

超声波对红曲菌的诱变筛选及发酵过程在线处理

杨胜利^{1*} 王金字² 杨海麟¹ 王 武¹

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)¹

(内蒙古鄂伦春自治旗讷尔克气农业技术推广学校 鄂伦春 022476)²

摘要:以红曲菌为出发株,经超声波诱变,获得一株高产菌株,并对该菌株在液态深层发酵过程中,进行超声波在线处理,结果表明:红曲色素和 Monacolin K 的产量都有明显提高,分别达 29.74% 和 39.96%。

关键词:超声波,红曲,发酵

中图分类号: Q 681 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0045-05

* 联系人 E-mail: yangshengli01@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-11-27, 修回日期: 2003-01-13

THE ULTRASONIC SCREENING OF *MONASCUS* SP. MUTANTS AND THE TREATMENT WITH ON LINE ULTRASONIC DURING FERMENTATION

YANG Sheng-li¹ WANG Jin-Yu² YANG Hai-Lin¹ WANG Wu¹

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University; Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Jiangsu, Wuxi 214036)¹ (The Inner Mongolia Autonomous Region Elunchun autonomous county, Nerkeqi Popularize School of Agricultural technology, Inner Mongolia, Elunchun 022476)²

Abstract: The train *monascus* sp. was chosen as the start strain for mutagenic treatments with Ultrasonic wave. After the mutagenic treatments high mutant was obtained. And fermentation liquid was treated with on line ultrasonic during deep submerged fermentation. The results indicate that the *Monascus* pigment and Monacolin K content of the mutant is higher than that of the parent strain. Numerical value reached 29.74% and 39.96% respectively.

Key words: Ultrasonic, *Monascus* sp., Fermentation

红曲色素是一种优良的天然食用色素,是迄今公认的对人畜无害的微生物色素,有热稳定性好、蛋白着色力强、色调柔和、对 pH 稳定等特点^[1]。其生产原料价格便宜且来源丰富,可通过固体和液体在短周期内大量生产,固态发酵法生产因其生产周期长、工艺繁杂、劳动强度大、原料利用率低、生产中易染菌且产品应用范围窄而不适宜大规模工业化生产。进行红曲色素大规模工业化生产出路在于液态深层发酵,但深层液态发酵目前仍没有成功地进行稳定而大规模的工业化生产的重要原因之一是发酵色价偏低,生产成本高,商业上难以推广。近年来,随着科学技术水平的提高,以及人们对传统中药的日益重视,红曲的药用价值也越来越受到人们的关注。日本学者远藤章首先在红曲霉菌中先后发现 HMG—CoA 还原酶抑制剂 Monacolin K L、X、J, 和 Dihydromevinolin 和 Dihydromevinolin L 的存在^[2~4],并证明其具有降血脂的功效。自此之后,国内过去生产红曲色素的厂家都渴望能够生产 Monacolin K,增加产品种类、提高经济效益。鉴于此,选育出一株高产色素和降脂成分的红曲霉,或用其他生物学手段提高其产量,是目前红曲科技工作者的重要使命。

超声波具有很强的生物学效应,其机理很复杂,主要就是空化作用,是指在声波作用下,存在于液体中的微小气泡(汽泡或空穴)所发生的一系列动力学过程:振荡、扩大、收缩乃至崩溃。空化泡绝热收缩至崩溃瞬间,泡内可呈现5,000℃以上的高温 and 几千个大气压,并伴有强大的冲击波或射流等^[5],这足可以改变细胞的壁膜结构,使细胞内外发生物质交换,甚至是发生突变。超声波作用于工业微生物并产生生物学效应已有很多报导^[6~9]。我们对红曲菌种进行超声波诱变,并在液态深层发酵过程中,对其进行超声波处理,均收到良好效果。采用这种传统的生物物理学方法,不但生产出的产品安全无毒副作用,而且可以提高红曲霉菌色价和 Monacolin K 的产量。

1 材料与方法

1.1 菌种

红曲菌购于中国科学院微生物研究所。

1.2 培养基及培养条件

麦芽汁琼脂斜面培养基:葡萄糖 1%,酵母膏 0.3%,麦芽汁粉 0.2%,蛋白胨

0.3%, 琼脂 2%, pH6.0, 灭菌, 接种后 30℃ 黑暗中培养 6d。

种子培养基: 葡萄糖 70g, 蛋白胨 30g, 硝酸钠 2g, MgSO_4 1g, 消泡剂 1~2 滴, 定容至 1L, pH 自然。

发酵培养基: 葡萄糖 60g, NaNO_3 2.5g, KH_2PO_4 2.5g, MgSO_4 0.5g, 定容至 1L, pH5.0。

1.3 菌种超声波驯化和筛选

1.3.1 红曲菌悬浮液的制备: 将出发菌株接种于斜面培养基上, 30℃ 黑暗培养 6d, 取 5mL 无菌生理盐水加入斜面培养基上, 洗下菌落, 倒入带有玻璃珠无菌三角瓶中, 振荡 20min, 用带有脱脂棉的漏斗过滤即得菌体悬浮液。

1.3.2 超声波驯化: 取菌体悬浮液 30mL 在 20kHz, 200W, 工作电压 200V 的超声条件照射 10min, 按 10 倍稀释法稀释, 取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 3 个稀释度 0.1mL 涂布于平板上, 培养 6d, 挑生长良好的单菌落扩大培养, 重复上述操作至第 6 代。

1.4 菌丝体常规培养

将母种接入基础培养基中, 30℃、200r/min 培养 2d, 按 5% 的接种量转入发酵培养基中, 发酵 7d 结束, 测定菌丝体干重、色价和 Monacolin K 的含量。

1.5 超声波处理

用 20kHz, 200W, 工作电压 200V 条件照射, 按照不同超声作用时间 (20min, 10min, 5min, 2min, 1min, 30s, 10s, 5s) 平行 3 份培养, 每隔 8h 作用 1 次, 培养 1 周后采集样品, 待分析测定。

2 分析测定

2.1 菌体干重的测定

发酵完毕后, 取 10mL 充分震荡均匀的发酵液, 加入 10mL 乙醇, 于 30℃ 下浸出 24h, 过滤, 滤渣用 50% 的乙醇溶液洗涤两次, 然后在 80℃ 烘干 24h, 称重, 得到 10mL 发酵液含干菌体重 W_1 , 然后换算成每升发酵液中干菌重: $W_1 \times 100$ (g/L)。

2.2 发酵色素的测定^[10]

2.2.1 胞外黄色素的测定: 取一瓶发酵液, 用蒸馏水定容至 75mL, 摇匀后取 10mL 发酵液, 用定性滤纸过滤, 以未添加种子的培养基滤液作为空白, 然后用 1cm 的比色皿测定滤液在 410nm 处的 OD 值 (U/mL)。

2.2.2 胞外红色素的测定: 处理方法同黄色素的测定, 但测定的波长为 510nm。

2.2.3 胞内黄色素的测定: 取一瓶发酵液, 用蒸馏水定容至 75mL, 摇匀后取 10mL 发酵液, 用定性滤纸过滤, 蒸馏水洗涤滤渣 2 次, 将滤渣移至 250mL 三角瓶中, 加 10mL 75% 乙醇溶液, 30℃ 保温萃取 24h 后过滤, 再用 75% 乙醇溶液洗涤残渣 2 次, 将滤液用 75% 乙醇溶液定容至 50mL 后测在波长 410nm 处的 OD 值, 将此值乘以稀释倍数 5 后得胞内黄色素色价 (U/mL)。

2.2.4 胞内红色素的测定: 方法同胞内黄色素的测定, 但测定波长为 510nm 处的值 (U/mL)。

2.3 Monacolin K 含量测定

2.3.1 色谱条件: HP1100 液相色谱仪; 色谱柱: C18, 250mm × 4.6mm, 粒径 5μm; 流动

相: 乙腈/0.1%磷酸 = 65/35 (V/V), 流速 1.0mL/min, 检测波长 238 nm, 进样量为 20 μ L。

2.3.2 Monacolin K 含量测定: 将发酵液离心, 上清液用 6mol/mL 盐酸酸化至 pH3, 以等量乙酸乙酯充分抽提 2 次, 抽提液用 5% NaHCO₃ 洗涤, 经无水硫酸钠干燥后, 于 50℃ 减压浓缩, 获得的残渣溶于甲醇, 经 0.45 μ m 滤膜过滤后上柱测样。

3 结果与分析

3.1 菌种筛选

按照 1.3.2 的方法驯化 6 代, 驯化菌株分别编号为 1、2、3、4、5、6, 未经驯化的编号为 CK。将其进行培养, 重复 3 次所得的结果一致, 现做一比较。如表 1, 2, 3。

表 1 经超声驯化的菌种与未经驯化的菌体干重比较

菌株	菌体干重 (g/L)			Ti	\bar{T}_i	对 CK 的 %
	I	II	III			
CK	1.34	1.37	1.37	4.08	1.36	100
1	0.98	1.24	1.17	3.39	1.13	83.09
2	1.14	1.25	1.22	3.61	1.20	88.24
3	1.23	1.26	1.26	3.75	1.25	91.91
4	1.26	1.31	1.30	3.87	1.29	94.85
5	1.31	1.37	1.31	3.99	1.33	97.79
6	1.35	1.36	1.32	4.03	1.34	98.53

表 2 经超声驯化的菌种与未经驯化的色价比较

菌株	色价 (总) (μ /mL)			Ti	\bar{T}_i	对 CK 的 %
	I	II	III			
CK	58.73	66.24	64.09	189.06	63.02	100
1	65.81	63.57	72.79	202.17	67.39	106.93
2	76.72	71.36	75.87	223.95	74.65	118.45
3	72.89	79.24	81.06	233.73	77.91	123.63
4	79.33	81.42	77.89	238.62	79.54	126.21
5	83.01	79.76	85.27	248.04	82.68	131.20
6	82.26	80.49	81.84	244.59	81.53	129.37

表 3 经超声驯化的菌种与未经驯化的 Monacolin K 产量比较

菌株	Monacolin K 含量 (μ /mL)			Ti	\bar{T}_i	对 CK 的 %
	I	II	III			
CK	5.22	5.36	5.26	15.84	5.28	100
1	4.93	5.34	5.45	15.72	5.24	99.24
2	6.28	5.76	6.36	18.40	6.13	116.16
3	6.52	6.52	6.43	19.47	6.49	122.92
4	7.04	6.99	6.72	20.75	6.92	131.06
5	7.33	7.52	7.26	22.11	7.37	139.58
6	7.36	7.41	7.44	22.21	7.40	140.15

表 1, 2, 3 结果表明, 经超声波驯化的菌种, 进行培养, 其菌丝体生长受到一定的限制, 虽是如此, 色价和 Monacolin K 产量都有大幅度提高。第 5、6 代菌种进行培养, 所得数据表明, 菌丝生长和常规培养基本一致, 说明菌体生长稳定, 且产量提高幅度最大, 分别提高 30% 和 40% 左右。以下超声培养实验都以第 5 代为菌种。由于第 6 代和第 5 代数据基本一致, 所以没必要再进一步驯化。

3.2 超声波作用起始时间的确定

红曲菌和其他微生物一样, 其生长同样分为 4 个时期, 即迟滞期、对数生长期、平衡期及衰老期。因此在不同时期对其进行照射, 会有截然不同的效果, 为了确定最佳照射起始时间, 我们选取几个有代表性的点作为起始照射时间, 超声培养后取样测定, 经多次实验, 重现性良好, 得结果如表 4 所示。

表 4 超声波作用起始时间对色价和 Monacolin K 产量的影响

超声波作用起始时间 (h)	CK	24	48	72	96	120	144
菌体干重 (g/L)	1.36	1.17	1.25	1.34	1.33	1.34	1.32
菌体相对干重 (%)	100	86.03	91.91	98.53	97.79	98.53	97.06
色价 (总) ($\mu\text{g/mL}$)	63.02	56.21	71.30	81.76	79.63	75.45	70.19
相对色价 (总) (%)	100	89.19	113.14	129.74	126.36	119.73	111.38
Monacolin K 含量 ($\mu\text{g/mL}$)	5.28	3.94	5.83	7.39	7.10	6.55	5.62
Monacolin K 相对含量 (%)	100	74.62	110.42	139.96	134.47	124.05	106.44

由表 4 可以看出, 在细胞迟滞期加以超声波照射, 对菌丝体生长有所限制, 直接导致色价和 Monacolin K 产量降低, 说明此时照射细胞大量死亡。在对数生长期对细胞生长影响不大, 而且色价和 Monacolin K 产量都有大幅度提高, 分别达 29.74% 和 39.96%。到稳定期和衰退期照射都会使色价和 Monacolin K 产量降低, 此时产色素和 Monacolin K 的高峰期已过, 并且细胞的活性降低, 超声刺激不能达到更好的效果。

4 讨论

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。正常情况下红曲菌落呈团状, 不利于对氧和营养物质吸收, 也不利于代谢物质分泌。采用超声波处理可以使菌丝体分散, 甚至是游离的单菌体, 克服了对菌体生产及色素生成的限制, 从而有利于菌体的代谢和产物量的提高。同时超声波处理可以使发酵液粘度降低, 物质混合均匀, 有利于氧气及营养物质的传递, 更重要的是便于色素的分离和提取。适当的超声波强度可以改变细胞的壁膜结构, 使细胞内外发生物质交换, 促进其色素的产生和分泌。也可能在超声波作用下, 膜内的流体静压力足够诱导细胞膜机械破裂, 从而加速色素的产生和分泌。或许二者兼而有之。

参考文献

- [1] 文东旭. 广西化工, 1990, (3): 27~35.
- [2] Endo A. J Antibiotics, 1979, 32 (8): 852~854.
- [3] Endo A, Hasuimik, Neishis. J Antibiotics, 1985, 38 (3): 420~422.
- [4] Endo A, Hasuimik, Nakmurat, et al. J Antibiotics, 1985, 38 (3): 321~327.
- [5] 袁易全, 陈思忠. 近代超声原理与应用. 南京: 南京大学出版社, 1996, 134.
- [6] Jeong Y K, Sung O P, Bong-S N. Food Science and Biotechnology, 2000, 9 (2): 124~129.
- [7] Cowan S E, Black-J, Keasling J D, et al. Analytical-Chemistry; 1999 71 (16): 3622~3625.
- [8] Perez-C G, Congregado F, Bou J J, et al. Biotechnology-and-Bioengineering, 1999, 63 (1): 110~115.
- [9] Wood B E, Aldrich H C. 1997, 13 (3): 232~237.
- [10] 张本权, 张亮琦, 淡家林. 食品与发酵工业, 1985, (6): 34~37.