

响应面法优化酱油渣红曲水溶性红色素发酵条件

张新峰¹,汪璇²,胡晨阳²,王伟平^{2*}

(1.佛山市海天(高明)调味食品股份有限公司,广东佛山 528500;2.湖北工业大学 生命科学与健康工程学院,湖北武汉 430068)

摘要:针对酱油渣资源化利用及水溶性红曲红色素低成本生产需求,开展红曲霉液态发酵酱油渣发酵条件优化研究。实验筛选出耐盐性较强的红曲霉菌株 *Monascus* sp. CJ 01-01 作为发酵菌株,以酱油渣为发酵基质,以水溶性红曲红色素色价为评价指标,采用单因素试验和响应面试验对酱油渣水溶性红曲红色素发酵条件进行优化。结果表明,最佳发酵条件为:酱油渣 60 g/L、乙酸铵 0.35 g/L、葡萄糖 34.05 g/L、硫酸亚铁 0.2 g/L、初始 pH 值为 8、发酵时间 7 d。在此优化条件下,酱油渣水溶性红曲红色素色价为 (108.5±2.1) U/mL,是优化前的 3.8 倍。综上,酱油渣作为底物生产水溶性红曲红色素具有较大的潜力,为酱油渣的资源化利用提供参考。

关键词:酱油渣;红曲霉;水溶性红曲红色素;发酵条件优化

中图分类号:TS264.2

文章编号:0254-5071(2025)09-0215-08

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2025.09.033

引文格式:张新峰,汪璇,胡晨阳,等.响应面法优化酱油渣红曲水溶性红色素发酵条件[J].中国酿造,2025,44(9):215-222.

Optimization of fermentation conditions for *Monascus* water-soluble red pigment from soy sauce residues by response surface methodology

ZHANG Xinfeng¹, WANG Xuan², HU Chenyang², WANG Weiping^{2*}

(1.Foshan Haitian (Gaoming) Flavoring & Food Co., Ltd., Foshan 528500, China;

2.School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: Aiming at the resource utilization of soy sauce residue and the demand for low-cost production of water-soluble *Monascus* red pigment, the research on the optimization of liquid fermentation conditions of soy sauce residue by *Monascus* were carried out. In this study, *Monascus* sp. CJ 01-01 with strong salt tolerance was screened as the fermentation strain, using soy sauce residues as the fermentation substrate and water-soluble *Monascus* red pigment color value as the evaluation index, and the fermentation conditions of water-soluble *Monascus* red pigment from soy sauce residues were optimized by single factor and response surface experiments. The results showed that the optimal fermentation conditions was as follows: soy sauce residues 60 g/L, ammonium acetate 0.35 g/L, glucose 34.05 g/L, ferrous sulfate 0.2 g/L, initial pH 8, and fermentation time 7 d. Under these optimal conditions, the color value of water-soluble *Monascus* red pigment from soy sauce residue was (108.5±2.1) U/ml, which was 3.8 times that of before the optimization. In conclusion, soy sauce residues as a substrate for the production of water-soluble *Monascus* red pigment had a greater potential, providing a valuable reference for the resource utilization of soy sauce residue.

Key words: soy sauce residues; *Monascus*; water-soluble *Monascus* red pigment; fermentation conditions optimization

红曲红色素是红曲霉发酵产生的一种天然色素,具有良好的着色性能,具有抗氧化、降血脂等生理功能^[1],广泛应用在食品、医药及化妆品体系中。水溶性红曲红色素是红曲红色素的衍生物,具有较高的水溶性和光稳定性^[2],具有更广阔的应用价值。

酱油是一种传统的发酵调味品,全球年产能已突破 800 万 t,我国占比超 60%^[3]。每生产 1 kg 酱油,就会产生大约 0.67 kg 酱油渣。酱油渣盐分含量为 5%~17%,粗纤维含量为 5%~10%,富含油脂、粗蛋白和还原糖等物质,是一种潜力巨大的生物资源^[4]。如何高效利用酱油渣,提升其利用价值是各酱油行业一直在探索的问题。酱油渣的高盐高纤维特性极大限制了其利用范围,酱油渣的利用集中在饲料^[5]、肥料^[6]和功能性成分提取^[7]等领域,传统的酱油渣

利用方法存在附加值低和预处理能耗高等问题。红曲霉 (*Monascus*) 可以利用大米、木薯淀粉等粮食作为发酵底物,也可以利用米醋废渣、玉米芯水解液作为碳源发酵生产红曲色素^[8-10]。张庆庆等^[9]利用红曲霉对豆渣进行液态发酵生产红曲色素,胞外和胞内红色素总色价为 114.28 U/mL。DA SILVA V L 等^[10]利用米粉和糖蜜副产物生产红曲红色素,实现了废渣的二次利用并降低了成本。以酱油渣为发酵底物生产红曲色素的研究尚鲜见报道。

为了考察红曲霉液态发酵酱油渣产水溶性红曲红色素的效果,本研究进行红曲霉发酵菌株的筛选及菌株特性研究,并以酱油渣为基础培养基,通过针对性的添加营养成分对筛选菌株产水溶性红曲红色素发酵培养基和发酵条件进行优化,以提高酱油渣发酵基质的水溶性红曲红色

收稿日期:2025-03-28

修回日期:2025-07-31

基金项目:广东省调味食品生物发酵先进技术企业重点实验室开放基金项目(2017B030302002);国家自然科学基金(31101349)

作者简介:张新峰(1983-),男,工程师,硕士,研究方向为酱油发酵色素的制备及性质。

*通讯作者:王伟平(1972-),女,教授,博士,研究方向为发酵代谢调控。

素色价,为酱油渣的综合利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原料和菌种

酱油渣:佛山市海天调味食品股份有限公司。

紫红曲霉(*Monascus purpureus*) GN01、红色红曲霉(*Monascus ruber*) HS 4000、红曲霉(*Monascus sp.*) CJ 01-01;湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室保藏。

1.1.2 试剂

可溶性淀粉、蛋白胨(均为生化试剂)、葡萄糖、甘油、乳酸、氢氧化钠、L-谷氨酸钠、七水硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸锌、硝酸钠、硫酸亚铁、乙酸铵、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 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,蒸馏水1 000 mL。115 ℃条件下灭菌30 min。

液体种子培养基:20 g/L葡萄糖,10 g/L蛋白胨,3 g/L NaNO₃,1 g/L MgSO₄,1.5 g/L KH₂PO₄,蒸馏水1 000 mL。115 ℃条件下灭菌30 min。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:将去皮切块马铃薯300 g,加1000 mL蒸馏水,煮沸10~20 min。用纱布过滤,加入葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L,蒸馏水至1 000 mL。121 ℃条件下灭菌20 min。

酱油渣发酵培养基:6 g酱油渣添加100 mL水置于250 mL锥形瓶中,121 ℃条件下灭菌30 min。

产纤维素酶培养基:羧甲基纤维素钠1 g/L,葡萄糖2 g/L,蛋白胨1 g/L,NaNO₃ 0.3 g/L,MgSO₄ 0.1 g/L,KH₂PO₄ 0.15 g/L,蒸馏水1 000 mL。115 ℃条件下灭菌30 min。

1.2 仪器与设备

722S可见光分光光度计、AR114电子天平:上海精密科学仪器有限公司;TGL-16C台式离心机:上海安亭科学仪器厂;DNP-9052电热恒温培养箱:上海精宏实验设备有限公司;ZHWHY-2102C恒温摇床:上海智诚分析仪制造有限公司;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。

1.3 试验方法

1.3.1 种子液及发酵液的制备

斜面培养:挑取一环红曲霉接种于斜面培养基上,30 ℃培养7 d。

种子液的制备: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,即得种子液。

发酵液的制备:将10%(V/V)的种子液接种到酱油渣基础培养基,在30 ℃、180 r/min培养7 d,即得发酵液。

1.3.2 产水溶性红色素菌株的筛选

将保藏的3株产水溶性红色素红曲霉菌株GN01、HS 4000、CJ 01-01,分别制备种子液后以10%(V/V)接种量接入酱油渣发酵培养基中,30 ℃培养7 d,测定水溶性红色素色价和菌体量,比较各菌株在酱油渣培养基中的生长能力和色素合成能力。

1.3.3 发酵条件优化

(1)单因素试验

以酱油渣发酵培养基为基础,固定发酵温度为30 ℃,考察添加量均为6%不同碳源种类(葡萄糖、可溶性淀粉、糯米粉、大米粉、甘油、蔗糖)、葡萄糖添加量(15 g/L、30 g/L、45 g/L、70 g/L、85 g/L)、谷氨酸钠添加量(1 g/L、2 g/L、3 g/L、4 g/L、5 g/L)、硝酸钠添加量(0.1 g/L、0.4 g/L、0.7 g/L、1.0 g/L、2.0 g/L)、乙酸铵添加量(0.5 g/L、1.0 g/L、3.0 g/L、5.0 g/L、7.0 g/L)、硫酸亚铁添加量(0.10 g/L、0.17 g/L、0.25 g/L、0.30 g/L)、初始pH值(3、4、5、6、7、8、9、10)和发酵时间(3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、10 d)等因素对水溶性红曲红色素色价的影响。

(2)Plackett-Burman试验

根据单因素试验结果,可以得到影响酱油渣水溶性红曲红色素色价的多个因素及每个因素的最适水平。在此基础上,选取7个影响较为显著的因素,运用Design Expert 10.0.7软件中的Plackett-Burman组合,从7个单因素中确定影响最显著的因素。Plackett-Burman设计11个变量,即葡萄糖、谷氨酸钠、乙酸铵、硫酸亚铁及硝酸钠添加量、初始pH值、发酵时间、另外增加4个虚拟变量。每一个变量分别确定高水平(1)和低水平(-1)两个水平值,在本实验中通过设计12次试验,确定这7个影响因素具体的影响因子值,分别对这7个影响水溶性红曲红色素色价的影响因子取各自的高水平和低水平,按照Plackett-Burman试验设计。

(3)Box-Behnken试验

在Plackett-Burman试验的基础上,采用Box-Behnken中心组合试验设计,确定显著因素的最佳条件,并研究他们的相互作用,使用Design Expert 10.0.7软件通过响应面方法对红色素色价进行统计优化。选择PB试验显著的四个因素在3个水平(+1、0、-1)进行优化。

1.3.4 分析检测

(1)水溶性红曲红色素色价

根据WANG MH等^[1]的方法并略加修改。过滤发酵液,并适当稀释过滤溶液,用紫外-可见光光度计全波长扫描(350~600 nm),水溶性红曲红色素特征吸收波长为490 nm。即测定波长490 nm处吸光度值,以吸光度值乘以稀释倍数除以滤液体积计算水溶性红曲红色素色价。

(2)菌体量

生物量测定采用干质量法。收集的菌丝体在通过预先称质量的滤纸抽滤后,用蒸馏水洗涤3次,并在80 ℃下干燥至质量恒定,并再次称质量,计算菌丝体干质量。菌体量表示为单位体积培养基的菌丝体干质量(g/L)。

(3) 菌株耐盐能力

在PDA平板中加入固体氯化钠使其含量分别为0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%。在PDA平板中央接种红曲霉菌株,30℃条件下培养5 d后,形成单菌落,测量其菌落直径。菌落直径越大,表明菌株耐盐性越强^[12]。

(4) 菌株产纤维素酶酶活

将红曲霉菌株接种到产纤维素酶培养基中,30℃、180 r/min培养2 d。采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[10]测定纤维素酶活。

纤维素酶酶活的定义:在pH4.8条件下,1 mL粗酶液在1 min内水解底物生成1 μmol葡萄糖所需要的酶量,定义为1个酶活力单位(U/mL)^[10]。

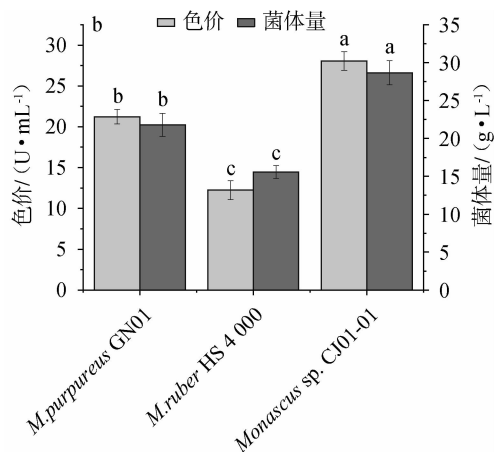
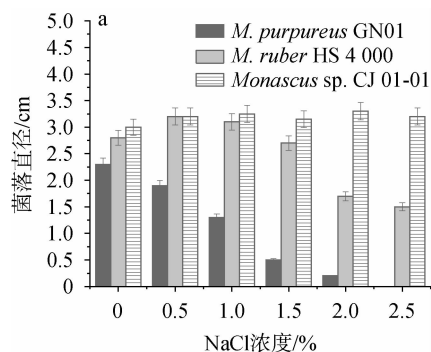
1.3.5 数据处理

使用Design-Expert 10.0.7软件获得响应面模型。在数据分析中,通过Fisher检验应用方差分析(analysis of variance, ANOVA)来评估自变量对响应值的影响。 $P < 0.05$ 表明对结果影响显著。每个试验代表3个独立试验的平均值,结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 菌株的特性分析

2.1.1 菌株盐耐受性分析



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图1 不同红曲菌株耐盐性(a)、产水溶性红色素及生长能力(b)比较
Fig. 1 Comparison of salt tolerance (a), water-soluble red pigment production and growth capacities (b) of different *Monascus* strains

3种红曲霉菌株在不同NaCl浓度PDA平板中的生长情况、在酱油渣发酵培养基中的生长和产红色素情况见图1。由图1a可知,菌株在不同NaCl浓度条件下的耐盐性表现出明显差异。*Monascus* sp. CJ01-01表现出最优的耐盐能力,随着NaCl浓度从0增加到2.5%,其菌落直径保持较稳定,始终维持在约3.0 cm左右。*M. ruber* HS 4000的耐盐能力较弱,在低浓度NaCl条件下(0~1.0%)表现稳定,在NaCl浓度>1.0%之后,菌落直径明显减小,表明其生长受到明显抑制。*M. purpureus* GN01的耐盐性最弱,其菌落直径随着盐浓度的增加迅速减小,在NaCl浓度>1.5%时,菌落直径已缩小至1.0 cm以下,表明其不稳定于高盐环境下的生长。由此可得,*Monascus* sp. CJ01-01得耐盐性较强,适宜在高盐环境下生长。

由图1b可知,*Monascus* sp. CJ01-01菌株的产水溶性红曲红色素能力最强,在发酵结束时,*Monascus* sp. CJ01-01所产生的水溶性红曲红色素色价为28.05 U/mL,菌体量为28.66 g/L,远高于*M. purpureus* GN01和*M. ruber* HS 4000在酱油渣培养基中产生的菌体量。这表明*Monascus* sp. CJ01-01在酱油渣基础培养基中产水溶性红色素能力及菌体生长能力较强。

2.1.2 菌株产纤维素酶能力分析

Monascus sp. CJ01-01产生的纤维素酶酶活为(35.0±1.2) U/mL,而*M. ruber* HS4000和*M. purpureus* GN01的纤维素酶活分别为(28.5±0.9) U/mL和(2.3±0.1) U/mL,这表明*Monascus* sp. CJ01-01更能够利用酱油渣中的纤维素,更适于在酱油渣培养基中发酵生产水溶性红曲红色素。因此,选择*Monascus* sp. CJ01-01作为后续发酵酱油渣产水溶性红曲红色素的试验菌株。

2.2 发酵条件优化单因素试验

2.2.1 添加不同碳源及葡萄糖的添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价及菌体量的影响

酱油渣经过发酵压榨后,可直接利用的碳源含量相对较低,酱油渣本身的碳源可能不足以支持高效发酵,需通过外源补充^[13]。为了提高红曲色素的产量,在酱油渣发酵培养基中以6%添加量添加葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、大米粉等常用碳源,不外加任何碳源为空白对照,以10%(V/V)接种量接种红曲霉*Monascus* sp. CJ01-01,30℃培养7 d后,测定水溶性红曲红色素色价,结果见图2a。由图2a可知,在酱油渣培养基中添加部分碳源,能明显提高红曲红色素的产量,且碳源种类对红曲色素合成也有较大的影响,葡萄糖为添加碳源时优于其他碳源及空白对照。因此,选择葡萄糖作为外加碳源。

为了研究葡萄糖添加量对水溶性红曲红色素产量的影响,分别在酱油渣培养基中添加15 g/L、30 g/L、45 g/L、70 g/L、85 g/L的葡萄糖,考察不同葡萄糖添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价及菌体量的影响,结果见图2b。由

图2b可知,在葡萄糖添加量为15~45 g/L时,酱油渣水溶性红曲红色素色价及菌体量均随之升高;在葡萄糖添加量为45 g/L时,酱油渣水溶性红曲红色素色价最高,为48.81 U/mL,且菌体量也达到最高,为28.77 g/L。在葡萄糖添加量>45 g/L之后,水溶性红曲红色素的色价和菌体量逐渐降低。吴宏等^[14]研究发现,葡萄糖是红曲色素最适的液体培养基配方之一。高起始葡萄糖浓度胁迫促使红曲色素合成相关基因的表达,高糖浓度发酵促使红曲霉细胞膜合成更多的不饱和脂肪酸,降低饱和脂肪酸的含量,从而增强细胞膜的流动相和通透性,促进胞内色素跨膜转化分泌到胞外,有利于水溶性红曲红色素的产生^[15]。因此,葡萄糖最适添加量为45 g/L。

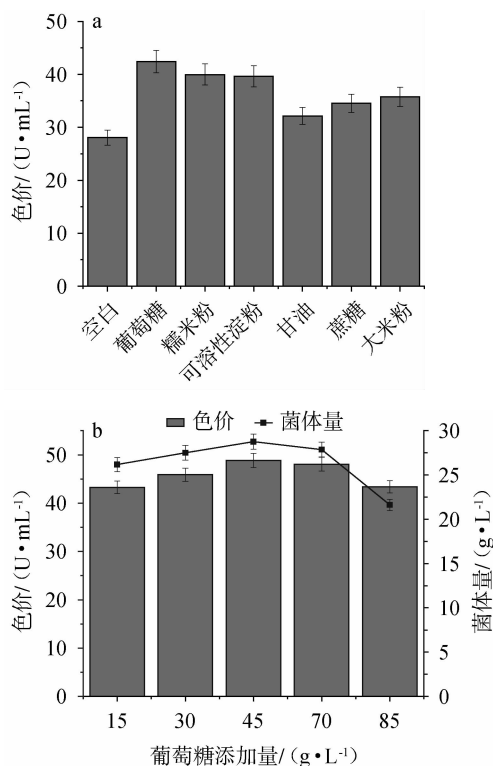


图2 碳源种类(a)以及葡萄糖添加量(b)对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量影响

Fig. 2 Effect of carbon sources types (a) and glucose addition (b) on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues

2.2.3 谷氨酸钠添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

考察不同谷氨酸钠添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响,结果见图3。由图3可知,谷氨酸钠添加量对于菌体量影响较小,当谷氨酸钠添加量为0~5 g/L时,菌体量变化不大。当谷氨酸钠添加量在0~4 g/L范围内增加时,酱油渣水溶性红曲红色素色价随之逐渐提高;当谷氨酸钠添加量为4 g/L时,酱油渣水溶性红曲红色素的色价最高,达到37.8 U/mL,菌体量为41.31 g/L。当谷氨酸钠

添加量>4 g/L之后,酱油渣水溶性红曲红色素的色价有所下降。这与SHARMILA G等^[16]研究结果一致,谷氨酸钠对水溶性红曲红色素的合成有显著影响。由谷氨酸钠解离产生的谷氨酸根离子能够通过电荷相互作用促使色素分子形成稳定的水溶性复合物^[17-19]。因此,谷氨酸钠最适添加量为4 g/L。

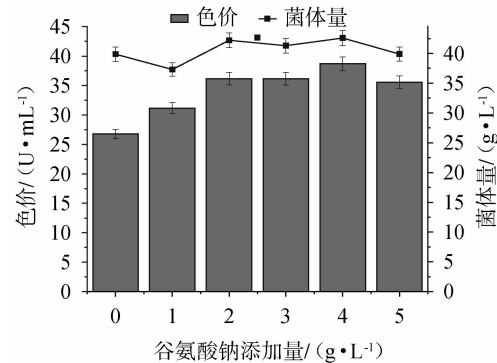


图3 谷氨酸钠添加量对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

Fig. 3 Effect of sodium glutamate addition on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues

2.2.4 硝酸钠添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

考察硝酸钠添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响,结果见图4。

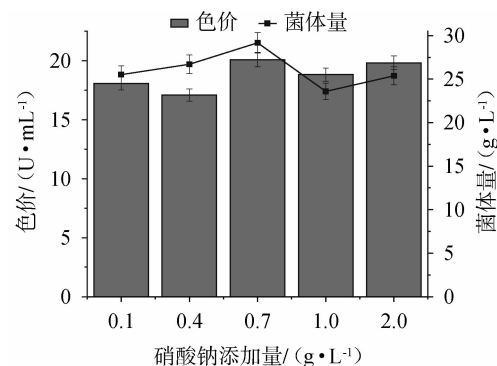


图4 硝酸钠添加量对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

Fig. 4 Effect of sodium nitrate addition on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues

由图4可知,硝酸钠添加量为0.1~0.7 g/L时,水溶性红曲红色素色价和菌体量都呈现上升趋势。在硝酸钠添加量为0.7 g/L时,溶性红色素色价最高为20.8 U/mL,菌体量为29.17 g/L。随着硝酸钠添加量>0.7 g/L之后,水溶性红曲红色素色价趋于稳定状态,菌体量有所下降。硝酸钠能在适宜浓度能够促进红曲霉的生长,但过量的硝酸钠可能会抑制红

曲红色素的合成,这可能是由于培养物内部的代谢转变或应激反应造成的^[20]。为了应对这些损伤,细胞可能将有限的能量用于修复损伤,而非色素生产,优化硝酸钠的浓度是提高红色素产量的重要因素。因此,硝酸钠最适添加量为0.7 g/L。

2.2.5 乙酸钠添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

乙酸钠添加量对红曲霉液态发酵酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响结果见图5。由图5可知,在乙酸钠添加量为0~0.5 g/L范围内,酱油渣水溶性红曲红色素色价随之增加,菌体量趋于稳定状态;在乙酸钠添加量为0.5 g/L时,酱油渣水溶性红曲红色素色价最高,水溶性红色素色价为21.44 U/mL,菌体量为26.08 g/L;在乙酸钠添加量>0.5 g/L之后,酱油渣水溶性红曲红色素色价有所下降,菌体量随着乙酸钠的添加有所升高。这表明乙酸钠的添加能够促进红曲霉菌体的生长,在红曲霉的液态发酵过程中,乙酸钠的添加不仅提供了氮源,与菌体生长、色素的产生和分泌之间存在密切关系,还可能激活或抑制红曲霉色素合成中一些关键酶的活性,对胞外水溶性红色素合成产生重要影响^[21-22]。因此,乙酸钠最佳添加量为0.5 g/L。

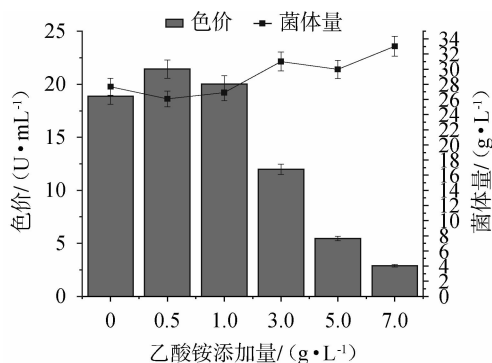


图5 乙酸钠添加量对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

Fig. 5 Effect of ammonium acetate addition on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues

2.2.6 硫酸亚铁添加量对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

硫酸亚铁添加量对红曲霉液态发酵酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响结果见图6。由图6可知,当硫酸亚铁添加量为0~0.17 g/L时,酱油渣水溶性红曲红色素色价随之升高;在硫酸亚铁添加量为0.17 g/L时,酱油渣水溶性红曲红色素色价最高,为14.66 U/mL,菌体量为29.1 g/L;当在硫酸亚铁添加量>0.17 g/L之后,酱油渣水溶性红曲红色素色价有所降低。当硫酸亚铁添加量为0~0.25 g/L时,菌体量变化不大;当硫酸亚铁添加量>0.25 g/L之后,菌体量有所下降。作为关键酶辅因子,Fe²⁺通过激活氧化还原酶

系(如苯丙氨酸氨基转移酶和醌合酶)直接促进色素合成,离子浓度与酶活性呈现显著正相关性^[23]。适量的Fe²⁺能够增强细胞代谢活性,通过调节氨基酸和糖代谢途径提高前体物质的供给^[24],提升色素产量。但这个过程具有严格浓度依赖性:低Fe²⁺环境会因酶活性抑制导致代谢受阻^[25],而过量Fe²⁺会因为诱导活性氧爆发而引发氧化应激,造成细胞损伤并抑制色素的合成^[26]。因此,硫酸亚铁最适添加量为0.17 g/L。

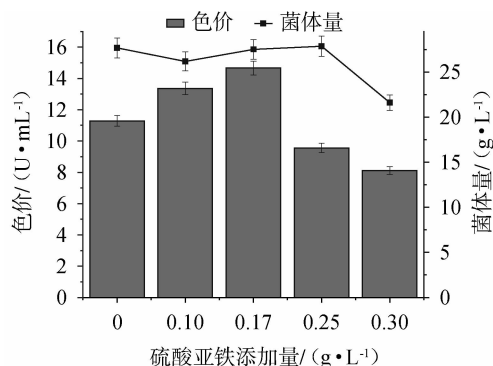


图6 硫酸亚铁添加量对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

Fig. 6 Effect of ferrous sulfate addition on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues fermentation

2.2.7 发酵时间对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

在酱油渣基础培养基中,考察发酵时间对酱油渣水溶性红曲红色素合成和菌体量的影响,结果见图7。

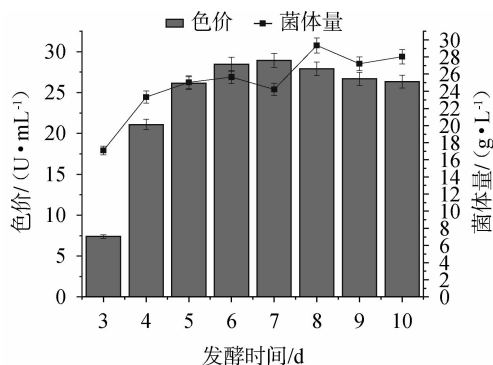


图7 发酵时间对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

Fig. 7 Effect of fermentation time on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues

由图7可知,随着发酵时间的增加,酱油渣水溶性红曲红色素色价逐渐增加,在发酵第4天,酱油渣水溶性红曲红色素色价迅速升高,发酵时间为7 d,红曲红色素色价最高,为28.94 U/mL,菌体量为24.22 g/L;发酵8 d后,色素含量趋于稳定并略有下降,表明此时红曲红色素的合成已经进入平稳期。菌体量在发酵前4 d呈对数期增长,发酵4~7 d内菌

体量变化不大,在发酵第8天菌体量最大,为30 g/L,然后开始趋于稳定,这可能是由于营养物质消耗以及次生代谢产物积累导致菌体生长环境恶化进而进入到衰亡期。这表明红曲霉的生长与色素的产生具有一定的同步性,但随着时间的延长,菌体量的增长速度变慢,红曲红色素的合成也逐渐进入稳定阶段。在红曲霉初期生长阶段迅速消耗营养物质并合成色素,随着发酵的进行,红曲红色素的合成逐渐受到细胞密度和资源消耗的限制^[27]。因此,最适发酵时间为7 d。

2.2.8 初始pH值对酱油渣水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响

考察初始pH值对酱油渣水溶性红曲红色素合成和菌体量的影响,结果见图8。由图8可知,当初始pH在3~8之间时,酱油渣水溶性红曲红色素色价随着培养基的pH值增加总体呈增长趋势(初始pH值为6时略有下降),酱油渣水溶性红曲红色素色价在初始pH值为8时达到峰值,为40 U/mL,菌体量为34 g/L;在初始pH值≥9之后,水溶性红曲红色素色价有所下降。在初始pH值较低时,发酵液中的菌体量能够保持在较高水平,这表明红曲霉在酸性环境能够较好的生长。当初始pH值为6时,酱油渣发酵培养基达到了菌体量最大,为42 g/L;培养基的初始pH值为6~7时,发酵液菌体量迅速减少;初始pH值为7~8时,发酵液菌体量稍有增加;初始pH值为8~9时,发酵液菌体量再次迅速减少;初始pH值为9~10时,发酵液菌体量基本不变,菌体量只有初始pH值为3时的菌体量的一半,表明强碱环境对红曲霉生长

的抑制作用。有研究表明^[28],乳酸或乳酸盐作为底物时,发酵液的pH环境直接调控桔霉素的合成,表明pH对次级代谢产物的定向合成具有关键作用。因此,培养基最适初始pH值为8。

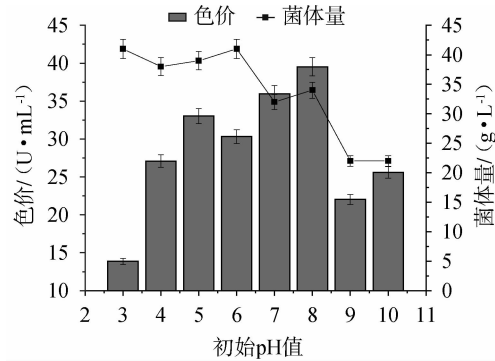


图8 初始pH对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价和菌体量的影响
Fig. 8 Effect of initial pH on color value of water-soluble *Monascus* red pigment and biomass in fermented soy sauce residues

2.3 Plackett-Burman试验结果

根据单因素的试验结果,选择影响水溶性红曲红色素色价(Y)的7个影响因素,葡萄糖(A)、谷氨酸钠(B)、硝酸钠(C)、硫酸亚铁(D)、乙酸铵(E)、初始pH值(F)和发酵时间(G),进行Plackett-Burman试验,Plackett-Burman试验结果见表1,通过Design Expert 10.0.7 软件对表2结果进行回归分析,结果见表2。

表1 Plackett-Burman试验设计及结果
Table 1 Design and results of Plackett-Burman experiments

编号	A 葡萄糖/(g·L ⁻¹)	B 谷氨酸钠/(g·L ⁻¹)	C 硝酸钠/(g·L ⁻¹)	D 硫酸亚铁/(g·L ⁻¹)	E 乙酸铵/(g·L ⁻¹)	F 初始pH值	G 发酵时间/d	Y 色价/(U·mL ⁻¹)
1	20.00	3.00	1.00	0.10	1.00	9.00	6.00	4.82
2	50.00	3.00	1.00	0.25	1.00	7.00	6.00	19.20
3	50.00	3.00	1.00	0.25	0.00	9.00	8.00	70.08
4	20.00	5.00	0.40	0.25	1.00	7.00	8.00	43.96
5	20.00	3.00	0.40	0.25	0.00	9.00	8.00	46.80
6	50.00	5.00	0.40	0.25	1.00	9.00	6.00	58.00
7	50.00	5.00	0.40	0.10	0.00	9.00	6.00	62.76
8	20.00	5.00	1.00	0.25	0.00	7.00	6.00	47.88
9	20.00	3.00	0.40	0.10	0.00	7.00	6.00	35.30
10	50.00	3.00	0.40	0.10	1.00	7.00	8.00	28.50
11	50.00	5.00	1.00	0.10	0.00	7.00	8.00	49.24
12	20.00	5.00	1.00	0.10	1.00	9.00	8.00	10.16

表2 Plackett-Burman试验回归分析结果
Table 2 Regression analysis results of Plackett-Burman experiments

方差来源	系数	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型		4316.69	7	616.67	6.97	0.039 7	*
葡萄糖	8.24	814.44	1	814.44	9.21	0.038 6	*
谷氨酸钠	5.61	377.44	1	377.44	4.27	0.107 7	
硝酸钠	-6.16	455.59	1	455.59	5.15	0.085 7	

方差来源	系数	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
硫酸亚铁	7.93	754.30	1	754.30	8.53	0.043 2	*
乙酸铵	-12.28	1 811.05	1	1 811.05	20.48	0.010 6	*
初始pH值	2.38	67.88	1	67.88	0.77	0.430 4	
发酵时间	1.73	35.98	1	35.98	0.41	0.558 2	

注:“*”表示对结果影响显著(P<0.05)。

续表

采用Design Expert 10.0.7软件处理数据获得一次回归方程如下：

$$Y=39.73+8.24A+5.61B-6.16C+7.93D-12.28E+2.38F+1.73G$$

采用最小二乘法进行多元回归分析,以检验模型的充分性和适用性,用方差分析来检验其显著性。由表2可知,该回归模型显著($P<0.05$),变量A(葡萄糖)、D(硫酸亚铁)和E(乙酸铵)对酱油渣水溶性红曲红色素色价影响显著($P<0.05$),其他因素对酱油渣水溶性红曲红色素色价影响不显著($P>0.05$)。因此,对显著性因素A(葡萄糖)、D(硫酸亚铁)和E(乙酸铵)进行进一步优化。

2.4 响应面试验结果及分析

在Plackett-Burman试验结果的基础上,以色价(Y)为响应值,对乙酸铵(A)、葡萄糖(B)及硫酸亚铁(C)进行响应面优化设计和分析试验。Box-Behnken试验设计及结果见表3,方差分析见表4。

表3 Box-Behnken试验设计及结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	A 乙酸铵/ (g·L ⁻¹)	B 葡萄糖/ (g·L ⁻¹)	C 硫酸亚铁/ (g·L ⁻¹)	Y 色价/ (U·mL ⁻¹)
1	0.50	50.00	0.25	79.30
2	1.00	50.00	0.17	82.52
3	0.50	35.00	0.17	109.00
4	1.00	35.00	0.25	88.80
5	0.50	50.00	0.10	80.68
6	0.00	20.00	0.17	90.00
7	0.50	35.00	0.17	105.64
8	0.00	35.00	0.25	106.00
9	0.50	20.00	0.25	90.70
10	0.50	35.00	0.17	110.24
11	1.00	20.00	0.17	79.36
12	0.00	35.00	0.10	91.00
13	0.00	50.00	0.17	91.60
14	1.00	35.00	0.10	88.00
15	0.50	35.00	0.17	109.76
16	0.50	35.00	0.17	108.96
17	0.50	20.00	0.10	60.00

表4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	3 161.16	9	351.24	63.95	<0.000 1	**
A	199.20	1	199.20	36.27	0.000 5	**
B	24.64	1	24.64	4.49	0.071 9	
C	254.48	1	254.48	46.33	0.000 3	**
AB	0.61	1	0.61	0.11	0.749 0	
AC	50.41	1	50.41	9.18	0.019 1	*
BC	257.28	1	257.28	46.84	0.000 2	**
A ²	52.62	1	52.62	9.58	0.017 4	*
B ²	1 570.82	1	1 570.82	286.01	<0.000 1	**
C ²	579.83	1	579.83	105.57	<0.000 1	**
残差	38.45	7	5.49			
失拟项	25.43	3	8.48	2.61	0.188 8	
纯误差	13.01	4	3.25			
总变异	3 199.61	16				

注：“*”表示对结果影响显著($P<0.05$),“**”表示对结果影响极显著($P<0.01$)。

运用Design-Expert 10.0.7软件对表3中的数据进行多元二次回归拟合分析,得到酱油渣水溶性红曲红色素色价(Y)对A(乙酸铵)、B(葡萄糖)、C(硫酸亚铁)3个影响因素的二次多项式回归方程如下：

$$Y=108.72-4.99A+1.76B+5.64C+0.39AB-3.55AC-8.02BC-3.54A^2-19.32B^2-11.73C^2$$

由表4可知,酱油渣水溶性红曲红色素的回归模型 $P<0.000 1$,极显著;失拟项 P 值=0.188 8 >0.05 ,不显著,表明模型可靠,试验的可信度强。决定系数 R^2 为0.988 0,校正决定 R^2_{adj} 为0.972 5,说明回归方程拟合度较好。变异系数(coefficient of variation, CV)为2.54%,解释了试验值和预测值之间的偏差,表明模型具有良好的精密度。通过3个因素的 F 值可知,影响水溶性红曲红色素色价的因素主次顺序为C(硫酸亚铁) $>$ A(乙酸铵) $>$ B(葡萄糖)。由 P 值可知,一次项A、C,交互项BC,二次项 B^2 、 C^2 对结果影响极显著($P<0.01$),交互项AC、二次项 A^2 对结果影响显著($P<0.05$)。

乙酸铵、葡萄糖和硫酸亚铁添加量之间的交互作用对结果影响的响应曲面及等高线见图9。

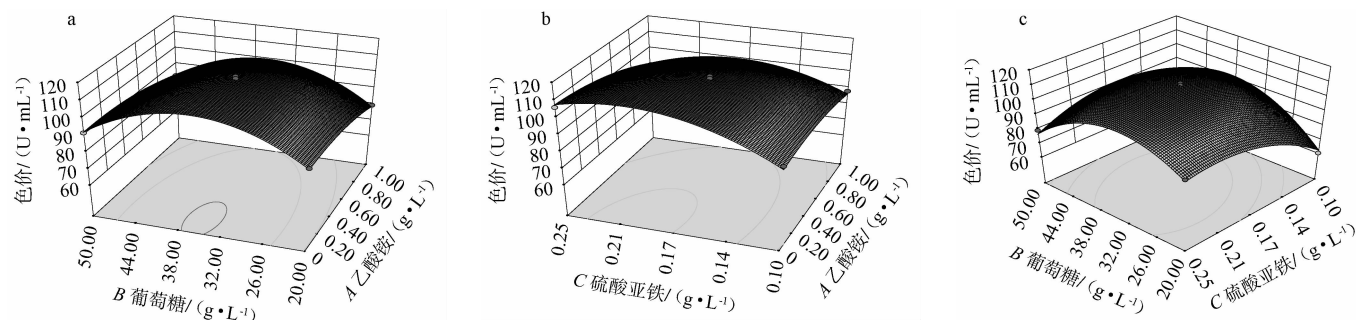


图9 各因素间交互作用对酱油渣发酵水溶性红曲红色素色价影响的曲面图及等高线

Fig. 9 Response surface plots and contour lines of effects of interaction between various factors on color value of water-soluble *Monascus* red pigment in fermented soy sauce residues

由图9可知,因素B(葡萄糖)与因素C(硫酸亚铁)间交互作用对酱油渣水溶性红曲红色素色价影响极强,A(乙酸铵)与因素C(硫酸亚铁)间交互作用对酱油渣水溶性红曲红色素色价影响较强,而其他因素间交互作用对酱油渣水溶性红曲红色素色价影响不大。这与表5方差分析结果一致。

2.5 最佳发酵条件确定和验证试验结果分析

运用 Design-Expert 10.0.7 软件对上述二次回归方程进行求解,可以得出最佳发酵条件为乙酸铵0.35 g/L、葡萄糖34.05 g/L、硫酸亚铁0.2 g/L。在此条件下,酱油渣水溶性红曲红色素色价预测值为110.85 U/mL。在此条件下进行3次平行验证试验,测得酱油渣水溶性红曲红色素色价平均实际值为108.50 U/mL,与预测值接近,说明通过响应面优化后的发酵参数可靠,模型预测性良好,通过响应面法优化得到的发酵工艺回归模型可行。

3 结论

酱油渣作为一种丰富的生物质资源,具有极高的利用价值。本研究筛选出耐盐性较强,在酱油渣培养基中产色能力较好的红曲霉 *Monascus* sp. CJ 01-01 为发酵菌株,液态发酵酱油渣生产水溶性红曲红色素。经过单因素和响应面试验确定红曲霉 *Monascus* sp. CJ 01-01 酱油渣水溶性红曲红色素的最佳发酵条件为酱油渣60 g/L、乙酸铵0.35 g/L、葡萄糖34.05 g/L、硫酸亚铁0.2 g/L、初始pH值8、发酵时间7 d。在此优化条件下,酱油渣水溶性红曲红色素色价为108.50 U/mL,是优化前的3.8倍。本研究可为酱油渣的高值转化提供参考。

参考文献:

- [1] 周文斌,贾瑞博,李燕,等. 红曲色素组分、功效活性及其应用研究进展[J]. 中国酿造,2016,35(7):6-10.
- [2] JUNG H, KIM C, SHIN C. Enhanced photostability of *Monascus* pigments derived with various amino acids via fermentation[J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 7108-7114.
- [3] 金河坡. 分离于酱油渣蜡样芽胞杆菌的耐盐机制研究[D]. 广州:华南理工大学,2016.
- [4] 谢承佳,于晓萍,徐娟. 酱油渣加工技术研究进展[J]. 中国酿造,2021,40(1):24-28.
- [5] UMMAH M M, ROJABI W R, HERTAMAWATI R T. Effects of dietary soy sauce dregs and cassava peel meal on the performance of production and reproduction of grower quails (*Cortunix cortunix Japonica*)[J]. *J Appl Vet Sci Technol*, 2024, 5(1): 7-11.
- [6] 高庭,洪嘉植,周其洋. 酱油渣转化利用研究进展[J]. 广东化工,2020,47(14):105-106,113.
- [7] 王帅,朱新贵,李学伟. 酱油渣中色素及大豆异黄酮的提取研究[J]. 中国酿造,2017,36(5):46-52.
- [8] 邢淑娟,周颖,刘开华. 玉米芯水解液发酵生产红曲色素的研究及条件优化[J]. 中国酿造,2010,29(9):130-133.
- [9] 张大庆,张帝,汤文晶,等. 红曲霉液态发酵豆渣产红曲色素培养基的优化[J]. 中国饲料,2013(23):27-31.
- [10] DA SILVA V L, IENCZAK J L, MORITZET D. Agro-industrial residues for the production of red biopigment by *Monascus ruber*: rice flour and sugarcane molasses[J]. *Braz J Microbiol*, 52(2): 587-596.
- [11] WANG M H, HUANG T, CHEN G, et al. Production of water-soluble yellow pigments via high glucose stress fermentation of *Monascus ruber* CGMCC 10910[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(8): 3121-3130.
- [12] 谢佳丽,李宝,刘佳,等. 盐生草根际耐盐性木霉菌分离鉴定及其耐盐性评价[J]. 草业科学,2021,38(10):1930-1937.
- [13] ZHAO X, HE Z, LU W, et al. High-Protein solid-state symbiotic fermentation of sauce residue for probiotic feed[J]. *Am J Biochem Biotechnol*, 2020, 16(4): 462-472.
- [14] 吴宏,代文婷,连喜军,等. 不同液态发酵基质对红曲霉产红曲色素及桔霉素的影响[J]. 中国酿造,2018,37(11):91-94.
- [15] 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.
- [16] SHARMILA G, NIDHI B, MUTHUKUMARAN C. Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder[J]. *Ind Crops Prod*, 2013, 44: 158-164.
- [17] ATALAY P, SARGIN S, GÖKSUNGUR M Y. Utilization of residual beer for red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation[J]. *Fresenius Environ Bull*, 2020, 29(2): 1025-1034.
- [18] CHAKRABORTY A, JAYASEELAN K. A comprehensive assessment of the biological attributes of and analytical quantification methods for monosodium glutamate[J]. *Acta Chromatogr*, 2024, 36(4): 287-306.
- [19] 徐开媛,王默涵,刘金洋,等. 谷氨酸钠协同低温冻融促进发芽芸豆富集 γ -氨基丁酸的机理研究[J]. 食品与发酵工业,2025,51(5):190-196.
- [20] CORTÉS N M, LORENZO G, CALIFANO A N. Food grade microemulsion systems: Sunflower oil/castor oil derivative-ethanol/water. Rheological and physicochemical analysis[J]. *Food Res Int*, 2018, 107: 41-47.
- [21] 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.
- [22] ZHOU B, WANG Y, LU H M, et al. Effect of ammonium salts on pigments production by *Monascus anka* mutant in 5 L bioreactor[J]. *Chiang Mai J Sci*, 2014, 41: 1032-1043.
- [23] GUZIK U, HUPERT-KOCUREK K, SALEK K, et al. Influence of metal ions on bioremediation activity of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29: 267-273.
- [24] 王昌禄,王旭锋,丁成芳,等. 组学技术在红曲霉研究中应用的进展[J]. 食品科学技术学报,2023,41(5):14-23.
- [25] WANG Z H, LIU H J, CUI T B. Identification of a strain degrading ammonia nitrogen, optimization of ammonia nitrogen degradation conditions, and gene expression of key degrading enzyme nitrite reductase[J]. *Fermentation*, 2023, 9(4): 397.
- [26] MOHAMMED Y M M, GHORABA W F S. Effect of biosorption of Fe^{2+} by *Rhodotorula mucilaginosa* YMM19 on the physiology of *Lupinus albus*, *Triticum aestivum*, *Vicia faba*, and *Zea mays* seedlings[J]. *Acta Physiol Plant*, 2022, 44: 101.
- [27] SILBIR S, GOKSUNGUR Y. Natural red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: brewer's spent grain[J]. *Foods*, 2019, 8(5): 161.
- [28] 周波,吴吉林,朱明军,等. 乳酸和乳酸钠对红曲霉突变菌株合成代谢色素及桔霉素的影响[J]. 食品工业科技,2011,32(4):185-188.