

# 红曲霉 JR 发酵动力学模型的建立

程新<sup>1</sup>, 夏海林<sup>1</sup>, 黄林<sup>1</sup>, 涂晓嵘<sup>1</sup>, 李昆太<sup>1,2\*</sup>

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045; 2. 南昌市发酵应用技术重点实验室, 江西 南昌 330045)

**摘要:**对红曲霉 JR 摇瓶分批补料发酵产红曲色素的发酵动力学进行研究, 并通过 Origin 7.5 软件分析得出菌体生长、产物合成与基质消耗的动力学模型。将模型预测值与实验值进行比较, 结果表明: 所建立模型能较好地反映红曲霉 JR 分批补料发酵过程。

**关键词:**红曲霉 JR; 红曲色素; 发酵动力学; 数学模型

**中图分类号:** Q811.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)03 - 0590 - 05

## Kinetic Study of Fed - batch Fermentation for Monascus Pigment Production by *Monascus purpureus* JR

CHENG Xin<sup>1</sup>, XIA Hai-lin<sup>1</sup>, HUANG Lin<sup>1</sup>, TU Xiao-rong<sup>1</sup>, LI Kun-tai<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Biological Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Nanchang Key Laboratory of Applied Fermentation Technology, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The kinetic models of *Monascus purpureus* JR shake - flask fed - batch fermentation for cell growth, monascus pigment content and total sugar consumption were studied. The parameters were obtained with nonlinear curve fit by Origin 7.5. And the good agreement of predicted values with the experimental results showed that the kinetic models could provide reasonable descriptions for the process of monascus pigment fed - batch fermentation.

**Key words:** *Monascus purpureus* JR; monascus pigments; fermentation kinetics; mathematical models

红曲色素是红曲霉 (*Monascus* sp.) 在生长代谢过程中产生的多种天然色素的混合物, 主要包括呈红色的红曲玉红素 (monascorubramine) 和红斑红曲素 (rubropunctamine)、呈橙色的红曲玉红胺 (monascorubrin) 和红曲斑红胺 (rubropunctatin), 以及呈黄色的安卡红曲黄素 (ankaflavin) 和红曲素 (monascin)<sup>[1]</sup>。此外, 红曲霉也能产生多种具有生理功能的活性物质, 如降低胆固醇的莫纳可林 (monacolins)、降血压的  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -Aminobutyric acid)、降血氨的潘红等<sup>[2-3]</sup>。由于红曲色素具有较强的耐光性、耐热性, 对酸、碱、氧化剂、还原剂均较稳定, 且具有色泽鲜红、着色力强、稳定性好、口味自然等优点, 自古以来在我国一直用于食品的着色, 而且也是我国食品法规规定允许使用的食用色素之一<sup>[4]</sup>。

发酵工程的重要目标和研究热点就是实现发酵过程优化和控制<sup>[5-6]</sup>, 而建立数学模型则是实现发酵过程优化控制的前提和关键<sup>[7-8]</sup>。通过发酵动力学的研究和发酵模型的建立, 能更好地认识微生物发酵过程中菌体的生长和产物形成的机制, 以及影响这些机制的一些重要环境因素, 最终实现发酵过程的有效控制, 达到提高产物发酵指标的目的<sup>[9]</sup>。

目前, 有关红曲色素的液态发酵工艺已有大量研究<sup>[10-12]</sup>, 但是对红曲霉合成红曲色素的发酵过程

收稿日期: 2010 - 04 - 19 修回日期: 2010 - 05 - 12

基金项目: 江西省科技支撑计划项目 (2009BG02100) 和江西农业大学博士科研启动基金资助项目 (08 - 2064)

作者简介: 程新 (1978 - ), 男, 讲师, 主要从事微生物学研究; \*通讯作者: 李昆太, 博士, E-mail: atai78@sina.com。

动力学研究却较少,因此本文对红曲霉 JR发酵动力学模型的建立进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 红曲霉 (*Monascus purpureus*) JR:由本实验室保存。

1.1.2 培养基 (1)斜面培养基 (g/L):蔗糖 20,蛋白胨 30,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.5,琼脂 30, pH 5.5~6.0; (2)种子培养基 (g/L):蔗糖 30,蛋白胨 30,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.5, pH 5.5~6.0; (3)发酵培养基 (g/L):葡萄糖 90,蛋白胨 30,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  1.0,  $\text{MnSO}_4$  0.1,  $\text{ZnSO}_4$  0.1, pH 5.5~6.0。

1.1.3 主要仪器 摇床、可见分光光度计、电子天平等。

### 1.2 方法

1.2.1 摇瓶培养方法 (1)斜面培养:将划线平板上的单菌落,接种于配制好的斜面,置于 30℃ 恒温箱培养 5 d; (2)摇瓶分批补料发酵种子培养:以带玻璃珠的 10 mL 无菌水洗下 1 支斜面上的菌体,制成菌悬液。取菌悬液 2 mL 接至装量为 30 mL/250 mL 三角瓶的发酵培养基中,28℃ 振荡 (180 r/min) 培养 168 h。总量 60 g/L 的葡萄糖和 30 g/L 的蛋白胨从发酵的第 48 h 开始平均分 6 次补加 (第 48, 60, 72, 84, 96 和 108 h)。

1.2.2 分析方法 (1)菌体生物量测定:采用测量菌丝干重法 (dry cell weight, DCW)。吸 10 mL 发酵液至离心管中,5 000 r/min 离心,去上清液,用蒸馏水洗菌体 1 次,所得菌体 80℃ 烘至恒重后称量; (2)葡萄糖测定:采用 DNS 法<sup>[13]</sup>; (3)红曲色素的提取及其色阶测定<sup>[14]</sup>:取发酵液 5 mL,再加入 (乙醇) = 75% 45 mL,静置浸 4 h,浸提完毕后用滤纸过滤。吸取 0.5 mL 滤液,加入 9.5 mL (乙醇) = 75% 稀释 20 倍,以 (乙醇) = 75% 作空白对照,在波长 510 nm 处测定 OD 值。将 OD 值乘以稀释倍数 200,即为红色素色价,色价单位为 U/mL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 红曲霉 JR 摇瓶分批补料发酵的过程代谢特征

基于前期对红曲霉 JR 摇瓶分批补料发酵工艺所进行的优化,红曲霉 JR 分批补料发酵过程的典型代谢特性如表 1 和图 1 所示。

表 1 红曲霉 JR 摇瓶分批补料发酵过程各参数的变化情况

Tab 1 The dynamic change of the metabolism parameters during the shake - flask fed - batch fermentation by *Monascus purpureus* JR

发酵周期 /h Fermentation time	菌体干重 /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) DCW	葡萄糖质量浓度 /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Concentration of glucose	红曲色素色阶 /( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) Monascus pigment content
0	2.132 4	92.44	0.6
12	3.245 0	87.12	0.6
24	5.233 3	75.49	0.6
36	7.501 0	63.58	2.6
48	10.285 9	48.52	15.8
60	16.020 2	16.39	59.6
72	21.000 0	15.35	102.4
84	29.166 7	13.03	160.2
96	35.001 3	14.26	210.6
108	40.499 8	16.87	250.0
120	43.512 1	15.35	310.2
132	45.936 9	16.71	373.4
144	45.801 3	13.26	420.4
156	45.090 9	5.46	468.2
168	44.990 3	2.32	500.2

从表 1 和图 1 中可以看出,菌体在 36 h 后进入快速的对数生长期,在 130 h 左右菌体量达到最大值,之后进入菌体衰亡期。与菌体生长对应的是,葡萄糖的利用速度随着发酵过程的不断进行而逐渐加剧,并且通过葡萄糖的外源补加,使得发酵液中总糖质量浓度在 60 h 后控制在 15 ~ 20 g/L。由图 1 还可以看出,红曲色素的合成在第 48 h 后迅速启动,最终(第 168 h)达到 500 U/mL 左右。

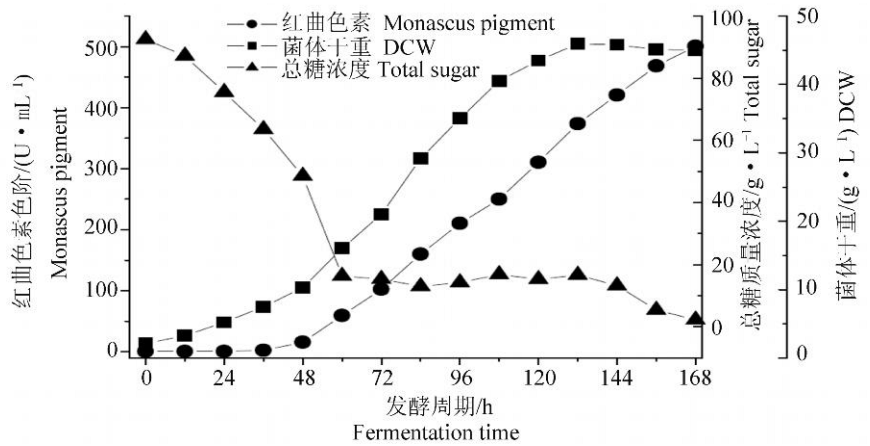


图 1 红曲霉 JR 摇瓶分批补料发酵过程典型代谢特性

Fig 1 Typical metabolism characteristics of *Monascus purpureus* JR in fed - batch fermentation

### 2.2 红曲霉 JR 摇瓶分批补料发酵动力学模型的建立

2.2.1 菌体生长动力学模型 微生物细胞生长动力学可由多种模型来描述,其中 Monod 和 Logistic 方程最为常用。但是,Monod 方程是基于单一生长限制性底物而成立的,而且其将微生物的生长视为简单反应,并假设菌体得率为常数,没有动态滞后。而在实际发酵过程中,菌体的生长因发酵条件的变化而变化,受到各种因素的影响。而 Logistic 方程反映了发酵过程中因菌体浓度增加对自身生长存在的抑制作用<sup>[15]</sup>,因此本文采用了 Logistic 方程来描述菌体生长动力学模型,即:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X \tag{1}$$

其中:  $\mu_m$  为最大比生长速率 ( $h^{-1}$ );  $X_{max}$  为可能的最大细胞质量浓度 (g/L)。

Logistic 方程可以积分为代数方程,以  $t=0, X=X_0$  为条件,公式 (1) 可积分为:

$$X = \frac{X_0 X_{max} e^{\mu_m t}}{X_{max} - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \tag{2}$$

2.2.2 产物形成动力学模型 Gaden 根据产物生成与菌体生长及底物消耗相关联,定性的将发酵过程分为 3 种类型<sup>[16]</sup>: I 生长偶联型; II 非生长偶联型; III 部分生长偶联型。其通用模型可用 Leudeking - pirt 方程<sup>[17]</sup>表示:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dX}{dt} + X \tag{3}$$

其中,  $\alpha$  为与菌体生长相关联的产物合成常数,  $\beta$  为与菌体量相关联的产物合成常数。当  $\alpha=0, \beta=0$  时为生长偶联型;当  $\alpha=0, \beta \neq 0$  时为非生长偶联型;当  $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$  时为部分生长偶联型。

由图 1 可以看出,红曲色素的发酵过程可分为两个阶段。第一阶段:菌体处于对数生长期,红曲色素同时产生。第二阶段:菌体处于稳定期,红曲色素继续以  $X$  方式生成。很明显红曲色素发酵属于部分生长偶联型。即  $\alpha \neq 0, \beta \neq 0$ 。

将 (2) 代入 (3) 式,并求积分得:

$$P = \frac{X_{max} (X_{max} - X_0)}{X_0 \mu_m} \ln \frac{X_{max} - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} + \frac{X_0^2 (e^{\mu_m t} - 1)}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \tag{4}$$

2.2.3 基质消耗动力学模型 在发酵过程中,基质消耗主要有 3 个方面: I 是细胞生长; II 是细胞维持生命活动的消耗; III 是生成代谢产物的消耗。基质消耗动力学模型通常采用以下方程:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \tag{5}$$

为简化模型,菌体呼吸等维持代谢消耗的基质可以归结在长菌消耗之内。红曲色素发酵的基质消耗大致可分为长菌消耗和产物合成消耗两部分。基质消耗的动力学模型简化为:

$$-\frac{dS}{dt} = k_1 \frac{dX}{dt} + k_2 \frac{dP}{dt} \tag{6}$$

其中  $k_1$  为长菌消耗系数,  $k_2$  为产物消耗系数。

将式 (2)、式 (4) 代入式 (6) 并积分得:

$$S = \frac{k_1 X_{max} (X_{max} - X_0)}{X_0 \mu_m} \ln \frac{X_{max} - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} + \frac{X_0 (k_1 X_0 + k_2 X_{max}) e^{\mu_m t} - k_1}{X_m - X_m + X_0 e^{\mu_m t}} + S_0 - k_2 X_0 \tag{7}$$

式 (1)、式 (3) 和式 (6) 构成红曲霉 JR 发酵过程中菌体生长, 红曲色素生成以及总糖消耗的动力学模型; 式 (2)、式 (4) 和式 (7) 分别为 3 个模型的积分形式, 有助于模型的拟和求解。以上各式反映了发酵过程中菌体生长, 红曲色素合成及总糖消耗同发酵时间之间的关系。

### 2.3 模型拟合求解与检验

将图 1 中的实验数据应用于上述模型, 利用 Origin 7.5 软件对实验数据进行非线性拟合, 可得出各参数值及初始值 (表 2)。

表 2 发酵动力学参数及初始条件值

Tab 2 Parameters of kinetic model and initial values

初始菌体干重 / (g · L <sup>-1</sup> ) $X_0$	最大菌体干重 / (g · L <sup>-1</sup> ) $X_{max}$	最大比生长速率 / ( $\mu_m \cdot h^{-1}$ )	初始基质浓度 / (g · L <sup>-1</sup> ) $S_0$
2.42	32.3	0.07925	78
与菌体生长相关联的 产物合成常数	与菌体量相关联的 产物合成常数	长菌消耗系数 $k_1$	产物消耗系数 $k_2$
1.8337	0.00364	-0.65784	1.93832

将各参数及初始条件代入 (1)、式 (3) 和式 (6) 得 3 个动力学模型分别为:

菌体生长动力学模型:

$$\frac{dX}{dt} = 0.0479 \left(1 - \frac{X}{47.11}\right) X \tag{8}$$

产物红曲色素合成动力学模型:

$$\frac{dP}{dt} = 83.974 \frac{dX}{dt} + 0.00268X \tag{9}$$

基质消耗动力学模型:

$$-\frac{dS}{dt} = 0.64866 \frac{dX}{dt} + 1.8873 \frac{dP}{dt} \tag{10}$$

将得到的发酵动力学模型的拟合曲线与实验数据比较, 如图 2 所示。

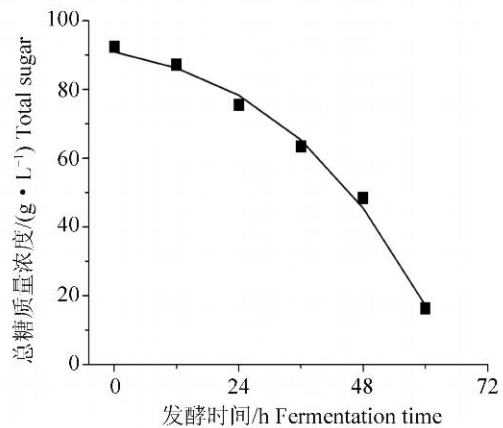
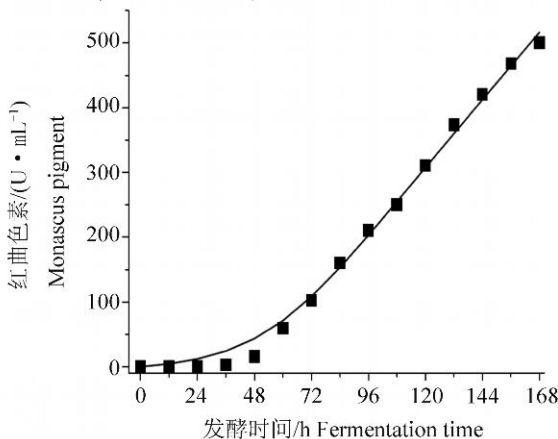
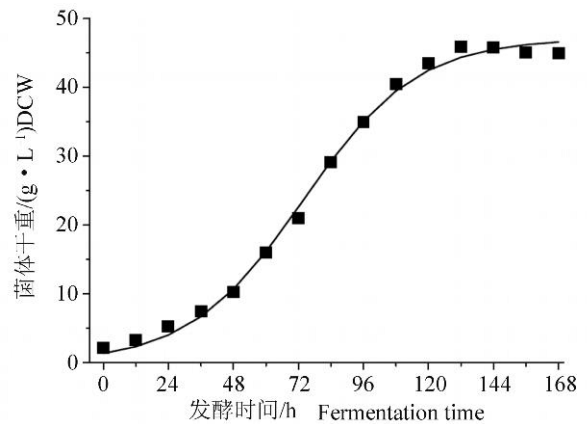


图 2 动力学模型曲线与实验值的比较

Fig 2 Comparison between model and actual values

从图 2 可以看出,所选择的动力学模型基本上反映了红曲霉 JR 发酵合成红曲色素的情况。

### 3 结 论

发酵动力学是研究各种环境因素与微生物代谢活动之间的相互作用随时间变化的规律的科学,研究发酵动力学的目的在于按人们的需要控制发酵过程<sup>[18]</sup>。本文研究了红曲霉 JR 产红曲色素分批补料发酵的发酵动力学,并通过 Origin 7.5 软件分析得出了菌体生长、产物合成与基质消耗 3 个动力学模型。将模型预测值与实验值进行比较,结果表明所建立模型能较好地反映红曲霉 JR 分批补料发酵过程,这对红曲霉 JR 发酵工艺的进一步优化具有重要的指导作用。

#### 参考文献:

- [1] Lin Y L, Wang T H, Lee M H, et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus* - fermented rice: A review [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 77 (5): 965 - 973.
- [2] 纪远中. 红曲及红曲霉的研究现状及进展 [J]. *天津药学*, 2005, 17 (2): 65 - 67.
- [3] Juzova P, Martinkova L, Kem V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1996, 16 (3): 163 - 170.
- [4] 季宏飞, 许杨, 李燕萍. 采用响应面法优化红曲霉固态发酵产红曲色素培养条件的研究 [J]. *食品科技*, 2008, 33 (8): 9 - 13.
- [5] 陈坚, 李寅. 发酵过程优化原理与实践 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 1 - 11.
- [6] Lee J, Lee S Y, Park S, et al. Control of fed - batch fermentations [J]. *Biochem Eng*, 1999, 17 (1): 29 - 48.
- [7] Johnson A. The control of fed - batch fermentation process a survey [J]. *Automatica*, 1987, 23 (6): 691 - 705.
- [8] Halme A. Modeling and control of biotechnical processes [M]. New York: Pergamon Press, 1982: 89 - 90.
- [9] 汪永宏, 张兴. *Xenorhabdus nematophila* 发酵动力学研究 [J]. *生物数学学报*, 2007, 22 (2): 243 - 250.
- [10] Hajjaj H, Blanc P, Groussac E, et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27 (8): 619 - 625.
- [11] Miyake T, Mori A, Kii T, et al. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32 (3): 103 - 108.
- [12] 孙菲菲, 岳田利, 袁亚宏, 等. 红曲霉菌 5040 发酵产生红曲色素的工艺及其色素特性研究 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34 (6): 137 - 144.
- [13] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31 (3): 426 - 428.
- [14] 彭中健, 梁淑娃, 陈郃东, 等. 红曲霉深层发酵生产红曲色素的研究 [J]. *四川食品与发酵*, 2004, 40 (122): 28 - 31.
- [15] 贾士儒. 生物反应工程原理 [M]. 天津: 南开大学出版社, 1990: 63.
- [16] Gaden E L. Fermentation kinetics and productivity [J]. *J Biochem Microbiol Technol*, 1959, 1 (4): 413 - 429.
- [17] Frame K K, Hu W S. A model for density dependent growth of anchorage dependent mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 153 (3): 1061 - 1067.
- [18] 张宇. 发酵动力学研究、开发与应用新进展 [J]. *中国新技术新产品*, 2009, 21: 7.