

不同品种大米发酵紫色红曲霉产色素的特性分析

夏欣欣, 陈迪*, 姜凌, 刘曼丽, 孙晶晶, 郭明伟, 吴兴泉*

(河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001)

摘要: 该研究以一株色素产量稳定的紫色红曲菌为试验菌株, 采用不同品种的大米(粳米、籼米、糯米)作为基质进行液态摇瓶发酵, 通过测定生物量、葡萄糖含量、大米成分, 分析红曲霉生长状况, 借助高效液相色谱、薄层色谱和色差仪对发酵所产红曲色素的颜色特性及安全性进行评价。结果表明: 粳米发酵的胞外色价最高, 于 505 nm 处最高可达 19.07 U/mL, 是籼米的 2.28 倍, 糯米的 2.53 倍; 发酵 3~4 d 籼米的红曲菌胞内色价可达 947.46 U/g (505 nm), 分别是糯米的 1.24 倍和粳米的 1.33 倍; 发酵 6~7 d 糯米的胞内色价较高, 于 505 nm 处可达 1762.80 U/g, 分别是籼米的 1.41 倍和糯米的 1.86 倍, 粳米的后期发酵更利于 M9 的色素累积。HPLC 分析六种主要红曲色素产量表明, 籼米和糯米发酵显著促进了两种橙色素 O1、O2 在胞内积累, 发酵第 7 d 的产量分别是粳米的 5.00 倍和 6.31 倍, 粳米发酵更有利于红色素(R1、R2)及黄色素(Y1、Y2)产生; 三种大米相比, 粳米发酵所产桔霉素最低, 安全性更高。总体而言, 以粳米为基质发酵更利于 M9 产红、黄色素, 而糯米和籼米更利于红曲菌 M9 产橙色素。

关键词: 红曲霉; 红曲色素; 色调; 大米品种

文章篇号: 1673-9078(2022)05-33-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.1075

Characteristics of Pigment Production from Fermentation of Different Varieties of Rice by *Monascus purpureus*

XIA Xinxin, CHEN Di*, JIANG Ling, LIU Manli, SUN Jingjing, GUO Mingwei, WU Xingquan*

(College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A *Monascus purpureus* strain with a stable pigment yield was used to examine pigment production in different varieties of rice (namely, japonica, indica, and glutinous), which were used as substrates for shaking flask fermentation. Growth of *Monascus* was analyzed by measuring biomass, glucose content, and rice composition. In addition, the color characteristics and consumption safety of the produced pigments were evaluated by chromatographic methods such as HPLC and TLC. The results showed that the extracellular color value of *Monascus* during fermentation of japonica rice was the highest, reaching 19.07 U/mL at 505 nm, which was 2.28 and 2.53 times that of indica and glutinous rice, respectively. The intracellular color value of *Monascus* was 947.46 U/g (505 nm) in indica rice after 3~4 days of fermentation, which was 1.24 and 1.33 times that of glutinous and japonica, respectively. On the 6~7th day, the intracellular color value of *Monascus* after fermentation of japonica was higher, reaching 1762.80 U/g at 505 nm, which was 1.41 and 1.86 times that of indica and glutinous rice, respectively. The late-stage fermentation of japonica rice was more conducive to the accumulation of M9 pigments. The yield of six main *Monascus* pigments was measured by HPLC. It was found that fermentation of indica and glutinous rice significantly promoted the accumulation of two orange pigments, O1 and O2, in the cell, yielding 5.00 and 6.31 times that of japonica rice on the 7th day of fermentation, respectively. Furthermore, fermentation of japonica rice was found to be more conducive to the production of red (R1, R2) and yellow pigments (Y1, Y2). Among the three rice varieties, japonica exhibited the lowest citrinin content during fermentation; therefore, it might be safer to use japonica rice for fermentation and pigment production. In general, when japonica rice was used as the substrate for fermentation, yields of the red and

引文格式:

夏欣欣,陈迪,姜凌,等.不同品种大米发酵紫色红曲霉产色素的特性分析[J].现代食品科技,2022,38(5):33-42

XIA Xinxin, CHEN Di, JIANG Ling, et al. Characteristics of pigment production from fermentation of different varieties of rice by *Monascus purpureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 33-42

收稿日期: 2021-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801512); 小麦和玉米深加工国家工程实验室开放课题(NL2018002)

作者简介: 夏欣欣(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: xiaxin1567060@163.com

通讯作者: 陈迪(1986-), 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: chendi.1126@163.com; 共同通讯作者: 吴兴泉(1970-), 男, 博士研

究生, 教授, 研究方向: 分子生物学, E-mail: 1103903113@qq.com

yellow pigments were higher, while higher yields of orange pigment were obtained for glutinous and indica rice.

Key words: *Monascus*; *Monascus* pigment; color; rice variety

红曲霉属是一个多功能的丝状真菌类群,包括从毛红曲菌(*Monascus pilosus*)、紫色红曲菌(*Monascus purpureus*)、红色红曲菌(*Monascus ruber*)、烟色红曲霉(*M. fuliginosus* Sato)、发白红曲霉(*M. albidus*)、锈色红曲霉(*M. rubiginosus*)、变红红曲霉(*M. rubropunctatus* Sato)、橙色红曲霉(*M. aurantiacus*)等。红曲菌属真菌门,子囊菌亚门,真核菌纲,散囊菌目,红曲科^[1]。在亚洲国家,如中国、日本、泰国等,红曲丝状真菌被用于天然色素、食品成分和食品添加剂的生产。其中最著名的就是红曲米,又称红槽、赤曲等^[2]。传统上红曲霉以大米为固态发酵基质,发酵后成为我国传统食用着色剂红曲米^[3]。红曲米外观呈砖红色或紫红色,质脆且断面为红色或粉红色^[4]。

中国食品自古讲究色、香、味俱全,着色剂更是自古以来就被用于食品中,以改善食品的外观、风味、口感和营养品质^[5]。食品着色剂根据来源不同可分为植物着色剂、动物着色剂、微生物着色剂及化学合成着色剂^[6]。合成色素具有潜在的毒性和致癌性,天然食用色素则更具安全性、营养价值和药用价值,因此天然食用色素更受大众认可^[7-9]。微生物以农业和食物废弃物为基质,在细胞内外产生色素,具有生产力高、可持续发展、成本低廉的特点,是最有前途的食用色素来源^[10,11]。红曲色素作为微生物来源的天然食用色素,是红曲霉的重要次生代谢产物,具有生产方便、底物廉价、在酸性水和乙醇中溶解性好、存在大量生物活性代谢物、在一定条件下生产安全等优点,具有很好的经济价值^[12]。红曲色素可以用作食品着色剂,改善食品风味,且具有抗菌性能^[13]。红曲色素是聚酮类和氮杂类化合物,含氧双环核和四元中心,是红曲霉代谢中多种聚酮类化合物的混合物,由红、黄、橙三类化学结构相近的色素构成,其中既有醇溶性色素又有水溶性色素^[14-17]。最常见的红曲色素是红色的红曲红胺素(*Monascorubramine*)与红斑胺素(*Rubropunctamine*),橙色的红曲红素(*Monascorubrin*)与红斑素(*Rubropunctatin*),黄色的红曲素(*Monascin*)与红曲黄素(*Ankaflavin*)^[18]。

目前,在我国国标规定的天然色素中,红曲色素已经根据不同色调被分别列出:红曲红色素、红曲黄色素、红曲米粉,生产不同色调的红曲色素已成为适应市场需求的发展趋势。大米作为一种淀粉质营养源,自古以来就是红曲菌的培养基,在中国有长达近两千

年的应用历史。当前研究中常以粳米为基质发酵红曲霉,而对比不同大米品种发酵红曲霉的研究报道并不多见。本研究分别以粳米粉、籼米粉、糯米粉为基质进行红曲菌的液态发酵,探究大米品种对红曲霉生长、红曲色素颜色特性以及安全性的影响,以期生产多色调红曲色素提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

市售糯米、籼米、粳米,购于河南省郑州市永辉超市,打粉后过100目筛;红曲菌种为实验室保藏菌种 *Monascus purpureus* M9 (strain NO. CGMCC 3.19586)。

1.2 实验方法

1.2.1 大米成分的测定

参照 GB 5009.268-2016 食品中多元素的测定第一法:电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定粳米、籼米、糯米的微量元素。水分测定则将大米粉(粳米粉、籼米粉、糯米粉)放入烘箱烘干至恒重,称量烘干前后质量。参照 GB 5009.6-2016 第一法:索氏抽提法,测定大米粉中的脂肪。参照 GB 5009.5-2016 第一法:凯氏定氮法,测定大米粉中的蛋白质。

采用双波长的方法测定直链淀粉和支链淀粉的含量,具体方法参照张雪梅等^[19]的方法,分别测定样品溶液在631、437、542、763 nm 波长下的吸光度值,根据直链淀粉和支链淀粉标准曲线分别算出样品的直链、支链淀粉和总淀粉的质量分数。

1.2.2 培养基配方

斜面培养基:将麦芽汁糖化液稀释至10度,加入3%琼脂,于121℃灭菌20 min,取出后摆斜面。

种子培养基:葡萄糖6 g,蛋白胨2 g, NaNO₃ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 1 g,用水定容至100 mL,121℃灭菌20 min。

液体培养基:大米粉(粳米粉、籼米粉、糯米粉)2.5 g, NaNO₃ 0.15 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, KH₂PO₄ 0.075 g,用水定容至50 mL,121℃灭菌20 min。

1.2.3 液态发酵红曲霉 M9

向活化好的菌株中加入5 mL 无菌水,用孢子铲刮下孢子,使孢子充分溶入水中。将此孢子液移入无菌种子培养基中摇匀,八层纱布包裹瓶口,于28℃、

180 r/min 的摇床中培养 36 h~48 h 得到种子液。将种子液用八层纱布过滤得到孢子悬液,用移液枪吸取 3 mL 孢子悬液接种于 50 mL 液体培养基上,放置在 28 °C、180 r/min 的摇床中,发酵 3~7 d。

1.2.4 生物量的测定

将发酵后的菌丝移入离心管中,以 4000 r/min 的转速离心 10 min,沉淀的菌丝体用蒸馏水冲洗后再次离心,反复冲洗三次。得到的菌丝体于 60 °C 烘箱中干燥至恒重后准确称量,获得的红曲霉菌丝体干重即为生物量。

1.2.5 二硝基水杨酸法 (DNS) 测葡萄糖含量

葡萄糖含量的测定采用二硝基水杨酸法 (DNS),具体参照黄涛^[20]的方法进行葡萄糖测定。

1.2.6 色素提取液的制备

将上述干燥后的样品用研钵磨成粉末并过 100 目筛。准确称取 0.5000 g 红曲样品粉末,加入 75%乙醇,超声波处理 30 min 后离心,此过程反复 3 次,合并三次上清液,用 75%乙醇定容至 10 mL。

1.2.7 胞内及胞外色价的测定

分别取 1 mL 发酵液(胞外)及适量色素提取液(胞内)用 75%乙醇稀释到合适的倍数,用 75%乙醇做空白,使用分光光度计 410、470、505 nm 处分别测定吸光度值 A_{410} 、 A_{470} 、 A_{505} ,并代入下列公式计算:

$$S = \frac{A' \cdot n}{G/V} \quad (1)$$

式中:

S—样品的色价, (U/mL)/(U/g);

A—稀释液的吸光度;

n—稀释倍数;

G—菌丝干重, g;

V—发酵液取样体积。

1.2.8 TLC 法初步分离红曲色素

参照屈炯^[21]的方法进行薄层色谱初步分离发酵所产红曲色素,75%乙醇色素提取液适当浓缩后,用毛细管点样于硅胶 G 板上,用吹风机吹干后放入展开剂中展开得到红色及黄色组分,展开剂体积配比甲苯:乙酸乙酯:甲酸=7:3:1。将乙酸乙酯浓缩液点样于硅胶 H 板上,吹干后放入展开剂中展开,展开剂配比 (V/V) 正己烷:乙酸乙酯:石油醚=30:17:5。展开得到带有橙色硅胶用小刀刮下,收集硅胶并用乙酸乙酯再次提取,适当浓缩后点样于硅胶 H 板上,吹风机吹干后于展开缸中展开,展开剂体积比甲苯:乙酸乙酯:甲酸=7:3:2,得到各橙色组分。

1.2.9 高效液相色谱法测定红曲色素组分

样品处理:上述溶液用 0.45 μ m 的膜过滤后,

再进行 HPLC 分析。色谱柱: XDB-C18 (5 μ m, 4.6×250 mm); 流动相选乙腈和水(加 0.1% 色谱级甲酸); 按照梯度洗脱方法洗脱(如下表); 检测器: 二极管阵列检测器 (DAD), 检测波长 410 nm; 柱温 25 °C; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μ L。

表 1 HPLC 洗脱方法

Table 1 HPLC elution method

时间	水	乙腈
0~12	40	60
12~25	40~10	60~90
25~27	10	90
27~30	10~40	90~60

1.2.10 高效液相色谱法测定桔霉素

具体参照薛原^[22]的桔霉素检测方法设置高效液相色谱条件。

1.2.11 色差的测定

参照 Chen 等^[23]的色差分析方法,使用 DC-P3 全自动测色色差计对不同培养条件下获得的红曲红色色素做出分析。采用 CIE 推荐的 D65 标准光源, o/d 条件及 10 °视场。测定色素液(适当稀释倍数)的明度 L^* , 色泽 a^* 、 b^* , 色调彩度 C_{ab} 和色相角 H_{ab} 。CIELAB 颜色空间是三维直角坐标系统,以明度 L^* 和色度坐标 a^* 、 b^* 来表示颜色在色空间中的位置。 L^* 表示颜色的明度即深浅, a^* 正值表示偏红,负值表示偏绿; b^* 正值表示偏黄,负值表示偏蓝。色相角 H_{ab} 0 °为红色,90 °时为黄色,180 °时为绿色。色调彩度 C_{ab} 和色相角 H_{ab} 按下列公式计算:

$$C_{ab} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (2)$$

$$H_{ab} = \tan^{-1}(b/a) \quad (3)$$

1.3 数据处理

实验数据分析采用 SAS 9.2 软件进行显著性差异分析 ($p < 0.05$), 字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$), 字母相同表示差异不显著 ($p > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 大米成分分析

表 2 为大米中淀粉含量,表 3 为大米成分,与汪建国等^[24]的成分结果相似。如表 2 所示粳米的总淀粉含量及直链淀粉含量最高,分别可达 72.87%、10.69%,支链淀粉含量 (62.19%) 也与糯米中支链淀粉 (63.47%) 含量相当。糯米中支链淀粉含量最高,可

达 63.47%，直链淀粉含量几乎没有 (0.80%)，支链淀粉与总淀粉之比为 98.76%，近 100%。籼米总淀粉含量最低 (58.30%)，支链淀粉含量最低 (54.04%)，支链淀粉与总淀粉之比比粳米高 7.36%。较高的支链淀粉与总淀粉之比可能是导致籼米和糯米发酵产橙色素较多的原因。其余大米成分包括粗脂肪、水分、蛋白质含量三种大米品种都接近，约为 7.72%、9.51%、6.99%，只有微量元素有较大差异。三种大米中铜元素含量接近 (2.01 mg/kg)，粳米中镁元素、锰元素、铁元素含量较高，分别可达 635.45、15.86、26.44

mg/kg，其中镁元素是籼米中的 2.56 倍，是糯米的 4.57 倍；锰元素是籼米的 1.83 倍，糯米的 2.45 倍；铁元素是籼米的 1.31 倍，糯米与之接近，仅差 2.28 mg/kg。据文献报道，Mg²⁺、Mn²⁺的适当添加对紫色红曲霉产红曲色素有促进作用^[22]。据杨晓君^[25]的研究，Zn²⁺、Mn²⁺对红曲霉的色价和色调都有促进作用，可使所产红曲色素色调偏黄。结合文献和小米成分差异，推测 Zn²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺及支链淀粉与总淀粉之比是不同品种大米发酵所产生色素组分差异的原因。

表 2 各品种大米淀粉含量 (%)

Table 2 Starch content of various varieties of rice (%)

大米品种	直链含量	支链含量	总淀粉含量	直/总	支/总
粳米	10.69±0.13 ^a	62.19±0.15 ^b	72.87±0.28 ^a	14.66±0.13 ^a	85.34±0.13 ^c
籼米	4.25±0.09 ^b	54.04±0.08 ^c	58.30±0.17 ^c	7.30±0.12 ^b	92.70±0.12 ^b
糯米	0.80±0.06 ^c	63.47±0.11 ^a	64.26±0.17 ^b	1.24±0.09 ^c	98.76±0.09 ^a

表 3 各品种大米成分

Table 3 Various varieties of rice ingredients

大米品种	粗脂肪/%	水分/%	蛋白质含量/%	Mg/(mg/kg)	Mn/(mg/kg)	Fe/(mg/kg)	Cu/(mg/kg)	Zn/(mg/kg)
粳米	8.03±0.09 ^a	10.35±0.11 ^a	6.99±0.07 ^a	635.45±0.23 ^a	15.86±0.08 ^a	26.44±0.09 ^a	1.83±0.03 ^b	16.88±0.10 ^b
籼米	7.72±0.08 ^b	8.24±0.12 ^c	6.96±0.09 ^a	248.36±0.18 ^b	8.64±0.07 ^b	20.22±0.06 ^c	2.01±0.05 ^a	18.55±0.04 ^a
糯米	6.94±0.06 ^c	9.51±0.09 ^b	7.17±0.11 ^a	138.92±0.13 ^c	6.48±0.04 ^c	24.16±0.08 ^b	2.08±0.05 ^a	13.01±0.07 ^c

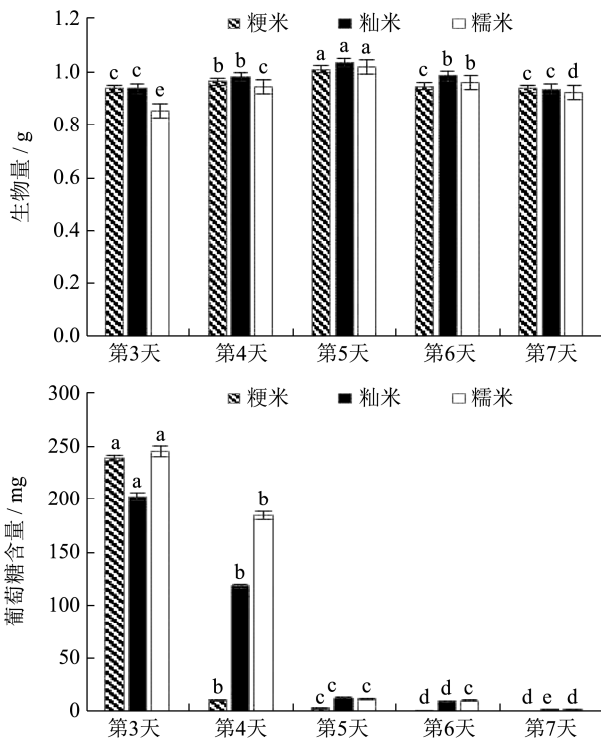


图 1 大米品种对生物量及葡萄糖含量的影响

Fig.1 Effects of rice varieties on biomass and glucose content

2.2 大米品种对 M9 液态发酵生物量及葡萄糖

含量的影响

如图 1，各品种大米发酵后的生物量随时间的变化趋势大体都相同，红曲菌 M9 在粳米、籼米、糯米上发酵后的生物量随时间的增长先升高，粳米、籼米、糯米的生物量分别从 0.94、0.94、0.85 g (3 d)，上升至 1.01、1.03、1.02 g (5 d 生物量最高值)，随后下降，落回 0.94、0.94、0.92 g (7 d)。这种生物量增长趋势与薛原^[21]的紫色红曲霉的生物量研究结果基本一致。各品种大米本质上都为淀粉质营养源，红曲霉发酵过程中产生初级代谢产物淀粉酶，淀粉酶催化淀粉转化为葡萄糖。结合葡萄糖含量结果，第 3 天存在大量葡萄糖 (238.29、202.07、245.40 mg)，菌体在发酵第 5 天生长达最高峰，同时葡萄糖含量大量减少 (3.75、12.86、11.68 mg)，说明此时的淀粉及营养物质被大量消耗，菌体生长进入稳定期；第 5 天以后菌体有所衰减，葡萄糖含量也大量减少，菌体开始进入衰亡期^[22]。第 3 天及第 7 天的粳米生物量最大且与籼米的生物量基本持平，第 4 天到第 6 天糯米的生物量在各品种中最高，糯米的生物量一直处于较低水平。葡萄糖含量总体一直呈下降趋势，与 Tao Huang 等^[26]的残余葡萄糖量结果基本相似。粳米内的淀粉及葡萄糖在第 4 天

(10.88 mg) 就基本被消耗殆尽, 而糯米和籼米第 5 天葡萄糖才迅速消耗直到发酵结束。粳米内的淀粉消耗较快, 在前期 (3~4 d) 促使菌体生长累积生物量, 籼米和糯米内的淀粉消耗速率相对较慢, 则在后期 (5~6 d) 积累生物量。这种现象可能和淀粉种类有关, 糯米中的淀粉由支链淀粉组成, 籼米和粳米中的淀粉都是由直链淀粉及支链淀粉构成 (籼米中的支链淀粉更多), 后续还需验证。

2.3 大米品种对胞内及胞外色价的影响

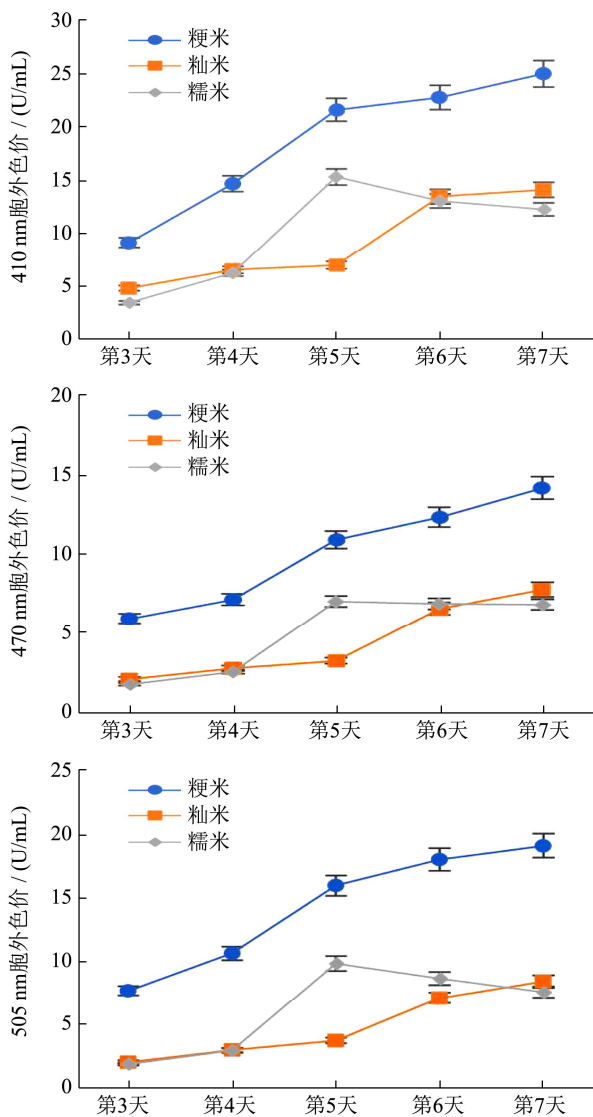


图2 大米品种对胞外色价 (410、470、505 nm) 的影响
Fig.2 Effects of rice varieties on extracellular color values (410, 470, 505 nm)

红曲菌 M9 以各品种 (粳、籼、糯) 为基质的液态发酵的胞外色价如图 2 所示, 胞内色价如图 3 所示, 分别于 410 nm (黄色素最大吸收峰)、470 nm (橙色素最大吸收峰)、505 nm (红色素最大吸收峰) 处测得胞外及胞内色价。其中粳米和籼米的胞外色价随时

间变化趋势一致, 在第 3 天到第 7 天一直呈增长趋势, 第 3 天粳米的胞外色价为 9.11、5.93、7.63 U/mL (依次为 410、470、505 nm 处的色价值, 下同), 籼米的胞外色价为 4.79、2.10、1.98 U/mL, 两者都于第 7 天达胞外色价最大值 (粳米可达 24.95、14.17、19.07 U/mL, 籼米可达 14.08、7.77、8.38 U/mL)。这种增长趋势与 Gong Chen^[27]的胞外色价研究结果相似。糯米第 3 天的胞外色价为 3.42、1.77、1.81 U/mL, 且于第 5 天达胞外色价最大值 (15.30、7.02、9.79 U/mL), 第 5 天后的色价呈下降趋势。各品种大米相比较而言, 粳米的胞外色价值最高, 整体胞外色价值显著高于籼米和糯米, 可达到籼米的 2.28 倍, 糯米的 2.53 倍。糯米和籼米的胞外色价整体接近, 但糯米的最大胞外色价值高于籼米。

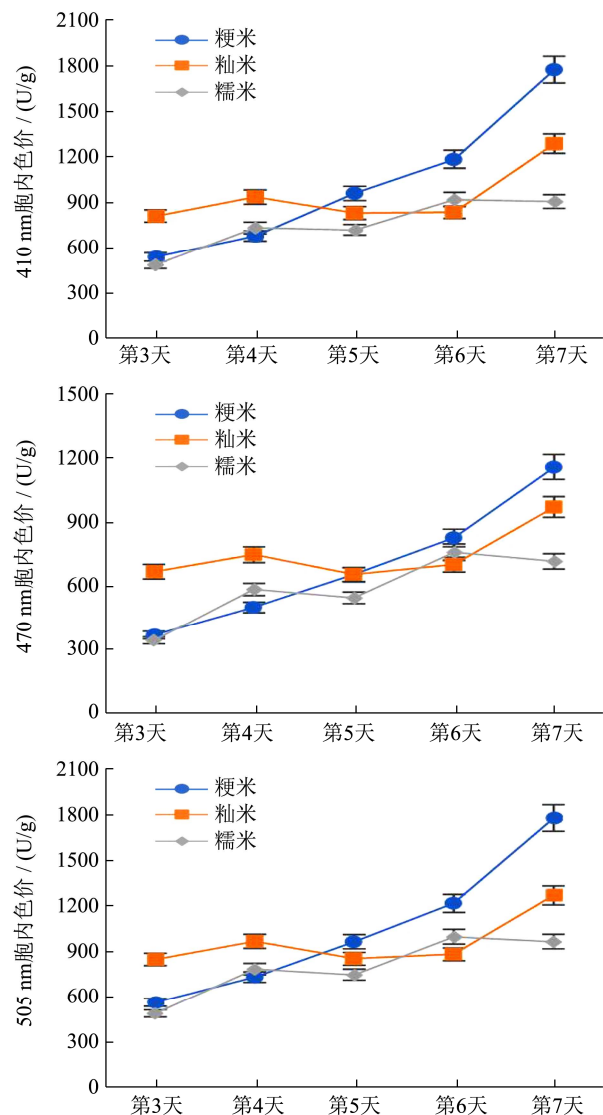


图3 大米品种对胞内色价 (410、470、505 nm) 的影响
Fig.3 Effects of rice varieties on intracellular color values (410, 470, 505 nm)

粳米的胞内色价在发酵过程中 (3~7 d) 一直呈显

著上升趋势,色价值从 540.18、369.36、540.18 U/g (3 d), 上升至 1772.16、1158.48、1762.80 U/g (7 d)。粳米胞内色价随发酵时间变化的趋势与杨晓君^[25]的研究结果相似。籼米的胞内色价第 3~6 天的色价值接近(约为 811.20、668.28、826.92 U/g), 于第 4 天(937.80、748.56、947.46 U/g) 略有起伏, 在第 7 天达色价最高值(1287.60、972.24、1251.36 U/g)。糯米的胞内色价整体呈上升趋势, 中间略有波动, 于第 6 天达色价最大值(921.00、759.00、978.36 U/g)。籼米和糯米随时间增长波动式的增长趋势与 Gong Chen^[27]的胞内色价结果基本一致。整体相比, 前期(3~4 d) 籼米的胞内色价高于糯米及粳米的胞内色价, 可达糯米的 1.24 倍, 粳米的 1.33 倍, 后期(6~7 d) 粳米的胞内色价值较高, 色价值最高可达籼米的 1.41 倍, 糯米的 1.86 倍。以粳米为基质的发酵更利于 M9 的色素累积, 就发酵时间来说, 发酵进行到第 7 天更有利于红曲色素的生产。

2.4 TLC 法初步分离红曲色素

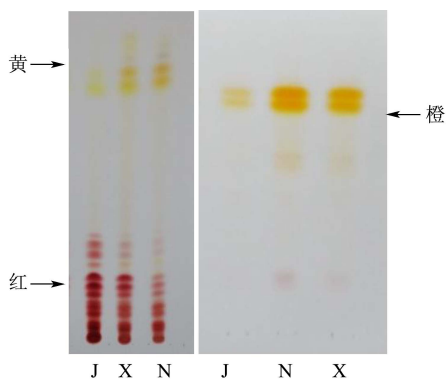


图 4 薄层分离图

Fig.4 TLC separation diagram

注: J: 粳米; X: 籼米; N: 糯米。

图 4 为经薄层分离后红曲色素的分布, 红、黄、橙色素的位置分布结果与 Liu 等^[28]的研究结果基本一致。左图得到 5 个清晰的红色素条带 (Rf=0.13、Rf=0.16、Rf=0.19、Rf=0.25、Rf=0.29), 2 个黄色条带 (图指位置, Rf=0.88、Rf=0.91), 右图得到两条清晰的橙色条带 (Rf=0.72、Rf=0.77)。根据条带可知粳米发酵所产红曲色素中红色素的种类及产量更多, 在薄层上呈现出的红色条带的颜色也更深更红。右图橙色条带明显糯米色泽最深, 条带清晰, 籼米次之, 而粳米的橙色条带最弱。说明糯米及籼米发酵所得橙色素比粳米发酵所得橙色素产量更高。就目前薄层结果来看, 以粳米为基质发酵更利于 M9 产红色素, 而糯米和籼米更利于红曲菌 M9 产橙色素。

2.5 HPLC 法测红曲色素组分

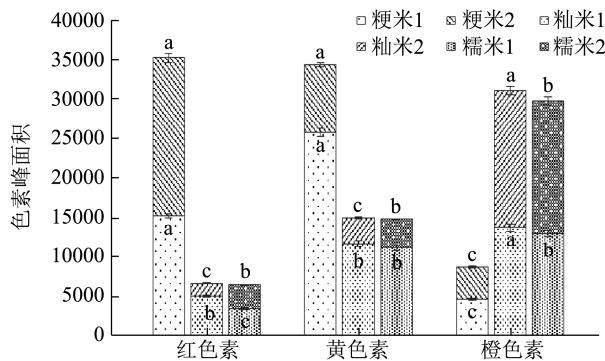


图 5 各大米品种发酵产色素组分 (5 d)

Fig.5 Each rice variety fermented to produce pigment components (5 d)

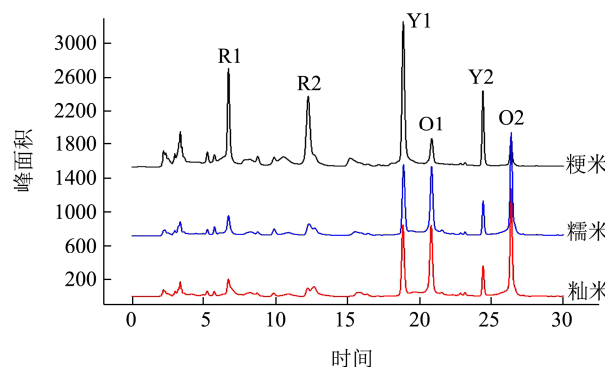


图 6 各大米品种发酵产色素峰图 (5 d)

Fig.6 Peak diagram of fermentation pigment production of rice varieties (5 d)

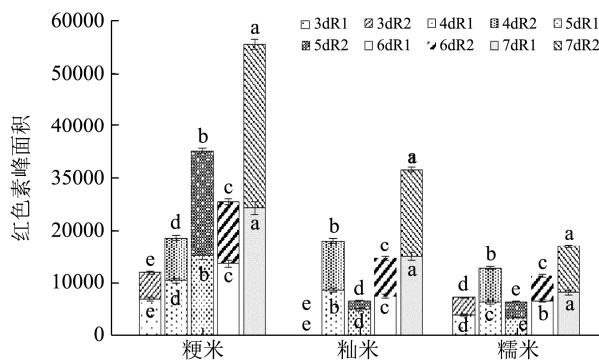


图 7 各大米品种发酵产红色素 (3~7 d)

Fig.7 Each rice variety fermented to produce red pigment (3~7 d)

经 HPLC 分析各品种大米发酵所产色素基本为红色素 R1、红色素 R2、黄色素 Y1、黄色素 Y2、橙色素 O1、橙色素 O2 这六种, 色素组分与 Chen 等^[23]研究的色素组分基本一致。图 5 所示为 6 种红曲色素的峰面积图, 图 6 为各大米品种发酵产色素的峰图, 由图可知粳米所产色素中红色素 (R1、R2) 及黄色素 (Y1、Y2) 最大, 而籼米和糯米中橙色素 (O1、O2) 最大。其中粳米中的红色素是籼米的 5.32 倍, 糯米的 5.50 倍; 黄色素是籼米的 2.29 倍, 糯米的 2.32 倍; 橙

色素则是籼米中橙色素的 27.84%，是糯米的 29.05%。各品种大米相比较，粳米更利于红曲菌 M9 发酵产红、黄色素，籼米和糯米则更利于橙色素的增长。

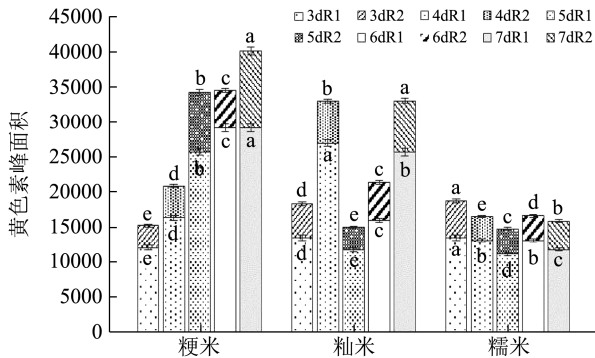


图 8 各大米品种发酵产黄色素 (3~7 d)

Fig.8 Each rice variety fermented to produce yellow pigment

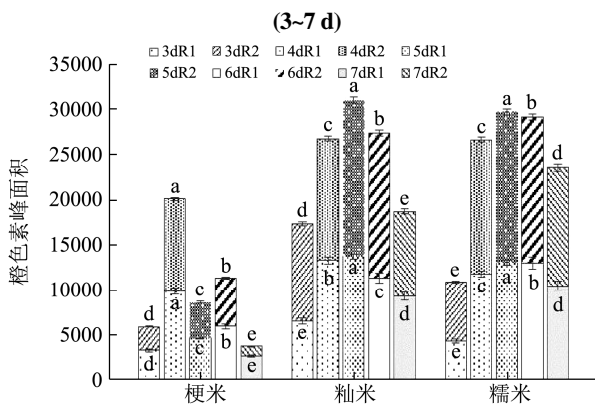


图 9 各大米品种发酵产橙色素 (3~7 d)

Fig.9 Each rice variety fermented to produce orange pigment

(3~7 d)

由图 7~9 可知各品种大米的红色素及粳米、籼米所产黄色素都于发酵第 7 天达最大值，黄色素 Y1 的最高峰 (27041.60) 则在发酵第 4 天，糯米中红色素 R1、R2 在发酵第 7 天有最大峰面积(8160.12、8883.31) 黄色素 Y1、Y2 在第 3 天就到达最高点 (13559.39、5243.64)。粳米橙色素 O1、O2 于第 4 天达最大值 (9871.99、10172.10)，籼米和糯米所产橙色素 O1、O2 在发酵第 5 天有最大值 (13752.70、17319.20、13077.20、16698.60)。随着发酵时间的增长，红色素 R1、R2 的增加通常伴随着橙色素 O1、O2 的减少。橙色素是可以转化为红色素的，如与氨基酸、肽、蛋白质的氨基发生加氨反应生成红色素^[29]。发酵后期红色素生成增多，橙色素减少，这种情况可能是由于后期橙色素开始向红色素转化。

2.6 HPLC 法测桔霉素

图 10 所示为通过 HPLC 分析各品种大米中桔霉素的峰面积图，桔霉素是与红曲色素一起产生的肾毒

性和肝毒性真菌毒素，威胁食用色素的安全^[22]。粳米及糯米的桔霉素含量随时间变化的整体趋势与陈蕴等^[30]的研究相似。由图可知，粳米及糯米的桔霉素产量随发酵时间的增长而逐步增长，发酵第 3 天时峰面积有最低值(88.35、251.18)，第 7 天则有最高值(550.34、1056.41)。籼米的桔霉素峰面积则在第 6 天增长至最大值 (714.62)，第 7 天略有下降 (525.89) 呈先上升后下降的趋势。整体的桔霉素含量糯米是 3 种大米中最高的，粳米则是三者中最低的，发酵第 3 天两者相差最大，此时糯米桔霉素含量是粳米桔霉素含量的 2.84 倍。整体来看粳米发酵所产色素安全性最高，籼米次之。

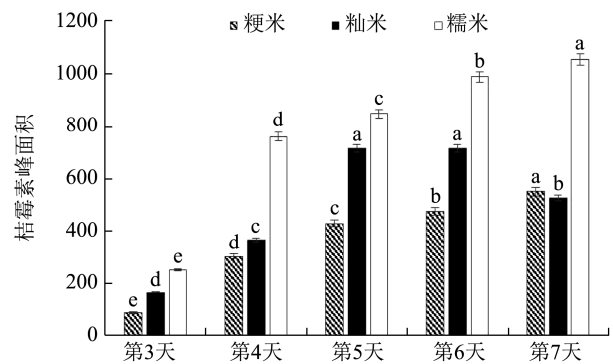


图 10 桔霉素峰面积

Fig.10 Peak area of citrinin

陈蕴等^[30]对红曲菌所产桔霉素含量随发酵时间的变化规律进行了研究，红曲色素和桔霉素的含量都随着时间的增加而增长，但两者的生产水平并不处于一个数量级，相比红曲色素，桔霉素的产量一般比较微量，其产生的时间也比红曲色素慢，桔霉素的合成也主要集中发酵后期。从安全性和色素总量的角度考虑，粳米更适合长时间 (7 d) 发酵，籼米和糯米更适合短时间 (4 d)，合适的发酵时间有利于产生更多的色素及更少的桔霉素。

2.7 色差分析

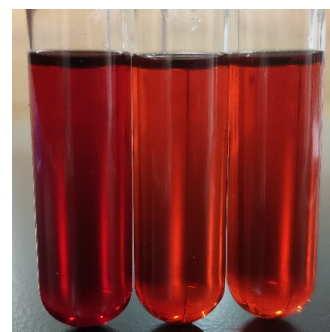


图 11 粳米、籼米、糯米色素对比图 (5 d)

Fig.11 Contrast of pigment of japonica rice, indica rice and glutinous rice (5 d)

表4 各品种大米发酵的颜色特征

Table 4 Color characteristics of rice fermentation of various varieties

大米品种	发酵时间/d	L*	a*	b*	H _{ab}	C _{ab}	视觉颜色
粳米	3	92.07±0.01 ^a	10.68±0.01 ^e	2.38±0.02 ^e	12.55±0.06 ^e	10.94±0.02 ^b	浅红
	4	83.98±0.02 ^d	20.37±0.02 ^b	6.45±0.02 ^b	17.57±0.02 ^a	21.37±0.02 ^a	浅红
	5	82.93±0.01 ^e	22.15±0.02 ^a	6.69±0.01 ^a	16.81±0.01 ^b	23.14±0.02 ^e	深红
	6	86.65±0.01 ^b	17.65±0.01 ^d	4.86±0.01 ^c	15.40±0.02 ^c	18.31±0.01 ^d	深红
	7	85.58±0.04 ^c	19.59±0.05 ^c	4.48±0.01 ^d	12.87±0.03 ^d	20.09±0.05 ^c	深红
籼米	3	87.03±0.02 ^d	16.82±0.02 ^b	7.31±0.02 ^b	23.48±0.02 ^c	18.34±0.02 ^b	橘红
	4	86.04±0.01 ^e	17.67±0.01 ^a	9.45±0.02 ^a	28.15±0.06 ^a	20.04±0.02 ^a	橘红
	5	89.57±0.01 ^b	13.07±0.02 ^d	6.23±0.01 ^c	25.50±0.01 ^b	14.48±0.02 ^d	橘红
	6	88.88±0.02 ^c	13.92±0.04 ^c	6.01±0.02 ^d	23.35±0.01 ^d	15.16±0.04 ^c	橘红
	7	95.05±0.03 ^a	6.44±0.03 ^e	1.58±0.06 ^e	13.76±0.06 ^e	6.63±0.06 ^e	深红
糯米	3	91.62±0.03 ^a	11.10±0.06 ^e	3.58±0.03 ^e	17.87±0.01 ^e	11.66±0.07 ^e	浅红
	4	88.51±0.04 ^d	14.55±0.05 ^b	6.89±0.01 ^b	25.33±0.03 ^a	16.09±0.05 ^b	橘红
	5	89.62±0.02 ^c	12.70±0.04 ^c	5.94±0.02 ^c	25.07±0.01 ^b	14.02±0.04 ^c	橘红
	6	91.23±0.03 ^b	11.37±0.06 ^d	4.47±0.03 ^d	21.48±0.01 ^d	12.22±0.06 ^d	深橘红
	7	86.65±0.02 ^e	17.01±0.02 ^a	7.67±0.02 ^a	24.28±0.02 ^c	18.66±0.02 ^a	深橘红

表4为各品种大米发酵的颜色特征,其中L*代表颜色的深浅,a*代表红绿色度值,b*代表黄蓝色度值,H_{ab}是色相角,C_{ab}是色调彩度。本研究根据色差仪所测指标结合视觉观察判定样品颜色。粳米发酵的色素色差结果与Chen等^[23]的研究结果相似。由表可知,视觉上粳米在第3、4天发酵色素呈浅红色,从第5天开始转为深红色;籼米第3~6天为橘红色,第7天则转为深红色;糯米第3天为浅红色,而后转为橘红色直到第7天发酵结束,其中第6~7天的色素颜色更深。由色差结果可知,粳米发酵偏红,籼米及糯米发酵偏橘红,与高效液相分析色素的结果相印证。在发酵第4~5天,这种现象更明显。

3 结论

3.1 以实验室保藏的色素产量稳定的紫色红曲菌M9为试验菌株,分别以粳米、籼米、糯米作为基质进行液态发酵,通过色价测定、高效液相色谱法、薄层色谱法、色差仪分析法分析所产色素产量及色素组分,并借助生物量测定、葡萄糖含量测定、大米成分测定深入研究大米中哪些成分导致了这种组分差异的产生。结果表明:菌体在发酵第5天生长达最高峰,同时淀粉及营养物质被大量消耗,菌体生长进入稳定期。粳米内的淀粉消耗较快,在前期(3~4d)促使菌体生长累积生物量,籼米和糯米内的淀粉消耗速率相对较慢,则在后期(5~6d)积累生物量。第5天以后菌体有所衰减,进入衰亡期。各品种大米相比较而言,粳米的胞外色价值最高,整体胞外色价值显著高于籼米

和糯米。前期籼米的胞内色价高于糯米及粳米的胞内色价,后期粳米的胞内色价值较高,可达到籼米的1.41倍,糯米的1.86倍,以粳米为基质的后期发酵更利于M9的色素累积。

3.2 视觉上不同品种大米发酵也呈现不同的色调,粳米呈现深红色,糯米及籼米则呈现橘红色。不同品种大米发酵色素组分不同,粳米中红色素(R1、R2)及黄色素(Y1、Y2)产量较高,橙色素O1、O2则更适合在籼米和糯米中生产。以粳米为基质发酵更利于M9产红、黄色素,而糯米和籼米更利于红曲菌M9产橙色素。整体来看粳米发酵所产色素安全性最高,桔霉素的产量最低,籼米和糯米的安全性次之,且糯米的安全性最差。结合文献和大米成分差异,推测Zn²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺及支链淀粉与总淀粉之比是不同品种大米发酵所产色素组分差异的原因。

3.3 今后,可探究直链淀粉、支链淀粉及镁元素对紫色红曲霉M9发酵产红曲色素色调的影响,深入研究大米品种调控红曲色素色调变化的机理。为生产不同色调的红曲色素适应市场需求提供理论依据,为进一步探究大米品种调控其他红曲霉的次级代谢提供参考。

参考文献

- [1] Patakova P. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(2): 169-181
- [2] Patakova P. Red yeast rice [C]// *McGraw-Hill Yearbook of*

- Science and Technology, McGraw-Hill, New York, 2005: 286-288
- [3] Ma J, Li Y, Ye Q, et al. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5220-5225
- [4] 张媛媛.红曲霉菌发酵糯米红曲的初步探究[D].合肥:安徽农业大学,2019
ZHANG Yuanyuan. A preliminary study of *Monascus* fermentation of glutinous rice red koji [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019
- [5] Barakat K M, Mattar M Z, Sabae S Z, et al. Production and characterization of bioactive pyocyanin pigment by marine *Pseudomonas aeruginosa* OSh1 [J]. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2015, 6(5): 933-943
- [6] Darwesh O M, Barakat K M, Mattar M Z, et al. Production of antimicrobial blue greenpigment pyocyanin by marine *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biointerface Research in Applied Chemistry, 2019, 9(5): 4334-4339
- [7] Ogbodo U O, Ugwuanyi J O. Production, use, and prospects of microbial food colorants [J]. Microbial Production of Food Ingredients & Additives, 2017: 189-216
- [8] Nigam P S, Luke J S. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties [J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 7: 93-100
- [9] Vendruscolo F, R M M Bühler, Carvalho J, et al. *Monascus*: a reality on the production and application of microbial pigments [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2016, 178(2): 211-223
- [10] Malik K, Tokkas J, Goyal S. Microbial pigments: a review [J]. International Journal of Microbial Resource Technology, 2012, 1: 361-365
- [11] Kim, Y E, Matter I A, Lee N, et al. Enhancement of astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* using magnesium aminoclay nanoparticles [J]. Bioresource Technology, 2020, 307: 123270
- [12] Mostafa, M E, Abbady M S. Secondary metabolites and bioactivity of the *Monascus* pigments review article [J]. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 2014, 9: 1-13
- [13] Ouyang W, Liu X, Wang Y, et al. Addition of genistein to the fermentation process reduces citrinin production by *Monascus* via changes at the transcription level [J]. Food Chemistry, 2020, 343(1): 128410
- [14] 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]. Applied Sciences, 2020, 10(24): 8867
- [15] 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(7):256-261
YI Shanshan, SHEN Chang, HAN Yongbin, et al. Formation mechanism of *Monascus* pigment and ways to improve its color value [J]. Food Science, 2005, 26(7): 256-261
- [16] Jun O, Jun K, Kunio O, et al. Biosynthesis of PP-V, a monascorubramine homologue, by *Penicillium* sp. AZ [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(6): 678-680
- [17] Hajjaj H, Kläbe A, Loret M O, et al. Production and identification of N-Glucosylrubropunctamine and N-Glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron-donor-acceptor complexes in these red pigments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(7): 2671-2678
- [18] Jung H, Kim C, Kim K, et al. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(5): 1302-1306
- [19] 张雪梅,张玲,高飞虎,等.不同分散温度、时间对双波长法测定大米中淀粉质量分数的影响研究[J].西南大学学报(自然科学版),2020,42(4):49-55
ZHANG Xuemei, ZHANG Ling, GAO Feihu, et al. Effects of different dispersion temperature and time on the determination of starch content in rice by dual wavelength method [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2020, 42(4): 49-55
- [20] 黄涛.环境因子对红曲霉发酵水溶性黄色素代谢调控机制[D].广州:华南理工大学,2018
HUANG Tao. Regulation mechanism of environmental factors on the metabolism of water-soluble yellow pigment by *Monascus* fermentation [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [21] 屈炯.红曲色素组分分离及其功能的初步研究[D].武汉:华中农业大学,2008
QU Jiong. Preliminary study on separation and function of *Monascus* pigment [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008
- [22] 薛原.发酵条件对红曲霉红曲素和桔霉素含量的影响[D].天津:天津科技大学,2015
XUE Yuan. Effects of fermentation conditions on the contents of monascus and citromycin in *Monascus* [D].

- Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015
- [23] Chen D, Wang Y, Chen M, et al. Ammonium nitrate regulated the color characteristic changes of pigments in *Monascus purpureus* M9 [J]. AMB Express, 2021, 11(1): 3-13
- [24] 汪建国,汪陆翔.大米品种和品质与黄酒酿造关系的探讨[J].中国酿造,2006,9:60-63
WANG Jianguo, WANG Luxiang. Study on the relationship between rice varieties and quality and rice wine brewing [J]. China Brewing, 2006, 9: 60-63
- [25] 杨晓君.主要营养源对红曲霉产色素的影响[D].福州:福建农林大学,2011
YANG Xiaojun. Effects of main nutrient sources on pigment production of *Monascus* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2011
- [26] Huang T, Tan H, Lu F, et al. Changing oxidoreduction potential to improve water-soluble yellow pigment production with *Monascus ruber* CGMCC 10910 [J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 208-219
- [27] Chen G, Yang S, Wang C, et al. Investigation of the mycelial morphology of *Monascus* and the expression of pigment biosynthetic genes in high-salt-stress fermentation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2469-2479
- [28] Liu Q, Xie N, He Y, et al. MpigE, a gene involved in pigment biosynthesis in *Monascus ruber* M7 [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(1): 285-296
- [29] Dhale M A. Physiology of *Monascus purpureus* in relation to metabolite production and application as functional food [D]. India: Doctor Thesis of University of Mysore, 2007
- [30] 陈蕴,夏永军,许赣荣,等.红曲液态发酵高产色素低产桔霉素的工艺条件[J].食品与发酵工业,2007,10:10-13
CHEN Yun, XIA Yongjun, XU Ganrong, et al. Liquid fermentation of *Monascus* with high yield of pigment and low yield of citrinin [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 10: 10-13

(上接第 188 页)

- [17] SONG Wei, SUN Yong, XU Lintao, et al. Synthesis of nature product kinsenoside analogues with anti-inflammatory activity [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2021, 29: 115854
- [18] Hsiao Hungbo, Hsieh Changchi, WU Jinbin, et al. Kinsenoside inhibits the inflammatory mediator release in a type-II collagen induced arthritis mouse model by regulating the T cells responses [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2016, 16(1): 80
- [19] LIU Qing, QIAO Aimin, YI Litao, et al. Protection of kinsenoside against AGEs-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells [J]. Life Sciences, 2016, 162: 102-107
- [20] 冯宇,刘雪梅,罗伟生,等.大孔树脂纯化荔枝核总黄酮工艺研究[J].中草药,2019,50(9):2087-2093
FENG Yu, LIU Xuemei, LUO Weisheng, et al. Study on purification of total flavonoids from litchi semen by macroporous resin [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(9): 2087-2093
- [21] 宋志华,鲁珊,黄健花,等.硅胶柱色谱制备高纯 1,3-二油酸甘油二酯的研究[J].中国油脂,2015,40(12):70-73
SONG Zhihua, LU Shan, HUANG Jianhua, et al. Preparation of high purity 1,3-dioleate glycerol by silica gel column chromatography [J]. China Oils and Fats, 2015, 40(12): 70-73
- [22] 姜瑞清,周琳,黎继烈,等.硅胶柱层析纯化花生根中白藜芦醇工艺研究[J].食品科技,2010,35(1):199-202
JIANG Ruiqing, ZHOU Lin, LI Jilie, et al. Purification of resveratrol from flower roots by silica gel column chromatography [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(1): 199-202