

# 正交试验法优化产 Monacolin K 发酵工艺条件

郑春明

(台州科技职业学院,浙江 台州 318020)

**摘要:**为进一步提高红曲米红曲色素含量,通过文献查阅和市场调研,确定接种量(A)、培养温度(B)、pH(C)、装液量(D) 4 种试验因素,各取 3 种水平,按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,以优化红曲霉发酵生产工艺,提高红曲发酵产品中 Monacolin K 的含量。结果表明:不管是极差分析还是方差分析,这 4 种因素变化均对红曲霉发酵形成 Monacolin K 产生极显著的影响,其最优组合为  $A_1B_3C_3D_3$ ,即 7% 接种量、培养温度 26 °C、pH 6.0 和装液量 100 mL 的组合下,Monacolin K 达到 250 mg·L<sup>-1</sup>。

**关键词:**红曲霉;正交试验;Monacolin K;方差分析;极差分析

**中图分类号:**TS201.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)05-0093-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.05.0093

红曲既是传统发酵食品(如红曲色素),又是传统的发酵中药。它产生的红曲色素在我国古代就被用作食品的染色加工,天然无害的优点广受欢迎<sup>[1-2]</sup>,从而沿用至今,如今红曲色素不仅被用作食品染色,还被广泛应用于药品、化妆品等<sup>[3-4]</sup>。此外,20 世纪 70 年代日本科学家远藤章从红曲菌分离出一种能降低血清胆固醇的物质——Monacolin K<sup>[5]</sup>,引起医学界对红曲米的关注。1980 年美国的 Alberts 等人也从土曲霉(*Aspergillus terreus*)发酵液中发现了洛伐它汀(Lovastatin, Mevinolin),研究表明洛伐它汀和红曲中的 Monacolin K 是同一种物质。1985 年,美国科学家 Goldstein 和 Brown 进一步找出了 Monacolin-k 抑制胆固醇合成的作用机理,并因此获得诺贝尔奖。红曲也由此名声大噪。

红曲发酵工艺在我国已经有上千年的历史,并被广泛应用于食品生产。但红曲霉发酵能形成一种能降低人体胆固醇的莫纳可林(Monacolin K)却是 20 世纪 70 年代发现的,随着现代物质条件的改善,人们患“三高”现象却越来越严重。功能性降血脂食品逐渐被开发出来,红曲产品的需求远未饱和,故对红曲发酵生产工艺进一步优化,提高红曲米红曲色素含量是很有现实意义的。据世界卫生组织公布的数据,每年死亡人数中超过 50% 的人死于心脑血管疾病,取代癌症成为人类

健康的头号杀手,而 Monacolin K 被认为是目前最佳的血脂调节物质。然而就这两种物质的巨大市场而言,它们的供应却十分匮乏。其中一个原因便是红曲霉发酵产品的产量过低。本项目就通过正交试验设计优化红曲霉发酵生产工艺条件,旨在提高红曲产品 Monacolin K 的产量,为企业提供实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要设备仪器 摇床 QYC-2102C 全温震荡培养箱;电子天平,PTX-FA210;紫外/可见分光光度计,UV-5100 型;立式压力蒸汽灭菌器,YXO-LS-50G;手提式压力蒸汽灭菌锅,YXQ-SG41.280;奥豪斯 pH 计(Starter 3C);洁净工作台,SW-CJ-2F;高速冷冻离心机,HC-3018R;超声波细胞粉碎机;数显电热鼓风干燥箱,DHG-9070AS;隔音箱,IN92-IZN;电热恒温水浴锅,HH-S11-2S。

1.1.2 菌种来源 红曲霉菌种来自浙江师范大学,经多次筛选培育,编号 zjsfedu02。

1.1.3 主要试剂 洛伐它汀标准试剂,从北京一家标准试剂网采购;75% 乙醇(AR);葡萄糖(AR);硝酸钠(AR);磷酸氢二钾(AR);硫酸镁(AR);硫酸亚铁(AR)。

1.1.4 培养基 菌种活化培养基:新鲜土豆(去皮)20%,牛肉膏 0.4%,葡萄糖 2%,琼脂粉 1.5%,自然 pH。PDA 液体培养基:新鲜土豆(去皮)20%,葡萄糖 2%,自然 pH,用于菌种扩大培养。PDA 液体发酵培养基:NaNO<sub>3</sub> 2 g、KCl 0.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g、FeSO<sub>4</sub> 0.01 g、

收稿日期:2017-03-13

基金项目:浙江省教育厅高等学校访问学者专业发展资助项目(FX2014200)

作者简介:郑春明(1960-),男,浙江省台州市人,硕士,副教授,从事微生物、统计学、组织培养等教学研究。E-mail:chunming863@163.com。

麦芽糖 30 g、新鲜土豆(去皮)10%、蒸馏水1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 菌种制备 (1)菌种活化:取冷藏的菌种→倒入 5 mL 无菌水洗下菌种→吸取刚洗下来的菌种液按每个培养皿 0.5 mL 菌液→涂布接种菌种活化培养基上→28 ℃恒温培养箱培养 3 d。(2)菌种扩大培养:用无菌水冲淋平板,制成菌落悬浊液接种到装有 PDA 液体培养基的250 mL三角烧瓶中→28 ℃和 180 r·min<sup>-1</sup>的摇床中培养 3 d→待用。

1.2.2 发酵工艺条件优化设计 根据资料查阅,考察接种量、发酵温度、培养基 pH 和250 mL规格三角烧瓶的装液量作为本次试验的试验因子,每个因子取 3 个水平并按照随机排序(见表 1),以减少主观因素导致的误差<sup>[6]</sup>,按照正交试验设计表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行试验(见表 1)。

表 1 产 Monacolin K 发酵工艺优化  
试验因素水平

Table 1 Factors and levels of fermentation conditions optimization test for producing Monacolin K				
水平 Levels	试验因素 Factors			
	接种量/% (A)	发酵温度/℃ (B)	pH	装液量/mL (D)
	Inoculum concentration	Fermentation temperature	(C)	Liquid volume
1	7	20.0	8.0	130
2	3	32.0	4.0	70
3	11	26.0	6.0	100

将已按 PDA 液体发酵培养基配方配制完成的培养基,按表 1 装液量要求对各试验处理号分装培养基到 250 mL 三角烧瓶中,并按试验水平调节 pH,八层纱布包扎,将处理号标记在锥形瓶上,每个处理号配制 5 瓶,121 ℃灭菌 20 min,冷却至室温;将灭菌后的培养基转移到超净工作台内,再按表 1 列出的接种量接种已扩大培养的菌种。接种完成后,分别放在设置为 20、26 和 32 ℃三种温度的摇床中进行培养,发酵前 3 d,摇床转速为 160 r·min<sup>-1</sup>,从第 4 天开始,摇床转速设置为 180 r·min<sup>-1</sup>。共发酵培养 7 d。

1.2.3 Monacolin K 测定方法 (1)制作工作曲线:精确称取 Lovastatin 标准品 100 mg,用 70%酒精加 1%亚硫酸钠(v/v, 100:1)溶解,倒入 100 mL容量瓶中定容,制成 1 mg·mL<sup>-1</sup>标准液。

再分别制成每毫升 0、6、12、24、36、48、64、96 μg 的溶液,在 238 nm 波长下测定吸光度,作标准曲线,并求得回归方程:A=0.0024C-0.0006。

(2)处理发酵液:将发酵培养 7 d 后的发酵浸取出,放置于冰箱冷冻储藏 15 min,以停止红曲霉菌的生理活性,15 min 后随机抽取处理号 1 的 3 只锥形瓶,从每只锥形瓶中准确量取 5 mL 菌液,加入等量 75%乙醇,超声波震碎 3 min,8 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min。为了减少红曲色素对 Monacolin K 测定时的影响,将离心后的上清液通过中性氧化铝柱层析,红曲色素则被层析柱吸附,而 Monacolin K 则被 75%乙醇洗脱出来。其它 8 个处理号均按照此方法进行处理。

(3)测定 Monacolin K:将上述洗脱液直接或稀释后放在紫外/可见光分光光度计 UV-5100 型中进行测定<sup>[7]</sup>,测定波长为 238 nm,读取吸光度 A。再按照图 1 中列出的方程计算 Monacolin K 浓度,再乘以稀释倍数。

1.2.4 统计分析 使用 MS Excel 2013 sp1 软件进行试验设计与数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

由图 1 可知,当洛伐他汀浓度在 0~96 μg·mL<sup>-1</sup>时,浓度与吸光度之间有很好的线性关系,回归方程的决定系数 R<sup>2</sup>达到 0.999 4。

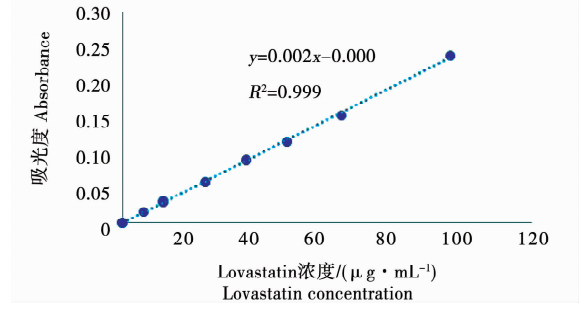


图 1 洛伐他汀 Lovastatin(即 Monacolin K)标准曲线  
Fig.1 Standard curve of Lovastatin(Monacolin K)

2.2 产 Monacolin K 正交试验的直观分析

比较表 2 极差 R 大小,各试验因子的主次为 R<sup>C</sup>>R<sup>A</sup>>R<sup>D</sup>>R<sup>B</sup>,R<sup>A</sup>与 R<sup>C</sup>基本接近。由此可知,培养基中的 pH 和接种量两个试验因素对红曲霉发酵产 Monacolin K 的影响较大,其次是三角烧瓶的装液量,对 Monacolin K 形成影响最小的是发酵温度。表 2 显示,红曲霉液态发酵产 Monacolin K 的工艺最优方案为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即接种量为 7%、发酵温度 26 ℃、pH 为 6、250 mL 三

角烧瓶的装液量为 100 mL 时,该优方案即为表 2 250 mg·L<sup>-1</sup>,较处理号 2、4、6、7、8、9 高出一倍多。  
中的处理号 3,平均 Monacolin K 达到

表 2 产 Monacolin K 正交试验结果  
Table 2 Optimization test result for producing Monacolin K

处理 Treatments	接种量/% (A) Inoculum concentration	温度/℃ (B) Temperature	pH (C)	装液量/mL (D) Liquid volume	平均产量/(mg·L <sup>-1</sup> ) Average production
1	1(7)	1(20)	1(8)	1(130)	158
2	1(7)	2(32)	2(4)	2(70)	116
3	1(7)	3(26)	3(6)	3(100)	250
4	2(3)	1(20)	2(4)	3(100)	113
5	2(3)	2(32)	3(6)	1(130)	152
6	2(3)	3(26)	1(8)	2(70)	103
7	3(11)	1(20)	3(6)	2(70)	116
8	3(11)	2(32)	1(8)	3(100)	122
9	3(11)	3(26)	2(4)	1(130)	92
k <sub>1</sub>	175	129	128	134	
k <sub>2</sub>	123	130	107	112	
k <sub>3</sub>	110	148	173	162	
R	65	19	66	50	

2.3 产 Monacolin K 正交试验的方差分析

对表 2 进行各因素的偏差平方和、自由度、均方等进行计算,得到表 3,从计算的 F 值和根据 F 值计算的 P 值可知:A、B、C、D 四种因素对红曲菌产 Monacolin K 的影响均极为显著, $P_A = 5.43934 \times 10^{-10} < P_C = 7.51694 \times 10^{-10} < P_D = 8.01044 \times 10^{-8} < P_B = 2.64996 \times 10^{-3} < \alpha =$

0.01,即 4 种试验因素的 P 值均远远小于临界高度显著检验水平  $\alpha=0.01$ ,说明 4 种因子的变化均会高度显著影响红曲菌产 Monacolin K,这与极差分析基本一致,不同的是方差分析时,A 因素较 C 因素对红曲霉产 Monacolin K 影响更为敏感。

表 3 产 Monacolin K 正交试验的方差分析

Table 3 Variance analysis of optimization test result for producing Monacolin K

方差来源 Soruces of variation	偏差平方和 DevSq	自由度 df	均方 MS	F	P	显著性 Significance
A	21294	2	10647	87.3	5.43934E-10	高度显著
B	2058	2	1029	8.4	2.64996E-03	高度显著
C	20466	2	10233	83.9	7.51694E-10	高度显著
D	11304	2	5652	46.3	8.01044E-08	高度显著
e <sub>1</sub>	0	0	0			
e <sub>2</sub>	2192	18	122			
e	2192	18	122			
总和	57049	26		$F_{0.01(2,18)} = 6.01$		

3 结论与讨论

3.1 接种量对产 Monacolin K 的影响

从图 2 可看出,接种量过低和过高,都会影响

Monacolin K 的形成,其原因是接种量过低,会影响红曲菌前期的生长启动,接种量过高,虽然前期生长启动较早,但由于菌丝生长过密,会导致红曲

霉生长缺乏氧气而影响 Monacolin K 的形成<sup>[8-11]</sup>,另外,还会导致红曲霉后期生长过程中营养物质的不足;因此,只有在 3%和 11%接种量之间再进行筛选优化,有可能会得到更好的接种量。

### 3.2 发酵温度对产 Monacolin K 的影响

培养温度过高和过低也会影响 Monacolin K 的形成,因为温度过高,会钝化 Monacolin K 合成的一些酶;温度过低,也会降低合成 Monacolin K 酶的活性,温度在 20~25 ℃时 Monacolin K 合成速度最大<sup>[10]</sup>,温度过高不利于 Monacolin K 的形

成。从图 2 可知,其中 26 ℃达到最大值<sup>[10]</sup>。因此,要筛选出更佳的发酵温度,还可在 20~32 ℃进行试验。

### 3.3 pH 对产 Monacolin K 的影响

过高和过低 pH 也会影响 Monacolin K 的形成,一般 pH 偏酸性有利于 Monacolin K 的形成<sup>[10]</sup>,但 pH 不能过低,过低同样会降低 Monacolin K 合成酶的活性。从图 2,可知,pH 在 6.0 时,合成 Monacolin K 的量最大。从趋势图看,要筛选出更佳的 pH,可以在 pH4~8 再进行试验。

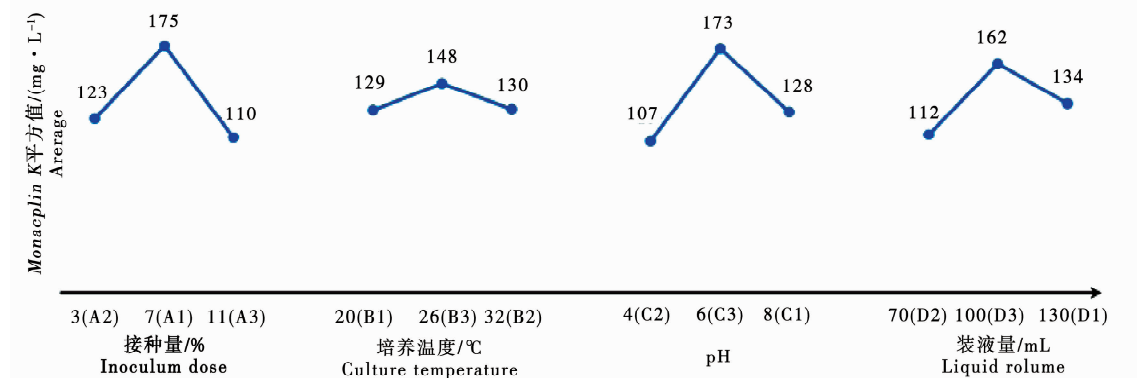


图 2 产 Monacolin K 试验因素和水平与试验指标的趋势

Fig. 2 Trend of index and factors and levels of test result for producing Monacolin K

### 3.4 装液量对产 Monacolin K 的影响

装液量过多或过少,也会影响 Monacolin K 的合成速度,因为,装液量过少,易导致红曲霉后期生长营养匮乏,而装液量过多,则会一定程度上影响培养液的溶氧,如果溶氧不足,也会严重影响 Monacolin K 的形成,因为在 Monacolin K 合成过程中需要消耗氧气。

因此,接种量、pH、培养温度和装液量要从表 1 所设计的水平内进一步筛选,才有可能找到更加优化的水平组合,限于研究时间和精力,作者没有再进行下去。

试验结果表明,A、C、D 3 个因素的  $F$  值远大于高度显著的临界  $F$  值( $F_{0.01(2,18)} = 6.01$ ),说明红曲菌产 Monacolin K 产量对这 3 种试验因子非常敏感。另外,A、C、D 3 种因素的  $P$  值远远小于临界检测水平  $\alpha = 0.01$ ,也说明 A、C、D 3 种因素的变化对红曲霉产 Monacolin K 量的影响高度显著。即使 B 因素,其  $P$  值也只有  $2.649\ 96 \times 10^{-3}$ ,也比高度显著检验水平  $\alpha = 0.01$  少得多,因此,B 因素水平的变化也对 Monacolin K 的合成影响呈高度显著。

另外,从表 2 知,3 号处理产 Monacolin K 的

量约为 9 号处理( $92\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的近 3 倍,是 2、4、6、7、8 号处理的 2 倍多,说明 4 种试验因子水平的不同组合,对红曲霉产 Monacolin K 的影响是高度显著的。本试验得出产 Monacolin K 发酵工艺的最优组合是  $A_1B_3C_3D_3$ ,即 7%接种量、26 ℃、pH 6.0 和在 250 mL 三角烧瓶中装液量 100 mL 的组合是最好的。

### 参考文献:

- [1] 郭涛宋,洪涛宓,鹤鸣.中药红曲的研究进展[J]. The Journal of Pharmaceutical Practice,1999,17(3): 172-174.
- [2] 杨璐芳,郭红珍.红曲霉的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2003(3):61-65.
- [3] 许赣荣.红曲霉菌的研究进展[J]. 中国酿造,2002(z1):7-11,21.
- [4] 侯敏,周端珉,王艳新,等.红曲霉的研究进展[J]. 安徽农业科学,2014(11):3382-3384.
- [5] Endo A. Monacolin K, A new hypocholesterolemic agent produced by a manascus species [J]. Antibiotics, 1979, 32(8):852-854.
- [6] 梅璐,郑春明.米饭制作方式影响红曲菌产红曲色素[J]. 生物化工,2017,3(2): 23-25.
- [7] 张建国,刘文华.紫外分光光度法测定洛伐他汀胶囊含量[J]. 中国生化药物杂志,1999,20(3): 152.
- [8] 张良.高产 Monacolin K 红曲菌的诱变选育及其固态发酵条件的优化[D]. 南昌:南昌大学,2010.

# 镇安县农产品质量安全检测体系现状

赵海翔<sup>1</sup>,董照锋<sup>2</sup>,张 健<sup>1</sup>,王亚静<sup>1</sup>

(1. 镇安县农产品质量安全检验检测站,陕西 镇安 715400;2. 商洛市农产品质量安全检验检测中心,陕西 商洛 726000)

**摘要:**通过阐述镇安县农产品质量安全检测体系建设及运行状况,分析了存在的问题,即技术人员比较缺乏、检测经费严重不足、镇级检测室作用发挥不够、企业自律性检测尚未有效落实、监督管理不到位等,提出了加强宣传推动提高认识水平、重视业务培训提升技术能力、整合涉农检验检测体系共享检测资源、加快信息平台建设推进农业标准化实施力度、加大监督管理力度强化政策支持等对策。

**关键词:**农产品;质量安全;检测体系;镇安县

中图分类号:F323 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2017)05-0097-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.05.0097

商洛市农产品检验检测机构承担着辖区农产品质量安全检测、“三品一标”认证、农业标准审定和农业风险评估等职能。近年来镇安县委、县政府把农产品质量安全体系建设纳入食品安全监管

体系建设,按照“政府负总责、三级有机构、监管到村组、检测全覆盖”的“商洛模式”<sup>[1]</sup>,坚持“分级建设,分层次监管”原则,建立了较为完善的农产品质量安全检验检测体系,逐步实现检测工作的常态化。随着2015年乡镇机构改革将乡镇农业综合服务站纳入乡镇政府管理,农产品检测工作出现了新的问题。为此,基于镇安县农产品质量安全检测体系开展了深入的调研,探索适合贫困山区的农产品质量安全监管的有效途径,以期政府决策提供依据,为农业生产和群众消费提供安全保障。

**收稿日期:**2017-03-20  
**基金项目:**陕西省农业科技推广及示范资助项目(KJ-2014-28)  
**第一作者简介:**赵海翔(1966-),男,陕西省镇安县人,农艺师,从事农产品检测研究。E-mai: dzf7612@163.com。  
**通讯作者:**董照锋(1977-),男,陕西洛南县人,硕士,农业推广研究员,从事农产品质量安全研究。E-mai: 516220829@qq.com。

[9] 付海平. 产 Monacolin K 红曲霉的筛选及其发酵条件的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2004.

[10] 郭晓旭,袁朝琪,李国莹,等. 高产 Monacolin K 纯种红曲培养条件的研究[J]. 工业微生物,2016(01): 27-30.

[11] 徐伟,王金凤,易曼. 红曲霉玉米发酵产 Monacolin K 最佳条件研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2008, 24(2): 207-209,223.

## Optimization of Fermentation Conditions for Producing Monacolin K by Orthogonal Test

ZHENG Chun-ming

(Taizhou Vocational College of Science and Technology, Taizhou, Zhejiang 318020)

**Abstract:** In order to improve the content of Monascus rice pigment, through literature review and market research, the establishment of inoculation amount (A), fermentation temperature (B), pH (C), the volume of liquid (D) of 4 kinds of test factors, from each of the 3 levels, according to  $L_9(3^4)$  orthogonal test to optimize the fermentation of Monascus production process, improve the content of Monascus fermented products Monacolin K. The results showed that whether the range analysis or analysis of variance, changes in these 4 factors all have significant effect on the fermentation of Monascus Monacolin K form, its advantages for the  $A_1B_3C_3D_3$ , that is, 7% inoculation quantity, culture temperature of 26 °C, pH 6.0 and liquid volume 100 mL combination, average production of Monacolin K was 250 mg L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Monascus; orthogonal test; Monacolin K; variance analysis; range analysis