

## 一株高产 Monacolin K 紫红曲霉菌株筛选、鉴定及发酵条件优化

赵娜,张红星\*,谢远红,金君华,贾宇

北京农学院食品科学与工程学院 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室  
食品质量与安全北京实验室 微生态制剂关键技术开发北京市工程实验室,北京 102206

**摘要:**为从天然发酵红曲米中分离的 30 株红曲霉菌株中筛选高产 Monacolin K 的菌株,并对其产 Monacolin K 的发酵条件进行优化。实验采用高效液相色谱法(HPLC)筛选到 9 株具有产 Monacolin K 能力的红曲霉菌株,其中以编号 ZX26 的菌株产 Monacolin K 能力最高,发酵液中 Monacolin K 产量达到 107.6 mg/L,并且产 Monacolin K 能力具有良好的稳定性。微生物形态学结合 ITS 基因同源性分析结果表明,编号 ZX26 菌株为紫红曲霉。进一步采用单因素试验和正交试验法优化紫红曲霉 ZX26 产 Monacolin K 的发酵条件,结果表明在培养基组分为葡萄糖 70 g/L,牛肉膏 15 g/L,NaNO<sub>3</sub> 2 g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L 时,其最优发酵条件为:发酵初始 pH4.0,接种量为 7%,培养温度 30℃,发酵 10 天,在此条件下,紫红曲霉 ZX26 发酵液中 Monacolin K 产量达到 271.36 mg/L,相对于培养条件优化前 Monacolin K 产量提高 152.19%,经验证此培养条件下 Monacolin K 产量最佳。

**关键词:**红曲霉;Monacolin K;高效液相色谱;正交试验

中图分类号:R939.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1326-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.004

## Screening, identification and fermentation condition optimization of a high Monacolin K producing *Monascus purpureus*

ZHAO Na,ZHANG Hong-xing\*,XIE Yuan-hong,JIN Jun-hua,JIA Yu

Beijing University of Agriculture,Beijing,Food Science and Engineering College,Beijing Key Laboratory of Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residues in Agricultural Products,Beijing Laboratory of Food Quality and Safety,Key Technology Development of Microecological Preparations Beijing Engineering Laboratory,Beijing 102206,China

**Abstract:**The purpose of this study was to screen the high Monacolin K-producing strains from 30 strains of *Monascus Strain* separated from natural fermented red yeast rice, and further to optimize the fermentation conditions of Monacolin K. The results showed that 9 strains of *Monascus* were found to produce Monacolin K by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The strain No. ZX26 was the strongest strain in producing Monacolin K, and the yield of Monacolin K in the fermentation broth reached up to 107.6 mg/L. The ITS gene homology analysis showed that *Monascus Strain* ZX26 was *Monascus purpureus*. The single factor test and orthogonal test method were used to optimize the fermentation conditions of Monacolin K produced by *Monascus purpureus* ZX26 further. The results showed that, when the composition of the medium was glucose 70 g/L, beef extract 15 g/L, NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L, the optimal fermentation conditions including the initial pH of 4.0, culture temperature of 30 °C, inoculum size of 7% and fermentation time of 10 days were determined. On the optimal fermentation conditions, the yield of Monacolin K reached up to 271.36mg/L, which increased by 152.19% compared with the production of Monacolin K before optimizing fermentation conditions, It was proved that the Monacolin K yield was the best under this cultivation condition.

**Key words:***Monascus strain*; Monacolin K; high performance liquid chromatography; orthogonal experiment

红曲霉 (*Monascus*) 是一类小型丝状腐生真菌, 属于囊菌亚门 (Ascomycotina) 不整囊菌纲 (Plectomycetes) 散囊菌目 (Eurotiales) 红曲科 (Monascace-

收稿日期:2019-01-03 接受日期:2019-07-02

基金项目:北京农学院研究生改革与发展项目(2018YJS031)

\* 通信作者 E-mail:hxzhang511@163.com

ae)<sup>[1]</sup>,某些红曲霉菌株在培养过程中能够产生生理活性物质 Monacolin K<sup>[2,3]</sup>。而 Monacolin K 是 HMG-CoA 还原酶的抑制剂,具有降低胆固醇的作用<sup>[4,5]</sup>。

自 20 世纪 70 年代末,日本 Endo 等<sup>[6]</sup>发现了红曲霉代谢产物中降胆固醇活性物质 Monacolin K 及其类似物,便有力地促进了红曲霉 Monacolin K 相关方面的研究与应用<sup>[7]</sup>。Monacolin K 属于聚酮类化合物,具有复杂的分子结构,因此化学合成的方法不能应用于大规模的生产<sup>[8]</sup>,所以采用生物发酵方法是其工业生产的主要途径之一<sup>[9]</sup>。目前,液态发酵 Monacolin K 具有规模大,自动化程度高,人力成本低,生产过程易控制等显著优点<sup>[10]</sup>,但由于液态发酵产量低,故需在高产 Monacolin K 菌株的筛选和工艺优化上取得突破<sup>[11]</sup>。本实验从天然发酵的红曲米中分离 30 株红曲霉菌,筛选得到高产 Monacolin K 菌株,采用正交试验法优化发酵工艺,以期为高产 Monacolin K 的红曲霉微生物发酵提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌种

从天然发酵的红曲米中分离的 30 株红曲霉菌株,编号见表 2。

#### 1.1.2 主要试剂

酵母浸粉、蛋白胨、牛肉膏,均为生物制剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;葡萄糖、蔗糖、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;琼脂粉,北京畅华志诚技术有限公司;米粉,宁波市江北五桥粮油有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA),北京陆桥技术有限公司;甲醇、乙腈,均为色谱纯,Fisher 公司;Monacolin K 标准品,青岛普瑞邦生物工程有限公司;Taq 聚合酶,宝日医生物技术(北京)有限公司(takara 中国);真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基:PDA 培养基。

种子培养基(L)<sup>[12]</sup>:米粉 30 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 15 g, $\text{NaNO}_3$  2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g,pH 自然。

发酵培养基(L)<sup>[12]</sup>:葡萄糖 70 g,牛肉膏 15 g, $\text{NaNO}_3$  2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g,pH 自然。

## 1.2 主要仪器与设备

BSA2202S 型电子天平,赛多利斯工业称重设备(北京)有限公司;DL-CJ-2ND1 型洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;MLS-3750 型立式压力蒸汽灭菌锅,日本三洋电器股份有限公司;THZ-C 型恒温振荡器,苏州培英实验设备有限公司;1260 型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;DYY-6D 型电泳仪,WD-9413B 凝胶成像分析仪,均为北京六一生物科技有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 红曲霉菌株的筛选

将采样自福建地区的天然发酵的红曲米磨碎,以接种环蘸取少量红曲米接种于 PDA 培养基平板上,进行连续多次划线分离,直到产生早期为白色、后期为红色或紫色的单菌落,再用 PDA 固体培养基纯化培养,将所获菌株编号,编号见表 2,置 4 ℃ 冰箱中保存,备用。

### 1.3.2 发酵液 Monacolin K 产量测定

将所筛菌种接种于 PDA 斜面培养基,28 ℃ 恒温培养 6 天。种子液制备:100 mL 三角瓶装入种子培养基 50 mL,接种 0.5 cm × 0.5 cm 大小的菌块,八层纱布包扎,28 ℃、160 rpm 恒温摇床中培养 3 天。液体发酵培养:100 mL 三角瓶装入发酵培养基 50 mL,按体积分数 7% 的接种量接种,八层纱布包扎,28 ℃、160 rpm 恒温摇床中培养 7 天。

取 2 mL 发酵液于 50 mL 的离心管中,加入 8 mL 无水甲醇。混匀放置于摇床中 160 rpm 震荡提取 3 h,5 000 rpm 离心 10 min 取上清<sup>[13]</sup>,用 0.22 μm 有机滤膜过滤后通过高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)进行 Monacolin K 产量测定<sup>[14]</sup>。

HPLC 检测条件,色谱柱 ZORBAX300SB-C<sub>18</sub>;柱长 150 mm;内径 4.6 mm;粒径 5 μm。流动相 V(乙腈):V(0.01% 磷酸) = 65:35;检测波长 237 nm;进样体积 20 μL;流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃。

### 1.3.3 菌株 Monacolin K 产量稳定性研究

将高产 Monacolin K 的优势菌株作为目的菌株进行传代培养,连续培养 10 代,通过测定每一代发酵液的 Monacolin K 产量分析其稳定性,测定方法同上。

### 1.3.4 菌株鉴定

将目的菌株接种于 PDA 平板上培养 7 天,观察目的菌株在 PDA 培养基上菌落形态和显微结构。采用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取红曲霉

基因组 DNA<sup>[15]</sup>, 采用 PCR 方法扩增 ITS rDNA 基因, 引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), PCR 反应体系见表 1。

表 1 红曲霉菌株 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system by *Monascus strain*

试剂名称(浓度) Reagent name (concentration)	体积 Volume ( $\mu\text{L}$ )
DNA	1
ITS1 (10 $\mu\text{M}$ )	1
ITS2 (10 $\mu\text{M}$ )	1
Taq 酶溶液 Ex Taq (2 $\times$ )	12.5
双蒸水 dd H <sub>2</sub> O	9.5

PCR 循环条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min<sup>[16]</sup>。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 对比分析。将目的菌株送至中国科学院微生物研究所进行微生物菌种鉴定。

### 1.3.5 发酵条件优化

以发酵液 Monacolin K 产量为评价指标进行单

因素试验, 发酵培养基配方同上, 并设定初始培养条件为: 发酵温度为 28  $^{\circ}\text{C}$ , 初始 pH 值自然, 接种量为体积分数 7%, 发酵时间为 7 天。对发酵培养的主要影响因素(接种量、发酵温度、发酵时间、初始 pH)进行单因素优化试验<sup>[17]</sup>, 接种量分别设定为体积分数 6%、7%、8%、9%、10%; 发酵温度设定为 24、26、28、30、32  $^{\circ}\text{C}$ ; 发酵时间分别设定为 6、8、10、12、14 天; 初始 pH 值设定为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0。测定各条件下发酵液中 Monacolin K 的产量, 每个实验重复 3 次。

在此单因素试验基础上, 设计正交试验方案如表 4。

## 2 研究结果与分析

### 2.1 高产 Monacolin K 红曲霉菌株筛选

将 PDA 平板上分批次分离的 30 株红曲霉菌株, 分别标记菌株代号为 ZX1、ZX2...ZX30。分别对 30 株红曲霉进行产 Monacolin K 能力检测试验。结果如表 2 所示, 有 9 株红曲霉的发酵液在检测波长 237nm 处有特征吸收峰, 说明具有产 Monacolin K 的能力; 其余 21 株没有特征吸收峰, 可初步判断这些菌株不产 Monacolin K。9 株红曲霉产 Monacolin K 能力差异较大, 其中编号 ZX26 菌株产 Monacolin K 能力最强, 达到 101.60 mg/L, 故在后继发酵条件优化中选择编号 ZX26 为目标菌株。

表 2 红曲霉菌株 Monacolin K 产量

Table 2 The concentration of Monacolin K produced by *Monascus Strain*

菌株号 Strain No.	Monacolin K 质量浓度 Monacolin K concentration (mg/L)	菌株号 Strain No.	Monacolin K 质量浓度 Monacolin K concentration (mg/L)
ZX1	0	ZX16	0
ZX2	66.93 $\pm$ 2.24	ZX17	0
ZX3	0	ZX18	0
ZX4	73.42 $\pm$ 2.68	ZX19	0
ZX5	0	ZX20	60.08 $\pm$ 2.20
ZX6	0	ZX21	0
ZX7	0	ZX22	0
ZX8	0	ZX23	90.68 $\pm$ 2.44
ZX9	0	ZX24	68.11 $\pm$ 2.41
ZX10	0	ZX25	0
ZX11	54.35 $\pm$ 2.71	ZX26	107.60 $\pm$ 2.01
ZX12	5.85 $\pm$ 1.15	ZX27	0
ZX13	0	ZX28	0
ZX14	0	ZX29	0
ZX15	11.51 $\pm$ 2.06	ZX30	0

## 2.2 红曲霉 ZX26 Monacolin K 产量稳定性

将编号为 ZX26 菌株传代培养,进行产 Monacolin K 稳定性试验,通过测定每一代发酵液的 Monacolin K 质量浓度,来判断产 Monacolin K 稳定性。结果如表 3 所示。

表 3 红曲霉 ZX26 产 Monacolin K 稳定性(连续培养 10 代)

Table 3 Genetic stability of ZX26 strain (continuous culture for 10 generations)

ZX26 遗传代数 ZX26 strain Number of inheritance	Monacolin K 质量浓度 Monacolin K concentration (mg/L)
第一代 First generation	108.32 ± 3.05
第二代 Second generation	106.55 ± 3.05
第三代 Third Generation	108.00 ± 2.94
第四代 Fourth Generation	107.75 ± 2.83
第五代 Fifth Generation	108.40 ± 2.55
第六代 Sixth generation	109.09 ± 3.28
第七代 Seventh generation	108.05 ± 2.93
第八代 Eighth generation	107.50 ± 3.09
第九代 Ninth generation	108.80 ± 2.94
第十代 Tenth generation	106.07 ± 2.86

结果表明,红曲霉 ZX26 菌株连续培养 10 代后,其 Monacolin K 产量仍然处于较高水平,可以基本判断 ZX26 菌株在产 Monacolin K 能力方面具有良好的稳定性。

## 2.3 ZX26 菌株的形态学鉴定与分子学鉴定

### 2.3.1 ZX26 菌株的菌落形态及显微特征

将编号为 ZX26 菌株接种于在 PDA 平板培养基上 28 ℃ 培养 7 天,直径 5 cm,紫红色,绒毛状,皱裂(图 1a),反面紫红色。菌丝具隔膜,多分枝,直径 3 ~ 6 μm。闭囊壳球形,直径 25 ~ 50 μm(图 1b),橙红色至紫红色。子囊孢子椭圆形,5 ~ 6 × 4 ~ 5 μm。分生孢子着生于孢梗顶端,单个或成串,近球形或倒梨形,8 ~ 11 × 6 ~ 8 μm(图 1c)。

### 2.3.2 ZX26 菌株的分子测序结果

将编号为 ZX26 菌株 ITS rDNA 基因 PCR 扩增后的结果送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 ITS 测序,得到了大小为 571bp 的序列。在 NCBI 中检索与该菌株序列相似性较高的菌株,结果表明 ZX26 菌株与 GenBank 数据库中红曲霉菌株同源性高达 98% ~ 99%。进化性分析表明(图 2),红曲霉 ZX26 与 *Monascus purpureus* strain FRR 1596 亲



图 1 菌株 ZX26 形态学鉴定

Fig. 1 Morphological identification of strain ZX26

缘关系最近,因此并将其命名为紫红曲霉 ZX26 (*Monascus purpureus* ZX26),且经中国科学院微生物研究所进行微生物菌种鉴定,此菌株为紫红曲霉 (*Monascus purpureus*),并于 2018 年 07 月 11 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 15992。

## 2.4 单因素培养条件确定

### 2.4.1 接种量的确定

不同接种量对紫红曲霉 ZX26 的影响结果如图 3 所示,接种量在体积分数 7% ~ 9% 时,有利于 Monacolin K 产量增加,在体积分数为 7% 的接种量时

Monacolin K 产量最高,为 101.62 mg/L。当接种量大于体积分数 9% 时,Monacolin K 产量开始下降。分析由于随着接种量的增加,菌体繁殖速度加快,Monacolin K 的产量也相应增加,但当接种量过高,菌体需要的能量大于培养基能提供的能量时,由于营养物质匮乏导致紫红曲霉 ZX26 生命活力下降,故 Monacolin K 的产量也相应减少。

### 2.4.2 发酵温度的确定

不同发酵温度对紫红曲霉 ZX26 的影响结果如图 4 所示,随着发酵温度的提高,Monacolin K 产量

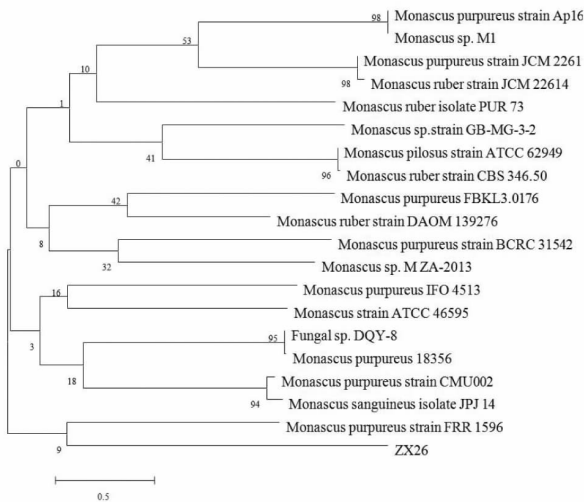


图2 基于菌株 ZX26 的 ITS 序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain ZX26 based on ITS sequences

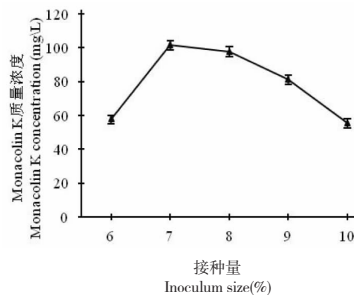


图3 不同接种量下 Monacolin K 的产量

Fig. 3 The effects of different inoculum on Monacolin K production

增加,在 30 ℃ 时 Monacolin K 产量达到最大值,为 111.47 mg/L,随后随着温度的升高,Monacolin K 产量开始下降。分析由于菌体对温度较为敏感,温度过高或过低都会使 Monacolin K 产量降低。

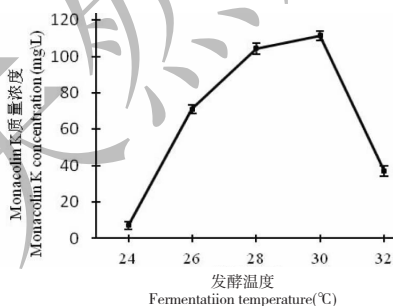


图4 不同发酵温度对 Monacolin K 产量的影响

Fig. 4 The effects of different temperature on Monacolin K production

#### 2.4.3 发酵时间对 Monacolin K 产量的影响

不同发酵时间对紫红曲霉 ZX26 的影响结果如

图5所示,随着发酵时间的增加,Monacolin K 产量也随之增加。在 14 天时 Monacolin K 产量达到峰值为 100.30 mg/L,但是,相对比 10 天时,Monacolin K 产量仅增加了 0.63 mg/L,结合实际分析,故认为最佳生长时间为 10 天。推测是因为在发酵初期,培养基内的营养物质充裕,菌体大量繁殖,故 Monacolin K 产量增加。后期培养基内的营养物质减少,同时菌体处于衰亡期,菌体数量开始减少,故产生 Monacolin K 的产量也相应减少。

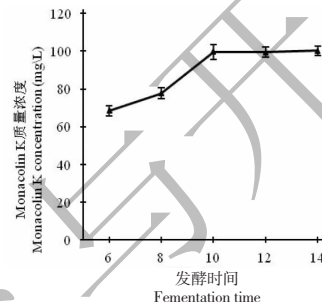


图5 不同发酵时间对 Monacolin K 产量的影响

Fig. 5 The effects of different fermentation time on Monacolin K production

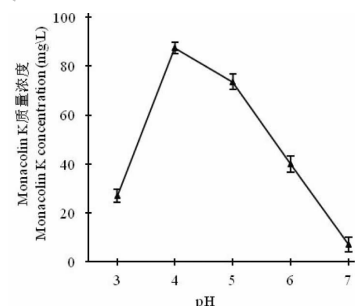


图6 不同初始 pH 对 Monacolin K 产量的影响

Fig. 6 The effects of different potential of hydrogen on Monacolin K production

#### 2.4.4 初始 pH 对 Monacolin K 产量的影响

初始 pH 对紫红曲霉 ZX26 的影响结果如图6所示,Monacolin K 产量在初始 pH 4~6 范围内较为理想。当发酵液的初始 pH 为 4.0 时,Monacolin K 产量达到峰值为 87.5 mg/L。当发酵液 pH 大于 5.0 时,Monacolin K 产量急剧下降。

#### 2.5 正交试验结果

为了更加方便快捷的确定各因素对 Monacolin K 产量的影响,以接种量、发酵温度、发酵时间、初始 pH 值设计了单因素试验并结合单因素试验的结果,设计四因素三水平正交试验  $L_9(3^4)$ 。试验设计如表4,试验结果如表5。

表4 不同元素水平  
Table 4 Levels of different elements

水平 Levels	因素 Factor			
	A	B	C	D
	接种量 Inoculum size (%)	培养温度 Culture temperature (°C)	发酵时间 Fermentation time (d)	初始 pH Initial pH
1	7	30	6	6
2	8	28	8	5
3	9	26	10	4

表5 发酵条件优化正交试验结果与分析  
Table 5 Results and analysis of orthogonal experiments for fermentation conditions optimization

序号 No.	因素 Factor				Monacolin K 质量浓度 Monacolin K concentration (mg/L)
	1 A	2 B	3 C	4 D	
1	1 (7)	1 (30)	1 (6)	1 (6)	257.39 ± 2.12
2	1	2 (28)	2 (8)	2 (5)	227.23 ± 2.09
3	1	3 (26)	3 (10)	3 (4)	96.79 ± 3.17
4	2 (8)	1	2	3	267.04 ± 3.00
5	2	2	3	1	233.77 ± 2.57
6	2	3	1	2	37.08 ± 3.22
7	3 (9)	1	3	2	222.14 ± 2.02
8	3	2	1	3	239.72 ± 2.33
9	3	3	2	1	50.34 ± 2.21
均值 1 Mean value 1	193.80	248.86	178.06	180.50	
均值 2 Mean value 2	179.30	233.57	181.54	162.15	
均值 3 Mean value 3	170.73	61.40	184.23	201.18	
极差 Range	23.07	187.46	6.17	39.03	

结果所示,极差 R 值大小顺序为:  $R_B > R_D > R_A > R_C$ ,说明发酵温度是 Monacolin K 产量最显著的影响因素。K 值分析结果显示,4 个因素的最优组合为  $A_1 B_1 C_3 D_3$ ,即接种量为体积分数 7%,发酵温度为 30 °C,发酵时间为 10 天,初始 pH 值为 4.0。根据此组合进行发酵试验验证(设置 3 个平行组),得出最终 Monacolin K 产量 271.36 mg/L,高于正交试验中所有的组合结果,说明该组合确实为最佳发酵条件。

### 3 结论

本文从高产 Monacolin K 的红曲霉菌株筛选出发,获得一株 Monacolin K 产量较高的紫红曲霉 ZX26 菌株,并对培养条件进行进一步优化。获得结论为,在培养基组分为葡萄糖 70 g/L,牛肉膏 15 g/L,  $\text{NaNO}_3$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5

g/L 下其最优发酵条件为:接种量为体积分数 7%,发酵温度为 30 °C,初始 pH 值为 4.0,发酵时间为 10 天。在此条件下,紫红曲霉 ZX26 发酵液中 Monacolin K 产量达 271.36 mg/L,相对于培养条件优化前 Monacolin K 产量提高 152.19%,经验证此培养条件下 Monacolin K 产量最佳。通过实验为紫红曲霉中 Monacolin K 的进一步研究提供了理论基础。

### 参考文献

- 1 Shen SX. Study, Production and application of ang-kak[J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2001, 22(1): 85-87.
- 2 Bibhu PP, Saleem J, Mohammad A. Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*[J]. Food Bio Tech, 2010, 3: 373-378.