

氮源对红曲霉菌株 HNLI 产色素的影响

李小龙, 张凤琴, 刘 飞, 何农跃

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室, 湖南 株洲 412008)

摘要: 对诱变的红曲霉菌株 HNLI 产色素进行培养基氮源优化, 研究了几种常见的有机氮源和无机氮源对 HNLI 产色素的影响。结果表明, 不同氮源对 HNLI 产色素影响有较大的差异, 其中, 有机氮源以质量分数为 5% 的蛋白胨, 无机氮源以质量分数为 5% 的硝酸钠的发酵液较有利于 HNLI 产色素, 该条件下总色价分别达到 80.84 μmL 和 57.37 μmL , 生物量分别为 31.9 g/L 和 14.7 g/L。无机氮源中氯化氨有利于 HNLI 产黄色素, 较高浓度的谷氨酸钠则不利于 HNLI 产色素。本试验还表明, 上述条件下红曲霉菌株 HNLI 的色价与色调并不呈正相比关系, 不同氮源发酵产色素色价差异明显, 而色调差异不明显。

关键词: 红曲霉菌株 HNLI; 氮源; 色素; 色价; 色调

中图分类号: Q936; TQ925^{+.7}

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2009)05-0022-04

Effects of Nitrogen Sources on *Monascus* Pigment Production by *Mounoculus* HNLI

Li Xiaolong, Zhang Fengqin, Liu Fei, He Nongyue

(Hunan Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology,
Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412008, China)

Abstract: The production of pigments by mutagenic *Monascus* HNLI was optimized with nitrogen culture mediums and the effects of various organic and inorganic nitrogen culture mediums were studied. Results indicated that differences among the production of azaphilone pigments, under various conditions, were significant. The optimal organic nitrogen sources and inorganic nitrogen sources for the production of azaphilone pigment by *Monascus* HNLI were 5% peptone and 5% NaNO_3 . Their azaphilone pigment values reached to 80.84 μmL and 57.37 μmL . Meanwhile, biomasses reached 31.9 g/L and 14.7 g/L, respectively. NH_4Cl , an inorganic nitrogen source, was more suitable to the production of red pigment than of orange pigment. However, high concentration of monosodium glutamate was unsuitable to the production of azaphilone pigment. In addition, the results also revealed that color value produced by *Monascus* HNLI was not in direct proportion with color hue. The difference of color values under conditions of liquid fermentation with different nitrogen sources was significant, while the difference of color hues was not significant.

Keywords: *Monascus* HNLI; nitrogen sources; pigment; color value; color hue

食用色素是食品工业、制药工业和日化工业不可缺少的一类添加剂, 按其来源可分为天然色素和合成色素^[1]。自发现 Hzorubin 和 Tartmzin 致敏以来, 合成色素的应用已大大减少, 而天然色素引起了世界范围内研究者的广泛注意^[2]。随着毒理学研究的深入和分析

技术的不断发展, 人们对绿色产品和天然产品追求的热潮越演越烈, 使得食用天然色素的研制显得尤为重要。因此, 开发和利用无毒或基本无毒的天然色素日益受到人们的重视。红曲色素是目前世界上唯一利用微生物发酵所得的天然色素, 在我国已有 1 000 多年的

收稿日期: 2009-08-17

基金项目: 湖南省教育厅科研基金资助项目(08C277), 湖南省科技计划基金资助项目(2008TP4022-3)

作者简介: 李小龙(1977-), 男, 湖南郴州人, 湖南工业大学讲师, 博士研究生, 主要从事生物色素方面的研究,

E-mail: lixiaolong100@tom.com

应用历史, 主要为固态发酵生产, 其原料多以大米或蔗糖、葡萄糖、淀粉、大豆蛋白粉等为主, 这导致粮食消耗量大或生产的综合成本较高。自 20 世纪 90 年代以来, 国内外在红曲色素的液态发酵生产方面做了大量工作^[3-8], 其中以培养液中营养成分对其产色素影响的研究较深入。如何寻求低成本的合适培养基是液态发酵生产色素的研究方向之一。本文就不同氮源对红曲色素的影响进行了试验, 为如何有效利用廉价的氮源资源打下基础, 也为红曲霉菌液态发酵生产高价低成本天然色素的研究提供科学依据。

1 试验材料与方法

1.1 菌种

红曲霉菌株 HNLI (*Monascus kaoliang mutant*) 由绿色包装与生物纳米技术应用湖南省重点实验室筛选。

1.2 试验设备

电子天平: 湘仪天平仪器设备有限公司; 温控摇床: 中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司; 离心机: 湖南凯达科学仪器有限公司; 双光束紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限公司。

1.3 种子培养和发酵方法

种子培养和发酵时均在 32℃ 条件下进行, 培养 2~6 d; 种子液于 180 r/min 转速下培养 2 d; 摇瓶发酵时, 将 100 mL 培养基装入 250 mL 三角瓶中, 接种体积分数为 5% 的种子液, 于 180 r/min 转速下培养 7~8 d, 所有发酵实验均为 3 个平行, 取计算平均值。

1.4 分析方法

生物量的测定 取 10 mL 发酵液, 于 3 000 r/min 条件下离心 20 min, 去上清液; 沉淀用蒸馏水洗涤, 再离心 (3 000 r/min, 20 min), 去上清液, 重复 3 次; 将所得的沉淀于 80℃ 烘箱中烘至恒重, 即得生物量。

胞内色价的检测 取 10 mL 发酵液, 于 3 000 r/min 条件下离心 20 min, 去上清液。所得沉淀用体积分数为 70% 的乙醇抽提 1 h, 然后离心 (3 000 r/min, 20 min), 上清液过滤并稀释适当倍数, 用双光束紫外可见分光光度计在 410 nm 和 510 nm 处, 分别测定其 OD 值, 并乘以稀释倍数, 即分别得胞内黄色素色价和胞内红色素色价。

胞外色价测定 取一定体积的发酵液于 3 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液, 将上清液过滤并且稀释适当倍数, 用双光束紫外可见分光光度计测定上述 2 波长处的 OD 值, 并分别乘以稀释倍数, 所得值即为胞外黄色素色价和胞外红色素色价。各色价与色调的计算式如下:

总黄色素色价 = 胞内黄色素色价 + 胞外黄色素色价;

总红色素色价 = 胞内红色素色价 + 胞外红色素色价;

总色价 = 黄色素色价 + 红色素色价;

色调 = 总黄色素色价 / 总红色素色价。

2 试验结果与讨论

2.1 不同氮源对红曲霉菌 HNLI 生长的影响

通过肉眼观察红曲霉菌发酵液的颜色变化来判断红曲霉菌对不同氮源的利用情况, 本试验中红曲霉菌 HNLI 对氮源的利用情况见表 1。从表 1 中可看出, 蛋白胨、谷氨酸钠、 NH_4Cl 、 NaNO_3 有利于红曲色素的合成, 其颜色改变明显; 精氨酸、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 NaNO_2 则不利于红曲色素的合成, 其颜色未改变。其中谷氨酸钠的发酵液颜色变化最明显, 1 周内能从无色变成深红色。这与邹宇等^[5]研究红曲产色素结论一致, 即有机氮源中蛋白胨和谷氨酸钠有助于红曲霉菌色素的合成。无机氮源中, 一般硝酸盐可被红曲霉菌利用, 而铵盐一般不利于红曲霉菌生长^[6], 但本试验中 NH_4Cl 有利于红曲霉菌产黄色素, 这与周波^[7]等的报道一致。此外, 亚硝酸盐作为氮源能否被红曲霉菌所利用至今未见报道, 但在本试验中红曲霉菌 HNLI 不能利用 NaNO_2 , 这可能是由于亚硝酸根的存在具有一定的毒性, 使红曲霉菌的生长受到限制。

表 1 不同氮源对红曲霉菌 HNLI 生长的影响

Table 1 Effects of nitrogen sources on the growth *Monascus HNLI*

N 源	放置时间 /d		生长状况
	1~7	7~10	
蛋白胨	不变色	浅红	+
谷氨酸钠	浅红	深红	+
精氨酸	不变色	不变色	-
NH_4Cl	不变色	桔黄	+
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	不变色	不变色	-
NaNO_3	不变色	浅红	+
NaNO_2	不变色	不变色	-

注: “+”表示生长良好; “-”表示无菌体生长

2.2 不同氮源对红曲霉菌 HNLI 的生物量的影响

红曲霉菌发酵生物量的多少直接影响红曲霉菌胞内外产物的产量, 因此, 生物量是红曲霉菌胞内外产物生产所必须考虑的指标之一。本试验中, 不同氮源下红曲霉菌 HNLI 发酵生物量具体见图 1。由图 1 可知, 以蛋白胨为氮源的红曲霉菌 HNLI 生物量最大, 为 31.9 g/L; 其次为谷氨酸钠, 为 23.2 g/L; 再次是氯化氨, 为 8.2 g/L; 而以精氨酸、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 和 NaNO_2 为氮源的, 无菌体生长。红曲霉菌 HNLI 发酵的生物量在有机氮源培养的条件下相比无机氮源培养条件下要高得多, 这说明红曲霉菌 HNLI 利用有机氮源的能力比无机氮源的能力强, 因此在氮源选择上, 应优先选择有机氮源; 在无机氮源的选择方面应首选以硝酸根形式存在的盐类。

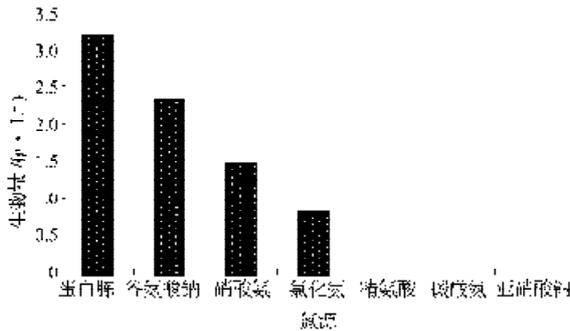


图1 氮源对红曲霉菌 HNLI 发酵生物量的影响

Fig. 1 Effects of nitrogen sources on biomass of *Monascus*

2.3 不同氮源对红曲霉菌 HNLI 产黄色素和红色素的影响

不同氮源对红曲霉菌 HNLI 产黄色素和红色素的影响分别见图 2、3。

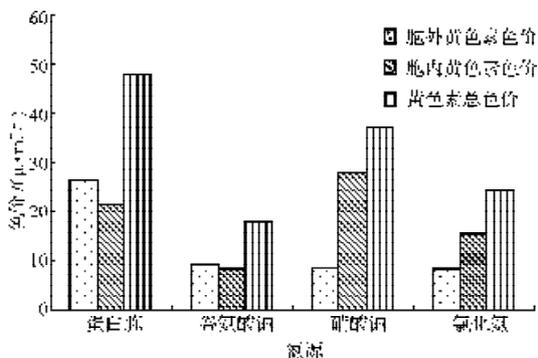


图2 氮源对红曲霉菌 HNLI 黄色素色价的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen sources on *Monascus* yellow pigment value

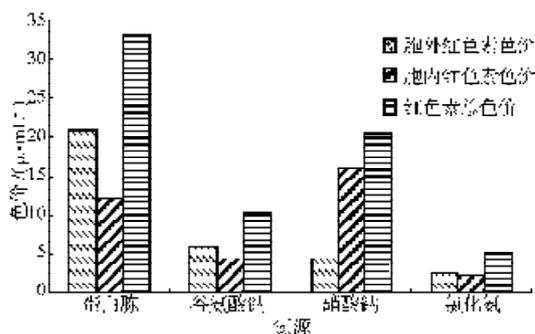


图3 氮源对红曲红色素色价的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on *Monascus* red pigment value

由图 2 可知, HNLI 菌胞外产黄色素色价的高低依次为蛋白胨>谷氨酸钠>硝酸钠>氯化氨;而胞内产黄色素色价的高低却为硝酸钠>蛋白胨>氯化氨>谷氨酸钠;黄色素总色价为蛋白胨>硝酸钠>氯化氨>谷氨酸钠。由图 3 可知,不同氮源对红曲霉菌 HNLI 胞外产红色素的影响与其胞外产黄色的影响相似,以蛋白胨的发酵液中最高,氯化氨的发酵液中最低;胞内产红色素与胞外产红色素的的变化相似,色素总色价的高低

为蛋白胨>硝酸钠>谷氨酸钠>氯化氨。

结合图 2、3 可知,红曲霉菌 HNLI 在有机氮源中发酵所产黄色素色价和红色素色价均以质量分数为 5% 的蛋白胨最高,分别为 47.7 μ/mL 和 33.14 μ/mL;无机氮源中以质量分数为 5% 的硝酸钠发酵所产黄、红色素色价最高,分别为 36.86 μ/mL 和 20.51 μ/mL;这一结论与王伟平等人的报道相一致^[9]。对于红曲霉菌 HNLI 总体而言,以质量分数为 5% 谷氨酸钠为氮源则不利于 HNLI 发酵产黄色素,而以质量分数为 5% 的氯化氨为氮源的发酵条件不利于 HNLI 产红色素。据此结论,可利用氯化氨作发酵培养基中的氮源来生产红曲霉菌的黄色素,以满足色素市场需求。但有关氯化氨是如何限制红曲霉菌产红色素的机理有待探讨。

2.4 不同氮源对红曲霉菌 HNLI 产色素总色价的影响

不同氮源培养条件下,红曲霉菌 HNLI 产色素总色价情况见图 4。由图 4 可知,以质量分数为 5% 的蛋白胨为氮源发酵产色素总色价最高,达 80.84 μ/mL,而以质量分数为 5% 的谷氨酸钠为氮源发酵的色素总色价最低,为 28.13 μ/mL。文献^[10]报道了在 1% 的玉米粉作氮源的情况下,添加 0.4% 的谷氨酸钠有利于红曲霉产色素。本试验中,以质量分数为 5% 的谷氨酸钠培养条件反而对红曲霉菌 HNLI 发酵产色素不利,可见谷氨酸钠作为红曲霉菌单一的氮源并不能促进色素的合成,而与其他组分共同作为红曲霉菌的氮源则有利于色素的合成。结合图 1~4 可知,红曲霉菌 HNLI 能较好地利用硝酸钠,为以后优化红曲霉菌 HNLI 发酵基质提供了一定的参考价值。

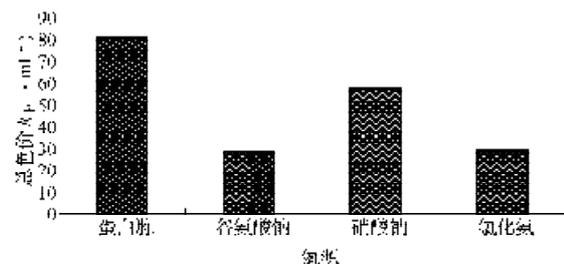


图4 氮源对红曲霉总色价的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen sources on total *Monascus* pigment value

2.5 不同氮源对红曲霉菌 HNLI 色调的影响

不同氮源培养条件下,红曲霉菌 HNLI 发酵色调的影响如图 5 所示。由图 5 可知,蛋白胨、谷氨酸钠、硝酸钠作为氮源培养条件下,色调差异不显著。影响色调的因素较多,在极端环境下,红曲霉的色调较高,产黄色素越多,越不利于红曲霉菌的生长代谢。从图 5 中可看出,以质量分数为 5% 的氯化氨为氮源,红曲霉菌 HNLI 的色调最大,为 4.93。表明 5% 氯化氨不利于红曲霉的生长,这与图 1 中氯化氨作氮源时红曲霉菌 HNLI 的生物量最低结论相一致。色调超过 1 即黄色

素的色价超过红色素色价, 培养液将呈现黄色^[11], 但本试验中, 尽管色调超过了数值 1, 但培养液仍呈红色。这可能是培养液中除了红黄 2 种色素外, 还有其它色素的干扰。因此, 尽管色调能说明红曲霉中合成的红色素与黄色素的相互关系, 但能否以色调值来衡量红曲霉菌生长是否受到环境胁迫, 以及红曲霉菌生长受到环境因素胁迫时色调阈值取多大较适宜, 有待于进一步研究。

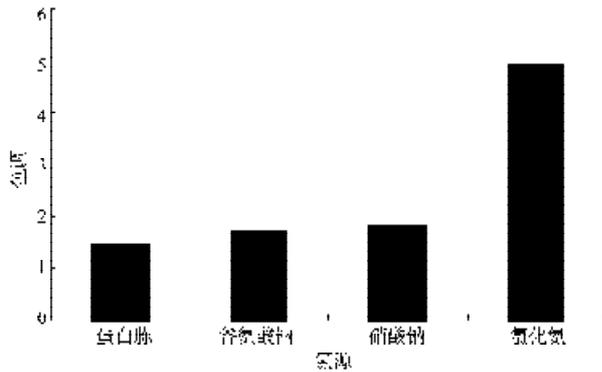


图 5 氮源对红曲霉色调的影响

Fig. 5 Effects of nitrogen sources on *Monascus* color hue

3 结论

研究了不同的有机氮源和无机氮源对红曲霉菌 HNLI 发酵产色素的影响, 其结果有较大的差异。有机氮源中 HNLI 菌以蛋白胨发酵产色素总色价最高, 而无机氮源中则以硝酸钠发酵产色素色价最高; 较高浓度的谷氨酸钠则不利于红曲霉菌 HNLI 产色素, 而氯化铵对红曲霉菌 HNLI 产黄色素有一定的促进作用; 有关色价与色调不呈正相比关系是否能以色调来衡量红曲霉菌 HNLI 生长受胁迫, 需进一步试验。其次, 随着人们对生活要求的不断提高和对色素认识的不断深入, 红曲的价值及其他功能会进一步发掘出来, 提高红曲色素的产量与色价, 确定出色调和色价的关系, 将有利于红曲的应用。

参考文献:

- [1] Bianc P J, Loret M O, Santeree A L, et al. Pigment of *Monascus*[J]. Journal of Food Science, 1994, 59: 4-9.
- [2] 张徐兰, 吴天祥, 李鹏. 红曲霉有效成分应用研究进展[J]. 酿酒科技, 2006(9): 78-81.
Zhang Xulan, Wu Tianxiang, Li Peng. Research Progress in the Use of Effective Constituents of *Monascus*[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2006(9): 78-81.
- [3] 盖栋梁, 刘爱英, 梁宗琦. 红曲中橘霉素问题研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(6): 549-554.
Gai Dongliang, Liu Aiying, Liang Zongqi. Advances of

- Research on Citrinin in Red Yeast Rice[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2005, 24(6): 549-554.
- [4] 李时珍. 本草纲目[M]. 长春: 时代文艺出版社, 2004: 61, 66, 108, 154.
Li Shizhen. Compendium of Materia Medica [M]. Changchun: Time and Literature Press, 2004: 61, 66, 108, 154.
- [5] 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.
Zou Yu, Hou Hongman, Zhang Xiao, et al. Culture Condition Optimization for *Monascus* 0301 Producing Pigment and Its Citrinin Content Measurement[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2005, 24(3): 202-206.
- [6] 贾万利. 红曲霉的液态发酵研究[J]. 山西化工, 2006, 26(3): 1-4.
Jia Wanli. Research of Liquid Fermentation of *Monascus Purpureus*[J]. Shanxi Chemical Industry, 2006, 26(3): 1-4.
- [7] 周波, 浦跃武, 朱明军, 等. 氮源对红曲霉突变株产黄色素的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 123-127.
Zhou Bo, Pu Yewu, Zhu Mingjun, et al. Effects of Nitrogen Sources on *Monascus* Yellow Pigment Production by *Monascus* Mutant[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 123-127.
- [8] 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.
Ge Jizhi, Zhang Ying. Screening of *Monascus* Strain A₆ for Fermentation Conditions[J]. Journal of Biology, 1999, 16(2): 29-30.
- [9] 王伟平, 吴思方, 彭其安, 等. 红曲霉液态发酵生产红色素培养基配方研究[J]. 食品科技, 2006(11): 76-78.
Wang Weiping, Wu Sifang, Peng Qian, et al. Study on the Submerged Fermentation Culture Medium Producing Red Pigment by *Monascus*[J]. Food Science and Technology, 2006(11): 76-78.
- [10] 李喜仙, 刘玺. 小米液态发酵生产红曲色素技术研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 83-86.
Li Xixian, Liu Xi. Study on the Monascouranin Production by Submerged Fermentation of Millet[J]. Food Science, 2003, 24(1): 83-86.
- [11] 孙菲菲, 岳田利, 袁亚宏, 等. 红曲霉 5040 发酵产生红曲色素的工艺及其色素特性的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 137-140.
Sun Feifei, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Study on Technical Conditions and Characteristics of Pigments by *Monascus* Anka 5040[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2006, 34(6): 137-140.

(责任编辑: 廖友媛)