降脂红曲高产 Monacolin K 生产工艺优化

邢宏博[1]，张薄博[*1]，许赣荣[1]，刘仁春[1]，张 耀[1]，江 云[2]，张大永[2]
（1. 江南大学 生物工程学院 江苏无锡 214122；2. 四川新荷花中药饮片股份有限公司 四川 成都 610036）

摘要： 为了提高降脂红曲中功能性成分 Monacolin K 的产量，降低生产成本，作者从多株红曲菌中筛选出高产 Monacolin K 的菌株为红色红曲菌 9901。以不同品种的大米作为红曲菌固态发酵基质，确定广西早籼米为红色红曲菌 9901 产 Monacolin K 的最适基质，并对其高产的原因进行了初步分析，随后对发酵时间、抖料次数、变温时间、加水量及接种体积分数进行单因素实验。在此基础上用 Design-Expert 对红色红曲菌 9901 固态发酵产 Monacolin K 进行响应面分析，确定最适合红色红曲菌 9901 固态发酵产 Monacolin K 条件为：以初始含水量为 10%左右的广西早籼米作为固态发酵基质，加水量为 45 mL，接种体积分数为 10 %，先于 30 ℃培养 50 h，然后变温到 25 ℃培养至 20 d，在此条件下 Monacolin K 产量达到 10 453.07 mg/kg，比优化前提高了 48.97%。

关键词： 降脂红曲；红曲菌；Monacolin K；生产工艺；响应面优化
中图分类号：Q 81　**文章编号：**1673-1689(2020)02-0097-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.02.013

Process Optimization for Enhanced Production of Monacolin K by Lipid-Lowering *Monascus*

XING Hongbo[1]，*ZHANG Bobo*[*1]，*XU Ganrong*[1]，*LIU Renchun*[1]，*ZHANG Yao*[1]，*JIANG Yun*[2]，*ZHANG Dayong*[2]
(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Sichuan Neautus Traditional Chinese Medicine Co. LTD., Chengdu 610036, China)

Abstract: In order to improve the yield of Monacolin K in lipid-lowering *Monascus* and reduce the production cost, seven strains of *Monascus* were screened for the efficient production of Monacolin K in this study. Among the tested strains, *Monascus ruber* 9901 was found to be the most suitable one for the purpose. Various kinds of rice were used as substrates for Monacolin K production by solid-state fermentation of *Monascus ruber* 9901, among which Guangxi indica rice was found as the best substrate. Afterwards, the appropriate fermentation time, the shaking frequency, the time of temperature adjustment, the amount of water addition and inoculation were systematically studied by single factor experiments. Based on these results, the response surface design was further used for the process optimization. The results showed that the optimal conditions were 45 mL water amount, 10%

收稿日期： 2017-07-28
基金项目： 国家“十三五”重点研发计划项目(2016YFD0400802)；国家中医药管理局 2015 年中医药行业项目(201507004-03)。
* **通信作者：** 张薄博(1982—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事真菌发酵合成活性产物方面的研究。
E-mail:superzbobo@gmail.com

inoculation amount,and incubated at 30 ℃ for 50 h followed with 25 ℃ until 20 d. Under the optimal conditions,the maximal yield of Monacolin K reached 10 453.07 mg/kg,corresponding to 48.97% higher than that of the control.

Keywords: lipid-lowering *Monascus*;*Monascus* strains;Monacolin K;production process;response surface methodology

红曲作为一种药食两用丝状真菌,在我国有着悠久的历史。东汉王粲的《七释》中已有瓜州红曲的记载[1],本草纲目、本草从新及食用本草等均对红曲菌的药用价值进行介绍,这可能与红曲米发酵产生的中的活性物质有着一定关系[2]。

降脂红曲是红曲中药饮片中应用最广的品种之一。由于 Monacolin K(MK)的结构与合成胆固醇的 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-COA)结构相似,故 MK 能够竞争性抑制胆固醇合成过程中的关键酶 HMG-CoA 还原酶,从而可以有效地降低人体中胆固醇的合成量[3]。

目前对于红曲菌固态发酵产 MK 的研究,主要集中于通过优化碳源、氮源、无机盐等手段来提高 MK 的产量[4],但此法不太适用于红曲中药饮片类红曲的生产。作者从红曲菌株筛选、生产原料选择、基质加水量等基本条件进行研究,在单因素基础上用 Design-Expert 8.0 对红曲菌固态发酵的水分、变温时间和接种体积分数进行优化,以提高 MK 的产量。

1 材料与方法

1.1 红曲菌株

作者所在实验室保存菌株红色红曲菌(9901,9909)、丛毛红曲菌 9908,紫色红曲(W1,ZH2,ZH6 及 SJS-6)。

1.2 培养基

PDA 培养基:200 g 土豆,加水煮沸,过滤,定容至 1 L。加 20 g 葡萄糖,20 g 琼脂。115 ℃灭菌 15 min。

种子培养基:葡萄糖 60 g/L,蛋白胨 25 g/L,$NaNO_3$ 2 g/L,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L,$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1 g/L,玉米浆 6 g/L。121 ℃灭菌 20 min.

1.3 发酵方法与操作

1.3.1 孢子悬浮液制备 用无菌水将菌种孢子从斜面洗脱下来,制成孢子浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬液,用于接种。

1.3.2 液态种子培养 上述孢子悬液按一定的比例接种到装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 的三角瓶中,在 30 ℃、170 r/min 的旋转式摇床中培养 48 h。

1.3.3 发酵培养 将培养的液态种子按一定比例(最佳为 10%)接种于固态发酵培养基中,并放于生化培养箱培养。

1.4 MK 检测方法

按照轻工行业标准 QB/T 2847-2007 功能性红曲米(粉)的方法进行测定[5]。

1.5 红曲菌固态发酵产 MK 工艺优化

在单因素的基础上,选取加水体积分数(A)、变温时间(B)和接种体积分数(C) 3 个因素为自变量,以 MK 的产量为因变量,利用 Design-Expe 设计三因素三水平实验,响应面实验的因素水平见表 1。

表 1 响应面实验因素水平设计

Table 1 Response surface experimental factor level design

水平	因素		
	A	*B*	*C*
-1	40	24	5
0	45	48	10
1	50	72	15

1.6 直链淀粉质量分数检测方法

按照国家标准方法 GB/T 15683-2008 大米直链淀粉的测定进行测定[6]。

1.7 大米糊化特性检测方法

浸泡大米,胶体磨粉碎离心,用 0.2 mol/L 的NaOH 浸泡,过筛除杂质并用双蒸水洗涤。用 0.1 mol/L 的盐酸调节 pH,双蒸水洗涤后于 35 ℃烘干,用RVA4500 检测[7]。

2 结果与讨论

2.1 固态发酵产 MK 红曲菌株筛选

不同红曲菌株固态发酵产 MK 的能力不同,故对实验室保藏的 7 株红曲菌固态发酵产 MK 的能力进行检测,筛选出高产 MK 的菌株,结果见图 1。

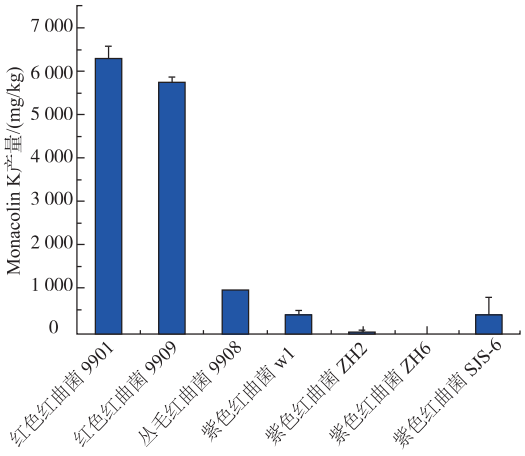


图 1　7 株红曲菌固态发酵产 MK 的对比

Fig. 1　Comparison of MK production by SSF of different *Monascus* strains

从图 1 可知,所选菌株中最适合生产 MK 的菌株为红色红曲菌 9901,其次为红色红曲菌 9909。目前降脂红曲的生产菌种要求是紫色红曲菌,但所选的 4 株紫色红曲菌固态发酵产 MK 能力较弱。实验结果表明,红色红曲菌也可以高产 MK。从降脂功能性来看,仅以紫色红曲菌作为生产菌种的合理性就值得商榷了[8]。另外,国内功能性红曲米(粉)的轻工行业标准 QB/T2847–2007 中规定所用菌种为红色红曲霉(*Monascus anka Nakazawa* et Sato),跟我们的实验结果较为相符[5]。作者综合考虑,选择红色红曲菌 9901 作为后续实验所用菌株。

2.2　红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 基质选择

传统红曲米均是以大米作为原料。但大米种类繁多,不同品系、不同产地的大米存在一定差异。因此选用 6 种常见大米作为红曲菌发酵基质,考察不同大米对红曲菌产 MK 的影响,结果见图 2。

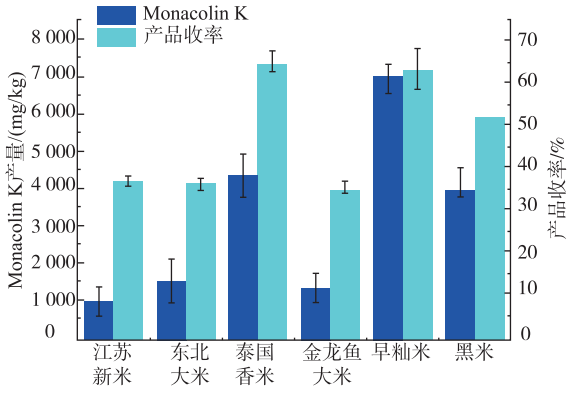


图 2　不同大米对红色红曲菌 9901 产 MK 的影响

Fig. 2　Effect of different solid substrates on the production of MK of *Monascus* ruber 9901

从图 2 可知,在所选的固态发酵基质中红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的产量最高的基质为广西早籼米,其 MK 产量可达 7 017.00 mg/kg。以江苏新米作为固态发酵基质时,红色红曲菌 9901 固态发酵产物中 MK 产量仅有 1 011.33 mg/kg。用广西早籼米作为固态发酵基质时 MK 产量为以江苏粳米作为固态发酵基质时 MK 产量的 6.94 倍。

可见,不同大米作为发酵基质对红色红曲菌 9901 产固态发酵 MK 有较大影响。为了研究不同大米作为基质时 MK 产量差异的原因,我们测定了 6 种大米的糊化特性及其直链淀粉质量分数,见图 3 及表 2。结果表明,6 种大米的直链淀粉质量分数和峰值粘度差异较大。大米中的直链淀粉质量分数及峰值粘度与大米的粘度之间有紧密联系,直链淀粉质量分数越高,峰值粘度值越大,粘性越差[9]。籼米的峰值粘度及直链淀粉质量分数均高于粳米,其中广西早籼米的峰值粘度和直连淀粉质量分数相对较高,分别为 2 972 cp 和 27.5%,且其粘度相对较小。这与实验中观察到的现象一致,因此,选用直链淀粉质量分数和峰值粘度相对较高的广西早籼米作为基质时,有利于红色红曲菌 9901 固态发酵高产 MK。

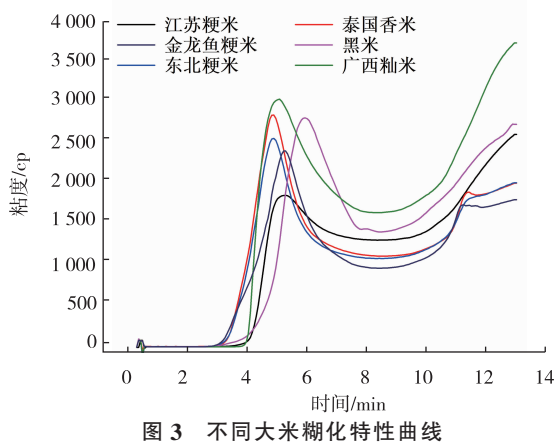


图 3　不同大米糊化特性曲线

Fig. 3　Curve of gelatinization characteristics of different rice

表 2　不同大米直链淀粉质量分数

Table 2　Amylose content of different rice

大米品种	大米种类	直链淀粉质量分数/%
广西早籼米	籼米	27.5
泰国香米	籼米	28.1
黑米	籼米	21.4
江苏粳米	粳米	20.2
东北粳米	粳米	20.1
金龙鱼粳米	粳米	19.1

2.3 发酵时间对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

红曲菌固态发酵产 MK 的发酵周期较长,不同菌株、不同培养方式红曲菌固态发酵产 MK 的周期不同[10-11],因此有必要研究红色红曲菌 9901 的最适发酵周期,结果见图 4。

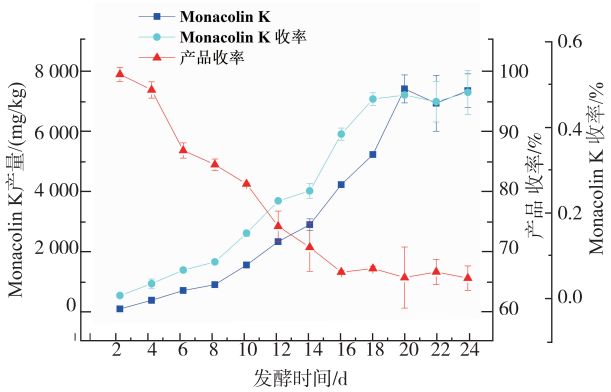


图 4 发酵时间对红色红曲菌 9901 固态发酵产 Monacoln K、Monacoln K 收率及产品收率的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on MK production of *Monascus* ruber 9901

从图 4 可以看出,从第 4 天到第 16 天底物消耗较快,可能是由于菌体快速生长及次级代谢产物大量生产所造成的。从第 8 天到第 18 天 MK 的产量及收率迅速增加,MK 大量积累,发酵 20 d 时 MK 的产量及收率都达到最大。而到了 20 d 后 MK 的产量及收率都稍微有所下降,可能是产物有所分解造成的。因此,红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的发酵周期为 20 d。

2.4 抖料次数对红色红曲菌固态发酵产 MK 的影响

在瓶式发酵过程中,物料易结块,抖料是将块状物料拍散成颗粒状的过程。作者对是否抖料及抖料次数进行研究,结果见图 5。

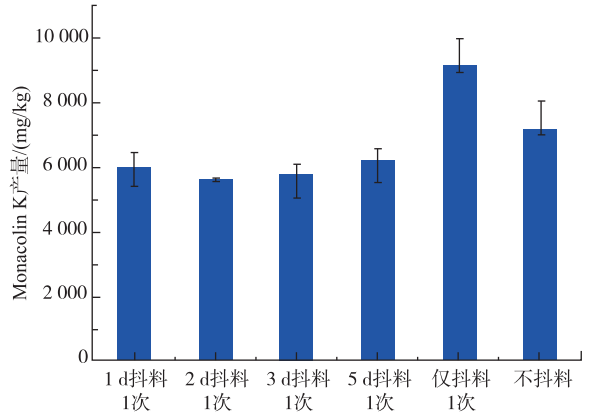


图 5 抖料次数对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

Fig. 5 Effect of shaking times on MK production in SSF of *Monascus* ruber 9901

从图 5 可知,抖料次数对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 有着较大影响。抖料频率过高或不抖料均不利 MK 的生产,可能是由于抖料次数过多对菌丝造成较大损伤,不抖料则会有结团现象,不利于基质利用造成的。当仅抖料一次时红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的产量达到最高。因此,仅抖料一次最有利于红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK。

2.5 不同加水量对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

固态发酵基质的水分质量分数一般在 40%~60%之间[12],水分过高过低均不利于红曲菌生长。分别向固态发酵基质中添加 30、35、40、45、50 mL 水,研究加水量对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响,结果见图 6。

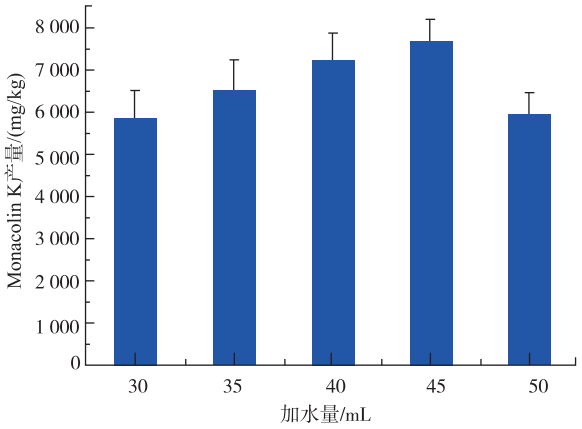


图 6 不同加水量对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

Fig. 6 Effect of different water addition on MK production of *Monascus* ruber 9901

从图 6 可以看出,随着加水量的增加,红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的产量先增加后减少。当加水量为 45 mL 时,发酵产物中 MK 产量达到最高。当加水量为 30 mL 时,发酵结束后米粒质地较硬,断层稍有白色,可能是由于基质未被水渗透,从而菌体不易生长到米粒内部。当加水量为 50 mL 时,发酵基质出现严重结团现象。而加水量为 45 mL 时,结团现象并不明显。因此,加 45 mL 水最有利于红色红曲菌 9901 的生长及 MK 的合成。

2.6 接种体积分数对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

接种体积分数直接影响菌体生长进而影响次级代谢产物的合成,因此研究了不同接种体积分数对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响,结果见图7。

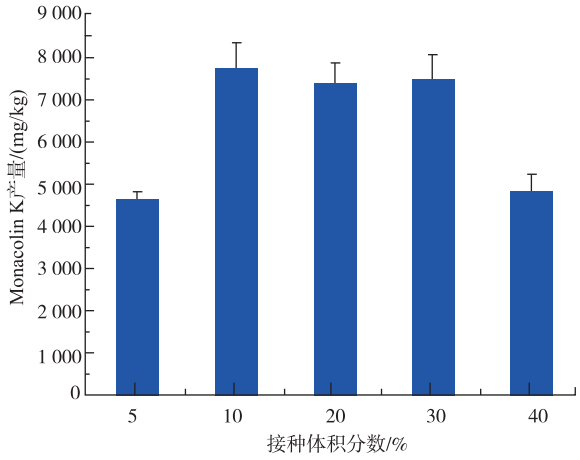


图 7　接种体积分数对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

Fig. 7　Effect of inoculation amount on production of MK by SSF of *Monascus* ruber 9901

从图 7 可以看出,随接种体积分数的增加,发酵产物中MK 产量先升高后降低。这是因为接种体积分数太少菌体生长较慢,但过大的接种体积分数会使菌体生长过快,营养物质迅速消耗,同样不利于 MK 的合成。当接种体积分数为 10%时,发酵产物中 MK 产量最高。因此 10%的接种体积分数为红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的最适接种体积分数。

2.7　不同变温方式对红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的影响

关于红曲菌发酵产 MK 的研究大都采用变温培养,但不同菌株变温方式不同[4,10]。因此,作者采用先 30 ℃或 32 ℃培养然后变温到 25 ℃培养,从而确定红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的最佳培养方案。

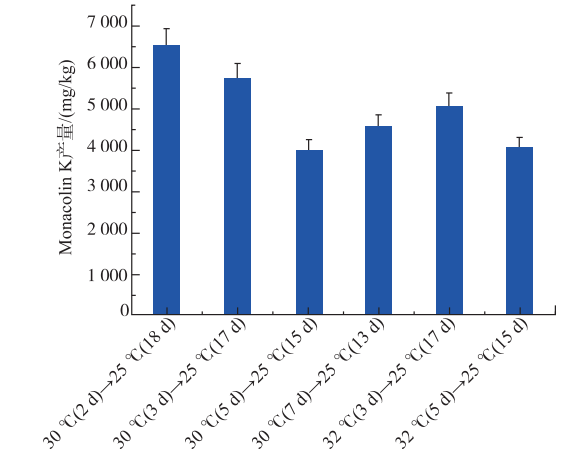


图 8　不同变温方式对红色红曲菌 9901 固态发酵产MK 的影响

Fig. 8　Effect of different temperature on MK production by *Monascus* ruber 9901

从图 8 可以看出,在所选的条件中,最适合红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 的培养条件为:30 ℃培养 2 d,变温到 25 ℃继续培养 18 d。30 ℃及 32 ℃培养时红曲菌体生长较快,营养物消耗也快。但由于红曲菌固态发酵产 MK 发酵周期为 20 d,如果在 30 ℃或 32 ℃培养过久,可能到了后期生产次级代谢产物时营养物质已经消耗殆尽。故 30 ℃培养 2 d,变温到 25 ℃继续培养 18 d 为红色红曲菌 9901 固态发酵产MK 的最适条件。

2.8　红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 响应面优化结果

根据 Box–Behnken 中心组合实验设计原理和单因素试验的结果,选取加水量、变温时间及接种量作为自变量,设计了 3 因素 3 水平的响应面分析实验。以 MK 产量作为考核指标进行实验,相关的设计与结果见表 3。

表 3　响应面实验设计及结果

Table 3　Response surface experimental design and results

试验号	*A*	*B*	*C*	MK 产量/(mg/kg)	
				实际值	预测值
1	40	48	5	4 003.69	3 676.93
2	45	48	10	9 855.42	10 197.91
3	45	72	5	7 090.25	7 138.80
4	50	72	10	7 282.99	7 053.76
5	45	72	15	7 010.05	6 912.51
6	40	72	10	7 675.03	7 953.24
7	40	48	15	6 430.43	6 249.75
8	45	24	15	6 470.04	6 421.49
9	50	48	15	5 232.70	5 559.46
10	45	24	5	4 571.63	4 669.17
11	40	24	10	4 224.69	4 453.92
12	50	24	10	7 870.63	7 592.42
13	45	48	10	10 249.37	10 197.91
14	45	48	10	10 665.27	10 197.91
15	45	48	10	10 245.07	10 197.91
16	50	48	5	6 425.58	6 606.25
17	45	48	10	9 974.37	10 197.91

采用 Design-Expert 8.0.1 对实验结果进行二次回归拟合,得到红色红曲菌固态发酵产 MK 的回归方程为:Y=10 197.90+559.76A+740.17B+381.51C–1 009.50AB–904.90AC–494.65BC–2 098.48A^2–1 336.09B^2–2 576.32C^2。回归模型分析见表 4。模型 P 值小于

0.01 说明该模型极显著；失拟项为 0.267 9，大于 0.05，说明回归方程没有失拟，所以该模型可信度较高。因变量与自变量之间的线性关系显著 R^2_{Adj}=0.987 6，模型调整复相关系数 R^2_{Adj}=0.971 8，说明该模型与实验拟合良好，该回归方程能够用来描述各因素与响应值之间的关系。

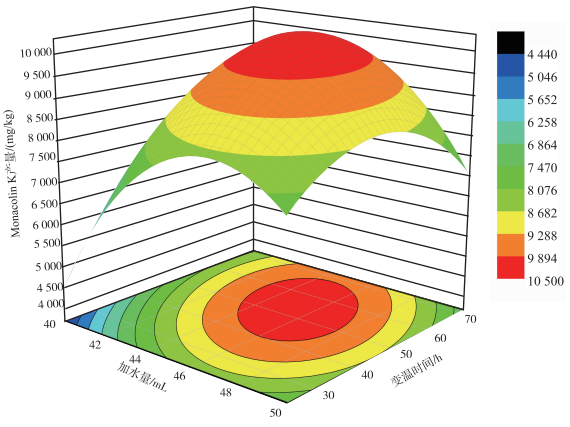
表 4　回归模型分析结果

Table 4　Regression model analysis results

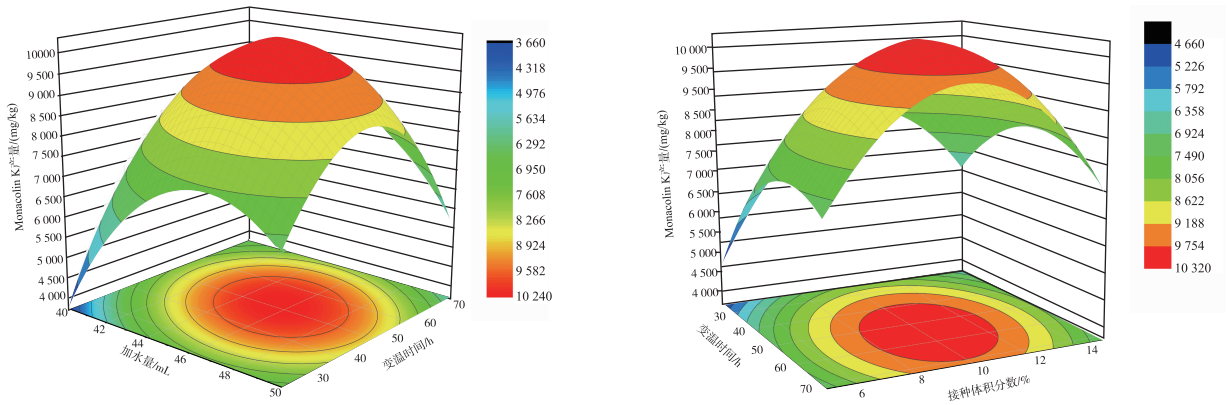
变量	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	76 190 322	9	8 465 591	62.179 7	< 0.000 1	显著
A	2 506 633	1	2 506 633	18.411 2	0.003 6	
B	4 382 769	1	4 382 769	32.191 4	0.000 8	
C	1 164 388	1	1 164 388	8.552 419	0.022 2	
AB	4 076 321	1	4 076 321	29.940 54	0.000 9	
AC	3 275 404	1	3 275 404	24.057 81	0.001 7	
BC	978 724.4	1	978 724.4	7.188 723	0.031 5	
A^2	18 541 549	1	18 541 549	136.187 5	< 0.000 1	
B^2	7 516 321	1	7 516 321	55.207 32	0.000 1	
C^2	27 947 103	1	27 947 103	205.271 3	< 0.000 1	
残差	953 030.3	7	136 147.2			
失拟项	562 460.5	3	187 486.8	1.920 137	0.267 9	不显著
纯误差	390 569.8	4	97 642.44			
总离差	77 143 353	16				
R^2=0.987 6，R^2_{Adj}=0.971 8						

如图 9 所示，从 3D 响应面图可以看出曲面最高点均在响应面上，故各因素最优水平在所选范围之内。各因素对红色红曲菌 9901 影响越大，其 3D 响应面图越为陡峭。从以上结果可以看出 *A*（加水量）、*B*（30 ℃培养时间）对红色红曲菌 9901 固态发酵产 MK 影响较大。结合表 4 可以看出，三者的交互作用 *AB*>*AC*>*BC*。

用 Design-Expert 以 MK 产量最高为目标，对模型进行优化，当加水量为 45.33 mL，30 ℃培养 53.86 h，接种体积分数为 10.19%时，红色红曲菌 9901 固态发酵产物中 MK 产量为 10 314.4 mg/kg。为了方便生产，以初始水分质量分数为 10%左右的广西早籼米作为固态发酵基质，加水量为 45 mL，接种体积分数 10 %，先于 30 ℃培养 50 h，然后变温到 25 ℃培养至 20 d，在此条件下 MK 产量达到 10 453.07 mg/kg，与模型预测结果差异不大，说明该模型预测值与实验值具有良好的拟合性。



(a)



(b) (c)

图 9　响应面 3D 图及平面图

Fig. 9　Response 3D surface and contour

3 结　语

通过对实验室保藏的 7 株红曲菌进行筛选,从中筛选出一株高产 MK 的红色红曲菌 9901,通过不同谷物基质筛选,最终选择了粘性较小的广西早籼米作为固态发酵基质。用 Box–Behnken Design 对红色红曲菌固态发酵的加水量、接种体积分数及 30 ℃培养时间进行优化,从而确定色红曲菌固态发酵产 MK 的最佳发酵条件为:加水量 45 mL,30 ℃培养 50 h,然后变温到 25 ℃培养 20 d,接种体积分数为 10 %。在不添加无机盐及额外碳源、氮源的条件下,红色红曲菌 9901 固态发酵产物中 MK 的产量可达 10 453.07 mg/kg。

参考文献:

[1] FU Jinquan. Redstarter in ancient times & red starter liquor history [J]. **Liquor–Making & Technology**, 2008, (3): 108-110. (in Chinese)

[2] BURKE F M. Red yeast rice for the treatment of Dyslipidemia[J]. **Current Atherosclerosis Reports**, 2015, 17(4): 22-27.

[3] PATEL S. Functional food red yeast rice (RYR) for metabolic syndrome amelioration: a review on pros and cons[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2016, 32(5): 87-98.

[4] LU L P, ZHANG B B, XU G R. Efficient conversion of high concentration of glycerol to Monacolin K by solid-state fermentation of *Monascus purpureus* using bagasse as carrier[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2012, 36(3): 293-299.

[5] QB/T 2847-2007, 功能性红曲米(粉)[S].

[6] GBT 15683-2008, 大米直链淀粉含量的测定[S].

[7] LU Fangfang, LU Weiping, LIU Ping, et al. Heterosis analysis of starch RVA viscosity in waxy corn [J]. **Acta Agronomica Sinica**, 2006, 32(4): 503-508. (in Chinese)

[8] JIANG Bingjie, XU Ganrong, ZHANG Bobo, et al. Discussion on quality standards of lipid-reducing *Monascus* product[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2015, 46(3): 453-456. (in Chinese)

[9] YANG Xiaorong, LI Xin, LING Jiayu. Differences among rice categories in pasting characteristics and amylose content[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, 2001, 16(6): 37-42.

[10] XU B J, WANG Q J, JIA X Q, et al. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus* ruber[J]. **Biotechnology & Bioprocess Engineering**, 2005, 10(10): 78-84.

[11] FENG Y, SHAO Y, ZHOU Y, et al. Monacolin K production by citrinin-free *Monascus pilosus* MS-1 and fermentation process monitoring[J]. **Engineering in Life Sciences**, 2014, 14(5): 538-545.

[12] 许赣荣,胡文锋. 固态发酵原理、设备与应用 [M]. 北京:化学工业出版社,2009.