[文章编号] 1003－4684(2025)05-0069-05

基于不同发酵培养基的红曲红色素稳定性分析

李 平，汪 璇，陈 鑫，王伟平
（湖北工业大学生命科学与健康工程学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 针对红曲红色素(MRPs)稳定性低、易分解的问题，以 MRPs 半衰期和保存率为指标，比较两种不同发酵培养基对水溶性 MRPs 与醇溶性 MRPs 稳定性的影响。结果表明，发酵培养基配方的差异对 MRPs 的稳定性具有显著影响；添加了甘油、$ZnSO_4$ 和味精的培养基 1，可明显提升 MRPs 的光稳定性和 pH 稳定性，其光稳定性和 pH 稳定性分别为未添加上述成分的培养基 2 的 1.29～1.67 倍；而在热稳定性和金属离子稳定性方面，两种培养基发酵所得 MRPs 的差异较小。进一步分析显示，两种培养基发酵产生的水溶性 MRPs，其光稳定性、pH 稳定性和高温条件下的热稳定性均高于醇溶性 MRPs，但两类 MRPs 在金属离子稳定性方面的表现无明显差异。

[关键词] 水溶性红曲红色素；醇溶性红曲红色素；发酵培养基；光稳定性；金属离子稳定性
[中图分类号] Q556 [文献标识码] A

红曲色素(MPs)是经欧盟批准、由红曲霉发酵产生的一种天然可食用色素[1-2]。根据颜色差异，MPs 可以分为红曲红色素(MRPs)、红曲黄色素(MYPs)和红曲橙色素(MOPs)三类。其中，MRPs 作为食品着色剂具有良好的生物安全性[3]；此外，其还具备抑菌性，能够在肉制品中替代亚硝酸盐[4]；同时，在红曲米生产的过程中，MRPs 还被发现有一定的治疗用途[5-6]。近年来，MRPs 的研究已扩展到饮料、葡萄酒、糖果等领域中，使用范围越来越广泛[7]。

然而，MRPs 在稳定性方面明显不足，例如对光敏感，且在强酸、强碱的条件下易发生分解，这一问题严重制约了其在食品领域的进一步应用与发展[8]。朱佳丽等[9]的研究表明，MRPs 在 pH 5～9 范围内相对稳定，一旦超出该区间，就会逐渐降解，且在持续 6 h 的光照条件下，其色素保存率仅有 77.4%。

不同的金属离子对 MRPs 稳定性的影响存在差异。Feng 等[10]报道，MRPs 在低浓度 Na^+、Mg^{2+}、K^+、$A1^{3+}$、Ca^{2+}、Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 存在时，MRPs 保持稳定；但在相同浓度下的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 会显著降低其稳定性。此外，菌株差异与 MRPs 的种类也会对其稳定性产生一定的影响。刘杰等[11]研究发现，南极真菌红色素在酸度稳定性、金属离子稳定性等方面都优于 MRPs。王昌禄等[12]则指出，红曲色素的成分不同，其光稳定性也会存在差异。

根据溶解性的不同，MRPs 可以分为水溶性 MRPs 与醇溶性 MRPs。二者稳定性存在一定的差异：醇溶性 MRPs 对光敏感，尤其是对阳光和紫外线更为敏感，在光照条件下易分解；相比之下，水溶性 MRPs 稳定更优[13-14]。

大多数天然色素对光、热、pH 值和部分金属离子敏感[15]，稳定性不及人工合成色素。因此，在开发利用天然色素资源前，需优先对色素的稳定性展开系统研究。本研究以 MRPs 的半衰期和保存率为评价指标，比较两个不同发酵培养基对水溶性 MRPs 和醇溶性 MRPs 稳定性的影响，旨在为提高 MRPs 稳定性提供理论依据与实践参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

红曲霉(Monascus)GN01，湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室保藏。

葡萄糖、蛋白胨、甘油、可溶性淀粉、琼脂、$NaNO_3$、KH_2PO_4、K_2HPO_4、$MgSO_4$、乳酸、味精、$ZnSO_4$、$CaCl_2$、$CuSO_4$、$FeSO_4$，国药集团化学试剂有限公司；马铃薯，市售。

1.2 仪器与设备

DNP-9052 电热恒温培养箱，上海精宏实验设备有限公司；ZHWY-2102C 恒温摇床，上海智诚分析仪制造有限公司；722S 可见光分光光度计，上海

[收稿日期] 2024－03－08
[基金项目] 国家自然科学基金(31101349)
[第一作者] 李 平(1997－)，男，河南济源人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为生物与医药。
[通信作者] 王伟平(1972－)，女，湖北当阳人，湖北工业大学教授，研究方向为生物工程。

精密科学仪器有限公司;CJ-2D型洁净工作台,天津市泰斯特仪器有限公司;电热压力蒸汽灭菌锅,上海三申治疗器械有限公司;AR114电子天平,上海精密科学仪器有限公司;高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;TGL-16C台式离心机,上海安亭科学仪器。

1.3 培养基

斜面培养基:60 g/L葡萄糖,20 g/L蛋白胨,30 g/L可溶性淀粉,30 g/L琼脂,乳酸2～3滴,115℃灭菌30 min。

液体种子培养基配方:20 g/L葡萄糖,10 g/L蛋白胨,3 g/L$NaNO_3$,1 g/L $MgSO_4$,1.5 g/L KH_2PO_4,用自来水溶解,取250 mL种子液置于500 mL锥形瓶中,于121℃下灭菌20 min。

发酵培养基1:30 g/L可溶性淀粉,9 g/L蛋白胨,1.25 g/L $NaNO_3$,40 g/L甘油,0.2 g/L $ZnSO_4$,2.5 g/L味精,用自来水溶解,取100 mL培养基置于250 mL锥形瓶中,于121℃下灭菌20 min。

发酵培养基2:30 g/L可溶性淀粉,15 g/L蛋白胨,2 g/L $NaNO_3$,0.5 g/L $MgSO_4$,1.5 g/L KH_2PO_4,用自来水溶解,取100 mL培养基置于250 mL锥形瓶中,于121℃下灭菌20 min。

1.4 方法

1.4.1 培养方法

斜面培养:挑取一环红曲霉于斜面培养基上,30℃培养7 d,活化菌株。

液体种子培养:从长好菌种的斜面上刮取菌丝接种至种子培养基中,30℃、180 r/min培养2 d,制备种子液。

发酵培养:将体积分数为10%的种子液接种到两种发酵培养基,在30℃,180 r/min培养7 d,获得发酵液。

1.4.2 待测液样品的制备 取发酵液5 mL在4000 r/min的条件下离心15 min,上清液即为水溶性MRPs粗提液,取离心后的沉淀,加入10 mL 70%乙醇在40℃条件下振荡提取2 h得到醇溶性MRPs粗提液。用分光光度计调整MRPs粗提液在505 nm处的初始OD值至1.0±0.1,得到MRPs的待测液样品,备用。

1.4.3 不同发酵培养基对MRPs光稳定性的影响 将MRPs的待测液样品暴露于阳光下,每隔3 h取样1次,测定505 nm处的吸光度,计算色素保存率,绘制降解曲线。

1.4.4 不同发酵培养基对MRPs pH稳定性的影响 制备5种不同pH值(3、5、7、9和11)的缓冲溶液(0.1 mol/L,磷酸钾),将缓冲溶液与待测液样品以1∶1混合并暴露于阳光下。6 h后,测定505 nm处的吸光度(A_{ph}),计算色素保存率与半衰期。

1.4.5 不同发酵培养基对MRPs热稳定性的影响 取待测液样品10 mL,分别在4℃、25℃和85℃的黑暗条件下贮藏,48 h后取样,测定505 nm处的吸光度,计算色素保存率。

1.4.6 不同发酵培养基对MRPs金属离子稳定性的影响 取待测液样品9 mL,分别添加1 mL 0.1%(质量分数)的金属盐溶液($CuSO_4$、$FeSO_4$、$ZnSO_4$、$MgSO_4$、$CaCl_2$),将其全部静置于黑暗条件下的30℃恒温培养箱中,48 h后,测定505 nm处的吸光度,计算色素保存率。

1.4.7 MRPs含量的测定 使用紫外-可见分光光度计对MRPs进行定量,测量待测液在505 nm处的吸光度,以"每毫升溶液的吸光度单位(U/mL)"表示MRPs含量[16]。

1.4.8 MRPs保存率的测定和计算 用紫外分光光度计测定处理后样品在505 nm处的OD值,并计算其色素保存率:$R=A/A_0\times100\%$。其中,A_0为样品初始OD值,A为经过处理样品的OD值。

1.4.9 动力学分析 所有组分的MRPs的降解都遵循一级反应[17],假设混合物的降解也遵循一级反应,反应公式为:$dC/dt=-kC$。方程积分公式为:$\ln(C/C_0)=-kt$(C是t时的MRPs浓度,C_0是t_0时的MRPs浓度,k为速率常数(h^{-1}),t为照射时间(h)),半衰期公式为:$t_{1/2}=\ln 2/k$。通过绘制$\ln C/C_0$相对于t的曲线来估计所有MRPs的分解速率常数。

2 结果与分析

2.1 不同发酵培养基对MRPs光稳定性的影响

不同发酵培养基发酵产生的水溶性MRPs和醇溶性MRPs在阳光下的分解过程遵循一级反应。MRPs的速率常数和半衰期数值如表1所示,MRPs在阳光下的降解曲线如图1所示。MRPs的光稳定性于与培养基配方有关。两种培养基发酵产生的水溶性MRPs的半衰期都大于醇溶性MRPs,光稳定性更强。发酵培养基1水溶性MRPs的半衰期(96 h)是发酵培养基1醇溶性MRPs(53 h)的1.8倍,发酵培养基2水溶性MRPs的半衰期(70 h)是发酵培养基2醇溶性MRPs(41 h)的1.7倍;不同发酵培养基发酵产生的MRPs的光稳定性不同,发酵培养基1水溶性MRPs的半衰期(96 h)是发酵培养基2水溶性MRPs半衰期(70 h)的1.37倍,发酵培养基1醇溶性MRPs的半衰期(53 h)是发酵培养基2醇溶性MRPs半衰期(41 h)的1.29倍。朱佳

丽等[9]测得江门科隆生物技术股份有限公司生产的 MRPs 粉末，其在光照下的半衰期为 22.1 h；Jung 等[17]使用葡萄糖蛋白胨培养基纯化的 MRPs 在光照下的半衰期为 0.22～26.5 h，王昌禄等[12]分离纯化的 MRPs 在光照下的半衰期为 1.58～2.52 h。对比实验结果发现，培养基 1 和培养基 2 的半衰期都明显高于文献报道的值，其原因可能是由于培养基中氮源的不同造成 MRPs 光稳定性的不同[18]。水溶性 MRPs 是醇溶性的 MRPs 经过和氨基酸的氨化反应的衍生物，衍生物的结构构象更为稳定，减少了因能量跃迁发生的光化学反应[19]，光稳定性大大增强。衍生物的结构不同，光稳定性不同，发酵培养基 1 中加入了稳定的水溶性 MRPs 的前体味精，可以与醇溶性 MRPs 发生氨化反应而生成水溶性 MRPs，因此发酵培养基 1 发酵产生的 MRPs 光稳定性较强。

表 1　阳光下各种 MRPs 脱色的动力学分析

MRPs 种类	K/h^{-1}	$T_{1/2}/h$
培养基 1 水溶性 MRPs	0.007	96
培养基 2 水溶性 MRPs	0.0098	70
培养基 1 醇溶性 MRPs	0.013	53
培养基 2 醇溶性 MRPs	0.017	41

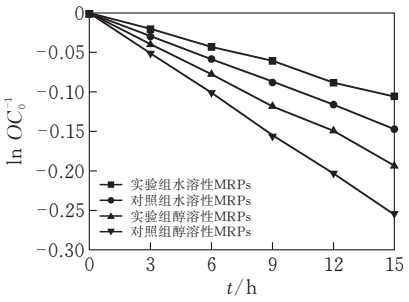

图 1　各种 MRPs 在阳光下的降解曲线

2.2　不同发酵培养基对 MRPs pH 稳定性的影响

不同发酵培养基对 MRPs pH 稳定性的影响如图 2 所示。所有 MRPs 在 pH 值为 5～9 时保持稳定，超出这个范围则迅速降解，这与朱佳丽等[9]研究结果一致。MRPs 的 pH 稳定性与培养基配方有关。MRPs 在 pH 值为 7 时最稳定，两种培养基发酵产生的水溶性 MRPs 的 pH 稳定性高于醇溶性 MRPs，发酵培养基 1 水溶性 MRPs 的半衰期(89.55 h)是发酵培养基 1 醇溶性 MRPs(42.12 h)的 2.1 倍，发酵培养基 2 水溶性 MRPs 的半衰期(67.29 h)是发酵培养基 2 醇溶性 MRPs(25.21 h)的 2.6 倍；不同发酵培养基发酵产生的 MRPs 的 pH 稳定性不同，发酵培养基 1 水溶性 MRPs 的半衰期(89.55 h)是发酵培养基 2 水溶性 MRPs 半衰期(67.29 h)的 1.33 倍；发酵培养基 1 醇溶性 MRPs 的半衰期(42.12 h)是发酵培养基 2 醇溶性 MRPs 半衰期(25.21 h)的 1.67 倍。Hilares 等[20]用 PDA 培养基测得 MRPs 在 pH 4.5～6.5 的半衰期为 1.72～18.33 h；Vendruscolo 等[21]用葡萄糖甘氨酸培养基测得 MRPs 在 pH 4.08～6.91 的半衰期为 0.7～14.46 h。对比本研究结果发现，培养基 1 和培养基 2 的半衰期都明显高于文献报道值。因此，不同发酵培养基对 MRPs pH 稳定性的影响十分显著。MRPs 在强酸性和强碱性条件下不稳定可能是由于强酸强碱破坏了 MRPs 的发色团结构导致 R 侧链从发色团结构中解离下来，MRPs 的稳定性降低。

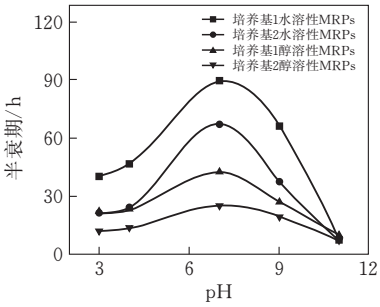

图 2　不同发酵培养基对 MRPs pH 稳定性的影响

2.3　不同发酵培养基对 MRPs 热稳定性的影响

不同发酵培养基对 MRPs 热稳定性的影响结果如图 3 所示，MRPs 的热稳定性较差，不同发酵培养基对 MRPs 热稳定性的影响不明显，但在高温下水溶性 MRPs 的热稳定性高于醇溶性 MRPs。在 4℃的条件下，所有的 MRPs 都很稳定，超过 98%的色素保存下来。在 25℃时，超过 95%的 MRPs 保留下来。在 85℃时，有 88%的水溶性 MRPs 保留下来，醇溶性色素在 85℃的稳定性极差，只保留了 50%以上。朱佳丽等[9]用江门科隆生物技术股份有限公司生产的 MRPs 粉末，在 30℃条件下水浴 1.5 h，MRPs 保存率为 97.5%，但在 80℃条件下水浴 1.5 h 后 MRPs 的保存率为 80%。对比我们的实验结果发现，MRPs 在低温下的稳定性与文献报道的相似，但是高温下水溶性 MRPs 稳定性高于文献报道，醇溶性 MRPs 热稳定性低于文献报道。这可能是由于后者没有将水溶性 MRPs 和醇溶性 MRPs 分离所造成的。

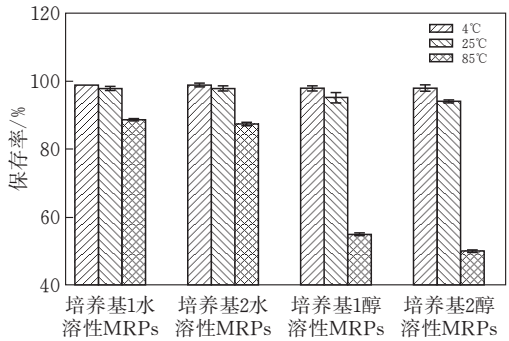

图 3　不同发酵培养基对 MRPs 热稳定性的影响

2.4 不同发酵培养基对 MRPs 金属离子稳定性的影响

不同发酵培养基对 MRPs 金属离子稳定性的影响结果如图 4 所示，可见不同发酵培养基产生的 MRPs 的金属离子稳定性几乎一致。Fe^{2+} 对 MRPs 稳定性的影响较为显著，样品保存率为 30%～58%；Mg^{2+} 对 MRPs 的影响较小，样品保存率为 60%～70%；Ca^{2+}、$Cu2^{+}$ 和 Zn^{2+} 几乎不改变 MRPs 的稳定性。金属离子和天然色素发生氧化还原反应或螯合作用是颜色改变的可能机理之一[22]。

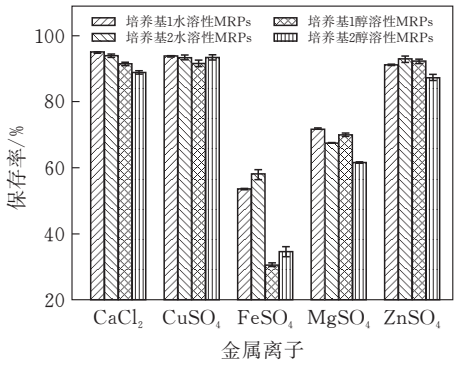

图 4 不同发酵培养基对 MRPs 金属离子稳定性的影响

3 结论

本文采用两种不同的发酵培养基进行红曲霉液态发酵实验，以美拉德反应产物(MRPs)的半衰期和保存率为指标，对所产水溶性 MRPs 与醇溶性 MRPs 的稳定性展开探讨。结果表明，发酵培养基配方的差异对 MRPs 稳定性具有显著影响，具体数据如下。

1)光照稳定性。两种培养基发酵所得 MRPs 的光照半衰期为 41～96 h，相较于文献报道中其他培养基 MRPs 的最高光照半衰期(26.5 h)，提升幅度达 1.54～3.6 倍。

2)pH 稳定性。在 pH=7 的条件下，两种培养基发酵 MRPs 的半衰期为 25.21～89.55 h，是文献报道最高半衰期(18.33 h)的 1.37～4.88 倍。

3)热稳定性。两种培养基发酵 MRPs 在低温环境下的保存率与文献报道一致；在 80℃条件下，水溶性 MRPs 保存率为 88%，高于文献报道的 80%，而醇溶性 MRPs 保存率为 50%，低于文献[17]报道的值。

进一步分析培养基成分及其影响发现：添加甘油、$ZnSO_4$ 与味精的发酵培养基 1，其发酵产物 MRPs 的光稳定性与 pH 稳定性显著提升，分别为未添加上述成分的发酵培养基 2 的 1.29～1.67 倍；但两种培养基在 MRPs 热稳定性与金属离子稳定性方面的差异较小。

此外，对比两种溶解性 MRPs 的稳定性可知：两种培养基发酵所得的水溶性 MRPs，其光稳定性、pH 稳定性及高温热稳定性均高于醇溶性 MRPs。综合来看，培养基 1 发酵所得的 MRPs 稳定性更优，具备更广阔的应用前景，适合多场景推广使用。

[参 考 文 献]

[1] CHEN W, CHEN R, LIU Q, et al. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in Monascus fungi [J]. Chem Sci, 2017, 8(07): 4917-4925.

[2] MEINICKE R M, VENDRUSCOLO F, ESTEVES MORITZ D, et al. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by Monascus ruber in submerged fermentation [J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2012, 1(03): 238-242.

[3] DARWESH O M, MATTER I A, ALMOALLIM H S, et al. Isolation and optimization of monascus ruber OMNRC45 for red pigment production and evaluation of the pigment as a food colorant [J]. Appl Sci-Basel, 2020, 10(24):1-15.

[4] MUKHERJEE G, SINGH S K. Purification and characterization of a new red pigment from Monascus purpureus in submerged fermentation [J]. Process Biochem, 2011, 46(01): 188-192.

[5] ZHENG Y, XIN Y, SHI X, et al. Anti-cancer effect of rubropunctatin against human gastric carcinoma cells BGC-823 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(05): 1169-1177.

[6] AKIHISA T, TOKUDA H, UKIYA M, et al. Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of Monascus pilosus fermented rice (red-mold rice) [J]. Chem Biodivers, 2005, 2(10): 1305-1309.

[7] LIAN X, LIU L, DONG S, et al. Two new monascus red pigments produced by Shandong Zhonghui Food Company in China [J]. Eur Food Res Technol, 2014, 240(04): 719-724.

[8] 黄宇峰，赵海，王忠彦，等. 护色剂对红曲红色素稳定性的研究 [J]. 食品科技，2006，(11)：186-189.

[9] 朱佳丽，敬璞. 红曲红色素稳定性研究及光热降解动力学分析 [J]. 食品与发酵科技，2016，53(05)：49.

[10] FENG Y, SHAO Y, ZHOU Y, et al. Monascus pigments [M]. Erick J. Vandamme, José Luis Revuelta ed. Weinheim Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.

[11] 刘杰，董龙龙，郭昱东，等. 南极真菌红色素与红曲红色素稳定性比较 [J]. 食品与发酵工业，2017，43(02)：90-94.

[12] 王昌禄，王莹，陈勉华，等. 红曲色素不同成分的光稳

定性研究 [J]. 食品研究与开发，2008，29(10)：189-192.

[13] JUNG H，CHOE D，NAM K-Y，et al. Degradation patterns and stability predictions of the original reds and amino acid derivatives of monascus pigments [J]. European Food Research and Technology，2011，232(04)：621-629.

[14] SHEU F，WANG C L，SHYU Y T. Fermentation of Monascus purpureus on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of Monascus-nata Complex [J]. Journal of food science，2000，65(02)：342-345.

[15] 杨萌，吴振强. 食用天然黄色素的研究近况 [J]. 中国调味品，2008，2(02)：67-71.

[16] AGBOYIBOR C，KONG W B，ZHANG A M，et al. Nutrition regulation for the production of Monascus red and yellow pigment with submerged fermentation by Monascus purpureus [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology，2019，21：1-7.

[17] JUNG H，KIM C，SHIN C S. Enhanced photostability of monascus pigments derived with various amino acids via fermentation [J]. Journal of agricultural and food chemistry，2005，53(18)：7108-7014.

[18] ZHANG X W，WANG J H，CHEN M H，et al. Effect of nitrogen sources on production and photostability of monascus pigments in liquid fermentation [J]. IERI Procedia，2013，5：344-350.

[19] 衣珊珊，沈昌，韩永斌，等. 红曲色素形成机理及提高其色价的途径 [J]. 食品科学，2005，26(07)：256-260.

[20] TERÁN HILARES R，DE SOUZA R A，MARCELINO P F，et al. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by Monascus ruber [J]. Food Chemistry，2018，245：786-791.

[21] VENDRUSCOLO F，LUISE MÜLLER B，ESTEVES MORITZ D，et al. Thermal stability of natural pigments produced by Monascus ruber in submerged fermentation [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology，2013，2(03)：278-284.

[22] 刘玲红，许国娟，程荣，等. 不同环境因子对栀子黄/姜黄共混色素体系稳定性的影响 [J]. 食品与发酵工业，2022，48(14)：195-201.

Stability Analysis of Two Fermentation Media for *Monascus* Red Pigments

LI Ping，WANG Xuan，CHEN Xin，WANG Weiping

(*School of Life and Health Sciences，Hubei Univ. of Tech.，Wuhan* 430068，*China*)

Abstract：Aiming at the problem of low stability and easy decomposition of*Monascus* red pigments (MRPs)，liquid fermentation experiments of Monascus were carried out by utilizing two different fermentation media，and the stability of the produced water soluble MRPs and alcohol soluble MRPs were investigated. The results showed that the stability of MRPs was related to the fermentation medium formulation. The light stability，pH stability and thermal stability at high temperature of water soluble MRPs obtained from the fermentation of the two media were higher than those of alcohol soluble MRPs. The light and pH stability of the fermentation medium 1 MRPs with the addition of glycerol，$ZnSO_4$ and monosodium glutamate (MSG) were significantly improved，and the light and pH stability of the fermentation medium 1 MRPs was 1.29 1.67 times higher than that of the fermentation medium 2 MRPs，while the thermal stability and metal ion stability did not change much. The MRPs fermented in medium 1 were more stable and had a broader development prospect for multi—scenario applications.

Keywords：water-soluble*Monascus* red pigments；alcohol-soluble*Monascus* red pigments；stability

[责任编校：张　众]