

## 研究报告

## 一株高产洛伐他汀红曲霉的筛选与液态发酵条件优化

毛继龙<sup>1</sup>, 张建辉<sup>2</sup>, 王璨<sup>1</sup>, 赵芃<sup>1</sup>, 陈文静<sup>1</sup>, 邱忠平<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031<sup>2</sup> 成都市第三人民医院, 四川 成都 610081

毛继龙, 张建辉, 王璨, 赵芃, 陈文静, 邱忠平. 一株高产洛伐他汀红曲霉的筛选与液态发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2221-2232

Mao Jilong, Zhang Jianhui, Wang Can, Zhao Peng, Cheng Wenjing, Qiu Zhongping. Screening and liquid fermentation condition optimization of a high lovastatin producing *Monascus*[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2221-2232

**摘 要:**【背景】洛伐他汀(lovastatin)是红曲霉的次生代谢产物, 是重要的临床用降血脂药物。在液态发酵条件下, 红曲霉的洛伐他汀产量较低, 难以满足工业化生产的要求。【目的】筛选获得一株高产洛伐他汀的红曲霉菌株, 并通过优化液态发酵条件提高洛伐他汀的产量。【方法】从红曲米中筛选获得一株高产洛伐他汀的红曲霉菌株, 依据形态学特征、生理生化特性及 18S rRNA 基因序列分析对分离菌株进行鉴定; 通过响应面法对其产洛伐他汀的液态发酵条件进行优化。【结果】获得一株产洛伐他汀的紫红曲霉(*Monascus purpureus* M4), 该菌在甘油 57.80 g/L、酵母浸粉 5.52 g/L、接种量为 6.90%条件下, 洛伐他汀产量(173.60 mg/L)较优化前提高了 4.8 倍。【结论】菌株 M4 产洛伐他汀最优液态发酵条件的建立, 为洛伐他汀的大规模生产及该菌株的工业化应用提供了技术支撑。

**关键词:** 红曲霉; 洛伐他汀; 液态发酵; 响应面法

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51978576); 四川省重点研发计划(2019YFN0027)

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (51978576); Key Research and Development Program of Sichuan Province (2019YFN0027)

**\*Corresponding author:** E-mail: zhpqiu@sina.com

**Received:** 2021-05-13; **Accepted:** 2021-07-15; **Published online:** 2022-03-22

# Screening and liquid fermentation condition optimization of a high lovastatin producing *Monascus*

MAO Jilong<sup>1</sup>, ZHANG Jianhui<sup>2</sup>, WANG Can<sup>1</sup>, ZHAO Peng<sup>1</sup>, CHENG Wenjing<sup>1</sup>,  
QIU Zhongping<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, Sichuan, China

<sup>2</sup> Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610081, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] Lovastatin is a secondary metabolite of *Monascus* and an important clinically used lipid-lowering drug. Under liquid fermentation conditions, the production of lovastatin from *Monascus* is low, which is difficult to meet the requirements of industrial production. [Objective] In this study, a *Monascus* strain with high lovastatin yield was screened, and the production of lovastatin was improved by optimizing liquid fermentation conditions. [Methods] A high lovastatin yielding *Monascus* strain was selected from red yeast rice, which was identified based on morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and 18S rRNA gene sequence analysis, response surface methodology (RSM) was applied for the optimization of the liquid fermentation conditions for lovastatin production. [Results] A lovastatin-producing fungus (*Monascus purpureus* M4) was obtained. With glycerol at 57.80 g/L, yeast extract powder at 5.52 g/L, and inoculation size at 6.90%, the lovastatin output (173.60 mg/L) was 4.8 times higher than that before optimization. [Conclusion] The establishment of the optimal liquid fermentation conditions for lovastatin production by strain M4 provided technical support for the large-scale production of lovastatin and the industrial application of the strain.

**Keywords:** *Monascus*; lovastatin; liquid fermentation; response surface methodology

洛伐他汀(lovastatin)是一种真菌产生的次生代谢产物,是目前临床上重要的降血脂药物。研究表明,羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA)还原酶是人体内胆固醇合成的限速酶,洛伐他汀的开环酸形式与 HMG-CoA 结构相似,因此能够竞争性抑制体内胆固醇的合成过程,阻断细胞内甲羟戊酸的代谢途径,使细胞内游离胆固醇含量减少,已广泛应用于治疗高胆固醇血症和心血管疾病<sup>[1]</sup>。

洛伐他汀分子结构复杂,难以大规模化学合成,利用土曲霉和红曲霉发酵是洛伐他汀工业化生产的主要途径<sup>[2]</sup>。然而土曲霉是一种条件致病菌,会引起浅表真菌感染,甚至造成侵袭性曲霉病。与土曲霉相比,红曲霉具有无致病性、安全性高等优点,被广泛应用于食品、药品、保健等

多个领域,是工业化生产洛伐他汀的良好菌株<sup>[3]</sup>。

目前,固态发酵工业化生产洛伐他汀存在劳动强度大、产量不稳定和易受杂菌污染等诸多问题,而液态发酵具有发酵条件易控制、不易染菌、产物易提取等优点,是工业化生产洛伐他汀的主要方式<sup>[4]</sup>。然而在液态发酵条件下,红曲霉的洛伐他汀产量较低,难以满足工业化生产的要求,是阻碍其工业化应用的主要原因。因此,筛选高产洛伐他汀红曲霉株并优化其液态发酵条件,对提高其洛伐他汀产量尤为重要。响应面设计法是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法,是数学方法和统计方法相结合的产物,该法具有试验次数少、周期短、精度高等优点,而且可以建立连续变量曲面模型,同时对影响试验指标的各因子水平及其交

互作用进行优化和评价,可快速有效地确定多因子系统的最佳条件<sup>[5]</sup>。

本文从红曲米中筛选得到一株产洛伐他汀的红曲霉,并利用响应面法对该菌株产洛伐他汀的液态发酵条件进行优化,以提高该菌株的洛伐他汀产量,为其产业化应用提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 培养基

PDA 培养基、种子培养基和发酵培养基参考文献[6]配制。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘油、可溶性淀粉、蔗糖、山梨糖、果糖,上海生物工程技术服务有限公司;蛋白胨、酵母浸粉、玉米浆、大豆粉、牛肉膏、 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 、明胶、乙酸乙酯、氯仿、乙醇和洛伐他汀,国药集团化学试剂有限公司;PCR 反应试剂和 DNA 提取试剂盒,北京擎科新业生物技术有限公司;

PCR 仪, Bio-Rad 公司;紫外分光光度计,上海尤尼柯公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;全温振荡培养箱,上海智城分析仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 红曲霉株的筛选与稳定性研究

初筛:将红曲米研磨成粉末状后涂布于 PDA 培养基上,30 °C 培养 5–7 d,挑取菌丝转移接种到新的 PDA 培养基上,经反复分离纯化得到具有红曲霉基本特征的菌株单菌落,将所获菌株编号,置 4 °C 冰箱中保存。

复筛:将所获菌株接种到 100 mL 种子培养基中,在 30 °C、150 r/min 孵育 3 d 后,将种子液接种到发酵培养基中,在恒温摇床中 30 °C、

150 r/min 培养 10 d。培养结束后使用四层纱布对整个发酵液进行过滤,测定发酵液中洛伐他汀的含量及生物量,从而筛选出洛伐他汀产量最高的菌种,并将其作为出发菌株进行传代培养,连续培养 10 代,通过测定每一代发酵液的洛伐他汀产量及生物量分析其稳定性。

#### 1.2.2 菌株鉴定

形态学鉴定、碳源利用试验和明胶水解试验参照参考文献[7]。

分子生物学鉴定参照参考文献[8]。以洛伐他汀产量最高的菌株 M4 基因组为 DNA 模板,用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对菌株 M4 的 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 1.1 $\times$ T3 Super PCR Mix 44  $\mu\text{L}$ , 通用引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ , 基因组 DNA 模板(1 mg/L) 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 57 °C 10 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 4 °C 保存。PCR 产物送擎科科技有限公司进行测序和拼接。将所测序列在 GenBank 数据库用 BLAST 分析比对。

#### 1.2.3 发酵条件优化

##### (1) 单因素试验设计

分别以碳源的种类和浓度、氮源的种类和浓度及接种量作为唯一变量进行发酵实验,确定各因素对菌株洛伐他汀产量及生物量的影响,重复 3 次取平均值。

##### (2) 响应面实验设计

根据单因素试验结果,采用 Box-Behnken 中心组合设计,以碳源浓度(A)、氮源浓度(B)、接种量(C)为自变量,以洛伐他汀产量(Y)为响应值设计三因素三水平试验,其他次要因素均取初始浓度进行实验,重复 3 次取平均值。

### 1.3 测定方法

洛伐他汀含量的测定:收集发酵液到离心

管中, 匀浆机搅碎后, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 完全混合后静置分层, 取上清液重复几次至上清液无色为止, 合并上清液, 旋转蒸发仪 45 °C 浓缩至干, 用少许氯仿溶解干燥物, 待氯仿溶液挥发后, 再用 75% 乙醇溶液溶解至一定体积, 在 239 nm 波长处测定溶液吸光度, 根据洛伐他汀标准曲线( $y=0.0682x-0.0464$ ,  $R^2=0.9980$ )计算洛伐他汀的产量<sup>[9]</sup>。

菌体生物量的测定: 抽滤, 无菌水洗脱菌丝体, 80 °C 烘干至恒重后称重得到生物量。

#### 1.4 数据处理

每个实验重复 3 次( $n=3$ ), 取平均值, 采用 Origin 8.5 软件作图分析。采用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素方差分析及显著性差异分析。采用 Design Expert 8.0 软件进行响应面优化的实验设计和数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选与鉴定

#### 2.1.1 产洛伐他汀菌株的筛选与稳定性研究

通过反复分离纯化共获得 9 株红曲霉株,

分别标记菌株代号为 M1–M9。菌株经发酵培养基发酵培养后, 测定发酵液中的洛伐他汀产量。由图 1 可知, 编号 M4 菌株产洛伐他汀能力最强, 达到 $(29.3\pm1.5)$  mg/L; 而且连续培养 10 代后其洛伐他汀产量仍然处于较高水平, 可以判断菌株 M4 在产洛伐他汀能力方面具有良好的稳定性, 因此在后继发酵条件优化中选择编号 M4 为目标菌株。

#### 2.1.2 菌株 M4 的鉴定

##### (1) 形态学及生理生化鉴定结果

由图 2 可知, 菌株 M4 菌落颜色为橙色或偏棕红色, 菌落中央突起, 边缘不规则状, 气生菌丝被茸毛状至被卷棉毛状; 菌丝具隔膜, 多分枝, 分生孢子连续分生呈链, 6–8  $\mu\text{m}$ 。子囊孢子呈圆形, 光滑, 5–6  $\mu\text{m}$ , 符合紫红曲霉的形态学特征<sup>[10]</sup>。由表 1 可知, 菌株 M4 能使明胶培养基水解, 在含葡萄糖和麦芽糖的培养基上生长状况良好, 但是在含有蔗糖、果糖、乳糖的培养基上生长状况较差, 而在含有山梨糖的培养基上则完全不生长<sup>[11]</sup>。因此, 初步判断菌株 M4 为紫红曲霉。

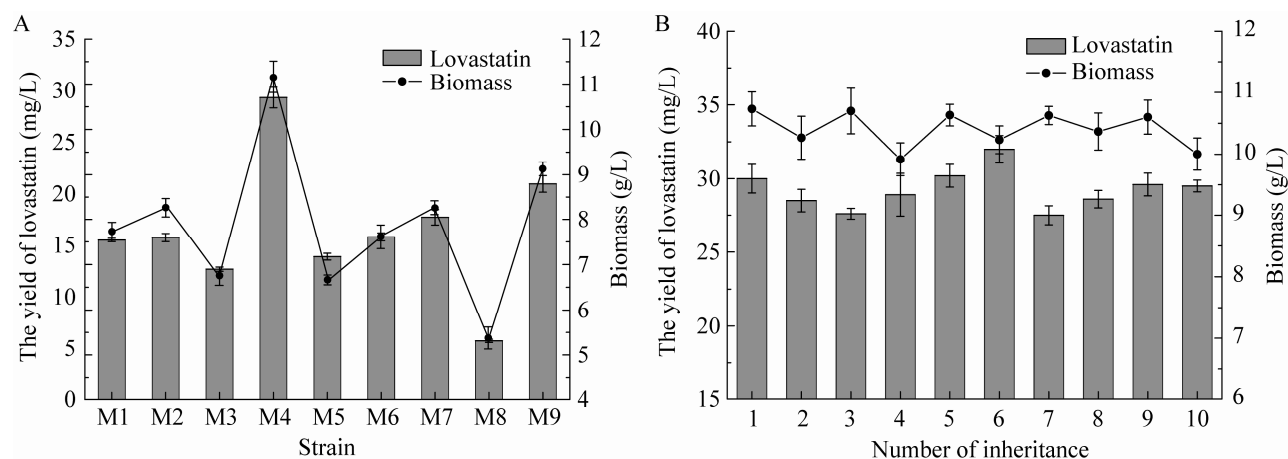


图 1 高产洛伐他汀红曲菌株的筛选与稳定性研究 A: 高产菌株的筛选; B: 菌株 M4 稳定性研究

Figure 1 Screening and stability test of high-yield lovastatin monascus strain. A: Screening of high yield strains; B: Study on the stability of strain M4.

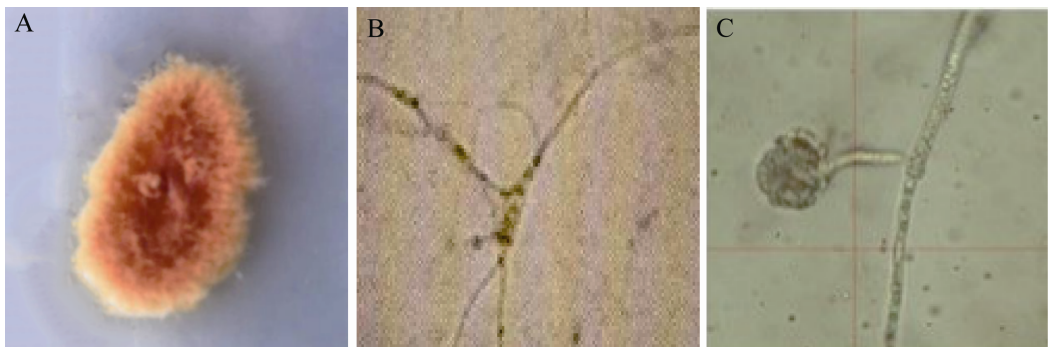


图 2 菌株 M4 的形态特征 A：菌落形态；B：菌丝形态；C：子囊孢子

Figure 2 Morphological characteristics of M4. A: Colony morphology; B: Mycelium morphology; C: Ascospores.

表 1 菌株 M4 生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain M4

Gelatin hydrolysate	Utilization of carbon sources					
	Glucose	Maltose	Saccharose	Lactose	Sorbose	Fructose
++	+++	++	+	+	-	+
++	+++	++	+	+	-	+
++	+++	++	+	+	-	+

注：明胶水解试验：++：完全水解；+：轻度水解；-：阴性。碳源利用情况：+++：生长良好；++：生长较好；+：生长一般

Note: Gelatine hydrolysis test: ++: Complete hydrolysis; +: Mild hydrolysis; -: Negative. Carbon source utilization: +++: Good growth; ++: Good growth; +: Growth is average.

(2) 分子生物学鉴定

对菌株 M4 的 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增，产物测序后获得长度为 560 bp。相似性比较发现，菌株 M4 与红曲霉的序列相似性为 99%，该菌与其近源菌株基于 18S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树如图 3 所示，菌株 M4 与 *Monascus purpureus* strain CMU003 在同一分支。综合形态特征、生理生化特性以及 18S rRNA 基因序列分析，初步鉴定其属于紫红曲霉 (*Monascus purpureus*)，并命名为 *Monascus purpureus* M4，其 18S rRNA 基因序列登录号为 MW527421。

2.2 发酵条件优化

2.2.1 单因素试验结果

以葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘油、可溶性

淀粉及蔗糖为碳源时，洛伐他汀的产量差异显著 ( $P<0.05$ )。以蔗糖为碳源时菌体生长最好，但以甘油作为碳源时洛伐他汀产量最高 [ $(35.5\pm1.5)$  mg/L]，可溶性淀粉次之，因此选择甘油为碳源进一步优化(图 4A)。在此基础上，继续研究了不同质量浓度的甘油对菌株洛伐他汀产量及生物量的影响。随着甘油质量浓度的增加，菌株的洛伐他汀产量逐渐增加，但是当质量浓度超过 50 g/L 时，菌株的洛伐他汀产量反而逐渐下降，因此最适甘油浓度为 50 g/L (图 4B)。不同氮源对细胞生长和洛伐他汀产量的影响差异显著 ( $P<0.05$ )。当以酵母浸粉为氮源时洛伐他汀产量最高 [ $(28.5\pm1.6)$  mg/L]，因此选择酵母浸粉为氮源进一步优化(图 4C)。继续研究了不同氮源浓度对菌株洛伐他汀产量及生物量的影

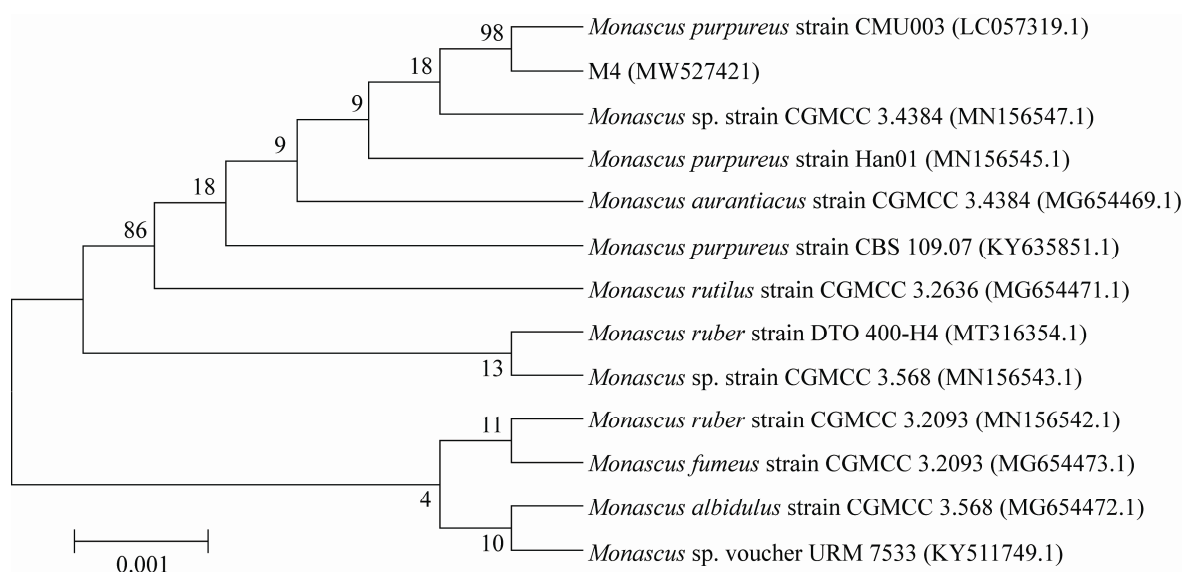


图3 M4菌株基于ITS序列建立的系统发育树 Bootstrap次数设置为1 000;邻接法构建系统发育树;括号内代表序列GenBank登录号;分支处的数字表示bootstrap支持率;标尺表示0.1%的序列进化差异

Figure 3 Phylogenetic tree of genus established by ITS sequence of strain M4. Set the bootstrap times to 1 000; Phylogenetic tree is constructed by adjacency method; Numbers in parentheses are GenBank accession number; The numbers in each branch point denote the percentages supported by bootstrap; The scale presents 0.1% sequence variance.

响,结果表明,当酵母浸粉浓度为6 g/L时,菌株洛伐他汀产量最高[(32.9±1.2) mg/L],因此最适酵母浸粉浓度为6 g/L(图4D)。当接种量为8%时洛伐他汀产量最高[(38.3±1.7) mg/L],选择8%为最佳接种量(图4E)。

### 2.2.2 响应面实验结果

采用Box-Behnken响应面实验设计,分析显著因素之间的交互作用及最佳值,Box-Behnken实验设计及实验结果见表2和表3。对实验结果进行回归方差分析,洛伐他汀产量 $Y$ 与自变量甘油浓度、酵母浸粉浓度及接种量的多元回归方程为: $Y=164.60-8.13A-19.50B-20.63C-17.00AB-26.25AC+15.50BC-24.18A^2-66.43B^2-27.18C^2$ 。回归模型的方差分析见表4,二次回归模型 $P<0.0001$ ,达到极显著水平;决定系数 $R^2$ 为0.9861,表明该模型能解释98%响应值的

变化,预测结果与实际结果有着较好的一致性;模型的复合相关系数 $R^2_{adj}$ 为0.9683,表明试验结果有96.83%受试验因素的影响;变异失拟项不显著( $P=0.1773>0.05$ ),即试验无失拟因素存在,回归模型能充分反映实际情况。Adeq Precision测得信号与噪音的比率为20.159(>4),说明这个模型能合适地反映实验结果。方差分析中的显著性检验可以判断自变量对因变量的影响。由表4可知, $B$ 、 $C$ 对洛伐他汀产量的影响显著( $P<0.01$ ),而 $A$ 的影响不显著( $P>0.05$ );模型中的交互项 $AB$ 、 $AC$ 和 $BC$ 对洛伐他汀产量的影响极显著( $P<0.01$ );模型中的二次项 $A_2$ 、 $B_2$ 、 $C_2$ 对洛伐他汀的影响均达极显著水平( $P<0.01$ );各因素对洛伐他汀产量的影响程度为 $C>B>A$ ,即接种量>酵母浸粉浓度>甘油浓度。

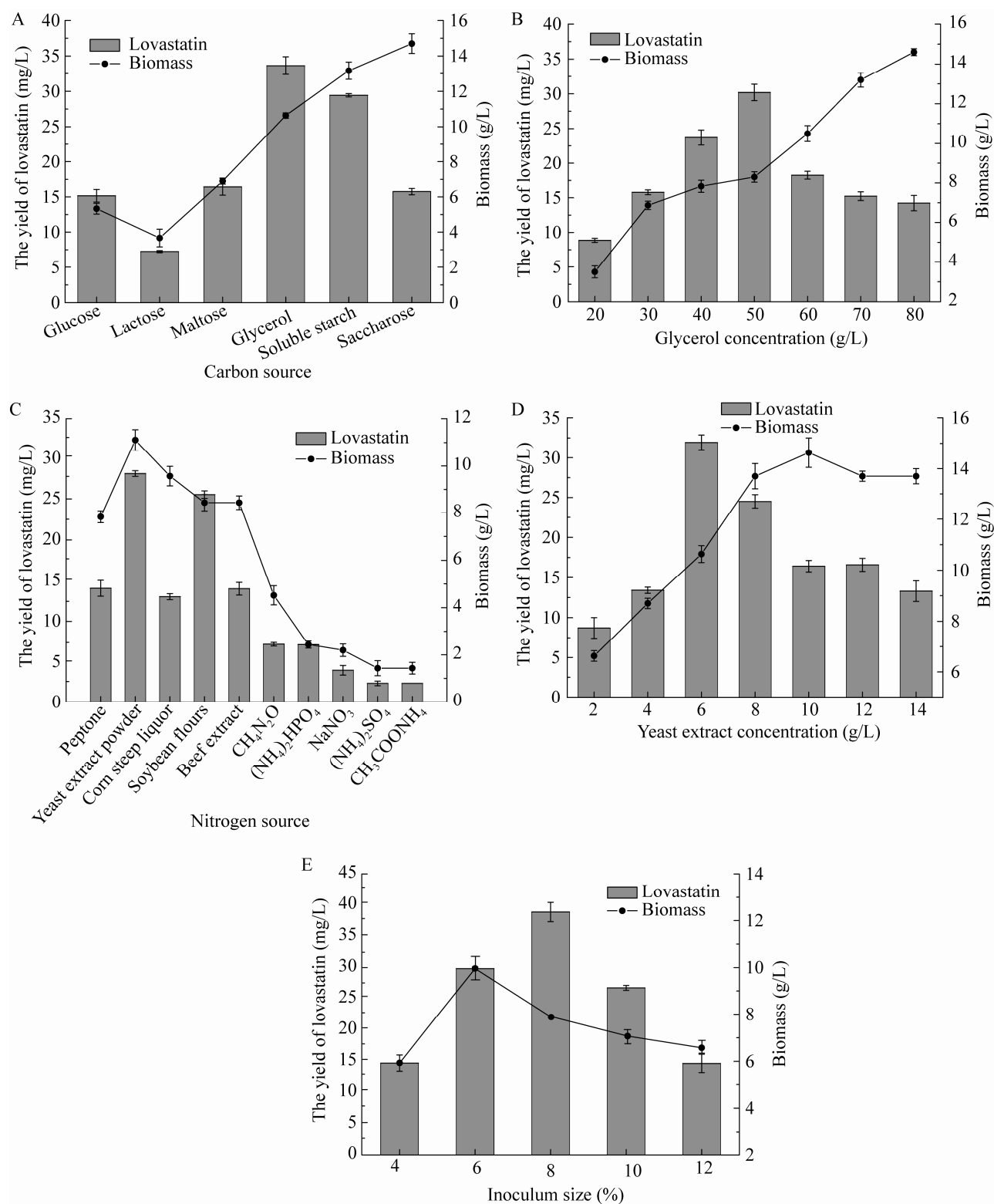


图4 不同培养条件对洛伐他汀产量及生物量的影响

Figure 4 Effects of different culture conditions on lovastatin yield and biomass.

表 2 Box-Behnken 设计试验的因素与水平

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design experiment

Factor	Level		
	-1	0	1
A (g/L)	50	60	70
B (g/L)	4	6	8
C (%)	6	8	10

表 3 Box-Behnken 试验设计及实验结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken design experiment

Test number	Level of factor			Y (mg/L)	
	A	B	C	Observed	Predicted
1	-1	-1	0	81	84
2	1	1	0	33	39
3	0	0	0	164	164
4	0	1	-1	58	56
5	0	1	1	37	46
6	-1	1	0	84	80
7	0	-1	1	53	54
8	0	0	0	158	164
9	0	-1	-1	136	126
10	1	0	-1	147	152
11	0	0	0	160	164
12	-1	0	-1	110	115
13	1	0	1	64	58
14	0	0	0	175	164
15	1	-1	0	98	102
16	-1	0	1	132	127
17	0	0	0	166	164

根据多元回归方程绘制的接种量、酵母浸粉浓度、甘油浓度两两交互作用的响应曲面及等高线见图 5。由各因素响应面曲线皆呈开口向下的抛物线形状,说明存在响应最大值。 $C_1$ 、 $C_2$ 相较于其他  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $B_1$ 、 $B_2$  等高线分布密集作用对响应面值的影响显著,与表 3 中的数据一致。模型预测编码单元中测试因子的最佳值且呈椭圆形,表明接种量(C)和氮源浓度(B)交互

表 4 响应面二次模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for response surface second-order polynomial equation

Source	Degree of freedom	F	P (Prob>F)	Significance
Model	9	55.27	<0.000 1	Significant
A	1	6.90	0.034 0	*
B	1	39.77	0.000 4	**
C	1	44.49	0.000 3	**
AB	1	15.11	0.006 0	**
AC	1	36.03	0.000 5	**
BC	1	12.56	0.009 4	**
A <sup>2</sup>	1	32.17	0.000 8	**
B <sup>2</sup>	1	242.87	<0.000 1	**
C <sup>2</sup>	1	40.65	0.000 4	**
Residual	7			
Loss of quasi item	3	2.74	0.177 3	Not significant
Pure error	4			
Total	16		$R^2=0.986 1$ $R^2_{adj}=0.968 3$	

注: \*: 差异显著( $P<0.05$ ); \*\*: 差异极显著( $P<0.01$ )

Note: \*: Significant difference ( $P<0.05$ ); \*\*: Extremely significant ( $P<0.01$ ).

为  $A=0.22$ 、 $B=-0.24$  和  $C=-0.55$ 。相应地,甘油浓度、酵母浸粉浓度和接种量分别为 57.8 g/L、5.52 g/L 和 6.90%。洛伐他汀产量的最大预测值为 172 mg/L。为了验证响应面设计结果的可靠性,以响应面实验确定的因素的最优组合配制培养基进行摇瓶发酵,重复 3 次。结果显示,在最优条件下洛伐他汀的产量为  $(173.6\pm 1.2)$  mg/L,比原始培养基提高了 4.8 倍。洛伐他汀产量实际值与预测值接近,表明响应面优化得到的发酵工艺条件合理可靠。

### 3 讨论与结论

微生物发酵过程中发酵条件对微生物的生长及微生物次级代谢产物生产具有决定性影响,合适的碳源、氮源、接种量能够促进菌株的生长和次级代谢产物生成<sup>[12]</sup>。碳源作为前体



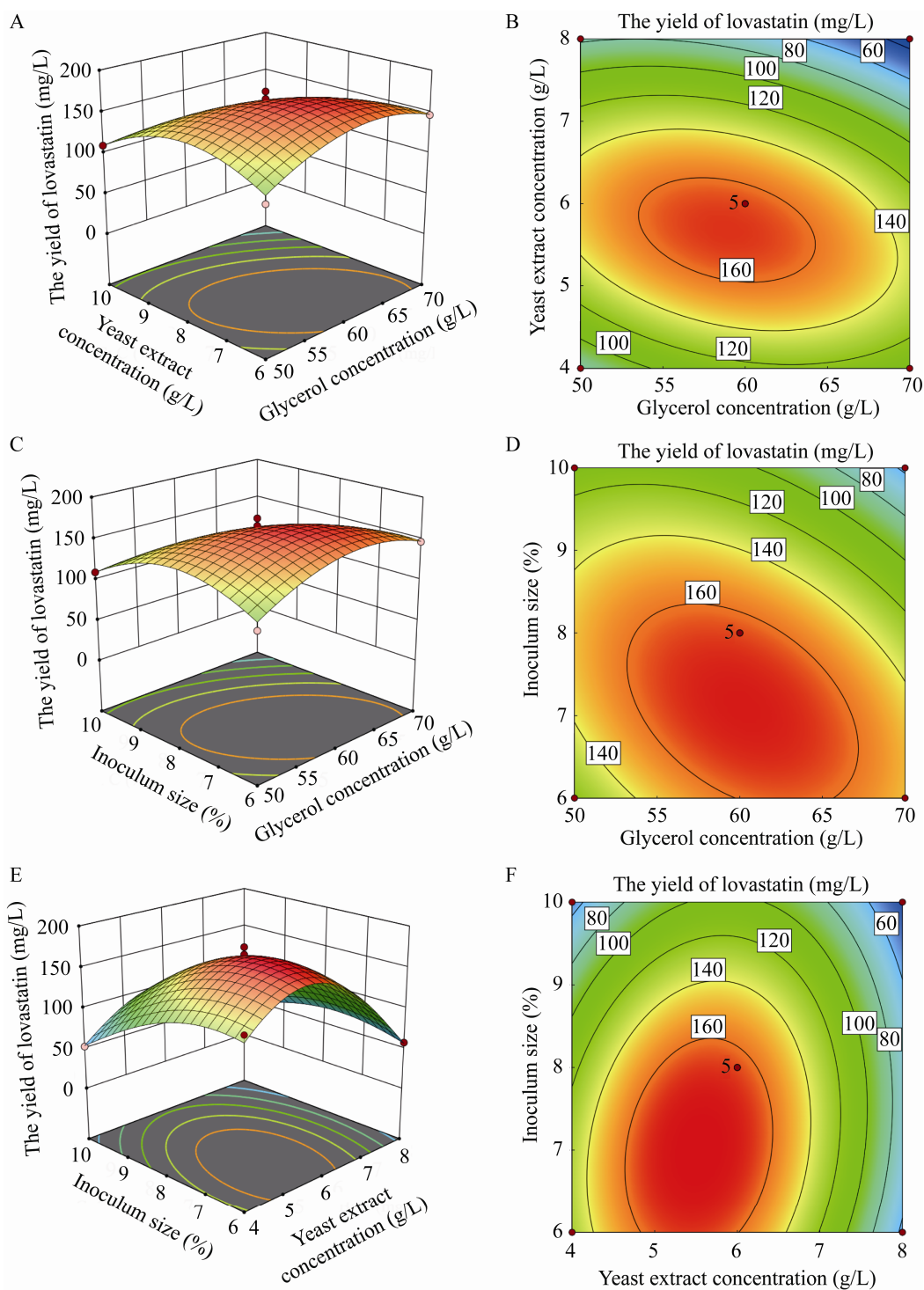


图5 各因素对洛伐他汀产量交互影响的三维曲面图 A、B: 甘油和酵母浸粉之间的交互影响; C、D: 甘油和接种量之间的交互影响; E、F: 酵母浸粉和接种量之间的交互影响

Figure 5 Surface of mutual-influence for different factors on the yield of lovastatin. A, B: Mutual-influence for glycerol and yeast extract; C, D: Mutual-influence for glycerol and inoculation amount; E, F: Mutual-influence for yeast extract and inoculation amount.

及能量的来源参与合成生物量构成骨架及目标代谢物的合成, 可通过碳分解代谢阻遏效应、底物限制及对关键酶(LovD)的调控等途径影响洛伐他汀的生物合成<sup>[13]</sup>。由于细胞对碳源利用程度的不同导致了菌体生长上的明显差异( $P<0.05$ )。缓慢利用碳源更有利于细胞生长, 所以一般来说可溶性淀粉得到最大生物量, 甘油次之, 而乳糖很难被细胞利用。葡萄糖、蔗糖等快速利用碳源不利于细胞生长和产物合成, 不仅因为存在碳分解代谢物阻遏现象, 还可能抑制洛伐他汀生物合成途径中的关键酶转酯酶(LovD 蛋白)活性<sup>[14]</sup>; 甘油等缓慢利用碳源可避免碳分解代谢物阻遏现象, 对 LovD 蛋白抑制较小, 可保持发酵液适度生物量和充足溶氧量, 有利于菌体生长和洛伐他汀的合成与积累<sup>[15]</sup>。本文以甘油作为碳源时, 发酵液中的洛伐他汀产量达到 $(35.5\pm 1.5)$  mg/L, 较其他碳源高 54%–78%, 为红曲霉液态发酵生产洛伐他汀的最优碳源。

氮源是影响洛伐他汀生物合成的另一个重要限制因素, 其不仅参与菌体生长, 而且通过底物限制和参与洛伐他汀生物合成中相关酶的组成等途径调控洛伐他汀的生物合成, 尽管洛伐他汀分子结构中不包含氮原子<sup>[16]</sup>。由于氮源成分复杂, 不同氮源种类所含营养成分差异较大, 各种氮源对菌体生长和洛伐他汀产量的影响差异显著( $P<0.05$ )。与无机氮源相比, 有机氮源更有利于洛伐他汀的合成积累及菌体生长, 这与 Hajjai 等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。研究表明, 酵母浸粉等有机氮源中含 B 族维生素、D-泛酸钙、VB<sub>6</sub> 和烟酸等物质, 它们已被证实分别是洛伐他汀生物合成所必需的能量供体 NAD(P)、FAD 和 CoA 的前体物质, 增加这些物质可有效促进洛伐他汀的生物合成<sup>[18]</sup>。本文以酵母浸粉作为氮源时, 发酵液中的洛伐他汀产量达到

$(28.5\pm 1.6)$  mg/L, 远高于其他氮源, 为红曲霉液态发酵生产洛伐他汀的最优氮源。

培养基的 C/N 比通过底物限制显著影响洛伐他汀的生物合成<sup>[19]</sup>。研究表明, 高 C/N 的发酵培养基更有利于洛伐他汀的合成, 洛伐他汀的产生通常与氮限制生长的静止阶段有关, 氮源的限制作用使发酵液保持了合适的生物量和充足的溶氧量, 促使大量的碳源被用来合成洛伐他汀, 提高了洛伐他汀的产量<sup>[20]</sup>。本研究发现, 当培养基的甘油浓度为 57.80 g/L 和酵母浸粉浓度为 5.52 g/L, 即 C/N 比值为 44 时, 可以有效提高洛伐他汀的产量。此外, 在利用红曲霉进行洛伐他汀大规模生产中, 高 C/N 比意味着需要大量的碳源供应, 而与酵母浸粉相比, 甘油具有来源广、成本低等优点, 可显著降低洛伐他汀工业化生产成本<sup>[21]</sup>。接种量与发酵过程中底物的消耗、菌体生长速率有密切的关系, 其通过底物的消耗速率、菌体形态分化等途径参与洛伐他汀生物合成的调控<sup>[22]</sup>。本文研究发现, 当接种量为 6.90% 时, 微生物的生长、产物合成和底物的消耗处于动态平衡, 更有利于产物的积累, 这与 Atlı 等<sup>[23]</sup>的研究结果一致。

目前已报道的红曲霉在液态发酵条件下洛伐他汀产量普遍较低。Mohan-Kumari 等<sup>[24]</sup>对菌株 *M. ruber* MTTC 410 的碳源、氮源、pH、温度等发酵参数进行优化后其洛伐他汀产量最高为 81 mg/L; Chang 等<sup>[25]</sup>对菌株 *M. ruber* CCRC 31535 的碳源、氮源进行优化后其洛伐他汀产量最高为 131 mg/L; Seraman 等<sup>[26]</sup>对菌株 *M. purpureus* MTCC 369 的碳源、氮源和无机盐进行优化后其洛伐他汀最高产量为 97.5 mg/L。Kamal 等<sup>[27]</sup>报道一株红曲霉在液体培养基中能够产生 127 mg/L 的洛伐他汀, 这是目前关于红曲霉深层发酵生产洛伐他汀产量最高的报道之一。目前针对红曲菌产洛伐他汀液态发酵条件

的优化主要是碳源、氮源、无机盐、pH、温度等的优化,而对红曲菌碳源、氮源及接种量的优化及相互关系尚未见报道。碳源、氮源和接种量是以营养物质为纽带的“供给-消耗”的相互作用关系,对于菌体的生长与产物的积累密切相关。因此,本文从红曲米中分离、筛选得到一株洛伐他汀产量较高的紫红曲霉 M4 菌株(*Monascus purpureus* M4),并利用响应面实验对该菌产洛伐他汀的碳源、氮源及接种量进行优化,结果表明,在甘油浓度为 57.80 g/L、酵母浸粉浓度为 5.52 g/L 和接种量为 6.90%时洛伐他汀产量最高,为 173.60 mg/L,较优化前提高了 4.8 倍,与目前已报道的红曲菌洛伐他汀产量相比优势明显,这不仅丰富了生产洛伐他汀的菌种资源,而且摇瓶发酵条件的优化也为提高洛伐他汀产量和发酵罐培养提供了良好的基础,对洛伐他汀的工业生产具有重要的指导意义。另外,后续我们将通过菌株诱变手段、基因编辑技术等继续改造该菌种,确定更为廉价的原料,降低生产成本,进一步提高洛伐他汀的产量,为洛伐他汀的大规模生产及菌株 M4 的工业化应用提供技术支撑。

## REFERENCES

- [1] 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
- [2] Barrios-González J, Miranda RU. Biotechnological production and applications of statins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 869-883
- [3] Jahromi F. Production of lovastatin from rice straw using *Aspergillus terreus* in solid state fermentation[J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013, 7(29): 2106-2111
- [4] Toyotome T, Saito S, Koshizaki Y, Komatsu R, Matsuzawa T, Yaguchi T. Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens and their antifungal susceptibility: a five-year single-center study in Japan[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 26(2): 321-323
- [5] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 894-903
- Dai ZK, Zhang C, Ruan Z. The application of experimental design and optimization techniques in optimization of microbial medium[J]. Microbiology China, 2010, 37(6): 894-903 (in Chinese)
- [6] 吕旭聪, 翁星, 韩妙坤, 张雯, 饶平凡, 倪莉. 福建红曲中红曲菌的分离鉴定及菌株特性研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(2): 88-97
- Lü XC, Weng X, Han MK, Zhang W, Rao PF, Ni L. Identification and characterization of *Monascus* sp. from Fujian Hongqu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(2): 88-97 (in Chinese)
- [7] 朱蕊, 彭林, 刘双平, 韩笑, 毛健. 高产洛伐他汀红曲菌的筛选及菌种共酵对红曲固态发酵的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 168-173, 177
- Zhu R, Peng L, Liu SP, Han X, Mao J. Screening of *Monascus* with high-yield lovastatin and effects of co-fermentation on solid-state fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(11): 168-173, 177 (in Chinese)
- [8] 杨锦, 沈宏. 海藻酸裂解酶高产菌株 *Microbulbifer* sp.SH-1 的分离、鉴定及其产酶条件优化[J]. 微生物学报, 2020, 60(4): 679-694
- Yang J, Shen H. Isolation, identification and culture optimization of an alginate lyase-producing strain *Microbulbifer* sp. SH-1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(4): 679-694 (in Chinese)
- [9] 万云雷, 韩红霞, 李利, 伍潇洁, 高梦祥. 低频磁场对紫色红曲菌液态发酵产麦角固醇的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 37-41
- Wan YL, Han HX, Li L, Wu XJ, Gao MX. Effect of low-frequency magnetic field on ergosterol production by *Monascus purpureus* in liquid-state fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(10): 37-41 (in Chinese)
- [10] 李钟庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003
- Li ZQ, Guo F. Morphology and taxonomy of *Monascus*[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2003
- [11] 杨宁, 郭红珍, 郝林. 山西老陈醋大曲红曲霉分离鉴定及生物学特性研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2006, 26(1): 4-6

- Yang N, Guo HZ, Hao L. Studies on identification and biological characteristics of *Monascus* in super-mature-vinegar daqu[J]. Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science Edition, 2006, 26(1): 4-6 (in Chinese)
- [12] Wen QY, Cao XH, Chen ZT, Xiong ZX, Liu JH, Cheng ZX, Zheng ZH, Long CN, Zheng BD, Huang ZW. An overview of *Monascus* fermentation processes for monacolin K production[J]. Open Chemistry, 2020, 18(1): 10-21
- [13] Sayyad SA, Panda BP, Javed S, Ali M. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5): 1054-1058
- [14] 贾志华, 张小里, 曹学君. 碳源对土曲霉中洛伐他汀生物合成的影响[J]. 化学工程, 2008, 36(5): 51-54  
Jia ZH, Zhang XL, Cao XJ. Effect of carbon source on lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*[J]. Chemical Engineering: China, 2008, 36(5): 51-54 (in Chinese)
- [15] VK P, Santebennur B, J S. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* (KM017963) in submerged and solid state fermentation: a comparative study[EB/OL]. 2015
- [16] 贾志华, 张小里, 曹学君, 秦宝福, 刘建党. 复合氮源对土曲霉洛伐他汀生物合成的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(10): 159-164  
Jia ZH, Zhang XL, Cao XJ, Qin BF, Liu JD. Effect of complex nitrogen source on lovastatin biosynthesis from *Aspergillus terreus*[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2010, 38(10): 159-164 (in Chinese)
- [17] Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2596-2602
- [18] 叶昌亚, 张薄博, 许赣荣. 液态发酵条件对红曲菌菌体形态及产物 monacolin K 的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(9): 27-33  
Ye CY, Zhang BB, Xu GR. Effects of the fermentation conditions on mycelial morphology of *Monascus ruber* 9901 and production of monacolin K through its submerged fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(9): 27-33 (in Chinese)
- [19] Bashir T, Faisalabad UOA, Asgher M, Hussain F, Bhatti HN. Optimization of process variables for hyper-production of lovastatin from wild type *Aspergillus terreus* and its efficacy studies[J]. Revista Mexicana De Ingeniería Química, 2019, 19(2): 929-939
- [20] 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
- [21] 赵薇, 周雨辛, 卢绍闯, 胡琳慧, 冯艳丽. 粗甘油及分析纯甘油用于红曲菌产莫纳可林 K 及色素的对比[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(12): 37-43  
Zhao W, Zhou YX, Lu SC, Hu LH, Feng YL. Comparison of crude glycerol and analytical grade glycerol for monacolin K and pigments production by *Monascus* spp.[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(12): 37-43 (in Chinese)
- [22] Casas López JL, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Acien Fernández FG, Molina Grima E, Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(2/3): 270-277
- [23] Atlı B, Yamaç M, Yıldız Z, Isikhuemhen OS. Statistical optimization of lovastatin production by *Omphalotus olearius* (DC.) singer in submerged fermentation[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2016, 46(3): 254-260
- [24] Mohan-Kumari HP, Dhale MA, Govindaswamy V. Optimization of monacolin K production by *Monascus purpureus* MTTC 410 in submerged fermentation[J]. International Journal of Food Engineering, 2012, 8(3): 1115-1125
- [25] Chang YN, Huang JC, Lee CC, Shih IL, Tzeng YM. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(7): 889-894
- [26] Seraman S, Rajendran A, Thangavelu V. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*[J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(2/3): 266-276
- [27] Kamal S, Akhter N, Khan SG, Kiran S, Farooq T, Akram M, Shah SMA, Tahir IM, Akhlaq M, Said F, et al. Enhanced production of lovastatin by filamentous fungi through solid state fermentation[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 31(4): 1583-1589