

# 红曲霉菌固体发酵产 Monaclin K 工艺的优化

董文宾<sup>1</sup>, 陶璐<sup>1</sup>, 张建华<sup>1</sup>, 郑丹<sup>1</sup>, 荣晓峰<sup>2</sup>, 吴旭<sup>1</sup>

(1. 陕西科技大学, 陕西 西安 710021) (2. 咸阳市产品质量监督检验所, 陕西 咸阳 712000)

**摘要:** 以大米为原料, 对红曲霉固体发酵生产功能性红色素和 Monaclin K 的培养条件和培养基进行了优化。考察了起始含水量、发酵时间、培养基 pH 值等因素的影响, 以及大米培养基中添加附加碳源、氮源、无机盐等的影响。

**关键词:** 红曲霉; 固体发酵; Monaclin K

中图分类号: TQ925<sup>+</sup>.7; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)08-0032-04

## Optimization of Production Conditions of Monaclin K by Solid Fermentation with *Monascus*

DONG Wen-bin<sup>1</sup>, TAO Lu<sup>1</sup>, ZHANG Jian-hua<sup>1</sup>, ZHENG Dan<sup>1</sup>, RONG Xiao-feng<sup>2</sup>, WU Xu<sup>1</sup>

(1. Shanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

(2. The Xianyang product quality supervises examination center, Xianyang 712000, China)

**Abstract:** The fermentation conditions for the production of functional *Monascus* pigments and Monaclin K by solid fermentation with *Monascus* were studied, including initial water content, fermentation time, initial pH value, appendant carbon and nitrogen source, and the concentration of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

**Key words:** monascus; solid fermentation; Monaclin K

红曲霉的利用在我国具有悠久的历史, 红曲霉在生长过程中可以产生色素、抑菌物质、酶类、胆固醇生物合成抑制剂等多种代谢产物。但液体深层发酵生产红曲色素的工艺设备投资大, 生产成本低, 且规模较小, 而固态发酵优势明显。因为固态发酵所得全部发酵物均可入药, 这样不仅可以省去提取过程, 并且发酵物中含有的其他有益组分协同作用更有助于全面治疗, 也可以制成各种营养保健食品, 方法简单, 产品商业效益高。因而本文研究拟采用红曲霉固态发酵工艺, 通过实验优化工艺条件, 提高色价及 Monaclin K 产量<sup>[3-5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

红曲霉菌株 *Monacus-3*, 由作者所在实验室自行筛选并保存。

#### 1.1.2 培养基

收稿日期: 2007-05-09

基金项目: 陕西省教育厅自然科学基金资助

作者简介: 董文宾(1951-), 教授, 博导, 主要从事生物技术与质量控制研究

斜面培养基: 麦芽汁 10° Bx, 琼脂 2%。

孢子培养基: 小米 25 g, 水 30 mL, 装入 1000 mL 三角瓶, 121 °C 下灭菌 60 min。

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

大麦芽、琼脂、葡萄糖、果糖、甘油、酵母膏、CO(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、乙醇、乙酸乙酯、NaCl 等均从市场购买。

#### 1.1.4 主要仪器

无菌操作台、恒温恒湿化培养箱、摇瓶机、灭菌机、糖度计、接种铲、分析天平、生物显微镜、723 分光光度计、高效液相色谱仪、数字酸度计、离心机、热风干燥箱、玻璃仪器若干种。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养方法

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。

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 50%。不同

实验因素根据设计实施。

### 1.2.2 Monacolin K含量的测定

采用美国 Waters 公司 HPLC 仪，色谱柱：phenomenex C18，5  $\mu\text{m}$ ，250 mm $\times$ 4.6 mm；流动相：甲醇：0.18%磷酸=80:20，流速：0.8 mL/min，紫外检测237 nm；进样体积20  $\mu\text{L}$ ；柱温为35  $^{\circ}\text{C}$ ，样品经0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后用HPLC法测定Monacolin K含量，外标法。

## 2 结果与分析

### 2.1 初始含水量对Monacolin K产量的影响

物料的初始含水量是影响固体发酵的主要因素之一。基质含水量同氧向空隙的转移紧密相关。因为过多的游离水将充满空隙，挤走空气，妨碍空气流动。低含水量使基质膨胀程度低，水张力高，生长受抑制。如表1，考察起始含水量（相当于大米质量）为20%，30%，40%，50%，60%和70%对 Monacolin K 产量的影响。发酵15 d后测定各样品中 Monacolin K 的含量。

从表1可知，含水量为30%左右时，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 d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。故固体发酵起始含水量以50%最为合适，这与产红曲色素的最适含水量相同。

表1 起始含水量对 Monacolin K 产量的影响

Table 1 Effect of initial water content on Monacolin K production

基质含水量/%	20	30	40	50
菌体生长情况	很差	较差	一般，培养基较干	较好
菌体生长情况	0	0.564	1.255	2.381
基质含水量/%	60		70	
菌体生长情况	培养基含水量较大，有乙醇生成		菌体生长较差，培养基游历水很多	
菌体生长情况	1.690		0.237	

### 2.2 培养时间对 Monacolin K 产量的影响

加20 g大米于250 mL三角瓶中，起始含水量为50%，进行红曲霉固体发酵。每天取样测定 Monacolin

K 的含量。

表2 不同发酵时间对 Monacolin K 产量的影响

Table 2 Time course for the Monacolin K production

实验号	发酵时间/d	Monacolin K 含量/(mg/g)
1	2	0
2	4	0
3	5	0.031
4	6	0.161
5	7	0.245
6	8	0.489
7	9	0.523
8	10	0.571
9	11	1.024
10	12	1.158
11	13	1.775
12	14	1.770
13	15	1.812
14	16	1.805
15	17	1.721
16	18	1.716

如表2所示，固体培养7 d后，Monacolin K 产量开始增加，从第10 d开始增加迅速，一直到13 d，之后增长变慢，到第16 d，Monacolin K 含量有下降的趋势。实验还发现，培养到第4 d，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，固体发酵的周期以15 d为宜。

### 2.3 温度对 Monacolin K 产量的影响

温度对红曲霉产 Monacolin K 很敏感，23  $^{\circ}\text{C}$ ~32  $^{\circ}\text{C}$  的范围内，Monacolin K 产量随着温度升高而急剧降低。在32  $^{\circ}\text{C}$ ，Monacolin K 产量非常低，23  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$  最为合适。但在发酵前7 d，23  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$  不适合菌体生长，因此采用变温培养，即：32  $^{\circ}\text{C}$ ~35  $^{\circ}\text{C}$  培养7 d后，降温至23  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$  培养至15 d。

### 2.4 初始pH值对 Monacolin K 产量的影响

分别调整起始pH值至2.5，3.0，4.0，5.0，6.0，7.0，8.0按上述条件进行固体发酵培养，测定 Monacolin K 产量，结果见表3。从表3知起始pH值在3~6时对比 Monacolin K 产量影响不大，所以试验中可选用自然 pH。这与红曲霉固态发酵产色素对 pH 的要求相同。

表3 起始pH对Monacolin K产量的影响

Table 3 Effect of initial pH on the Monacolin K production

实验号	起始pH	Monacolin K产量/(mg/g)
1	2.5	0.031
2	3.0	0.247
3	4.0	1.210
4	5.0	1.161
5	6.0	0.970
6	7.0	1.101
7	8.0	0.538

## 2.5 辅加碳源对Monacolin K产量的影响

分别添加0.2%的甘油、5%葡萄糖、5%麦芽糖及5%蔗糖为附加碳源,比较不同附加碳源对Monacolin K产量的影响,结果见表4。

表4 不同附加碳源对Monacolin K产量的影响

Table 4 Effect of different appendant carbon source on the Monacolin K production

实验号	附加碳源	Monacolin K产量/(mg/g)
1	0.2%的甘油	0.761
2	5%葡萄糖	0.743
3	5%麦芽糖	0.364
4	5%蔗糖	0.250
5	空白	0.219

由表4可知,这几种附加碳源的加入都有利于Monacolin K的积累,其中以0.2%的甘油和5%葡萄糖为附加碳源时,Monacolin K产量都较高,而甘油做附加碳源时,产量最高,故选择甘油为适宜的附加碳源。葡萄糖做附加碳源使得在菌体生长初期容易被利用,因而菌体生长较好。

## 2.6 氮源对Monacolin K产量的影响

选取各种氮源进行比较,结果见表5。

表5 不同附加氮源对Monacolin K产量的影响

Table 5 Effect of different nitrogen source and on the Monacolin K production

实验号	附加氮源	Monacolin K产量/(mg/g)
1	玉米粉	0.310
2	有机氮源	0.879
3	大豆粕	0.412
4	NaNO <sub>3</sub>	0.792
5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.506
6	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.625
7	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0.208
8	NH <sub>4</sub> Cl	0.372

实验表明,在所选择的附加氮源中,以有机氮源蛋白胨和无机氮源NaNO<sub>3</sub>较好。其中加入蛋白胨,Monacolin K产量可达0.879 mg/g;加入0.2%的NaNO<sub>3</sub>,Monacolin K产量可达0.792 mg/g。因此,我们选用蛋白胨作为附加氮源。

## 2.7 培养基配比的正交试验结果与讨论

由单因子试验可知,以质量分数为0.2%的甘油、5%的蛋白胨和50%的起始含水量为最好。

在单因子试验的基础上,选择了甘油、蛋白胨和起始含水量3个影响因素,在培养条件为:250 mL三角瓶中加20 g大米、pH自然偏酸、培养15 d的基础上作三因素四水平的正交试验,以确立培养基中各组分的质量分数及其配比。结果见表6。

表6 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)正交设计及结果Table 6 Design and results of L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) orthogonal experiment

试验号	A(甘油质量分数/%)	B(蛋白胨质量分数/%)	C(起始含水量/%)	Monacolin K产量/(mg/g)
1	0.0	0	40	0.476
2	0.0	0.3	50	0.638
3	0.0	0.5	60	0.491
4	0.0	0.7	70	0.0000
5	0.1	0	40	0.560
6	0.1	0.3	50	0.891
7	0.1	0.5	70	0.127
8	0.1	0.7	60	0.510
9	0.2	0	40	0.623
10	0.2	0.3	70	0.137
11	0.2	0.5	60	0.801
12	0.2	0.7	50	0.931
13	0.3	0	70	0.098
14	0.3	0.3	40	0.506
15	0.3	0.5	60	0.890
16	0.3	0.7	50	0.927
K1	0.401	0.439	0.541	
K2	0.522	0.543	0.847	
K3	0.623	0.577	0.673	
K4	0.605	0.592	0.091	
优水平	A <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	C <sub>2</sub>	
R	0.222	0.153	0.756	

主次顺序: C A B

表6的正交试验结果表明,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<sub>3</sub>B<sub>4</sub>C<sub>2</sub>,即甘油和蛋白胨的质量分数以0.2%和0.7%

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:250 mL 三角瓶中装 20 g 大米,甘油质量分数 0.2%、蛋白胨质量分数 0.7%,起始含水量 50%。

### 3 结论

最佳发酵培养基配方:250 mL三角瓶中装20 g大米,发酵时间15 d,采取变温培养,即32 ℃~35 ℃培养7 d后降至23 ℃~25 ℃培养到15 d, pH自然,麦芽汁斜面直接接种,甘油0.2%,蛋白胨0.7%,起始含水量50%,并保持在46%~52%。

采用优化工艺配方,结合最佳的培养条件,重复3次实验,结果表明,Monacolin K产量稳定在1.8 mg/g左右,最高产量为2.1 mg/g干固体。

建议进行中试以及工业化生产的实验时,适当调整发酵工艺以适应新条件,最终达到或超过实验室水平。同时可探索在线检测生物体生长,监控基质含水量工艺,实现传统固态发酵现代化。

### 参考文献

[1] 熊晓辉,张李阳,韦策,等.红曲霉菌产Monacolin K 固体发酵条件的优化[J].无锡轻工大学学报,2004.1:9

- [2] 陈运中.功能性红曲色素发酵工艺研究[J].食品科学,2003,7:83
- [3] 熊晓辉,张李阳,韦策,等.固体发酵生产Monacolin K的动力学模型[J].工业微生物,2003,12:27
- [4] 童群义.红曲霉产生的生理活性物质研究进展.食品科学[J].2003,24:163
- [5] 赵树欣,苏万春.红曲色素及其相关产物的代谢调控[N].中国食品报,2004,6:22
- [6] 中华人民共和国国家标准[S].食品添加剂(红曲米),GB4926-85
- [7] 中国微生物菌种保藏委员会等编.菌种目录[M].北京:中国农业科技出版社,1997,第三版
- [8] 中国科学院微生物研究所.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1973
- [9] 上海工业微生物研究所.红曲色素的研究与应用[J].工业微生物,1980,4:1-10
- [10] 章可秀,红曲霉及红曲色素[J].中国调味品,1989,2:1-5
- [11] 赵树欣.红曲霉及生理活性物质的研究III-红曲霉发酵生产Monacolin K 初步研究[J].无锡轻工业学院学报,1998,2:6
- [12] 栾兴社.论固态发酵[J].山东食品发酵,1996(2):35-38
- [13] 傅亮.红曲色素在红曲霉发酵代谢中生理功能的探讨[J].食品科学,1998,10:10-12

### 胡萝卜下酒会中毒

胡萝卜中含有丰富的胡萝卜素,在肠道中经酶的作用后可变成人体所需的维生素 A,人体缺乏维生素 A,易患干眼病、夜盲证,易引起皮肤干燥,以及眼部、呼吸道、泌尿道、肠道粘膜的抗感染能力降低。儿童缺乏维生素 A,牙齿和骨骼发育还会受到影响。现代药理研究证明,胡萝卜中含有一种能够降低血糖的成分。即将胡萝卜经石油醚提取后可得到一种不定型的黄色物质,对动物和人都有明显的降低血糖作用。此外,人若每天服三次胡萝卜汁,可降低血压,并有抗肺癌作用。英国癌症研究会主席理多尔认为,吸烟者常吃些胡萝卜,癌症发病率比不吃胡萝卜者会明显下降。

胡萝卜现已是世界公认的营养佳品。1991年1月1日欧洲经济共同体作出决议,将胡萝卜列为水果。根据这项决议,在用胡萝卜制作蜜饯时,胡萝卜被称为水果。

诚然,胡萝卜具有很高的保健作用和医疗价值,但美国食品专家却告诫人们:“胡萝卜下酒”的吃法是不利健康的。因为胡萝卜中丰富的胡萝卜素和酒精一同进入人体,就会在肝脏中产生毒素,引起肝病。所在,人们要改变“胡萝卜下酒”的传统吃法,胡萝卜不宜做下酒菜,饮酒时也不要服用胡萝卜素营养剂,特别是在饮用胡萝卜汁后不要马上饮酒,以免危害健康。