

高产洛伐他汀红曲菌的筛选 及菌种共酵对红曲固态发酵的影响

朱蕊¹, 彭林¹, 刘双平^{1,2}, 韩笑^{1,2}, 毛健^{1,2,*}

(1.江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室,

粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏无锡 214122;

2.江苏省产业技术研究院食品生物技术研究, 如皋江大食品生物技术研究有限公司, 江南大学(如皋)食品生物技术研究, 江苏如皋 226500)

摘要:本研究以筛选高产洛伐他汀红曲菌, 并进一步优化富含洛伐他汀的红曲制曲方法为目的, 分离筛选市售红曲中的红曲菌, 并进行固态发酵制曲, 使用 HPLC 法对红曲中的洛伐他汀含量进行测定, 使用紫外分光光度法检测红曲的色价, 选择产洛伐他汀含量最高的菌株进行形态观察和分子生物学鉴定; 并进一步将高产菌株与常用食源菌株进行共酵制备红曲, 优化洛伐他汀的含量。结果表明, 分离筛选得到 10 株红曲菌, 产洛伐他汀最高的菌种是 H8-2, 经固态发酵 14 d 后洛伐他汀产量达到 9.79 mg/g, 色价为 1805.43 μ /g。菌株 H8-2 经形态观察和生物学鉴定为紫色红曲菌 (*Monascus purpureus*)。共酵制曲发现除枯草芽孢杆菌外其他菌种均可提高红曲菌产洛伐他汀含量, 其中酵母对洛伐他汀产量提高的效果最显著 ($p < 0.01$), 发酵结束后洛伐他汀含量可达 12.37 mg/g。进一步对实验室保藏的多株酵母菌株进行评价, 发现酿酒酵母对洛伐他汀产量提高最为明显, 共酵后红曲中洛伐他汀含量达到 12.93 mg/g, 相比未共酵条件下的洛伐他汀产量提高了 34.5%。在红曲菌发酵培养基中添加不同酿酒酵母处理液, 发现高温灭菌液和酵母破壁液可以使洛伐他汀产量显著提高 ($p < 0.01$), 分别可达 11.96 和 12.24 mg/g, 比对照组提高了 24.8% 和 27.8%。说明酵母的代谢产物对红曲菌发酵产洛伐他汀有一定影响, 相关诱导物质可能存在于胞内并且对热不敏感。

关键词: 紫色红曲菌, 固态发酵, 菌种共酵, 洛伐他汀, 色价

Screening of *Monascus* with High-yield Lovastatin and Effects of Co-fermentation on Solid-state Fermentation

ZHU Rui¹, PENG Lin¹, LIU Shuang-ping^{1,2}, HAN Xiao^{1,2}, MAO Jian^{1,2,*}

(1.School of Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Grain Fermentation Process and Technology, National Engineering Laboratory, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.Jiangsu Industrial Technology Research Institute of Food Biotechnology, Rugao JN University Institute of Food Biotechnology Co., Ltd., Institute of Food Biotechnology (Rugao), Jiangnan University, Rugao 226500, China)

Abstract: The commercially available hongqu was as raw material to screen the *Monascus* with high-yield lovastatin and further improving the method of making lovastatin-rich hongqu. *Monascus* strains were isolated and screened from commercial hongqu and fermented by solid state fermentation, the lovastatin in hongqu was determined by HPLC. The color value of hongqu was detected by ultraviolet spectrophotometry. The strain with the highest content of lovastatin was selected for morphological observation and molecular biological identification. Furthermore, high-yielding strains were co-fermented with common food-source strains, and the content of lovastatin was optimized. The results showed that 10 strains of *Monascus* were isolated. The most powerful capability of producing lovastatin named H8-2 was verified to have a lovastatin yield of 9.79 mg/g and a pigment value of 1805.43 μ /g on solid-state fermentation for 14 d. The *Monascus* strain H8-2 was identified as *Monascus purpureus* by morphological observation and molecular biology identification. Most of the strains had beneficial effects on the yield of lovastatin except *Bacillus subtilis*. Yeast had the most obvious effect on the increase of lovastatin production. The lovastatin content reached 12.37 mg/g after the end of fermentation. By evaluating the effects of different yeast strains, it was found that *S. cerevisiae* had the greatest effect on lovastatin, and the lovastatin yield was 12.93 mg/g, which was 34.5% higher than the control. Adding different *S. cerevisiae* treated liquid to the fermentation medium of *Monascus*, it was found that the high

收稿日期: 2018-09-21

作者简介: 朱蕊 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 黄酒酿造, E-mail: zr340403@foxmail.com。

* 通讯作者: 毛健 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 传统酿造、食品微生物, E-mail: maojian@jiangnan.edu.cn。

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0400401, 2016YFD0400504, 2017YFD0400103); 江苏省自然科学基金-面上研究项目 (BK20171405, BK20161293); 国家自然科学基金 (面上项目: 31571823, 31771968; 青年项目: 31701593); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (LITE2018-13); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索资助课题 (SKLF-ZZB-201804)。

temperature sterilizing liquid and the breaking yeast liquid could make the yield of lovastatin increase significantly. The lovastatin production significantly increased to 11.96 and 12.24 mg/g, respectively, which was 24.8% and 27.8% higher than the control group. This result suggested that metabolites in yeast might had certain effects on lovastatin production by *Monascus* fermentation, and related inducers might be intracellular and not sensitive to heat.

Key words: *Monascus purpureus*; solid-state fermentation; co-fermentation; lovastatin; pigment value
中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2019)11-0168-07
doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.11.028
引文格式: 朱蕊, 彭林, 刘双平, 等. 高产洛伐他汀红曲菌的筛选及菌种共酵对红曲固态发酵的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 168-173, 177.

红曲菌是一种具有我国传统特色的丝状真菌,经固态发酵得到的产物为红曲^[1]。红曲作为中国传统的药食兼用天然制品,广泛应用于食品、医药、保健品等行业^[2],多将紫色红曲菌用于生产^[3]。红曲菌发酵能够产生多种对人体有益的代谢产物^[4-8],其中洛伐他汀具有很强的降胆固醇、降血脂的保健作用^[9]。

目前我国洛伐他汀的生产主要来源于红曲菌发酵,红曲的固态发酵相比于液态发酵节省了发酵后期的分离纯化工作,更安全且容易吸收,可以直接通过食用达到治疗目的^[10-11]。红曲的发展方向多集中于红曲菌菌种选育、优化培养参数提高红曲中洛伐他汀的含量,降低生产成本^[1,12-13]。近年来有学者研究发现添加一些外源诱导物可以促进洛伐他汀的合成^[14-16],Sun等^[17]发现通过添加真菌诱导剂-掷孢酵母滤液可以提高液态发酵的洛伐他汀产量,当酵母滤液在第4 d加入时,最高产量可达446.92 mg/L。研究表明^[18],因为培养条件相似,红曲菌与酵母菌、乳酸菌或其他真菌诱导子通过共酵的培养方式能使次级代谢产物的产量有所提高,这提示其他微生物代谢的某些酶或是产物可能对红曲菌生长及洛伐他汀的积累有促进作用。

因此本文在市售红曲中筛选出高产洛伐他汀紫色红曲菌的基础上,利用特性较优的紫色红曲菌株固态发酵生产红曲,采用不同菌种与其共酵的方式进一步优化其洛伐他汀产量,筛选出共酵优秀菌株,并初步探究其诱导机理,为深度开发药食兼用的功能性红曲提供更多参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红曲样品 从福建宁德、浙江温州、广东丽水等

地采集市售红曲样品 10 份; 粳米 市售; 克鲁斯假丝酵母 Y6、酿酒酵母 SY、枯草芽孢杆菌 4-LCW、植物乳杆菌 X5、米曲霉 P7、黄酒酵母 S2-1392、酿酒酵母 2.2084、毕赤酵母 S12、热带假丝酵母 CS8、贝酵母 S.bay 均为本实验室筛选保藏菌株,来源如表 1 所示; 马铃薯葡萄糖水培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、麦芽汁琼脂(MEA)、察氏培养基(CYA) 广东环恺威生物科技有限公司; 洛伐他汀(纯度 ≥ 98%) Sigma 公司。

YXQ-LS-50SI 型立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; PRX-450C 型智能人工气候箱 宁波赛福实验仪器有限公司; SW-CJ 系列超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; UV-1800 型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; Waters e2695 高效液相色谱系统(配有 2489 紫外检测器及 Empower 2 色谱工作站) 美国沃特世公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红曲筛选分离源指标检测 选取来自福建、广东、浙江等不同来源的 10 份市售红曲米作为筛选的分离源,初步评价市售红曲,与后续实验中纯种制曲比较,利用高效液相色谱法测定市售红曲中的洛伐他汀含量,紫外分光光度法测定其色价,实验重复 3 次取平均值。

1.2.2 产洛伐他汀红曲菌的筛选及鉴定

1.2.2.1 红曲菌的筛选 称取 5 g 红曲样品,在无菌研钵中研磨成粉末后置于 95 mL 带玻璃珠的无菌生理盐水的三角瓶中,在摇床上振荡 30 min 后进行梯度稀释。吸取 0.1 mL 涂布于 PDA 平板上,28 ℃ 培养 3~4 d,用无菌接种环挑取单个菌落转接至新的 PDA 平板,经过反复分离纯化,得到具有红曲菌基本特征

表 1 不同菌种及其来源
Table 1 Different strains and its sources

菌株名称	来源	菌株种类
SY	安琪商业酵母	商业酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SY
4-LCW	绍兴生麦曲	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
X5	古越龙山黄酒发酵醪	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>
P7	金枫生麦曲	米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i> JF8
S2-1392	绍兴古越龙山黄酒	黄酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HJ1
Y6	金枫生麦曲	克鲁斯假丝酵母 <i>Candida krusei</i> JY6
2.2084	糯米酒	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S12	绍兴会稽山熟麦曲	毕赤酵母 <i>Pichia kudriavzevii</i>
CS8	柠檬酸水	热带假丝酵母 <i>Candida tropicalis</i>
S.bay	果酒	贝酵母 <i>Saccharomyces bayanus</i>

的较纯菌株,鉴定完毕后甘油管保藏至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2.2 菌落形态观察 参考《红曲菌的形态与分类学》^[19],采用三点接种法将菌株分别点种于 MEA、PDA 和 CYA 培养基上,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d,观察菌落的形态特征,包括菌落的正反面颜色、质地、边缘等。

1.2.2.3 分子生物学鉴定 以提取的红曲菌总 DNA^[20]为模板,利用真菌 ITS 通用引物(ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增,PCR 扩增的反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。所得产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序所得的序列信息利用 BLAST 程序在 GenBank 核酸数据库中进行相似性比对,利用 MEGA6.0 软件对所测红曲菌与序列同源性高的模式菌株的基因序列进行多序列比对分析,利用 Neighbor-Joining 邻接法构建系统进化树。

1.2.3 菌种培养 红曲菌菌株活化:用无菌接种环刮取保藏管里的菌种划线于麦芽汁斜面上。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5~7 d,培养至红曲菌长出孢子。

固态发酵:用 0.1% 无菌吐温水洗下斜面上的孢子,30 g 粳米浸泡 2 h 后转入 250 mL 锥形瓶,封口后于 121 $^{\circ}\text{C}$,0.08 MPa 灭菌 20 min 后,趁热将米粒拍散,接种 10^6 个孢子/g(大米干重)接种于冷却至室温的固态发酵培养基,补加无菌水调节含水量在 40%~50%;拌匀后使培养基堆至瓶内一角,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h 后摇散、摊平;此后每 24 h 摇瓶 1~2 次,直到 14 d 发酵结束。利用高效液相色谱法测定红曲固态发酵产物中的洛伐他汀含量,紫外分光光度法测定其色价,实验重复 3 次取平均值。

1.2.4 菌种共酵

1.2.4.1 红曲菌共酵菌种活化 分别选取 1.1 中列举的实验室保藏菌株于马铃薯葡萄糖液体培养基中进行活化,28 $^{\circ}\text{C}$ 活化 24 h 至培养基浑浊。

1.2.4.2 红曲菌与不同菌种共发酵 按照 1.2.3 中固态发酵法制备红曲,同时将活化后的菌种菌液以 2% 接种量接入固态发酵培养基与红曲菌进行共酵实验,以红曲菌 H8-2 纯种发酵作为对照组。利用高效液相色谱法测定红曲固态发酵产物中的洛伐他汀含量,紫外分光光度法测定其色价,实验重复 3 次取平均值。

1.2.5 添加不同酵母诱导剂的研究 根据 1.2.4 的实验结果,选择酿酒酵母 2.2084 为共酵菌株,以此制备不同酵母诱导剂。酵母菌液:将酿酒酵母 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养 24 h 取样;酵母发酵液:将上述酿酒酵母摇瓶 24 h 后的菌液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 8000 r/min 离心所得上清液;高温灭菌液:酵母培养 24 h 后,100 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 20 min;酵母破壁液:将酿酒酵母 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养 24 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 8000 r/min 离心后用无菌水洗涤菌体,重复两次,将酵母菌体置于含有石英砂的灭菌研钵中研磨 10 min,吸取至 2 mL 离心管中 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 8000 r/min 离心,所得上清液为酵母破壁液。按照 1.2.3 中固态发酵法制备红曲,同时将酵母诱导剂以 2% 接种量接入固态发酵培养基与红曲菌进行共酵

实验,以红曲菌 H8-2 纯种发酵作为对照组。利用高效液相色谱法测定红曲固态发酵产物中的洛伐他汀含量,紫外分光光度法测定其色价,实验重复 3 次取平均值。

1.2.6 洛伐他汀的检测 参考文献[21]检测方法,在实验室条件下进一步优化,采用 HPLC 法,称取红曲粉 0.5 g 置于 50 mL 离心管中,加入甲醇 30 mL,50 $^{\circ}\text{C}$ 振荡水浴 2 h,摇匀,常温条件下 8000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜。

色谱条件:色谱柱:Athena C18-WP(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1% 的磷酸水溶液(65:35,V/V);流速:1.0 mL/min;紫外检测波长:238 nm;进样量:5 μL ;柱温:(30.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。以 70% 乙醇溶液配制 400 mg/L 的洛伐他汀标准储备液,等比稀释制得浓度分别为 3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 mg/L 的洛伐他汀标准工作液,进行外标定量。标曲线性方程为: $y = 3.64 \times 10^4 x - 2.35 \times 10^5$,决定系数 $R^2 = 0.9912$ 。

1.2.7 色价的测定 采用紫外分光光度计法,参考国标 GB 4926-2008《食品添加剂 红曲米(粉)》。

1.3 数据分析

实验操作重复三次,采用 Excel 进行数据计算,采用 Graphpad Prism 7 软件进行分析绘图。

2 结果与分析

2.1 高产洛伐他汀红曲菌的筛选和鉴定

2.1.1 红曲菌筛选分离源指标检测 对取样红曲样本进行初步评价,由表 2 可知,取样的这些市售红曲洛伐他汀含量较低,基本在 1.8~3.5 mg/g 之间,色价质量参差不齐,洛伐他汀产量和色价之间无必然联系。

表 2 红曲分离源指标检测结果

Table 2 Detection results of hongqu separation source index

样品编号	来源	洛伐他汀含量 (mg/g)	色价 ($\mu\text{g/g}$)
H1	福建宁德	2.83 $\pm$ 0.11	496.9 $\pm$ 24.55
H2	福建宁德	3.24 $\pm$ 0.06	685.36 $\pm$ 71.03
H3	福建古田	2.67 $\pm$ 0.10	1442.78 $\pm$ 55.76
H4	福建古田	1.86 $\pm$ 0.11	1360.80 $\pm$ 34.02
H5	福建三明	2.20 $\pm$ 0.15	516.24 $\pm$ 76.20
H6	浙江温州	2.86 $\pm$ 0.13	527.64 $\pm$ 22.96
H7	浙江温州	2.09 $\pm$ 0.14	437.15 $\pm$ 18.93
H8	浙江丽水	2.59 $\pm$ 0.08	226.46 $\pm$ 16.58
H9	广东梅州	3.09 $\pm$ 0.06	1197.48 $\pm$ 61.66
H10	广东梅州	2.98 $\pm$ 0.12	397.89 $\pm$ 17.77

2.1.2 红曲菌株筛选结果 红曲菌是一种腐生菌,其生长适应的温度范围很广,最适温度为 25~30 $^{\circ}\text{C}$,能利用多种碳源和氮源生长。相较于其他菌,红曲菌生长比较缓慢,因此采用比较普适的 PDA 培养基平板,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5~6 d 进行筛选。通过梯度稀释及反复分离纯化,从上述 2.1.1 的 10 份红曲米中分离疑似霉菌菌株的纯培养菌株 21 株。根据进一步形态观察,并以产红色素的菌株为挑选标准,选取菌落呈现红色并具有红曲菌典型特征的菌株进一步筛

表3 菌株 H8-2 固态发酵情况
Table 3 Condition of solid state fermentation using H8-2 strain

H8-2	1	2	3	均值
洛伐他汀含量(mg/g)	9.64 ± 0.06	9.82 ± 0.10	9.91 ± 0.12	9.79
色价(μ/g)	1687.45 ± 43.77	1875.21 ± 105.39	1853.63 ± 111.71	1805.43

选,共得到 10 株红曲菌菌种,分别命名为 H1-4、H4-2、H4-4、H6-2、H6-3、H7-2、H8-1、H8-2、H9-2、H10-1。

2.1.3 红曲菌的固态发酵特性比较 为筛选得到高产洛伐他汀的红曲菌,本研究对 2.1.2 中筛选得到的 10 株红曲菌进行了固态发酵实验,并检测发酵后红曲中洛伐他汀的含量和色价。如图 1 菌株 H8-2 的洛伐他汀产量明显高于其他菌株(图 1a),色价结果也较优(图 1b)。为进一步确定菌株 H8-2 的发酵稳定性,本研究利用菌株 H8-2 连续发酵三次后(表 3),得到洛伐他汀产量基本稳定,均值达到9.79 mg/g(干重),色价可达 1805.43 μ/g,发酵制备的红曲质量远高于 2.1.1 中菌种来源的市售红曲。说明利用 H8-2 菌株纯种制曲可得到高产洛伐他汀的红曲,故确定菌株 H8-2 为后续实验的供试菌株。

2.1.4 菌株 H8-2 的鉴定

2.1.4.1 形态观察 将菌株 H8-2 分别点种于 MEA、PDA 和 CYA 培养基上,25 ℃ 培养 7 d。在相同培养条件下这 10 株红曲菌菌落形态差异很小,其典型菌株形态如图 2 所示,红曲菌在 MEA 平板上生长状况最好,明显优于 PDA 平板和 CYA 平板,在 MEA 平板上红曲菌菌落呈绒毡状,有浅色且短的气生菌丝,背面呈现出放射状辐射纹,菌丝体开始为白色,随菌落成熟而变成橙红色至深红色,菌落略微隆起,边缘不整齐。PDA 平板上生长状况次之,红曲菌生长速度较慢,放射状辐射波纹减少。CYA 培养基上生长状况最不理想,生长速度最慢,未见放射状辐射波纹,菌落颜色也较浅,呈粉色。参考《真菌鉴定

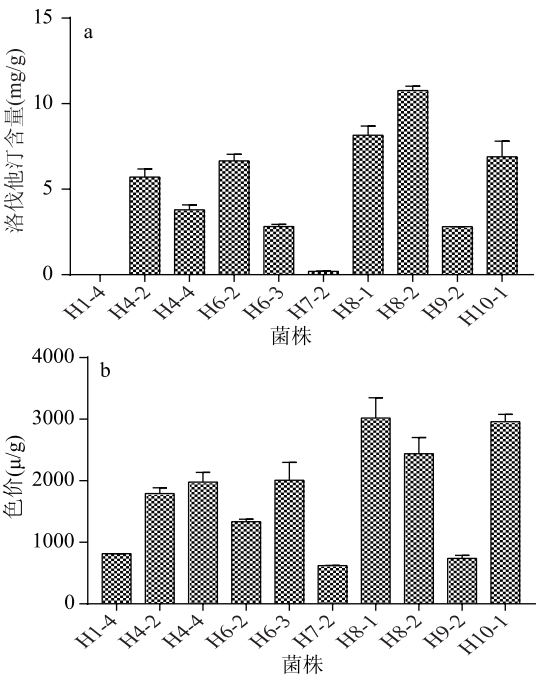


图1 红曲菌菌固态发酵洛伐他汀产量(a)和色价(b)比较
Fig.1 Comparison of the *Monascus* sp.strains' lovastatin production(a) and pigment value(b) based on solid state fermentation

手册》^[22],并根据《红曲菌的形态与分类学》^[19]进行检索,对红曲菌进行初步观察,鉴定菌株为紫色红曲菌。

2.1.4.2 分子生物学鉴定 菌株 H8-2 的 rDNA-ITS PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图 3 所示,

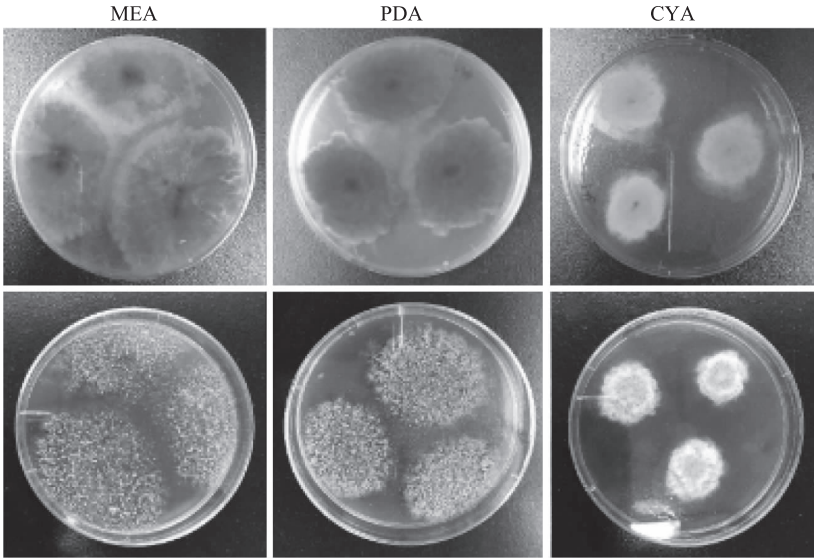


图2 红曲菌株 H8-2 在不同培养基上的菌落形态
Fig.2 Cultural characteristics of the *Monascus* sp. strain H8-2 on different plate mediums
注:从左至右分别为 MEA、PDA、CYA 平板上红曲菌的菌落特征,上一排为菌落反面图,下一排为菌落正面图。

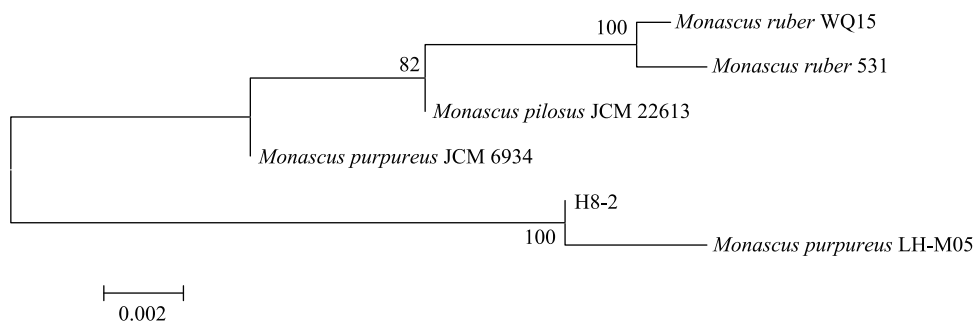


图4 红曲菌 H8-2 的 ITS 系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Monascus* sp.strain H8-2 based on ITS sequence

扩增产物长度在 500~700 bp 之间,条带明亮单一,说明特异性扩增良好。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序后将得到的受试菌基因序列经校对和拼接后在 NCBI 上比对发现与紫色红曲菌 *Monascus purpureus* JCM 6934 的同源性达 99% 以上,构建系统进化树(图 4)。结合形态学观察,基本可以将此红曲菌种鉴定为紫色红曲菌(*Monascus purpureus*)。该菌种是在食品中使用最广泛的红曲固态发酵菌种。

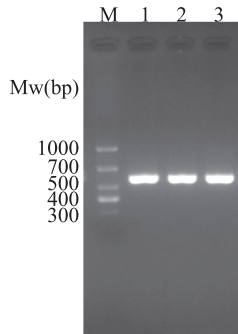


图3 红曲菌株 H8-2 的 rDNA-ITS PCR 产物电泳图

Fig.3 Electropherogram of rDNA-ITS PCR products from *Monascus* sp.strain H8-2

注:M 为 Marker,1、2、3 分别为菌株 H8-2 的 PCR 产物平行点样 3 次。

2.2 不同菌株与红曲菌共酵培养对洛伐他汀产量及色价的影响

在我国传统发酵食品的生产中常采用多菌种混合体系进行发酵,发酵过程中菌种之间的相互作用对食品的风味和功能性物质的含量具有直接影响。因此在本研究中,将红曲菌 H8-2 与食品中筛选得到的酵母、枯草芽孢杆菌、霉菌、乳酸菌进行共酵,发酵结束后检测红曲中洛伐他汀和色素含量。

由图 5a 可知,相比较红曲菌 H8-2 纯种制曲的对照组,除枯草芽孢杆菌 4-LCW 外,其他菌种的共酵都使洛伐他汀的产量有不同程度的提高,其中酵母菌 SY 及米曲霉 P7 显著提高了红曲中的洛伐他汀含量,发酵结束后洛伐他汀含量分别达到 12.37 和 12.10 mg/g。图 5b 在检测不同菌种共酵后红曲的色素含量后发现,酵母 SY 共酵后色价达到 2014.49 μ g/g,是所有共酵菌种中红曲色价含量最高的菌种。因此,综合不同菌种共酵对红曲洛伐他汀和色素含量的影响后,确定以酵母作为红曲的共酵

菌种进行进一步的优化。

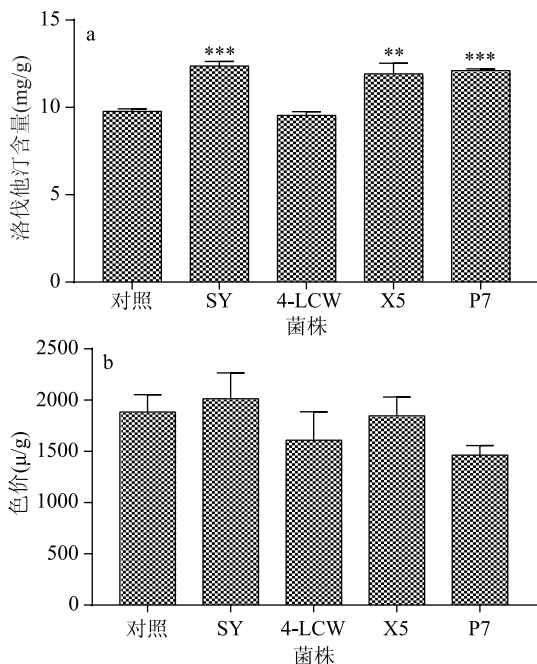


图5 不同菌种对红曲洛伐他汀产量(a)和色价(b)的影响
Fig.5 Effect of different strains on lovastatin production(a) and pigment value(b) in hongqu

注:与对照组相比,*代表差异显著($p < 0.05$),**代表差异很显著($p < 0.01$),***代表差异高度显著($p < 0.001$),****代表差异极显著($p < 0.0001$);图 6~图 7 同。

2.3 不同种类酵母菌与红曲菌共酵对洛伐他汀产量及色价的影响

基于 2.2 实验结果,发现酵母菌更适合与红曲菌共酵制曲,并对洛伐他汀产量有显著影响。因此选择实验室保藏的不同种类的 7 株食品来源酵母菌,与红曲菌 H8-2 共酵制曲,考察不同酵母对固态发酵红曲质量的影响,并筛选出优良的共酵菌株。由图 6a 可知,两种酿酒酵母 2.2084 与 SY 对洛伐他汀产量有显著性提高,其中酿酒酵母 2.2084 使洛伐他汀产量极显著提高($p < 0.0001$),达 12.93 mg/g,产量相比 H8-2 纯种制曲的对照组提高了 34.5%。图 6b 共酵对红曲色价的影响,发现酿酒酵母 2.2084 也能使色价有小幅提高,但不同酵母与红曲菌共酵对红曲色价的影响都不显著($p > 0.05$),说明共酵可能对红曲色价的影响不大。因此综合考虑选择酿酒酵母 2.2084 为与红曲菌 H8-2 共同发酵制曲的优良共酵

菌株,拟用此菌株进行后续研究。

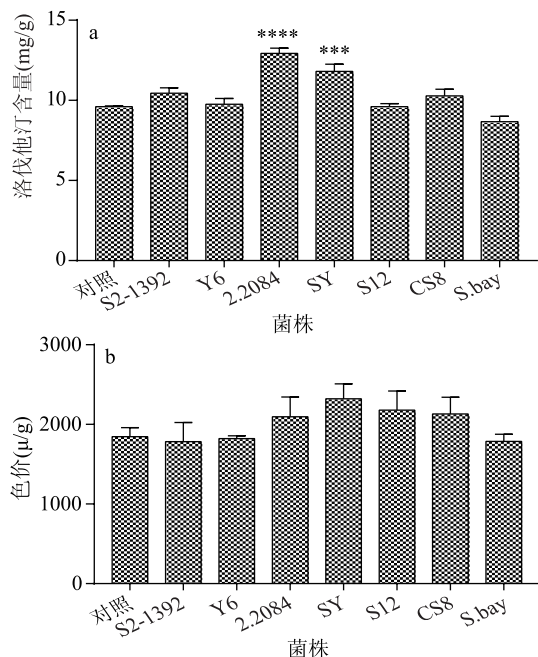


图6 不同酵母菌种对红曲中洛伐他汀产量和色价的影响
Fig.6 Effect of different *Saccharomyces* strains on lovastatin production (a) and pigment value (b) in hongqu

2.4 不同酵母诱导剂对红曲固态发酵中洛伐他汀及色价的影响

为初步探究共酵使洛伐他汀产量提升的机理,选择2.3中最优共酵菌种酿酒酵母2.2084制备不同诱导剂,分别添加酿酒酵母菌液、酵母发酵液、高温灭菌液和酵母破壁液到红曲菌固态发酵培养基中与红曲菌H8-2进行共酵,经过14 d的固态发酵后,发现不同酵母诱导剂都对洛伐他汀的产量有较明显的提高,如图7a所示,其中酵母菌液的提高作用最为显著($p < 0.001$)。推测活的酵母菌液对固态发酵产洛伐他汀更为有益,可能由于酵母在固态发酵过程中与红曲菌共酵,持续生长,从而释放更多对洛伐他汀产量提高有益的诱导因子,使产量显著提高。而高温灭菌液、酵母破壁液也能使红曲固态发酵中洛伐他汀的产量显著提高($p < 0.01$),产量分别为11.96和12.24 mg/g,分别比H8-2纯种制曲的对照组提高了24.8%和27.8%。由图7b观察酵母诱导剂对红曲色价的影响,发现4种酵母诱导剂均能使色价有所提高,对色价有较好影响,因此酵母对色价无不良影响。赵树欣等^[23]在红曲菌液态发酵中也做过类似研究,发现在红曲菌发酵初始添加酵母破壁液2.7% (v/v),洛伐他汀的产量可达61.93 mg/L。分析可能因为固态发酵与液态发酵的状态对共发酵制曲的影响不同。因此酵母共酵提高红曲菌洛伐他汀含量的关键物质存在于胞内,且关键物质在热处理后仍保持洛伐他汀促进作用,表明关键物质对热不敏感。对于酵母中关键物质的进一步确认和探索其诱导机制,仍需要进一步研究。

3 结论

本实验从市售红曲中筛选得到一株高产洛伐他

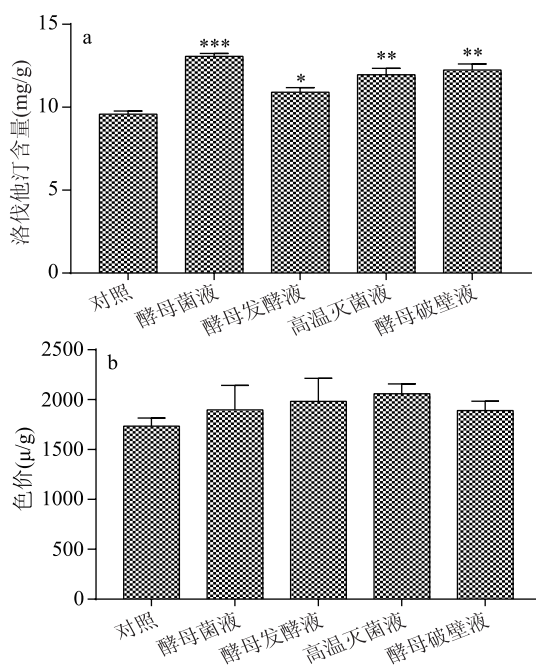


图7 不同酵母诱导剂对红曲洛伐他汀产量和色价的影响
Fig.7 Effect of different yeast elicitors on lovastatin production (a) and pigment value (b) in hongqu

汀的紫色红曲菌 (*Monascus purpureus*) H8-2,并通过与食品来源菌株共酵的方式进一步优化红曲制曲方法。研究表明,红曲菌与酿酒酵母共酵使洛伐他汀产量由未共酵的9.79 mg/g提高到12.93 mg/g,洛伐他汀含量提高了34.5%,对色价无不良影响,可得到质量较高的功能性红曲。相比市售红曲中洛伐他汀产量在1.8~3.5 mg/g范围内,本研究筛选的菌株纯种制曲产洛伐他汀含量远高于市售红曲,并成功建立一种共酵提高红曲洛伐他汀的方法。在对酿酒酵母共酵提高红曲洛伐他汀含量的机理进行初步探究后,发现促进红曲霉产洛伐他汀的关键物质可能存在于酵母胞内,且热处理对关键物质的促进没有负面影响,此结果为后续进一步探索关键物质的种类及其促进机制提供了研究基础。

参考文献

- [1] 李晶,马贵民,冯晓明,等.红曲霉发酵产物 Monacolin K 的研究进展与应用[J].食品工程,2014(2):9-11.
- [2] 李雪梅,沈兴海,段震文,等.红曲霉代谢产物的研究进展[J].中草药,2011,42(5):1018-1025.
- [3] 文镜,常平,顾晓玲,等.红曲及洛伐他汀的生理活性和测定方法研究进展[J].中国食品添加剂,2001(3):7-14.
- [4] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemia agent produced by a *Monascus* species[J].Journal of Antibiotics,2000,32(8):85-854.
- [5] Mapari S A. Fungal polyketideazaphilone pigments as future natural food colorants[J].Trends in Biotechnology,2010,28(6):300-307.
- [6] 黄志兵,许杨,张泓,等.红曲菌几种主要次级代谢产物及其生物活性的研究进展[J].食品与发酵工业,2010,36(4):

(下转第177页)

($p < 0.01$), 别嘌呤醇对照组肌酐浓度和尿酸浓度均极显著低于模型组($p < 0.01$)。以上结果表明, 高剂量的植物乳杆菌 ZXH-1304S 能够明显降低模型大鼠血中肌酐和尿酸浓度, 其作用效果较别嘌呤醇略差。

3 结论

采用前期筛选得到一株能够降解肌酐和尿酸的植物乳杆菌 ZXH-1304S, 发现该菌在 MRS 诱导培养基中生长状况良好, 其微观形态没有发生改变, 说明该菌适合大规模培养, 且该菌表现出较强的耐酸和耐胆盐能力。通过诱导培养后, 该菌能够在体外降解肌酐和尿酸, 体内实验也验证了其降解肌酐和尿酸的能力显著, 仅比别嘌呤醇略低, 其作用机制还有待进一步研究。植物乳杆菌为药食同源的益生菌, 安全性极高, 因此该菌有望进一步开发成为具有药用价值的益生菌制剂。

参考文献

- [1] 尹靖怡, 孙恩涛. 高尿酸与循环系统相关性的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2018(16): 2487-2489.
- [2] Zhou Y, Zhang X, Li C, et al. Research on the pharmacodynamics and mechanism of Fraxini Cortex on hyperuricemia based on the regulation of URAT1 and GLUT9[J]. Biomed Pharmacother, 2018(106): 434-442.
- [3] 林少凯, 黄峥, 赖善榕. 成人血尿酸对代谢综合征的筛检能力研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2018(8): 790-794.
- [4] Duan K, Hua X, Wang Y, et al. Oral immunization with a recombinant *Lactobacillus* expressing CK6 fused with VP2 protein against IPNV in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2018(83): 223-231.
- [5] 赵彤, 钟宜科, 荀一萍, 等. 乳酸菌抗氧化性及其作用机制研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2018(9): 202-209.

(上接第 173 页)

- 143-148.
- [7] 张圆林, 王昌禄, 陈勉华, 等. 高产 γ -氨基丁酸的红曲霉菌株筛选及发酵条件优化[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(5): 35-40.
- [8] Chuang C Y, Shi Y C, You H P, et al. Antidepressant effect of GABA-rich *Monascus*-fermented product on forced swim ming rat model[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(1): 3027-3034.
- [9] 李浩然, 冯雅丽, 伍军. 降脂红曲研究进展[J]. 北京农学院学报, 2001, 16(3): 80-85.
- [10] 沈士秀. 红曲的研究、生产及应用[J]. 食品工业科技, 2001, 22(1): 85-87.
- [11] 吴旭. 洛伐他汀的发酵合成进展[J]. 中国医疗前沿, 2012(16): 11-12.
- [12] 江利香, 葛锋, 刘畅. 红曲洛伐他汀的高产策略[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1446-1452.
- [13] 侯敏, 周端项, 王艳新, 等. 红曲霉的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014(11): 3382-3384.
- [14] Chairote E O, Jannoey P. Influence of air limitation and histidine addition on citrinin content and color of Thai glutinous rice, korkor 6 (rd 6), red yeast rice [J]. Chiang Mai Journal of Science, 2016, 43(4): 712-717.

- [6] Arasu M V, Al - Dhahi N A, Ilavenil S, et al. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field[J]. Saudi J Biol, 2016, 23(S1): 6-10.
- [7] 金方, 杨虹. 降血尿酸益生菌株的筛选和降血尿酸机理的探索[J]. 微生物学通报, 2018, 45(8): 1757-1769.
- [8] Yamada N, Iwamoto C, Kano H, et al. Evaluation of purine utilization by *Lactobacillus gasseri* strains with potential to decrease the absorption of food-derived purines in the human intestine [J]. Nucleosides Nucleic Acids, 2016, 35(10): 670-676.
- [9] 陈光亮, 徐叔云. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004(4): 369-372.
- [10] 马金魁, 张宏斌. 高尿酸血症及治疗药物的研究进展[J]. 广东医学, 2018, 39(S2): 262-267.
- [11] 杨波, 蒋芬, 朱艳, 等. 肌酐水解酶基因工程菌的构建及功能研究[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(5): 494-498.
- [12] 杨殿斌, 袁杰利. 降血尿酸乳酸菌筛选及其对高尿酸血症模型大鼠作用研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 125-128.
- [13] 刘芳. 分解肌酐、尿酸基因工程菌的构建及其功能研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [14] 许女, 史改玲, 张浩, 等. 植物乳杆菌 KF1 对奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J]. 中国食品学报, 2016, 16(10): 19-27.
- [15] 朱丽, 韩德权, 张家玲, 等. 植物乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离及鉴定[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2011, 28(1): 113-116, 120.
- [16] 裘迪红, 黄丽华, 陈哲科, 等. 植物乳杆菌发酵乳对小鼠降胆固醇作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 313-316.
- [17] GB 4789.2-2016 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

- [15] Zhang C, Liang J, Yang L, et al. Glutamic acid promotes monacolin K production and monacolin K biosynthetic gene cluster expression in *Monascus* [J]. Amb Express, 2017, 7(1): 22.
- [16] Zhang J, Wang Y L, Lu L P, et al. Enhanced production of Monacolin K by addition of precursors and surfactants in submerged fermentation of *Monascus purpureus* 9901 [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2014, 61(2): 202-207.
- [17] Sun J L, Zou X, Liu A Y, et al. Elevated yield of monacolin K in *Monascus purpureus* by fungal elicitor and mutagenesis of UV and LiCl [J]. Biological Research, 2011, 44(4): 377-382.
- [18] 杨萌, 吴振强, 梁世中. 功能红曲的研究现状及前景预测[J]. 现代食品科技, 2007, 23(3): 95-98.
- [19] 郭芳, 李钟庆. 红曲菌的形态与分类学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [20] Li P. Rapid extraction of filamentous fungal DNA for PCR amplification[J]. Microbiology China, 2010, 37(3): 450-453.
- [21] 牟鑫, 毛健, 刘双平, 等. 产洛伐他汀红曲菌的筛选及中药对其固态发酵的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 114-119.
- [22] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 129-136.
- [23] 赵树欣, 汤卫华, 乔长晟. 添加酵母破壁液提高红曲霉 Monacolin K 产率[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 119-121.