

光照对红曲霉形态、孢子及色素的影响研究

赵永霞 周礼红 黄艳婷 吴砾溟 胡久平

(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 丝状真菌利用光源并不是单纯的作为能源而是作为信息的来源,对真菌的生长发育及次级代谢有重要的调控作用。本研究通过菌落观察、色价测定及分生孢子和闭囊壳的计数方法发现,黑暗条件下 *Monascus anka* GZU4577 菌落较大,促进菌株的营养生长,而且黑暗条件下 *Monascus anka* GZU4577 菌株的色素积累,分生孢子数量以及闭囊壳的数量明显大于光照条件。实验证实相比于白光条件,黑暗条件更有利于 *Monascus anka* GZU4577 的生长发育以及色素的积累。推测红曲霉可能存在不同的光反应调控系统,为后续红曲霉光调控研究奠定基础。

关键词: 红曲霉; 白光; 黑暗; 色素

中图分类号: TS261.1; TQ925.7; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2012)09-0042-04

Investigation on the Effects of Light on Shape, Spore-producing Capacity and Pigments of *Monascus*

ZHAO Yongxia, ZHOU Lihong, HUANG Yanting, WU Shuoming and HU Jiuping

(College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Different from plants, fungi use light not only as a source of energy but as a source of information. Accordingly, light plays important roles in fungi growth and the regulation and the control of secondary metabolism. In this study, through the observation of *Monascus* shape, the measurement of color value, and the counting of spore and cleistothecia, it was found that dark could enhance the formation of cleistothecium as well as conidia and mycelia in *Monascus anka* GZU4577 and dark could stimulate the production of pigments in *Monascus anka* GZU4577. It was then concluded that dark, compared with light, was good for the growth of *Monascus anka* GZU4577 and the accumulation of pigment. These findings suggested that different light regulation system might exist in *Monascus*. This study had laid foundation for consequent research on light regulation and control of *Monascus*.

Key words: *Monascus*; light; dark; pigments

光作为自然界信息的主要载体,影响着生物体发育和生理过程,包括丝状真菌也会受到光的影响。光信号调控首先主要是在 *Neurospora crassa* 中研究,进而在许多其他真菌中也逐渐发现光的代谢及调控途径。对于不同波长的光,丝状真菌有不同的感知和反应调控系统,其中主要光反应调控蛋白是 PAS-domain^[1],包括 WHITE COLLAR-1(WC-1)和 WHITE COLLAR-2(WC-2),组成 WCC 复合物,是 *Neurospora crassa* 调控蓝光的关键复合物^[2]。而 *Aspergillus nidulans* 是通过一种类似光敏色素的受体蛋白感受红光,并作为一种调控有性发育和无性发育的信号^[3]。并且发现了另一个依赖于光的调节基因簇 velvet 家族。其中,蛋白 VeA (velvet 编码)在 *Aspergillus nidulans* 中被鉴定^[4],证实对分生孢子有调控作

用,能够促进有性发育而抑制无性发育,并且还是许多次级代谢产物的关键调控因子^[5]。真菌的发育与次级代谢是相关联的,velvet 家族的异源蛋白 VelB/VeA/LaeA 与光反应发育调节和次级代谢的控制有关。黑暗条件促进 VeA 进入细胞核,与 VelB/VeA/LaeA 构成复合物调控真菌向有性发育进行,以及产生更多的次级代谢产物,也是无性发育的负调控因子^[6]。

红曲霉多年来一直用于东方传统食品及药品的生产,能产生很多具有生理功能的次级代谢产物,包括红曲色素、 γ -氨基丁酸、洛伐它汀等。也有研究发现红曲霉对光和黑暗有一定的感知和反应,有研究显示红光和蓝光对红曲霉的发育及代谢都有影响^[7]。而且光照对聚酮类次级代谢产物的合成也具调节作用^[7-8]。红曲霉是否有相

基金项目:贵州大学研究生创新基金“*M.anka* 中 *laeA* 基因的克隆”[农科 2012015]。

收稿日期:2012-07-16

作者简介:赵永霞(1986-),女,在读硕士,研究方向:真菌学。

通讯作者:周礼红(1975-),女,副教授,从事发酵工程,真菌遗传与育种研究,E-mail:lhzhou33@yahoo.com.cn。

优先数字出版时间:2012-08-07;地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120807.1452.002.html。

同的光调控机理,以及会引起哪些发育及次级代谢的变化,能否使提高有益代谢产物或降低甚至消除有害代谢产物成为可能。所以研究光照对红曲霉发育及代谢的影响有重要的意义。

有大量文献报道,光照、黑暗以及不同波长的单色光对丝状真菌的发育及代谢有重要的调控作用。本课题组采用白光和黑暗处理对红曲霉进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

GZU4577 菌株: *Monascus.anka*, 保藏于本研究室。

沙氏琼脂改良培养基: 麦芽糖 5 g, 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 20 g, 酵母膏 5 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL, pH 值自然, 121 °C 灭菌 25 min。用于菌种的活化和斜面培养。

PDA 培养基: 称 200 g 马铃薯洗净去皮切块, 煮沸 30 min, 过滤, 取滤液; 加葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水补足 1000 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

1.2 实验方法

1.2.1 菌落形态观察

在固体平板中进行菌落形态观察。将 GZU4577 接种于含有 20 mL 固体培养基的平板中, 每隔 24 h 进行拍照, 并对菌落形态进行观察。

1.2.2 色素的提取^[9]

将平板菌落划下, 将得到的菌丝体放入干燥箱中干燥至恒重, 准确称量, 得干重。将烘干的菌丝体置于带塞试管中, 加入 10 mL 80% vol 乙醇, 避光静置浸提 5 h, 得色素粗提物。

1.2.3 色价的测定

取色素提取物稀释后选取 505 nm、465 nm、410 nm 固定波长测定色素的 OD 值。其中以 505 nm 的吸收值代表红色素, 465 nm 的吸收值代表橙色素, 410 nm 的吸收值代表黄色素^[10]。色价 (U/g) 计算方法: $OD \times \text{稀释倍数} / \text{菌体干重}$ 。

1.2.4 孢子计数

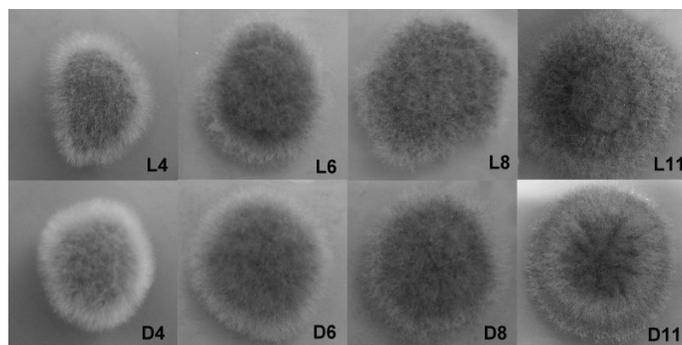
取内径为 10.00 mm 的打孔器在平板均匀打孔, 置于灭菌带玻璃珠试管中, 加入 2 mL 0.2% Tween80 漩涡振荡洗孢子, 血球计数板显微镜计数 (平均 4 次重复)。

2 结果与分析

2.1 光照和黑暗对 GZU4577 菌落形态的影响

分别对持续光照和持续黑暗培养条件下在 PDA 平板上培养 4 d、6 d、8 d、11 d 的 GZU4577 的菌落形态进行观察, 结果见图 1。

图 1 表明, 在持续黑暗和持续光照条件下培养 2 d 的菌落为白色, 但第 3 天基内菌丝颜色发生变化。说明在



(L4, L6, L8, L11 分别是持续光照 4 d, 6 d, 8 d, 11 d; D4, D6, D8, D11 分别是持续黑暗 4 d, 6 d, 8 d, 11 d)

图 1 光照和黑暗下 GZU4577 菌落形态

PDA 培养基上, 光照或黑暗对 GZU4577 进入色素合成期没有影响。黑暗下气生菌丝浓密, 菌丝较长, 边缘一圈白色菌丝, 后期有辐射状沟纹, 菌丝弯曲。光照下气生菌丝较黑暗下疏松, 菌丝较长, 边缘有少量白色菌丝, 后期菌丝也弯曲, 中心凸起, 形成同心环, 无辐射状褶皱。黑暗条件下的气生菌丝均比白光下的多。

从图 1 还可以看出, PDA 培养基培养 3 d 光照条件下基内菌丝变黄色, 黑暗条件下基内菌丝变橙黄色, 然后均向橙黄色转变。光照下色泽暗淡, 培养 9 d 时由中心向四周: 基内菌丝深红色-橙黄色, 菌落正面橙色-黄色-白色。黑暗条件下培养 9 d 后由中心向四周: 基内菌丝深红色-橙色-黄色; 菌落正面暗红色-橙色-黄色-白色。培养 11 d 时白光下菌落中央呈橙色, 而黑暗下菌落中央呈红色, 说明黑暗有助于红色素的积累。

2.2 光照和黑暗对 GZU4577 菌落直径的影响

每天分别测量持续白光和持续黑暗下 GZU4577 在 PDA 培养基上的菌落大小, 结果见图 2。

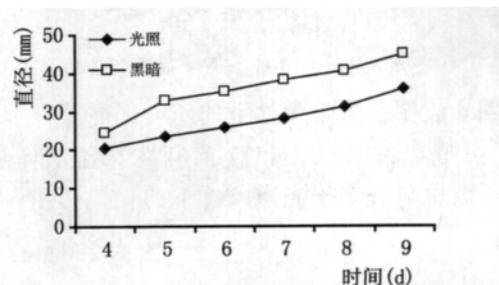


图 2 白光和黑暗条件下 GZU4577 菌落生长情况

图 2 表明, 培养 1~3 d, 菌落较小, 且无显著差异; 培养 4~9 d 时的菌落在白光和黑暗下菌落直径有显著差异, 黑暗条件下菌落较大, 表明黑暗有助于 GZU4577 的径向生长。

2.3 光照和黑暗对 GZU4577 色素色价的影响

分别对在光照下和黑暗下培养 4~9 d 的色素粗提物进行固定波长扫描, 结果见图 3。

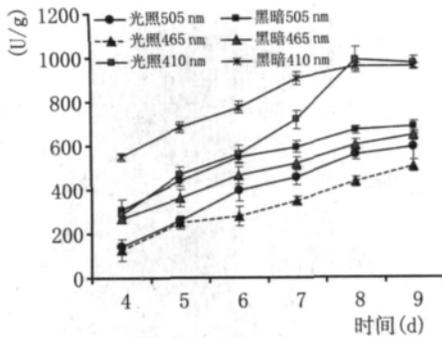


图3 光照和黑暗对GZU4577色素色价的影响

图3表明,光照下3种色素色价整体均显著低于黑暗下的3种色素色价,与菌落观察结果一致。说明黑暗条件对GZU4577的色素合成和积累有促进作用。在410 nm处的光照条件下GZU4577的黄色素积累量最高,且光照条件下黄色素到第8天与黑暗条件下光色素含量无显著差异,说明光照对黄色素的积累也有一定促进作用。同时光照条件和黑暗条件下的505 nm及465 nm在8~9 d的色价变化均不显著,说明从第8天开始色素基本达到稳定,不再积累。

2.4 光照和黑暗对孢子数量的影响

选取分别在光照和黑暗条件下培养到第9天的GZU4577进行闭囊壳和孢子计数,结果见图4。

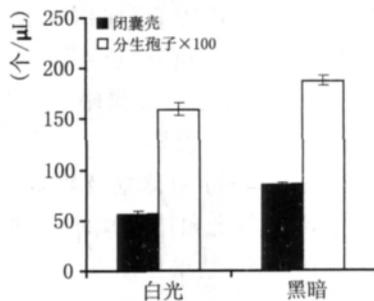


图4 光照和黑暗条件对孢子形成的影响

图4表明,黑暗条件下的闭囊壳显著多于光照条件下的,黑暗有利于GZU4577向有性发育方向进行,且分生孢子数也显著多于光照条件下的。

3 讨论

3.1 光照和黑暗对发育的影响

丝状真菌利用光照不是作为能源而是作为一种信息载体,细胞转化光能到细胞化学能,转化得到的化学语言为生物体传递了生长发育的重要信息,而且也是真菌与环境相互感知、相互作用的重要信号之一。以*Aspergillus nidulans*研究显示,给予光照抑制闭囊壳的产生,促进无性发育的进行,相反在黑暗下则促使细胞进行有性繁殖,产生大量的闭囊壳^[11-12]。也有报道在*Monascus pilosus*,红光和蓝光都较黑暗下产生更多的闭囊壳和分

生孢子^[7]。在本研究中,黑暗条件下气生菌丝茂密,菌落直径较大,与黑暗条件下会提高*M. purpureus*,*I. farinose*,*E. nidulans*,*F. verticillioides*,*P. purpurogenum*的生物量^[13](Palanivel Velmurugan, Yong Hoon Lee et al.2010)的结论相一致。而且黑暗下闭囊壳的数量和分生孢子数量显著高于白光下的数量,这表明,黑暗促进GZU4577的有性繁殖,与以上研究一致,但是本研究显示,黑暗也有助于产生更多的分生孢子,与已有研究存在差异,推测红曲霉的光调控机理与*Aspergillus nidulans*或*Neurospora crassa*可能存在差异,还需进一步的实验验证。

3.2 光照对次级代谢的调控

多数研究者将发育和次级代谢分开研究,但是近几年的研究显示发育与次级代谢存在密切联系,还可能共享同一个调控网络^[1](Doris Tisch, Monika Schmoll 2010)。调控发育的基因家族同样调控着次级代谢产物,velvet家族基因簇就是一个典型的例子。文献报道采用黑暗,白光、红光、蓝光、黄光、绿光等条件对*M. purpureus*,*I. farinose*,*E. nidulans*,*F. verticillioides*,*P. purpurogenum*的研究表明,对胞内和胞外色素的合成均有促进作用。相对黑暗,红光的调控不显著,但是白光、绿光、黄光显著抑制了生物量的积累及胞内外色素的合成^[13]。本研究黑暗色素积累量较光照下大,与大量文献报道的黑暗会促进有性发育及产生更多的次级代谢产物相一致^[6,14],而且黑暗条件促进velvet家族及*laeA*基因向细胞核内转化从而产生更多的代谢产物在*Aspergillus nidulans*^[6],*Aspergillus fumigatus*^[15],*Aspergillus flavus*^[16]等曲霉属中都已经研究得到佐证。黑暗有助于合成更多的色素,该研究对后续深入研究红曲霉的培养条件对生长发育及次级代谢的影响奠定基础,有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] Doris Tisch, Monika Schmoll. Light regulation of metabolic pathways in fungi[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85: 1259-1277.
- [2] Paola Ballario, Paola Vittorioso, Armando Magrelli, et al. Whitecollar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein[J]. The EMBO Journal, 1996, 15: 1650-1657.
- [3] Luis M. Corrochano. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and Behavior[J]. Photochemical & Photobiological Sciences. Photochem. Photobiol. Sci., 2007, 6: 725-736.
- [4] Jeffrey L. Mooney, Lawrence N. Yager. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*[J]. Genes, 1990, 4: 1473-1482.
- [5] Ana M. Calvo. The VeA regulatory system and its role in morpho-

- logical and chemical development in fungi (Review)[J].Fungal Genetics and Biology,2008,45: 1053-1061.
- [6] Özgür Bayram,Sven Krappmann,Min Ni,et al.VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism[J].Science,2008,320: 1504-1506.
- [7] Tsuyo shi Miyake,Akira Mori, Toshie Kii,et al.Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*[J].JInd Microbiol Biotechnol,2005,32: 103-108.
- [8] Nancy P. Keller, Geoffrey Turner,Joan W. Bennett. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. Reviews[J]. Nature,Microbiology,2005,3: 937-947.
- [9] 宋水山,司世林,汪继东,等.不同氮源对红曲霉菌产红曲色素的影响[J].河北省科学院学报,1992(4): 65-71.
- [10] 王昌禄,张晓伟,陈勉华,等.红光对红曲霉生长及次级代谢产物的影响[J].天然产物研究与开发,2009(21): 91-95.
- [11] Hee-Seo Kim,Kyu-Yong Han,Kyung-Jin Kim,et al.The ve A gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. Fungal Genetics and Biology,2002(37): 72-80.
- [12] Petra Spröte· Axel A,Brakhage. The light-dependent regulator velvet A of *Aspergillus nidulans* acts as a repressor of the penicillin biosynthesis[J]. Arch Microbiol ,2007(188): 69-79.
- [13] Palanivel Velmurugan,Yong Hoon Lee,Chidambaram Kulandaisamy Venil,et al. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering ,2010,109: 346-350.
- [14] Özlem Sarikaya Bayram, Özgür Bayram,Oliver Valerius,et al. LaeA Control of Velvet Family Regulatory Proteins for Light-Dependent Development and Fungal Cell-Type Specificity[J].PLoS Genetics,2010(12): 1-17.
- [15] Janyce A.Sugui,Julian Pardo,Yun C.Chang,et al.Role of laeA in the Regulation of alb1, gliP, Conidial Morphology, and Virulence in *Aspergillus fumigates*[J].Eukaryotic Cell, 2007,6:1552-1561.
- [16] Saori Amaike, Nancy P. Keller.Distinct Roles for VeA and LaeA in Development and Pathogenesis of *Aspergillus Flavus* [J].Eukaryotic Cell,2009(8): 1051-1060.

(上接第 38 页)

到的成分一定程度上反映果酒酒体中含量最高的成分。

参考文献:

- [1] 刘学铭,肖更生,陈卫东.桑椹的研究与开发进展[J].中草药, 2001,32(6): 569-571.
- [2] 吴继军,肖更生,刘学铭,等.桑椹酒的研制与规模化生产[J].食品与发酵工业,2002,28(6): 76-77.
- [3] 陈祖满.桑椹酒人工发酵过程中化学成分变化的研究[J].中国酿造,2010(8): 139-141.
- [4] 梁明芝,孙日彦,杜建勋,等.桑椹的化学成分及药理作用[J].广西蚕业,2004,41(4): 39-41.
- [5] 陈娟,阚建全,张荣,等.蜂蜜桑椹酒主要成分的分析[J].食品与发酵工业,2011,37(2): 113-119.
- [6] 史青龙,樊明涛,马兆瑞.营养型桑椹酒加工工艺的研究[J].酿酒,2005,32(6): 78-79.
- [7] 王艳辉,白兴荣,等.桑椹干红的营养成分分析[J].云南农业科技,2006(2): 29-30.
- [8] 买买提依明,刘念,印玉萍,等.新疆药桑果酒营养成分分析与保健作用探讨[J].酿酒科技,2007(8): 40-44.
- [9] 栾金水.桑椹酒的酿制工艺[J].酿酒科技,2003(6): 98-100.

(上接第 41 页)

取率比索氏提取法略低,但油中脂肪酸含量较低;石油醚浸泡法提取率最低,且提取油中杂质最多。由此可见,索氏提取法对于葡萄皮中油脂的提取效果最优。

参考文献:

- [1] 彭丽霞,黄彦芳,刘翠平,等.酿酒葡萄皮渣的综合利用[J].酿酒科技,2010(10): 93-96.
- [2] 李莹,苏婷婷,王战勇.葡萄加工副产品的综合利用研究[J].食品科学,2006,22(4): 106-108.
- [3] 唐春江,舒畅.刺葡萄籽油萃取及成分分析研究[J].农产品加工: 学刊,2012,268(1): 49-51.
- [4] 邹磊.酿酒后葡萄籽综合利用的研究进展[J].中国酿造,2012(1): 16-18.
- [5] 张国治,韩宝丽,王伟玲,等.葡萄籽油中脂肪酸成分分析[J].粮食科技与经济,2011,36(3): 49-50.
- [6] 张振华,闫红,葛毅强,等.超临界流体萃取葡萄皮精油的最佳工艺研究[J].食品科学,2005,26(3): 94-96.
- [7] 张振华,闫红,倪元颖,等.超临界流体萃取葡萄皮精油的影响因素研究[J].食品工业,2004(3): 18-19.
- [8] 刘玉梅,高智明,王健,等.裸仁南瓜籽及南瓜籽油的营养成分研究[J].食品工业科技,2010,31(6): 313-316.
- [9] 刘祝祥,陈功锡,欧阳姝敏,等.华榛种仁油提取及 GC-MS 分析[J].中国油脂,2011,36(9): 14-17.
- [10] 高鹏,赵曙辉,邵志宇.GC-MS 法分析鹰嘴豆油中脂肪酸组成及含量[J].中国油脂,2008,33(6): 76-77.
- [11] GB/T 22478—2008,葡萄籽油中国标准书号[S].
- [12] 李淳,胡定煜,李双石,等.金花葵籽油中不饱和脂肪酸的 GC-MS 测定[J].食品研究与开发,2012,33(5): 121-123.