

微波辐照诱变选育高产橙色素红曲霉菌

徐 伟, 范志诚, 刘艳华

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要: 采用带水循环冷却装置的微波设备, 对紫红曲(*Monascus purpureus*)进行诱变处理, 研究微波辐照功率和辐照时间对红曲霉菌的致死规律和突变规律, 获得微波功率和时间的最佳辐照剂量, 结果表明: 在微波功率 500W、辐照时间 80s 时, 得到突变株 W5S8, 液态发酵产橙色素色价为 16.38U/mL, 较原始菌株橙色素色价 10.26U/mL 提高了 59.62%, 连续遗传 5 代, 产色素性状稳定。

关键词: 红曲霉菌; 微波辐照; 橙色素; 诱变

Mutation Breeding of *Monascus purpureus* with High Productivity of Orange Pigments by Microwave Irradiation

XU Wei, FAN Zhi-cheng, LIU Yan-hua

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Microwave irradiation with water-cooling device was used for the mutagenesis of *Monascus purpureus*. The optimal microwave power, irradiation duration and dosage for the mutagenesis of *Monascus purpureus* were explored by evaluating the lethal and mutation regularity of *Monascus purpureus*. Results indicated that the optimal mutation conditions were microwave power of 500 W and irradiation duration of 80 s. Under the optimal microwave irradiation conditions, a mutated strain W5S8 with the highest productivity of orange pigments was achieved and the color value of orange pigments from strain W5S8 was 16.38 U/mL, which was increased by 59.62% compared with the parent strain. Its productivity for orange pigments remained stable after subculture for 5 generations or storage.

Key words: *Monascus purpureus*; microwave irradiation; orange pigment; mutation

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0224-04

食品添加剂正朝着天然、安全、高效方向发展, 国内外对红曲霉的研究大多集中在发酵生产天然红色素、降胆固醇活性物质等方面^[1-3]。红曲的防腐作用早有报道^[4-5], 近年来发现, 红曲发酵产物中的重要抑菌成分为红曲橙色素, 可抑制革兰氏阳性菌以及大肠杆菌, 橙色素也有增强免疫力、抗疲劳和降血脂等作用^[6-8]。红曲橙色素作为一种具有生理功效的天然色素和抑菌物质, 在需要着色和防腐的产品中都可以使用, 因而, 高产橙色素红曲霉菌的育种工作具有重要的意义。

优良的工业菌种是发酵工业的核心, 诱变育种是目前大多数工业微生物育种重要且有效的技术^[9]。微波辐照诱变微生物菌种, 具有清洁、高效、设备简单等优点, 克服了紫外诱变易产生光修复现象的缺点^[10-11]。本研究以一株从腐乳中分离的紫红曲(*Monascus purpureus*)为出发菌株, 微波辐照获得高产橙色素的红曲霉突变菌

株, 为红曲防腐剂的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

紫红曲(*Monascus purpureus*)从腐乳中分离, 经中科院微生物研究所鉴定为紫红曲。

1.2 培养基

固体培养基(g/L): 葡萄糖 20、麦芽糖 5、蛋白胨 10、酵母膏 5、琼脂 20g, pH 值自然; 液体发酵培养基(g/L): 大米粉 60、黄豆粉 5、葡萄糖 3、NaNO₃ 4、酵母粉 5、ZnSO₄ 0.2、MgSO₄ 1、K₂HPO₃ 5。

1.3 微波辐照诱变装置

目前进行微波育种的研究人员一般采用普通的家用微波炉设备。在高功率微波辐照条件下, 由于微波产生的热效应, 会使菌种在短时间内达到很高的热致死

收稿日期: 2010-09-20

基金项目: 黑龙江省科技厅重大科技攻关项目(GA07B401-3)

作者简介: 徐伟(1963—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: xuwei20070808@yahoo.com.cn

率,微波导致的基因突变性状难以充分显现,为防止诱变过程中菌体温度过高致使孢子大量死亡,本实验采用自行设计的水循环冷却装置^[12]保持微波辐照过程中菌悬液温度的低温环境,抵消一部分热效应,实现对出发菌株的低温辐照。

1.4 方法

1.4.1 孢子悬液的制备

菌种斜面在 30℃ 培养 7d,用无菌生理盐水将孢子洗涤下来,倒入装有已灭菌玻璃珠的三角瓶中,振荡,将孢子打散,滤去菌丝体,制得孢子悬浮液,并调整孢子浓度至 10^5 个/mL。

1.4.2 微波辐照诱变方法

将已制备的浓度为 10^5 个/mL 孢子悬液 10mL 移入无菌试管内,并将该试管置于带冷却循环水的微波装置中,在时间为 90s 时,分别以 100~800W(间隔 100W)功率进行辐照处理,辐照功率为 500W 时,分别以 10~150s(间隔 10s)时间进行辐照处理。对辐照后孢子悬液进行倍比稀释,涂布于平板固体培养基上,于 30℃ 恒温培养 3d,记录总菌落数和存活菌落数,计算致死率和突变率,确定最佳诱变条件。

1.4.3 菌株筛选

初筛:辐照后孢子悬液于 30℃ 恒温平板培养,7~10d 后观察菌落形态差异,选取形态和颜色变化较大的菌落,用无菌水洗涤孢子,分别制得孢子悬液,进行复筛备用。

复筛:分别将初筛到的红曲霉菌孢子悬液吸取 10mL,接种于 150mL 液态发酵培养基中,在培养温度 30℃、摇床转速 200r/min 条件下培养 14d,测定红曲霉菌橙色素色价,挑选橙色素产量高的菌株进行培养。

1.4.4 突变株的遗传稳定性实验

将复筛得到的橙色素高产突变株连续传代 5 次,分别于培养温度 30℃,摇床转速 180r/min 条件下在液体发酵培养基中培养 14d,并测各代菌株所产橙色素色价。

1.4.5 橙色素色价测定^[13]

吸取发酵液 1mL 加入装有 75% 乙醇溶液 9mL 的试管中,加塞、摇匀,静置 20min 后,用快速滤纸过滤得清液,再适当稀释,用 75% 乙醇溶液作空白对照,用紫外分光光度计在橙色素最大吸收波长 465nm 处测定 OD 值,将 OD 值乘以稀释倍数,即为橙色素色价。橙色素色价计算公式如下:

$$\text{橙色素色价}/(\text{U/mL}) = \text{OD}_{465\text{nm}} \times \text{稀释倍数}$$

2 结果与分析

2.1 微波辐照功率和辐照时间对红曲霉菌致死率的影响

考察辐照时间 90s 时,微波功率不同辐照剂量对红曲霉菌的致死规律,同时进行微波功率为 500W,不同辐照时间的红曲霉菌致死率实验。对辐照后菌悬液进行梯度稀释,选取稀释度 10^{-3} 、 10^{-4} 菌悬液涂布平板上,各稀释度做 3 个平行样,在温度 30℃ 培养 3d,进行菌落计数,计算致死率,结果如图 1 所示。

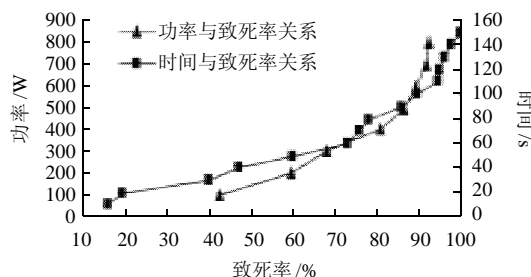


图1 微波功率和辐照时间与致死率的关系

Fig.1 Correlation of microwave power and irradiation duration with lethal rate of *Monascus purpureus*

由图 1 可知,微波辐照时间不变,致死率随微波辐照功率提高而增大;在微波功率不变时,致死率随着微波辐照时间延长而增大。据资料显示^[14],红曲霉菌在致死率为 60%~90% 时,菌株突变率大,本实验得到微波辐照 90s,功率 300~600W 时,致死率恰好在 60%~90% 之间;微波功率为 500W,辐照时间 60~90s 时,致死率也在 60%~90% 之间,因此,选择辐照功率范围为 300~600W 时,辐照时间在 60~90s 时,进行橙色素突变菌株的研究。

2.2 微波辐照剂量对红曲霉菌橙色素产量的影响

2.2.1 微波辐照功率对红曲霉菌橙色素产量的影响

时间为 90s 时,对微波功率 300、400、500、600W 的 4 个剂量组辐照后的孢子悬液进行平板培养,分别挑取 15 株菌进行摇瓶发酵实验,测定橙色素色价,结果如图 2~5 所示,其中 0 号菌株为原始菌株。

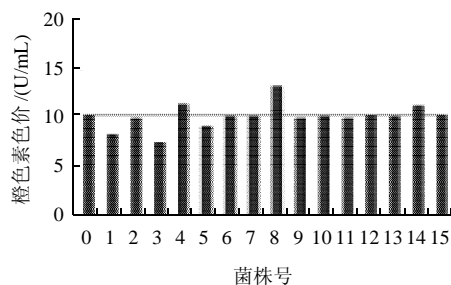


图2 300W 微波辐照 90s 菌株产橙色素色价

Fig.2 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 300 W and irradiation duration of 90 s

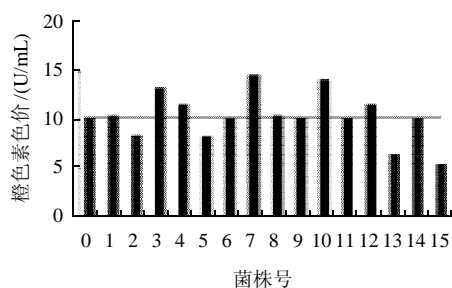


图3 400W微波辐照90s菌株产橙色素色价

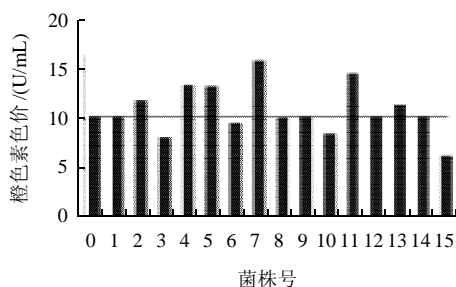
Fig.3 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 400 W and irradiation duration of 90 s

图4 500W微波辐照90s菌株产橙色素色价

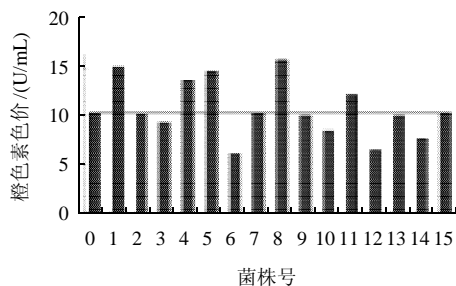
Fig.4 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 500 W and irradiation duration of 90 s

图5 600W微波辐照90s菌株产橙色素色价

Fig.5 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 600 W and irradiation duration of 90 s

本实验考虑检测误差,限定产橙色素色价超过原始菌株5%以上为正突变、±5%以内为未突变、-5%以下为负突变,与原始菌株比较,计算各段内菌株的百分数,结果如表1所示。

由表1可知,在辐照时间90s条件下,正突变率随微波辐照功率增大而先增大后减小,在功率为500W时,正突变率最高为47%,得到橙色素色价为16.05U/mL的突变株W5S9,该菌株比未照射组提高了56.43%。300W时得突变株W3S9,产橙色素色价为13.29U/mL,提高了29.53%;400W时得突变株W4S9,产橙色素色价为14.63U/mL,提高了42.59%;600W时得突变株

W6S9,产橙色素色价为15.81U/mL,提高了54.09%。

表1 微波时间90s时不同辐照功率的红曲霉菌株突变比例
Table 1 Mutation rate of *Monascus purpureus* under different microwave powers and irradiation duration of 90 s

微波功率/W	正突变	未突变	负突变
300	20	53	27
400	33	40	27
500	47	33	20
600	40	33	27

注:功率500W辐照90s时得到的突变菌株编号为突变株W5S9。其他突变菌株按此形式表示。

2.2.2 微波辐照时间对红曲霉菌橙色素产量的影响

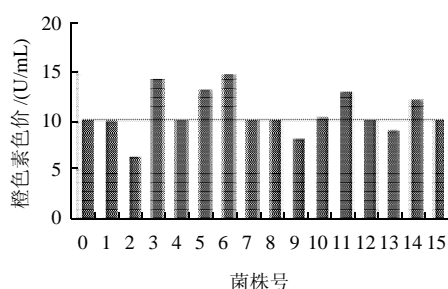


图6 500W微波辐照60s菌株产橙色素色价

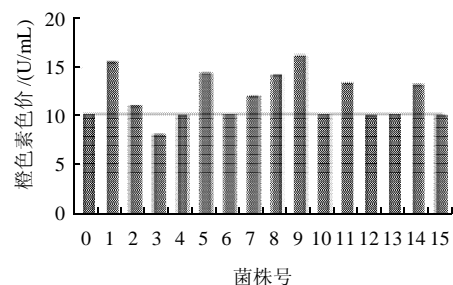
Fig.6 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 500 W and irradiation duration of 60 s

图7 500W微波辐照70s菌株产橙色素色价

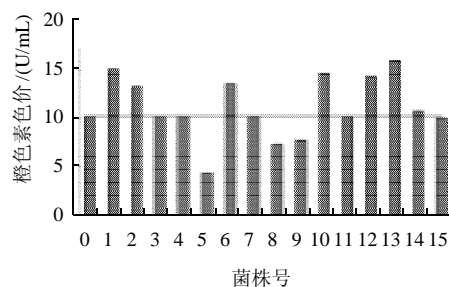
Fig.7 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 500 W and irradiation duration of 70 s

图8 500W微波辐照80s菌株产橙色素色价

Fig.8 Color value of orange pigments produced by *Monascus purpureus* under the microwave power of 500 W and irradiation duration of 80 s

功率为 500W 时, 对辐照时间 60、70、80、90s 的 4 个剂量组辐照后的孢子悬液进行平板培养, 分别挑取 15 株菌, 进行摇瓶发酵实验, 测定橙色素色价, 结果如图 4、图 6~8 及表 2 所示, 其中 0 号菌株为原始菌株

表 2 微波功率 500W 不同辐照时间时红曲霉突变菌株比例

Table 2 Mutation rate of *Monascus purpureus* under different microwave irradiation duration and microwave power of 500 W %

辐照时间 /s	正突变	未突变	负突变
60	33	47	20
70	40	40	20
80	53	33	14
90	47	33	20

由表 2 可知, 正突变率随微波辐照时延长间而先增大后减小, 其中微波辐照 500W, 辐照时间为 80s 时正突变率最高为 53%, 可得突变株 W5S8, 产橙色素色价为 16.38U/mL, 比未照射组提高了 59.62%。功率 500W 辐照时间 60s 时, 得突变株 W5S6, 产橙色素色价为 15.02U/mL, 比未照射组提高了 46.39%; 辐照时间 70s 时, 得突变株 W5S7, 产橙色素色价为 15.93U/mL, 比未照射组提高了 55.26%。

2.3 微波辐照突变株的稳定性

通过对原始菌株与辐照后菌株的菌落形态观察对比发现, 突变菌株的菌落形态和颜色、孢子大小、菌丝粗细均有不同程度变化。突变株 W5S8 较原始株菌落直径变大, 菌落颜色加深, 气生菌丝也更加浓密, 将红曲霉突变株 W5S8 接种于斜面培养基, 连续传代 5 次, 进行液态发酵, 测定橙色素色价。其橙色素色价分别为 16.38、16.34、16.42、16.39、16.41U/mL, 说明产橙色素遗传稳定性较好。

3 讨 论

采用水循环冷却装置的微波设备, 克服了在高功率辐照时, 短时间内热致死率高、基因突变率低的问题。通过考察微波辐照功率和时间对红曲霉菌株突变率的影响, 可知, 正突变率随微波辐照剂量增大而增大, 但超过一定剂量, 正突变率下降。微波是一种电磁波, 能引起水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子转动, 尤其是水分子在 2450MHz 微波作用下, 能

在 1s 内 180°来回转动 24.5×10^8 次, 从而, 引起分子间强烈的摩擦, 使得菌体细胞内 DNA 分子氢键和碱基堆集化学力受损, 最终引起 DNA 分子结构发生变化, 导致遗传变异。

微生物在未接受到足够损伤造成突变的照射之前, 由于蛋白质、酶的活性都会不断地变化, 在某一范围内, 恰好使细胞内合成蛋白质或酶的活性达到最大, 此时, 就大大地提高了孢子分裂增殖速度。当然强度过大, 也会导致蛋白质变性、酶失活、孢子死亡、致死率增大^[15]。在微波辐照功率 500W、辐照时间 80s 条件下, 红曲霉产橙色素色价正突变率高。因此, 微波诱变应用于红曲霉菌株选育简便、有效, 为红曲橙色素在食品防腐抑菌中应用提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 吴正奇. 高安全性生物型防腐剂的研究进展[J]. 中国食品与营养, 2006(10): 22-24.
- [2] 张庆庆, 危勤涛, 汤斌, 等. 红曲霉发酵生产 MonacolinK 的研究进展[J]. 生物学杂志, 2008, 25(1): 51-54.
- [3] CHIU S W, POON Y K. Submerged production of *Monascus* pigments [J]. Mycologia, 1993, 85: 214-218.
- [4] 雷阳. 浅述可用于食品防腐剂的微生物物质[J]. 贵州畜牧兽医, 2002, 26(4): 16-17.
- [5] CHI D P, HYUCK J J, HANG W L. Antioxidant activity of *Monascus* pigment of *Monascus purpureus* P-57 mutant[J]. Korean Microbio, 2005, 41(2): 135-139.
- [6] 涂志英, 邵伟. 国内外红曲的应用现状及发展趋势[J]. 广州食品工业科技, 2008(7): 7-9.
- [7] MARTINKOVA L, JUZLOVA P, VESELY D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1995, 79: 609-616.
- [8] 宫慧梅, 阿布力米提·克里木, 赵树欣. 红曲安全性研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2008, 18(1): 60-62.
- [9] 雷肇祖, 钱志良, 章健. 工业菌种改良述评[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 39-51.
- [10] 贾红华, 周华, 韦萍. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物, 2003, 33(2): 46-50.
- [11] 李永泉, 翁醒华, 贺筱蓉. 微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌[J]. 微生物学报, 1999, 39(2): 181-183.
- [12] 王鹏, 徐伟, 张兴. 功率连续可调循环冷却式微波辐照育种装置: 中国, ZL 2007 1 0072381.4[P]. 2007-12-05.
- [13] 张慧娟. 红曲橙色素研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [14] 杜连祥, 陆福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 354.
- [15] 方春玉, 周健, 邓静. 高产红曲色素的紫红红曲霉诱变育种技术研究[J]. 中国酿造, 2008, 31(12): 19-31.