

红曲霉 9901 液态发酵产莫纳可林 K 的发酵条件

陈 晔 朱 华 许赣荣

(江南大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘 要 对红曲霉 9901 产莫纳可林 K 的液态发酵培养基的组成和发酵条件进行了研究, 确定出以甘油为碳源, 大豆水解液为氮源, C/N 比为 10/1 的最佳培养基组成, 得出 9901 液态法产莫纳可林 K 的最适 pH 为 4.5, 温度 26℃, 接种量为 5% (体积分数), 发酵时间 14 d。通过实验, 摇瓶发酵的莫纳可林 K 含量可以达到 1 600 mg/L, 在 15 L 小型发酵罐实验中, 莫纳可林 K 含量可达到 888.9 mg/L。

关键词 红曲霉, 莫纳可林 K, 液态发酵

1979 年, 日本的 Endo 等发现了红色红曲霉 (*M. ruber*) 能够产生强力的降胆固醇物质莫纳可林 K (Monacolin K, MK)^[1]。传统的固态发酵生产方式, 主要缺点是: 发酵周期较长, 人力投入大, 生产效率低, 生产能力和产品质量参差不齐。目前适用于功能性红曲的固态发酵设备还处于研发阶段, 还不能解决长时间发酵而可能带来的杂菌污染问题及适宜的基质水分控制问题。与传统固态发酵法相比, 液态发酵法具有规模大, 自动化程度高, 人力成本低, 生产过程中易控制杂菌污染等显著优点。作者利用红曲霉 9901 菌进行红曲发酵研究了发酵培养基、液态发酵工艺条件。

1 材料和方法

1.1 菌 种

红曲霉 9901 为本实验室保藏菌株。

1.2 培养基

斜面培养基: 土豆培养基。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 60, 蛋白胨 25, NaNO₃ 2, MgSO₄·7H₂O 1, K₂HPO₄·3H₂O 1, 玉米浆 10 mL/L, pH 5.0。

摇瓶发酵培养基 (g/L): 甘油 100, 大豆水解液 25, NaNO₃ 2, MgSO₄·7H₂O 1, K₂HPO₄·3H₂O 1, ZnSO₄·7H₂O 2, 玉米浆 10 mL/L, pH 4.5。

1.3 培养条件及方法

刮 1 环, 在将斜面培养基上生长 7 d 的菌体, 接到装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 在往复式摇床上 (行程 10 cm, 70~80 r/min) 振荡, 30℃ 下培养 2~2.5 d。

液体摇瓶发酵在 500 mL 三角瓶中进行, 装液量 100 mL, 种子液接种量为 5% (体积分数)。在往复式摇床 (行程 10 cm, 70~80 r/min) 振荡, 28℃ 下发酵 14 d。

1.4 菌体量测定方法

菌体量采用干重法测定。取一定体积发酵液, 用 3 层纸巾过滤, 清水洗涤 2 遍, 50~60℃ 烘干至恒重。菌体量计算公式:

菌体量 (g/L) = 干物质质量 (g) / 发酵液体积 (L)

1.5 发酵液中残余甘油含量的测定

发酵液中的残余甘油含量用高碘酸氧化滴定碘法测定^[4]。发酵液研磨后恢复至初始体积, 取出 5 mL, 稀释至 100 mL, 静置 10 min 后, 取用滤纸过滤部分上清液, 取 2~5 mL 滤液 (V_s, 控制其中所含的甘油量不高于 25 mg) 至 250 mL 三角瓶中, 加水 20 mL, 加入 0.023 mol/L 高碘酸钾溶液 25 mL, 静置 120 s。加入 20% 碘化钾溶液 15 mL, 6 mol/L HCl 溶液 (或 3 mol/L H₂SO₄ 溶液) 15 mL, 然后用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定, 近终点时加 2 mL 淀粉指示液, 继续滴定至溶液蓝色消失, 读取标准液消

第一作者 硕士研究生。

收稿时间 2003-07-04, 改回时间 2003-08-28

耗体积(V_1)。同时作一空白试验,读取标准液消耗体积(V_0)。

甘油含量计算公式:

$$\text{甘油含量}(\text{mg}) = (1/4) \times (V_0 - V_1) \times (20/V_s) \times M$$

式中: V_0 为空白式样消耗硫代硫酸钠溶液的体积, mL; V_1 为式样消耗硫代硫酸钠溶液的体积, mL; V_s 为被测液的体积, mL; M 为甘油分子质量 92.09。

1.6 发酵液中 MK 含量的测定

将研磨后的发酵液恢复至初始体积,调整 pH 至 6.5,量取 5 mL 发酵液,加入甲醇近 20 mL, 50°C 水浴 1 h,间歇振荡 3~4 次,定容到 25 mL。

MK 标样 酸型和内酯型分别制备。

HPLC 测定采用色谱仪: HP1100; 色谱柱: ZORBAX SB C-18, 5 μm (150 \times 4.6) mm; 流动相: V(乙腈): V(0.1% 磷酸水溶液) = 65: 35; 柱温: 28°C; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL ; 萃取液经 0.45 μm 滤膜过滤后用 HPLC 测定。

2 结果与讨论

2.1 碳源对 MK 产量的影响

选择葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、糊精、玉米淀粉、糯米粉、乳酸和甘油为碳源进行实验(见图 1)。碳源浓度 80 g/L,培养基的其他配比见 1.2 节。在以甘油作为 9901 菌种发酵的碳源时, MK 的产量远远高于采用其他碳源时的产量,但菌体量却差不多,这说明甘油很可能不仅仅对菌体的生长作贡献,更重要的是对 MK 这个次级代谢产物的合成起到积极的作用,甘油可能作为 MK 的前体物质,有可能起到其他的作用。由此确定,甘油为最佳 MK 碳源。

培养基中不同浓度的甘油对红曲霉 9901 产莫 MK 的影响情况见图 2。分别选取 60, 80, 100, 120, 150 g/L 五个浓度水平。综合考虑 MK 的产量和原料利用率,最终选用浓度为 100 g/L 的甘油作为培养基的碳源。

2.2 氮源对 MK 产量的影响

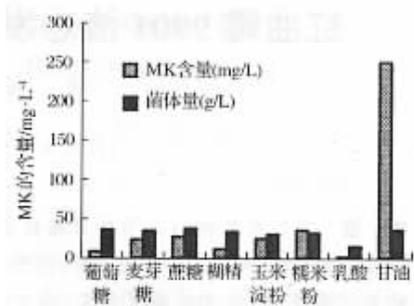


图 1 不同碳源对红曲霉 9901 产 MK 的影响

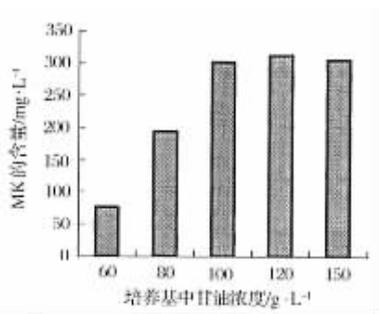


图 2 培养基中甘油浓度对红曲霉 9901 产 MK 的影响

在 100 mL 培养基中,含有 10 g 甘油, 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g K_2HPO_4 , 0.2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 玉米浆和氮源,实验测定,不同的氮源对 MK 的产量有明显影响(见图 3)。有机氮源能促进菌体的次级代谢, MK 含量相对较高,其中大豆水解液的作用最为明显。无机氮源中, NaNO_3 的效果好于 NH_4NO_3 。

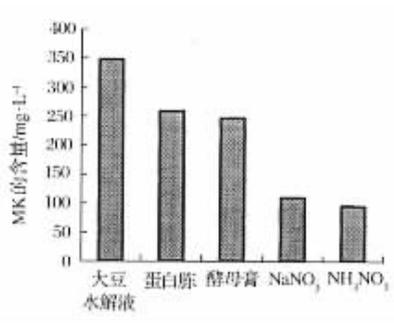


图 3 不同氮源对红曲霉 9901 产 MK 的影响

2.3 C/N 对 MK 产量的影响

在红曲发酵中, C/N 是非常重要的因素^[5]。以甘油为碳源, 大豆水解液为氮源(以大豆中含蛋白质 40% 计), 配成不同 C/N 的培养基(见表 1), 结果表明, C/N 为 10/1 时, MK 产量最高。

表 1 培养基 C/N 对红曲霉 9901 产 MK 的影响

甘油含量 /g·L ⁻¹	大豆水解液 /g(干物质)·L ⁻¹	C/N	MK 含量/mg·L ⁻¹
95	27	8.8/1	486.21
100	25	10/1	508.32
105	23	11.4/1	510.24

2.4 培养基初始 pH 对红曲霉 9901 产 MK 的影响(图 4)

在偏酸性的培养基初始条件下, MK 产量相对较高, 随着 pH 升高, 高产量逐渐下降。根据实验结果确定培养基的初始 pH 为 4.5。

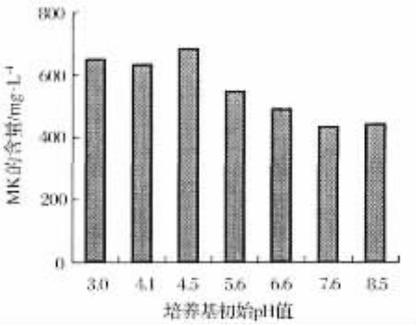


图 4 培养基 pH 对红曲霉 9901 产 MK 的影响

2.5 种子液接种量对 MK 产量的影响

接种量过小时发酵液中初始菌浓过低, 使迟滞期过长, 降低产物合成的速率。接种量过大时, 不仅引入了过多不新鲜的培养基影响正常发酵, 而且初始菌浓过大可能导致发酵初期菌体过快生长而造成的代谢产物合成阻遏现象(见表 2)。实验结果表明 5% 的接种量较为合适。

表 2 接种量对红曲霉 9901 产 MK 的影响

接种量/%	1	2.5	5	10
MK 含量/mg·L ⁻¹	247.18	521.98	610.54	587.88

2.6 温度对 9901 产 MK 的影响

温度对红曲霉 9901 产 MK 十分敏感, 在 26~32℃ 的范围内, MK 产量随着温度升高而急剧降低。在 32℃ MK 产量非常低, 26~28℃ 最为合适(见图 5)。

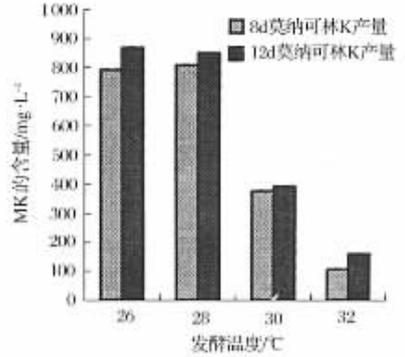


图 5 温度对红曲霉 9901 产 MK 的影响

2.7 Zn²⁺ 对红曲霉 9901 产 MK 的影响

Zn²⁺ 能极大促进红曲霉 9901 发酵产生色素和 MK。ZnSO₄·7H₂O 的添加量为 2 g/L 时, MK 产量达到最大, 添加量小于或大于 2 g/L 时, MK 的产量都相对较低(见图 6)。

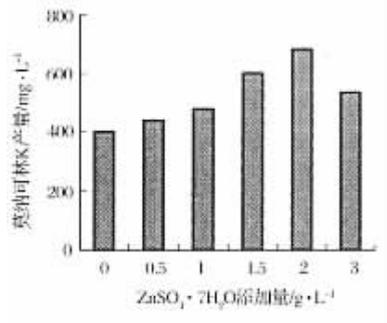


图 6 ZnSO₄·7H₂O 对红曲霉 9901 产 MK 的影响

2.8 发酵时间对 MK 形成的影响

MK 的合成随着发酵天数的增加而增加, 在后期产量的增长趋于平缓(见图 7)。在第 4~第 14 天产量迅速增加, 生产能力平均为 130.14 mg/(L·d), 第 14 天以后, MK 产量增加趋于平缓, 维持在 1600 mg/L, 第 23 天时的产量较第 17 天已略有下降。在 MK 开始快速合成之前, 菌体浓度都已经达到了最大值, 这说明 MK 的合成属于典型的次级代谢产物的合成方

式。

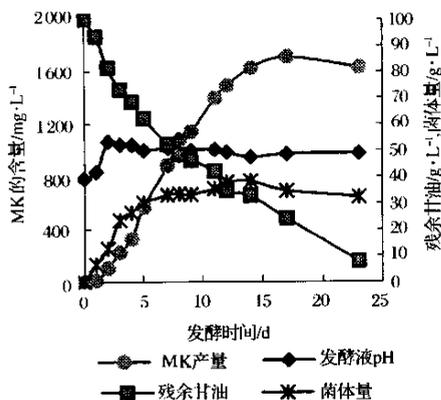


图7 摇瓶发酵红曲霉 9901 产 MK

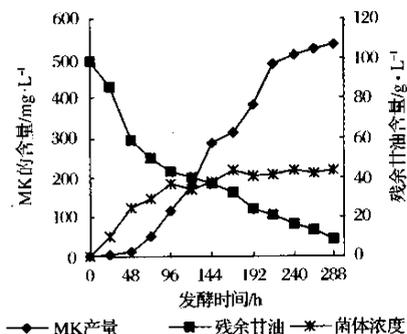
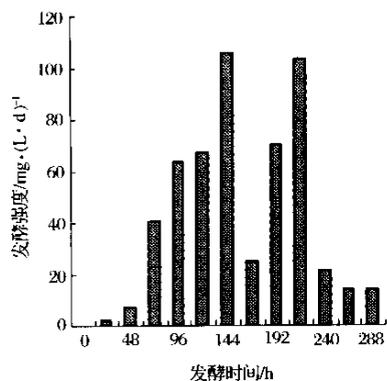


图8 15L 发酵罐的液态深层发酵过程

2.9 红曲霉 9901 液态发酵罐发酵

采取分批流加的培养方式来控制菌体的菌球形态及菌体的生长速度,可以解除底物抑制、产物反馈抑制和葡萄糖分解阻遏效应,并且可以减轻发酵前期细胞大量生长,耗氧过多,以致

通风搅拌设备不能匹配的状况。15 L 罐发酵实验结果见图 8。发酵罐初始培养基改进为:甘油 100 g/L,大豆水解液干物质 5 g/L, NaNO_3 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/L,玉米浆 10 mL/L, pH4.5,总体积 10 L。流加用大豆水解液 1L (含固形物 200 g) 3 mol/L HCl 100 mL(用以控制最高 pH7.0 以下,以防止染菌)。初始搅拌转速 150 r/min,菌球形成后逐步增加转速,4 d 后增加到 300 r/min。初始通风量为 1 L/(L·min),逐步提高到 1.6~1.8 L/(L·min),培养温度 28℃。周期为 12d 的 15L 发酵罐(初始装液量 10 L)液态深层发酵的 MK 最高产量达到了 888.9 mg/L。

3 结论

(1)以甘油为碳源,大豆水解液为氮源,C/N 为 10/1,添加 2 g/L 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,在接种量体积分数为 5%、pH 值 4.5、26~28℃ 下培养 14 d, MK 产量可以达到 1600 mg/L。

(2)在 15 L 的小型发酵罐实验中,采取分批流加的培养方式来控制菌体的菌球形态及菌体的生长速度,最终 MK 产量达到 888.9 mg/L。发酵罐培养与摇瓶培养产量相差较大,这是由于红曲霉这种丝状真菌在发酵罐中生长的模式和摇瓶条件下有着很大的不同,在发酵罐中培养时,菌体受到搅拌、剪切、通风、罐压等诸多原来摇瓶中没有的因素的影响。

(3)实验中发现,甘油作为碳源比其他碳源有着明显的优势,但是由于甘油价格昂贵,在实际生产中对经济效益会有一定的影响,因此研究甘油促进红曲霉产 MK 的机理以及寻找其他物质替代甘油将是今后工作的重点。

参 考 文 献

- 1 Endo A. Monacolin K, A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. *J Antibiotics*, 1979, 32(8): 852~854
- 2 Albert A W. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent[J]. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 1980, 77: 3957~3961
- 3 Endo A. Monacolin K A new hypocholesterole mic agent that specifcaug inhibit 3-Hydroxy methylglutaryl coszyme a redutas[J]. J Antibiotics, 1980, 33 :334~337
- 4 彭晋平,杨继红,彭新立等. 高碘酸氧化—滴定法测定甘油含量的研究[J]. 精细石油化工, 2001, 4: 67~68
- 5 姚汝华. 微生物工程工艺原理[M]. 广州:华南理工大学出版社, 1996

Liquid Fermentation of *Monascus* sp. 9901 to Produce Monacolin K

Chen Ye Zhu Hua Xu Ganrong

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

ABSTRACT Medium compositions for the liquid-state fermentation and the fermentation condition using *Monascus* sp. 9901 for producing Monacolin K were studied. The optimal initial pH of 4.5, the optimal temperature of 26°C, and the inoculum's size of 5%(v/v) were obtained. The yield of Monacolin K reached 1 600 mg/L in 500mL flasks for the flask-liquid-state fermentation and the yield of Monacolin K reached 888.9 mg/L in a 15L fermenter for the liquid submerged fermentation.

Key words *Monascus*, Monacolin K, liquid-state fermentation

信息窗

少儿多吃苦味食品好处多

人在通过食物摄取辛甘苦酸咸5种味道时,大致是平衡的。但现在少儿摄取的咸、甜之味过度,并已引发许多疾病,造成幼儿体质不佳,抵抗力下降。为了改变五味失衡状况,应给孩子吃些苦味食品。

(1)苦味可促进食欲。苦味以其清新、爽口而能刺激舌头的味蕾,激活味觉神经,也能刺激唾液腺,增进唾液分泌,还能刺激胃液和胆汁的分泌。这一系列作用结合起来,便会增进食欲,促进消化,对增强体质、提高免疫力有益。

(2)苦味可清心健脑。苦味食品泄去心中烦热,具有清心作用,使头脑清醒,使大脑更好地发挥功能。

(3)苦味可促进造血功能。苦味食品可使肠道内的细菌保持正常的平衡状态。这种抑制有害菌、帮助有益菌的功能,有助于肠道发挥功能,尤其是肠道和骨髓的造血功能,改善少儿的贫血状态。

(4)苦味可泄热、排毒。祖国医学认为,苦味属阴,有疏泄作用,对于由内热过盛引发的烦躁不安有泄热宁神之作用。泄热、通便不仅可以退烧,还能使体内毒素随大、小便排出体外,使少儿不生疮疖,少患其他疾病。

苦味食品就在日常饮食生活中,关键是注意选择,合理食用。苦味食品以蔬菜和野菜居多,如莴苣叶、莴笋、生菜、芹菜、茴香、香菜、苦瓜、萝卜叶、蔓菁、苜蓿、曲菜、苔菜等。在干鲜果品中,有苹果、杏、荸荠、杏仁、黑枣、薄荷叶等。此外还有荞麦、苡麦等。更有食药兼用的五味子、莲子芯等,用沸水浸泡后饮用更好。五味子适用于冬春季,莲子芯适用于夏季饮用。

我国军用功能食品抗核辐射技术国际领先

据报道,我国军用功能食品研究正向系列化、高能化、配套化、实用化方向发展,目前已研制出抗辐射、抗疲劳、抗中暑、抗缺氧、抗晕船的功能食品共5类10余种。

由总后军需装备研究所利用生物发酵技术研制的功能肽野战粉状流质食品,已达到基因分子水平。这种功能食品在我军东北地区进行实战演习的某应急机动作战部队官兵服用后,可以抗核辐射,并可快速补充肽类高级营养、快速修复骨骼、快速恢复体力,减少大运动量的肌肉损伤。以中药为基础研制的高能固体能量棒,在我海军、空降兵、陆军应急机动作战部队中服用后,均达到抗晕船、抗晕机、抗中暑、抗疲劳的奇效。

功能食品测试技术权威,美国佐治亚大学食品科学系黄耀文教授评价说,中国军方研制的功能食品已达到国际领先水平。