

双载体固定化红曲发酵红曲色素的研究

王克明

(浙江科技学院 生物与化学工程学系,浙江 杭州 310012)

摘要: 对以粉丝生产废液为主要培养基,以聚乙烯醇和海藻酸钠双载体固定红曲(*Monascus purpureus*),采用气升式生物反应器重复发酵生产红曲色素进行了考察研究.实验结果表明:粉丝生产废液经适当补充营养盐可作为发酵生产红曲色素的良好培养基,其最佳发酵条件为发酵培养基始初 pH 值 5~6、发酵温度 30℃、固定化细胞粒子接入量 20%、通气量 0.35vvm、发酵周期 50h 左右.

关键词: 生物反应器;固定化;双载体;最佳发酵条件;天然色素

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-8798(2002)04-0021-05

化学合成色素的毒性问题已逐步引起人们的关注,其中有些化学合成色素由于确证其有毒已被逐步禁止使用或限制使用.为满足食品、化妆工业的需要,应大力提倡和开发天然色素.采用微生物液态发酵法进行大规模的天然色素的生产将成为天然色素生产的主流.天然色素中,红曲色素由于其诸多优良性能,一直为国内外学者研究的热点^[1-3].

粉丝生产厂家在粉丝生产过程中产生大量废液,其有机质含量高.目前国内粉丝生产企业仅采用沉淀法对粉丝生产废液中的粗蛋白进行提取,而把仍含有大量蛋白和糖类的废液直接排放或进入氧化塘,使流出氧化塘的废水 COD 值仍远远高于排放标准.采用我们培育的红曲 M₁₀₁ 菌种,可直接利用粉丝废液发酵生产天然色素,既简化生产工艺,降低成本,同时又大大减轻粉丝废液排放对环境的污染.

红曲为专性好氧丝状真菌,由于菌丝发达,其游离细胞在搅拌罐中进行深层发酵的时候,在罐中易形成菌丝团,引起氧气及其他营养物质的传递困难;或由于菌丝缠绕于搅拌叶上使搅拌阻力增加,从而导致色素产率低于传统固态发酵.采用固定化细胞技术具有菌体密度高、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,因此,固定化细胞技术的应用有利于提高细胞的利用率、促进生物反应速率及便于连续化生产.

本研究对采用聚乙烯醇和海藻酸钠双载体固定红曲菌细胞,采用气升式生物反应器重复发酵生产红曲色素进行了试验研究.结果表明,红曲菌株 M₁₀₁ 利用经适当调兑的粉丝废液培养基经 80h 培养,每立方米粉丝废液可产色素(色价达 150U/mL 左右的红曲色素)200~250g.这方面的研究国

收稿日期: 2002-10-10

基金项目: 教育部高等学校生物反应器工程国家重点实验室访问学者基金资助(F200-C-09)

作者简介: 王克明(1949-),男,辽宁大连人,浙江科技学院生物与化学工程学系教授、博士生导师,主要从事微生物及海洋生物工程方面的教学与研究工作.

内外鲜为报道.

1 材料与方法

1.1 菌株

红曲(*Monascus purpureus*) M_{101} 系由红曲 As.3.55 经硫酸二乙酯及紫外线复合诱变处理获得的高产水溶性色素菌株.

1.2 培养基(浓度均为质量分数)及培养方法

斜面培养基:可溶性淀粉 3%,葡萄糖 6%,蛋白胨 2%,琼脂 3%,pH 5.5~6.

增殖培养基:粉丝废液,硝酸钠 0.3%, KH_2PO_4 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10%, pH 5.5~6.

发酵培养基:(1)粉丝废液未经处理;(2)粉丝废液经液化处理;(3)粉丝废液经糖化处理.以上3种不同处理的粉丝废液均加入可溶性淀粉 8%,硝酸钠 0.2%, KH_2PO_4 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.10%,pH 5.5~6.

米粉发酵培养基(作为发酵对照培养基):大米粉 8%,硝酸钠 0.2%, KH_2PO_4 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%,pH 5.5~6.

以上培养基均用 0.08MPa 灭菌 30min.

1.3 细胞固定化方法

将灭过菌的 4% 海藻酸钠溶液与以生理盐水制备红曲孢子悬液(孢子浓度为 6×10^6)8:2 混合均匀,然后用滴入含 2% 聚乙烯醇的 4% $CaCl_2$ 溶液中,钙化 2h 制成直径为 3~4mm 的球形粒子.以无菌水洗 2~3 次,转入增殖培养基进行增殖培养.

1.4 生物反应器

玻璃柱气升式反应器,如图 1 所示.

1.5 分析测定方法

残糖的测定采用费林氏快速测定法^[4].

发酵液中色素色价的测定、醇溶性色素的测定:发酵液过 100 目筛,取滤液 0.1mL,调 pH 为 5.8~6.0 后与 75% 乙醇溶液 9.9mL 混合摇匀静置 20min,用同一浓度乙醇溶液适当稀释,用分光光度计测 OD_{420} 和 OD_{520} 值.色价(U/mL) = $[OD_{420} \times 420 + OD_{520} \times 520] \times D$,式中 D 为稀释倍数.

水溶性色素的测定:发酵液过 100 目筛,取滤液 0.1mL,经适当稀释后,用分光光度计测 OD_{420} 和 OD_{520} 值.其色价计算方法同醇溶性色素.

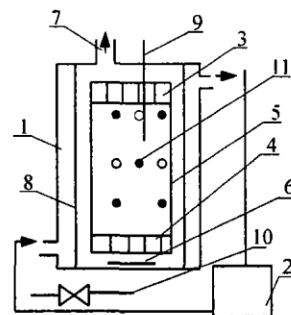


图1 气升式生物反应器

1 气升式生物反应器($H = 500mm$, $dR = 80mm$, $V_{总} = 2.5L$, $V_{工作} < 1.8L$)内筒体;2 恒温槽;3、4 多孔挡板;5 导流筒;6 空气分布器;7 出气口;8 外筒体;9 温度计;10 进气口;11 固定化细胞粒子

2 结果与分析

2.1 不同处理培养液的还原糖含量

为考察不同处理方法所得到的3种培养液营养成分的差别,分别对3种培养液的成分进行分析.结果表明:3种培养液的成分差别主要在于还原糖含量.未经处理的粉丝废液的还原糖含量为1.2g/L,经液化处理后还原糖含量上升为11.8g/L,经糖化处理后还原糖上升为27.1g/L.3种不同处理的培养液经0.08MPa灭菌30min后,未经处理的粉丝废液的还原糖含量上升为4.1g/L,经液化

处理的粉丝废液的还原糖含量上升为 12.4g/L, 而经糖化处理的粉丝废液的还原糖含量上升不大. 还原糖含量上升是因高温下淀粉及糊精一定程度的降解所致.

2.2 不同培养液发酵红曲色素试验

为考察粉丝废液用于固定化细胞发酵红曲色素的情况, 以传统的大米粉发酵培养基为对照, 分别以不同处理方法所得到的 3 种不同处理培养基进行固定化细胞红曲发酵试验. 其红曲色价及发酵液中的总糖、还原糖的测试结果如表 1 所示.

表 1 不同处理的培养液发酵红曲色素的情况

培养液	总糖(g/L)	还原糖(g/L)	色价(U/mL)
未处理废液	1.42	0.46	169.5
液化废液	1.36	1.02	174.6
糖化废液	1.28	1.41	176.4
大米培养基	1.56	1.38	188.9

注: 表中数据为 5 批发酵的平均值.

首先由表 1 可以看出, 利用粉丝废液为主要营养成分, 经不同方式处理得到的 3 种发酵液中总糖含量无明显差别. 经液化处理粉丝废液和未经处理粉丝废液的 2 种培养液中总糖下降量大于还原糖的下降量. 其次从表 1 还可看出, 固定化红曲在以粉丝废液为主要成分的 3 种不同处理的培养液发酵产红曲色素的色价程度相差不大. 这一事实表明, 由于红曲菌细胞能分泌胞外淀粉酶和糖化酶, 所以它可直接利用粉丝废液中的淀粉及蛋白质等营养物质进行生长和代谢. 同时从表 1 还可看出, 以粉丝废液为主要营养成分的 3 种不同处理的培养液进行固定化红曲菌发酵产红曲色素的色价程度, 与以传统大米粉发酵培养基发酵产红曲色素的色价相差也不大, 这说明粉丝废液无需经过特殊处理即可直接用于发酵生产天然红曲色素.

2.3 生物反应器最佳发酵条件的确定

2.3.1 最适 pH 值的确定

要使红曲在培养基中能充分繁殖, 并生成大量的色素, 调整培养基以最适的 pH 值是至关重要的. 首先进行最适 pH 值的试验. 将发酵培养基的初始 pH 值分别调为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 进行发酵. 结果表明, 发酵培养基初始 pH 值为 5~6 时, 色素产量较高且残糖最低. 故发酵培养基的初始 pH 值应调为 5~6 之间.

2.3.2 最适温度的确定

为了考察气升式生物反应器培养红曲产色素的最适温度, 分别设置了 20、25、30、32、35、40℃ 的发酵温度进行发酵试验. 结果表明, 当温度为 30℃ 时, 红曲色素产量高, 残糖最低, 因此, 确定最适发酵温度为 30℃.

2.3.3 最佳通气量的确定

红曲为好气性菌, 它的耗氧量随着它的生理状态的不同而异, 其细胞的生长与色素的形成都需要有足够的氧气. 为达到最高的色素产量与最低的动力消耗, 供给适宜的溶解氧是极为重要的. 为此, 在通入恒定压力的压缩空气, 分别以 0.1、0.15、0.25、0.35、0.5vvm 进行培养试验. 结果表明, 随着通气量的增加, 红曲的代谢速度加快, 菌体和色素产量都升高. 当通气量由 0.35vvm 增加至 0.5vvm 时, 色素产量增加幅度并不大, 故通气量以选用 0.35vvm 为宜.

2.3.4 固定化细胞接入量的确定

为了考察接种量对红曲霉发酵中菌体生长和色素产量的影响, 分别设置了 15%、20%、25%、30% 4 种固定化细胞粒子接入量进行发酵 60h 试验. 结果表明, 随着固定化细胞粒子接入量的加大, 发酵液中色素浓度的积累加快, 色素色价达到峰值的发酵时间明显缩短. 但当固定化细胞粒子

接入量由 20% 增为 25% 时, 发酵液中色价由 186.9U/mL 增加至 187.4U/mL, 发酵时间由 50h 缩减为 47h 左右. 可见, 随着固定化细胞接入量的加大, 发酵液中色素色价的增加和发酵时间的缩短并不十分显著, 而大量的固定化细胞接入量会增加菌种制备的工作量和降低生物反应器的有效工作体积. 因此, 选择最适固定化细胞粒子的接入量为 20%, 此时, 发酵至 50h 左右发酵液中色素色价已达最高值, 所以, 发酵周期确定为 50h. 这比采用游离细胞的发酵周期 130~150h 大大缩短^[5].

2.3.5 固定化细胞粒子的重复发酵

细胞的可重复利用是固定化细胞的主要优点之一. 固定化细胞在重复使用中, 发酵性能的稳定及固定化细胞粒子的机械强度是重要的指标之一. 对红曲固定化细胞进行了 20 批次的重复发酵实验, 其产色素及固定化粒子的机械强度的情况如表 2 所示.

表 2 固定化红曲细胞粒子重复发酵产色素情况

重复次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
色价(U/mL)	162.3	176.5	187.3	188.3	188.5	188.8	189.1	189.3	188.9	189.5
残糖(g/L)	9.2	9.1	8.7	8.5	8.6	7.9	6.8	6.6	7.1	6.8
固定化细胞强度情况	好	好	好	好	好	好	好	好	好	好
重复次数	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
色价(U/mL)	190.1	189.7	191.3	189.4	188.7	186.7	183.6	184.8	179.8	180.6
残糖(g/L)	5.6	6.2	4.7	5.6	7.9	9.4	9.8	11.2	15.5	14.7
固定化细胞强度情况	好	好	好	好	好	好	好	好	好	好

从表 2 的结果可以看出, 采用气升式生物反应器固定化红曲发酵红曲色素, 固定化细胞经 20 批次发酵, 产色素一直稳定在较高水平, 而且固定化细胞凝胶粒子完好性很高, 经 20 批次发酵未见破损.

3 讨 论

从以上实验结果可以看出:

(1) 利用粉丝废液作为主要营养成分发酵生产红曲色素是完全可行的. 由于红曲菌自身可分泌蛋白酶和淀粉酶, 所以, 粉丝废液无需经过特殊处理即可直接用于发酵生产红曲色素, 从而大大降低了天然红曲色素的生产费用.

(2) 采用固定化红曲细胞培养对红曲色素的生成优于游离细胞液态发酵^[6], 说明固定化红曲细胞对红曲色素的形成十分有利. 这可能是因为固定化培养红曲类似于传统的糯米固体培养红曲, 为红曲的生长、代谢提供了附着支持的框架, 从而有利于红曲的生长和色素的形成.

(3) 红曲菌为好气性真菌, 而气升式生物反应器内部结构简单, 剪切力小、反应器内醪液处于循环状态, 物质混合均匀, 氧气供应充足而且供氧、传质的周期振荡性强等, 从而有利于菌体的代谢和产物量的提高^[7]. 因此, 采用气升式反应器培养固定化红曲细胞其产色素能力和机械强度比在机械搅拌发酵罐中发酵培养, 能够维持在较高的水平^[8,9].

(4) 由于采用红曲细胞包埋固定化培养, 发酵液中游离菌丝减少, 所以发酵液黏度低, 有利于氧气及营养物的传递, 更重要的是便于色素的分离和提取.

(5) 采用气升式反应器培养固定化红曲细胞生产红曲色素可施行连续重复发酵, 发酵时间比液态发酵大为缩短, 从而提高了效率并减少菌种制备工序及杂菌污染.

(6) 采用粉丝生产废水为培养基发酵生产红曲色素, 一则可生产天然色素, 降低天然色素生产的成本, 促进天然色素的推广; 二则可减少粉丝废水直接排放引起的环境污染, 将产生极大的社会效益和经济效益.

参考文献:

- [1] 王克明,王雪筠.流加糖发酵提高红曲色素产量的研究[J].中国调味品,1995,(6):1-10.
- [2] Wang HC.Regulation of growth and antibiotic from *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration[J]. Mycologia,1981,73:649-658.
- [3] Lin CF.Production and isolation of antibiotic from *Monascus purpureus* and it relationship to pigment production[J]. Food Sci,1973,6:589-593.
- [4] 天津轻工业学院,无锡轻工学院,大连轻工学院,等.工业发酵分析[J].北京:工业出版社,1980.1-421.
- [5] 傅亮,周卫兵,高孔荣.红曲色素高产菌株发酵特性的研究[J].食品科学,1996,17(3):6-9.
- [6] 张名光,常韩生,林长勇.红曲菌生产红曲色素的研究[J].食品与发酵工业,1982,(6):1-68.
- [7] 李学梅,林建平,刘娥,等.固定化米根霉发酵制取L-乳酸[J].菌物系统,1998,17(4):318-326.
- [8] 王克明.PVA固定化红曲生产红曲色素的研究[J].烟台大学学报,1998,11(4):306-309.
- [9] Patrick J E, Wang HY.Pigment production from immobilized *Monascus* sputilizing polymeric resin adsorption[J]. Appl. Environ Microbiol,1984,6:1323-1326.

Formation of pigment by fermentation of immobilized *Monascus purpureus* in three-phase airlift reactor

WANG Ke-ming

(Dept. of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The cell of *Monascus purpureus* immobilized with double carrier sodium alginate and polyvinyl alcohol is used for pigment formation in airlift bioreactor utilizing vermicelli processing waster. The experiment shows that the vermicelli processing waster is a good culture medium for *Monascus purpureus* and the optimal conditions of fermentation are : pH 5 ~ 6, temperature 30℃, 20% inoculating quantity of immobilized cell particles, 0.35vvm of aeration rate and 50h of fermenting period.

Key words: bioreactor; immobilized cell; double carrier; optimal conditions of fermentation; natural pigment