

# 橙色红曲菌及其 $pksCT$ 基因缺失株液态发酵产橘霉素及色素的变化

张淑云, 黄志兵\*, 许 杨, 李燕萍

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘 要:** 以橙色红曲菌AS3.4384(原始菌株)及其 $pksCT$ 基因缺失株(PHDS26)为发酵菌株, 分别于酵母浸膏蔗糖(YES)、米粉、米粉无机盐培养基中进行液态发酵, 采用高效液相色谱法(HPLC)和紫外分光光度法分别测定AS3.4384及PHDS26菌株于上述培养基中橘霉素和红曲色素的含量。结果表明: 在酵母浸膏蔗糖(YES)、米粉、米粉无机盐培养基中, PHDS26橘霉素最高产量较橙色红曲菌AS3.4384橘霉素最高产量分别降低了97.24%、98.35%、39.18%。在米粉培养基中PHDS26红曲色素最高产量较橙色红曲菌AS3.4384红曲色素最高产量降低了71.0%, 而在含无机盐的米粉培养基中PHDS26红曲色素最高产量较橙色红曲菌AS3.4384红曲色素最高产量却提高了60.2%。

**关键词:** 橙色红曲菌;  $pksCT$ 基因缺失菌株; 液态发酵; 橘霉素; 色素

## Comparative Production of Citrinin and Pigments in Submerged Fermentation by *Monascus aurantiacus* and Its $pksCT$ Gene Deficient Mutant

ZHANG Shu-yun, HUANG Zhi-bing\*, XU Yang, LI Yan-ping

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Submerged fermentation was performed with *Monascus* AS3.4384 or its  $pksCT$  gene deficient mutant (PHDS26) in YES, rice flour or inorganic salt fortified rice flour media. The production of citrinin and red pigment in PHDS26 fermentation was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet spectrophotometry, respectively. The results showed that the production of citrinin by PHDS26 fermentation in the three media presented a decrease by 97.24%, 98.35% and 39.18%, respectively, when compared with the original strain. Meanwhile, its capacity of pigment production in rice flour medium was decreased by 71.0%, but increased by 60.2% in inorganic salt fortified rice flour medium.

**Key words:** *Monascus aurantiacus*;  $pksCT$  gene-deficient mutant; submerged fermentation; citrinin; pigments

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)19-0148-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201319032

红曲在我国古代也称“丹曲”, 具有药用和食用双重功效。红曲菌在生长代谢过程中产生的一系列色素广泛用于食品的着色, 与已知的天然色素相比, 红曲色素对pH值、温度、金属离子、氧化还原剂等较稳定<sup>[1]</sup>。红曲色素具有很多生物活性, 例如, 黄色素类化合物Xanthomonasin A和Xanthomonasin B, 具有较强的NO清除活性<sup>[2-4]</sup>; 物质的量比为3:2的Xanthomonasin A与Xanthomonasin B的混合物对诱变剂Trp-P-2(NHOH)具有较强的抗突变功能; 黄色素Monankarins A~F对单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)具有抑制活性<sup>[5]</sup>; 红曲黄素

具有降低胆固醇改善血脂症的作用<sup>[6]</sup>; 有的红曲色素具有抗革兰氏阳性菌的生物活性<sup>[7]</sup>; 此外, 红曲色素的氨基衍生物对3T3-L1细胞成脂分化有抑制作用<sup>[8]</sup>。但由于红曲菌同时能够产生橘霉素, 使红曲产品的安全性受到质疑。

近年来, 国内外学者主要致力于高产活性代谢产物低产橘霉素红曲菌株的筛选及发酵条件的优化<sup>[9-14]</sup>。而在红曲菌产橘霉素基因等领域的研究也取得了较大进展。Shimizu等<sup>[15]</sup>从紫色红曲菌(*M. purpureus*)中克隆得到了1个合成橘霉素基因- $pksCT$ 基因, 该基因全长7838bp, 含有56bp内含子。Chen等<sup>[16]</sup>研究了18种红曲菌中橘霉素

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(31160308); 江西省教育厅一般科技项目(GJJ11291)

作者简介: 张淑云(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物代谢产物的分离与分析。E-mail: 806441658@qq.com

\*通信作者: 黄志兵(1975—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全快速检测和微生物代谢产物的分离与分析。

E-mail: hzbchem@163.com

生物合成的相关基因的分布情况,发现紫色红曲菌、红色红曲菌、烟色红曲菌的橘霉素的聚酮类合成与酰基转移酶和聚酮合成酶的 $pksCT$ 基因结构域相关。Xu Minjun等<sup>[17]</sup>采用 $pksI$ 基因替换紫色红曲菌中另外1个产橘霉素相关 $ctnA$ 基因,结果显示红曲菌产橘霉素能力降低了42%,而红曲色素产量提高了33.9%。

橙色红曲菌(*Monascus aurantiacus*)AS.34384属于子囊菌纲,红曲菌属,具有高产橘霉素,低产色素的特性,是我国学者李钟庆<sup>[18]</sup>首次发现的我国特有的一种菌种。本实验室运用DNA重组技术敲除了橙色红曲菌AS3.4384中的 $pksCT$ 基因,获得PHDS26菌株<sup>[19]</sup>,但对于PHDS26菌株橘霉素及色素生产尚未作深入研究。YES培养基是专门用于检测微生物是否产真菌毒素的<sup>[20]</sup>,因此将PHDS26菌株接种到YES培养基检测橘霉素产量;季鸿飞<sup>[21]</sup>优化了Mr11k的培养基,利用含无机盐的米粉培养基,色素产量达到170.6U/mL,橘霉素含量为2.8 $\mu$ g/mL;通过米粉及含无机盐的米粉培养基进行液态发酵,考察 $pksCT$ 基因缺失株与原始菌株产色素及橘霉素的变化情况,有利于更深入地了解PHDS26菌株特性,为进一步敲除红曲菌产橘霉素相关基因提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

橙色红曲菌(*M. aurantiacus*)AS3.4384由中国科学院微生物研究所提供,接种于MES斜面,−4℃保存,每3个月传代1次。橙色红曲菌(*M. aurantiacus*)AS3.4384的 $pksCT$ 基因缺失株PHDS26,由本实验室构建<sup>[19]</sup>。

#### 1.1.2 试剂

甲醇、乙腈为国产色谱纯;橘霉素标准品 美国Sigma公司;孢子洗液:含有0.05%吐温-80的生理盐水。

#### 1.1.3 培养基

MPPY培养液(g/L):葡萄糖40、NaNO<sub>3</sub> 3、酵母浸粉2、KCl 0.5, pH 6.8, 121℃灭菌15min。麦芽汁(MES)固体培养基:麦芽、水比1:4(m/V),在60℃水浴锅中使其自行糖化,直至完全糖化;用4层纱布过滤;在滤液中加1~2个蛋清,搅拌均匀,煮沸,再用4层纱布过滤,其滤液即为麦芽汁。用糖度计测定其波美度,用蒸馏水稀释至6°Bé,调节 pH 6.4, 15g/L琼脂, 121℃灭菌20min。酵母浸膏蔗糖(YES)液体培养基:酵母浸粉40g、蔗糖160g,加水至1000mL, pH7.0, 121℃灭菌20min。含无机盐的米粉液态发酵培养基(g/L):大米粉50、NaNO<sub>3</sub> 2、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, 121℃灭菌20min。米粉液态发酵培养基:大米粉50g/L, 121℃灭菌20min。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 红曲菌孢子悬液的制备

将斜面保存的AS3.4384, PHDS26转接至MES固体培养基中, 28℃划线培养以得到单菌落;挑取单菌落接种于MPPY液体培养基中,置于恒温摇床, 28℃、180r/min培养72h;定量接种到MES固体培养基, 28℃静置培养10~12d;待长出大量孢子后,用无菌孢子洗液将孢子轻轻洗脱;双层500目尼龙布过滤菌丝体,制备成均一的孢子悬液(镜检应不含菌丝和子囊体);用血球计数板测定孢子悬液浓度。

#### 1.2.2 液态发酵

##### 1.2.2.1 YES培养基液态发酵

取1.2.1节制备的孢子悬液分别接种到50mL YES液体培养基,至终浓度为 $1 \times 10^3$ 个/mL, 30℃静置培养22d。

##### 1.2.2.2 米粉培养基液态发酵

取1.2.1节制备的孢子悬液分别接种到50mL米粉无机盐及米粉液体培养基,至终浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL, 30℃静置培养22d。

##### 1.2.2.3 米粉无机盐培养基液态发酵

方法同1.2.2.2节。

### 1.2.3 发酵液橘霉素的测定

#### 1.2.3.1 测定条件

采用HPLC法测定。检测条件<sup>[21]</sup>:色谱柱: Symmetry C<sub>18</sub> (250mm×4.6mm, 5 $\mu$ m);流动相:乙腈-水(77:23, V/V), pH 2.6;检测波长:  $\lambda_{Ex}$ =331nm,  $\lambda_{Em}$ =500nm;柱温: 26℃;流速: 0.8mL/min;进样量: 20 $\mu$ L。

#### 1.2.3.2 橘霉素HPLC标准曲线制定

将标准样品用乙腈稀释成不同质量浓度(0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25 $\mu$ g/mL)。从稀到浓依次进样,每次进样20 $\mu$ L,每个质量浓度进样3次;根据标品质量浓度(X)和峰面积(Y)绘制标准曲线:  $Y = 47.68759X - 0.19602$  ( $R^2=0.99951$ ),线性范围为0.1~25 $\mu$ g/mL。

#### 1.2.3.3 样品中的橘霉素含量测定<sup>[21-22]</sup>

发酵液研磨后恢复至初体积,在培养液中加入等体积甲醇,超声波处理20min,室温提取橘霉素5~8h;提取混合液 10000r/min离心20min去除菌丝;上清液通过孔径为0.45 $\mu$ m的微孔滤膜过滤;可根据需要将滤液用甲醇-水缓冲液(50:50, V/V)进行稀释。

按照1.2.3.1节方法,用HPLC检测培养液中的橘霉素含量。

### 1.2.4 发酵液色价的测定

采用分光光度法测定。发酵液研磨后恢复至初始体积,取1mL培养液加入80%乙醇定容至10mL摇匀,过滤或4000r/min离心20min,取清液,用80%乙醇适当稀释(稀释倍数控制在所测最大吸收波长410nm处得的OD值为0.5~1.0),以80%乙醇做空白对照,于紫外分光光度计上

进行全波长扫描,取 $OD_{410nm}$ 值计算色价。按照下式计算发酵液的色素产量( $E$ , 色价)。

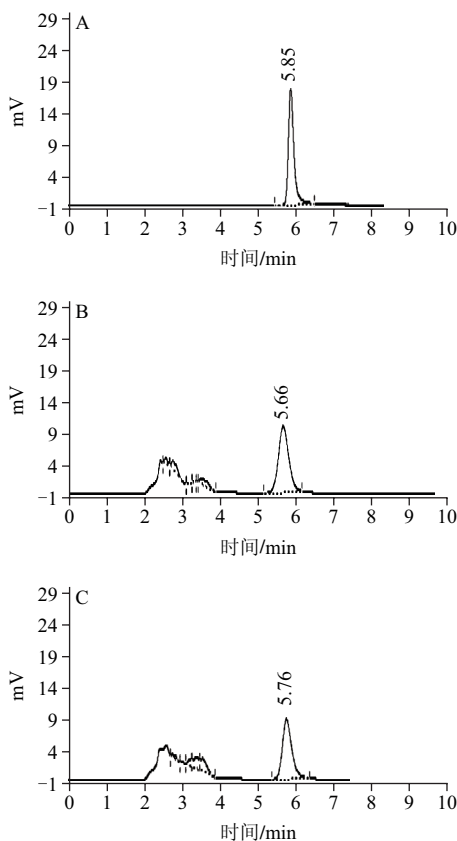
$$E/(U/mL)=OD_{410nm} \times \text{稀释倍数}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 红曲菌产橘霉素能力对比

#### 2.1.1 橘霉素标准品HPLC图谱

在1.2.3.1节的实验参数条件下,橘霉素标准品( $10\mu\text{g/mL}$ )的HPLC图谱显示(图1 A),橙色红曲菌AS3.4384和 $pksCT$ 基因缺失菌株PHDS26在YES发酵液中,在5.85min左右均出现了1个峰,因此判断橘霉素的保留时间是5.85min。



A.  $10\mu\text{g/mL}$ 橘霉素标准品HPLC图谱; B. 橙色红曲菌AS3.4384发酵液中橘霉素的HPLC图谱(YES发酵液稀释10倍); C. PHDS26发酵液中橘霉素的HPLC图谱(YES发酵液原液)。

图1 橘霉素的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of citrinin standard and samples produced by AS3.4384 and PHDS26

#### 2.1.2 红曲菌培养液样品中橘霉素的分析结果

##### 2.1.2.1 红曲菌YES培养液样品中橘霉素的分析

由图2可知, PHDS26菌株从发酵第8天开始产生橘霉素, 橘霉素产量比较低且稳定, 并在发酵第16天达到最大值 $10.10\mu\text{g/mL}$ ; 对照的原始菌株AS3.4384橘霉素产量较高并在发酵第12天橘霉素产量达到最大值 $365.40\mu\text{g/mL}$ 。

2005年Shimizu等<sup>[23]</sup>从紫色红曲菌中克隆得到了一个橘霉素合成基因 $pksCT$ 基因, 利用基因敲除技术验证了该基因编码橘霉素生物合成的聚酮合酶, 与红曲色素的生物合成无关。本实验中 $pksCT$ 基因缺失菌株PHDS26在常用真菌产毒素YES培养基中发酵还有少量的橘霉素合成, 与对照的原始菌株AS3.4384相比, PHDS26菌株橘霉素的产量显著降低, 橘霉素产量最大值仅为出发菌株的2.76%, 即降低了97.24%; 并且橘霉素产量达到最大值的发酵时间滞后于出发菌株AS3.4384, 暗示在橙色红曲菌中除了 $pksCT$ 基因以外, 橘霉素的生物合成可能还有其他未知基因的参与。

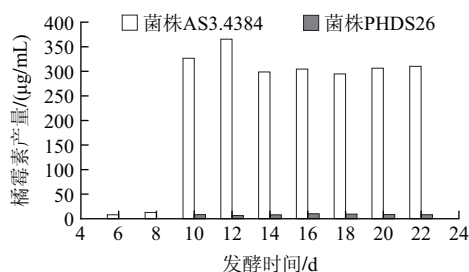


图2 原始菌株AS3.4384和基因缺失菌株PHDS26橘霉素产量比较

Fig.2 Comparison of citrinin production by the original strain AS3.4384 and the  $pksCT$ -deficient strain PHDS26 in YES medium

##### 2.1.2.2 红曲菌米粉培养液样品中橘霉素的分析

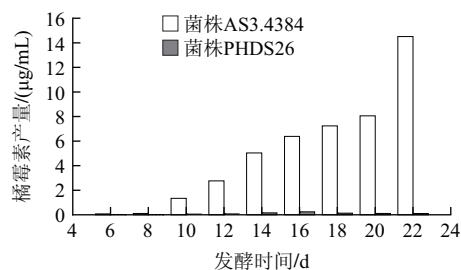


图3 原始菌株AS3.4384和基因缺失菌株PHDS26橘霉素产量比较

Fig.3 Comparison of citrinin production by the original strain AS3.4384 and the  $pksCT$ -deficient strain PHDS26 in rice flour medium

由图3可知, PHDS26菌株从发酵第12天开始产生橘霉素, 橘霉素产量比较低且稳定, 并在发酵第16天达到最大值 $0.24\mu\text{g/mL}$ ; 对照的原始菌株AS3.4384橘霉素产量较高并在发酵第22天橘霉素产量达到最大值 $14.51\mu\text{g/mL}$ 。与原始菌株AS3.4384相比, PHDS26菌株橘霉素的产量显著降低, 橘霉素产量最大值仅为出发菌株的1.65%, 即降低了98.35%。其原因可能是米粉培养基不利于 $pksCT$ 基因的缺失株生长, 橘霉素的合成量受到限制, 具体原因正在研究中。

##### 2.1.2.3 红曲菌米粉无机盐培养液样品中橘霉素的分析

由图4可知, PHDS26菌株橘霉素产量逐渐升高, 发酵22d达到 $2.22\mu\text{g/mL}$ ; 对照的原始菌株AS3.4384橘霉素



产量逐渐升高,发酵22d橘霉素产量达到3.65 $\mu\text{g/mL}$ 。与原始菌株AS3.4384相比,PHDS26菌株橘霉素的产量有所降低,橘霉素产量最大值为原始菌株的60.80%。与只有米粉的培养基相比,PHDS26菌株的橘霉素产量提高了89.20%。初步判断是米粉无机盐培养基有 $\text{NaNO}_3$ 提高了氮源的浓度,而易于橘霉素的产生<sup>[14-15]</sup>。

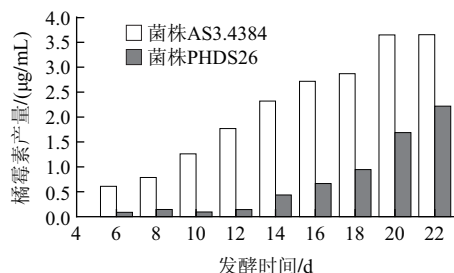


图4 原始菌株AS3.4384和基因缺失菌株PHDS26橘霉素产量比较

Fig.4 Comparison of citrinin production by the original strain AS3.4384 and the *pksCT*-deficient strain PHDS26 in inorganic salt fortified rice flour medium

## 2.2 红曲菌产色素能力对比

### 2.2.1 红曲菌米粉培养液样品中色素的分析

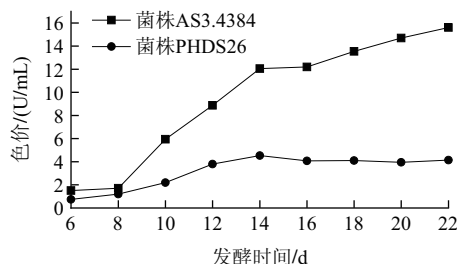


图5 红曲菌米粉培养液中原始菌株AS3.4384和基因缺失菌株PHDS26色素产量比较

Fig.5 Comparison of pigment production by the original strain AS3.4384 and the *pksCT*-deficient strain PHDS26 in rice flour medium

由图5可知, PHDS26菌株色素产量较低并且增长较慢,发酵14d达到最大值4.53U/mL,发酵14d后色素产量略微降低;原始菌株AS3.4384在发酵第8天色素产量迅速增长,发酵14d后色素产量增长缓慢,发酵22d时,色素产量达到15.61U/mL。与原始菌株AS3.4384相比,PHDS26菌株色素的产量有所降低,仅为出发菌株的29.00%。结合图3分析发现,利用米粉培养基发酵虽然有效降低了PHDS26菌株橘霉素产量,但同时色素产量也降低了,因此,菌株PHDS26在米粉培养中发酵达不到高产色素低产橘霉素的效果。其原因可能米粉培养基不利于*pksCT*基因的缺失株生长,红曲色素的合成量受到限制,具体原因正在研究中。

### 2.2.2 红曲菌米粉无机盐培养液样品中色素的分析

由图6可知, PHDS26菌株在发酵第8天色素产量缓

慢增长,发酵16d后色素产量迅速增长,发酵20d时,色素产量达到最大值14.01U/mL;而原始菌株AS3.4384发酵期间色素产量缓慢增长,发酵20d色素产量达到最大值5.58U/mL。与原始菌株AS3.4384相比, PHDS26菌株色素的产量显著升高,为出发菌株的2.5倍。与只有米粉的培养基相比, PHDS26菌株的色素产量提高了60.2%;但由于橘霉素产量也高,米粉无机盐培养基并非*pksCT*基因缺失菌株PHDS26低产橘霉素高产色素的最佳培养基。

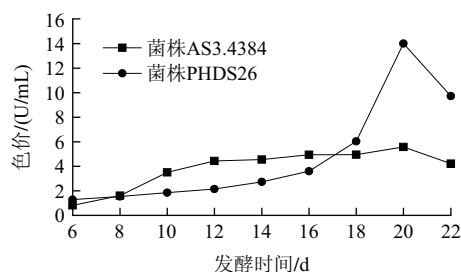


图6 红曲菌米粉无机盐培养液中原始菌株AS3.4384和基因缺失菌株PHDS26色素产量比较

Fig.6 Comparison of pigment production by the original strain AS3.4384 and the *pksCT*-deficient strain PHDS26 in inorganic salt fortified rice flour medium

## 3 讨论

从生产及应用的角度出发,旨在提高色素含量的同时,尽可能地降低或完全去除红曲产品中有毒副产品橘霉素。在红曲菌固态发酵中,红曲色素含量越高,其橘霉素含量可能也越高<sup>[20]</sup>。红曲菌本身的代谢机制及发酵工艺条件的不同都有可能是色素与橘霉素的关联性大的原因。由于橘霉素的存在,使得红曲菌发酵产品在食品和药品中的应用受到了极大的挑战,也成为限制我国红曲菌发酵产品出口的瓶颈,目前,主要通过自然筛选低产橘霉素菌株和诱变育种等方法来降低红曲菌代谢产物中橘霉素污染。然而,自然筛选和诱变育种等传统选育方法有着工作量大,定向性差等缺点。采用分子生物学技术对橘霉素合成的相关基因进行修饰或沉默,阻断红曲菌中橘霉素的合成途径,从而构建适用于工业生产的基因工程菌株是目前最有效的选育方法之一。例如对红曲菌中另外一个产橘霉素相关*ctnA*基因进行替换,使得红曲菌产橘霉素能力降低了42%,而红曲色素产量提高了33.9%<sup>[17]</sup>。随着分子生物学技术的迅速发展,利用基因工程技术对红曲菌聚酮体合成酶基因*PKS*进行研究,找到*PKS*对红曲代谢色素和橘霉素因子的控制点,提高色素的含量,降低并消除橘霉素的合成。通过对*pksCT*基因缺失菌株液态发酵的研究,发现*pksCT*基因的缺失不能完全阻断橘霉素的合成,并且存在色素产量高,橘霉素产

量也高的问题。控制橘霉素的产生发酵条件,与色素相比,橘霉素含1个羧基,氧原子比例较大,理论上提高通风量会促使橘霉素的生成,因此液态发酵时采用静置培养。较高的氮源含量,会强化橘霉素的生成;利用米粉发酵的橘霉素的产量较低,但色素产量也不高,因此不能通过单一的降低含氮无机盐的浓度来生产色素。利用米粉无机盐培养基发酵时,橘霉素生产量很高,却同时提高了色素的生产量。发酵工艺及条件的变化,对目的产物色素及副产物橘霉素的生成及消失复杂多变,需要长期研究。

结合两株菌在米粉培养基中的发酵情况,PHDS26菌株橘霉素产量显著降低,但色素产量也相对较低;而在米粉无机盐培养基中,色素产量和橘霉素含量都比较高,可能原因是色素与橘霉素的合成开始于同一个代谢途径和合成前体,因此色素与橘霉素生成量的多少具有相对的一致性。米粉无机盐的培养基含有较高浓度的氮源,促进了菌株PHDS26橘霉素的合成,同时促进了色素的合成;而米粉培养基限制了PHDS26菌株橘霉素的产量,但色素的产量也降低了。

本实验研究了*pksCT*基因缺失株在米粉及米粉无机盐培养基中的色素和橘霉素的生成量,没能实现高产色素低产橘霉素的期望;但在米粉液态培养基中橘霉素合成量显著降低,而在米粉无机盐培养基中色素的合成量得到相应的提高;因此,通过基因工程手段结合发酵工艺条件的优化,有望实现红曲菌高产色素低产橘霉素愿望。

#### 4 结 论

*pksCT*基因缺失菌株PHDS26在YES培养基中的橘霉素产量比原始菌株下降了97.24%,仅为10.1 $\mu$ g/mL;在米粉培养基中色素产量比原始菌株AS3.4384下降了71.0%,仅为4.53U/mL;但橘霉素产量比原始菌株下降了98.35%,仅为0.24 $\mu$ g/mL,通过对*pksCT*基因敲除能有效降低橘霉素的合成量;在米粉无机盐培养基中,橘霉素产量与原始菌株AS3.4384相比下降了39.18%,为2.22 $\mu$ g/mL,但色素产量比原始菌株提高了60.2%,达到了14.01U/mL。

#### 参考文献:

- [1] 刘松青. 红曲大量培养技术的研究[J]. 食品工业, 1995(3): 19-20.
- [2] SATO K, IWAKANMI S, GODA Y, et al. Novel natural colorants from *Monascus anka* U-1[J]. Heterocycles, 1992, 34(11): 2057-2060.
- [3] AKIHISA T, TOKUDA H, YASUKAWA K, et al. Azaphilones, furanoisophthalides, amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects[J]. Agric Food Chem, 2005, 53: 562-565.
- [4] IZAWA S, HARADA N, WATANABE T, et al. Inhibitory effects of food-coloring agents derived from *Monascus* on the mutagenicity of

- heterocyclic amines[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 3980-3984.
- [5] HOSSAIN C F, OKUYAMA E, YAMAZAKI M, et al. A new series of coumarin derivatives having monoamine oxidase inhibitory activity from *Monascus anka*[J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44(8): 1535-1539.
- [6] HSU W H, HUANG Y C, LEE B H, et al. The improvements of ankaflavin isolated from *Monascus*-fermented products on dyslipidemia in high-fat diet-induced hamster[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5: 434-443.
- [7] MUKHERJEE G, SINGH S K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation[J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 188-192.
- [8] CHOE D, LEE J, WOO S, et al. Evaluation of the amine derivatives of *Monascus* pigment with anti-obesity activities[J]. Food Chemistry, 2012, 134: 315-323.
- [9] 李利, 陈福生. 红曲菌GABA高产菌株的筛选及培养基的研究[J]. 安徽农业学报, 2012, 40(30): 14956-14957.
- [10] SERAMAN S. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*[J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88: 266-276.
- [11] 王渊龙, 夏永军, 侯建平, 等. 红曲菌液态发酵产Monacolin K的现状 & 展望[J]. 食品工业, 2012, 33(10): 129-132.
- [12] 产竹华, 许赣荣. 不产橘霉素红曲诱变菌株的选育及色素发酵条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(11): 28-31.
- [13] SHARMILA G, NIDHI B, MUTHUKUMARAN C, et al. Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder[J]. Industrial Crops and Products, 2012, 44: 158-164.
- [14] CHENG M J, WU M D, SU Y S, et al. Secondary metabolites from the fungus *Monascus kaoliang* and inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages[J]. Phytochemistry Letters, 2012, 5(2): 262-266.
- [15] SHIMIZU T, KINOSHITA H, ISHIHARA S, et al. Polyketide biosynthesis gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*[J]. Applied and Environment Microbiology, 2005, 71(7): 3453-3457.
- [16] CHEN Y P, TSENG C P, CHIEN I L, et al. Exploring the distribution of citrinin biosynthesis related genes among *Monascus* species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24): 11767-11772.
- [17] XU Minjun, YANG Zeliang, LIANG Zhizhou, et al. Construction of a *Monascus purpureus* mutant showing lower citrinin and higher pigment production by replacement of *ctnA* with *pksI* without using vector and resistance gene[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(20): 9764-9768.
- [18] 李钟庆. 红曲霉属的一个新种[J]. 微生物学报, 1982, 22(2): 118-122.
- [19] FU Guiming, XU Yang, LI Yanping, et al. Construction of a replacement vector to disrupt *pksCT* gene for the mycotoxin citrinin biosynthesis in *Monascus aurantiacus* and maintain food red pigment production[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2007, 16(Suppl 1): 137-142.
- [20] 许赣荣. 红曲橘霉素的检测及发酵控制技术[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [21] 季鸿飞. 红色红曲菌*pksCT*基因缺失株的构建及其固液态发酵生产红曲色素的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- [22] 黄志兵, 李燕萍, 王延华, 等. 橙色红曲菌AS3.4384及其诱变体发酵产物中的橘霉素和色素的高校液相色谱研究[J]. 分析化学, 2007, 35(4): 474-478.
- [23] SHIMIZU T, KINOSHITA H, ISHIHARA S, et al. Polyketide synthesis gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3453-3457.