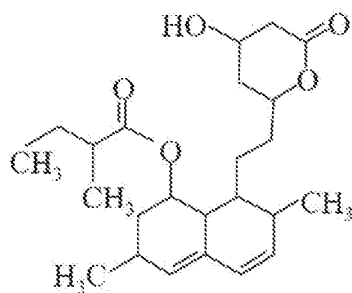


式 I

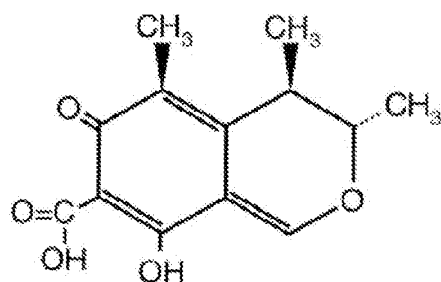


式 II

[0004] 羟甲基戊二酰单酰辅酶A(hydroxymethylglutaryl CoA, HMG-CoA)还原酶是人体中的胆固醇生物合成限速酶,而洛伐他汀可以与HMG-CoA还原酶受体竞争性结合,从而抑制HMG-CoA还原酶活性,进一步减少胆固醇的合成。同时,洛伐他汀还可以通过提升肝细胞膜上的低密度脂蛋白受体的数量、活性及其亲和力,促使胆固醇转化为胆汁而排出体外,从而降低血浆中的胆固醇含量。

[0005] 在红曲的发酵中,产生桔霉素是一个普遍现象,国标准中红曲及其制品的检出限和定量限分别为25 μg/kg和80 μg/kg。欧盟规定红曲中限量为100 μg/kg。有研究报道红曲中桔霉素含量在1.40—24.70 μg/g(高产莫纳可林K、低产桔霉素的红曲霉菌株筛选及其发酵条件优化,庄月娥;陈华观,福建农业科技,2020—01—28)。

[0006] 桔霉素(Citrinin)是一种由青霉或曲霉(例如红曲霉)生长代谢产生的霉菌毒素。桔霉素是柠檬黄色、无序的晶体结构,熔点为175℃。在干燥条件下,桔霉素在温度超过175℃时分解,在水溶液中,桔霉素在温度超过100℃时分解。桔霉素的结构式如下面的式III所示。



式 III

- [0007] 桔霉素具有强烈的肾脏毒性。毒理实验表明，桔霉素具有神经毒性、肾毒性和肝毒性，能诱发细胞突变导致恶性肿瘤，可引起人体肾脏肿大、肾小管扩张、上皮细胞坏死及肝脏中心出血等，具有较强的致畸性和致癌性。另外还有研究发现，桔霉素能够减少动物大脑中多巴胺的分泌，导致一些神经递质浓度的升高对人体造成极大的伤害。这些原因极大地限制了红曲产品的使用。国标对红曲产品中桔霉素含量建立十分严格的限定。
- [0008] 目前，尚需要开发新的红曲霉菌株和制备红曲的工艺。
- [0009] 发明内容
- [0010] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，利用紫外或复合诱变筛出3株高产莫纳克林K的红曲霉突变菌株M7、M8和M2-4，其中M7和M8经固态发酵25天，检测到莫纳克林K的总量分别为12.42mg/g、12.49mg/g，比对照组分别提高了26%、27%。将诱变菌株M7、M8分别与酿酒酵母共同培养，发现加入3%灭活酵母发酵液后，发酵的红曲中莫纳克林K总量最高的分别为10.14mg/g，比对照组提高了11.31%。M2-4发酵后的红曲中莫纳克林K总量为13.21mg/g。本发明的红曲霉突变菌株制得的红曲中在25 μ g/kg以及甚至5 μ g/kg的检测限下均未检出桔霉素。
- [0011] 由此提供了下述发明：
- [0012] 本发明的一个方面涉及红曲霉突变菌株，
- [0013] 其保藏编号为CGMCC No.40403(对应于本发明的菌株M7)，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)，或者
- [0014] 其保藏编号为CGMCC No.40487(对应于本发明的菌株M2-4)，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)。
- [0015] 本发明的上述两个菌株属于红曲霉属，在进一步的分类中归为紫红曲霉。考虑到菌种之间的某种程度上的近似性，如果从菌种的形态特征和/或培养特征将上述两个菌株归为红色红曲霉，也在本发明的保护范围之内。
- [0016] 本发明的另一方面涉及红曲霉发酵物，其由本发明的红曲霉突变菌株发酵得到；

- [0017] 优选地，所述红曲霉发酵物为红曲霉发酵液，其由本发明的红曲霉突变菌株在液态发酵培养基中进行发酵得到。
- [0018] 在本发明的一些实施方式中，所述的红曲霉发酵物，其中，
- [0019] 所述液态发酵培养基包含如下组分：
- [0020] 葡萄糖30–150g/L，蛋白胨2–30g/L， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5–7g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01–1.2g/L， CaCl_2 0.01–0.8g/L；以土豆汁或蒸馏水配制；
- [0021] 葡萄糖65–95g/L，蛋白胨5–16g/L， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1–3g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2–0.8g/L， CaCl_2 0.05–0.2g/L；以土豆汁或蒸馏水配制；或者
- [0022] 葡萄糖80g/L，蛋白胨10g/L， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L， CaCl_2 0.1g/L；以土豆汁或蒸馏水配制成发酵培养基。
- [0023] 在本发明的一些实施方式中，所述的红曲霉发酵物，其中，
- [0024] 发酵的温度为25℃–35℃、28℃–32℃或30℃；和/或
- [0025] 发酵的时间为20–72小时、24–50小时、36–48小时或48小时。
- [0026] 本发明的再一方面涉及一种发酵液组合，包括：
- [0027] 酵母发酵液；和
- [0028] 本发明中任一项所述的红曲霉发酵液，
- [0029] 其中，所述酵母发酵液和红曲霉发酵液混合或者不混合。
- [0030] 在本发明的一些实施方式中，所述的发酵液组合，其中，所述酵母发酵液为酿酒酵母发酵液或啤酒酵母发酵液；
- [0031] 可选地，所述酵母发酵液为灭活的酵母发酵液或者未经灭活的酵母发酵液。
- [0032] 在本发明的一些实施方式中，所述的发酵液组合，其中，所述酵母发酵液通过包含如下条件的方法得到：
- [0033] 酵母在麦芽汁中活化，优选在12Brix的麦芽汁中活化；
- [0034] 活化温度为25℃–30℃，优选28℃；和/或
- [0035] 活化时间为12–36小时，优选24小时。
- [0036] 本发明的再一方面涉及一种制备红曲的方法，包括如下步骤：
- [0037] 将本发明的红曲霉突变菌株、本发明任一项所述的红曲霉发酵物或者本发明任一项所述的发酵液组合接种至大米培养基中培养，得到培养产物，即为红曲；

- [0038] 可选地，还包括对培养产物进行干燥和/或粉碎的步骤。
- [0039] 在本发明的一些实施方式中，所述的制备红曲的方法，其中接种的比例为：
- [0040] 酵母发酵液为大米培养基质量的1%–5%、2%–4%或3%；和/或
- [0041] 红曲霉发酵液或发酵液组合为大米培养基质量的15%–40%、20%–25%、18%–23%或20%。
- [0042] 本发明中，如果没有特别说明，接种的比例是指发酵液的体积/大米培养基的质量(mL/g)。
- [0043] 在本发明的一些实施方式中，所述的制备红曲的方法，其中：
- [0044] 所述大米培养基包含大米粉、麸皮、蛋白胨、葡萄糖和水；
- [0045] 优选地，按照质量百分比计算，所述大米培养基包含如下组分：
- [0046] 大米粉35%–42%、麸皮6%–9%、蛋白胨1.2%–2.2%、葡萄糖1.4%–3.0%和水48%–52%；例如：
- [0047] 大米粉38.5%、麸皮7.5%、蛋白胨1.5%、葡萄糖2.5%和水50%；
- [0048] 大米粉37.7%、麸皮7.5%、蛋白胨1.9%、葡萄糖2.6%和水50.2%；
- [0049] 大米粉41.1%、麸皮6.2%、蛋白胨1.2%、葡萄糖1.4%和水50.1%；或者
- [0050] 大米粉35.8%、麸皮8.9%、蛋白胨2.1%、葡萄糖3.0%和水50.1%。
- [0051] 在本发明的一些实施方式中，所述的制备红曲的方法，其中，所述大米培养基由上述组分组成。
- [0052] 在本发明的一些实施方式中，所述的制备红曲的方法，其中，将上述大米培养基进行灭菌处理，例如进行高温灭菌处理。
- [0053] 在本发明的一些实施方式中，所述的制备红曲的方法，其特征在于如下的(1)至(3)项中的任意1项、2项或者全部3项：
- [0054] (1)培养时间为15–38天、18–32天、20–25天、22–30天、24–26天或25天；
- [0055] (2)培养温度为18–35℃、28℃–32℃、28–30℃或30℃；
- [0056] (3)调节至适当的pH，例如pH值为3–7、4–6.5或5–6。
- [0057] 本发明的再一方面涉及一种红曲，其由本发明的红曲霉突变菌株制得；优选地，其由本发明中任一项所述的制备红曲的方法制得。
- [0058] 在本发明的一些实施方式中，所述的红曲，其特征在于：

- [0059] 不含桔霉素、桔霉素的含量小于 $25\mu\text{g/kg}$ 或者小于 $5\mu\text{g/kg}$ ；和/或
- [0060] 不含黄曲霉毒素B1、或者黄曲霉毒素B1的含量小于5ppb。
- [0061] 在本发明的一些实施方式中，所述红曲中的莫纳克林K含量大于或等于 8.9mg/g 、大于或等于 9.97mg/g 、大于或等于 12.42mg/g 、大于或等于 12.85mg/g 、或者大于或等于 13.21mg/g ；
- [0062] 优选地，所述红曲中的酸型莫纳克林K的含量大于或等于 1.6mg/g 、大于或等于 1.8mg/g 、大于或等于 2.0mg/g 、大于或等于 2.2mg/g 、大于或等于 2.4mg/g 、大于或等于 2.5mg/g 、大于或等于 3.0mg/g 、大于或等于 3.5mg/g 、大于或等于 3.9mg/g 、大于或等于 4.5mg/g 、或者大于或等于 5.2mg/g 。
- [0063] 在本发明的一些实施方式中，所述的红曲，其中酸型莫纳克林K的含量：内酯型莫纳克林K的含量的比例较高，例如所述比例 ≥ 0.20 、 ≥ 0.21 、 ≥ 0.22 、 ≥ 0.23 、 ≥ 0.24 、 ≥ 0.25 、 ≥ 0.26 、 ≥ 0.27 、 ≥ 0.28 、 ≥ 0.29 、 ≥ 0.30 、 ≥ 0.31 或 ≥ 0.32 。
- [0064] 本发明的再一方面涉及一种红曲提取物，其由本发明中任一项所述的红曲经乙醇或水提取制得。
- [0065] 在本发明的一些实施方式中，本发明任一项所述的红曲或者本发明中任一项所述的红曲提取物，其用于治疗或预防高血脂症或骨质疏松症。
- [0066] 本发明的再一方面涉及一种制备莫纳克林K的方法，包括从本发明任一项所述的红曲或者本发明的红曲提取物中分离得到莫纳克林K的步骤；
- [0067] 优选地，所述莫纳克林K为内酯型莫纳克林K和/或酸型莫纳克林K。
- [0068] MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K的总量。
- [0069] 本发明中，如果没有特别说明，术语“莫纳克林K含量”是指酸型莫纳克林K和内酯型莫纳克林K的合计含量。
- [0070] 本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的红曲或者本发明的红曲提取物在制备治疗或预防高血脂症或骨质疏松症的药物或保健食品中的用途。

- [0071] 本发明的再一方面涉及一种治疗或预防高血脂症或骨质疏松症的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的红曲或者本发明中任一项所述的红曲提取物的步骤。
- [0072] 术语“有效量”是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的剂量。
- [0073] 术语“疾病和/或病症”是指所述受试者的一种身体状态，该身体状态与本发明所述疾病和/或病症有关。
- [0074] 术语“受试者”可以指患者或者其它接受本发明药物或药物组合物以治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的动物，特别是哺乳动物，例如人、狗、猴、牛、马等。
- [0075] 发明的有益效果
- [0076] 本发明取得了如下的技术效果中的一项或者几项：
- [0077] (1)本发明的红曲霉突变菌株无论是单独发酵培养还是与酿酒酵母共同培养，均能提高莫纳克林K的产量；
- [0078] (2)本发明制得的红曲中，桔霉素含量均在 $25\text{ }\mu\text{g/kg}$ 以下，甚至在 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 以下；
- [0079] (3)本发明制得的红曲中，黄曲霉毒素B1未检出或含量小于 5ppb ；
- [0080] (4)本发明红曲霉突变菌株发酵的红曲莫纳可林K总量高，尤其酸型莫纳可林K含量高；
- [0081] (5)本发明红曲含多种活性成分，含多种他汀、甾醇、色素等，尤其含 γ -氨基丁酸、麦角甾醇等。
- [0082] (6)本发明的红曲霉突变菌株的稳定性较好；有效解决现有技术中一些常见问题，例如：
- [0083] 菌种经多代培养，出现活性衰退现象；
- [0084] 发酵后活性成分含量降低；或
- [0085] 长期反复使用单一诱变剂之后，菌株产生诱变剂“疲劳效应”。

附图说明

- [0086] 图1：紫外照射时间对红曲霉MY-11致死率的影响。

- [0087] 图2A：麦芽汁琼脂培养上的菌落形态图。
- [0088] 图2B：红曲霉M7的菌体形态。
- [0089] 图2C：红曲霉M7的菌体形态。
- [0090] 图2D：红曲霉M7的菌体形态。
- [0091] 其中，图2B、图2C和图2D分别显示了同一个样本在不同视野下的生长状态。
- [0092] 图3：桔霉素对照溶液(20.0ng/ml)的色谱图。
- [0093] 图4：检测红曲M7的桔霉素的色谱图。
- [0094] 涉及保藏的生物材料：
- [0095] 紫红曲霉(*Monascus purpureus*)M7，其于2022年11月2日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)，保藏编号为CGMCC No.40403，保藏单位地址是北京市朝阳区北辰西路1号院3号，中国科学院微生物研究所，邮编：100101。
- [0096] 紫红曲霉(*Monascus purpureus*)M2-4，其于2023年1月13日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)，保藏编号为CGMCC No.40487，保藏单位地址是北京市朝阳区北辰西路1号院3号，中国科学院微生物研究所，邮编：100101。

具体实施方式

- [0097] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。
- [0098] 材料与试剂
- [0099] 紫色红曲霉MY-11：实验室自存菌种；
- [0100] 酿酒酵母2.2084：中国普通微生物菌种保藏管理中心；
- [0101] 葡萄糖、七水硫酸镁、无水氯化钙、磷酸二氢铵、蛋白胨(均为分析纯或生化试剂)；
- [0102] 大米粉、土豆、麸皮：市售；
- [0103] 甲醇，甲酸及甲酸铵均为色谱纯；

- [0104] 95%乙醇(分析纯): 国药集团化学试剂公司;
- [0105] 洛伐他汀对照品(内酯型莫纳克林K): 市售, 含量99.7%; 水: 超纯水。
- [0106] 洛伐他汀酸钠盐对照品(酸型莫纳克林K): 市售, 纯度98%
- [0107] 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar)培养基(简称PDA培养基):取46.0g, 加入1000mL蒸馏水中, 121℃高压灭菌30min, 备用。下面实施例中提到的斜面培养基是PDA培养基。
- [0108] 液体发酵培养基: 葡萄糖80g/L, 蛋白胨10g/L, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, CaCl_2 0.1g/L, 以土豆汁代替蒸馏水溶解上述药品, 制成液态发酵培养基待用。
- [0109] 大米培养基: 大米粉38.5%, 麸皮7.5%, 水50%, 葡萄糖2.5%, 蛋白胨1.5%, pH值为5, 121℃灭菌20min。
- [0110] 仪器与设备
- [0111] ZHWY-2102恒温培养振荡器: 上海智诚有限公司;
- [0112] LRH-250-HSE恒温恒湿培养箱: 珠江泰宏君仪器;
- [0113] BXM-110VE立式压力蒸汽灭菌器: 博讯;
- [0114] WGL-230B电热鼓风干燥箱: 天津市泰斯特仪器有限公司;
- [0115] FW80高速万能粉碎机: 天津市泰斯特仪器有限公司;
- [0116] 岛津LC-20AT型高效液相色谱仪;
- [0117] KQ5200DE型超声波清洗机: 昆山合创超声仪器有限公司;
- [0118] METTLER XPE205DR型电子天平;
- [0119] 超纯水仪: 美国PALL公司。
- [0120] 制备例1: 红曲霉突变菌株的获取
- [0121] 孢子菌悬液的制备: 取一支斜面菌种(紫色红曲霉MY-11), 加入少量的无菌水, 用接种环刮下斜面上的孢子, 装入三角瓶中振摇15分钟, 使得孢子充分散开, 然后使用带有4层擦镜纸漏斗过滤掉菌丝, 定容至50mL, 制成孢子菌悬液。
- [0122] 经小试菌种生长状态, 初筛紫外灯的瓦数(5、10、15、20), 紫外距离15、30、45cm。研究发现紫外距离30cm、15w效果较好。

- [0123] 紫外诱变：取10mL孢子菌悬液于无菌培养皿中，置于15W紫外灯下30cm处，分别照射0s、10s、20s、30s、40s、60s。取诱变后各照射时间段孢子悬液0.5mL，按照10倍系列将浓度稀释至 10^{-4} 。取各稀释液1mL涂布于PDA培养基，置于30℃条件下培养避光7天，记录平板菌落数，计算诱变致死率。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。
- [0124] 红曲霉初筛：观察平板上长出的菌落，挑取生长速度较快或形态、颜色变化的菌株转接到PDA培养基30℃培养。
- [0125] 红曲霉复筛：将筛选得到的红曲霉菌株按照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，30℃条件下摇床培养2天。吸取液体种子于大米培养基中，搅拌均匀，30℃培养25天，得到红曲。
- [0126] 取红曲进行莫纳克林K的检测，以挑选莫纳克林K含量高的诱变菌株。检测方法如下：
- [0127] 红曲于90℃干燥24h，利用高能粉碎机粉碎成红曲粉，检测红曲粉中MK和MKA的含量，具体检测方法参照文献进行(李雪梅,等.HPLC法测定血脂康胶囊中洛伐他汀和洛伐他汀酸的含量[J].中国药师,2012,15(02))。
- [0128] 结果如图1所示。
- [0129] 如图1所示，紫外诱变剂量达到20s时，红曲菌的致死率达到76%，所以确定20s时为紫外诱变的最佳剂量。
- [0130] 对红曲霉菌MY-11进行紫外诱变，采用致死率来考察紫外线对红曲霉的损伤作用。为获得较高的正突变率，方便诱变菌株的筛选，选取致死率在70%~80%的最佳。不拘于理论的限制，为了提高诱变成功率，应选取较高致死率的平板菌落继续进行后续实验，但过高致死率平板上的突变菌株容易发生回复突变的情况，性状不稳定。因此，实际操作中一般选取致死率在70%~80%的平板的诱变剂量作为最佳诱变剂量。
- [0131] 以紫色红曲霉MY-11为原始菌种，按照上述紫外诱变剂量进行紫外诱变，经菌落形态初筛，获得紫外诱变菌株8株，分别编号为M1~M8，分别按照上述方法对其进行固态发酵并测定莫纳克林K的含量，检测其是否高于原始菌株莫纳克林K的含量，若高于原始菌株为正突变。结果如表1所示。

[0132] 由表1可知，相对于原始菌株紫色红曲霉MY-11，诱变菌株M7、M8的莫纳克林K的含量均有较大提高，莫纳克林K含量分别达到了12.42mg/g(是指在发酵产物红曲干燥后的含量，下同)、12.49mg/g；相比原始菌株MY-11，分别提高了26%、27%，将作为下一次共同培养的菌种。

[0133] 表1：红曲霉MY-11紫外诱变复筛检测莫纳克林K含量

样品编号	MKA (mg/g)	MK (mg/g)	MK+MKA (mg/g)	提高率 %
MY-11	2.59	7.25	9.84	0
M1	2.85	6.22	9.07	-8%
M2	2.76	8.27	11.03	12%
M3	2.50	7.71	10.21	4%
M4	2.96	7.44	10.4	6%
M5	2.63	6.08	8.71	-11%
M6	2.99	6.59	9.58	-3%
M7	2.47	9.95	12.42	26%
M8	3.24	9.25	12.49	27%

[0134] 注：MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K的总量。

[0135] 对M7和M8进行微生物鉴定为紫色红曲菌，并将M7送到菌种鉴定机构鉴定，经过对菌种的培养特性、显微特性、rRNA基因序列等鉴定，结果显示，本发明的红曲霉突变菌株属于紫红曲霉(Monascus purpureus)。

[0136] rRNA基因序列测定结果如下，包括18rRNA片段，ITS1、5.8S rRNA、ITS2的全序列及28S rRNA区序列片段。

5'-ATCATTACCGAGTGCGGGTCCCCTTCGTGGGACCCAACCTCCCACCC
GTGATTATTGTACCTCCTGTTGCTTCGGCGCGGCCCCCGGGGCCCGCCGG
AGACATCTTCTCGAACGCTGTCTTTGAAAAGGATTGCTGTCTGAGTAAACAT
ACCAAATCGGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTACTGCCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGTTGGGCCGCGG
TCCCCTGCGCCTCCGGGCAAGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGTGGCGGGCG
CCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCAGTAGGTCCG
GGCCGGGGCCCTTTGCCCTCTCCAACCTTTTTTTCCTTAGGTTGACCTCGGAT
CAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA -3' (SEQ ID NO: 1)

[0137] 红曲霉M7的菌落形态及显微特征如图2A至图2D所示。

[0138] 红曲霉M7在麦芽汁琼脂培养基上生长较快，25℃黑暗条件下培养7天，菌落直径35mm-40mm，气生菌丝茂盛(图2A)，浅橙色；菌落背面暗橙色，色素可溶于培养基中。

[0139] 图2B、图2C和图2D均为显微镜下的红曲霉M7，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，5.8 μm-9.6 μm。未见有性型产孢子结构及孢子。

[0140] 实验例1：诱变菌株M7、M8产出莫纳克林K的遗传稳定性实验

[0141] 经诱变处理得到的高产突变菌株遗传性状可能不稳定，易发生回复突变或者突变性状衰退甚至消失，导致产莫纳克林K能力下降等问题，因此需要验证其传代稳定性，便于考虑使用方式或周期及在工业化生产菌株的应用。将筛选得到的高产莫纳克林K的诱变菌株M7、M8分别接种到斜面培养基上，连续转接5代，相同条件下发酵培养，每代通过前述的HPLC法测定莫纳克林K含量，分析诱变菌株的稳定性，结果见表2。

[0142] 表2：红曲菌诱变菌种莫纳克林K产量情况

菌 种 名称	传 代 次 数	MKA/(mg/g)	MK/(mg/g)	MK+MKA/(m g/g)	提高率/%
红 曲 霉 M7	第一代	2.47	9.95	12.42	0
	第二代	2.19	8.00	10.19	-18%
	第三代	2.34	7.34	9.67	-22%
	第四代	1.33	7.13	8.46	-32%
	第五代	1.67	7.44	9.11	-27%
红 曲 霉 M8	第一代	3.24	9.25	12.49	0
	第二代	2.47	5.14	7.61	-39%
	第三代	2.02	6.30	8.32	-33%
	第四代	1.47	7.12	8.59	-31%
	第五代	1.41	6.27	7.68	-39%

- [0143] 注：MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K总量。
- [0144] 如表2所示，诱变菌株M7、M8传代5次，相比于第一代，后4次传代其莫纳克林K总量均低于第一代、出现下降趋势，但在第五代含量已趋于稳定。M7的第5代含量升高，并高于第4代，含量已稳定。
- [0145] 实验例2：共同培养对莫纳克林K含量的影响
- [0146] 将酿酒酵母2.2084在12Brix.麦芽汁中进行活化，28℃活化24h至培养基(这里的培养基指麦芽汁，用糖度计调成12Brix.)浑浊，得到酵母发酵液。
- [0147] 将诱变菌株M7和M8均按照5%(V/V)接种于液体发酵培养基中，30℃震荡培养48h，得到红曲霉发酵液。
- [0148] 将酵母发酵液和红曲霉发酵液接入大米培养基内，20%(按照大米培养基计，V/m，mL/g，下同)红曲发酵液分别与0%、1%、2%、3%、4%(按照大米培养基计，V/m，mL/g，下同)的酵母发酵液进行共同培养，搅拌混匀，30℃培养25天，得到发酵产物，即红曲，红曲可为类似整粒米、或不规则颗粒、或有时也为粉末，故又称红曲米。

[0149] 红曲霉M7与不同添加量酵母发酵液共同培养25天制备莫纳克林K的产量如表3所示，加入3%的酵母发酵液使得莫纳克林K总量最高的为9.35mg/g，相比不加酵母发酵液，提高了2.63%。

[0150] 表3：红曲霉M7与酵母共同培养制备红曲，25天莫纳克林K含量

样 品 批 号	酵母液占 比/%	MKA (mg/g)	MK (mg/g)	MK+MKA (mg/g)	提高率 %
M7	0	1.67	7.44	9.11	0
M7-1	1	1.83	6.31	8.14	-10.65
M7-2	2	1.55	5.41	6.96	-23.60
M7-3	3	1.74	7.61	9.35	2.63
M7-4	4	2.13	7.01	9.14	0.33

[0151] 注：MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K总量。

[0152] 表4：红曲霉M8与酵母共同培养制备红曲，25天莫纳克林K类含量

样 品 批号	酵母液占 比/%	MKA (mg/g)	MK (mg/g)	MK+MKA (mg/g)	提高率/%
M8	0	1.41	6.27	7.68	0
M8-1	1	1.73	4.76	6.49	-15.49
M8-2	2	1.94	5.63	7.57	-1.43
M8-3	3	2.21	6.73	8.94	16.41
M8-4	4	1.55	5.15	6.70	-12.76

[0153] 注：MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K总量。

[0154] 红曲霉M8与不同添加量酵母发酵液共同培养25天制备红曲发酵莫纳克林K含量由表4所示，加入3%的酵母发酵液使得莫纳克林K总量最高的为8.94mg/g，相比不加酵母发酵液提高16.41%。

[0155] 此外，本发明人还研究了添加灭活酵母发酵液对菌种及莫纳可林含量的影响。

[0156] 灭活酵母发酵液：将酿酒酵母于12Bx的麦芽汁中进行活化，28℃活化24h至培养基浑浊，得到酵母菌液。酵母菌液经过100℃高温灭菌20min，得到灭活酵母发酵液。

[0157] 将酵母发酵液和红曲霉发酵液接入大米培养基内，20% (按照大米培养基计) 红曲霉发酵液分别与0、1%、2%、3%、4% (按照大米培养基计) 的灭活酵母发酵液进行培养，搅拌混匀，30℃培养至25天、31天分别取样。

[0158] 结果如下面的表5所示。

[0159] 表5：红曲霉M7与灭活酵母发酵液培养制备红曲，25天莫纳克林K类含量

样品批号	灭活酵母发酵液 接种量%	MKA (mg/g)	MK (mg/g)	MK+MKA (mg/g)	提高率 %
M7	0	1.67	7.44	9.11	0.00
M7-1	1	2.09	7.58	9.67	6.15
M7-2	2	1.86	7.69	9.55	4.83
M7-3	3	1.89	8.25	10.14	11.31
M7-4	4	1.75	7.05	8.80	-3.40

[0160] 注：MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K总量。

[0161] 红曲霉M7(对照)与不同添加量的灭活酵母发酵液培养后MK、MKA含量的影响如表5所示，在发酵25天时，添加1%、2%、3%的灭活酵母发酵液后莫纳克林K总量全部提升，尤其添加3%灭活酵母发酵液使得红曲中莫纳克林K总量达到10.14mg/g，相比对照M7，总含量提高了11.31%。

[0162] 本发明的含量测定通常是指对发酵后得到的红曲进行测定结果。

[0163] MKA为酸型莫纳克林K，MK为内酯型莫纳克林K。

[0164] 制备例2：红曲霉突变菌株的获取和稳定性试验

[0165] 长期反复使用单一诱变剂之后，菌株易产生诱变剂“疲劳效应”，引起菌种生长周期延长、活性代谢产物减少等，为了提高诱变效果，在实践过程中常常采用复合诱变操作。复合诱变指采用两种或两种以上诱变剂交替或同时处理出发

菌株，由于不同的诱变剂其特异性作用位点不同，从而引起菌体遗传物质的多种变异，提高诱变效果。

- [0166] 通过菌落形态和莫纳克林K含量，筛选诱变LiCl浓度(0.2‰、0.4‰、0.6‰、0.8‰、1‰)，综合对比后选择0.8‰浓度。
- [0167] 菌种：M2；涂布含0.8‰LiCl的PDA培养基，将紫外诱变照射初筛挑选的菌种M2接种到含有0.8‰LiCl培养基中，30℃暗培养3天，挑取单菌落。
- [0168] 取经复合诱变菌株，继续做五代的稳定性考察，每瓶300g湿物料，接种60ml，培养21天和25天分别取样，蒸汽灭菌器在120℃灭活50分钟，90℃烘干24h，检测21天和25天的MK和MKA的含量的稳定性。
- [0169] 红曲霉M2-4在麦芽汁琼脂培养基上，25℃黑暗条件下培养7天，菌落直径33mm-40mm，气生菌丝茂盛，浅橙色；表面平坦，质地毡绒状；菌落背面暗橙色，色素可溶于培养基中。分生孢子大量产生，分生孢子着生在小梗上或菌丝顶端，近球形，无色，串生，5.6 μm-9.8 μm。未见有性型产孢子结构及孢子。
- [0170] 稳定性试验结果
- [0171] 21天和25天的MK和MKA的含量，及3代遗传稳定性见表6。

表 6: 红曲霉 M2 及诱变菌株的 3 代遗传稳定性他汀类含量

菌种性质	样品批号	第一代				第二代				第三代			
		MK mg/g	MKA mg/g	MK+MKA mg/g	MK mg/g	MKA mg/g	MK+MKA mg/g	MK mg/g	MKA mg/g	MK mg/g	MKA mg/g	MK+MKA mg/g	MK+MKA mg/g
原始	M2	7.69	2.30	9.99	8.04	1.18	9.22	8.72	2.19	10.90			
诱变	25 天-M2-4	9.06	2.11	11.16	10.04	2.56	12.59	10.02	3.19	13.21			
	25 天-M2-5	9.80	2.48	12.28	10.13	2.54	12.67	9.91	2.94	12.85			

- [0172] 注：MK为内酯型莫纳克林K，MKA为酸型莫纳克林K，MK+MKA为莫纳克林K总量。
- [0173] 由表6可知，M2-4和M2-5菌株在25天莫纳克林K总量较高，且内酯型莫纳克林K和酸型莫纳克林K的含量在每一代的发酵后的红曲中含量逐渐升高。第三代发酵的红曲中莫纳克林K总量可达13.21mg/g(MK为10.02mg/g，MKA为3.19mg/g)；可见发明菌株在传代培养中表现出突出的稳定性。若继续优化M2-4和M2-5的最适发酵条件，红曲含量还将提高。
- [0174] 现有技术中红曲菌株或经诱变后菌株存在经多代培养后，菌种活性衰退，尤其是发酵产物中部分成分含量持续降低。而本发明多代的研究发现，本发明菌株的稳定性突出，不仅解决衰减，而且活性成分还会升高。
- [0175] MKA是莫纳可林K在人体内的活性成分，MK进入体内在一定条件下可部分转化为MKA发挥活性。本发明菌株发酵的红曲不仅总量高，尤其MKA含量较高，具有突出的活性。
- [0176] 实验例3：桔霉素检测
- [0177] 取本发明M7、M8、M2-4和M2-5发酵25天后得到的红曲(M7样品、M8样品为实验例1中制备的第五代样品，M2-4样品和M2-5样品为制备例2中制备的第三代样品)后的样品，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)检测桔霉素含量。
- [0178] 结果如下面的表7所示。
- [0179] 表7：桔霉素含量结果

菌种	桔霉素含量 (检出限 25μg/kg)	桔霉素含量 (检出限 5μg/kg)
M8	未检出	未检出
M7	未检出	未检出
M2-4	未检出	未检出
M2-5	未检出	未检出

- [0180] 结果显示,经检测桔霉素含量均未检出,检出限 $25\mu\text{g/kg}$,即 $2.5\times 10^{-2}\mu\text{g/g}$,远低于现有技术中桔霉素 $1.40\text{--}24.70\mu\text{g/g}$ (即 $1400\text{--}24700\mu\text{g/Kg}$)。
- [0181] 采用液相色谱法中国药典2020年版第四部通则0512检测桔霉素含量,在检测限为5ppb(或1ppm)时,桔霉素结果均为未检出。且由图3至图4可知,本品几乎可视为不含桔霉素,具有预料不到的效果。本发明菌种发酵的红曲更为安全。
- [0182] 在5ppb的检测限下,黄曲霉毒素B1,未检出。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)。
- [0183] 另外,对红曲的质谱研究及含量测定,本发明的3个菌株发酵的红曲含有 γ -氨基丁酸、麦角甾醇。
- [0184] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求书

- [权利要求 1] 红曲霉突变菌株，
其保藏编号为CGMCC No.40403，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)；或者
其保藏编号为CGMCC No.40487，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)。
- [权利要求 2] 红曲霉发酵物，其由权利要求1所述的红曲霉突变菌株发酵得到；
优选地，所述红曲霉发酵物为红曲霉发酵液，其由权利要求1所述的红曲霉突变菌株在液态发酵培养基中进行发酵得到。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的红曲霉发酵物，其中，
所述液态发酵培养基包含如下组分：
葡萄糖30–150g/L，蛋白胨2–30g/L， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5–7g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01–1.2g/L， CaCl_2 0.01–0.8g/L；以土豆汁或蒸馏水配制；
葡萄糖65–95g/L，蛋白胨5–16g/L， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1–3g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2–0.8g/L， CaCl_2 0.05–0.2g/L；以土豆汁或蒸馏水配制；
或者
葡萄糖80g/L，蛋白胨10g/L， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L， CaCl_2 0.1g/L；以土豆汁或蒸馏水配制成发酵培养基。
- [权利要求 4] 根据权利要求2至3中任一权利要求所述的红曲霉发酵物，其中，
发酵的温度为25℃–35℃、28℃–32℃或30℃；和/或
发酵的时间为20–72小时、24–50小时、36–48小时或48小时。
- [权利要求 5] 发酵液组合，包括：
酵母发酵液；和
权利要求2至4中任一权利要求中所述的红曲霉发酵液，
其中，所述酵母发酵液和红曲霉发酵液混合或者不混合。

- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的发酵液组合，其中，所述酵母发酵液为酿酒酵母发酵液或啤酒酵母发酵液；
可选地，所述酵母发酵液为灭活的酵母发酵液或者未经灭活的酵母发酵液。
- [权利要求 7] 根据权利要求5至6中任一权利要求所述的发酵液组合，其中，所述酵母发酵液通过包含如下条件的方法得到：
酵母在麦芽汁中活化，优选在12Brix的麦芽汁中活化；
活化温度为25℃–30℃，优选28℃；和/或
活化时间为12–36小时，优选24小时。
- [权利要求 8] 一种制备红曲的方法，包括如下步骤：
将权利要求1所述的红曲霉突变菌株、权利要求2至4中任一权利要求所述的红曲霉发酵物或者权利要求5至7中任一权利要求所述的发酵液组合接种至大米培养基中培养，得到培养产物，即为红曲；
可选地，还包括对培养产物进行干燥和/或粉碎的步骤。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的制备红曲的方法，其中接种的比例为：
酵母发酵液为大米培养基质量的1%–5%、2%–4%或3%；和/或
红曲霉发酵液或发酵液组合为大米培养基质量的15%–40%、20%–25%、18%–23%或20%。
- [权利要求 10] 根据权利要求8至9中任一权利要求所述的制备红曲的方法，其中：
所述大米培养基包含大米粉、麸皮、蛋白胨、葡萄糖和水；
优选地，按照质量百分比计算，所述大米培养基包含如下组分：
大米粉35%–42%、麸皮6%–9%、蛋白胨1.2%–2.2%、葡萄糖1.4%–3.0%和水48%–52%。
- [权利要求 11] 根据权利要求8至10中任一权利要求所述的制备红曲的方法，其特征在于如下的(1)至(3)项中的任意1项、2项或者全部3项：
(1)培养时间为15–38天、18–32天、20–25天、22–30天、24–26天或25天；
(2)培养温度为18–35℃、28℃–32℃、28–30℃或30℃；

- (3)调节至适当的pH，例如pH值为3-7、4-6.5或5-6。
- [权利要求 12] 红曲，其由权利要求1所述的红曲霉突变菌株制得；优选地，其由权利要求8至11中任一权利要求所述的制备红曲的方法制得。
- [权利要求 13] 根据权利要求12所述的红曲，其特征在于：
不含桔霉素、桔霉素的含量小于25 $\mu\text{g/kg}$ 或者小于5 $\mu\text{g/kg}$ ；和/或不
含黄曲霉毒素B1、或者黄曲霉毒素B1未检出或含量小于5ppb。
- [权利要求 14] 根据权利要求12至13中任一权利要求所述的红曲，其中莫纳克林
K含量大于或等于8.9mg/g、大于或等于9.97mg/g、大于或等于12.
42mg/g、大于或等于12.85mg/g、或者大于或等于13.21mg/g。
- [权利要求 15] 根据权利要求12至14中任一权利要求所述的红曲，其中酸型莫纳克
林K的含量大于或等于1.6mg/g、大于或等于1.8mg/g、大于或等于
2.0mg/g、大于或等于2.2mg/g、大于或等于2.4mg/g、大于或等于
2.5mg/g、大于或等于3.0mg/g、大于或等于3.5mg/g、大于或等于
3.9mg/g、大于或等于4.5mg/g、大于或等于5.2mg/g。
- [权利要求 16] 红曲提取物，其由权利要求12至15中任一权利要求所述的红曲经乙
醇或水提取制得。
- [权利要求 17] 一种制备莫纳克林K的方法，包括从权利要求12至15中任一权利要
求所述的红曲或者权利要求16所述的红曲提取物中分离得到莫纳克
林K的步骤；
优选地，所述莫纳克林K为内酯型莫纳克林K和/或酸型莫纳克林
K。
- [权利要求 18] 权利要求12至15中任一权利要求所述的红曲或者权利要求16所述的
红曲提取物在制备治疗或预防高血脂症或骨质疏松症的药物或保健
食品中的用途。
- [权利要求 19] 根据权利要求12至15中任一权利要求所述的红曲或者权利要求16所
述的红曲提取物，其用于治疗或预防高血脂症或骨质疏松症。

[权利要求 20] 一种治疗或预防高血脂症或骨质疏松症的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求12至15中任一权利要求所述的红曲或者权利要求16所述的红曲提取物的步骤。