

一种红曲霉菌株及其应用

相关申请的交叉引用

本申请要求享有于 2023 年 12 月 28 日提交的名称为“一种红曲霉菌株及其应用”的中国专利申请 202311841573.2 的优先权，该申请的全部内容通过引用并入本文中。

5 技术领域

本申请涉及微生物发酵领域，具体涉及一种红曲霉菌株、红曲、红曲饮片、红曲的制备方法、红曲提取物和药物。

背景技术

红曲是我国的传统发酵产品，主要成分不同，被应用在药品、食品、染色不同领域。
10 红曲中洛伐他汀类化合物的发现使红曲被作为天然药物中抑制胆固醇合成和降血脂的首选药物，并受到世人瞩目。

洛伐他汀类化合物种类较多，具体有洛伐他汀 (Monacolin K (MK))、洛伐他汀酸 (Acid form of Monacolin K (MKA))、洛伐他汀 J (Monacolin J (MJ))、洛伐他汀 J 酸 (Acid form of Monacolin J (MJA))、洛伐他汀 L (Monacolin J (ML)) 、洛伐他汀 L 酸 (Acid form of Monacolin
15 L (MLA))、洛伐他汀 M (Monacolin M (MM))、洛伐他汀 M 酸 (Acid form of Monacolin M (MMA))、脱氢洛伐他汀 (Dehydromonacolin K (DMK))。其中有些含量测定方法中，莫纳克林 K 是洛伐他汀和洛伐他汀酸的含量之和，为红曲的检测指标。但是，研究证明其余的洛伐他汀类化合物也具有较高的抑制胆固醇合成和降血脂活性。因此，在提高洛伐他汀和洛伐他汀酸含量的同时，提高整体洛伐他汀类化合物的含量也可以提高红曲药物活性。

20 目前红曲作为天然降脂药物的形式通常为红曲饮片，国家以及部分省市对红曲饮片的浸出物以及洛伐他汀类化合物的含量提出倡议标准，以保证红曲饮片的降脂效果。浸出物是指用水或醇性溶剂对药材和饮片中可溶性物质进行测定，以药材浸出物的含量作为其质量控制的标准，一般用于药材中的活性成分或含量很低或指标性成分不清或尚无精确的定量方法时采用。药用红曲中含有多种有效成分，具有多种药理作用，如甾醇类、 γ -氨基丁
25 酸、色素、有机酸等成分，具有调血脂、降血糖、降胆固醇、增强免疫力、抗肿瘤等功效，因此用浸出物作为质量控制，可以客观衡量红曲产品综合的药理作用。因此，红曲产品的浸出物含量和洛伐他汀类化合物的含量高低是红曲品质好坏的关键。

研究发现市售产品中浸出物、洛伐他汀和洛伐他汀酸、桔青霉素（或称桔霉素）、黄曲霉素的含量，差异较大，记录在表 1 中。

30 表 1

序号	生产厂家	批号	标准 $\geq 7.0\%$ (北京) 浸出物 (%)	洛伐他汀酸 (mg/g)	洛伐他汀 (mg/g)	桔青霉素 ($\mu\text{g/kg}$)	黄曲霉毒素 B1 ($\mu\text{g/kg}$)
----	------	----	---------------------------------	-----------------	----------------	------------------------------	----------------------------------

1	北京某中药饮片有限公司	181114008	10.5	无	无	24.5	2.1731
2	广东某中药饮片有限公司	1808571131	13.2	2.3	无	62.3	3.3776
3	北京某公司	20150314	8.9	无	无	37.965	0.4395
4	浙江某公司	20180603	5.2	1.31	1.95	12.1	0.4012

市售饮片产品存在浸出物合格，但不含活性成分洛伐他汀、洛伐他汀酸的含量，而且浸出物含量增加，桔青霉素、黄曲霉毒素有毒有害成分含量增加。或含有洛伐他汀、但浸出物含量不合格。

此外，毒性成分的含量，也影响红曲的安全性并限制其应用。

5 发明内容

本申请提供了一种红曲霉菌株、红曲、红曲饮片、红曲的制备方法、红曲提取物及药物，以提高红曲、红曲饮片或其产品中洛伐他汀类化合物的含量和浸出物的含量。

本申请的第一方面提供了一种红曲霉菌株，红曲霉菌株的拉丁学名为紫红曲霉 *Monascus purpureus*，保藏编号为 CGMCC No. 40777。

10 本申请的第二方面提供了一种红曲，采用第一方面提供的红曲霉菌株发酵得到。

在第二方面的任意实施方式中，基于红曲的干物质计，红曲中洛伐他汀类化合物的含量为 4 mg/g-40mg/g，优选为 6 mg/g-30mg/g，更优选为 7.0mg/g-22mg/g。

在第二方面的任意实施方式中，优选洛伐他汀类化合物包括洛伐他汀和洛伐他汀酸，基于红曲的干物质计，优选红曲中洛伐他汀的含量为 3.07 mg/g-13.5 mg/g，进一步优选为 7.25 mg/g-13.5 mg/g，进一步优选为 8.5 mg/g-13.5 mg/g；基于红曲的干物质计，优选红曲中洛伐他汀酸的含量为 2.0 mg/g-5.0 mg/g，进一步优选为 2.3 mg/g-4.25mg/g，进一步优选为 3.5mg/g-4.23 mg/g。

在第二方面的任意实施方式中，进一步优选洛伐他汀类化合物还包括洛伐他汀 L、洛伐他汀 M 酸和脱氢洛伐他汀，基于红曲的干物质计，优选红曲中洛伐他汀 L 的含量为 0.3 mg/g -1.33 mg/g，优选为 1.12 mg/g -1.33 mg/g，优选红曲中洛伐他汀 M 酸的含量为 0.27 mg/g -0.81 mg/g，优选为 0.72 mg/g -0.81 mg/g，优选红曲中脱氢洛伐他汀的含量为 0.2mg/g -0.78 mg/g，优选为 0.65 mg/g -0.78 mg/g。

在第二方面的任意实施方式中，更优选洛伐他汀类化合物还包括洛伐他汀 L 酸、洛伐他汀 J 和洛伐他汀 J 酸，基于红曲的干物质计，优选红曲中洛伐他汀 L 酸的含量为 0.29 mg/g -0.46 mg/g，优选为 0.41 mg/g -0.46 mg/g；优选红曲中洛伐他汀 J 的含量为 0.11 mg/g -0.43 mg/g，优选为 0.41 mg/g -0.43 mg/g；优选红曲中洛伐他汀 J 酸的含量为 0.16 mg/g -0.28 mg/g，优选为 0.27 mg/g -0.28 mg/g。

在第二方面的任意实施方式中，基于红曲的干物质计，优选红曲中浸出物的含量大于7%，优选浸出物含量为7.5%-30%；优选浸出物含量为8%-30%；优选浸出物含量为10%-29%；优选浸出物含量为15%-25%；优选浸出物含量为17.4%-23.6%。

本申请的第三方面提供了一种红曲饮片，采用第二方面任意实施方式提供的红曲制备而成。

本申请的第四方面提供了一种红曲的制备方法，制备方法包括采用第一方面提供的红曲酶菌株为菌种进行发酵制备红曲。

在第四方面的任意实施方式中，上述制备方法包括：采用液体培养基对红曲霉菌株进行扩大培养，得到液体菌种；将液体菌种接种在固体培养基中进行发酵，得到含有红曲的发酵产物。

在第四方面的任意实施方式中，液体培养基包括葡萄糖、蛋白胨、磷源和微量元素。

在第四方面的任意实施方式中，优选地，液体培养基中葡萄糖的含量为30 g/L-150 g/L；优选地，液体培养基中蛋白胨的含量为2 g/L-30 g/L；优选地，液体培养基中磷源的含量为0.5 g/L-7 g/L，优选地，磷源包括 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 。

在第四方面的任意实施方式中，优选地，微量元素包括镁元素、钙元素，进一步优选地采用 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供镁元素，液体培养基中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的含量为0.01 g/L-1.2 g/L，进一步优选地采用 CaCl_2 提供钙元素，液体培养基中 CaCl_2 的含量0.01 g/L-0.8 g/L。

在第四方面的任意实施方式中，优选地，液体培养基的液体包括淀粉水溶液。

在第四方面的任意实施方式中，固体培养基包括大米、麸皮、蛋白胨、葡萄糖和水。

在第四方面的任意实施方式中，优选地，以重量份计，固体培养基包括大米100份、麸皮6份-9份、蛋白胨2份-8份、葡萄糖1.4份-3.0份；优选固体培养基还包括乙醇，进一步优选乙醇相对于固体培养基的干物质的质量含量为0.2%-1%更优选为0.35%-0.7%。

在第四方面的任意实施方式中，优选地，固体培养基还包括豆粉，进一步优选豆粉的重量份为2份-8份，进一步优选豆粉选自青豆粉、绿豆粉、黑豆粉、红豆粉、黄豆粉中一种或多种。

在第四方面的任意实施方式中，优选大米采用蒸制、煮制或热浸，进一步优选为蒸制或热浸。

在第四方面的任意实施方式中，优选蒸制温度为90°C-120°C，蒸制的时间为25 min-50 min，优选为35 min-45 min。

在第四方面的任意实施方式中，优选蒸制时所添加水相对大米的质量添加比例为30%-70%，更优选为40%-55%。

在第四方面的任意实施方式中，优选热浸时，热浸温度为90°C-100°C，热浸时间为6h-18h，更优选为10h-14h。

在第四方面的任意实施方式中，将液体菌种接种在固体培养基中进行发酵的过程包括：将固体培养基进行灭菌处理后，将液体菌种接种在固体培养基中，优选地，灭菌处理的温度为 120°C-125°C，时间为 30 min -90min；将接种后的固体培养基在 30°C-36°C、相对湿度 40%-80%的环境中进行一级培养 48h-120h，得到一级培养物；将二级培养物在 18°C-25°C、相对湿度为 40%-80%的环境中进行二级培养 7 天-30 天，优选 7 天-20 天，得到发酵后体系。

在第四方面的任意实施方式中，在一级培养持续 48h-120h 时，向固体培养基中加入水并将固体培养基进行搅拌处理，水的加入量为固体培养基的干物质质量的 5%-15%，优选 6%-10%。

本申请的第五方面提供了一种红曲提取物，采用第二方面的任意实施方式提供的红曲经水或乙醇提取制备而成。

本申请的第六方面提供了一种药物，包括红曲或红曲提取物，该红曲包括第二方面的任意实施方式提供的红曲、或第三方面的任意实施方式提供的红曲饮片、红曲提取物包含第五方面的任意实施方式提供的红曲提取物，药物选自降脂药物、降压药物、降血糖药物和/或抗癌药物。

利用本申请提供的红曲霉菌株发酵制备的红曲产品中，洛伐他汀类化合物的含量和浸出物含量均较多，并含有多羟基甾醇、黄酮类成分，而且安全性好，从而提高了红曲产品的药物活性和品质。

生物材料保藏信息

本发明提供的红曲霉菌株，已于 2023 年 8 月 4 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，邮编：100101，保藏编号为：CGMCC No. 40777，培养物名称是紫红曲霉，拉丁命名是 *Monascus purpureus*。

附图说明

为了更清楚地说明本申请实施例的技术方案，下面将对本申请实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面所描述的附图仅仅是本申请的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据附图获得其他的附图。

图 1 示出了本申请的红曲霉菌种筛选过程中不同化学诱变时间的致死率。

图 2 示出了本申请的红曲霉菌种筛选过程中不同紫外诱变时间的致死率。

图 3 示出了本申请的红曲霉菌落形态及显微特征图。

图 4 示出了本申请实施例 5 中 15 天、26 天所得到红曲饮片的指纹图谱。

图 5 示出了本申请实施例 5 中 26 天所得红曲饮片的黄曲霉毒素的液相色谱图。

图 6 示出了本申请实施例 5 中 26 天所得红曲饮片的桔青霉素的液相色谱图。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本申请的实施方式作进一步详细描述。以下实施例的详细描述用于示例性地说明本申请的原理，但不能用来限制本申请的范围，即本申请不限于所描述的实施例。

- 5 如本申请背景技术所分析的，现有技术的红曲产品中洛伐他汀类化合物的含量和浸出物含量不能同时提升，为了解决该问题，本申请提供了一种红曲霉菌株、红曲、红曲饮片及红曲的制备方法。

在本申请的第一种实施方式中，提供了一种红曲霉菌株，红曲霉菌株的拉丁学名为紫红曲霉 *Monascus purpureus*，保藏编号为 CGMCC No. 40777。

- 10 利用本申请提供的红曲霉菌株发酵制备的红曲产品中，洛伐他汀类化合物的含量和浸出物含量均较多，并含有多羟基甾醇、黄酮类成分，而且安全性好，从而提高了红曲产品的药物活性和品质。

在一些实施方式中，上述红曲霉菌株的 18S rRNA 的序列如 SEQ ID No. 1 所示，包括 18S rRNA 片段，ITS 1、5.8S rRNA、ITS2 的全序列及 28S rRNA 区序列片段：

- 15 5'-TCATTACCGAGTGC GGGTCCCCTTCGTGGGACCCAACCTCCCACCCGTGATTA
TTGTACCTCCTGTTG TTCGGCGCGGCCCCCGGGGCCCGCCGAGACATCTTCTCGA
ACGCTGTCTTTGAAAAGGATTGCTGTCTGAGTAAACATACCAAATCGGTAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
20 GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCCCTCAAGCGCGGCTTGT
GTGTTGGGCCCGCCGTCCCCTGCGCCTCCGGGCAAGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAG
TGCGGCGCGCGCTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCAGTAGGT
CGGGCCGGGGCCTTTGCCCTCTCCAACCTTTTTTTCCTTAGGTTGACCTCGGATCAGG
TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA-3'.

- 25 在本申请的第二实施方式中，提供了一种红曲，该红曲采用上述第一实施方式提供的红曲霉菌株发酵得到。该红曲中洛伐他汀类化合物的含量和浸出物含量均较高。而且本发明的研究发现，在浸出物含量提高时，仍未检出有毒有害成分，比如未检出桔青霉素和黄曲霉毒素。

- 30 此外该红曲可作为功能性红曲或药物红曲的原料。该红曲可以作为红曲药材、饮片、各种原料，直接使用或经过处理后使用。

在一些实施方式中，基于红曲的干物质计，红曲中洛伐他汀类化合物的含量为 4 mg/g-40mg/g，优选为 6 mg/g-30mg/g，更优选为 7.0mg/g-22 mg/g。

- 35 在一些实施方式中，优选洛伐他汀类化合物包括洛伐他汀和洛伐他汀酸，基于红曲的干物质计，优选红曲中洛伐他汀的含量为 3.07 mg/g-13.5 mg/g，进一步优选为 7.25 mg/g-13.5 mg/g，进一步优选为 8.5 mg/g-13.5 mg/g；优选红曲中洛伐他汀酸的含量为 2.0 mg/g-5.0 mg/g，进一步优选为 2.3 mg/g-4.25mg/g，进一步优选为 3.5mg/g-4.23 mg/g。

5 在一些实施方式中,进一步优选洛伐他汀类化合物还包括洛伐他汀 L、洛伐他汀 M 酸和脱氢洛伐他汀,基于红曲的干物质计,优选红曲中洛伐他汀 L 的含量为 0.3 mg/g-1.33 mg/g,优选为 1.12 mg/g -1.33 mg/g,优选红曲中洛伐他汀 M 酸的含量为 0.27 mg/g -0.81 mg/g,优选为 0.72 mg/g -0.81 mg/g,优选红曲中脱氢洛伐他汀的含量为 0.2mg/g -0.78 mg/g,优选为 0.65 mg/g -0.78 mg/g;更优选洛伐他汀类化合物还包括洛伐他汀 L 酸、洛伐他汀 J 和洛伐他汀 J 酸,优选红曲中洛伐他汀 L 酸的含量为 0.29 mg/g -0.46 mg/g,优选为 0.41 mg/g -0.46 mg/g,优选红曲中洛伐他汀 J 的含量为 0.11 mg/g -0.43 mg/g,优选为 0.41 mg/g -0.43 mg/g,优选红曲中洛伐他汀 J 酸的含量为 0.16 mg/g -0.28 mg/g,优选为 0.27 mg/g -0.28 mg/g。

10 很多红曲产品中不含或仅含微量的洛伐他汀 J 酸无法检测含量,本发明红曲具有一定的该成分。

在一些实施方式中,基于红曲的干物质计,优选红曲中浸出物的含量大于 7%,优选浸出物含量为 7.5%-30%;优选浸出物含量为 8%-30%;优选浸出物含量为 10%-29%;优选浸出物含量为 15%-25%;优选浸出物含量为 17.4%-23.6%

15 在本申请的第三实施方式中,提供了一种红曲饮片,该红曲饮片采用上述第二实施方式提供的任意红曲制备而成。

在本申请的第四实施方式中,提供了一种红曲的制备方法,该制备方法包括采用第一实施方式提供的红曲霉菌株为菌种发酵制备红曲。

20 利用本申请提供的红曲霉菌株发酵制备的红曲产品中,洛伐他汀类化合物的含量和浸出物含量均较高,从而提高了红曲产品的药物活性。

在本申请的一些实施方式中,上述制备方法包括:采用液体培养基对红曲霉菌株进行扩大培养,得到液体菌种;将液体菌种接种在固体培养基中进行发酵,得到含有红曲的发酵产物。

先对红曲霉菌株进行扩大培养,在进行发酵培养,提高了发酵培养效率。

25 对红曲霉菌株进行扩大时,所用的液体培养基组成可以参考常规红曲霉菌株扩大培养的液体培养基组成,在一些实施方式中,上述液体培养基包括葡萄糖、蛋白胨、磷源和微量元素;以提高扩大培养效率。在一些实施方式中,优选地,液体培养基中葡萄糖的含量为 30 g/L -150 g/L;优选地,液体培养基中蛋白胨的含量为 2 g/L -30g/L;优选地,液体培养基中磷源的含量为 0.5 g/L-7 g/L,优选地,磷源包括 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$;优选地,微量元素包括镁元素、钙元素,进一步优选地采用 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供镁元素,液体培养基中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的含量为 0.01 g/L -1.2g/L,进一步优选地采用 CaCl_2 提供钙元素,液体培养基中 CaCl_2 的含量 0.01 g/L -0.8 g/L;以提高液体培养基利用率。优选地,液体培养基的液体包括淀粉水溶液,比如马铃薯水煮汁或马铃薯淀粉的水溶液。

35 对液体菌种进行发酵培养时,其固体培养基组成也可参考常规红曲霉发酵培养用的固体培养基,在一些实施方式中,上述固体培养基包括大米、麸皮、蛋白胨、葡萄糖和水。为了优化固体培养基的营养组分组成,进一步提高洛伐他汀类化合物的产量和浸出物含量,在一些实施方式中,优选地,以重量份计,固体培养基包括大米 100 份、麸皮 6 份-9 份、

蛋白胨 2 份-8 份、葡萄糖 1.4 份-3.0 份。

在一些实施方式中，固体培养基还包括乙醇，进一步优选乙醇相对于固体培养基的干物质的质量含量为 0.2%-1%，优选为 0.35%-0.7%。其中乙醇用于抑制杂菌、微量醇性代谢因子的作用。

- 5 在本申请一些实施方式，固体培养基还包括豆粉，优选豆粉的重量份为 2 份-8 份，进一步优选豆粉选自青豆粉、绿豆粉、黑豆粉、红豆粉、黄豆粉中一种或多种，以进一步提高洛伐他汀类化合物的含量和浸出物含量。

10 上述大米可以选用大米粉或大米粒。在一些实施方式中，为了提高大米的发酵效率，优选大米采用蒸制、煮制、热浸或冷浸，进一步优选为蒸制或热浸。上述形式的大米经过熟化后更容易被红曲霉利用，因此更有利于提高发酵效率。

比如将大米和水以水和大米的质量比为 (30-120): 100 的比例混合 (上述固体培养基中大米的质量百分含量以大米的干重计) 后进行蒸制、煮制、热浸或冷浸。煮制、热浸或冷浸后沥干水分后使用。

- 15 在一些实施方式中，当大米采用蒸制、煮制或热浸时，水和大米的重量比为 (30-70):100。比如蒸制时水相对大米的质量添加比例为 30%-70%。

在一些实施方式中，蒸制温度为 90°C-120°C (比如 90°C、100°C、110°C、120°C)，水相对大米的质量添加比例为 30%-70%，更优选为 40%-55% (比如 40%、45%、50% 或 55%)，蒸制的时间为 25 min -50 min (比如为 25min、30min、35min、40min、45min 或 50min)，优选为 35 min -45min。

- 20 在一些实施方式中，优选热浸温度为 50°C-100°C (比如 60°C、70°C、80°C、85°C、90°C、95°C)，优选热浸温度为 90°C-100°C，热浸时间为 6h-18h，优选为 10h-14h。

25 在一些实施方式中，将液体菌种接种在固体培养基中进行发酵的过程包括：将固体培养基进行灭菌处理后，将液体菌种接种在固体培养基中，优选地，灭菌处理的温度为 120°C-125°C，时间为 30 min -90min；将接种后的固体培养基在 30°C-36°C、相对湿度 40%-80% 的环境中进行一级培养 48h-120h，得到一级培养物；将一级培养物在 18°C-25°C、相对湿度为 40%-80% 的环境中进行二级培养 7 天-30 天，优选 7 天-20 天，更优选 10 天-20 天，得到发酵后体系。经过上述发酵过程的培养，可以充分提高洛伐他汀类化合物及浸出物的含量，而且减少桔青霉素和黄曲霉素 B1 的产出，提高红曲的综合品质。

- 30 经过试验，在一些实施方式中，在一级培养持续 72h-120h 时，向固体培养基中加入水补充发酵过程水分，水的加入量为固体培养基的干物质质量的 5%-15%。在高温培养过程中或高温培养结束时加水，进一步提高了红曲中洛伐他汀类物质和浸出物含量。

35 在一些实施方式中，发酵后上述制备方法还包括对发酵产物进行干燥的过程，该过程不仅是去除水分的过程，在该过程中也存在部分酸式成分比如洛伐他汀酸向内酯式洛伐他汀转化的平衡过程，如果条件剧烈即干燥温度过高，酸式和内酯式或降解或转化为不可逆的脱水洛伐他汀，对含量有影响，其他成对的他汀类成分变化类似，因此，在一些实施方

式中，干燥的温度为 50°C-100°C，优选为 60-70°C，干燥的时间为 6h-15h。

在一些实施方式中，上述红曲饮片采用上述第二种实施方式提供的制备方法制备而成。

本申请的第五实施方式提供了一种红曲提取物，采用第二实施方式提供的任意一种红曲经水或乙醇提取制备而成。

- 5 本申请的第六实施方式提供了一种药物，包括红曲或红曲提取物，该红曲包括第二实施方式提供的红曲、或第三实施方式提供的红曲饮片、红曲提取物包含第五实施方式提供的红曲提取物，药物选自降脂药物、降压药物、降血糖药物和/或抗癌药物。

由于本申请的红曲中浸出物和洛伐他汀含量均较高，因此具有较高的降脂、降血糖和/或降压效果。

- 10 以下将结合实施例，进一步说明本申请的有益效果，但本发明范围不限于这些实施例。

实验仪器设备：ZHWY-2102 恒温培养振荡器：上海智诚有限公司；LRH-250-HSE 恒温恒湿培养箱：珠江泰宏君仪器；BXM-110VE 立式压力蒸汽灭菌器：博讯；WGL-230B 电热鼓风干燥箱：天津市泰斯特仪器有限公司；FW80 高速万能粉碎机：天津市泰斯特仪器有限公司；

- 15 液相色谱仪：型号为 LC20AT，日本岛津公司，UV 检测器。色谱柱：以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Waters Symmetry C18，3.9×150mm，5μm）。电子天平：XS205DU，METTLER；超纯水仪：PALL CascadaIX；超声波清洗机：KH-500DB 昆山合创超声仪器有限公司；快速水分测定仪，型号 MA50，赛多利斯；

- 20 实验材料及试剂：乙腈：色谱级，Fisher 公司（Lot 211921）；三氟乙酸：色谱级，Fisher（Lot 145624）；95%乙醇：AR，国药集团化学试剂公司；纯化水：自制；甲醇：色谱纯，Fisher（批号 157751）。对照品洛伐他汀（Monacolin K，中检院，纯度大于 99%，批号：100600）。1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍（MNNG）：美国 Sigma 公司。

红曲霉菌种筛选过程

- 25 菌悬液制备方法：将初始菌株（编号 WP03）接种于 PDA 培养基上，29°C 培养 7d 后，用接种环将菌丝及孢子刮下，转移至装有 20mL 无菌水的三角瓶中，三角瓶底铺满玻璃珠，180r/min 震荡 20min，后经过滤，制成孢子菌悬液，稀释使孢子浓度为 10⁶ 个/mL 的菌悬液。

- 30 化学诱变：MNNG 溶液的制备，称取 50mgMNNG，置容量瓶中，加丙酮至 5ml，配成浓度为 1%母液。取浓度为 10⁶ 个/mL 的孢子悬浮液，0.9、0.8mL，加入 1%MNNG 母液 0.1mL、0.2mL（浓度分别为 0.1%、0.2%），分别处理 10、30、60、90min 后，按梯度稀释，分别取 0.1mL 菌浮液涂平板，29°C 培养 3d-5d 进行孢子计数，以未经过处理做对照计算致死率（致死率见图 1）。取最佳致死条件 0.2%MNNG 处理 90min 的菌种进行接下的紫外诱变。

- 35 致死率/%=（对照平板上长出来的菌落数-诱变平板上长出来的菌落数）/对照平板菌落数。

紫外诱变：取 MNNG 诱变菌种按上述方法制备 10⁶ 个/mL 孢子菌悬液，分别取 5mL

的孢子悬浮液置 20W 紫外灯下 20cm 处，分别照射 0s、30s、60s、90s、120s、180s，同上方法涂布平板，以未经照射处理做对照计算致死率（致死率见图 2），最终紫外最优照射时间 120S。

结果经过上述化学紫外反复诱变，最终得到的到本发明红曲霉突变菌株。红曲霉突变菌株，保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），其保藏编号为 CGMCC No. 40777。

上述红曲霉菌株的 18S rRNA 的序列如 SEQ ID No.1 所示，包括 18S rRNA 片段，ITS I、5. 8S rRNA、ITS2 的全序列及 28S rRNA 区序列片段：

5'-TCATTACCGAGTGC GGGTCCCTTTCGTGGGACCCAACCTCCCACCCGTGATTA
TTGTACCTCCTGTTG TTCGGCGCGGCCCCCGGGGCCCGCCGGAGACATCTTCTCGA
ACGCTGTCTTTGAAAAGGATTGCTGTCTGAGTAAACATACCAAATCGGTATAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCCCTCAAGCGCGGCTTGT
GTGTTGGGGCCCGCTCCCCTGCGCCTCCGGGCAAGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAG
TGGCGGCGCCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCAGTAGGT
CGGGCCGGGGCCTTTGCCCTCTCCAACCTTTTTTTTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGG
TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA-3'.

该红曲霉菌落形态及显微特征如图 3 所示。

送检菌种在麦芽汁琼脂培养基上生长较快，25℃ 黑暗条件下培养 10 天，菌落直径 40~45 mm，气生菌丝茂盛，初期色浅（如图 3 的左上图），后期橙红色；菌落背面暗橙色，色素溶于培养基中。

分生孢子大量产生，分生孢子梗特化不明显，直或稍弯曲，分生孢子球形，无色，壁略粗糙，基部平截，串生，5.5~10.1 μm（如图 3 的右上图、左下图和右下图）。

菌种稳定性研究

该菌种经传代 20 次后，所得红曲饮片中洛伐他汀和洛伐他汀酸的含量基本保持不变，具体见表 2，说明发明菌株稳定性较好（采用实施例 5 的发酵条件，培养周期 23 天）。

表 2

样品类型	MK(mg/g)	MKA(mg/g)
新菌种 1 代	7.98	1.83
传代 20 次后	7.92	1.85

实施例 1

将红曲霉菌株（保藏编号为 CGMCC No. 40777，以下称为红曲霉菌株 1）和初始菌株（WP03）按照 5%（菌种斜面菌悬液体积/液体培养基体积）接种于液态发酵培养基中，液态发酵培养基为葡萄糖 85 g/L，蛋白胨 15 g/L，NH₄H₂PO₄ 1.5 g/L，MgSO₄·7H₂O 0.8 g/L，CaCl₂ 0.2g/L；以蒸馏水配制成发酵培养基。发酵温度为 30℃；发酵时间为 40-48 小时，30℃ 条件下，摇床培养 2 天。

吸取液体种子于固体培养基中，搅拌混匀。固体培养基：大米、在室温（20℃-25℃）

浸泡（14 小时），水与大米的质量比为 120:100，沥干水分，按比例加入营养成分后（组成为大米 100 份（加水前）、麸皮 8 份、蛋白胨 2 份、葡萄糖 2 份）搅拌均匀；在发酵温度为在 30℃-36℃、相对湿度 40%-80%的环境中进行一级培养 5 天，从第 6 天开始在 18℃-25℃、相对湿度为 40%-80%的环境中进行二级培养至 25 天，得到发酵物。70℃温度进行干燥，得到红曲。洛伐他汀含量测定参照药典 2020 版记载。

浸出物测定方法为照醇溶性浸出物测定法（中国药典 2020 年版通则 2201）项下的热浸法测定，用 70%乙醇作溶剂。

桔青霉素检测（检测限 5ppb），参照国家标准--GB 5009.222-2016《食品中桔青霉素的测定》中的第一法（免疫亲和柱净化-高效液相色谱法）检测桔霉素（同“桔青霉素”）含量。

其中检测黄曲霉毒素的方法参考药典黄曲霉毒素测定法（中国药典 2020 年版四部通则 2351--液相色谱法/光化学衍生法）。

采用高效液相检测各他汀类物质含量，检测方法如下：液相色谱条件：以乙腈为流动相 A，以 0.1%(体积分数)三氟乙酸(T F A)水溶液为流动相 B，梯度洗脱，0~28min，流动相 A 35%和流动相 B 65%（体积分数，下同）；28~30min，线性梯度流动相 A 从 75%降低到 35%，流动相 B 从 25%增加到 65%；30~35min，回到初始条件流动相 A 35%和流动相 B 65%。流速 1.0ML/min，柱温 30℃，进样 20μL，PDA 设置 200~350，检测波长：237nm。）。

测试结果记录在表 3 中。

表 3

	洛伐他汀含量 (mg/g)	洛伐他汀酸 (mg/g)	总洛伐他汀 (mg/g)	桔青霉素 (mg/g)	黄曲霉毒 (mg/g)
初始菌株	0.7	0.45	1.23	0	0
红曲霉菌株 1	1.5	0.81	3.2	0	0

本发明菌株其洛伐他汀含量约为初始菌株的 2.14 倍，且不含桔青霉素、黄曲霉毒素。

以下采用红曲霉菌株 1 进行发酵，对固体培养基所用米的处理方式、固体培养基处方、培养工艺进行考察。

实施例 2

固体培养基的大米分别如下：

热浸大米：将大米与高温水（80℃）混合，分别浸泡 4h、12h 和 18h，维持温度在 70℃以上，水与大米的质量比为 120:100。

煮米：大米与 100℃热水混合，并持续加热，保持温度在 90℃-100℃持续 2min，水与大米的质量比为 120:100。

低温浸泡：加入 20-25℃的水，浸泡 14h，水与大米的质量比为 120:100。

按实施例 1 的发酵条件进行发酵，对比发酵后红曲中浸出物和洛伐他汀含量。具体见表 4。

表 4

	煮米	热浸大米 80℃			低温浸泡
处理方式	2min	浸泡 4h	浸泡 12h	浸泡 18h	14h
醇浸出物 (%)	10.8	2.9	2.8	3.0	2.4
洛伐他汀含量(mg/g)	2.7	1.5	1.7	1.87	0.81

可见，热浸和煮米效果较好，可明显提高洛伐他汀的含量，尤其以含有煮米的固体培养基在相同的发酵条件下得到的红曲中洛伐他汀的含量为室温浸泡大米的 3.33 倍，浸出物的含量提升 4.5 倍，但试验中发现大米在煮制过程中比较粘稠，发酵中结块，发酵不均匀，因此米的处理方式主要考虑沸水浸或蒸制。

实施例 3

采用前述实施例 2 浸泡 18 小时的热浸大米作为固体培养基的大米，考察固体培养基中醇的作用以及一级培养过程的 5 天内增加了补水的工艺。表 5 中示出了蛋白胨和乙醇含量，以及补水量（补水%为所补水为固体培养基的干物质质量的含量）。

按实施例 1 的发酵条件进行发酵，对比发酵后红曲中浸出物和洛伐他汀含量。具体见表 5。

表 5

	处方组成					
蛋白胨量（份）	2	2	2	2	2	2
乙醇含量（%）	0.7	0.7	0.7	0.7	0.35	0
补水（%）	10	8	5	不补	不补	不补
洛伐他汀含量 (mg/g)	4.4	5.1	3.9	3.5	3.2	1.87
洛伐他汀酸 (mg/g)	2.1	2.0	1.9	1.5	1.7	1.4
浸出物含量（%）	7.8	8.3	7.1	4.5	3.9	3.0

结果显示，当使用乙醇或一级培养过程加水均可以增加洛伐他汀、洛伐他汀酸以及浸出物的含量。

实施例 4

固体培养基中含有 0.7%的乙醇（相对于干物质的重量含量），采用不补水工艺，对浸泡米饭、蒸米饭进行实验。

其中，浸泡米饭的浸泡条件：浸泡温度 90℃，加水 1.2 倍量，时间 18 小时。

蒸米饭采用的条件：

条件 1：温度 110℃、加水量为大米重的 45%，时间 40 分钟；

条件 2：温度 90℃、加水量为大米重的 45%，时间 50 分钟；

条件 3: 温度 120℃、加水量为大米重的 45%，时间 25 分钟；
条件 4: 温度 110℃、加水量为大米重的 30%，时间 40 分钟；
条件 5: 温度 110℃、加水量为大米重的 70%，时间 40 分钟。
另外，采用初始菌株以及条件 1 进行蒸米。

5 按实施例 1 的发酵条件进行发酵，对比发酵后红曲中浸出物和洛伐他汀含量。具体见表 6。

表 6

试验分 组	MK (mg/g)	MKA (mg/g)	MK+MKA (mg/g)	总他汀 (mg/g)	浸出物 (%)
浸泡	3.80	1.77	5.57	6.75	8.4
条件 1	5.07	2.18	7.25	9.13	9.2
条件 2	4.57	2.35	6.92	8.68	8.9
条件 3	4.44	2.43	6.87	8.51	8.7
条件 4	4.06	2.5	6.56	7.89	7.9
条件 5	4.16	2.59	6.75	8.19	8.2

结果蒸米饭方式比浸泡工艺稳定，且洛伐他汀含量更高。

此外，测试条件 4、条件 5 和初始菌株发酵所得红曲中他汀的含量，记录如下表 7 中。

表 7

10

对 应 条 件	MJA (mg/ g)	MJ (mg/ g)	MLA (mg/ g)	MKA (mg/ g)	ML (mg/ g)	MMA (mg/ g)	MK (mg/ g)	DMK (mg/ g)	MK+M KA (mg/g)	总他 汀 (mg/ g)
4	0.16	0.11	0.29	2.5	0.3	0.27	4.06	0.2	6.56	7.89
5	0.18	0.13	0.29	2.59	0.32	0.31	4.16	0.21	6.75	8.19
初 始 菌 株	0.03	0.05	0.09	1.02	0.21	0.08	2.76	0.16	3.78	4.41

实施例 5

15 固体培养基中的大米处理方式为例 4 的条件 1，按实施例 1 的发酵条件进行发酵的基础上，采用一级培养过程补水 8%工艺，对培养天数进行考察，从 15 天开始其外观、含量、浸出物、桔青霉素、黄曲霉毒素 B1 等项目均符合各个省最严的炮规的要求。对比发酵后红曲中浸出物和洛伐他汀含量。结果记录在表 8 中。

表 8

	MK (mg/g)	MKA (mg/g)	MK+MK A (mg/g)	总他汀 (mg/g)
15 天	3.07	2.18	5.25	6.63
20 天	4.29	2.39	6.68	8.22
26 天	7.25	3.31	9.56	12.57
浸出物%	7.9% (15 天)			
桔青霉素 (μg/kg, 最低检出限 5ppb) : 0				
黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) (μg/kg) : 0				

可见, 本申请的红曲菌株 1 可以明显缩短发酵周期缩短至 15 天洛伐他汀等成分含量已较高, 如不同用途用红曲, 发酵天数可以更短。

另外, 上述 15 天、26 天所得红曲饮片的指纹图谱记录在图 4 中, 采用药典 2020 版红曲指纹图谱测定方法检测。研究发现本发明红曲成分较多, 除了包括他汀类化合物外, 还包括黄酮类化合物、甾醇类化合物、酰胺类化合物、色素等成分。

而且, 图 5 和图 6 示出了 26 天得到的红曲饮片的黄曲霉毒素和桔青霉素的液相色谱图, 其红曲供试液即为待测红曲饮片的供试液, 对应黄曲霉毒素和桔青霉素的位置未出峰, 证明各自含量为 0。

10 实施例 6

固体培养基中的大米处理方式为实施例 4 的条件 1, 在按照实施例 1 的发酵条件进行发酵的基础上, 一级培养过程采用补水工艺 (将灭菌水加入培养容器中搅拌) 补水 8%, 培养时间为 30 天。调整固体培养基中蛋白胨、青豆粉或绿豆粉的加入量 (具体见表 9)。

对比发酵后红曲饮片中浸出物和洛伐他汀含量。具体见表 9。

15 表 9

组号	1	2	3	4	5	6
	蛋白胨 8 份	青豆粉 2 份、蛋白胨 8 份	青豆粉 5 份、蛋白胨 5 份	青豆粉 8 份、蛋白胨 2 份	青豆粉 8 份	绿豆粉 5 份、蛋白胨 5 份
MKA mg/g	2.86	4.23	4.23	3.50	2.20	4.16
MK mg/g	3.31	2.33	12.08	8.43	9.12	13.1
MK+MKA(mg/g)	6.17	6.56	16.31	11.93	11.32	17.26
总洛伐他汀 (mg/g)	7.17	7.77	19.9	15.17	14.93	21.35
浸出物%	7.9	8.5	24.5	7.8	17.4	23.6

结果显示当固体培养基处方中青豆粉用量为 5 份、蛋白胨用量为 5 份时, 洛伐他汀含量为单独应用蛋白胨时的 3.19 倍, 洛伐他汀酸为单独应用蛋白胨时的 1.53 倍。另外黑豆、红豆、黄豆也可组合或单独替换使用。

另外，检测表 9 中第 3 组和第 6 组所得红曲饮片中 9 中种洛伐他汀的含量，记录在表 10 中

表 10

	MJA (mg/ g)	MJ (mg/ g)	MLA (mg/ g)	MKA (mg/ g)	ML (mg/ g)	MMA (mg/ g)	MK (mg/ g)	DMK (mg/ g)	MK+M KA (mg/g)	总他 汀 (mg/ g)
3	0.27	0.41	0.41	4.23	1.12	0.72	12.08	0.65	16.31	19.90
6	0.28	0.43	0.46	4.16	1.33	0.81	13.10	0.78	17.26	21.35

5 需要说明的是，本申请不限于上述实施方式。上述实施方式仅为示例，在本申请的技术方案范围内具有与技术思想实质相同的构成、发挥相同作用效果的实施方式均包含在本申请的技术范围内。此外，在不脱离本申请主旨的范围内，对实施方式施加本领域技术人员能够想到的各种变形、将实施方式中的一部分构成要素加以组合而构筑的其它方式也包含在本申请的范围内。

10

权 利 要 求

1. 一种红曲霉菌株，其特征在于，所述红曲霉菌株的拉丁学名为紫红曲霉 *Monascus purpureus*，保藏编号为 CGMCC No. 40777。
2. 一种红曲，其特征在于，采用权利要求 1 所述的红曲霉菌株发酵得到。
3. 根据权利要求 2 所述的红曲，其特征在于，基于所述红曲的干物质计，所述红曲中洛伐他汀类化合物的含量为 4 mg/g-40mg/g，优选为 6 mg/g-30mg/g，更优选为 7.0mg/g-22mg/g；

优选所述洛伐他汀类化合物包括洛伐他汀和洛伐他汀酸，基于所述红曲的干物质计，优选所述红曲中洛伐他汀的含量为 3.07 mg/g-13.5 mg/g，进一步优选为 7.25 mg/g-13.5 mg/g，进一步优选为 8.5 mg/g-13.5 mg/g；基于所述红曲的干物质计，优选所述红曲中洛伐他汀酸的含量为 2.0 mg/g-5.0 mg/g，进一步优选为 2.3 mg/g-4.25mg/g，进一步优选为 3.5mg/g-4.23 mg/g；

进一步优选所述洛伐他汀类化合物还包括洛伐他汀 L、洛伐他汀 M 酸和脱氢洛伐他汀，基于所述红曲的干物质计，优选所述红曲中所述洛伐他汀 L 的含量为 0.3 mg/g-1.33 mg/g，优选为 1.12 mg/g-1.33 mg/g，优选所述红曲中所述洛伐他汀 M 酸的含量为 0.27 mg/g-0.81 mg/g，优选为 0.72 mg/g-0.81 mg/g，优选所述红曲中所述脱氢洛伐他汀的含量为 0.2mg/g-0.78 mg/g，优选为 0.65 mg/g-0.78 mg/g；

更优选所述洛伐他汀类化合物还包括洛伐他汀 L 酸、洛伐他汀 J 和洛伐他汀 J 酸，基于所述红曲的干物质计，优选所述红曲中所述洛伐他汀 L 酸的含量为 0.29 mg/g-0.46 mg/g，优选为 0.41 mg/g-0.46 mg/g；优选所述红曲中所述洛伐他汀 J 的含量为 0.11 mg/g-0.43 mg/g，优选为 0.41 mg/g-0.43 mg/g；优选所述红曲中所述洛伐他汀 J 酸的含量为 0.16 mg/g-0.28 mg/g，优选为 0.27 mg/g-0.28 mg/g。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的红曲，其特征在于，基于所述红曲的干物质计，优选所述红曲中浸出物的含量大于 7%，优选浸出物含量为 7.5%-30%；优选浸出物含量为 8%-30%；优选浸出物含量为 10%-29%；优选浸出物含量为 15%-25%；优选浸出物含量为 17.4%-23.6%。
5. 一种红曲饮片，其特征在于，采用权利要求 2 至 4 中任一项所述的红曲制备而成。
6. 一种红曲的制备方法，所述制备方法包括采用权利要求 1 所述的红曲霉菌株为菌种进行发酵制备红曲。
7. 根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括：

采用液体培养基对红曲霉菌株进行扩大培养，得到液体菌种；

将所述液体菌种接种在固体培养基中进行发酵，得到含有红曲的发酵产物。
8. 根据权利要求 7 所述的制备方法，其特征在于，所述液体培养基包括葡萄糖、蛋白胨、磷源和微量元素；

优选地,所述液体培养基中所述葡萄糖的含量为 30 g/L -150 g/L;优选地,所述液体培养基中所述蛋白胨的含量为 2 g/L -30g/L;优选地,所述液体培养基中所述磷源的含量为 0.5 g/L-7 g/L,优选地,所述磷源包括 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$;

优选地,所述微量元素包括镁元素、钙元素,进一步优选地采用 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 提供镁元素,所述液体培养基中所述 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的含量为 0.01 g/L -1.2g/L,进一步优选地采用 CaCl_2 提供钙元素,所述液体培养基中所述 CaCl_2 的含量 0.01 g/L -0.8 g/L;

优选地,所述液体培养基的液体包括淀粉水溶液。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的制备方法,其特征在于,所述固体培养基包括大米、麸皮、蛋白胨、葡萄糖和水;

优选地,以重量份计,所述固体培养基包括大米 100 份、麸皮 6 份-9 份、蛋白胨 2 份-8 份、葡萄糖 1.4 份-3.0 份;优选所述固体培养基还包括乙醇,进一步优选所述乙醇相对于所述固体培养基的干物质的质量含量为 0.2%-1%更优选为 0.35%-0.7%;

优选地,所述固体培养基还包括豆粉,进一步优选所述豆粉的重量份为 2 份-8 份,进一步优选所述豆粉选自青豆粉、绿豆粉、黑豆粉、红豆粉、黄豆粉中一种或多种;

优选所述大米采用蒸制、煮制或热浸,进一步优选为蒸制或热浸;

优选蒸制温度为 90°C-120°C,蒸制的时间为 25 min -50 min,优选为 35 min -45min;

优选蒸制时所添加水相对大米的质量添加比例为 30%-70%,更优选为 40%-55%;

优选热浸时,热浸温度为 90°C-100°C,热浸时间为 6h-18h,更优选为 10h-14h。

10. 根据权利要求 7 至 9 中任一项所述的制备方法,其特征在于,将所述液体菌种接种在固体培养基中进行发酵的过程包括:

将所述固体培养基进行灭菌处理后,将所述液体菌种接种在所述固体培养基中,优选地,所述灭菌处理的温度为 120°C-125°C,时间为 30 min -90min;

将接种后的固体培养基在 30°C-36°C、相对湿度 40%-80%的环境中进行一级培养 48h-120h,得到一级培养物;

将所述二级培养物在 18°C-25°C、相对湿度为 40%-80%的环境中进行二级培养 7 天-30 天,优选 7 天-20 天,得到发酵后体系。

11. 根据权利要求 10 所述的制备方法,其特征在于,在一级培养持续 48h-120h 时,向所述固体培养基中加入水并将所述固体培养基进行搅拌处理,所述水的加入量为所述固体培养基的干物质质量的 5%-15%,优选 6%-10%。
12. 一种红曲提取物,其特征在于,采用权利要求 2 至 4 中任一项所述的红曲经水或乙醇提取制备而成。

13. 一种药物，包括红曲或红曲提取物，其特征在于，所述红曲包括权利要求 2 至 4 中任一项所述的红曲、或权利要求 5 所述的红曲饮片、所述红曲提取物包含权利要求 12 所述的红曲提取物，所述药物选自降脂药物、降压药物、降血糖药物和/或抗癌药物。