DOI:10.12441/spyswjs.20240403001 [文章编号] 1673-1689(2024)10-0054-11

延胡索酸对紫色红曲菌生长和次级代谢的影响

秦昱晖[1] 王海蛟[1] 程 颖[1] 王聪聪[1] 孙 晴[1] 董慧君[1]
张薄博[3] 刘成建[4] 王成涛[1,2] 张 婵[1,2*]

(1. 北京工商大学食品与健康学院,北京 100048; 2. 北京市食品添加剂工程技术研究中心,北京 100048; 3. 汕头大学理学院,广东 汕头 515063; 4. 山东凡卉药业有限公司,山东 济南 271100)

摘要:红曲菌(*Monascus*)发酵可产生多种有益次级代谢产物,如Monacolin K、红曲色素等。Monacolin K可以抑制胆固醇的形成并降低血脂,但野生型红曲的Monacolin K产量极低,严重限制了功能红曲的应用。作者所在研究团队前期通过代谢组学分析发现三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,TAC)途径参与调控Monacolin K的合成,且延胡索酸的表达与Monacolin K合成呈正相关。为进一步探究延胡索酸对紫色红曲菌(*Monascus purpureus*)生长和次级代谢的影响,提高紫色红曲菌的Monacolin K产量,作者以野生型紫色红曲菌M1作为发酵菌株,通过干质量、分光光度、扫描电子显微镜、超高效液相色谱、实时荧光定量PCR等方法探究延胡索酸对红曲菌菌丝体生长及次级代谢产物Monacolin K和黄、橙、红共3种红曲色素合成等的影响。结果表明,延胡索酸的添加抑制了菌丝体的生长以及红曲色素的合成,但菌丝体褶皱程度和密度有所提高,Monacolin K产量较对照组提高了49.38 %,与Monacolin K合成相关的9段基因呈现不同程度的上调趋势。

关键词:红曲菌;延胡索酸;Monacolin K;实时荧光定量PCR

Effects of Fumaric Acid on Growth and Secondary Metabolism of *Monascus purpureus*

QIN Yuhui[1] *WANG Haijiao*[1] *CHENG Ying*[1] *WANG Congcong*[1] *SUN Qing*[1] *DONG Huijun*[1]
ZHANG Bobo[3] *LIU Chengjian*[4] *WANG Chengtao*[1,2] *ZHANG Chan*[1,2*]

(1. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing 100048, China; 3. School of Science, Shantou University, Shantou 515063, China; 4. Shandong Fanhui Pharmaceutical Co. Ltd., Jinan 271100, China)

Abstract: *Monascus* fermentation can produce various beneficial secondary metabolites, such as Monacolin K, *Monascus* pigments, and so on. Monacolin K can inhibit cholesterol synthesis and reduce blood lipid levels. However, wild-type *Monascus* strains have extremely low yields of Monacolin K, significantly limiting the application of functional *Monascus* products. The previous metabolomics analysis of the author's research team revealed that the tricarboxylic acid cycle (TAC) is involved in regulating Monacolin K synthesis, and fumaric acid expression was positively correlated with the synthesis of Monacolin K. To further investigate the effect of fumaric acid on the growth and secondary metabolism of *Monascus purpureus* and to improve Monacolin K yield in *Monascus purpureus*, the author utilized the wild-type strain *Monascus purpureus* M1 as the fermentation

基金项目:国家自然科学基金项目(32172185);北京市科技新星计划项目(20240484599);北京工商大学食品科学与工程"双一流"学科建设培育项目(BTBUYXTD202208)。

通信作者:张婵(1984—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail:zhangchan@th.btbu.edu.cn

收稿日期:2024-04-03 **修回日期:**2024-05-07

strain. Using methods such as dry weight measurement, spectrophotometry, scanning electron microscopy, ultra-high-performance liquid chromatography, and real-time quantitative PCR, this author investigated the impact of fumaric acid addition on *Monascus* growth and the synthesis of secondary metabolite Monacolin K, as well as the yellow, orange, and red pigments of *Monascus*. The results demonstrated that fumaric acid addition inhibited the growth of mycelia and the synthesis of *Monascus* pigments. However, it increased the degree of mycelial folding and density, with Monacolin K production showing a 49.38% increase compared to the control. Additionally, nine genes associated with Monacolin K synthesis exhibited varying degrees of upregulation.

Keywords: *Monascus purpureus*; fumaric acid; Monacolin K; real-time quantitative PCR

红曲菌可药食两用，广泛应用于食品、医药、化妆品等多个行业[1-3]。红曲菌发酵可产生多种有益的次级代谢产物，如具有降胆固醇功效的Monacolin K、具有抑菌抗炎功效的红曲色素、用于抗真菌药物生产的麦角固醇等物质[4-5]以及具有肾毒性的桔霉素[6]。红曲菌具有降低血脂、保护神经、减缓氧化速度、抑菌抗炎等多重功效[7-9]，有较高的药用价值和经济价值。

Monacolin K，又称洛伐他汀[10]，最早是在1979年由Akira等[11]从红色红曲菌的发酵液中分离出的，后经试验鉴定其具有降低人体胆固醇的功效[12]，因此成为研究的热点。现代临床试验已验证，Monacolin K可用于治疗高胆固醇血症，可竞争性地抑制人体内胆固醇合成途径关键酶HMG-CoA的活性，从而抑制胆固醇合成，降低血脂[13-14]。此外，与从其他途径得到的洛伐他汀相比，红曲产的Monacolin K结晶度少、溶解度和生物利用度较高，可被人体直接利用，具有高效、安全、无毒等特点[15-18]，应用价值极高。但是由于野生型红曲菌的Monacolin K产量不高，严重限制了功能红曲在降低胆固醇方面的大规模应用。因此，如何通过现代技术手段，优化红曲菌发酵工艺，促进Monacolin K产量提高一直是研究人员重点关注的问题。作者所在团队前期通过代谢组学分析发现，TCA途径与Monacolin K的合成密切相关，当Monacolin K产量提高时，与乙酰辅酶A合成或TCA有关的化合物和作用酶的表达具有显著差异，二者表达呈正相关，且筛选到20多种包括延胡索酸在内的差异代谢化合物。作者所在团队发现通过培养基优化能有效提高红曲菌有益次级代谢产物的产量[19]，如在原有培养基基础上添加谷氨酸进行发酵，可极大提高Monacolin K的产量[20]。在此基础上，作者选定延胡索酸作为外源添加物与紫色红曲菌进行发酵，探究其在特定质量浓度下对Monacolin K和红曲色素代谢合成的影响，并从基因水平出发，初步阐述延胡索酸对紫色红曲菌生产降脂次级代谢产物Monacolin K的调控机制，为后续深入探究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验菌株

紫色红曲菌M1：由北京市食品添加剂工程技术中心保藏，菌株编号CGMCC 3.0568。

1.1.2 主要试剂

FastQuant cDNA试剂盒、SuperReal PreMix Plus试剂盒、RNA prepPure试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；延胡索酸、PDA培养基、乙腈（色谱级）、葡萄糖、磷酸二氢钾、蛋白胨、硝酸钠、大豆粉、七水合硫酸镁、甘油、无水乙醇（分析纯）、大米粉、乙酸铵、七水合硫酸锌、甲醇（色谱级）：北京半夏科技发展有限公司；醋酸异戊酯、六甲基二硅胺：北京迈瑞达科技有限公司。

1.2 仪器与设备

恒温培养箱：BPH-9082型，德国New Brunswick公司；超净工作台：SW-CJ-1FD型，苏州安泰空气技术有限公司；紫外检测仪：SPD-M20A型，日本岛津公司；高效液相色谱仪：SIL-20A型，日本岛津公司；全温振荡培养箱：HZQ-F160型，江苏太仓市实验设备厂；离心机：MICRO 17R型，美国热电公司；超声波清洗仪：SB15-12D型，宁波新芝生物科技股份有限公司；智能电热恒温鼓风干燥箱：HW-500AS型，上海琅玕实验设备有限公司；立式压力蒸汽灭菌箱：LDZX-252CKX型，上海申安医疗器械厂；扫描电子显微镜：SU8010型，日本日立公

司；PCR扩增仪：CEX96型，德国Biometra公司。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基配制

平板培养基：PDA培养基37.0 g，琼脂5.0 g，1 L水，121 ℃灭菌15 min。液体种子培养基：甘油70.0 g，葡萄糖30.0 g，大豆粉15.0 g，蛋白胨10.0 g，磷酸二氢钾2.0 g，硝酸钠2.0 g，七水合硫酸镁1.0 g，1 L水，取50 mL分装至250 mL三角瓶，115 ℃高压蒸汽灭菌20 min。对照组液体发酵培养基：甘油90.0 g，蛋白胨10.0 g，大米粉20.0 g，磷酸二氢钾2.5 g，硝酸钠5.0 g，七水合硫酸锌2.0 g，七水合硫酸镁1.0 g，1 L水，取50 mL分装至250 mL三角瓶，121 ℃高压蒸汽灭菌15 min。试验组发酵培养基：配制质量浓度600 g/L的延胡索酸水溶液，在对照组发酵培养基的基础上添加一定体积的延胡索酸水溶液。

1.3.2 菌株培养

取1 mL于−80 ℃冰箱保藏的紫色红曲菌M1−甘油保藏液，在PDA培养基上活化培养至第2代，接种于液体种子培养基，在30 ℃、200 r/min的恒温摇床上避光培养48 h，以体积分数10%接种至液体发酵培养基中，在30 ℃、150 r/min条件下避光培养2 d，温度调整为25 ℃继续培养至第15天。

1.3.3 菌丝体生物量测量

干质量法测定紫色红曲菌的菌丝体生物量。取5 mL发酵液置于折叠好的滤纸内，用蒸馏水冲洗3次，静置，待无水滴从滤纸滴落，放入恒温烘箱中烘干，称菌丝体干物质质量，生物量（单位体积发酵液内包含的菌丝体干物质质量）计算见式（1）。

$$B=(m_1-m_2)/V \tag{1}$$

式中：

B——生物量g/L；

m_1——滤渣及滤纸的总质量，g；

m_2——滤纸质量，g；

V——发酵液体积，L。

1.3.4 Monacolin K检测

基于作者所在团队前期对紫色红曲菌代谢合成Monacolin K的研究，发现Monacolin K在发酵前期的产量不高，几乎检测不到，在第12天Monacolin K产量的增速最快，然后逐渐下降，并在第15天产量积累达到峰值。因此，分别取5 mL第5、8、12、15天的紫色红曲菌发酵液于试管中，用体积分数75%的甲醇稀释4倍，超声萃取30 min，避光静置过夜，取1 mL上清液经0.22 μm微孔滤膜进行过滤处理至液相小瓶中待测。采用HPLC法检测发酵液中Monacolin K的质量浓度，检测条件为：色谱柱为InertsilODS-3 C_{18}色谱柱（150 mm×4.6 mm×5 μm），流动相V（磷酸）：V（甲醇）=1∶3，总流量1 mL/min，进样量10 μL，柱温箱温度30 ℃，紫外检测波长237 nm。

1.3.5 红曲色素检测

分别取5 mL第8、12、15天的紫色红曲菌发酵液，加入15 mL体积分数为70%的乙醇溶液，放入60 ℃恒温水浴锅中浸提1 h，冷却后于4 000 r/min离心15 min，避光静置以待检测。利用紫外分光光度计检测红曲黄、红曲橙和红曲红色素的吸光度（OD值），测定波长分别为410、448、505 nm。红曲色素色价计算见式（2）[21]。

$$E=A\times f \tag{2}$$

式中：

E——红曲色素色价；

A——红曲色素的吸光度；

f——发酵液稀释倍数。

1.3.6 菌丝体形态观察

取2 mL第8天的紫色红曲菌发酵液至离心管中，12 000 r/min离心5 min后弃去上清液，收集菌丝体细胞。用质量分数2.5%的戊二醛溶液对菌丝体进行重悬和固定，于冰箱冷藏静置12 h。向离心管中加入0.01 mol/L磷酸盐缓冲液对菌丝体进行冲洗，以去除管内残留戊二醛，然后进行1次重复操作。离心后，根据体积分数从低到高的顺序，加入体积分数30%、50%、70%、80%、90%、100%的乙醇溶液进行脱水处理，每次加入后，都需要混匀并静置10 min，然后12 000 r/min离心5 min，弃去上清液，重复操作2次。不同梯度的乙醇处理结束后，分别向离心管中加入体积分数100%的醋酸异戊酯溶液和体积分数50%的醋酸异戊酯溶液，每次加入试剂后静置10 min，离心弃

去上清液，以此去除管中残留乙醇。最后向离心管中加入体积稍高于样品的六甲基二硅胺，使用脱脂棉塞住离心管顶部，将样品置于60 ℃烘箱中干燥至粉末状，将干燥后的样品常温干燥保藏，留待观察。通过扫描电子显微镜分别观察试验组和对照组的形态结构以及褶皱程度。

1.3.7 Monacolin K合成相关基因的荧光定量PCR分析

分别取1.8 mL第2、5、8、12、15天的紫色红曲菌发酵液，用无菌水洗涤离心至澄清。使用RNA prepPure试剂盒，按照说明书操作要求，从菌丝体中提取总RNA，并测定其质量浓度和纯度。吸取1 μL的RNase-Free ddH_2O，点在核酸定量分析仪检测孔内作为空白对照，取1 μL RNA进行RNA质量检测，记录OD值用于衡量蛋白质的污染程度。使用FastQuant cDNA试剂盒，按照说明书进行cDNA的反转录。根据NCBI网站（http://www. ncbi. nlm. nih. gov/nuccore/DQ176595.1），选取与Monacolin K合成相关的9段关键基因及内参基因*GAPDH*，设计的引物序列见表1。使用SuperReal PreMix Plus试剂盒对其扩增并进行荧光定量PCR分析。首先在95 ℃预变性15 min，接着在95 ℃变性10 s，52 ℃退火处理20 s，72 ℃延伸30 s。“变性-退火-延伸”的循环过程重复40次，并计算转录相对丰度，对每个样品进行荧光定量PCR分析，试验重复3次并取平均值。

1.3.8 数据处理

所有试验均重复3次，采用Excel软件进行数据计算，采用Origin 2019软件绘图。

表1 Monacolin K合成相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes related to Monacolin K synthesis

基因	引物序列（5′—3′）	长度/bp	熔解温度/℃
mokA	GACCTCGGTCATCTTGGC	18	59.1
	TTGTTCCAAGCGGTCTTC	18	57.3
mokB	AAACATCGTCACCAGTCT	18	50.7
	CTAAGTCGGGCATCTACC	18	53.1
mokC	CAAGCTGCGAAATACACCAAGCCTC	25	63.6
	AGCCGTGTGCCATTCCTTGTTGTCC	25	65.3
mokD	TTCATCTGCTGCTGGTAT	18	59.8
	AACTTCTCACCGTCAATG	18	58.7
mokE	ATCGCAGGTCACGCACATCCAAGTC	25	72.3
	GTAAAGGCAGCCCGAGCAGCTTCAT	25	71.1
mokF	GAGATCATAGTGGCCGACTGAA	22	59.8
	ACCGTCTCATCCAACCTCACGA	22	56.1
mokG	CCAGGTAACCAACGGATTA	29	56.0
	GATCAGAGCAGTCACCAG	18	52.0
mokH	CAGGAAATCTGGACTTACCCCATTG	25	65.8
	TGTTGGATTGTTGTTGGAGATATAC	25	59.2
mokI	ATGTTGAATGGCAATGATGG	20	60.9
	CAGCGTGGGTGATGTATC	18	61.7
GAPDH	CCGTATTGTCTTCCGTAAC	19	55.4
	GTGGGTGCTGTCATACTTG	19	57.6

2 结果与讨论

2.1 延胡索酸对紫色红曲菌菌丝体生物量的影响

通过比较两组菌株在不同发酵时间点的紫色红曲菌菌丝体干物质质量，探究外源添加延胡索酸对菌丝体生物量的影响。由图1可知，对照组菌丝体生物量随着发酵时间的增加而增大，在第12天

达到最大值，试验组菌丝体生物量在第 5 天达到最大值，后续呈下降趋势，且在发酵周期内试验组菌丝体生物量均明显低于对照组菌丝体生物量。延胡索酸参与菌丝体内 TCA，见图 2。TCA 是糖类、脂类和氨基酸三大营养素代谢的关键枢纽，小分子物质大多通过 TCA 途径合成菌丝体生长所需的营养物质[22]。通过 TCA 可以将乙酰辅酶 A 彻底分解成水和二氧化碳，为菌丝体生长提供能量，因此延胡索酸对菌丝体生长起重要调控作用。该研究中延胡索酸的添加对菌丝体生物量起抑制作用，推测是由于外源添加引起环境中延胡索酸质量浓度增加，反向抑制了菌丝体内小分子物质参与 TCA，导致菌丝体生长缓慢，未参与 TCA 的乙酰辅酶 A 可以与丙二酰辅酶 A 反应生成丁酮，进而生成次级代谢产物 Monacolin K 和红曲色素。因此延胡索酸可以在抑制菌丝体生长的同时，促进紫色红曲菌次级代谢产物的合成，后续还需进一步探究延胡索酸添加量与菌丝体生长之间的关系。

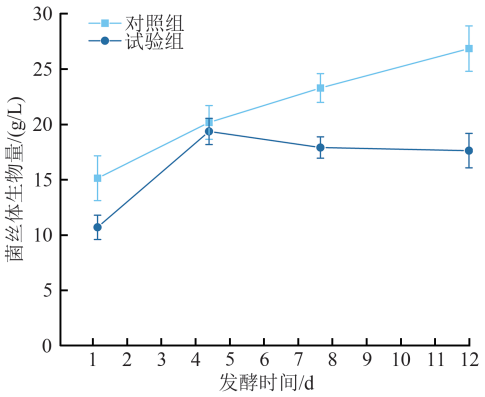


图 1　延胡索酸对菌丝体生物量的影响

Fig. 1　Effects of fumaric acid on mycelial biomass

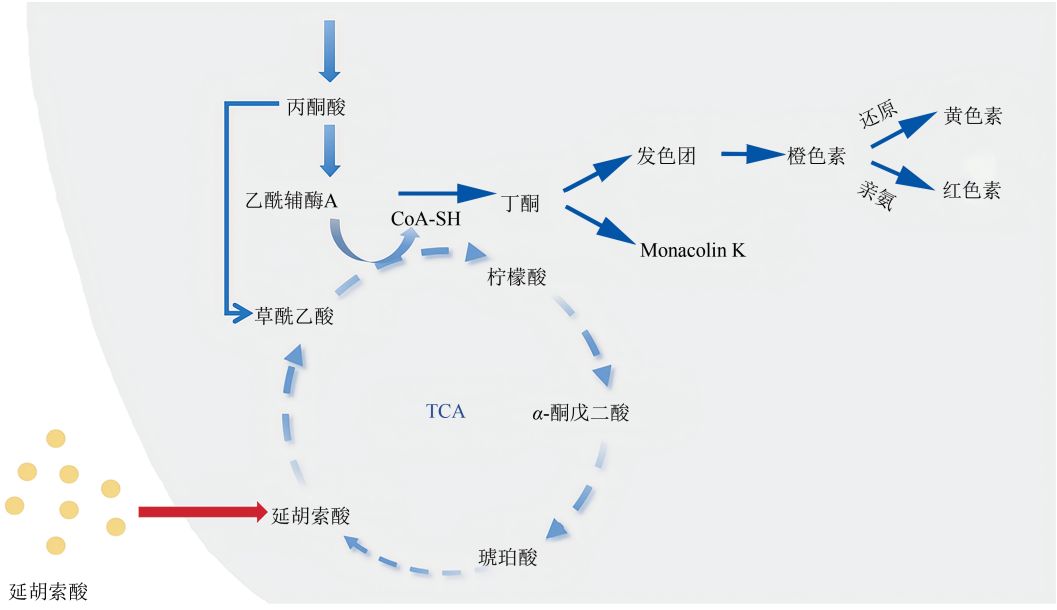


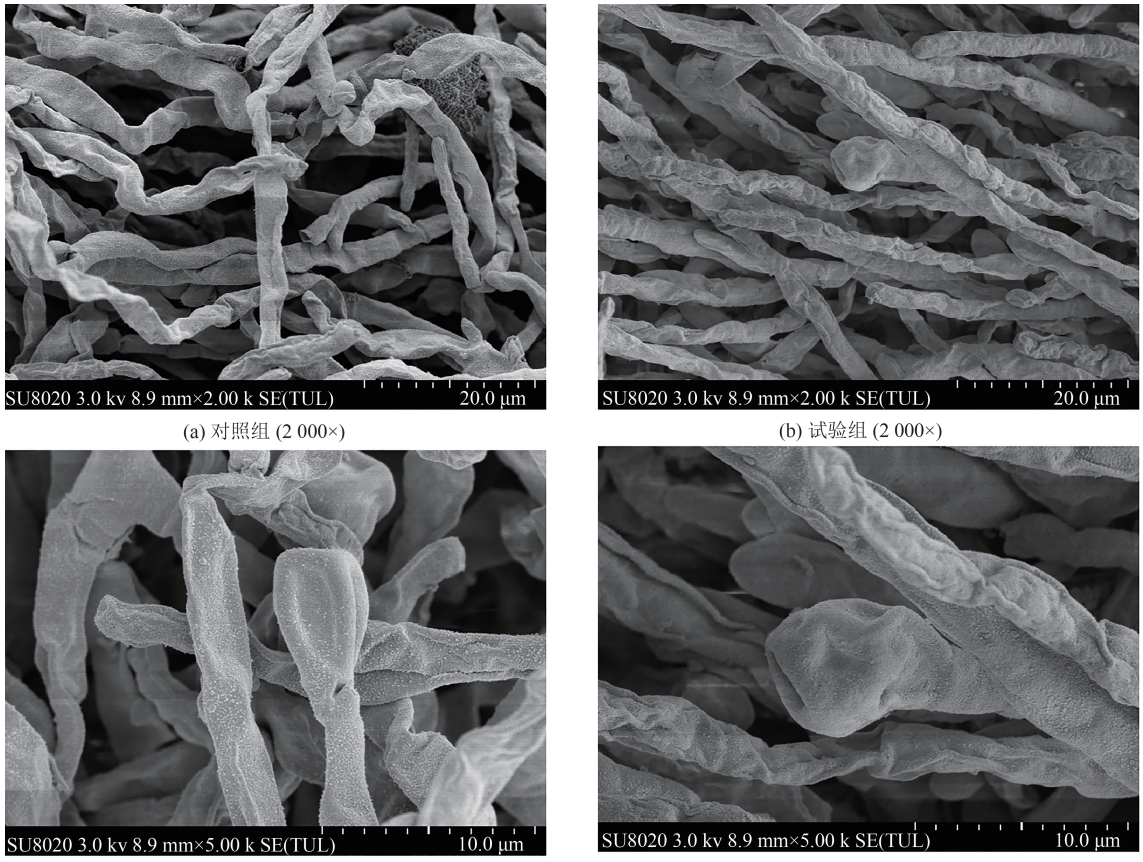
图 2　TCA、延胡索酸、乙酰辅酶 A、Monacolin K、红曲色素及其他代谢物之间的模拟流程图

Fig. 2　Schematic diagram to illustrating the relationships among the TCA, fumaric acid, acetyl-CoA, Monacolin K, *Monascus* pigments, and other metabolites

2.2　延胡索酸对紫色红曲菌菌丝体形态的影响

由 2.1 可知，延胡索酸的添加影响了紫色红曲菌的生长和整体密度，因此通过扫描电子显微镜进一步检测试验组和对照组菌丝体的形态差异。对比图 3(a)~(b)可知，试验组的菌丝体褶皱和凹陷程度明显多于对照组，褶皱增多进而导致菌丝体表面积增大，并且试验组的菌丝体密度高于对照组，但菌丝体之间的紧密性低于对照组。菌丝体相对较多，分叉较少，减少了菌丝体相互缠绕对紫色红曲菌生长代谢的影响。对比图 3(c)~(d)发现，试验组的孢子头与对照组相比，褶皱和凹陷区域面积有所增加，同时菌丝体的膨大程度也有所提升。真菌菌丝体的形态对其生长代谢存在一定的影响，并且会随着发酵条件的改变而发生变化。已有研究证实外源添加物可改变紫色红曲菌菌丝体细胞膜的通透性，增

强产物的胞外分泌过程，进而缓解产物抑制现象[23-24]。Lyu等[25]的研究表明，菌丝体直径能影响红曲黄色素的生物合成过程。结合其他相关研究发现，菌丝体的形态变化能够对其生物学特性产生影响，进而影响其次级代谢产物的合成[26-27]。因此推测添加延胡索酸改变了菌丝体的形态和直径，改变了细胞膜的通透性，提高了Monacolin K从胞内转移至胞外的效率，使得胞内积累的次级代谢产物减少，减少产物的反馈抑制，提高了Monacolin K的产量。



(a) 对照组 (2 000×)　(b) 试验组 (2 000×)

(c) 对照组 (5 000×)　(d) 试验组 (5 000×)

图3　延胡索酸对菌丝体形态的影响

Fig. 3　Effect of fumaric acid on mycelial morphology

2.3　延胡索酸对紫色红曲菌Monacolin K产量的影响

基于作者所在团队前期关于Monacolin K的研究结果，选取第5、8、12、15天的发酵液，通过HPLC法检测其Monacolin K产量。在发酵初期，两组发酵液中Monacolin K的产量均较小，随着发酵时间的延长，Monacolin K的产量逐渐增加，见图4。这是因为Monacolin K是红曲菌的次级代谢产物，菌丝体需要先经过一定的生长期后才开始大量合成次级代谢产物[28]。因此在发酵初期，紫色红曲菌处于种子萌发期，此时Monacolin K产量较小，几乎检测不到；在发酵中期，紫色红曲菌适应了发酵环境，菌丝体生长成熟，Monacolin K产量增长较快；在发酵后期，紫色红曲菌进入衰亡期，Monacolin K产量积累至最高水平。从图4还可以看出，在发酵过程中，试验组发酵液中Monacolin K产量始终高于对照组。在发酵第12天，试验组的发酵液中Monacolin K产量为114.79 mg/L，较原始发酵液中Monacolin K产量（76.84 mg/L）提高了49.39%，可见延胡索酸的添加对紫色红曲菌Monacolin K产量起到明显促进作用，这可能是与延胡索酸对紫色红曲菌菌丝体生长及代谢的影响有关。

2.4　延胡索酸对红曲色素色价的影响

紫外检测仪检测第8、12、15天的两组发酵液中红曲色素色价，见图5。红曲红、红曲黄、红曲橙

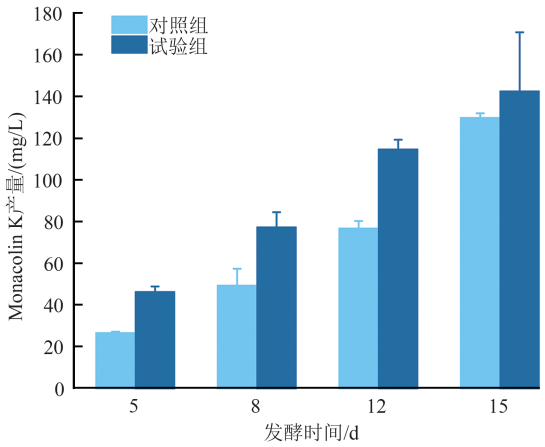


图 4　延胡索酸对 Monacolin K 产量的影响

Fig. 4　Effect of fumaric acid on the production of Monacolin K

色素色价的变化情况基本一致，均随发酵时间延长呈上升趋势，在第 15 天时色价最高。对照组的红曲色素色价均高于试验组，这可能是由于延胡索酸的添加抑制了红曲色素的合成。Jůzlová 等[29]认为红曲色素是通过聚酮途径在菌丝体内合成的。红曲色素与 Monacolin K 都是聚酮类物质，这两种合成途径的前半部分都是通过乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 反应生成丁酮，然后分别进入各自的代谢途径生成相应的物质，因此红曲色素和 Monacolin K 有一定的底物竞争关系。已有研究表明，发酵培养基中加入适量的外源性物质在提升 Monacolin K 产量的同时会减少红曲色素的生成[30-32]。由此推测，紫色红曲菌中添加延胡索酸后，抑制了红曲色素合成代谢途径，更多的丁酮参与 Monacolin K 合成途径，从而使 Monacolin K 产量增加，而红曲色素的产量随之减少。除此之外，对比 3 种色素发现，红曲红色素的抑制作用最为明显，而黄色素的抑制作用最弱。红曲色素是由多种聚酮化合物组成的混合物，在其合成的过程中，初始底物首先通过聚酮化和脂肪酸反应

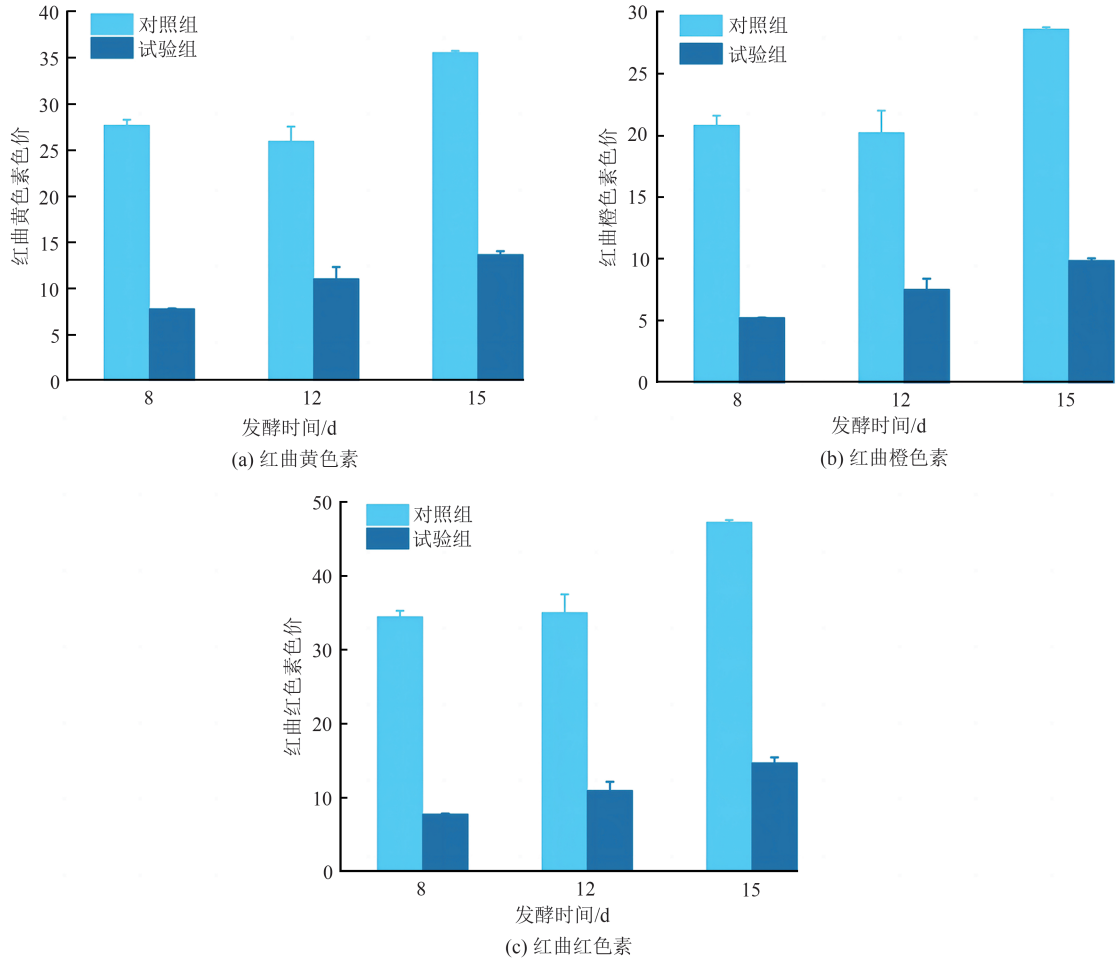


图 5　延胡索酸对红曲色素色价的影响

Fig. 5　Effect of fumaric acid on the color value of *Monascus* pigment

生成中间的橙色素。随后，在关键的色素合成基因的影响下，通过加氨和还原两种不同的反应路径，分别产生了红色素和黄色素[33]。延胡索酸是一种良好的抗氧化助剂、酸度调节剂、酸化剂，是酸味最强的固体酸之一，能够使水溶液pH保持在3.0。延胡索酸的加入使发酵环境的还原性增强，影响了菌丝体内部的相关反应，使还原性物质增多，进而提高了通过还原反应转化生成的黄色素的产量，使得试验组黄色素的抑制作用减弱。而橙色素可在中性条件下自发进行嗜氮加成反应，转化生成红色素，延胡索酸的加入导致了培养基酸化，抑制了嗜氮加成反应，使得红色素产量进一步降低。

2.5　Monacolin K合成相关基因的荧光定量PCR分析

为了进一步明确延胡索酸对Monacolin K合成的影响，对其合成基因簇中参与Monacolin K合成的9段关键基因的表达量进行分析，见图6。延胡索酸的添加对于Monacolin K合成的9段关键基因的表达基本表现为促进作用，但对转录水平的影响存在差异。在9段基因中，*mokA*、*mokB*、*mokC*、*mokD*、*mokE*、*mokF*基因在发酵前期的转录水平变化较为明显，*mokA*、*mokB*、*mokC*、*mokD*基因均在发酵第8天时变化程度最大，转录水平分别为对照组的3.90倍、3.19倍、2.28倍、3.03倍；试验组*mokH*、*mokG*、*mokE*基因在发酵过程中变化显著，其中

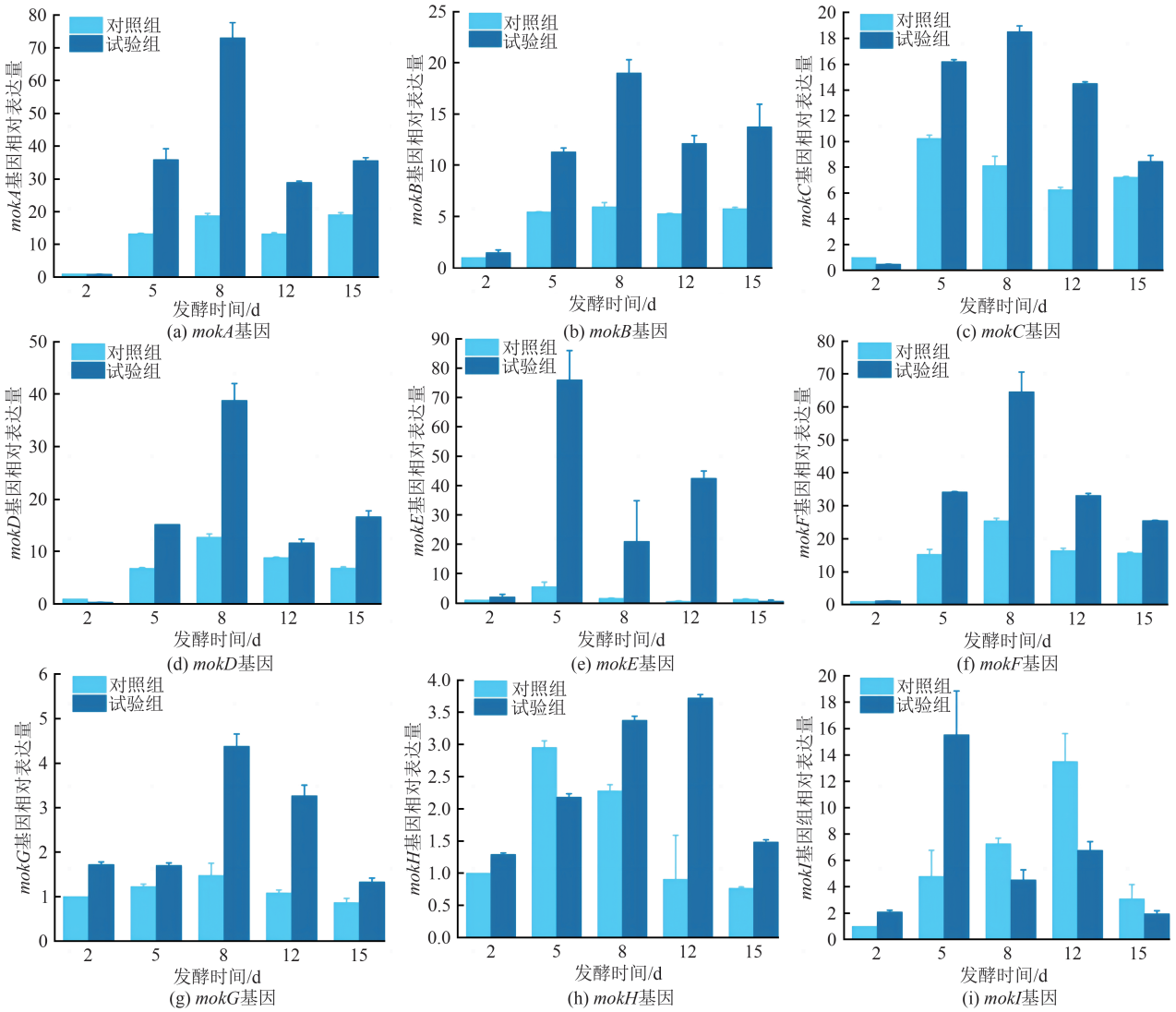


图6　紫色红曲菌Monacolin K合成相关基因的表达量分析

Fig. 6　Expression analysis of genes related to Monacolin K synthesis in *Monascus purpureus*

mokE 基因第 12 天的转录水平更是达到了对照组的 72.89 倍；而 *mokI* 基因在发酵后期的表达呈下调趋势。在紫色红曲菌中，*mokA* 和 *mokE* 基因主要参与聚酮合成酶的编码，该酶是紫色红曲菌中红曲色素、Monacolin K 和桔霉素三大次级代谢产物合成过程中的关键酶，且 *mokA* 基因负责合成非缺失骨架，这两种基因的缺失会导致紫色红曲菌不合成 Monacolin K[34-35]；*mokB* 基因参与 Monacolin K 的二酮侧链合成；*mokF* 基因具有酰基转移酶的活性，在合成 Monacolin K 的最后一步发挥重要作用[36]；*mokH* 基因是 Monacolin K 的激活剂，编码 Zn(Ⅱ)2Cys6 双核 DNA 结合蛋白[37]。Chen 等[37]构建了 *mokH* 基因过表达菌株，经 PCR 和 Southern 杂交验证，可上调 Monacolin K 生物合成基因的表达，并使 Monacolin K 产量明显高于野生型菌株。综上，延胡索酸的加入使次级代谢产物主链和侧链合成相关基因的表达增强，正向调节 Monacolin K 的分泌过程，在多段基因的共同作用下使 Monacolin K 的产量提高。

3 结论

外源添加延胡索酸能够显著影响紫色红曲菌的代谢水平，Monacolin K 的产量提高了 49.39%，在第 12 天产量达到 114.79 mg/L。但延胡索酸对 3 种红曲色素色价呈显著的抑制作用，推测延胡索酸的加入可以抑制色素产生，使得前体物质更多地用于合成 Monacolin K。通过扫描电子显微镜观察菌丝体结构，发现延胡索酸改变了紫色红曲菌菌丝体的形态和细胞膜的通透性，提高了 Monacolin K 从胞内转移至胞外的效率，减少胞内积累的次级代谢物产量，减少产物的反馈抑制，进而提高了 Monacolin K 产量。通过对紫色红曲菌 Monacolin K 合成相关的 9 段基因进行荧光定量 PCR 分析发现，在添加延胡索酸的试验组中，从 *mokA* 到 *mokH* 基因的表达量呈现不同程度的上升趋势，而 *mokI* 基因的表达量在发酵的后期呈现下降趋势。因此，推测延胡索酸可能是通过综合调控与 Monacolin K 合成相关的基因来影响 Monacolin K 的合成。作者研究了延胡索酸对紫色红曲菌次级代谢合成 Monacolin K 和红曲色素的影响，为进一步研究通过液态发酵来提高 Monacolin K 产量提供了理论依据。但未深入研究延胡索酸是如何影响 Monacolin K 合成的关键代谢通路以及相应调控基因，因此后续会从分子水平进行深入研究，以阐明延胡索酸影响紫色红曲菌生长代谢的作用机制。

参考文献

[1] CHOE D，JUNG H H，KIM D，et al. *In vivo* evaluation of the anti-obesity effects of combinations of *Monascus* pigment derivatives[J]. RSC Advances，2020，10(3)：1456-1462.

[2] 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，2022，117：19-29.

[3] CHEN G，WU Z Q. Production and biological activities of yellow pigments from *Monascus* fungi[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology，2016，32(8)：136.

[4] PATTANAGUL P，PINTHONG R，PHIANMONGKHOL A，et al. Mevinolin，citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp.[J]. International Journal of Food Microbiology，2008，126(1/2)：20-23.

[5] ZHANG C，LIANG J，YANG L，et al. *De novo* RNA sequencing and transcriptome analysis of *Monascus purpureus* and analysis of key genes involved in Monacolin K biosynthesis[J]. PLoS One，2017，12(1)：e0170149.

[6] 唐光甫，桂艳玲，满海乔，等. 红曲桔霉素致毒机理的网络药理学分析[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(2)：90-96.
TANG G F，GUI Y L，MAN H Q，et al. Toxicity mechanism of citrinin in *Monascus* analyzed by network pharmacology[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(2)：90-96.(in Chinese)

[7] ZHU B，QI F Y，WU J 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]. Frontiers in Pharmacology，2019，10：1449.

[8] DIVSALAR P，NOORBALA A A，MOAZEN-ZADEH E，et al. Red yeast rice as an adjunct to sertraline for treatment of depression in patients with percutaneous coronary intervention：placebo-controlled trial[J]. Advances in Integrative Medicine，2018，5(2)：69-74.

[9] ZHANG C，ZHANG H，ZHU Q Q，et al. Overexpression of global regulator *LaeA* increases secondary metabolite production in *Monascus purpureus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104(7)：3049-3060.

[10] 付兴周，路志芳．红曲的生物学功能及其在家禽生产中的应用[J]．家畜生态学报，2017，38(1)：70-72，84．
FU X Z，LU Z F．Biological function of *Monascus* pigment and its application in poultry production[J]．Journal of Domestic Animal Ecology，2017，38(1)：70-72，84．(in Chinese)

[11] AKIRA E．Monacolin K，a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]．Journal of Antibiotics，1979，32(8)：852-854．

[12] 李春雨，蔡吉光，李继红，等．含莫纳可林K红曲降低鸡蛋胆固醇效果的研究[J]．中国兽药杂志，2006，40(8)：28-30．
LI C Y，CAI J G，LI J H，et al．Study on the effects of Monacolin K in red yeast on the reduced content of cholesterol in egg yolk[J]．Chinese Journal of Veterinary Drug，2006，40(8)：28-30．(in Chinese)

[13] ZHANG B B，LU L P，XU G R．Why solid-state fermentation is more advantageous over submerged fermentation for converting high concentration of glycerol into Monacolin K by *Monascus purpureus* 9901：a mechanistic study[J]．Journal of Biotechnology，2015，206：60-65．

[14] ZHANG C，CHAI S Y，HAO S，et al．Effects of glutamic acid on the production of Monacolin K in four high-yield Monacolin K strains in *Monascus*[J]．Applied Microbiology and Biotechnology，2019，103(13)：5301-5310．

[15] CHEN C H，YANG J C，UANG Y S，et al．Improved dissolution rate and oral bioavailability of lovastatin in red yeast rice products[J]．International Journal of Pharmaceutics，2013，444(1/2)：18-24．

[16] 于卓然，洪厚胜．功能性红曲Monacolin K产量控制策略的研究进展[J]．食品与发酵工业，2019，45(3)：288-292．
YU Z R，HONG H S．Research progress on the strategy of controlling Monacolin K production from functional *Monascus*[J]．Food and Fermentation Industries，2019，45(3)：288-292．(in Chinese)

[17] 陈景智，王力超，李亮，等．红曲霉洛伐他汀的液态发酵及其分离纯化研究[J]．食品与发酵工业，2019，45(2)：31-38．
CHEN J Z，WANG L C，LI L，et al．Fermentation conditions and separation of lovastatin for *Monascus*[J]．Food and Fermentation Industries，2019，45(2)：31-38．(in Chinese)

[18] XIONG Z X，CAO X H，WEN Q Y，et al．An overview of the bioactivity of Monacolin K/lovastatin[J]．Food and Chemical Toxicology，2019，131：110585．

[19] 张占军，王富花．基于红曲高产莫纳可林K的固态发酵工艺条件优化[J]．食品研究与开发，2020，41(7)：124-130．
ZHANG Z J，WANG F H．Technological conditions optimization of high-yield Monacolin K from red yeast rice by solid-state fermentation[J]．Food Research and Development，2020，41(7)：124-130．(in Chinese)

[20] 于卓然，陈程鹏，张耀，等．基于两阶段*L*-谷氨酸添加的功能性红曲产酸式Monacolin K的发酵工艺优化[J]．食品与发酵工业，2020，46(16)：127-134．
YU Z R，CHEN C P，ZHANG Y，et al．Optimization of fermentation process for Monacolin K acid production using functional *Monascus* with two-stage *L*-glutamic acid addition[J]．Food and Fermentation Industries，2020，46(16)：127-134．(in Chinese)

[21] 张斌，黄丽萌，王成涛，等．氨基酸对紫红曲霉Y66中红曲色素合成影响的研究[J]．中国食品添加剂，2016，27(8)：142-147．
ZHANG B，HUANG L M，WANG C T，et al．Effect of amino acids on *Monascus* pigments biosynthesis in *Monacus purpureus* Y66[J]．China Food Additives，2016，27(8)：142-147．(in Chinese)

[22] 陈幽幽，刘佳艳，张曦予，等．与兰茂牛肝菌菌丝生长相关的潜在小分子物质分析[J]．云南大学学报(自然科学版)，2024，46(4)：1147-1148．
CHEN Y Y，LIU J Y，ZHANG X Y，et al．Analysis of potential small molecule substances associated with mycelia growth of *Lanmao asiatica*[J]．Journal of Yunnan University：Natural Sciences Edition，2024，46(4)：1147-1148．(in Chinese)

[23] 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．

[24] YANG X L，XIANG L B，ZHANG C，et al．Promotion of Monacolin K production in *Monascus* extractive fermentation：the variation in fungal morphology and in the expression levels of biosynthetic gene clusters[J]．Journal of the Science of Food and Agriculture，2021，101(13)：5652-5659．

[25] LYU J，ZHANG B B，LIU X D，et al．Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture：the relationship between fermentation conditions and mycelial morphology[J]．Journal of Bioscience and Bioengineering，2017，124(4)：

452-458.

[26] SALIMIAN RIZI E, JAHADI M, ZIA M. Evaluation of gamma irradiation effect on morphological changes, macroscopic, microscopic characteristics and pigment production of *Monascus purpureus*[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(1): e16129.

[27] 乔双逵,彭林,丁重阳,等. 液体发酵条件对灵芝菌体形态及胞外多糖活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(10): 1070-1076.
QIAO S K, PENG L, DING Z Y, et al. Effect of different culture conditions on *Mycelium* morphology and activity of exopolysaccharides from *Ganoderma lucidum* in submerged culture[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(10): 1070-1076. (in Chinese)

[28] 谢炎福,杜苗苗. 红曲霉和虎杖共发酵体系的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 272-275.
XIE Y F, DU M M. Preliminary study on the co-fermentation system of *Monascus purpureus* and *Polygonum cuspidatum*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(8): 272-275. (in Chinese)

[29] JŮZLOVÁ P, MARTÍNKOVÁ L, KŘEN V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 16(3): 163-170.

[30] 柴诗缘,张安安,梁健,等. 十种添加物对红曲菌Monacolin K产量的促进效果分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 103-107, 113.
CHAI S Y, ZHANG A A, LIANG J, et al. Analysis of ten additives for the promoting effect of Monacolin K production in *Monascus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 103-107, 113. (in Chinese)

[31] 李颖慧,朱倩倩,焦梓,等. 柠檬酸对紫色红曲菌液态发酵产Monacolin K能力的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 104-110.
LI Y H, ZHU Q Q, JIAO Z, et al. Effect of citric acid on the production of Monacolin K by liquid state fermentation of *Monascus purpureus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 104-110. (in Chinese)

[32] 张函,张楠,朱倩倩,等. 烟酰胺对紫色红曲菌生长和次级代谢产物合成的影响[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(2): 83-90.
ZHANG H, ZHANG N, ZHU Q Q, et al. Effects of nicotinamide on growth and secondary metabolite synthesis of *Monascus purpureus*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(2): 83-90. (in Chinese)

[33] CHEN W P, FENG Y L, MOLNÁR I, et al. Nature and nurture: confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies *Monascus* azaphilone pigments[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(4): 561-572.

[34] TSUKAHARA M, SHINZATO N, TAMAKI Y, et al. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(2): 476-482.

[35] 李利,陈莎,陈福生,等. 红曲菌次生代谢产物生物合成途径及相关基因的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(2): 294-303.
LI L, CHEN S, CHEN F S, et al. Review on biosynthetic pathway of secondary metabolites and the related genes in *Monascus* spp.[J]. Bulletin of Biology, 2013, 40(2): 294-303. (in Chinese)

[36] 刘畅. 红曲霉洛伐他汀生物合成相关基因克隆与分析[D]. 昆明:昆明理工大学, 2011.

[37] CHEN Y P, YUAN G F, HSIEH S Y, et al. Identification of the *mokH* gene encoding transcription factor for the upregulation of Monacolin K biosynthesis in *Monascus pilosus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 287-293.

（责任编辑:闫林红）