

# 氮源对红曲霉突变株产黄色素的影响

周波, 浦跃武, 朱明军, 梁世中

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641)

**摘要:** 本文对诱变得到的红曲霉突变株 MYM2 产黄色素进行培养基氮源的优化, 研究了了几种常见的无机氮源和有机氮源对 MYM2 产黄色素的影响。结果表明, 有机氮源玉米浆和无机氮源氯化铵有利于 MYM2 产黄色素, 最佳质量分数均为 1% 左右, 该条件下产黄色素色价分别达到 84.12 U/mL 和 72.17 U/mL。使用这两种氮源混合来培养 MYM2, 最终黄色素产量达到 96.51 U/mL, 其胞外色调和胞内色调都达到 3 以上。

**关键词:** 红曲霉突变株; 氮源; 黄色素; 色价; 色调

**中图分类号:** TS202.3; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)02-0123-05

## Effects of Nitrogen Sources on *Monascus* Yellow Pigment Production by *Monascus* Mutant

ZHOU Bo, PU Yue-wu, ZHU Ming-jun, LIANG Shi-zhong

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

**Abstract:** In this paper, the nitrogen sources of culture media for *Monascus* mutant MYM2 were optimized. Effects of some inorganic nitrogen sources and organic nitrogen sources on *Monascus* yellow pigment production were investigated. Results showed that the best inorganic nitrogen source, organic nitrogen source for the production of yellow pigment by MYM2 were 1% of corn steep liquor and ammonium chloride, with which the yields of *Monascus* yellow pigment productions reached 84.12 U/mL and 72.17 U/mL respectively. cultured in the medium containing the mixture of the corn steep liquor (1%) and ammonium chloride (1%), MYM2 could produce 96.51 U/mL of the *Monascus* yellow pigment. Both intracellular and extracellular colour hue were > 3.

**Key words:** *Monascus* mutant, nitrogen sources, *Monascus* yellow pigment, pigment value, colour hue

红曲, 在东方是一种传统产品, 在中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<sup>[1]</sup>。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。但国内目前尚无工业化生产的报道, 还仅仅停留在菌

种选育阶段, 且选育出的菌株液态发酵水平偏低, 色价不到 20 单位<sup>[1,2]</sup>。而国外的专利和文献报道, 选育出的菌株液态发酵的色价和色调水平都比较高, 适合工业化生产<sup>[3,4]</sup>。因此菌种的选育和培养基的优化是关键问题。本文对本实验室通过复合诱变得到的菌株红曲霉菌突变株 MYM2 进行培养基氮源的优化, 期望提高红曲黄色素的代谢产量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、试剂与培养基

#### 1.1.1 菌种

红曲霉突变株菌 MYM2 (*Monascus kaoliang* mutant): 华南理工大学生化工程研究室保存。

#### 1.1.2 试剂

所用化学试剂除玉米粉是从超市购买外, 其余均从广州市化学试剂厂购买, 均为分析纯。

#### 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

收稿日期: 2007-10-23

作者简介: 周波 (1978-), 男, 博士研究生, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 梁世中, 教授

江啤酒有限公司提供); 种子培养基 (g/L): 玉米粉 30, 硝酸钠 3, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 磷酸二氢钾 4, pH 自然; 发酵培养基 (g/L): 玉米粉 70, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 磷酸二氢钾 5, 氯化钙 0.1, 调 pH 4.0, 发酵培养基其它成分根据实验设计使用。培养基均在 121 °C 饱和蒸汽灭菌 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 下培养 2~3 d; 种子液在 32 °C, 160 r/min 培养 2~3 d; 摇瓶发酵条件为 250 mL 三角瓶装 30 mL 培养基, 160 r/min, 32 °C 下培养 7 d, 所有发酵实验均三个平行, 计算平均值。

1.4 分析方法<sup>[5]</sup>

1.4.1 胞外色价测定

取一定体积的发酵液, 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<sub>410</sub> 值, 此值乘以稀释倍数即为胞外黄色素色价; 在 510 nm 波长下测得 OD<sub>510</sub> 乘以稀释倍数即为胞外红色素色价。

1.4.2 胞内色价测定

离心后的菌体沉淀用 70% 乙醇抽提 1 h, 然后 4000 r/min 再离心 20 min, 上清液过滤, 滤液经稀释至适当倍数, 测定其 OD<sub>410</sub>, 此值乘以稀释倍数即为胞内黄色素色价; 测得的 OD<sub>510</sub> 值乘以稀释倍数即为胞内红色素色价。

1.4.3 总黄色素色价的计算

总黄色素色价(U/mL)=胞外黄色素色价+胞内黄色素色价。

1.4.4 色调的计算

色调=黄色素色价/红色素色价。

1.4.5 细胞干重(CDW)的测定:

吸取 5 mL 发酵液, 4000 r/min 离心 20 min, 去上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤, 4000 r/min 离心 20 min, 去上清液, 重复三次后沉淀于 80 °C 烘箱中烘至恒重。

2 实验结果

2.1 无机氮源种类对红曲黄色素代谢的影响

2.1.1 对色调的影响

无机氮源对色调的影响如图 1 所示。从图 1 中可

以看出, 氯化铵有利于红曲黄色素的合成, 氯化铵环境下的胞外色调为 3.51, 胞内色调为 2.29, 而草酸铵环境下的胞内色调为 1.74, 而在氯化铵和草酸铵环境下的总色调分别为 2.38 和 2.12。总而言之, 在所选无机氮源的发酵环境中, 发酵液胞外色调都比胞内色调要高, 尤其是无机铵盐环境下。

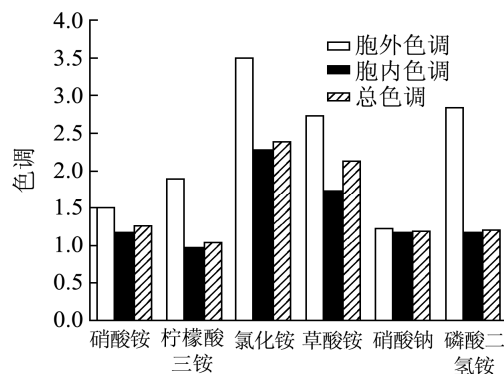


图 1 无机氮源对色调的影响

Fig.1 The effects of inorganic nitrogen sources on colour hue

2.1.2 对红曲黄色素色价的影响

无机氮源对红曲黄色素色价的影响如图 2 所示。从图 2 可以看出, 草酸铵和硝酸钠不利于 MYM2 代谢产生红曲黄色素, 其黄色素色价不到 30 U/mL, 而柠檬酸三铵和氯化铵环境下代谢形成的总黄色素色价比较高, 分别达到 55.4 U/mL 和 58.7 U/mL, 而磷酸二氢铵环境下代谢形成的总黄色素色价也达到 50.37 U/mL。从图 2 可知, 除草酸铵和硝酸钠外, 其他无机氮源环境下的 MYM2 生产的胞内黄色素量都比胞外的要高很多, 其中磷酸二氢铵环境下发酵液的胞内黄色素色价达到 45.23 U/mL, 但是其色调不高, 不到 1.5。

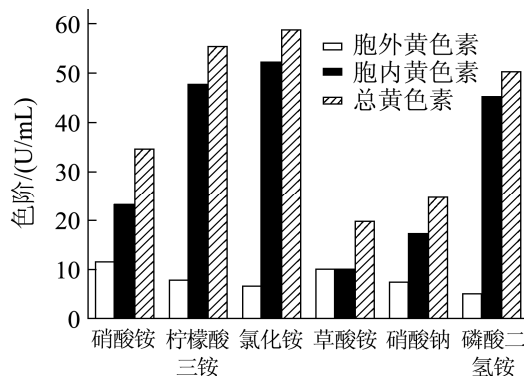


图 2 无机氮源对红曲黄色素色价的影响

Fig.2 The effects of inorganic nitrogen sources on *Monascus* yellow pigment value

2.2 不同氯化铵质量分数对红曲黄色素代谢的影响

根据不同无机氮源环境下发酵液色调和总黄色素色价的情况, 确定氯化铵是一种有利于红曲黄色素代谢的无机氮源, 因此, 有必要研究适合 MYM2 代谢

形成黄色素的最适氯化铵质量分数。

2.2.1 对色调的影响

氯化铵质量分数对色调的影响如图 3 所示。从图 3 中可以看出, 氯化铵质量分数为 1.5% 时的发酵液的胞外色调、胞内色调和总色调最高, 分别为 3.64、3.41 和 3.43。

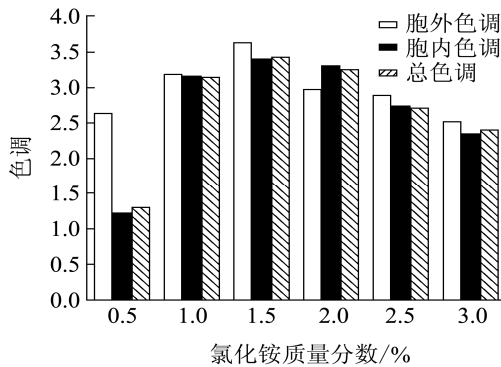


图 3 氯化铵对色调的影响

Fig.3 The effects of ammonium chloride on colour hue

2.2.2 对红曲黄色素色价的影响

氯化铵质量分数对红曲黄色素色价的影响如图 4 所示。从图 4 中可以看出 0.5%~1% 左右的氯化铵质量分数有利于红曲黄色素的代谢, 当质量分数为 0.5% 和 1% 时, 总黄色素色价分别达到 71.41 U/mL 和 72.67 U/mL, 总量相差不大, 但是, 质量分数为 1% 的氯化铵时, 胞内黄色素色价要略高于质量分数为 0.5% 时的发酵情况, 胞内黄色素色价分别达到 65.98 U/mL 和 63.24 U/mL, 氯化铵质量分数为 0.5% 时的胞外黄色素色价略高于质量分数为 1% 时的胞外黄色素色价, 分别为 8.17 U/mL 和 6.18 U/mL。随氯化铵质量分数提高, 黄色素产量呈下降趋势, 这说明高质量分数的氯化铵并不利于 MYM2 代谢产生红曲黄色素。但是, 总的而言, 氯化铵质量分数高低对胞外黄色素色价的影响不大, 主要是影响胞内黄色素色价。

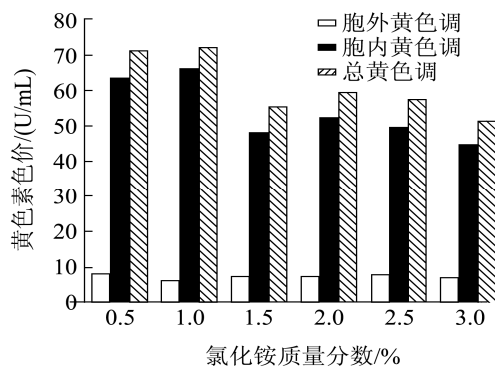


图 4 氯化铵对红曲黄色素生产的影响

Fig.4 The effects of ammonium chloride on *Monascus* yellow pigment production

2.2.3 对细胞干重的影响

氯化铵质量分数对细胞干重的影响如图 5 所示。从图 5 可以看出, 氯化铵的质量分数大小对细胞干重影响不是很大。氯化铵质量分数为 1.5% 的环境下, 细胞干重最大, 达到 23.27 g/L。

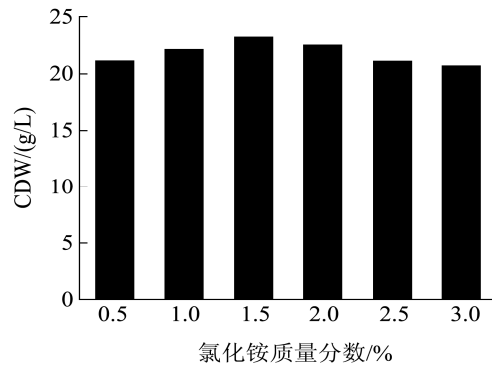


图 5 氯化铵对细胞干重的影响

Fig.5 The effect of ammonium chloride on cell dry weight

2.3 有机氮源种类对红曲黄色素代谢的影响

根据实验室中常用的有机氮源, 挑选了玉米浆、蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、尿素和酵母抽提物, 来研究它们对 MYM2 发酵生产黄色素的影响。

2.3.1 对色调的影响

有机氮源对色调的影响如图 6 所示。从图 6 中可以看出, 在所选的有机氮源中胞外色调最高的是尿素, 为 3.67, 其次为玉米浆和酵母抽提物, 分别为 1.63 和 1.34。而胞内色调最高的是尿素和玉米浆, 分别为 1.64 和 1.29。总色调最高的是尿素, 其次是玉米浆, 分别为 3.03 和 1.53。无论是胞内色调还是胞外色调, 在所选有机氮源中, 只有尿素氮源发酵液的色调超过 2.0。

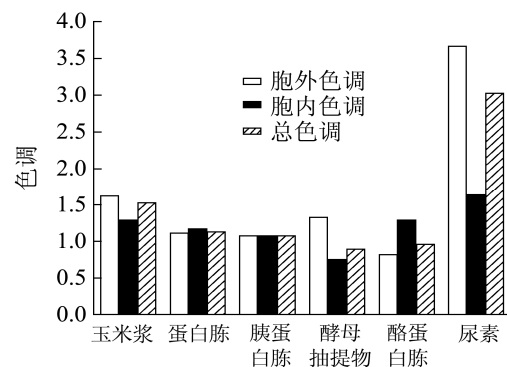


图 6 有机氮源对色调的影响

Fig.6 The effects of organic nitrogen sources on colour hue

2.3.2 对红曲黄色素生产的影响

有机氮源对红曲黄色素的影响如图 7 所示。从图 7 可知, 在所选择的有机氮源中, 玉米浆最有利于红曲黄色素的生产, 其胞外黄色素色价、胞内黄色素色价和总黄色素色价分别达到 28.72 U/mL、45.07 U/mL

和 73.79 U/mL。尿素最不利于红曲黄色素的生产。

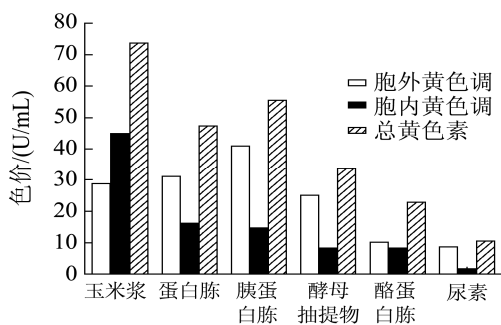


图 7 有机氮源对红曲黄色素生产的影响

Fig.7 The effects of organic nitrogen sources on *Monascus* yellow pigment production

2.4 不同玉米浆质量分数对红曲黄色素代谢的影响

根据不同有机氮源环境下发酵液色调和总黄色素色价的情况，确定玉米浆是一种有利于红曲黄色素代谢的有机氮源，因此，有必要研究适合 MYM2 代谢形成黄色素的最适玉米浆质量分数。

2.4.1 对色调的影响

不同玉米浆质量分数对色调的影响如图 8 所示。从图 8 中可以看出，随着玉米浆质量分数的提高，胞内色调和总色调呈上升趋势，而胞外色调呈下降趋势，这说明，高质量分数的玉米浆，比较有利于胞内色调和总色调的提高，而低质量分数的玉米浆比较有利于胞外色调的提高。

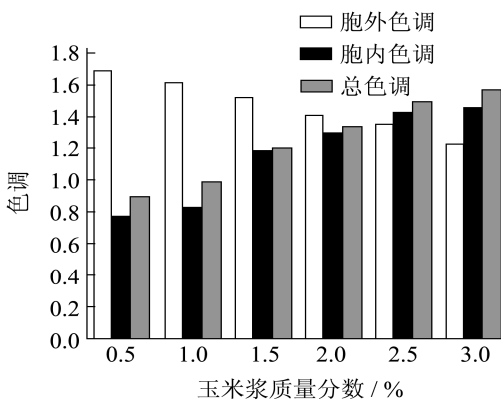


图 8 玉米浆对色调的影响

Fig.8 The effects of corn steep liquor on colour hue

2.4.2 对红曲黄色素色价的影响

表 1 MYM2 产黄色素稳定性实验

Tab.1 The stable experiment of *Monascus* yellow pigment production

胞内色调	胞外色调	总色调	胞外黄色素色价/(U/mL)	胞内黄色素色价/(U/mL)	总黄色素色价/(U/mL)
3.19±0.035	3.53±0.076	3.24±0.053	32.34±1.756	64.15±2.207	96.51±2.189

从以上实验结果可以看出，有利于红曲霉突变株 MYM2 代谢产生黄色素的氯化铵和玉米浆的合适质

不同玉米浆质量分数对红曲黄色素色价的影响如图 9 所示。从图 9 中可以看到，质量分数为 1% 的玉米浆发酵时，其胞内黄色素色价和总黄色素色价都是最高的，分别达到 51.27 U/mL 和 84.12 U/mL，而玉米浆质量分数为 1.5% 时，胞外黄色素色价最高，达到 40.97 U/mL。

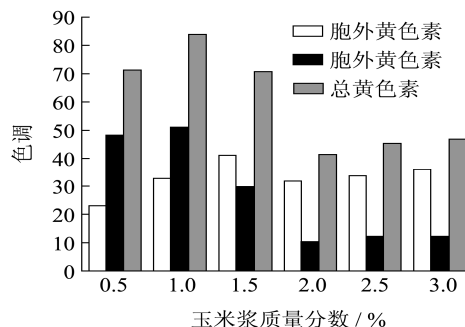


图 9 玉米浆对红曲黄色素生产的影响

Fig.9 The effects of corn steep liquor on *Monascus* yellow pigment production

2.4.3 对细胞干重的影响

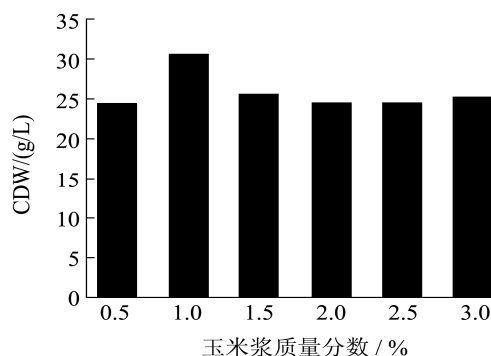


图 10 玉米浆对细胞干重的影响

Fig.10 The effect of corn steep liquor on dry cell weight

不同玉米浆质量分数对细胞干重的影响如图 10 所示。从图 10 可以看出，玉米浆质量分数为 1% 时的细胞干重达到最大，为 30.53 g/L。总体而言，玉米浆质量分数对细胞干重影响比较大。

2.5 混合氮源对红曲黄色素代谢的影响

以总红曲黄色素色价为出发目标，参考色调，来研究混合无机氮源和有机氮源对 MYM2 发酵生产黄色素的影响。

量分数都为 1%。以此为基础，以 1% 的氯化铵质量分数和 1% 质量分数的玉米浆为混合氮源混合培养发酵

MYM2 来生产黄色素。其发酵实验结果如表 1 所示。最终总黄色素色价达到  $96.51 \pm 2.189$  U/mL, 胞内色调、胞外色调和总色调都达到 3 以上。

### 3 实验结果讨论

#### 3.1 氮源种类对红曲黄色素代谢的影响

氮源对于微生物的生长和代谢是非常重要的, 无机氮源和有机氮源都是影响微生物目标产物形成和微生物菌体本身生长的关键因素。对于红曲霉突变株 MYM2 也不例外。

不同的有机氮源和无机氮源对黄色素的色调和色价影响不一样(见图 1, 图 2, 图 6, 图 7), 对色调影响大的并不一定对色价影响也大, 也并不是有利于黄色素的代谢产生, 也就是说, 色调和色价并不是成正比关系。影响色调的原因很多, 原因之一就是极端环境下, 红曲霉的色调比较高, 但不利于色素的代谢, 因为在极端环境下, 红曲霉不易生长, 而黄色素是一种次级代谢产物, 只有当微生物菌体生长到一定程度才会形成次级代谢产物。红曲霉突变株 MYM2 是一株产红曲黄色素的高产菌株, 并且, 它是先代谢产生黄色素, 然后再代谢产生红色素的, 所以在极端环境下, MYM2 发酵时色调较高。并且从图 1, 图 3, 图 6, 图 8 中看出, 用含无机氮源的培养基培养 MYM2 的发酵液色调总体上高于用含有机氮源的培养基培养 MYM2 的发酵液色调(尿素除外)。

#### 3.2 氮源质量分数对红曲黄色素代谢的影响

很多文献报道, 有利于红曲霉菌株生长代谢的无机氮源一般为硝酸盐<sup>[6]</sup>, 而本研究中发现氯化铵比硝酸钠更有利于 MYM2 的生长代谢, 并且发现, 绝大多数实验室常用无机铵盐代替硝酸钠更有利于 MYM2 的生长代谢, 这说明, 是无机铵根离子影响了 MYM2 的代谢形成红曲黄色素, 这与以前文献报道的无机铵根离子不利于黄色素代谢形成的报道不同<sup>[7]</sup>(见图 3, 图 4)。其中原因很可能就是所用菌株不同造成的。本文研究者也对诱变菌株用含有氯化铵的培养基发酵培养, 发觉氯化铵确实不利于红曲黄色素的代谢形成, 这说明本文中的红曲霉突变菌株的红曲黄色素代谢途径很可能不同于以前报道过的红曲霉菌株, 有可能是红曲红色素代谢途径中的某个关键酶受到阻抑或抑制, 或者是红曲黄色素代谢形成途径中的某个关键酶的酶活因为氯化铵的存在而得到提高, 或者根据相关文献报道<sup>[10]</sup>来推测, 氯化铵很可能是对红曲霉突变株产生胁迫作用, 使得 MYM2 菌株的细胞

形态发生变化, 而导致有利于黄色素的代谢形成。至于铵根离子是怎样影响 MYM2 代谢形成黄色素的原因还有待进一步研究。

对于红曲霉液态发酵所用的有机氮源用得比较多的一般是蛋白胨或谷氨酸钠<sup>[8,9]</sup>, 但是本研究所用的有机氮源玉米浆比较适合 MYM2 代谢形成黄色素(见图 6, 图 8)。实验结果表明 1% 的氯化铵和 1% 的玉米浆比较适合 MYM2 代谢形成黄色素。但是从图 5, 图 10 来推测, 氯化铵和玉米浆影响黄色素代谢形成的机理并不一样。氯化铵很可能是影响次级代谢产物的代谢形成过程(见图 3, 表 1), 因为氯化铵单独使用和氯化铵与玉米浆混合使用时的发酵液的色调并没有改变多少, 而玉米浆与氯化铵混合使用比玉米浆单独使用时的发酵液色调提高很多。玉米浆有利于 MYM2 菌体的生长, 生物量达到最大, 有利于次级代谢产物黄色素积累, 这一点还有待进一步研究证实。

### 参考文献

- [1] 唐秋琳, 赵海, 等. 一株产黄色素红曲霉 *Monascus* HB-5 的生物学特性研究[J]. 食品科技, 2006, (7): 47-51
- [2] 马美荣, 方慧英, 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
- [3] Yongsmith B, Chaisrisook C, Chimanage P, et al. Papers of the Symposium on *Monascus* Culture and Application. Toulouse France[J]. 1998, 115-126
- [4] Chen Yen-Lin, et al. *Monascus purpureus* mutant and its use in preparing yellow pigment. UPT.NO 6635467[P].
- [5] 中华人民共和国国家标准. 食品添加剂红米. GB. 4926-1985
- [6] 葛继志, 张颖. 红曲霉变异株 A6 产色素发酵条件研究[J]. 生物学杂志, 1999, 16(2): 29-30
- [7] Kurono, M., K. Nakanish, K. Shindo and M. Tada. Biosynthesis of monascorubrin and monascofla[J]. Chem. Pharm. Bull., 1963, (11): 359-362
- [8] 邹宇, 侯红漫, 张笑, 等. 红曲霉 0301 产色素培养条件优化及其桔霉素含量检测[J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24(3): 202-206
- [9] 贾万利. 红曲霉的液态发酵研究[J]. 山西化工, 2006, 26(3): 1-4
- [10] Chul S. Shin, Hyung J. Kim, Moon J. Kim, Jae Y. Ju. Morphological Change and Enhanced Cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*[J]. Biotechnology and bioengineering, 1998, 59(5): 576-581