

溫度轉換效應對紅麴菌 *Monascus ruber* 生產二次代謝物 monacolin K 之影響

Effects of temperature-shift on monacolin K production by *Monascus ruber*

賴龍山 陳美琪

Long-Shan T. Lai Mei-Chi Chen

摘要

本研究探討菌株醱酵培養過程之溫度瞬間轉換效應對紅麴菌 *Monascus ruber* ATCC 18199 生產二次代謝產物 monacolin K 之影響。實驗結果顯示，若使用簡易的溫度轉換方式(即在種槽階段後之生產階段第 0 天將培養溫度 28°C 轉換降低至 23°C，即 28°C→23°C at day 0)，第十二天之 monacolin K 之生產量可增加 55%(達 153.8 mg/L)，此時紅麴紅色、橘色與黃色天然色素也分別增產約 17.9%、10.7%與 2.3%，但發現菌體產量卻只減少 6%；實驗觀察，此溫度轉換確會造成菌體增長型態的改變、並影響醱酵液 pH 變化趨勢，可能因而造成其二次代謝物的增產。

進一步在使用兩階段溫度變化，即溫度循環方法(28→23→28°C)的實驗中，本文發現在第一階段溫度轉換如預期地是會造成菌體產量的減少，而在第二階段升溫卻無法再回復此真菌之細胞成長與產物生產活性，發現 monacolin K 產量僅達控制組之 31%。本研究之實驗結果說明菌株之培養溫度主宰紅麴菌醱酵代謝路徑之走向，相對於研究者常用的恆溫培養，此最佳之培養溫度轉換(28°C→23°C at day 0)確能增加紅麴菌二次代謝產物 monacolin K 之生產，此時，該產物之比生產速率的最高值可曾增為高達四倍之多。

關鍵詞：紅麴菌、monacolin K、溫度瞬間轉換效應。

ABSTRACT

In this study, attempts were made to investigate the effects of the shift in the culturing temperature on monacolin K production by *Monascus ruber* ATCC 18199. A simple temperature-shift approach (28°C→23°C at day 0 of production) was proved highly valuable, where monacolin K production of day 12 was enhanced by 55% (153.8 mg/L), as compared with that of an isothermal culture at 28°C. Meanwhile, the production of *Monascus*-pigments was also increased by 17.9% (red), 10.7% (orange) and 2.3% (yellow), respectively. Nevertheless, biomass production was decreased by 6% only. This temperature-shift method used here closely influenced the morphology and changed the physiological state (such as the pH kinetics), probably thus resulting in the enhancement of monacolin K production by the fungus.

In the experiments using temperature-cycling (28→23→28°C), biomass production of the fungus decreased, as expected, in the first phase of temperature-cycling, but it was decreased further in the second phase. It was found that the fungus was unable to resume its growing activity and productivity, where monacolin K production was minimized as only 31% of that without cycling. Such experiments described that the culturing temperature served as an environmental signal for directing metabolism of *M. ruber*. As compared with an isothermal culture, monacolin K production by *M. ruber* was substantially enhanced when the optimal temperature-shift method (28°C→23°C at day 0) was applied in the cultures. Meanwhile, the maximum of the specific monacolin K production rate was largely increased as 4-fold of that of an isothermal culture at 28°C.

Keywords: *Monascus ruber*, Monacolin K, Effects of temperature-shift.

一、前言

在東方國家食品上，紅麴菌屬(*Monascus spp.*) 是使用悠久的菌種之一，估計已達百年以上。紅麴菌除了可經一次代謝作用生產酸、酯和醇等物質外，也能產生多種的水解酵素，它們可分解澱粉、蛋白質、果膠和半乳糖等[1]；近年來，紅麴菌屬的二次代謝產物(secondary metabolites)更是研究的重點，這類代謝產物中除了當作食品之色素添加劑的紅麴天然色素[2][3]外、尚包括降膽固醇成份 monacolin K [4][5]以及一種真菌毒素的橘黴素(citrinin)[6][7]等物質。

近年來，國人常攝取含量過多的醣類、蛋白質或脂質等高度精緻食品，導致慢性文明病日益嚴重，其中的高膽固醇血症(hypercholesteremia)更是重大疾病；據了解，血液中高膽固醇濃度是引起高血壓、心血管疾病(如血管動脈粥狀硬化等)的危險因子。目前能顯著減少人體膽固醇合成且無顯著不良副作用的優選藥物 mevacor(美國 Merck 藥廠)之主成份是 monacolin K(或稱為 lovastatin)。

據瞭解，人體中膽固醇合成之速率決定步驟主要是受制於稱為 HMG-CoA 還原酵素(即 hydroxy methylglutaryl-CoA reductase)之活性，而 monacolin K 則能抑制此膽固醇合成之關鍵步驟，科學家研究並發現 monacolin K 分子上的內酯環(lacton ring)經人體腸胃吸收後，會很快地被水解形成 β -hydroxy acid 的型式，此物質會與膽固醇合成關鍵步驟之基質(指六碳物質 HMG-CoA)相互競爭酵素的催化活性部位，進而減低前驅物 mevalonic acid 之生合成因而得以減低體內膽固醇之生成[8][9]。

真菌(如紅麴菌屬)由於其菌絲增長特性，其醱酵系統行為與回應受培養環境因子之影響(如醱酵液的 pH 或溶氧, dissolved oxygen (DO)，之控制)甚巨；Sanchez 與 Demain 歸納微生物醱酵過程中代謝產物的增產可以藉由培養環境因子之改變而進行醱酵生化調控[10]，此外，Weinberg 也報導菌株培養溫度與磷酸鹽類濃度亦可調控微生物二次代謝之走向[11]。在微好氧的酵母菌 *Pachysolen tannophilus* 醱酵過程中，Converti 等人報導在 25-30°C 的環境中，約有 83% 木糖(xylose)會被還原成木糖醇(xylitol)；相對地，若培養在 20°C 下，細胞則是進行呼吸作用[12]。在以 *Corynebacterium*

glutamicum 之細菌醱酵生產麩胺酸鹽(glutamate)的過程中，Delaunay 等人若將培養溫度自 39°C 降低至 33°C，可成功誘發產物的增產[13]。此外，Choi 等人[14]也發現紅豆杉懸浮細胞培養於 24 °C 時之細胞生長達最大量，但卻發現該植物細胞之二次代謝產物紫杉醇(Taxol)之生合成最佳溫度則在另一個溫度(29°C)。據報導，真菌的二次代謝產物極可能是為了調節生理需求或藉以舒緩外在逆境壓力(environmental stress)所產出的小分子量物質[15][16]；而培養溫度極可能是主宰細胞生長或代謝走向的重要環境訊號之一，本文並推測微生物之產物高生產率極可能是細胞處在於一種不同於自然培養的環境壓力狀況下之結果；此外，在好氧性醱酵液中之菌株培養環境(例如液中溶氧濃度之高低)，亦可能受驟然改變培養溫度之影響，而使得菌株培養環境連帶受影響，導致代謝路徑或走向因而更動。

回顧文獻，前人實驗結果已說明液態培養紅麴菌二次代謝生產紅麴天然色素、橘黴素的恆溫最佳溫度是介於 28°C 與 30°C 間[7][17]；不同於本實驗室先前之生產培養基組成份設計與最適化工作[18]，亦非只尋找最佳的單一恆溫培養溫度，本研究在應用二階段醱酵(two-stage fermentation technique)培養紅麴菌 *Monascus ruber* 的醱酵過程中，將先探討更大範圍的恆溫培養，瞭解此紅麴菌之菌體量生產或二次代謝產物(monacolin K 與紅麴天然色素)生產之最佳溫度是否相同？繼而在培養過程，利用溫度瞬間轉換的方式(temperature-shift，即將菌株培養溫度自生長最佳培養溫度立即轉換至二次代謝產物生產之最佳培養溫度)，來探討培養溫度轉換效應對紅麴菌 *M. ruber* 細胞生長或增產其二次代謝物 monacolin K 或紅麴天然色素(*Monascus-pigments*)之影響，在此非固定單一培養溫度的實驗中，相關的菌株醱酵生化回應也是本實驗觀察的重點。

貳、實驗材料與方法

一、實驗材料

(甲)菌株

本研究所選用生產二次代謝的菌株為 *Monascus ruber* ATCC 18199，乃購自新竹食品工業發展研究所。

紅麴菌是屬於真菌界(Fungi)中的子囊菌門(Ascomycota)，子囊菌綱(Ascomycetes)，散囊菌目(Eurotiales)，紅麴菌科(Monascaceae)。該菌株之增殖特性為雌雄同體(homothallic)，其營養菌絲呈不規則狀分歧，它可藉由分生孢子(conidium)進行無性生殖或產生子囊果行有性生殖[19][20]。

(乙)培養基

本實驗研究所使用的培養基，乃參考前人研究[21][22][23]，所用組成份與其相對濃度如表一、二、三所示；本研究之初步實驗說明：表一之組成份 maltose 與 peptone 是有助於產孢能力不佳之紅麴菌特性；惟在後續實驗亦經局部修改(如下內文之說明)。

二、實驗材料

(甲)培養方法

依真菌二次代謝產物產出是在菌株生長後期所產出的特性，本研究使用二階段醱酵培養技術(two-stage fermentation technique)，意即此真菌醱酵程序概分為種槽(seed stage，細胞成長階段)與生產槽(production stage，二次代謝產物生產階段)兩個階段，實驗步驟概述如下：

步驟一：製備產孢培養基，以斜面培養方式於 28°C 培養箱中培養十天後，再以 4 mL 無菌水洗下孢子，以無菌方式製備孢子懸浮液，備用。

步驟二：將孢子懸浮液接種於第一階段種槽(細胞生長)之培養基 20 mL 於 125 mL 的錐形瓶中，搖瓶震盪頻率設定為 200 rpm；溫度設定為 28°C 下培養 4 天。

步驟三：配製生產培養基，於每一 125 mL 錐形瓶中注入 20 mL 之生產培養基後以 121°C 殺菌 20 分鐘。

步驟四：以無菌方式將每一錐形瓶接種 2 ml 的菌絲量，意即 10%之接種量(inoculum)，搖瓶實驗在震盪頻率設定為 200 rpm、培養溫度設定為 28°C 之迴旋式震盪培養箱中培養 10-12 天(此恆溫 28°C 之培養為控制組實驗)，本研究也將產物之生產階段設定在已調控好不同溫度(18-33°C)之震盪培養箱中，以進行溫度轉換測試。

(乙)分析方法

本實驗的測量與定量分析包括 pH、monacolin K、紅麴天然色素與細胞產量，其中也包括細胞增長形態之光學顯微鏡觀察，所得之實驗數據皆為五重複獨立實驗之平均值，誤差約為 5~10%。

(1) pH 值

每日測量並將培養 10-12 天之醱酵液直接以 pH 計測其最終 pH 值，觀察其變化趨勢以瞭解對產物生產可能之影響。

(2) monacolin K

本實驗首先配置不同濃度之標準品 lovastatin(該分子之化學結構式與 monacolin K 完全相同)，來製備校正曲線。其中標準品為台北榮民總醫院教學研究部蕭明熙教授所贈。

基本上，本實驗中產物之萃取、分析方法是參考前人研究[23]，本實驗所使用的方法概述如下：將醱酵液用濾紙過濾掉菌液，再加入等體積比例之乙醇(95%)，靜置 24 小時後再以 0.45 μ m 微過濾膜過濾，利用 HPLC 在室溫下進行定量分析。管柱為 COSMOSIL C₁₈ 逆相管柱(4.6×250 mm)，UV 偵測器吸收波長設定為 237 nm，其移動相則為甲醇和水 4：1 的比例，經調配後再以磷酸調整為 pH 3.5，流速為 1.0 mL/min，分析時樣品之注射體積為 20 μ L。

(3)紅麴色素(Monascus-pigments)

步驟一：生產培養後的醱酵液，利用濾紙過濾菌液，將菌體與菌液分離，加入等比例之乙醇(95%)，菌體浸泡萃取 24 小時後，收集萃取液。

步驟二：萃取液以分光光度計測其吸收值，本實驗以偵測紅色、橙色與黃色色素之吸收值為主，其偵測波長分別為 500 nm、470 nm 與 400 nm [24]。

(4)細胞乾重(Dry Cell Weight, DCW)

步驟一：以定量吸管吸取充分混合的適量體積醱酵液，經濾紙抽氣過濾，並以十倍之去離子水洗去攪雜在菌絲中的培養液成份；第二次再重作此步驟。

步驟二：將此乾淨之菌絲固體連同濾紙置於 102°C 之烘箱中乾燥 24 小時後，取出秤重，在

扣除濾紙重後計算 DC0W。

此外，本實驗也利用光學顯微鏡(Nikon Eclipse E400, 日本)來觀察紅麴菌醱酵過程中，因應培養溫度之改變菌株之增長形態與其變化。

參、結果與討論

本實驗室先前實驗結果說明紅麴菌二次代謝產物 monacolin K 的生產受菌株培養環境因子(如培養基組成份、pH 等)之影響[18][22]，而在培養溫度之效應的初步實驗結果顯示：溫度轉換若發生在細胞成長之種槽階段並無明顯效果(data not shown)；因之，以下實驗主要探討在代謝產物生產階段不同培養溫度與其瞬間改變對菌體產量、紅麴色素與產物 monacolin K 生合成等之影響：

(甲)、恆溫之紅麴菌培養(Cultivation of *M. ruber* at a constant temperature)

若以表三之生產培養基為基礎，表四所列为經局部修正而使用不同的碳源濃度時所得 monacolin K 的產量，當中以組成份 glucose 30 g/L 與 glycerol 88.2 g/L，所得 monacolin K 的產量為試驗各組中最高，約增加 46%，達 99.2 mg/L，因此本研究後續實驗乃沿用此一修正培養基主要以下列各組實驗探討溫度效應對紅麴菌醱酵生產二次代謝物之影響。

在先前培養基設計實驗，吾人瞭解培養環境因子之一的菌株培養溫度可能控制其代謝路徑或其走向[18]，本文因之推測微生物之高產率或許是細胞處於一種不同於自然的培養環境壓力狀況下所使然，而培養過程之溫度瞬間轉換可能代表外界正施加於微生物細胞的一種環境壓力。本研究之實驗策略是將生產培養溫度條件由控制組的 28°C 降低一個溫度級距(即 5°C)為 23°C，或者升高一個溫度級距(即 5°C)至 33°C，藉以探討對其生產二次代謝產物之影響。

圖一是在 28°C 恆溫培養條件下，菌體生長，以及二次代謝產物 monacolin K 及紅麴天然色素之生產動力學趨勢。如圖一(a)所示，實驗發現培養至第 2 天時就有色素產生，而培養至第 4 天時才開始偵測出有 monacolin K 之合成。此結果似乎說明兩種推論：其一是，此兩類產物(指 monacolin K 與紅麴天然色素)在菌株之營養源的代謝過程中可能是共用生物源的(biogenesis)，其二則可說在紅麴菌的

二次代謝作用中兩代謝產物是經由次序先後的生化反應(consecutive reactions)所合成的。若依據第一種推論，此兩類化合物亦可能在細胞生長期間即分道揚鑣、各自合成而互不干擾，意即，紅麴色素與 monacolin K 的合成路徑不是相互競爭而是分開平行進行的；相對地，第二種推論則說明若要增產 monacolin K，似乎可能必需先提高紅麴色素之生產，之後，再藉由培養環境因子之調控以使天然色素繼續經菌株之代謝因而得以增產 monacolin K。但本文認為除非發現紅麴菌屬二次代謝作用之分岐點(branch points)或關鍵中間體(key intermediates)，實難推論；從另一觀點，這樣的推論也與國內為探討所知有限之紅麴菌二次代謝作用(含其調控)而進行的基因體學研究[19]相互呼應。此外，本實驗結果亦發現在第 11 天時，色素產量最高，而第 12 天時 monacolin K 也達到最高之產量(99.2 mg/L)，之後，monacolin K 的產量有下降之趨勢。依此結果，本研究遂採取生產培養 12 天為其醱酵程序檢測的基準點。

圖一(b)則表示當培養時間天數增加時，其乾細胞重 DCW 呈現一個穩定增加的趨勢，此時醱酵液 pH 值則隨著天數增加而呈現一個緩慢下降的趨勢，到達 pH 值 3~4 之間時，本實驗室未公開的實驗結果也說明：此最終的醱酵液 pH 區間(含其變動趨勢，即 pH 位於 3 與 4 之間)似對 monacolin K 之產量是有幫助的，本文推測此現象的成因可能與紅麴菌的二次代謝與培養基中碳源的被利用與有機酸之產生有關[17]。

若在不同的培養溫度(18-33°C)，細胞產量、二次代謝作用之產物 monacolin K、紅麴天然色素之生產的實驗結果如圖二所示，若以醱酵 12 天為基準，本文發現在 33°C 培養的情況下之 monacolin K 產量僅 19.9 mg/L、28°C 產量 99.2 mg/L、而在 23°C 之產量則增為 153.8 mg/L，但若繼續降溫至 18°C，產量則為 94.1 mg/L(如圖二(a)示)；以上結果說明，相對於控制組(28°C)之產量，若將溫度改變至 23°C 則可增加 55%之 monacolin K 產量；若將溫度再降至 18°C 時，則對 monacolin K 生產影響有限；但若反過來將溫度升高到 33°C，則減少 monacolin K 之合成達五倍之多，因之，依以上結果得知 23°C 是紅麴菌 *M. ruber* 進行二次代謝作用時最佳生產 monacolin K 的菌株培養溫度。

圖二(b)的實驗結果則顯示：控制組實驗(28°C)之菌體產量(DCW)重約 0.0188 g/mL、33°C 時 DCW 約可增加此數值之 35%，而 23°C 之 DCW 產量減少僅約 6%、18°C 情況下的 DCW 則是大幅減少，達 44%之多，是故，此結果說明相對於控制組實驗(28°C)，培養過程升高溫度確實是有助於此紅麴菌之菌體成長，但卻同時減低二次代謝物 monacolin K 之產量。同樣地，圖二(c)則說明紅麴菌 *M. ruber* 經二次代謝作用生產紅色、橙色與黃色天然色素的過程中所受到培養溫度改變之影響，依據所得實驗結果顯示：較之 monacolin K，此類色素生合成之關鍵酵素似乎較不受培養溫度立即改變之影響，但仍證實紅麴菌在次佳的生長溫度(the sub-optimal temperature for cell growth)是該菌株進行二次代謝作用的最佳條件。

本研究中也對紅麴菌 *M. ruber* 醱酵過程中，菌絲顆粒形態與其變化進行顯微觀察，若以控制組(28°C)及 23°C、18°C 與升溫 33°C 進行比較，由光學顯微照片中(如圖三所示)，發現 23°C 醱酵液中菌絲狀生長比 18°C、28°C 與 33°C 多，吾人觀察紅麴菌是在 23°C 之下所產生菌絲形態，似有助於二次代謝物 monacolin K 之生產，相對地，因為在 18°C 的培養溫度較低，導致菌體生長狀況並不好，此時菌絲少而 DCW 也最輕；但若將生產培養溫度條件由 28°C 向上提升為 33°C 時，則會形成大型圓球狀顆粒，也顯示溫度愈高是有助於 DCW 的增加，實驗數據明白顯示，若形成菌絲顆粒明顯無助於二次產物 monacolin K 之生產。回顧前人研究[20]，紅麴是菌在營養菌絲(vegetative hyphae)形成的階段產生二次代謝產物紅麴色素，並將之堆積在菌絲體內，再由菌絲尖端的微孔或細胞壁之破裂部分擠出色素。若考慮膽固醇合成抑制劑成份 monacolin K 與紅麴色素一樣為是屬於此菌株之 polyketide 化合物，故本文推測 monacolin K 也可能是在紅麴菌 *M. ruber* 菌絲形成的階段產生的，易言之，在紅麴菌 *M. ruber* 之生長過程中，菌絲之形成(mycelium formation)而非菌絲裸粒之產生(pellet formation)可能較有利於該菌株二次代謝作用之發生。

(乙)、溫度轉換之培養(Cultures of *M. ruber* under temperature-shift)

此部份實驗主要是探討培養溫度之瞬間轉換時，細胞是否會對此環境壓力作出不同回應(例如細

胞生長情形或二次代謝物生產之高低等)。實驗上，乃在紅麴菌的一階醱酵過程(即種槽)時將菌株培養於恆溫(28°C)情形下，而於第二階段(即生產槽)培養於不同溫度(如下文所述)；換言之，此部份紅麴菌培養實驗是以溫度作二階段之梯度方式進行。

依據上述恆溫培養的實驗結果，得知紅麴菌培養在 18°C 或 33°C，均非其最適合生產二次代謝物 monacolin K 溫度，而培養在 23°C 或 28°C 可能較佳。圖四(a)則是比較控制組(28°C)與降低一個溫度級距的 23°C(生產槽階段)，在此真菌醱酵 0~15 天過程中，所偵測的 monacolin K 及紅麴色素之生產趨勢圖。如前所述，培養在 28°C 或 23°C 時，第 2 天時就有紅麴色素產生，而培養在 28°C 或 23°C 時，第 4 天時才開始產生另一代謝產物 monacolin K；此實驗結果說明：降低培養溫度對紅麴菌二次代謝產物生產的醱酵後期階段(第 8-12 天)是明顯有利的。簡言之，紅麴菌在 23°C 培養之第 12 天，monacolin K 生產達 153.8 mg/L，增產約達 55%；而在第 13 天，紅色色素產量陡然大幅提升，增產約達 89%。

依據圖四(a)上之數據，生產階段培養溫度之瞬間改變對紅麴色素與對 monacolin K 之生合成的影響，是完全不同的；詳細地說，若將培養溫度自 28°C 降至 23°C，在醱酵前 11 天的紅色色素之生合成亦隨之下降，此時 monacolin K 之生產卻因溫度降低而提升；但在醱酵 12 天後，兩者對改變培養溫度改變之回應便趨於一致；簡言之，本研究在紅麴菌 *M. ruber* 之醱酵過程，僅利用培養溫度之瞬間轉換操作便發現了一有趣現象：在培養過程的前 11 天，瞬間溫度轉換效應對紅麴色素或 monacolin K 之生產之效應，兩者是截然不同的，意即培養溫度之將降低溫度對同屬二次代謝作用所生產的 monacolin K 在降溫後第七天就顯現增產效果，相對地，紅麴色素之增產則延至降溫後第十二天才發生；此結果也暗示，該菌株培養過程中，掌控 monacolin K 生產的關鍵酵素對培養溫度之改變較之紅麴色素更為敏銳。本實驗中更進一步發現此降溫操作並可延長產物之生產期間，數據顯示在第 13 天時 monacolin K 的產量達到最高值(即 172.8 mg/L)，若比較恆溫 28°C 條件下之最大產量可增產 80% 以上；而圖四(b)則顯示控制組(28°C)與較低溫度(23°C)培養 *M. ruber*，所偵測之 pH 值和菌體生長的趨勢圖，此圖初步說明紅麴菌培養在培養溫度介於 28°C 或低 5°C(即 23°C)間，對菌體成長、pH 之變化趨勢，

兩者在醱酵後期之差異雖可略的，但在整個醱酵過程中 pH 變化之差異卻明顯不同，對此 pH 之差異對紅麴菌醱酵生理或生化學的意義究竟代表何種意義，本實驗建議作醱酵過程之殘餘糖源分析[25]或作糖源利用率計算。

為進一步驗證前述：「紅麴菌培養在培養溫度介於 28°C 或 23°C 間，其 monacolin K 之生產明顯有異，但它對菌體成長的差異是可略的」之說法，本研究進一步探討在不同的產物生產時機使用降低培養溫度的策略。當此降溫操作(即 28→23°C)之時機(timing)發生在第 0、1、2 或 3 天(它們各別相對於圖五之 operation mode I、II、III 或 IV)，相對於控制組(28°C)之恆溫培養，此圖形說明 monacolin K 之生產以 operation mode I(即 28-23°C at day 0)為最佳(圖五(a))，但其細胞產量減少是次多的(圖五(b))，而(圖五(c))則再次證實使用不同的時機作此溫度轉換，此舉對紅麴色素與對 monacolin K 之生合成的生產雖皆有增加，但增產效果是不同的。整體來說，以圖五的數據為例，此結果說明在 *M. ruber* 醱酵二次代謝過程中，因溫度轉換造成在第 12 天之 monacolin K 增產可達 55%，而同一時間紅麴色素則僅約 25% 左右，因之本文推論紅麴菌中控制 monacolin K 生合成之關鍵酵素對溫度轉換的敏感性似較控制紅麴色素生產之酵素為高。

相對於一般的認知，吾人瞭解在利用微生物藉由醱酵過程來生產有用代謝物之產程最適化工作所面臨的問題，主要是缺乏此醱酵過程中關鍵酵素活性，何時因何環境因子之改變而提升抑或何時又因何衰退，對此，本研究的此部份實驗結果僅提出初步的嘗試，本研究說明針對紅麴菌 *M. ruber* 二次代謝產物之生產，適時、適度的降低培養溫度的操作明顯優於一般常用恆溫的醱酵過程；易言之，紅麴菌細胞生長的最佳培養溫度並非其二次代謝產物生產之最佳溫度。

(丙)、溫度循環之紅麴菌醱酵培養實驗(Fermentation of *M. ruber* using temperature-cycling)

此第三部份實驗是以溫度梯度方式進行，其目的是希望能藉由後期將菌株培養溫度再度回復原先所設定的恆溫培養(28°C)，本研究在實驗之初是冀望透過細胞能夠再恢復生長活性(resume its growing activity)來瞭解二次代謝產物可否因而增產。簡言之，在實驗之初吾人預測 monacolin K 生

產量會再次減低，因為本文前述實驗(圖一至圖五)已證實紅麴菌 *M. ruber* 最佳的二次代謝產物生產溫度是在最佳的細胞成長溫度中進行。

依據前述第二部份之變換溫度實驗，結果說明於紅麴菌醱酵的第 0 天就進行降低培養溫度至 23°C 為最佳條件，本研究進一步設計在醱酵後期階段之第 5、7、9 或 11 天時，再將培養溫度由第 0 天之 23°C 提升回復原來的 28°C，藉以偵測 monacolin K、紅麴天然色素之生產與菌體產量是否受此影響，此時的實驗對照組是圖五中的最佳變溫操作(即 28-23°C at day 0)；其結果如圖六所示。圖六(a)則說明利用溫度循環的結果，若在第 5、7、9 或 11 天換溫，在醱酵產程結束時 monacolin K 產量與控制組實驗結果相比，分別被降低了 52%、47%、29% 與 22%，此結果與預期相同(因為溫度升回到菌體最佳生長溫度，即 28°C，而非維持最佳的二次代謝產物生產溫度，即 23°C)，圖六(b)的實驗結果則與預期結果相反；詳細地說，monacolin K 之產量若經由再一次換溫，毋論第二次溫度轉換時機是第 5 天或在更後期之第 11 天，它對二次代謝產物增產皆無任何助益；此時，菌體產量的實驗結果似乎說明：菌體的成長主要只發生在醱酵初期，而在後期(如第 5 天後)溫度升高的刺激並不會促進菌體再次成長，原因可能是細胞生長期已經終止、或因年齡老化將進入穩定期或培養基營養源耗盡等因素；圖六(c)則說明：紅麴菌的色素產量較不受溫度循環操作的影響，再次顯示控制紅麴色素產出的關鍵酵素對培養溫度的敏感性較低，或者說控制紅麴天然色素生產之關鍵酵素有較大範圍的最適溫度區域，基於此推論與圖五結果，吾人合理地推測：紅麴菌中控制 monacolin K 生合成之關鍵酵素活性對溫度的敏感性較紅麴色素之酵素為高，或者說其最適溫度範圍較窄。

圖七則總結本研究實驗之結果：當紅麴菌 *M. ruber* 之生產培養階段是在 23°C 或 28°C 的情況下(註：此兩種培養狀況之種槽階段均是培養在 28°C 下，達 4 天，詳如前實驗材料部份之培養方法的第二步驟所述)，本研究發現在 0~48h 期間該細胞的菌體比成長速率(specific growth rate, 簡稱為 SGR)最快；若在紅麴菌二次代謝產物之生產階段將此菌株培養在 23°C 下，其 SGR 值與 28°C 之值相較，在整個醱酵過程兩者差異有限；而對於產物 monacolin K 生產的比較，28°C 下產物之比生產速率(specific

production rate, 簡稱為 SPR)由第 4 天起, 雖有變動但基本上大約維持一定的比生產量; 但在 23°C 下, monacolin K 之生產則在第 7-10 天此產率之最高值提升為高達四倍之多, 在整個過程中最適操作的 SPR 值皆比 28°C 來的高, 此數據似暗示掌控紅麴菌醱酵生產二次代謝產物 monacolin K 的酵素活性確實是在 23°C 時為最高。

整體而言, 相對一般常用的恆溫培養, 在紅麴菌 *M. ruber* 醱酵生產其二次代謝產物 monacolin K 時, 相對於細胞生長之培養溫度, 若在產物生產階段適度的降低培養溫度, 是可能有效地達到二次代謝產物增產之目的。

肆、結論與建議

本研究證實培養溫度之轉變(temperature-shift)主宰紅麴菌醱酵菌株代謝路徑之走向; 上述實驗證實在代謝產物生產階段之恆溫培養(28°C)、升/降溫測試(18-33°C)與不同時機(timing)之溫度循環(28→23→28°C)等三組實驗, 實驗結果闡明適當的降溫操作確有助於紅麴菌二次代謝物 monacolin K 之生產; 反之, 相對於細胞生長階段之培養溫度(28°C), 若升高培養溫度雖有助於菌體的生長, 但卻減低其二次代謝產物之生合成。具體的說, 本實驗數據證實: 23°C 是最佳生產 monacolin K 生產之紅麴菌菌株培養溫度, 但它卻只是次佳的細胞生長溫度(the sub-optimal temperature for cell growth); 在比較菌體生長與其二次代謝物(如紅麴天然色素與 monacolin K)之產量, 從不同培養溫度之醱酵液 pH 值之變化情形來推測, 本文認為紅麴菌代謝路徑中關鍵酵素之活性高低極可能是受菌株培養溫度瞬間改變之影響, 由於光學顯微鏡之放大倍數有限, 本文於是建議利用電子顯微鏡之菌絲體或菌絲顆粒之觀察可能有助於紅麴菌醱酵過程之進一步瞭解。

簡言之, 本文發現針對紅麴菌 *M. ruber* 二次代謝產物 monacolin K 之生產, 適當的降溫操作明顯優於傳統的恆溫醱酵過程; 另外, 在此紅麴菌培養過程中, 若使用溫循環的二階段溫度轉換試驗, 本實驗結果也說明: 第一、因非處於菌株進行二次代謝之最佳培養溫度, 是故產物 monacolin K 大幅減低; 第二、菌體產量可能因菌株老化或營養源不足以致無法再恢復其生長活性。此外, 在此變溫操作下, 實驗數據說明紅麴天然色素的產量較不受溫度

循環所影響, 它暗示控制紅麴天然色素生產的酵素活性對培養溫度之轉換的敏感性是較低的。

整體來看, 本實驗設計主要雖僅利用簡易的培養溫度因子之轉換, 藉以探討紅麴菌 *M. ruber* 醱酵生產二次代謝產物 monacolin K 之效應, 實驗數據卻證明紅麴菌細胞之最佳生長溫度可能只是該菌株進行二次代謝作用產物生產之次佳培養溫度; 換言之, 一般常用的恆溫培養並非此紅麴菌二次代謝作用的最佳培養條件, 此實驗結果也暗示在紅麴菌二次代謝過程中, 細胞生長的滋養相(trophophase)與二次代謝產物生產的自生相(idiophase)各有其最適之培養溫度, 是故, 本研究結論對醱酵產業實質上發展, 頗具應用潛力。

參考文獻

- [1] 林讚峰, 「紅麴菌研究發展之演進」, 科學農業, 第四十卷, 第三期, 第 193-198 頁(1992)。
- [2] Carels M. and D. Shepherd, "The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture," *Can. J. Microbiol.*, Vol. 23, 1360-1372 (1977).
- [3] Lin T. F. and A. L. Demain, "Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 36, 70-75 (1991).
- [4] Endo A., Y. Negishi, T. Iwashita, K. Mizukawa, and M. Hiramata, "Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K," *J. Antibiot.*, Vol. 28, 444-448 (1985).
- [5] Su Y. C., J. J. Wang, T. T. Lin and T. M. Pan, "Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 30, 41-46 (2003).
- [6] Yamamoto T. K. and Y. Iitak, "Biosynthesis of citrinin in *Aspergillus terreus*," *Tetrahedron*, Vol. 39, 3583-3591 (1983).
- [7] Hajjaj H., P. J. Blanc, E. Groussac, G. Goma, J. Uribelarrea and P. Loubiere, "Improvement of red pigment/ citrinin production ratio as a

- function of environmental conditions by *Monascus ruber*,” *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 64, 497- 501 (1999).
- [8] Brown M. S. and J. L. Goldstein, “Drugs used in the treatment of hyper-lipoproteinemias,” In: Gilman A. G., W. R. Theodore, S. N. Alan and T. Palmer (eds.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (8th edit., Chap. 36), McGraw-Hill, Inc. New York (1991).
- [9] Tobert J. A., “New development in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase,” *Circulation*, Vol. 76, 534-538 (1987).
- [10] Sanchez S. and A.L. Demain, *Metabolic regulation of fermentation processes*. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 31, 895-906 (2002).
- [11] Weinberg E.D., “Secondary metabolism control by temperature and inorganic phosphate,” *Dev. Ind. Microbiol.*, Vol.15, 70-81 (1974).
- [12] Converti A., P. Perego, J.M. Dominguez, and S.S. Silva, “Effect of temperature on the microaerobic metabolism of *Pachysolen tannophilus*,” *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 28, 339-345 (2001).
- [13] Delaunay S., P. Gourdon, P. Lapujade, E. Maily, E. Oriol, J.M. Engasser, N.D. Lindley, J.L. Goergen, An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 25, 762-768 (1999).
- [14] Choi H.K., S.I. Kim, J.S. Son, S.S. Hong, H.S. Lee, and H.J. Lee, “Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis*,” *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 27, 593-598 (2000).
- [15] 蕭明熙, 「真菌代謝物之最近研究趨勢」, 真菌學之最近發展, 國科會生物科學研究中心專刊第十二集, 第 163-183 頁(1985)。
- [16] Griffin D. H., *Fungal Physiology* (2nd edit., Chap 9), Wiley-Liss, Inc. New York (1993).
- [17] Hajjaj H., P. J. Blanc, E. Groussac, J. Uribe Larrea, G. Goma and P. Loubiere, “Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation,” *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 27, 619-625 (2000).
- [18] 賴龍山、楊偉宗、蔡杏怡、陳美琪, 「探討環境因子對紅麴菌生產二次代謝物 monacolin K 之影響」, 臺北科技大學學報, 第三十七之二期, 第237-249頁(2004)。
- [19] 陳彥霖、李昭蓉、陳建州、袁國芳, 「紅麴菌種的研究開發與應用」, 食品工業月刊, 第三十卷, 第七期, 第 1-9 頁(1998)。
- [20] 蘇遠志, 應用微生物學, 國立編譯館, 華香園出版, 第 945-960 頁(1999)。
- [21] 王蘊蘭、洪哲穎、張勝善、簡宏堅、許文輝, 「篩選 *Monascus pilosus* 藥物抗性突變株以獲得 monacolin K 高產菌株」, 中國農業化學會誌, 第三十六卷, 第二期, 第 192-200 頁(1998)。
- [22] 蔡杏怡, 「探討環境因子對紅麴菌生產二次代謝物 monacolin K 之研究」, 碩士論文, 朝陽科技大學應用化學系, 台中 (2003)。
- [23] Chang Y. N., J. C. Huang, C. C. Lee, I. L. Shih and Y. M. Tzeng, “Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*,” *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 30, 889-894 (2002).
- [24] Chen M.-H. and M.R. Jones, “Effects of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.40 132-138 (1993).
- [25] Dubois, M., K.A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, “Colorimetric method for determination of sugars and related substances,” *Anal. Chem.*, Vol.28, 350-56 (1956).

表一、產孢培養基組成分

Components	Concentration (g/L)
PDA	39
Maltose	20
Peptone	1

表二、種槽培養基組成分

Components	Concentration (g/L)
Yeast extract	5
Peptone	1
Glucose	20
Maltose	20

表三、生產培養基組成分

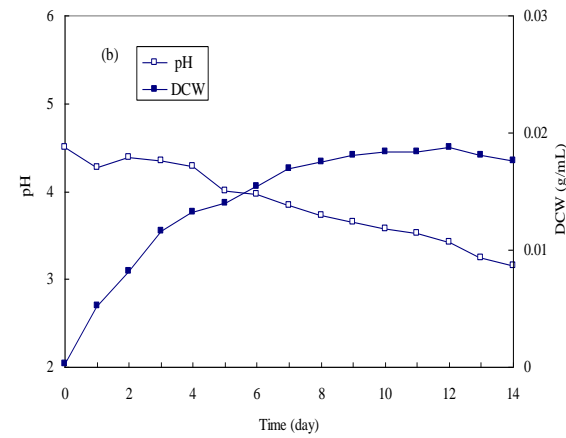
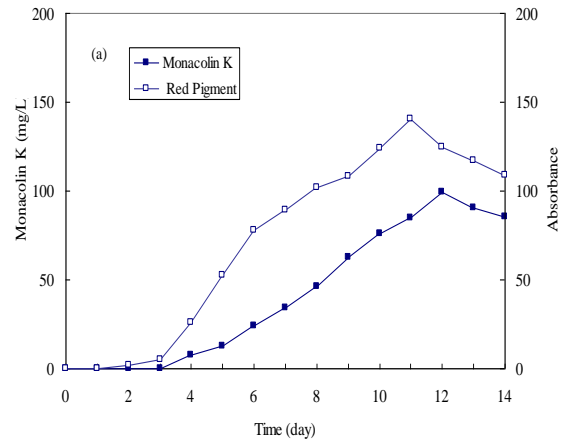
Components	Concentration (g/L)
Rice powder	30
Peptone	8
Glycerol	30
Glucose	110
KNO ₃	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1

(pH 4.0)

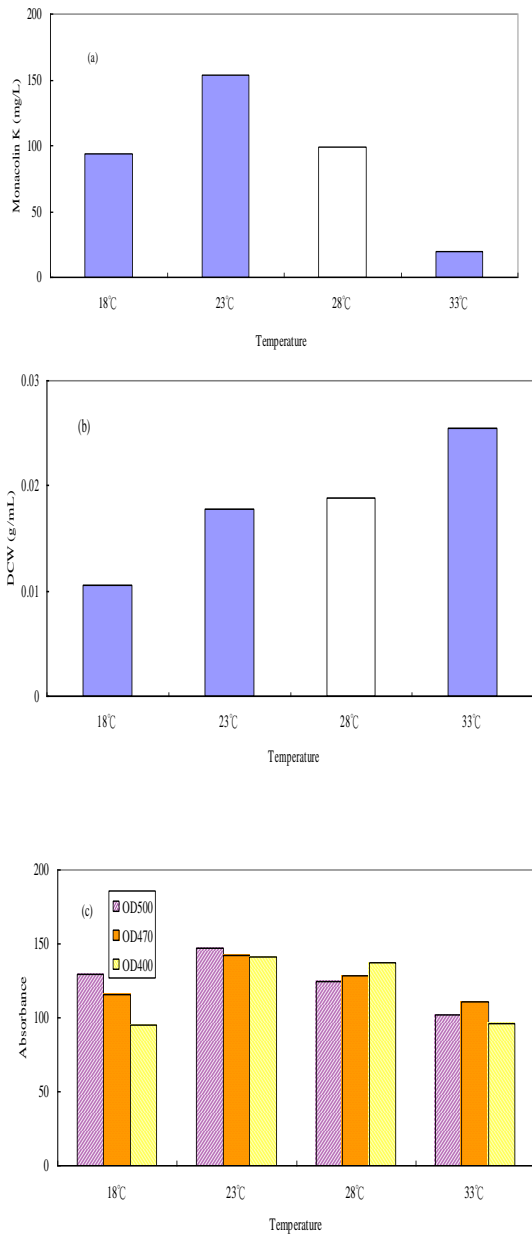
表四、碳源濃度之成分、濃度與二次代謝產物 monacolin K 之相對產量。

No.	Glucose (g/L)	Glycerol (g/L)	Monacolin K production (mg/L)
控制組	110	30	67.86
1	110	88.2	67.99
2	30	30	59.25
3	30	88.2	99.20

(註：除兩成份外，生產培養基(表三)之其他組成份與其濃度，均不改變)

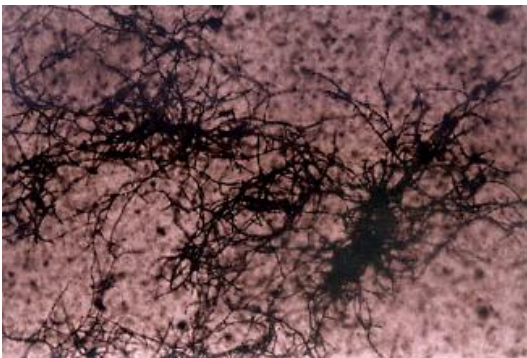


圖一、紅麴菌 *M. ruber* 在 28°C 恆溫培養條件下，monacolin K、紅麴紅色天然色素、pH 值與 DCW 生產之趨勢

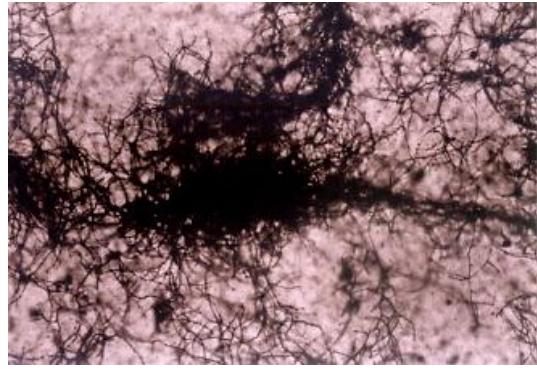


圖二、不同的溫度之恆溫培養對紅麴菌 *M. ruber* 發酵生產 monacolin K、紅麴天然色素(紅色 OD₅₀₀、橙色 OD₄₇₀ 與黃色 OD₄₀₀)與 DCW 產量之影響。

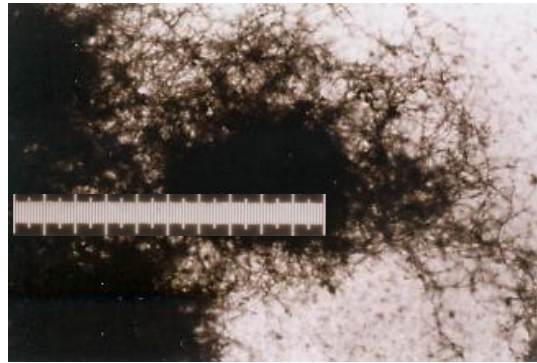
(a)



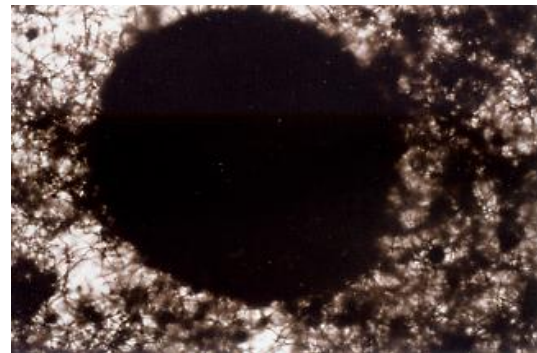
(b)



(c)

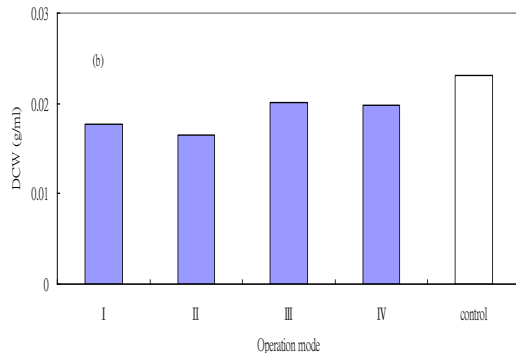
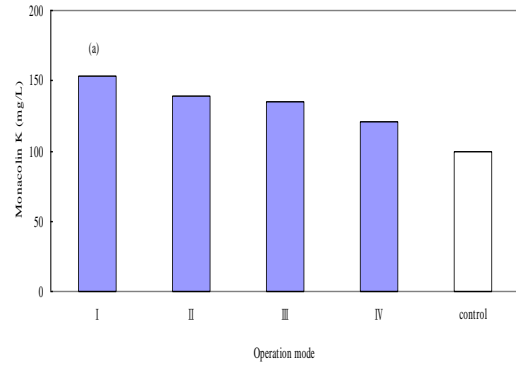
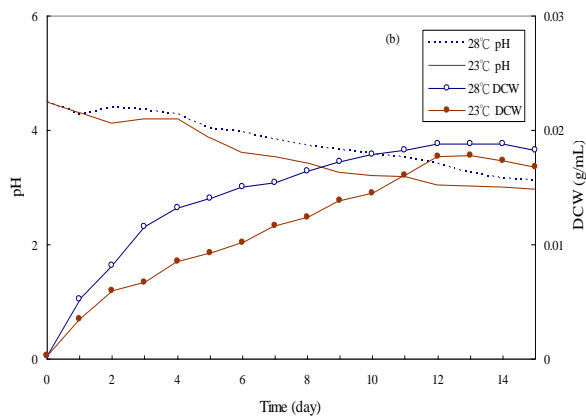
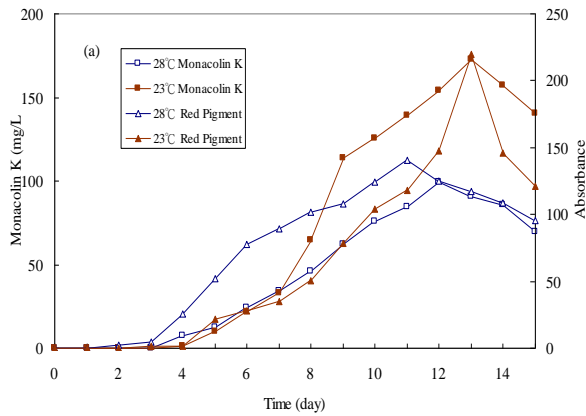


(d)

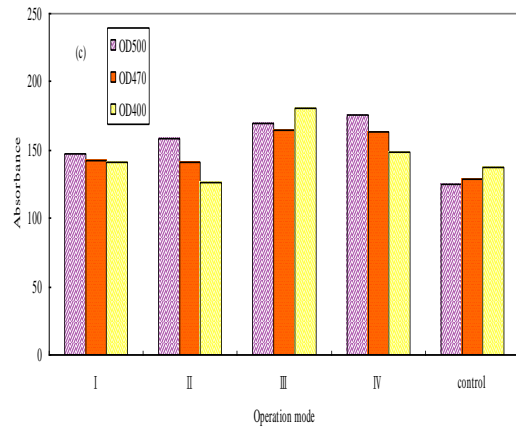


圖三、不同溫度的恆溫培養對紅麴菌 *M. ruber* 發酵過程中菌株增長型態之影響

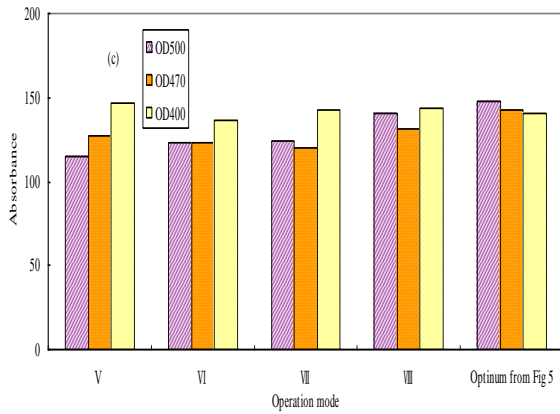
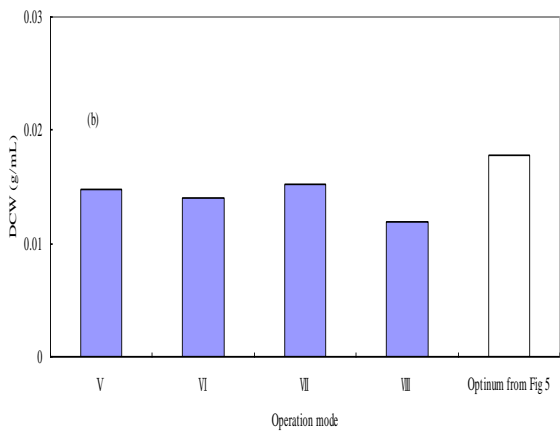
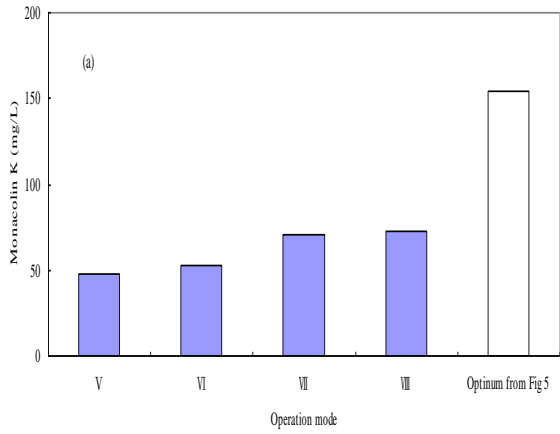
(a)18°C(b)23°C(c)28°C(d)33°C(游標尺總長度為 1 mm，此圖之顯微鏡放大倍率為 40 倍)。



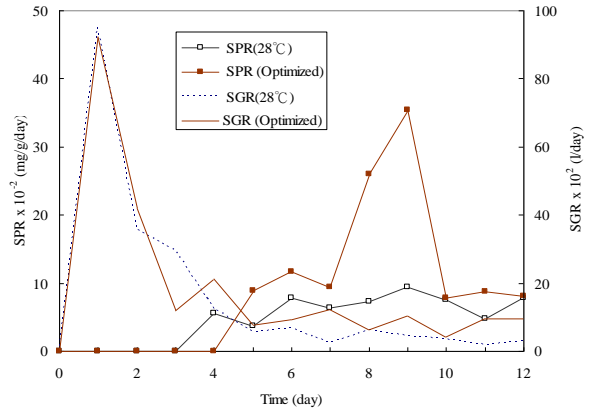
圖四、28°C 與 23°C 之恆溫培養對紅麴菌 *M. ruber* 發酵生產 monacolin K、紅麴紅色天然色素、pH 與 DCW 產量之變化趨勢。



圖五、在生產階段使用溫度轉換(28°C→23°C，分別發生於第 0、1、2 或 3 天)對紅麴菌 *M. ruber* 發酵生產 monacolin K、紅麴天然色素(紅色 OD₅₀₀、橙色 OD₄₇₀ 與黃色 OD₄₀₀)與 DCW 之影響。



圖六、使用溫度循環方式之操作試驗，對紅麴菌 *M. ruber* 生產 monacolin K、紅麴天然色素(紅色 OD₅₀₀、橙色 OD₄₇₀ 與黃色 OD₄₀₀)與 DCW 生產之影響。



圖七、生產培養階段是在 28°C 或 23°C 下(註：此醱酵過程之種槽階段是在 28°C 下)，紅麴菌 *M. ruber* 醱酵過程中產物 monacolin K 之比生產速率 (SPR) 與菌體比成長速率 (SGR) 之生產趨勢圖。