

红曲霉桔霉素的检测方法及其产桔霉素的判别方法*

许赣荣¹ 李凤琴² 陈 蕴¹ 李玉伟² 虞慧玲¹

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)¹

(中国疾病预防控制中心食品与营养研究所 北京 100021)²

摘要: 建立了红曲霉真菌毒素桔霉素的 HPLC 检测方法。用谷氨酸和葡萄糖为唯一氮、碳源的培养基 (MSG) 液态摇瓶培养及红曲米固态培养, 对 30 多株红曲霉产桔霉素的情况进行了普查, 发现大多数红曲霉菌种可产生桔霉素。红曲霉的培养状态及条件对桔霉素的产生有重大影响。红曲霉菌种是否产桔霉素, 可根据 MSG 培养基摇瓶发酵液中是否含有桔霉素来初步定性判断, 为准确判断红曲霉菌是否产桔霉素, 可采用多种培养法综合判断。

关键词: 红曲霉, 桔霉素, 高压液相色谱

中图分类号: TQ925 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 03-0016-05

Monascus Citrinin Analysis Methods and A Study on Formation of Citrinin by Monascus

XU Gan-Rong¹ LI Feng-Qin² CHEN Yun¹ LI Yu-Wei² YU Hui-Ling¹

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education in Southern Yangtze University, Wuxi 214036)¹

(Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021)²

Abstract: A HPLC method of analysis of *Monascus citrinin* was established. More than 30 strains of *Monascus* spp. were cultured in steamed rice at solid state or in MSG liquid medium composed of monosodium glutamate as sole nitrogen source and glucose as sole carbon to investigate their ability of producing citrinin. The results indicated that most of the *Monascus* strains are able to produce citrinin. MSG medium can be used as a specific culture medium to qualitatively identify if the strain is the potential citrinin producer. But to confirm whether the *Monascus* strains are potential citrinin producers, these strains should be cultured in several cultivation methods, as the culture states and culture conditions influence the citrinin production greatly.

Key words: *Monascus*, Citrinin, HPLC

1995 年法国人 Blanc 博士证实红曲霉菌产生真菌毒素桔霉素 (或桔青霉素, Citrinin)^[1]。红曲产品的食用安全性受到挑战。生产无桔霉素或低桔霉素含量的红曲产品, 具有重要的现实意义。为了筛选不产桔霉素的红曲霉菌种, 了解红曲霉菌种是否产桔霉素, 要采用可靠的红曲霉培养方式和培养条件, 并建立灵敏简便的红曲桔霉素检测方法, 才能对红曲霉产桔霉素的性能做出客观评价。

许赣荣^[2] 初步发现红曲霉菌种普遍具有产生桔霉素的潜在能力, 但当时培养红曲霉的方法不得当, 检测桔霉素的方法不完善而不能确认。YES 培养法^[3] 是用于确认真菌是否产真菌毒素的常用实验法, 但我们发现, 在 YES 培养基及静置液态培养条件下,

* 国家十五科技攻关重大专项基金项目 (No. 2001BA804A02)

收稿日期: 2003-04-29, 修回日期: 2003-07-02

不少红曲霉菌生长差,或不生长;而用谷氨酸和葡萄糖为氮、碳源的培养基摇瓶培养一周,或采用固态红曲米发酵法,大多数红曲霉能生长并产生色素,只要红曲霉具有产生桔霉素的能力,就可生产并检测出桔霉素。

我们承担了国家有关部门下达课题中的红曲桔霉素检测标准方法(送审稿)的建立工作,提出了一套红曲桔霉素的检测方法,并得到验证。详细内容可参考虞慧玲等^[4]及陈 蕴等^[5]的论文。本文将列出该检测方法,并对有关红曲霉培养方法,30多株红曲霉菌株产毒性能检定及市售红曲产品及实验室试制红曲产品的桔霉素检测进行讨论,以期对红曲霉产桔霉素的现状做出客观评估。

1 材料与方法

1.1 液态培养红曲

MSG 培养基:谷氨酸单钠 5 g,葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 5 g, K_2HPO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g。定容至 1 L。500 mL 瓶装培养基 100 mL。用乙酸调 pH 至 6.0 后, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。接液态种 10%, 于 30℃ 振荡 (200 r/min) 培养 7 d。

1.2 红曲米培养方法

用 pH 4.0 的水浸泡粳米 24h 后,再用蒸锅蒸至半熟(约 10 min), 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。接入液态种子 20%, 三角瓶静置培养,视具体情况,添加 pH 4.0 的无菌水, 30℃ 培养 8 d。

1.3 红曲桔霉素检测方法

1.3.1 液态发酵液的预处理:在比色管中加入 10 mL 研碎的发酵液,加入乙醇,定容至 30 mL,摇匀,加热 60℃, 1h 后 3,000 r/min 离心 15 min,取上清液,用孔径为 0.45 μm 的偏氟微孔滤膜(上海医药工业研究院,上海亚东核级树脂有限公司)微滤后,直接用于 HPLC 分析。

1.3.2 红曲米粉样品预处理方法:在 50 mL 烧杯中,准确称入红曲米粉 0.500 ~ 3.000 g (根据样品中桔霉素含量高低而定),准确加入复合萃取剂甲苯、乙酸乙酯、甲酸(简称 TEF, 体积比, 7: 3: 1) 20 mL,称重(记录下连烧杯在内的重量),超声波处理 5 min (强度 40%, 5s, 5s),自然澄清后,用 TEF 补足至原重量。用移液管将上清液移入 50 mL 具塞试管。再在残渣中加入 15 mL TEF 萃取剂,第 2 次称重(记录),第 2 次超声波处理 5 min,自然澄清后,再次补足至第 2 次所称的重量,将上清液移入 50 mL 具塞试管。再在残渣中加入 15 mL TEF 萃取剂,第 3 次称重,第 3 次超声波处理 5 min,补足至第 3 次所称重量。将上清液(最后 1 次尽可能收集清液)移入具塞试管。3 次所得的上清液,离心。用移液管取离心后的清液微滤(膜孔径 0.45 μm)后,用于 HPLC 分析。

红曲米粉同时应测水分含量(用水分天平),桔霉素含量以绝干物为基准计算。

样品最佳稀释倍数是控制上样液中桔霉素的浓度在 0.1 ~ 10.0 mg/L 范围。当样品中的桔霉素质量分数较高时(如 500 mg/kg 以上时),称取的红曲样品数量应酌情减少(总稀释倍数应为 50 倍以上)。当红曲样品中的桔霉素质量分数为 0.5 mg/kg 时,取一定体积的离心清液,真空浓缩至干,用更少体积的甲醇溶解真空浓缩的残余物。使样品浓度更符合桔霉素浓度与峰面积的线性关系。一般情况下,红曲产品色价越高,桔霉素含量也越高。红曲米桔霉素含量在 10 ~ 800 mg/kg 之间。

1.3.3 HPLC 条件: HPLC 仪为 HP1100; 色谱柱: Eclipse XDB Reversed-phase C₁₈, 5μm, 250×4.6 mm; 检测器: 荧光检测器: (Ex331, Em500); 流动相为乙腈和水 (用磷酸调 pH2.5): 35: 65 (体积比); 流速: 1mL/min。桔霉素出峰时间: 约 18 min。

用 HPLC 荧光检测器, 可检测浓度为 0.05 mg/L 的样品, 因固态红曲米需经过溶剂萃取, 用此法可检测桔霉素含量为 1 mg/kg 的样品 (稀释倍数最好在 10 倍以内)。因而采用 HPLC 方法基本能满足对红曲样品的检测要求。本方法经过国内两个单位的验证, 结果基本与我们的相同。

1.4 色价测定方法

红曲发酵液研磨后, 用粗口径移液管取少量发酵液加入乙醇, 使乙醇浓度达 70% (体积比), 30 min 后过滤, 稀释, 以 70% (体积比) 乙醇做空白对照, 用日立 UV 3000 分光光度计扫描。红曲米色价测定采用国家标准 (GB 4926-85)^[6] 测定。色价计算公式: 色价 (CV) = OD₅₀₅ × 稀释倍数 (U/kg, 或 U/mL)。

2 结果与讨论

2.1 几种氨基酸为唯一氮源时对红曲桔霉素生成的影响 (所用菌种为红曲霉 ZH12)

使用 10 多种氨基酸为唯一氮源 (6 g/L), 其它成分见 1.1 节 MSG 培养基。摇瓶发酵液分析桔霉素和色素。结果见表 1。谷氨酸为唯一氮源, 所产生的桔霉素和色素最高 (分别为 170.10 mg/L 和 26.18 U/mL)。此外, 还有天冬氨酸, 丝氨酸, 缬氨酸为唯一氮源的培养基产色素及桔霉素都较高。以不同浓度 (2, 4, 6, 8, 10 g/L) 的谷氨酸或天门冬氨酸为唯一氮源, 葡萄糖浓度不变, 发现随着氮源浓度的提高, 色价与桔霉素均呈增加的趋势 (数据未显示)。

表 1 添加不同氨基酸 (浓度均为 6 g/L) 对红曲产桔霉素的影响

氨基酸 及浓度 (g/L)	桔霉素 (mg/L)	505 色 价 (U/mL)	菌体 生长	氨基酸 浓度 (g/L)	桔霉素 (mg/L)	505 色 (U/mL)	菌体 生长
Met	0.46	1.67	+	Phe	1.63	1.08	++
His	未检出	34.33	++	Leu	未检出	8.76	+
Glu	170.10	26.18	+++	Ala	4.74	5.58	++
Asp	39.80	23.64	+++	Gly	15.09	7.65	++
Val	0.11	23.65	+++	Ser	71.36	21.33	+
Trp	未检出	19.89	++	Arg	未检出	32	+
Tyr	7.77	21.24	+				

谷氨酸为唯一氮源的 MSG 培养基可作为红曲霉菌产桔霉素性能的一种初步鉴定培养基。用此种方法, 结果的重现性好于 YES 培养法, 培养时间较短。用 MSG 培养基可产生较多的桔霉素和色素, 原因可能是, 色素及桔霉素均为聚酮体化合物。而聚酮体化合物的前体物质是乙酰 CoA 和丙二酰 CoA。以谷氨酸 (或天门冬氨酸) 和葡萄糖分别为氮、碳源的 MSG 培养基, 葡萄糖很容易形成乙酰 CoA, 谷氨酸及天门冬氨酸代谢可生成草酰乙酸, 草酰乙酸的大量积累, 使更多的乙酰 CoA 和丙二酰 CoA 这些聚酮体的前体物质在产物合成期间, 流向了桔霉素。因此只要红曲霉菌种合成桔霉素聚酮体合成酶基因没有被破坏, 在以葡萄糖和谷氨酸 (或天门冬氨酸) 为培养基中生长就有可

能产生桔霉素。

2.2 红曲霉菌种产桔霉素性能的检定

用 MSG 培养基液态发酵和米饭固态发酵两种方式, 对 36 株红曲霉菌株的产桔霉素性能作了系统研究。有 6 株菌的 MSG 发酵液中未测出桔霉素。其余 30 株菌, 产桔霉素 0.09 ~ 55.65 mg/L (3 个平行样的平均值, 下同)。而固态红曲米中, 仅有 1 株菌在米饭上不生长, 未测出桔霉素 (该菌株, 在 MSG 上也未测出桔霉素)。其余 35 株红曲霉菌都产桔霉素。最高的 1 株菌 (Sjs-33 号菌), 红曲米中桔霉素平均含量达 2,458.80 mg/kg 但该菌在 MSG 液态培养时, 桔霉素含量仅 1.68 mg/L。说明用 MSG 培养基能初步确认红曲霉菌种是否产桔霉素。但不能作为唯一的定性及定量的标准。有时, 用固态培养法反而更能确定红曲霉菌是否产桔霉素。总之要确认红曲霉菌是否产桔霉素, 产多少, 需要在多种培养基及培养条件下做实验, 如果其中有一种培养基或培养条件, 发现产桔霉素, 则说明该菌有能力产桔霉素。

本次所得到的结论与许赣荣等 2000 年所发表的结论基本相同 (当时采用 YES 培养基), 可以认为红曲霉菌种普遍具有产生桔霉素的潜力。至于其产桔霉素的能力有多大, 还需注明培养状态和有关条件。最好是综合各种因素, 给予准确的描述。

2.3 部分红曲样品桔霉素的检测结果

用统一的检测方法对实验室自制红曲米及国内外部分红曲样品中的桔霉素含量进行了检测, 结果见表 2。色素用红曲米粉样品中, 只有极少数未测出桔霉素。大多数红曲米粉中含桔霉素 (最高 855.67 mg/kg)。红曲红产品 (1% 含量色价 100 U/g) 也含桔霉素。但不同厂家的样品, 含量相差悬殊, 最高达 713.00 mg/kg。有的红曲红桔霉素含量很低, 为 2.18 mg/kg。与日本的红曲红样品 (1% 含量色价 60 U/g, 桔霉素 0.73 mg/kg) 中桔霉素含量相近。大多数功能性红曲样品中桔霉素含量一般较低 (1 mg/kg 左右), 或者未测出。

表 2 部分红曲产品的桔霉素测定结果

样品编号	产品种类	色价 (U/g)	桔霉素含量 (mg/kg)	样品编号	产品种类	色价 (U/g)	桔霉素含量 (mg/kg)
SDWM	红曲米粉 1	2,000	855.67	YW	功能性红曲 4		0
GUT	红曲米粉 2	-	0.82	WX	功能性红曲 5		1.26
PHU	红曲米粉 3	1,200	4.36	TW	功能性红曲 1		1.85
SZYB	红曲米粉 4	2,000	0	LAB1	功能性红曲 2		0
SJS-33-1	红曲米粉 5	800	2312.72	LAB2	功能性红曲 3		0
NXMR	红曲红 1	10,000	713.57	LAB3	功能性红曲发		0
					酵液		
JM1	红曲红 2	10,000	6.32				
JM2	红曲红 3	10,000	2.18				
JP	红曲红 4	6,000	0.73				

注: 数据来源为本实验室对各地红曲产品桔霉素检测报告, 红曲红色价按红曲米色价方法表示

3 讨论

本次实验结果再次证实, 大多数红曲霉菌种具有生产桔霉素的遗传特性。大部分

红曲米中桔霉素含量偏高, 仅有极少数的红曲米样品未测出桔霉素, 部分红曲红产品中桔霉素含量较高。功能性红曲产品中桔霉素含量一般较低, 或者 HPLC 法无法检出。

红曲霉的培养状态及条件对桔霉素的产生有重大影响, 而鉴定红曲霉菌种是否产桔霉素, 用谷氨酸为唯一氮源, 葡萄糖为唯一碳源的 MSG 培养基比 YES 培养的效果更好。可用于初步定性红曲霉菌种是否产桔霉素, 但要准确地对红曲霉产桔霉素进行定量分析, 要选定培养基, 培养状态。从生产低桔霉素或无桔霉素的红曲产品的角度来说, 重点应放在筛选低产或不产桔霉素的菌种上。

参 考 文 献

- [1] Blanc P J, Laussac, J P, Le Bars J, *et al.*, International Journal of Food Microbiology, 1995, **27**: 201 ~ 213.
- [2] 许贇荣, 卢 晨, 穆晓青, 等, 无锡轻工大学学报, 2000, **19** (1): 58 ~ 61.
- [3] Davis N D, Diener U L, Eldridge D W. Appl Microbiol, 1966, **14**: 378.
- [4] 虞慧玲, 许贇荣, 陈 蕴. 食品与发酵工业, 2003, **29** (6): 55 ~ 59.
- [5] 陈 蕴, 许贇荣, 虞慧玲, 等, 食品与发酵工业, 2004, **30** (1): 118 ~ 123.
- [6] 中国国家质量监督局, 中华人民共和国红曲米国家标准 .1985 (GB4926-85) .