

高产色素红曲霉菌株的选育

姚万春,唐玉明,任道群,廖建民,熊 洪

(四川省农科院水稻高粱研究所生物中心,四川 泸州 646000)

摘 要: 以大曲、大曲酒醅、黄水、窖泥作为菌源,经分离、筛选、诱变、菌落形态鉴定和稳定性试验,从中分离筛选得一株产酶、产酒、产色素、产生理活性物质强的红曲霉菌株——MK3.101。根据微生物形态特征初步定为紫红曲霉。(孙悟)

关键词: 红曲霉; 选育; 色素

中图分类号:TQ925.7;TS261.1;Q93-33 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)02-0029-03

Breeding Selection of *Monascus* Strains of High-yield Colorant

YAO Wan-chun, TANG Yu-ming and REN Dao-qun et al.

(Biology Center of Sichuan Agriculture Science Academy Paddy & Sorghum Research Institute, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Daqu, fermented grains of Daqu, yellow water and pit mud were used as microbe source, then through separation, screening, mutation, colony morphology identification and stability test, a *monascus* strain -MK3.101 in possession of strong enzyme-producing, liquor-producing, pigment-producing, and physiological activity substance-producing capability was finally separated. Such *monascus* strain was named purple *monascus* according to its morphological characteristics. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *monascus*; breeding selection; colorant

红曲霉作为红曲的生产菌,以其能产生大量天然色素而著称,是目前世界上唯一生产食用色素的微生物^[1]。红曲是以粳米(*Oryza sativa*)为原料经红曲霉发酵而成的一种紫红色米曲,它的发明至今有 1000 多年的历史,是我国的宝贵科学遗产,很早就用于食品着色、食品发酵以及中医中药。近年来,由于发现红曲霉产生具有防癌、治疗消化系统炎症、降血压、阻止胆固醇形成等的生理活性物质,以及在世界范围内对化学合成色素使用的限制,使红曲霉的研究进入一个新阶段。

目前,我国红曲色素发酵的生产设备、色素的后期提取工艺水平及精炼工艺都不如国外,通过菌种诱变选育提高生产菌株的发酵水平,降低生产成本,对我国色素产业参与国际市场的竞争有着重要意义。

笔者在对红曲色素生产菌株改良过程中得到一株产色素强的突变菌株。本文介绍该菌株诱变选育的方法、控制要点及菌株的形态特征。

1 材料与方法

1.1 菌种的分离

1.1.1 含菌样品

收稿日期:2004-07-20

作者简介 姚万春(1964-),女,本科,副研究员,发表论文 19 篇。

大曲药、酒醅、黄水、窖泥、尘埃。

1.1.2 培养基

富集培养基:7~8°Be 麦芽汁,0.7%乳酸液,可溶性淀粉 2%,蛋白胨 0.5%,0.1 MPa 灭菌 20 min,用时加入 10%的乙醇和适量的青霉素。

分离培养基:7~8°Be 麦芽汁,可溶性淀粉 2%,蛋白胨 0.5%,琼脂 2%,0.1 MPa 灭菌 30 min。

1.1.3 分离方法

将含菌样品 1 g 加入富集培养基,32~34℃培养一定时间后将培养液转入另一瓶相同的新鲜培养液中,如此反复转接 2~3 次,再采用稀释平板分离,32~34℃培养 4 d,挑选平板上长出的单个菌落反复纯化,直到镜检无杂菌为止。将纯化后的菌株转入斜面培养保藏。

1.2 菌种的筛选

1.2.1 培养基

种子培养基(%):大米粉 5,NaNO₃ 0.2,KH₂PO₄ 0.5,MgSO₄·7H₂O 0.1,pH5.8。

液体发酵培养基(%):大米粉 5,酵母膏 0.2,NaNO₃ 0.2,KH₂PO₄ 0.5,MgSO₄·7H₂O 0.1,FeSO₄·7H₂O 0.05,

ZnSO₄·7H₂O 1.0×10⁻⁵。

1.2.2 筛选方法

斜面菌种转接于种子培养基,32~34℃培养4d(孢子浓度为90个/mL)。以5%的接种量接入液体发酵培养基,32~34℃避光培养18d,每天摇瓶2次。

1.2.3 分析方法^[2]

液态发酵样品用滤纸过滤得滤液和滤渣,滤液经适当稀释后用721型分光光度计于510nm处测定OD值,滤渣用蒸馏水洗涤3次后于60℃烘干称重测得生物量,然后称取1g干菌丝用75%的乙醇浸提2次,每次2h,过滤,合并后的滤液适当稀释后用721型分光光度计于510nm处测定OD值。色价=稀释倍数×OD值。

1.3 菌种的诱变

1.3.1 诱变条件及方法^[3]

出发菌株点接于含氯化锂的平板上32~34℃培养4d,生理盐水下洗,经玻璃珠打散,无菌擦镜纸过滤,制成含孢子1.0×10⁵个/mL悬浮液,取2mL悬浮液于培养皿中置15W紫外灯30cm处,搅拌下进行不同剂量紫外线诱变,菌液红光下稀释后涂布平皿,32~34℃避光培养,选取菌落直径大、色泽红的菌株转入斜面培养保藏。

1.3.2 突变菌株的筛选

挑选诱变株进行液态发酵初筛和固态发酵复筛。

1.3.3 分析方法^[2]

液态发酵测定方法同1.2.3。

固态发酵样品色价测定:粳米浸泡2h,洗净、沥干、蒸熟,倒入容器分散并喷上10%的pH3.5~4.5的醋酸液,装瓶灭菌,接入菌悬浮液,32~34℃培养10d,25℃培养15d,每天摇瓶2次,成熟后烘干,称取0.5g样品加75%乙醇50mL,在50℃下浸提2次,每次2h,过滤,合并后的滤液适当稀释后用721型分光光度计测定410nm和510nm处的OD值。固态发酵样品的色价为(OD₄₁₀+OD₅₁₀)×100×稀释倍数(u/g)。

1.4 菌种的分类、鉴定

根据霉菌的常用鉴定方法^[4,5],主要采用平皿培养,肉眼观察菌落形态和显微观察个体形态。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的分离

目前红曲霉生产中常用的菌株已经过多次驯化,性能稳定不易改变,首选确定分离野生红曲霉为出发菌株,共分离出46株红曲霉。

2.2 菌种的筛选

对所分离出的46株红曲霉进行液体发酵初筛,发现它们的产色差异很大,其中有6株的菌丝体和发酵液

都呈紫红色,对这6株菌进行测定,结果见表1。

表1 出发菌株的筛选结果

菌号	发酵液色价 (u/mL)	菌丝体色价 (u/g)	生物量 (g/瓶)
K3.101	10.2	1160	1.29
K3.1.2	9.2	825	1.03
K3.1.3	6.8	1095	1.19
DL3.101	10.8	146	1.31
DL3.1.8	7.2	165	1.20
DL3.1.9	10.0	154	1.05

这6株红曲霉中K3.101不仅产色好,而且生物量也高,故以K3.101作出发菌株。

2.3 菌种的诱变

采用氯化锂和紫外线等简便易行的方法对出发菌株K3.101进行诱变处理,以期得到发酵速度快、产色能力强的优良红曲菌株。

将K3.101点接于分别含氯化锂0.03%,0.4%,0.5%的平板上,比较各浓度的诱变差异,结果见表2。

表2 不同氯化锂浓度的诱变效果

浓度(%)	菌落直径(cm)	比对照色深的菌落数
0	(2.5~2.8)×(2.6~3.2)	—
0.3	(2.5~2.8)×(2.6~3.2)	0
0.4	(2.5~2.8)×(2.8~3.4)	2
0.5	(2.5~2.7)×(2.6~3.2)	1

选择氯化锂浓度为0.4%的平板上直径大、色最红的菌落进行紫外线诱变,诱变处理时间与对致死率之间的关系见表3。

表3 紫外线处理时间与对致死率之间的关系

处理时间(min)	致死率(%)	处理时间(min)	致死率(%)
1	42.74	4	85.13
2	53.49	5	95.52
3	73.51		

由表3可见,随着紫外线照射剂量的增加,菌株的致死率逐渐升高,到5min时已达95.52%。当处理剂量大时,杀菌率高(90%~99%),在单位存活细胞中负突变菌株多,正突变菌株少。用小剂量处理时,杀菌率为50%~80%,在单位存活细胞中正突变菌株多^[6]。所以选取紫外线照射剂量2~4min的诱变株中直径大、菌丝体和菌落背面均为紫红色的变异株37株进行初筛,将产色幅度提高较大的5株进行复筛(结果见表4),其中MK3.101菌株的产色幅度提高最大。

2.4 诱变株的稳定性实验

将5株诱变所得的红曲霉在麦芽汁斜上传代7次,进行稳定性实验,结果见表5。从中看出除MK3.116外,其他菌株的性能稳定,MK3.101菌株是一株高产色素红曲霉菌株,具有工业应用价值。

2.5 MK3.101的外观形态特征

表 4 出发菌株紫外线处理复筛结果

菌号	发酵液色价 (u/mL)	比出发株 提高(%)	菌丝体色价 (u/g)	比出发株 提高(%)
MK3.101	19.5	91	1436	24
MK3.102	16.9	66	1252	8
MK3.103	18.6	82	1362	17
MK3.116	14.4	41	1295	12
MK3.127	14.5	42	1207	4

表 5 诱变菌株的稳定性实验结果

菌号	液体发酵样		固体发酵样	
	水溶性色 价(u/mL)	醇溶性色 价(u/g)	色价 (u/g)	颜色
MK3.101	19.2	1435	1147	紫红色
MK3.102	17.0	1252	1002	紫红色
MK3.103	18.4	1349	1090	紫红色
MK3.116	10.0	419	496	紫红色
MK3.127	14.5	11195	996	紫红色

表 6 MK3.101 红曲霉菌株的菌落形态

培养基	察氏培养基	麸皮汁培养基	麦芽汁培养基	PDA 培养基
菌丝生长	极微弱	一般	良好	一般
表面形状	蔓延成膜状, 皱纹和气生菌丝		蔓延成膜状, 皱纹和气生菌丝	
表面颜色	白色→红棕色		白色→紫红色	
背面颜色	红棕色		紫红色	
大小(直径, cm)	(3.5~4.5) × (4.0~5.2)		已满平皿 9×9	
			(4.2~4.8) × (3.6~5.1)	

表 7 MK3.101 红曲霉菌株的显微形态

培养基	麸皮汁培养基	麦芽汁培养基	PDA 培养基
菌丝体	分枝甚繁, 有隔, 多核, 含有橙红色颗粒	分枝甚繁, 有隔, 多核, 含有橙红色颗粒	分枝甚繁, 有隔, 多核, 含有橙红色颗粒
分生孢子生长部位	菌丝及其分枝的顶端	菌丝及其分枝的顶端	菌丝及其分枝的顶端
分生孢子着生形式	单生或 2~6 个成链	单生或 2~6 个成链	单生或 2~6 个成链
分生孢子形状	梨形	梨形	梨形
分生孢子大小(μm)	8.0~10.0×6.0~9.0	9.0~11.0×6.0~9.0	6.0~10.0×6.0~10.0
子囊果柄	具有短柄	具有短柄	具有短柄
子囊果形状	球形	球形	球形
子囊果颜色	橙红色	橙红色	浅红色
子囊果大小(μm)	直径 25~52	直径 37~64	直径 26~48
子囊	10 多个光滑球形	10 多个光滑球形	10 多个光滑球形
子囊孢子形状	椭圆形	椭圆形	椭圆形
子囊孢子颜色	无色	浅红色	无色
子囊孢子大小(μm)	5.0~6.5×3.5~5.0	5.0~6.5×3.5~5.0	5.0~6.5×3.5~5.0

将 MK3.101 点接于不同培养基上, 培养一定时间, 肉眼观察菌落形态(表 6)和显微观察个体形态(表 7)。

依据上述形态特征, 利用文献^[4,5]的检索表, 将 MK3.101 鉴定为真菌门(*Eumycophyta*)、子囊菌纲(*Ascomycetes*)、曲霉目(*Eurotiales*)、曲霉科(*Eurotiaceae*)、红曲霉属(*Monascus Went*)。该菌株的菌落形态与文献^[7]报道的紫红曲霉(*M.purpureus*)的特征相同, 因此, 初步确定 MK3.101 属于紫红曲霉。

3 讨论

3.1 提高产色红曲霉发酵水平是近年来红曲研究和生产者普遍关注的一个课题。这一研究的技术关键在于获得发酵快、色素生成能力强的菌株。红曲霉中的某些种虽然具有较强的色素生成能力, 但培养基及其培养方式对其发酵结果影响很大, 寻找最佳条件的工作正在进行中, 有可能获得更好的结果。

3.2 红曲霉生长、产酶、分泌色素、生成生理活性物质及发酵生成乙醇和其他代谢物之间的关系是比较复杂

的, 既有相互促进, 又相互制约, 其间的关系有待深入研究。

3.3 在进一步研究的基础上, 如能将红曲霉具有的产酶、产酒、产色素、产生理活性物质的诸多功能协调起来, 则有望出现顺应时代健康要求的新饮品。

参考文献:

- [1] 马美荣, 方慧英, 王正祥, 等. 红曲霉单产黄色素突变株的选育[J]. 微生物学通报, 2001, 28(4): 66-69.
- [2] 傅金泉. 中国红曲及实用技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [4] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学出版社, 1997.
- [6] 施巧琴, 吴松刚, 等. 工业微生物育种学[M]. 福州: 福建科学出版社, 1991.
- [7] 傅金泉. 谈有关红曲生产和应用的问题[J]. 酿酒科技, 1998, (2): 102.