

吐温 80、甲苯、乙醚对红曲菌 GM011 液态发酵的影响

陈小林, 周立平, 王兰

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 以吐温、甲苯、乙醚三种作为改变红曲霉菌 GM011 细胞膜通透性的有机溶剂, 探讨其对红曲霉菌 GM011 液态发酵的影响, 结果表明: 甲苯对该菌的生长、Monacolin K 和色素的产生均具有抑制作用, 对菌体生长的形态的影响也最大, 且这种抑制和影响根添加量成正比例关系; 吐温则可以促进色素产生和菌体的生长, 但是对 Monacolin K 的产生却有抑制作用; 而乙醚在所试验的添加浓度范围内, 对菌体生长、红色色素色价、以及菌体形态几乎不产生影响, 但是对 Monacolin K 的产生却有很大的促进作用。当每隔 24 h 添加 1 mL 乙醚, 发酵周期为 14 d 时, 发酵液中 monacolin K 的浓度为 425 mg/L, 是对照的 2.53 倍。

关键字: 红曲霉菌; Monacolin K; 红色色素色价; 细胞膜通透性

中图分类号: TQ920.1; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)05-0014-04

Influence of Addition of Tween-80, Toluene and Aether on the Liquid Fermentation of *Monascus* GM011

CHEN Xiao-lin, ZHOU Li-ping, WANG Lan

(College of bioengineering and Environmental Engineering, Zhejiang University of technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The influence of toluene, aether and tween-80 on the liquid fermentation of *Monascus* GM011 was studied due to their capability of changing the cell membrane permeability. Results showed that toluene not only inhibited the growth of GM011 and the production of Monacolin K and red pigment, but also greatly influenced the morphology of GM011, while tween-80 could promote the growth of the fungus, favor the production of red pigment and inhibit the production of Monacolin K. When aether was added to the fermentation liquid, little effect was found on the growth of GM011, the production of red pigment and the morphology of GM011, while it greatly improved the production of Monacolin K. By adding 1 mL aether into 100 mL broth per 24 h, the concentration of Monacolin K was up to 425 mg/L, which is 2.53 times higher than that of the control.

Key words: *Monascus*; Monacolin K; red pigment value; cell membrane permeability

红曲霉菌能产生降胆固醇的 Monacolin K^[1], 但因液态发酵产 Monacolin K 的单位低, 限制了其进一步应用。细胞膜是细胞内外物质和能量交换的主要障碍, 对于 Monacolins 物质来说, 催化其合成的酶更是完全在细胞内, 因此如能增强细胞膜的通透性, 一则可以使酶的作用底物更多的进入细胞内, 这样一方面可以引导细胞合成更多的酶, 另一方面可以使酶尽可能的与底物结合, 从而增加酶促反应的速率。二则可以使细胞内合成的目标产物释放到细胞外, 从而减少由于产物积累而造成的产物反馈抑制现象。有些机溶剂如氯仿, 苯酮, 甲苯, 乙醚等等可以提高细胞膜的通透性^[2], 使细胞内外的物质和能量的交换得到加强, 因此本实验选用毒性小、易挥发的吐温、甲苯, 和乙醚

收稿日期: 2007-03-02

作者简介: 陈小林 (1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为红曲、大型真菌

通讯作者: 周立平, 男, 研究员, 研究方向为红曲、大型菌蕈的活性物质

作为改变细胞膜通透性的有机溶剂进行实验, 考察其对红曲霉菌 GM011 液态发酵的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种: GM011 为浙江工业大学红曲研究所保存

1.2 培养基

斜面培养基: 麦芽汁培养基。

液体种子培养基: 葡萄糖 3%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 2%, 黄豆粉 1%, 甘油 5%, MgSO₄ 0.1%, NaNO₃ 0.2%, ZnSO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%。

发酵培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 1%, 黄豆粉 1%, 甘油 5%, MgSO₄ 0.1%, NaNO₃ 0.2%, ZnSO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%。

1.3 方法

先将菌种接种到斜面培养基上, 30 °C 培养 7 d 后用无菌水将孢子洗到液态种子培养基中; 然后在

30 ℃、200 r/min 下培养 48 h 后接种至发酵培养基中。发酵培养基培养时,先在 200 r/min、28 ℃下培养 48 h,然后添加甲苯、吐温-80、乙醚 3 种物质,并在 26 ℃、250 r/min 培养 48 h;进一步降温至 25 ℃下培养 48 h,最后将温度降至 23 ℃,继续培养 8 d。

1.3.1 Monacolin K 的检测

Monacolin K 的检测用 HPLC 法,色谱柱为: Shim-pack VP-ODS C₁₈(4.6×150 mm);柱温 30 ℃,进样体积 20 μL。色谱条件为:流动相: v_{1%}磷酸: v_{甲醇} = 1:3,流速 1 mL/min,检测器为紫外光检测器,检测波长 237 nm。

1.3.2 红色色素色价的检测

取 1 mL 过滤后的发酵液,将其稀释 100 倍,在 505 nm 的波长下,测定其吸光度 OD₅₀₅,色价计算公式:色价(U) = OD₅₀₅ × 100

1.3.3 菌体干重

取一定体积的发酵液,用六层纱布过滤后,将菌丝体放在 60 ℃干燥箱中干燥到恒重,然后称重。

2 结果与分析

2.1 不同的有机溶剂添加量对发酵液中 Monacolin K 浓度的影响

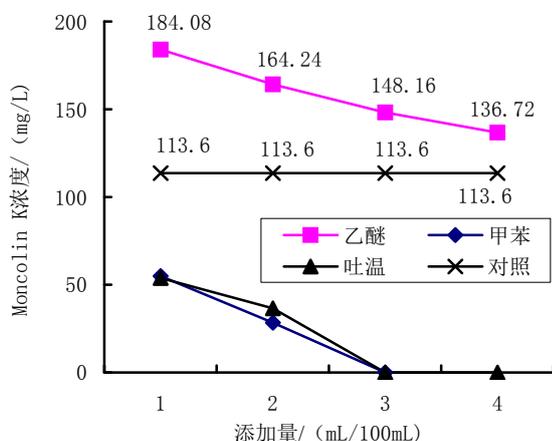


图 1 不同的有机溶剂和不同添加量与发酵液中 Monacolin K 浓度关系图

从图 1 可看出,添加乙醚对 Monacolin K 有明显的促进作用,但是这种促进作用,随着添加量的增加而减弱。当乙醚添加量为 1 mL/100 mL 发酵液时,Monacolin K 的量达到了 184.08 mg/L,比未添加乙醚的对照提高了 62%。而添加吐温-80 和甲苯对 Monacolin K 有明显的抑制效果,当甲苯的添加量为 1%时,发酵液中的 Monacolin K 浓度就较对照低近一倍。当添加量为 3%,发酵液中未见 Monacolin K 检出,吐温

亦然,可见其抑制效果十分明显。

2.2 不同的有机溶剂添加量对菌体干重的影响

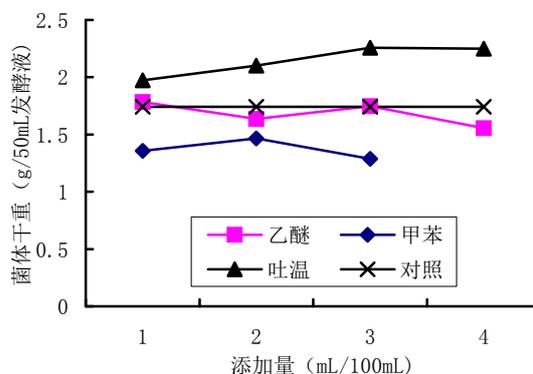


图 2 不同的有机溶剂和不同添加量与菌体干重的关系

图 2 中,添加吐温的发酵液菌体干重曲线始终处在对照菌体干重的上方,说明添加吐温可以促进红曲霉的生长,这一点与连喜军等的试验结果相反^[3]。因所用的发酵培养基中含有不可溶物黄豆粉,为了验证实验结果的可靠性,我们随后用清夜进行了实验,实验结果进一步证实吐温对该菌生长的促进作用(实验数据未列出)。添加甲苯的实验组的菌体干重明显低于对照组,这说明甲苯对菌体的生长有很明显的抑制作用。添加乙醚的实验组的菌体干重曲线则是围绕着对照上下作微小波动,说明添加乙醚浓度在试验范围内对菌体的生长几乎没有影响。

2.3 不同的有机溶剂添加量对发酵液中红色色素色价的影响

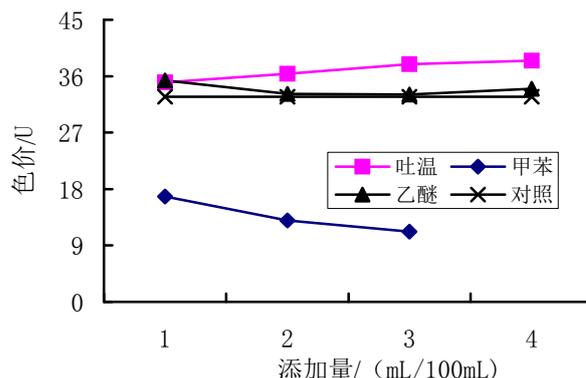


图 3 不同的有机溶剂和不同添加量与发酵液中红色色素色价的关系

从图 3 可以看到,添加甲苯的红色色素色价远小于对照,说明其对红色色素的产生具有明显的抑制作用,且这种抑制效果呈现出对添加量的依赖性。而一次性添加乙醚则对色素的产生几乎不产生影响。从图中还可以看到吐温对色素的产生有显著的促进作用,这一点与连喜军等报道的相一致^[3]。

2.4 三种不同的有机溶剂对红曲霉生长形态的影响



图4 1%的甲苯对红曲霉生长形态的影响



图5 2%的甲苯对红曲霉生长形态的影响



图6 3%的甲苯对红曲霉生长形态的影响



图7 对照



图8 1%的乙醚对红曲霉生长形态的影响



图9 4%的乙醚对红曲霉生长形态的影响

通过观察图4~6,可以看到随甲苯浓度的增大,菌球的数量在慢慢减少,而菌球的直径却在慢慢的变大。分析其原因,这可能是该菌抵御甲苯毒害的一种方式。因为甲苯对红曲霉的溶解能力强,小的菌球几乎无法生存,只有形成较大的菌球,才可以抵御这种毒害,使自身得以生存。而这也可能是造成添加甲苯的实验组 Monacolin K 减少的原因之一,因为对于液态发酵来说,一般菌球多,菌球直径小有利于营养物质和氧气的传递^[4]。反之,则相反。

通过观察图8和图9,可以看出,添加1%和4%乙醚的红曲的形态跟对照组相差十分小。这说明乙醚对红曲菌的形态的影响很小。

2.5 多次少量补加乙醚对红曲霉液态发酵产生 Monacolin K 和红曲色素的影响

通过上述实验可以看到,添加乙醚对 monacolin K 有很大促进作用。但是由于乙醚具有很强的挥发性,因此会随着发酵时间的进行而在发酵液中的浓度慢慢减少,这样其对细胞的作用就会越来越少。而如果一次加入过多,又会给细胞的生长,生存带来影响,因

此为了克服以上问题,考虑用多次少量添加乙醚的方式来克服。实验结果见表1。

表1 多次少量添加乙醚时发酵液中 Monacolin K 和红色色素产量的关系

乙醚添加量	添加次数	Monacolin K 的含量/(mg/L)	红色色素价/U
1 ml/24 h	12	425	36.7
2 ml/48 h	6	279	30
3 ml/72 h	4	205	27
对照	0	168	43

从表1的实验数据可以看到,少量多次添加乙醚对 monacolin K 的产生有很大的促进,其中以1 ml/24 h 为最佳,发酵液中 monacolin K 的浓度达到425 mg/L,是对照的2.53倍。而乙醚的这种促进作用,随着添加次数的减少而减少。其中的原因可能是在刚开始时,发酵液中乙醚的浓度过大,对菌体造成不利影响,而随着发酵的进行,乙醚挥发,发酵液中乙醚的量越来越少,又几乎对该菌细胞不起作用。从表1中还可以看到多次少量添加乙醚对红色色素的产生表现出抑制作用,且这种抑制作用随着添加次数的减少而加强。这说明乙醚除能改变细胞膜通透性外,还可能改变了细胞的代谢途径。

3 讨论

鉴于吐温80即能促进色素的产生,又能促进菌体的生长,笔者认为,吐温对该菌的作用不仅是溶解色素,作用于细胞膜,使胞内的色素释放到胞外^[3],而且还可能作为该菌生长的碳源被利用或促进O₂等物质的溶解,加速细胞内外的物质交换,提高其利用率;具体的原因需要进一步试验证实。据刘晓艳等报道^[2],在用乙醚、甲苯两种有机溶剂处理酵母细胞时,发现当甲苯添加量为1%,细胞的存活率几乎为0,而乙醚对其存活影响很少;酵母与红曲菌同属于真菌,这可能从一个方面解释了为什么添加甲苯会导致该菌形态变化、色素、Monacolin K 以及细胞干重的减少,而添加乙醚却几乎对其干重、色素和形态没有影响;多次少量添加乙醚的试验结果说明乙醚除改变细胞膜通透性外,可能还存在其他作用。

参考文献

- [1] Endo A. Monacolin K. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. *J Antibiot*, 1979(32): 175-177

(下转第7页)