

红曲红色素深层发酵桔霉素的控制

杨晓暉 胡文林 谢凤娇 王民俊

(东莞市天益生物工程有限公司 523521)

摘要: 简要叙述了通过特殊处理、分离诱变, 筛选出优良的红曲菌具有: ①性能稳定、产色高; ②不产或低产桔霉素; ③能充分利用现有的培养基(以大米、黄豆为主要原料)进行产业化大生产; 红曲红深层发酵低产或不产桔霉素(Citrinin)的生产工艺条件及控制方法。

关键词: 红曲菌; 红曲红色素; 深层发酵; 桔霉素

Cirinin control in processing monascus red

YANG Xiao-chun HU Wen-lin XIE Feng-jiao WANG Min-jun

(Dongguan City Tianyi Biology Engineering Co., Ltd. 523521)

1 前言

目前, 国内外对合成色素的限制越来越严格, 而对天然色素的开发使用方兴未艾。红曲红色素是利用微生物发酵法大规模生产的天然生物色素, 是目前已应用于食品工业的, 来源于微生物发酵的天然着色剂。1995年法国学者P. J. Blanc等^[3]在红曲菌发酵产物中检测到一种对人畜有害的真菌毒素桔霉素(Citrinin), 使红曲菌产品在世界范围内应用受到限制, P. J. Blanc认为, 桔霉素的产生与红曲菌次生代谢产物的代谢途径, 与红曲菌培养方式及培养基组成密切相关, 同一菌株不同条件下可能产或不产桔霉素, 不同条件下产桔霉素差异的形成可能与外界因素诱导基因组产生差异表达有关。日本厚生省在1999年颁布、2003年修订的《日本食品添加剂标准》中对红曲色素的桔霉素含量做了限定, 限量指标定为0.2mg/kg(色价基准为5u/g, 1%)。经江南大学和中国疾病预防控制中心合作课题组、中国食品添加剂协会等组织的红曲红桔霉素的普查, 结果表明, 我国红曲色素中桔霉素的含量普遍偏高。红曲色素桔霉素含量的控制已被各

生产企业定为攻关目标。东莞市天益生物工程有限公司与江南大学生物工程学院共同承担的东莞市科研发展专项基金项目《无桔霉素红曲色素生产技术》经过近两年的攻关, 通过菌种的改造选育, 原材料选择、发酵生产工艺条件的控制等措施, 取得了阶段性的成果, 深层发酵大生产(30m³发酵罐)已连续多批次生产出桔霉素含量达标的产品。基本满足了出口客户的要求。

2 材料与方法

2.1 红曲菌优良菌种的选育^[1]

2.1.1 培养基

(1) 分离培养基 PDA: 20% 马铃薯 1000mL, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g;

(2) 分离培养基 CYA: 蔗糖 3%, 酵母膏 5.0%, KH₂PO₄ 0.1%, NaNO₃ 0.3%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%, 蒸馏水 1000mL, 1.5% 琼脂;

(3) 麦芽汁培养基: 10⁰Bx1000mL, 20g 琼脂

(4) KMA: 可溶性淀粉 3%, 麦芽糖 3%, 蛋白胨 2%, 琼脂 2%

2.1.2 选育方法

(1) 紫外诱变

将已培养好的试管斜面种，挑入内装有30~50mL的无菌水的三角瓶，置于摇床振荡30~40min，过滤，取10mL孢子悬浮液，加到Φ9mL的带磁力棒的培养皿内，在磁力搅拌下进行紫外照射(2~10min)，涂平板(用黑布包扎)，于温度32~35℃下培养6~8天。

(2) 化学诱变

制备孢子悬浮液，用0.01~0.1M H₂NO₃和1M醋酸(pH4.5)处理，震荡摇匀5~30min，再用0.05M NaH₂PO₄作缓冲液(pH8.0)终止反应。涂布平板培养(温度32~35℃、时间6~8天)。

(3) 复合诱变

先用亚硝酸处理后终止反应，再经紫外照射2~10min处理。

2.2 选育步骤

如何筛选优良的生产菌株，是降低生产成本、提高产品收得率的重要保证。在红曲菌菌种的选育过程中，我们着重以下几点：

2.2.1 ①性能稳定、产色高；②不产或低产桔霉素；③能充分利用现有的培养基(以大米或玉米淀粉为主要原料)进行产业化大生产；

2.2.2 利用原生产菌种为母种，经紫外诱变处理(3~5min)后接于平板培养基进行分离培养(温度32~35℃)6~8天，在培养过程中不定期观察其生长变化情况，挑选有代表性的菌落接入试管斜面培养6~8天；

2.2.3 用已培养成熟的菌株作摇瓶跟踪试验，淘汰生长慢、发酵水平低的菌株，筛选生长快、产色高具有代表性的分离种，再次进行培养基配方试验；

2.2.4 用米粉和玉米淀粉作碳源，NaNO₃、NH₄NO₃、尿素等作无机氮，黄豆、玉米浆、酵母粉、蛋白胨作有机氮源，MgSO₄、KH₂PO₄等无机盐，按一定的比例、不同配方分别进行摇瓶试验，分析检测色价、pH值及残糖。

2.3 摇瓶试验

2.3.1 摇瓶培养基的类别

2.3.2 以大米为碳源，黄豆、蛋白胨、玉米浆为有机氮源，发酵液产色高，其渣的酒精浸提液紫红色重；

摇瓶配方①：

米粉6%~7%，KH₂PO₄0.3%~0.5%，NaNO₃0.2%~0.4%，MgSO₄0.2%~0.4%，黄豆2%~3%，蛋白胨2%~3%，玉米浆0.2%~0.5%；

2.3.3 以大米为碳源，黄豆、酵母粉、玉米浆为有机氮源，发酵液产色次之，其渣的酒精浸提液橙红色重；

摇瓶配方②：

米粉6%~7%，KH₂PO₄0.3%~0.5%，NaNO₃0.2%~0.4%，MgSO₄0.2%~0.4%，黄豆2%~3%，酵母粉2%~3%，玉米浆0.2%~0.5%；

2.3.4 以大米为碳源，黄豆、蛋白胨、酵母粉为有机氮源，发酵液产色较低，发酵渣酒精浸提液紫红、色发暗；

摇瓶配方③：

米粉6%~7%，KH₂PO₄0.3%~0.5%，NaNO₃0.2%~0.4%，MgSO₄0.2%~0.4%，黄豆2%~3%，蛋白胨2%~3%，酵母粉0.2%~0.5%；

2.3.5 以大米为碳源，黄豆、酵母粉、玉米浆为有机氮源，发酵液产色较高，发酵渣酒精浸提液偏黄。

摇瓶配方④：

米粉6%~7%，KH₂PO₄0.3%~0.5%，NaNO₃0.2%~0.4%，MgSO₄0.2%~0.4%，黄豆2%~3%，酵母粉2%~3%；

2.3.6 以玉米淀粉作碳源，酵母粉、玉米浆为有机氮源，发酵液产色较低，发酵液及酒精浸提液偏黄重。

摇瓶配方⑤：

米粉6%~7%，KH₂PO₄0.3%~0.5%，NaNO₃0.2%~0.4%，MgSO₄0.2%~0.4%，酵母粉2%~3%，玉米浆0.2%~0.5%。

2.4 大罐发酵工艺条件

30M³发酵罐：初定容有效体积为22.0M³，生长温度32~35℃，通风比为1:0.3~0.6，罐压0.4~0.7MPa，时间65~85H。

2.5 分析方法

2.5.1 桔霉素的测定方法

检测依据：保健食品检验与评价技术规范，

中国卫生部 2003 年版。

样品经 TEF (固态样)、乙醇 (液态样品) 三次萃取后, 微滤后直接进样分析。

高效液相色谱仪及色谱条件:

仪器: HP1100; 检测器: 荧光检测器; ($\lambda_{ex} = 331, \lambda_{em} = 500$);

进样量: 5 μ L; 温度: 28 $^{\circ}$ C; 流速: 1mL/min。

桔霉素含量计算公式:

红曲样品中桔霉素含量 $C = D \times (S_2 \times C_1) / S_1$ (mg/kg 或 mg/L); 其中:

D: 稀释倍数; S_2 : 样品峰面积; S_1 : 标样峰面积;

C_1 : 标样浓度 (mg/L);

2.5.2 色价测定方法

(1) 半成品 (发酵液): 用 10mL 刻度吸管准确吸取发酵液 1mL 缓慢放入试管中, 再加入 9mL 70% 乙醇, 摇匀, 使之彻底溶解 20min, 用快速滤纸过滤, 按色价的高低稀释倍数, 用 722 型分光光度计在波长 495 ~ 505nm 测其吸光值。

色价 (u/mL) = 稀释倍数 X 吸光值

(2) 红曲红成品粉: 参照红曲红国标 GB2005—15961 检测。^[5]

3 实验结果

3.1 摇瓶试验

摇瓶试验结果表 1。

表 1 摇瓶发酵实验结果

批次	配方 1	配方 2	配方 3	配方 4	配方 5	备注
1	378u/mL	353u/mL	313u/mL	345u/mL	310u/mL	色价
1	紫红	橙红	紫红、发暗	偏黄	偏黄重	色调
2	356u/mL	344u/mL	289u/mL	318u/mL	298u/mL	色价
2	紫红	橙红	紫红、发暗	偏黄	偏黄重	色调
3	360u/mL	368u/mL	320u/mL	343u/mL	315u/mL	色价
3	紫红	橙红	紫红、发暗	偏黄	偏黄重	色调

根据摇瓶试验结果, 我们分别选用①、②、④组配方进行放大生产, 其发酵水平、产品收得率顺序是: ① > ② > ④, 色调紫红或橙红。③、⑤组配方淘汰。同时分别对以上三种配方所生产的红曲红产品进行桔霉素检测, 其结果是: ①未检测出; ②很少 (小于 1ppM); ④较多 (大于 3 ~ 5ppM);

经近两年的生产试验跟踪 (定期抽样分析), 初步结果表明: 红曲菌在有机氮源丰富的培养基中较容易产桔霉素, 尤其是以酵母粉为氮源的培养基更易产生桔霉素, 而且随着使用量的增加而增大。^[2~3]

3.2 严格控制深层发酵红曲红生产过程中的主要原材料

生产红曲红的主要原材料分别为: 大米、黄豆、乳酸、蛋白胨、玉米浆等, 在仓库进货时, 质检部必须对原料进行常规的理化指标分析检测, 根据生产需要制定本公司《原材料采购企业标准》; 严禁采购霉变或劣质的大米、黄豆等原料;

定期对来料进行桔霉素跟踪检测, 查找和排除因原料带进的污染;

3.3 红曲红深层发酵生产工艺条件的控制^[4]

3.3.1 浓度比

除了摸索红曲菌合适的发酵生产配方外, 碳、氮比, 料液浓度比也是高色价、低产桔霉素最基本保证, 一般控制碳、氮比 8 : 1.5 较为合适; pH4.5 ~ 6.5 条件下对红曲菌生长有利。

3.3.2 温度

我们知道, 红曲红的最适生长温度为 32 ~ 35 $^{\circ}$ C, 从节能降耗考虑, 相对提高红曲菌发酵生产温度, 缩短发酵时间 (65 ~ 75h), 便于生产控制。在筛选菌种时, 我们对红曲菌进行了特殊处理 (如耐高温、耐酸及耐高压、嗜乙醇等), 使筛选种具有产色高、性能稳定和培养粗放的特点; 经多次试验说明: 相对升高红曲菌发酵生长温度 (35 ~ 36.5 $^{\circ}$ C), 不但可以节能降耗, 而且还能提高生产发酵水平的同时使桔霉素含量减少。

3.3.3 通风比

红曲菌属于耗氧型微生物, 在发酵生产过程中需要一定的通风量, 我们发现: 通风量大小直

接影响红曲菌生产过程中速度的快慢,同时通风量(即溶氧)对红曲菌发酵产色与次代谢物桔霉素产生成正比^[2~3],因此,如何保证红曲菌生长旺盛期代谢力强、需氧量较大而不产(或低产)桔霉素?我们采取了降低发酵液的浓度比,使液体流动性增大,从而相对增加通风量的同时可以降低溶解氧(产色不受影响),因此而降低桔霉素的产量,通风比值在1:0.3~0.6左右较好。由于控制深层发酵过程中通风量在不同时期有不

同要求,应根据具体发酵罐体积、浓度比等条件而定。如何把握好液体深层发酵红曲红生产过程的三大要素(温度、通风量、罐压),仍需进一步摸索、探讨。

经过多批次生产验证,将所得红曲红产品分别抽样送江南大学和北京联合大学等国内权威检测机构分析检测,其检测结果基本一致。见表2和表3。

表2 红曲红样品桔霉素含量的测定结果

样品种类	色价 (U/g, 1%)	样品编号	测定时间	样品重量 (g)	稀释倍数	峰面积	桔霉素含量 (mg/kg, 或 mg/L)	备注
红曲红	100	20051117	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20051225	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060209	2006-5-28	2	25		<1ppm	
红曲红	100	20060228	2006-5-28	2	25		<1ppm	
红曲红	100	20060306	2006-5-28	2	25	0	<1ppm	
红曲红	100	20060319	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060324	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060403	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060415	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060423	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	60060428	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060505	2006-5-28	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060515	2006-5-28	2	25	0	未测出	

表3 红曲红样品桔霉素含量的测定结果

样品种类	色价 (U/g, 1%)	样品编号	测定时间	样品重量 (g)	稀释倍数	峰面积	桔霉素含量 (mg/kg, 或 mg/L)	备注
红曲红(液)	20	T061103	2006-12-6	5	10	0	未测出	
红曲红(液)	20	T061025	2006-12-6	5	10	0	未测出	
红曲红(液)	20	T061108	2006-12-6	5	10	8.07	0.798	0.18ppm
红曲红(液)	20	T061120	2006-12-6	5	10	0.565	0.282	0.07ppm
红曲红	100	20060522	2006-12-06	2	25	0	未测出	
红曲红	100	20060915	2006-12-06	2	25	10.9	3.03	0.15ppm
红曲红	100	20060928	2006-12-06	2	25	5.7	1.59	0.08ppm
红曲红	145	20061024	2006-12-06	2	25	18.9	5.27	0.18ppm
红曲红	100	20061103	2006-12-06	2	25	18.3	5.10	0.02ppm
红曲红	100	20061108	2006-12-06	2	25	3.9	1.09	0.06ppm
红曲红	100	20061112	2006-12-06	2	25	8.5	2.37	0.12ppm
红曲红	100	20061116	2006-12-06	2	25	13.4	3.73	0.17ppm

(下转第145页)

氮含量制品的生产具有重大意义。此外，大豆蛋白的黏度随其浓度的增高而急剧升高，但对于低分子的大豆多肽来说此种变化很小，即使在50%的高浓度下也仍然富有流动性。大豆蛋白浓度提高到10%以后，黏度呈直线上升，而30%大豆多肽的黏度与10%大豆蛋白的黏度相当，即使达到50%时，其流动性仍然很好。此外，大约10%浓度的大豆蛋白质水溶液一经加热就会凝固，而大豆多肽的水溶液不会产生凝固现象。

大豆肽具有良好的生物活性与功能特性，因而适宜于各类食品的加工中调整蛋白质食品的硬度，改善口感。

4 大豆肽的安全性

4.1 潜在的毒性问题

大豆与发酵大豆产品应经食用了几千年，没有明显的副作用问题，肽一般在胃肠道蛋白质消化过程中生成，消化过程释放产生毒性肽的几率是十分微小的，现尚无出现毒性肽的报道。而大豆肽生产涉及生产工艺及其发酵、酶解选用的菌种及酶等，需要注意大豆肽的安全性。

4.2 对繁殖激素的影响

大豆蛋白及其产物中含有高量的大豆异黄酮，大豆异黄酮是一种类雌激素，被称为植物雌激素，虽然植物雌激素的效果只有动物雌激素的1/3，但仍可以起到雌激素的作用。虽然许多学

者已经证明植物雌激素的作用取决于动物摄入量的多少，有人怀疑大量摄入大豆及其制品是否影响男性生殖能力，但流行病学研究及相关研究尚无发现大量摄入大豆及其制品生殖激素睾酮的水平影响。

4.3 抗原性

大豆蛋白具有抗原性。具有抗原性的蛋白通常分子量较大。大豆蛋白经酶解，其抗原性大大降低，不溶性蛋白等物质被去除以后，用酶免疫测定法(ELISA)测得其抗原性比原先的大豆蛋白质降低了0.1%~1%。所以在食用后不会产生或很大程度上减弱了由大豆蛋白质引起的过敏反应，尤其适用于生产低抗原性婴幼儿食品。

5 结语

大豆肽的应用需要加强研究与开发。在大豆蛋白酶解生产中，如何有效地生产活性多样的产品以及改善产品风味，需要进一步研究水解和精制方法，降低成本。对于大豆蛋白潜在的生物活性肽需要进行深入的研究，利用大豆蛋白氨基酸数据库，建立生物活性肽库，加快大豆生物活性肽的开发，大豆肽具有良好的营养、生物学活性以及功能特性，相信大豆肽将成为一种防治人类慢性代谢疾病的优异的资源。

参考文献(略)

(上接第212页)

从以上表中检测结果可以看出，红曲红色素中的桔霉素含量是很低的，基本上符合日本最低限量标准。说明通过对红曲菌的改造选育，在一定的工艺条件下，完全可以控制红曲红产品中的桔霉素含量。

随着红曲红色素的应用范围不断扩大，市场需求量的增大，液体深层发酵红曲红生产水平的不断提高，我们有信心、有能力继续进行更加细致、深入、透彻的研究，把红曲红产品质量进一步稳定、提高，使红曲红生产过程中桔霉素的产生可以得到有效控制。使中国千年国宝红曲真正

走向世界、造福于人类。

参考文献

- [1] 杨晓曦, 胡文林等. 红曲霉深层发酵用高色价红曲霉菌株的选育. 2004 东方红曲国际学术研讨会.
- [2] 许贇荣等. 低产桔霉素红曲霉菌种的筛选及液态发酵工艺条件的研究. 2000 东方红曲国际学术研讨会.
- [3] 法国 (P. J. Blanc). 红曲霉产色过程中桔霉素的产生. 2000 东方红曲国际学术研讨会.
- [4] 杨晓曦. 红曲霉深层发酵法生产红曲红. 2000 东方红曲国际学术研讨会.
- [5] 中华人民共和国国家标准, 食品添加剂. 红曲红. 中国标准出版社, 2005 年第二版.