

界面上红曲霉的生长及 Monacolin K 的产生*

赵树欣 陈 云 许春英 贾士儒

(天津科技大学食品科学与生物工程学院,天津 300222)

摘 要 采用界面培养方法,对红曲霉的生长及其代谢产物的生成进行了研究。结果表明,采用界面培养方法,红曲霉的生物量、产量与温度的关系,同以大米为基质的固态发酵过程相似。这说明以界面培养法来简化传统的固态发酵过程是合理的。在界面上,红曲霉仍表现为顶端生长,在恒温条件下可获得比变温培养多的菌体量及色素,但变温培养可获得较多的 Monacolin K。

关键词 红曲霉,界面培养,Monacolin K

自日本学者远藤^[1]在红曲霉代谢产物中发现 Monacolin K(简称 MK)——一种高效胆固醇合成抑制剂以来,关于培养红曲霉生产 Monacolin K 的研究一直方兴未艾。我们曾对红曲霉液态与固态发酵进行过较详细的研究^[2,4],文中报道的是采用界面培养方法培养红曲霉生产 MK。所谓界面培养(interface culture)是指将微生物在气-液、液-液、液-固或气-固两相界面上进行培养的方法^[6],它是指丝状菌生长在多孔膜表面,暴露在空气中,膜的另外一面与固体或液体培养基接触进行培养的方法。采用界面培养,是为了模仿传统固态发酵过程,进而研究固态发酵过程中的微生物反应变化。为此,文中通过界面培养,研究了温度和湿度等因素对红曲霉发酵过程中的形态变化以及对产物生成的影响,并探讨了其相互关系。

1 材料与方法

1.1 菌 种

红曲霉 TQ-57,天津科技大学酿造研究室保藏。

1.2 培养基

斜面培养基:麦芽汁(糖度 12°Brox)加 2%琼脂。

膜面培养基:麦芽汁(糖度 12°Brox)加

2%琼脂,倒平板($\phi 9\text{ cm}$),铺膜(celluloid)。

1.3 培养方法

1.3.1 孢子悬浮液的制备

斜面种子在 32℃ 下培养 7~10 d,用 10 mL 无菌水将孢子洗涤下来,倒入带玻璃珠的三角瓶中,用力振荡,打散孢子团粒,使之形成均匀的孢子悬浮液。滤液即为制得的孢子悬浮液。

1.3.2 膜面培养

膜面培养系统如图 1 所示。

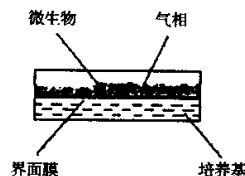


图 1 界面培养系统示意图

将孢子悬浮液接种到膜面上,每个平皿接种量为 50 μL ,采用如下条件进行培养:

- (1)恒温恒湿:温度 32℃,湿度 72%;
- (2)恒温非恒湿:温度 32℃,不控制湿度;
- (3)变温非恒湿:培养前 7 d 温度为 32℃,后期为 25℃;
- (4)变温恒湿:培养前 7 d 温度为 32℃,后期为 25℃,湿度 72%。

第一作者:学士,副教授。

*天津市自然科学基金资助项目(No. 013609911)和教育部与地方共建项目(No. GJDF03)

收稿时间 2002-09-05,改回时间 2003-03-30

每天定时取样,观察形态,定时将菌膜从玻璃纸上剥下,80℃烘干,称重,即为菌体量。

1.4 分析方法

1.4.1 生物量的测定

采用测定氨基葡萄糖含量的方法^[4]。

1.4.2 色价的测定方法^[5]

取待测样 1 g,用 10 mL 70% 体积分数的乙醇溶液浸泡 10 h,取滤液适当稀释后在 505 nm 下测吸光值。

色价 = $OD_{505nm} \times \text{稀释倍数}$

1.4.3 M K 的检测方法^[6]

称取待测样 1 g,置于 10 mL 量瓶中,加混合溶剂溶解并稀释至刻度,浸泡 10 h,过滤,洗涤滤渣后,适当稀释滤液,在 238 nm 下测吸光度。

1.4.4 形态观测方法

采用显微镜观测的方法。

2 结果与讨论

2.1 不同培养条件下生物量的变化

由于温度和空气相对湿度是影响固态发酵的重要因素,为此,考察了恒温与变温、恒湿与非恒湿等 4 种条件下膜面培养对红曲霉生长的影响(如图 2 所示)。从图 2 可以看

出 4 条曲线形状基本相似,第 10 d 生物量达到最大值。其恒温恒湿、恒温非恒湿分别达到 0.0126 g/cm^2 和 0.0123 g/cm^2 。变温恒湿、变温非恒湿分别为 0.0112 和 0.0108 g/cm^2 。改变温度(即降低温度),导致菌体生长速度下降,从而,生物量相对较低。

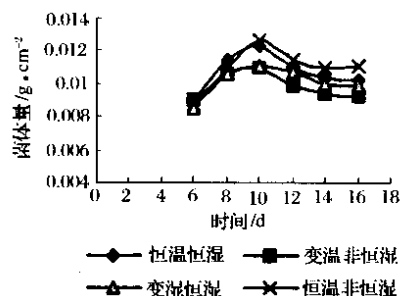


图 2 不同条件下菌体量的比较

2.2 红曲霉生长过程的形态变化

从图 3 可以看出,膜面培养初期,红曲霉的生长为顶端生长,菌丝体不断延长并交叉。培养 4 d 后,可以观察到分生孢子,孢子单个或成链状,大小约为 $(6.9 \sim 7.7) \mu\text{m} \times (8.6 \sim 9.4) \mu\text{m}$ 。培养 5 d 可以观察到子囊孢子,但数量较少。培养 6 d 子囊孢子数量增加。

图 4 为恒温恒湿条件下菌落形态变化过程。从实验结果来看,其他条件下,菌落形态

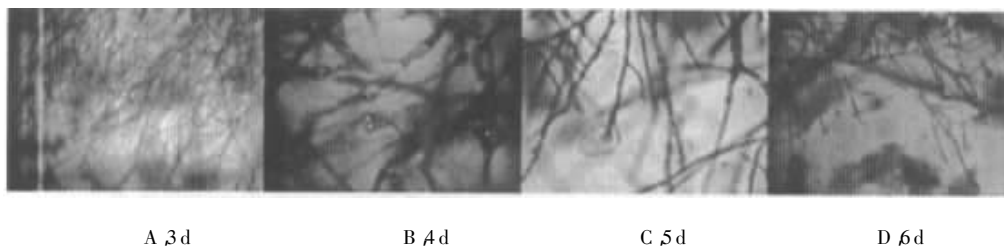


图 3 膜面培养过程红曲霉菌体形态变化

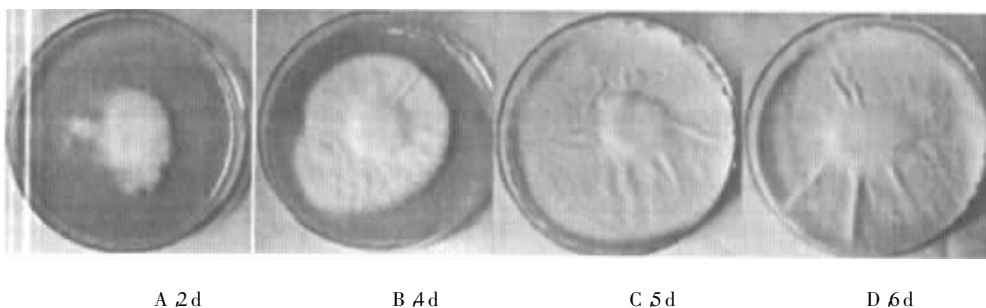


图 4 膜面培养菌落形态

的变化基本与之相同。因为第 6 到第 7 d 菌落都已长满平皿,变温是在第 7 d,所以前期形态变化相同。这也说明湿度对宏观菌落形态影响不大。

由于膜面培养初始含水量一致,这里着重探讨温度、湿度对培养过程微观形态的影响。从图 5 可以看出,红曲霉生长过程中的

形态变化。生长的前期(培养 6 d 时)不同培养条件下的菌体形态基本相同,菌丝的生长通过顶端的延伸和分叉来实现。到后期(培养 10 d 时)其微观形态有一定区别,变温条件下比恒温培养时产生的分生孢子明显增多。这可能是因为环境变化引起孢子的形成,而孢子形成与代谢抑制和 C-AMP 调节有关。

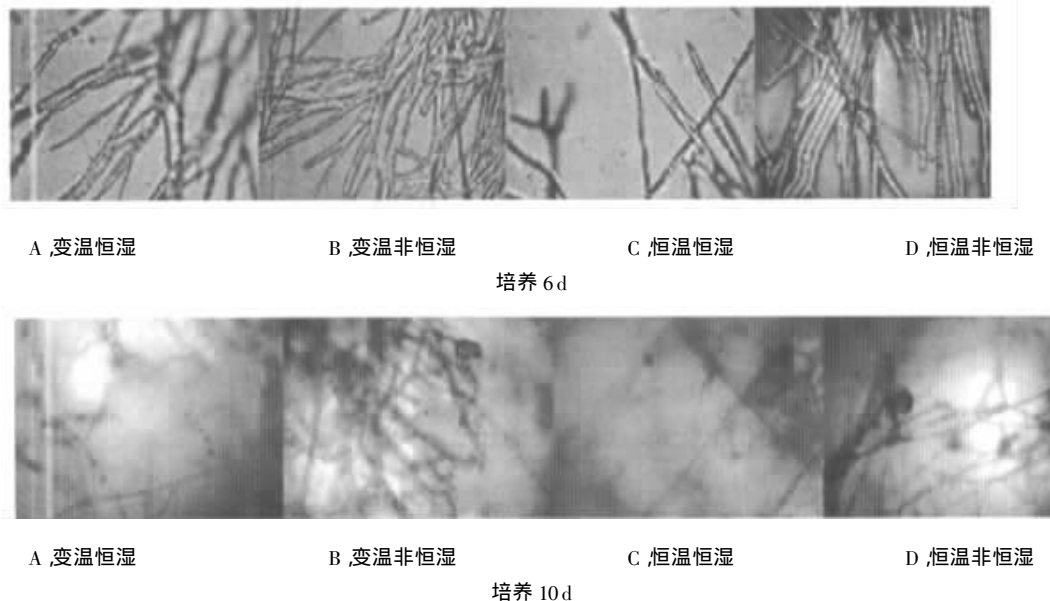


图 5 不同条件下膜面培养过程的形态

2.3 红曲霉发酵产物的分析

从图 6 中看出, M K 产量在 10 d 前增加较少,菌体生长进入稳定期后大量增加,说明此后菌体消耗基质大部分转用于形成代谢产物。到第 14 d 基本达到稳定。而且变温培养时的最终产量比恒温培养时的要高,分别为 9.0 mg/g(干菌体)和 7.4 mg/g(干菌体)。说明

25℃低温促进 M K 的积累,由此可见,温度控制对于以高产 M K 为目的的红曲霉固态发酵来说非常关键,而空气相对湿度影响不大。由图 7 可知,恒温培养时色素产量比变温 25℃培养时要高。这与常规固态发酵时一致,说明高温有利于色素的产生。从图 8 可以看出,变温培养比恒温培养条件下所产

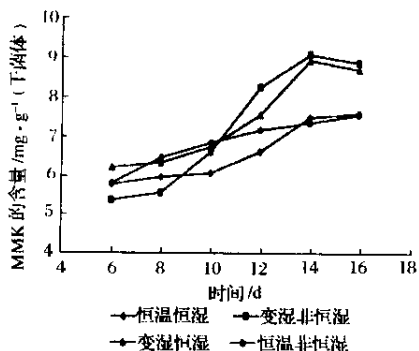


图 6 不同条件下膜面培养时 M K 产率的比较

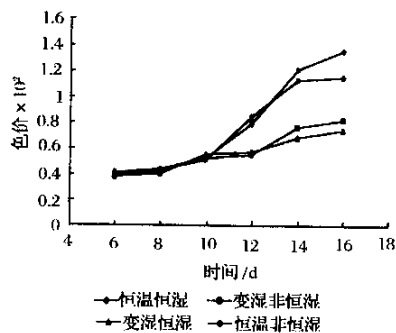


图 7 不同条件下膜面培养时色价的比较

生的孢子多。孢子的形成与 M K 和色价的量化关系还有待于进一步研究。

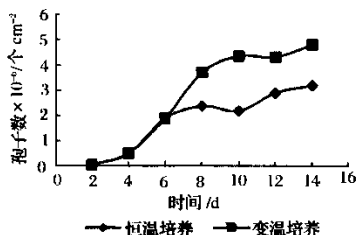


图 8 不同条件下孢子数的比较

3 结 论

由图 8 可以得到以下结论：

(1) 采取变温培养, 即 32℃ 培养 9 d 后降至 25℃ 培养到 14 d, 有利于 Monacolin K 的积累与孢子的形成, 不利于色素的生成。

(2) 采用膜面培养方法, 其生物量和产物量与温度的关系与以大米为基质的固态发酵过程一致, 这说明以膜面培养方法简化传统固态发酵过程是合理的。

(3) 膜面培养时菌体量随时间线性增长。

参 考 文 献

- 1 Endo A. J Antibiotics, 1980, 3: 334 ~ 337
- 2 张俊杰. 天津轻工业学院硕士学位论文, 1997
- 3 Jung-hae Suh, Chul Soo Shin. FEMS Microbiology Letters, 2000, (190): 26 ~ 30
- 4 路秀玲, 赵树欣. 食品与发酵工业, 2001, 27(6): 45 ~ 49
- 5 高福成. 新型发酵食品. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 15 ~ 17
- 6 张惠霞. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 60 ~ 61

Growth and Monacolin K Production of *Monascus* on Membrane Surface

Zhao Shuxin Chen Yun Xu Chunying Jia Shiru

(The College of Food and Biotechnology Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222)

ABSTRACT Cultured on membrane surface, *Monascus* showed hyphal tip growth. More biomass and less red pigment were obtained under constant temperature than under variable temperature by means of membrane surface Culture of *Monascus*.

Key words *Monascus*, membrane surface culture, Monacolin K

我国首个鸡精标准 2003 年 6 月出台

我国首个鸡精标准是由上海某调味品公司负责制定, 并将于 2003 年 6 月份出台。制定该标准的负责人透露, 在该标准中, 规定鸡精中鸡肉的含量须在 5% 以上, 其鲜味度也需比味精高 20% 以上。

中国调味品行业协会卫祥云会长说, 鸡精进入我国市场已有 12 年, 但由于没有行业标准, 造成了整个行业质量参差不齐, 出现了部分厂家欺骗消费者的现象, 只有制定统一的行业标准, 才能规范市场。

专家介绍, 鸡精含有鸡肉后, 不仅具有一定的营养价值, 其味道也比无鸡肉的调味品鲜香。目前市场上的鸡精品牌多达近百个, 一旦该标准出台, 全国符合此 2 项要求的鸡精生产企业只有十几家。

据了解, 鸡精的食用量在欧美国家占鲜味料总量的 80% 以上, 是世界上使用最广泛的鲜味料。统计资料显示, 欧美国家食用鸡精和味精的比例是 9:1, 中国香港特区的比例约是 8.5:10。日本、美国等发达国家对鸡精产品的鸡肉含量、鲜度、颗粒大小等均有明确规定。

据统计, 2002 年我国鸡精的消费量为 7 万 t, 味精的消费量为 70 万 t 左右, 鸡精对味精的取代率已达 10%, 有人预计, 在 3 ~ 5 年内, 中国鸡精的消费量每年将达到 30 ~ 50 万 t。