

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(7):863–872; 4 July 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140579

红色红曲菌 M7 中色素聚酮合酶基因敲除突变体的鉴定

谢娜娜^{1,2}, 张乙平², 陈福生^{2*}

¹重庆工商大学环境与生物工程学院, 催化与功能有机分子重庆市重点实验室, 重庆 400067

²华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】研究红色红曲菌 (*Monascus ruber*) M7 中控制红曲色素合成的聚酮合酶基因 (*pksPT*) 的功能。【方法】对 M7 中 *pksPT* 进行了生物信息学分析;借助农杆菌介导的红曲菌转化技术敲除 M7 中 *pksPT*, 获得 *pksPT* 缺失突变体 ($\Delta pksPT$), 比较 M7 和 $\Delta pksPT$ 菌落形态、产孢能力、生长速度、色素和桔霉素产量的差异。【结果】*pksPT* 全长 8687 bp, 编码蛋白含有 2690 个氨基酸, 属于非还原 III 型聚酮合酶, 包括 β -酮酯酰基合成酶 (KS)、酰基载体蛋白 (ACP)、酰基转移酶 (AT) 和甲基转移酶 (ME) 四种结构域, 组合形式为 KS-AT-ACP-ACP-ME。 $\Delta pksPT$ 的分析结果显示, *pksPT* 的敲除不影响其产分生孢子和闭囊壳的能力; $\Delta pksPT$ 不能产生任何一种红曲色素; 其生长速度明显快于野生菌株 M7; 桔霉素产量较 M7 提高了 2.8 倍。【结论】*pksPT* 是 M7 中控制红曲色素合成的关键基因, 红曲色素的合成显著影响红曲菌产桔霉素能力和生长速度。

关键词: 红曲色素, 桔霉素, 聚酮合酶基因, 红色红曲菌

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0863-10

聚酮化合物 (Polyketides, PKs) 是一大类具有类似合成途径的次级代谢产物的总称, 主要包括很多抗生素、真菌毒素和部分色素^[1]。在植物、真菌和细菌中已经发现 1 万多种 PKs^[2], 一些 PKs 具有有益的生物活性, 如能够降血脂 (洛伐他汀, Lovastatin)^[3] 和抑制真菌 (灰黄霉素, Griseofulvin)^[4] 等, 因此被广泛应用于农业、医药和食品领域中; 还有很多 PKs 具有毒性, 如黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 分泌的黄曲霉毒素具有强致癌性^[5]。研究发现, 参与聚酮化合物合成的基因通常连接在一起, 以基因簇的形式存在, 在簇中均至少存在一个编码聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS) 的基因^[6-7]。PKS 是控制聚酮合成途径的限速酶, 按照

结构和催化机理, PKS 可以分为模块型 (I 型)、重复型 (II 型)、查尔酮型 (III 型) 和重复 I 型 4 类^[1, 8-9]。真菌中的 PKS 大多属于重复 I 型 PKS^[10]。重复 I 型 PKS 是多功能蛋白, 拥有多个具有不同催化功能的结构域, 根据 PKS 中结构域的种类, 这类 PKS 又进一步被划分为 8 类, 分别是 4 种非还原型 PKS (非还原 I 型、II 型、I & II 型、III 型) 和 4 种还原型 PKS (还原 I 型、II 型、III 型和 IV 型)^[12]。虽然不同的重复 I 型 PKS 拥有的结构域种类和数目不同, 但是它们都有 3 个必需的保守结构域, 即 β -酮酯酰基合成酶 (β -ketosynthase, KS)、酰基载体蛋白 (Acyl carrier protein, ACP) 和酰基转移酶 (Acyltransferase, AT)^[11]。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31330059/31171649); 湖北省对外科技合作类项目 (2014BHE0016); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2662014PY034)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-27-87282927; E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 谢娜娜 (1984 -), 女, 安徽淮北人, 讲师, 博士研究生, 主要研究方向为食品微生物发酵及功能基因组研究。E-mail: 315069517@qq.com

收稿日期: 2014-12-03; **修回日期:** 2015-02-08

丝状真菌——红曲菌 (*Monascus* spp.) 是我国及东南亚国家传统的发酵微生物, 主要用于红曲的生产。红曲菌可以产生多种有益的次级代谢产物, 如降血脂药物莫纳可林 K^[12]、降血压药物 γ -氨基丁酸^[13] 和食品着色剂红曲色素 (*Monascus* pigments, MPs) 等, 同时还可以分泌一种肾脏毒素——桔霉素^[14], 导致红曲产品受到污染。

MPs 是红曲菌产生的最主要的次级代谢产物之一, 是具有类似结构 (嗜氮酮) 的一类化合物的总称, 主要有红、橙和黄 3 类色素组分, 现在已经有超过 50 种 MPs 被鉴定^[15-16]。除了着色功能外, 部分 MPs 还具有抗氧化、消炎和抗癌等生物学活性^[17-19]。研究表明, 桔霉素、莫纳可林 K 和 MPs 均是聚酮化合物, 在 2005 年和 2008 年分别成功地从红曲菌中克隆得到控制桔霉素和莫纳可林 K 合成的 PKS 基因^[12, 20]。基于此, 桔霉素和莫纳可林 K 在分子水平上的研究得到迅猛发展。本实验室早在 2010 年已经通过基因组测序技术获得红色红曲菌 (*M. ruber*) M7 中控制红曲色素合成的 PKS 基因簇, 并通过敲除簇内调节基因证实了该基因簇是控制 MPs 合成的 PKS 基因簇^[21]; 2013 年, Balakrishnan 等也从从毛红曲菌 (*M. pilosus*) 中克隆得到该基因簇^[22]。本研究对 *M. ruber* M7 中色素 PKS 基因 (*pksPT*) 进行了详尽的生物信息学分析, 并构建了色素 PKS 基因缺失突变菌株 ($\Delta pksPT$), 着重分析了红曲菌不产红曲色素时, 桔霉素和红曲菌生长速度上的差异, 以探讨红曲色素合成途径与桔霉素合成途径、红曲菌生长的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 野生菌株 *M. ruber* M7 是一株高产 MPs 和桔霉素的菌株, 由本实验室鉴定和保藏^[23]; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 为转化供体, 本实验室保藏; 质粒 pCAMBIA3300 为二元载体, 由华中农业大学植物科技学院姜道宏教授惠赠; 质粒 pSKH 提供潮霉素抗性标记基因, 本实验室保藏。

1.1.2 培养基: 马铃薯葡萄糖固体培养基 (PDA)^[21]、马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB)^[21]、米饭培养基^[17] 和 YES 培养基 (Yeast extract sucrose)^[14]。

1.1.3 主要试剂和仪器: *TransTaq* DNA Polymerase HiFi Fidelity (HiFi) 和 Trans 2K plus marker (全式金生物有限公司, 北京); 限制性内切酶和 T4 连接酶 (宝生物工程 (大连) 有限公司, 大连); 潮霉素 B (Hygromycin B) (Amresco); 桔霉素标准品 (美国 Sigma 公司); DIG-High Prime DNA Labeling & Detection Starter kit I (瑞士 Roche 公司)。PCR 仪 (德国 Biometra 公司); 凝胶成像系统 (北京六一仪器厂); 相差显微镜 (BH-2) (日本 Olympus 公司); Water e2695 高效液相色谱仪 (Waters 1525 泵, 2998PDA 检测器, 270 进样器, 美国 Waters 公司)。

1.1.4 相关引物: 敲除 *pksPT* 的相关引物及 *pksPT* 敲除突变体的验证引物如表 1 所示。所有引物由金斯瑞生物科技公司 (南京) 合成。

表 1. 本研究用到的引物

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Function
p1	<i>GGGGTACC</i> ACATCCAAGTCGAGATGGTCAAGTC <u>AGTGCCTCTCAATATCATCTTCTGTCGAC</u>	For amplification of the 5' flanking region of KS domain (828 bp)
p2	<u>ATGATGCCAGCTGAACGGAGT</u> <u>CACCTGTTTACAGGTAATCCTTCTTTCTAG</u>	For amplification of the 3' flanking region of KS domain (878 bp)
p3	GGCGAGCTGGAACAGAAGT	
p4	<i>CGCTCTAG</i> ACACGGCGTGATTGAAATAGA	
hphf	GTCGACAGAAGATGATATTG	For amplification of <i>hph</i> cassette (2137 bp) from plasmid pSKH
hphr	CTAGAAAGAAGGATTACCTC	and the amplification of probes for Southern blot
p5	TCAGGCACAGTTGTCATATG	For the identification of mutants and the amplification of probes for Southern blot
p6	GTCTTGGACTGGATGAAGCGTAGG	
pksPT-F	CCAACCTCCGTAGCGATGAT	For RT-PCR
pksPT-R	GCAAACCGTGCCACAGTAAC	
GAPDH-F	GTCTATGCGTGTGCCTACTTCC	
GAPDH-R	GAGTTGAGGGCGATACCAGC	For RT-PCR

Bold italic letters indicate *Kpn* I and *Xba* I, respectively; Underlined letters are a portion of *hph*.

1.2 *pksPT* 生物信息学分析

采用 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 预测基因的结构及其编码的氨基酸序列。采用 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 预测基因编码蛋白的活性结构域。采用 NCBI 的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行基因功能预测。采用 Model_3D_PKS (http://www.nii.ac.in/~swadha/prog_htmls/try2.html) 模拟色素 PKS 的 AT 三维结构。聚酮合成酶结构域保守氨基酸比对所用到的序列均从 NCBI 获得。

1.3 红曲菌基因组的抽提

将红曲菌涂布在铺有玻璃纸的 PDA 平板上, 28℃ 培养 7 d, 揭取菌丝体, 采用十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB) 法从菌丝体中提取基因组^[24]。

1.4 敲除载体的构建

1.4.1 敲除盒的构建: 分别采用引物对 p1/p2 和 p3/p4 从 M7 基因组中扩增待敲除区域的 5'-同源臂 (828 bp) 和 3'-同源臂 (878 bp); 采用引物对 hphf/hphr 从质粒 pSKH 中扩增潮霉素抗性基因 (*hph*); 采用 Double-joint PCR^[25] 将 5'-同源臂和 3'-同源臂分别连接在 *hph* 的两侧, 获得敲除盒。

1.4.2 敲除载体的构建: 采用 *Kpn* I 和 *Xba* I 分别双酶切敲除盒和双元载体 pCAMBIA3300, 在 T4 DNA 连接酶作用下将敲除盒连入双元载体多克隆位点之间, 获得敲除载体。

1.5 红曲菌转化

采用根癌农杆菌介导的红曲菌转化技术^[24] 将敲除载体转入 M7 中; 以潮霉素作为抗性筛选标记, 对转化子进行初步筛选。

1.6 转化子的 PCR 和 Southern 杂交验证

提取不产色素的转化子基因组进行 PCR 验证, 验证引物为 p1/p4、hphf/hphr 和 p5/p6。采用限制性内切酶 *Bgl* II、*Cla* I、*Nco* I 和 *Nde* I 分别酶切 M7 的基因组, 引物 p5/p6 的扩增产物使用地高辛标记后作为探针 (Probe1), 检测 *pksPT* 在红曲菌中的拷贝数。采用地高辛标记的 *hph* 基因 (Probe2) 和 Probe1 杂交 *Bgl* II 酶切的转化子基因组, 鉴定 *pksPT* 缺失突变体。

1.7 *pksPT* 表达量检测

将 50 μ L 红曲菌孢子悬浮液 (10^5 个孢子/mL) 接种至盛有 50 mL PDB 培养基的 100 mL 三角烧瓶中, 28℃、120 r/min 培养 7 d, 过滤收集菌丝体, 抽提

RNA, 以 GAPDH 基因 (扩增引物: GAPDH-F/GAPDH-R) 作为内参基因, 采用反转录 PCR (Reverse transcription PCR) 测定 *pksPT* 的表达量。

1.8 形态观察和显微观察

在 PDA 平板上分别接种 0.5 μ L M7 和突变体孢子悬浮液 (10^5 个孢子/mL), 28℃ 静置培养 14 d, 观察菌落大小和颜色, 并观察突变子是否产闭囊壳和分生孢子。

1.9 MPs 检测

将 2 mL 红曲菌孢子悬浮液 (10^5 个孢子/mL) 接种至米饭培养基中, 28℃ 静置培养 14 d。每个样品作 3 个平行。14 d 后 40℃ 烘干红曲米, 粉碎成粉末。取 0.5 g 红曲米粉末加入 3 mL 70% (V/V) 乙醇, 37℃、220 r/min 孵育 2 h, 9724 \times g 离心 10 min, 取上清, 70% (V/V) 乙醇稀释后 (5 倍稀释 M7 提取液, 突变体提取物为原液) 采用 HPLC 分析乙醇提取液中的色素。色谱条件是: Agilent C₁₈ column (Zorbax eclipse XDB-C18, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相是 甲醇(A)/酸水(B, 甲酸调 pH 值至 3.0)/纯水(C); 流速 0.5 mL/min; 进样体积 10 μ L; 柱温 38℃; PDA 检测器; 采用梯度洗脱, 程序是起始流动相比例 50% A/45% B/5% C (V/V/V), 40 min 内 A 升至 75%, B 降至 20%, C 保持不变。分别观察 390、470 和 500 nm 下的色谱图, 以检测黄、橙和红色素的种类^[15, 26]。

1.10 生物量和桔霉素产量测定

将 400 μ L 红曲菌孢子悬浮液 (10^5 个孢子/mL) 接种至盛有 20 mL YES 培养基的 50 mL 三角烧瓶中, 28℃ 静置培养 15 d。第 7、9、11、13 和 15 天取样, 每个样品取 3 个平行。滤纸过滤分离滤液和菌丝体, 滤液用于桔霉素产量测定, 菌丝体用于生物量测定。

1.10.1 生物量测定: 使用蒸馏水冲洗菌丝体至无色, 真空冷冻干燥。称量冻干的菌丝体重量, 用于衡量生物量变化。

1.10.2 桔霉素产量测定: 测定培养 7、11 和 13 d 的发酵液中桔霉素的产量。取 500 μ L 发酵液, 加入等量的甲苯/乙酸乙酯/甲酸 (7:3:1, V/V/V) 混合液, 剧烈振荡混匀, 9724 \times g 离心 10 min, 取上层, 甲醇稀释后采用 HPLC 测定浓度, 具体参考 Xie 等建立的色谱条件^[21]。

2 结果和分析

2.1 *pksPT* 的生物信息学分析

pksPT (GenBank ID: JF832916) 全长 8687 bp, 与丛毛红曲菌 (*M. pilosus*) 中控制 MPs 合成的 PKS 基因 (KC148521.1)^[22] 表现出 96% 的相似度, 基因覆盖度达 100%; 编码 2690 个氨基酸, 编码的蛋白 (PKSPT) 与紫色红曲菌 (*M. purpureus*) 中控制桔霉素合成的 PKS (BAD44749) 表现出 50% 的相似度, 基因覆盖度达 98%。采用 Pfam 进行结构域预测, 发现 PKSPT 含有 5 个结构域, 分别是 KS (388-756)、AT (912-1202)、ACP (1661-1727)、ACP (1772-1834) 和 ME (甲基转移酶) (2086-2186), 拥有“KS-AT-ACP-ACP-ME”的结构域组合

形式 (图 1), 属于非还原 III 型 PKS (Non-reduced PKS clade III)。使用 ClustalW 对 PKSPT 和几株非还原 III 型 PKS 进行各结构域的比对, 如图 1 所示, 在 PKSPT 中找到了 KS、AT 和 ACP 保守氨基酸序列, 分别是 DTACSSS、GHSFG 和 GVDLSL^[27-28], ME 结构域中保守的氨基酸序列是 GAGTGG^[29] (黑点标注的氨基酸为活性氨基酸)。在 PKS 中, AT 结构域负责识别和运输低级羧酸, 因此它的结构决定了聚酮化合物碳链延伸过程中装载的延伸单元^[30]。AT 结构域的三维结构 (图 1) 显示, Q₉₁₈ Q₉₇₂ G₉₉₈ H₉₉₉ S₁₀₀₀ F₁₀₀₁ G₁₀₀₂ R₁₀₂₅ F₁₁₁₄ H₁₁₁₅ S₁₁₅₀ H₁₁₆₂ V₁₁₆₇ 是 AT 的活性氨基酸序列, 其中 S₁₀₀₀ 是 AT 结构域的催化位点, 这种 AT 结构域能特异性识别丙二酸 (Malonate), 所以丙二酸是 MPs 生物合成途径的延伸单元。

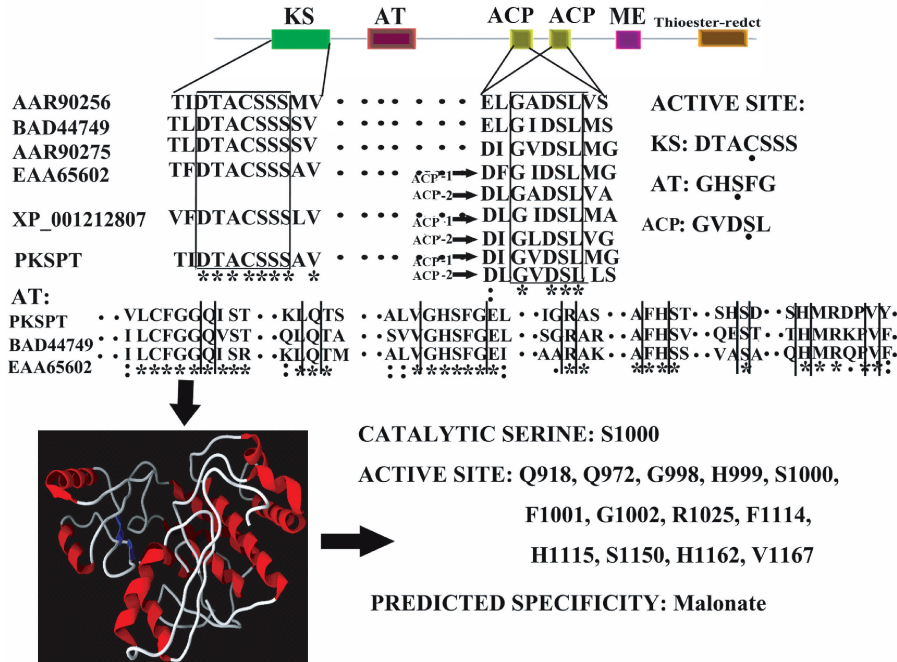


图 1. PKSPT 结构域和相应的活性氨基酸预测

Figure 1. Domains and activities amino acids analysis of putative PKSPT.

2.2 *pksPT* 拷贝数检测

采用 Southern 杂交技术检测了 *pksPT* 在 M7 中的拷贝数。杂交结果显示在各酶切基因组中均只有 1 条杂交条带 (图 2-B, 泳道 2-5), 并且条带大小和预期的一致。说明 *pksPT* 在 M7 的基因组中只有 1 个拷贝数存在。

2.3 突变体的鉴定

基于同源重组的原理, 如图 3 所示, 拟采用潮霉

素抗性基因 (*hph*) 替换 *pksPT* 中编码色素聚酮合成酶 KS 结构域的关键序列, 构建 *pksPT* 功能缺失突变株。经过一次转化共获得 16 株白化菌株, 经过 3 次传代培养, 它们性状稳定。随机抽取一株进行 PCR 和 Southern 杂交验证。

采用 3 对引物 *hphf/hphr*, *p1/p4* 和 *p5/p6* 对转化子进行 PCR 验证, 如图 2-A 所示, 从 M7 基因组中分别克隆到 0 (泳道 1, 即没有产物)、1480 bp (泳道

3) 和 3608 bp (泳道 5) 的条带, 而从转化子基因组中分别扩增出 2137 bp (泳道 2)、0 (泳道 4) 和 3837 bp (泳道 6), 条带大小和预期一致, 初步证明这株转化子是 *pksPT* 敲除突变体。

进一步采用 Southern 杂交检验转化子。如图 2-B 所示, 以 Probe1 为探针, 在 *Bgl* II 酶切的转化子基因组中未出现 Probe1 的杂交带 (泳道 1), 但是以 Probe2 为探针时出现了预期大小的杂交带 (泳道

1), 说明在转化子 ($\Delta pksPT$) 中 *pksPT* 的 KS 结构域编码序列被 *hph* 替换。

2.4 突变体中 *pksPT* 表达量分析

采用 RT-PCR 比较了 M7 和 $\Delta pksPT$ 中 *pksPT* 的表达量, 如图 2-C 所示, 在 M7 中 *pksPT* 能正常表达, 但是在 $\Delta pksPT$ 中检测不到 *pksPT* 的表达量。

2.5 突变体菌落形态和显微形态观察

将 M7 和 $\Delta pksPT$ 点接到 PDA 平板上培养, 观

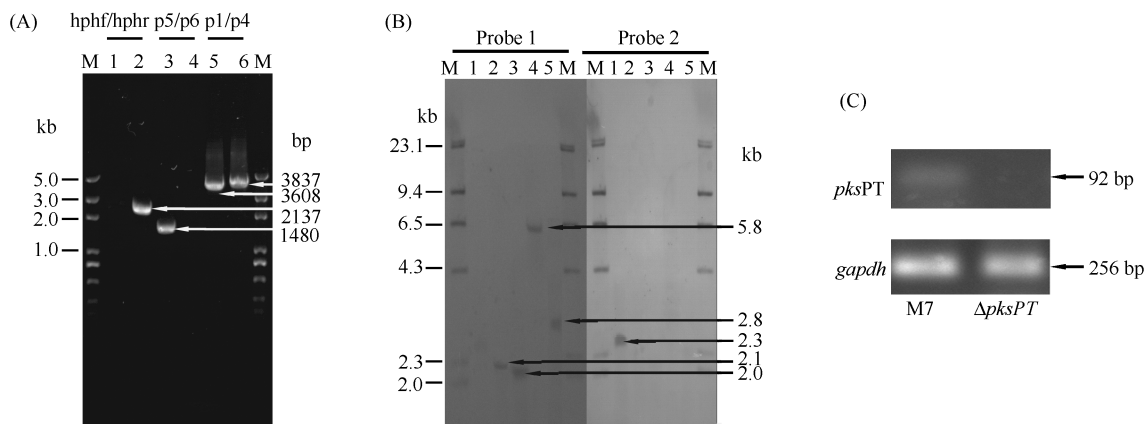


图 2. 转化子的 PCR 和 Southern 杂交及 *pksPT* 表达量分析

Figure 2. PCR and Southern blot analysis of $\Delta pksPT$ and analysis of *pksPT* expression. A: PCR identification of $\Delta pksPT$. PCR products of M7 (Lane 1, 3, 5) and $\Delta pksPT$ (Lane 2, 4, 6) with different primers; M: Trans 2K plus marker. B: Southern hybridization analysis. Lane 1: *Bgl* II-digested genomic DNA of $\Delta pksPT$; Lane 2-5: *Bgl* II, *Cla* I, *Nco* I, and *Nde* I-digested the genome of M7, respectively; M: λ DNA/*Hind* III marker. C: *pksPT* expression in M7 and $\Delta pksPT$ were determined by RT-PCR. The two tested strains were incubated in PDA medium on a 120 r/min rotary shaker for 7 days at 28°C for analysis of the transcriptional level of *pksPT*. The GAPDH gene was used as control.

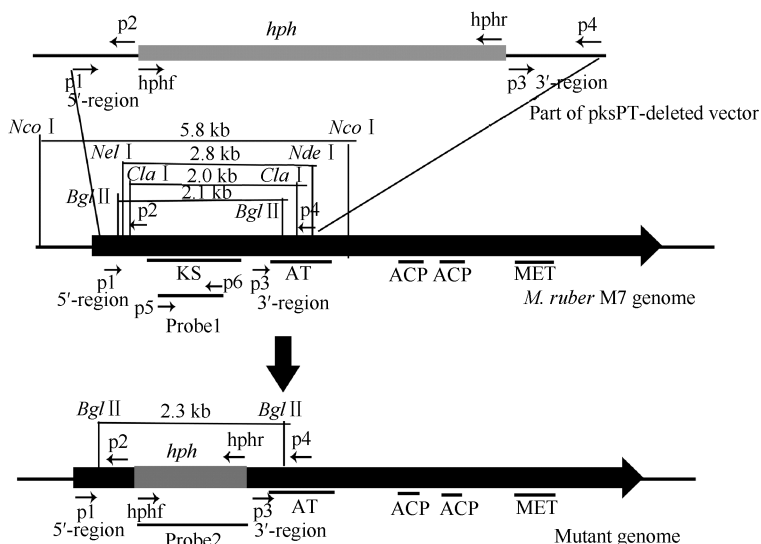


图 3. *pksPT* 基因敲除策略及其限制性内切酶酶切图谱

Figure 3. Strategy to disrupt *pksPT* gene and restriction map of *pksPT*.

察菌落形态和显微形态的差异。如图 4 所示, $\Delta pksPT$ 的生长速度均稍快于 M7, 其直径比野生菌株大约 6%; 随着培养时间的延长, $\Delta pksPT$ 菌落中央出现自

溶现象, 而 M7 未出现; 与 M7 相比, $\Delta pksPT$ 菌落颜色发生明显变化, M7 正反面均呈现橙红色, 而 $\Delta pksPT$ 为白色; $\Delta pksPT$ 能正常产生闭囊壳和分生孢子。

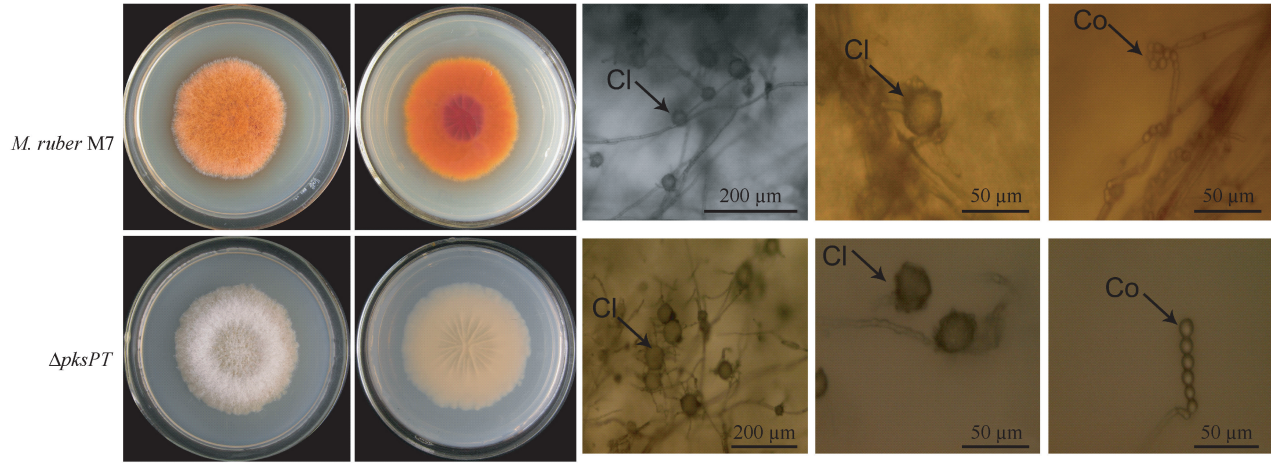


图 4. 不同菌株的菌落表型和形态比较

Figure 4. Colony phenotype and morphology of different strains. The tested strains were inoculated on PDA plate and cultivated at 28°C for 14 days.

Cl: cleistothecium; Co: conidium.

2.6 MPs 分析

在 HPLC 分析中, 红曲黄、橙、红色素有其各自的特征光谱图^[21], 在进行 HPLC 分析时, 根据色谱图中各物质的光谱图确定其是否是 MPs。如图 5 所示, 在米饭培养基上, M7 可以产生 5 种黄色素、1 种橙色素和 8 种红色素; $\Delta pksPT$ 不能产生这些色素, 证明 *pksPT* 的敲除导致红曲菌丧失产 MPs 的能力。

2.7 生长速率比较

将野生菌株和突变体接种到 YES 液体培养基中培养, 收集菌丝体冷冻干燥后测定其重量用以表示菌株生长速率。从图 6-A 可以看出, *pksPT* 的敲除导致红曲菌生长速度加快, 并且总的生物积累量也比 M7 高, 在培养第 9 天时, $\Delta pksPT$ 的生物量达到 0.3631 ± 0.0028 g, 而 M7 只有 0.2862 ± 0.0001 g, 证明 MPs 的合成能够显著影响红曲菌生长。

2.8 产桔霉素能力的比较

如图 6-B 所示, $\Delta pksPT$ 产桔霉素能力远远高于出发菌株, 在培养 13 d 时, $\Delta pksPT$ 的桔霉素产量是 578.12 ± 9.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 M7 只产生了 150.45 ± 10.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的桔霉素, 说明 MPs 代谢合成途径的中断能够显著提高桔霉素的产量。

3 讨论

大量的研究发现, 红曲色素和桔霉素相伴产生, 红曲色素产量的升降同时伴随桔霉素产量的升降, 因此, 一直以来认为红曲色素和桔霉素拥有一段相同的合成途径, 即以乙酰 CoA 为起始单元, 丙二酰 CoA 为延伸单元, 在 PKS 催化作用下形成聚酮骨架, 后期分别合成红曲色素和桔霉素^[31]。然而, 目前已经分别获得控制红曲色素和桔霉素合成的 PKS 基因簇^[22, 32], 说明两者在红曲菌中拥有各自的合成途径。本研究发现敲除红曲色素 PKS 基因后桔霉素产量提高了约 3 倍(图 6-B), 说明红曲色素合成途径会显著影响桔霉素的合成途径。这一结论在对色素簇内调节基因(*pigR*)的研究中也得到证实: 敲除 *pigR* 基因后获得不产色素的突变体($\Delta pigR$), $\Delta pigR$ 中桔霉素产量提高了 1.3 倍; 另一方面, 过表达的回突变体中色素产量得到明显提高, 无法检测出桔霉素产量^[21]。而 Shimizu 等(2005)发现敲除桔霉素 PKS 基因对红曲色素产量的影响不明显^[20], 由此可见, 桔霉素产量的高低对色素产量影响不明显, 色素产量的高低对桔霉素的合成有非常显著的影响, 介于它们拥有各自的合成途径, 我们推

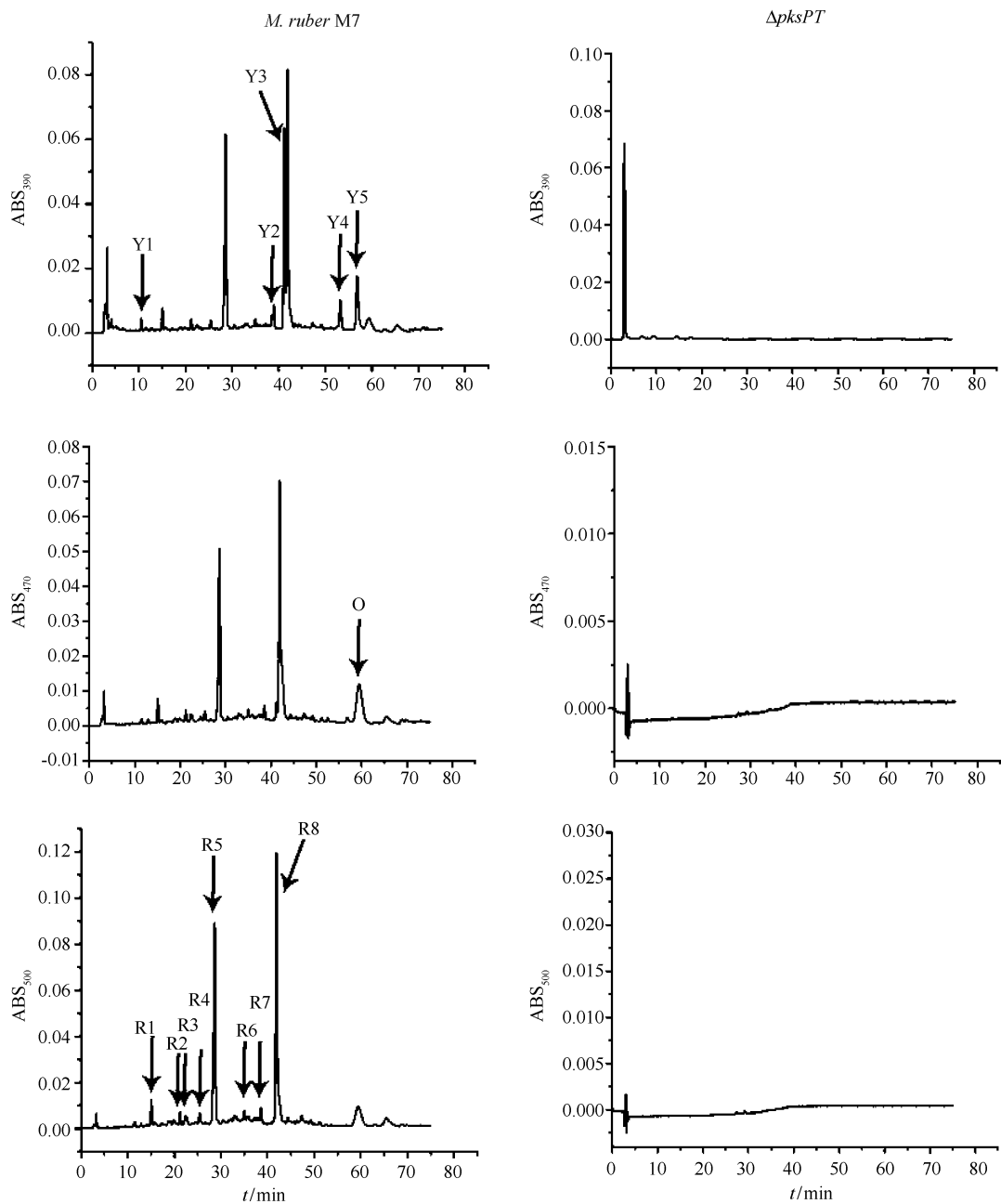


图 5. HPLC 分析红曲米中色素种类

Figure 5. Analysis of the type of pigment in fermented rice by HPLC method. Absorbance was monitored at 390 nm, 470 nm, and 500 nm, the maximal absorption of yellow (Y), orange (O), and red pigment (R), respectively. Arrows indicate the position for these pigments.

测这一原因是色素合成和桔霉素合成竞争性的利用小分子羧酸原料。为什么桔霉素的合成竞争不过色素合成呢? Hajjaj 等(1999)通过同位素标记的方法研究发现红曲色素和桔霉素合成的原料均是乙酰 CoA 和丙二酰 CoA^[31], 目前已经发现至少 50 种具有类似结构的红曲色素^[16], 那么在红曲菌中相当于

50 多种色素类物质与桔霉素竞争性地利用原料, 这些色素类物质共用一套 PKS 基因簇, 按照相同的合成途径合成, 色素聚酮合酶的催化作用位于该合成途径的顶端, 当 *pksPT* 被破坏后, 这 50 种物质的合成被中断, 此时, 有大量的乙酰 CoA 和丙二酰 CoA 供桔霉素合成使用, 桔霉素产量得到显著提高; 反

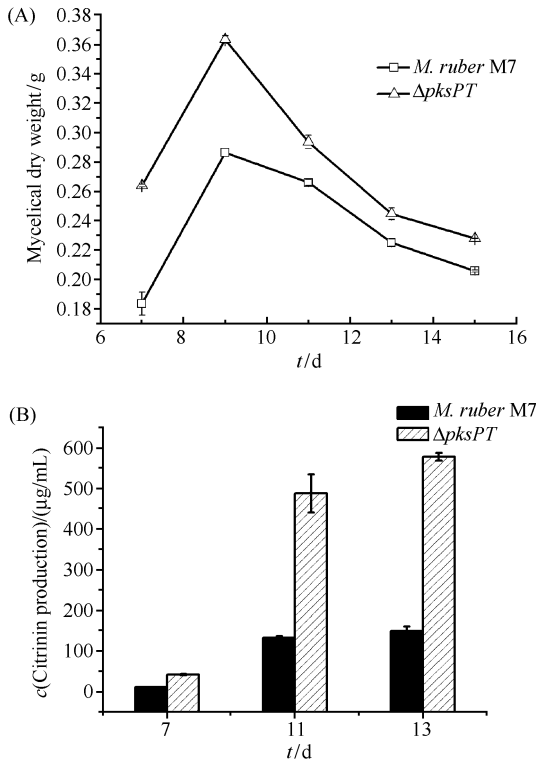


图 6. 不同菌株菌丝体干重和产桔霉素产量比较

Figure 6. Dry weight of mycelia and citrinin production from different strains.

之,桔霉素合成中断所积累的原料被 50 多种色素合成瓜分,每种色素产量的提高便不明显。这一发现对于从分子水平提高红曲色素产量降低桔霉素产量具有重要的意义,同时对阐明红曲色素和桔霉素合成途径上的关系也有一定的帮助。

此外,从图 6-A 可以看出色素缺失突变体的生长速率明显快于野生菌株,说明红曲色素的合成途径也会影响红曲菌的生长。初级代谢途径合成的长链脂肪酸是微生物细胞膜的重要组成部分,它的合成的中断将显著抑制微生物菌体的生长^[1, 33]。长链脂肪酸是在脂肪酸合成酶的催化作用下合成,原料也是低级羧酸——乙酰 CoA 和丙二酰 CoA,由此推测,红曲色素合成途径与长链脂肪酸合成途径竞争性地利用乙酰 CoA 和丙二酰 CoA。这一现象并没有在其他聚酮合成途径的研究中被发现,可能是由于其他聚酮合成途径合成的聚酮化合物的种类远远没有红曲色素的种类多,长链脂肪酸合成受到的影响不明显。

MPs 是我国重要的食品级天然着色剂,为了提高其产量,研究者对红曲菌的培养条件如氧气、pH、

碳源、氮源、不同培养基质等进行了大量的研究,并通过优化这些条件使 MPs 产量在一定程度上得到提高^[34-36]。本研究结果显示 *pksPT* 对 MPs 合成至关重要,因此,在此基础上,借助分子手段采用强启动子驱动 *pksPT* 的表达将很可能使色素产量得到显著提高,这也是下一步的工作重点,对于 MPs 的工业化生产具有一定的指导作用。

参考文献

- [1] Chan YA, Podevels AM, Kevany BM, Thomas MG. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Natural Product Reports*, 2009, 26(1): 90-114.
- [2] Carreras CW, Santi DV. Engineering of modular polyketide synthases to produce novel polyketides. *Current Opinion Biotechnology*, 1998, 9(4): 403-411.
- [3] Lai L, Pan C, Tzeng B. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, 2003, 38(9): 1317-1326.
- [4] Chooi Y H, Cacho R, Tang Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chemistry and Biology*, 2010, 17(5): 483-494.
- [5] Yu J, Bhatnaga D, Cleveland TE. Completed sequence of aflatoxin patywaygene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters*, 2004, 564(1-2): 126-130.
- [6] Hutchinson CR, Kennedy J, Park C, Kendrew S, Auclair K, Vederas J. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78(3-4): 287-295.
- [7] Keller NP, Hohn TM. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics Biology*, 1997, 21(1): 17-29.
- [8] John U, Beszteri B, Derelle E, de Peer YV, Read B, Moreau H, Cembella A. Novel insights into evolution of protistan polyketide synthases through phylogenomic analysis. *Protist*, 2008, 159(1): 21-30.
- [9] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 285-295.
- [10] Fujii I, Watanabe A, Sankawa, U, Ebizuka Y. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry and Biology*, 2001, 8(2): 189-197.

- [11] Kroken S, Glass NL, Taylor JW, Yoder OC, Turgeon BG. Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100 (26) : 15670-15675.
- [12] Chen YP, Tseng CP, Liaw LL, Wang CL, Chen IC, Wu WJ, Wu MD, Yuan GF. Cloning and characterization of monacolin K biosynthetic gene cluster from *Monascus pilosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(14) : 5639-5646.
- [13] Su YC, Wang JJ, Lin TT, Pan TM. Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(1) : 41-46.
- [14] Blanc PJ, Laussac JP, Bars JL, Bars PL, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 27: 201-213.
- [15] Campoy S, Rumbero A, Martin, JF, Liras P. Characterization of a hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006: 70(4) : 488-496.
- [16] Feng Y, Shao Y, Chen F. *Monascus* pigments. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2012, 96(6) : 1421-1440.
- [17] Qu J, Wang B, Wu JJ, Xu C, Zhu SM, Chen FS. Study on separation of *Monascus* pigments and their antioxidative properties. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(6) : 527-531. (in Chinese)
屈炯, 王斌, 吴佳佳, 徐驰, 朱胜梅, 陈福生. 红曲色素组分分离及其抗氧化活性研究. *现代食品科技*, 2008, 24(6) : 527-531.
- [18] Hsu LC, Hsu YW, Liang TH, Kuo YH, Pan TM. Antitumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (4) : 1124-1130.
- [19] Zheng Y, Xin Y, Shi X, Guo Y. Anti-cancer effect of rubropunctatin against human gastric carcinoma cells BGC-823. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2010, 88 (5) : 1169-1177.
- [20] Shimizu T, Kinoshita H, Ishihara S, Sakai K, Nagai S, Nihira T. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7) : 3453-3457.
- [21] Xie NN, Liu QP, Chen FS. Deletion of *pigR* gene in *Monascus ruber* leads to loss of pigment production. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(9) : 1425-1432.
- [22] Balakrishnana B, Karki S, Chiu SH, Kim HJ, Suh JW, Nam B, Yoon YM, Chen CC, Kwon HJ. Genetic localization and *in vivo* characterization of a *Monascus azaphilone* pigment biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (14) : 6337-6345.
- [23] Chen FS, Hu XQ. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(3) : 331-337.
- [24] Shao YC, Ding Y, Zhao Y, Yang S, Xie, BJ, Chen FS. Characteristic analysis of transformants in T-DNA mutation library of *Monascus ruber*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(6) : 989-995.
- [25] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominiguez Y, Sczzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41 (11) : 973-981.
- [26] Mukherjee G, Singh SK. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 2011, 46 (1) : 188-192.
- [27] Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay F. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 1996, 169(1) : 9-16.
- [28] Mathur M, Kolattukudy PE. Molecular cloning and sequencing of the gene for mycocerosic acid synthase, a novel fatty acid elongating multifunctional enzyme, from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* *Bacillus Calmette-Guerin*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(27) : 19388-19395.
- [29] Seshime Y, Juvvadi PR, Tokuoka M, Koyama Y, Kitamoto K, Ebizuka Y, Fujii I. Function expression of the *Aspergillus flavus* PKS-NRPS hybrid CpaA involved in the biosynthesis of cyclopiazonic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19(12) : 3288-3292.
- [30] Musiol EM, Hartner T, Kulik A, Moldenhauer J, Piel J, Wohlleben W, Weber T. Supramolecular templating in kirromycin biosynthesis: the acyltransferase KirC II loads enthylmalonyl-Coa extender onto a specific ACP of

- the trans-AT PKS. *Chemistry and Biology*,2011,18(4): 438-444.
- [31] Hajjaj H, Klaébé A, Loret MO, Goma G, Blanc PJ, Francois J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by¹³C nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*,1999,65(1):311-314.
- [32] Shimizu T, Kinoshita H, Nihira T. Identification and in vivo functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and Environmental Microbiology*,2007,73(16):5097-5103.
- [33] Brown DW, Adams TH, Keller NP. *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,1996,93(25):14873-14877.
- [34] Nimnoi P, Lumyong S. Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production. *Food Bioprocess Technol*, 2009, 4(8):1384-1390.
- [35] Babitha S, Soccol CR, Pandey A. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. *Journal of Basic Microbiology*, 2007,47(2):118-126.
- [36] Zhou B, Zhu MJ, Wang JF, Wu ZQ, Liang SZ. Effect of ammonium salts on *Monascus* yellow and red pigments and citrinin production. *Journal of Chongqing Institutes of Technology (Natural Science)*, 2009, 23(1):46-53. (in Chinese)
周波,朱明军,王菊芳,吴振强,梁世中. 铵盐对红曲黄色素、红色素及桔霉素代谢形成的影响. 重庆工学院学报:自然科学,2009,23(1):46-53.

Identification of a pigment-polyketide synthase gene deleted mutant of *Monascus ruber* M7

Nana Xie^{1,2}, Yiping Zhang², Fusheng Chen^{2*}

¹College of Environmental and Technology, Chongqing Key Laboratory of Catalysis and Functional Organic Molecules, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

²College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] To reveal the function of a polyketide synthase gene (*pkpPT*), probably responsible for the synthesis of *Monascus* pigments in *Monascus ruber* M7. [Methods] The *pkpPT* was analyzed using bioinformatics method; it was disrupted using *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation method, generating the *pkpPT-deleted* mutant (Δ *pkpPT*). Colonial morphology, conidial germination, pigment and citrinin production, and growth rate of Δ *pkpPT* were analyzed. [Results] The *pkpPT* with the length of 8687 bp encoded a putative protein of 2690 amino acids, which is a non-reduced type III polyketide synthase and has some active domains with the arrangement of KS (β -ketosynthase) -AT (Acyltransferase) -ACP (Acyl carrier protein) -ACP-ME (Methyltransferase). The analysis of Δ *pkpPT* displayed that it could generate cleistothecium and conidium normally and was unable to produce any kinds of *Monascus* pigments; compared to M7, the growth rate of Δ *pkpPT* was increased obviously and the yield of citrinin in Δ *pkpPT* was increased about 2.8 times. [Conclusion] *pkpPT* is of extremely importance to the biosynthetic pathways of *Monascus* pigments in M7 and the synthesis of *Monascus* pigments gives a significant effect on the produce of citrinin as well as the growth of M7.

Keywords: *Monascus* pigments, citrinin, polyketide synthase gene, *Monascus ruber*

(本文责编:王晋芳,李磊)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31330059/31171649), the Science & Technology Cooperation Program of Hubei (2014BHE0016), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities(2662014PY034)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87282927; E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

Received: 3 December 2014/ Revised: 8 February 2015