



单羧酸转运蛋白 MpMch2 调控紫色红曲霉的性发育及代谢产物的产生

潘妍妍, 邵嘉朱, 蒋冬花*

浙江师范大学 生命科学学院, 浙江 金华 321004

潘妍妍, 邵嘉朱, 蒋冬花. 单羧酸转运蛋白 MpMch2 调控紫色红曲霉的性发育及代谢产物的产生[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3436-3452.

PAN Yanyan, SHAO Jiazhu, JIANG Donghua. Monocarboxylate transporter MpMch2 regulates the sexual development and metabolite production of *Monascus purpureus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3436-3452.

摘要: 乳酸、丙酮酸、酮体等单羧酸盐在生物体的代谢活动中发挥重要作用。MpMch2 作为单羧酸转运蛋白, 主要负责单羧酸盐的跨膜转运, 维持葡萄糖代谢平衡等。【目的】在紫色红曲霉中对单羧酸转运蛋白 MpMch2 进行功能分析。【方法】以紫色红曲霉 Mp-21 为出发菌株, 通过构建敲除载体, 利用同源重组的方式将潮霉素基因替换 MpMch2 得到缺失株 Δ MpMch2。观察 Mp-21 和 Δ MpMch2 在不同培养基上菌落形态、显微形态, 测定其红曲色素、 γ -氨基丁酸产量、分生孢子、子囊孢子产量等; 利用 RT-qPCR 检测分生孢子、 γ -氨基酸丁酸相关基因表达量。【结果】在不同培养基上野生型和 Δ MpMch2 在菌落形态上无显著差异, 该基因敲除后菌株分生孢子、子囊孢子产量下降, 红曲色素、 γ -氨基丁酸产量及相关基因表达量下降。【结论】表明 MpMch2 基因正调控分生孢子和子囊孢子发育及红曲色素、 γ -氨基丁酸产量。

关键词: 紫色红曲霉; MpMch2; 分生孢子; 次级代谢

Monocarboxylate transporter MpMch2 regulates the sexual development and metabolite production of *Monascus purpureus*

PAN Yanyan, SHAO Jiazhu, JIANG Donghua*

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: Monocarboxylates such as lactate, pyruvate, and ketone bodies play an important

资助项目: 国家自然科学基金(31270061, 31570013)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270061, 31570013).

*Corresponding author. E-mail: jdh@zjnu.cn

Received: 2024-03-06; Accepted: 2024-04-23; Published online: 2024-04-25

role in the metabolic activities of organisms. As a monocarboxylate transporter, MpMch2 is mainly responsible for the transmembrane transport of monocarboxylates and the maintenance of glucose metabolism balance. **[Objective]** To analyze the functions of MpMch2 in *Monascus purpureus*. **[Methods]** The *MpMch2* in *M. purpureus* Mp-21 was replaced with the hygromycin gene by homologous recombination to construct the deletion strain $\Delta MpMch2$. The colony and cell morphology of Mp-21 and $\Delta MpMch2$ on different media was observed, and the yield of monascus pigment, γ -aminobutyric acid, conidia and ascospores were determined. The expression levels of genes related to conidia and γ -aminobutyric acid were determined by RT-qPCR. **[Results]** There was no significant difference in the colony morphology between the wild type and $\Delta MpMch2$ on different media. After knockout of *MpMch2*, the yields of conidia, ascospores, *Monascus* pigments, and γ -aminobutyric acid decreased, and the expression levels of related genes were down-regulated. **[Conclusion]** *MpMch2* positively regulated the development of conidia and ascospores and the production of *Monascus* pigments and γ -aminobutyric acid.

Keywords: *Monascus purpureus*; *MpMch2*; conidia; secondary metabolism

紫色红曲霉(*Monascus purpureus*)属于丝状真菌,其主要次级代谢产物红曲色素作为天然着色剂广泛应用于食品行业、纺织行业,通过传统发酵方式得到红曲色素具有低成本、无污染等优点。近年来研究表明,红曲色素还具有抗癌、抗炎、抗肥胖、抗衰老等功能^[1-5],在前期研究中,本实验室对红曲霉次级代谢产物进行分离纯化,发现其中部分活性化合物具有抗氧化和抑制 α 糖苷酶作用^[6-7],可应用于降血糖和抗氧化药物的开发。因此研究基因功能对于红曲霉资源的开发利用具有重要意义。主要协同转运蛋白超家族是目前已知最大的膜转运蛋白超家族之一^[8],广泛存在于自然界几乎所有生物体中,在细胞膜上承担着物质交换功能,是维持生物体基本生命活动的关键,主要包括同向转运蛋白、单转运蛋白、反向转运蛋白。单羧酸转运蛋白是一种转运蛋白,主要负责转运丙酮酸、乳酸、酮体等代谢产物,参与营养物质的吸收、药物运输等多种生物学功能^[9]。截至目前,在哺乳动物中发现单

羧酸转运蛋白家族有 14 个成员,均由 12 个跨膜结构域组成,其编码的氨基酸序列保守。然而,由于其表达的差异性,每个成员表现出对不同底物的亲和力不同,在乳酸、脂肪酸代谢中发挥不同的作用^[10]。近期相关研究表明,单羧酸转运蛋白还参与多种生理和病理过程,在恶性肿瘤与癌症细胞中高度表达,作为肿瘤治疗的潜在靶点在药物试用中发挥作用。在丝状真菌中,对单羧酸转运蛋白研究较少,2016 年,李志勇在灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)中敲除单羧酸转运蛋白 BC1G_04502.1,发现其可能参与丙酮酸与乙酸的转运以及孢子和菌核的形成^[11]。2021 年,赵璇竹在苹果炭疽叶枯病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)中敲除单羧酸转运蛋白 cgMCT1,结果表明敲除后菌株的致病性消失,并且在培养中外源添加乳酸时,基因表达量上升,推测该基因介导乳酸的转运^[12]。在美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)中进行蛋白质同源比对,发现 Mch2 在米曲霉

(*Aspergillus oryzae*)和拟青霉(*Paecilomyces* sp.) 中为单羧酸转运蛋白, 在菌株的羧酸类物质运输、生长代谢方面承担重要的作用。目前, 在紫色红曲霉中未见相关研究, 因此在紫色红曲霉中通过敲除 *MpMch2* 基因探究基因功能。

1 材料与方法

1.1 菌株

紫色红曲霉 Mp-21 从市售红曲米中分离所得。敲除载体 pKO1B 由浙江大学农业与生物技术学院王政逸教授惠赠。感受态大肠杆菌购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 农杆菌感受态细胞 AGL-1 购自上海唯地生物技术有限公司。

1.2 培养基

紫色红曲霉 Mp-21 用马铃薯葡萄糖(PDA)培养基培养, 发酵用马铃薯葡萄糖培养基(PDB)。大肠杆菌和农杆菌均用 LB 培养基培养。察氏酵母膏琼脂(CYA)培养基(g/L): 磷酸二氢钾 20.0、氯化钾 20.0、硝酸钠 3.0、七水合硫酸镁 0.01, 酵母粉 5.0, 蔗糖 30.0, 琼脂 18.0。25% 甘油硝酸盐琼脂(G25N)培养基(g/L): 在 CYA 的基础上加入 0.25 甘油。麦芽提取物琼脂(MA)培养基(g/L): 麦芽膏 20.0, 蔗糖 20.0, 琼脂 18.0。IM 诱导培养基(IM): 磷酸氢钾缓冲液(pH 4.9) 0.8 mL, MgSO₄-NaCl 溶液 20 mL, 50%丙三醇

10 mL, 葡萄糖 2 g, 1%氯化钙溶液 1 mL, 20% 硝酸铵溶液 2.5 mL, 加蒸馏水溶解后定容至 1000 mL, 同时调节至 pH 5.5, 灭菌后分装至 250 mL 锥形瓶中, 每瓶 100 mL。在使用前加入 100 g/L 2-(N-吗啉)乙磺酸钠溶液 1 mL, 0.1 g/L 硫酸亚铁溶液 1 mL, 0.1 mol/L 乙酰丁香酮溶液 0.4 mL。共培养诱导培养基(Co-IM): 相较于 IM 诱导培养基, Co-IM 培养基中葡萄糖减半并加入 15g 营养琼脂。在使用前加入 100 g/L 2-(N-吗啉)乙磺酸钠溶液 1 mL, 0.1 g/L 硫酸亚铁溶液 1 mL, 0.1 mol/L 乙酰丁香酮溶液 0.8 mL。

1.3 主要试剂

引物合成和基因测序由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

LA *Taq* DNA Polymerase、反转录试剂盒(Primescript RT Master Mix)、RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus), TaKaRa 公司; 真菌 DNA 提取试剂盒(Fungal DNA Kit), OMEGA 公司; HotStart 2×SYBR Green qPCR Master Mix, 合肥海伯莱生物技术有限公司。

1.4 *MpMch2* 基因克隆和生物信息学分析

以紫色红曲霉 DNA 为模板、*MpMch2*-F/R 为引物克隆 *MpMch2* 基因, 具体引物序列见表 1, 将克隆产物寄往北京擎科生物科技股份有限公司进行测序验证。

表 1 扩增 *MpMch2* 基因和敲除载体 3 个片段所用的引物序列

Table 1 The primer sequences used to amplify the *MpMch2* gene and the three fragments of the knockout vector

Name	Sequences (5'→3')
<i>MpMch2</i> -F	GGGGGTTATGCCGATCTGATAAAAC
<i>MpMch2</i> -R	GAGTAGCACTGCCACGCTTTCCATA
<i>MpMch2</i> -5F	CGGGATCCCCGACTGCTCCGATGCTGTCTAAGTAAG
<i>MpMch2</i> -5R	GCTCCTTCAATATCATCTTCTCTCGGTCTGCCTGTGCGTTATTTTGTGGT
<i>MpMch2</i> -3F	TAGAGTAGATGCCGACCGAACAAGAAAAAGAGTCTCGTCAATGGTATCA
<i>MpMch2</i> -3R	CCAAGCTTGGGCACGAGTAGCACTGCCACGCTTT
<i>hph</i> -F	CGAGAGAAGATGATATTGAAGGAGC
<i>hph</i> -R	TCTGTTCGGTCGGCATCTACTCTA

1.5 敲除载体的构建

根据 NCBI 中查找到的 *MpMch2* 基因序列 (MAP00_000247), 选取基因上、下游 1 000 bp 左右片段设计引物构建同源臂, 利用双接头 PCR 技术, 将 5'同源臂、潮霉素基因片段及 3'同源臂 3 个片段连接在一起, 连接至 pMD-20T 上, 酶切后再与载体 pKO1B 连接, 引物序列见表 1。PCR 反应体系(25 μ L): DNA 模板(10 μ mol/L) 0.5 μ L, LA *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 10 \times LA PCR Buffer 2.5 μ L, 无菌水 15.75 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。具体构建过程见图 1。再将含有 *MpMch2* 敲除盒的载体转化至大肠杆菌, 菌落 PCR 验证后挑选阳性转化子, 提取质粒后将其转化至农杆菌内。菌液 PCR 验证后挑取阳性转化子, 摇菌培养后涂布在 LB 平板上, 用于农杆菌介导的红曲霉转化。

将感受态农杆菌 AGL-1 从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 于室温等待其融化成冰水混合物时插入冰中。取敲除载体加入农杆菌感受态细胞中, 依次在冰上静置、液氮、37 $^{\circ}$ C 水浴、放置冰上 5 min。加入 800 μ L LB 培养基, 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 3 h。将菌液涂布在含有 50 μ g/mL 卡那霉素 (kanamyceticus, Kana) 的 LB 平板上。72 h 后, 在 LB 平板上挑取单菌落, 置于含 50 μ g/mL Kana 的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养过夜, 进行菌液 PCR 验证。挑取阳性转化子, 进行下一步实验。

1.6 农杆菌介导的红曲霉转化

在 LB 平板上挑取农杆菌, 在试管中用 LB 液体培养基(含 50 μ g/mL Kana)在摇床中 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h, 5 000 r/min 离心 5 min 后用 IM 培养基稀释至 OD_{600} 为 0.5, 再放置摇床中诱导培养 6-8 h。取 PDA 上生长 15 d 左右的紫色红曲霉, 用灭菌后的纯水将孢子冲洗下来, 用擦

镜纸过滤菌丝后用血球计数板计数, 用诱导后的农杆菌菌液将孢子浓度稀释至 10^5 个/mL, 充分混匀后涂在含玻璃纸的 IM 固体培养基上共培养 3 d。等待孢子萌发后, 将玻璃纸转移到含有 50 μ g/mL 潮霉素和 Kana 的 PDA 培养基上, 培养 7 d 后将萌发的转化子挑出。挑到新的含有 50 μ g/mL 潮霉素的平板上, 对能稳定生长的转化子验证是否为目标菌株。

1.7 菌落形态观察

取培养 10 d 后的野生型 *Mp-21* 和 Δ *MpMch2*, 用无菌水将孢子冲下, 将孢子稀释至 10^5 个/mL, 分别点接于 PDA、MA、G25N 和 CYA 培养基上, 培养 10 d 拍照记录菌落形态。另取 100 μ L 孢子混悬液涂布接于 PDA 平板上, 在第 6 天取灭菌后的载玻片斜插入菌落内, 培养到 7 d 取载玻片显微镜观察子囊孢子、分生孢子和菌丝的形态。

1.8 产孢量的测定

将野生型 *Mp-21* 和 Δ *MpMch2* 孢子稀释至 10^5 个/mL, 点接于 PDA 平板上, 培养 14 d 后用灭菌后的无菌水将孢子冲洗下来, 用擦镜纸过滤菌丝后用血球计数板计数。每个菌种重复计数 3 次, 统计分生孢子、子囊孢子数量。

1.9 红曲色素产量测定

将等量 100 μ L 野生型 *Mp-21* 和 Δ *MpMch2* 的孢子悬液分别接种至预先灭菌的 PDB 培养基中, 随后进行摇瓶发酵, 取发酵 3、6、9、12 和 15 d 的发酵液, 将过滤后的菌丝置于烘箱干燥 72 h, 记录菌丝的质量。取 1 mL 发酵液加 9 mL 70% 的乙醇, 在 40 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床萃取 2 h, 采用分光光度计在 410、470、505 nm 波长处分别测定黄色素、橙色素、红色素的吸光度值, 三者相加为红曲色素。

1.10 γ -氨基丁酸 (γ aminobutyric acid, GABA) 产量测定

取 GABA 标准品分别配成 1、10、25、50、100 mg/L 标准溶液, 用滤膜过滤后储存在色谱进样

瓶中备用。

分别取野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 第 12 天发酵液 10 mL, 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤作为待测品。

使用高效液相色谱仪测定野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 发酵液中 GABA 产量。检测条件: 流动相为乙腈+三水合乙酸钠(35+65) (A 液), 甲醇(B 液), 色谱柱 Agilent TC-C18 液相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 紫外检测器波长为 436 nm, 进

样量 20 μL , 流速 1 mL/min。

1.11 RT-qPCR 检测产孢、GABA 相关基因表达量

将 PDA 上培养 3、7、11 d 的野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 菌丝分别用液氮研磨后, 用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 再用逆转试剂盒将 RNA 逆转得到 cDNA。用软件设计产孢、GABA 相关基因引物, 引物序列见表 2。RT-qPCR 反应体系(20 μL): 正反引物(100 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,

表 2 RT-qPCR 实验所用引物

Table 2 Primers used in RT-qPCR experiments

Primers name	Sequences (5'→3')
<i>actin</i> -F	TCTGGCACCACACATTCTACAA
<i>actin</i> -R	CGAAGACGATCTGGGTCATCT
<i>qMpMch2</i> -F	GTGAGGGGGAGGGATTATTC
<i>qMpMch2</i> -R	TTTTGTGGTTCATTGAGGGC
<i>citrate</i> -F	CGAGCACGGAAAGACTAAGAA
<i>citrate</i> -R	CACCGAACAGGACAGTGTAAATA
<i>GAD</i> -F	TATGAGGAGTATCCCCAGAGTGC
<i>GAD</i> -R	TCTGGAGTAGTCCTTGCCCTC
<i>Glucokinase</i> -F	TTCCAACCTTCATCACCTCC
<i>Glucokinase</i> -R	CTGTGAGGAGACGGTTTGGT
<i>Ketoglutarate</i> -F	GGATGTTGAGCGTGGTACTT
<i>Ketoglutarate</i> -R	GCTCAGAGAAGAGTTGGAGATG
<i>Malate dehydrogenase</i> -F	CGAGGCTAAGATCCTCGTTATC
<i>Malate dehydrogenase</i> -R	GAAGAGACGCTTAGGGTTGTAG
<i>NADP</i> -F	GTACTIONACTGGGCATTGA
<i>NADP</i> -R	CTTGACACCGACACCATACTT
<i>Pyruvate kinase</i> -F	GATACGTCCCTTCCTGTTTACTC
<i>Pyruvate kinase</i> -R	GAATGCCACTGCAACTTCATC
<i>succinate</i> -F	TTCTCCTCACCTCACCATCTA
<i>succinate</i> -R	GGTAGGCAATCGAGAAGAGATAC
<i>phosphofruco kinase</i> -F	TACTTGCGTAGTGTATGTGG
<i>phosphofruco kinase</i> -R	CGTCGTCGTGTTTTTGTGGT
<i>flbA</i> -F	GGTTCTCCCAATCCAATCGC
<i>flbA</i> -R	CCATTCTCTGGCAGAAACG
<i>flbB</i> -F	CTTCGAGGCAGAAATTGGAGC
<i>flbB</i> -R	ACGTGGTCTGAGGAGGAAAG
<i>flbC</i> -F	TCTGCTCACTCCTCTGCTTC
<i>flbC</i> -R	CTTGGTGGACGTGGTAGAGT
<i>flbD</i> -F	CATTACCATCCCCGGCCTAT
<i>flbD</i> -R	GCATATCGGAATAGCGCTGG
<i>flbE</i> -F	TCATCAGGAGCAAGGGTACG
<i>flbE</i> -R	TACCGTCACCATCTTCGCTT
<i>fluG</i> -F	GGATGATCTGCTGGCTGTTG
<i>fluG</i> -R	CTGTGAACTGAACCGTGCAA
<i>wetA</i> -F	ACTCTGAGGCGTGGACTGAG
<i>wetA</i> -R	CCGTCTGTTGACTGGGAATA
<i>brlA</i> -F	CAGGGTGGCGTGAAGTAG
<i>brlA</i> -R	TCTGGCGATTGTTGTAGGA
<i>vosA</i> -F	CCAGACACCACCATTGCT
<i>vosA</i> -R	TCAGCAAAAAGAGAAAGGC

2×SYBR Green qPCR Master Mix 10.0 μL, DNA 0.8 μL, ROX 0.4 μL, Nuclease-free Water 7.8 μL。RT-qPCR 反应采用两步法, 条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 40 s, 40 个循环。基因的相对表达量以 *actin* 作为参考, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达量。

2 结果与分析

2.1 *MpMch2* 基因克隆

以 Mp-21 DNA 为模板, 用表 1 所示引物克隆紫色红曲霉 Mp-21 中的 *MpMch2* 基因。PCR 反应产物在琼脂糖凝胶电泳中可以看到在 2 000 bp 附近位置有清晰条带(图 1)。将目的条带割胶回收后寄往北京擎科生物科技股份有限公司测序, 得到 *MpMch2* 基因序列, 长度为 1 884 bp。

2.2 *MpMch2* 蛋白生物信息学分析

在 NCBI 对蛋白进行保守结构域分析中, 发现属于主要促进者超家族(major facilitator superfamily, MFS)为转运蛋白, 家族内蛋白功能主要为促进一种或多种底物, 如各种离子、磷酸

糖类、氨基酸和肽类、药物等穿过细胞质或内膜的转运。利用生物信息学相关软件对其进行分析, 结果如下。

2.2.1 理化性质预测

MpMch2 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)长度 1 374 bp, 负责翻译 458 个氨基酸残基, 分子质量为 47 274.69, 理论等电点为 8.5, 属于碱性蛋白质, 分子式为 $C_{2177}H_{3385}N_{545}O_{578}S_{26}$, 原子总数为 6 711, 在 458 个氨基酸残基中, 带负电荷的氨基酸残基数量为 20, 带正电荷的氨基酸残基数量为 25, *MpMch2* 蛋白的不稳定系数为 39.3, 属于稳定蛋白质, 所考虑序列的 N 末端是 M (Met)。估计半衰期: 30 h (哺乳动物网织红细胞, 体外)、>20 h (酵母, 体内)、>10 h (大肠杆菌, 体内)。脂肪系数为 113.83, 总的平均亲水性为 0.702。

2.2.2 亲疏水性预测

结果显示 11 位氨基酸有最小亲水性-2.444, 432 位氨基酸有最大疏水性为 3.156, 为亲水蛋白, 如图 2 所示。该结果与 ProtParam 结果一致, 可信性大。

2.2.3 跨膜结构域预测

如图 3 所示, 1-43、122-127、181-184、

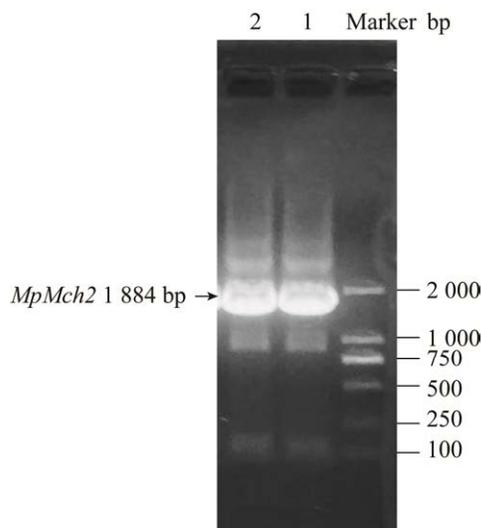


图 1 *MpMch2* 基因扩增电泳图

Figure 1 Electrophoresis diagram of the amplification of the *MpMch2* gene. Lane 1-2: *MpMch2* gene.

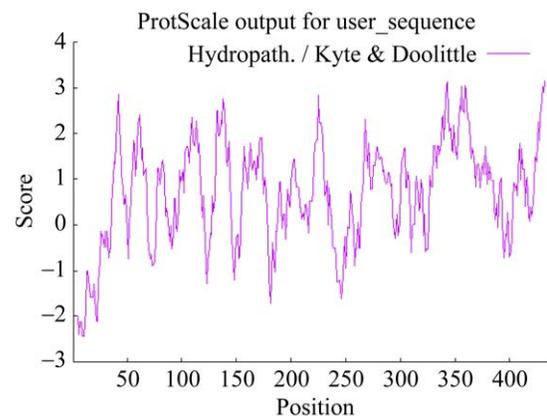


图 2 *MpMch2* 蛋白亲/疏水性预测结果

Figure 2 Hydrophilicity and hydrophobicity prediction of *MpMch2* protein.

240–262、348–351、436–436 aa 为胞内区域，67–98、148–157、208–216、286–327、375–417 aa 为胞外区域，44–66、99–121、128–147、158–180、185–207、217–239、217–239、263–285、328–347、352–347、418–435 aa 为跨膜区域，共有 11 个跨膜区域。而单羧酸转运蛋白属于跨膜转运蛋白，作为一种载体蛋白，它的结构为多回旋折叠的跨膜蛋白质，与被传递的分子特异性结合将其运输至质膜外，预测结果与蛋白功能一致。

2.2.4 亚细胞定位、信号肽、磷酸化位点预测

使用 PSORT II 软件对 MpMch2 蛋白进行亚细胞定位预测，结果显示位于质膜、内质网、液泡、线粒体、细胞核、高尔基体的概率分别是 60.9%、17.4%、8.7%、4.3%、4.3%、4.3%。位于细胞膜的概率最大，预测结果与单羧酸转运蛋白属于跨膜蛋白相符。

使用 SignalP 5.0 对 MpMch2 蛋白进行亚信号肽预测，结果显示存在信号肽的可能性为 0.002 3，从图 4 中可以看到，不存在剪切位点，属于分泌蛋白的可能性较低。分泌蛋白主要是指在细胞内合成后，分泌到细胞外起作用的蛋白质，例如唾液淀粉酶、胃蛋白酶。单羧酸转运蛋白作为一种转运蛋白，显然不属于分泌蛋白，这与预测结果相符。

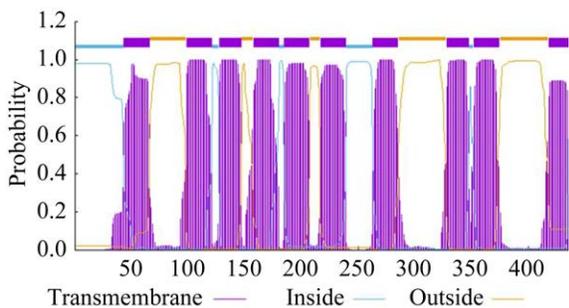


图 3 MpMch2 蛋白跨膜结构域预测

Figure 3 The transmembrane domain of prediction MpMch2 protein.

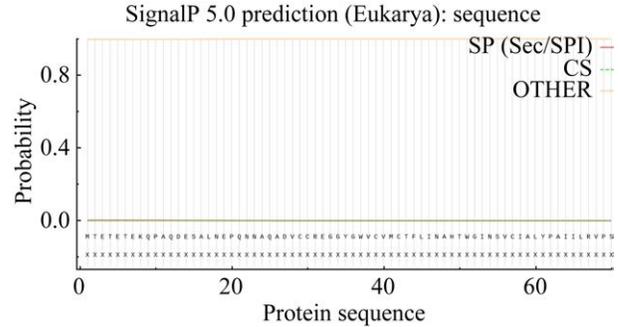


图 4 MpMch2 蛋白亚信号肽预测

Figure 4 Prediction of sub-signal peptide of MpMch2 protein.

使用 NetPhos 对 MpMch2 蛋白进行磷酸化位点预测，结果如图 5 显示，丝氨酸磷酸化位点最多，数量多达 40 个，苏氨酸磷酸化位点 18 个，酪氨酸磷酸化位点 14 个。丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化作用是一个可逆的蛋白修饰过程，推测 MpMch2 蛋白在运输物质过程中充当了 ATP 水解酶的作用，ATP 被水解后释放一个磷酸基团与 MpMch2 蛋白结合，通过以上 3 种氨基酸的磷酸化导致蛋白的构象发生变化，与运输的丙酮酸等物质结合，实现单羧酸盐的跨膜转运。

2.3 MpMch2 敲除载体的构建和敲除转化子的筛选鉴定

敲除载体构建过程：首先扩增出 MpMch2 基因的 5'端和 3'端同源臂及潮霉素的基因片段，见图 6A，3 个片段连接后长度为 3 557 bp，再将

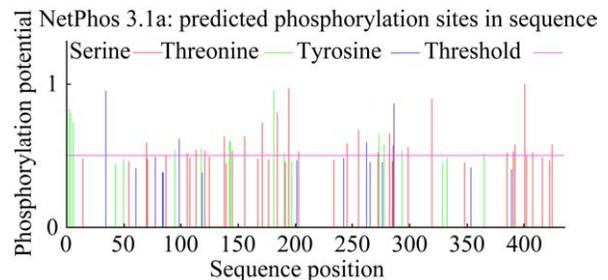


图 5 MpMch2 蛋白磷酸化位点预测

Figure 5 Prediction of phosphorylation sites of MpMch2 protein.

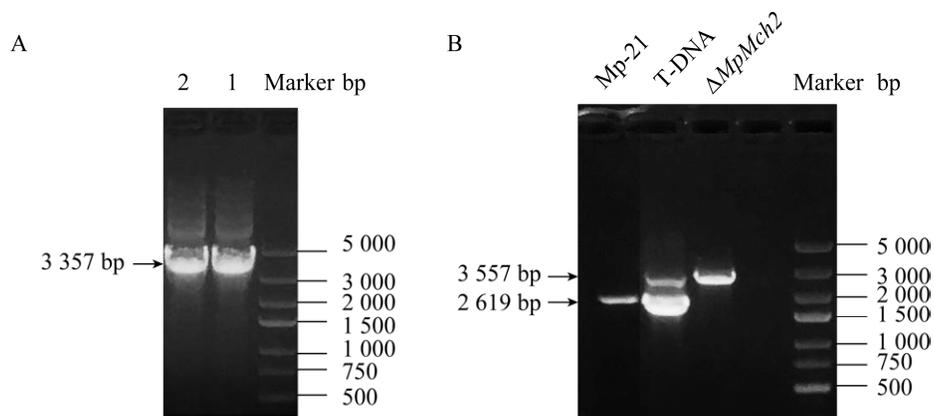


图 6 *MpMch2* 敲除载体的构建和敲除转化子验证 Figure 6 Construction of *MpMch2* knockout vector and verification of knockout transformants. A: *MpMch2* gene knockout box. Lane 1–2: *MpMch2* gene knockout box. B: Verification result of knockout strains. Mp-21: Primer amplified fragment in Mp-21 strain; T-DNA: The knockout box was randomly inserted into the primer amplification fragment in the strain; Δ *MpMch2*: Primer amplification fragments in knockout strains.

其连接至 pKO1B 载体后转化大肠杆菌进行农杆菌介导的转化, 挑取能在潮霉素抗性平板上稳定生长的转化子进行筛选, 筛选引物为 *MpMch2*-5F、*MpMch2*-3R, 目标长度为 2 619 bp, 包括整个 *MpMch2* 基因的开放阅读框, 筛选结果见图 6。农杆菌介导的转化有 2 种结果, 一种是敲除盒与 *MpMch2* 发生同源重组, 将潮霉素基因整合进基因组内替换 *MpMch2*, 另一种则为随机插入, 如图 6B 所示, 野生型 Mp-21 中只有一个条带, 长度为 2 619 bp, 发生了随机插入的菌株, 除了原有 2 619 bp 条带, 还有敲除盒的条带 3 557 bp。而发生了同源重组的菌株基因组内只有一个 3 557 bp 敲除盒片段。

将 Mp-21 和 Δ *MpMch2* 菌株分别在 PDA 培养基上培养 3、7、11 d, 提取 RNA 后逆转录为 cDNA, 对 2 种菌株内 *MpMch2* 基因进行检测。结果表明, 在 Δ *MpMch2* 内 3、7、11 d, 3 个时期均无法检测出 *MpMch2* 基因的表达, 如图 7 所示, 进一步说明 *MpMch2* 已被敲除成功。

2.4 培养特征观察

2.4.1 在不同培养基上菌落形态观察

从图 8 中可以看出在 PDA、MA、CYA 平

板上, 野生型 Mp-21 和 Δ *MpMch2* 的菌落形态和菌落大小无明显差异, 生长速率无明显差异。然而 Δ *MpMch2* 在 CYA 培养基上菌落颜色较野生型 Mp-21 深。在 G25N 培养基上, Δ *MpMch2* 的生长速度比 Mp-21 快, 菌落形态无明显差异。

2.4.2 菌落显微形态观察

将野生型 Mp-21 和 Δ *MpMch2* 分别培养 7 d 后, 在显微镜下观察发现分生孢子和子囊孢子及菌丝形态无明显差异(图 9)。这与 2 个菌株在 PDA 培养基上菌落形态无明显差异的结果一致。说明敲除 *MpMch2* 基因对分生孢子、子囊孢子、菌丝形态无影响。

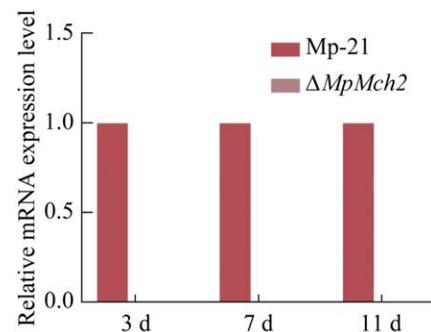


图 7 RT-qPCR 检测野生型 Mp-21 和 Δ *MpMch2* 中 *MpMch2* 基因表达量

Figure 7 The expression of *MpMch2* gene in wild type Mp-21 and Δ *MpMch2* was detected by RT-qPCR.

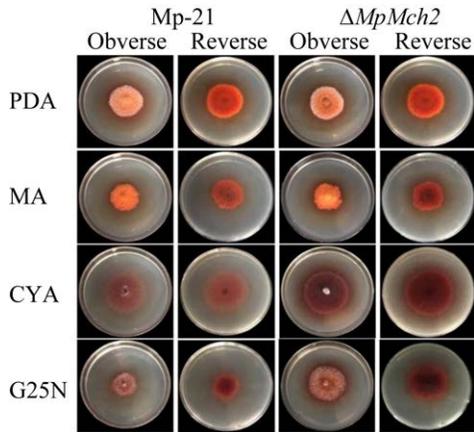


图 8 野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 在 PDA、MA、CYA 和 G25N 培养基上的菌落形态

Figure 8 The colony morphology of wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ on PDA, MA, CYA, and G25N media.

2.5 产孢量的测定

在 PDA 平板上生长 14 d 左右的 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 菌株，分别用 5 mL 无菌水将孢子冲下，计数子囊孢子和分生孢子数。结果如图 10 所示，与 Mp-21 菌株相比， $\Delta MpMch2$ 的分生孢子数目下降 47.9%，子囊孢子数目下降 43.7%，2 个菌株的孢子数差异显著，说明敲除 *MpMch2* 导致菌株分生孢子和子囊孢子数目下降。

2.6 在 PDB 液体培养基中发酵特征

在发酵过程中，发现 $\Delta MpMch2$ 菌株的菌丝呈现球状，与 Mp-21 菌丝的丝状有较大差异。Mp-21 的菌丝为絮状，并且随着发酵天数的增加，球状菌丝逐渐膨大，呈现放射状，产生菌丝。随着发酵天数的增加，野生型 Mp-21 培养基的

颜色逐渐加深， $\Delta MpMch2$ 菌株的培养基颜色差异不大，几乎不产生红曲色素，发酵过程如图 11 所示。

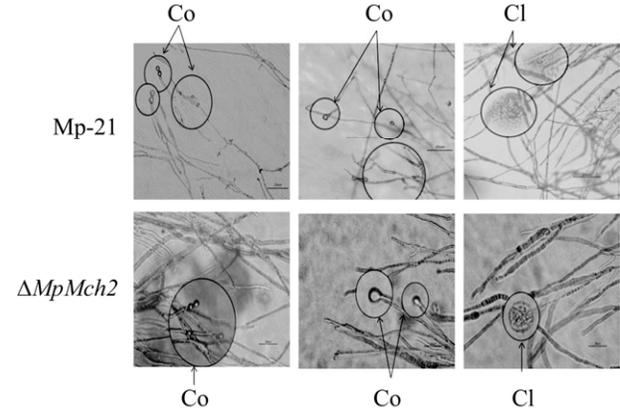


图 9 野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 显微形态观察

Figure 9 Microscopic structure of wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ strain. Co: conidium; Cl: Cleistothecium.

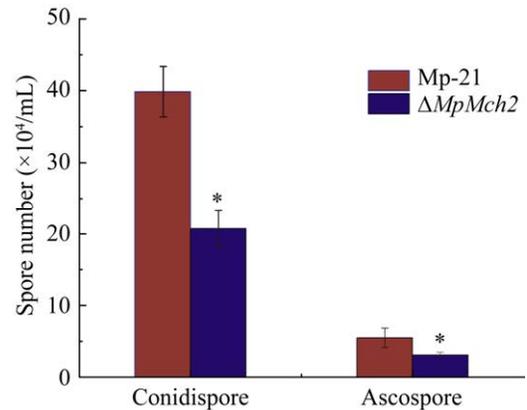


图 10 野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 产孢量比较

Figure 10 Comparison of spore yields of wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ strain. *: $P < 0.05$.

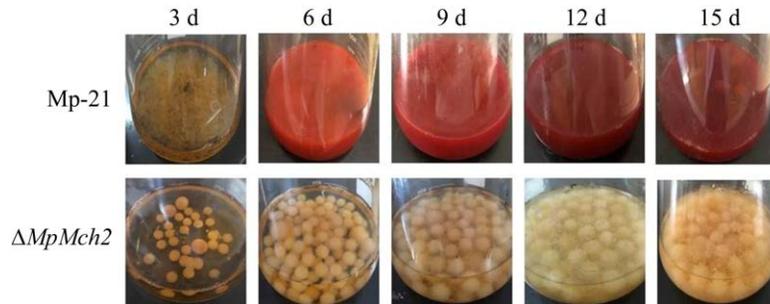


图 11 发酵过程中野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 发酵液菌液对比

Figure 11 Comparison of wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ strain fermentation broth during fermentation.

2.7 红曲色素产量测定

将野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 菌株的发酵液处理后分别测定黄色素、橙色素、红色素产量, 三者产量相加为红曲色素产量, 两者红曲色素差异显著, 结果如图 12 显示, 与野生型 Mp-21 相比, $\Delta MpMch2$ 黄色素、橙色素、红色素产量大幅下降, 分别下降 93%、92% 和 93%, 三者之和红曲色素产量下降 92% (图 13)。

2.8 GABA 产量测定

高效液相色谱检测野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 发酵 10 d 后发酵液中 GABA 产量, 结果如图 14 所示, 野生型 Mp-21 菌株发酵液中

GABA 产量为 2.16 mg/mL, $\Delta MpMch2$ 发酵液中为 1.10 mg/mL, 两者差异显著, 表明敲除 *MpMch2* 基因会导致 GABA 产量下降。

2.9 RT-qPCR 检测野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 中产孢、GABA 相关基因表达量

参考丝状真菌有性生殖和无性生殖相关研究, 包括模式菌株构巢曲霉的相关研究, 发现 *flbA* 等基因与分生孢子和子囊孢子产生密切相关, 因此选取以下基因测定其表达。结果如图 15 所示, 在培养 3 d 时, 检测了 2 种菌株相关基因的表达量, 发现与野生型 Mp-21 菌株相比, $\Delta MpMch2$ 菌株中 *flbA*、*flbB*、*flbC*、*flbD*、*flbE*、

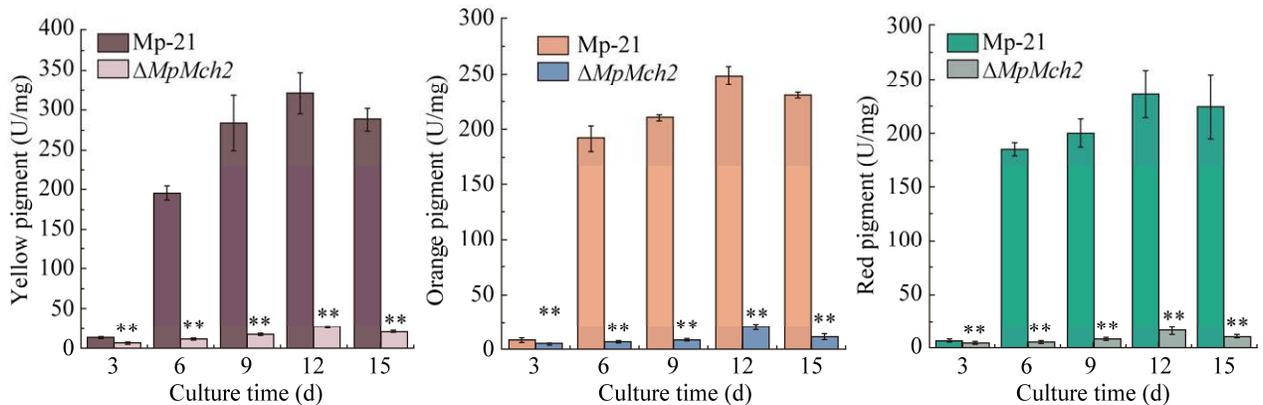


图 12 野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 发酵液中黄色素、橙色素、红色素产量比较

Figure 12 Comparison of yellow pigment, orange pigment and red pigment production in fermentation broth of wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ strain. **: $P < 0.01$.

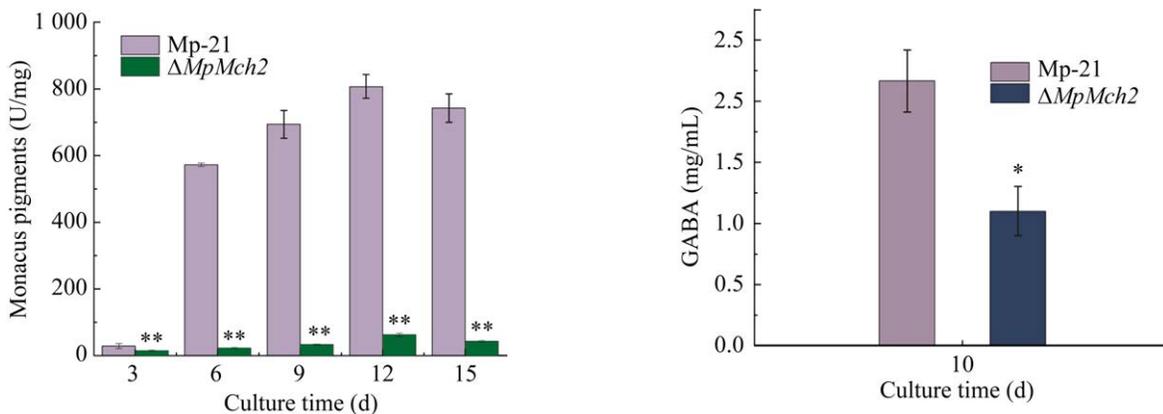


图 13 野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 发酵液中红曲色素产量比较

Figure 13 Comparison of monascus pigments production in wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ fermentation broth. **: $P < 0.01$.

图 14 野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 发酵液中 GABA 产量比较

Figure 14 Comparison of GABA production in wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$ fermentation broths. *: $P < 0.05$.

fluG、*wetA*、*brlA*、*vosA* 的表达量分别是 Mp-21 的 0.046、0.260、0.690、0.054、1.040、0.050、0.046、0.090 及 0.030 倍。可以看出在 3 d 时，除了 *flbE* 以外，在 $\Delta MpMch2$ 菌株中其他产孢基因表达量均显著下降。

在培养 7 d 时， $\Delta MpMch2$ 菌株中 *flbA*、*flbB*、*flbC*、*flbD*、*flbE*、*fluG*、*wetA*、*brlA*、*vosA* 的表达量分别是 Mp-21 的 15.38、0.95、7.20、13.88、23.92、8.70、29.43、32.06 及 10.80 倍。可以看出在 7 d 时，除了 *flbB* 以外，在 $\Delta MpMch2$ 菌株中其他基因表达量均显著上升。

在培养 11 d 时， $\Delta MpMch2$ 菌株中 *flbA*、*flbB*、*flbC*、*flbD*、*flbE*、*FluG*、*wetA*、*brlA*、*vosA* 的表达量分别是 Mp-21 的 0.270、0.200、0.261、0.050、0.037、0.020、0.369、0.486 及 0.040 倍。可以看出在 11 d 时，在 $\Delta MpMch2$ 菌株中其他基因表达

量均下降。

为了探究 GABA 产量减少的原因，测定 γ -氨基丁酸相关基因表达量来验证敲除 *MpMch2* 是否会导致其发生变化。根据前期研究得知，在微生物中 GABA 的产生方式为葡萄糖通过糖酵解分解一系列反应，最终生成丙酮酸^[13]。在这一过程中选择 3 种限速酶，测定其表达量，分别为己糖激酶(glucokinase)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase)。丙酮酸通过氧化脱羧反应生成乙酰 CoA，作为三羧酸循环的原料，通过一系列酶的催化后，中间产物生成 α -酮戊二酸，在谷氨酸脱氢酶的作用下生成 L-谷氨酸，最后在谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)的作用下生成 GABA。在这一过程中选取柠檬酸合酶(citrate synthase)、异柠檬酸脱氢酶(NADP-dependent

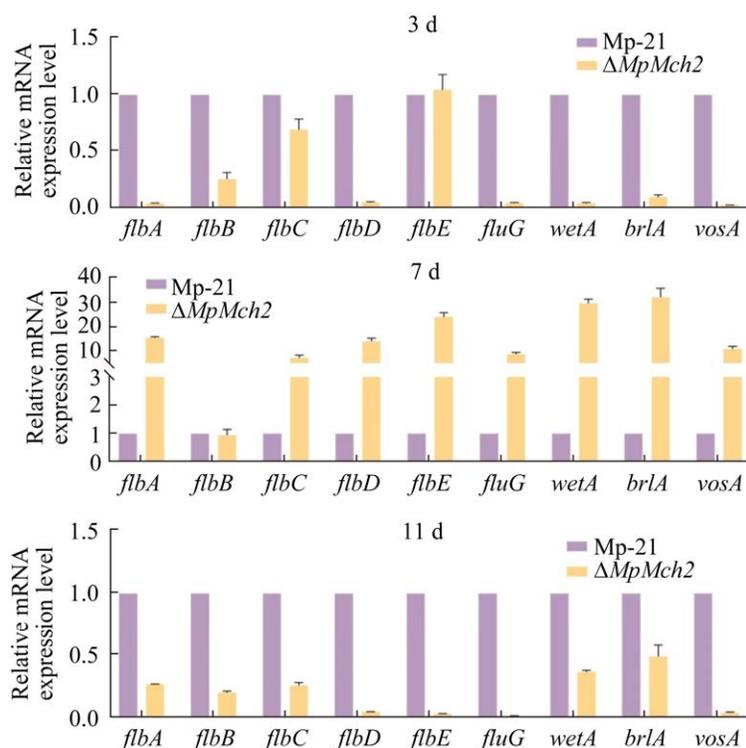


图 15 RT-qPCR 检测野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 中产孢相关基因表达量

Figure 15 RT-qPCR was used to detect the expression of sporulation-related genes in wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$.

isocitrate dehydrogenase)、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体亚基(ketoglutarate dehydrogenase complex subunit Kgd1)、琥珀酸脱氢酶(succinate

dehydrogenase)、苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)、谷氨酸脱羧酶, 测定其表达量, 结果如图 16 所示。

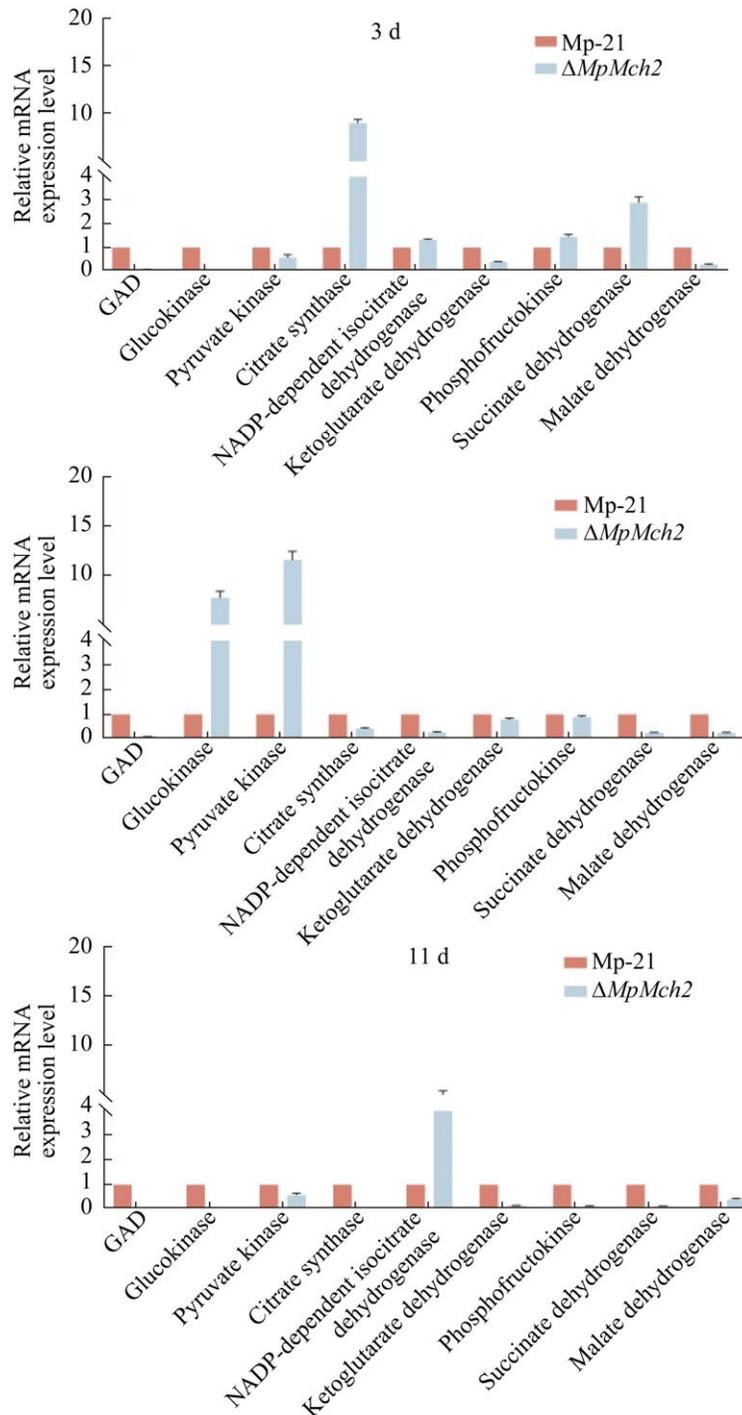


图 16 RT-qPCR 检测野生型 Mp-21 和 $\Delta MpMch2$ 中 GABA 代谢相关基因表达量

Figure 16 RT-qPCR was used to detect the expression of GABA metabolism-related genes in wild type Mp-21 and $\Delta MpMch2$.

在 3 d 时, 检测了 2 种菌株 GABA 相关基因表达量(图 16), 发现与 Mp-21 菌株相比, $\Delta MpMch2$ 菌株中的谷氨酸脱羧酶、己糖激酶、丙酮酸激酶、柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体亚基、磷酸果糖激酶、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶表达量分别是 Mp-21 的 0.060、0.042、0.570、9.040、1.320、0.390、1.450、2.890 及 0.280 倍。可以看出在 3 d 时, 柠檬酸合酶、琥珀酸脱氢酶表达量显著上调, 大部分基因表达量在 $\Delta MpMch2$ 菌株中均下调。

在 7 d 时, 检测了 2 种菌株 GABA 相关基因表达量, 发现与 Mp-21 菌株相比, $\Delta MpMch2$ 菌株中的谷氨酸脱羧酶、己糖激酶、丙酮酸激酶、柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体亚基、磷酸果糖激酶、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶表达量是 Mp-21 的 0.10、7.75、11.61、0.42、0.26、0.78、0.88、0.25 及 0.25 倍。可以看出在 7 d 时, 除己糖激酶、丙酮酸激酶, 其他基因表达量在 $\Delta MpMch2$ 菌株中下调。

在 11 d 时, 检测了 2 种菌株 GABA 相关基因表达量, 发现与 Mp-21 菌株相比, $\Delta MpMch2$ 菌株中的谷氨酸脱羧酶、己糖激酶、丙酮酸激酶、柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体亚基、磷酸果糖激酶、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶表达量是 Mp-21 的 0.000 27、0.006 1、0.003 2、0.570、4.390、0.153、0.100、0.130 及 0.400 倍。可以看出在 11 d 时, 除柠檬酸合酶, 其他基因在 $\Delta MpMch2$ 菌株中基因表达量下调。

可以把 GABA 的合成分为 3 个阶段, 第一阶段是糖酵解反应, 反应产物为丙酮酸。在第 3 天和第 11 天, 与野生型 Mp-21 相比, $\Delta MpMch2$ 菌株中的己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶表达量均下降, 磷酸果糖激酶表达量在第 7 天下降。说明敲除 *MpMch2* 基因会对糖酵解反应产生影响, 从而影响丙酮酸的产量, 导致进入下一

步反应的原料减少。第二个阶段丙酮酸通过三羧酸循环一系列反应生成 α 酮戊二酸, 在第 3 天, $\Delta MpMch2$ 除了柠檬酸合酶和琥珀酸脱氢酶, 第 11 天除了柠檬酸合酶, 三羧酸循环中其他几种酶表达量均下降, 说明该阶段产物 α 酮戊二酸产量与野生型 Mp-21 相比下降。GABA 合成的关键步骤所需要的酶——谷氨酸脱羧酶, 在 3 个时间段表达量均下降。3 个阶段 $\Delta MpMch2$ 菌株相关基因表达量下降, 导致最终产物 GABA 产量下降。另一方面 *MpMch2* 敲除后, 丙酮酸的转运受阻, 进入代谢途径的丙酮酸产量下降, GABA 合成的原料下降。这两方面均会导致 GABA 产量下降。

3 讨论与结论

3.1 丝状真菌无性和有性繁殖相关基因功能的研究

真菌同时拥有无性和有性两种繁殖方式, 每个与繁殖相关的基因在不同菌株中发挥的作用有差异, 某些基因之间还存在协同作用, 截至目前研究最多的是构巢曲霉, 为丝状真菌的模式植物, 本次选取的基因可大致分为分生孢子相关和子囊孢子相关。

在构巢曲霉中研究发现, *F1bA*^[14] 是 G 蛋白信号通路调节因子, 敲除后菌落表型变得蓬松, 气生菌丝生长丰富, 过表达会导致 *brlA* 异常表达, 导致发育提早, 形成分生孢子^[14]。这与红色红曲霉中 *mrflbA* 缺失抑制分生孢子萌发的结果一致^[15], 另外, 在 *mrflbA* 株中也未观察到子囊孢子。得出结论: *mrflbA* 对菌株的有性繁殖和无性繁殖均有调控。

F1bB 是碱性转录因子, 过表达会抑制分生孢子的产生, 发现该基因正常表达是 *brlA* 转录的前提^[16-17], 而 *brlA* 的激活是无性孢子产生的前提。推测 *F1bC* 是核转录因子, 敲除该基因发

现导致分生孢子的萌发的延迟或减少,并且该基因的定位与表达不受 *FlbB* 和 *FlbE* 的影响^[18]。

研究发现 *FlbD* 在无性、有性生殖方面均发挥作用。删除整个编码区的菌株分生孢子产量低于单个碱基发生突变的菌株,但是 mRNA 水平无影响,说明该基因编码的蛋白质在分生孢子的产生中有调控作用。在有性繁殖方面,*FlbD* 缺失株和单个碱基突变株均能产生子囊孢子,*FlbD* 缺失株的子囊孢子数量要少于单个碱基突变株,但是不能产生子囊孢子外的包被^[19]。这些结果表明 *FlbD* 对构巢曲霉的有性繁殖至关重要。

FlbE 是一种发育激活因子,在构巢曲霉生长的早期阶段瞬时表达,基因缺失导致产孢量下降^[20],并且导致产孢相关基因 *brlA* 和 *VosA*^[21] 的表达延迟。*FluG* 是构巢曲霉无性发育的早期调节因子,位于 *FlbA*、*FlbB* 等基因上游,具有 N-末端氨基水解酶区域,该区域与 C-末端 γ -谷氨酰连接酶区域相连。研究表明 *FluG* 缺失突变体无分生孢子产生,而 C-末端缺失突变体也无法产生分生孢子,说明 C-末端对分生孢子的产生是必需的^[22]。在球孢白僵菌内,*FlbD* 敲除后对分生孢子的产量和生物量均无影响^[23]。与构巢曲霉中不同的是:*FluG* 的缺失不影响 *brlA* 和 *FlbA-E* 的表达^[24-25]。丝状真菌中无性孢子的产生主要由 *brlA-abaA-wetA* 级联调控,*brlA* 的激活对于分生孢子梗的发育必不可少,*wetA*^[26] 是该级联的最后一步,参与分生孢子细胞壁的合成、次级代谢。mRNA 水平分析发现,*wetA* 通过抑制途径上游 *brlA* 负反馈回路,负向调控分生孢子的产生^[26]。

VosA 在构巢曲霉的无性繁殖和有性繁殖方面均发挥作用^[27]。研究表明 *VosA* 基因缺失导致分生孢子活力下降,在子囊孢子形成过程中,*VosA* 基因的缺失导致子囊孢子活力下降,并且子

囊孢子对于高温、氧化的胁迫耐受性下降^[28]。因此,推测在紫色红曲霉中,*VosA* 与分生孢子生长相关。

值得关注的是,某些基因存在于构巢曲霉,例如 *abaA*,在构巢曲霉中与分生孢子的产生有关,但不存在于红曲霉中,将其导入红曲霉中却能使分生孢子数量增多^[29],说明两者同属于丝状真菌,在无性繁殖方面可能存在不同的调控模式。在红色红曲霉敲除 *MrFlbC* 和 *MrFlbG* 后孢子数量无明显变化^[30],发现缺失、过表达 *MrwetA*、*MrbrlA* 对分生孢子的大小、数目、形态无影响,但是缺失或过表达 *MrwetA* 会阻碍子囊孢子的产生^[31]。然而在紫色红曲霉中敲除 *brlA* 基因却导致分生孢子产量下降^[32]。说明红色红曲霉的繁殖调控模式与构巢曲霉并不相同,在同一种曲霉中也可能存在不同的调控模式,基因功能甚至相反或者完全不同。

比较 3、7、11 d 产孢相关基因的表达量发现,在生长过程中选取这 3 个时间点的原因是 3 d 时紫色红曲霉的孢子开始萌发,7 d 是紫色红曲霉快速生长期,11 d 时红曲霉生长减慢逐渐停止。3 d、9 d 时 $\Delta MpMch2$ 株与野生型 Mp-21 相比,除 3 d 时 *flbB* 外其他基因表达量显著下降,7 d 时 $\Delta MpMch2$ 株与野生型 Mp-21 相比测定的有性生殖和无性生殖相关基因表达量显著上升。说明在红曲霉生长初期和后期,推测缺失 *MpMch2* 基因导致菌株有性和无性生殖相关基因表达量下降,菌株在对数期进行某些补偿性调节后使菌株产孢相关基因表达量上升,究竟是怎样的机制导致这一结果尚不明确,但是最终分生孢子和子囊孢子数量与野生型相比下降。

分生孢子和子囊孢子产量下降的原因,推测与碳源相关,因为碳源是真菌生长的必需营养元素之一,碳源的种类会影响多聚糖合成酶的表达从而影响丝状真菌分生孢子的萌发^[33]。丝状真

菌的细胞壁的成分为葡聚糖和糖蛋白,细胞质膜的成分为含偶数碳原子的饱和或不饱和脂肪酸。从这个角度来看,单羧酸转运蛋白 MpMch2 缺失后转运丙酮酸、乳酸等碳代谢中间产物的功能受阻,部分碳源无法正常转运,但是紫色红曲霉中还有其他单羧酸转运蛋白继续发挥作用,所以只是导致分生孢子和子囊孢子的产量下降,并不是完全不产生。

3.2 MpMch2 基因缺失导致液态发酵后红曲色素产量下降

在发酵过程中发现, Δ MpMch2 菌株的菌丝呈现球状,与 Mp-21 菌丝的丝状有较大差异。随着发酵天数的增加,球状菌丝逐渐膨大,呈现放射状,产生菌丝。此外,在摇瓶发酵时, Δ MpMch2 菌株几乎不产生红曲色素,连菌丝都呈现浅黄色,而在 PDA 固体培养基上, Δ MpMch2 菌株能够分泌红曲色素。推测在液体发酵的过程中,氧气浓度增加,糖酵解反应产生大量的乳酸,而单羧酸转运蛋白作用则是将产生的大量乳酸转运到细胞外,维持细胞内环境稳态。一方面 Δ MpMch2 菌株中转运蛋白功能受阻,导致乳酸堆积使糖酵解反应停滞,另一方面细胞内酸性升高也会影响其他代谢途径,最终导致细胞死亡。相关研究表明,葡萄糖等碳源是红曲色素合成的重要原料^[33-35],葡萄糖通过糖酵解、糖异生等途径生成乙酰辅酶 A,而乙酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 是合成红曲色素的前体聚酮化合物的原料。糖酵解等代谢反应停滞甚至细胞死亡都会导致 Δ MpMch2 液体发酵过程中不产生红曲色素。说明单羧酸转运蛋白在维持正常生命活动中发挥重要作用。

目前在红曲霉属中并未见单羧酸转运蛋白的研究,通过本文研究单羧酸转运基因对红曲霉繁殖、次级代谢的合成均有重要影响。这些实验结果为红曲霉资源开发利用提供一定的借鉴。

参考文献

- [1] LONG PC, ZHU LS, LAI HF, XU SY, DONG XX, SHAO YC, WANG LL, CHENG SY, LIU G, HE JR, HE Y. *Monascus* red pigment liposomes: microstructural characteristics, stability, and anticancer activity[J]. *Foods*, 2023, 12(3): 447.
- [2] CHAUDHARY V, KATYAL P, PANWAR H, KAUR J, ALUKO RE, PUNIYA AK, POONIA AK. Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer properties of the red biopigment extract from *Monascus purpureus* (MTCC 369)[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(9): e14249.
- [3] WU L, ZHOU KX, CHEN F, CHEN GM, YU Y, LV XC, ZHANG W, RAO PF, NI L. Comparative study on the antioxidant activity of *Monascus* yellow pigments from two different types of Hongqu-functional qu and coloring qu[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 715295.
- [4] HONG XK, GUO TL, XU XQ, LIN J. Multiplex metabolic pathway engineering of *Monascus pilosus* enhances lovastatin production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(21): 6541-6552.
- [5] SHEVCHUK Y, KUYPERS K, JANSSENS GE. Fungi as a source of bioactive molecules for the development of longevity medicines[J]. *Ageing Research Reviews*, 2023, 87: 101929.
- [6] 丁允章,倪峰,赵鑫,张奕嘉,蒋冬花. 紫色红曲霉 Mp-21 胞内次级代谢产物的分离纯化与活性研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(7): 1997-2006.
DING YZ, NI F, ZHAO X, ZHANG YJ, JIANG DH. Separation, purification and bioactivity analysis of intracellular secondary metabolites from *Monascus purpureus* Mp-21[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 1997-2006 (in Chinese).
- [7] 丁允章,孔黎春,张奕嘉,蒋冬花. 紫色红曲霉 Mp-21 次级代谢产物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(1): 103-118.
DING YZ, KONG LC, ZHANG YJ, JIANG DH. Antioxidation and inhibition of α -glucosidase activity of secondary metabolites of *Monascus purpureus* Mp-21[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 103-118 (in Chinese).
- [8] 邓东,颜宁. MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制. *科学通报*, 2015, 60: 720-728.
DENG D, YAN N. Structural basis and transport mechanism of the major facility superfamily (MFS)

- transporter. Chinese Science Bulletin, 2015, 60: 720-728 (in Chinese).
- [9] SAUVE S, WILLIAMSON J, POLASA A, MORADI M. Ins and outs of rocker switch mechanism in major facilitator superfamily of transporters[J]. Membranes, 2023, 13(5): 462.
- [10] 张维, 严汉池. 单羧酸转运蛋白(MCT)的功能调控及生理特性研究[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(13): 165-172. ZHANG W, YAN HC. Functional regulation and physiological characteristics of monocarboxylic acid transporter (MCT)[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61(13): 165-172 (in Chinese).
- [11] 李志勇. 灰葡萄孢单羧酸转运蛋白基因 BC1G₀4502.1 的功能研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2016. LI ZY. Gene disruption and characterization of BC1G₀4502.1 in *Botrytis cinerea*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [12] 赵璇竹. 苹果炭疽叶枯病菌单羧酸转运蛋白 CgMCT1 的功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021. ZHAO XZ. Function analysis of monocarboxylate transporter CgMCT1 in *Colletotrichum gloeosporioides*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [13] 吴安琪. 基于 ARTP 诱变育种制备优质曲种及其生产富含 GABA 红曲米粉的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2022. WU AQ. Study on optimization of the Hongqu starter preparation process for the manufacturing of red mold rice power with high gamma-aminobutyric acid production based on ARTP breeding[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2022 (in Chinese).
- [14] SEO JA, HAN KH, YU JH. Multiple roles of a heterotrimeric G-protein γ -subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*[J]. Genetics, 2005, 171(1): 81-89.
- [15] YANG YS, LI L, LI X, SHAO YC, CHEN FS. *mflbA*, encoding a putative FlbA, is involved in aerial hyphal development and secondary metabolite production in *Monascus ruber* M-7[J]. Fungal Biology, 2012, 116(2): 225-233.
- [16] ETXEBESTE O, NI M, GARZIA A, KWON NJ, FISCHER R, YU JH, ESPESO EA, UGALDE U. Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(1): 38-48.
- [17] HERRERO-GARCIA E, PEREZ-DE-NANCLARES-ARREGI E, CORTESE MS, MARKINA-IÑARRAIRAEGUI A, OIARTZABAL-ARANO E, ETXEBESTE O, UGALDE U, ESPESO EA. Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells[J]. Molecular Microbiology, 2015, 98(4): 607-624.
- [18] KWON NJ, GARZIA A, ESPESO EA, UGALDE U, YU JH. FlbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(5): 1203-1219.
- [19] ARRATIA-QUIJADA J, SÁNCHEZ O, SCAZZOCCHIO C, AGUIRRE J. FlbD, a Myb transcription factor of *Aspergillus nidulans*, is uniquely involved in both asexual and sexual differentiation[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(9): 1132-1142.
- [20] KWON NJ, SHIN KS, YU JH. Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2010, 47(12): 981-993.
- [21] SON YE, YU JH, PARK HS. Regulators of the asexual life cycle of *Aspergillus nidulans*[J]. Cells, 2023, 12(11): 1544.
- [22] SEO JA, GUAN YJ, YU JH. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1535-1544.
- [23] GUO CT, LUO XC, TONG SM, ZHOU Y, YING SH, FENG MG. FluG and FluG-like FlrA coregulate manifold gene sets vital for fungal insect-pathogenic lifestyle but not involved in asexual development[J]. mSystems, 2022, 7(4): e0031822.
- [24] GUO CT, LUO XC, YING SH, FENG MG. Differential roles of five fluffy genes (*flbA*-*flbE*) in the lifecycle *in vitro* and *in vivo* of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(4): 334.
- [25] OJEDA-LÓPEZ M, CHEN W, EAGLE CE, GUTIÉRREZ G, JIA WL, SWILAIMAN SS, HUANG Z, PARK HS, YU JH, CÁNOVAS D, DYER PS. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli[J]. Studies in Mycology, 2018, 91: 37-59.
- [26] WU MY, MEAD ME, LEE MK, OSTREM LOSS EM, KIM SC, ROKAS A, YU JH. Systematic dissection of the evolutionarily conserved WetA developmental regulator across a genus of filamentous fungi[J]. mBio, 2018, 9(4): e01130-18.

- [27] THIEME KG, GERKE J, SASSE C, VALERIUS O, THIEME S, KARIMI R, HEINRICH AK, FINKERNAGEL F, SMITH K, BODE HB, FREITAG M, RAM AFJ, BRAUS GH. Velvet domain protein VosA represses the zinc cluster transcription factor ScIB regulatory network for *Aspergillus nidulans* asexual development, oxidative stress response and secondary metabolism[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(7): e1007511.
- [28] KIM MJ, LEE MK, PHAM HQ, GU MJ, ZHU BH, SON SH, HAHN D, SHIN JH, YU JH, PARK HS, HAN KH. The velvet regulator VosA governs survival and secondary metabolism of sexual spores in *Aspergillus nidulans*[J]. *Genes*, 2020, 11(1): 103.
- [29] 黄志明. *abaA* 基因影响红色红曲菌 M7 分生孢子产生的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017.
HUANG ZM. The effect of *abaA* on generation of conidium in *Monascus ruber* M7[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [30] JIA LL, YU JH, CHEN FS, CHEN WP. Characterization of the asexual developmental genes *brlA* and *wetA* in *Monascus ruber* M7[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2021, 151: 103564.
- [31] 杨孙玉悦, 廖鑫琳, 潘妍妍, 王嘉琦, 蒋冬花. 红曲霉繁殖相关 *brlM* 基因鉴定及功能分析[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 4992-5004.
YANG SY, LIAO XL, PAN YY, WANG JQ, JIANG DH. Identification and function analysis of the *brlM* gene related to *Monascus* reproduction[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4992-5004 (in Chinese).
- [32] JIA LL, HUANG YY, YU JH, STADLER M, SHAO YC, CHEN WP, CHEN FS. Characterization of key upstream asexual developmental regulators in *Monascus ruber* M7[J]. *Food Bioscience*, 2022, 50: 102153.
- [33] 李翀. 黄曲霉分生孢子萌发期代谢变化规律及其调控机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2022.
LI C. The study on metabolic changes and regulation mechanism of *Aspergillus flavus* conidia during germination[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [34] HONG JL, WU L, LU JQ, ZHOU WB, CAO YJ, LV WL, LIU B, RAO PF, NI L, LV XC. Comparative transcriptomic analysis reveals the regulatory effects of inorganic nitrogen on the biosynthesis of *Monascus* pigments and citrinin[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(9): 5268-5282.
- [35] LIU HH, ZHANG J, LU GG, WANG FH, SHU L, XU HM, LI ZJ, WANG YR, GUO QB, WU SF, JIANG LY, WANG CL, HUANG D, LIU B. Comparative metabolomics analysis reveals the metabolic regulation mechanism of yellow pigment overproduction by *Monascus* using ammonium chloride as a nitrogen source[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(16): 6369-6379.
- [36] HUANG D, WANG YH, ZHANG J, XU HM, BAI J, ZHANG HJ, JIANG XL, YUAN J, LU GG, JIANG LY, LIAO XP, LIU B, LIU HH. Integrative metabolomic and transcriptomic analyses uncover metabolic alterations and pigment diversity in *Monascus* in response to different nitrogen sources[J]. *mSystems*, 2021, 6(5): e0080721.