

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0289 - 03

红曲霉发酵产胞外多糖工艺的优化

赵振锋 , 方惠英 , 诸葛健

(江南大学 教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要 :研究了碳源、氮源和无机盐对红曲霉 Y-7 产多糖的影响 ,优化并确定了产胞外多糖的培养基组成 :麦芽糖 60 g/L ,蛋白胨 2.5 g/L ,磷酸二氢钾 4 g/L ,硫酸镁 0.5 g/L ,氯化钙 0.6 g/L .研究了油脂对胞外多糖的影响 ,并确定棕榈油的添加量为 0.2 g/dL .在 500 mL 的三角瓶装培养基 75 mL ,接种量 15% ,种子液种龄 24 h ,培养温度 33 ℃ ,摇床转速 220 r/min ,培养 96 h .在上述条件下生物量干重为 1.42 g/dL ,发酵液胞外多糖产量可达 3.24 g/L ,比初始条件高出 2.5 倍 .

关键词 :红曲霉 ;多糖 ;优化

中图分类号 :TQ 93

文献标识码 :A

The Fermentation Condition of *Monascus spp.* for Extracellular Polysaccharides

ZHAO Zhen-feng , FANG Hui-ying , ZHUGE Jian

(The Key laboratory of industrial biotechnology under Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract :One strain Y-7 of monascus which can produce extracellular polysaccharides was obtained in our lab . The effects of carbon source , nitrogen source and inorganic salts on the production of extracellular polysaccharides were investigated , and the optimized culture medium was obtained . The medium contained maltose 60 g/L , peptone 2.5 g/L and potassium dihydrogen phosphate 4 g/L , bitter salt 0.5 g/L , calcium chloride 0.6 g/L . Furthermore , the effects of palm oil , and oleic acid on extracellular polysaccharides were researched , the optimized amount of the palm oil is 0.2 g/dL . The optimized conditions were as followings : culture volume 75 mL in 500 mL flask , inoculated volume 15% , shake culture 24 h , 33 ℃ . Under these conditions , the yield of extracellular polysaccharides of mutant Y-7 was 3.24 g/L , which was one and half times higher than the yield under original conditions .

Key words : *Monascus spp.* ; polysaccharides ; optimize ;

红曲是我国“药食同源”的典型代表 ,其药用价值在《本草纲目》、《兽医本草》、《医林纂要》、《天工开物》中都有记载 . 具体功效有 (1) 杀菌防腐 , 解毒 (2) 消食、活血、健脾、燥胃等 . 现代生化实验也证明红曲霉对多种细菌和病原菌有抑制作用 , 从红

曲霉中发现了多种生理活性物质 , 如降血压活性物质 Monacolin K、降血糖活性物质等 .

功能性多糖是目前世界研究的热点之一 . 目前已经发现功能性多糖具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、增强免疫等多方面功能 . 作者在对红曲的研究中 ,

收稿日期 2001 - 11 - 22 ; 修订日期 2002 - 01 - 25 .

作者简介 : 赵振锋 (1974 -) 男 , 河南郑州人 , 发酵工程硕士研究生 .

万方数据

筛到一株红曲霉 Y-7,该菌具有产胞外多糖能力,并证明该多糖具有明显的生物活性.有关红曲霉胞外多糖的研究,目前尚未见文献报道.

1 材料与方法

1.1 菌种

由作者所在实验室对红曲菌种 M-34 进行 C_{60} 诱变得到.

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 种子培养基 葡萄糖 70 g/L,蛋白胨 30 g/L, $NaNO_3$ 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L,消泡剂 1~2 滴,自然 pH.

1.2.2 斜面培养基 麦芽汁 10 °Bx 琼脂 20 g/L.

1.2.3 基础培养基 葡萄糖 60 g/L, $NaNO_3$ 2.5 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L,自然 pH.

1.2.4 初始培养方法 斜面 30 °C 恒温培养 4 d,取斜面菌体接种入种子培养基中,30 °C 往复式摇床上培养 30 h,种子液均质后接入发酵培养液.

1.3 测定方法

1.3.1 生物量测定 发酵液用 8 层纱布过滤,得到菌体在 80 °C 下烘干 12 h,称量至恒重.

1.3.2 多糖的测定 发酵滤液定容至 100 mL,取发酵液 15 mL 加入 60 mL 无水乙醇中,在 5 °C 下静置 8 h,过滤,在 80 °C 烘干 12 h 至恒重,称量.

2 结果与分析

2.1 液体培养基成分的优化

2.1.1 碳源对胞外多糖产量的影响 在发酵基础培养基中维持其它成分不变,分别加入不同种类的碳源.培养 96 h 后,分别测生物量和多糖含量.表 1 表明:该菌能利用多种碳源产生多糖,以麦芽糖为碳源时,生物量和胞外多糖含量均较高;其次为可溶性淀粉、葡萄糖,对蔗糖利用较差.

表 1 不同碳源对多糖产量及生物量的影响
Tab.1 The effect of the different carbon source on the production of extracellular polysaccharides and biomass

碳源	质量浓度/ (g/L)	生物量/ (g/dL)	多糖产量/ (g/L)
葡萄糖	60	1.84	1.25
蔗糖	60	0.79	0.37
麦芽糖	60	1.90	2.60
可溶性淀粉	60	1.58	1.85

2.1.2 氮源对胞外多糖产生的影响 在基础培养

基中,维持其它成分不变,分别加入不同种类的氮源,培养 96 h,生物量及胞外多糖含量见表 2,结果显示,不同氮源对红曲霉胞外多糖合成的影响很大,其中以蛋白胨为好.其次为硝酸钠、酵母膏、尿素、硝酸铵.硝酸铵的菌体产量和多糖产量都为最低,该结果同类似研究的结果相同^[2,3].1983 年,Seviour 和 Kristiansen 对短梗霉的研究中发现类似规律,认为 NH_4^+ 初始浓度高时,多糖合成的起始反应受到迟延. NH_4^+ 消耗殆尽是短梗霉多糖合成开始的信号.硝酸铵作用造成红曲霉胞外多糖产量低的原因可能也在此.

表 2 不同氮源对生物量及胞外多糖产量的影响
Tab.2 The effect of the different nitrogen source on the production of extracellular polysaccharides and biomass

氮源	质量浓度/ (g/L)	生物量/ (g/dL)	多糖产量/ (mg/L)
硝酸钠	2.5	2.09	1.25
硝酸铵	2.5	2.06	0.50
尿素	2.5	2.18	1.15
酵母膏	2.5	2.22	1.20
蛋白胨	2.5	2.15	1.40

2.1.3 无机盐比例对胞外多糖的优化试验

据文献报道^[4],无机盐有促进菌体生长及多糖合成的作用.预备试验中,也已证明磷酸盐、 Mg^{2+} 对红曲霉的生长为必需因子.同时,不同无机盐的加入对发酵液 pH 值等内环境都可能改变,考察单种无机盐意义不大.为了考察其协同作用,确定其合适用量,进一步优化培养基组成,降低生产成本,选用磷酸二氢钾质量浓度为 A 因素,硫酸镁质量浓度为 B 因素,硫酸钙质量浓度为 C 因素,各取 3 个水平,以菌体生物量和胞外多糖产量为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验.

极差分析见图 1,各种无机盐对红曲霉胞外多糖产量的影响程度为 $A > C > B$,即磷酸二氢钾的影响最大,其次为氯化钙,而硫酸镁的影响最小.其中氯化钙的加入,先引起多糖产量的降低,后升高.分析其原因可能在于初始加入氯化钙时,钙离子同硫酸根离子可能产生沉淀,使氯化钙的作用被掩盖,硫酸根离子浓度降低,这些共同作用使多糖产量出现降低.

2.2 摇瓶发酵条件的确定

2.2.1 通气量对多糖产量的影响 多数菌株产多糖的能力都同通气量有关^[2,4],作者通过改变其加液量来控制通气量(见表 3).结果表明,多糖的产量与通气量关系密切.装量少、通气好的多糖产量较

高,反之则多糖产量低.考虑单瓶产量和总产量因素,选用加液量为 75 mL.

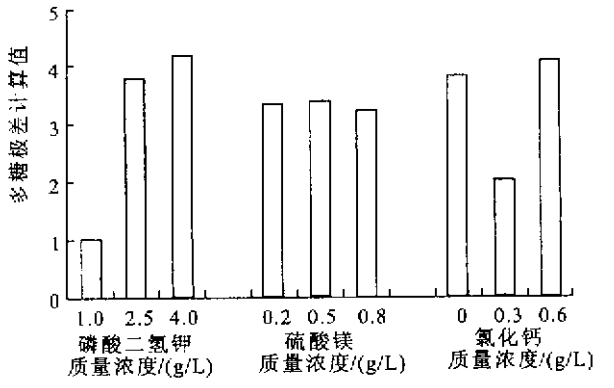


图 1 无机盐正交试验结果的极差分析

Fig.1 Optimization analysis of inorganic salt orthogonal results

表 3 通气量对多糖产量的影响

Tab.3 The effect of ventilation quantity on the production of extracellular polysaccharides and biomass

装液量/mL	生物量/(g/dL)	多糖产量/(g/L)
50	2.34	1.81
75	2.18	1.65
100	1.85	1.49
120	1.56	1.31

2.2.2 温度对多糖产量的影响 温度往往影响菌株的生长状态,引起代谢流变化,作者考察了不同温度对红曲霉胞外多糖产生的影响(见表 4),结果表明,产多糖的最适温度为 33 ℃.

表 4 温度对多糖产量的影响

Tab.4 The effect of temperature on the production of extracellular polysaccharides and biomass

温度/℃	生物量/(g/dL)	多糖产量/(g/L)
27	1.99	1.34
30	1.78	1.49
33	1.93	2.19
36	1.91	1.72

2.2.3 接种量对多糖产量的影响 改变接种量大小,考察其对多糖产量的影响.结果表明 15% 接种量时多糖产量最大.其中多糖产量随接种量出现‘S’形变化,排除测量误差后,推测可能是在接种量较小时,主要是通过影响发酵培养基中的菌体细胞密度来影响多糖产生,而在接种量 15% 时,种子液中的营养成分的作用凸现,从而出现产量的再度提高.根据表 5 的结果,选取接种量 15% 作为最终接

种量.

表 5 接种量对生物量和多糖产量的影响

Tab.5 The effect of inoculum size on the production of extracellular polysaccharides and biomass

接种量/%	生物量/(g/dL)	多糖产量/(g/L)
3	1.09	1.32
5	1.76	1.52
10	1.85	1.49
15	1.82	1.98

2.2.4 种龄对多糖产量的影响 采用不同种龄种子液,考察种龄对多糖产量的影响,结果见表 6.接入种龄为 24 h 的种子液时,多糖产量最高.

表 6 种龄对生物量和多糖产量的影响

Tab.6 The effect of inoculation time on the production of extracellular polysaccharides and biomass

种龄/h	生物量/(g/dL)	多糖产量/(g/L)
24	1.95	1.71
30	1.91	1.36
36	1.83	1.54

2.3 脂肪酸对红曲霉生物量和产胞外多糖的影响 一些植物油对真菌胞外多糖的产生具有促进作用^[21],其具体机理尚不清楚,推测可能是其作用于细胞胞壁,与改变其通透性有关.作者考察了不同量的棕榈油和油酸对红曲霉胞外多糖产量和生物量的影响,结果见图 2.同报道情况相同:两者对产红曲霉胞外多糖都具有促进作用.其中棕榈油对胞外多糖产量的影响大于油酸的作用,而与报道不同的是对生物量的作用,根据作者的试验,棕榈油对生物量具有促进作用,而油酸对其产生了抑制.

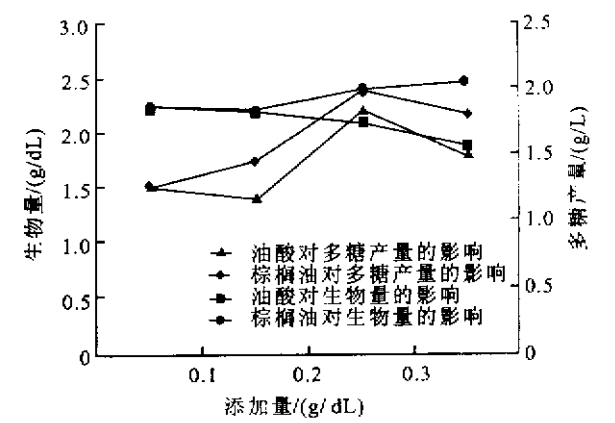


图 2 油脂对生物量和多糖的影响

Fig.2 The effect of different oil on the production of extracellular polysaccharides and biomass

果实的可溶性固形物含量 ,降低可滴定酸含量 ,抑制叶绿素的降解 ,增加果实绿色指数 ,降低烂果率和鸭梨黑心病的发病率 .

早在 20 世纪 80 年代就有人研究了乙醇在果实采后贮藏中的作用 ,乙醇可以抑制乙烯的生成 ,延缓番果实或康乃馨切花的衰老^[6] .乙醇延缓果实成熟、抑制黑心病的机理 ,一方面可能是因为乙醇处理后 ,乙醇作用于细胞膜位点 ,抑制了乙烯的生

物合成^[7] ;另一方面 ,在低浓度情况下 ,它通过引起细胞膜的变化 ,改变结合蛋白质的性质 ,使变性速度趋缓 ,同样起到了抑制作用^[8] .

乙醇抑制乙烯、延迟老化活动 ,对于贮藏环境因素的控制和采后处理等 ,都具有重要的生理作用和应用价值 ,可应用于果实采后减缓成熟 ,延长果实贮藏和货架期寿命 ,增加经济效益 .

参考文献：

[1] HEINS R D. Inhibition of ethylene synthesis and senescence in carnation by ethano[J]. **J Amer Soc Hort Sci** , 1980 ,105(1) : 141 - 144 .

[2] MIKAL E S ,JRAND MENCARELLI F. Inhibition of ethylene synthesis and action in ripening tomato fruit by ethanol vapors [J]. **J Amer Soc Hort Sci** ,1988 ,113 (4) : 572 - 576 .

[3] GHAHRAMANI F ,SCOTT K J. The action of ethanol in controlling superficial scald of apples[J]. **Aust J Agric Res** , 1998 , 49 :199 - 205 .

[4] INGLE M. Physiology and control of superficial scald of apples : A review[J]. **Hortscience** , 1989 , 24 :28 - 31 .

[5] 冯双庆 ,周丽丽 ,赵玉梅 . 果蔬贮运学实验指导 [M]. 北京 :北京农业大学出版社 ,1990 .

[6] KELLY M O ,SALTEVIT M E. Effect of endogenously synthesized and exogenously applied ethanol on tomato fruit ripening [J]. **Plant Physiol** , 1998 , 88 :143 - 147 .

[7] SCOTT K J. Ethanol vapor -a new anti-scald treatment for apples[J]. **Postharvest Biology and Technology** ,1995 (6) :201 - 208 .

[8] SALTVEIT M E. Effect of alcohols and their interaction with ethylene on the ripening of epidermal pericarp discs of tomato fruit [J]. **Plant Physiol** , 1989 ,90 :167 - 172 .

(责任编辑 杨 萌 朱 明)

(上接第 291 页)

2.4 发酵优化条件检验

在 500 mL 的三角瓶中加入优化组合的培养基 75 mL ,加入棕榈油 0.2 g/dL ,在 33 ℃ ,转速为 220 r/min 的旋转式摇床上培养 ,接种量为 15 % ,种龄取 24 h ,测多糖产量 .表 7 表明最终优化后平均产量达到 3.24 g/dL ,比初始条件高出约 1.5 倍 .

红曲霉发酵胞外多糖初始被发现 ,结合其综合利用 ,具有很高的潜在价值和开发前景 .

参考文献：

[1] 尤新 .功能性发酵制品[M].北京 :中国轻工业出版社 ,2000 .

[2] 李平作 . 灵芝胞外多糖深层发酵培养基的优化[J]. 无锡轻工业大学学报 ,1998 ,17(4) :27 - 30 .

[3] 方宜钧 ,张英 .出芽短梗霉菌株紫外诱变及其发酵条件优化[J]. 农业生物技术学报 ,1998 ,1(2) :124 - 128 .

[4] EVELEIGH D E. Handbook of Microbiology[M]. New York :Acedemic Press ,1978 .

[2] FAN-CHIANG YANG. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by Ganoderma lucidum in shake cultures[J]. **enzyme and microbial technology** , 2000 , 27 :295 - 301 .

(责任编辑 杨 萌 朱 明)

表 7 多糖的发酵条件检验试验		
Tab. 7 The proof-tests of the fermentation conditions of extracellular polysaccharides		
平行标号	生物量/(g/dL)	胞外多糖产量/(g/L)
1	1.48	3.00
2	1.45	3.56
3	1.34	3.17
平均	1.42	3.24