

研究报告



乙酸钠、烟酸对红曲菌白色变种产 Monacolin K 的影响

赵宽^{1,2} 刘宇欣^{1,2} 陆信曜^{1,2} 诸葛斌^{1,2} 宗红^{*1,2}

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】红曲是由红曲菌寄生在大米发酵而成的一种食用米曲，含有胆固醇抑制剂 Monacolin K，但市售红曲中酸式 Monacolin K 含量低且普遍呈红色，其应用存在局限性。红曲菌白色变种 3001-18 具有不产色素和桔霉素而高产酸式 Monacolin K 的优点。【目的】研究微量营养物对红曲菌固态发酵 Monacolin K 产量及酸式结构占比的作用，并分析其对相关基因表达的影响。

【方法】将不同微量营养物添加到固态发酵培养基中以提高红曲菌生物量、Monacolin K 产量及酸式结构的含量，并对 Monacolin K 合成相关基因进行分析。【结果】添加质量分数为 0.1% 的乙酸钠后红曲 Monacolin K 总产量提高 10.63%，可达 17.90 mg/g；添加 0.015% 的烟酸后可以使红曲产品中 Monacolin K 酸式结构的比例由 76.08% 提升至 90.51%；乙酸钠能促进 Monacolin K 合成相关基因 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 的表达，提高 Monacolin K 产量；烟酸则通过上调 *mokF*、*mokH* 和 *mokI* 的表达，使酸式 Monacolin K 迅速合成并外排且产物 Monacolin K 中酸式结构占比提升。【结论】微量营养物能通过增加红曲菌 Monacolin K 合成相关基因的表达量来促进其合成，为高产酸式 Monacolin K 的研究提供了一定的理论依据。

关键词: 微量营养物，红曲菌，固态发酵，Monacolin K，相对转录水平

Effect of sodium acetate and niacin on monacolin K production by *Monascus sp. var. white*

ZHAO Kuan^{1,2} LIU Yuxin^{1,2} LU Xinyao^{1,2} ZHUGE Bin^{1,2} ZONG Hong^{*1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 Research Center of Industrial Microbiology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] Red yeast rice is an edible rice koji fermented by *Monascus* on rice, and possess the cholesterol inhibitor monacolin K. However, commercially available red yeast rice has low levels of acid form monacolin K and generally exhibits red color, which limit its application. *Monascus sp. var. white* 3001-18 has the advantages of not producing pigments and citrinin, but producing high levels of acid form monacolin K. [Objective] To study the effect of micronutrients on the production of monacolin K and the proportion of acid form, and also their effects on synthesis-related genes expression. [Methods]

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918106; E-mail: zonghong163@163.com

Received: 20-08-2020; Accepted: 19-10-2020; Published online: 17-11-2020

*通信作者: Tel: 0510-85918106; E-mail: zonghong163@163.com

收稿日期: 2020-08-20; 接受日期: 2020-10-19; 网络首发日期: 2020-11-17

Adding different micronutrients to the solid-state fermentation medium to increase the biomass of *Monascus*, monacolin K production and the content of acid form. We analyzed the expression of genes related to monacolin K synthesis. [Results] The production of monacolin K improved by 10.63%, reached up to 17.90 mg/g by adding 0.1% sodium acetate. Moreover, the proportion of acid form monacolin K increased from 76.08% to 90.51% by adding 0.015% niacin. RT-qPCR analysis showed that sodium acetate increased the production of monacolin K by promoting the expression of *mokA*, *mokB* and *mokC* genes related to the synthesis of monacolin K. Niacin up-regulated the transcription of *mokF*, *mokH* and *mokI* genes, resulting in faster transport and higher proportion of acid form monacolin K. [Conclusion] Micronutrients can promote the synthesis of monacolin K by increasing the expression of synthesis-related genes. The study provides a certain theoretical basis for the application research of high producing acid form monacolin K.

Keywords: micronutrients, *Monascus*, solid-state fermentation, monacolin k, relative transcription level

红曲是由丝状真菌红曲菌寄生在大米发酵而成的一种食用米曲,在我国已经有近千年的历史,主要应用于食品及中医中药^[1-3]。红曲含有多种对人体有益的次级代谢产物,包括 Monacolin K、红曲色素、 γ -氨基丁酸、麦角固醇、黄酮类化合物及不饱和脂肪酸等^[4-5]。其中 Monacolin K 最早由 Endo 在红曲菌发酵液中发现,其与土曲霉合成的洛伐他汀(Lovastatin)结构相似^[6],作为降胆固醇药物被广泛应用。红曲还具有抗炎、降血糖、降血脂和降胆固醇等功效,如今成为众人关注的焦点^[7-8],但由于红曲产红曲色素普遍呈红色,添加时会限制食品和保健品的颜色。

Monacolin K 有酸式和内酯式 2 种存在形态,2 种形式之间可以相互转化。由红曲菌生物合成的酸式 Monacolin K 为主要药理活性形态,能竞争抑制人体内 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶的活性,从而抑制胆固醇的合成;内酯式 Monacolin K 由酸式结构脱水形成,其作为药物前体本身没有活性^[9]。功能性红曲产品的获得需要经过湿热灭菌和烘干等处理,不可避免地造成酸式 Monacolin K 失去其结合水而变成内酯式^[10],因此,目前红曲产品中 Monacolin K 以内酯式为主,含量一般在 55%以上,在人体内需要通过羟基酯酶水解成相应的酸式结构才能发挥作用,这

一转化过程会增加肾脏及肝脏的负担,有一定的毒副作用^[11]。目前对 Monacolin K 的研究主要是提高其总产量。夏诗棋等对红曲菌进行复合诱变和发酵条件优化,使其固态发酵 Monacolin K 的产量达到 9.06 mg/g^[12]。Suraiya 等以褐海藻作为基质进行红曲菌固态发酵时,Monacolin K 产量可达 13.98 mg/g^[13]。Zhang 等发现红曲菌液态发酵时,添加 10 mmol/L 谷氨酸可以使 Monacolin K 产量由 48.4 mg/L 增加至 215.4 mg/L^[14]。Lin 等过表达调控 Monacolin K 合成途径中脱氢酶的 *mokE* 基因,Monacolin K 的产量相比野生型提高了 188.5%^[15]。然而目前关于酸式 Monacolin K 的研究仍较少,武慧佳对红曲菌固态发酵条件及金属离子种类进行优化,其酸式 Monacolin K 含量最高,可达 9.05 mg/g^[16]。黄颖颖等发现红曲液态发酵时添加前体物质、生长因子和金属离子后酸式 Monacolin K 的比例最高可分别达到 47%、67%和 60%,但未针对常用的固态发酵方式进行研究^[17]。

本研究室前期筛选获得了一株不产红曲色素和桔霉素的红曲菌白色变种 *Monascus* sp. var. white^[18],在食品、保健品领域具有很大的应用潜力。本文研究不同种类微量营养物对红曲菌白色变种发酵过程中生物量、Monacolin K 总产量及酸式结构占比的影响,并通过荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative PCR, RT-qPCR)技术对其

合成相关基因的表达进行分析, 以期为高产酸式 Monacolin K 红曲的应用研究提供一定的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

红曲霉白色变种 3001-18 (*Monascus* sp. var. white 3001-18)由本研究室筛选, 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏号 CGMCC0517。

1.1.2 培养基

斜面种子培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, 蛋白胨 20.0, NaNO_3 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 琼脂 20.0。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, 蛋白胨 20.0, NaNO_3 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0。

营养液(g/L): 葡萄糖 200.0, 酵母膏 30.0, NaNO_3 10.0。

培养基使用前均于 1×10^5 Pa 条件下灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

精品糯米(碳水化合物含量为 79.6%, 蛋白质含量为 6.1%), 沈阳天地粮人粮油连锁有限责任公司; 低温食用豆粕(蛋白质含量约为 55.0%, 氮溶解指数为 81.4%), 江苏全盈生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂盒, 北京天漠科技开发有限公司; 一步法 SYBR Green RT-qPCR 试剂盒, 武汉爱博泰克生物科技有限公司。

分光光度计, Unico 公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; 谷物粉碎机, 永康市速锋工贸有限公司; 液相色谱仪, Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 白色红曲菌的发酵培养

称取糯米 1 000 g 洗净, 加水没过米粒表面 3–5 cm, 室温浸泡 15 h; 再用清水淋洗干净, 沥干后常压加盖蒸煮约 40 min; 冷却后加入 100 mL 营养液和 150 mL 去离子水, 再加入 200 g 豆粕粉, 搅拌均匀装入 500 mL 三角瓶中, 每瓶装约

50 g, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后取出冷却至室温, 得到初始培养基。每瓶接入培养好的液体种子 5 mL, 混匀, 32 °C 静置培养 4 d, 每天手动摇瓶 2–3 次, 每次 3 min, 然后调节温度至 28 °C 继续培养 15 d。

1.2.2 不同微量营养物对 Monacolin K 产量及生物量的影响

通过前期实验确定了不同微量营养物的最适添加量, 分别向初始培养基中添加质量分数为 0.1% 的乙酸钠、0.1% 的柠檬酸三钠、0.05% 的柠檬酸铁铵、0.015% 烟酸、0.015% 的叶酸、0.01% 的 Vitamin C 和 0.1% 的 Zn^{2+} , 按照 1.2.1 的方法进行培养, 检测发酵培养基中红曲菌生物量, 以及发酵结束时 Monacolin K 总产量及酸式结构的含量。

1.2.3 不同浓度乙酸钠和烟酸对 Monacolin K 产量及生物量的影响

将不同质量分数的乙酸钠(0.05%、0.10% 和 0.15%)与烟酸(0.010%、0.015% 和 0.020%)二者混合添加到发酵培养基中, 按照 1.2.1 的方法进行红曲菌固态发酵, 并检测 Monacolin K 总产量及酸式结构的含量。

1.2.4 Monacolin K 合成相关基因相对转录水平检测

在固态培养基上取适量的红曲菌菌丝体, 用试剂盒提取 RNA 并检测浓度。以 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 用于进行 RT-qPCR 实验。采用 18S rRNA 基因作为内参基因, 以第 3 天对照组红曲菌 *mokA-mokI* 基因的转录水平作为对照, 进行 Monacolin K 合成相关基因相对转录水平测定。通过软件设计基因引物, 如表 1 所示。RT-qPCR 反应体系: $2 \times$ Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 10 μL , cDNA 0.5 μL , 上、下游引物 (1.0 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , 加 ddH_2O 至总体积 20 μL 。每个样品做 3 个平行实验。RT-qPCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共循环 40 次。每个反应设计 3 个平行。通过 StepOne Software 软件,

表 1 引物信息

Table 1 List of primers used in RT-qPCR

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>mokA</i> -F	GAGCCTTGACAGCCGTTTGG
<i>mokA</i> -R	ACTCCGTCCTCGCCCTTCATC
<i>mokB</i> -F	ACGCCATCGCCGCTCCTC
<i>mokB</i> -R	GGACCGCACCCCTACTTGAAAGC
<i>mokC</i> -F	CAAATGCCTCGCCCAAGGGATC
<i>mokC</i> -R	AGGTCAGAGGTGCCGTAGATGC
<i>mokD</i> -F	GCAACGGCACCCCTCCCTTC
<i>mokD</i> -R	CAGCAGACCCAGACGGAGAAC
<i>mokE</i> -F	AGGAATCACCCGCAGAGGATGG
<i>mokE</i> -R	GCATTCGGCGAGGAGTTGTGG
<i>mokF</i> -F	GCCTGGACCTGGAGCAGTACC
<i>mokF</i> -R	CCTGTGTGCGGTGCGTCTGG
<i>mokG</i> -F	CCGATCACGCCAACCTCCAAC
<i>mokG</i> -R	CAACAAACTCCACCGCCTCCAG
<i>mokH</i> -F	GGACCAGCAGCATCAGCAGAC
<i>mokH</i> -R	ACGACGGCGGACGAGGATC
<i>mokI</i> -F	GGAGATTTGCGGGGACGACATC
<i>mokI</i> -R	CGGCGGCTCCCTCTTCCTC
18S rRNA-F	GTAGTCATATGCTTGTCTC
18S rRNA-R	TCCGCAGGTTCACTACGGA

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量分析法, 对酸式 Monacolin K 合成相关基因转录水平进行分析, 式中 $\Delta C_t = C_t - C_{t18S rRNA gene}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 实验组}} - \Delta C_{t \text{ 对照组}}$ 。

1.2.5 Monacolin K 的检测

采用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)法同时检测内酯式 Monacolin K 及酸式 Monacolin K 含量, Monacolin K 总产量为内酯式 Monacolin K 及酸式 Monacolin K 含量之和。称取 Monacolin K 标准品即内酯式 Monacolin K, 甲醇溶解配制 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL 的标准溶液; 准确称取 Monacolin K 标准品 5.0 mg 置入容量瓶中, 加入 90 mL 预热好的甲醇, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调至 pH 7.7, 最后用甲醇定容至 100 mL, 振荡混匀, 于 50 °C、40 kHz 连续超声转化 1 h, 制备得酸型 Monacolin K 标准溶液。色谱条件为: 色谱柱 Supersil ODS2 (4.6 mm×250 mm); 粒径 5 μm; 流

动相为甲醇:0.1% H_3PO_4 =77.5:22.5 (体积分数); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 237 nm; 检测灵敏度 0.01 AUFS; 进样量 20 μL。

为避免烘干对红曲中 Monacolin K 的结构造成影响, 称取 1.0 g 未干燥的红曲米样品, 粉碎至约 85%后置于 150 mL 三角瓶中, 加入 20 mL 甲醇, 30 °C、250 r/min 萃取 3 h。取上清液经 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤进样, 利用 HPLC 测定产品中内酯式 Monacolin K 及酸式 Monacolin K 的含量, 所得数据换算成每克干红曲中 Monacolin K 的含量。

1.2.6 生物量的测定

参考范海滨等^[19]的方法并加以改进, 通过测定氨基葡萄糖吸光度计算固态发酵红曲菌的生物量。

收集斜面保藏的红曲菌菌体, 烘干后分别称取 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 g, 加入 2.0 mL 60% H_2SO_4 溶液, 25 °C 静置 24 h, 然后稀释至 1.0 mol/L, 100 °C 加热 1 h, 冷却后用 1.0 mol/L NaOH 溶液中和至 pH 7.0, 定容至 100 mL。取 2.0 mL 样品加 1.0 mL 乙酰丙酮试剂(3.5 mL 乙酰丙酮+50 mL 1.2 mol/L Na_2CO_3), 以蒸馏水为空白, 90 °C 加热 30 min, 冷却后加入 Ehrlich 试剂振荡混匀, 再加入 4.0 mL 乙醇, 60 °C 水浴处理 1 h, 于 530 nm 处测定吸光度。

准确称取烘干后的样品 1.0 g, 按照以上方式处理后, 在 530 nm 处测定吸光度, 经换算得到每克干红曲中干菌体的质量, 即生物量, 公式如下:

$$\text{生物量(g/g)} = \frac{a - 0.5143}{0.351 \times 1.0}$$

式中 a : 530 nm 处测得 OD_{530} 值。

2 结果与分析

2.1 不同微量营养物对红曲菌生物量及 Monacolin K 产量的影响

研究表明某些营养物(前体物质、生长因子和金属离子)会对红曲菌生长以及次级代谢产物合成存在影响, 能调控红曲菌次级代谢产物生物合成

的方向^[20]。通过预实验确定了微量营养物的最适添加量,分别向初始培养基中添加质量分数为0.1%的乙酸钠、0.1%的柠檬酸三钠、0.05%的柠檬酸铁铵、0.015%的烟酸、0.015%的叶酸、0.01%的Vitamin C和0.1%的 Zn^{2+} 进行固态发酵,考察对红曲菌生物量的影响,结果如图1A所示。以未添加的培养基为对照,发酵结束时红曲菌生物量为81 mg/g。不同的微量营养物中,乙酸钠使生物量提高了6.90%;烟酸和叶酸在发酵前期对生物量有一定促进作用,但发酵后期无明显差异;柠檬酸三钠和 Zn^{2+} 对生物量无明显影响;然而Vitamin C和柠檬酸铁铵会导致生物量增长缓慢,发酵结束时分别降低58.02%和74.08%,明显低于其他微量营养物。

微量营养物对未烘干红曲中Monacolin K产量的影响如图1B所示,对照组Monacolin K总产量为16.18 mg/g,酸式结构含量为12.31 mg/g。添加乙酸钠使红曲Monacolin K总产量达到17.90 mg/g,相比对照组提升10.63%;添加烟酸发酵红曲的酸式Monacolin K含量占总产量的比例由76.06%提升至90.51%,并且总产量也略有提高;叶酸也可以提高酸式结构的占比,但对总产

量的影响不大; Zn^{2+} 对Monacolin K总产量和酸式结构的占比都具有一定促进作用但不明显;然而柠檬酸三钠、柠檬酸铁铵和Vitamin C不利于红曲菌生长与产物合成,使Monacolin K总产量分别降低了35.73%、54.88%和56.60%。由上述结果可知,乙酸钠能提升红曲Monacolin K总产量,烟酸可以提高酸式结构的占比。

2.2 不同浓度乙酸钠、烟酸对红曲菌产Monacolin K的影响

考察不同添加量的乙酸钠和烟酸对固态发酵红曲Monacolin K总产量和酸式结构占比的影响。由图2A可知,当乙酸钠添加量为0.10%时,Monacolin K总产量最高为17.90 mg/g,而酸式结构占比无明显变化;随着添加量继续增加,Monacolin K总产量和酸式结构含量降低较明显。在图2B中,随着烟酸添加量增加,酸式Monacolin K的占比升高,当添加量为0.015%时,Monacolin K总产量和酸式结构占比达到最高;然而继续增加烟酸添加量,总产量和酸式结构占比基本不变。因此,可以确定红曲固态发酵培养基中乙酸钠和烟酸的最适添加量分别为0.100%和0.015%。

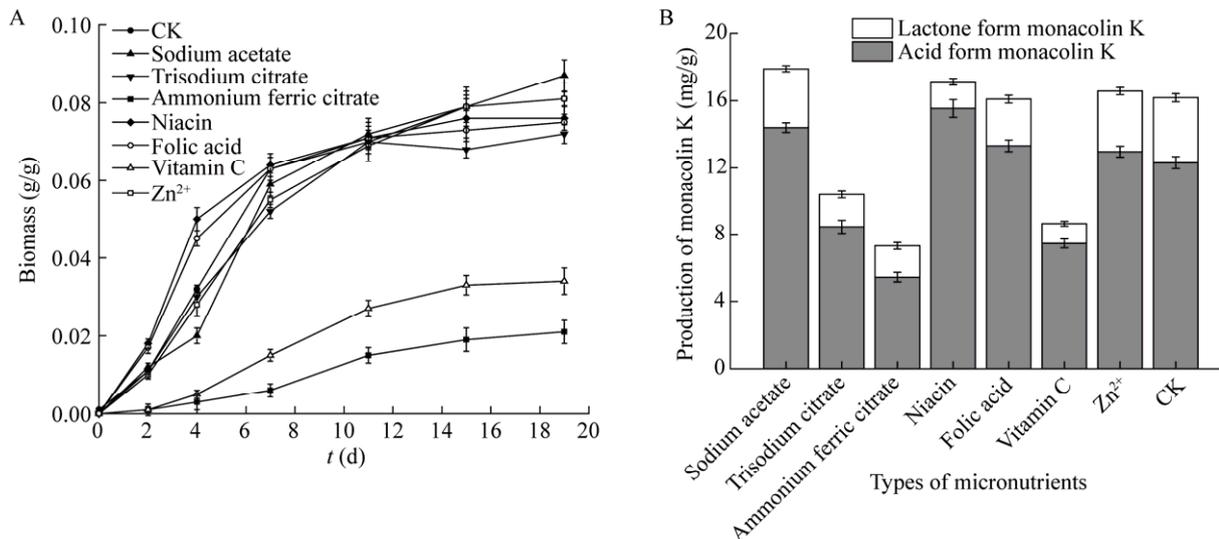


图1 不同微量营养物对生物量(A)及Monacolin K产量(B)的影响

Figure 1 Effects of different micronutrients on the biomass (A) and monacolin K production (B) of *Monascus*

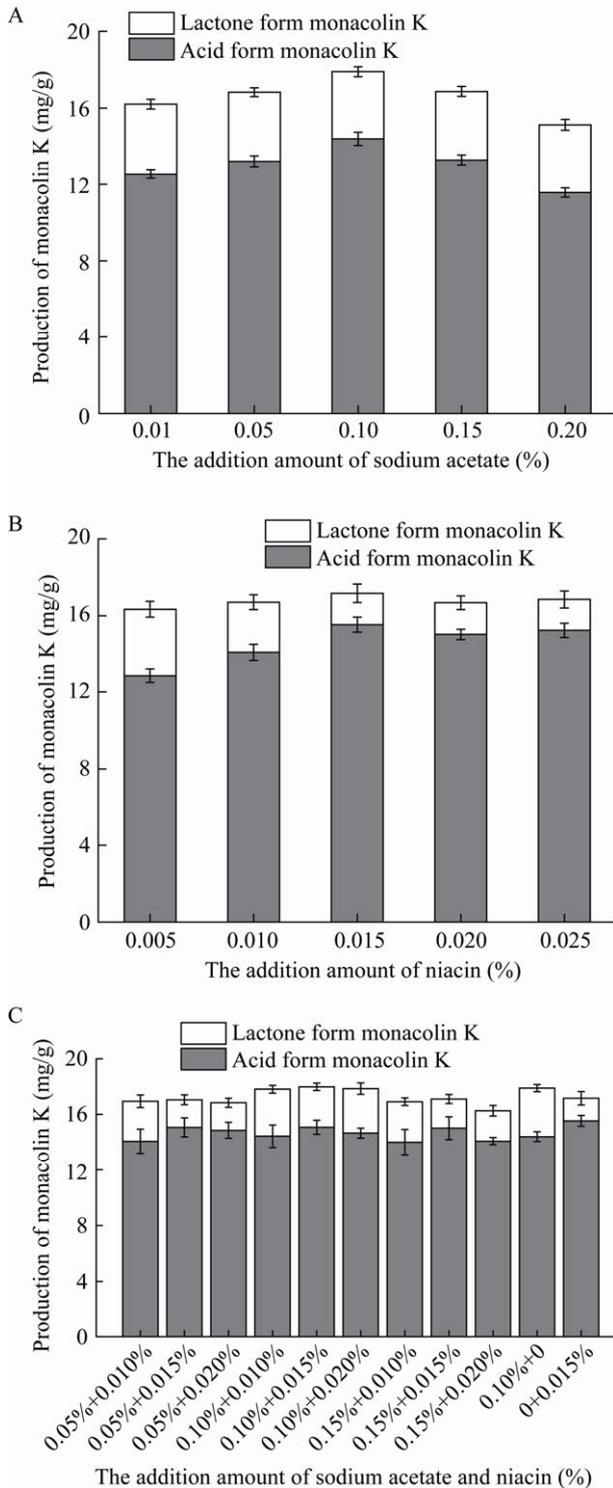


图 2 不同添加量的乙酸钠(A)、烟酸(B)及混合添加(C)对 Monacolin K 产量的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of sodium acetate (A), niacin (B) and mixed (C) on the monacolin K production

考察了乙酸钠和烟酸二者混合对红曲菌固态发酵的影响, 结果如图 2C 所示。可以看出, 乙酸钠和烟酸混合添加后对 Monacolin K 合成不存在叠加效应, 即使采用乙酸钠和烟酸的最适添加量配比, Monacolin K 总产量也无明显差异, 并且无论乙酸钠和烟酸二者采用何种添加量配比, 酸式结构的含量均低于烟酸单独作用的结果。

2.3 乙酸钠对 Monacolin K 合成相关基因转录水平的影响

进一步研究乙酸钠对不同发酵时间的未烘干红曲中 Monacolin K 总产量及酸式结构含量的影响, 结果如图 3 所示。整个发酵过程中, 添加乙酸钠发酵红曲的 Monacolin K 总产量均明显高于未添加的对照组, 而酸式结构的占比略有上升但不明显。第 19 天发酵结束, 此时红曲 Monacolin K 总产量不再增加, 对照组的 Monacolin K 总产量为 16.18 mg/g, 添加乙酸钠使 Monacolin K 总产量提高了 10.63%, 达到 17.90 mg/g。因此, 添加适量的乙酸钠可以有效提升固态发酵红曲中 Monacolin K 的总产量。

在 Monacolin K 生物合成过程中, 存在 9 个基因与 Monacolin K 合成有关: *mokA*、*mokB*、*mokC*、*mokD*、*mokE*、*mokF*、*mokG*、*mokH* 和

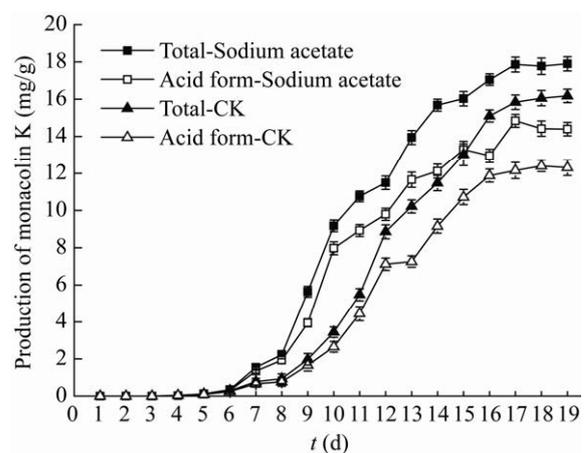


图 3 添加乙酸钠培养基不同发酵时间红曲 Monacolin K 产量的变化

Figure 3 Production of monacolin K at different fermentation time by adding sodium acetate

mokI 基因, 它们分别调控代谢途径中的洛伐他汀九酮合成酶(Lovastatin Nonaketide Synthase, LNKS)、洛伐他汀二酮合成酶(Lovastatin Diketide Synthase, LDKS)、P450 单加氧酶、氧化还原酶、脱氢酶、转酯酶、HMG-CoA 还原酶、转录因子和外排泵蛋白^[21]。通过 RT-qPCR 分析红曲菌 Monacolin K 生物合成相关基因的转录水平, 结果如图 4 所示, 在发酵过程中相关基因的转录水平均有不同程度的上调, 其中 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 转录水平上调程度比较明显, 分别在发酵第 11、11

和 15 天时达到最高, 分别为对照组的 4.24、4.17 和 3.47 倍, *mokF* 和 *mokI* 基因略有上调, 而其他基因转录水平变化不大。结合图 3 中实验结果, 可以推测乙酸钠使红曲 Monacolin K 总产量增加主要与 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 基因相对转录水平的上调有关。

2.4 烟酸对 Monacolin K 合成相关基因转录水平的影响

烟酸对不同发酵时间红曲 Monacolin K 总产量及酸式结构含量的影响结果如图 5 所示。添加

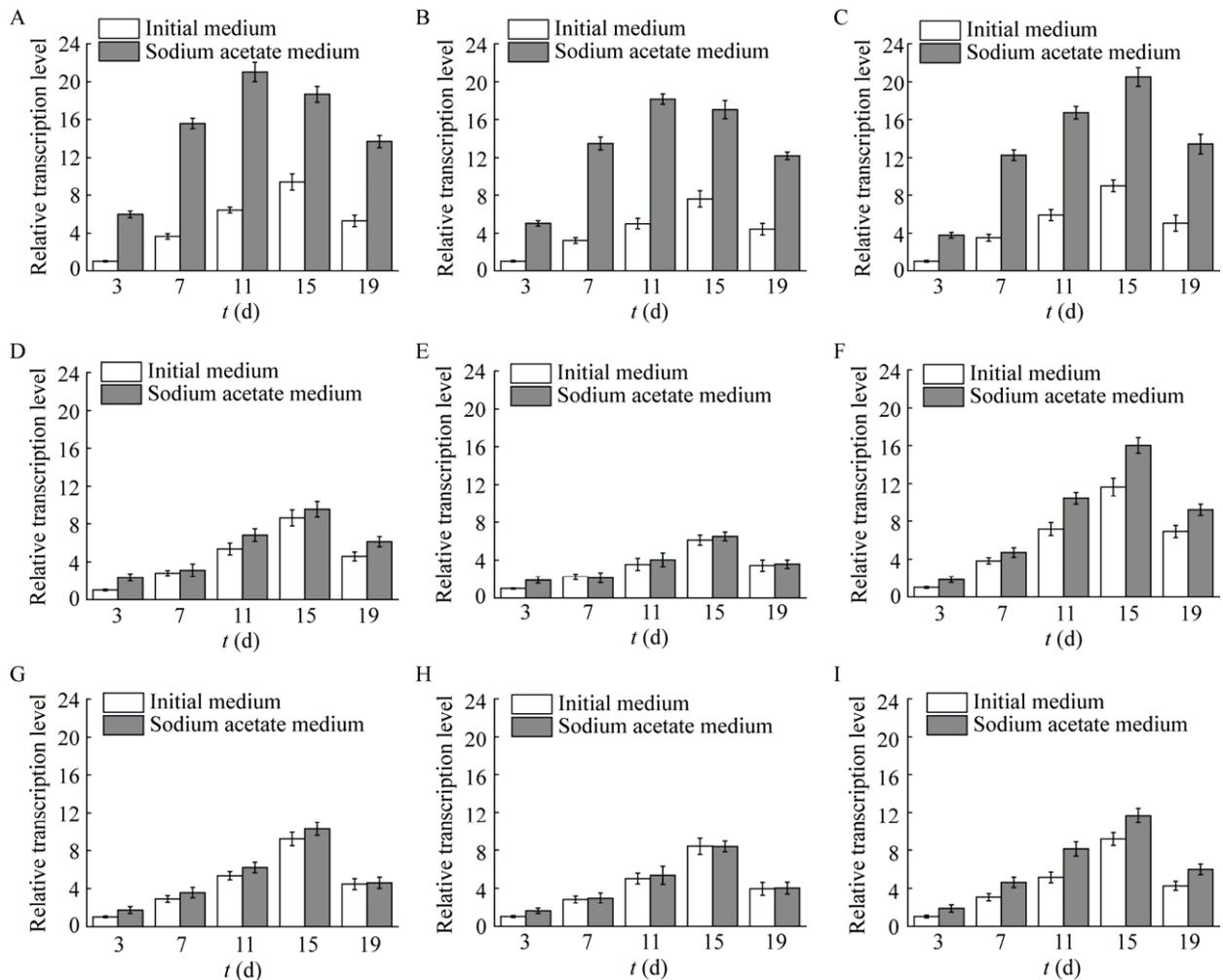


图 4 乙酸钠对 Monacolin K 合成基因的相对转录水平的影响

Figure 4 Relative transcription levels of monacolin K biosynthesis-related genes (*mokA*–*mokI*) during the fermentation with sodium acetate

Note: A: *mokA*; B: *mokB*; C: *mokC*; D: *mokD*; E: *mokE*; F: *mokF*; G: *mokG*; H: *mokH*; I: *mokI*

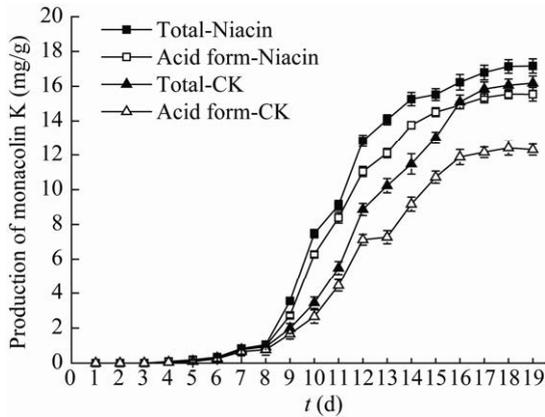


图 5 添加烟酸培养基不同发酵时间红曲 Monacolin K 产量的变化

Figure 5 Production of monacolin K at different fermentation time by adding niacin

烟酸发酵红曲的酸式 Monacolin K 含量明显高于对照组, 而且 Monacolin K 总产量也略有提升。在发酵结束时对照组 Monacolin K 总产量为 16.18 mg/g, 其中酸式结构含量为 12.31 mg/g, 占总产量的 76.08%。然而添加烟酸发酵红曲的酸式 Monacolin K 含量提高了 26.24%, 达到 15.54 mg/g, 占总产量比例提升至 90.51%。因此, 添加适量烟酸能够明显提升红曲 Monacolin K 中酸式结构的占比。

烟酸对红曲菌 Monacolin K 生物合成相关基因相对转录水平的影响结果如图 6 所示。添加烟酸进行固态发酵时, 发酵前期 Monacolin K 生物合成相关基因中 *mokA* 和 *mokB* 的转录水平略低于

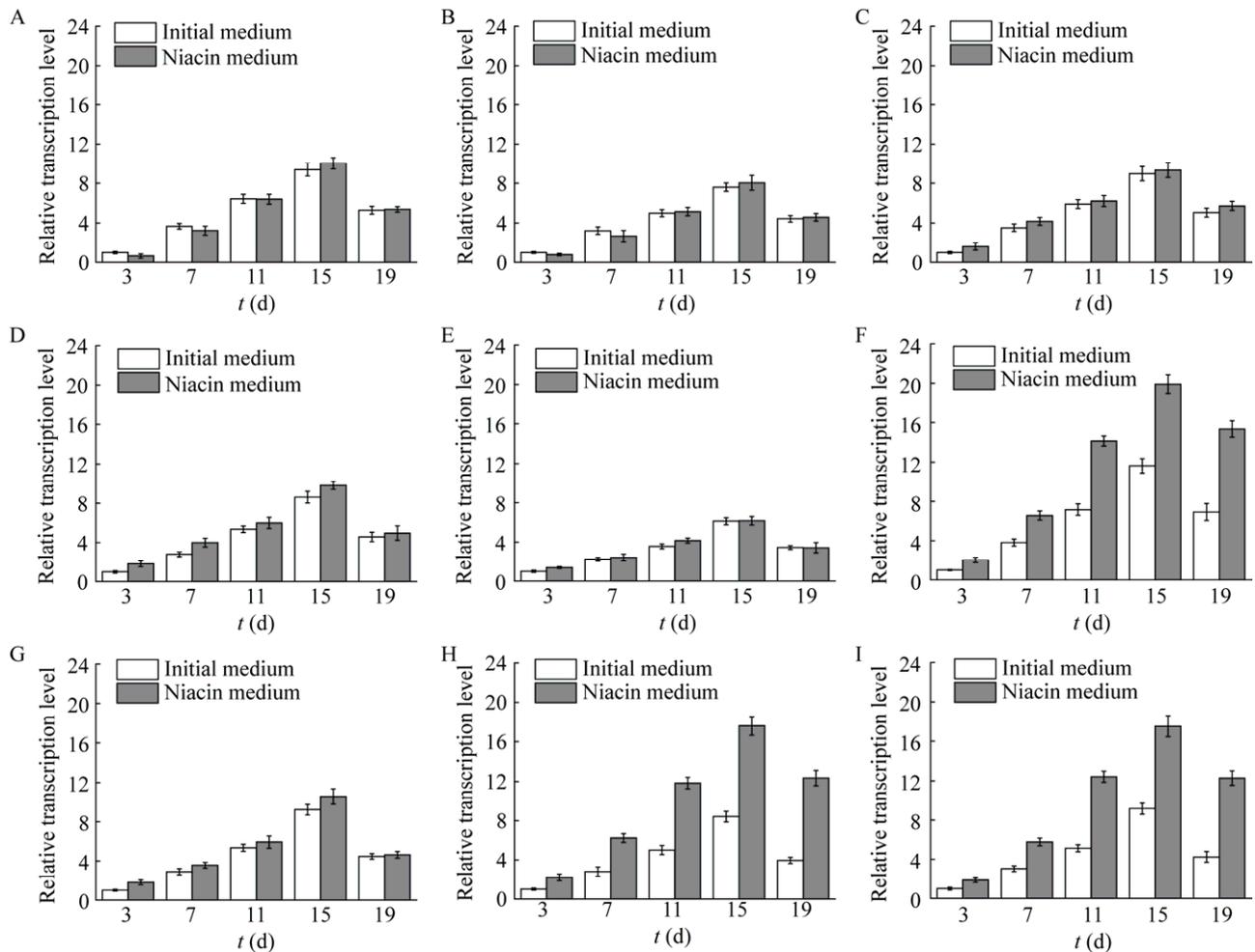


图 6 不同烟酸对 Monacolin K 合成基因的相对转录水平的影响

Figure 6 Relative transcription levels of monacolin K biosynthesis-related genes during the fermentation with niacin

Note: A: *mokA*; B: *mokB*; C: *mokC*; D: *mokD*; E: *mokE*; F: *mokF*; G: *mokG*; H: *mokH*; I: *mokI*

对照组, 甚至在第 3 天略有下调。但是随着发酵的进行, 与对照组红曲菌 *mokA* 和 *mokB* 基因转录水平的上调程度基本相同。*mokF*、*mokH* 和 *mokI* 基因的转录水平显著上调, 在发酵第 15 天上调水平平均达到最高, 分别为对照组的 1.97、2.09 和 1.91 倍, 而其他 Monacolin K 生物合成相关基因 *mokC*、*mokD*、*mokE* 和 *mokG* 的相对转录水平与对照组无明显差别。因此, 烟酸能使红曲 Monacolin K 中酸式结构的占比提升可能主要与 *mokF*、*mokH* 和 *mokI* 基因有关。

3 讨论

研究表明, 前体物质、生长因子和金属离子能调控红曲菌次级代谢产物生物合成的方向。添加不同微量营养物进行红曲菌固态发酵, 其中乙酸钠使红曲菌生物量提高 6.90%, Monacolin K 总产量提升至 17.90 mg/g。原因是乙酸钠作为乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成酶的诱导物^[22], 能够增加中间代谢产物合成, 使 Monacolin K 大量累积。添加烟酸发酵红曲 Monacolin K 酸式结构的占比提升至 90.51%, Bizukojc 等发现 B 族维生素能够促进土曲霉 Lovastatin 的合成^[23], 烟酸属于 B 族维生素且红曲菌 Monacolin K 的生物合成途径与土曲霉 Lovastatin 类似, 因此, 烟酸也能够对红曲菌 Monacolin K 的合成起到促进作用。同样属于 B 族维生素的叶酸也能提升酸式 Monacolin K 的占比, 但是对总产量影响较小。有研究表明, Zn^{2+} 可以参与 Monacolin K 合成调控蛋白的形成^[24], 但在本研究中 Zn^{2+} 对 Monacolin K 合成的影响并不显著。柠檬酸三钠、柠檬酸铁铵和 Vitamin C 会严重抑制 Monacolin K 的合成, 因为前二者在发酵后期产生大量 OH^- , 致使培养基 pH 升高, 不利于 Monacolin K 合成^[25]; Vitamin C 则会降低培养基的 pH, 致使 Monacolin K 产量降低。黄颖颖等研究发现, 添加乙酸钠和烟酸的红曲菌发酵液中 Monacolin K 总产量为 16.31 mg/L 和 9.23 mg/L, 酸式结构分别占总产量的 47% 和 67%^[17]。本研究

中, 添加乙酸钠和烟酸发酵红曲 Monacolin K 总产量分别为 17.90 mg/g 和 17.17 mg/g, 酸式结构分别占比为 80.43% 和 90.51%, 均高于文献报道。因此, 乙酸钠能够提高 Monacolin K 总产量, 烟酸可以使 Monacolin K 酸式结构的占比增加。

乙酸钠和烟酸对红曲菌发酵产 Monacolin K 有一定促进作用。本研究中, 当乙酸钠添加量较低时, Monacolin K 产量随着添加量的增加不断升高; 当添加量达到 0.10% 后, 总产量和酸式结构含量则开始降低。添加量较低时, 乙酸钠可以诱导 Monacolin K 的合成, 而乙酸钠过多会使培养基 pH 升高, 而且对菌体有一定毒害作用, 从而抑制 Monacolin K 的合成^[17]。随着烟酸添加量的增加, Monacolin K 总产量和酸式结构含量不断提升, 当添加量达到 0.015% 时, 烟酸作为生长因子能促进菌体生长和 Monacolin K 合成, 此时总产量和酸式结构占比达到最高, 而继续增加添加量对 Monacolin K 产量的影响不明显。本研究发现将不同添加量的乙酸钠和烟酸混合加入到固态发酵培养基中, Monacolin K 总产量均无明显提升, 即使采用乙酸钠和烟酸的最适添加量配比也无明显差异, 并且无论二者采用何种添加量配比, 酸式结构的含量均低于烟酸单独作用的结果。由于乙酸钠呈弱碱性^[26], 在碱性条件下产物中酸式 Monacolin K 会逐渐转化为内酯式, 致使酸式结构占比低于烟酸单独作用的结果。两种添加物之间对于 Monacolin K 的合成不存在叠加效应, 后续将进一步对其进行详细研究。

本研究中添加乙酸钠固态发酵红曲的 Monacolin K 总产量明显提高, 是因为乙酸钠作为乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 的前体, 可为 Monacolin K 生物合成提供起始物质, 加速中间代谢产物的合成, 促进 Monacolin K 生物合成相关酶的表达, 而合成酶系中 LNKS、LDKS 和单加氧酶分别由 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 基因调控, 因此它们的表达量会显著增加。有研究表明, Monacolin

K的合成与 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 基因的表达量有关, 缺失 *mokA* 和 *mokB* 基因的红曲菌会丧失生产 Monacolin K 的能力^[27]。Zhang 等发现谷氨酸可以促进 *mokC* 基因的表达, 从而提高 Monacolin K 的产量^[28]。因此, 乙酸钠主要是通过促进红曲菌 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 基因的表达, 使合成途径的中间产物增多, 最终提高红曲中 Monacolin K 的总产量。

本研究中添加烟酸固态发酵红曲的实验结果发现, 在发酵前期, *mokA* 和 *mokB* 的转录水平较低, 甚至在第 3 天下调, 这是由于营养物质主要用于菌体生长而抑制了次级代谢产物合成。随着发酵的进行, 对照组红曲中酸式 Monacolin K 的占比无明显变化, 推测可能是 Monacolin K 被排放到胞外之前, 部分酸式结构在胞内会转化为内酯式, 导致 Monacolin K 中酸式结构的占比降低, 而添加烟酸后, 相同发酵时间酸式结构的占比明显提高, 因此, 烟酸对 Monacolin K 中酸式结构占比的影响可能与细胞的外排效率有关。烟酸是辅酶 I (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD⁺)的前体, 而 Monacolin K 合成需要大量的 NAD⁺^[23], 因此能够上调红曲菌 *mokF*、*mokH* 和 *mokI* 基因的转录水平, 提高 Monacolin K 生物合成速率, 增加转录因子的合成, 促进其他生物合成相关基因的表达, 并促进外排泵蛋白的合成, 将胞内的 Monacolin K 迅速外排, 从而提升胞外 Monacolin K 中酸式结构的占比。有研究表明, 过表达红曲菌 *mokI* 基因时菌体表面有明显褶皱, 有利于代谢产物的外排^[29]。*mokH* 基因可以通过上调其他 Monacolin K 生物合成基因的转录而增加 Monacolin K 的合成^[30]。Zhang 等发现负责编码转酯酶的 *mokF* 基因也能调节红曲菌 Monacolin K 的生物合成, 其转录水平的上调可以促进 Monacolin K 的合成^[31]。因此, 烟酸主要是通过上调 *mokF*、*mokH* 和 *mokI* 基因表达的共同作用, 使酸式

Monacolin K 快速合成并迅速外排, 最终明显提高 Monacolin K 中酸式结构的占比。

4 结论

本研究以高产酸式 Monacolin K 的红曲菌白色变种 3001-18 为实验对象, 通过添加不同的微量营养物来提升红曲菌 Monacolin K 产量及酸式结构含量, 并对其生物合成相关基因的表达情况进行分析。结果表明, 添加质量分数为 0.1% 的乙酸钠能使 Monacolin K 的总产量提升至 17.9 mg/g, 0.015% 的烟酸可以使 Monacolin K 中酸式结构的占比由 76.08% 提升至 90.51%; 乙酸钠通过促进 *mokA*、*mokB* 和 *mokC* 基因表达, 提高 Monacolin K 的总产量, 而烟酸上调 *mokF*、*mokH* 和 *mokI* 基因的表达, 使酸式 Monacolin K 迅速合成并外排, 最终明显提高酸式结构的占比。以上结果为高产酸式 Monacolin K 的合成及应用研究提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] Fabre CE, Santerre AL, Loret MO, Baberian R, Pareilleux A, Goma G, Blanc PJ. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*[J]. Journal of Food Science, 1993, 58(5): 1099-1102
- [2] Chen FS, Hu XQ. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(3): 331-337
- [3] Liu YH, Xu WS, Wan SH, Xia YT. The present situation and progress of red yeast rice research[J]. Food and Fermentation Industries, 1997, 23(5): 69-72 (in Chinese)
刘永华, 徐文生, 万邵琥, 夏云梯. 红曲研究的现状与进展[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(5): 69-72
- [4] Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Ukiya M, Kiyota A, Sakamoto N, Suzuki T, Tanabe N, Nishino H. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 562-565
- [5] Patakova P. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(2): 169-181
- [6] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent

- produced by a *Monascus* species[J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32(8): 852-854
- [7] Lin L, Li ZJ, Chen MH, Gao YJ, Wu HJ, Wang CL. Effect of four kind of medium on *Monascus* M1 with monacolin K production and real-time quantitative analysis[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 34(5): 43-47 (in Chinese)
林琳, 李贞景, 陈勉华, 高雅娟, 武慧佳, 王昌禄. 4种培养基对红曲霉 M1 莫纳可林 K 产量影响及基因差异表达分析[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(5): 43-47
- [8] Panda BP, Javed S, Ali M. Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(3): 373-378
- [9] Halpin RA, Ulm EH, Till AE, Kari PH, Vyas KP, Hunninghake DB, Duggan DE. Biotransformation of lovastatin. V. species differences in *in vivo* metabolite profiles of mouse, rat, dog, and human[J]. Drug Metabolism and Disposition, 1993, 21(6): 1003-1011
- [10] Chen Y, Chen Y, Xu GR. The effect of dring and radiation on the monacolin K content in functional *Monascus* red rice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(4): 16-19 (in Chinese)
陈蕴, 陈晔, 许赣荣. 烘干和辐照对功能性红曲 Monacolin K 含量的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 16-19
- [11] Xiong ZX, Cao XH, Wen QY, Chen ZT, Cheng ZX, Huang XY, Zhang YX, Long CN, Zhang Y, Huang ZW. An overview of the bioactivity of monacolin K/lovastatin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 131: 110585
- [12] Xia SQ, Guan YN, Fu Z, Zou Y, Li JJ, Guan B, Kong Q. Screening and fermentation conditions of *Monascus anka* with high yield of monacolin K[J]. China Brewing, 2017, 36(8): 62-66 (in Chinese)
夏诗棋, 管轶男, 付正, 邹艳, 李俊杰, 管斌, 孔青. 高产 Monacolin K 红曲霉菌株选育及发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2017, 36(8): 62-66
- [13] Suraiya S, Kim JH, Tak JY, Siddique MP, Young CJ, Kim JK, Kong IS. Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate[J]. LWT, 2018, 92: 1-9
- [14] Zhang C, Liang J, Yang L, Chai SY, Zhang CX, Sun BG, Wang CT. Glutamic acid promotes monacolin K production and monacolin K biosynthetic gene cluster expression in *Monascus*[J]. AMB Express, 2017, 7(1): 22
- [15] Lin L, Wu SF, Li ZJ, Ren ZY, Chen MH, Wang CL. High expression level of *mok E* enhances the production of monacolin K in *Monascus*[J]. Food Biotechnology, 2018, 32(1): 35-46
- [16] Wu HJ. Preliminary study on the mechanism of monacolin K by *Monascus fuliginosus* sato[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2017 (in Chinese)
武慧佳. 烟色红曲霉产酸型 Monacolin K 机理的初步研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2017
- [17] Huang YY, Lu DH, Yang CL, Chen S. Effect of trace elements on monacolin K and lovastatin production in liquid fermentation of *Monascus*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(3): 286-292 (in Chinese)
黄颖颖, 陆东和, 杨成龙, 陈慎. 微量营养源对红曲霉产洛伐他汀开环组分的影响[J]. 福建农业学报, 2015, 30(3): 286-292
- [18] Zhuge J. Variant strain of *Monascus purpureus* for generating lovastatin with high yield and its application: CN, 1373208A[P]. 2002-10-09 (in Chinese)
诸葛健. 高产洛伐他汀的红曲霉变异株及其应用: 中国, 1373208A[P]. 2002-10-09
- [19] Fan HB, Huang CY, Xu GR, Zhang BB, Liu F. The study of indirect determination of biomass in solid-state fermentation of *Monascus* by the measurement of glucosamine content[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1909-1916 (in Chinese)
范海滨, 黄常毅, 许赣荣, 张薄博, 刘飞. 用氨基葡萄糖含量的测定值间接表示红曲菌固态发酵过程中生物量的研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1909-1916
- [20] Shi QQ, Wu SG. Industrial Microbial Breeding Science[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2003: 245 (in Chinese)
施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2003: 245
- [21] Chen Q, Wu YZ, Zhao XY, Zhao JX, Li Y, Li JS. Research progress on genes related three main polyketides biosynthetic pathway in functional *Monascus*[J]. China Brewing, 2014, 33(8): 10-14 (in Chinese)
陈泉, 吴远征, 赵晓燕, 赵吉兴, 李耀, 李纪顺. 功能性红曲中三类主要聚酮类化合物合成途径相关基因研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(8): 10-14
- [22] Hendrickson L, Davis CR, Roach C, Nguyen DK, Aldrich T, McAda PC, Reeves CD. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene[J]. Chemistry & Biology, 1999, 6(7): 429-439
- [23] Bizukojc M, Pawlowska B, Ledakowicz S. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances

- lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 127(2): 258-268
- [24] Wang TH, Lin TF. *Monascus* rice products[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2007, 53: 123-159
- [25] Zhang J, Wang YL, Lu LP, Zhang BB, Xu GR. 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
- [26] Lin XH. Analytical Chemistry Experiment Guide[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2014: 43-44 (in Chinese) 林新华. 分析化学实验指导[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2014: 43-44
- [27] Chen WP, He Y, Zhou YX, Shao YC, Feng YL, Li M, Chen FS. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015, 14(5): 555-567
- [28] Zhang C, Chai SY, Hao S, Zhang AA, Zhu QQ, Zhang H, Wang CT. 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
- [29] Zhang C, Liang J, Zhang AA, Hao S, Zhang H, Zhu QQ, Sun BG, Wang CT. Overexpression of monacolin K biosynthesis genes in the *Monascus purpureus* azaphilone polyketide pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(9): 2563-2569
- [30] Hutchinson CR, Kennedy J, Park C, Kendrew S, Auclair K, Vederas J. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(3/4): 287-295
- [31] Zhang C, Liang J, Yang L, Sun BG, Wang CT. *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

征订启事**欢迎订阅《微生物学通报》**

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊, CSCD 核心期刊, 中国科技核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2021 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413