

红曲霉液态发酵条件的优化

付荣霞,崔 艳,杨树成,高 蓉

(天津市农副产品深加工技术工程中心/天津农学院 食品科学与生物工程学院,天津 300384)

摘要:以红曲米粉中分离纯化的红曲霉为菌种进行液态发酵,生产红曲色素,利用正交试验设计,研究不同碳源、氮源、pH、装液量对红曲霉色价及菌体干重的影响。结果表明:红曲霉最佳发酵工艺条件为以3%玉米粉为碳源、0.02%酵母膏为氮源,调整发酵液初始pH至4.0,装液量125 mL/250 mL,红曲霉产生的红曲色素能较好地积累,总色价可达93.66 U·mL⁻¹。

关键词:红曲霉;液态发酵;色价

中图分类号:TQ929.2 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)07-0130-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.07.0130

红曲是一种兼有食疗作用的传统中药,具有化痰、健脾消食、抑制肿瘤生长等作用^[1-3]。红曲产品(红曲米、红曲米粉或红曲红)的应用越来越广泛,可以作为天然色素^[4-5],取代合成色素,防腐红曲和功能红曲的产量也在增加^[6-7]。红曲霉属于腐生真菌,最适的生长pH3.5~5.0,尤嗜乳酸。在26~42℃均可生长,最适温度为32~35℃,可耐受10%乙醇。红曲霉能产生大量的天然红色素,是制造红曲米的主要微生物^[8-10]。

传统生产红曲色素的方法是利用固态发酵,近十几年也应用液态发酵来生产^[11]。液态发酵法的特点是周期短,产量高,杂质少,用粮省等,但是红曲色素色价偏低。本文从福建古田特产的红曲米粉中分离纯化红曲霉,研究液态发酵条件对红曲霉产色的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

红曲霉由福建古田辉荣工贸有限公司提供的红曲米粉中分离、纯化获得。试验所用仪器有ZDX-35BI型高压蒸汽灭菌锅;YLE-2000型电热恒温培养箱、DHZ-CA型大容量恒温振荡器和UV-7504紫外可见分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 种子培养 种子培养基的配制:NaNO₃ 2 g,麦芽糖 30 g,KCl 0.5 g,K₂HPO₄ 1 g,MgSO₄ 0.5 g,FeSO₄ 0.01 g,蒸馏水1 000 mL;在用蒸馏水定容之前,调整培养基pH至7,用250 mL三角瓶分装,每瓶100 mL,共3瓶;121℃灭菌20 min。取新鲜菌丝二环,接种到种子培养基中,将三角瓶置于摇床中,28℃ 160 r·min⁻¹震荡培养3 d,选择长势较好的一瓶做种子液。用灭菌玻璃珠将种子液打碎备用。

1.2.2 不同碳源对红曲霉产色素的影响 分别以葡萄糖、淀粉、玉米粉、麦芽糖、大米粉为碳源(3%),其余成分同种子培养基,用250 mL三角

收稿日期:2014-10-30
第一作者简介:付荣霞(1972-),女,湖南省汨罗市人,博士,副教授,从事营养与生物技术研究。E-mail: furongxia@ sina.com。

Study on Physiological Property of *Pleurotus ferulae* Lanzvi. Mycelium

SHAO Hong-wei

(College of Life Science, Qilu Normal University, Jinan, Shandong 250013)

Abstract: In order to explore the suitable condition for growth of *Pleurotus ferulae* Lanzvi. mycelium, the growth rate of *Pleurotus ferulae* Lanzvi. mycelium was studied under different nutrient and culture conditions. The results showed that the optimum carbon source for mycelium growth was maltose, nitrogen source was peptone. Potassium dihydrogen phosphate and magnesium sulfate could promote mycelium growth, and ferrous sulfate had inhibitory effect. At 25℃, the hyphae grew the fastest. The alkaline medium environment was suitable for the mycelium growth, the most appropriate pH was 8.0.

Keywords: *Pleurotus ferulae* Lanzvi.; mycelial growth; growth speed

瓶分装,装液量为 100 mL。调整液体 pH 至7.0。经 121℃灭菌 20 min 后,接入 3 mL 种子液,28℃震荡培养 6~7 d。

1.2.3 不同氮源对红曲霉产色素的影响 分别采用尿素、黄豆粉、硝酸钠、NH₄Cl、酵母膏为氮源(0.02%),其余条件同 1.2.2。

1.2.4 不同 pH 对红曲霉产色素的影响 分别选用 3.5、4.5、5.5、6.5、7.0 的 pH,其余条件同 1.2.2。

1.2.5 不同装液量对红曲霉产色素的影响 装液量分别为 50、75、100、125、150 mL,接种量为液体培养基体积的 3%,其余条件同 1.2.2。

1.2.6 正交试验 以碳源、氮源、pH、装液量为因素,利用 L₉(3⁴)进行正交试验,各因素水平见表 1。

表 1 正交试验设计

Table 1 The level and factor arrangement of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 碳源	B 氮源	C pH	D 装液量/mL
	Carbon source	Nitrogen source		Liquid volume
1	淀粉	黄豆粉	4.0	100
2	玉米粉	硝酸钠	4.5	125
3	大米粉	酵母膏	5.0	150

1.2.7 测定项目与方法 1)菌体干重的测定:用两层纱布过滤发酵液,收集菌体,105℃烘干,称重。菌体干重以每 100 mL 发酵液所含干菌体量(g)表示。2)色价的测定:包括胞外和包内红

曲色素色价测定。

胞外红曲色素色价的测定:2 层纱布过滤发酵液以后,50%乙醇稀释,摇匀,以 50%乙醇为对照,利用分光光度计测定 510 和 410 nm 的 OD 值,记作 A₅₁₀和 A₄₁₀^[12]。

胞内红曲色素色价的测定:将烘干的菌丝体、充分研磨,准确称取 0.05 g 于 250 mL 三角瓶中,用 75%乙醇溶液稀释至 100 mL,60℃水浴萃取 30 min,过滤,用适量 75%乙醇稀释,以 75%乙醇做空白对照,分别用分光光度计在 510 和 410 nm 处测定吸光度,分别记作 A'₅₁₀和 A'₄₁₀。

红曲色素总色价为包外和包内色素色价的总和。

胞外红曲色素的色价(U·mL⁻¹)=(A₅₁₀ + A₄₁₀)×稀释倍数 (1)

胞内红曲色素的色价(U·mL⁻¹)=(A'₅₁₀ + A'₄₁₀)×稀释倍数 (2)

总色价(U·mL⁻¹)= 胞外红曲色素色价+胞内红曲色素色价 (3)

2 结果与分析

2.1 不同碳源对红曲霉产色素的影响

从表 2 中可以看出,当淀粉作为碳源时,色价最高,其次是大米粉,二者发酵液均呈深红色。以玉米粉为碳源时,红曲霉菌丝体生长量最多,产色较好,说明玉米粉中含有的某些营养物质促进了红曲霉的生长。以葡萄糖或麦芽糖为碳源时,总色价均较低,发酵液颜色为浅粉色,菌体生长量较少。

表 2 不同碳源对红曲霉产色素的影响

Table 2 The effect of different carbon sources on pigment of monascus

碳源 Carbon source	胞外色素 OD 值 Exo-cell pigment		胞内色素 OD 值 Endochrome		总色价/(U·mL ⁻¹) Total color value	菌体干重/(g·100 mL ⁻¹) Dry cell weight
	510 nm	410 nm	510 nm	410 nm		
葡萄糖	0.164	0.151	0.016	0.014	9.15	0.09
淀粉	1.918	1.916	0.028	0.036	51.14	0.68
玉米粉	1.082	1.112	0.017	0.017	28.74	2.18
麦芽糖	0.068	0.072	0.019	0.016	8.40	0.09
大米粉	1.283	1.528	0.012	0.010	32.51	0.28

2.2 不同氮源对红曲霉产色素的影响

从表 3 可以看出,利用酵母膏、黄豆粉作为氮源时,菌体干重大,总色价高。使用硝酸钠或者 NH₄Cl 作为氮源时,菌体干重很小,总色价也较低,但使用硝酸钠效果略好。以尿素为氮源时,红曲霉基本不生长。

2.3 不同的 pH 对红曲霉产色素的影响

由表 4 可以看出,红曲霉在发酵过程中,菌体干重与色价呈正相关,中性环境的培养液既不利于菌体生长,也抑制了红曲霉的产色;中性偏酸的环境有利于红曲霉菌产红曲色素,菌体得率也较高。当 pH4.5~6.5 时,菌体生长良好,总色价较

高,发酵液颜色较深,其中以 pH4.5 的培养液效果最好,红曲霉产色最适 pH 应该最接近 4.5。

表 3 不同氮源对红曲霉产色素的影响

Table 3 The effect of different nitrogen sources on pigment of monascus

氮源 Nitrogen source	胞外色素 OD 值 Exo-cell pigment		胞内色素 OD 值 Endochrome		总色价/(U·mL ⁻¹) Total color value	菌体干重/(g·100 mL ⁻¹) Dry cell weight
	510 nm	410 nm	510 nm	410 nm		
尿素	-	-	-	-	-	-
NH ₄ Cl	0.275	0.350	0.016	0.014	12.23	0.32
硝酸钠	0.230	0.380	0.018	0.020	13.70	0.36
黄豆粉	1.106	1.615	0.034	0.036	41.21	3.41
酵母膏	0.533	1.096	0.019	0.020	24.09	4.13

表 4 不同 pH 对红曲霉产色素的影响

Table 4 The effect of different pH on on pigment of monascus

pH	胞外色素 OD 值 Exo-cell pigment		胞内色素 OD 值 Endochrome		总色价/(U·mL ⁻¹) Total color value	菌体干重/(g·100 mL ⁻¹) Dry cell weight
	510 nm	410 nm	510 nm	410 nm		
3.5	0.078	0.021	0.010	0.010	4.49	0.65
4.5	0.140	0.124	0.050	0.048	22.24	2.56
5.5	0.109	0.082	0.017	0.019	9.11	2.42
6.5	0.130	0.100	0.012	0.015	7.60	2.05
7.0	0.014	0.012	0.012	0.003	1.26	0.02

2.4 装液量的差异对红曲霉产色素影响

由表 5 可以看出,利用 250 mL 的三角瓶,装液量为 100 和 125 mL 时,菌体干重较大,总色价

高,两者差别不大。装液量为 150 mL 时,菌体干重较大,总色价最高。装液量为 50 和 75 mL 时,菌体干重很小。

表 5 不同装液量对红曲霉产色素的影响

Table 5 The effect of different liquid volume on pigment of monascus

装液量/mL Liquid volume	胞外色素 OD 值 Exo-cell pigment		胞内色素 OD 值 Endochrome		总色价/(U·mL ⁻¹) Total color value	菌体干重/(g·100 mL ⁻¹) Dry cell weight
	510 nm	410 nm	510 nm	410 nm		
50	0.059	0.052	0.001	0.003	1.91	0.02
75	0.078	0.057	0.002	0.003	2.35	0.05
100	0.105	0.101	0.011	0.021	8.46	0.32
125	0.149	0.116	0.009	0.021	8.65	0.22
150	0.154	0.133	0.019	0.022	11.07	0.21

2.5 正交试验

由表 6 可见,装液量是影响色素产率的关键因子;其次是 pH,而碳源影响最小。菌体干重只是反映菌体生长状况的一个指标,试验并不以利用菌体本身(比如菌体蛋白)为目的,而是要获得最大量的红曲色素,而红曲色素的产量以总色价来评价,所以,以总色价的正交试验分析结果为红

曲霉产色素的最佳培养条件。红曲霉产红色素最优水平组合为 A₂B₃C₁D₂,即以玉米粉为碳源,酵母膏为氮源,pH4.0 装液量 125 mL。分析得到的最优水平组合与实际得到的最优水平组合相一致,在 A₂B₃C₁D₂ 组合发酵培养中,红曲霉菌丝体生长量比较多,发酵液为橙红色,偏深,生产的红色素总色价为 93.66 U·mL⁻¹。

表 6 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 6 The results of orthogonal experiment (L₉(3⁴))

试验号 No.	因素 Factors				菌体干重/(g·100 mL ⁻¹)(K) Dry cell weight	色价/(U·mL ⁻¹)(K') Total color value
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	0.38	13.79
2	1	2	2	2	1.94	56.50
3	1	3	3	3	2.23	5.19

续表 6 Continuing Table 6

试验号 No.	因素 Factors				菌体干重/(g·100 mL ⁻¹)(K)	色价/(U·mL ⁻¹)(K')
	A	B	C	D	Dry cell weight	Total color value
4	2	1	2	3	1.87	8.33
5	2	2	3	1	1.09	19.82
6	2	3	1	2	1.14	93.66
7	3	1	3	2	1.92	14.81
8	3	2	1	3	0.24	16.32
9	3	3	2	1	0.50	20.96
K ₁	4.55	4.17	1.76	1.97		
K ₂	4.10	3.27	4.31	5.00		
K ₃	2.66	3.87	5.24	4.34		
K' ₁	75.48	36.93	123.77	54.57		
K' ₂	121.81	92.64	85.79	164.97		
K' ₃	52.09	119.81	39.82	29.84		
极差 R	1.89	0.90	3.48	3.03		
极差 R'	69.72	82.88	83.93	135.13		

3 结论

利用液态发酵培养红曲霉,通过单因素和正交试验,研究各因素对红曲色素产量的影响,红曲霉的最佳发酵工艺条件为 3%玉米粉作碳源、0.02%酵母膏作氮源,调整发酵液初始 pH 至 4.0,装液量 125 mL/250 mL,红曲霉产生的红曲色素能较好地积累,色价可达 93.66 U·mL⁻¹。

参考文献:

[1] 毛瑞丰.红曲米中红曲霉的分纯及红曲色素测定[J].广西轻工业,2003(1):29-30.
[2] 邢旺兴,宓鹤鸣,贺祥,等.红曲考证[J].中药材,2000,17(3):175-176.
[3] 宋洪涛,宓鹤鸣,郭涛.中药红曲的研究进展[J].药学实践杂志,1999,17(3):172-173.
[4] 杨宗渠,朱军,宋卫东,等.红曲米粉安全性控制技术[J].食品科学,2007,28(3):121-122.
[5] 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):154-156.
[6] Johanna Fink-Gremmels. Use of Monascus Extracts as an Alternative to Nitrite in Meat Product[M]. Fleischwirtsch;1991.
[7] 范志诚,徐伟,王金凤,等.玉米液态发酵制红曲色素及在食品防腐中应用研究[J].中国调味品,2010,35(12):89-92.
[8] 吴定,方琪琼,孙德坤,等.红曲霉的分离和纯化研究[J].食品科学,2003,24(10):107.
[9] Carvalho J C,Oishi B O,Pandey A,et al. Biopigments from Monascus:strain selection,citrinin production and color stability[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005,48:885-894.
[10] Kim Chulyoung,Jung Heeyong,Kim Yong Ook,et al. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006,264(1):117-124.
[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):24-27.
[12] 石鹤,李清顺.不同培养基对红曲霉产色的影响[J].中国调味品,2005,317(7):35-37.

Optimization of Monascus' Liquid State Fermentation Conditions

FU Rong-xia,CUI Yan,YANG Shu-cheng,GAO Rong

(Tianjin Engineering and Technology Research Center of Agricultural Products Processing/Food Science and Biological Engineering Department,Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: In order to take Monascus separated and purified from Red Kojic Rice as a stain,make the liquid state fermentation,and produce Monascus Pigment,taking five different sorts of carbon source,nitrogen source,pH and the volume of liquid as single factor,the three better standards among these factors via the pigment value and the determination of the thalli's dry weight were determined,and finally make an orthogonal test. The orthogonal test showed the best condition of fermentation technology were 3% corn flour as carbon source,0.02% yeast extract as nitrogen source,adjusting the initial pH 4.0 of fermentation broth and the volume of liquid was 125 mL/250 mL,during Monascus Pigment produced by Monascus it would have a better accumulation and its color value would reach 93.66 U·mL⁻¹ in total.

Keywords: Monascus; liquid state fermentation; pigment value