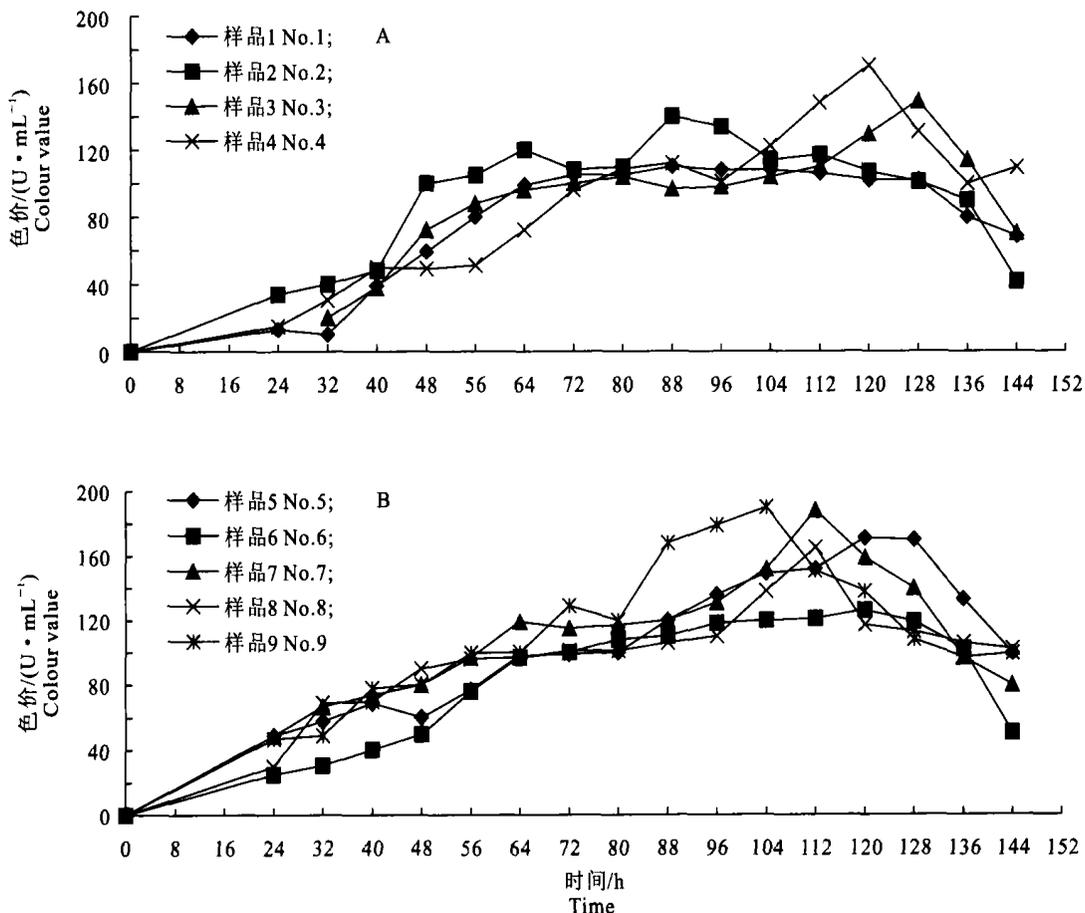


图 2 红曲霉菌 5040 发酵过程中发酵液色价的变化

A. 1~4 号色价随时间的变化规律; B. 5~9 号色价随时间的变化规律

Fig. 2 Pattern of colour values of *M. oryzae* anka 5040

A. Pattern of colour values according to time by No. 1- 4; B. Pattern of colour values according to time by No. 5- 9

2.3 发酵液中红、黄色素的胞内外分布情况

正交试验所得各样品发酵液中红、黄色素的胞内外分布情况如表 3 所示。由表 3 可以看出: (1) 9 个样品的胞内红色素量分别占胞外红色素量的 6.7%~48.2%, 不足胞外红色素的 1/2; 各样品的胞外红色素量均占红色素总量的 60% 以上。说明红色素在发酵过程中大量分泌至胞外, 胞内含量较少。(2) 9 个样品的胞内黄色素量占胞外黄色素量的

60.0%~203.5%, 为胞外黄色素的 50% 以上, 而各样品的胞外黄色素量占黄色素总量的 32.9%~62.6%。说明胞内外黄色素的分布不呈规律性。(3) 9 个样品的胞外黄色素量均超过胞外红色素量的 50%, 黄色素总量均为红色素总量的 1 倍以上。结果表明, 红曲霉菌 5040 在不同条件下发酵所得发酵液的色调呈黄色。

表 3 红曲霉菌 5040 发酵液中红、黄色素的胞内外分布情况

Table 3 Distribution of red and yellow pigments inside and outside cells in the fermentation course by *M. oryzae* anka 5040

试验号 No.	红色素 Red pigments					黄色素 Yellow pigments					黄色素/红色素 Yellow pigment/ red pigments	色调 Colour
	胞外 Outside cells	胞内 Inside cells	胞内外 Inside and outside cells	胞内/胞外 Inside cells/ outside cells	胞外/ 胞内外 Outside cells/ cell	胞外 Outside cells	胞内 Inside cells	胞内外 Inside and outside cells	胞内/胞外 Inside cells/ outside cells	胞外/ 胞内外 Outside cells/ cell	胞外 Outside cells	
1	0.266	0.075	0.341	0.282	0.780	0.255	0.198	0.453	0.776	0.563	0.959	1.328
2	0.193	0.013	0.206	0.067	0.937	0.184	0.206	0.390	1.120	0.472	0.953	1.893
3	0.285	0.065	0.350	0.228	0.814	0.217	0.235	0.452	1.083	0.480	0.761	1.291
4	0.413	0.134	0.547	0.324	0.755	0.612	0.424	1.036	0.693	0.591	1.481	1.894
5	0.384	0.112	0.496	0.292	0.774	0.192	0.360	0.552	1.875	0.348	0.500	1.113
6	0.199	0.054	0.253	0.271	0.786	0.879	0.526	1.405	0.600	0.626	4.417	5.553
7	0.265	0.124	0.389	0.468	0.681	0.521	0.486	1.007	0.933	0.517	1.966	2.589
8	0.365	0.145	0.510	0.397	0.716	0.256	0.516	0.772	2.016	0.332	0.701	1.514
9	0.369	0.178	0.547	0.482	0.674	0.227	0.462	0.689	2.035	0.329	0.615	1.260

3 结 论

(1) 红曲霉菌 5040 发酵的最佳工艺条件为: 摇床转速 170 r/min, 温度 32℃, pH 5.4, 接种量 90 mL/L。其中, 摇床转速对色价的影响最大。

(2) 红曲霉菌 5040 的发酵过程是典型的真菌液体发酵过程, 整个发酵过程分为 3 个阶段: 菌体生长期、色素稳定形成期、色素含量下降期。整个发酵期

在 0~128 h 色素增长较为均匀。

(3) 胞外红色素含量高于胞内, 胞内外黄色素的分布不呈规律性, 黄色素总量高于红色素, 整个发酵液色调呈黄色。

(4) 本试验只研究了红曲霉产红曲色素的工艺及其色素特性, 而未涉及红曲霉另一产物桔霉素的研究, 在液态发酵过程中提高红曲色素产量, 同时降低桔霉素产量的研究将成为以后研究的一个重点。

[参考文献]

- [1] 张纪忠. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [2] 李清春, 张景强. 红曲色素的研究及进展[J]. 肉类工业, 2001, 238(4): 25-28.
- [3] 贾波, 周立平. 红曲霉研究之现状及发展前景[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 32.
- [4] 文东旭. 食用天然色素的性质及其开发利用[J]. 广西化工, 1990(3): 27-35.
- [5] 天津轻工业学院食品工业教研室. 食品添加剂[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987: 244.
- [6] 熊晓辉, 沈昌, 高巍, 等. 红曲色素液体深层发酵工艺研究[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(1): 90-95.
- [7] 夏书华, 刘颖. 有关红曲色素的提取及提高其色价的研究[J]. 北京农学院学报, 1999, 14(1): 44-47.
- [8] 傅亮, 周卫兵, 高孔荣. 红曲色素高产菌株发酵特性的研究[J]. 食品科学, 1996(3): 6-9.
- [9] 张永权. 红曲色素色价和色调分析方法探讨[J]. 食品与发酵工业, 1985(6): 34-37.

(下转第 144 页)

- [4] 陈彦光, 刘继生. 城市土地利用结构和形态的定量描述: 从信息熵到分数维[J]. 地理研究, 2001, 20(2): 146-152
- [5] 王 栋, 朱元甞. 信息熵在水系统中的应用研究综述[J]. 水文, 2001, 21(2): 9-14
- [6] 冯国章. 水事活动对区域水文生态系统的影响及其对策研究[D]. 陕西杨陵: 西北农业大学, 1998: 80-86

Study on the evolution of water resource structure based on information entropy

L IU Yan¹, HU An-yan¹, DENG Ya-zhi²

(1 College of Environment Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an, Shaanxi 710054, China;

2 College of Water Resources and Hydroelectric Power, Xi'an University of Technology, Xi'an, Shaanxi 710048, China)

Abstract: Concept of entropy is introduced into water resource system, expressions of information entropy and balance degree are given, which can be used to distinguish the rationality of water resource utilization system. On the basis of entropy variation theory, a method is produced to distinguish evolution pattern of water resource utilization system, and it can be used in Guanzhong area in Weihe River basin. Results manifest that water resources utilization in Weihe River basin is becoming more and more reasonable. Entropy provides reference for human to regulate water resource utilization.

Key words: water resource system; information entropy; evolution of system structure; Weihe River basin

(上接第 140 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)06-0137-EA

Study on technical conditions and characteristics of pigments by *Monascus anka* 5040

SUN Fei-fei, YUN Tian-li, YUAN Ya-hong, GAO Zhen-peng

(School of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The fermentation conditions of *Monascus anka* 5040 was optimized to produce monascus pigments; And the change regulation of colour values by *Monascus anka* 5040 in submerged culture and the distribution of red and yellow pigments in monascus pigments were studied. The results showed that:

The optimum fermentation conditions of *Monascus anka* 5040 were 170 r/m in table rotational speed, 32 °C temperature, pH 5.4 and 90 mL/L load. There were three phases in the fermentation course: a lot of the *Monascus anka* grew in the 0-32 h of fermentation, and the pigments were produced stably and largely in the 32-128 h, the *Monascus anka* and the pigments were reduced after 128 h; the pigments were produced stably in the 0-128 h of fermentation. The content of red pigments inside cells were more than that outside cells. There was no regulation about the distribution of yellow pigments inside and outside cells, and the contents of yellow pigments were more than that of red ones, the liquid appeared yellow.

Key words: *Monascus anka*; monascus pigments; colour values; red pigments; yellow pigments