

橙色红曲菌液体发酵产桔霉素特性的研究

熊勇华, 谭文辉, 赖卫华, 许 杨

(中德联合研究院 食品科学教育部重点实验室(南昌大学), 江西 南昌 330047)

摘 要: 本文测定了橙色红曲菌 AS3.4384 在酵母浸膏培养基中生长曲线以及碳源、氮源消耗量, 并探讨了接种孢子量与桔霉素产生量的关系。

关键词: 橙色红曲菌; 生长曲线; 桔霉素

Characteristics Study on Producing Citrinin in the Submerged Culture of *Monascus aurantiaaeus*

XIONG Yong-Hua, TAN Wen-Hui, LAI Wei-Hua, XU Yang

(The Key Laboratory of Food Science (Nanchang University) Ministry of Education, Sino-germany Joint Research Institute, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this paper, the growth curve and utility rate of carbon and nitrogen of *Monascus aurantiaaeus* (AS3.4384) in the submerged culture with yeast extract sucrose (YES) were determined. The relationship between the number of inoculating spores and the yields of citrinin was discussed.

Key words: *Monascus aurantiaaeus*; the growth curve; citrinin

收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 江西省自然科学基金资助(0330040)

作者简介: 熊勇华(1970-), 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 在职博士, 研究方向为食品生物技术。

- [2] 邓继尧, 陈继坤, 何文品. 对影响猕猴桃中 VC 各种因素的研究[J]. 四川农业大学学报, 1993, 4(1): 6-9.
- [3] Franco Alvisi. Kiwifruit: Poducing and marketing[J]. Acta Horticulturae, 1990, 282: 21-28.
- [4] 李忠宏, 姜道年, 陈勇斌, 等. 猕猴桃果浆贮藏期间维生素C和叶绿素的变化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(增刊): 16-17.
- [5] 成坚, 曾庆孝, 王琴. 冷冻干燥速率强化措施[J]. 食品与机械, 2000, (6): 20-22.
- [6] 张晋陆, 张俊杰. 真空冷冻干燥食品的品质控制[J]. 食品科学, 1998, 19(10): 38-40.
- [7] 梁尚勇. 食品冷冻干燥及其发展[J]. 食品工业科技, 1995, (1): 70-73.
- [8] Hammami. Determination of freeze - drying process variables for strawberries[J]. J Food Eng Oxford: Elsevier Science Ltd, 1997, 32 (2): 133-154.
- [9] Iwaniw-DC. Process optimization of freeze dried strawberries [J]. Canadian Agricultural Engineering, 32 (2): 323-328.
- [10] 生庆海, 车云波, 骆承痒. 冷冻干燥的发展及其研究内容[J]. 食品工业, 1997, (4): 42-44.
- [11] 蓝仁华, 涂伟平, 杨卓如. 胡萝卜土豆冷冻干燥的优化条件[J]. 食品科学, 1995, 16(12): 30-32.
- [12] 张凤英, 黄安全, 刘火兴. 猕猴桃果粉的研制[J]. 食品科学, 1997, 18(12): 30-32.
- [13] 彭运生. 关于提取叶绿素方法的比较研究[J]. 北京: 农业大学学报, 1992, (18)3: 247-250.
- [14] 李忠宏, 姜道年, 陈香维, 等. 猕猴桃果浆冻干过程中 VC 和叶绿素的损失规律[J]. 西北农林科技大学学报, 2003, 31(6): 1-3.
- [15] 杨中平. 试验优化设计技术[M]. 杨陵: 西北农林科技大学自编教材, 1999.
- [16] 汪萍. 机械优化设计[M]. 呼和浩特: 中国地质大学出版社, 1985.
- [17] 梁兆兰. 机械优化设计补充教材[M]. 杨陵: 西北农业大学自编教材, 1998.
- [18] 姬长英. 感官模糊综合评价中权重分配的正确制定[J]. 食品科学, 1991, (3): 9-10.
- [19] 余疾风. 在食品感官质量的模糊综合评价中如何正确的制定权重分配方案[J]. 食品科学, 1990, 11: 15-16.

中图分类号: TS204.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)08-0097-04

红曲菌在真菌界属于囊菌纲, 不整子囊菌目, 曲菌科, 是典型的腐生丝状真菌。用红曲菌生产红曲在民间已有几千年的历史, 红曲还被广泛应用于酿酒、发酵食品、食用色素、烹调食物、酿醋、肉制品腌制、腐乳酿造以及中药等方面^[1,2]。李时珍在《本草纲目》中记载, 红曲主治消食活血、健脾燥胃等。现代研究证实, 红曲菌发酵过程中产生的多种次级代谢产物具有重要的生理活性^[3,4]。然而法国学者 Blanc 于 1995 年在红曲菌发酵产物中检测到 1 种对人畜有害的真菌毒素—桔霉素(citrinin)^[5], 使红曲菌产品在世界范围内的应用受到了限制。随后几年该课题组通过同位素标记对红曲菌产毒(桔霉素)的生化代谢途径以及桔霉素与红曲色素产生关系进行了深入探讨, 认为桔霉素的产生与红曲色素代谢途径密切相关^[6]。本实验室前期研究显示, 大部分红曲菌菌株在一定的培养条件下均能产生桔霉素, 桔霉素的产生与红曲菌的培养方式及培养基的组成有显著相关性, 且同一菌株在不同条件下可能产毒或不产毒。以上结果提示红曲菌在不同条件下产毒差异的形成与外界因素诱导基因组产生差异表达有关。橙色红曲菌(*Monascus aurantiaaeus*)是我国学者李钟庆先生首先发现的一株红曲菌新种^[7], 有关其产桔霉素的研究目前报道甚少, 本文仅就该菌株在酵母浸膏液体培养基中的发酵特性以及产桔霉素的关系进行了初步探讨, 从而为在基因水平筛选产桔霉素差异表达的连锁基因奠定一定的前期工作基础。

1 材料与方法

1.1 菌株 AS3.4384 (橙色红曲霉, *Monascus aurantiaaeus*), 购自中科院微生物研究所。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 酵母浸膏 40g、蔗糖 160g、加水至 1000ml、pH 值自然、121.3℃灭菌 20min。

1.2.2 固体培养基 酵母浸膏 4g、蔗糖 16g、琼脂 2g、加水至 100ml、pH 值自然、121.3℃灭菌 20min。

1.2.3 发酵培养基 酵母浸膏 40g、蔗糖 160g、加水至 1000ml、pH 值自然、121.3℃灭菌 20min。

1.3 橙色红曲菌孢子悬液的制备

将橙色红曲菌单菌落接种至种子培养基, 置于恒温摇床 30℃, 120r/min 振荡培养 72h。待长出球状菌丝体后, 转入固体培养基, 于 28℃ 恒温培养 7d, 用适量无菌生理盐水(加入 0.1% 吐温 80)从培养基表面轻轻洗下孢子(镜检应不含菌丝和子囊体), 血球计数板测定孢子悬液的浓度。

1.4 液体发酵培养

将 3.02×10^6 个孢子悬液分别接种至多瓶 100ml 发酵培养液中, 于 28℃ 静置培养, 每 24h 取样一次, 镜检观察红曲菌形态学变化, 采用氨基氮法^[8]测定培养基氮源消耗量, 费林试剂定糖法^[9]测定碳源消耗量。

1.5 生物生成量、桔霉素含量与接种量的关系

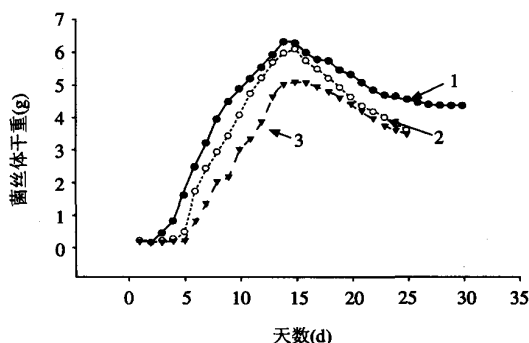
将 3.02×10^6 、 3.02×10^5 、 3.02×10^4 浓度的孢子悬液 1ml, 分别接种至 100ml 发酵培养液静置培养, 用菌丝干重法测定不同时间培养红曲菌的菌丝体干重, HPLC 法检测发酵液中桔霉素含量。

1.6 桔霉素 HPLC 法检测

参照文献^[10,11]方法进行, 采用 Waters 荧光检测器, 激发光滤光片波长 313nm, 发色光滤光片波长 495nm, 色谱柱为 C₁₈ 反相柱(4.6mm × 250mm), 流动相为甲醇:乙腈:水 = 5:2:3, 磷酸调 pH 为 2.5, 流速 1.0ml/min。样品处理按如下方法进行, 发酵液中加入等体积甲醇, 充分振荡混匀抽提 10min, 4℃ 静置 2h, 12000r/min, 离心 15min, 取上清进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 橙色红曲菌菌丝体生成量与接种量的关系



1: 孢子接种量 3.02×10^6 ; 2: 孢子接种量 3.02×10^5 ;
3: 孢子接种量 3.02×10^4

图1 橙色红曲菌生长曲线图

接种不同浓度的孢子悬液, 橙色红曲菌生长曲线见图1, 从图1可知, 在不同接种量时, 菌丝体增重趋势基本相似, 同时期菌丝体干重与初期接种量呈正相关, 培养后的第3d, 培养液上层覆盖了一层白色菌膜, 随着时间延长, 菌膜逐渐增厚并缓慢变红, 16d后, 靠近发酵液的菌膜粘稠度逐渐增大, 菌丝体取样较为困难, 从生长曲线分析, 16d后菌体生长进入衰亡期, 可能部分菌丝体已发生自溶现象, 导致发酵液粘稠度增大。

2.2 橙色红曲菌的发酵特性以及形态学变化

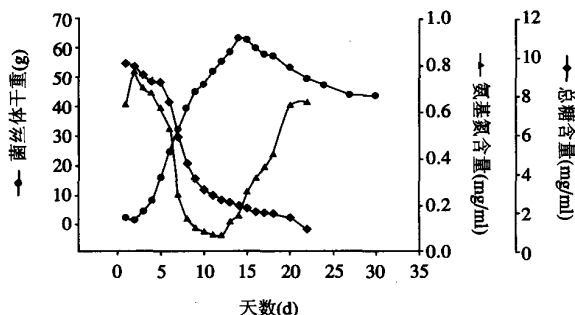


图2 橙色红曲菌的生长曲线与氮源、碳源消耗量的关系

为了更好地描述橙色红曲菌在液体发酵过程中氮源、碳源以及形态学变化与生长曲线的关系,本研究测定了孢子接种量为 3.02×10^6 时,不同发酵时期发酵液中总糖,氨基氮含量变化,具体结果见图2。从图中可知,发酵初期发酵液中氨基氮含量逐渐下降,但从13d开始,氨基氮又呈上升趋势,分析可能在发酵中后期,营养下降,橙色红曲菌为了适应生存的需要,分泌的蛋白酶增多,同时亦可能与发酵后期菌体自溶有关。通过镜检分析不同时期红曲菌形态学变化发现,在接种后第2d,即观察到孢子萌发并形成菌丝体,第4d,一小部分菌丝体已经长出横隔;第7d,部分菌丝体已经变成淡红色,随着培养时间的延长,菌丝体红色逐渐加深;第8d,观察到有孢子存在,并且孢子数随着培养时间的延长而增加;第16d,部分菌丝体内产生小的空泡,菌体衰亡后期菌丝体空泡现象越来越明显,而且菌丝体空泡呈增大趋势,第27d,菌丝体中出现大量的子囊体,部分子囊体呈现红色,且菌丝体形态比初期细长了许多。

2.3 桔霉素含量与接种量的关系

采用三种接种量测定不同生长时期发酵液中桔霉素含量的变化,结果见图3。橙色红曲菌在发酵过程中桔霉素的生成均出现了一次高峰,高峰期出现时间早晚与

接种量有明显的关系,接种量大的产桔霉素时间早,第5d发酵液中即可检出桔霉素含量为 $12.34 \mu\text{g/ml}$,接种孢子量为 3.02×10^5 时,第7d发酵液中检出有桔霉素,含量为 $29.73 \mu\text{g/ml}$,而接种孢子量为 3.02×10^4 时,第9d发酵液中方能检出桔霉素,含量为 $25.40 \mu\text{g/ml}$ 。同时从图中可看出,接种孢子量大,初期产桔霉素含量远较接种孢子量少的高,并且桔霉素达到高峰期时间明显提前,接种量为 3.02×10^5 ,发酵至12d桔霉素含量达到高峰,为 $428.68 \mu\text{g/ml}$,接种孢子量为 3.02×10^5 ,发酵至13d桔霉素含量达到高峰,为 $966.71 \mu\text{g/ml}$,接种孢子量为 3.02×10^4 ,发酵至15d桔霉素含量达到高峰,为 $788.51 \mu\text{g/ml}$ 。从以上数据显示,发酵液中桔霉素产量与接种量不呈正相关,但在接种孢子量较大时(3.02×10^6),在菌体进入衰亡后期桔霉素含量又逐渐呈现上升趋势,但由于发酵后期(22~27d)菌丝体自溶比较明显,因此数据未继续采集,在培养27d后,桔霉素含量是否仍能保持上升趋势并再次出现高峰,则很难预测。

3 结论

3.1 橙色红曲霉在液体静置培养的条件下,其生长曲线符合多细胞生物的生长曲线规律,出现了明显的快速生长期、稳定期以及衰亡期三阶段,菌体进入稳定期后迅速进入衰亡期。接种量的大小对菌体进入快速生长期,稳定期以及衰亡期的时间早晚并无显著的关系,但同时期菌丝体干重与初期接种量呈正相关。

3.2 橙色红曲菌在整个发酵过程中总糖含量呈现稳定的下降趋势,氨基氮含量在发酵初期下降较为迅速,进入发酵中后期由于菌体自溶等原因,其氨基氮含量又呈现上升趋势。当接种量为 3.02×10^6 ,发酵进入第8d显微镜可观察到菌丝体开始产生红曲色素,红曲色素生成时间较检测到桔霉素的时间晚3d,镜检第16d的菌丝体,在菌丝体中观察到了空泡的产生,表明部分菌体进入衰亡期,其菌丝体的形态特征与生长曲线特征基本吻合。

3.3 橙色红曲菌在酵母浸膏液体培养基上会产生桔霉素,发酵液中桔霉素检出时间以及高峰期的出现与接种量呈正相关,但产桔霉素含量与接种量并无显著相关性,实验结果显示在接种量为 3.02×10^5 时,橙色红曲菌产桔霉素可达到较高水平。

参考文献:

- [1] 李昭蓉. 漫谈红曲菌[J]. 食品工业(台湾), 1997, 29(2): 33.
- [2] 刘松青. 红曲大量培养技术的研究[J]. 食品工业, 1995, (3): 19-20.
- [3] 赖卫华, 许杨. 国内外红曲霉研究的最新动态[J]. 食品工业科技, 2001, (4)(增刊): 107-109.

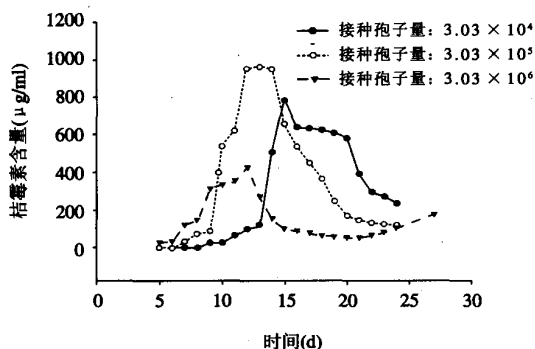


图3 不同发酵时期桔霉素含量与接种孢子量的关系

黑木耳粗多糖(CAAP)的分离提取工艺 及其理化性能研究

樊黎生¹, 张声华¹, 夏服宝²

(1.华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070;

2.湖北工业大学生物工程学院, 湖北 武汉 430064)

摘 要: 以黑木耳(*Auricularia auricula*)的子实体粉粒为原料, 研究了其中黑木耳粗多糖(CAAP)的分离提取方法及其产品的溶解性能等特性。以蒸馏水为提取剂, 当分离提取的工艺条件为: 20~40 目的子实体粉粒的料水比为 1:15, 乙醇与浓缩后物料的体积比为 4:1, 提取液的水温控制为 75℃, 每次浸提时间 2h, 提取次数为 5 次时, 产品的得率较高; 采用冷冻干燥工艺制得的 CAAP 产品的性能优于真空干燥的产品; 胰蛋白酶法与 *Sevage* 法结合使用脱除蛋白质时, CAAP 的纯化效果优于单独使用 *Sevage* 法。

关键词: 黑木耳; 多糖; 提取; 性质

Studies on the Extraction Conditions and Properties of Polysaccharides of *Auricularia auricula*

FAN Li-sheng¹, ZHANG Sheng-hua¹, XIA Fu-bao²

(1.Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.College of Biology Engineering, Hubei Industry University, Wuhan 430064, China)

Abstract: The optimal processing conditions for the extraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* fruit-body were studied. Using distilled water as extraction agent was better than dilute alkali or acid. The results showed that: the rate of fruit-body powder to water was 1:15, the optimal rate of alcohol to concentrate liquid was 4:1, the extracting temperature was controlled at 75℃ with 2h for each time and total times were 5. The quality of freeze drying CAAP was better than that of vacuum drying. Combining enzyme deprotein method with *Sevage* method was found better than *Sevage* deprotein method.

收稿日期: 2003-09-16

作者简介: 樊黎生(1966-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为功能食品活性成分。

-
- [4] 毛宁, 陈松生. 红曲霉的有效生理活性物质及其应用[J]. 中国调味品, 1995, (4): 8-11.
 - [5] Blace P J, Loret M O, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(3): 291.
 - [6] Hassan Hajjaj, Alain Klæbe, Marieo Loref, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 311-314.
 - [7] 李钟庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学[M]. 中国轻工业出版社, 2003.
 - [8] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 轻工业出版社, 1989. 6-7, 31-33.
 - [9] Vail R B., Homann M J. Rapid and sensitive detection of citrinin production during fungal fermentation using high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1990, 535: 317-323.
 - [10] Franco C M, Fente C A, Vazquez B, et al. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography fluorescence method for the determination of citrinin-application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts[J]. *Journal of Chromatography*, 1996, 723: 69-75.