

文章编号 :1009-038X(2000)04-0358-03

## 低产桔霉素红曲霉菌种筛选

许赣荣, 陈蕴, 顾玉梅, 陈记亮

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:**对部分红曲霉菌种的液态发酵液和固态红曲米中桔霉素质量分数进行了测定,从中筛选了数株低产桔霉素的红曲霉菌种,重点对红曲霉 ZK0A 菌种生产的红曲米的色价及桔霉素质量分数进行了测定.连续培养 3 批该菌种,所生产的红曲米色价高于 1 000 U/g,桔霉素质量分数低于 5 mg/kg.而另一株红曲霉 ZH-12 生产的红曲米(色价 1 700 U/g)中桔霉素质量分数则高达 1 g/kg 以上.对这两株红曲霉菌种的菌落形态进行了鉴定,初步认定这两株菌种都是紫色红曲霉.

**关键词:**红曲霉;桔霉素;筛选

中图分类号:Q935

文献标识码:A

## Screening of *Monascus* Strains with Low Content Citrinin Production Ability

XU Gan-rong, CHEN Yun, GU Yu-mei, CHEN Ji-liang

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract:** Several *Monascus* strains with low citrinin production ability were screened. The citrinin contents in liquid (shaking flasks) and solid state cultivation (red rice) by some selected *Monascus* strains were determined. The pigments and citrinin production properties by the strain of *Monascus* sp. ZK-0A were investigated, and it was found that this strain produced moderate amount of pigments (above 1 000 U/g) and less amount of citrinin (below 5 mg/kg) in the three batches of solid state cultivation experiments. The low citrinin producer, *Monascus* sp. ZK-0A and the high citrinin-producer, *Monascus* sp. ZH-12 (color value of its red rice is 1 700 U/g) were identified to be the same species of *Monascus purpureus*, according to morphological characters and growth in MEA medium of the strain, but had small difference in the colony appearance.

**Key words:** *Monascus*; citrinin; screen

近年来国内外学者研究发现<sup>[1,2]</sup>,红曲产品中含有真菌毒素桔霉素(citrinin),因此筛选低产或不产桔霉素的红曲霉菌种,具有重要的现实意义.据国内外的报道,红曲米产品中,都不同程度地存在桔霉素<sup>[3]</sup>,紫色红曲霉和红色红曲霉菌种被认为是

产生桔霉素的菌种<sup>[4]</sup>.作者在研究中对不同的红曲霉菌种采用统一的培养方法生产红曲米,并采用统一的色价及桔霉素测定方法,对部分红曲霉菌种的色价及产桔霉素的能力进行了评估,目的在于筛选低产或不产桔霉素的红曲霉菌种.

收稿日期:1999-11-23;修订日期:2000-04-25.

作者简介:许赣荣(1957-),男,江西南康人,工学硕士,副教授.

万方数据

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养方法

1.1.1 红曲霉菌种 作者所在实验室保藏的菌种以及从红曲米中筛选到的菌种.重点研究的菌种是紫色红曲霉 ZK0A 和紫色红曲霉 ZH-12.

1.1.2 液态培养红曲 豆饼培养基(g/dL):葡萄糖 5,豆饼粉 0.5,氯化钙 0.01,硫酸亚铁 0.001,硫酸镁 0.05,硫酸锰 0.003,硫酸锌 0.001,磷酸二氢钾 0.5,磷酸氢二钾 0.5. 500 mL 容积的三角瓶装液量为 100 mL,30 ℃于往复式摇床培养 5 d.

1.1.3 红曲米培养方法 粳米用 pH 4 的水浸泡 24 h 后,用蒸锅蒸至半熟,于 0.1 MPa 下灭菌 15 min.种子置于三角瓶液态培养 2 d,接入装有米饭的小型固态发酵罐静置培养,每天翻曲,并根据具体情况添加 pH 4 的无菌水,以保持适当的水分,30 ℃培养 8 d.

### 1.2 测定方法

1) 桔霉素测定方法:参照文献[3],先富集浓缩,再板层析,然后用 HP1100 高压液相色谱仪定量测定.

2) 色价测定方法:按 85 版红曲米国家标准测定.

### 1.3 菌种鉴定

1) 菌种鉴定方法:参照文献[6].

2) MEA 培养基(g/dL):麦芽粉提取物 2,蛋白胨 0.1,葡萄糖 2,琼脂 2. 30 ℃培养 150 h.

## 2 实验结果

### 2.1 不同红曲霉菌种在 YES 培养基中产桔霉素能力的测定

将菌种置于三角瓶中,采用豆饼粉培养基进行培养,定性分析的结果表明,所测试的菌种或多或少都产桔霉素<sup>[5]</sup>.对产桔霉素不明显的菌种进行液态培养,测定发酵液的色价和桔霉素质量浓度,结果见表 1.

用豆饼粉培养基培养微生物,用以检测微生物是否产生真菌毒素.从表 1 数据可见,所收集的红曲霉菌种用豆饼粉培养基培养都产桔霉素,说明红曲霉产桔霉素是一个普遍的现象,但不同菌种产桔霉素的能力是不同的.红曲霉 ZK-0A 发酵液中桔霉素质量浓度较低,而色价相对较高,因此选定该株菌种作为下一步研究的首选菌株.

### 2.2 不同菌株固态发酵生产的红曲米中桔霉素质量分数的测定

用自行设计的小型固态发酵罐,按统一的方法以一些重点菌种培养了一批红曲米,定量测定了桔霉素的质量分数和色价,测定结果见表 2.

可见,有的红曲霉所生产的红曲米的桔霉素质量分数非常高,如 ZH-12.从红曲米的色调看,橙色素质量分数高,可能桔霉素与橙色素之间有某种关系.但三批用 ZK-0A 菌种培养的红曲米的桔霉素质量分数都在 5 mg/kg 以下,并且色价高达 1 000 U/g 以上.从色调上看,属红色偏紫,是固态发酵比较理

表 1 红曲霉菌种 YES 培养基液态发酵液中桔霉素质量浓度和色价

Tab.1 Citrimin mass fraction and color value of some *Momascus sp.* on YES

红曲霉菌种	发酵液颜色	定性观察结果 <sup>1)</sup>	桔霉素质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	色价/(U/mL)	
				505 nm	410 nm
<i>Momascus sp.</i> WM-951	紫红色	+	20	5.13	4.49
<i>Momascus sp.</i> ZK-5	深红色	+	<10	2.10	3.76
<i>Momascus sp.</i> ZK-0A	土红色	+	<10	5.10	5.70
<i>Momascus sp.</i> WM-961	土红色	+++	94	5.03	6.03
<i>Momascus sp.</i> 9085	油红色	++	14	0.97	2.75
<i>Momascus sp.</i> ZH-4#	土红色	+++	47	3.19	4.19
<i>Momascus sp.</i> NJ	土红色	++	34	2.43	3.22
<i>Momascus sp.</i> QZ	土红色	+++	240	5.42	6.01
<i>Momascus sp.</i> WX	鲜红色	+	<10		2.98
<i>Momascus sp.</i> ZK-1	鲜红色	+	<10		3.14
<i>Momascus sp.</i> JH-2	鲜红色	++	<10	0.96	1.94
<i>Momascus sp.</i> ZK-2	土红色	+++	190	5.96	6.57
<i>Momascus sp.</i> JH-3	土红色	++	310	5.21	5.28
<i>Momascus sp.</i> SZ	土红色	+	<10	5.75	

注:1) 万方数据多少表示紫外灯下荧光标记的强弱程度.

想的菌种,这一结果与表1是一致的。

表2 红曲米色价和桔霉素质量分数测定结果

Tab.2 The results of color value and citrimin mass fraction of red rice samples

样品编号	色价/(U/g) (OD <sub>505</sub> )	桔霉素质量分数/ (mg/kg)
ZH-6	4 914	16.32
JH-2	4 375	51.56
ZH-12	1 750	1 178
ZH-12(平行样)	1 750	1 180
ZK-0A(第一批)	987.9	4.27
ZK-0A(第二批)	1 140	0.1152
ZK-0A(第三批)	1 140	0.5398
ZK-0A(第三批)	1 226	2.27
ZK-0A(第三批)	1 226	2.96
ZH-4(第一批)		8.28
ZH-4(第二批)		10.39
ZH-4(第三批)	1 638	6.99
ZH-4(第四批)	1 750	5.7

发酵比较理想的菌种,这一结果与表1是一致的。

### 2.3 ZK-0A菌种的培养特征和初步鉴定

由于红曲霉 ZK-0A 所生产的红曲米桔霉素质量分数较低,色调较好,色价也达到较高的水平,因此对该菌株进行了初步的菌种鉴定<sup>[6]</sup>。同时,对另一株产桔霉素特别高的红曲霉 ZH-12 菌株也进行了菌种的初步鉴定。

红曲霉 ZK-0A 的菌落特征为:菌落直径 35~40 mm,表面有褶皱和气生菌丝,菌落初为白色,成熟后呈橙红色,菌落边缘不光滑,背面中部为橙红色,边缘橙黄色。

红曲霉 ZK-0A 菌丝的显微镜观察结果:菌丝粗细基本一致,透明至橙色,有分支,有隔膜,菌丝细

胞内外均可见橙色粒,分生孢子单独生于菌丝末端,呈球形,闭囊壳呈橙红色,子囊孢子为圆形或椭圆形,光滑且透明。

根据以上特征,可初步判断红曲霉 ZK-0A 属紫色红曲霉(*Monascus purpureus* Went)。另一株红曲霉 ZH-12 菌株的菌落特性与红曲霉 ZK-0A 基本相同,也属于紫色红曲霉。它们在菌落形态上的差别是:红曲霉 ZH-12 菌落较小,30~32 mm,气生菌丝较多,褶皱较多,菌落边缘更粗糙一些。但显微镜下观察到的特征几乎相同。因此,虽然这两株菌种都是同一菌种,但在长期的生产过程中发生了变异,因此产色素及桔霉素的能力都发生了变化。

### 3 结论

通过菌种筛选,得到了数株低产桔霉素的红曲霉菌种,对其中一株 ZK-0A 菌株进行了多批红曲米培养实验,红曲米的色价高于 1 000 U/g,桔霉素质量分数低于 5 mg/kg,该菌株属于紫色红曲霉。另一株桔霉素高产菌 ZH-12 也属于紫色红曲霉,但从菌落形态上看,该菌株与 ZK-0A 稍有差别,这可能是菌种在长期的生产过程中,自发地或人为地发生了变化。

实验中发现,红曲米中桔霉素的质量分数主要由红曲霉菌种本身决定。不同的菌种所产生红曲米的色调也有差别。从红曲米甲醇萃取物板层析的结果看,桔霉素的质量分数往往与色素中橙色素的质量分数有一定的比例关系。除菌种因素外,发酵工艺对红曲米的色调影响较大。由此推论,发酵工艺也是决定红曲米桔霉素质量分数高低的因素之一,这仍需进一步研究。

### 参考文献

- [1] P J BLANC, J P LAUSSAC, J LE BARS. Characterization of *Monascidin*A from *Monascus as citrinii*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 27: 201~213.
- [2] P J BLANC, M O LORET, G GOMAM. Production of citrinin by various species of *Monascus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(3): 291~294.
- [3] PASTRANA L, P J BLANC. Production of citrinin by *Monascus Ruber* submerged culture in chemically defined media[J]. *Acta Biotechnol*, 1996, 16(4): 315~319.
- [4] P J BLANC, M O LORET, G GOMA. Production of citrinin by various species of *Monascus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(3): 291~294.
- [5] XU GANRONG, LU CHEN, MU XIAOQING. A study on the production of citrinin by *Monascus spp*[J]. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 1999, 88~91.
- [6] HAWKSWORTH D L, PITT J I. A new taxonomy for *Monascus* species based on the cultural and microscopical characters[J]. *Aust J Bot*, 1991, 39: 31~56.

(责任编辑:李春丽)