

红曲菌的复合诱变及其固态发酵条件的优化

杨欢欢, 胡中泽*

(武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 通过紫外线和 LiCl 对一株红曲菌 MP 进行复合诱变, 并通过响应面法对其固态发酵条件进行优化分析。结果表明: 在前期温度为 30 , 后期温度为 24 , 初始含水量为 60% 的条件下, Monacolin K 的产量最高可达 5.33mg/g。
关键词: 红曲菌; 复合诱变; Monacolin K; 响应面

Combined Mutation of *Monascus* and Optimization of Fermentation Conditions for Monacolin K Production

YANG Huan-huan, HU Zhong-ze*

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: A strain of *Monascus purpureus* was treated with UV irradiation and its spore was then incubated in media containing LiCl to induce mutation. A mutant strain with high yield of monacolin K was obtained and its fermentation conditions were optimized for monacolin K production. The results showed that the optimal fermentation conditions were initial temperature of 30 , late temperature of 24 and original moisture content of germinated brown rice of 60%. Under these conditions, the yield of monacolin K reached 5.33 mg/g.

Key words: *Monascus*; combined mutation; monacolin K; response surface methodology

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0247-05

红曲起源于中国, 其在食品方面的应用已很广泛。目前, 随着对红曲研究的深入, 红曲在医药保健方面的用途也越来越受关注, 其中功能性红曲在此方面的价值更为突出。功能性红曲是指可降低胆固醇、治疗高血脂的红曲^[1-2]。

红曲菌的主要功能性产物之一——Monacolin K 是日本远藤章利用小型发酵罐深层发酵培养红曲菌得到的。Monacolin K 抑制胆固醇形成的机理是 Monacolin K 能竞争性地抑制羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶(HMG-R), 进而抑制了胆固醇的合成, 其中 HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成中的限速酶^[3]。Monacolin K 还能增加胆固醇的分解代谢, 降低甘油三酯及低密度脂蛋白(LDL)^[4]。由于此种特性, 如何提高红曲菌中 Monacolin K 的产量成为研究重点。

目前红曲生产中广泛采用的是固态发酵法, 其具有投资少, 产量大, 生产经验丰富等优点^[5]。生产 Monacolin K 一般也利用红曲菌固体发酵法, 但在工业化固体培养时, 培养条件对其产量的影响很大, 因此合理设计固态发酵工艺条件是达到高产

Monacolin K 目的的关键步骤^[6]。

本实验利用理化复合诱变方法提高红曲菌产 Monacolin K 的能力, 并通过响应面分析法研究固态发酵过程中各工艺条件对红曲生产 Monacolin K 的影响, 最终得到固态发酵条件的最优组合。

1 材料与方 法

1.1 菌株与培养基

红曲菌 MP 本实验室分离保藏。

基础培养基: 麦芽汁 10 Bx, 琼脂 2%。用作斜面和平板培养。固态发酵培养基: 适量发芽糙米洗净浸泡后于 250mL 锥形瓶中蒸煮, 灭菌 20min。

1.2 试剂与仪器

无水乙醇、磷酸(分析级)、乙腈(色谱级)、洛伐他汀对照品。

PHS-3C 型精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; YM50 型不锈钢立式蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司; YM50 型不锈钢立式高压蒸汽灭菌箱 上海三申医疗器械有限公司; DNP-9082 型电热恒温培养箱

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目(2009CDA099)

作者简介: 杨欢欢(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: yanghuanhuan022@126.com

* 通信作者: 胡中泽(1968—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为粮油工程。E-mail: hzz1968@126.com

上海精密实验设备有限公司; SW-CJ-2D 型净化工作台
广州瑞智科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株诱变的处理方法

在红曲菌的培养过程中, Monacolin K 是次级代谢产物, 代谢机制复杂, 其产量是由多基因决定的, 诱变后产量提高是多基因效应的结果^[7]。本实验采用 LiCl 作为化学因子和 UV 作为物理因子对红曲菌 MP 进行复合诱变处理。

具体操作步骤: 量取 6mL 孢子悬液于无菌平皿中, 在距离紫外灯 30cm 处打开皿盖开始照射。将照射后的菌悬液转入无菌试管中, 并立即浸入冰水中暗室保存 3h。按 10 倍稀释法将经 UV 处理过的孢子悬液依次稀释, 并各吸取 0.1mL 涂布在含有 0.8g/L LiCl 溶液的平板上, 放入暗室中 34 培养 6d, 以备分离筛选^[7]。

1.3.2 诱变筛选

在对菌种进行诱变时, 只有每次诱变后有 1~2 个控制产量的基因突变, 使产量合成稍有增加且又能维持其最起码代谢平衡的菌株才能生存下来, 因此, 高产菌株的产量提高, 是通过多代诱发突变逐渐积累的结果^[8]。

采用传统选育中常用的方法, 挑选的菌落直接接入固体培养基中培养。

第一代: 红曲菌 MP 制备孢子悬液 UV 照射分离到含有 LiCl 的 MEA 平板上 挑选 200 个菌落 初筛 50 株 复筛 4 株^[8]。第二代: 出发菌株 4 株 制备孢子悬液 UV 照射 分离到含有 LiCl 的 MEA 平板上 挑选 200 个菌落 初筛 50 株 复筛 4 株。第三、四代与以上操作方法相同。

初筛: 选择生长速度减缓和形态发生明显变异的菌落。

复筛: 对初筛出的 50 株红曲菌进行固态发酵培养 14d, 采用 HPLC 法对发酵产物中的 Monacolin K 进行定量检测, 筛选出产量高的菌株^[9-10]。

1.3.3 HPLC 法定量检测

样品处理: 将发酵后的红曲米于 60 烘干至质量恒定, 研磨过 100 目筛。取适量样品溶于 5mL 流动相中, 并超声助溶 30min, 40 水浴 1h, 5000r/min 离心 15min, 取上清液过 0.45 μ m 滤膜待用。

色谱柱: Welchrom-C₁₈(4.6mm \times 250mm, 5 μ m); 检测波长: 238nm; 流动相: 乙腈-磷酸水溶液; 流速: 1mL/min; 进样量: 20 μ L。

1.3.4 响应面试验分析法

在红曲菌固态发酵萌芽米过程中采用变温培养, 以前期培养温度、后期培养温度以及初始含水量为 3 个主

要影响因素, 进行单因素试验, 基于单因素试验结果确定响应面因素水平。具体设计见表 1。

表 1 响应面因素水平及编码设计表
Table 1 Factors and levels in Box-Behnken design

水平	X ₁ 前期温度/	X ₂ 后期温度/	X ₃ 初始含水量/%
-1	27	21	50
0	30	24	60
1	33	27	70

2 结果与分析

2.1 复合诱变

2.1.1 紫外线复合 0.8g/L LiCl 诱变对菌株的影响

选择紫外线照射时间分别为 15、30、45、60、75、90、105、120s, 将孢子悬液涂布在含 LiCl 质量浓度为 0.8g/L 的 MEA 平板上, 观察红曲菌的生长情况。

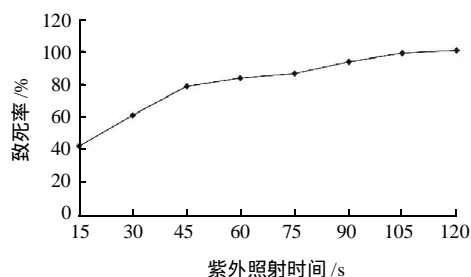
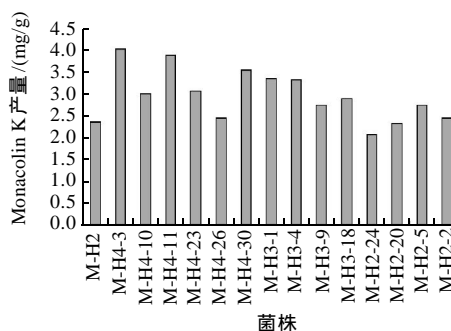


图 1 紫外线照射时间对红曲孢子的致死作用
Fig.1 Lethal effect of UV light on *Monascus purpureus*

由图 1 可知, 孢子的致死率随着紫外照射时间的延长而增大, 当照射时间为 120s 时, 孢子的致死率近 100%。而照射时间 90s 时致死率为 90% 左右, 将此时作为复合诱变处理的紫外照射时间。

2.1.2 复合诱变筛选出菌种的发酵产量



图中 15 株菌株为经第一、二、三代突变株中 Monacolin K 产量较高的菌株。

图 2 突变菌株和出发菌株 M-H2 的比较

Fig.2 Comparative monacolin K yield of original strain M-H2 and its mutant strains

对红曲菌 MP 进行上述复合诱变, 诱变条件为紫外照射时间 90s, LiCl 质量浓度为 0.8g/L。MP 经诱变后得到 80 多株突变株, 挑取菌落形态发生明显变异的 30 株进行固态发酵培养 14d, 采用 HPLC 法对发酵产物中的 Monacolin K 进行定量检测。按 1.3.2 节的筛选步骤和方法, 连续诱变 4 代后得到以下突变株, 结果如图 2 所示。15 株菌株为第一、二、三代突变株中 Monacolin K 产量较高菌株, 而第四代诱变时, 相同条件下致死率下降, 产 Monacolin K 能力无明显变化。经过初筛和复筛, 并与诱变前进行比较得到目的菌株 M-H4-3, 其 Monacolin K 的产量为 4.02mg/g, 而相同发酵条件下出发菌株 M-H2 的 Monacolin K 的产量仅为 2.35mg/g。

2.1.3 遗传稳定性实验

对目的菌株 M-H4-3 进行遗传稳定性实验, 将其接种在麦芽汁培养基上连续传代至第五代, 每代均接种到萌芽米上进行固态发酵培养。利用 HPLC 法对发酵样品进行检测, 结果见图 3。菌株 M-H4-3 在固态发酵萌芽米过程中对 Monacolin K 有较高的产量, 且性能稳定。

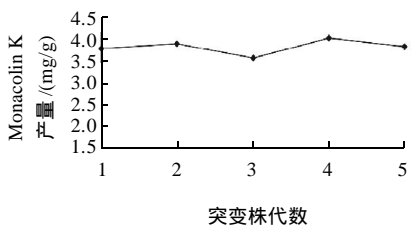


图 3 突变株 M-H4-3 遗传稳定性实验结果
Fig.3 Genetic stability of mutant strain M-H4-3

2.2 前期温度对 Monacolin K 产量的影响

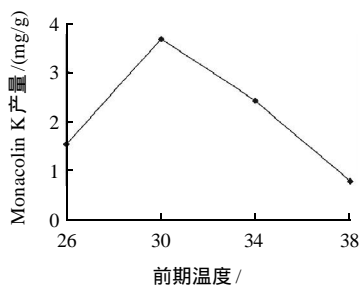


图 4 前期温度对 Monacolin K 产量的影响
Fig.4 Effect of initial temperature on monacolin K yield

Monacolin K 是红曲发酵过程中产生的次级代谢产物, 而次级代谢的一个重要特征是其代谢产物一般只在菌丝体的生长速率降低时才合成^[11], 因此 Monacolin K 的形成应滞后于菌丝体的生长, 而红曲菌丝体的良好生长是高产 Monacolin K 的重要基础^[12]。采用变温培养,

在其他条件不变的情况下, 首先固定后期温度为 25 , 研究前期发酵温度对 Monacolin K 产量的影响, 结果见图 4。30 时 Monacolin K 产量最高, 之后 Monacolin K 产量随着温度的升高而增大, 当温度升至 38 时几乎没有产量, 说明此温度红曲菌菌丝体几乎不生长。

2.3 后期温度对 Monacolin K 产量的影响

在红曲米发酵过程中后期温度直接影响 Monacolin K 在菌丝体生长中的代谢积累^[13], 因此, 固定前期温度 30 , 后期温度分别设为 20、24、28、32 培养红曲米, 研究后期温度对 Monacolin K 产量的影响, 结果见图 5。

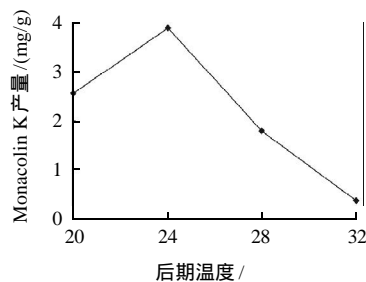


图 5 后期温度对 Monacolin K 产量的影响
Fig.5 Effect of late temperature on monacolin K yield

由图 5 可知, 后期温度为 24 时 Monacolin K 的产量达到最大, 而当温度高于 24 时 Monacolin K 的产量骤降, 当后期温度高于前期温度时红曲生长缓慢几乎不代谢 Monacolin K。

2.4 初始含水量对 Monacolin K 产量的影响

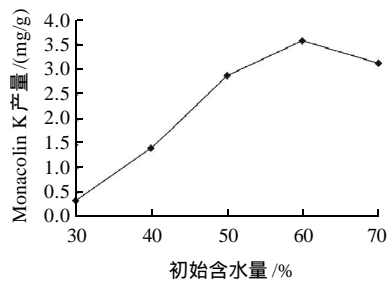


图 6 初始含水量对 Monacolin K 产量的影响
Fig.6 Effect of original moisture content on monacolin K yield

在固态发酵时, 孢子萌发及菌丝生长都需要适宜的水分, 而固态发酵最大的特点就是无游离水^[14], 因此底物含水量的变化对微生物的生长及代谢能力会产生重要的影响^[15]。在其他条件不变的情况下进行发酵实验, 研究初始含水量对 Monacolin K 产量的影响, 结果见图 6。在初始含水量 60% 时 Monacolin K 累积量达到最大值, 通过观察各水平红曲米的发酵生长情况得知潮湿的环境比较适合红曲菌的生长。

2.5 固态发酵条件的响应面分析结果

以 Monacolin K 的产量为响应值(Y), 通过 Box-Behnken 设计并进行试验, 得到红曲菌固态发酵萌芽米的最优组合条件。结果见表 2。方差分析见表 3。根据回归方程, 采用软件绘制响应面和等值线图, 考察响应曲面情况, 见图 7。

表 2 响应面试验设计方案与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	Y Monacolin K 产量/(mg/g)
1	0	1	1	1.25
2	0	1	-1	0.61
3	1	1	0	2.27
4	0	0	0	5.69
5	1	-1	0	3.58
6	-1	-1	0	0.22
7	1	0	1	3.19
8	-1	1	0	0.51
9	0	0	0	5.21
10	1	0	-1	1.01
11	-1	0	-1	0.34
12	-1	0	1	0.67
13	0	0	0	5.7
14	0	-1	1	4.11
15	0	-1	0	0.89

对表 2 中的数据进行二次多项回归拟合, 获得回归方程:

$$Y = -441.84500 + 14.82403X_1 + 11.71889X_2 + 2.62963X_3 - 0.044444X_1X_2 + 0.015417X_1X_3 - 0.021500X_2X_3 - 0.23894X_1^2 - 0.19310X_2^2 - 0.020804X_3^2$$

表 3 方差分析

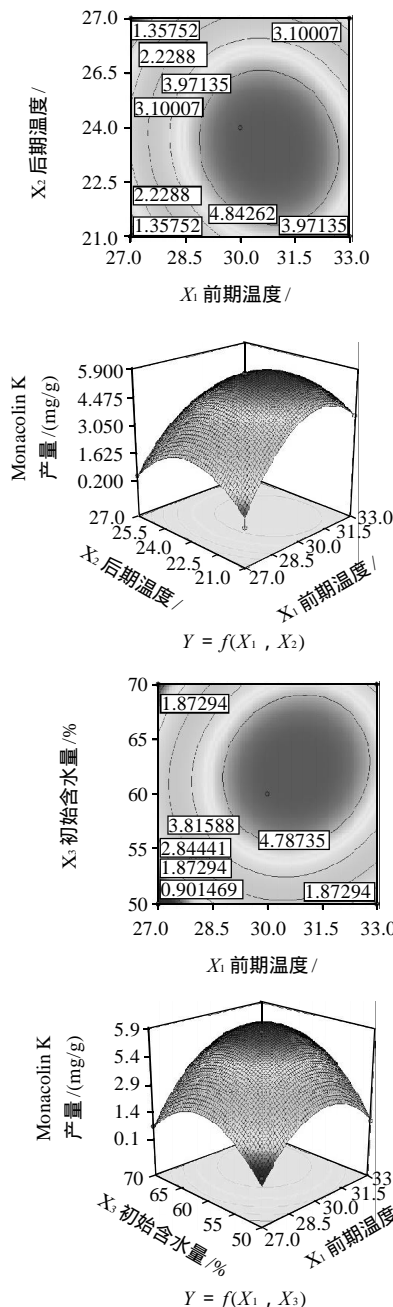
Table 3 Variance analysis for the fitted regression equations

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F
X_1	8.632013	1	8.632013	30.56463	0.0027
X_2	2.1632	1	2.1632	7.659559	0.0395
X_3	5.072113	1	5.072113	17.95957	0.0082
X_1X_2	0.64	1	0.64	2.266142	0.1926
X_1X_3	0.855625	1	0.855625	3.029637	0.1422
X_2X_3	1.6641	1	1.6641	5.892323	0.0596
X_1^2	17.07431	1	17.07431	60.45751	0.0006
X_2^2	11.15208	1	11.15208	39.4878	0.0015
X_3^2	15.9808	1	15.9808	56.58556	0.0007
回归	57.41791	9	6.379768	22.58978	0.0016
残差	1.412092	5	0.282418		
失拟	1.255225	3	0.418408	5.334573	0.1619
纯误差	0.156867	2	0.078433		
合计	61.26707	14			

对回归方程求一阶偏导数并等于零, 得到有 3 个方

程组成的方程组, 解答该方程组得到: $X_1 = 30.53$, $X_2 = 25.68$, $X_3 = 60.07$ 。即应用数学模型得出的理论最优培养条件: 前期温度为 30.53, 后期温度为 25.68, 初始含水量为 60.07%, Y 的最大值为 5.92mg/g。而第 4 组试验的产量最高, 即在前期温度为 30、后期温度为 24、初始含水量为 60% 的条件下, Monacolin K 产量是 5.69mg/g。因此可以看出理论最优点在此附近。

由表 3 可知, 一次项以及二次项对响应值的影响均很显著, 交互项则不显著。在此模型中失拟项不显著, 回归高度显著, 可以用此模型进行响应值的预测。模型的复相关系数的平方 $R^2 = 0.9981$, 说明回归方程的拟合程度良好, 可以用该方程代替真实试验点进行分析。



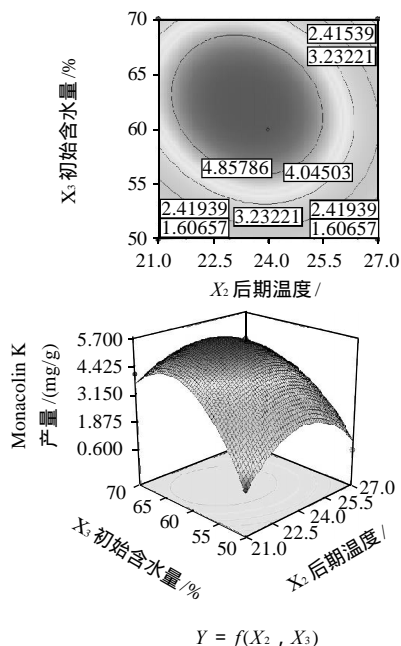


图7 前期温度、后期温度和初始含水量对 Monacolin K 产量影响的响应面及等值线图

Fig.7 Response surface and contour plots for the effects of initial temperature, late temperature and original moisture content on monacolin K yield

2.6 拟合优化的验证

为检验响应面法所得结果的可靠性，通过重复性实验对统计分析计算出的理论最优条件进行验证，即在前期温度为 30、后期温度为 24、初始含水量为 60% 的条件下，用目的菌株 M-H4-3 固态发酵萌芽米，进行 5 次固态发酵所得的实验数据的平均值为 5.33mg/g，与理论值的相对误差为 0.91%。

3 结论

3.1 以 LiCl 作为化学因子和 UV 作为物理因子对红曲菌 MP 进行复合诱变处理，通过反复诱变和筛选得到一株 Monacolin K 产量较高的菌株 M-H4-3，其产量为 4.02mg/g，与作为对照的出发菌株(2.35mg/g)相比，其产量提高 1.7 倍。

3.2 通过单因素及响应面实验对红曲菌固态发酵萌芽米

条件进行优化，并通过 Box-Behnken 试验设计，建立红曲菌固态发酵萌芽米过程中 Monacolin K 代谢积累的回归模型，分析各因素效应的显著性以及两两因素间的交互作用。在前期温度为 30、后期温度为 24、初始含水量为 60% 的条件下，Monacolin K 产量提高至 5.33mg/g。

参考文献：

- [1] 熊晓辉, 张李阳, 韦策, 等. 红曲霉菌产 Monacolin K 固体发酵条件的优化[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(1): 8-10.
- [2] 崔有贵, 李永峰, 任南奇, 等. 甜菜废蜜生物制氢细菌的诱变育种[J]. 中国甜菜糖业, 2004, 1(3): 36-40.
- [3] 张素青. 糖蜜发酵选育高产蛋白酵母及发酵条件优化研究[J]. 内蒙古农业大学, 2009, 12(7): 76-80.
- [4] 丘振宇, 王雅琴, 许喜林, 等. 红曲霉的特点及应用研究[J]. 食品工业科技, 2006(12): 55-59.
- [5] 张良. 高产 Monacolin K 红曲霉的诱变选育及其固态发酵条件的优化[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.
- [6] 王金宇. 红曲菌固态发酵产红曲色素和 Monacolin K 条件研究[J]. 陕西科技大学, 2010, 20(3): 67-71.
- [7] 索江华, 黄现青, 郭爽, 等. 红曲霉及其主要产物[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2006(1): 21-23.
- [8] 孙嘉龙, 邹晓, 刘爱英, 等. 高产 Monacolin K 红曲菌株的复合诱变选育[J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 507-516.
- [9] 王立新, 莫海涛, 石红. 红曲霉固态发酵生产洛伐他汀的研究[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(2): 96-98.
- [10] SAYYAD S A, PANDA B P, JAVED S, et al. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology [J]. Microbiol Biotechnol, 2007, 73(21): 1054-1058.
- [11] WANG J, LEE C L, PAN T M. Improvement of Monacolin K, -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601[J]. Microbiol Biotechnol, 2003, 30(12): 669-676.
- [12] 谌斌. 紫红曲的原生质体紫外线诱变育种[J]. 广西科学院学报, 1999, 15(2): 86-89.
- [13] BLANC P J, LAUSZAC J P, le BARS J, et al. Characterization of monascidin A from *Monascus as citrinin*[J]. Int J Food Micmbiol, 1995, 27(2/3): 201-213.
- [14] CHULEE C H. Mycelial reactions and mycelial compatibility group of red rice mould (*Monascus purpureus*)[J]. The British Mycological Society, 2002, 106(3): 298-304.
- [15] MAARSE H. Volatile compounds in foods and beverages[M]. New York: Mareel Dekker, 1991: 168-173.