



# 高产色素和洛伐他汀红曲菌株的 筛选、鉴定及发酵条件研究

高 婷, 任珂瑶, 张舒婷, 张静雅, 赵洪新

(浙江理工大学, a. 生命科学与医药学院; b. 浙江省植物与次生代谢重点实验室, 杭州 310018)

**摘 要:** 红曲色素(*Monascus* pigments, MPs)和洛伐他汀(Lovastatin)是两种具有极高营养、保健和药用价值的红曲菌代谢产物, 寻找挖掘高产 MPs 和洛伐他汀的红曲菌, 具有重要实践意义。从土样中分离得到红曲菌 A1 和 A2, 在对其进行分类鉴定的基础上, 采用分光光度法对 MPs 的色价和洛伐他汀含量进行测定, 并通过单因素和正交试验对发酵培养基进行了优化。结果表明: 菌株 A1 和 A2 隶属于紫色红曲菌(*Monascus purpureus*)。在基础培养基中, 菌株 A1 和 A2 的 MPs 色价分别为 3287.11、2561.30 U/g, 洛伐他汀含量为 31.35、33.74  $\mu\text{g/mL}$ 。通过  $L_{16}(4^5)$  正交试验优化培养基, 获得产 MPs 最优配方为乳糖 20 g/L、 $\text{KNO}_3$  5 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L、KCl 2 g/L、 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  2 g/L, 产洛伐他汀最优配方为乳糖 20 g/L、 $\text{KNO}_3$  15 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L、KCl 6 g/L、 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  4 g/L。在最优培养基中 A1 菌株总色价可达 15851.98 U/g, 提高了 3.82 倍, 洛伐他汀含量为 122.96  $\mu\text{g/mL}$ , 提高了 2.92 倍; A2 菌株总色价为 8933.58 U/g, 提高了 2.49 倍, 洛伐他汀含量达 198.26  $\mu\text{g/mL}$ , 提高了 4.88 倍。该本文为红曲菌资源库提供了优秀潜力菌株, 为工业上大规模生产 MPs 和洛伐他汀奠定了理论基础并提供了实际方案。

**关键词:** 红曲菌; 红曲色素; 洛伐他汀; 鉴定; 发酵条件

**中图分类号:** Q939.9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851 (2024)09-0725-09

**引文格式:** 高婷, 任珂瑶, 张舒婷, 等. 高产色素和洛伐他汀红曲菌株的筛选、鉴定及发酵条件研究[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2024, 51(5): 725-733.

**Reference Format:** GAO Ting, REN Keyao, ZHANG Shuting, et al. Research on the screening, identification, and fermentation conditions of high-yield *Monascus* strains for pigments and lovastatin[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2024, 51(5): 725-733.

## Research on the screening, identification, and fermentation conditions of high-yield *Monascus* strains for pigments and lovastatin

GAO Ting, REN Keyao, ZHANG Shuting, ZHANG Jingya, ZHAO Hongxin

(a. College of Life Sciences and Medicine; b. Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation of Zhejiang Province, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** *Monascus* pigments (MPs) and lovastatin are two highly valuable metabolites of *Monascus* with significant nutritional, healthcare and medicinal benefits, and exploring high-yield *Monascus* strains for MPs and lovastatin is of significant practical importance. Strains A1 and A2 of *Monascus* were isolated from soil samples. Based on their classification and identification, spectrophotometry was employed to quantify the pigment value and lovastatin content of MPs and lovastatin. Subsequently, single-factor and orthogonal experiments were conducted to optimize the fermentation medium for these two strains. Results indicated that strains A1 and A2 belonged to *Monascus purpureus*. In the basal medium, the MPs pigment value produced by strains A1 and A2 reached 3287.11 U/g and 2561.30 U/g, respectively, while

收稿日期: 2024-03-29 网络出版日期: 2024-07-22

基金项目: 企业委托研发项目(19040097-J)

作者简介: 高 婷(1996—), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物学方面的研究。

通信作者: 赵洪新, E-mail: bxxbj2003@gmail.com

lovastatin content was 31.35  $\mu\text{g/mL}$  and 33.74  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The medium was optimized by  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiments, and the optimal medium formulation for MPs production required lactose of 20 g/L,  $\text{KNO}_3$  of 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  of 4 g/L, KCl of 2 g/L, and  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  of 2 g/L, while the optimal formulation for lovastatin production required lactose of 20 g/L,  $\text{KNO}_3$  of 15 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  of 2 g/L, KCl of 6 g/L, and  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  of 4 g/L. In the optimal medium, the MPs pigment value of strain A1 reached 15851.98 U/g, an increase of 3.82 times, and the lovastatin yield was 122.96  $\mu\text{g/mL}$ , an increase of 2.92 times. For strain A2, the MPs pigment value was 8933.58 U/g, an increase of 2.49 times, and the lovastatin yield reached 198.26  $\mu\text{g/mL}$ , an increase of 4.88 times. This study provides potential high-yield strains for the *Monascus* strain repository and lays a theoretical foundation and offers practical solutions for the industrial-scale dual production of MPs and lovastatin.

**Key words:** *Monascus*; *Monascus* pigment; lovastatin; identification; fermentation condition

# 0 引言

红曲霉(*Monascus*)又称红曲菌,是重要的药食两用微生物资源之一,该菌的发酵产品——红曲在中国已有近两千年的应用历史<sup>[1-2]</sup>。红曲菌隶属于真菌门、真子囊菌纲、散囊菌目、红曲科、红曲霉属,是一种典型的丝状真菌,用于生产的主要种类有安卡红曲菌(*M. anka*)、丛毛红曲菌(*M. pilosus*)、红色红曲菌(*M. ruber*)和紫色红曲菌(*M. purpureus*)<sup>[3]</sup>。红曲菌可以合成多种对人体有益的次生代谢产物,如红曲色素(*M. pigments*, MPs)、洛伐他汀(Lovastatin,又名 Monacolin K)和 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -Aminobutyric acid, GABA)等<sup>[4-5]</sup>。

MPs 是多种聚酮化合物的混合物,主要分为红、橙、黄三类色素<sup>[5]</sup>,已被证明具有多种生物学功能<sup>[6]</sup>。MPs 具有广谱的抗菌活性<sup>[7-8]</sup>。Tan 等<sup>[9]</sup>发现水溶性天然红曲菌黄色素具有显著改善的抗氧化活性,Choe 等<sup>[10]</sup>通过胺化反应合成了具有抗炎活性的各种橙色色素衍生物;Su 等<sup>[11]</sup>研究发现,红曲黄色素 Ankaflavin 可以诱导人体的肝癌细胞 HepG2 和肺癌细胞 A549 凋亡。因此,MPs 不仅仅作为一种着色剂,还拥有多种生物学功能,如抗菌、抗氧化、抗炎以及抗癌作用等,已经在食品、化妆品、医药、纺织、染料、化工等领域被广泛应用<sup>[12]</sup>,是一种极具开发价值的天然色素。

洛伐他汀最初是从红色红曲菌和土曲霉(*Aspergillus terreus*)代谢产物中分离出来的一种物质,有酸型和内脂型两种结构形态,具有多种对人体有益的功效和作用<sup>[13]</sup>。红曲菌产生的洛伐他汀具有良好的降胆固醇、降血脂、抗炎和神经保护等作用<sup>[14-19]</sup>,众多体外研究证明,洛伐他汀对结直肠癌、乳腺癌、胃癌和肺癌等种类的癌细胞均展现显著的抑制效果<sup>[20-22]</sup>。因此,洛伐他汀具有多重功效,除了

作为降脂治疗的首选药物,具有较大的潜在价值和良好的应用前景。

近年来,有不少关于红曲菌发酵条件优化的报道,如:蒋冬花等<sup>[23]</sup>从红曲米中分离筛选得到 1 株红曲菌,对其进行发酵条件优化,红曲米色价达 5340.4 U/g。袁天慧等<sup>[24]</sup>优化了紫色红曲菌 FDSJA-01 的液态发酵生产工艺参数,发酵后红、橙、黄色素含量分别为 3454.9、3746.7 U/g 和 3295.8 U/g,分别比优化前提高了 4.6、4.7 和 3.4 倍,总色价提高了 4.2 倍。唐旭等<sup>[25]</sup>和毛继龙等<sup>[26]</sup>通过优化液态发酵条件后,洛伐他汀产量分别达到 79.83、173.60 mg/L。目前市面上红曲菌发酵生产的 MPs 和洛伐他汀产量不高,且能够同时高产 MPs 和洛伐他汀的红曲菌较少。因此,继续寻找在生产应用中性能更好的菌株,并提高其发酵生产水平一直是研究者关注的一个重要研究方向。

本文采用菌落形态观察和 ITS rDNA 序列分析对分离得到的红曲菌进行分类鉴定,再对筛选出的目标菌株通过单因素和正交试验进行培养基成分的优化,旨在为 MPs 和洛伐他汀的大规模工业化生产提供优秀菌株和发酵工艺参考。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 出发菌种

从自然土样中分离得到的 4 株红曲菌 A1、A2、B2 和 B4,由浙江理工大学微生物实验室保藏。

### 1.1.2 主要培养基配方

本文所用部分培养基的配制参考 Agboyibor<sup>[27]</sup>的配方,具体如下:

PDA 培养基:马铃薯浸出粉 6.00 g/L,葡萄糖 20.00 g/L,琼脂 20 g/L,pH 值 6。

种子培养基:葡萄糖 30.00 g/L,蛋白胨

10.00 g/L, 酵母提取物 3.00 g/L,  $\text{NaNO}_3$  2.00 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.00 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.00 g/L,  $\text{KCl}$  0.50 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L, pH 值 6。

基础培养基: 葡萄糖 20.00 g/L,  $\text{NaNO}_3$  2.00 g/L,  $\text{KCl}$  0.50 g/L, pH 值 6。

色素培养基: 乳糖 20.00 g/L,  $\text{KNO}_3$  5.00 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.00 g/L,  $\text{KCl}$  2.00 g/L,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  2.00 g/L, pH 值 6。

洛伐他汀培养基: 乳糖 20.00 g/L,  $\text{KNO}_3$  15.00 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.00 g/L,  $\text{KCl}$  6.00 g/L,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  4.00 g/L, pH 值 6。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 红曲菌的分离纯化

将采集的土壤样品通过 10 倍稀释法梯度稀释后, 取 100  $\mu\text{L}$  涂布接种于 PDA 培养基上, 30  $^\circ\text{C}$  培养 5~7 d, 取单菌落经 3 次纯化得到纯菌株, 编号并保存于甘油管中。

### 1.2.2 培养方法

液体种子培养: 用 PDA 上培养 5~7 d 的红曲菌制作浓度控制在  $10^7$  个/mL 浓度的孢子悬液, 按 5% 的接种量接种于 100 mL/250 mL 种子培养基中, 置于恒温摇床上, 于 30  $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 3 d。

液体发酵培养: 在 100 mL 三角瓶中装入 40 mL 发酵培养基和 8 颗 5 mm 玻璃珠, 按 5% 的接种量将种子液接入发酵培养基, 于 30  $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 7 d。

### 1.2.3 红曲菌目的菌株的鉴定

a) 形态特征。将菌接种于 PDA 培养基, 在 30  $^\circ\text{C}$  条件下培养 5 d, 观察菌落特征, 包括大小、颜色、表面质地、边缘等。采用载片培养法在 30  $^\circ\text{C}$  条件下菌株培养 7 d, 高倍镜下观察菌株的菌丝、孢子和闭囊壳等结构。

b) ITS 区域序列和系统发育树。将红曲菌接种到种子培养基中 30  $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 5 d, 发酵液经过滤获得菌丝球用液氮冷冻后磨碎。采用真菌 DNA 试剂盒提取其基因组 DNA, 再利用真菌通用引物对 ITS1 和 ITS4 扩增 ITS rDNA 基因, 送上海生物工程公司测序。最后通过 BLAST 程序与 GenBank 核酸数据库分析 ITS rDNA 序列的同源性, MEGA11 构建系统发育树, 确定红曲菌目的菌株的分类地位<sup>[28]</sup>。

### 1.2.4 高产色素红曲菌的筛选

发酵液色价测定: 参考 Zhen 等<sup>[29]</sup> 和黄艳<sup>[30]</sup> 采用的方法提取 MPs、测定 MPs 色价。称取干菌丝

0.05 g, 加 10.00 mL 70% 乙醇溶液, 通过超声处理破坏细胞, 60  $^\circ\text{C}$  水浴 1 h, 经定性滤纸过滤后取上清液用分光光度法分别在 410、465 nm 和 505 nm 处测量其吸光度来测定黄色、橙色和红色 3 种 MPs。通过计算吸光度和稀释度对 MPs 进行定量分析, 并以每克干菌丝体的吸光度单位 (U/g) 表示, 筛选出高产 MPs 的红曲菌, 按式(1)计算 MPs 色价:

$$\begin{cases} X_1 = OD_{505} \times D_1 \times 20, \\ X_2 = OD_{465} \times D_2 \times 20, \\ X_3 = OD_{410} \times D_3 \times 20 \end{cases} \quad (1)$$

其中:  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  分别对应红、橙、黄色价;  $D_1$ 、 $D_2$ 、 $D_3$  分别为红、橙、黄色价对应的发酵液稀释倍数。

### 1.2.5 高产洛伐他汀红曲菌的筛选

a) 洛伐他汀标准曲线的制备: 参考文镜等<sup>[31]</sup> 采用的方法配制洛伐他汀标准品溶液, 绘制洛伐他汀标准曲线。称取 3.2 mg 洛伐他汀标准品溶于 50.0 mL 70% 乙醇, 配制成质量浓度为 64.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液, 分别量取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0 mL 和 9.0 mL 定容到 10.0 mL, 使其质量浓度分别为 3.2、6.4、12.8、19.2、25.6、32.0、38.4、51.2、57.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 64.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 根据标准曲线方程求出对应  $\Delta A (OD_{246} - OD_{254})$  的洛伐他汀含量。

b) 洛伐他汀含量测定: 采用双波长紫外分光光度法测定洛伐他汀含量<sup>[31]</sup>, 具体如下: 量取发酵液 6.25 mL 至 50.00 mL 离心管中, 用 70% 乙醇定容至 25.00 mL, 颠倒均匀后置于 55  $^\circ\text{C}$  恒温水浴锅中 1 h, 最后冷却至室温。发酵液经定性滤纸过滤, 滤液用 70% 乙醇稀释适当倍数, 并以 70% 乙醇为对照, 用分光光度法在对应波长下测定 OD 值。

### 1.2.6 单因素优化碳源、氮源和无机盐对色素和洛伐他汀产量的影响

a) 碳源。以基础培养基为对照, 分别加入质量浓度 20 g/L 的蔗糖、乳糖、麦芽糖、甘油、淀粉代替基础培养基中的葡萄糖, 每个处理设置 3 个重复, 进行液体发酵培养, 测定 MPs 色价和洛伐他汀含量, 分析碳源种类对 MPs 和洛伐他汀合成的影响。确定最优碳源后, 采用不同碳源质量浓度的培养基进行液体发酵培养, 每个处理设置 3 个重复, 测定 MPs 色价和洛伐他汀含量, 考察碳源质量浓度对 MPs 和洛伐他汀合成的影响。

b) 氮源。在确定最优碳源的基础上, 进一步优化氮源。以基础培养基为对照, 分别加入质量浓度



2 g/L 的(NH 瘙吃)瘙肝 SO 瘙吃、NH<sub>4</sub>Cl、CO(NH 瘙肝)瘙肝、蛋白胨、KNO<sub>3</sub> 代替基础培养基中的 NaNO<sub>3</sub>,每个处理设置 3 个重复,进行液体发酵培养。确定最优氮源后,采用不同氮源质量浓度的培养基进行液体发酵培养,每个处理设置 3 个重复,测定 MPs 色价和洛伐他汀含量,考察不同质量浓度对 MPs 和洛伐他汀合成的影响。

c)无机盐。在最佳碳源和氮源的基础上,以基础培养基为对照,分别在培养基中添加质量浓度 0.5 g/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、KCl、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 进行液体发酵培养,每个处理设置

3 个重复。确定最优无机盐后,采用不同的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KCl 和 Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 质量浓度的培养基进行液体发酵培养,每个处理设置 3 个重复,测定 MPs 色价和洛伐他汀含量,考察不同质量浓度对 MPs 和洛伐他汀合成的影响。

### 1. 2. 7 正交试验

通过碳源、氮源和无机盐的单因素试验筛选出最佳碳源、氮源和无机盐,并通过正交试验,确定各因素的最佳配比。正交实验设计表如表 1,采用 5 因素 4 水平 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)的正交表,以总色价和洛伐他汀产量为效应值,每个处理设置 3 个重复。

表 1 正交实验设计表

水平	因素				
	A	B	C	D	E
	乳糖质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	KNO <sub>3</sub> 质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	KCl 质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> 质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )
1	10	0	0	2	1
2	20	5	1	4	2
3	40	10	2	6	4
4	60	15	4	8	6

### 1. 2. 8 统计分析

所有数据都是以平均值±SD 表示 3 个独立实验的平均值,采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差 ANOVA 检验、Duncan 检验和 LSD 检验。当  $p < 0.05$  时,差异显著, $p < 0.01$  时,差异为极显著。采用 Origin 2022 进行作图,ImageJ 进行图片处理。

## 2 结果与讨论

### 2. 1 高产色素和洛伐他汀红曲菌的分离纯化与筛选

以不同质量浓度的洛伐他汀标准品为横坐标,双波长紫外分光光度法测定的洛伐他汀吸光度差值为纵坐标,绘制得到洛伐他汀标准曲线:  $y = 0.0347x + 0.0420$ ,相关系数  $R^2 = 0.9990$ 。用分光光度法测定了 4 株红曲菌的色价和洛伐他汀含量,结果如图 1 所示。由图 1 可知:不同红曲菌的总色价和洛伐他汀含量均存在显著差异,色价范围为 931.35~3165.43 U/g,洛伐他汀含量范围为 19.55~32.55 μg/mL。其中红曲菌 A1 的 MPs 总色价最高,为 3165.43 U/g;红曲菌 A2 的洛伐他汀含量最高,为 32.55 μg/mL;红曲菌 A1 的红色价和橙色价最高,分别为 1168.41、896.99 U/g;红曲菌 B2 的黄色价最高,为 1138.17 U/g。因此后续选取 A1 和 A2 红曲菌为进一步研究的对象。

### 2. 2 红曲菌目的菌株的分类鉴定

#### 2. 2. 1 形态特征

PDA 培养基中 2 个菌株的单菌落形态如图 2。图 2 表明:菌株气生菌丝致密,橘红色呈绒毛状,背面均有辐射状;A1 菌落中间裂开,边缘不整齐,A2 菌落中间无裂缝,边缘整齐。显微镜下观察红曲菌 A1 和 A2 显微形态特征如图 3。由图 3 可知:A1 和 A2 菌丝透明有横隔和色素颗粒,分生孢子着生于菌丝分枝顶端呈球形或椭球形;闭囊壳球形,囊内孢子可见,子囊孢子球形。参照李钟庆等<sup>[32]</sup>提出的分类方法,A1 和 A2 菌株单菌落形态和显微形态符合红曲菌的基本特征,2 株菌株可初步鉴定为红曲菌属 (*Monascus* spp.)。

#### 2. 2. 2 ITS 区域序列和系统发育树

红曲菌 A1 和 A2 菌株 rDNA-ITS 基因 PCR 扩增的 ITS rDNA 基因序列建立的系统进化树如图 4 所示。结合红曲菌 A1 和 A2 菌株形态特征、NCBI (National Center for Biotechnology Information)中 ITS rDNA 基因序列的 blast 比对情形以及系统进化树的构建,确定 A1 和 A2 菌株均为紫色红曲菌 (*Monascus purpureus*)。

### 2. 3 目的菌株培养基优化

2. 3. 1 不同碳源对色素和洛伐他汀产量的影响  
不同碳源对 MPs 和洛伐他汀产量的影响见

表 2。表 2 显示:以乳糖作为培养基时,总色价和洛伐他汀质量浓度均达到最高,分别为 8045.66 U/g、52.63 μg/mL,故 A1 菌株最适碳源为乳糖。

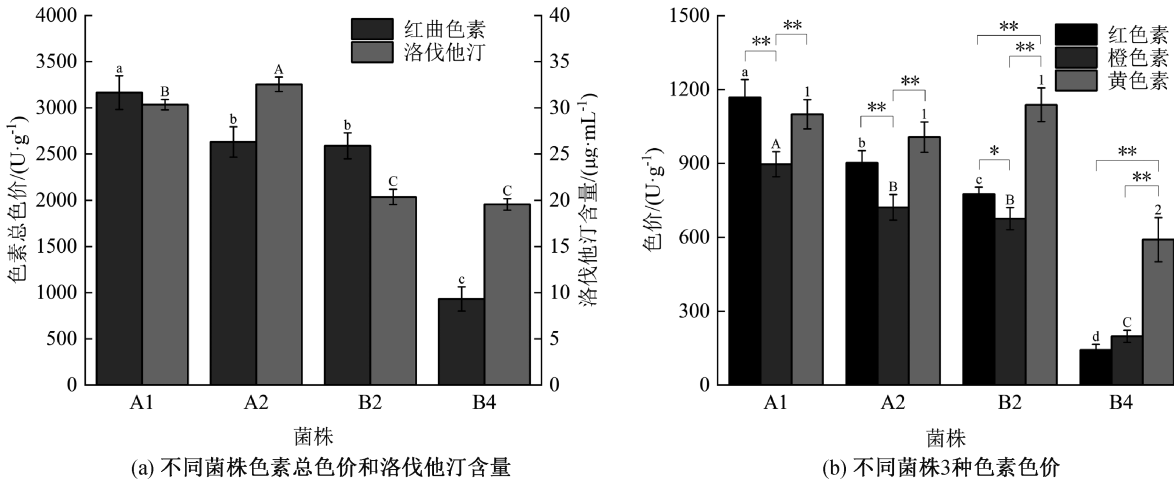


图 1 不同菌株色素色价和洛伐他汀含量

注:数据为平均值±标准差( $n=3$ )。图(a)中不同小写字母表示色素总色价有显著性差异,不同大写字母表示洛伐他汀含量有显著性差异( $p<0.05$ );图(b)中不同小写字母表示红色素色价有显著性差异,不同大写字母表示橙色素色价有显著性差异,不同数字表示黄色素色价有显著性差异( $p<0.05$ );\*表示有显著性差异( $p<0.05$ );\*\*表示有极显著差异( $p<0.01$ )。

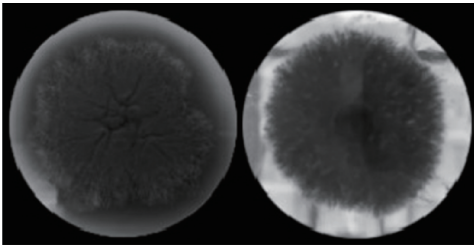


图 2 红曲菌平板图

为了分析不同质量浓度的乳糖对 MPs 和洛伐他汀产量的影响,向培养基中加入不同质量浓度的乳糖,结果如图 5 所示。图 5 表明:在乳糖质量浓度为 20 g/L 时 MPs 和洛伐他汀含量均最高,随着乳糖质量浓度的逐渐增加,MPs 和洛伐他汀含量均呈现不同程度的下降趋势,在此质量浓度时 A1 菌株对碳源达到了饱和状态,过多的碳源物质给菌株带来了代谢负担,使得 MPs 和洛伐他汀含量下降。

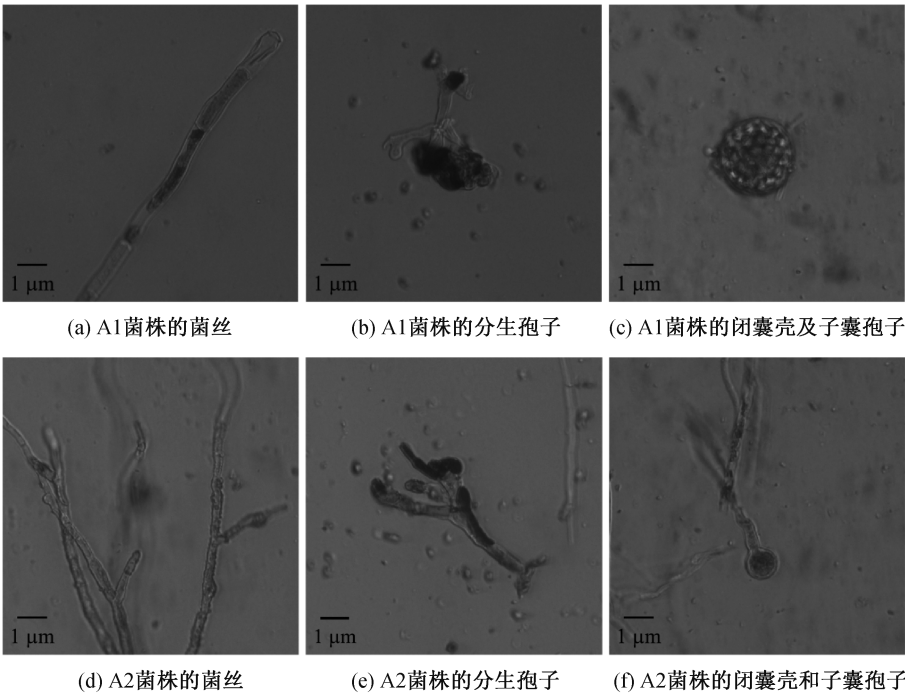


图 3 红曲菌 A1 和 A2 菌株的显微镜图

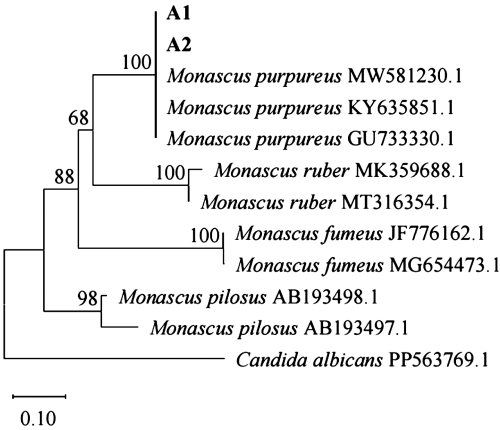


图 4 红曲菌 A1 和 A2 菌株系统进化树

表 2 碳源单因素实验结果

碳源	总色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	洛伐他汀质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
葡萄糖	3077.25±156.54 <sup>f</sup>	31.50±0.75 <sup>d</sup>
蔗糖	7239.14±220.57 <sup>b</sup>	49.63±0.88 <sup>b</sup>
乳糖	8045.66±195.36 <sup>a</sup>	52.63±0.94 <sup>a</sup>
麦芽糖	4470.88±142.25 <sup>e</sup>	28.75±1.02 <sup>e</sup>
甘油	5158.57±144.96 <sup>d</sup>	44.88±1.29 <sup>c</sup>
淀粉	6235.30±174.32 <sup>c</sup>	26.62±0.95 <sup>f</sup>

注:数据为平均值±标准差( $n=3$ )。同一列中不同小写字母显示的平均值有显著性差异( $p<0.05$ )。

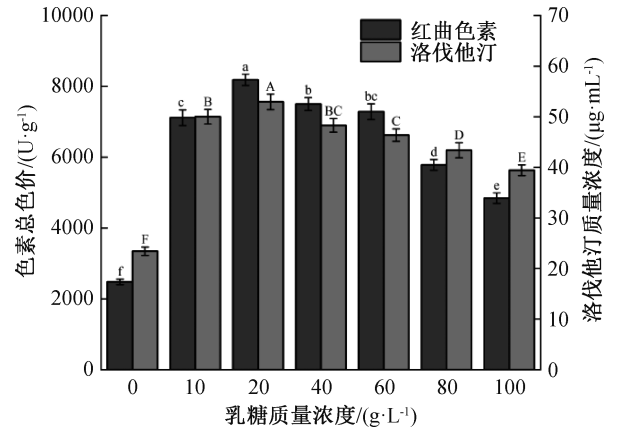


图 5 乳糖质量浓度对 A1 菌株生产色素和洛伐他汀的影响

注:数据为平均值±标准差( $n=3$ )。不同小写字母表示色素总色价有显著性差异,不同大写字母表示洛伐他汀含量有显著性差异( $p<0.05$ )。

2.3.2 不同氮源对色素和洛伐他汀产量的影响

不同氮源对 MPs 和洛伐他汀产量的影响如表 3 所示。由表 3 可知:以  $\text{KNO}_3$  作为培养基时,MPs 和洛伐他汀产量均达到最高,MPs 含量达到了  $9110.92 \text{ U/g}$ ,洛伐他汀含量达到了  $81.72 \text{ μg/mL}$ ,因此最适碳源为  $\text{KNO}_3$ 。

为了分析不同质量浓度的  $\text{KNO}_3$  对 MPs 和洛伐他汀产量的影响,向培养基中加入不同质量浓

度的  $\text{KNO}_3$ ,结果如图 6 所示。图 6 表明:在  $\text{KNO}_3$  质量浓度为  $5 \text{ g/L}$  时 MPs 含量最高,质量浓度为  $25 \text{ g/L}$  时洛伐他汀含量最高。随着  $\text{KNO}_3$  质量浓度的逐渐提高,MPs 和洛伐他汀含量均呈现不同程度的下降趋势,说明在此质量浓度时该菌株对氮源达到了饱和状态,过多的氮源物质给 A1 菌株带来了代谢负担,使得 MPs 和洛伐他汀含量下降。

表 3 氮源单因素实验结果

氮源	总色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	洛伐他汀质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
$\text{KNO}_3$	$9110.92 \pm 154.47^a$	$81.72 \pm 1.46^a$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$2996.05 \pm 73.38^e$	$34.91 \pm 1.20^f$
$\text{NH}_4\text{Cl}$	$3178.80 \pm 113.57^e$	$38.22 \pm 1.40^e$
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	$6311.82 \pm 152.71^b$	$46.67 \pm 1.18^c$
蛋白胨	$3657.83 \pm 175.99^d$	$41.19 \pm 1.44^d$
$\text{NaNO}_3$	$5048.18 \pm 164.07^c$	$52.86 \pm 1.58^b$

注:数据为平均值±标准差( $n=3$ )。同一列中不同小写字母显示的平均值有显著性差异( $p<0.05$ )。

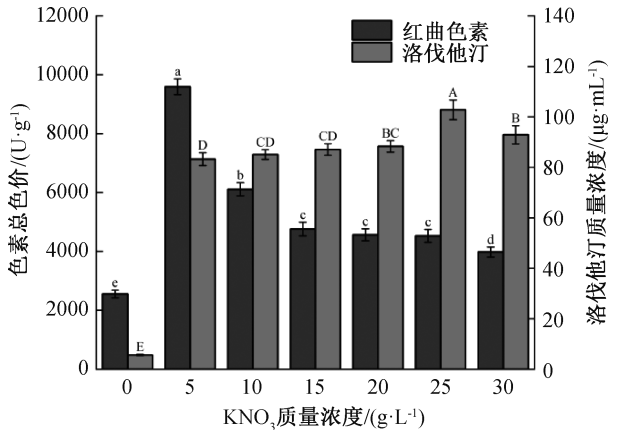


图 6  $\text{KNO}_3$  质量浓度对 A1 菌株生产色素和洛伐他汀的影响

注:数据为平均值±标准差( $n=3$ )。不同小写字母表示色素总色价有显著性差异,不同大写字母表示洛伐他汀含量有显著性差异( $p<0.05$ )。

2.3.3 不同无机盐对色素和洛伐他汀产量的影响

测定不同无机盐对 MPs 和洛伐他汀产量的影响如表 4 所示。由表 4 可知:以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  作为无机盐时,MPs 产量最高,达到了  $9844.37 \text{ U/g}$ ;以  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  作为无机盐时,洛伐他汀含量最高,达到了  $95.94 \text{ μg/mL}$ 。因此,以 MPs 含量为效应值时,最适碳源为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;以洛伐他汀含量为效应值时,最适碳源为  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。由于无机盐种类对洛伐他汀含量影响不如 MPs 含量显著,所以后续以提高 MPs 含量为主效应选择最适无机盐种类进行以下实验研究。



表 4 无机盐单因素实验结果

无机盐	总色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	洛伐他汀质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9844.37±322.03 <sup>a</sup>	89.25±2.41 <sup>bc</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6897.62±246.51 <sup>c</sup>	95.94±2.60 <sup>a</sup>
KCl	9567.89±284.38 <sup>a</sup>	85.48±2.00 <sup>c</sup>
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	7927.78±263.37 <sup>b</sup>	80.26±2.67 <sup>d</sup>
CaCl <sub>2</sub>	5874.26±241.18 <sup>d</sup>	88.16±2.48 <sup>bc</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6901.07±267.64 <sup>c</sup>	91.42±2.54 <sup>b</sup>

注:数据为平均值±标准差(n=3)。同一列中不同小写字母显示的平均值有显著性差异(p<0.05)。

为了分析不同质量浓度的无机盐对 MPs 和洛伐他汀产量的影响,向发酵液中分别加入不同质量浓度的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KCl 和 Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>,结果如图 7 所示。图 7 表明:随着无机盐质量浓度的增加,MPs 和洛伐他汀的含量也在上升。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 质量浓度为 2 g/L 时 MPs 和洛伐他汀含量最高;KCl 质量浓度为 4 g/L 时 MPs 含量最高,6 g/L 时洛伐他汀含量最高;Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 质量浓度为 2 g/L 时 MPs 含量最高,4 g/L 时洛伐他汀含量均最高。随着无机盐质量浓度的逐渐提高,MPs 和洛伐他汀含量均呈

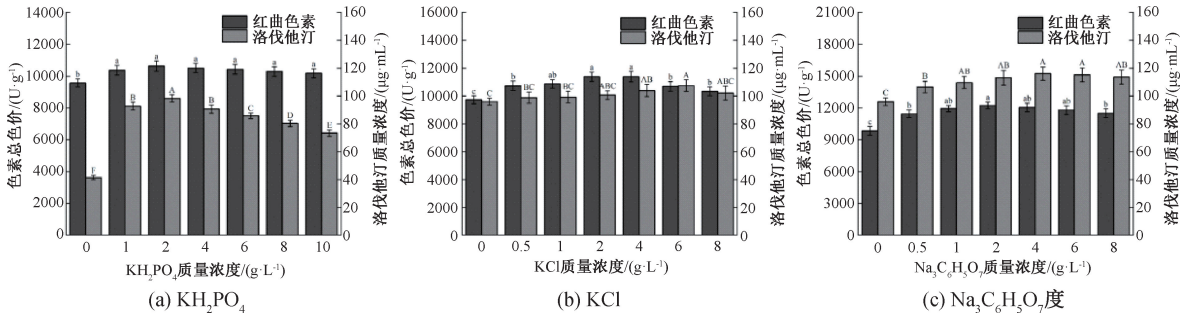


图 7 不同无机盐质量浓度对 A1 菌株生产色素和洛伐他汀的影响

注:数据为平均值±标准差(n=3)。不同小写字母表示色素总色价有显著性差异,不同大写字母表示洛伐他汀含量有显著性差异(p<0.05)。

现先上升后下降的总体趋势,为下一步正交试验优化进一步缩小了质量浓度范围。

2.3.4 正交试验

以碳源、氮源和无机盐液态发酵 MPs 和洛伐他汀的单因素实验结果为依据,进行 5 因素 4 水平的正交试验,正交试验结果见表 5。由表 5 可以看出:各因素对 MPs 色价影响的先后顺序为 A、E、B、C、D;根据 *k* 值得出产 MPs 最佳培养条件为: A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>4</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>,即乳糖 20 g/L、KNO<sub>3</sub> 5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/L、KCl 2 g/L、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 2 g/L。根据极差 *R* 可知,影响洛伐他汀产量的因素主次顺序为 B、A、E、C、D,即 KNO<sub>3</sub>、乳糖、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KCl。根据 *k* 值得出,产洛伐他汀最佳培养条件为: A<sub>2</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>E<sub>3</sub>,即乳糖 20 g/L、KNO<sub>3</sub> 15 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L、KCl 6 g/L、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 4 g/L。

根据正交试验结果,得出最佳产 MPs 培养基和产洛伐他汀培养基配方,以基础培养基为对照,进行正交试验验证,试验结果见表 6。表 6 显示:采用色素培养基分别发酵培养 A1 和 A2 菌株,总色价分别高达 15851.98、11724.07 U/g。其中色素培养基中 A1 菌株红、橙、黄色价分别为 5076.08、4065.81 和 6710.09 U/g,相比基础培养基 A1 菌株红、橙、黄色价分别提高了 3.08、3.57 和 4.82 倍,总色价提高了

3.82 倍。色素培养基中 A2 菌株红、橙、黄色价分别为 4663.58、2967.72、4092.77 U/g,相比基础培养基 A2 菌株红、橙、黄色价分别提高了 3.52、3.78 和 3.51 倍,总色价提高了 3.58 倍。采用他汀培养基分别发酵培养 A1 和 A2 菌株,洛伐他汀含量分别高达 156.30、198.26 μg/mL。相比基础培养基 A1 和 A2 菌株洛伐他汀含量分别提高了 3.99、4.88 倍。

3 结 论

本文对自然界中分离获得的红曲新菌株进行了鉴定,并分析了发酵培养基中碳源、氮源、无机盐及其质量浓度对紫色红曲菌产 MPs 和洛伐他汀的影响,进而对培养基的组分进行了优化,获得产 MPs 和洛伐他汀最佳培养基配方,主要结论如下:

a)从土样中分离纯化获 4 株红曲菌,筛选 2 株 MPs 和洛伐他汀产量较高的红曲菌 A1 和 A2 菌株。经菌落形态分析和分子鉴定确定 A1 和 A2 菌株分类隶属于紫色红曲菌。

b)碳源、氮源及无机盐单因素优化培养基结果表明:产 MPs 和洛伐他汀发酵培养基中最佳碳源为乳糖,最佳氮源为 KNO<sub>3</sub>,无机盐为 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KCl 和 Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>;色素和洛伐他汀培养基各组分最适质量浓度分别为乳糖 20、10 g/L,KNO<sub>3</sub> 5、25 g/L,

表 5 正交试验结果

编号		A/ (g·L <sup>-1</sup> )	B/ (g·L <sup>-1</sup> )	C/ (g·L <sup>-1</sup> )	D/ (g·L <sup>-1</sup> )	E/ (g·L <sup>-1</sup> )	总色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	洛伐他汀质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
1		1	1	1	1	1	9438.88±355.56	17.15±1.34
2		1	2	2	2	2	9684.21±418.94	53.15±3.07
3		1	3	3	3	3	8355.42±569.95	119.69±5.76
4		1	4	4	4	4	3912.79±129.90	88.34±4.46
5		2	1	2	3	4	6632.40±92.11	18.17±1.10
6		2	2	1	4	3	7573.07±517.03	61.30±6.96
7		2	3	4	1	2	12393.34±207.78	97.83±3.75
8		2	4	3	2	1	8063.09±279.64	109.86±7.29
9		3	1	3	4	2	7777.62±335.45	16.22±1.66
10		3	2	4	3	1	8377.88±441.27	40.38±1.53
11		3	3	1	2	4	2427.45±203.33	42.93±1.74
12		3	4	2	1	3	4292.01±151.51	86.87±4.20
13		4	1	4	2	3	5221.80±753.66	12.79±0.30
14		4	2	3	1	4	4028.99±271.94	24.62±2.44
15		4	3	2	4	1	4473.17±308.19	52.60±1.29
16		4	4	1	3	2	3335.60±168.47	70.98±2.11
总色价	k1	7847.82	7267.67	5693.75	7538.30	7588.25		
	k2	8665.47	7416.04	6270.45	6349.14	8297.69		
	k3	5718.74	6912.34	7056.28	6675.32	6360.58		
	k4	4264.89	4900.87	7476.45	5934.16	4250.41		
	R	4400.58	2515.17	1782.70	1604.14	4047.28		
洛伐他汀 质量浓度	k1	69.58	16.08	48.09	56.62	55.00		
	k2	71.79	44.86	52.70	54.68	59.55		
	k3	46.60	78.26	67.60	62.30	70.16		
	k4	40.25	89.01	59.84	54.62	43.51		
	R	31.54	72.93	19.51	7.69	26.65		

注:A为乳糖,B为KNO<sub>3</sub>,C为KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,D为KCl,E为Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>。数据为平均值±标准差(*n*=3)。k1至k4是在因子作用下不同质量浓度对应色素和洛伐他汀产量的平均值,R是k1至k4的极差。

表 6 正交试验验证结果

培养基 种类/菌株	总色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	红色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	橙色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	黄色价/ (U·g <sup>-1</sup> )	洛伐他汀质量 浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	他汀含量 提高倍数	总色价 提高倍数	红色价 提高倍数	橙色价 提高倍数	黄色价 提高倍数
BM/A1	3287.11±27.13	1244.44±52.86	890.25±30.83	1152.42±54.25	31.35±0.70					
BM/A2	2561.30±129.56	1032.14±68.02	621.51±12.24	907.65±52.16	33.74±1.69					
PM/A1	15851.98±517.77	5076.08±205.82	4065.81±59.42	6710.09±273.54	122.96±2.00	2.92	3.82	3.08	3.57	4.82
PM/A2	11724.07±617.21	4663.58±303.72	2967.72±135.27	4092.77±184.51	93.55±3.24	1.77	3.58	3.52	3.78	3.51
LM/A1	3477.20±92.77	1443.34±29.62	889.15±30.29	1144.71±100.48	156.30±6.18	3.99	0.06	0.16	0.00	-0.01
LM/A2	8933.58±475.83	3335.80±189.25	2548.79±147.42	3048.99±216.89	198.26±10.38	4.88	2.49	2.23	3.10	2.36

注:数据为平均值±标准差(*n*=3)。基础培养基以BM表示,色素培养基以PM表示,洛伐他汀培养基以LM表示;其中BM/A1和BM/A2作为对照组。

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1、2 g/L、KCl 均为 4 g/L,Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 均为 2 g/L。

c)根据单因素实验结果进行正交试验对培养基进行了优化,确定了最佳发酵条件为:产MPs最佳培养条件为乳糖 20 g/L、KNO<sub>3</sub> 5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/L、KCl 2 g/L、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 2 g/L,产洛伐他汀最佳培养条件为:乳糖 20 g/L、KNO<sub>3</sub> 15 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L、KCl 6 g/L、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 4 g/L。经优化后的培养基对A1和A2进行培养,总色价分别提高了3.82、3.58

倍;洛伐他汀含量分别提高了3.99、4.88倍。

高产菌株一直是红曲发酵追求的目标,本文结果将为红曲发酵工业提供新的高性价比菌株,为新型食品、保健品和药品的开发提供理论依据。

参考文献:

[1] 张婵,程颖,秦昱晖,等.红曲霉合成莫纳克林K的研究进展[J].食品科学技术学报,2023,41(5):24-33.



- [2] 李牧, 李利, 冯艳丽, 等. 古老而充满魅力的红曲菌[J]. 科学通报, 2023, 68(5): 479-494.
- [3] 徐晓飞, 何瑞琪, 宗敏华, 等. 红曲霉代谢产物的调控及在酿酒中的应用研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(4): 8-13.
- [4] Shi J, Qin X L, Zhao Y R, et al. Strategies to enhance the production efficiency of *Monascus* pigments and control citrinin contamination[J]. Process Biochemistry, 2022, 117(6): 19-29.
- [5] Feng Y, Shao Y, Chen F. *Monascus* pigments[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(6): 1421-1440.
- [6] Long P C, Zhu L S, Lai H F, et al. Red Pigment Liposomes: Microstructural Characteristics, Stability, and Anticancer Activity[J]. Foods, 2023, 12(3): 447.
- [7] El-Sayed E R, Abdelhakim H K, Zakaria Z. Extracellular biosynthesis of cobalt ferrite nanoparticles by and their antioxidant, anticancer and antimicrobial activities: Yield enhancement by gamma irradiation[J]. Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications, 2020, 107(5): 110318.
- [8] Kim C, Jung H, Kim Y O, et al. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *Monascus* pigments[J]. Fems Microbiology Letters, 2006, 264(1): 117-24.
- [9] Tan H L, Xing Z Y, Chen G, et al. Evaluating Antitumor and Antioxidant Activities of Yellow Pigments from Fermentation[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3242.
- [10] Choe D, Song S M, Shin C S, et al. Production and Characterization of Anti-Inflammatory *Monascus* Pigment Derivatives[J]. Foods, 2020, 9(7): 858.
- [11] Su N W, Lin Y L, Lee M H, et al. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 1949-1954.
- [12] He J, Jia M, Li W, et al. Toward improvements for enhancement the productivity and color value of *Monascus* pigments: A critical review with recent updates[J]. Critical Reviews In Food Science and Nutrition, 2022, 62(26): 7139-7153.
- [13] Xiong Z, Cao X, Wen Q, et al. An overview of the bioactivity of monacolin K/lovastatin[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 131: 110585.
- [14] Liu X, Zeng X, Mahe J, et al. The Effect of Nattokinase-*Monascus* Supplements on Dyslipidemia: A Four-Month Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial[J]. Nutrients, 2023, 15(19): 4239.
- [15] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. Journal of Antibiotics, 1979, 32(8): 852-854.
- [16] 丁亚光, 任怀松. 红曲地龙蛋白片对高脂血症大鼠的降脂作用[J]. 工业微生物, 2023, 53(4): 104-106.
- [17] 王岚. 红曲对高脂大鼠降脂作用的实验研究[J]. 心血管外科杂志, 2019, 8(4): 50-51.
- [18] 蒋沅岐, 董玉洁, 周福军, 等. 红曲的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(23): 7379-7388.
- [19] Abdanipour A, Deheshjo F, Sohrabi D, et al. Neuroprotective effect of lovastatin through down-regulation of pro-apoptotic gene expression in rat model pilocarpine epilepsy[J]. Neurological Research, 2018, 40(10): 874-882.
- [20] 王天莹, 姜瑶, 褚慧, 等. 洛伐他汀肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2019, 17(6): 260-265.
- [21] Wang T Y, Jiang Y, Chu H, et al. Doxorubicin and Lovastatin co-delivery liposomes for synergistic therapy of liver cancer[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2019, 52: 452-459.
- [22] Zhang K L, Zhu W W, Wang S H, et al. Organ-specific cholesterol metabolic aberration fuels liver metastasis of colorectal cancer[J]. Theranostics, 2021, 11(13): 6560-6572.
- [23] 蒋冬花, 孙蕾, 陈璨, 等. 高产色素红曲霉菌株的筛选、鉴定和固体发酵条件优化[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(9): 1639-1645.
- [24] 袁天慧, 陈景智, 郭天龙, 等. 红曲色素液态发酵生产工艺研究[J]. 福州大学学报, 2020, 48(5): 667-672.
- [25] 唐旭, 赵森, 刘洪, 等. 产洛伐他汀紫红色红曲霉的发酵罐补料液体发酵的研究[J]. 化学研究与应用, 2017, 29(8): 1207-1210.
- [26] 毛继龙, 张建辉, 王璨, 等. 一株高产洛伐他汀红曲霉的筛选与液态发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2221-2232.
- [27] Agboyibor C. 一株紫色红曲霉液态发酵产红曲色素的特性研究[D]. 兰州: 西北师范大学, 2019: 22-26.
- [28] Marey R, 谷佳欢, 许楚旋, 等. 高产色素低产桔霉素红曲霉菌株的筛选、鉴定和抑菌性分析[J]. 湖南农业科学, 2018(1): 1-6.
- [29] Zhen Z X, Xiong X Q, Liu Y B, et al. NaCl Inhibits Citrinin and Stimulates *Monascus* Pigments and Monacolin K Production[J]. Toxins, 2019, 11(2): 118.
- [30] 黄艳. 红曲菌液态发酵生产红、橙、黄色素的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 10-11.
- [31] 文镜, 顾晓玲, 常平, 等. 双波长紫外分光光度法测定红曲中洛伐他汀(Lovastatin)的含量[J]. 中国食品添加剂, 2000(4): 11-17.
- [32] 李钟庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 12-16.