

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240131003

降解桔霉素酵母菌的筛选及降解条件的优化

申家荣¹, 李 鑫¹, 王娅楠¹, 王丽玲^{1*}, 何 毅²

(1. 塔里木大学食品科学与工程学院/南疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 阿拉尔 843300;
2. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023)

摘 要: **目的** 从阿瓦提红葡萄果园土壤以及实验室现有酵母菌株中筛选出一株降解桔霉素(citrinin, CIT)的酵母菌, 并对其降解桔霉素的培养条件进行优化。**方法** 以 YES 为基本培养基, 将筛选得到的酵母菌与高产 CIT 红曲菌 M7 共培养, 挑选对 CIT 降解率较高的菌株, 采用形态学和分子生物学进一步对菌株进行鉴定, 采用单因素结合正交试验法优化酵母菌降解 CIT 的培养条件。**结果** 得到一株降解 CIT 能力较高的酵母菌株 PT, 经鉴定为库德毕赤酵母, 酵母菌 PT 降解 CIT 的最优条件为: 葡萄糖添加量为 165 g/L, FeSO₄ 添加量为 0.50 g/L, pH 为 3.0, 于 28℃培养 13 d, 在此培养条件下酵母菌 PT 对 CIT 的降解率为 76.78%。**结论** 采用生物法降解 CIT 是可行的途径。本研究结果可为微生物脱除 CIT 的方法提供参考, 同时筛选的酵母菌也可应用于其他发酵食品中。

关键词: 桔霉素; 酵母菌; 降解

Screening of yeast for degrading citrinin and optimization of degradation conditions

SHEN Jia-Rong¹, LI Xin¹, WANG Ya-Nan¹, WANG Li-Ling^{1*}, HE Yi²

(1. School of Food Science and Engineering, Tarim University/Key Laboratory of Deep Processing of Southern Xinjiang Special Agricultural Products Corps, Alar 843300, China; 2. School of Food Science and Engineering, Wuhan Light Industry University, Wuhan 430023, China)

ABSTRACT: Objective To select a yeast that degrades citrinin (CIT) from the existing yeast strains in the soil and laboratory of Avati red grape orchard, and to optimize its culture conditions for degrading citrinin. **Method** Using YES as the basic medium, the selected yeast was co-cultured with high-yielding monasgillus CIT M7, and the strains with high CIT degradation rate were selected. The strain was identified by its morphology and molecular biology. Using single factor method combined orthogonal design, the optimal conditions were studied. **Results** A strain with strong degradation rate of CIT was obtained as PT, which was identified as *Pichia kudriavzevii*. Through the optimization of fermentation conditions, the optimum fermentation conditions for the degradation rate of CIT by the strain were as follows: Glucose addition was 165 g/L, FeSO₄ addition was 0.50 g/L, pH was 3.0, the culture

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(202310757019)、新疆维吾尔自治区重点研发任务专项项目(2022B02024-4)、国家自然科学基金地区基金项目(32060526)、兵团财政科技计划项目(2021CB023)

Fund: Supported by the National College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (202310757019), the Special Project for Key Research and Development Tasks in Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022B02024-4), the National Natural Science Regional Fund Project (32060526), and the Xinjiang Production and Construction Corps Financial Science and Technology Plan (2021CB023)

***通信作者:** 王丽玲, 博士, 教授, 主要研究方向为发酵食品微生物, 农产品深加工。E-mail: 63502574@qq.com

***Corresponding author:** WANG Li-Ling, Ph.D, Professor, School of Food Science and Engineering, Tarim University/Key Laboratory of Deep Processing of of Southern Xinjiang Special Agricultural Products, Alar 843300, China. E-mail: 63502574@qq.com

temperature was 28°C, and the culture time was 13 d, under these conditions, the degradation effect of CIT produced by the strain was 76.78%. **Conclusion** Biodegradation of CIT is a feasible approach. The results of this study can provide a reference for the method of microbial removal of CIT, and the selected yeast can also be applied to other fermented foods.

KEY WORDS: citrinin; yeast; degradation

0 引言

桔霉素(citrinin, CIT)是一种多环羧酸类化合物, 1931年, 从桔青霉(*Penicillium citrinum*)的代谢产物中首次发现CIT的存在^[1], 进一步研究表明其具有肾脏、肝和骨髓毒性, 主要由青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)和红曲菌(*Monascus*)等丝状真菌的某些菌种代谢产生, 广泛污染水果、粮食和饲料等^[2], 尤其对我国红曲相关产品的污染, 限制了红曲的出口和应用^[3]。研究者对如何控制CIT的产生开展了广泛的研究, 主要包括物理、化学和生物学方法, 如高强度的蓝光可以抑制红曲菌产生CIT^[4], 在湿润的条件下将CIT加热到140°C可以将其转化为毒性相对较低的CIT H₂, 但光照和加热等方式降解CIT耗时、耗能, 或者仅将CIT转化为其他有毒的化合物^[5-6], 也有研究者将曲克芦丁加入发酵培养基中, 降低红曲菌CIT的产生^[7], 但曲克芦丁作为药物不能作为食品添加剂应用^[8]。碱性化学试剂如NaOH、NaHCO₃和氨水可以破坏含内酯基团的化合物, 因此可以破坏CIT^[9], 降低发酵液pH也可以降低CIT的产量^[10], 但是化学试剂的加入会改变食品的感官特性; 生物方法控制CIT绿色环保、价格低廉, 逐渐受到重视。目前, 通过敲除CIT合成相关基因控制CIT产生的报道较多^[11-12], 但基因改造菌的遗传稳定性较差, CIT降解菌的筛选仅有少量报道, 例如IWAHASHI等^[13]报道酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)可以对CIT进行脱毒, KANPIENGJAI等^[14]发现土壤根瘤菌(*Rhizobium borbori*)培养物中含有降解CIT的酶, LI等^[15]发现卵磷脂可以促进葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)的生长, 通过空间与营养的竞争提高其对柑橘绿霉病的致病菌指状青霉(*Penicillium digitatum*)的拮抗效果, 从而可以间接减少CIT的产生。CAO等^[16]发现卡利比克毕赤酵母(*Pichia caribbica*)可以拮抗苹果青霉病致病菌扩展青霉(*Penicillium expansum*)的生长, 进而抑制扩展青霉产生CIT。利用降解菌株进行CIT控制容易制剂化并且稳定, 应用前景广阔。

阿瓦提县位于塔里木盆地西北边缘, 光照时间长、降水少、昼夜温差大, 盛产的阿瓦提红葡萄广泛用于当地慕萨莱思的自然酿造^[17], 由于独特的生态环境条件, 使得阿瓦提红葡萄及生长环境酵母菌存在多样性。红曲菌(*Monascus ruber*) M7是高产红曲色素及CIT的菌株, 为将其应用于食品工业, 研究者对控制其CIT的产量开展了大

量的研究^[4], 本研究拟从阿瓦提红葡萄果园土壤以及实验室现有酵母菌株中筛选降解CIT酵母菌, 探讨酵母菌降解CIT最优培养条件, 为CIT降解的生物技术提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高产CIT红曲菌(*Monascus ruber*) M7(华中农业大学农业微生物国家重点实验保藏中心保藏, 编号为CCAM070120); 桔霉素CIT(纯度98%, 上海源叶生物科技有限公司); 葡萄糖、氯化钾、甲酸、甲苯、乙酸乙酯(分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司); 酵母浸膏、琼脂、(分析纯, 北京奥博星生物技术有限责任公司); 可溶性淀粉(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 麦芽糖(分析纯, 上海蓝季科技发展有限公司); α -乳糖(分析纯, 上海山浦化工有限公司); 乳糖(分析纯, 天津永晟精细化工有限公司); 果糖(分析纯, 山东西亚化学有限公司); D-木糖(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); MgSO₄、NaOH、HCl(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 无水Na₂SO₄(分析纯, 天津市光复科技发展有限公司); 无水CaCl₂(分析纯, 上海山浦化工有限公司); FeSO₄(分析纯, 天津市化学试剂三厂); ZnSO₄(分析纯, 天津市鑫铂特化工有限公司); MnSO₄(分析纯, 福晨天津化学试剂有限公司); 无水CuSO₄(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 甲醇(分析纯, 洛阳市化学试剂厂); YPD培养基(分析纯, 广东环凯微生物科技有限公司); PDB培养基(分析纯, 上海博微生物科技有限公司)。

1.2 仪器设备

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); PHSJ-3F pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司); PX125DZH/PMK电子天平[d=0.00001 g, 奥豪斯仪器(常州)有限公司]; TGL-20bR 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); SW-CJ-2F 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); SPX-250BE 生化培养箱(上海力辰邦西仪器科技有限公司); THZ-98C 恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司); LDZX-50L 立式高压蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械有限公司); SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); BJZ-246 电热鼓风干燥箱(上海博迅有限公司医疗设备厂); Synergy H1 多功能微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司); Inertsil ODS-3 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm,

5 μm , 日本岛津公司)。

1.3 培养基

YES 培养基参考程功等^[17]的方法制备。

1.4 高效液相色谱检测 CIT 条件

参考王丽玲^[6]方法。CIT 检测方法: Inertsil ODS-3 液相色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 荧光检测器; 流动相是 A: 乙腈, B: 0.1%甲酸水, 洗脱程序为: 0~3.00 min, 10% A 和 90% B; 3.00~10.00 min, 70% A 和 30% B; 10.01~12.00 min, 90% A 和 10%; 12.01~15.00 min, 10% A 和 90% B; 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测条件: Ex=330 nm, Em=500 nm。

1.5 降解 CIT 酵母菌的分离鉴定

1.5.1 CIT 溶液的制备

将高产 CIT 红曲菌 M7 于 28 $^{\circ}\text{C}$ YES 培养基中培养 1 周, 得到含有一定浓度 CIT 的溶液。

1.5.2 降解 CIT 酵母菌的分离筛选

以阿瓦提红葡萄果园土壤为样品, 采用稀释涂布法, 分离出单菌落, 挑取单菌落接种于 YPD 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 观察菌落形态和显微形态; 将疑似酵母菌接种于 1.5.1 中制备的含有一定浓度 CIT 的红曲菌液中共培养, 每隔 1 d 检测 CIT 含量, 比较酵母菌降解 CIT 的溶液的效果。

1.5.3 酵母菌分子生物学鉴定

以筛选得到的降解 CIT 的酵母菌株的全基因组为模板, 以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')为引物进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。PCR 反应体系(20 μL): ddH₂O 14.7 μL , 10 $\times$ Taq buffer 2.0 μL , Taq DNA 聚合酶 0.1 μL , dNTP Mix 1.6 μL , Primer 1 0.8 μL , Primer 2 0.8 μL , 模板 1 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 0.5 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。对 PCR 扩增产物进行电泳检测并送至上海生工科技有限公司进行测序。测序结果通过生物大分子序列对比搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)进行同源性分析, 采用 MEGA11 软件构建系统发育进化树^[18]。

1.6 酵母菌降解 CIT 条件优化

1.6.1 碳源对酵母菌降解 CIT 效果的影响

以 YES 培养基为基础培养基, 分别以质量浓度为 160 g/L 的葡萄糖、果糖、可溶性淀粉、乳糖、木糖、 α -乳糖、大米粉、黄豆粉, 麦芽糖作为唯一碳源, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 将红曲菌 M7 培养 7 d, 接种筛选的酵母菌共培养至第 13 d, 每隔 48 h 测定 CIT 含量。以 CIT 的降解率为指标, 考察不同碳源对混菌发酵降解 CIT 的影响。

1.6.2 不同碳源添加量对 CIT 降解效果的影响

以 YES 培养基为基础培养基, 以 1.6.1 筛选的碳源作为唯一碳源, 设置质量浓度分别为 140、150、160、170、180 g/L 进行单因素试验, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 将红曲菌 M7 培养 7 d, 接

种筛选的酵母菌共培养至第 13 d, 每隔 48 h 测定 CIT 含量。以 CIT 的降解率为指标, 考察不同碳源添加量对混菌发酵降解 CIT 的影响。

1.6.3 无机盐对 CIT 降解效果的影响

培养基中分别添加 0.5 g/L 的 KCl、Na₂SO₄、CaCl₂、ZnSO₄、MnSO₄、FeSO₄、CuSO₄、MgSO₄, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 将红曲菌 M7 培养 7 d, 接种筛选的酵母菌共培养至第 13 d, 每隔 48 h 测定 CIT 含量。以 CIT 的降解率为指标, 考察不同无机盐对混菌发酵降解 CIT 的影响。

1.6.4 不同无机盐添加量对 CIT 降解效果的影响

以 YES 培养基为基础培养基, 设置 1.6.3 筛选的无机盐质量浓度分别为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 g/L 进行单因素试验, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 将红曲菌 M7 培养 7 d, 接种筛选的酵母菌共培养至第 13 d, 每隔 48 h 测定 CIT 含量。以 CIT 的降解率为指标, 考察无机盐添加量对混菌发酵降解 CIT 的影响。

1.6.5 pH 对 CIT 降解效果的影响

以 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 溶液分别调整培养基 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 将红曲菌 M7 培养 7 d, 接种筛选的酵母菌共培养至第 13 d, 每隔 48 h 测定 CIT 含量。以 CIT 的降解率为指标, 考察 pH 对混菌发酵降解 CIT 的影响。

1.6.6 正交试验设计

以葡萄糖、硫酸亚铁和 pH 作为主要因素, 采用 L₉(3³) 正交试验, 确定混菌发酵降解 CIT 的最优条件。试验设计见表 1。

表 1 正交试验设计因素与水平			
Table 1 Orthogonal experimental design factors and levels			
水平	因素		
	A: 葡萄糖添加量 /(g/L)	B: 硫酸亚铁添加量 /(g/L)	C: pH
1	155	0.45	2.5
2	160	0.50	3.0
3	165	0.55	3.5

1.7 数据处理

各试验重复 3 次, 试验数据采用 3 次平行试验的平均值, 所有数据用平均值 $\pm$ 标准偏差表示。利用 MEGA 11 对酵母菌序列进行分析对比, 构建系统发育树。用 SPSS 23.0 和 Design-Expert 13 软件进行单因素方差分析, 采用 Excel 2019、Orgin 2022 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 降解 CIT 酵母菌的分离鉴定结果

2.1.1 降解 CIT 酵母菌的筛选

以从阿瓦提红葡萄果园土壤中分离的和实验室保存的 18 株酵母菌种为原料, 对比降解 CIT 的效果, 结果见图 1, 由图 1 可知疑似酵母菌 PT 对 CIT 降解率最高, 为 63%,

因而后续采用酵母菌 PT 为试验菌株。

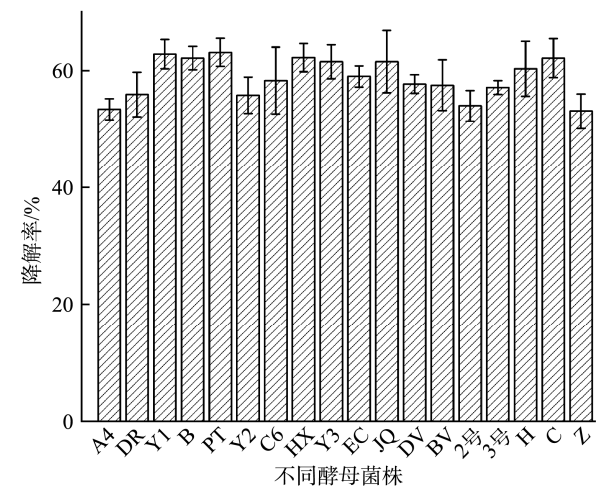
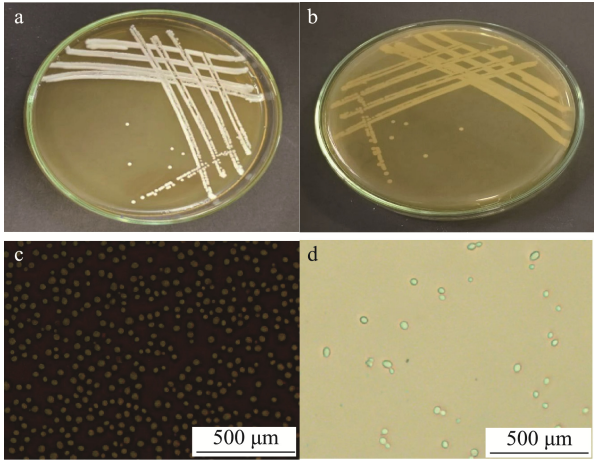


图1 不同酵母菌株对降解CIT的结果
Fig.1 Results of CIT degradation by different yeast strains

2.1.2 形态学鉴定

图 2 为疑似酵母菌 PT 在 YPD 培养基中的菌落形态及在电子显微镜下的显微形态。由图 2 可知疑似酵母菌 PT 表面光滑，颜色为乳白色，单细胞呈卵圆形，其中有些单细胞正在出芽生殖，具有明显的酵母菌形态特征，因此确定菌株 PT 为酵母菌。



注: a, b是疑似酵母菌PT在YPD培养基中培养3 d的形态;
c, d是酵母菌PT在物镜(×40)的光学显微镜下的形态。

图2 疑似酵母菌PT的菌落形态和显微形态
Fig.2 Colony morphology and microscopic morphology of suspected yeast PT

2.1.3 分子生物学鉴定

ITS 测序结果表明酵母菌 PT 的 ITS 区序列共有 472 bp。图 3 为酵母菌 PT ITS 区序列系统发育进化树。由图 3 可知酵母菌 PT 与对比菌株 *Pichia kudriavzevii* ATCC 6258 (NR_131315) 具有高度同源性，同源性为 100%，再结合菌落形态可以得出酵母菌 PT 为库德毕赤酵母 PT。

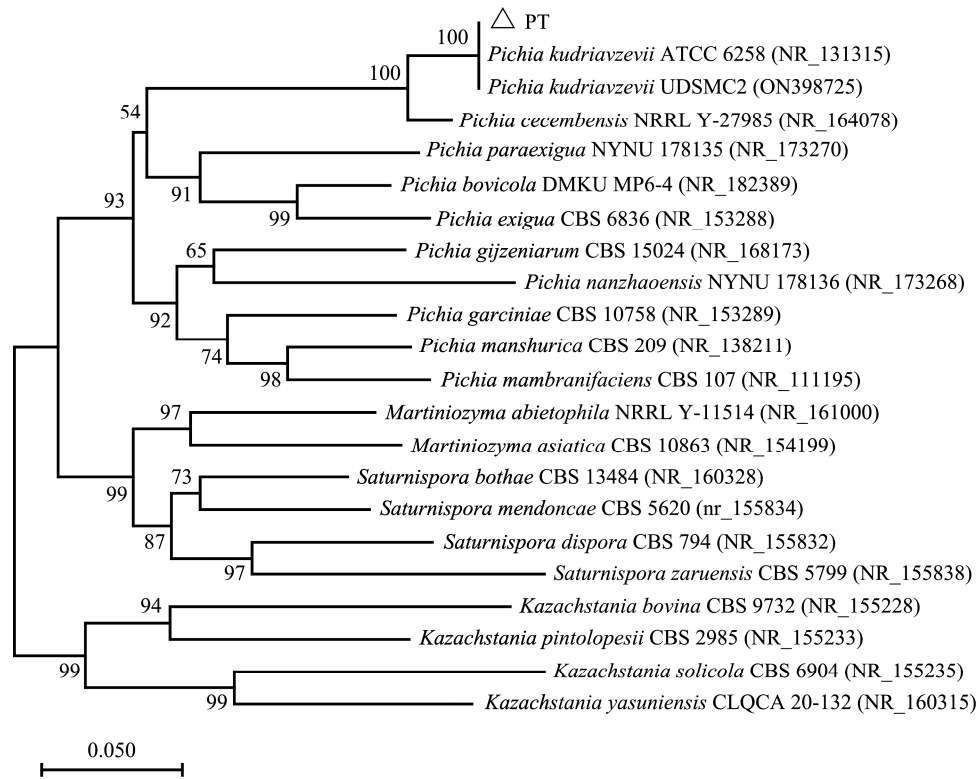


图3 PT菌株ITS区序列系统发育进化树
Fig.3 Phylogenetic evolution tree of ITS region sequence of PT strain

2.2 库德毕赤酵母 PT 菌降解 CIT 条件优化结果

2.2.1 碳源对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 的影响结果

不同碳源对库德毕赤酵母 PT 菌降解 CIT 的结果如图 4 所示, 由图 4 可知, 不同碳源对 CIT 降解率从高到低为葡萄糖>木糖>蔗糖>果糖>乳糖>大米> α -乳糖>淀粉。当葡萄糖作为唯一碳源时, 培养 13 d 后 CIT 降解率达到 61.53%, 且菌株生长良好, 这可能是由于筛选的酵母菌利用葡萄糖作为碳源时, 促进了其产生相关降解 CIT 的酶或者代谢产物, 故后续试验选用葡萄糖作碳源。

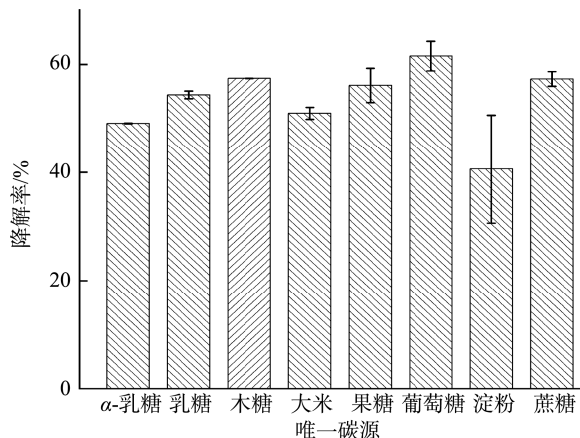


图4 不同碳源对CIT降解率的影响

Fig.4 Effects of different carbon sources on the degradation rate of CIT

2.2.2 葡萄糖添加量对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 的影响结果

不同葡萄糖浓度对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 的结果如图 5 所示, 由图 5 可知, 当葡萄糖添加量为 160 g/L 时, 降解效果最好, 培养 13 d 后 CIT 降解率为 78.02%。可能是由于葡萄糖添加量低于 160 g/L 时, 不能够满足菌体的正常生长繁殖, 导致 CIT 降解率偏低; 当碳源添加量大于 160 g/L 时, 可能导致渗透压过高, 不利于酵母菌菌株生长, 导致 CIT 降解率偏低。因此最适葡萄糖的添加量为 160 g/L。

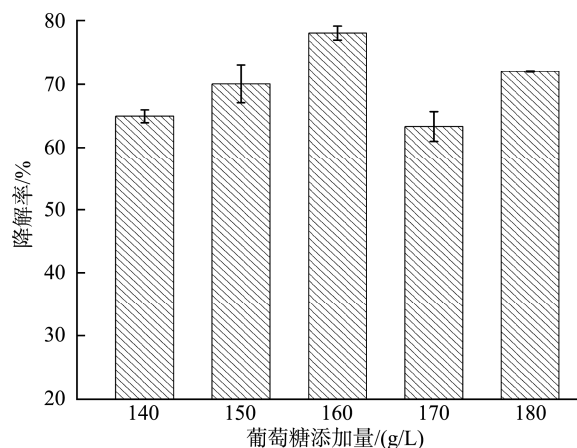


图5 不同葡萄糖添加量对CIT降解率的影响

Fig.5 Effects of different glucose additive concentrations on the degradation rate of CIT

2.2.3 无机盐对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 效果的影响结果

不同无机盐对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 的结果如图 6 所示, 由图 6 可知, 不同无机盐对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 从高到低为: $\text{FeSO}_4 > \text{ZnSO}_4 > \text{CuSO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MnSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{KCl}$, FeSO_4 为无机盐时, 降解效果最好, 培养 13 d 后 CIT 降解率为 63.63%, 这可能是由于筛选的酵母菌利用 FeSO_4 作为无机盐时, 产生相关降解 CIT 的酶或者代谢产物较多, 因此后续试验选择 FeSO_4 作为无机盐。

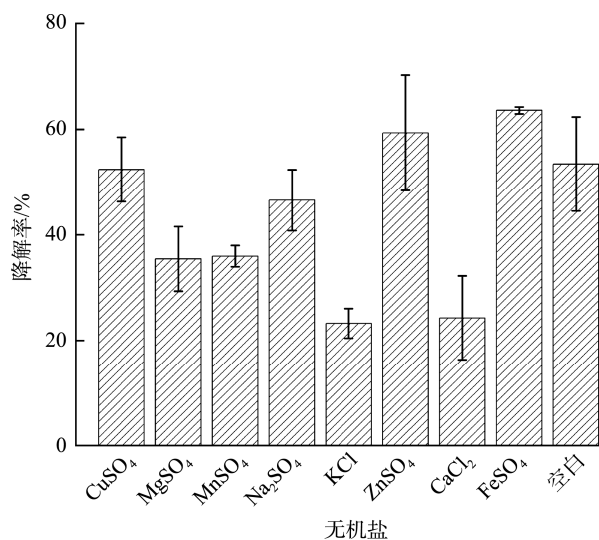


图6 不同无机盐对CIT降解率的影响

Fig.6 Effects of different inorganic salts on the degradation rate of CIT

2.2.4 FeSO_4 添加量对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 效果的影响结果

不同 FeSO_4 浓度对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 的结果如图 7 所示, 由图 7 可知, 随着 FeSO_4 添加量不断升高, 低于 0.5 g/L 时, CIT 降解率逐步升高, 当质量浓度大于 0.5 g/L, CIT 降解率逐步降低, 可能是由于随着 FeSO_4 添加量不断升高, 渗透压改变, 导致 CIT 降解率降低; 当 FeSO_4 添加量为 0.5 g/L 时, 降解效果最好, CIT 降解率为 71.87%, 因此确定最适 FeSO_4 的添加量为 0.5 g/L。

2.2.5 pH 对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 效果的影响结果

不同 pH 对库德毕赤酵母菌 PT 降解 CIT 的结果如图 8 所示, 由图 8 可知, 随着培养基 pH 的升高, 库德毕赤酵母菌 PT 对 CIT 的降解率整体上先升高后降低, 当 pH 为 3.0 时, CIT 的降解率最高达到 72.12%。这可能是由于 pH 为 3.0 时, 适合酵母菌 PT 的生长及产生对 CIT 降解的相关代谢产物, 研究结果与 SHI 等^[3]报道的较低发酵液 pH 可以降低 CIT 的积累结论一致, 因此确定 pH 3.0 为最适库德毕赤酵母 PT 降解 CIT pH。

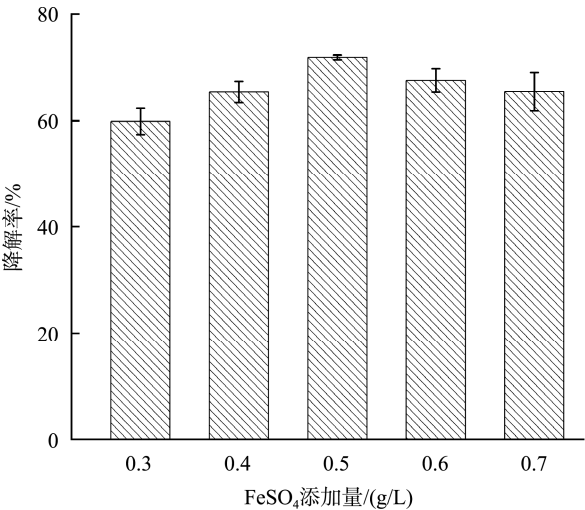


图7 不同FeSO₄添加量对CIT降解率的影响
Fig.7 Effects of different FeSO₄ additive concentrations on the degradation rate of CIT

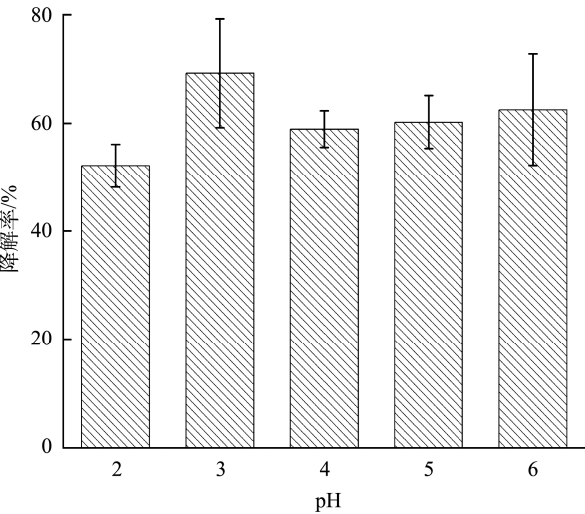


图8 不同pH对CIT降解率的影响
Fig.8 Effects of different pH values on the degradation rate of CIT

2.2.6 正交试验结果

正交试验结果见表 2。从表 2 可知，三因素的主次顺序为 $A > B > C$ ，三因素的最优水平为 $A_3B_2C_2$ 。因此最优培养基组分为葡萄糖添加量为 165 g/L，FeSO₄ 添加量为 0.50 g/L，pH 3.0。在此条件下库德毕赤酵母 PT 对 CIT 降解率为 76.78%。

以正交试验得出最佳发酵条件即葡萄糖添加量为 165 g/L，FeSO₄ 添加量为 0.50 g/L，pH 3.0，培养温度为 28℃，培养时间为 13 d，进一步验证库德毕赤酵母 PT 对 CIT 的降解率，在此发酵条件下，CIT 的降解率为 77.24%±0.36%，降解率最高。

表 2 培养基组分正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal experiment on culture medium components

试验号	因素与水平			CIT 降解率/%
	A: 葡萄糖添加量/(g/L)	B: FeSO ₄ 添加量/(g/L)	C: pH	
1	155	0.45	2.5	66.67
2	155	0.50	3.0	73.34
3	155	0.55	3.5	70.13
4	160	0.45	3.0	71.12
5	160	0.50	3.5	72.04
6	160	0.55	2.5	69.24
7	165	0.45	3.5	74.64
8	165	0.50	2.5	75.58
9	165	0.55	3.0	76.78
K1	70.05	70.81	70.90	
K2	70.80	73.65	73.35	
K3	75.67	72.05	72.27	
最优水平	A ₃	B ₂	C ₂	
R	5.62	2.84	2.45	

3 讨论与结论

红曲是我国食用历史悠久的红曲霉发酵产品^[19]，红曲霉(红曲菌)不仅可以用作食品着色剂红色素^[20-21]、黄色素^[22-23]、橙色素的^[24-25]生产菌株，也可用于生产含莫纳可林 K 的降血脂药物^[26-27]和保健食品^[28]，而且，红曲霉产生的糖化酶、酯化酶等酶系也被广泛用于酒^[29-30]、醋^[31-32]和奶酪^[33-34]等发酵食品的生产，由于有的红曲霉菌株会产生 CIT^[35-36]，而限制了其应用，本研究考察了不同培养条件对库德毕赤酵母菌 PT 与红曲菌 M7 共培养降解 CIT 的影响，结果显示，不同碳源、葡萄糖浓度、不同无机盐、FeSO₄ 浓度、不同 pH 会影响酵母菌 PT 降解 CIT 的效果。有研究报道不同的碳源，适宜的底物浓度有利于微生物产生相关的降解酶，酸性条件有利于酵母菌对 CIT 的降解^[37]，本研究表明，最适碳源葡萄糖浓度为 165 g/L，最适无机盐 FeSO₄ 质量浓度为 0.50 g/L，pH 3.0 时，库德毕赤酵母菌 PT 对 CIT 的降解率最高达到了 76.78%，林珍^[37]的研究结果表明，当改变培养基 pH 为 4 或 6 时，所筛选的酵母菌在培养 14 h 后 CIT 均被降解，本研究筛选的酵母菌对 CIT 的降解率低于其研究结果，可能是由于林珍^[37]的研究是将 CIT 加入培养基，研究酵母菌对 CIT 的降解，本研究是将所筛选的酵母菌与高产 CIT 的红曲霉共培养，研究酵母菌对 CIT 的降解，红曲菌在培养过中还会不断产出 CIT，致使最终 CIT 降解率低于其研究结果。在今后的研究中，可对本研究筛选的库德毕赤酵母菌 PT 进行基因工程改造，使其对 CIT 的降解能力进一步提高。本研究结果为微生物发酵法

控制 CIT 提供了一定的理论依据和参考,同时筛选的酵母菌也可应用于其他发酵食品中。

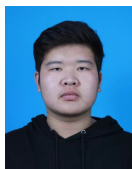
参考文献

- [1] KOVAC S, NEMEC P, BETINA V, *et al.* Chemical structure of citrinin [J]. *Nature*, 1961, 190: 1104–1105.
- [2] LI L, XU N, CHEN F. Inactivation of *MrPigH* in *Monascus ruber* M7 results in its *Monascus* pigments increase and citrinin decrease with *mrpyrG* selection marker [J]. *J Fungi*, 2021, 7(12): 1094–1094.
- [3] SHI J, QIN X, ZHAO Y, *et al.* Strategies to enhance the production efficiency of *Monascus* pigments and control citrinin contamination [J]. *Process Biochem*, 2022, 117: 19–29.
- [4] WANG LL, DAI Y, CHEN WP, *et al.* Effects of light intensity and color on the biomass, extracellular red pigment, and citrinin production of *Monascus ruber* [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(50): 9506–9514.
- [5] KITABATAKE N, TRIVEDI AB, DOI E, *et al.* Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions [J]. *J Agric Food Chem*, 1991, 39(12): 2240–2244.
- [6] 王丽玲. 红色红曲菌 M7 中光受体基因的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- WANG LL. Functional study of photoreceptor genes in red *Monascus* M7 [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [7] HUANG ZB, ZHANG LJ, WANG YL, *et al.* Effects of rutin and its derivatives on citrinin production by *Monascus aurantiacus* Li AS3. 4384 in liquid fermentation using different types of media [J]. *Food Chem*, 2019, 284: 205–212.
- [8] 邱凌骐, 邱浩强, 陈松深. 依达拉奉右莰醇联合曲克芦丁脑蛋白水解物对急性缺血性脑卒中患者凝血功能及神经功能的影响[J]. *中国当代医药*, 2023, (4): 105–108.
- QIU LQ, QIU HQ, CHEN SS. The effect of the combination of edaravone and camphor on coagulation function and neurological function in patients with acute ischemic stroke [J]. *China Mod Med*, 2023, (4): 105–108.
- [9] KAUSHIK G. Effect of processing on mycotoxin content in grains [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2015, 55(12): 1672–1683.
- [10] PATROVSKY M, SINOVSKA K, BRANSKA B, *et al.* Effect of initial pH, different nitrogen sources, and cultivation time on the production of yellow or orange *Monascus purpureus* pigments and the mycotoxin citrinin [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(11): 3494–3500.
- [11] 李琦, 高健信, 陈福生, 等. 不产桔霉素高产红曲色素的基因工程红曲菌株构建[J]. *中国酿造*, 2018, 37(6): 30–35.
- LI Q, GAO JX, CHEN FS, *et al.* Construction of genetically engineered red yeast strains that do not produce citrinin and high yield *Monascus* pigments [J]. *China Brew*, 2018, 37(6): 30–35.
- [12] HU Y, ZHENG Y, LIU B, *et al.* *Mhrst4* gene, coding for NAD⁺-dependent deacetylase is involved in citrinin production of *Monascus ruber* [J]. *J Appl Microbiol*, 2023, 134(3): 1xad042.
- [13] IWAHASHI H, KITAGAWA E, SUZUKI Y, *et al.* Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray [J]. *Bmc Genom*, 2007, 8: 95.
- [14] KANPIENGJAI A, MAHAWAN R, LUMYONG S, *et al.* A soil bacterium *Rhizobium borbori* and its potential for citrinin-degrading application [J]. *Ann Microbiol*, 2016, 66(2): 807–816.
- [15] LI WH, ZHANG HY, LI PX, *et al.* Biocontrol of postharvest green mold of oranges by *Hanseniaspora uvarum* Y3 in combination with phosphatidylcholine [J]. *Biol Control*, 2016, 103: 30–38.
- [16] CAO J, ZHANG HY, YANG QY, *et al.* Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 162(2): 167–173.
- [17] 程功, 王丽玲, 霍亚蒙, 等. 阿瓦提红葡萄酒酵母菌的分离鉴定及应用[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1–10. [2024-03-04]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037975>.
- CHENG G, WANG LL, HUO YM, *et al.* Isolation, identification, and application of yeast from Avati red grape [J/OL]. *Food Ferment Ind*: 1–10. [2024-03-04]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037975>
- [18] 童文华, 乔磊, 李佳伟, 等. 大曲中产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其特性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, (1): 171–181.
- TONG WH, QIAO L, LI JW, *et al.* Screening and characteristic analysis of *ferulate esterase* strains in Daqu [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, (1): 171–181.
- [19] 李牧, 李利, 冯艳丽, 等. 古老而充满魅力的红曲菌[J]. *科学通报*, 2023, 68(5): 479–494.
- LI M, LI L, FENG YL, *et al.* The ancient and charming *Monascus fungus* [J]. *China Sci Bull*, 2023, 68(5): 479–494.
- [20] WU HC, CHENG MJ, WU MD, *et al.* Secondary metabolites from the fermented rice of the fungus *Monascus purpureus* and their bioactivities [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(24): 3541–3550.
- [21] GBOYIBOR C, KONG WB, CHEN D, *et al.* *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2018, 16: 433–447.
- [22] 汪航, 徐雄, 曹玉清. 红曲黄色素在食品中的应用研究[J]. *中国食品*, 2023, (16): 135–137.
- WANG H, XU X, CAO YQ. Research on the application of *Monascus* yellow pigment in food [J]. *China Food*, 2023, (16): 135–137.
- [23] 龚子涵. 水溶性红曲黄色素的分离纯化、抗氧化活性及其在米粉中的应用[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.
- GONG ZH. Separation, purification, antioxidant activity, and application of water-soluble *Monascus* yellow pigment in rice flour [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2023.
- [24] 胡依萍, 蒋璇, 金枫, 等. 红曲霉液体深层发酵生产红曲色素条件的优化及其抗氧化活性[J]. *廊坊师范学院学报(自然科学版)*, 2023, 23(3): 37–42.
- HU YP, JIANG X, JIN F, *et al.* Optimization of conditions and antioxidant activities for the production of *Monascus* pigment by liquid deep fermentation of *Monascus purpureus* [J]. *J Langfang Nor Univ (Nat Sci Ed)*, 2023, 23(3): 37–42.
- [25] 玛合沙提·努尔江, 包天雨, 张添琪, 等. 红曲色素的生物活性及其作用机制研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(6): 347–356.
- NURJIANG MHST, BAO TY, ZHANG TQ, *et al.* Research progress on the biological activity and mechanism of action of *Monascus* pigments [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(6): 347–356.
- [26] 张亚如, 肖丽飏, 陈丽晨, 等. 丛毛红曲霉工程菌 TI-25 高产莫纳可林 K 发酵工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(20): 115–121.
- ZHANG YR, XIAO LJ, CHEN LC, *et al.* Optimization of the fermentation process for high-yield monacolin K by the engineering strain TI-25 of *Aspergillus roseus* [J]. *Food Res Dev*, 2023, 44(20): 115–121.
- [27] 温钦友, 叶燕芳, 郑政淮, 等. 外源诱导物对丛毛红曲霉固态发酵产莫

- 纳可林 K 的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(19): 191–200.
- WEN QY, YE YF, ZHENG ZH, *et al.* The effect of exogenous inducers on the solid-state fermentation of monacolin K by *Aspergillus roseus* [J]. Food Res Dev, 2022, 43(19): 191–200.
- [28] 王晶. 具有抗炎活性红曲色素的筛选及应用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- WANG J. Screening and application research of *Monascus* pigments with anti-inflammatory activity [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.
- [29] 郑平, 覃先武, 张彦, 等. 高产开环型 monacolin K 红曲霉菌株的筛选及其在红曲酒酿造中的应用[J]. 中国酿造, 2023, 42(3): 129–134.
- ZHENG P, QIN XW, ZHANG Y, *et al.* Screening of high-yield open-loop monacolin K *Monascus* strains and their application in red yeast wine brewing [J]. China Brew, 2023, 42(3): 129–134.
- [30] 李慧敏, 林凤, 王玉梅, 等. 红曲柿酒工艺优化及挥发性风味物质分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 126–133.
- LI HM, LIN F, WANG YM, *et al.* Optimization of *Monascus* persimmon wine process and analysis of volatile flavor substances [J]. Food Res Dev, 2021, 42(7): 126–133.
- [31] 高航, 续丹丹, 王文平, 等. 基于多元统计学分析红曲米醋醋酸发酵阶段挥发性风味特征组分[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 219–227.
- GAO H, XU DD, WANG WP, *et al.* Volatile flavor characteristic components of *Monascus* rice vinegar during acetic acid fermentation stage based on multivariate statistical analysis [J]. Food Sci, 2022, 43(12): 219–227.
- [32] 邹昆, 程强, 鲁兰, 等. 红曲醋的研究现状和发展趋势[J]. 中国调味品, 2022, 47(2): 211–215, 220.
- ZOU K, CHENG Q, LU L, *et al.* The research status and development trend of *Monascus* vinegar [J]. China Cond, 2022, 47(2): 211–215, 220.
- [33] 徐杏敏. 红曲霉菌株的筛选及其对红曲霉奶酪中代谢产物的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- XU XM. Screening of *Monascus* strains and their effects on metabolites in *Monascus* cheese [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [34] 王童, 逢晓阳, 芦晶, 等. 响应面法优化红曲奶酪加工工艺[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(5): 21–25, 36.
- WANG T, PANG XY, LU J, *et al.* Response surface methodology optimization of *Monascus* cheese processing technology [J]. China Dairy Ind, 2019, 47(5): 21–25, 36.
- [35] 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 GF, GUI YL, MAN HQ, *et al.* Network pharmacology analysis of the toxic mechanism of *Monascus* citrinin [J]. J Food Sci Biotechnol, 2023, 42(2): 90–96.
- [36] 彭碧宁, 余创波, 曾川, 等. 红曲红色素中桔青霉素检测方法的优化研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(8): 208–215.
- PENG BN, YU CB, ZENG C, *et al.* Optimization of the detection method for citrinin in *Monascus* pigments [J]. China Food Addit, 2022, 33(8): 208–215.
- [37] 林珍. 桔霉素降解菌的筛选及其降解机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- LIN Z. Screening and degradation mechanism of citrinin degrading bacteria [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2018.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



申家荣, 主要研究方向为食品科学与工程。
E-mail: 1452367942@qq.com



王丽玲, 博士, 教授, 主要研究方向为发酵食品微生物, 农产品深加工。
E-mail: 63502574@qq.com