

低频交变磁场对红曲霉固态发酵生物量的影响*

邓光武 夏帆 王洁雅 高梦祥

(长江大学生命科学学院, 荆州 434025)

【摘要】 为了探讨磁场对工程菌发酵性能的影响,研究了紫色红曲霉在 50 Hz 低频交变磁场 0~2 mT 条件下,固态发酵生物量的变化规律。结果表明,磁场处理 3 d 对红曲霉生物量的产生具有促进作用,其中 0.6 mT 作用最大,提高了 29.9%。0~2 mT 磁场处理 15 d,处理组 and 对照组在第 11 天生物量达到最大值。处理组 and 对照组的生物量与底物消耗量的比值无明显差异。低频交变磁场可促红曲霉生长、进而可改变其代谢途径,提高发酵效益。

关键词: 红曲霉 低频交变磁场 固态发酵 生物量

中图分类号: Q937 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2012)06-0128-05

Effect of Low-frequency Alternating Magnetic Field on Biomass of *Monascus purpurus* Solid-state Fermentation

Deng Guangwu Xia Fan Wang Jieya Gao Mengxiang

(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract

The biomass of *Monascus purpurus* solid-state fermentation influenced by low frequency alternating magnetic field (50 Hz, 0~2 mT) was main studied in order to discuss the magnetic field influence on the performance of engineering bacteria fermentation. Results showed that the magnetic treatment could promote *Monascus purpurus* biomass producing in the third day with the maximum improving of 29.9% at 0.6 mT. The biomasses of treatment group and control group reach maximum in the eleventh day with the whole procedure of 15 days and magnetic field intensity of 0~2 mT. But the biomass and substrate consumption ratio of treatment group and control group did not show obviously difference. Low-frequency alternating magnetic field could promote *Monascus purpurus* growth, then change their metabolic way and enhance the fermentation benefits.

Key words *Monascus purpurus*, Low-frequency alternating magnetic field, Solid-state fermentation, Biomass

引言

红曲霉(*Monascus purpurus*)可利用多种碳源和氮源,能合成多种色素、洛伐他汀、麦角甾醇、酶类及其他生理活性物质。目前,红曲的生产方法主要有两种:传统固态法制曲和现代液-固二步法制曲。深层液态发酵法产洛伐他汀的量(30~50 mg)低,而

固态发酵法产量相对较高、无废弃物,且固态发酵物可全部入药^[1]。

低频磁场对生物界的作用是普遍存在的,目前国内关于人、动物和植物研究较多,而对真菌和非磁细菌相对较少^[2~4]。磁场对微生物的影响,主要集中在磁场杀菌方面的研究。对发酵工程菌整个发酵周期生物量影响的研究则很少。本文通过试验确

收稿日期: 2011-09-17 修回日期: 2011-12-13

* 江苏省农产品物理加工重点实验室开放研究资助项目(JAPP2010-3)和长江大学博士启动基金资助项目(03000282)

作者简介: 邓光武,工程师,主要从事发酵微生物的磁效应研究,E-mail: dgw2001@yahoo.com.cn

通讯作者: 高梦祥,教授,主要从事生物磁效应研究,E-mail: mxgao0398@yahoo.com.cn

定低频交变磁场对红曲霉生物量的影响,并研究磁场促进微生物生长机理,为磁场在发酵工业的应用提供参考。

1 试验仪器与材料

1.1 仪器设备

磁化摇床,自行研制;冷冻干燥机,德国 Christ Alpha 1-2 LD plus;UV1601PC 型紫外分光光度计,日本岛津 SHIMADIU 公司;HH-4 型恒温水浴锅,国华电器有限公司;BS-IE 型振荡培养箱,国华电器有限公司;HS-1300-U 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;DL-5-C 型低速离心机,上海安亭科学仪器厂;410 型高斯计/特斯拉计,美国 lakeshore 公司。

1.2 试验材料

紫色红曲霉由长江大学生命科学学院微生物实验室提供。麦芽糖、可溶性淀粉、蛋白胨、黄豆粉、琼脂、冰醋酸、KNO₃、ZnSO₄、无水 MgSO₄、NaCl、酵母膏、三氯乙酸、体积分数为 95% 乙醇等均为化学级。米饭按相同的米、水比例蒸煮。

(1) 斜面培养基:麦芽糖 7.2%、可溶性淀粉 5%、蛋白胨 3%、琼脂 2%~3%、冰醋酸 0.2% (均为质量分数),0.1 MPa 灭菌 25 min。

(2) 菌悬液制备:将斜面培养基上已长好的菌株用适量无菌水冲洗、刮下来,置于装有玻璃珠的 100 mL 锥形瓶中,轻轻摇荡,然后用 6 层纱布过滤,滤液即为菌悬液。

(3) 液态发酵培养基:蔗糖 10%、酵母膏 0.3%、KNO₃ 0.2%、MgSO₄ 0.05%、NaCl 0.05%、FeSO₄·7H₂O 0.001% (均为质量分数),0.1 MPa 灭菌 25 min。

(4) 种子培养基:可溶性淀粉 6%、黄豆粉 0.5%、KNO₃ 0.25%、ZnSO₄ 0.05%、MgSO₄ 0.05% (均为质量分数),0.1 MPa 灭菌 25 min。

(5) 种子液的制备:在 144 mL 种子培养基中接种 6 mL 菌悬液,30℃ 振荡培养 36 h,即得种子液。

2 试验方法

所用磁场处理设备为磁化摇床,由变压器调节磁场强度。整个摇床实验区域包括 10 个磁场发生器,同一外界条件下这 10 个磁场发生器中的磁场强度两两相等。磁场强度通过特斯拉计测定。红曲霉发酵物被置于磁场发生器中间的绝缘平台上,每个磁场发生器中放置 8 个发酵管(放置位置的磁场强度一致)。发酵温度控制在 (30±2)℃。

2.1 红曲霉固态发酵试验

将米饭趁热打散,冷却后准确称取 5 g 装入容积为 50 mL 的发酵管中,用无菌封口膜封口后 0.1 MPa 灭菌 25 min,接入已制备好的菌悬液 2 mL。放入磁场强度为 0.02~0.2 mT 的磁场发生器中,并将不经磁场处理的 24 只发酵管作为对照。分别在发酵 0、1、3、5、7、9、11、13、15 d 取出,测定处理组和对照组的生物量。每组试验作 2 次重复。

2.2 红曲霉生物量测定

2.2.1 生物量标准曲线测定

向液态发酵液中接入体积分数为 6% 红曲霉种子液,发酵 6 d 后将发酵液用 6 层纱布过滤,并用蒸馏水充分洗涤纱布上的滤出物,收集滤出物置于冷冻干燥机中冻干至恒量,研钵研碎,即得红曲霉纯菌丝干粉。

分别准确称取 0.025、0.050、0.100、0.150、0.200 g 纯菌丝干粉,加入体积分数为 5% 的三氯乙酸 25 mL,于 80℃ 水浴提取 25 min,中间进行摇动。水浴后取出置于冰浴中进行冷却,然后在 4℃、8 000 r/min、离心 15 min,取上清液,稀释 25% 后在波长为 260 nm 处测定其吸光度^[5]。设 3 个平行,根据所得数据绘制菌丝干质量与吸光度 A₂₆₀ 的关系曲线即为标准曲线,如图 1 所示。

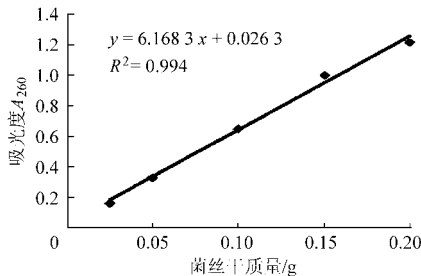


图 1 生物量标准曲线

Fig.1 Standard curves of biomass

2.2.2 红曲霉固态发酵产物生物量的测定

将红曲霉固态发酵产物置于冷冻干燥机中冻干至恒量、称量。取出后用研钵磨成粉状并过 100 目筛,称取 0.2 g 菌丝干粉按照标准曲线的测定方法测定其吸光度 A₂₆₀。通过标准曲线计算生物量^[5]。

2.3 生物量与底物消耗量的关系

$$D = C_m - F_m + B_m \quad (1)$$

式中 D ——底物消耗量 B_m ——生物量

C_m ——初始培养基干质量

F_m ——发酵后培养基干质量

按式(1)求得底物消耗量,其中直接将 5 g 大米培养基干燥至恒量为初始干底物质量。作生物量/底物消耗量与培养天数的关系曲线图。

所有数据采用 Excel 2003 的 t 检验进行统计分析。

3 结果分析

3.1 处理时间

将磁场固定为 0.6 mT 处理 15 d。相对生物量(处理组与对照组生物量之比)与培养天数的关系曲线,如图 2 所示。由图 2 可知,0.6 mT 处理红曲霉固态发酵,在第 3 天相对生物量达到最大值。选择处理 3 d 作为磁场处理的最佳时间。

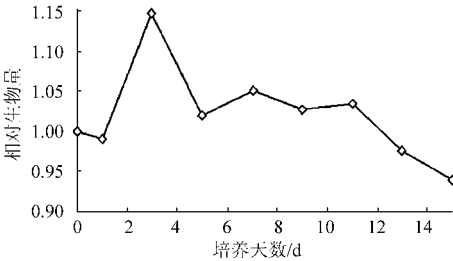


图 2 相对生物量与培养天数关系曲线(磁场强度 0.6 mT)

Fig.2 Relationship between relative biomass and number of days (magnetic field intensity of 0.6 mT)

3.2 磁场强度

在 0~2 mT 磁场范围内对红曲霉固态发酵进行试验,处理 3 d 后关闭磁场,磁场强度与相对生物量的关系曲线,如图 3 所示。由图 3 可知,在 0~2 mT 磁场处理 3 d 条件下 0.6 mT 磁场强度下相对生物量达到最大值。选择 0.6 mT 处理 3 d 作为最佳磁场处理条件。

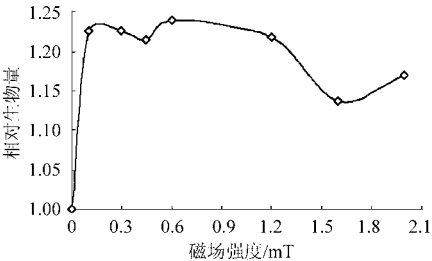


图 3 相对生物量与磁场强度关系曲线
(磁场处理 3 d 后关闭磁场)

Fig.3 Relationship between relative biomass and magnetic field intensity (shut off magnetic field in the third day)

3.3 磁场处理全程对红曲霉固体发酵生物量的影响

在 0~2 mT 磁场范围内连续处理 15 d,对红曲霉进行固态发酵试验。第 11 天时磁场强度与相对生物量的关系曲线,如图 4 所示。由图 4 红曲霉生长曲线可知,生物量在第 11 天达到最大值。在 0.3 和 1.6 mT 处相对生物量出现最小值,为明显的强度窗效应。除去这 2 个磁场强度,0~2 mT 中其他磁场强度处理对红曲霉生物量无显著影响($P > 0.05$)。

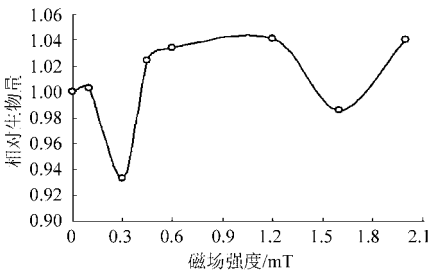


图 4 相对生物量与磁场强度关系曲线(磁场处理 11 d)
Fig.4 Relationship between relative biomass and magnetic field intensity (treated for 11 days by magnetic field)

3.4 磁场处理对生长曲线的影响

磁场强度为 0.6 mT 处理 3 d 后关闭磁场和连续处理 15 d 的条件下,红曲霉的生长曲线如图 5 所示。由图 5 可知,磁场处理与未处理的对照组红曲霉的生长曲线趋势是一致的。在 3~7 d 和 7~15 d 出现两个生物量增长阶段,在 4~7 d 生物量下降。这是由于菌体在 4 d 以后大部分进入成熟期及衰老期,同时产生大量孢子,导致生物量下降。而固态培养基上营养充足,在 7~11 d 孢子萌发,进一步产生大量菌丝。该结果与路秀玲等的结果一致^[6]。在第 3 天生物量明显高于对照组($P < 0.05$),提高了 29.9%,说明磁场处理对红曲霉菌丝生长有促进作用。在第 7 天生物量下降到低谷时,处理组和对照组生物量降到同一水平($P > 0.05$)。处理组生物量下降明显。说明磁场处理的菌丝容易衰老死亡。

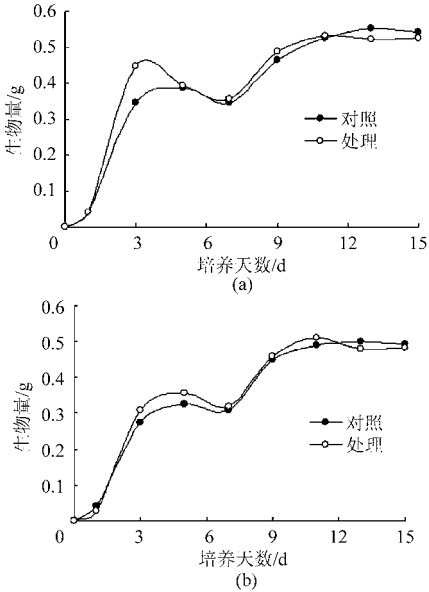


图 5 磁场强度 0.6 mT 条件下红曲霉生长曲线
Fig.5 Growth curves of magnetic field intensity of 0.6 mT
(a) 磁场处理 3 d 后关闭 (b) 磁场连续处理 15 d

3.5 生物量与底物消耗量关系

磁场强度为 0.6 mT 处理 3 d 后关闭磁场和连续处理 15 d 的条件下,红曲霉生长的生物量与底物消耗量比值和培养天数的关系如图 6 所示。由图 6

可知,磁场处理与未处理的对照组的生物量与底物消耗量的比值和培养天数的关系趋势是一致的。而且磁场强度 0.6 mT 下处理 3 d 和处理 15 d,其生物量与底物消耗量比值在生长周期内与对照组均无显著差异。由生物量与底物消耗量的比值可知磁场处理对红曲霉固态发酵的生长效率无明显影响,磁场处理造成的生物量增加可能是由于红曲霉新陈代谢加快,底物消耗增加造成的。

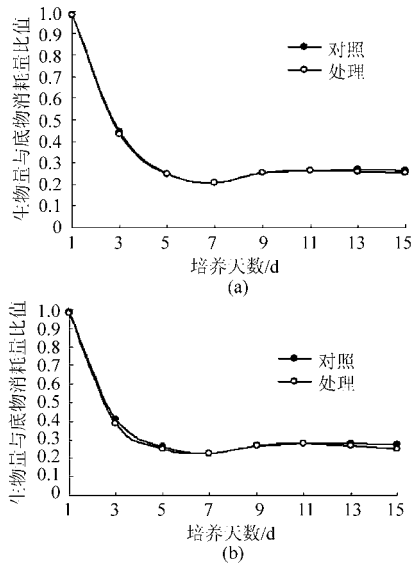


图 6 磁场强度 0.6 mT 条件下生物量与底物消耗量比值和培养天数关系曲线

Fig.6 Relationship between ratio of biomass and substrates consumption and number of days with magnetic field intensity of 0.6 mT
(a) 磁场处理 3 d 后关闭 (b) 磁场连续处理 15 d

4 讨论

已有研究证明强磁场对微生物的杀灭作用和弱磁场对微生物的生长具有促进作用都有明显的强度“窗”、频率“窗”和时间“窗”效应^[7-10]。本研究同样发现 0.02 ~ 2 mT、50 Hz 交变磁场处理 3 d 对红曲霉的生物量具有促进作用,0.6 mT 处理组比对照组提高了 29.9%。关闭磁场后,处理组生物量比对照组生物量下降明显,可能是由于磁场处理红曲霉使其细胞膜稳定性降低,细胞容易破碎死亡而造成的^[4,11]。而磁场处理 15 d,生物量在第 11 天达到最大值,与对照组相比没有明显的促进作用。在

0.3 mT 和 1.6 mT 条件下,处理组的生物量出现最小值,表现出明显的强度窗效应。当磁场为某些特定频率时,磁场对微生物的作用一般取决于离子的核质比和磁场强度。当离子处于其共振频率的磁场强度时会吸收能量,累积转变成动能,导致该阶段的磁场对微生物的作用强烈,这样就会出现特定的“窗”效应。

本研究还发现,磁场作用对红曲霉底物消耗产生生物量的速率没有影响,即处理 3 d 促进其生物量生长不是因为底物利用率增加,而是加速其新陈代谢速率。生物量产量大,底物消耗大,反之亦然。

磁场对红曲霉生物量的促进作用大致可由细胞膜在电磁场中对钙离子的释放来解释^[4,11]:电磁场主要影响细胞膜上钙离子的跃迁,释放带点的结合钙离子,另外则影响细胞膜外部或周围的钙离子。细胞膜中钙离子的浓度控制许多新陈代谢的速率,包括部分酶的活性和基因表达。胞质中钙离子的浓度由细胞膜上的新陈代谢驱动的离子泵控制,使其保持内部浓度为外界的千分之一。当需要时,少数钙离子运输进入胞质参与新陈代谢过程。当电磁场作用增加细胞膜的通透性,大量钙离子在不受调节的情况下涌入细胞。随后引起的效应取决于涌入的量和细胞所处的状态。如果处于生长期,其生长速率增加;如果处于修复期,其修复速率增加。同样离子回旋谐振中理论中也提及:穿过离子通道的离子的运动学特性由外部电磁场施加的电场力和罗仑兹力的共同作用所决定,致使通透行为被干扰。

本试验结果证明了磁场处理导致细胞膜对钙离子释放理论,同时也证明低频磁场对微生物的生长有促进作用。

5 结论

- (1) 磁场强度 0.6 mT 处理 3 d,红曲霉生物量提高了 29.9%。
- (2) 磁场强度 0 ~ 2 mT 连续处理 15 d,处理组和对照组在第 11 天生物量达到最大值。
- (3) 磁场强度 0.6 mT 处理 3 d 和连续处理 15 d 的条件下,处理组和对照组的生物量与底物消耗量的比值均无明显差异。

参 考 文 献

1 朱效刚.红曲功能性成分分析及发酵法生产的研究[D].无锡:江南大学,2005.
Zhu Xiaogang. Studies on the determination and fermentation of the functional ingredients in *Monascus* red rice [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005. (in Chinese)

2 Galland P, Pazur A. Magnetoreception in plants [J]. Journal of Plant Research, 2005, 118(6): 371 ~ 389.

3 Wiltshcko W, Wiltshcko R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals [J]. Journal of

- Comparative Physiology A, 2005, 191(8): 675 ~ 693.
- 4 Pazur A, Schimek C, Galland P. Magneto reception in microorganisms and fungi [J]. Central European Journal of Biology, 2007, 2(4): 597 ~ 659.
- 5 魏培莲. 土曲霉固态发酵产洛伐他汀的关键技术和新工艺探索[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
Wei Peilian. Efficient and novel technologies for lovastatin production with *Aspergillus terreus* in solid state fermentation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007. (in Chinese)
- 6 路秀玲, 赵树欣, 刘忠华. 红曲霉固态发酵中生物量的测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(6): 45 ~ 49.
Lu Xiuling, Zhao Shuxin, Liu Zhonghua. Biomass estimation of *Monascus* in solid-state fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27 (6): 45 ~ 49. (in Chinese)
- 7 Moore R L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 25(10): 1 145 ~ 1 151.
- 8 Justo O R, Perez V H, Alvarez D C, et al. Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 134(2): 155 ~ 163.
- 9 Aarholt E, Flinn E A, Smith C W. Effects of low-frequency magnetic fields on bacterial growth rate [J]. Physics in Medicine Biology, 1981, 26(4): 613 ~ 621.
- 10 高梦祥, 夏帆, 胡秋冬. 交变磁场对啤酒酵母的生长促进效应[J]. 农业机械学报, 2007, 38(7): 91 ~ 93.
Gao Mengxiang, Xia Fan, Hu Qiudong. Stimulation of alternating magnetic field on *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2007, 38 (7): 91 ~ 93. (in Chinese)
- 11 Goldsworthy A. Effects of electrical and electromagnetic fields on plants and related topics [M] // Volkov A G. Plant electrophysiology-theory & methods. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006: 247 ~ 267.
- 12 Liu Y, Edge R, Henbest K, et al. Magnetic field effect on singlet oxygen production in a biochemical system[J]. Chemical Communication, 2005, 14(2): 174 ~ 176.
- 13 Ahmad M, Galland P, Ritz T, et al. Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 2007, 225(3): 615 ~ 624.
- 14 McLeod B R, Liboff A R. Dynamic characteristics of membrane ions in multifold configurations of low-frequency electromagnetic radiation [J]. Bioelectromagnetics, 1986, 7(2): 177 ~ 189.
- 15 Liboff A R, McLeod B R. Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields [J]. Bioelectromagnetics, 1988, 9(1): 39 ~ 51.
- 16 Lednev V V. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems [J]. Bioelectromagnetics, 1991, 12(2): 71 ~ 75.

(上接第 138 页)

- 20 Rapp A, Versini G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine [C] // JoAnne M Rantz. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture, 1991: 156 ~ 164.
- 21 Ribéreau G P, Glories Y, Maujean A, et al. Handbook of enology. Vol. 2: the chemistry of wine stabilization and treatments [M]. 2nd ed. Chichester, England: Jon Wiley & Sons, 2006.
- 22 Escudero A, Campo E, Fariña L, et al. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11): 4 501 ~ 4 510.
- 23 Xu Yan, Fan Wenlai, Qian M C. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2007, 55(8): 3 051 ~ 3 057.
- 24 Leila D F, Gilles R, Jean P R, et al. Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-olfactometry) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 497 ~ 505.
- 25 Alessandro G, Angelita G, Paola P, et al. Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine [J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1 228 ~ 1 236.
- 26 Beata P, Waldemar W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages—a review [J]. Food Chemistry, 2008, 107(1): 449 ~ 463.