

高产红曲黄色素菌株的选育

周 波 王菊芳 吴振强 梁世中*

(华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510641)

摘 要: 利用紫外、硫酸二乙酯、氯化锂和亚硝基胍复合诱变的方法, 选育到一株高产黄色素的红曲霉突变株 MYM2。经过稳定性实验证明, 诱变得到的菌株稳定性较好, 液态发酵试验黄色素色价达到 100 U/mL 以上, 黄色素色调达到 3.5 左右。此黄色素在 300 nm~600 nm 波长之间只有一个在 410 nm 附近的最大吸收峰, 在 pH 3~8 之间稳定性较好。当 pH 小于 3 时, 红曲黄色素不稳定, 黄色素溶液变混浊, 放置后有沉淀产生。

关键词: 红曲霉, 突变株, 黄色素, 色价, 色调

Selection of *Monascus* with High Yellow Pigment Production

ZHOU Bo WANG Ju-Fang WU Zhen-Qiang LIANG Shi-Zhong*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract: The *Monascus* mutant with high yield of yellow pigment was obtained by using conventional relevant mutation techniques, e.g., treating with physical mutagens (such as UV light) and chemical substances (such as N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). The yellow pigment was scanned from 300 nm to 600 nm with UV spectrometer, the maximal absorption was determined at 410 nm. The growth characteristic of *Monascus* mutant is stable, the yellow pigment value and colour hue in liquid fermentation can reach 100 U/mL and 3.5 respectively. The yellow pigment is stable from pH 3 to pH 8, but the precipitation appeared as the pH of the pigment solution lower than 3.

Keywords: *Monascus*, Mutant, Yellow pigment, Pigment value, Colour hue

红曲是一种具有东方色彩的传统产品, 在我国已有数千年的应用历史。红曲色素作为一种天然色素, 其安全性高, 经急性毒性试验、慢性毒性试验以及致突变性实验都证明无毒性, 也无致畸变作用, 故红曲色素现已广泛应用于各种食品着色剂^[1]。在食品安全问题日益受到关注的今天, 由此类天然色素取代人工合成色素的前景广阔。红曲色素属于聚酮类色素, 由 6 种结构相近的成分组成, 其中, Ankaflavine 与 Monascin 为黄色素, Rubropunctatine 与 Monascorubrine 是橘黄色素, Rubropunctamine 与

Monascorubramine 为红色素。其中黄色素作为一类主要的食用色素的品种, 通常占市场需求量的 60%, 故红曲黄色素的开发研究具有广阔的前景及重大的经济效益。日本目前已实现了红曲黄色素的工业化生产, 产品名为日本天然 No393。红曲黄色素在国内已有市售产品, 但是色价不到 30 个色价单位或黄色素色价能达到 80 以上色价单位, 但黄色素色调不到 1^[1,2]。而国外的专利和文献报道, 选育出的菌株液态发酵的色价高或色调水平比较高, 色调能达到 3~4, 但黄色素色价不到 60 色价单位左右^[3], 黄色素

* 通讯作者: Tel: 020-39380623; ✉ fesliang@scut.edu.cn
收稿日期: 2008-05-06; 接受日期: 2008-07-02

色价达到 100 左右色价单位的,但是色调不到 1.5^[4],现在就泰国在这方面的研究有特色,他们通过诱变得到单产黄色素的菌株,经过二十多年的研究已经工业化生产并成功应用到食品行业^[5-8]。因此菌种的选育是关键问题。本研究对本实验室保存的一株红曲霉菌进行物理和化学复合诱变,期望获得高产黄色素的菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂与培养基

1.1.1 菌种:红曲霉菌(*Monascus anka*),华南理工大学生化工程研究室保存。

1.1.2 诱变剂:紫外灯(15 W),苏净集团安泰公司;氯化锂,天津市科密欧化学试剂有限公司;亚硝基胍,上海化学试剂采购供应站分装;硫酸二乙酯,上海东懿化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基:斜面种培养基:麦芽汁琼脂培养基(麦芽汁由珠江啤酒有限公司提供);种子培养基(g/L):玉米粉 30,硝酸钠 3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01,磷酸二氢钾 4, pH 自然;发酵培养基(g/L):玉米粉 70,硝酸钠 7, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01,磷酸二氢钾 5,氯化钙 0.1,调 pH 4.0。培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 试验设备

紫外可见分光光度计(UV-2501PC 型),日本岛津公司;可见分光光度计(722s 型),上海精密科学仪器有限公司;全温摇床(C25KC 型),美国 New Brunswick Scientific 公司;生化培养箱(SPX-250B-Z 型),上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电子天平(ER-180A 型),日本 A&D 公司。

1.3 种子培养和发酵方法

斜面种在 32°C 培养 2 d~3 d;种子液在 32°C、

160 r/min 培养 2 d~3 d;摇瓶发酵条件为 250 mL 三角瓶装 30 mL 培养基,160 r/min,32°C 培养 7 d。

1.4 诱变条件及方法

1.4.1 孢子悬浮液制备:斜面种在 32°C 培养 2 d~3 d 后,用 5 mL 生理盐水冲洗菌种斜面,经玻璃珠打散,无菌擦镜纸过滤,制成含孢子 1×10^5 个/mL 悬浮液。

1.4.2 紫外诱变:孢子悬浮液在 15 W 紫外灯垂直距离下 30 cm,同时磁力搅拌照射一定时间,在红光下进行实验。

1.4.3 硫酸二乙酯诱变:用 95%的乙醇与硫酸二乙酯混合配制成不同浓度的硫酸二乙酯稀释溶液。取 1 mL 经过紫外诱变过的孢子悬浮液,加入 1 mL 不同浓度的硫酸二乙酯稀释溶液,32°C 充分振荡 30 min,然后加入 1 mL 25%硫代硫酸钠溶液终止反应。

1.4.4 氯化锂诱变:称取不同量的氯化锂分别添加到 50 mL 麦芽汁琼脂培养基中,配置成含不同氯化锂浓度的麦芽汁琼脂培养基,然后灭菌,倒平板。吸取经过紫外和硫酸二乙酯诱变过的且等梯度稀释过的孢子悬浮液 0.2 mL 涂平板,32°C 避光培养 2 d~3 d。

1.4.5 亚硝基胍诱变:称取 50 mg 的亚硝基胍,用 2 mL 丙酮溶解,然后用蒸馏水定容至 10 mL,配成 5 mg/mL 浓度的亚硝基胍溶液母液,然后根据实验设计用蒸馏水稀释成不同浓度的亚硝基胍稀释溶液。吸取 1 mL 经过紫外,硫酸二乙酯和氯化锂复合诱变过的斜面种制备成的孢子悬浮液,然后再加入 1 mL 不同浓度的亚硝基胍稀释溶液,32°C 充分振荡处理 30 min,离心去上清液,然后用 pH 7.0 的磷酸缓冲液等梯度大量稀释孢子沉淀以终止反应。整个复合诱变流程如图 1。

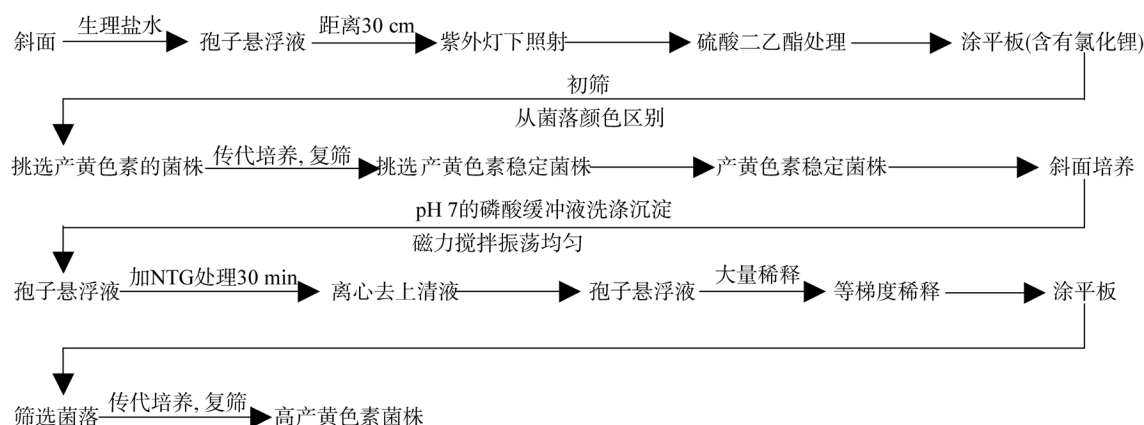


图 1 红曲黄色素菌株的选育工艺流程

Fig. 1 Mutagenesis procedure of *Monascus anka* producing yellow pigment

1.5 分析方法^[10]

1.5.1 色价测定:取 5 mL 的发酵液, 用 5 mL 的 70% 乙醇混合, 加塞摇匀, 静置 1 h 后 4000 r/min 离心 20 min, 上清液经定性滤纸过滤, 滤液稀释至适当倍数, 用 722 型分光光度计在波长 410 nm 下测定其 OD_{410} 值, 此值乘以稀释倍数即为黄色素色价; 在 510 nm 波长下测定其 OD_{510} 值, 此值乘以稀释倍数即为红色素色价。

1.5.2 色调的计算:色调=黄色素色价/红色素色价。

2 实验结果与分析

2.1 诱变致死率的确定

2.1.1 紫外诱变致死率的确定:孢子悬浮液经紫外照射不同时间后, 用生理盐水稀释, 涂布于麦芽汁琼脂培养基平板上, 3 d 后计数, 以出发原始菌株的孢子为空白对照, 计算其致死率。如图 2 所示, 紫外线对红曲霉菌孢子的致死率为 80% 左右的有效照射时间为 30 s。通过紫外诱变得到的单菌落形态与出发原始菌株相比基本没明显区别, 菌落颜色也无明显差别。

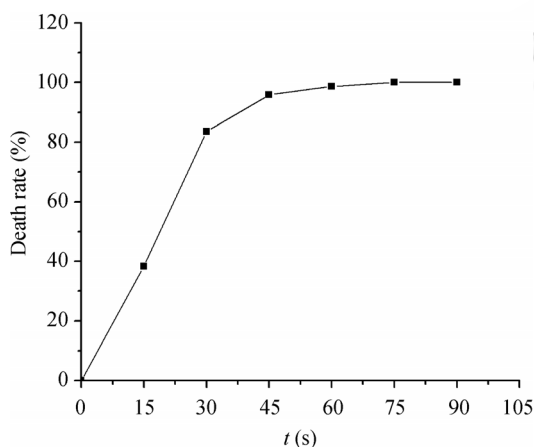


图 2 紫外照射的致死有效时间

Fig. 2 The effect time of ultraviolet radiation on the death rate

2.1.2 硫酸二乙酯诱变致死率的确定:用不同浓度的硫酸二乙酯来处理经过紫外诱变过的孢子液悬浮液, 然后涂平板培养 3 d 后计数, 以经过紫外诱变过的孢子悬浮液为空白对照, 计算其致死率。如图 3 所示, 硫酸二乙酯对红曲霉菌孢子的致死率为 75% 左右的致死有效浓度为 0.4%。通过紫外和硫酸二乙酯复合诱变得到的单菌落形态与出发原始菌株相比

菌落大小没明显区别, 但是菌落颜色呈现红偏橙色。

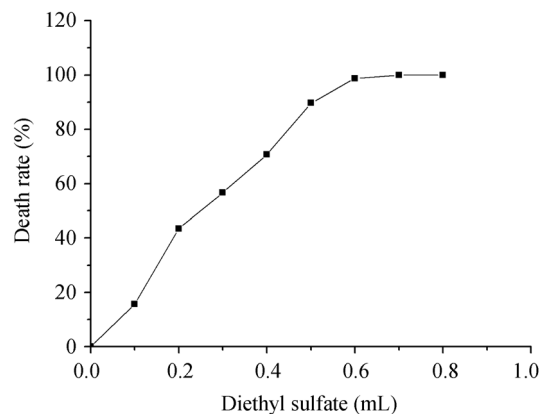


图 3 硫酸二乙酯的致死有效浓度

Fig. 3 The effect concentration of Diethyl sulfate on the death rate

2.1.3 氯化锂诱变致死率的确定:用加有不同浓度氯化锂的麦芽汁琼脂平板来培养经过紫外和硫酸二乙酯复合诱变过的孢子悬浮液, 3 d 后计数, 以经过紫外和硫酸二乙酯复合诱变过的孢子悬浮液为空白对照, 计算其致死率。如图 4 所示, 氯化锂对红曲霉菌孢子的致死率为 80% 左右的致死有效浓度为 0.06%。

通过紫外、硫酸二乙酯、氯化锂复合诱变得到的单菌落形态比出发原始菌株明显小很多, 菌落在培养初期呈现浅黄色, 随培养时间延长整个菌落呈现橙色。然后挑选菌落形态大且颜色为黄色的突变菌株进行进一步的亚硝基胍诱变。

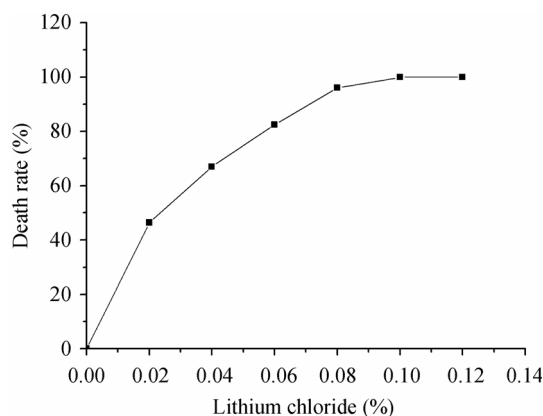


图 4 氯化锂的致死有效浓度

Fig. 4 The effect concentrations of lithium chloride on the death rate

2.1.4 亚硝基胍诱变致死率的确定：用不同浓度的亚硝基胍来处理红曲霉菌孢子液，然后涂平板培养 3 d，以经过紫外、硫酸二乙酯以及氯化锂复合诱变过的孢子悬浮液为空白对照，计算致死率。如图 5 所示，亚硝基胍对红曲霉菌孢子的致死率为 75%左右的致死有效浓度为 1.5 mg/mL。

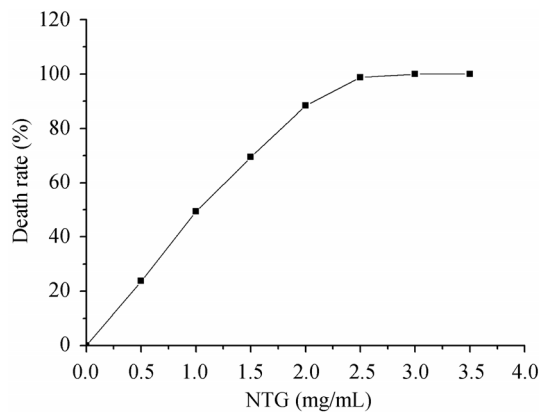


图 5 亚硝基胍的致死有效浓度
Fig. 5 The effect concentrations of NTG on the death rate

2.2 菌种选育结果分析

目前红曲色素产品中，黄色素在总色素中所占的比例很少，简单的分离纯化方法很难得到黄色素。Yongsmith 等人在选育红曲霉黄色素产生菌种方面，取得了丰富的经验，他们得到的黄色突变株的色素发酵液在可见光谱 370 nm 处有最大吸收峰^[5-9]。

本实验采用的出发原始菌株在麦芽汁培养基上培养 2 d 后，菌落呈现明显的红色。经过紫外、氯化锂，硫酸二乙酯和亚硝基胍的复合诱变后，突变菌株在麦芽汁琼脂平板上培养 2 d~3 d，挑取正面为黄色，背面为浅黄色的突变株，在本实验中最终得到 3 株这样的突变株，对它们分别编号为 MYM1、MYM2 和 MYM3。对经诱变得到的突变株在麦芽汁斜面上上传代，进行稳定性试验，观察突变株是否恢复产红色素的性状，从菌落形态上进行突变菌株稳定性生长实验。结果如表 1 所示。从表中可以看出只有 MYM2 突变株的菌落性状比较稳定。以下的实验均使用稳定性最好的 MYM2 突变株。

从图 6 可以看出，MYM2 生长在麦芽汁琼脂平板上，菌落呈明显的黄色，并且随培养时间延长，其黄色更明显。从菌落颜色上看，MYM2 并不是只产黄色素，还是有一定红色素的产生，只是产量相

对于黄色素而言比较少。而出发原始菌株菌落颜色呈现明显的红色，菌落大小比突变菌株要大很多。

表 1 突变菌株菌落性状的稳定性实验
Table 1 The stability experiment of mutant colony characteristic

突变菌株 Mutant	传代培养 Subculture					
	1	2	3	4	5	6
MYM1	+	+	+	+	-	-
MYM2	+	+	+	+	+	+
MYM3	+	+	+	-	-	-

注：+：稳定；-：不稳定
Note: +: Stable; -: Unstable

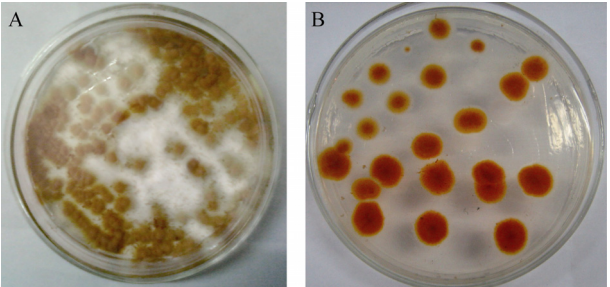


图 6 红曲霉突变菌株 MYM2 与原始菌株的菌落形态对比
Fig. 6 The control of colony morphology between the mutant MYM2 and original *Monascus*
注：A：突变菌株 MYM2；B：出发菌株
Note: A: Mutant MYM2; B: Original strain

2.3 菌落液态发酵结果分析

从液态发酵结果(见图 7)来看，在发酵 4 d 左右，整个发酵液呈现明显的黄色；但发酵到 7 d，发酵液颜色变深，且发酵液过滤后经过适当稀释，可以明显看出发酵滤液呈现黄色，但是也还含有少量的红色素。

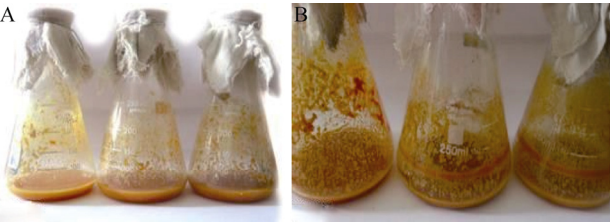


图 7 MYM2 摇瓶上发酵情况
Fig. 7 The circumstance of MYM2 fermentation in shake flask
Note: A: 4 days; B: 7 days

2.4 红曲黄色素吸收光谱分析

从图 8 可以看出, 在 300 nm~600 nm 间用紫外可见光分光光度计进行吸收峰扫描。结果表明, 发酵液在 410 nm 附近有个最大吸收波峰。这跟文献报道的在 370 nm 处有最大吸收波峰的结果不一样^[5-9], 这说明, 本实验中诱变得到的红曲霉突变菌株 MYM2 代谢形成的黄色素跟文献中报道的很可能不一样。红曲霉一般都产黄色素, 只是相对于红色素而言, 比例非常少, 而本文中诱变得到的 MYM2 代谢形成的红曲色素中黄色素比例很大(见图 9)。通过对 MYM2 进行生长曲线研究, 初步认为本实验诱变得到的突变菌株代谢形成红色素的某个关键酶酶活降低, 而影响黄色素代谢形成的关键酶酶活得到提高或降低程度非常小(见图 9)。从实验结果也可以看出, 以 MYM2 突变株进行发酵生产, 完全可以得到比较纯的红曲黄色素。

2.5 红曲霉突变菌株稳定性发酵实验结果分析

从表 2 (发酵 7 d 的结果)可以看出, MYM2 液态发酵生产红曲黄色素色价达到 110 U/mL, 这比国内报道的液态发酵水平高出很多^[1,2], 并且与出发原始菌株对比, 出发原始菌株发酵生产的黄色素色价不到 70 U/mL, 色调不到 1。对 MYM2 传代培养后, 随机挑 50 个单菌落进行突变株产黄色素稳定性实验, 实验结果表明突变菌株 MYM2 代谢形成黄色素的性能比较稳定(实验结果未出现文中)。这说明, 本文中诱变得到的 MYM2 突变菌株有望作为工业生产的菌株来发酵生产红曲黄色素。

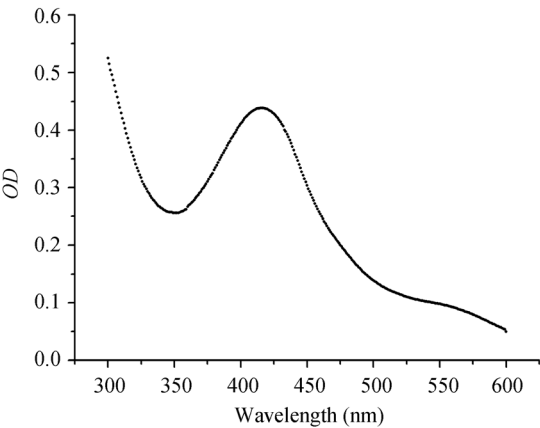


图 8 红曲黄色素的吸收光谱(溶剂: 70%乙醇)
Fig. 8 Absorption spectrum of *Monascus* yellow pigment(solvent: 70% ethanol)

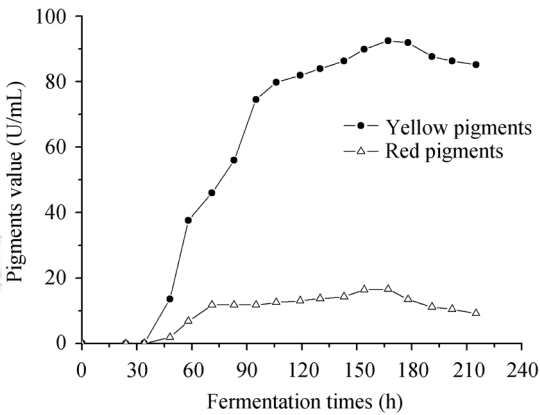


图 9 MYM2 代谢形成红曲色素的情况
Fig. 9 The circumstance of *Monascus* pigment metabolism by MYM2

表 2 MYM2 产黄色素稳定性实验 Table 2 The stable experiment of <i>Monascus</i> yellow pigment production						
突变株 MYM2 Mutant MYM2	传代培养 Subculture					
	1	2	3	4	5	6
黄色素色价 Yellow pigments value (U/mL)	127 ± 0.15	120 ± 0.17	121 ± 0.20	135 ± 0.23	141 ± 0.14	111 ± 0.19
色调 Colour hue	3.53 ± 0.08	3.46 ± 0.02	3.27 ± 0.02	3.48 ± 0.01	3.42 ± 0.05	3.35 ± 0.03

通过实验还发现, MYM2 菌株代谢产生的红曲黄色素受 pH 影响很大。红曲黄色素溶液 pH 低于 3 时, 色素溶液变浑浊; 当 pH 大于 8 时, 黄色素就不稳定, 颜色会发生变化。总的说来, MYM2 菌株代谢产生的黄色素在 pH 3~8 间比较稳定, 这跟日本生产的红曲黄色素的性质基本符合^[11]。

参 考 文 献

[1] 唐秋琳, 赵 海, 王忠彦, 等. 一株产黄色素红曲霉 *Monascus* HB-5 的生物学特性研究. 食品科技, 2006, 7: 47-51.

[2] 马美荣, 方慧英, 王正祥, 等. 红曲霉单产黄色素突变株的选育. 微生物学通报, 2001, 28(4): 66-69.

- [3] Chen Yen-Lin, Hwang Ing-Er, Lin Ming-Chih, *et al.* *Monascus purpureus* mutant and its use in preparing yellow pigment. UPT. No 6635467.
- [4] Chul SS, Hyung JK, Moon JK, *et al.* Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **59**(8): 576–581.
- [5] Yongsmith B, Chaisrisook C, Chimanage P, *et al.* Papers of the symposium on *Monascus* culture and application. *Toulouse France*, 1998, **9**: 115–126.
- [6] Yongsmith B, Krairak S, Bavavoda R. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* sp.. *J Ferment Bioeng*, 1994, **78**: 223–228.
- [7] Yongsmith B, Kitprechavanich V, Chitradon L, *et al.* Color mutants of *Monascus* sp. Kb9 and their comparative glucoamylase on rice solid culture. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2000, **10**: 263–272.
- [8] Somchai Krairak, Kouji Yamamura, Ryoichi Irie, *et al.* Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus* sp.. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, **90**(4): 363–367.
- [9] Yongsmith B, Tabloka T, Yongmanitchai W, *et al.* Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KBIO grown in cassava medium. *World J Microbial Biotechnol*, 1993, **9**: 85–90.
- [10] 中华人民共和国国家标准. 食品添加剂. GB: 4926–1985.
- [11] 项 斌, 高健荣. 天然色素. 北京: 化学工业出版社, 2004, p.2.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsP14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008-00-00 ; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p.1937)