

贮藏条件对从江红曲孢子活力的影响

Study of storage conditions on *Monascus purpureus* spore viability

李永波 李 静 宋丽莎 肖国学 马 媛

LI Yong-bo LI Jing SONG Li-sha XIAO Guo-xue MA Yuan

(黔南民族师范学院生命科学与农学院, 贵州 都匀 558000)

(Academy of Life Science and Agriculture, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun, Guizhou 558000, China)

摘要:以孢子萌发率为评价指标,研究光照、贮藏温度、氧化还原电位、金属离子及低浓度乳酸对从江红曲孢子活力的影响。结果表明:2℃低温贮藏、黑暗、添加 400 μg/mL 的 Vc、添加 1% 的乳酸均有利于从江红曲霉孢子活力的保持,其中添加 400 μg/mL Vc 的活性最高,孢子萌发率达 74.22%;强光、紫外线、0.1% H₂O₂ 处理下,从江红曲孢子萌发率均显著降低。

关键词:贮藏;红曲霉;孢子活力;萌发率

Abstract: Using the spore germination rate as evaluation index, study the effects of light, storage temperature, oxidation reduction potential, metal ions and low concentration of lactic acid on *Monascus purpureus congjiang var.* spore viability. The results showed that at the 2℃ low-temperature storage, darkness, adding 400 μg/mL of Vc, adding 1% lactic acid were beneficial to the *Monascus purpureus congjiang var.* spore viability. With the addition of 400 μg/mL Vc had the highest activity, spore germination rate reached 74.22%; treatments of light, ultraviolet rays, 0.1% H₂O₂, *Monascus purpureus congjiang var.* spore germination rate were significantly reduced.

Keywords: storage; *Monascus purpureus*; spore viability; germination rate

红曲霉(*Monascus*),属于真菌界子囊菌门真子囊菌纲散囊菌目红曲菌科红曲霉属,是重要的工业丝状真菌,蕴藏着丰富的聚酮体,是药物开发的宝库^[1],具有很丰富的药用价值。

红曲是通过红曲霉在大米等物料中发酵生产的,其中含有大量红曲红色素,是安全的生物色素^[2-4]。笔者^[5]前期从贵州从江采集的样本中分离得一株艳玫瑰红的红曲霉菌

株——从江红曲霉(*Monascus purpureus congjiang var.*),该菌株生产的红曲米色泽鲜艳艳丽,香气浓郁。该菌株应用红曲甜米酒生产时,由于红曲霉与根霉发酵的不同步(红曲霉从接种至产生大量色素需要 15 d 左右,而根霉发酵甜米酒通常不超过 1.5 d),需要预先生成大量红曲米,因此,在存放过程中保持红曲米的生物活性至关重要,其重要指标即孢子的活力。目前,对影响红曲霉孢子活力条件的研究鲜见报道,可能是不同的红曲霉菌株或在不同的培养条件下的同一菌株孢子活力差异较大,加之红曲霉固态发酵过程中,除产生大量的分生孢子,还产生少量的子囊孢子,在较短的观察时间,这些孢子的萌发活性差异较大,造成测量数据不稳定,因此探索能够促使红曲霉孢子长时间保持活力的条件显得尤为重要。本研究拟采用血球板计数方法,通过观察诸如温度、光照、氧化剂、还原剂、离子等不同处理条件下的红曲霉孢子萌发率,筛选出对红曲霉孢子活力有正面影响的理化因子,为科学保藏红曲米、判断其品质提供借鉴,为分步发酵生产红曲甜米酒提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

从江红曲霉(*Monascus purpureus congjiang var.*):黔南民族师范学院生物科学与农学院微生物实验室分离鉴定;圆粒糯米:产自贵州黔东南;葡萄糖:注射级,贵州都匀湘君大药房;氯化铁、氯化锌、H₂O₂:分析纯,贵州省化学试剂有限公司;恒温箱:ZXDP-A2050 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

无菌操作台:SW-CJ 型,成都精宏仪器设备有限公司;致微高压灭菌器:Zealway GR-60DA 型,致微(厦门)仪器有限公司;

离心机:TGL-20M 型,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;尼康显微镜:Ti-E 型,上海衡浩仪器有限公司;高压灭菌锅:YXQ-LS-50S 型,西安泰康仪器设备有限公司;

基金项目:贵州省科技厅项目(编号:黔科合 LH[2012]7427);黔南民族师范学院微生物学院级重点学科项目(编号:zdxk2011-09);黔南民族师范学院院级重点项目(编号:QNSY0918)

作者简介:李永波(1976—),男,黔南民族师范学院副教授,硕士。

E-mail: 2320952518@qq.com

收稿日期:2016-02-05

公司；

电子天平:JT502N 型,上海精天电子仪器有限公司。

1.2 从江红曲孢子的制备及萌发率的测定

1.2.1 红曲米的生产 取 30 g 的糯米,分别装入洁净的小广口瓶中,用单层牛皮纸包扎,121 ℃、0.1 MPa、灭菌 20 min。于超净工作台上按 3% 的比例接种从江红曲霉并加入少量无菌水搅拌均匀后,置入恒温培养箱 30 ℃ 倾斜培养至菌丝布满米粒表面时,转入 20~25 ℃ 变温培养,第 15 天停止发酵,自然晾干即得红曲米。

1.2.2 预萌发液的制备 取灭菌注射器、无菌水、葡萄糖(注射级)于超净工作台上,配制质量浓度为 1.8% 的无菌生理糖水溶液,现配现用。

1.2.3 孢子的分离 称取 10 g 自然阴干的红曲米,研磨后倒入少量无菌水中,混匀,纱布过滤,反复洗脱至滤液基本无色,收集滤液,用无菌水多次洗涤离心(2 000 r/min, 20 min),去除上清液合并沉淀,冰箱冷藏保存备用。

1.2.4 萌发率的测定 用 10 mL 无菌生理糖水分散 10 g 红曲米中提取的孢子,置于 30 ℃ 恒温箱中培养 48 h 后,于显微镜下用血球计数板统计红曲孢子总数与萌发孢子个数,每个样品以 10 个计数室为 1 次计数(相当于计数 1 μL 孢子悬液),重复 10 次并统计萌发率。按孢子萌发率式(1)计算:

萌发率 = $\frac{\text{萌发孢子数}}{\text{孢子总数}} \times 100\%$ 。(1)

1.3 贮藏条件对从江红曲孢子活力的影响

1.3.1 不同温度处理后孢子的萌发率 将自然阴干的红曲米分别置于 2,11(平均室温),30 ℃ 条件下避光保存 3 个月,收集孢子,并测定孢子萌发率。

1.3.2 不同光照下孢子的萌发率 按 1.2.3 收集 2 ℃ 低温冷藏红曲米孢子并按 1.2.4 制成孢子悬液,将其置于超净工作台上分别在黑暗或散光、强光(40 W)、紫外光(40 W)条件下照射 2 h(照射距离 30 cm),于 30 ℃ 恒温箱中培养 48 h 后,测定孢子萌发率。

1.3.3 不同氧化还原电位下孢子的萌发率 按 1.2.3 收集 2 ℃ 低温冷藏红曲米孢子并按 1.2.4 制成孢子悬液,加入等体积不同浓度的 Vc 溶液(100,200,300,400,500 μg/mL)及 0.2% 的 H₂O₂,于 30 ℃ 恒温箱中培养 48 h 后,测定孢子萌发率。

1.3.4 不同金属离子和乳酸下孢子的萌发率 按 1.2.3 收集 2 ℃ 低温冷藏红曲米孢子并按 1.2.4 制成孢子悬液,分别用 ZnCl₂、FeCl₃、乳酸调节体系的 Zn²⁺ 浓度为 60 μg/mL、Fe³⁺ 浓度为 50 μg/mL、乳酸浓度为 1%,于 30 ℃ 恒温箱中培养 48 h,测定孢子萌发率。

1.4 数据处理

对分组试验数据计算方差和标准误差后,用 *t* 检验比较各处理之间以及与空白对照的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同温度处理后孢子的萌发率

由图 1 可知,2 ℃ 保存 3 个月条件下的孢子萌发率平均

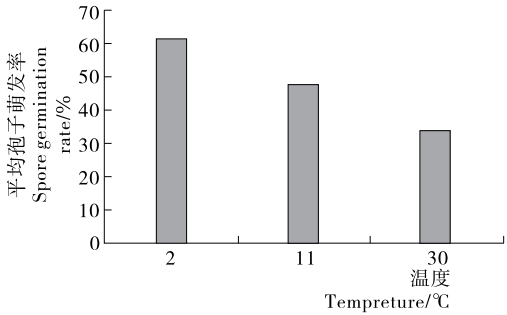


图 1 不同温度下储藏 3 个月后红曲霉孢子的萌发率
Figure 1 The monascus spore germination rate under different storage temperature

为 61.44%。与之相较,30 ℃ 保存条件下孢子活力下降了近 50%。杨宁等^[6]研究表明,紫色红曲霉的最适生长温度为 25~30 ℃,红色红曲霉的最适生长温度为 30~35 ℃。本试验中红曲霉菌种接种后的培养和后期萌发培养温度均为 30 ℃,在适温范围(25~35 ℃)内。刺激处理的低温为 2 ℃,为冰箱的保鲜温度,研究结果表明在此温度条件下能更好地保持孢子的活力,推测低温大大降低孢子的代谢速率,从而能长期保持活力。

2.2 不同光照处理下红曲霉孢子的萌发率

由图 2 可知,黑暗条件下的孢子萌发率最高为 62.18%,散光对孢子活力的影响不大,强光照与紫外光的影响较明显,如紫外光处理后孢子的萌发率大幅下降至 30.9%。徐力文等^[7]研究紫外线对菌株分生孢子萌发率的影响中表明,室内紫外灯下,孢子萌发率因照射强度(照距)和时间的增加而下降。本试验也发现经过白炙灯照射后红曲孢子的萌发率也有所下降,推测可能是光照钝化降低酶活性。赵永霞等^[8]在光照对红曲霉形态、孢子及色素的研究中表明,相比于白光条件,黑暗条件更有利于 Monascus anka GZU4577 的生长发育以及色素的积累,本试验表明在黑暗处理下孢子的活性保持更久,推测色素的积累与孢子活性有正相关,可从红曲米的颜色初步推断红曲霉的孢子活力。

2.3 不同氧化还原电位下孢子的萌发率

由图 3 可知,加入氧化还原电位较低的还原性试剂能提高孢子的萌发率,如加入等体积 400 μg/mL Vc 可使孢子的

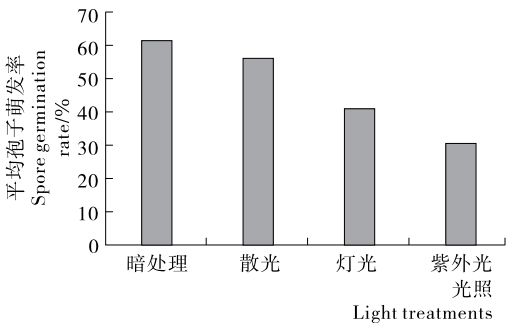


图 2 不同光照处理下红曲孢子的萌发率
Figure 2 The monascus spore germination rate under different light treatment

萌发率提高至 74.22%，相比空白组提高了 20.8%，而氧化还原电位较高的 H₂O₂ 中的萌发率明显降低，只有不到 5%。杨成龙等^[9]在几种维生素对红曲霉 S 产色素的影响时发现 Vc 对红曲霉产色素有促进作用。本试验则发现 Vc 对红曲孢子活性的保持有显著促进作用，进一步说明孢子活力与色素的积累两者呈正相关性。

2.4 不同金属离子和低浓度乳酸处理下孢子的萌发率

由图 4 可知,与空白(61.56%)相比较,加入 1%乳酸后,红曲孢子的萌发率有所提高,孢子平均萌发率为 67.20%,提高了 9.16%。而加入金属离子会使孢子萌发率降低,如 50 μg/mL 的 Fe³⁺ 处理后孢子萌发率为 54.17%,降低 12.00%。冯宏等^[10]在重金属对溶磷黑曲霉生长影响的研究

表明,Ag⁺胁迫对黑曲霉菌落直径的影响变化规律与 Zn²⁺ 基本一致,而本试验中 Zn²⁺ 和 Fe³⁺ 对红曲霉孢子也存在不同程度的胁迫作用。

2.5 不同理化因子对孢子萌发率影响的统计分析

由表 1 可知:在低温(2℃)、400 μg/mL Vc、1%乳酸处理条件下红曲霉平均孢子萌发率均有增加,而在紫外线、强光照处理、添加氧化还原电位较高的生化试剂条件下,红曲霉平均孢子萌发率显著降低。其中,添加 400 μg/mL Vc、紫外线处理、H₂O₂ 处理与空白对照存在显著性差异(P<0.05)。可能是红曲霉喜偏酸环境,且乳酸对细菌等杂菌有较好的抑制作用,氧化还原电位也较低,因此对红曲霉孢子的萌发率有促进作用。

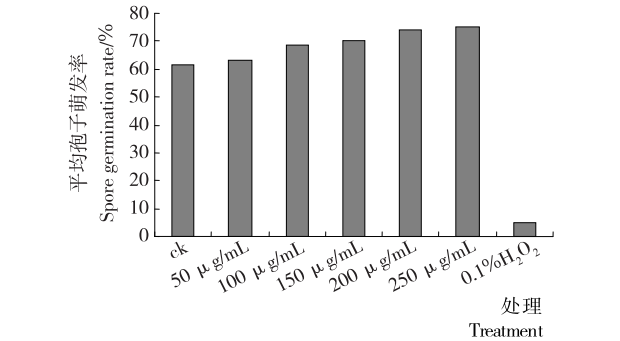


图 3 不同氧化还原电位下孢子的萌发率
Figure 3 The monascus spore germination rate under different oxidation-reduction potentials

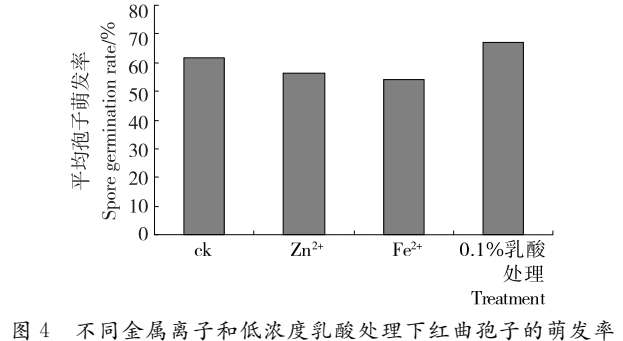


图 4 不同金属离子和低浓度乳酸处理下红曲孢子的萌发率
Figure 4 The monascus spore germination rate under different metal ions and low concentration lactic acid treatment

表 1 各种处理条件对孢子萌发率的差异性比较 [†]							
Table 1 The differences of all kinds of processing conditions on the spore germination rate (n=10)							
处理条件	CK	2℃	1%乳酸	400 μg/mL Vc	0.1% H ₂ O ₂	UV	Fe ³⁺
萌发率/%	61.56±5.12 ^{bc}	61.44±6.25 ^{bc}	67.21±5.48 ^{ab}	74.22±6.47 ^a	4.68±0.62 ^f	30.9±4.28 ^e	54.17±5.54 ^{cd}

[†] 标注含不同字母表示在 P=0.05 水平有显著性差异。

3 结论

研究表明,从江红曲在温度 2℃、黑暗、400 μg/mL Vc、1%乳酸等条件下孢子萌发率均有所提高,但只有加 Vc 的处理与对照达到 0.05 水平差异显著性;较高的贮藏温度、光照、氧化剂均对孢子活力有不利影响,均达到了差异显著性水平,Fe³⁺、Zn²⁺ 虽对孢子萌发有不利影响,但未达到显著差异水平,主要是测试浓度较低缘故。

研究^[5]发现,在培养红曲霉时适当的低温刺激有利于色素合成,同样的,在低温存放条件下红曲霉孢子的萌发活力衰减很慢,孢子活力与色素的积累能力呈一定的正相关,互为判断红曲霉菌种品质的依据。

试验中观察到红曲霉除了产生大量的分生孢子外,还有极少量其它类型的孢子,由于试验方法所限,不能对不同孢子的萌发活力单独测定,加之观察的预萌发时间较短,因此实际上红曲霉孢子的萌发率可能比试验数据要高,此外,有于试验规模,预设的影响因子如离子浓度的选择主要是从稻米的背景值考虑,未测试产生离子胁迫的浓度边际,这需要在以后的研究中加以完善。

参考文献

[1] 李钟庆, 杨晓曦, 郭芳. 综观红曲与红曲霉[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 1-12.

[2] 李昭蓉. 漫谈红曲菌[J]. 食品工业(台湾), 1997, 29(2): 33-39.

[3] 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.

[4] 朱效刚, 许赣荣. 红曲的保健功能及产品开发趋势[J]. 食品研究与开发, 2005(3): 128-130.

[5] 李永波, 宋丽莎, 肖国学, 等. 高产红曲色素菌株筛选[J]. 黔南民族师范学院学报, 2010, 30(6): 43-47.

[6] 杨宁, 郭红珍, 郝林. 山西老陈醋大曲红曲霉分离鉴定及生物学特性研究[J]. 山西农业大学学报, 2006(1): 1-2.

[7] 徐力文, 周天雄, 杨美林. 蜡蚧轮枝菌昆明菌株生物学特性研究(三): 紫外线对菌株分生孢子萌发率的影响[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(3): 394-395.

[8] 赵永霞, 周礼红, 黄艳婷, 等. 光照对红曲霉形态、孢子及色素的影响研究[J]. 酿酒科技, 2012(9): 42-45.

[9] 杨成龙, 杨晓君, 邓思珊, 等. 几种维生素对红曲霉 S 产色素的影响[J]. 福建农业学报, 2014, 29(3): 266-270.

[10] 冯宏, 王艳霞, 李永涛, 等. 重金属对溶磷黑曲霉生长的影响[J]. 广东农业科学, 2010(6): 200-202.