

高产洛伐他汀紫色红曲霉的分离与 ITS 分子鉴定

王琼晓, 齐方圆, 鲍博涵, 孙庆妹, 秦路平*, 朱波* (浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要:目的 筛选高产洛伐他汀的紫色红曲霉菌种,为红曲产业发展提供菌种参考。方法 收集红曲资源 12 份,采用传统分离法进行红曲霉的分离,结合形态学与 ITS 测序进行菌种鉴定,进一步选取紫色红曲霉菌株,采用高效液相色谱法(HPLC)测定其代谢产物中总洛伐他汀[包括内酯式洛伐他汀($C_{24}H_{36}O_5$)和酸式洛伐他汀($C_{24}H_{38}O_6$)]的含量,用 SPSS 25.0 软件进行方差分析。结果 从 12 个产地中共分离得到红曲霉属(*Monascus* sp.)菌株 35 株,其中 23 株鉴定到种,包括紫色红曲霉(*M. purpureus*)11 株,红色红曲霉(*M. ruber*)10 株,橙色红曲霉(*M. aurantiacus*)2 株。11 株紫色红曲霉菌株发酵产物中洛伐他汀含量存在显著差异($P < 0.05$),其中 SM-1 菌株总洛伐他汀含量最高,达 $(4.652 \pm 0.001) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;其次为 M4-1、F1-3,分别为 (2.903 ± 0.033) $(3.108 \pm 0.009) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,最低菌株为 M4-5,仅有 $(2.712 \pm 0.014) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论 市售红曲米发酵所用红曲霉繁杂;筛选得到一株高产洛伐他汀的菌株 SM-1,可作为红曲米发酵的备选菌株。

关键词:红曲霉;分离和分子鉴定;洛伐他汀;菌种筛选

doi:10.11669/cpj.2024.03.004 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)03-0220-07

Isolation and Molecular Identification of *Monascus purpureus* with High Yield of Lovastatin

WANG Qiongxiao, QI Fangyuan, BAO Bohan, SUN Qingmei, QIN Luping*, ZHU bo* (School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To screen one *Monascus purpureus* stain that has high yield of lovastatin and provide potential strains for the development of red yeast rice (RYR) industry. **METHODS** Twelve RYR samples were collected, and *Monascus* sp. was isolated from these samples using traditional isolation technology and identified by morphology and ITS sequencing. All *M. purpureus* strains were screened and their total lovastatin contents [including lactone lovastatin ($C_{24}H_{36}O_5$) and acid lovastatin ($C_{24}H_{38}O_6$)] were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). SPSS 25.0 was used for variance analysis. **RESULTS** A total of 35 *Monascus* sp. strains were isolated and 23 of them were identified at specie level, including 11 *M. purpureus* strains, 10 *M. ruber* strains and 2 *M. aurantiacus* strains. There was significant difference ($P < 0.05$) in lovastatin production among 11 *M. purpureus* strains. Among them, SM-1 isolate produced the highest amount of total lovastatin, with the value reaching $(4.652 \pm 0.001) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, followed by M4-1, F1-3, and F5-3 strains with the value reaching (2.903 ± 0.033) and $(3.108 \pm 0.009) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. M4-5 isolate produced the lowest amount of lovastatin with the value of $(2.712 \pm 0.014) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **CONCLUSION** Fungal strain is chaotic in the fermentation of RYR on the market. A high-yielding lovastatin strain SM-1 is screened and can be used a potential strain for RYR production.

KEY WORDS: *Monascus* sp.; isolation and molecular identification; lovastatin; strain screening

红曲是由曲霉科真菌紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*) 菌株,接种于稻米(去皮种仁)上,人工培养制成^[1-2]。红曲为药食同源,具有健脾消食,活血化瘀,以及降血糖、降血脂、降血压等功效^[3]。在目前的红曲成品中,常出现红曲发酵菌种混杂且退化、生产过程不规范的问题。红曲霉属是一个多功能的丝状真菌类群,包括从毛红曲霉 (*M. pilosus*)、紫色

红曲霉 (*M. purpureus*)、红色红曲霉 (*M. ruber*)、烟色红曲霉 (*M. fuliginosus* Sato)、发白红曲霉 (*M. albidus*)、锈色红曲霉 (*M. rubiginosus*)、变红红曲霉 (*M. rubropunctatus* Sato)、橙色红曲霉 (*M. aurantiacus*) 等^[4]。紫色红曲霉 *M. purpureus* 属于小型丝状腐生真菌,可产生的有益次生代谢产物有天然色素、洛伐他汀、 γ -氨基丁酸等^[3],在食品、药品领域应

作者简介:王琼晓,女,学士 研究方向:中药资源评价 * 通讯作者:朱波,男,副研究员,硕士生导师 研究方向:中药新资源
Tel:(0571)61768525;秦路平,男,教授,博士生导师 研究方向:中药资源评价与质量控制 Tel:(0571)61768525

用广泛。洛伐他汀具有抑制胆固醇合成、保护肾脏、抗动脉粥样硬化、预防癌症等功能^[5]；洛伐他汀中含有一个与 HMG-CoA 结构相似的基团，能竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶活性，制约胆固醇的过量合成^[6]。2020 年版《中国药典》红曲质量标准规定 C₂₄H₃₆O₅ (内酯式) 不得少于 0.22%。现有的对红曲中洛伐他汀的研究表明固态发酵产物中洛伐他汀的含量比液态发酵高^[7-8]。另外，在不同生产条件下，同种菌株洛伐他汀含量有所不同是由于培养条件的变化导致菌种生产能力差异，而在相同条件下，同种菌株洛伐他汀产生能力不同则是因为菌株本身在代谢过程中基因表达差异不同。

表 1 不同产地红曲米样品信息

Tab. 1 Red yeast rice collected from various origins

Sample name	Morphological classification	Collection time	Origins (in Chinese)
Zhejiang SM	Monascus powder	June 2019	Jiande, Zhejiang(浙江建德)
Zhejiang BD	Monascus powder	June 2019	Ningbo, Zhejiang(浙江宁波)
Zhejiang SH	Monascus powder	June 2019	Jiangshan, Zhejiang(浙江江山)
Zhejiang YJ	Red yeast rice	July 2019	Lishui, Zhejiang(浙江丽水)
Zhejiang TJT	Red yeast rice	June 2019	Hangzhou, Zhejiang(浙江杭州)
Zhejiang TX	Red yeast rice	June 2019	Gutian, Fujian 1(福建古田 1)
Fujian PHH	Red yeast rice	June 2019	Gutian, Fujian 2(福建古田 2)
Fujian SF	Red yeast rice	July 2019	Nanping, Fujian(福建南平)
Fujian XXC	Red yeast rice	June 2019	Pingnan, Fujian(福建屏南)
Hubei JC	Red yeast rice	June 2019	Wuhan, Hubei(湖北武汉)
Shandong ZH	Monascus powder	July 2019	Binzhou, Shandong(山东滨州)
Yunnan NJ	Monascus powder	June 2019	Kunming, Yunnan(云南昆明)

1.2 试剂

酵母浸膏(上海博微生物科技股份有限公司)；琼脂粉(纯化,杭州百思生物技术有限公司)；DNA iso(9770A)、6 × Loading Buffer(9156)、Marker(1000 bp)均购于宝日生物技术有限公司(北京)有限公司；TE 缓冲液(N634,河北品科研生物科技有限公司)；核酸染料[10201ES03,翌圣生物科技(上海)有限公司]；乙腈、磷酸(色谱级)；洛伐他汀对照品(B20806-20 mg,上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 仪器

霉菌恒温培养箱(LMI-475-N,上海龙跃仪器设备有限公司)；pH 计(FE28,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)；立式压力蒸汽灭菌器(YXQ-LS-75S II,上海博讯实业有限公司医疗设备厂)；离心机(5810R)、超低温冰箱(900 Series)均购于艾本德中国有限公司；PCR 仪(4375786,赛默飞世尔科技(中国)有限公司)；电泳仪(DYY-8C,北京六一生物科技有限公司)；凝胶成像仪(GenoSens 1850,上海勤

因此,本研究采用传统分离法进行红曲菌株的分离,结合形态学和内源转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列分析,筛选出不同的红曲霉菌株从而获得目标紫色红曲霉菌株,利用 HPLC 测定,筛选得到高产洛伐他汀的紫色红曲霉菌株。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料

2019 年 6 月至 2019 年 7 月,收集浙江、福建、山东、湖北、云南等省红曲米资源 12 份,保存于浙江中医药大学中药资源教研室,见表 1。

翔科学仪器有限公司)；电热鼓风干燥箱(DHG-9080A)、电热恒温水浴锅(HWS-24)均购于上海哈伟实业有限公司；高速粉碎机(DXF-06D,温岭市林大机械有限公司)；高效液相色谱仪(Waters Alliance e2695,美国 Waters 公司)；数控超声波清洗器(KQ-300DV,昆山市超声仪器有限公司)；超纯水仪(Milli-Q,美国 Millipore 公司)。

2 实验方法

2.1 培养基的配制

分离纯化培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA 培养基)。种子液培养基的配制参考已有文献[9]进行改良:称取 50 g 葡萄糖(5%)、10 g 蛋白胨(1%)、10 g 酵母浸膏(1%)、1 g KH₂PO₄ (0.1%)、0.01 g FeSO₄ · 7H₂O (0.001%)、0.5 g MgSO₄ · 7H₂O (0.05%)、纯水定容至 1 L(大米营养液在此基础调 pH 至 4.0),分装于 250 mL 三角瓶中(每瓶 100 mL),用 8 层纱布和一层牛皮纸封

口,棉线绳扎紧,经 121 °C 高温灭菌 30 min,洁净工作台内紫外放凉,待接菌。大米培养基:取过 60 目筛的籼米米粉 135 g 和米糠 15 g(减少黏性,发酵完成后筛去)置于 650 mL 大组培瓶中,混合均匀后加入 54 mL 营养液($0.36 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,营养液即种子液培养基基础调 pH 至 4.0),再次混合均匀,用 8 层纱布和一层牛皮纸封口,棉线绳扎紧,经 121 °C 高压灭菌 40 min,洁净工作台内紫外放凉,即得。

2.2 红曲霉菌株的分离与纯化

将不同来源的红曲米研磨成粉和红曲米粉分别少量均匀撒于 PDA 培养基中,用两层封口膜封紧,置于霉菌恒温培养箱(28 °C)中培养 3~5 d,待白色绒毛菌丝长出后,洁净工作台内操作挑取少许菌丝接种于 PDA 培养基上培养 1 周,后转移纯化培养 3 次即可在培养基上出现形态单一的菌落。

2.3 红曲霉菌株的 ITS 鉴定

采用 TakaRa DNAiso 9770A 试剂盒对分离出的单一真菌进行基因组 DNA 的提取。采用通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增,扩增反应体系($50 \mu\text{L}$):DNA 样本 $2 \mu\text{L}$,ITS4 $1 \mu\text{L}$,ITS5 $1 \mu\text{L}$, $2 \times$ Tap PCR MasterMix $25 \mu\text{L}$,dd H_2O $21 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应条件具体如下:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后在 72 °C 下稳定延伸 5 min,终止反应,-20 °C 保存。吸取扩增产物 $5 \mu\text{L}$ 经琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将基因测序结果与 BLAST 工具软件进行比对,选取同源性较高的菌株序列并下载作为参考序列比对,

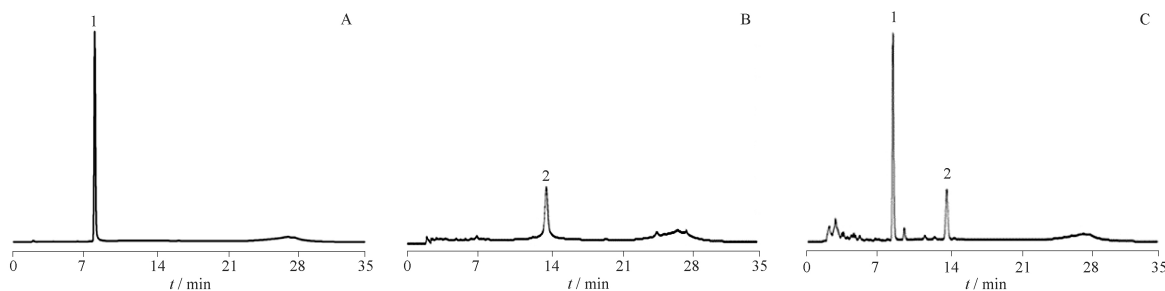
利用 MEGA 7.0 软件分析,以邻位连接法构建系统发育树^[10]。

2.4 紫色红曲霉固态发酵

选取分离鉴定得到的且保藏生长状态较好的 11 株紫色红曲霉菌株,分别为 M1-7、M2-4、M4-1、M4-5、F1-3、F4-4、F4-7、F5-5、SM-1、HQ-W、YY1~3 进行菌种活化。用经过高温灭菌的打孔器(6 mm)在活化好的菌种平板上打出菌饼,接种到液体种子液培养基中(每 150 mL 1 个菌饼),用 8 层纱布和 1 层牛皮纸封口,橡皮筋扎紧,30 °C,160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,避光恒温振荡培养 3 d,期间注意观察颜色及黏稠度的变化。大米培养基放凉($<40 \text{ }^\circ\text{C}$),接入 20% 种子液($0.2 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$),敲打松散混合均匀后用 8 层纱布和 1 层牛皮纸封口,橡皮筋扎紧,变温培养,培养箱内 30 °C 避光静置培养 3 d,后降温至 26 °C 稳定 6 h,敲散培养基呈松散状态,继续培养至 35 d。期间每隔 5 d 敲打松散(无需打开发酵瓶,防污染)。固态发酵期间,每隔 5 d 洁净工作台内取样一次(5、10、15、20、25、30、35 d),60~65 °C 烘 4~5 h 至恒重,研磨粉碎后过 60 目筛,密封于封装袋中备用。

2.5 HPLC 色谱条件

以 ZORBAX Eclipse C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 为色谱柱,乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)为流动相,梯度洗脱(1~5 min,60%~65% A;5~20 min,65% A;20~25 min,65%~90% A;25~30 min,90%~60% A;30~35 min,60%),体积流量为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 28 °C,检测波长 238 nm,进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。对照品溶液及发酵产物样品溶液 HPLC 色谱图见图 1。



1 - 酸式洛伐他汀; 2 - 内酯式洛伐他汀。

1 - lovastatin acid; 2 - lovastatin lactone.

图 1 酸式洛伐他汀(A)、内酯式洛伐他汀(B)与发酵产物样品(C)的高效液相色谱(HPLC)法色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of lovastatin acid(A), lovastatin lactone(B) and fermentation products(C)

2.6 标准品、供试品溶液的配制

内酯式洛伐他汀标准品溶液:精密称取洛伐他汀标准品适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻

度,配制成浓度为 $206.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内酯式洛伐他汀标准品溶液。

酸式洛伐他汀标准品溶液^[11]:精密称取内酯式

洛伐他汀标准品 2 mg, 适量甲醇溶解, 用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液超声转化 40 min, 取出冷却后, 用 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸将 pH 调至 7.7, 加甲醇定容至 10 mL 量瓶, 即得 $208.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酸式洛伐他汀标准品溶液。

供试品溶液的配制: 精密称取经烘干粉碎后的发酵产物(过 60 目筛) 0.5 g, 置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声(300 W, 40 KHz) 45 min 后, 取出, 放冷, 再称定质量, 加甲醇补足失重, 摇晃均匀, 离心($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔有机滤膜, 取续滤液, 即得, 实验重复 3 次($n=3$)。

2.7 线性关系、检测限及定量限考察

将“2.6”项下各标准品溶液用甲醇进行稀释后, 在“2.5”项下相对应成分色谱条件下进样测定, 以标准品溶液质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归分析, 可得到内酯式洛伐他汀、酸式洛伐他汀的线性回归方程, 分别为 $Y=27454X-3352.9$, $Y=40797X+70300$ 。各标准品溶液稀释至不同倍数后, 在“2.5”项下相对应成

分色谱条件下进样测定, 采用信噪比法测定各指标成分的检测限($S/N=3:1$)及定量限($S/N=10:1$), 内酯式洛伐他汀的检测限和定量限分别为 87.87, $293.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 酸式洛伐他汀的检测限和定量限分别为 35.65, $119.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。两个成分在一定的浓度范围内与峰面积的线性关系良好。

2.8 样品含有量测定

将“2.6”项下供试品处理溶液在“2.5”项下相对应成分色谱条件下进样测定, 记录峰面积, 计算样品中内酯式洛伐他汀、酸式洛伐他汀的含有量, 并对其含有量差异比较分析。

2.9 数据处理与分析

应用 SPSS 25.0 软件处理数据, 方差分析采用单因素 ANOVA 分析, 聚类分析采用组间联接法^[12]。

3 结果与分析

3.1 红曲霉菌株的分离与纯化

应用传统分离法, 并通过对菌落形态的观察, 从红曲样品中共计分离真菌 117 株, 纯化后获得单一菌落菌株 35 株, 部分菌株在 PDA 培养基上的形态见图 2。

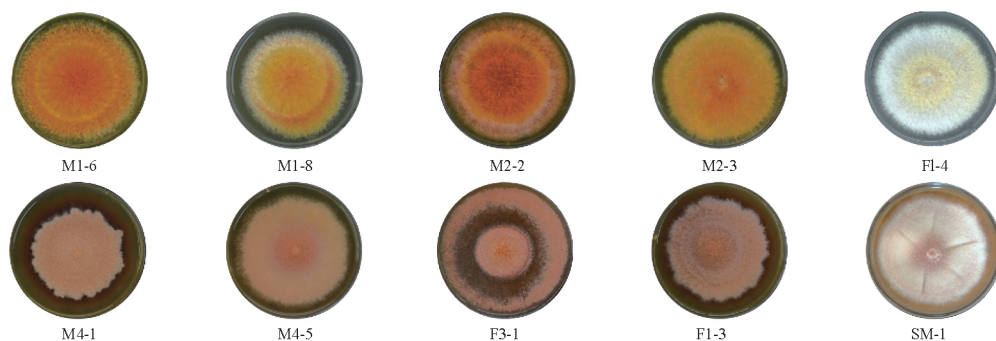


图 2 部分红曲霉菌株在 potato dextrose agar(PDA 培养基)上的菌落形态

Fig. 2 Colonial morphology of isolated *Monascus* sp.

3.2 红曲霉菌株的 ITS 鉴定

ITS 序列比对和鉴定结果见表 3, 由表 3 可知, 35 株红曲霉菌株 Blast 比对结果相似度可达 97%~100%, 其中可鉴定到红曲霉属(M1-6、M2-1、M2-2、M4-4、F1-4、F2-3、F4-1、F4-3、F4-5、F4-6、F5-1、F5-4)的菌株共计 12 株; 紫色红曲霉(M1-7、M2-4、M4-1、M4-5、F1-3、F4-4、F4-7、F5-5、SM-1、YY1-3、HQ-W)共计 11 株, 红色红曲霉(M4-2、M4-3、M4-4'、M4-6、M6-2、M6-3、M6-4、F3-1、F4-2、F5-2)共计 10 株, 橙色红曲霉(M1-8、M2-3)共计 2 株。SM-1 与 *Monascus* 属的 4 个参考序列形成支持强度为 99% 的分

支, 并且 SM-1 与 *M. purpureus* (LT963493.1) 形成支持强度为 99% 的末端分支。部分红曲霉菌 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图见图 3, 系统发育树见图 4。

3.3 高产洛伐他汀紫色红曲霉的筛选

采用 HPLC 对 11 株紫色红曲霉(*M. purpureus*)的固态发酵产物进行内酯式及酸式洛伐他汀的测定, 并计算总洛伐他汀的含有量, 结果见表 4, 图 5。由表 4 可知, 11 株紫色红曲霉中有 4 株(SM-1、M4-1、F1-3、M4-5)产洛伐他汀, 其中, 发酵 35 d 结束后, SM-1 产总洛伐他汀含量最高, 可达到

表3 35株红曲霉内源转录间隔区(ITS)序列比对及鉴定结果

Tab. 3 ITS sequence alignment and identification of 35 *Monascus* sp. isolates

Strain number	Result	Strain number	Result
M1-6	<i>Monascus</i> sp.	F1-4	<i>Monascus</i> sp.
M1-7	<i>Monascus purpureus</i>	F2-3	<i>Monascus</i> sp.
M1-8	<i>Monascus aurantiacus</i>	F3-1	<i>Monascus ruber</i>
M2-1	<i>Monascus</i> sp.	F4-1	<i>Monascus</i> sp.
M2-2	<i>Monascus</i> sp.	F4-2	<i>Monascus ruber</i>
M2-3	<i>Monascus aurantiacus</i>	F4-3	<i>Monascus</i> sp.
M2-4	<i>Monascus purpureus</i>	F4-4	<i>Monascus purpureus</i>
M4-1	<i>Monascus purpureus</i>	F4-5	<i>Monascus</i> sp.
M4-2	<i>Monascus ruber</i>	F4-6	<i>Monascus</i> sp.
M4-3	<i>Monascus ruber</i>	F4-7	<i>Monascus purpureus</i>
M4-4	<i>Monascus</i> sp.	F5-1	<i>Monascus</i> sp.
M4-4'	<i>Monascus ruber</i>	F5-2	<i>Monascus ruber</i>
M4-5	<i>Monascus purpureus</i>	F5-4	<i>Monascus</i> sp.
M4-6	<i>Monascus ruber</i>	F5-5	<i>Monascus purpureus</i>
M6-2	<i>Monascus ruber</i>	SM-1	<i>Monascus purpureus</i>
M6-3	<i>Monascus ruber</i>	YY1-3	<i>Monascus purpureus</i>
M6-4	<i>Monascus ruber</i>	HQ-W	<i>Monascus purpureus</i>
F1-3	<i>Monascus purpureus</i>		

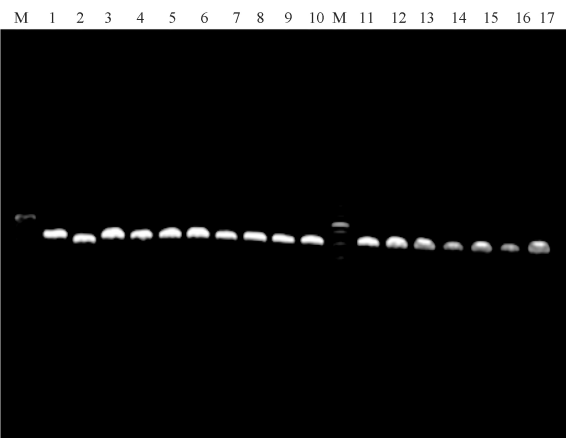


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the PCR amplification products of 35 strains of *Monascus* sp.

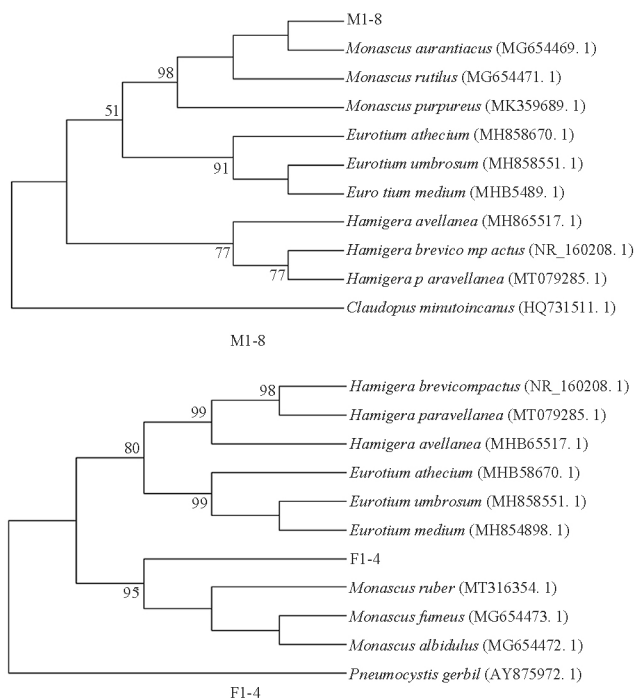
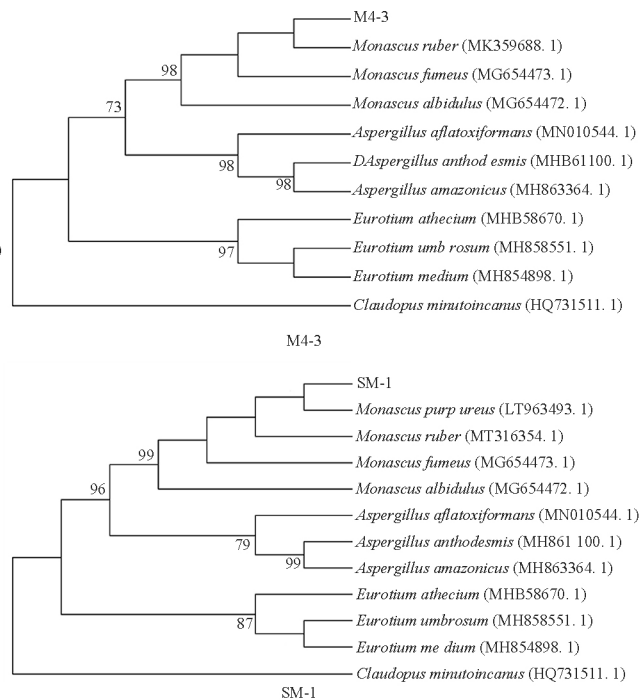


图4 M1-8、M4-3、F1-4和SM-1红曲霉的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of M1-8, M4-3, F1-4, and SM-1 *Monascus* sp. isolates



(4.652 ± 0.001) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;产量居中的有 M4-1、F1-3;产量最低的是 M4-5,仅有 (2.712 ± 0.014) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;其余7株紫色红曲霉(M1-7、M2-4、F4-4、F4-7、F5-5、HQ-W、YY1-3)不产洛伐他汀。利用SPSS 25.0软件分析,将上述4株固态发酵产生洛

伐他汀的菌株分别在同一发酵时间段总洛伐他汀的产量做差异比较分析(表4)。由表4中可知,不同菌株紫色红曲霉在发酵时间段(5、10、15、20、25、30、35 d)上产洛伐他汀的量存在显著差异($P < 0.05$)。

表 4 不同发酵时间段紫色红曲霉发酵产物内酯式及酸式洛伐他汀含量测定. $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 4 Determination results of lovastatin lactone and acid contents in fermentation products of *M. purpureus* in different fermentation periods. $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3, \bar{x} \pm s$

Sample Strain ¹⁾	Fujian SF			Fujian SF			Shandong ZH			Zhejiang SM		
	M4-1			M4-5			F1-3			SM-1		
number	lactone	acid	total	lactone	acid	total	lactone	acid	total	lactone	acid	total
5 d	0.016 ± 0.001	0.010 ± 0.000	0.026 ± 0.001 ¹⁾	0.073 ± 0.000	0.021 ± 0.000	0.094 ± 0.000	0.050 ± 0.000	0.029 ± 0.000	0.079 ± 0.000	0.022 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.031 ± 0.000
	0.412 ± 0.000	0.056 ± 0.002	0.468 ± 0.002	0.755 ± 0.003	0.047 ± 0.001	0.802 ± 0.004	0.846 ± 0.003	0.043 ± 0.002	0.889 ± 0.005	0.562 ± 0.001	0.063 ± 0.000	0.625 ± 0.001
10 d	1.486 ± 0.001	0.162 ± 0.003	1.648 ± 0.004	1.197 ± 0.004	0.133 ± 0.002	1.330 ± 0.006	1.681 ± 0.002	0.157 ± 0.002	1.838 ± 0.004	1.985 ± 0.003	0.247 ± 0.004	2.232 ± 0.007
	1.819 ± 0.007	0.284 ± 0.008	2.103 ± 0.015	1.524 ± 0.003	0.257 ± 0.002	1.781 ± 0.005	1.791 ± 0.001	0.308 ± 0.000	2.099 ± 0.001	2.633 ± 0.001	0.316 ± 0.000	2.949 ± 0.001
15 d	2.273 ± 0.002	0.367 ± 0.001	2.640 ± 0.003	2.040 ± 0.001	0.298 ± 0.001	2.338 ± 0.002	2.420 ± 0.005	0.320 ± 0.003	2.740 ± 0.008	3.350 ± 0.003	0.393 ± 0.003	3.743 ± 0.003
	2.419 ± 0.005	0.386 ± 0.007	2.805 ± 0.012	2.215 ± 0.001	0.304 ± 0.001	2.429 ± 0.001	2.460 ± 0.002	0.377 ± 0.002	2.837 ± 0.004	3.916 ± 0.001	0.434 ± 0.000	4.350 ± 0.001
20 d	2.465 ± 0.018	0.438 ± 0.015	2.903 ± 0.033	2.317 ± 0.014	0.395 ± 0.014	2.712 ± 0.014	2.700 ± 0.009	0.408 ± 0.009	3.108 ± 0.009	4.177 ± 0.000	0.475 ± 0.001	4.652 ± 0.001

注: ¹⁾分离源样品为福建 TX、福建 PHH、云南 NJ、云南 NJ、湖北 JC、福建 XXC, 菌株编号分别为 M1-7、M2-4、F4-4、F4-7、F5-5、HQ-W、YY1-3 未检测到洛伐他汀。

Note: ¹⁾The samples are Fujian TX, Fujian PHH, Yunnan NJ, Yunnan NJ, Hubei JC, Fujian XXC, lovastatin was not detected in M1-7, M2-4, F4-4, F4-7, F5-5, HQ-W, and YY1-3 strains.

4 讨论

本实验利用收集到的 12 个产地的红曲样品,从中分离得到红曲霉菌株 35 株,初步建立了红曲霉资源库。通过 ITS 测序得到 2020 年版《中国药典》所规定的红曲发酵菌种紫色红曲霉 11 株,并对 11 株紫色红曲霉进行固态发酵,利用 HPLC 测定发酵产物中总洛伐他汀的含量,筛选得到 4 株产洛伐他汀的菌株,分别为 SM-1、M4-1、F1-3、M4-5,其中 SM-1 菌株产洛伐他汀的能力最强。在酸性条件下,酸式洛伐他汀能转化为内酯式洛伐他汀,但转化并不完全^[13]。通过对它们的固体发酵产物中内酯式洛伐他汀与酸式洛伐他汀含量的比率进行分析,发现在发酵中后期(20~35 d),SM-1 菌株的内酯式洛伐他汀与酸式洛伐他汀含量的比率均大于其他四株紫色红曲霉,如发酵 35 d,SM-1 内酯式洛伐他汀与酸式洛伐他汀含量的比率为 8.79,而 M4-1、M4-5、F1-3 分别为 5.63、5.87 与 6.62,较高的内酯式洛伐他汀与酸式洛伐他汀含量比例可能是 SM-1 高产的原因之一。

从分离鉴定的结果可知,部分红曲是由橙色红曲霉或红色红曲霉发酵制成,不符合 2020 年版《中国药典》规定的紫色红曲霉发酵规定,表明市售红曲发酵菌种较为繁杂,存在红曲伪品,如浙江宁波与福建屏南产地红曲,只分离得到了红色红曲霉 *M. ruber*。

传统红曲霉发酵大多采用固态发酵,Wu 等^[14]、Wu 等^[15]通过固态发酵实验筛选出的高产洛伐他汀的红曲菌株,洛伐他汀产量分别达 $17.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $5.75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,均高于本试验 SM-1 菌株洛伐他汀的产量。经对比分析发现,Wu 等所使用的为固态发酵培养基用乳酸调节了 pH 至 5.0,并浸泡 2 h,且种子液孢子浓度控制在每克 10^6 个(大米干质量),而本实验未调节 pH 及定量孢子浓度,这可能是 SM-1 菌株产量低的原因。Wu 等所使用的固态发酵培养基中含有米粉和豆粉,比例为 3:2,该培养基有利于洛伐他汀产量积累,原因可能培养基中豆粉含有丰富的蛋白质,降低了发酵基质中 C/N 值。而有研究表明,通过降低发酵基质中 C/N 值可以有效提高洛伐他汀的产量^[16]。在下一步工作中,我们将优化 SM-1 发酵条件,包括培养基的配比与 pH,以期提高 SM-1 洛伐他汀的含量。2020 年版《中国药典》红曲质量标准规定 $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_5$ (内酯式)不得少于 0.22%,忽略了酸式洛伐他汀的存在。而纯天然发酵的红曲产品中,洛伐他汀是以内酯式与酸式两种形式存在,内酯式洛伐他汀需体内产生的羟基酯酶水解成酸式方能发挥药效,酸式洛伐他汀与 HMG-CoA 还原酶结构更为接近,具有更强的生物活性^[17],因此,同时测定红曲中两种构型洛伐他汀的含量更能反映红曲产品的质量。

REFERENCES

- [1] Ch. P (2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部)[S]. 2020; 906-907.
- [2] ZHU B, QI F, WU J, *et al.* Red yeast rice: a systematic review of the traditional uses, chemistry, pharmacology, and quality control of an important Chinese folk medicine[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1449. DOI:10.3389/fphar.2019.01449.
- [3] YU H J, JIANG Y M, ZHANG W X. Identification of *Monascus Purpureus* and optimization of the conditions for polysaccharide production in the two-stage culture[J]. *Fujian Agric Sci Technol* (福建农业科技), 2021, 52(12):32-37.
- [4] XIA X X, CHEN D, JIANG L, *et al.* Characteristics of pigment production from fermentation of different varieties of rice by *Monascus Purpureus*[J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2022, 38(5):33-42.
- [5] WANG P, XU C Y, XU D D, *et al.* Screening of high-yield lovastatin *Monascus* sp. strain and its application in red sufu[J]. *China Brew*(中国酿造), 2020, 39(11):52-57.
- [6] WU Y F. Breeding of high lovastatin-producing *Monascus* and its application in Huangjiu[D]. Wuxi:Jiangnan University, 2021.
- [7] ASHOK P, CARLOS R S, DAVID M. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products[J]. *Process Biochem*, 2000, 35(10):1153-1169.
- [8] WANG L X, MO H T, SHI H. Production of lovastatin with solid state fermentation of *Monascus ruber*[J]. *Chin J Antibiot*(中国抗生素杂志), 1999, 24(2):18-20,37.
- [9] ZHU Y H. Study on preparing high Monacolin K Red Yeast Rice from different genotypes of rice and *Monascus* strains [D]. Fuzhou:Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [10] YANG Y, LI X X, TANG O F, *et al.* Diversity and community structure of endophytic fungi in *Corydalis yanhusuo* tuber and their correlations with tetrahydropalmatine content[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2020, 51(7):1901-1908.
- [11] KLINGELHÖFER I, MORLOCK G E. Lovastatin in lactone and hydroxy acid forms and citrinin in red yeast rice powders analyzed by HPTLC-UV/FLD[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(25):6655-6665.
- [12] DING Y X, XU J X, WU W, *et al.* Simultaneous determination of four sesquiterpenes in *Atractylodes macrocephala* by HPLC[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2020, 42(4):927-931.
- [13] ZHU H, XU G R, CHEN Y. HPLC analysis of acid form and lactone form Monacolin K from *Monascus* red rice [J]. *J Wuxi Univ Light Ind*(无锡轻工大学学报), 2003, 22(3):46-52.
- [14] WU Y F, LIU S P, HAN X, *et al.* Screening of *Monascus* strains with high lovastatin production for brewage[J]. *J Food Sci Technol* (食品科学技术学报), 2021, 39(6):77-86.
- [15] WU S S, LIU W L, DENG X F, *et al.* Screening of *Monascus* strain with high Monacolin K or pigments production by ultraviolet-chemistry mutagenesis[J]. *China Brew*(中国酿造), 2018, 37(11):116-121.
- [16] SHI C, WANG X, GAO J X, *et al.* Effects of two auxiliary substrates on yield of Monacolin K and *Monascus* pigments in solid-state fermentation of red yeast rice[J]. *J Food Sci Technol* (食品科学技术学报), 2020, 38(4):119-126.
- [17] SONG J W, LUO J, MA Z B, *et al.* Quality and authenticity control of functional red yeast rice-a review [J]. *Molecules*, 2019, 24(10):1944. DOI:10.3390/molecules24101944.

(收稿日期:2023-01-15)