

产红色素真菌 *Monascus sanguineus* 的液态发酵条件研究何亚涛<sup>1</sup>,刘俊林<sup>1</sup>,郑青波<sup>1</sup>,柳玉瑛<sup>1</sup>,罗琨映<sup>2</sup>,高丹丹<sup>1\*</sup><sup>1</sup>西北民族大学生命科学与工程学院;<sup>2</sup>西北民族大学化工学院,兰州 730124

**摘要:**从药用植物地黄中分离出一株产红色素内生真菌 RJL03 (*Monascus sanguineus*),为进一步提高菌株 RJL03 的红色素产量,采用响应面法(RSM)对其液态摇瓶发酵条件进行研究。在单因素实验的基础上,以发酵液 OD 值为指标,利用 Box-Behnken 中心组合实验设计原理(BBD)优化菌株液态发酵产红色素的工艺条件。结果显示,该色素发酵液在 474 nm 处有最大吸收波长,最佳发酵工艺为温度 30 ℃、装瓶量 67%、初始 pH 自然(7)。在此条件下液态发酵菌株,显著提高了菌株 RJL03 的红色素产量。

**关键词:**地黄;内生真菌;红色素;液态发酵;红曲霉;*Monascus sanguineus*

中图分类号:Q939.97

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.3.016

## Optimization of Flask Fermentation Conditions for the Production of Red Pigment from *Monascus sanguineus*

HE Ya-tao<sup>1</sup>, LIU Jun-lin<sup>1</sup>, ZHENG Qing-bo<sup>1</sup>, LIU Yu-ying<sup>1</sup>, LUO Kun-Ying<sup>2</sup>, GAO Dan-dan<sup>1\*</sup><sup>1</sup>College of life science and Engineering;<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China

**Abstract:** A strain of red pigment fungi RJL03 (*Monascus sanguineus*) was isolated from the medicinal plant *Rehmannia glutinosa* Libosch by tissue block separation method. *Monascus sanguineus* was identified according to morphological characteristics and rDNA ITS1-5.8S-ITS2 sequence analysis. Response Surface Methodology (RSM) was used to further improve the red pigment yield of RJL03 strain. On the basis of single factor tests, the strain was fermentation process of the liquid shake flask by using the Box-Behnken design (BBD), with the optical density of the fermentation broth as an index. The experiment manifests that the fermentation broth of pigment has its maximal absorption wavelength at 474 nm. The optimum fermentation conditions were as follows: temperature 30 ℃, bottling volume 67%, initial pH natural (7). After the fermentation of the strain, optimization by RSM significantly increased the yield of the target strain.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa*; endophytic fungi; red pigment; flask fermentation; *Monascus*; *Monascus sanguineus*

食用色素是食品工业中不可缺少的添加剂,包括天然色素和合成色素,但由于合成色素所具有的毒副作用,使得大家更为重视安全性高,并具有一定药理作用的天然色素<sup>[1]</sup>。目前我国的天然色素主要来源于植物,具有产量有限且生产受季节、气候、产地等因素影响的缺点,而利用微生物发酵生产天然色素可以解决上述问题并且易于工业化生产<sup>[2]</sup>。

红曲霉属(*Monascus* spp.)由 Van Tieghem 于 1884 年建立<sup>[3]</sup>,真菌 *Monascus sanguineus* 在 1995 年被分离于伊拉克的阿拉伯河(Shatt-al-Arab River, Iraq)<sup>[4]</sup>。红曲霉菌在生长代谢过程中产生天然的

红曲色素,红曲色素具有着色、防腐、保健和药用等价值,是安全性最高的食用色素之一,应用历史悠久,广泛地被用于食品、饲料和医药等领域<sup>[5]</sup>。传统的红曲色素生产方式为固态发酵,但固态发酵具有不利于大规模工业化生产等缺点,因此红曲霉菌的液态发酵近年来成为了研究热点<sup>[6-8]</sup>。

内生真菌由于长期与宿主存在共生关系,导致其功能和活性有别于其它环境中的微生物<sup>[9,10]</sup>。有研究表明药用植物地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)内生菌及其代谢产物具有抑菌、促生等活性作用<sup>[10]</sup>。本研究采用响应面法对从药用植物地黄中选育的产红曲色素菌株血红红曲霉 RJL03 (*Monascus sanguineus*)液态发酵条件进行研究,旨在优化得到 RJL03 液态摇瓶发酵产红色素的最佳条件,提高红曲色素产量,为红曲霉的液态深层发酵研究提供理论参考。

收稿日期:2017-09-14 接受日期:2017-11-02

基金项目:西北民族大学中央高校基本科研业务费(Z17001,31920170178);西北民族大学“双一流引导专项”生物工程特色学科建设(10018704);甘肃省科技计划(1504WKCA094);科技部援助项目(KY201501005)

\*通信作者 Tel:86-9314512903;E-mail:gaodan0322@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

菌种血红红曲霉 RJL03 (*Monascus sanguineus*), 由西北民族大学生命科学与工程学院选育保存<sup>[11]</sup>; 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司;自制马铃薯葡萄糖液体(PDB)培养基<sup>[12]</sup>;葡萄糖、琼脂粉等试剂均为分析纯。

UV-1800 紫外可见分光光度计,日本岛津公司;MaxQ436 大型落地式恒温摇床,美国 Thermofisher 公司;HWS 型智能恒温恒湿箱,宁波东南仪器有限公司;BME 生物显微镜,上海 LEICA 显微系统有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 红曲色素发酵液检测波长的选择

由于天然色素提取物中存在着大量非色素成分,故采用中国食品添加剂标准,用 OD 值表示<sup>[13]</sup>。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素与水平编码

Table 1 Box-Behnken experimental design factor and level code

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A 温度(℃) Temperature	28	32	36
B 装瓶量(%) Bottling volume	60	70	80
C 初始 pH Initial pH	6	7	8

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 RJL03 形态学特征

PDA 培养基上,RJL03 菌落初为白色,后变为深褐色,绒毡状,5 d 后在 PDA 培养基上直径达到 3 ~

取适量发酵好的 RJL03 菌株发酵液,过滤,离心后扫描其在 375 ~ 650 nm 范围内紫外可见光谱。

#### 1.2.2 液态摇瓶发酵单因素实验

采用 50 mL 锥形瓶,每瓶接种一个生长 10 d,直径为 1 cm 的菌饼,转速 110 rpm 发酵 7 d。控制以下三种不同的发酵条件进行发酵培养,以 OD 值为指标,考察不同发酵因素对发酵效果的影响。保持发酵温度 37 ℃,初始 pH 自然,控制不同的装瓶量(50、60、70、80、90%);保持装瓶量 80%,初始 pH 自然,控制不同的发酵温度(25、28、30、33、37 ℃);保持发酵温度 37 ℃,装瓶量 80%,控制不同的初始 pH 值(5、6、7、8、9)。(配制好的发酵培养液初始 pH 在不调节的自然条件下,pH 值 7 ± 0.14)。

#### 1.2.3 响应面法菌株液态发酵实验设计

在单因素实验基础上,以温度(A)、装瓶量(B)、初始 pH(C)为考察因素,依照 Box-Behnken 中心组合实验设计原理设计实验,每因素设 3 个水平,用代码值-1,0,1 表示,因素水平见表 1。

5 cm,可溶性红色素存在于培养基中,如图 1(A)。菌丝分枝,分隔;分生孢子梨形,单生或成短链状,7 ~ 14 μm;孢子囊圆球形,外壳褐色,直径 25 ~ 60 μm;孢子梗菌丝状,子囊孢子椭圆形,表面平滑,无色或红色,如图 1(B-D)。

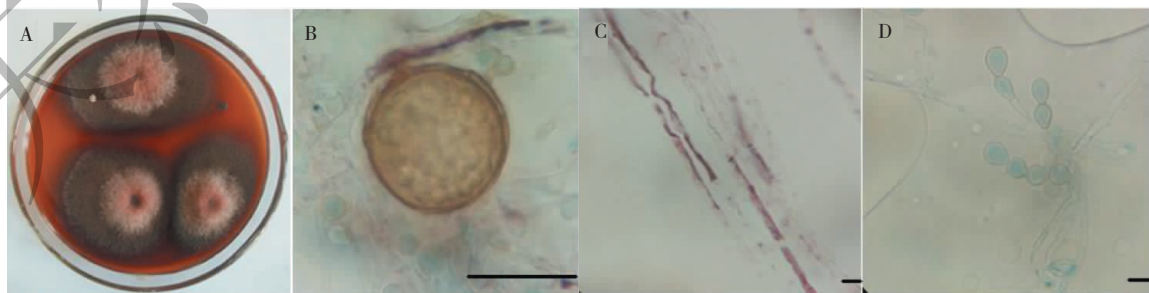


图 1 RJL03 菌株的菌落及形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of strain RJL03

A. 菌落正面;B. 孢子囊;C. 菌丝;D. 分生孢子梗及分生孢子(20 μm)

A. Reverse of colonies of RJL03; B. Sporangium; C. Mycelium; D. Conidiophore and conidium (Bar = 20 μm)

## 2.2 红色素发酵液检测波长的确定

如图2所示,4条曲线由高到底依次是稀释过1、2、4、8倍的发酵液OD值曲线。图中有两个吸收峰,400 nm处的黄色素吸收峰和474 nm处的红色素吸收峰。由图可知此菌株的红色素和黄色素的发酵液特征吸收峰与已经报道的一般红曲色素检测中常用的410、415 nm(黄色调特征吸收),465 nm(橙色调特征吸收),500、505、510 nm(红色调特征吸收)波长有所出入<sup>[14-16]</sup>,这可能与不同菌株之间的色素性质不同或发酵液成分不单一有关。Rashmi D在对分离自石榴(pomegranate)的野生型 *M. sanguineus* 菌株进行不同条件下红色素产量的研究时采用波长510 nm的特征吸收峰<sup>[17]</sup>。由于本实验发酵液外观为红色,故选择接近红色波长范围的474 nm处吸收峰值作为检测波长。

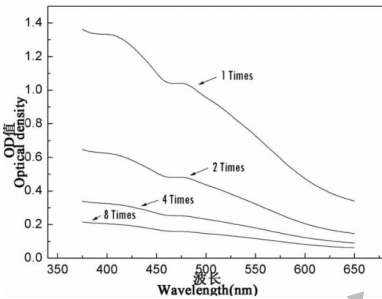


图2 RJL03 菌株发酵液紫外-可见光吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of fermentation broth from RJL03

## 2.3 单因素实验结果

### 2.3.1 发酵温度对发酵效果的影响

结果见图3(A),控制温度在25~30℃之间时,发酵效果与发酵温度呈正相关。在30~37℃之间,随温度升高,发酵效果反而有所下降。可知,温度过高不利于此菌株发酵,30℃时为此菌株的最佳发酵温度。温度这一因素对菌株发酵的影响主要表现

在:影响酶活性、细胞质的流动性、物质的溶解度等<sup>[18]</sup>。此菌株单因素实验结果显示,该菌株在30℃色素生成量较高,但该菌株与一般的红曲菌相比,其嗜温特性并不十分明显。

### 2.3.2 装瓶量对发酵效果的影响

由于红曲菌本身为好氧真菌,装瓶量是影响液态发酵的一个重要因素<sup>[8]</sup>,结果见图3(B),装瓶量在50%~70%时,发酵效果随装瓶量的增加而增加,在70%时发酵效果最优,超过70%发酵效果变差。装瓶量主要影响瓶内的溶氧量,氧气通过影响微生物的代谢反应,影响发酵效果。可见该菌株在本实验条件下液态发酵时可以适应较大的装瓶量,但本研究单个实验的发酵量较小,发酵时间较短,得出的装瓶量结果可能并不十分准确,进一步还需进行扩大培养的研究。

### 2.3.3 初始 pH 对发酵效果的影响

结果见图3(C),RJL03 适宜在偏中性环境下生长,与已经报道的红曲菌具有嗜酸特性的结果有所出入。Rashmi D在关于 *M. sanguineus* 作为天然红色素潜在来源进行探索的研究中发现, *M. sanguineus* 可以在 pH 值 4.5~8.5 条件下存活,在 pH 4.5 下有最大的生物量,在 pH 6.5 附近有最大的色素产率<sup>[17]</sup>。pH 主要通过影响菌株体内的酶促反应,影响发酵效果。本实验在初始 pH 为 7 时,发酵效果最好,而在过酸过碱条件下发酵效果较差。由于在菌株发酵过程中,随着发酵时间的增长,发酵液的 pH 也会发生变化,且本实验发酵时间较短,在发酵完成后,测定发酵后发酵液的 pH 值,发现发酵前后变化不是很大。若发酵时间过长,则应在一定时间内人为调节发酵液的 pH 值。综合考虑,采用 pH 为自然的培养液来发酵菌株,即配好的培养液对 pH 不加调节。

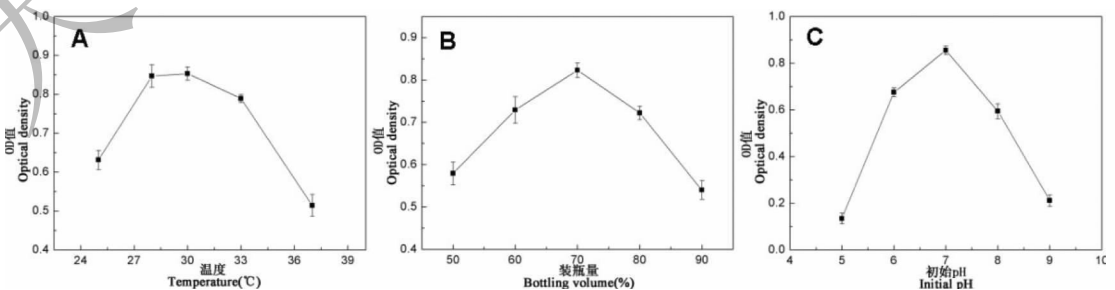


图3 发酵温度(A)、装瓶量(B)及初始 pH(C)对发酵效果的影响

Fig. 3 Effect of temperature (A), bottling volume (B) and initial pH (C) on the hyphae of fermentation broth efficiency

## 2.4 响应面法优化实验

软件 Box-Behnken 中心组合实验设计原理安排并完成实验,实验结果见表 2。

### 2.4.1 回归模型的建立及显著性检验

根据单因素实验结果,利用 Design-Expert 8.0

表 2 Box-Behnken 响应面实验设计与结果

Table 2 Box-Behnken response surface experimental design and result

实验序号 No.	A	B	C	OD 值 Optical density
1	-1	-1	0	0.757
2	1	-1	0	0.621
3	-1	1	0	0.659
4	1	1	0	0.535
5	-1	0	-1	0.601
6	1	0	-1	0.501
7	-1	0	1	0.655
8	1	0	1	0.632
9	0	-1	-1	0.688
10	0	1	-1	0.629
11	0	-1	1	0.776
12	0	1	1	0.655
13	0	0	0	0.788
14	0	0	0	0.838
15	0	0	0	0.799
16	0	0	0	0.827
17	0	0	0	0.822

表 2 中给出了 17 组实验数据,根据表 2 的实验数据,利用 Design-expert8.0 软件对实验数据进行方差分析和二次回归拟合,得出回归拟合方程。Y 即 OD 值(发酵效果) = + 0.81 - 0.048A - 0.045B + 0.037C + 3.000E-003AB + 0.019AC - 0.016BC + 0.13A<sup>2</sup> - 0.041B<sup>2</sup> - 0.087C<sup>2</sup>

对上述回归模型进行方差分析,见表 3,由表可

知,本实验所选模型的  $P < 0.01$ ,说明此回归方程在描述响应值与各因子之间的关系时,其全体自变量与因变量之间的线性关系极为显著,表明该方法非常可靠<sup>[19]</sup>,适合液态发酵菌株。失拟项为  $P = 0.2162 (P > 0.05)$ ,因此失拟项不显著。模型的相关系数  $R^2 = 0.9731$ ,说明模型可靠性较好,97.31% 的实验数据也与模型一致,表明该模型在统计学上

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源 Sources of variance	自由度 Degrees of freedom	平方和 Sum of squares	均方 The mean square	F 值 F	P 值 P	显著性 Significant
模型 Model	9	0.17	0.019	28.15	0.0001	**
残差 Residual	7	4.685E-003	6.693E-004			
失拟项 Loss of quasi item	3	2.978E-003	9.927E-004	2.33	0.2162	
误差项 Error term	4	1.707E-003	4.267E-004			
总和 Sum	16	0.17				

$R^2 = 0.9731, R^2_{Adj} = 0.9385, C. V. \% = 3.73$

是合理的,响应值与预测值之间的拟合程度良好,实验所存在的误差较小,这进一步表明了该模型可以较好的反应各变量与响应值之间的关系,因此该模型可以用来预测菌株 RJL03 液态发酵效果<sup>[20]</sup>。

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性,由 F 检验来判断,概率  $P$  的值越小,相应的变

量显著程度就越高。从表 4 可知,用上述回归方程描述各因素中一次项 A、B、C 均是显著的,影响菌株 RJL03 发酵效果的因素主次顺序为 A(温度) > B(装瓶量) > C(初始 pH),所有交互项的  $P$  值均大于 0.05,说明各因素的交互作用不显著。

表 4 回归方程系数显著性分析

Table 4 Analysis of the significant coefficients of regression equation

方差来源 Sources of variance	自由度 Degrees of freedom	平方和 Sum of squares	均方 The mean square	F 值 F	$p$ 值 $p$	显著性 Significant
A	1	0.018	0.029	27.40	0.0012	*
B	1	0.017	0.017	0.085	0.0016	*
C	1	0.011	0.020	131.80	0.0047	*
AB	1	3.600E-005	3.600E-005	2.60	0.8232	
AC	1	1.482E-003	1.323E-004	4.98	0.1803	
BC	1	9.610E-004	9.610E-004	0.83	0.2698	

注: \* 显著( $P < 0.05$ ), \*\* 极显著( $P < 0.01$ )。

Note: \* Significant ( $P < 0.05$ ), \*\* Very significant ( $P < 0.01$ ).

#### 2.4.2 回归模型的验证实验

软件预测最优提取条件为发酵温度 30.742 °C,装瓶量 67.223%,初始 pH 6.841。结合实际情况确定 RJL03 中红色素发酵工艺参数为发酵温度 30 °C,装瓶量 67%,初始 pH 自然(7)。据此参数进行验证实验,得到的 OD 值为 0.827 与预测值 0.819 较为接近,说明模型较为准确可靠。优化发酵条件前

OD 值为 0.642,优化后 OD 值可比优化前提高约 28.8%,说明经过 RSM 优化后菌株 RJL03 的红色素产量得到了显著提高。

#### 2.4.3 响应面图分析

由回归方程绘制出响应面分析图,如图 4,该图直观的反映出了各因子间的交互作用,可以看出本实验中各因子间的交互作用并不显著,故不作详细研究。

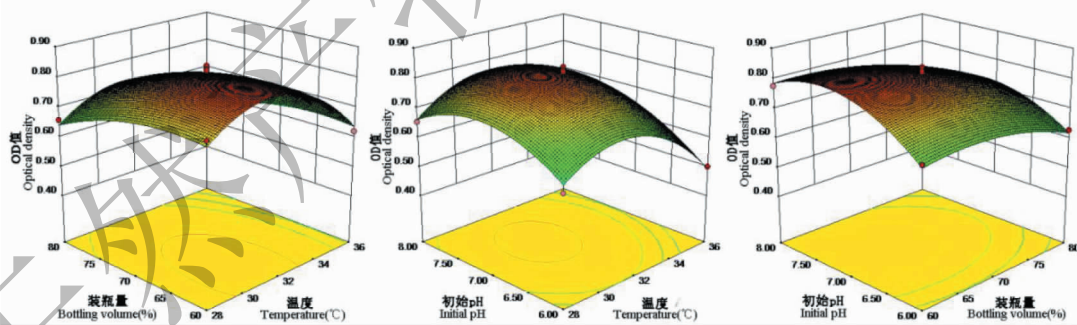


图 4 不同发酵因素对红色素发酵效果的相互作用响应面图

Fig. 4 Response surface plots showing interactive effects of different fermentation factors on the efficiency of the red pigment fermentation

### 3 结论

本研究在实验室水平对产天然红色素真菌菌株 RJL03 (*Monascus sanguineus*) 进行了较为初步的液态发酵,优化得到的发酵工艺参数为发酵温度 30 °C,装瓶量 67%,初始 pH 自然(7)。采用优化后的实

验参数进行实验,菌株 RJL03 的红色素产量得到了显著提高,为红曲霉属菌种 *M. sanguineus* 作为天然红色素潜在来源奠定了理论和实验基础。

#### 参考文献

- Li CY (李春燕), Mou X (牟希), Zhang Y (张媛), et al.

- The identification of prodigiosin family red pigment producing bacterium and characterization of the red pigment [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2017, 1: 1-6.
- 2 Wang J (王君), Zhang BS (张宝善). Research progress on natural pigments produced by microorganisms [J]. *Microbiol China* (微生物学通报), 2007, 34: 580-583.
  - 3 Tieghem MPV. *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycètes [J]. *Bulletin De La Société Botanique De France*, 1884, 31: 226-231.
  - 4 Cannon PF, Abdullah SK, Abbas BA. Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus [J]. *Mycol Res*, 1995, 99: 659-662.
  - 5 Chen W, He Y, Zhou Y, et al. Edible filamentous fungi from the Species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics [J]. *Comprehen Rev Food Sci Food Safety*, 2015, 14: 555-567.
  - 6 Yang XJ (杨晓君), Yang CL (杨成龙), He ZG (何志刚), et al. Advances in studies of monascus submerged culture [J]. *Fujian J Agric Sci* (福建农业学报), 2010, 25: 796-800.
  - 7 Liu DH (刘德华), Liu DX (刘代喜), Ding HY (丁海洋), et al. Liquid-state fermentation conditions for monascus pigments production by *Monascus purpureus* JR [J]. *China Brew* (中国酿造), 2010, 29(5): 59-61.
  - 8 Zhang R (张锐). Optimization of production condition of monascus pigment by *Monascus purpureus* in liquid state fermentation [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2015, 31: 187-195.
  - 9 Qiu M, Xie RS, Shi Y, et al. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26: 993-998.
  - 10 Yang QX (杨清香), Xie YS (谢永生), Zhang H (张昊), et al. Isolation, identification and antagonism on microorganisms and cancer cells by active endophytes from *Rehmannia glutinosa* Libosch [J]. *Microbiol China* (微生物学通报), 2010, 37: 1467-1474.
  - 11 He YT (何亚涛), Gao DD (高丹丹), Zheng TL (郑田留), et al. Isolation and the optimization of red pigment extraction from *Monascus sanguineus* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1952-1958.
  - 12 Shen P (沈萍). *Microbiology experiment* (微生物学实验) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2016: 242.
  - 13 Wang QB (王清滨), Chen GL (陈国良). *Food colorants and their analytical methods* (食品着色剂及其分析方法) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 58.
  - 14 Rashmi D, Padmavathi T. Statistical optimization of pigment production by *Monascus sanguineus* under stress condition [J]. *Preparat Biochem Biotechnol*, 2014, 44: 68-79.
  - 15 Niu GQ (牛国强). Study on fermentation and recovery of natural orange/ yellow pigments by *Monascus* [D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2015.
  - 16 Cui L (崔莉), Zhang PZ (张培正), Sun AD (孙爱东). Effects of ultrasonic assist on extraction of *Monascus* pigments [J]. *Trans CSAE* (农业工程学报), 2009, s1: 159-163.
  - 17 Rashmi D, Padmavathi T. Exploring *Monascus sanguineus* as a potential natural source for pigment production [J]. *Int Res J Biol Sci*, 2013, 2(5): 59-67.
  - 18 Shen P (沈萍). *Microbiology* (微生物学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2016: 138-142.
  - 19 Zhang HR (张海容), Liu J (刘娟), Wei ZY (魏增云). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharide from *Radix Rubiae* by response surface methodology [J]. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2015, 37: 2321-2325.
  - 20 Gao DD (高丹丹), Yang LL (杨璐璐), Qi GZ (祁高展). Optimization of extraction conditions of polysaccharide from *Potentilla anserina* by response surface methodology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1099-1104.

(上接第 424 页)

- 15 Yang CY (杨翠云), Liu YD (刘永定). Evaluation of MTT Method for quantification of microbial cell viability in microplates [J]. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2009: 577-580.
- 16 Chen JS (陈家盛), Wu H (吴华), Cao Y (曹蕴). Effect of nitric oxide (NO) on TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 in rat with inflammation [J]. *Mod J Integr Tradit ChinWest Med* (现代中西医结合杂志), 2013: 2294-2296.
- 17 Wang LJ (王利津), Xu Q (徐强). Mechanism of anti-inflammatory action of Huanglian Jiedu decoction a traditional Chinese Prescription [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中国中药杂志), 2000, 25: 493.
- 18 Lv GH (吕冠华), Wang CH (王长洪), Wang LX (王立新), et al. Study on effects of rhubarb and its compound on pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Chin J Tradit Med Sci Tech* (中国中医药科技), 2009: 265-267.
- 19 Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, et al. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications [J]. *Curr Drug Targets: Inflammation Allergy*, 2002, 1: 393-403.