

固定化液态发酵红曲霉色素的研究

王琛, 张宏宇, 李纯, 李韬

(辽宁省农业科学院食品与加工研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 对红曲霉 F4018 菌株固定化(用海藻酸钙包埋法固定)液态发酵生产色素进行了研究。其整个发酵过程分为 3 个阶段: 0~48 h 为快速生长期, 并伴随少量色素合成; 48~96 h 为平衡期, 大量合成色素, 占总色素的 85% 以上, 其中红色素的合成速度超过黄色素的合成速度; 96 h 后衰老期, 色素色价开始下降, 但下降缓慢, 持续时间长, 发酵液的色调偏红。同传统的液态发酵具有两方面优势: (1) 具有一样的生长期, 较长、稳定的平衡期和缓慢的衰老期, 非常有利于色素产量的提高。(2) 多批次发酵后固定化细胞的稳定性表现仍然良好, 适合现代工业化大规模生产的需要。

关键词: 红曲霉; 固定化; 色价

中图分类号: TS264.4; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)04-0330-03

Study of Pigment Production via Liquid-state Fermentation by Immobilized Monascus

WANG Chen, ZHANG Hong-yu, LI Chun, LI Tao

(Food and Processing Institute, Liaoning Academy of Agriculture Science, Shenyang 110161, China)

Abstract: The pigment production via liquid-state fermentation by monascus F4018, immobilized on sodium alginate, was studied. In the first fermentation phase (0~48 h), the cells growth rapidly but only a small quantity of pigment was produced. In the balanced phase (48~96 h), pigments were produced in a great quantity (>85%) and the synthesis rate of the red pigment was higher than that of the yellow pigment. After 96 h, the pigment values became to slowly drop. Compared with the traditional pigment fermentation, the immobilized cell mediated fermentation had similar cell growth phase, longer and more stable balanced phase and slower decline phase, which was more favorable for the pigment production. Besides, the immobilized cells showed higher operational stability, suitable for the modern industry with a large scale.

Key words: monascus; immobilization; pigment value

红曲色素是由红曲霉经发酵产生的天然色素, 含黄、橙、红等多种色素成分, 具有色价高、毒性低、稳定性好、对蛋白质着色强等优点, 是一种安全、天然的食品添加剂^[3], 因此进一步开发利用红曲色素有着十分重要的意义。

我国目前红曲色素的生产仍以传统的固态发酵法为主, 其生产效率低, 劳动强度大, 品质难以控制。近年液态深层发酵法生产红曲色素虽然取得一定进展, 实现了大规模的工业化生产, 但其发酵色价低, 只有固态的 10% 左右^[1,4], 因而难以推广。

固定化液态发酵具有菌体密度高、反应速率快、稳定性好, 使用寿命长、可重复利用、便于产物的分离等优点^[2]。因此, 在液态发酵的基础上, 采用细胞固定化技术, 综合固态发酵和液态深层发酵的双重优点, 可以有效提高红曲色素的产率和色价。

本实验采用海藻酸钙包埋法固定化红曲霉高产水溶性色素的菌株, 然后将其与传统的液态发酵进行比较, 研究其固定化液态发酵的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

红曲霉 F4018 菌株(沈阳农业大学食品学院提供菌株)。

1.1.2 培养基

(1) 麦芽汁琼脂斜面培养基(g/L): 取一定量的大麦芽, 粉碎, 加 4 倍于麦芽重量的 60 °C 热水, 在 55~60 °C 条件下保温糖化 3~4 h, 并不断搅拌, 然后用纱布过滤, 滤液经煮沸后再用滤纸或脱脂棉过滤一次, 即得澄清的麦芽汁, 加水稀释成 10~12 °Brix 麦芽汁。

pH 自然, 加入 2% 琼脂, 取 4~5 mL 于试管中, 在 121 °C, 0.1 MPa 下灭菌 20~25 min, 冷却后备用。

收稿日期: 2007-10-15

作者简介: 王琛(1979-), 女, 硕士, 从事食品发酵工程及天然色素的开发

(2) 发酵培养基 (g/L): 大米粉 80, NH₄NO₃ 4, KH₂PO₄ 2, MgSO₄ 1, ZnSO₄ 0.2, MnSO₄ 0.4, pH 5.5。

将配好的培养基在 121 °C, 0.1 MPa 下灭菌 20~25 min, 冷却后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 红曲霉菌株 F4018 孢子悬液的制备

将红曲霉菌株 F4018 接种到斜面培养基上, 30 °C 黑暗培养 72 h, 待孢子成熟后, 加入适量无菌生理盐水反复冲洗, 将得到的孢子悬液置于装有玻璃珠的三角瓶中, 30 °C 充分振荡培养 1~2 h, 使孢子充分分散, 然后稀释至 1×10⁹ 个/mL 备用。

1.2.2 海藻酸钙包埋法

将 2.5 g 海藻酸钠加入到 50 mL 热水中充分溶解混匀, 121.3 °C 下灭菌 10 min, 取出后室温静置至气泡消失。

在无菌操作条件下, 取 10 mL 孢子悬液加入到 10 mL 海藻酸钠溶液中, 搅拌均匀制成海藻酸钠—孢子悬浮液。然后, 将此悬浮液用 9 号针头的注射器逐滴滴入 200 mL 质量浓度为 40 g/L 的 CaCl₂ 溶液中, 磁力搅拌作用下形成直径 2~3 mm 珠状颗粒, 颗粒继续在 CaCl₂ 溶液中浸泡 1~2 h, 滤出后用无菌生理盐水洗涤数次。最后, 置于无菌生理盐水中 4 °C 下保存备用。

1.2.3 红曲霉菌株的液态培养

在 500 mL 的发酵培养基中接入 10 mL 孢子悬液, 30 °C 黑暗振荡 (180 r/min) 培养 144 h, 测定其发酵液的 OD 值, 转换成色价。

1.2.4 红曲霉菌株的固定化液态培养

在 500 mL 的发酵培养基中加入由 10 mL 孢子悬液制取的固定化孢子, 30 °C 黑暗振荡 (180 r/min) 培养 144 h, 测定其发酵液的 OD 值, 转换成色价。

1.2.5 色价测定

发酵液纱布过滤后将滤液在 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 mL 于试管中, 加水稀释。稀释液用 721 分光光度计在 420 nm 和 520 nm 测吸光度。按如下公式计算色价:

色价 (U/mL) = OD₄₂₀ × 稀释倍数 + OD₅₂₀ × 稀释倍数。

1.2.6 色调测定

色调 = OD₅₂₀ / OD₄₂₀

1.2.7 残糖测定

费林试剂法测定。

1.2.8 pH 值测定

PHS-3TC 精密数显酸度计 (0.01 级)。

2 结果与分析

2.1 传统液态发酵和固定化液态发酵的色价比较

按 1.2.3 和 1.2.4 方法, 分别对红曲霉菌进行液态培养和固定化液态培养, 并每隔 24 h 测定发酵液的色价, 结果如图 1。

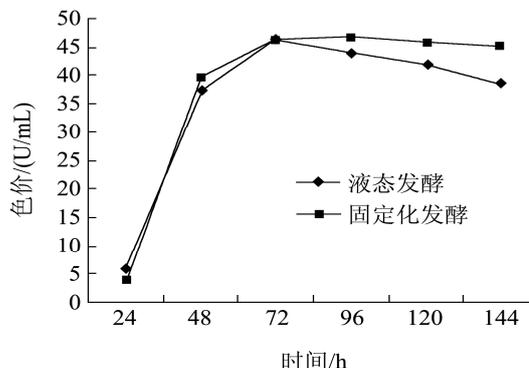


图 1 液态发酵培养和固定化液态发酵培养的色价比较

Fig.1 Pigment value course of free and immobilized cells at optimum conditions

由图 1 可见, 固定化液态发酵与液态发酵的对数生长期色价水平基本一致。但在生长顶点 (72 h) 后, 液态发酵的色价开始较大幅度的下降; 而固定化液态发酵的色价基本不变。可见固定化液态发酵比比液态发酵有更长的平衡期, 有利于色素产量的提高。

2.2 固定化液态发酵的特性分析

每隔 24 h 测定固定化液态发酵液的残糖、pH 值、色价, 结果见图 2 和图 3。

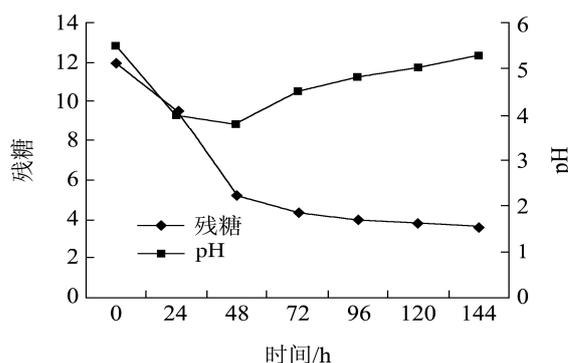


图 2 发酵过程中残糖和 pH 值的变化曲线

Fig.2 The variation of sugar and pH in the process in fermentation course

由图 2 和图 3 可知, 整个发酵过程大致可分为三个阶段。第一阶段为 0~48 h, 是快速耗糖的时期, 要消耗总糖的 65% 以上, 主要是菌体的快速生长和伴随着少量的色素合成; 第二阶段为 48~96 h, 是色素大量合成的时期, 所产色素占总色素的 85% 以上, 并且此阶段红色色素的合成速度超过黄色色素的合成速

度。96 h 以后为第三阶段, 此时菌体已趋衰老, 色素有下降的趋势, 但相对缓慢, 持续时间非常长, 且发酵液的色调偏红。

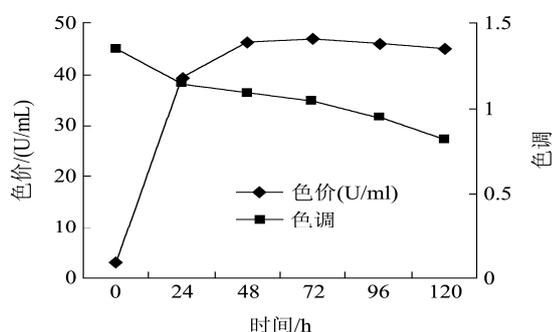


图3 发酵过程中色价和色调的变化曲线

Fig.3 The variation of pigment value and color in fermentation course

2.3 固定化液态发酵的稳定性分析

按 1.2.4 方法对红曲霉进行固定化液态发酵, 并每隔 3 d 更换固定化细胞的培养基, 并测定每一次发酵液的色价, 结果如图 4。

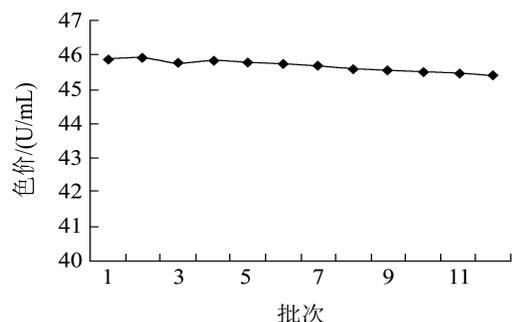


图4 固定化细胞的发酵稳定性

Fig.4 Ferment stability of Monascus F4018

固定化液态发酵与游离液态发酵相比的优势是发酵结束后可回收重复使用。由图 4 可知, 红曲霉固

定化细胞重复发酵 12 次连续作用 45 d, 其发酵液色价基本保持稳定, 并控制在 45 U/mL 以上。但随着发酵批次的增加, 胶珠受到发酵液中离子侵蚀的效应日益显著, 机械强度也日渐下降, 发酵液色价也缓慢下降。尽管如此, 固定化细胞在多批次发酵的稳定性方面仍表现得非常好, 适合于现代工业化大规模生产的需要。

3 结论

红曲霉 F4018 菌株固定化(用海藻酸钙包埋法固定)液态发酵的发酵过程可分为 3 个阶段: 0~48 h 为快速生长期, 并伴随少量色素合成; 48~96 h 为平衡期, 大量合成色素, 占总色素的 85% 以上, 其中红色素的合成速度超过黄色素的合成速度; 96 h 后衰老期, 色素色价开始下降, 但下降缓慢, 持续时间长, 发酵液的色调偏红。

固定化液态发酵与传统的液态发酵相比较, 具有两方面优势: (1) 具有一样的生长期, 较长、稳定的平衡期和缓慢的衰老期, 非常有利于色素产量的提高。(2) 多批次发酵后固定化细胞的稳定性表现仍然良好, 适合现代工业化大规模生产的需要。

参考文献

- [1] 林祖申.红曲的生产方法及其在调味品中的应用[J].中国酿造,2005,(10):1-4
- [2] 马子俊,陆志号.固定化细胞技术及其应用[M].银川:宁夏人民出版社,1990,13-34
- [3] 石鹤,周毅.红曲霉液态培养条件与产色的关系菌[J].食品研究与开发,2004,5(3): 83-85
- [4] 王克明.PVA 固定化红曲霉发酵生产红曲色素的研究[J].烟台大学学报,1998,11(4):16-18

(上接第 383 页)

- [4] Bidigare R. R., Kennicutt II M. C., et al. A photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. J. Phycol. 1993,29: 427-434
- [5] Muller T., Blerb W., et al. Snow algae from northwest Svalbard: their identification, distribution, pigment and nutrient content. Polar Biol. 1998,20: 14-32
- [6] M. Kobayashi. In vivo antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga Haematococcus pluvialis. Appl. Microbiol Biotechnol.2000, 54: 550-555
- [7] Smith J A , W eidemann M J. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1993, 162: 261-268
- [8] Wang H, Joseph J A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader [J]. Free Radic Biol Med ,1999,27 (526) : 612-616
- [9] Carolina Biological Supply Company. Culturing Algae. USA,1978