

红色红曲菌液态发酵产 Monacolin K 重要影响因素的研究

邱 源,周立平,嘉晓勤

(浙江工业大学生物与环境工程学院,浙江 杭州 310014)

摘 要: 对红色红曲菌(*Monascus ruber*) GM011 产 Monacolin K 的重要影响因素进行研究。结果表明,以燕麦粉、甘油为混合碳源,黄豆粉为氮源,能够显著提高发酵液中 Monacolin K 的含量。 Zn^{2+} 在红曲菌 GM011 的液态发酵中同样能显著提高 Monacolin K 的产量。采用响应面方法对培养基进行优化,得到最佳的培养基组成为:燕麦粉 32.0 g/L、甘油 66.9 g/L、黄豆粉 29.0 g/L、 $ZnSO_4$ 2.5 g/L。通过验证实验,Monacolin K 的实际质量浓度为 353.30 mg/L。

关键词: 微生物; 红曲菌; 液态发酵; Monacolin K; 响应面分析

中图分类号: Q93-3; TQ925.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2010)05-0047-04

Study on the Important Factors Influencing Monacolin K Production by Liquid Fermentation of *Monascus ruber* GM011

QIU Yuan, ZHOU Li-ping and JIA Xiao-qin

(Biology & Environmental Engineering College of Zhejiang Industrial University, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

Abstract: The important factors influencing Monacolin K production by liquid fermentation of *Monascus ruber* GM011 were investigated. The results showed that oat flour and glycerol as mixed carbon source and soybean meal as nitrogen source could evidently increase Monacolin K content in fermenting liquid, and Zn^{2+} in liquid fermentation of *Monascus ruber* GM011 could also evidently increase Monacolin K yield. The culture medium was optimized by response surface method as follows: oat flour 32.0 g/L, glycerol 66.9 g/L, soybean meal 29.0 g/L, and $ZnSO_4$ 2.5 g/L. The actual concentration of Monacolin K was 353.30 mg/L through experimental validation.

Key words: microbe; *Monascus ruber*; liquor fermentation; Monacolin K; response surface analysis

Monacolin K(MK)是通过聚酮途径合成的次级代谢产物,能够竞争性抑制胆固醇合成限制酶 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶,达到降血脂的效果。最初由 Endo 在红曲菌发酵液中发现^[1],后来研究证明,土曲霉(*Aspergillus terreus*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、短密青霉(*Penicillium brevicompactum*)都能通过该途径合成 MK。目前,土曲霉中 MK 合成的途径和酶已被鉴定和表征^[2]。这对红曲菌发酵产 MK 的研究有一定借鉴意义。

红曲菌发酵物中含有多种经济价值较高的生理活性成分,其中多数是次级代谢产物。碳、氮源对红曲菌合成次级代谢产物至关重要,不仅影响主要次级代谢途径的选择,还能通过葡萄糖阻遏、生长信号途径和底物抑制调控次级产物的合成。因此,本实验对红曲菌发酵产 MK 的碳源和氮源进行了筛选,以确定高产 MK 的培养基。另外,鉴于金属离子在酶催化生物合成反应中的重要作

用,结合红曲菌发酵中的相关经验,实验研究了二价金属离子对红曲菌液态发酵生成 MK 的影响。最后,通过响应面法(response surface methodology, RSM),对红色红曲菌 GM011 产 Monacolin K 的液态培养条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 菌种

红曲菌 GM011 为浙江工业大学发酵工程实验室保藏菌株。

1.2 培养基

斜面培养基为:12 °Bx 的麦芽汁培养基。

种子培养基为:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 30 g/L,甘油 20 g/L, $NaNO_3$ 2 g/L, $ZnSO_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L。

发酵培养基为:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 30 g/L,甘油 50 g/L, $NaNO_3$ 2 g/L, $ZnSO_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L。

收稿日期:2010-03-01

作者简介:邱源,男,浙江省建德市人,工学硕士,专业:发酵工程,研究方向:红曲菌液态发酵。

通讯作者:周立平,男,浙江杭州,浙江工业大学,生物与环境工程学院,发酵工程研究所教授,研究生导师, E-mail: njyjs@zjut.edu.cn。

1.3 培养条件及方法

斜面培养:挑取 1 环菌种接种于斜面培养基中,在 30 ℃ 培养箱中培养至菌丝长满斜面。

种子液培养:用 10 mL 无菌水洗涤试管斜面孢子,接种至装有 100 mL 种子液培养基的 500 mL 三角瓶中,在 30 ℃、180 r/min 的旋转式摇床上培养 1 d。

液体摇瓶发酵培养:将种子液按 5 % (v/v) 的接种量接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28 ℃、180 r/min 的条件下培养 2 d,然后于 26 ℃ 发酵 12 d。

1.4 响应面优化

本实验采用 Stat-Ease Design-Expert 7.1.3 版软件进行了实验设计和数据分析。通过 Box-Behnken 设计法进行设计并作响应面分析。根据实验方案得到的结果,按照下列多元二次方程进行回归拟合,以描述各因子对响应值的影响。

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

式中, Y 为预测响应值, β_0 为截距, β_{ii} 为线性系数, β_{ij} 为交互作用系数。

通过软件对实验数据进行回归拟合,并对拟合方程作显著性检验及方差分析。

1.5 分析方法

菌体量采用干重法测定。取发酵液,用 3 层纱布过滤,蒸馏水洗涤 2~3 次,拧干,在 60 ℃ 烘箱中烘干至恒重。菌体量计算公式:

$$\text{菌体量 (g/L)} = \text{干物质质量 (g)} / \text{发酵液体积 (L)}$$

MK 的测定:见文献[3]。

2 结果与分析

2.1 碳源对 Monacolin K 产量的影响

以蛋白胨 30 g/L, NaNO_3 2 g/L, ZnSO_4 2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L 为基本培养基,分别选择 30 g/L 甘油、燕麦粉、荞麦粉、大米粉、葡萄糖、蔗糖、糊精作为碳源,按照 1.3 的方法进行培养,结果见图 1。

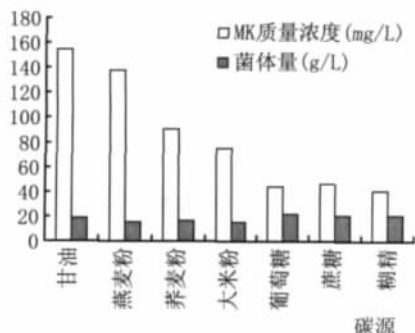


图1 不同碳源对MK质量浓度的影响

图1表明,快速利用碳源葡萄糖、蔗糖、糊精虽然菌

体量高,但是 MK 的产量却比缓慢利用碳源低。土曲霉合成 MK 的过程通常受葡萄糖阻遏作用的调控^[4]。上述研究现象说明,该现象同样在 GM011 发酵过程存在。缓慢利用碳源发酵液中 MK 含量相对较高。其中,以甘油为碳源时, MK 的质量浓度最高,达到 154.99 mg/L,这是因为甘油既能为红曲菌的生长提供营养,也能为 MK 的合成提供碳骨架。以燕麦粉为碳源时, MK 质量浓度达到 137.99 mg/L。这可能和燕麦中含有丰富的 B 族维生素有关。已有文献对 B 族维生素促进土曲霉合成 MK 做了报道^[5]。另外,燕麦粉中富含的氨基酸也有利于 MK 的积累^[6]。

实验发现,以燕麦粉-甘油为混合碳源比同质量的甘油更有利于提高发酵液中 MK 含量。当燕麦粉 30 g/L、甘油 60 g/L 时, MK 的产量较高,达到 297.34 mg/L。

2.2 氮源对 MK 产量的影响

在含有燕麦粉 30 g/L, 甘油 60 g/L, NaNO_3 2 g/L, ZnSO_4 2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L 的基本培养基上,分别添加 30 g/L 黄豆粉、蛋白胨、玉米粉、酵母膏、 NaNO_3 、 NH_4NO_3 作为氮源。实验结果发现,不同的氮源对 MK 的产量有明显的影响(见图 2)。图 2 表明,有机氮源更有利于菌体的次级代谢,其中黄豆粉的作用最显著。

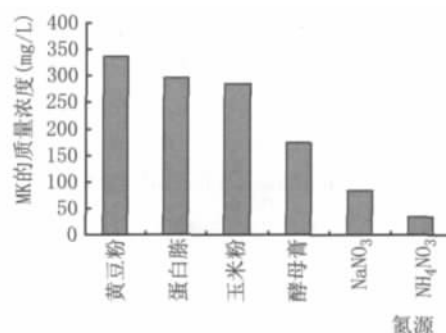


图2 不同氮源对MK质量浓度的影响

在发酵培养基中添加不同浓度的黄豆粉,分析培养基中黄豆粉浓度对 MK 的影响,结果见图 3。

图3结果表明,GM011 发酵液中 MK 的含量随黄豆粉浓度增加而上升,并在浓度为 30 g/L 时, MK 浓度达到最高。值得注意的是,在不添加黄豆粉的情况下,由于燕麦粉中的氮元素,红曲菌 GM011 仍能够生长,并能在发酵液中检测到 MK。另外,因为氮源用于细胞生长繁殖的效率比用于合成 MK 的效率更高,所以氮限制能够使更多的碳源被用于合成 MK,反之则会抑制 MK 的合成^[7]。所以,当黄豆粉的浓度超过 30 g/L 后, MK 的含量迅速降低。

2.3 二价金属离子对 MK 产量的影响

二价金属离子对 MK 质量浓度的影响结果见表 1。

以燕麦粉 30 g/L, 甘油 60 g/L, 黄豆粉 30 g/L, NaNO_3

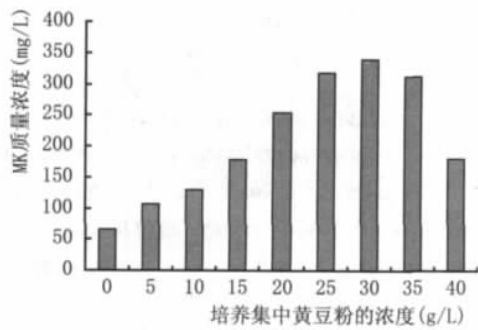


图3 培养基中黄豆粉浓度对MK的影响

表1 二价金属离子对MK质量浓度的影响

项目	MK(mg/L)	菌体量(g/L)	MK(菌体量, mg/g)
对照	87.24	11.05	7.90
Zn ²⁺	328.94	15.23	21.60
Mg ²⁺	242.76	20.46	11.86
Cu ²⁺	53.67	9.87	5.44
Ca ²⁺	95.87	12.80	7.49
Mn ²⁺	136.64	13.11	10.42
Fe ²⁺	168.48	15.21	11.08

2 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L 为基本培养基, 添加 0.015 mol/L 的 Zn²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺ 的硫酸盐, 对照组不添加 (见表 2)。

表2 响应面分析试验因素水平表

因素	符号	水平		
		-1	0	+1
燕麦粉(g/L)	X ₁	25	30	35
甘油(g/L)	X ₂	50	60	70
黄豆粉(g/L)	X ₃	25	30	35
ZnSO ₄ (g/L)	X ₄	2.0	2.5	3.0

检测结果发现, 添加了 Zn²⁺ 的培养基中 MK 含量最高, 达到了 328.94 mg/L, MK 与菌体量的比值为 21.60 mg/g, 是对照的 2.73 倍, 说明 Zn²⁺ 能促进 MK 的合成。研究表明, Zn²⁺ 不仅参与 MK 合成调控蛋白的形成, 还能提高 LovD 的活性, 使 MK 含量显著提高^[9]。

培养基中不同浓度的 ZnSO₄ 对 GM011 产 MK 的影响结果见图 4。图 4 表明, 添加量为 2.5 g/L 时, MK 的含量最大, 添加量小于或大于该浓度时, MK 含量均有所降低。当 ZnSO₄ 为 4 g/L 时, 含量极低, 这说明高浓度的 Zn²⁺ 对 MK 的合成产生抑制作用。

2.4 响应面优化^[9]

在对培养基的碳、氮源、二价金属离子进行筛选之后, 有必要对这些影响因素进行进一步的分析和考察, 从而确定最佳的培养条件。响应面方法能将实验设计和数学建模结合起来, 通过局部实验回归拟合因素与结果间的全局函数关系, 从而得到准确有效的实验结论。

以燕麦粉、甘油、黄豆粉、ZnSO₄ 为自变量, 各因素编

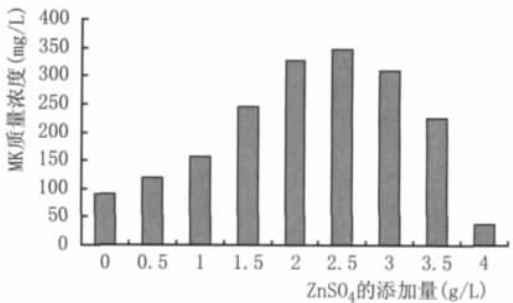


图4 ZnSO₄对MK质量浓度的影响

码水平见表 2 所示。Box-Behnben 实验设计和结果见表 3。运用 Design-Expert 软件拟合表 3 的实验数据, 可以得到燕麦粉浓度 (X₁)、甘油浓度 (X₂)、黄豆粉浓度 (X₃)、ZnSO₄ 浓度 (X₄) 与 MK 质量浓度的二次多项回归方程:

$$Y=347.11+7.61X_1+3.71X_2-7.75X_3-4.45X_4+3.18X_2X_4-9.66X_1^2-2.81X_2^2-18.97X_3^2-20.35X_4^2$$

表3 Box-Behnben 实验设计及结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	MK 含量(mg/L)
1	1	-1	0	0	338.67
2	0	0	-1	-1	323.79
3	0	-1	0	1	313.01
4	0	0	0	0	345.03
5	-1	0	1	0	303.80
6	0	-1	0	-1	325.79
7	0	-1	1	0	315.31
8	0	0	1	-1	305.07
9	-1	1	0	1	333.45
10	0	0	1	1	294.26
11	-1	0	0	-1	311.31
12	0	0	0	0	341.79
13	0	1	0	-1	328.38
14	0	-1	-1	0	329.25
15	-1	0	-1	0	317.16
16	0	0	0	0	348.47
17	-1	-1	0	0	323.59
18	1	0	0	1	320.66
19	0	1	0	1	328.31
20	1	1	0	0	344.05
21	0	0	0	0	350.42
22	1	0	-1	0	334.65
23	1	0	1	0	318.02
24	0	1	1	0	320.28
25	0	1	-1	0	335.63
26	-1	0	0	1	305.5
27	0	0	0	0	349.86
28	0	0	-1	1	309.23
29	1	0	0	-1	330.06

由该方程的方差分析(表 4)可知, 该模型显著 (P<0.0001), 方程的一次项、二次项的影响显著, 且交互项 X₂X₄ 也显著。模型的校正系数 R²=0.9853, R²_{Adj}=0.9707, 表明该模型与实验值拟合良好, 可以用于 GM011 液体

表 4 Box-Behnben 实验回归分析

模拟项	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	6285.42	14	448.96	67.20	<0.0001
X ₁	694.64	1	694.64	103.97	<0.0001
X ₂	164.87	1	164.87	24.68	<0.0001
X ₃	720.29	1	720.29	107.81	0.0002
X ₄	237.90	1	237.90	35.61	<0.0001
X ₁ X ₂	5.02	1	5.02	0.75	0.4008
X ₁ X ₃	2.67	1	2.67	0.40	0.5372
X ₁ X ₄	3.22	1	3.22	0.48	0.4988
X ₂ X ₃	0.50	1	0.50	0.074	0.7890
X ₂ X ₄	40.39	1	40.39	6.04	0.0276
X ₃ X ₄	3.52	1	3.52	0.53	0.4802
X ₁ ²	605.28	1	605.28	90.59	<0.0001
X ₂ ²	51.21	1	51.21	7.67	0.0151
X ₃ ²	2333.90	1	2333.90	349.32	<0.0001
X ₄ ²	2687.17	1	2687.17	402.19	<0.0001

发酵中 MK 质量浓度的理论预测。

对方程求偏导，并解方程组得到：燕麦粉浓度 32.0 mg/L (X₁=0.394)、甘油浓度 66.9 mg/L (X₂=0.694)、黄豆粉浓度 29.0 mg/L (X₃=−0.204)、ZnSO₄ 浓度 2.5 mg/L (X₄=0.060)。在此条件下模型的极值点即 MK 最高质量浓度，为 350.4 mg/L。

为了验证模型预测的准确性，在最佳实验点处进行实验，MK 的实际质量浓度为 353.30 mg/L (n=5)，可见该模型能较好地预测实际发酵情况。

3 结论

实验表明不同碳源、氮源和二价金属离子对红曲菌 GM011 液态发酵产 MK 有重要影响，其中以燕麦粉和甘油为混合碳源，黄豆粉为氮源，并添加适量的 Zn²⁺，能够显著提高 MK 产量。通过响应面法优化，当燕麦粉浓度 32.0 g/L、甘油浓度 66.9 g/L、黄豆粉浓度 29.0 g/L、ZnSO₄ 浓度 2.5 g/L 时，MK 的浓度达到 353.30 mg/L。实践证明，采用响应面法对红曲菌 GM011 液态发酵产 MK 的

培养基进行优化，效果良好。

参考文献：

- Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. Antibiotics, 1976, 32:852–854.
- Hendrickson L, Davis CR,Roach C, et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene [J]. Chemistry Biology, 1999, 6:429–439.
- 贾波,孙佰申,周立平. HPLC 法测定红曲发酵样品中 Monacolin K 的含量[J]. 食品与发酵工业,2003, 29(1):70–72.
- Hajjaj H,Niederberger P,Duboc P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium[J]. Appllied Environment Microbiology, 2001, 67:2596–2602.
- Bizukojc Marcin, Pawlowska Beata, Ledakowicz Stanislaw. Sup-
plementation of the cultivation media with B-group vitamins en-
hance lovastatin by *Aspergillus terreus*[J]. Journal of biotechnol-
ogy, 2007, 127:258–268.
- 梁剑光,朱玲,穆陆,徐正军. 氨基酸对于 *Monascus ruber* 生物
合成 Monacolin K 影响的研究[J].氨基酸和生物资源,2006,
(4):25–29.
- Casas Lopez J L,Sanchez Perez J A, Fernandez Sevilla J M,et al.
Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:
N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite pro-
ductionioin[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33:
270–277.
- Zhihua Jia, Xiaolin Zhang, Yaling Zhao,et al. Effects of divalent
metal cations on lovastatin biosynthesis from *Aspergillus terreus*
in chemically defined medium[J]. World Journal of Microbiol-
ogy Biotechnology, 2009, 25:1235–1241.
- Casas Lopez J L,Sanchez Perez J A, Fernandez Sevilla J M,et al.
Fermentation optimization for the production of lovastatin by
Aspergillus terreus: use of response surface methodology[J].
Journal Chemistry Technology Biotechnology, 2004, 79:
1119–1126.

(上接第 46 页)

- 术研究现状[J].应用与环境生物学报,2008,14(6):877–884.
- 陈玉亮,呼世斌,张守文,等.麦秆分步糖化发酵产乙醇的初步
研究[J].西北农业学报,2009,18(2):149–153.
 - 冀春雪,杜风光,史吉平,等.纤维乙醇用纤维素酶的研究进展
[J].酿酒科技,2007,(7):118–121.
 - 张辉,朱奇,朱蓝英.一株嗜热纤维素分解菌液体发酵条件初
步研究[J].天津农业科学,2006,12(1):15–17.
 - 张辉,桑青,马艳霞.嗜热侧孢霉固体发酵产纤维素酶条件研
究[J].食品研究与开发,2008,29(1):4–7.
 - 路梅,李多川.嗜热毛壳菌(*Chaetomium thermophile*)液体发酵
产生纤维素酶及酶学性质的研究[J].工业微生物,2003,33(3):
21–24.

- 聂志强.产纤维素酶真菌的筛选及其酶学性质的研究[J].中国
酿造,2009,(3):81–83.
- 石笛,杨础华,张竞立,等.一株耐热纤维素酶菌株的筛选及酶
学性质的研究[J].广西轻工业,2009,(4):14–15.
- 唐芳,程树峰,伍松陵.纤维素酶高产担子菌株的筛选鉴定及
酶学性质初探[J].粮油食品科技,2009,17(2):48–50.
- 王菁莎,王颖,刘景彬.里氏木霉 LW1 产纤维素酶的酶学性
质[J].纤维素科学与技术,2006,14(2):46–49.
- 曾青兰.产碱性纤维素酶真菌的筛选鉴定及酶学性质研究[J].
湖北农业科学,2008,47(8):899–901.
- 曾青兰,黄小罗,洪玉枝.产中性纤维素酶真菌的鉴定及其酶
学性质的初步研究[J].华中农业大学学报,2008,27(5):
621–624.