

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0043 - 05

红曲霉菌 9903 发酵工艺条件对色素及 桔霉素生产的影响

顾玉梅, 许赣荣, 陈 蕴, 刘绍艳, 徐人敬
(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要:筛选到一株高产色素、低产桔霉素的红曲霉菌 9903,并鉴定该菌种为红曲红曲菌。为提高色素含量、降低桔霉素含量,对该菌的发酵培养基成分进行了研究,通过三因素三水平正交实验得到了摇瓶最佳培养基配方,在 10 L 的自动发酵罐实验中,以玉米淀粉和谷氨酸单钠盐为主要成分的发酵液色价达到 184 U/mL,桔霉素质量浓度低于 1 mg/L。发酵动力学的初步研究表明,色素及桔霉素的生产与菌体生长有一定的偶联关系,而且桔霉素在发酵后期有一定程度的降解。此外,溶氧条件对红曲霉产色素和桔霉素的影响的初步研究表明,高溶氧对色素和桔霉素的生产都有促进作用。

关键词:红曲霉;色素;桔霉素;液态发酵;发酵工艺条件优化

中图分类号:TS 261.12

文献标识码:A

Influence of Fermentation Environmental Conditions on the Production of Pigments and Citrinin by *Monascus anka* 9903

GU Yu-mei, XU Gan-rong, CHEN Yun, LIU Shao-yan, XU Ren-jing
(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A strain of *Monascus anka* 9903 was found to produce high level of pigments and low level of citrinin. Medium compositions for fermentation of *Monascus anka* 9903 were studied, aiming at promoting pigments production and inhibiting citrinin production. The medium based on corn starch and glutamate as carbon and nitrogen sources, supplemented with minerals was proved to be the optimal, resulting in the highest pigments production (184 U/mL) and less citrinin production (less than 1 mg/L) as revealed by orthogonal experiment of the composition of the culture media and submerged fermentation in a 10 L fermentor. The production of pigments and citrinin is considered to be associated with cell growth, but the citrinin is degraded in the late fermentation phase to some extent. Higher concentration of dissolved oxygen promoted both pigment and citrinin production.

Key words: *Monascus anka*; pigment; citrinin; submerged fermentation; optimization of fermentation conditions

中国利用红曲霉已经有上千年的历史,红曲霉菌生产的天然色素,具有着色性能好、色调丰富等

收稿日期 2001 - 09 - 11; 修订日期 2001 - 12 - 07.

作者简介:顾玉梅(1976 -),女,江苏张家港人,发酵工程硕士研究生.

万方数据

特点,由于化学合成色素有毒副作用,用天然红曲色素代替合成色素用于食品、化妆品、药品的着色,已成为发展趋势^[1]。

由于红曲霉菌不仅生产色素,也产生真菌毒素桔霉素。近几年来,法国学者 P J Blanc 等在红曲霉的液态发酵色素与真菌毒素桔霉素方面发表了一系列的研究论文^[2~5]。目前国内外的研究注重于以葡萄糖和谷氨酸为主要碳氮源的合成培养基条件下,色素与桔霉素的性质,以及桔霉素分析方法方面的研究^[6~10]。在我国,液态发酵红曲技术已相当成熟^[11],除了在红曲霉菌种的诱变,获得高产色素菌种方面有重大突破外,在发酵培养基方面,采用以豆饼粉和淀粉为主要氮碳源的复合培养基及优化发酵工艺条件,在提高色素产量等方面都取得了重要的成果,并已应用于生产^[12]。但在液态发酵中色素与桔霉素的关系方面的研究还较少,尤其是在如何提高色素产量的同时,降低桔霉素的含量方面研究得更少,作者就此进行了一系列研究。

1 材料和方法

1.1 菌种及培养

红曲霉 *Monascus spp* 9903,作者所在实验室保藏。菌种鉴定方法,按文献[3]进行。将菌株接于培养基平板上,25℃下培养 7 d 后观察菌落色泽、大小、结构、质地,并于显微镜下观察菌丝、子囊孢子、分生孢子等。

1.2 培养基

1.2.1 麦芽汁琼脂培养基 15° 麦芽汁 80 g/L,琼脂 15 g/L。

1.2.2 PDA 培养基 200 g 新鲜马铃薯,加水煮并取汁制成 1 L 葡萄糖 20 g/L,琼脂 15 g/L。

1.2.3 G25N 培养基 NaNO_3 3 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, KCl 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L,酵母膏 5 g/L,琼脂 15 g/L,琼脂融化后再加入分析纯甘油,加入比率为培养基质量的 25%。

1.2.4 CYA 培养基 NaNO_3 3 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, KCl 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L,酵母膏 5 g/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 15 g/L。

1.2.5 MSG 合成培养基 葡萄糖 50 g/L,味精 5 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, K_2HPO_4 5 g/L, KH_2PO_4 5 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L。

1.2.6 YES 培养基 酵母膏 10 g/L,蔗糖 50 g/L。

1.3 红曲霉培养方法

1.3.1 红曲霉种子培养 装液量 50 mL(250 mL 的

三角瓶),接种量为 3 环, $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$, 往复摇床 100 r/min,培养 4~5 d。

1.3.2 红曲霉三角瓶培养 装液量 100 mL(500 mL 的三角瓶),接种量 5%, $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$, 往复摇床 100 r/min,培养 7 d。

1.4 分析方法

1.4.1 色价测定方法

发酵液研磨后,用移液管取少量发酵液用 70% (体积分数)乙醇萃取,0.5 h 后过滤,稀释,以 70% (体积分数)乙醇做空白对照,日立 UV3000 分光光度计上扫描。色价计算公式:

$$\text{色价(CV)} = \text{OD}_{505} \times \text{稀释倍数}$$

1.4.2 桔霉素测定方法

发酵液经研磨后用磷酸溶液调 pH 值至 3.0,过滤。滤液经微滤后用于 HPLC 分析,测桔霉素含量。

HPLC 色谱条件 流动相:V(去离子水,用磷酸调 pH 3.0):V(甲醇) = 47:53;高压液相色谱仪:HP 1100,荧光检测 $\lambda_{\text{ex}} = 331 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$;色谱柱:5 μm Edopse XDB Reversed-phase C_{18} 柱长及柱径:250 mm $\times$ 4.6 mm;体积流量:1.0 mL/min;温度:28 $^\circ\text{C}$;上样量 标准样及样品均为 20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选和红曲霉 *Monascus spp* 9903 菌种鉴定

采用作者所在实验室保藏的部分红曲霉菌种,测定摇瓶发酵液的色价和桔霉素含量,发现在液态发酵中红曲霉产桔霉素比较普遍,红曲发酵液的色价及桔霉素的产量与菌种有很大的关系,其中 *Monascus spp* 9903 菌株,色素产量最高,所测的几个典型波长下的色价计算值均高于其它红曲霉菌。而桔霉素含量不高,是一株较理想的工业化生产菌株。红曲霉 *Monascus spp* 9903 在 4 种不同培养基上的形态特征见表 1。

培养的红曲霉菌落的光学显微镜特征为:菌丝有不规则分支,菌丝中有间隔,有橙红色颗粒,分生孢子圆形,2~3 个成链状排列于菌丝顶端,子囊果和子囊孢子橙红色,参考李钟庆等提出的红曲菌属的分类方法^[13],初步鉴定 *Monascus spp* 9903 为红曲红曲菌,即 *Monascus anka* Nakazawa et Sato。

2.2 氮源对色素及桔霉素的影响

酵母浸出物和蔗糖培养基(YES)常用来检测真菌是否产真菌毒素。在此,作者比较了 YES 培养基及几种有代表性的氨基酸为氮源的培养基色素及桔霉素的产生情况。结果见表 2。

表 1 红曲霉 *Monascus spp* 9903 在不同培养基上的形态特征

Tab.1 The Morphological characteristics of *Monascus spp* 9903 on different culture media

培养基	培 养 特 征
麦汁	2.0~3.0 cm,背面紫红色,多皱,辐射不明显,正面红色,中央多毛.
PDA	2.5~3 cm,背面紫红色,菌落边缘不规则,正面红色.
G25N	不生长.
CYA	3.0~3.5 cm,背面红-紫红色,正面同色,无毛,规则.

表 2 不同氨基酸情况下色素及桔霉素的生产

Tab.2 Effects of different aminoacids on pigments and citrinin production

氮源	色 价/(U/mL)				桔霉素质量浓度/(mg/L)	色价值与桔霉素质量浓度数值比
	505 nm	470 nm	370 nm	410 nm		
谷氨酸	25.31	16.62	26.50	18.36	0.565	44.8
组氨酸	28.33	17.56	27.54	20.11	0.386	73.4
YES	8	-	-	-	4.77	1.7

从表 2 可看出,YES 培养基确实最易产生桔霉素.这可能是 YES 培养基中的酵母浸出物含有大量的其它氨基酸,而某些氨基酸的代谢产物容易转化为桔霉素.单一氨基酸为氮源时,产桔霉素明显少于 YES 培养基的.组氨酸为氮源的,与谷氨酸为氮源的相比,色素产量增加 11.9%,桔霉素产量则是谷氨酸为氮源的 68%.故组氨酸应是最理想的氮源,但由于组氨酸价格较高,从工业化生产的角度看,仍是以谷氨酸为最佳氮源.

工业化生产常用豆饼粉等氮源,作者有选择地比较了几种氮源配方.最终选定的氮源组合为(g/L):A 谷氨酸单钠盐 5;B 谷氨酸单钠盐 3.5+豆饼粉 1.5;C 硝酸钠 5;D 谷氨酸单钠盐 3.5+蛋白胨 1.5;E 氯化铵 5;F 硝酸钠 3+豆饼粉 2.

氮源以外的其它成分同 MSG 合成培养基.经液态三角瓶发酵,色素含量及桔霉素含量的结果见表 3.可见,培养基 A 和 B 以谷氨酸为唯一氮源或主要氮源,其发酵液中 505 nm 及 516 nm 处所测色价均较高,桔霉素含量与其它氮源的基本持平.培养基中含少量的蛋白胨对红曲霉产桔霉素有较大的刺激作用.考察色素(吸收峰对应波长为 505 nm)和桔霉素的数值比,谷氨酸单钠盐是比较理想的氮源.

豆饼粉为氮源的培养基,发酵液中桔霉素的含量,与蛋白胨为氮源的培养基相比较低.以无机氮源的培养基,色素产量均较低,桔霉素含量与谷氨酸为氮源的基本持平.值得注意的是,在培养基 E(氯化铵)的发酵液中,没有黄色素(390 nm 左右所测 OD 值),但有紫色素(516 nm 左右所测 OD 值),由于紫色素实际上是橙色素(红曲玉红素和红斑红曲素)中的 pyronoid 环的氧原子被氨基(如来自谷氨酸)取代后的产物,而氯化铵中存在铵离子,故发酵液中可测出紫色素.

表 3 不同氮源对红曲霉产色素和桔霉素的影响

Tab.3 Effects of nitrogen source on pigments and citrinin production

氮源	色 价/(U/mL)			桔霉素质量浓度/(mg/L)	色价值与桔霉素质量浓度数值比
	505 nm	519 nm	392 nm		
A	95.90	108.10	106.0	7.09	13.53
B	90.80	101.85	73.20	7.60	11.95
C	31.90	36.85	22.6	4.40	7.24
D	85.0	96.10	77.80	20.64	4.12
E	51.42	70.61	0	9.54	5.39
F	65.05	0.1426	57.75	4.08	15.93

2.3 碳源对色素及桔霉素产量的影响

选择葡萄糖、米粉、玉米淀粉为研究对象,并考察了米粉和玉米淀粉液化后的效果.碳源质量浓度 50 g/L,其余成分同 MSG 合成培养基,结果见表 4.

表 4 不同碳源对红曲霉产色素和桔霉素的影响

Tab.4 Effects of carbon source on pigment and citrinin production

碳源	色 价/(U/mL)			桔霉素质量浓度/(mg/L)	色价值与桔霉素质量浓度数值比
	505 nm	519 nm	392 nm		
葡萄糖	74.46	78.58	104.52	7.26	10.26
米粉	89.83	93.84	89.01	28.56	3.14
玉米淀粉	172.30	186.42	192.13	7.91	21.78
液化米粉	64.56	66.08	69.26	8.39	7.69

当采用葡萄糖或蔗糖为碳源时,葡萄糖为碳源的色素产量明显高于蔗糖为碳源的色素产量.而相对于葡萄糖,采用玉米淀粉原料能较大地刺激色素的生产,可能是玉米淀粉中含有有利于菌体生长的维生素,能使红色素产量提高到 231%,而对桔霉素的产生基本没有刺激作用.米粉对桔霉素的产生有较

大的刺激作用.因此,玉米淀粉为比较理想的碳源.

2.4 培养基成分的三因素三水平正交实验

选择碳源、氮源、ZnSO₄ 为考察因素,其余成分同 MSG 合成培养基.考察指标为 505 nm 所测色价和桔霉素质量浓度的比值.因素及水平的安排见表 5,实验方案和结果见表 6.

表 5 因素水平表

Tab.5 Factors and levels in orthotropic experiment			
因 素	水 平		
	1	2	3
A 玉米淀粉	3	5	7
B 谷氨酸单钠盐	0.7	0.3	0.5
C ZnSO ₄	0.05	0.03	0.07

表 6 正交实验结果

Tab.6 The results of the orthotropic experiment						
实验号	玉米淀粉 质量分数	谷氨酸单钠盐 (MSG)质量分数	ZnSO ₄ 质量分数	色价/ (U/mL)	桔霉素质量 浓度/(mg/L)	色价值与桔霉素 质量浓度数值比
1	1(3%)	1(0.7%)	1(0.05%)	129.95	27.33	4.75
2	1(3%)	2(0.3%)	2(0.03%)	139.15	8.19	16.99
3	1(3%)	3(0.5%)	3(0.07%)	120.25	17.04	7.06
4	2(5%)	1(0.7%)	2(0.03%)	148.65	12.92	11.50
5	2(5%)	2(0.3%)	3(0.07%)	129.15	4.91	26.30
6	2(5%)	3(0.5%)	1(0.05%)	156.15	9.21	16.95
7	3(7%)	1(0.7%)	3(0.07%)	207.0	20.00	10.35
8	3(7%)	2(0.3%)	1(0.05%)	81.85	6.44	12.71
9	3(7%)	3(0.5%)	2(0.03%)	152.50	11.09	13.75

正交实验数据处理 :以因素 A (玉米淀粉)为 例 :

$$K_1 = 4.75 + 16.99 + 7.06 = 28.80,$$
$$k_1 = K_1/3 = 9.61$$
$$K_2 = 11.50 + 26.30 + 16.95 = 54.75,$$
$$k_2 = K_2/3 = 18.25$$
$$K_3 = 10.35 + 12.71 + 13.75 = 36.81,$$
$$k_3 = K_3/3 = 12.27$$
$$R = \max(k_1 \ k_2 \ k_3) - \min(k_1 \ k_2 \ k_3) = 18.25 - 9.61$$
$$= 8.64$$

K 值	A	B	C
K ₁	28.80	26.60	34.41
K ₂	54.75	56.00	42.24
K ₃	36.81	37.76	43.71
k ₁	9.61	8.87	11.47
k ₂	18.25	18.67	14.08
k ₃	12.27	12.59	14.57
R	8.64	9.80	3.10

比较 3 种因素的极差 R,B 的极差最大,其次是 A,C 的极差最小,说明氮源含量对红色素色价值与桔霉素质量浓度的比值影响最大,其次是碳源的比例,而硫酸钾在实验中的变化范围内的影响不是很

大,在这次实验中并没有得出明显的结果,有待于进一步研究.根据实验的结果,选择最佳因素水平为 A₂B₂C₁,即玉米淀粉 5%,谷氨酸单钠盐 0.3%,ZnSO₄·7H₂O 0.05%,以此作为本实验条件下的最佳培养基配方.由于小型发酵罐溶氧条件等的限制,目前还不能作为大生产的最佳配方.

2.5 红曲霉菌种 9903 液态深层培养

采用正交实验所得的最佳培养基配方,进行了深层培养,发酵罐条件如下:10 L 的自动发酵罐,通风量 20 L/min,培养温度 32 ℃,转速 200 r/min,接种量 5% 培养 7 d.结果如图 1 所示.可见,红曲霉的生长过程大致可以分为 3 个阶段:生长停滞期(0 ~ 50 h),在这个阶段菌体量、色价值、桔霉素质量浓度都基本没有增长;第二个阶段,菌体干重迅速增加(50 ~ 150 h),同时色素产量也伴随着菌体生长迅速提高,而桔霉素则经历了迅速产生,又降低的过程;最后一个阶段(150 ~ 180 h),菌体干重的增加缓慢,而色素产量依然有较大程度的增加.可见,在前期桔霉素的产生与菌体生长基本同步,但在后期,可能是桔霉素被降解,发酵液中桔霉素明显下降,而色素含量持续增加,说明色素的生产与菌体的生长有一定的偶联,而菌体生长和桔霉素生产在前期是相偶联的,但在后期则可能是被降解掉.最终发酵液的色价为 184 U/mL,桔霉素质量浓度为 0.82 mg/L.发酵液经冷冻干燥后,所得产品色价为 3044.25

U/g,桔霉素质量分数 13.57 mg/kg.

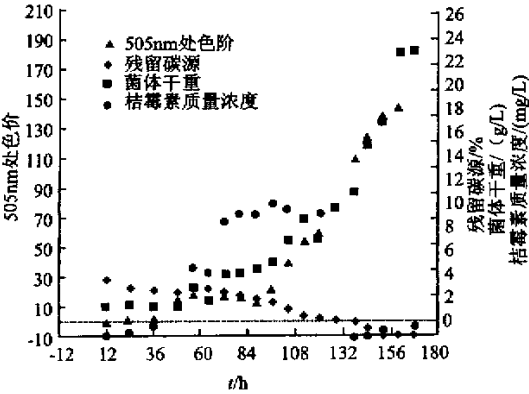


图 1 红曲霉菌种 9903 发酵曲线

Fig.1 Time course of *M. sp* 9903 fermentation in a 10 L fermentor

2.6 液态发酵中溶氧水平对色素及桔霉素产量的影响

红曲液态发酵是好氧发酵,因此溶氧水平是个重要的参数,它直接影响发酵产物尤其是次级代谢产物色素和桔霉素产量.作者对溶氧条件对红曲霉产色素和桔霉素的影响进行了初步的研究.通过改变通风量与搅拌转速形成高、低两种不同水平的溶氧条件,考察红曲霉在这两种不同的溶氧条件下产色素和桔霉素的情况,结果见图 2.

主要条件为菌种 :*Monascus sp* WM951 ;发酵

温度 32 ℃ 接种量 4% ;发酵时间 90 h ;低溶氧的通风量 15 L/min,搅拌转速 160 r/min ;高溶氧的通风量 30 L/min,搅拌转速 200 r/min .

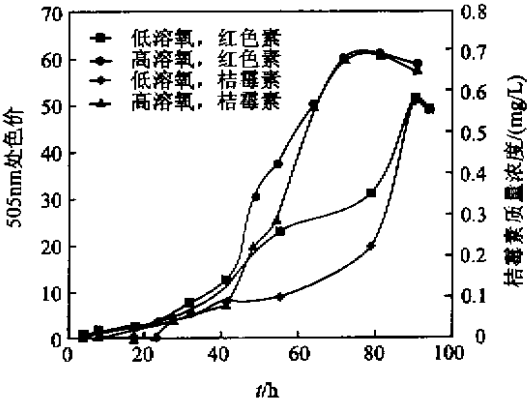


图 2 不同溶氧对红曲霉产色素和桔霉素的影响

Fig.2 Effects of dissolved oxygen on pigment and citrinin production by *Monascus spp.* WM951 in a 20-L fermentor

由图 2 可知,低溶氧情况下,产色素与桔霉素的最高峰时间明显滞后于高溶氧情况下,两种产物的最终产量也明显低.可见溶氧对红曲发酵产桔霉素与色素的影响是较大的.降低深层发酵中的溶解氧,可以降低桔霉素的产量,而同时色素的产量也降低.桔霉素伴随色素的同时生成,几乎同时达到顶峰后,稍有降低.可以认为红曲色素与桔霉素的产生具有一定的关联性.这是因为红曲霉的这两种代谢都是走聚酮体途径,其前体都是四酮体.

致谢 本课题得到华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室的经费资助.在此特表谢意.

参考文献 :

[1] BLANC P J, LORET M O, SANTERRE A L, *et al.* Pigment of *Monascus* [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59 : 4 - 9.

[2] BLANC P J, LAUSSAC J P. Characterization of Monascidin A from *Monascus* as citrinin [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 27 : 201 - 213.

[3] BLANC P J, LORET M O, GOMAN G. Production of citrinin by various species of *Monascus* [J]. *Biotechnology Letters*, 1995, 17 (3) : 291 - 294.

[4] PASTRINA L, BLANC P J. Production of citrinin by *Monascus* Tuber submerged culture in chemically defined media [J]. *Acta Biotechnol*, 1996, 16 (4) : 315 - 319.

[5] HASSA Hajjaj, ALAIN Klaebe, MARIE O. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus* rubber as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, (1) : 311 - 314.

[6] 李云, 阎雪秋, 李枚枚, 等. 红曲与桔霉素 [J]. *食品与发酵工业*, 26 (3) : 82 - 86.

[7] 许赣荣, 傅金泉. 红曲产品在欧洲的合法地位、菌种分类及有害物质桔霉素 [J]. *酿酒科技*, 1998, (6) : 16 - 18.

[8] 许赣荣. 浅谈红曲霉桔霉素 [J]. *酿酒科技*, 1999, (3) : 20 - 22.

[9] 赵海, 戚田胜. 红曲中桔霉素含量的简便快捷测定 [A]. 东方红曲国际学术研讨会, 北京, 2000.

[10] 李云, 张茂良. 红曲中桔霉素的含量检测和减少方法的研究 [A]. 东方红曲国际学术研讨会, 北京, 2000.

[11] 刘松青. 液态发酵工业化生产红曲色素的研究 [J]. *食品工业*, 1995, (3) : 15 - 18.

[12] 杨晓嫩. 红曲霉深层发酵法生产红曲红 [A]. 东方红曲国际学术研讨会, 北京, 2000.

[13] 李钟庆, 郭芳. 红曲菌属的分类 [A]. 东方红曲国际学术研讨会, 北京, 2000.

(责任编辑 朱 明, 秦和平)