

红曲色素液体发酵研究

马歌丽, 孙浩, 韩甜甜, 孙佳佳, 程战士, 路红娜

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 对红曲霉产红曲色素的液体发酵培养基组成和发酵条件进行了研究. 结果表明红曲霉发酵产红曲色素的最佳培养基组成为: 葡萄糖 30 g/L, 硝酸钠 15 g/L, 硫酸锌 0.05 g/L 和硫酸锰 0.05 g/L, 培养基初始 pH = 3, 装液量为 30 mL/250 mL, 培养时间为 120 h. 在此条件下, 红曲霉发酵产红曲色素的色价达到 16.91 U/mL.

关键词: 红曲霉; 红曲色素; 发酵条件; 正交试验

中图分类号: TS264.4; Q815 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.05.003

Liquid fermentation research of monascus pigment

MA Ge-li, SUN Hao, HAN Tian-tian, SUN Jia-jia, CHENG Zhan-shi, LU Hong-na

(College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The fermentation medium and conditions for monascus pigment production by *monascus* were studied. The results showed that the optimal medium composition for producing monascus pigments was as follows: glucose 30 g/L, NaNO₃ 15 g/L, ZnSO₄ 0.05 g/L and MnSO₄ 0.05 g/L, medium initial pH = 3, liquid volume 30 mL/250 mL, incubation time 120 h. Under these conditions, color value of *monascus* producing monascus pigment reached 16.91 U/mL.

Key words: *monascus*; monascus pigment; fermentation condition; orthogonal experiment

0 引言

红曲色素是红曲霉在生长代谢过程中产生的多种天然色素的混合物,是红曲霉菌的次级代谢产物.作为一种天然着色剂,红曲色素广泛用于肉制品、清酒、酱油、腐乳、糕点、糖果、冷饮等食品,也可用于医药和化妆品;此外,红曲色素还具有抑菌、防腐、降血脂、降血压、抗肿瘤、抗疲劳、预防动脉硬化等医疗保健作用^[1-5].

根据红曲霉菌培养方式的不同,红曲色素的生产方法分为固态发酵和液态发酵2种.固态发酵法

劳动强度大、生产周期长、生产效率低且产品质量稳定性差,不适宜大规模工业生产^[6-8].近年来,人们开始探索采用液态发酵法生产红曲色素^[9-11],但此法生产的红曲色素色价较低,从而制约其工业化生产.目前,提高红曲霉液体发酵生产红曲色素产量的主要途径有筛选高产红曲霉菌株、探索最佳发酵工艺条件和研究最佳提取工艺等^[12-13].本研究主要通过单因素和正交试验,考察摇瓶发酵培养基组成、初始 pH、培养时间和装液量对红曲霉产红曲色素的影响,以期得到红曲霉发酵产红曲色素的最佳摇瓶发酵条件,为红曲霉大规模工业生产红曲色素

收稿日期: 2013-06-19

基金项目: 郑州轻工业学院大学生科技活动项目(2013)

作者简介: 马歌丽(1963—),女,河南省漯河市人,郑州轻工业学院教授,主要研究方向为生物工程.

提供工艺参数和理论指导。

1 实验

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种 红曲霉, 郑州轻工业学院生物工程实验室选育。

1.1.2 培养基 斜面培养基: 土豆 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂粉 15 g/L; 种子培养基: 蔗糖 30 g/L, 蛋白胨 30 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, $\text{pH} = 5.5 \sim 6.0$; 基础发酵培养基: 葡萄糖 50 g/L, 蛋白胨 20 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 1.0 g/L, ZnSO_4 0.1 g/L, MnSO_4 0.1 g/L, $\text{pH} = 5.5 \sim 6.0$ 。

1.1.3 主要试剂 蔗糖、葡萄糖, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司产; 可溶性淀粉, 分析纯, 北京康普汇维科技有限公司产; 乳糖, 生化试剂, 北京鸿润宝顺科技有限公司产; 琼脂粉, 分析纯, 北京索莱宝科技有限公司产; 蛋白胨, 分析纯, 生工生物工程(上海)股份有限公司产; KH_2PO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , 均为分析纯, 广东汕头市西陇化工厂产。

1.1.4 仪器 CP214 型电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司产; SHP-250 型智能生化培养箱, 上海鸿都电子科技有限公司产; SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司产; SHP-3 型循环水式多用真空泵, 郑州杜甫仪器厂产; TDL-5A 型台式低速离心机, 北京天诚沃德生物技术有限公司产; QYC-211 型全温振荡培养箱, 上海福玛实验设备有限公司产; DGX-9053B 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海福玛实验设备有限公司产; LX-C35L 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅, 合肥华泰医疗设备有限公司产; UV-2600 型分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司产; PB-10 型酸度计, 北京赛多利斯科学仪器有限公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 红曲霉的培养和发酵 菌种活化: 选取保藏于冰箱中的红曲霉斜面菌种, 接至固体斜面培养基上, 于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 5 d。

种子培养: 选取活化好的红曲霉孢子接种至装液量为 50 mL/250 mL 三角瓶的种子培养基中, 于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 200 r/min 摇床培养 2 d。

摇瓶发酵: 将种子液以 10% 的接种量接至装液量为 30 mL/250 mL 三角瓶的发酵培养基中, 于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 200 r/min 摇床培养 6 d。

1.2.2 红曲色素色价的测定 取 10 mL 培养液, 于 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液适当稀释, 以蒸馏水为空白, 测 505 nm 处吸光值。色素色价($U \cdot \text{mL}^{-1}$)为

$$U = \frac{A_{505}}{V} \times n$$

式中 A_{505} 为 505 nm 处吸光值(数值在 0 ~ 2.5 范围), V 为上清液体积/mL, n 为稀释倍数。

1.2.3 菌体生物量的测定 取 10 mL 种子培养液, 真空抽滤, 菌体和滤纸一起置于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重, 总重与滤纸之差即为菌体干重。

2 结果与讨论

2.1 红曲霉生长曲线及种子液中红曲色素产量

将接种红曲霉孢子悬液的种子培养基于 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 200 r/min 摇床上培养, 每隔 12 h 取样 10 mL, 测菌体生物量。红曲霉生长曲线见图 1。

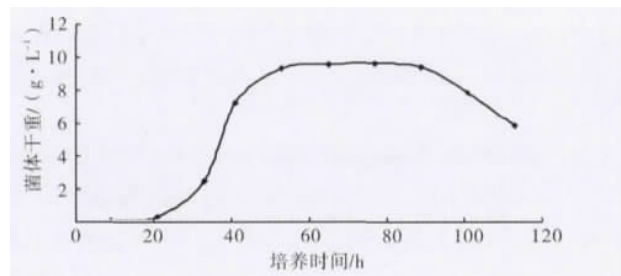


图 1 红曲霉生长曲线

据微生物生长速率的不同, 可将其分为调整期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个典型时期。由图 1 可见, 红曲霉的调整期为 0 ~ 32 h, 对数生长期为 33 ~ 49 h, 稳定期为 50 ~ 88 h, 在 88 h 以后进入衰亡期。在对数生长期, 菌体处于生长繁殖旺盛阶段, 能够很快适应生长环境, 因此选择 48 h 为种龄进行接种。

测定红曲霉生长曲线时发现, 随着培养时间的延续, 种子液中已有色素产生, 因此测定生物量的同时也测定了种子液中红曲色素的色价, 红曲色素色价随种子培养时间的变化如图 2 所示。

由图 2 可见, 在种子培养 52 ~ 76 h 后, 种子液中红曲色素产量急速增加, 在种子培养 77 ~ 112 h 之间, 红曲色素的产量增长缓慢, 处于稳定期。对比图 1 和图 2 可知, 红曲色素产量的累积明显滞后于红曲霉菌种的生长繁殖。在红曲霉的对数生长期, 红曲色素产生很少; 红曲霉产红曲色素主要是在红

曲霉生长的稳定期,这说明红曲色素属于红曲霉的次级代谢产物。

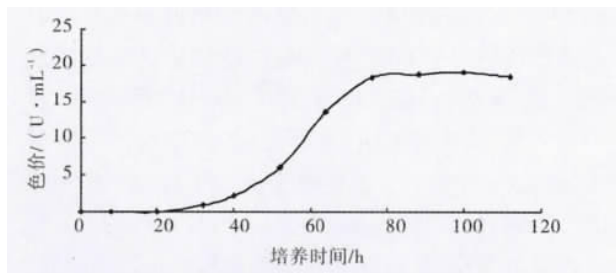


图2 种子液中红曲色素色价随培养时间的变化

2.2 碳源对红曲霉产红曲色素的影响

分别选取 50 g/L 蔗糖、可溶性淀粉和乳糖代替葡萄糖作为基础发酵培养基中的唯一碳源,碳源对红曲霉产红曲色素的影响见图 3。

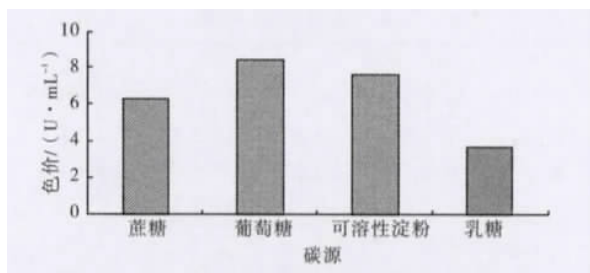


图3 碳源对红曲霉色素产量的影响

碳源是发酵培养基中重要的组分之一,是微生物生长代谢的碳架和能量来源。由图 3 可见,以葡萄糖为唯一碳源时,红曲霉产红曲色素产量最高,达到 8.58 U/mL,可溶性淀粉次之。蔗糖和乳糖作为碳源时,色素产量较低。因此确定葡萄糖为最佳碳源。

以葡萄糖为唯一碳源,改变培养基中葡萄糖的浓度分别为 10 g/L、30 g/L、50 g/L、70 g/L 和 90 g/L,葡萄糖浓度对红曲霉产红曲色素的影响见图 4。

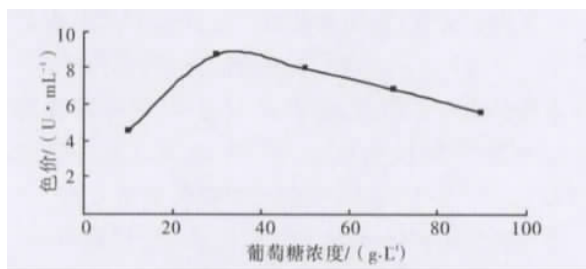


图4 葡萄糖浓度对红曲霉色素产量的影响

由图 4 可知,葡萄糖浓度为 30 g/L 时,红曲霉的红曲色素产量最高,为 8.72 U/mL。葡萄糖浓度 < 30 g/L 时,培养基中糖含量较少,不能满足微生物

生长代谢需要。红曲霉生长缓慢,色素产量较低;葡萄糖浓度 > 30 g/L 时,培养基中糖含量较高,导致培养基黏度增大,溶氧量下降,从而抑制红曲霉的生长,色素产量下降。因此确定葡萄糖浓度为 30 g/L。

2.3 氮源对红曲霉产红曲色素的影响

以 30 g/L 葡萄糖为碳源,分别选取 20 g/L 硫酸铵和硝酸钠代替蛋白胨,作为基础发酵培养基中的唯一氮源,氮源对红曲霉产红曲色素的影响见图 5。

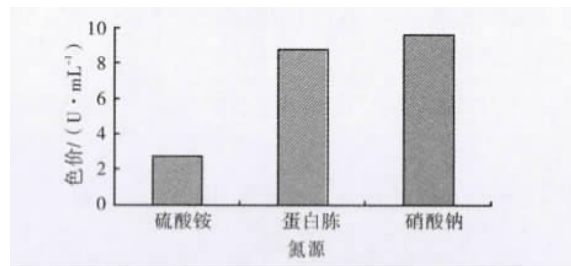


图5 氮源对红曲霉色素产量的影响

在红曲霉发酵过程中,氮不仅是构成红曲霉细胞蛋白质和核酸的主要元素,也是红曲色素和菌体合成色素所需酶的重要组成部分。由图 5 可知,硝酸钠为氮源时,红曲霉的红曲色素产量最高,为 9.57 U/mL,蛋白胨次之,硫酸铵为氮源时色素产量最低。因此确定硝酸钠为最佳氮源。

以 30 g/L 葡萄糖为碳源,硝酸钠为氮源,改变培养基中硝酸钠的浓度分别为 10 g/L、30 g/L、50 g/L、70 g/L 和 90 g/L,硝酸钠浓度对红曲霉产红曲色素的影响见图 6。

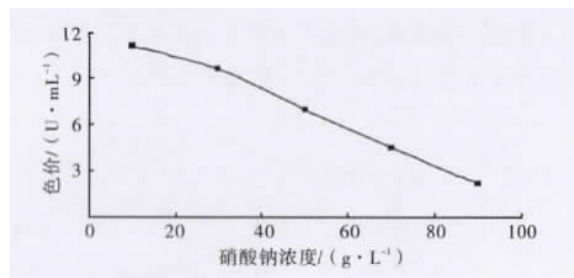


图6 硝酸钠浓度对红曲霉色素产量的影响

由图 6 可见,硝酸钠浓度为 10 g/L 时,红曲色素产量最高,为 11.07 U/mL;随着硝酸钠浓度增大,红曲色素产量逐渐下降。其原因可能是硝酸钠属于无机氮源,当培养基中无机盐含量较高时,微生物细胞外渗透压升高,细胞失水,菌体生长受到抑制,导致红曲霉的色素产量下降。因此确定硝酸钠浓度为 10 g/L。

2.4 无机盐对红曲霉产红曲色素产量的影响

以添加 30 g/L 葡萄糖和 10 g/L 硝酸钠、不添加任何无机盐的发酵培养基为对照,在发酵培养基中分别添加 1.0 g/L 磷酸二氢钾、1.0 g/L 硫酸镁和 0.1 g/L 硫酸锌 + 0.1 g/L 硫酸锰,无机盐对红曲霉产红曲色素的影响见图 7。

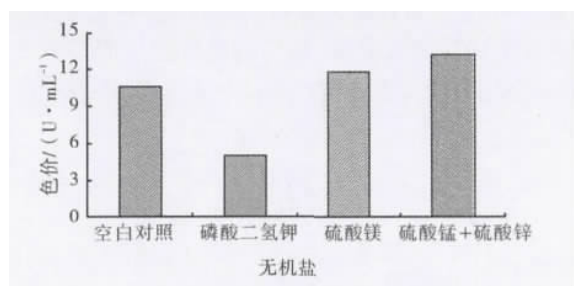


图 7 无机盐对红曲霉色素产量的影响

无机盐是微生物生长代谢中必不可少的营养物质,不仅可以作为某些微生物的能源物质,还可以作为酶活性中心的组成部分,维持生物大分子和细胞结构的稳定性,调节并维持细胞渗透压的平衡,控制细胞的氧化还原电位等。由图 7 可见,添加 0.1 g/L 磷酸二氢钾对红曲霉合成红曲色素表现出一定的负效应,而添加 1.0 g/L 硫酸镁和 0.1 g/L 硫酸锌 + 0.1 g/L 硫酸锰对红曲色素的合成均有一定的促进作用,且后者的作用更显著,此时红曲色素色价为 13.16 U/mL。

2.5 培养基初始 pH 对红曲霉产红曲色素的影响

在 30 g/L 葡萄糖和 10 g/L 硝酸钠的基础上,调节发酵培养基的初始 pH 分别为 1.5 3 5 7 9,培养基初始 pH 对红曲霉产红曲色素的影响见图 8。

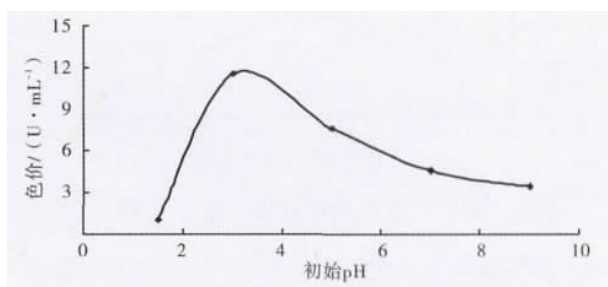


图 8 培养基初始 pH 对红曲霉色素产量的影响

pH 对微生物生长繁殖和产物合成的影响有以下几个方面: 1) 影响酶活性,当 pH 抑制菌体中某些酶的活性时,会阻碍菌体的新陈代谢; 2) 影响微生物细胞膜所带电荷的状态,改变细胞膜的通透

性,进而影响微生物对营养物质的吸收和代谢产物的排泄; 3) 影响培养基中某些组分和中间代谢产物的解离,从而影响微生物对这些物质的利用; 4) 引起菌体代谢过程不同,使代谢产物的质量和比例发生改变。另外, pH 还会影响到代谢产物的稳定性。由图 8 可见,培养基初始 pH 很低时,红曲霉产色素量极低; pH = 3 时,色素色价最高,为 11.54 U/mL; pH > 3 时,色素色价逐渐降低,且 pH = 7 ~ 9 时,色素产量基本稳定。因此确定发酵培养基的初始 pH = 3。

2.6 正交试验

根据上述单因素试验结果,选择葡萄糖(A)、硝酸钠(B)、硫酸锌 + 硫酸锰(C)和培养基初始 pH(D)这 4 个因素,每个因素选 3 个水平,进行 L₉(3⁴) 正交试验。正交试验方案与结果见表 1。

表 1 正交试验结果

序号	A/ (g · L ⁻¹)	B/ (g · L ⁻¹)	C/ (g · L ⁻¹)	D	色价/ (U · mL ⁻¹)
1	1(20)	1(5)	1(0.05)	1(2.5)	8.52
2	1	2(10)	2(0.1)	2(3)	3.44
3	1	3(15)	3(0.15)	3(3.5)	10.24
4	2(30)	1	2	3	1.68
5	2	2	3	1	4.92
6	2	3	1	2	16.56
7	3(40)	1	3	2	2.12
8	3	2	1	3	8.03
9	3	3	2	1	7.36
K ₁	22.20	12.32	33.11	20.80	
K ₂	23.16	16.39	12.48	22.12	
K ₃	17.51	34.16	17.28	19.95	
R _j	5.65	21.84	20.64	2.17	
主次顺序	B > C > A > D				
最佳组合	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂				

从表 1 可见,影响红曲霉产红曲色素的因素主次顺序为 B > C > A > D,即硝酸钠是影响红曲霉产红曲色素的主要因素,其次是无机盐、葡萄糖和培养基初始 pH。最佳组合为 A₂B₃C₁D₂,即葡萄糖 30 g/L,硝酸钠 15 g/L,硫酸锌和硫酸锰各 0.05 g/L,培养基初始 pH = 3,此时红曲色素的色价最高,为 16.56 U/mL。

2.7 培养时间对红曲霉产红曲色素的影响

采用优化后的发酵培养基,培养基初始 pH = 3,按 10% 接种量将种子液接至发酵培养基中,30 °C,200 r/min 培养,每隔 24 h 取样,测定上清液中红曲

色素的色价,培养时间对红曲色素产量的影响见图9。

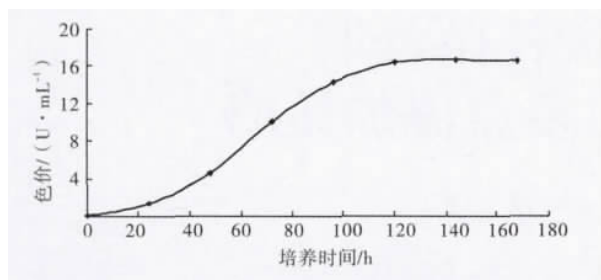


图9 培养时间对红曲霉色素产量的影响

从图9可见,随着培养时间的增加,红曲色素产量也逐渐升高。培养时间在24 h~120 h时,红曲色素产量增加迅速;当培养时间>120 h后,由于发酵培养基中的营养物质逐渐减少,不能满足菌体生长和合成色素的需要,红曲色素产量增加缓慢。因此,确定红曲霉液体发酵产红曲色素的培养时间为120 h。

2.8 装液量对红曲霉产红曲色素的影响

培养基初始 pH = 3,调节发酵培养基的装液量分别为 20 mL/250 mL, 30 mL/250 mL, 40 mL/250 mL, 50 mL/250 mL 和 60 mL/250 mL,按 10% 的接种量将种子液接种到发酵培养基中,30 °C, 200 r/min 培养 120 h,测定上清液中红曲色素的色价。装液量对红曲霉产红曲色素的影响见图 10。

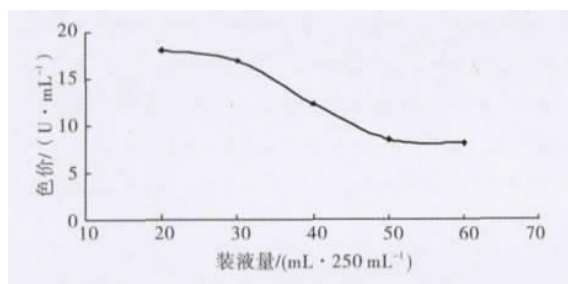


图10 装液量对红曲霉色素产量的影响

由图10可见,随着装液量的增加,红曲霉红曲色素产量下降。红曲霉为好氧菌,而装液量主要影响发酵培养基中的溶氧量,当发酵培养基中的接种量相同时,随着培养基装液量的增加,发酵液中单位体积的溶氧量下降,导致红曲色素产量下降。装液量为 20 mL/250 mL 时色素单位产量最高,但综合

考虑到总产量,选择装液量为 30 mL/250 mL,此时红曲色素色价达 16.91 U/mL。

3 结论

本文对红曲霉产红曲色素的液体发酵培养基组成和发酵条件进行了研究。通过单因素试验和正交试验,得到红曲霉发酵产红曲色素的最佳培养基配方:葡萄糖 30 g/L,硝酸钠 15 g/L,硫酸锌 0.05 g/L,硫酸锰 0.05 g/L,培养基初始 pH = 3;用此发酵培养基装液量为 30 mL/250 mL,于 30 °C, 200 r/min 摇床培养 120 h 时,红曲霉发酵产红曲色素的色价可达 16.91 U/mL。

参考文献:

- [1] 赵树欣,张建玲. 红曲抑菌物质研究的现状与展望[J]. 中国酿造, 2011, 30(3): 5.
- [2] 赵燕,温辉梁,胡晓波. 红曲色素及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004(4): 90.
- [3] 成晓霞,陈泽雄. 红曲抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2011, 13(3): 43.
- [4] 黄谚谚,毛宁,陈松生. 红曲霉发酵产物抗疲劳作用的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(9): 9.
- [5] Jeun J, Jung H, Kim J H, et al. Effect of the monascus pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice[J]. Food Chem, 2008, 107: 1078.
- [6] 崔莉,张德权,张培正. 红曲色素的研究现状分析[J]. 食品科技, 2008, 33(8): 115.
- [7] 王金宇,董文斌,陶璐,等. 红曲霉固态发酵产红曲色素的条件研究[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 199.
- [8] 孙春禄. 固态发酵红曲色素的稳定性研究[J]. 肉类工业, 2009(3): 29.
- [9] 王广峰. 红曲色素液体深层发酵工艺研究[J]. 食品科技, 2007, 32(10): 57.
- [10] 郭红珍,王秋芬,马立芝. 液态发酵产红曲色素的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(3): 154.
- [11] 游玫娟,鄢东. 采用响应曲面法优化红曲色素液态发酵条件[J]. 中国调味品, 2011, 36(8): 24.
- [12] 石文娟,谭俊,储炬,等. 红曲色素高产菌株的高通量选育[J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 25.
- [13] 李明起,陈运中. 红曲色素提取工艺条件的实验研究[J]. 肉类工业, 2011(4): 40.