

利用回應曲面法尋求紅麴菌生產膽固醇合成抑制劑之培養基最適化

黃壬章、張耀南

E-mail: 9018742@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究以 *Monascus ruber* CCRC 31535 為生產紅麴菌株，先進行甘油碳源濃度之探討，再利用回應曲面法以尋求白米粉-甘油複合培養基中四種組成分（白米粉、peptone、甘油、葡萄糖）等最適化濃度探討，以期得到最高產量的膽固醇合成抑制劑（monacolin K）。甘油碳源濃度探討之實驗結果顯示，在培養溫度為25℃，白米-甘油複合培養基之起始酸鹼值為pH 5.0，培養體積為25 mL等培養條件下，甘油濃度為26.4 mL/L時，monacolin K的平均產量可達到0.131 mg/mL。本研究亦利用回應曲面法來尋求白米粉-甘油複合式培養基中四種組成分（白米粉、PEPTONE、甘油、葡萄糖）之最適化濃度條件，並分析其對於MONACOLIN K產量之影響，結果發現四種組成分之平方項對MONACOLIN K產量達到顯著之影響（ $P < 0.05$ ）。由回應曲面法尋得最適培養基組成為34.4 G/L白米粉、10.8 G/L PEPTONE、26.4 ML/L甘油、129.2 G/L葡萄糖、2 G/L KNO₃、1 G/L MGSO₄ · 7H₂O。在此組成下，經過十天培養後，可得到本研究MONACOLIN K平均最高產量為0.131 MG/ML，而二階模式預測值則為0.130 MG/ML。此外在回應曲面模式適切性之統計檢驗上，R²為0.876，表示此一回應模式能適切地作為描述實驗數據參考用。

關鍵詞：紅麴菌、膽固醇合成抑制劑、白米-甘油複合培養基、回應曲面法

目錄

第一章 緒論--P1 第二章 文獻回顧--P8 2.1 紅麴菌簡介--P8 2.2 紅麴菌的代謝物--P9 2.2.1 紅麴色素--P9 2.2.2 膽固醇合成抑制劑--P13 2.2.3 其他紅麴代謝物--P22 2.3 紅麴菌在保健食品醫藥上的用途--P23 2.4 紅麴菌的培養--P24 2.5 其它有關紅麴菌的研究--P26 2.6 回應曲面法--P27 2.6.1 回應曲面法之原理--P28 2.7 二水準因子設計--P30 2.8 陡升路徑法--P33 2.9 中心混成設計--P36 2.10 回應曲面模式適切性之統計檢驗--P37 2.11 因子影響效應之分析--P38 第三章 利用回應曲面法尋求紅麴菌生產膽固醇合成抑制劑之培養基最適化--P40 3.1 前言--P40 3.2 材料與方法--P41 3.2.1 試驗材料--P41 3.2.2 儀器設備--P41 3.2.3 培養方法--P42 3.2.4 膽固醇合成抑制劑（monacolin K）之HPLC定量分析--P43 3.3 甘油濃度之測試--P46 3.4 回應曲面法之實驗設計--P46 3.4.1 部分因子之實驗設計--P48 3.4.2 陡升路徑之實驗設計--P48 3.4.3 中心混成實驗設計--P50 3.4.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗--P50 3.5 回應曲面實驗設計法之結果與討論--P50 3.5.1 部分因子設計實驗--P54 3.5.2 陡升路徑實驗--P54 3.5.3 中心混成設計實驗--P57 3.5.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗--P74 第四章 結論與展望--P77 參考文獻--P79 附錄--P87

參考文獻

- 1.王雲萍、張永吉（1996），文明產物 - 降血脂劑LOVASTATIN。甲、化工資訊，10（4）:53-57。
- 2.王英凱、林仁混（1999），紅麴降血脂作用之探討與紅麴活性成分LOVASTATIN及天然藥物類黃素抗癌細胞轉移與引發細胞凋亡機制之研究。國立台灣大學生化學研究所博士論文。
- 3.李昌憲、洪哲穎、熊光濱（1992），利用回應曲面法進行以STREPTOCOCCUS FAECALIS生產酪氨酸脫 胺酵素之培養基最適化研究。中國農業化學會誌，31:28-34。
- 4.李琇鈴、周正俊、吳淳美（1993），利用回應曲面法尋求STREPTOCOCCUS FAECALIS產生 g-DECALAC -TONE之最適條件。中國農業化學會誌，31:28-34。
- 5.李昭蓉（1997），漫談紅麴菌。食品工業月刊，29(2):86-89。
- 6.杜姿瑩（2000），具調節血脂功能的機能性食品漫談。食品工業月刊，32(10):23-32。
- 7.林怡昌、張耀南（1998），紅麴菌生產膽固醇合成抑制劑搖瓶培養條件之探討。大葉大學食品工程 研究所碩士論文。
- 8.林俊宏、曾耀銘（1998），備製含紅麴菌膽固醇合成抑制劑-MONACOLIN K健康酒之研究。國立東華 大學生物技術研究所碩士論文。
- 9.林讚峰（1982），紅麴菌研究發展之演進。製酒科技專論彙編，第四期，66-77。
- 10.林讚峰、黃正財（1983），紅麴菌釀造性質之研究（一）澱粉水解酵素。酒類試驗所研究年報72年度，157-167。
- 11.林讚峰（1983），紅麴菌之鑑定及實用分類法。製酒科技專論彙編，第五期，104-113。
- 12.林讚峰（1985），紅麴菌的次級代謝物聚克呋代謝。製酒科技專論彙編，第7期，170-187。
- 13.林讚峰（1986），紅麴菌級代謝物的經濟性評估及增產策略。製酒科技專論彙編，第8期，81-99。
- 14.林讚峰（1987），利用紅麴菌產生膽固醇合成抑制劑。酒類試驗所研究年報76年度，157-164。
- 15.林讚峰（1992 A），紅麴菌在保健食品上的新用途。食品工業，24（10）:41-45。
- 16.林讚峰（1992 B）紅麴菌研究發展之演進。科學農業，40（3-4）:193-198。
- 17.邱健人（1985），紅露酒之製法。食品科學文摘，5(7):41-42。
- 18.洪哲穎、陳國誠（1992），回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用，39（2）:3-18。
- 19.洪哲穎（1998），回應曲面品質工程技術。工業局八十八年度人才培訓計畫研習班，1998年11月，私立義守大學，高雄縣大樹鄉。
- 20.哈伯氏生物化學（1999），藝軒圖書出版社，第22版:317-331。
- 21.陳彥霖（2000），紅麴與高血壓。食品工業月刊，32(12):55-59。
- 22.黃顯宗（1985），紅麴菌研究之回顧與展望。真菌學之最近發展

(曾聰徹、陳瑞青主編) 109-124。國科會生物科學研究中心專刊 第十二集, 台北。23.劉繼賢, 廖啟成 (1994), 利用回應曲面法尋求以CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM生產苯丙氨酸之培養基之最適化研究。中國農業化學會誌, 32 (2) :149-155。24.蕭明熙 (1985), 真菌代謝物之最新研究趨勢。真菌學之最近發展 (曾聰徹、陳瑞青主編) 163-183。國科會生物科學研究中心專刊第十二集, 台北。25.謝鳳龍、黃育輝、陳亮尹、張耀南、曾耀銘 (1997), 利用紅麴菌 (MONASCUS PILOSUS) 產生膽固醇合成抑制劑之搖瓶培養條件探討。中國化學會86年年會, NO.P-2-BI-010, P240。26.謝鳳龍、黃育輝、張耀南、曾耀銘 (1998), 利用紅麴菌 (MONASCUS PILOSUS) 生產膽固醇合成抑制劑之固-液態培養條件探討。第三屆生化工程研討會, P133-136, 1998年6月27-28日, 國立東華大學, 花蓮縣壽豐鄉。27.蘇遠志與黃世佑 (1999), 微生物化學工程學。華香園出版社。28. ALBERT, A. W., C. CHEN, G. KURON, V. HUFF, C. HOFFMAN, J. ROTHROCK, M. LOPEZ, H. JOSH -UA, E. HARRIS, A. PATCHETT, R. MONAGHAN, S. CURRIE, E. STAPLEY, G. ALBERTS-SCHONBERG, O. HENSENS, J. HIRSHFIELD, K. HOOGSTEEN, J. LIESCH, AND J. SPRINGER, 1980, MEVINOLIN: A HIGHLY POTENT COMPETITIVE INHIBITOR OF HYDROXYMETHYL-GLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE AND A CHOLESTEROL-LOWERING AGENT. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMIC SCIENCE, USA, 77 : 3957-3961。29. BOTA, A., F. J. GELLA, AND F. CANALIAS, 2000, OPTIMIZATION OF ADENOSINE DEAMINASE ASSAY BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. CLINICA CHIMICA ACTA 290: 145-157。30. BOX, G. E. P., AND K. B. WILSON, 1951, ON THE EXPERIMENTAL ATTAINMENT OPTIMUM CONDITION -S. J. ROY. STANT. SOC., B13:1-45。31. BROWN, M. S., AND J. L. GOLDSTEIN, 1984, HOW LDL RECEPTORS INFLUENCE CHOLESTEROL AND AT -HEROSCLEROSIS. SCIENTIFIC AMERICAN, 251(5) : 52-60。32. BUCHANAN, R. L., AND J. G. PHILIPS, 1990, RESPONSE SURFACE MODEL FOR PREICTING THE EFFE -CTS OF TEMPERATURE, PH, SODIUM CHLORIDE CONTENT, SODIUM NITRITE CONCENTRATION AND ATM -OSPHERE ON THE GROWTH OF LISTERIA MONOCUTOGENES. J. FOOD PTOTECT., 53 : 370-376。33. CHAN, J. K., R. N. MOORE, T. T. NAKASHIMA, AND J. C. VEDERAS, 1983, BIOSYNTHESIS OF ME -VINOLIN (SPECTRAL ASSIGNMENT BY DOUBLE-QUANTUM COHERENCE NMR AFTER HIGH CARBON-13 IN CORPORATION). J. AM. CHEM. SOC., 105:3334-3335。34. DULIU, O.V.G., M. FERDES, AND O. S. FERDES, 2000, EPR IDENTIFICATION OF IRRADIATED MON -ASCUS PURPUREUS RED PIGMENT. RADIATION PHYSICS AND CHEMISTRY 57: 97-101。35. ENDO, A., 1979, MONACOLIN K, A NEW HYPOCHOLESTEROLEMIC AGENT PRODUCED BY MONASCUS SPECI -ES. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 32 : 852-854。36. ENDO, A., K. HASUMI, AND S. NEGISHI, 1985A, MONACOLINS J AND L, NEW INHIBITORS OF CHOL -ESTEROL BIOSYNTHESIS PRODUCED BY MONASCUS RUBER. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 38: 420- 422。37. ENDO, A., Y. NEGISHI, T. IWASHITA, K. MIZUKAWA, AND M. HIRAMA, 1985B, BIOSYNTHESIS OF ML-236B (COMPACTIN) AND MONACOLIN K. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 28: 444-448。38. ENDO, A., D. KOMAGATA, AND H. SHIMADA, 1986, MONACOLIN M, A NEW INHIBITOR OF CHOLESTER -OL BIOSYNTHESIS. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 39: 1670-1673。39. FEARS, R., 1983, PHARMACOLOGICAL CONTROL OF 3-HYDROXY-3-METHYL-甲、 GLUTARYL COENZYME A REDUCTASE. IN 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE, SABINE, J. R., ED, 189 -208, CRC PRESS, INC., BOCA RATON。40. GUERRERO, S., S. M. ALZAMORA, L. N. GERSCHENSON, 1996, OPTIMIZATION OF A COMBINED FACT -ORS TECHNOLOGY FOR PRESERVING BANANA PUREE TO MINIMIZE COLOUR CHANGES USING THE RESPO -NSE SURFACE METHODOLOGY. JOURNAL OF FOOD ENGINEERING 28:307-322。41. HALTRICH, D., M. PRESS, AND W. STEINER, 1993, OPTIMIZATION OF A CULTURE MEDIUM FOR INCR -EASED XYLANASE PRODUCTION BY A WILD STRAIN OF SCHIZOPHYLLUM COMMUNE. ENZYME MICROB. TEC -HNOL. 15 : 854-860。42. HAWKSWORTH D. L., AND J. I. PITT, 1983, A NEW TAXONOMY FOR MONASCUS SPECIES BASED ON CUL -TURAL AND MICROSCOPICAL CHARACTERS. AUST. J. BOT. 31 : 51-61。43. JUZLOVA, P., L. GOLDSTEIN, AND M. S. BROWN, 1990, REGULATION OF THE MEVALONATE PATHWAY. NATURE, 343:425-430。44. JUZLOVA, P., L. MARTINKOVA, AND V. KREN, 1996, SECONDARY METABOLITES OF THE FUNGUS MON -ASCUS: A REVIEW. J. IND. MICROBIOL., 16:163-170。45. KAUTOLA, H., AND Y. Y. LINKO. 1989. FUMARIC ACID PRODUCTION FROM XYLOSE BY IMMOBILIZED RHIZOPUS ARRHZISUS CELLS. APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 31 : 448-452。46. KIMURA, K., D. KOMAGATA, S. MURAKAWA, AND A. ENDO, 1990, BIOSYNTHESIS OF MONACOLINS: CONVERSION OF MONACOLIN J TO MONACOLIN K (MEVIOLIN). J. ANTIBIOTICS, 43 (12):1621-1622。47. MADDOX, I. S., AND S. H. RICHERT, 1977, PRODUCTION OF GIBBERELLIC ACID USING A DAIRY WASTE AS THE BASAL MEDIUM. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 33 : 201-202。48. MUDAHAR, S., R. T. TOLEDO, J. D. FLORES, AND J. J. JEN, 1989, OPTIMIZATION OF CARROT DEHYDRATION PROCESS USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. J. FOOD SCI., 54 : 714-719。49. MONTGOMERY, D. C., 1997, DESIGN AND ANALYSIS OF EXPERIMENT (THE 4TH EDITION) , JOHN WILEY & SONS, NEW YORK, USA。50. NIL, 1995 A, SSRI: UNPRECEDENTED US GROWTH, SCRIP, 2024 : 23。51. NIL, 1995 B, YEN EFFECT ON JAPAN'S PHARMA MARKET, SCRIP, 2023 : 22。52. NIL, 1996, TOP 10 DRUGS IN EUROPE, SCRIP, 2120 : 23。53. PRAPULLA, S. G., S. JACOB, N. CHAND, D. RAJALAKSHMI, AND N. G. KARANTH, 1992, MAXIMIZAT -ION OF LIPID PRODUCTION BY RHODOTROULA GRACILIS CFR-A USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. BIOTECH. BIOENG., 40 : 965-969。54. SHIEH, C.J., C.C. AKOH, AND P.E. KOEHLER, 1996, FORMULATION AND OPTIMIZATION OF SUCROSE POLYESTER PHYSICAL PROPERTIES BY MIXTURE RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. JAOCS, 73(4): 455-460。55. WOJCIK, C., B. MARCIN, S. TOMASZ, AND G. ADAM, 2000, LOVASTATIN AND SIMVASTATIN ARE MODULATORS OF THE PROTEASOME. THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIO -LOGY, 32:957-965。