

文章编号:1009-038X(2004)01-0009-05

红曲霉菌产 Monacolin K 固体发酵条件的优化

熊晓辉¹, 张李阳², 韦策¹, 熊强¹

(1. 南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009; 2. 南京晓庄学院, 江苏 南京 210006)

摘 要: 对 *Monascus spp.* 3 的固体发酵生产 Monacolin K 的培养条件和培养基进行了优化. 考察了物料厚度、起始含水量、发酵时间、起始 pH 值等发酵条件, 以及大米培养基中添加附加碳源、氮源、磷酸盐等的影响. 结果表明, 固体发酵的培养条件为: 物料(大米)厚度在 4 cm 以下, 起始 pH 值自然, 培养温度 32 ℃, 相对湿度 60%~70%, 发酵时间为 12 d; 经单因素和正交试验得适宜的发醇培养基为: 大米 100 g, 甘油 0.2 g, 玉米浆 0.15 g, 起始含水量 50%. 且以此优化条件固体发酵培养, Monacolin K 产量稳定在 1.4 mg/g 左右, 最高产量为 1.6 mg/g.

关键词: 红曲霉; Monacolin K; 固体发酵; 优化

中图分类号: TQ 925

文献标识码: A

Optimizing Solid Fermentation of *Monascus spp.* 3 for Producing Monacolin K

XIONG Xiao-hui¹, ZHANG Li-yang², WEI Ce¹, XIONG Qiang¹

(1. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering of Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. Life Science Department of Nanjing Xiaozhuang Institute, Nanjing 210006, China)

Abstract: The medium components and fermentation conditions for the Monacolin K production by *Monascus spp.* 3 solid fermentation were studied. The operating factors, including the thickness of rice, initial water content, fermentation time, initial pH, appendant carbon and nitrogen source, and the concentration of K_2HPO_4 were investigated. The optimal fermentation conditions were determined as follow: the thickness of materials 4.0 cm; natural initial pH; culture temperature, 32 ℃; relative humidity, 60~70%; and fermentation time, 12 days. The fermentation medium was optimized by single factors and orthogonal experiments: 100 g rice, 0.2 g glycerine, 0.15 g corn steep liquor and 50% initial water content. The yield of Monacolin K was stable at about 1.4 mg/g with the highest of 1.6 mg/g under the optimized condition and medium.

Key words: *Monascus spp.* 3; Monacolin K; solid fermentation; optimization

1976 年日本学者远藤章从桔青霉(*Penicillium citrinum*)代谢产物中发现了一个能够抑制 HMG-CoA 还原酶的活性物质 ML-236B(Compactin), 它

通过可逆反应, 竞争性地与 HMG-CoA 还原酶结合, 来抑制该酶的活性, 达到抑制体内胆固醇合成的目的^[1~3]. 之后远藤章又于 1979 年从红色红曲

收稿日期: 2003-05-26; 修回日期: 2003-07-03.

基金项目: 国家化学工程与技术重点实验室开放项目(编号: 20001860)资助课题.

作者简介: 熊晓辉(1964-), 男, 江西丰城人, 副教授, 工学博士.

霉(*Monascus ruber*) 发酵液中分离出高活性的 HMG-CoA 还原酶抑制剂 Monacolin K^[3,4]. Monacolin K 不但可作为降脂药物,还具有抑制肿瘤的功能^[5,6]. Monacolin K 可以采用液体发酵和固体发酵来生产,但液体发酵法产量低(5~130 $\mu\text{g/mL}$),远低于固体发酵产量.但在工业化固体培养时,培养基和培养条件对其产量影响很大,在条件不适时产量极微,甚至不产生.因此作者对红曲霉菌(*Monascus spp.*) 固体发酵法生产 Monacolin K 进行优化,提高其产量,并使产量保持稳定.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 红曲霉菌株 *Monascus spp.* 3, 由作者所在实验室自行筛选并保存.

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基: 10°Bx 麦芽汁 1 000 L, 琼脂 20 g.

2) 孢子培养基: 小米 25 g, 水 30 mL, 装入 1 000 mL 三角瓶, 121 °C 下灭菌 60 min.

3) 固体发酵培养基: 市售大米经清洗, 在碳、氮源溶液中浸泡 24 h 后, 沥干, 121 °C 灭菌. 在发酵过程中, 调整附加碳、氮源和其他成分的种类和比例.

1.1.3 主要试剂 Monacolin K 标样, 购自美国 Merck&Sharp 公司.

1.1.4 主要仪器 LGR10- 4.2 高速冷冻离心机: 北京医用离心机厂制造; 721 型分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司制造; pH5- 3C 数字酸度计: 上海雷磁仪器厂制造; 168 泵系统高效液相色谱: Backman 公司制造; ODS C_{18} 柱: 天津特纳公司制造.

1.2 方法

1.2.1 培养方法

1) 小米孢子培养: 取活化后的斜面菌种接入孢子培养基中, 32 °C 培养 7~11 d.

2) 固体发酵: 500 mL 三角瓶装约 20 g 大米, 每瓶接种适量小米孢子, 32 °C 培养, 相对湿度为 60%~70%. 不同实验因素根据设计实施.

1.2.2 发酵产物中 Monacolin K 含量测定方法

1) 样品处理: 取固体发酵产品于 60 °C 烘至恒重, 研磨过 100 目筛, 准确称取 0.100 0 g, 置 10 mL 具塞离心管中, 加体积分数为 75% 乙醇 5.0 mL, 以超声波破碎仪处理 20 min, 于 2 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为待分析样品.

2) Monacolin K 含量测定: 采用高效液相色谱法(外标法), 色谱柱为 ODS C_{18} 柱, 流动相为 V(甲醇): V(水)(75: 25); 紫外检测器的检测波长为 238 nm; 体积流量为 1 mL/min^[7,8].

2 结果与分析

2.1 培养时间对 Monacolin K 产量的影响

加 20 g 大米于 500 mL 三角瓶中, 起始含水量为 50%, 进行 *Monascus spp.* 3 固体发酵. 每天取样测定 Monacolin K 的含量. Monacolin K 产量随时间变化的趋势见图 1.

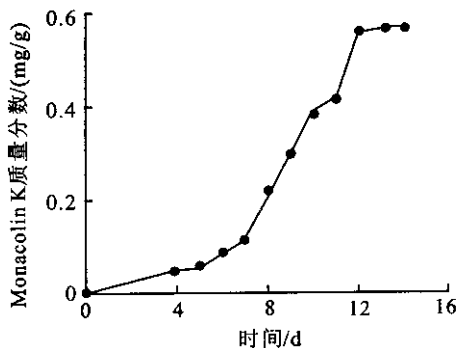


图 1 不同发酵时间 Monacolin K 的产量

Fig. 1 Time course for the Monacolin K production

如图 1 所示, 固体培养 7 d 后, Monacolin K 产量迅速增加, 12 d 后增长变慢. 实验还发现, 培养到第 4 天, 大多数米粒开始呈微红, 且粘附在瓶壁上的米粒边缘可看见红色菌丝. 从 Monacolin K 的积累量来看, *Monascus spp.* 3 固体发酵的周期以 12 d 为宜.

2.2 起始含水量对 Monacolin K 产量的影响

物料的起始含水量是影响固体发酵的主要因素之一. 考察起始含水量(相当于大米质量)为 35%, 40%, 50%, 60% 和 70% 对 Monacolin K 产量的影响. 发酵 12 d 后测定各样品中 Monacolin K 的含量, 结果见图 2. 含水量为 35% 时, 物料干硬, 菌体难以生长, 产量低, 如果发酵过程中不补充水分, 发酵产物中几乎检测不到 Monacolin K; 含水量为 70% 时, 发酵第 1, 2 天时菌体长势较好, 之后, 物料开始结团, 底部出现红色粘稠液体, 发酵产物中 Monacolin K 含量极微; 而含水量为 50% 时, 发酵过程较平稳, 不但利于菌体的生长而且 Monacolin K 产量高. 故 *Monascus spp.* 3 固体发酵起始含水量以 50% 最为合适.

2.3 物料厚度对 Monacolin K 产量的影响

向 500 mL 三角瓶中加入不同量的物料以形成不同厚度; 起始含水量为 50% 时, 发酵 12 d 后测定

各样品的 Monacolin K 含量,结果见表 1.

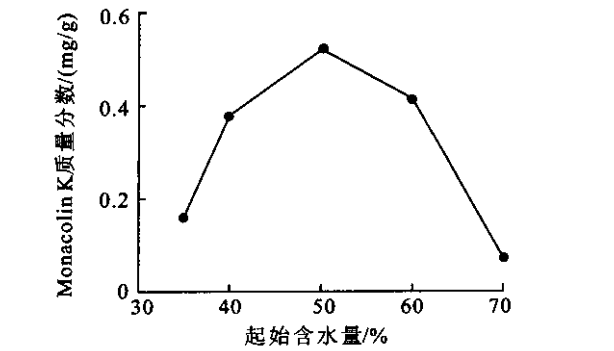


图 2 起始含水量对 Monacolin K 产量的影响
Fig. 2 Effect of initial water content on Monacolin K production

表 1 物料厚度对 Monacolin K 产量的影响
Tab. 1 Effect of the thickness of medium on the Monacolin K production

实验号	大米质量/g	物料厚度/cm	Monacolin K 产量/(mg/g)
1	20.0	1.0	0.5684
2	30.0	2.0	0.5322
3	40.0	4.0	0.4614
4	50.0	7.0	0.0863

如表 1 所示,物料厚度低于 4.0 cm 时对发酵产物中 Monacolin K 的产量影响不大,而当物料厚度大于 4.0 cm 时,发酵产物中 Monacolin K 产量明显下降. 在固体发酵过程中,微生物在生长期,尤其是处于生长旺盛期,会产生大量的发酵热. 由于物料基本处于静止状态,传热性能较差,只有当发酵产热速率小于或等于体系传热速率时,发酵体系的温度才能保持相对恒定. 当料层过厚,发酵热不能及时排除,使物料中心温度高于表面温度 5~10 ℃. 已证明过高的温度(大于 35 ℃)将抑制红曲霉生产 Monacolin K^[9]. 另外,料层过厚也不利于 O₂ 和 CO₂ 的传递. 因此,对于固体发酵生产 Monacolin K,物料厚度不应大于 4.0 cm.

2.4 起始 pH 值对 Monacolin K 产量的影响
分别调整起始 pH 值至 3.0、4.5、6.0、7.5、9.0,按上述条件进行固体发酵培养,测定 Monacolin K 产量,结果见表 2. 起始 pH 值不同,对 Monacolin K 产量影响不大,所以试验中可选用自然 pH.

2.5 接种方法对 Monacolin K 产量的影响
为了尽可能地增加接入菌体与固体培养基的接触,考察了 3 种接种方式对 Monacolin K 产量的影响. 这 3 种接种方式分别为干接(直接接入小米

孢子),粉接(将小米孢子研碎后,接入发酵培养基),湿接(将小米孢子研碎后,用少量无菌水将其全部移入发酵培养基,发酵培养基灭菌前要将这部分水量扣除),其余培养条件同上,结果见表 3.

表 2 起始 pH 对 Monacolin K 产量的影响
Tab. 2 Effect of initial pH on the Monacolin K production

实验号	起始 pH	Monacolin K 产量/(mg/g)
1	3.0	0.4862
2	4.5	0.5104
3	6.0	0.5205
4	7.5	0.4947
5	9.0	0.4950

表 3 不同接种方法对 Monacolin K 产量的影响
Tab. 3 Effect of different inoculation mode on the Monacolin K production

接种方法	Monacolin K 产量/(mg/g)
干接	0.5643
粉接	0.5441
湿接	0.3248

表 3 表明,干接与粉接这两种接入方式对 Monacolin K 产量影响不大,而湿法接入会降低它的产量. 原因是采用湿法接入的小米孢子全部粘成一团,反而没有干接时分散均匀. 所以,只要将小米孢子直接接入即可.

2.6 附加碳源对 Monacolin K 产量的影响
选择甘油、葡萄糖、麦芽糖及蔗糖为附加碳源,比较不同质量分数碳源对 Monacolin K 产量的影响,结果见图 3.

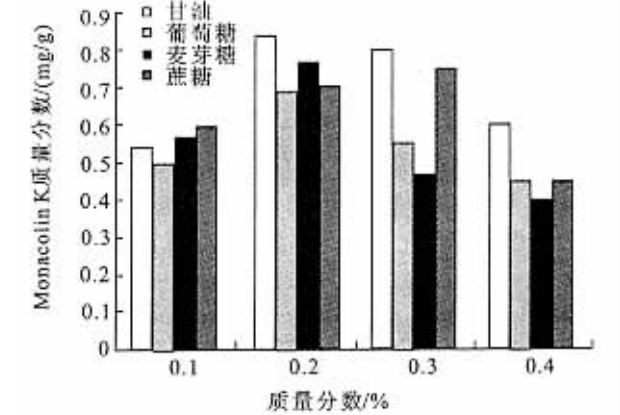


图 3 不同附加碳源及其质量分数对 Monacolin K 产量的影响
Fig. 3 Effect of different appendant carbon source and its concentration on the Monacolin K production

如图 3 所示,这几种附加碳源的加入都有利于 Monacolin K 的积累,其中以 0.2%的甘油为附加碳源时,Monacolin K 产量最高,达到0.836 4 mg/g,故选择甘油为适宜的附加碳源.

2.7 氮源对 Monacolin K 产量的影响

选取玉米浆、胰蛋白胨、NaNO₃、(NH₄)₂SO₄、草酸铵为氮源进行比较,培养条件同附加碳源,结果见图 4.

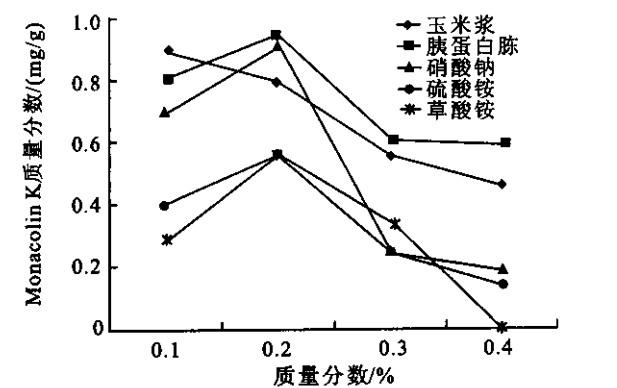


图 4 不同氮源及其质量分数对 Monacolin K 产量的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen source and its concentration on the Monacolin K production

图 4 表明,在所选择的 5 种氮源中,以玉米浆、胰蛋白胨和 NaNO₃为最好.加入质量分数为 0.1%的玉米浆,Monacolin K 产量可达 0.890 2 mg/g;加入质量分数为 0.2%的胰蛋白胨,Monacolin K 产量可达 0.948 5 mg/g;加入质量分数为 0.2%的 NaNO₃,Monacolin K 产量可达 0.903 7mg/g.显然,利用胰蛋白胨作为氮源,Monacolin K 产量最高,但考虑到胰蛋白胨的价格太高,工业生产中不宜采用;而利用 NaNO₃作为氮源,虽然价格低廉,但添加量稍有偏差,就可能使 Monacolin K 产量急剧减少,所以也不适宜采用.因而,从工业成本以及产量的稳定性来考虑,以玉米浆为氮源最好.

2.8 磷酸盐对 Monacolin K 产量的影响

磷酸盐中的磷是合成细胞的组成成分,如核酸、磷酸和辅酶的重要元素,也是霉菌发酵中通常选用的营养成分.考察了添加不同质量分数的 K₂HPO₄对 Monacolin K 产量的影响,结果见图 5.添加不同质量分数的磷酸盐反而使产量下降,不利于 Monacolin K 的积累.

2.9 培养基配比的正交试验

在单因子试验的基础上,选择了甘油、玉米浆和起始含水量 3 个影响因素,各设四水平进行正交试验,以确立培养基中各组分的质量分数及其配

比.由单因子试验可知,以质量分数为 0.2%的甘油、0.1%的玉米浆和 50%的起始含水量为最好.设计的每一因素的四水平如 L₁₆(4³)正交表所示.培养条件为:500 mL 三角瓶中加 20 g 大米,pH 自然,32 ℃培养 12 d 后测定 Monacolin K 含量,结果见表 4.

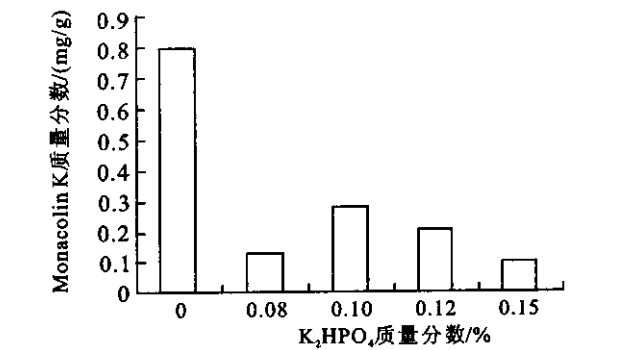


图 5 K₂HPO₄质量分数对 Monacolin K 产量的影响

Fig. 5 Effect of K₂HPO₄ concentration on the Monacolin K production

表 4 L₁₆(4³)正交设计及结果

Tab. 4 Design and results of L₁₆(4³) orthogonal experiment

试验号	A 甘油 质量 分数/%	B 玉米浆 质量 分数/%	C 起始含 水量/%	Monacolin K 产量/ (mg/g)
1	0.0	0.00	40	0.4478
2	0.0	0.05	50	0.6756
3	0.0	0.10	60	0.4846
4	0.0	0.15	70	0.0000
5	0.1	0.00	40	0.5193
6	0.1	0.05	50	0.8500
7	0.1	0.10	60	0.1748
8	0.1	0.15	70	0.4518
9	0.2	0.00	40	0.6101
10	0.2	0.05	50	0.1282
11	0.2	0.10	60	0.7647
12	0.2	0.15	70	0.9294
13	0.3	0.00	40	0.0973
14	0.3	0.05	50	0.4409
15	0.3	0.10	60	0.8509
16	0.3	0.15	70	0.9860
K ₁	1.608 0	1.674 5	2.913 4	
K ₂	1.995 9	2.094 7	3.110 3	
K ₃	2.432 4	2.275 0	1.987 4	
K ₄	2.375 1	2.367 2	0.400 7	
R	0.824 4	0.692 7	2.709 6	

正交试验结果表明,影响因子 C>A>B,即起

始含水量的影响最大,这更加说明了固体发酵中起始含水量是最关键的影响因素. 最佳培养基配方为 $A_3B_4C_2$, 这个结果基本与单因子试验结果一致,即甘油和玉米浆的质量分数以 0.2% 和 0.15% 最好,起始含水量 50% 最好. 根据以上分析,最佳的发酵培养基配方为:500 mL 三角瓶中装 20 g 大米,甘油

质量分数 0.2%、玉米浆质量分数 0.15%,起始含水量 50%;采用以上优化配方,结合最佳的培养条件进行补充试验,重复 3 次实验,结果表明,Monacolin K 产量基本稳定在 1.4 mg/g 左右,最高产量为 1.6 mg/g.

参考文献:

[1] Endo A, Kuroda M, Tusija Y. ML- 336, ML- 236B and ML- 236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*[J]. **J Antibiot**, 1976,29:1346—1348.

[2] Masao Kuroda, Kazuhiko Tanzawa, Yoshio Tsujita,*et al.* Mechanism for elevation of hepatic cholesterol synthesis and serum cholestrol levels in triton wr- 1339- induced hyperlipodemia[J]. **Biochimica Biophysica Acta**, 1977,489:119—125.

[3] Takumi K, Nobukazu T. *Manascus* koji rich in monacolin k, its manufacture, and products using the koji[J]. **Jpn Kokai Tokkyo Koho**, 2000,106:835.

[4] Endo A. Monacolin K—— A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. **J Antibiot**,1979,32:852—854.

[5] Jones K D, Couldwell W T, Hinton D R, *et al.* Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells[J]. **Biochem Biophys Res Commum**, 1994,205: 1681—1688.

[6] 张萍,糜漫天,韦娜,等. 洛伐他汀对 MCF- 7 细胞 pRb 蛋白表达及增殖功能的影响[J]. **中国公共卫生**,2002,18(10): 1198—1200.

[7] 张小茜,周富荣,石济民. 高效液相色谱法测血脂康胶囊及红曲中洛伐他汀的含量[J]. **中国中药杂志**,1997,22(40):222—224.

[8] 宋洪涛,宓鹤鸣,郭涛,等. HPLC 法对不同来源红曲中洛伐他汀的定量分析[J]. **中草药**,1999,30(2):100—102.

[9] 高嘉安,郭东,王德辉,等. 产 Monacolin K 红曲霉的筛选及发酵条件的研究[J]. **吉林农业大学学报**,1997,19(3):85—90.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 8 页)

[7] Bazile D, Prud'homue C, Bassoullt MT, *et al.* PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system[J]. **J Pharm Sci**, 1995, 84(4):493—498.

[8] Damage C, Vonderscher J,Marbach P, *et al.* Poly(alkylcyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin[J]. **J Pharm Sci**, 1997, 86(2):1403—1409.

[9] V D Athawale, V Lele. Syntheses and characterization of graft copolymers of maize starch and methacrylonitrile[J]. **Carbohydr Polym**, 2000, 41:407—408.

[10] Kantor T G. Summary: Ibuprofen-past,present, and future [J]. **Am J Med**,1984, 77(1A):121.

(责任编辑:李春丽)