

双载体固定化细胞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 310023)

摘 要: 采用玉米芯为吸附载体,海藻酸钠为包埋剂对红曲霉细胞进行吸附包埋固定化培养。对以不同浓度的硝酸钾、大米粉、不同初始 pH 值等条件变化对细胞红曲霉菌进行发酵培养。通过正交优化实验表明:硝酸钾浓度为 0.2%,米粉浓度为 5%,培养基初始 pH5.5 时,通气量为 75 mL/500 mL 时产色素色价最高。包埋载体海藻酸钠的浓度为 5%,固化剂氯化钙浓度为 4%时,红曲霉的固定化粒子的机械强度较好。

关键词: 红曲霉; 固定化; 色素; 发酵; 双载体

中图分类号: TS202.3; TS26

文献标识码: A

文章编号: 1671-8798(2005)01-0030-04

On immobilized cell fermentation of *monascus* pigment with complex carriers

WANG Ke-ming

(Department of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Huangzhou 310023, China)

Abstract: The experiment of immobilized *monascus purpureus* for fermentation of *monascus* pigment were carried out by using the pith of maize as absorbing carrier and Na-alginate as entrapment agent. Fermentation for the cell *monascus* was carried out with different concentration of potassium nitrate, rice powder and preliminary pH. The optimizing experiment shows that the optimal conditions of fermentation are: KNO_3 0.2%, rice powder 5%, preliminary pH 5.5 and ventilation 75 mL/500 mL. When the Na-alginate's concentration is 5% and CaCl_2 is 4%, the strength of immobilized cell is best.

Key words: *monascus purpureus*; immobilization; pigment; fermentation; complex carries

有关红曲色素的生产我国仍以传统的固体发酵法为主,但其生产效率低、劳动强度大、品质难以控制^[1]。特别是进行大规模工业化生产时需要进行液态深层发酵,但是,这种方法发酵色价低,只有固态

的 10%左右,因而难以推广。分析传统的固态法以大米为基质培养,可能是以米粒为红曲霉菌的吸附和支持的骨架而有利于其生长与代谢,细胞固定化技术可以综合固态发酵与液态深层发酵的双重优

收稿日期: 2004-08-12

作者简介: 王克明(1949—),男,辽宁大连人,教授,主要从事微生物及海洋生物工程方面的教学与研究工作。

点,从而有效地提高了发酵色价。

固定化细胞具有细胞密度大,反应速度快,微生物流失少,产物容易分离及反应过程控制较容易等优点,与游离细胞相比,优越性明显。其中,微生物被固定化后,细胞内酶系保存完整,相当于一个多酶生物反应器。这是生物工程领域的一项新兴技术。关于单一载体固定化红曲霉细胞发酵的研究,笔者已作过报道^[2,3]。本研究采用玉米芯为吸附载体、海藻酸钠为包埋剂,对红曲霉细胞进行吸附与包埋法相结合,固定化培养红曲霉,对以复合载体固定化的红曲霉培养之发酵条件进行了优化实验。

1 材料与方法

1.1 菌 种

红曲霉(*Monascus purpureus*)M.₁₀₁,系红曲霉 As. 3.55 经诱变选育的高产突变株,由浙江科技学院生物工程实验室提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基及培养条件 麦芽汁琼脂斜面培养基(浓度均为质量分数):黄豆芽 10%,葡萄糖 5%,自然 pH。121 ℃灭菌 30 min,接种后在 30 ℃培养 6 d。

1.2.2 发酵培养基(浓度均为质量分数) 大米粉 5%,KNO₃ 0.15%,KH₂PO₄ 0.3%,MgSO₄·7H₂O 0.8%,pH5,250 mL 三角瓶中装培养基 50 mL,121 ℃灭菌 30 min。

1.2.3 固定化细胞液态发酵 于无菌条件下,将 10 mL 红曲霉种子培养液与 10 g 粉磨成直径为 3 mm 球形玉米芯混合浸泡 10 min 后再与 15 mL 4%海藻酸钠混浸,倾入含 100 mL 含 CaCl₂ 为 4%的溶液中,制成直径 3 mm 的颗粒,固化 4 h,滤出凝胶粒,以生理盐水洗 3 次后转入发酵培养基中。

本实验主要进行不同碳源、氮源、接种量、起始 pH 及不同海藻酸钠浓度、氯化钙浓度对双载体固定化红曲霉产色素和固定化细胞粒子机械强度影响的研究,所以,对发酵液的装量(发酵液装液量为 75 mL/500 mL 三角瓶)、培养温度(30 ℃)、摇床转速(140 r/min)等条件固定不变。

1.3 发酵液分析

1.3.1 醇溶性色素的分析 准确吸取 5 mL 发酵液于试管中,加入 95%乙醇,振荡提取 1 h 后 3 000 r/min,离心 5 min,取上清液 5 mL 于试管中加水稀释。稀释液用 722 分光光度计用 0.5 cm 比色皿测

420 nm 和 520 nm 的吸光度。

1.3.2 水溶性色素的分析 发酵液经纱布过滤,将滤液 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液 5 mL 于试管中。加水稀释。稀释液用 722 分光光度计于 0.5 cm 比色皿测 420 nm 和 520 nm 的吸光度。色价计算:色价(U/mL)=[OD_(420 nm)×稀释倍+OD_(520 nm)×稀释倍]。

2 实验结果与分析

2.1 单一因素的影响实验

2.1.1 发酵培养基中硝酸钾浓度的影响 根据文献[1,2,4]报道,混合氮源对红曲霉菌的生长极为有利,其中以硝酸钾为红曲霉菌的生长提供无机氮源,对菌体的生长和色素的产生有很大的影响。本实验中无机氮源的添加分别采用不同的硝酸钾浓度(0.1%、0.2%、0.3%和 0.4%)对红曲霉进行对比发酵培养试验,结果见表 1。

表 1 硝酸钾浓度对红曲色素色价的影响 U/mL

培养时间 /d	硝酸钾浓度/%			
	0.1	0.2	0.3	0.4
2	230	453	367	401
4	1 452	3 780	3 679	3 211
5	2 036	4 978	4 560	4 600
6	2 100	5 013	4 780	4 600
发酵液颜色	橙红色	深红	深红	紫红色

由表 1 可以看出,当硝酸钾浓度为 0.2%时,色价最高。随着氮源用量的增加,发酵液的颜色逐渐变深,由橙红色变成紫红色,菌丝粗壮且着色重。

2.1.2 发酵培养基中米粉浓度的影响 米粉为红曲霉的发酵提供有机碳源,对色价的产生极为重要。为考察米粉浓度对发酵的影响,实验分别设置了 3%、4%、5%、6%和 7%等不同的米粉浓度进行发酵培养,试验结果见表 2。

表 2 不同米粉浓度对产色素的影响 U/mL

培养时间 /d	大米粉浓度/%				
	3	4	5	6	7
2	334	460	580	600	518
4	1 450	2 089	2 997	3 452	3 007
5	3 673	3 476	2 439	4 893	3 068
6	3 681	3 588	4 401	4 976	3 378
发酵液颜色	暗红	深红	深红	红色	橙红

由表 2 可以看出,当大米粉浓度为 5%~6%时,色价最高,发酵效果最好。随着米粉浓度的增大,即碳源的升高,发酵液颜色逐渐变浅。

2.1.3 培养基初始 pH 的影响 pH 是影响色素在

溶液中稳定性的主要因素,而且 pH 对微生物的生长和代谢影响很大^[5,6]。不同微生物对 pH 条件的要求各不相同,它们只能在一定的 pH 范围内生长,这个 pH 范围有宽、有窄,而其生长最适 pH 常限于一个较窄的 pH 范围。因此,要使红曲在培养基中能充分繁殖,并生成大量的红曲色素,调整最适的 pH 值是很重要的。为考察培养基的初始 pH 的影响,分别设定培养基初始 pH 为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5 进行发酵培养 5 d,试验结果如图 1 所示。

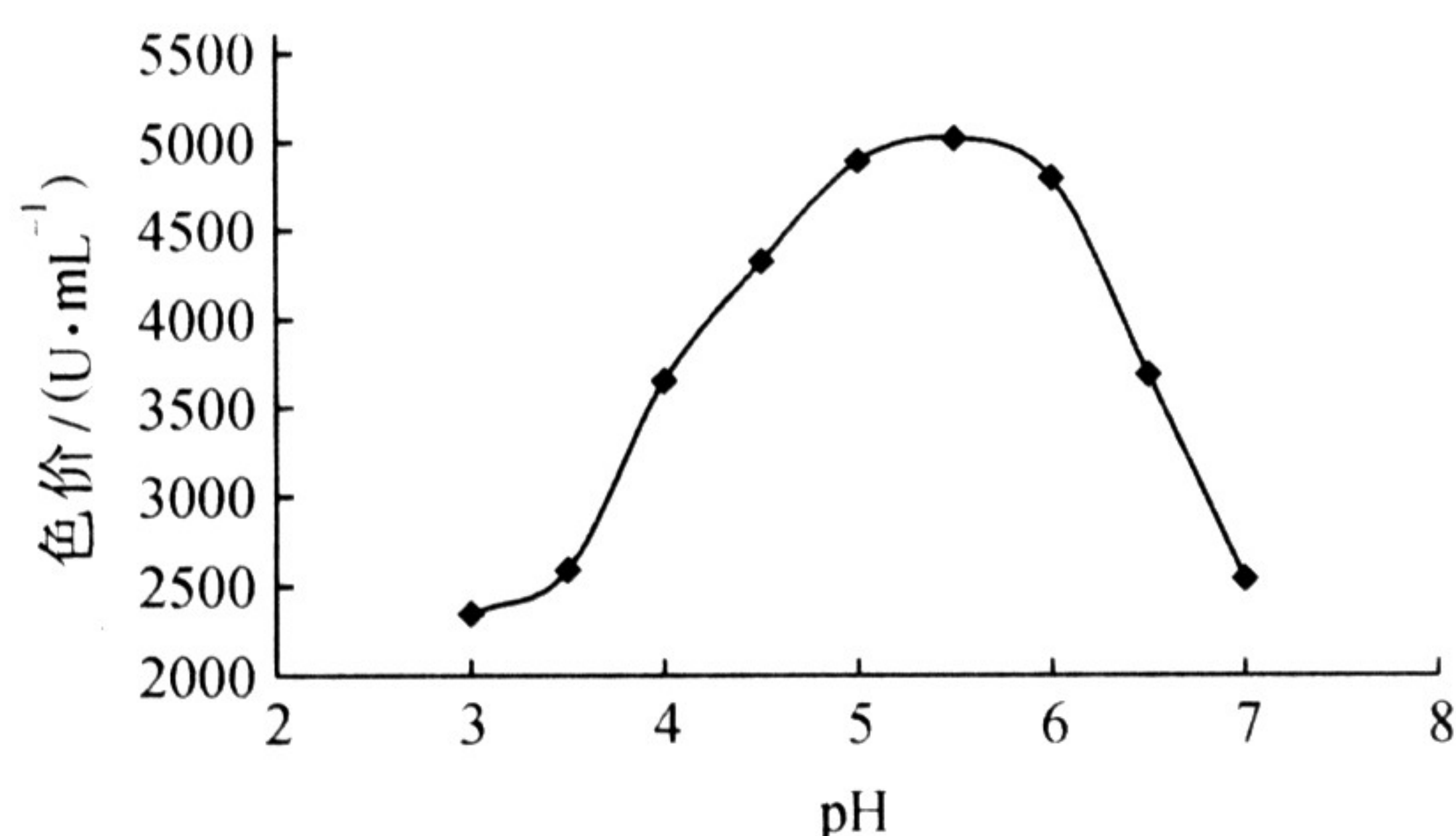


图 1 色素产量随初始 pH 值的变化情况

由图 1 可以看出,在 pH3~4 时,红曲色素产量较低;之后随着 pH 值的升高,色素产量逐步增大。在 pH5.5 时,色素产量最高;随后又逐渐下降。所以培养基的最适初始 pH 值为 5~6。

2.1.4 固定化细胞粒子接入量的影响 为了考察细胞接入量对红曲霉产红色素的影响,实验分别设置了 5%、15%、20% 和 25% 4 种固定化细胞粒子接入量,进行发酵 5 d 试验,结果如图 2 所示。

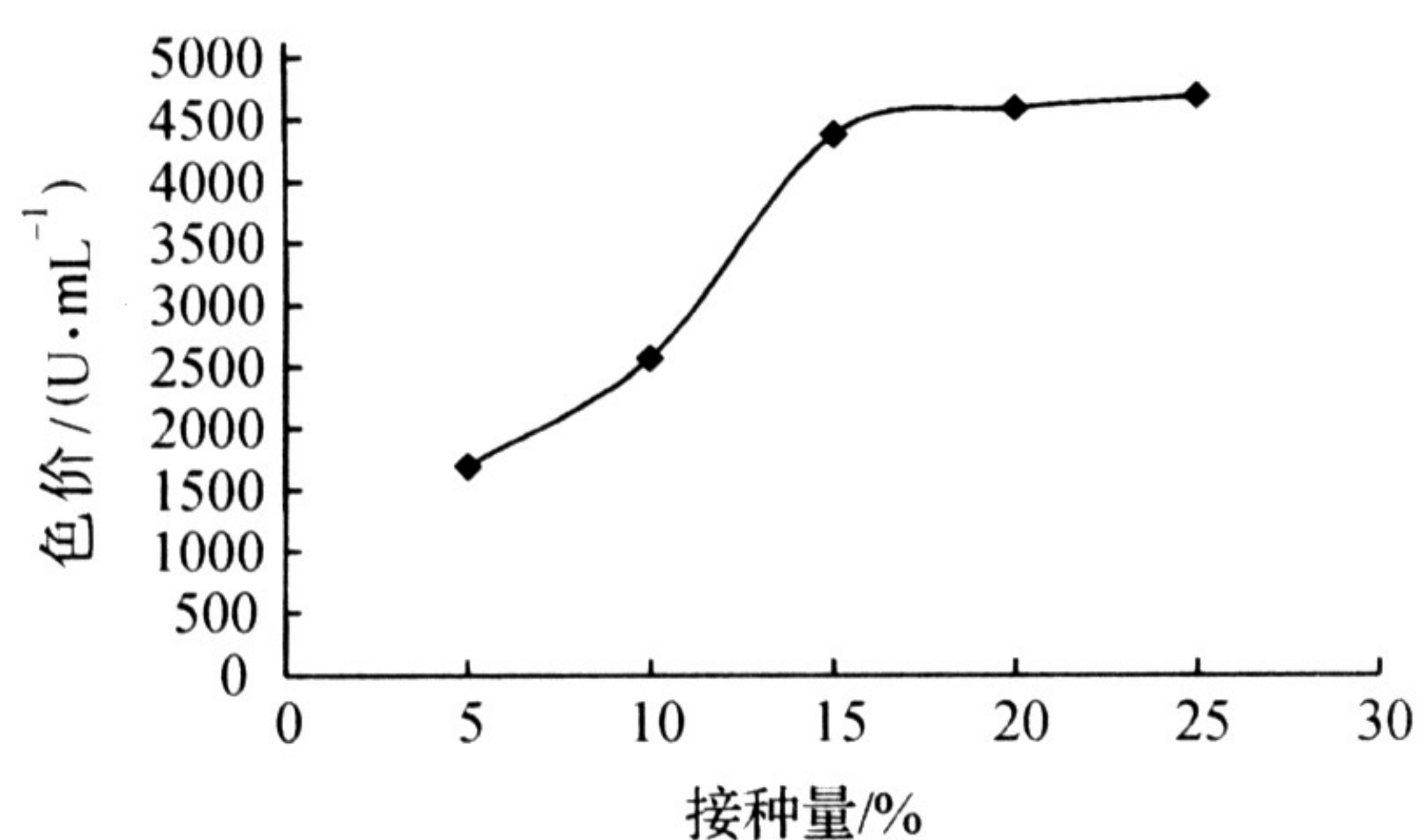


图 2 不同接种量对色价的影响

由图 2 可见,随着固定化细胞粒子接入量加大,发酵液中色素浓度的积累加快,色素色价明显升高。但当固定化细胞粒子接入量由 15% 增为 20% 时,发酵液中色价由 4 700 U/mL 增加并不明显。而大量的固定化细胞接入量会增加菌种制备的工作量。故选取最适固定化细胞粒子的接入量为 15%。

2.1.5 CaCl_2 浓度对细胞机械强度的影响 CaCl_2 的浓度直接影响海藻酸钠的固化效果。实验分别采

用 1%、2%、3%、4% 和 5% 的氯化钙进行发酵培养 20 批,实验结果如表 3 所示。

由表 3 可知, CaCl_2 浓度对色价的影响不明显,但是对红曲细胞的固定化强度有很大的影响,当氯化钙的浓度较低时,固化效果不好。达到 4% 时,效果最好。

表 3 不同 CaCl_2 浓度对凝胶粒机械强度的影响

CaCl_2 浓度/%	1	2	3	4	5
色价/(U·mL ⁻¹)	3 560	3 898	3 496	4 280	4 067
细胞机械强度 (第 20 批)	破裂	破裂	较好	完好	完好

2.1.6 海藻酸钠浓度对细胞机械强度的影响 包埋载体对基质(特别是氧气)和产物存在扩散阻力,而且它的凝胶性对固定化粒子的影响很大。因此确定海藻酸钠浓度对固定化粒子的固定化效果及色素的产生影响较大。本实验采用 2%、3%、4%、5%、6%、7% 的浓度进行 20 批的发酵研究,实验结果如表 4 所示。

表 4 不同海藻酸钠浓度对红曲菌产色素的影响

海藻酸钠 浓度/%	2	3	4	5	6	7
色价 (U·mL ⁻¹)	3 670	4 689	5 208	5 067	4 683	3 847
机械强度 (第 20 批)	破碎	破碎	较好	完好	完好	完好

从表 4 可以看出,海藻酸钠浓度为 4% 和 5% 时色价较高且固定化效果最好。海藻酸钠浓度逐渐提高时,固定化效果较好,但色价的变化不大。从经济实用方面看,不实用。实验对分别发酵培养了 4 d 和 6 d 的固定化粒子,进行切片观察菌丝生长分布情况。结果分别如图 3 所示。

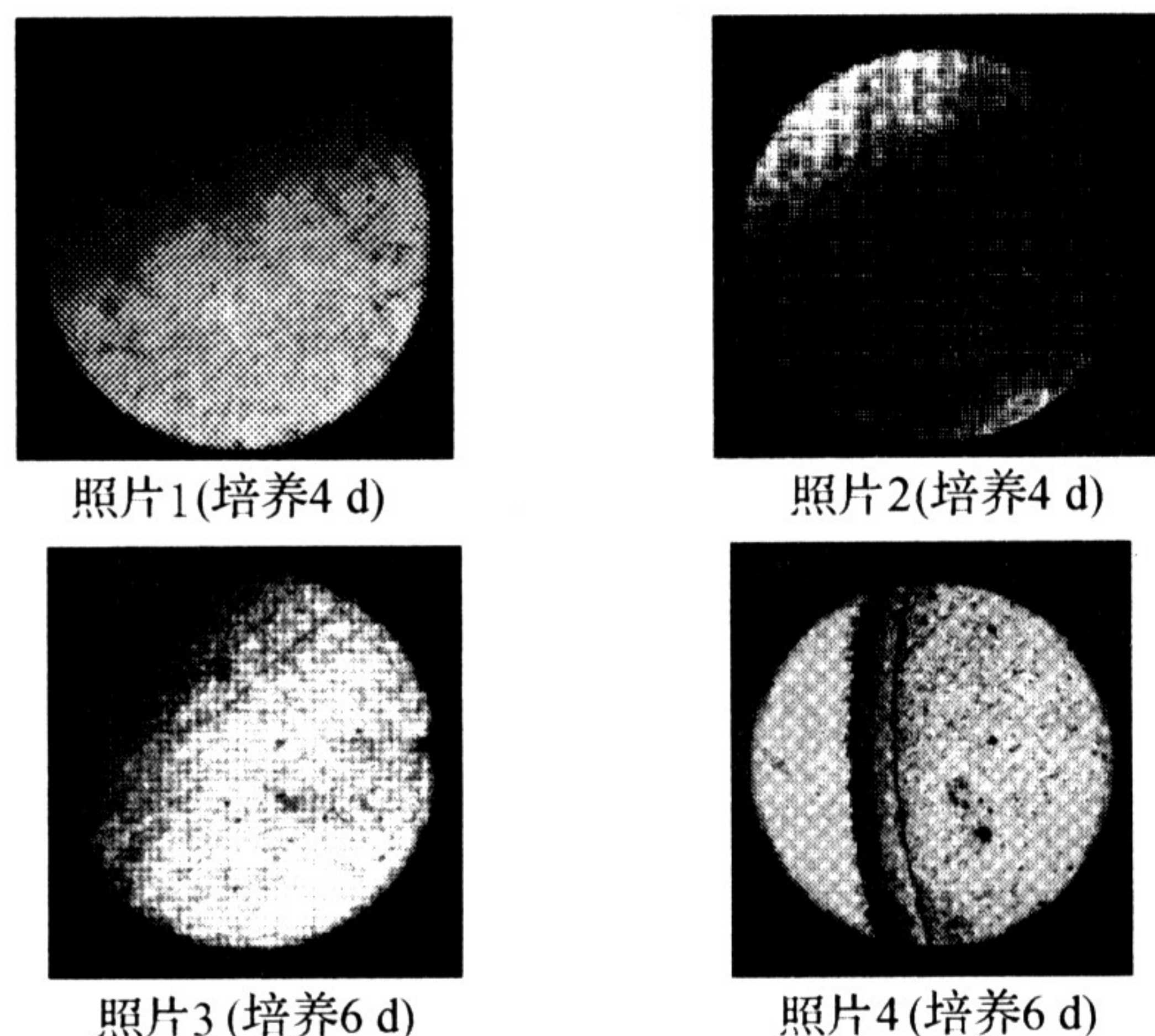


图 3 固定化粒子菌丝生长分布情况

从照片中可以看到相互交叉的菌丝体和孢子,显示了固定化细胞中菌丝体随着发酵的进行其浓度逐渐增大;同时,还可以看出在靠近凝胶粒子的边缘处聚集着大量鲜艳的红色的红曲菌菌丝,这可能是因为靠近凝胶粒子的边缘处氧的供给更充分,对红曲菌的生长和产色素更为有利。

2.2 正交优化实验

为了进一步确定红曲霉发酵的最佳发酵条件,在单一因素实验的基础上进行了 $L_9(3^4)$ 因素水平正交实验(表5)。

表5 正交实验 $L_9(3^4)$ 因素水平表

水平	1	2	3
A: 硝酸钾浓度/%	0.1	0.2	0.3
B: 接种量/%	10	15	20
C: pH	5.0	5.5	6.0
D: 米粉浓度/%	4.0	5.0	6.0

按表5所示的正交实验因素水平进行正交实验,正交实验结果分析用 I_1 、 I_2 和 I_3 分别表示各因素列的第一、第二和第三水平所对应的指标的和;用 R 表示 I_1 、 I_2 和 I_3 中最大值减最小值分别得到的极差。结果见表6。

表6 正交实验方案及结果

实验组别	A	B	C	D	色阶/(U·mL ⁻¹)
1	0.1	10	5.0	4	1 300
2	0.1	15	5.5	5	3 124
3	0.1	20	6.0	6	4 358
4	0.2	10	5.0	4	2 341
5	0.2	15	5.5	5	6 008
6	0.2	20	6.0	6	6 839
7	0.3	10	5.0	4	4 991
8	0.3	15	5.5	5	3 340
9	0.3	20	6.0	6	6 033
I_1	8 782	8 632	11 479	13 341	
I_2	15 188	12 472	11 498	14 954	
I_3	14 364	17 230	15 357	10 039	
R	6 406	8 698	4 868	4 915	

实验得出极差 R_B 最大、 R_C 最小,即接种量对色价影响最大、pH 的影响最小。较好水平是 A(0.2)、B(20)、C(6.0)和 D(5),即最佳发酵条件是:硝酸钾 0.2%,接种量 20%,pH6.0,米粉浓度 5%。

3 讨论

本实验探讨了不同碳源、氮源、接种量和起始 pH 及不同海藻酸钠浓度、氯化钙浓度各种因素对双载体固定化红曲霉产色素和固定化细胞粒子机械强度的影响,并进行了培养条件的优化实验。结表

明,优化的发酵培养基配方组成为:大米粉 5%,硝酸钠 0.2%,磷酸氢二钾 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%。控制发酵温度 30℃,转速为 140 r/min,发酵时间为 5 d 左右,发酵液装液量为 75 mL/500 mL 三角瓶,摇瓶发酵的接种量为 15%,发酵起始 pH5.5。

从试验可知,发酵培养基中,碳源和氮源的比例控制对红曲霉产色素影响很大,当碳源偏高时,发酵液偏黄,呈橙红色重;当氮源偏高时,发酵液偏紫,色暗,且着色重,但较难提取。由此提示我们红曲霉产生的色素是多组分的,如我们需要不同色调的红色素,是否可以通过改变培养基中的碳、氮比例来实现,有待于进一步研究。

采用玉米芯和海藻酸钠作为固定化复合载体,具有经济实用、无毒、机械强度高优点。由于采用了复合载体进行了吸附包埋固定化技术,菌体得以吸附在玉米芯颗粒的表面及内部,再经海藻酸钠薄层包埋,使菌体得到支撑而利于生长和代谢活动,同时,复合载体固定化细胞的机械强度大提高了固定化细胞粒子的使用寿命(另作报道)。采用玉米芯为吸附载体及海藻酸钠为包埋固定化载体对红曲霉菌进行了固定化细胞发酵,实验中发现最适合的海藻酸钠浓度为 5%。此时的海藻酸钠与 4% 的 $CaCl_2$ 溶液钙化后形成的固定化凝胶性能最好,又有利于色素的产生。在固定化发酵培养的初期,由于细胞对固定化体系需要一个适应的过程,发酵速度比游离培养慢。随着发酵的进行,菌体的浓度越来越高,色素产率远远高于游离培养。

参考文献:

- [1] 熊晓辉,沈昌,高魏,等,红曲色素液体深层发酵工艺研究[J]. 南京农业大学学报,1997,20(1):90-95.
- [2] 王克明,钟建江. 固定化红曲细胞生物反应器发酵红曲色素的研究[J]. 菌物系统,2002,(2):64-69.
- [3] 王克明. 多菌种共固定化发酵保健红醋的研究[J]. 中国酿造,2004,(2):17-19.
- [4] 宋水山,司世林,汪继东,等. 不同氮源对红曲霉产红曲色素的影响[J]. 河北省科学院学报,1992,(4):65-71.
- [5] Patrick J E, Wang H Y. Pigment Production from Immobilized *Monascus* sp. Utilizing Polymeric Resin Adsorption[J]. Appl Environ Microbiol, 1984, 47(6):1323-1326.
- [6] Zhang M G, Chang H S, Lin C Y. The Study in Production of *Monascus* Pigment with *Monascus* sp[J]. Food and Fermentative Industry, 1992,(6):1-8.