

## 几种酶活抑制剂对红曲霉色素合成的影响

朱 雷, 常慧萍, 唐欣昀\*, 李坤阳, 曹媛媛

(安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

**摘 要** 红曲色素是天然安全的色素和防腐剂, 根据代谢数据库选择了 6 种代谢途径关键酶的抑制剂, 在基本培养基中考察这些抑制剂对红曲霉生长和合成色素的影响。甲羟戊酸合成途径的抑制剂邻氨基苯甲酸和 3-*A*-二羟苯甲酸对红曲霉生长和色素生物合成都没有影响, 莽草酸途径关键酶氨基苯甲酸合成酶的抑制剂三甲胺不抑制红曲霉的生长和色素的合成。在不影响红曲霉生长的浓度范围内, 聚酮途径中  $\beta$ -酮酯酰-ACP 合成酶的专性抑制剂碘乙酰胺(0.5mmol/L)抑制红曲霉色素合成程度达 64.7%, 非专性抑制剂咪唑(1mmol/L)抑制幅度达 60%, 聚酮途径硫酯酶的抑制剂 2-*A*-二硝基氟苯(0.5mmol/L)强烈抑制红曲霉合成色素的活性, 抑制程度达 91.5%。相关酶活抑制的试验数据显示红曲霉可能经过聚酮途径合成红曲色素。

**关键词**: 红曲霉, 色素合成, 酶活抑制剂, 聚酮途径

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0706-04

红曲霉(*Monascus*)是重要的用于传统食品加工的微生物<sup>[1-5]</sup>, 在中国及东南亚地区已有上千年的历史, 红曲霉的发酵产物红曲是天然安全的色素和防腐剂, 在酿酒、食品、食用色素、中药等方面得到广泛应用。红曲色素是红曲霉的次生代谢产物, 由黄色及红色等多种色素组成, 红曲色素稳定性好, 是具有防腐、保健、药用作用的主要成份<sup>[6]</sup>。目前国内外的研究都集中在优化培养基提高色素产量、选育高产菌株以及红曲霉产生的其它代谢产物等方面, 虽然已经揭示了红曲色素的化学结构<sup>[7]</sup>, 属 Azaphilone 类有机物, 但尚没有关于其生物合成代谢途径的研究<sup>[8,9]</sup>; 由于不了解红曲色素合成机理及生物合成代谢途径, 因而也难以通过科学的手段进行发酵代谢调控。

由红曲色素的化学结构推测其可能属于聚酮类化合物<sup>[10]</sup>, Moor<sup>[11,12]</sup>等用核磁共振和质谱相结合的方法证明红曲霉色素之一 Monacolin K 由 2 个聚酮体链构成, 通过对 C-H、C-O 键形成的研究表明 Monacolin K 合成与脂肪酸合成十分相似, 因此他们推测 Monacolin K 是通过与脂肪酸合成途径十分相似的聚酮体途径合成, 这为代谢途径的研究提供了线索。本研究将采用酶活抑制剂来探讨红曲色素的生物合成途径, 为红曲色素合成机理的研究和高产菌株的选育工作提供参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种 红曲霉菌株 M5034(*Monascus anka*)从中国工业

微生物菌种保藏中心购得。

**1.1.2 试剂和仪器**: 三甲胺、邻氨基苯甲酸、3-*A*-二羟苯甲酸、碘乙酰胺、咪唑、2-*A*-二硝基氟苯均购自北京原平皓生物技术公司合肥分公司。TU-1800spc 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司)测定 OD 值。液体振荡培养采用 HZ-2010K 恒温摇瓶柜(太仓科教仪器厂)。

**1.1.3 培养基**: ①麦芽汁琼脂斜面培养基: 每升含葡萄糖 10g, 酵母膏 3g, 麦芽浸膏 3g, 蛋白胨 5g, 琼脂 20g, pH6.4, 100kPa 灭菌 20min; ②种子培养基: 种子培养基成分与斜面培养基相同, 不加琼脂; 500mL 三角瓶分装 75mL, 100kPa 灭菌 20min; ③基本培养基: 每升含葡萄糖 20g, 蛋白胨 5g, 酵母膏 5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.1g, pH6.4, 250mL 三角瓶分装 60mL, 0.1mPa 灭菌 20min。

#### 1.2 酶活抑制剂的选择

参考 KEPP Database 和 Brenda Database<sup>[13,14]</sup>的代谢途径选择各类酶活抑制剂三甲胺、邻氨基苯甲酸、3-*A*-二羟苯甲酸、碘乙酰胺、咪唑、2-*A*-二硝基氟苯。

#### 1.3 抑制色素合成方法

用 10mL 无菌水从麦芽汁琼脂斜面培养基上洗下红曲霉孢子, 每瓶种子培养基接种 5mL 孢子悬浮液(孢子浓度镜检为  $10^6$ /mL), 30℃ 下 140r/min 回转摇床上避光培养 3d; 在每瓶基本培养液中加入 3mL 种子培养液, 30℃、120r/min 振荡避光培养。用 3d 菌龄的菌液作为种子, 按 1% 的比例接种到新鲜基本培养液中, 无菌加入各种不同浓度的抑制剂, 每种处理 3 次重复, 30℃、120r/min 振荡避光培养; 定时取样测定抑制剂

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(2006KJ173B)

\* 通讯作者。Tel: 86-551-5786129; Fax: 86-551-5786833; E-mail: tangxinyun@21cn.com

作者简介: 朱 雷(1983-), 男, 安徽淮南人, 研究方向为微生物生理学。E-mail: zhulei19832001@sohu.com

收稿日期: 2006-11-30; 接受日期: 2007-01-08; 修回日期: 2007-03-27

对生长的影响。

#### 1.4 结果测定

**1.4.1 菌体干重的测定**：取 10mL 充分振荡均匀的菌液，滤纸过滤，80℃ 烘干 24h 称重，每 10mL 菌液含干菌体重  $W_1$ ，然后换算成菌液中干菌重  $W = W_1 \times 100$  (g/L)。

**1.4.2 培养液色价的测定**：按参考文献 [15] 测定计算，以总 OD 值 ( $OD_{410} + OD_{510}$ ) 表示红曲色素色价。

**1.4.3 数据处理**：利用计算机对所有数据进行方差分析和差异显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 甲羟戊酸合成途径的抑制剂对色素生物合成的影响

根据 KEPP Database 和 Brenda Database<sup>[13,14]</sup>，邻氨基苯甲酸和 3,4-二羟苯甲酸分别抑制甲羟戊酸途径的两个关键酶——磷酸甲羟戊酸激酶和二磷酸甲羟戊酸脱羧酶——的活性。邻氨基苯甲酸对红曲霉素生物合成的影响见图 1，从该图可以看出邻氨基苯甲酸对菌体的生长没有影响，只有当浓度大于 15mmol/L 时对菌体的生长才有微弱的影响 ( $p < 0.05$ ) 而对色素生物合成几乎没有影响。从图 2 可以看出 3 个浓度的 3,4-二羟苯甲酸对菌体生长和色素的合成均没有显著的影响。结果表明红曲色素的合成途径不是由甲羟戊酸途径合成。

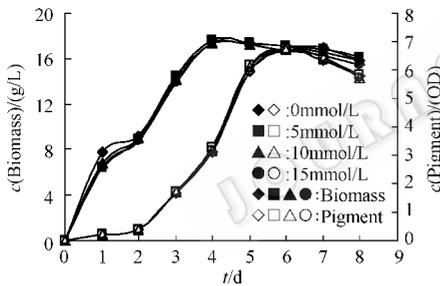


图 1 邻氨基苯甲酸对 M5034 菌株色素合成的影响

Fig.1 Effects of anthranilic acid on pigments biosynthesis of M5034 strain.

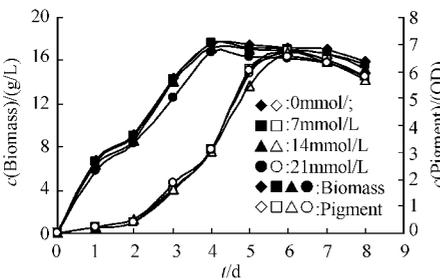


图 2 3,4-二羟苯甲酸对 M5034 菌株色素合成的影响

Fig.2 Effects of 3,4-dihydroxybenzoic acid on pigments biosynthesis of M5034 strain.

### 2.2 三甲胺对色素生物合成的影响

三甲胺是莽草酸途径的关键酶氨基苯甲酸合成酶的抑制剂。不同浓度三甲胺对菌体生长和色素的合成均没有显著的影响 (图 3)，因此证明红曲色素不是由莽草酸途径合成。

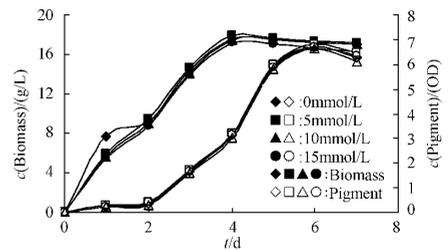


图 3 三甲胺对 M5034 菌株色素合成的影响

Fig.3 Effects of trimethylamine on pigments biosynthesis of M5034 strain.

### 2.3 碘乙酰胺对色素生物合成的影响

从图 4 可以看出，碘乙酰胺对菌体的生长几乎没有影响，而 0.1mmol/L 的碘乙酰胺对色素的合成即表现出明显的抑制效果，0.5mmol/L 浓度的抑制程度达到 64.7%，1mmol/L 的碘乙酰胺完全抑制了红曲色素的合成。碘乙酰胺是聚酮合成途径中  $\beta$ -酮酯酰-ACP 合成酶的专一性抑制剂。

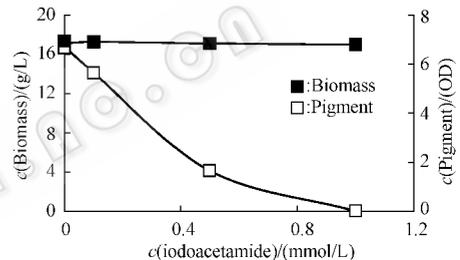


图 4 碘乙酰胺对 M5034 菌株色素合成的影响

Fig.4 Effects of iodoacetamide on pigments biosynthesis of M5034 strain.

### 2.4 咪唑对色素生物合成的影响

咪唑对红曲霉生长和色素的影响见图 5，从图中可以看出，当咪唑浓度小于 1mmol/L 时，红曲霉菌的菌体生长不受影响，而咪唑浓度大于 1mmol/L 时，菌体生长开始受到抑制；浓度进一步升高才开始抑制菌体生长，2.5mmol/L 时菌体基本上不再生长。当咪唑浓度达到 1mmol/L 时，色素产量就受到强烈抑制 ( $p < 0.01$ )，仅为对照的 40% 左右 (6d)；浓度进一步升高，色素的合成几乎完全受到抑制。由于咪唑浓度为 1mmol/L 时菌体生长未受到抑制，而色素的合成已受到显著抑制，可以认为咪唑对色素合成的抑制作用并非是由于抑制菌体生长而产生的结果，而是对  $\beta$ -酮酯酰-ACP 合成酶活性

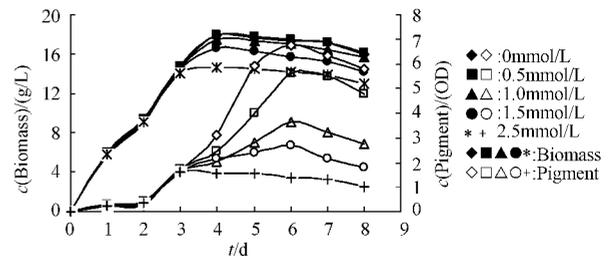


图 5 咪唑对 M5034 菌株色素合成的影响

Fig.5 Influence of imidazole on pigments biosynthesis of M5034 strain.

抑制作用导致的。

## 2.5 二硝基氟苯对色素合成的影响

2-*A*-二硝基氟苯的阻断抑制实验结果如图6所示,数据表明浓度大于2mmol/L的2-*A*-二硝基氟苯才对菌体生长开始出现抑制效应。而当二硝基氟苯浓度为0.5mmol/L时,红曲色素产量已经只有对照的51%,红曲色素的合成已经受到显著抑制;当二硝基氟苯浓度为1.0mmol/L时,细胞量只受到轻微影响,而红曲色素产量只有对照的8.5%。这些数据说明2-*A*-二硝基氟苯是红曲色素合成的抑制剂。2-*A*-二硝基氟苯能强烈抑制聚酮类抗生素合成过程中具有重要作用的硫酯酶的活性<sup>[16]</sup>,本组试验结果说明红曲色素的合成可能与聚酮途径有关。

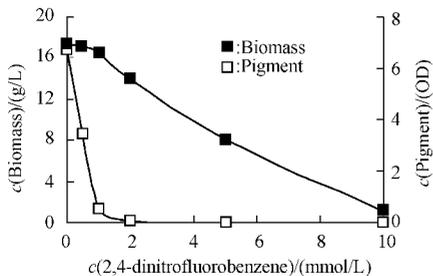


图6 2-*A*-二硝基氟苯对 M5034 菌株色素合成的影响

Fig.6 Influence of 2-*A*-dinitrofluorobenzene on pigments biosynthesis of M5034 strain.

## 3 讨论

甲羟戊酸途径是合成萜类抗生素和许多次级代谢产物的主要途径<sup>[13,14]</sup>,与聚酮途径具有很多相似之处,磷酸甲羟戊酸激酶和二磷酸甲羟戊酸脱羧酶是该途径2个关键酶,邻氨基苯甲酸和3-*A*-二羟苯甲酸分别抑制这2种酶的酶活;本实验数据显示邻氨基苯甲酸和3-*A*-二羟苯甲酸对红曲霉色素的合成没有抑制作用。莽草酸途径关键酶氨基苯甲酰合成酶的抑制剂三甲胺对红曲霉色素的合成也没有抑制作用。聚酮合成途径中 $\beta$ -酮酯酰-ACP合成酶专一性抑制剂碘乙酰胺和非专一性抑制剂咪唑都对红曲霉色素的生物合成具有强烈的抑制作用。类似地聚酮合成途径中硫酯酶的抑制剂2-*A*-二硝基氟苯也能强烈抑制红曲霉色素的合成。这些实验数据都从不同的角度显示在红曲霉中是经过聚酮途径合成色素。

要详细阐明研究一个代谢途径可以采用补加前体法<sup>[17]</sup>、放射性同位素示踪法<sup>[18]</sup>、代谢突变株分析法<sup>[19]</sup>、DNA重组技术<sup>[20,21]</sup>、酶抑制剂法<sup>[22,23]</sup>等技术。Moor和Yoshizawa等<sup>[11,12]</sup>用核磁共振和质谱结合的方法证明红曲霉色素由2个聚酮体链构成,从物质结构的角度推测红曲霉色素是经过聚酮途径合成,本研究小组已经采用添加前体的方法研究发现能分解为琥珀酰CoA的缬氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、谷氨酸以及乙酸、丙酸等具有前体的作用,能够刺激红曲霉色素的合成<sup>[24]</sup>,本文从相关酶活抑制的角度也获得相同的结论。研究一个代谢途径需要先易后难,采用不同的方法进行交互验证

证<sup>[25,26]</sup>,在基本确定了红曲霉素的合成途径后可以筛选色素合成突变株,采用分子生物学技术进一步研究红曲霉素的合成机理,从代谢工程角度选育高产菌株,提高红曲霉色素产量。

## 参考文献

- [1] 陈彦霖,李昭蓉,陈建州,等. 红曲菌种的研究开发与应用. 食品工业月刊(台),1998,30(7):1-10.
- [2] Chu SW, Poon YK. Submerged production of Monascus pigments. *Mycologia*, 1993, 85: 214-218.
- [3] Fink-Gremmels J, Leistner L. Biological effects of *Monascus purpureus*. *Fleischwirtschaft*, 1989, 69: 115-122.
- [4] 何秉旺,郭君,方一澄,等. 产葡萄糖淀粉酶的红曲霉的筛选及其发酵条件的研究. 微生物学报, 1973, 13(2): 142-150.
- [5] Iizuka H, Lin CR. On the genus *Monascus* of Asia and its specific characteristics. *Adv Biochem*, 1981, 2: 555-561.
- [6] 上海工业微生物研究所. 红曲色素的研究与应用. 工业微生物, 1980, 4: 1-10.
- [7] 傅亮,周卫兵,高孔荣. 红曲色素发酵特征的研究. 食品科学, 1996, 17(3): 69.
- [8] 傅金泉. 我国红曲生产与应用的现状及发展前景. 食品与发酵工业, 1995, 5: 76-79.
- [9] Lakrod K, Chairisook C, Skinner DZ. Expression of pigmentation genes following electroporation of albino *Monascus purpureus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 369-374.
- [10] 陈义先,彭桃娇,田宏现. 红曲及红曲霉的研究与应用. 湖北农学院学报, 2000, 20(2): 188-190.
- [11] Moore RN, Bigam G, Chan JK, et al. Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevinoлин by *Aspergillus terreus*. *J Am Chem Soc*, 1985, 107(12): 3694-3701.
- [12] Yoshizawa Y, Witter DJ, Liu YQ, et al. Revision of the biosynthetic origin of ofoxgens in mevinoлин (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(6): 2693-2694.
- [13] KEGG Database. <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>.
- [14] Brenda Database. <http://www.brenda.unikoeln.de>.
- [15] 傅亮. 红曲色素在红曲霉发酵代谢中生理功能的探讨. 食品科学, 1998, 10: 10-12.
- [16] Tang L, Fu H, Betlach MC, et al. Elucidating the mechanism of chain termination switching in the pikromycin/methymycin polyketide synthase. *Chem Biol*, 1999, 6: 553-558.
- [17] Chen P, Qi FX, Novak J, et al. Effect of amino acid substitutions in conserved residues in the leader peptide on biosynthesis of the lantibiotic mutacin II. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195: 139-144.
- [18] Stefensky M, Li SM, Vogler B, et al. Novobiocin biosynthesis in *Streptomyces spheroides*. *FEMS Microb Lett*, 1998, 161: 69-74.
- [19] Cole SP, Rudd BAM, Hopwood DA. Biosynthesis of the antibiotic actinorhodin: analysis of blocked mutants *S. coelicolor*. *J Antibiotics*, 1987, 40(5): 340-347.
- [20] Cafrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide

- [ 21 ] Cerdeno AM, Bibb MJ, Challis GL. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology*, 2001 **8**: 817 – 829.
- [ 22 ] Nonaka K, Kumasaka C, Okamoto Y, et al. Bioconversion of millibemycin-related compounds: biosynthetic pathway of millibemycins. *J Antibiotics*, 1999, **52**(2): 109 – 116.
- [ 23 ] Nonaka K, Tsukiyama T, Sato K, et al. Bioconversion of millibemycin-related compounds: Utilization of non-producer, strain. RNBC-5-51. *J Antibiotics*, 1999, **52**(2): 620 – 627.
- [ 24 ] 朱 雷, 常慧萍, 韦 兵, 等. 红曲色素合成机理的初步探讨. *食品科学* 2007 **28**(3): 77 – 79.
- [ 25 ] 李越中. 药物微生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2004, 172 – 173.
- [ 26 ] 李季伦, 张伟心, 杨启瑞, 等. 微生物生理学. 北京: 北京农业大学出版社, 1993 91 – 101.

## Effects of enzyme inhibitors on the pigment synthesis in *Monascus anka*

ZHU Lei, CHANG Hui-ping, TANG Xin-yun<sup>\*</sup>, LI Kun-Yang, CAO Yuan-yuan  
(Life Science College, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract** *Monascus* pigment is a natural, safe pigment and preservative. Six inhibitors of key enzymes from three metabolic pathways were chosen according to databases, and were used in basic medium to study their effects on the pigment synthesis in *Monascus anka* strain M5034. Trimethylamine, inhibitor of shikimic acid pathways, and anthranilic acid and 3-*A*-dihydroxybenzoic acid, inhibitors of mevalonic acid pathways, had no effects on the pigment biosynthesis. Pigment biosynthesis was severely inhibited by three inhibitors of the key enzymes in the polyketide pathways at the concentrations with no effects for growth of the strain. Iodiacetamide (lower than 0.5mmol/L), specific inhibitor of  $\beta$ -ketoacyl-acylcarrier protein (ACP) synthase, reduced remarkably the pigment synthesis by 64.7%; 1.0 mmol/L imidazole, being nonspecific inhibitor of ACP synthase, could strongly suppress the synthesis of pigment by 60%, and 0.5mmol/L 2-*A*-dinitrofluorobenzene, inhibiting the activity of thioesterase, strongly limited the pigment production with inhibitory extent up to 91.5%. All data implied that *Monascus* pigments might be synthesized through polyketide pathway.

**Keywords** : *Monascus anka* ; pigment synthesis ; inhibitors of enzymes ; polyketide pathway

Foundation item : Natural Science Foundation of Anhui Province(2006KJ173B)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel : 86-551-5786129 ; Fax 86-551-5786833 ; E-mail tangxinyun@21.cn.com

Received 30 November 2006/ Accepted 8 January 2007/ Revised : 27 March 2007