

4株红曲霉发酵产生次级代谢产物的分析

张郡莹¹, 杨强¹, 张婵^{1,2*}, 刘国荣^{1,2}, 王成涛^{1,2*}, 赵吉兴³

(1. 北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048; 2. 北京工商大学北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048; 3. 山东中惠食品有限公司, 惠民 251706)

摘要: **目的** 为研究评价红曲霉产生次级代谢产物能力, 选育优良菌株。**方法** 通过建立的发酵液中 γ -氨基丁酸(GABA)、红曲色素、monacolin K和桔霉素的比色法和高压液相色谱检测方法, 比较了紫色红曲霉(*Monascus purpureus*)、丛毛红曲霉(*Monascus pilosus*)、红色红曲霉(*Monascus ruber*)、橙色红曲霉(*Monascus aurantiacus*)的液体发酵产生上述4种次级代谢产物能力。**结果** 不同红曲霉菌株产生上述4种次级代谢产物的能力是不同的, 4种红曲霉均可产生的红曲色素、monacolin K和桔霉素3种次级代谢产物, 其中*M. pilosus* J2的monacolin K产量最高(8.1 mg/L)、桔霉素生成量最低(0.09 mg/L); *M. purpureus* Y4的红曲色素色价最高, 为380 U/mL; 仅有紫色红曲霉Y4可代谢产生 γ -氨基丁酸, 产量约为0.2 g/L。**结论** 不同红曲霉菌株产生 γ -氨基丁酸、红曲色素、monacolin K和桔霉素这4种次级代谢产物能力存在较大差异。

关键词: 红曲霉; 次级代谢产物; γ -氨基丁酸; 红曲色素; monacolin K; 桔霉素

Analysis of the secondary metabolites produced by 4 strains of *Monascus*

ZHANG Jun-Ying¹, YANG Qiang¹, ZHANG Chan^{1,2*}, LIU Guo-Rong^{1,2},
WANG Cheng-Tao^{1,2*}, ZHAO Ji-Xing³

(1. Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Shandong Zhonghui Food Co. LTD, Huimin 251706, China)

ABSTRACT: Objective To study the ability of secondary metabolites of *Monascus*, and to breed excellent strains. **Methods** Detection methods of γ -aminobutyric acid (GABA), monascus pigments, monacolin K and citrinin by colorimetry and HPLC in fermentation were founded, the abilities of secondary metabolites produced by *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus ruber* and *Monascus aurantiacus* were compared. **Results** The producing abilities of secondary metabolites among the 4 strains of *Monascus* were different. The four strains of *Monascus* could produce monascus pigments, monacolin K and citrinin. The *M. pilosus* strain J2 had the highest producing ability of monacolin K (8.1 mg/L) and lowest producing ability of citrinin (0.09 mg/L); *M. purpureus* Y4 had the highest producing ability of monascus pigments producing (380 U/mL), and only *M. purpureus* Y4 can produce γ -aminobutyric acid (0.2 g/L). **Conclusion** There are differences in

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301411, 31071593)、北京市自然科学基金项目(5122008)、教育部科学技术研究重点项目(211101)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31301411, 31071593), Natural Science Foundation of Beijing (5122008) and the Key Project of Chinese Ministry of Education (211101)

*通讯作者: 张婵, 博士, 主要研究方向: 食品生物技术, E-mail: zhangchan@th.btbu.edu.cn; 王成涛, 博士, 教授, 主要研究方向: 食品生物技术, E-mail: wct5566@163.com

*Corresponding author: ZHANG Chan, PhD., Food Biotechnology, Email: zhangchan@th.btbu.edu.cn; WANG Cheng-Tao, Professor, the Department of Food Science and Technology, No.33, Fucheng Road, Haidian District, School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China. Email: wct5566@163.com

producing γ -aminobutyric acid, monascus pigments, monacolin K and citrinin among different strains.

KEY WORDS: *Monascus*; secondary metabolite; γ -aminobutyric acid; monascus pigments; monacolin K; citrinin

1 引言

红曲霉(*Monascus*)是一类小型的丝状腐生真菌,可以发酵产生红曲色素、 γ -氨基丁酸(GABA)、monacolin K、桔霉素等多种次级代谢产物^[1],其中前3者已表明其具有重要的生理活性功能。GABA具有降血压和预防老年痴呆的生理作用^[2],其合成由三羧酸循环(TAC)开始,由谷氨酸脱羧酶(GAD)催化生成,葡萄糖(Glu)是GABA的唯一来源^[3]。红曲色素为我国重要的食用色素,以红曲色素为主要成分的红曲米在我国已有几百年的食用历史,作为食品着色剂广泛用于酿酒制醋、肉制品等^[4]。莫那可林K(monacolin K)能有效抑制胆固醇生物合成中的关键酶3-羟基-3-甲基-戊二酰基-辅酶A还原酶(HMG-CoA)的活性,表现出较好的降胆固醇和血脂作用^[5,6],目前已作为临床降血脂的药物或用于制备保健食品。研究^[7]发现桔霉素有肾脏毒性,且有致畸作用,需要限制其产生。红曲米中含有桔霉素的问题已成为严重制约我国红曲米的应用及出口的重要因素。

李利等^[8]研究发现,红曲色素、monacolin K和桔霉素等均为一类聚酮化合物,其合成可能开始于同一途径,往往是相伴而生。本文建立了红曲霉聚酮类化合物的检测方法,对实验室分离得到的红曲霉产生上述4种次级代谢产物进行分析,以期为优良红曲霉菌株的筛选及应用提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 试剂与菌株

甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher公司); γ -氨基丁酸、monacolin K、桔霉素(sigma公司); 无水乙醇、硼酸、苯酚、次氯酸钠、无水甲醇、磷酸等(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

丛毛红曲霉(*Monascus pilosus*) J2、紫色红曲霉(*Monascus purpureus*) Y4、红色红曲霉(*Monascus ruber*) F9-7、橙色红曲霉(*Monascus aurantiacus*) F8-1, 以上菌种均为本实验室从红曲米、功能性红曲胶囊等样品中分离获得, 并经遗传学、生理生化等系统鉴定。

2.2 培养基

斜面培养基(g/L): 葡萄糖 20, 麦芽浸粉 20, 琼脂粉 20, 蛋白胨 3, 酵母提取物 4, KH_2PO_4 2, MgSO_4 1, 121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 大米粉 40, 蛋白胨 8, 豆饼粉 5, KH_2PO_4 2, NaNO_3 2, MgSO_4 1, 乳酸调 pH 4.0, 121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 大米粉 60, 葡萄糖 40, 豆饼粉 2, NaNO_3 2, KH_2PO_4 2, MgSO_4 1, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

2.3 主要仪器

LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; ZWP-A1230 恒温恒湿培养箱, 上海绿宇生物科技有限公司; QYC-2102C 恒温摇床, 上海福玛实验设备有限公司; HDL 洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; SCIENTZ II-D 超声波细胞粉碎机, Ningbo Scientz Biotechnology Co., LTD; UV-2450 岛津分光光度计, 日本岛津公司; LC-20AT 岛津高压液相色谱(配有 SPD-M20A 紫外检测器和 RF-20Axs 荧光检测器), 日本岛津公司。

2.4 方法

2.4.1 摇瓶发酵培养

将种子培养液按 6% 的接种量接种到 50 mL 发酵培养基(250 mL 三角瓶), 33 °C, 200 r/min 摇床培养。

2.4.2 γ -氨基丁酸(GABA)的检测

γ -氨基丁酸的检测采用 Berthelot 比色法^[9,10], 630 nm 检测吸光度。

取红曲霉发酵液, 超声破碎细胞 10 min(功率 200 W, 间隔时间 2 s, 杆振幅 $\Phi 06$), 12000 r/min 离心 15 min。取 1 mL 适当稀释液, 加入 0.6 mL 的 6% 苯酚和 2.0 mL 6% NaClO 溶液, 混匀、沸水浴冰浴 10 min, 630 nm 检测吸光度, 按标准曲线得 GABA 含量。

2.4.3 红曲色素的检测

色价的测定方法采用国标法(GB-T 5009.150-2003)^[11]。取红曲霉发酵液 5 mL, 加入 45 mL 70% 乙醇, 于 60 °C 水浴萃取 2 h 后, 4000 r/min 离

心 15 min。取上清液, 用 70%乙醇做适当稀释, 在 505 nm 下测定 OD 值; 红色素色价 = OD × 稀释倍数。

2.4.4 Monacolin K 的检测

发酵液中 monacolin K 含量检测参考朱华等^[12]、李燕等^[13]的方法。取红曲霉发酵液 5 mL, 超声波细胞破碎 10 min(条件同方法 2.4.2), 加入 15 mL 75%甲醇震荡混匀, 5000 r/min 离心 10 min, 放置过夜, 用 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤, 采用高压液相色谱法(HPLC)检测。

HPLC 法检测条件: 色谱柱为 C₁₈(4.6 mm× 250 mm, 5 μm), 0.1%磷酸: 甲醇=1:3 作为流动相, 紫外检测器 波长 238 nm, 柱温 30 ℃, 流速 1 mL/min, 进样量 10 μL。

2.4.5 桔霉素的检测

发酵液的预处理参照许赣荣等^[14]方法。取红曲霉发酵液 10 mL, 超声破碎细胞 10 min(条件同方法 2.4.2), 加入 20 mL 无水乙醇, 60 ℃水浴振荡 1 h, 冷却至室温, 3000 r/min 离心 15 min, 0.45 μm 滤膜过滤。

桔霉素含量的 HPLC 检测, 参照国标 GB/T 5009.222-2008^[15], 检测条件: 色谱柱 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈: 水(磷酸调 pH2.5)=35:65 作为流动相, 荧光检测器 激发波长 λ_{ex} = 331 nm, 发射波长 λ_{em} = 500 nm, 柱温 28 ℃, 流速 1.2 mL/min, 进样量 50 μL。

3 结果

3.1 不同红曲霉菌株的 γ-氨基丁酸产量

绘制 γ-氨基丁酸(GABA)的标准曲线, 获得回归曲线方程 $Y=3.4824X-0.0746$, 相关系数 $R^2=0.9972$ 。按照方法 2.4.2 检测不同红曲霉菌株的 γ-氨基丁酸(GABA)发酵生成量。由图 1 可知, 试验的 4 株红曲霉发酵液中仅有紫色红曲霉 Y4 代谢产生 GABA, 其产量约为 0.2 g/L, 其它 3 株红曲霉发酵液未检测出 GABA。紫色红曲霉 Y4 的 GABA 生成量与秦江辉等^[16]报道数据相比产量较低。

3.2 不同红曲霉菌株的红曲色素产量

图 2 可知, 4 株红曲霉都可产生一定量的红曲色素, 其中, 紫色红曲霉 Y4 的红曲色素色价约为 380 U/mL, 其次为红色红曲霉 F9-7, 其色价约为 350 U/mL, 它们的发酵液均呈现紫红色, 并带有金

属光泽; 橙色红曲霉 F8-1、丛毛红曲霉 J2 的红色素产量较低, 发酵液呈浅红色, 橙色红曲霉 F8-1 的红色素产量为 145 U/mL、丛毛红曲霉 J2 的红色素产量为 100 U/mL。

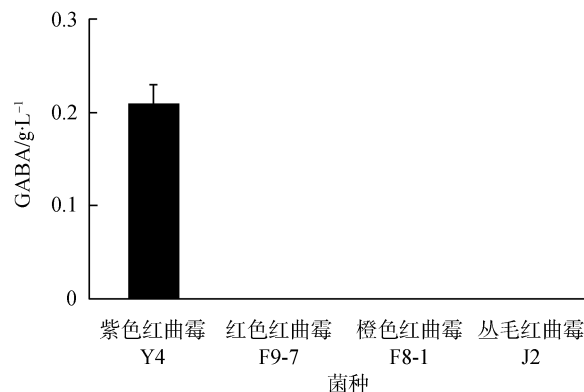


图 1 不同红曲霉菌株摇瓶培养的 γ-氨基丁酸生成量(n=5)

Fig. 1 GABA yields of different *Monascus* in shake flask culture (n=5)

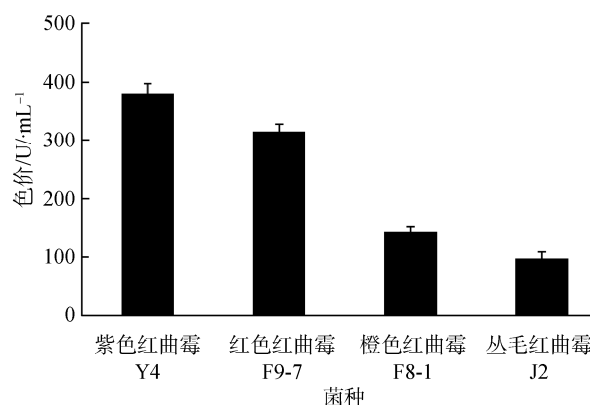


图 2 不同红曲霉菌株摇瓶培养的红曲色素生成量(n=5)

Fig. 2 Red pigment yields of different *Monascus* in shake flask culture(n=5)

3.3 不同红曲霉菌株的 monacolin K 产量

绘制 monacolin K 标准曲线, 获得回归曲线的方程 $Y=31640X-23285$, 相关系数 $R^2=0.9995$ 。图 3 可知, 不同种属的红曲霉都可代谢产生一定量的 monacolin K, 其中丛毛红曲霉 J2 的 monacolin K 含量为最高, 约为 8.1 mg/L, 其它 3 株红曲霉代谢产生的 monacolin K 量差别较小。紫色红曲霉 Y4 产量为 4.9 mg/L, 红色红曲霉 F9-7 产量为 5.2 mg/L, 橙色红曲霉 F8-1 产量为 3.8 mg/L。

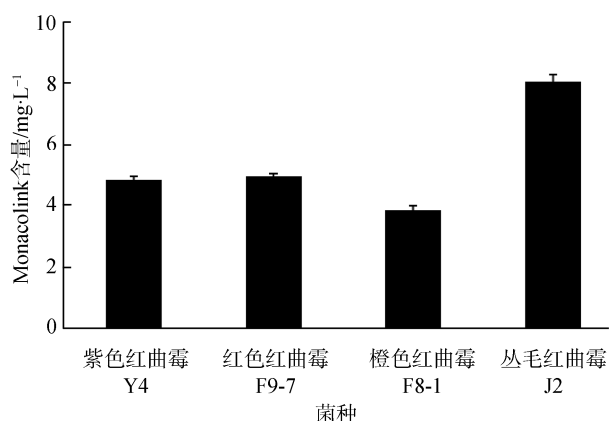
图 3 不同红曲霉菌株摇瓶培养的 monacolin K 生成量($n=5$)

Fig. 3 Monacolin K yields of different *Monascus* in shake flask culture ($n=5$)

3.4 不同红曲霉菌株的桔霉素生成量的比较

研究发现,在相同培养基、培养条件下,4 株红曲霉发酵液中均产生一定量的桔霉素,且产生桔霉素的能力存在一定差异(图 4、图 5),其中发现较高 monacolin K 的丛毛红曲霉 J2 代谢产生桔霉素量为最低,约为 0.09 mg/L;其它 3 种红曲霉产生桔霉素相对较高。紫色红曲霉 Y4 产量为 0.21 mg/L,红色红曲霉 F9-7 产量为 0.24 mg/L,橙色红曲霉 F8-1 产量为 0.2 mg/L。因此,4 株菌产生的桔霉素量均低于日本规定红曲色素的桔霉素限量标准(4 mg/kg)。

4 小结与讨论

4.1 小结

不同红曲霉菌株产生 γ -氨基丁酸(GABA)、红曲色素、monacolin K 和桔霉素 4 种次级代谢产物的能

力是不同的。试验研究的 4 种红曲霉均可产生红曲色素、monacolin K 和桔霉素 3 种次级代谢产物。丛毛红曲霉 J2 的 monacolin K 产量最高(8.1 mg/L),其他 3 株红曲霉 monacolin K 产量差别较小,但与丛毛红曲霉 J2 差距较大。紫色红曲霉 Y4 的红曲色素色价最高为 380U/mL,红色红曲霉 F9-7 红曲色素色价次之,橙色红曲霉 F8-1 和丛毛红曲霉 J2 红曲色素产量较低。4 株红曲霉均有桔霉素代谢产生,其中丛毛红曲霉 J2 的桔霉素含量最低(0.09 mg/L)。试验菌株中仅有紫色红曲霉 Y4 可代谢产生 GABA,产量约为 0.2 g/L。

4.2 讨论

有报道称^[8],红曲霉的合成代谢途径中红曲色素、monacolin K 和桔霉素这 3 种次级代谢产物起始于同一途径,相互之间存在伴生和竞争关系。本课题组前期研究中,收集了国内不同地区、不同菌种的 20 余种红曲米,发现不同厂家使用不同红曲霉菌种,红曲米产品中红曲色素、桔霉素的含量存在较大差异。

本实验采用自然光照条件培养,根据 Chen^[17]报道 GABA 产量的调控与聚酮化合物的调控不同,红光刺激聚酮化合物的生成,蓝光刺激 GABA 的生成,从研究结果可知自然光与红光有相似作用。顾玉梅^[18]报道,红曲霉产桔霉素的量,除与菌种有关,与发酵工艺条件也有着密切的关系,受到所使用的培养基、培养条件的较大影响。在菌种筛选中,选择合适的培养基和培养条件对于促进红曲色素等产物的代谢和抑制桔霉素产生具有重大意义。许赣荣等报道^[19-20],大多数红曲霉菌种均具有桔霉素的遗传特性,可产生一定量的桔霉素,并推论桔霉素的生成量与红曲

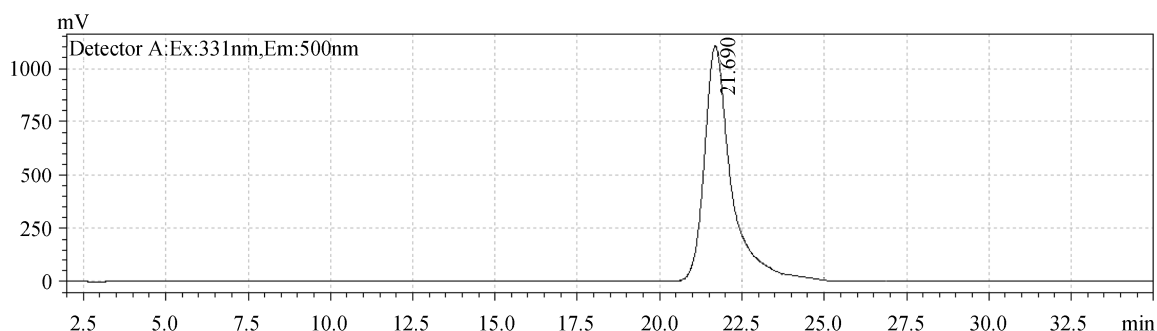


图 4 桔霉素的 HPLC 色谱图(桔霉素出峰时间在 21.69 min 左右)

Fig. 4 HPLC chromatogram of citrinin (the peak time of citrinin is about 21.69 min)

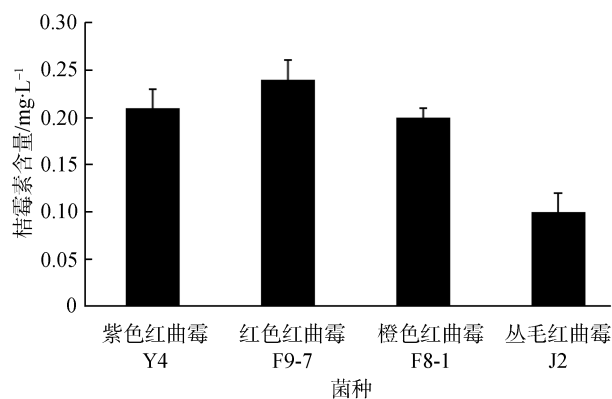


图5 不同红曲霉菌株摇瓶培养的桔霉素生成量($n=5$)

Fig. 5 Citrinin yields of different *Monascus* in shake flask culture ($n=5$)

色素产量有一定相关性。本研究中发现, 红曲色素和 monacolin K 产量较高的紫色红曲霉 Y4 和丛毛红曲霉 J2, 其桔霉素含量较低。其原因可能是这两种产物的合成途径有较大重合度、相似性, 只是合成途径接近目的产物时发生了分支途径, 但目前对于红曲色素与桔霉素的合成途径中的关键酶及相关调控基因等并不清楚, 有待深入研究。

参考文献

- [1] 刘毅, 宁正祥. 红曲霉发酵产物的保健作用及应用[J]. 广州食品工业科技, 1999, 15(2): 1-4.
Liu Y, Ning ZX. The health care effect and application of *Monascus* fermentation products [J]. Guangzhou Food Sci Technol, 1999, 15(2): 1-4.
- [2] 张晖, 姚惠源, 姜元荣. 富含 γ -氨基丁酸保健食品的研究与开发[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9): 69-72.
Zhang H, Yao HY, Jiang YR. Development of the Health Food Enriched with γ -aminobutyric acid [J]. Food Ferment Ind, 2002, 28(9): 69-72.
- [3] Streeter JG, Thompson JF. In vivo and in vitro studies on γ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus*, L.) [J]. Plant Physiol, 1972, 49(4): 579-584.
- [4] 张志刚, 马歌丽. 红曲霉的应用现状及发展前景[J]. 食品加工, 2007, 3: 36-39.
Zhang ZG, Ma GL. Existing application and future development of *Monascus* [J]. Grain Distrib Technol, 2007, 3: 36-39.
- [5] 高红. 红曲在我国传统食品和食疗保健中的作用[J]. 中国酿造, 1997, 6: 11-13.
Gao H. The effect of *Monascus* in traditional food and health [J]. China Brew, 1997, 6: 11-13.
- [6] Endo A. Monacolin K. A new hypocholesterolemic agent produced by a monascus species [J]. Antibiot, 1979, 32: 852.
- [7] Betina V (Editor). Mycotoxins-production, isolation, separation and purification [J], Elsevier, Amsterdam, 1983, 10: 217-236.
- [8] 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 FS, et al. Review on biosynthetic pathway of secondary metabolites and the related genes in *Monascus* spp[J]. Microbiol China, 2013, 40(2): 294-303.
- [9] 赵宏飞, 宋伟, 裴家伟, 等. 食品中三种 γ -氨基丁酸检测方法比较[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(11): 51-55.
Zhao HF, Song W, Pei JW, et al. Comparisons of three methods available for the analysis of γ -aminobutyric acid from food environment [J]. China Dairy Ind, 2008, 36(11): 51-55.
- [10] 雷恒. 高产 GABA 的红曲菌种选育以及发酵工艺优化[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2010.
Lei H. Breeding of GABA-high yielding *Monascus* strain and optimization of fermentation process [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2010.
- [11] 标准: GB4926-1985 中华人民共和国红曲米国家标准[S].
GB4926-1985 Food additive Red koji rice [S].
- [12] 朱华, 许赣荣, 陈蕴. HPLC 法测定红曲中酸型与内酯型 monacolin K[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(3): 25-30.
Zhu H, Xu GR, Chen Y. HPLC analysis of acid form and lactone form monacolin K from *Monascus* red rice [J]. J Wuxi Univ Light Ind, 2003, 22(3): 25-30.
- [13] 胡常琳, 高玉荣. 高产 monacolin K 红曲菌株筛选及菌种液态培养工艺[J]. 中国酿造, 2013, (3): 48-51.
Hu CL, Gao YR. Breeding of monacolin K-high yielding *Monascus* strain and fermentation process [J]. China Brew, 2013, (3): 48-51.
- [14] 许赣荣. 红曲桔霉素的检测及发酵控制技术[D]. 江南大学, 2005.
Xu GR. Determination and fermentation control of *Monascus* citrinin [D]. Jiangnan Univ, 2005.
- [15] GB/T5009.222-2008 中华人民共和国红曲类产品中桔青霉素的测定[S].
GB/T5009.222-2008 Determination of citrinin in *Monascus* products [S].
- [16] 秦江辉, 周礼红, 胡开成, 等. 高产 γ -氨基丁酸的红曲霉菌株选育[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 320-322.
Qin JH, Zhou LH, Hu KC, et al. Screening of *Monascus* strains with high breeding citrinin production ability [J]. Jiangsu Agric Sci, 2012, 40(3): 320-322.

- [17] 陈庆国(Chen CK). 探讨光对深层培养 *Aspergillus ficuum* 的影响及以 *Microbacterium sp.* 去除二甲基硫之研究[D]. 2009.
Chen CK. The influence of light to deep culture *Aspergillus ficuum* and study of *Microbacterium sp.* removal diemthylsulfide [D]. 2009.
- [18] 顾玉梅, 许贇荣, 陈蕴. 红曲霉菌 9903 发酵工艺条件对色素及桔霉素生产的影响[J]. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 43-47.
Gu YM, Xu GR, Chen Y. Influence of fermentation environmental conditions on the Production of pigments and citrin by *Monascus anka* 9903 [J]. J Food Sci Biot, 2002, 21(1): 43-47.
- [19] 许贇荣, 李凤琴, 陈蕴, 等. 红曲霉桔霉素的检测方法及其产桔霉素的判别方法[J]. 微生物通报, 2004, 3: 23-26.
Xu GR, Li FQ, Chen Y, et al. *Monascus* citrinin analysis methods and a study on formation of citrinin by *Monascus* [J]. Microbiol China, 2004, 3: 23-26.
- [20] 许贇荣, 陈蕴, 顾玉梅, 等. 低产桔霉素红曲霉菌种筛选[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(4): 358-360.
Xu GR, Chen Y, Gu YM, et al. Screening of *Monascus* strains with low content citrinin production ability [J]. J Wuxi Univ of Light Ind, 2000, 19(4): 358-360.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张郡莹, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。
E-mail: zhangjy-316@163.com



张婵, 博士, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: zhangchan@th.btbu.edu.cn



王成涛, 博士, 教授, 副院长, 研究方向为食品生物技术。
E-mail: wangchengtao@th.btbu.edu.cn