

# 红曲霉单产黄色素突变株的选育

马美荣 方慧英 王正祥 李岩 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

**摘要:**在对红曲色素生产菌选育的过程中,得到了9株在麦汁平板上不产红色素的突变株。对稳定性良好的8株突变株进行固体发酵实验,两个样品呈黄色,其它呈白色。发酵样品在可见光谱范围内扫描,两黄色样品仅在370nm处有一吸收峰,其它白色样品无吸收峰。单产黄色素突变株再经液体发酵实验,同样单产黄色素,说明这两株菌单产黄色素的性能是稳定的。

**关键词:**红曲霉,突变株,黄色素,吸收峰

**中图分类号:** TQ920.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0066-04

## SCREENING OF *MONASCUS* PRODUCING ONLY YELLOW PIGMENTS

MA Mei-Rong FANG Hui-Ying WANG Zheng-Xiang LI Yan ZHU Ge-Jian

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

**Abstract:** 9 mutants which didn't produce red pigments on malt extract agar plate were obtained. The 8 stable mutants

收稿日期: 2000-01-10, 修回日期: 2000-05-08

were cultured on solid medium. Two samples were yellow, the others were white. The extracted samples were scanned in visible length. 2 yellow samples showed only one absorptive peak at 370nm, the 6 white samples showed no absorptive peak. The mutants producing only yellow pigments on solid medium were tested in liquid culture. The results indicated their ability to produce only yellow pigments were stable.

**Key words:** *Monascus*, Mutants, Yellow pigments, Absorptive peak

红曲在我国应用源远流长,《本草纲目》、《兽医本草》和《天工开物》中对于红曲早有记载。红曲霉以其能产生大量天然红色素而著称。红曲霉是目前世界上唯一生产食用色素的微生物。可以通过固体和液体两种方法培养红曲霉,从而可以在生产中大量提取红曲色素。红曲色素是红曲霉在生长代谢过程中产生的天然色素,是多种色素成分的混合物。红曲霉所产生的色素已被确定出化学结构且广为人知的有6种,可分为3类,即红色素 Monascorubramine 与 Rubropunctamine、橙色素 Monascorubine 与 Rubropunctatine 及黄色素 Ankaflavine 与 Monascine<sup>[1]</sup>。作者在对红曲色素生产菌改良的过程中,得到了2株单产黄色素的突变株,本文介绍红曲霉单产黄色素突变株的诱变筛选以及发酵结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

红色红曲霉 MD, 由本实验室分离保藏。

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面和平板培养基: 10~12Brix 麦芽汁 1L, 20g 琼脂。

1.2.2 固体发酵培养基: 米饭培养基。

1.2.3 液体发酵培养基: (1) 种子培养基: 葡萄糖 70g, 蛋白胨 30g, 硝酸钠 2g, 硫酸镁 1g, 定容至 1L 水中, pH 自然。(2) 发酵培养基: 玉米淀粉 100g, 豆饼粉 30g, 硝酸钠 2g, 硫酸镁 1g, 定容至 1L 水中, pH 自然。

### 1.3 诱变条件及方法<sup>[2]</sup>

孢子悬浮液制备: 斜面菌种点接平板, 在 30℃ 培养 3~4d, 无菌水洗下, 经玻璃珠打散, 无菌擦镜纸过滤, 制成含孢子  $1 \times 10^5$  个/mL 悬浮液。

紫外诱变: 15W 紫外灯, 距离 30cm, 磁力搅拌 45s, 红光下涂平板后避光培养。

<sup>60</sup>Co 诱变: 分别以 1 万、2 万、4 万、5 万和 6 万伦琴对试管中孢子悬浮液进行 <sup>60</sup>Co 照射, 作致死率, 选用 99% 致死率 (5 万伦琴) 进行诱变。

亚硝基胍诱变: 称取一定量的亚硝基胍于无菌管中, 加入菌悬液使亚硝基胍最终浓度为 0.3mg/mL, 30℃ 充分振荡处理 30min, 大量稀释以终止反应。

### 1.4 培养方法

1.4.1 平板培养: 将诱变后的孢子悬浮液涂布在麦芽汁培养基平板上, 30℃ 培养, 观察生长情况, 挑取突变株。

1.4.2 固体培养: 见文献 [3]。

1.4.3 液体培养: 种子培养基接种后, 用摇床在 28℃、220r/min 培养 2d。再以 5% 的接种量接入发酵培养基, 在 30℃、250r/min 培养 7d。

## 1.5 分析方法

液态发酵液中色价测定：取发酵液经定性滤纸过滤，滤液经稀释至适当倍数，以分光光度计测定其  $OD$  值（波长 505nm），结果乘以稀释倍数即为发酵液色价。

固态发酵样品色价测定：称取固态样品 0.5g，放入带有刻度的 100mL 具磨口塞试管中，加入 70% 的乙醇至 50mL，摇匀后放入 60℃ 水浴保温萃取 2h，取出冷却（必要时补充定容）。用普通定性滤纸过滤至具磨口塞试管或三角瓶中。取滤液稀释至适当倍数，以分光光度计测定其  $OD$  值（波长 505nm），结果乘以稀释倍数再乘以 100 即为固态样品色价。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种选育

目前红曲色素产品中，黄色素在混合色素中所占的比例最少，改变萃取溶剂和萃取的方法，可得到部分黄色素<sup>[4]</sup>。Yongsmith 等人在选育红曲霉黄色素生产菌方面，取得了丰富的经验，他们得到的黄色突变株的发酵液在可见光谱范围内只有一个小于 400nm 吸收峰<sup>[5]</sup>。

本实验采用的出发菌株在麦芽汁培养基上培养 2d 后，会产生明显的红色，因此，平板培养数天后，挑取正面为白色或黄色，背面为浅黄色的突变株。本实验采用 UV、<sup>60</sup>Co 和亚硝基胍进行诱变，经过比较诱变效果，确定以 <sup>60</sup>Co 诱变进行后续诱变工作。经过多次 <sup>60</sup>Co 诱变，共得到 9 株这样的突变株，对它们分别编号为 MY-1、MY-2……MY-9。

对经诱变得到的目的突变株在麦芽汁斜面上代，进行稳定性试验，观察突变株是否恢复产红色素的性状，结果如表 1 所示。从表中可以看出除 MY-7 菌外，其它突变株的性状稳定。其中 MY-3、MY-6 两株菌长时间培养后，背面黄色越来越深，表面菌丝逐渐发黄；而其它菌随着培养时间的延长变化不大。MY-7 突变株在 3~4d 产生桔红色素。

表 1 目的突变株的稳定性实验

菌号	传代次数								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MY-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MY-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MY-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+ 稳定，- 不稳定

### 2.2 突变株的发酵实验结果

对 8 株稳定的目的突变株进行固体发酵实验，结果发现 MY-3 和 MY-6 样品呈黄色，而其它样品呈白色。样品用 70% 乙醇提取后，在可见光谱范围内扫描，结果发现 MY-3、MY-6 的样品仅在 370nm 处出现一吸收峰，与 Yongsmith 等的结果一致<sup>[5]</sup>，而其它几个样品在可见光谱范围内无吸收峰。原种和突变株的光谱图见图 1。对 MY-3 和 MY-6 两株菌继续液体发酵实验，发酵液也呈黄色，发酵上清液在可见

光谱范围内扫描，结果发现也仅在 370nm 有吸收峰，这说明诱变得到的这两株菌的性能是稳定的。红曲霉单产黄色素突变株的发酵结果如表 2 所示。目前红曲黄色素的生产

是通过液体发酵进行的<sup>[5]</sup>。尚无通过固态发酵进行生产的报导。从表2可以看出, 固态样品色价为液体样品色价的10余倍。

表2 红曲霉单产黄色素突变株的发酵色价

菌种	固态样品色价 (U/g)	液体样品色价 (U/mL)
MY-3	203	18
MY-6	170	16

### 参 考 文 献

- [1] 黄显宗. 红曲霉研究的回顾与展望. 真菌学最近发展 (曾昭彻、陈瑞青主编). 国科会生物科学研究中心专刊 (台北), 1985, 第十二集, 109~124.
- [2] 诸葛健, 王正祥编著. 工业微生物实验技术手册 (第一版). 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [3] 傅金泉. 中国红曲及实用技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [4] Sweeny J G, Estrada-Valdes M C, Iacobucci G A, *et al.* J Agric and Food Chem. 1981, 29 (6): 1189~1193.
- [5] Yongsmith B, Chairisook C, Chimanage P, *et al.* Papers of the Symposium on *Monascus* Culture and Application. Toulouse France. 1998, 115~126.