



# 红色红曲菌 M7 的丝衣霉酸基因簇及其功能研究

洪莘, Virk Muhammad Safiullah, 陈福生\*

华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070

洪莘, Virk Muhammad Safiullah, 陈福生. 红色红曲菌 M7 的丝衣霉酸基因簇及其功能研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2415-2429.

HONG Shen, VIRK Muhammad Safiullah, CHEN Fusheng. Study on the byssochlamic acid gene cluster of *Monascus ruber* M7 and its function[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2415-2429.

**摘要:**【目的】明确红色红曲菌(*Monascus ruber*) M7 的基因组中是否存在丝衣霉酸(byssochlamic acid, BA)基因簇,并探讨 BA 基因簇中聚酮合酶基因 *mr-Bys* 及 3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶基因 *mr-hdh* 对 BA 产生的影响。【方法】采用生物信息学方法对 M7 基因组进行分析,以确定 BA 候选基因簇;以基因敲除及过表达方法研究 *mr-Bys* 和 *mr-hdh* 对 BA 产生的影响;以超高效液相色谱(ultra-performance liquid chromatography, UPLC)和质谱(mass spectrometry, MS)方法分析 BA。【结果】在红色红曲菌 M7 基因组中发现了 BA 基因簇,敲除 *mr-Bys* 后,BA 消失,而敲除和过表达 *mr-hdh* 均可影响 BA 的产生。【结论】红色红曲菌 M7 基因组中存在 BA 基因簇,可产生 BA。研究结果不仅丰富了红曲菌次级代谢产物及其合成途径的相关研究,也为以红曲菌为菌种开发新产品奠定了基础。

**关键词:** 红曲菌; 丝衣霉酸; 次级代谢; 聚酮合酶; 3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶

资助项目: 国家自然科学基金(31730068, 31330059)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31730068, 31330059).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87282111, E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

Received: 2022-09-21; Accepted: 2022-11-27; Published online: 2022-12-01

# Study on the byssochlamic acid gene cluster of *Monascus ruber* M7 and its function

HONG Shen, VIRK Muhammad Safiullah, CHEN Fusheng\*

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

**Abstract:** [Objective] To determine whether the byssochlamic acid (BA) gene cluster exists in the genome of *Monascus ruber* M7, and to explore the effect of polyketide synthase gene *mr-Bys* and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase gene *mr-hdh* in BA gene cluster on BA production. [Methods] The M7 genome was analyzed by bioinformatics methods to identify the BA candidate gene clusters. The effects of *mr-Bys* and *mr-hdh* on BA production were studied by the gene knockout and over-expression methods. BA was analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and mass spectrometry (MS). [Results] A BA gene cluster was found in the genome of *M. ruber* M7. After knocking out *mr-Bys*, BA disappeared, while both knockout and over-expression of *mr-hdh* affected BA production by *M. ruber* M7. [Conclusion] There is a BA gene cluster in the genome of *M. ruber* M7, which can produce BA. The research results enrich the research on the secondary metabolites of *Monascus* spp. and their synthetic pathways and lay a foundation for the development of new products using *Monascus* spp.

**Keywords:** *Monascus* spp.; byssochlamic acid; secondary metabolites; polyketide synthase; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

丝状真菌红曲菌(*Monascus* spp.)又称红曲霉,是在我国有近 2 000 年应用历史的传统发酵产品——红曲(米)的生产菌种<sup>[1-2]</sup>。红曲菌可产生红曲色素(*Monascus* pigments, MPs)<sup>[3-5]</sup>和莫纳可林 K (monacolin K, MK)<sup>[6-7]</sup>等多种有益的次级代谢产物(secondary metabolites, SMs)。同时,某些红曲菌株也可产生真菌毒素桔霉素(citrinin, CIT)<sup>[8-12]</sup>。近年来,围绕红曲产品中 MPs 和 MK 含量的提高<sup>[13-14]</sup>以及 CIT 含量的控制<sup>[15-16]</sup>,已有很多相关研究报道。目前,我国红曲产品中的 CIT 问题已经得到很好解决<sup>[17]</sup>。关于红曲菌 MPs 和 CIT 的基因簇(gene cluster)及其生物合成途径也已明确<sup>[18-20]</sup>。

基因组分析发现,在红曲菌基因组中,除合成 MPs、MK 和 CIT 的相关基因外,在红色红曲

菌(*M. ruber*) M7 的基因组中还发现了丝衣霉酸(byssochlamic acid, BA)聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)基因 *mr-Bys* (byssochlamic acid PKS gene from *M. ruber* M7)<sup>[21]</sup>。这预示着红曲菌还可能产生 BA。BA 是由 C7–C9 碳环和 1 个或 2 个马来酸酐(maleic anhydride)组成的马来酰亚胺(maleidrides)类 SMs 中的一种<sup>[22]</sup>。它于 1933 年首次从纯黄丝衣霉(*Byssochlamys fulva*)的代谢产物中分离得到<sup>[23]</sup>,由 1 个九元(C9)碳环和 2 个马来酸酐组成<sup>[24]</sup>。由于马来酰亚胺类化合物的结构独特性<sup>[25]</sup>以及有望开发成抗真菌剂和除草剂等<sup>[26]</sup>,所以这类真菌 SMs 的基因簇与生物合成途径已成为近年来的研究热点<sup>[27-28]</sup>。

本实验室前期在红色红曲菌 M7 基因组中发现了 BA 的 PKS 基因 *mr-Bys*<sup>[21]</sup>,但关于 BA

基因簇及其功能目前仍不清楚。本研究首先分析了红曲菌 M7 基因组中的 BA 基因簇, 然后分别构建了 BA 基因簇中 *mr-Bys* 和 3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶基因 *mr-hdh* (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase gene from *M. ruber* M7) 的敲除菌株以及 *mr-hdh* 的过表达菌株, 并分析了这些敲除与过表达菌株的形态特征及产 BA 能力的变化。研究结果丰富了红曲菌产 SMs 的种类及其产生机理, 也为研发红曲新产品奠定了理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和培养基

红色红曲菌 M7<sup>[29]</sup>: 出发(原始)菌株, 保存于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)斜面上。

诱导培养基(inducing media, IM)和潮霉素与新霉素筛选培养基: 用于 BA 基因簇中相关基因敲除和过表达菌株的筛选。PDA、麦芽提取物琼脂培养基(malt extract agar, MA)、察氏酵母提取物琼脂培养基(Czapek yeast extract agar, CYA)和 25%甘油硝酸盐琼脂培养基(25% glycerol nitrate agar, G25N), 用于红曲菌 M7 及其基因敲除和过表达菌株的形态学研究。米饭培养基用于红曲的制备。这些培养基的详细配方见参考文献[30]。

### 1.2 丝衣霉酸基因簇的生物信息学分析

基于 NCBI 截至 2022 年 7 月已发布的微生物基因组信息与纯黄丝衣霉中 BA 聚酮合酶 Bfpks1 的氨基酸序列<sup>[26]</sup>, 采用 MEGA 7.0<sup>[31]</sup>分析并绘制了来自于不同真菌与 Bfpks1 同源(同源性 >40%)的 BA 聚酮合酶系统发育树。以 antiSMASH<sup>[32]</sup>预测了红曲菌 M7 基因组中的 BA 基因簇, 并以 Clinker 绘制基因簇图谱<sup>[33]</sup>。

### 1.3 基因敲除及过表达菌株的构建

分别对红曲菌 M7 的 BA 基因簇中的 *mr-Bys* 和 *mr-hdh* 进行敲除并对 *mr-hdh* 进行过表达。基

因敲除与过表达的步骤详见本实验室已建立的方法<sup>[34,30]</sup>。主要过程如下:

以潮霉素抗性基因(*hyg*)通过定点同源重组替代目的基因, 分别构建敲除菌株  $\Delta mr-Bys$  和  $\Delta mr-hdh$ 。首先, 将 *mr-Bys* 或 *mr-hdh* 基因的 2 个侧翼序列插入 *hyg* 的 5' 和 3' 端, 并通过 double-joint PCR 分别构建 *mr-Bys* 和 *mr-hdh* 的敲除盒 pM-*mr-Bys* 和 pM-*mr-hdh* (数据已提交到国家微生物科学数据中心 NMDC, 见 NMDCX0000154 中的图 S1)。以 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切 pM-*mr-Bys* 和双元载体 pCambia3300, 将敲除盒连接到质粒 pCambia3300 中构建 *mr-Bys* 的敲除载体 pC-*mr-Bys* (见 NMDCX0000154 中的图 S2), 以限制性内切酶验证其正确性(见 NMDCX0000154 中的图 S3)。同时, 以 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切 pM-*mr-hdh* 和 pCambia3300, 将敲除盒连接到质粒 pCambia3300 中构建 *mr-hdh* 的敲除载体 pC-*mr-hdh* (见 NMDCX0000154 中的图 S4), 以限制性内切酶验证其正确性(见 NMDCX0000154 中的图 S5)。随后, 将 *mr-Bys* 和 *mr-hdh* 敲除载体, 分别导入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 中, 并以农杆菌介导的转化方法 (*Agrobacterium*-mediated transformation method) 转移到红曲菌 M7 的细胞中<sup>[30]</sup>, 并在含有 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的 PDA 上筛选可能的基因敲除子  $\Delta mr-Bys$  和  $\Delta mr-hdh$ 。

以同样方法构建 *mr-hdh* 的过表达菌株。依次将 *mr-hdh* 的 5' 侧翼序列、*G418* 抗性基因、*trpC* 启动子与 *mr-hdh* 的 3' 侧翼序列(含 *mr-hdh* 目的基因)融合连接, 构建 *mr-hdh* 的过表达盒 pM-OE-*mr-hdh* (见 NMDCX0000154 中的图 S6), 并以 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切 pM-OE-*mr-hdh* 和 pCambia3300 (见 NMDCX0000154 中的图 S7), 将过表达盒导入 pCambia3300 中构建过表达

载体 pC-OE-*mr-hdh*, 通过限制性酶切验证其正确性(见 NMDCX0000154 中的图 S8), 然后将 *mr-hdh* 过表达载体导入根癌农杆菌 EHA105 中, 并转移到红曲菌 M7 中后, 在含有 G418 (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 PDA 平板上筛选可能的基因过表达子 M7::*PtpC-mr-hdh*。

以上实验采用的相关引物见表 S1 (NMDCX0000154)。

#### 1.4 基因敲除与过表达子的鉴定

以 1.3 中得到的可能基因敲除子与过表达子的基因组 DNA 为模板, 以相应引物(表 1)扩增 *mr-Bys*、*mr-hdh*、*hyg* 和 *G418*, 以 Southern 杂交验证基因敲除子与过表达子的正确性。如不能扩增出 *mr-Bys* 或 *mr-hdh* 的 DNA 片段但可扩增 *hyg* 的 DNA 片段, 则表明基因敲除成功, 得到基因敲除子  $\Delta\text{mr-Bys}$  或  $\Delta\text{mr-hdh}$ ; 如可同时扩增 *mr-hdh* 和 *G418* 的 DNA 片段, 则表明基因过表达成功, 得到基因过表达子 M7::*PtpC-mr-hdh*。

#### 1.5 菌株形态学观察

将出发菌株红曲菌 M7 及其基因敲除子 ( $\Delta\text{mr-Bys}$  或  $\Delta\text{mr-hdh}$ ) 和过表达子 (M7::*PtpC-mr-hdh*) 分别接种于 PDA 斜面上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 10 d 后, 以适量无菌水洗涤并收集分生孢子, 调整孢子浓度为  $1 \times 10^5$  个/ $\text{mL}$ <sup>[35]</sup>。分别将 1  $\mu\text{L}$  孢子液点接于 PDA、CYA、G25N 和 MA 培养基平板的中心, 28  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 11 d 后, 观察菌落颜色、大小以

及气生菌丝生长情况等。同时, 将无菌盖玻片以 45 $^{\circ}$  插片于采用涂布法接种了 M7 及其基因敲除子和过表达子孢子后的 PDA、CYA、G25N 和 MA 平板培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 11 d 后, 观察闭囊壳与分生孢子等显微形态。

### 1.6 丝衣霉酸分析

#### 1.6.1 丝衣霉酸提取

按 4% 的接种量, 将孢子浓度为  $1 \times 10^5$  个/ $\text{mL}$ <sup>[35]</sup> 的红曲菌 M7 及其基因敲除子和过表达子孢子液分别接种于米饭培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 11 d, 每隔 2 d 取样, 40  $^{\circ}\text{C}$  干燥至恒重后, 粉碎并过 40 目筛得红曲米粉。将 3 g 红曲米粉置于 20 mL 石油醚(30–60  $^{\circ}\text{C}$ ) 中, 充分混合后, 过滤, 滤液于 40  $^{\circ}\text{C}$  真空蒸发至干, 以 2 mL 乙腈溶解浓缩物, 备用。

#### 1.6.2 丝衣霉酸检测

以超高效液相色谱(ultra-performance liquid chromatography, UPLC, Waters ACQUITY)检测 BA 的含量, 具体参数为:  $\text{C}_{18}$  柱(Waters, 2.1 mm $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 2  $\mu\text{L}$ , 流速 0.3 mL/min, 梯度洗脱。梯度洗脱程序为: 先将乙腈:超纯水:0.1%甲酸水溶液按 35:55:10 的比例保持 3 min, 然后按 75:15:10 比例保持 15 min, 再按 90:0:10 比例保持 5 min, 最后, 按 35:55:10 比例平衡色谱柱 3 min。采用二极管阵列检测器。

表 1 Southern 杂交验证中使用的引物

Table 1 Primers used in Southern hybridization validation

Primer	Sequence (5'→3')	Description
mr-Bys-F	GCTCAGTGGTGTGGAATGGG	For amplification of the partial <i>mr-Bys</i> gene which was used as probe 2 to calculate the validity of the gene knockout
mr-Bys-R	ACGCTGGATGGGCTGTTGAC	
mr-Bys-UP	CCGTTTCAGATTGCCATTGTCG	For amplification of the partial <i>mr-Bys</i> gene which was used as probe 8 to calculate the validity of the gene over-expression
mr-Bys-DO	CCAGTATGTGTTAGTGTGATTC	
mr-hdh-F	TCAGTTCCACCCTGTCTA	For amplification of the partial <i>mr-hdh</i> gene which was used as probe 3 to calculate the validity of the gene knockout
mr-hdh-R	CTCTTGCTCTTGTTGCTC	
mr-hdh-UP	CAAGAGTCCTTGCTGGAT	For amplification of the partial <i>mr-hdh</i> gene which was used as probe 5 to calculate the validity of the gene over-expression
mr-hdh-DO	ACACCGTTAATCACTCCC	

### 1.6.3 丝衣霉酸的分离及鉴定

采用半制备高效液相色谱通过 Inertsil ODS-3 色谱柱(10 mm×250 mm×5 μm, 岛津)分离 1.6.1 的 BA 提取物,柱温 30 °C,流速为 3 mL/min,流动相为 80:20 的乙腈:0.1%甲酸水溶液,检测波长为 249 nm。

采用 Acquity TQD 串联四重质谱仪(Waters),以电喷雾电离源在负离子模式下分析 BA 的质量分布图。

### 1.7 转录水平分析

分别将红色红曲菌 M7、M7::PtrpC-mr-hdh、Δmr-hdh 和 Δmr-Bys 的孢子液(10<sup>5</sup>个/mL)涂布接种于铺有玻璃纸的 PDA 平板上,28 °C 静置培养,于第 3 天和第 7 天时刮取菌丝,参照全式金高纯度 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA。

按照 Hiscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转试剂盒的说明书配制体系合成 cDNA。

对红曲菌 M7、M7::PtrpC-mr-hdh、Δmr-hdh 和 Δmr-Bys 中的 BA 基因簇内全部基因进行转录水平分析,以 *beta-actin* 基因为内参,利用 AceQ

qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)反应。所用引物如表 2 所示。

其中,目的基因与内参基因相对表达水平根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算<sup>[36]</sup>。

$A=C_t$  (目的基因,待测样本)– $C_t$  (内参基因,待测样本)

$B=C_t$  (目的基因,对照样本)– $C_t$  (内参基因,对照样本)

相对表达水平= $2^{-(A-B)}$

## 2 结果与分析

### 2.1 丝衣霉酸基因簇的生物信息学分析

以纯黄丝衣霉(*B. fulva*)丝衣霉酸(BA)聚酮化合酶 Bfpks1<sup>[26]</sup>的氨基酸序列为参考,采用 BLASTp 对 NCBI 的蛋白质数据库进行比对,共发现了相似度大于 40%的 Bfpks1 的同源蛋白 74 个(见 NMDCX0000154 中的表 S2)。以 MEGA 7.0 构建了 Bfpks1 及其同源蛋白的系统发育树(图 1)。

表 2 RT-qPCR 所用引物

Table 2 Primers used in real-time quantitative PCR

Gene	Upstream primer (5'→3')	Downstream primer (5'→3')
<i>beta-actin</i>	TCTGGCACCACACATTCTACAA	CGAAGACGATCTGGGTCATCT
<i>mr-nuc</i>	GGATCTACTCACCTCGCCTC	GAGGGCGTGAATTCATCCAC
<i>mr-oxo</i>	CTCTCCTCGAAATTGCAGCC	CATGAACTCGAAGCGACAGG
<i>mr-tf2</i>	TCTCCGATCCACATCTCAGC	AGATCTCTTCGCCACTCTG
<i>mr-hdh</i>	AACCTCCGGATCAACACCAT	CGAGACGGGTGAGACTATCC
<i>mr-tf1</i>	GACTATCTCAACCCGGCTGA	CGTAACAGGCAAGAACACCC
<i>mr-Bys</i>	TTTGGAACCGTCGACAACAC	TCTGGTGGCCTGCATTAAGA
<i>mr-hd</i>	CTTCGGGCTTCTTGTTTAC	CAGCGCCAGAGAAAACCTTGT
<i>mr-cs</i>	ACTGTCCTGTTTCCGACGAT	TTCCCGTCTTCACTTCTCCTCC
<i>mr-amp</i>	AGGGTTTCAAGACGGTTCGAT	GCAATCCCAGTACGACGTTT
<i>mr-md</i>	TCCCTCGGATAACATCGGTG	CCCGAATTCAATGGAACGCAT
<i>mr-pho</i>	ACACTGACCGAATAAACGCG	GGGATTCGTATCGGGTTGC
<i>mr-pt</i>	GAACATGAGGTCCCTGGTGA	CTTCGTTTCATGTGCCGGTAG
<i>mr-mfs</i>	CGGTCTGATCACGTTCTTG	TGTACTTCCCGGACATGACC
<i>mr-hy</i>	GCATAATCGGCCCTTTCTCG	GTACGTGCCGGTGTAGTAGA

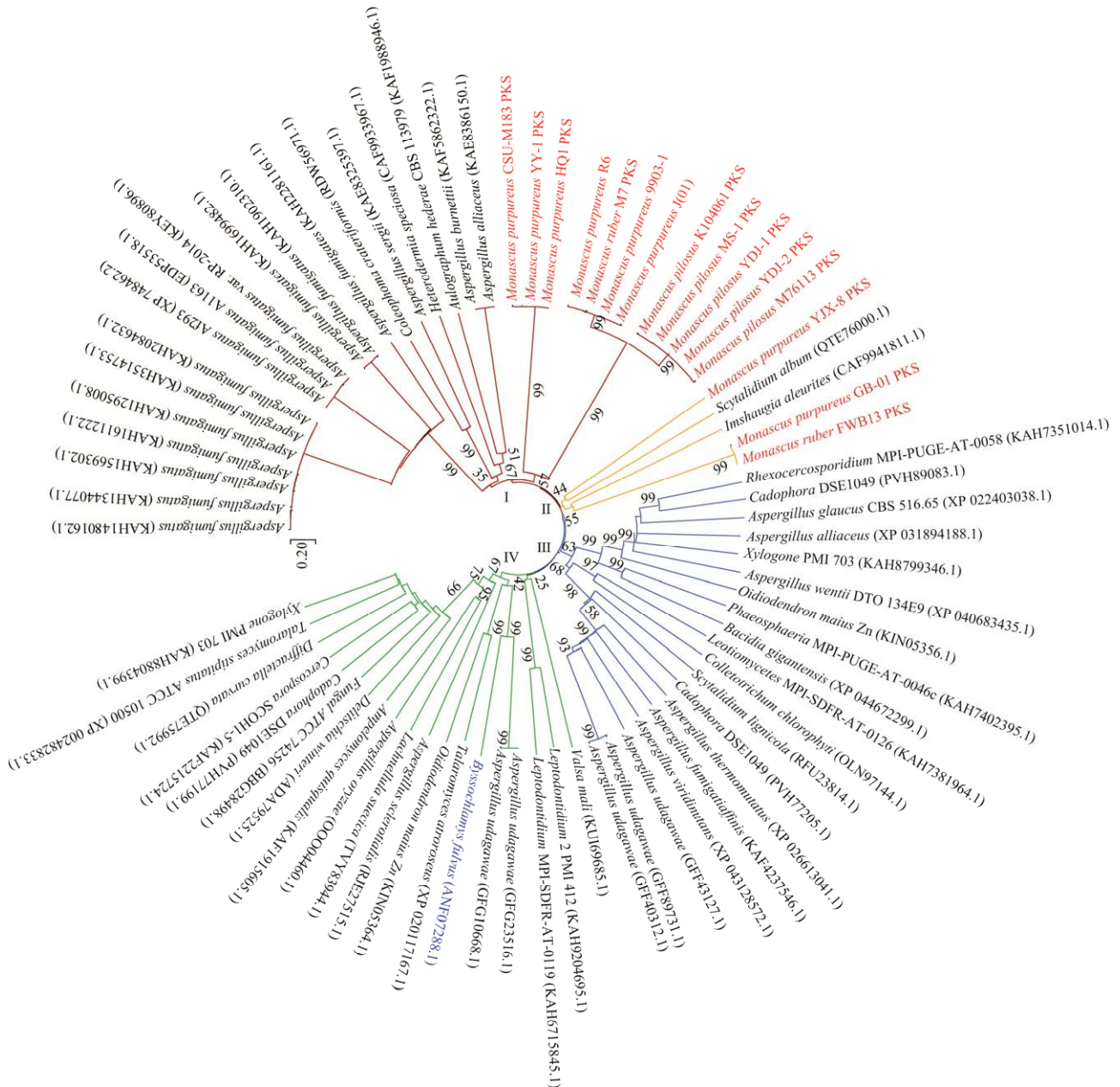


图 1 丝衣霉聚酮合酶及其同源蛋白的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of polyketide synthases of byssochlamic acid and its homologous proteins.

由图 1 可知, BA 的 PKS 同源蛋白广泛存在于真菌的基因组中, 它们聚为 4 个簇(I-IV)。其中, 15 株红曲菌(红色字体部分)中的紫色红曲菌(*M. purpureus*) GB-01、YJX-8 和红色红曲菌 FWB13 中 BA 的 PKS 同源蛋白, 与柱顶孢霉(*Scytalidium album*)及小梅衣属(*Imshaugia aleurites*) BA 的 PKS 同源蛋白聚为一个簇(II), 而其他 12 株红曲菌的

BA 的 PKS 同源蛋白与曲霉属(*Aspergillus*)等的 BA 聚酮合酶聚为另一个簇(I)。这表明, 不同红曲菌株中 BA 的 PKS 同源蛋白可能来源不同。

基于红曲菌 BA 的 PKS 同源蛋白, 以 antiSMASH 对 15 株红曲菌基因组中 BA 基因簇进行预测, 以 Clinker 比对 BA 基因簇中各基因编码蛋白质的同源性, 并绘制比对图(图 2)。

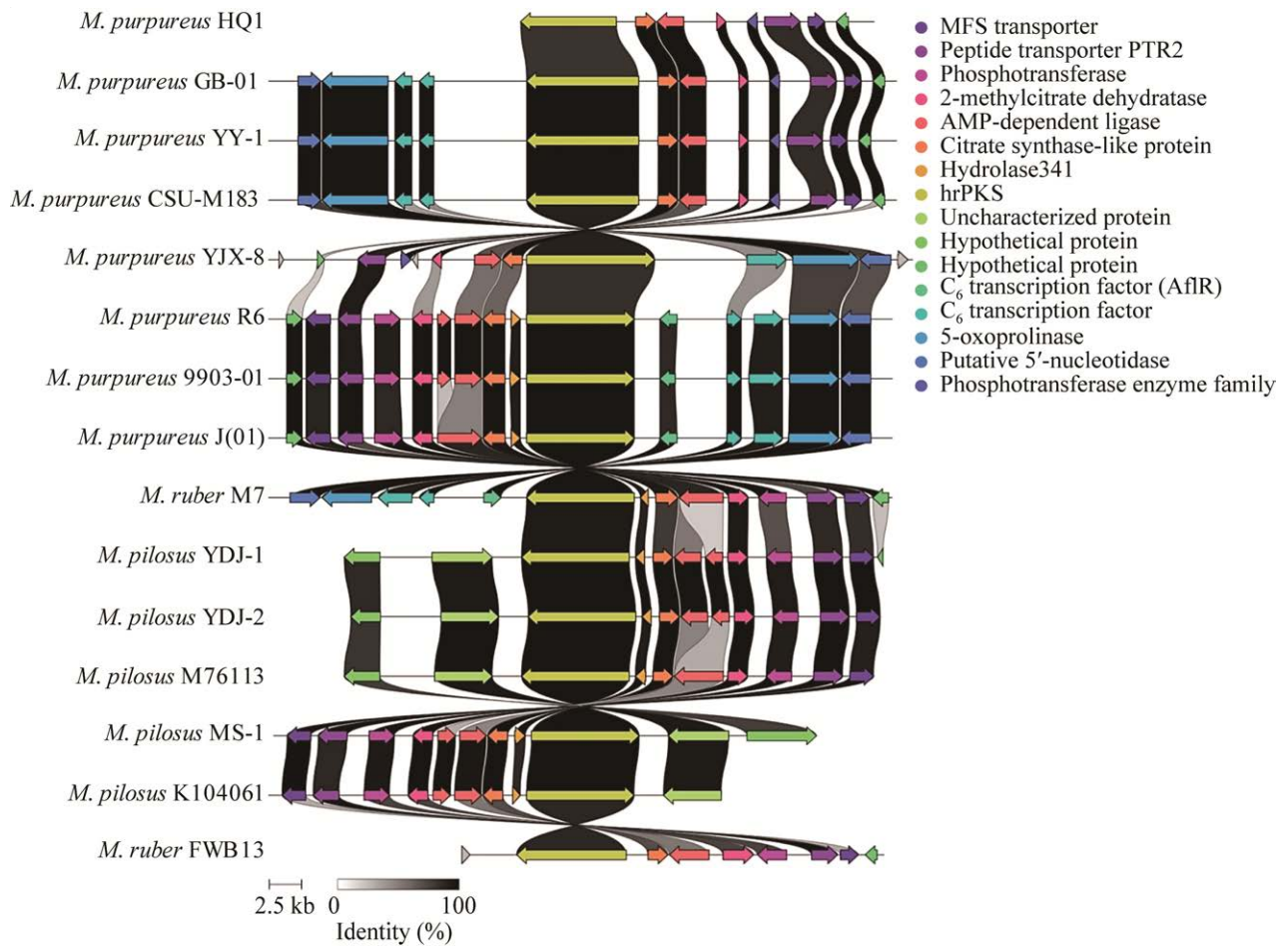


图2 红曲菌丝衣霉酸基因簇中各基因编码蛋白的同源性比对

Figure 2 Homology alignment of the proteins encoded by each gene in the *Monascus* BA gene cluster.

从图2可知,不同红曲菌中BA基因簇的基因数量不一,最多的达15个基因,例如紫色红曲菌9903-01和R6;少的则仅为8个基因,如紫色红曲菌HQ1。在红曲菌BA基因簇中相同基因的同源性也存在差异(详情见NMDCX0000154中的表S3)。另外,在所有红曲菌BA基因簇中均未发现产生BA所必需的二聚化相关基因,即与酮类固醇异构酶(ketosteroid isomerase, KI)和磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP)类似的基因<sup>[26]</sup>(见NMDCX0000154中的表S3)。这预示着红曲菌必须由BA基因簇之

外的KI和PEBP同源基因参与,才可能合成BA。

## 2.2 基因敲除及过表达子的验证

以农杆菌介导的基因重源重组方法,共获得*mr-Bys*的可能敲除子3株,*mr-hdh*敲除与过表达子各2株。以表1中相关引物对上述可能的*mr-Bys*敲除菌株和*mr-hdh*敲除与过表达子,进行Southern杂交验证,分别获得*mr-Bys*的敲除子( $\Delta mr-Bys$ )3株,*mr-hdh*敲除( $\Delta mr-hdh$ )与过表达子(M7::*P<sub>trpC</sub>-mr-hdh*)各2株。其中,1株*mr-Bys*的敲除子、1株*mr-hdh*敲除子与1株*mr-hdh*过表达子的Southern杂交结果如图3所示。

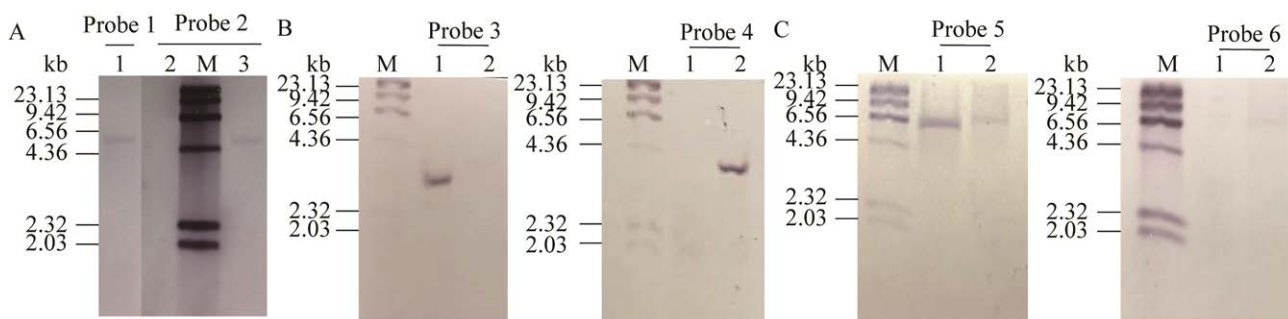


图 3 基因敲除及过表达菌株的 Southern blotting 验证

Figure 3 Southern blotting validation of gene knockout and over-expression strains. M: Marker; A: Identification of *mr-Bys* knockout strains by Southern blotting. Lane 1: Presence of *hyg* in  $\Delta mr-Bys$  strain; Lane 2: Absence of *mr-Bys* in the mutant; Lane 3: Presence of *mr-Bys* in *M. ruber* M7; Probe 1: Digoxin labeled *hyg* gene; Probe 2: Digoxin labeled *mr-Bys* gene. B: Identification of *mr-hdh* knockout strain by Southern blotting. Lane 1 and 2 represent *M. ruber* M7 and  $\Delta mr-hdh$  strain, respectively; Probe 3: Digoxin labeled *mr-hdh* gene; Probe 4: Digoxin labeled *hyg* gene. C: Identification of *mr-hdh* over-expression strain by Southern blotting. Lane 1 and 2 represent *M. ruber* M7 and M7::*PtpC-mr-hdh* strain, respectively; Probe 5: Digoxin labeled *mr-hdh* gene; Probe 6: Digoxin labeled *G418* gene.

从图 3 可以看出, 基因敲除子(图 3A、3B)中没有目的基因(*mr-Bys* 和 *mr-hdh*)条带, 但存在抗性基因 *hyg* 条带, 而过表达子(图 3C)中显示出目的基因(*mr-hdh*), 且存在抗性基因 *G418* 条带。这些结果表明, *mr-Bys* 敲除子和 *mr-hdh* 敲除与过表达子构建成功。

### 2.3 菌落与显微形态观察

分析比较了出发菌株 M7、M7::*PtpC-mr-hdh*、 $\Delta mr-hdh$  和  $\Delta mr-Bys$  在 4 种红曲菌常用培养基上<sup>[30]</sup>培养 11 d 后的菌落和显微形态(图 4)。

从图 4A 可以看出, 培养 11 d 后, M7 的菌落与其基因敲除和过表达子的均有一定差别。在 PDA 培养基上, M7::*PtpC-mr-hdh* 比 M7 长得更不规则一些, 气生菌丝也多一些; 在 CYA 培养基上, M7::*PtpC-mr-hdh* 的白色气生菌丝比 M7 要多, 菌落中心颜色更深; 在 G25N 及 MA 培养基上, 两者差别不大。 $\Delta mr-hdh$  与 M7 相比, 在所有培养基上的菌落整体上偏小, 在 G25N 培养基上尤其明显, 说明其可能对高渗透压耐受性更差。 $\Delta mr-Bys$  与 M7 相比, 在所用培养基上, 菌落直径比 M7 的略小且颜色偏白, 其气生菌丝比

M7 的偏多。

而从图 4B 可以看出, 在 PDA 和 MA 上所有菌株都可产生闭囊壳, 闭囊壳从大到小依次排列为: M7::*PtpC-mr-hdh*、红曲菌 M7、 $\Delta mr-Bys$  和  $\Delta mr-hdh$ , 且 M7 在 PDA 和 MA 上的闭囊壳数量明显多于其他 3 株菌。在 CYA 以及 G25N 上 4 个菌株都能产生分生孢子, 其中,  $\Delta mr-hdh$  产生的分生孢子数量最少。

### 2.4 丝衣霉酸分析

将红曲菌 M7、M7::*PtpC-mr-hdh*、 $\Delta mr-hdh$  和  $\Delta mr-Bys$  的孢子液接种至米饭培养基中, 28 °C 培养 11 d 后, 以 UPLC 分析 BA 及中间体含量, 结果如图 5 所示。

由图 5A 可知, 在 315 nm 下, 除  $\Delta mr-Bys$  外, 其他 3 株菌株的红曲米, 在 6.704 min 处均观测到 BA 前体物 C<sub>9</sub>-马来酸酐单体的色谱峰<sup>[26]</sup>;  $\Delta mr-hdh$ 、红曲菌 M7 和 M7::*PtpC-mr-hdh* 的峰面积分别为 269.54、445.82 和 560.89 AU/mg, 表明敲除 *mr-hdh* 可抑制 BA 前体物的产生, 而过表达该基因可促进 BA 前体物的产生。



由图 5B 可知, 除  $\Delta mr-Bys$  外, 其他 3 株红曲菌的红曲米中, 在 13.167 min 处均观测到 BA 色谱峰<sup>[21,26]</sup>;  $\Delta mr-hdh$ 、红曲菌 M7 和 M7::*PtpC-mr-hdh* 的 BA 峰面积分别为 8 664.8、

9 573.58 和 11 569.88 AU/mg, 表明敲除 *mr-hdh* 可抑制 BA 产生, 而过表达该基因可促进 BA 产生。以 UPLC-MS/MS 分析 BA 的质谱(mass spectrometry, MS) (图 6)与文献[26]报道一致。

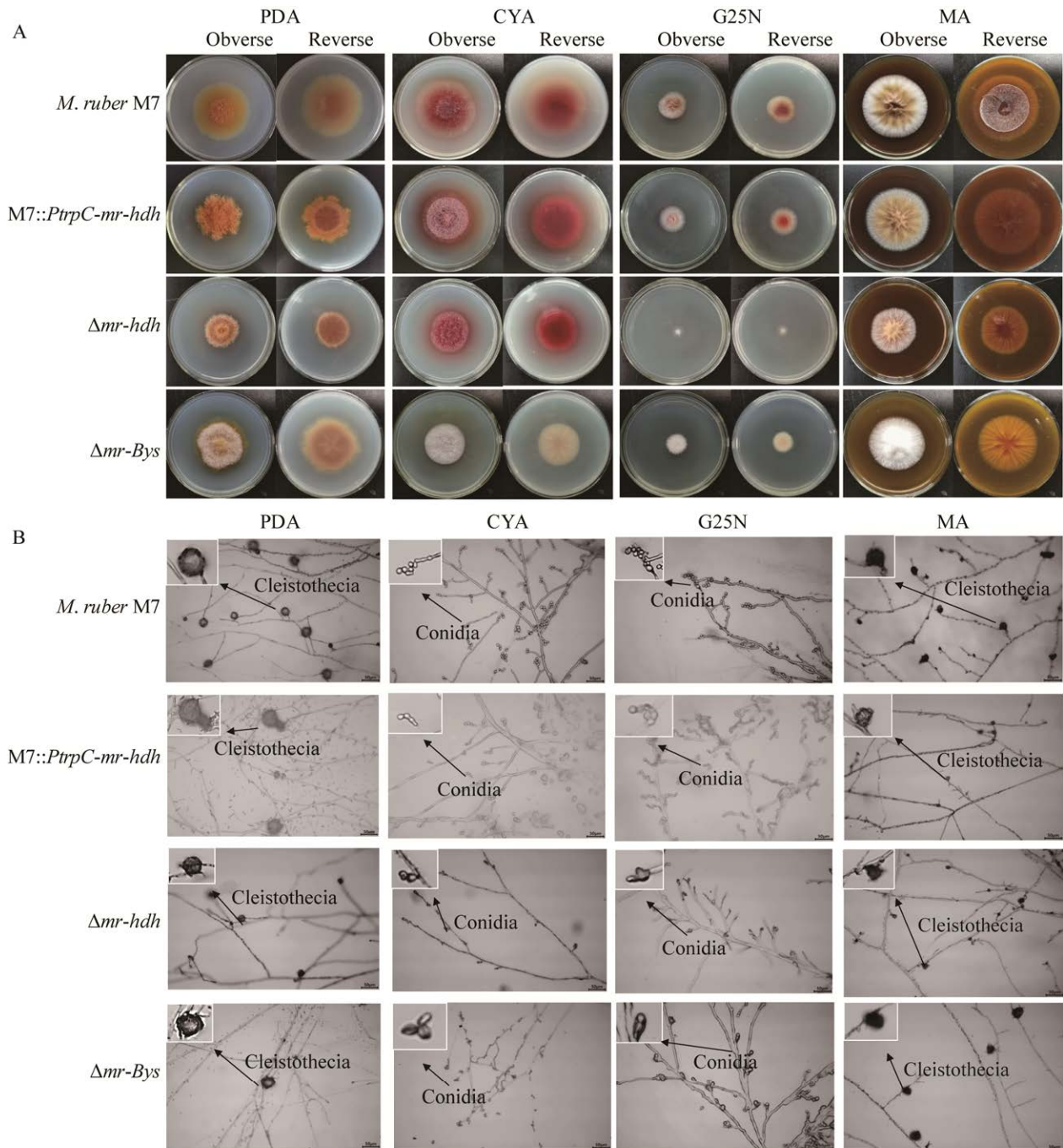


图 4 红曲菌 M7、M7::*PtpC-mr-hdh*、 $\Delta mr-hdh$  和  $\Delta mr-Bys$  在不同培养基上的菌落与显微形态观察  
 Figure 4 Colonial and microscopic morphologies observation of *Monascus ruber* M7, M7::*PtpC-mr-hdh*,  $\Delta mr-hdh$  and  $\Delta mr-Bys$  on different media.

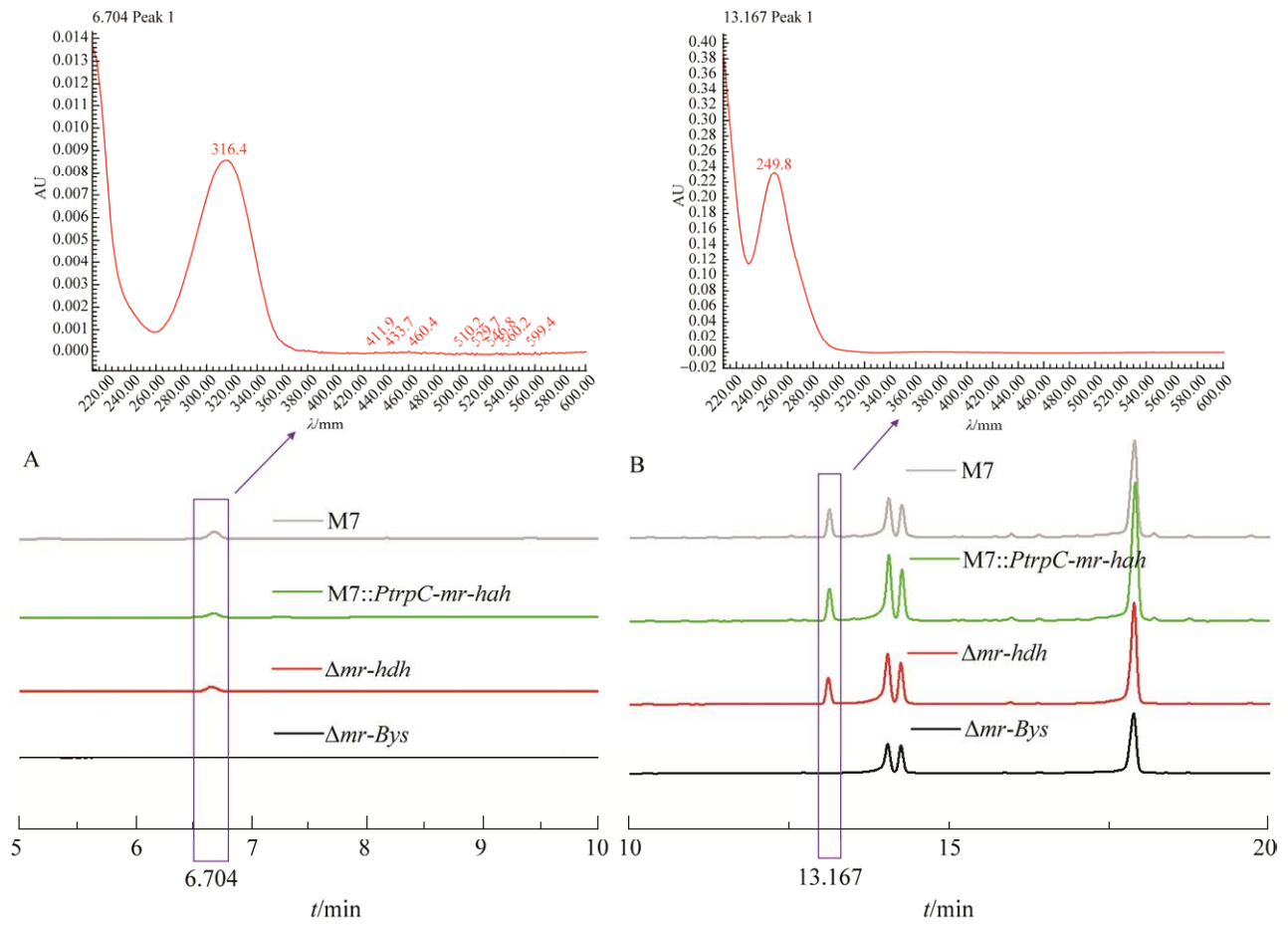


图 5 M7、M7::PtrpC-mr-hdh、Δmr-hdh 和 Δmr-Bys 与红曲米的 UPLC 分析

Figure 5 UPLC analysis of Hongqu of M7, M7::PtrpC-mr-hdh, Δmr-hdh and Δmr-Bys. A: 315 nm. B: 249 nm.

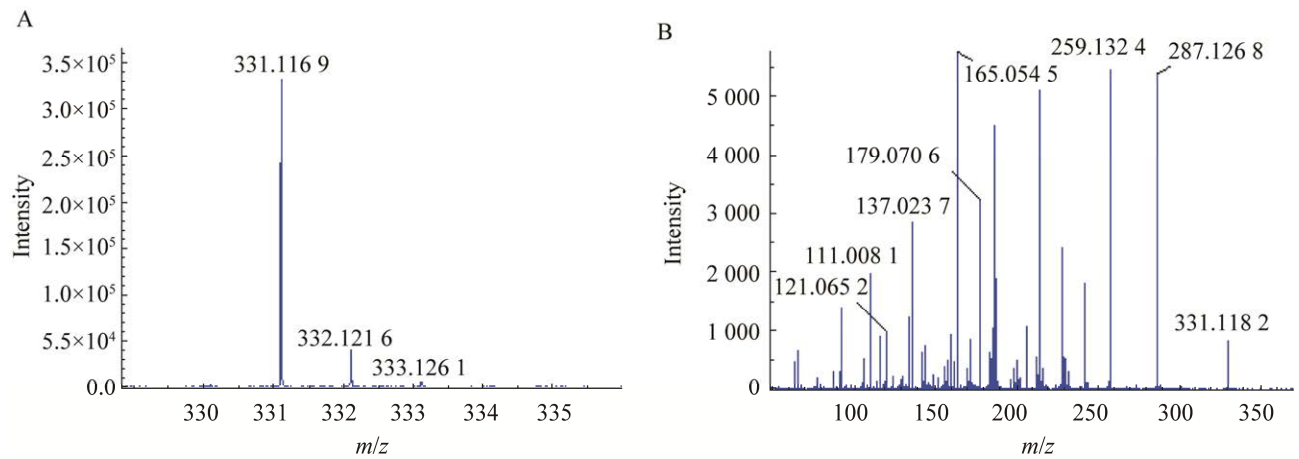


图 6 丝衣霉酸的 UPLC-MS/MS 分析

Figure 6 UPLC-MS/MS detection of byssochlamic acid. A: Primary mass spectrometry. B: Secondary mass spectrometry.

## 2.5 红曲菌丝衣霉酸基因簇中相关基因转录水平的分析

采用 RT-qPCR 检测了红曲菌 M7 及其基因过表达与敲除子(M7::*P<sub>trpC</sub>-mr-hdh*、 $\Delta$ *mr-hdh* 和  $\Delta$ *mr-Bys*)中 BA 基因簇内各基因的转录水平, 以 M7 中 BA 相关基因的转录水平为 1, 以基因的相对表达量为纵坐标, 分析了红曲菌 M7 及其基因敲除与过表达子中 BA 基因簇内相关基因在不同培养时间(3 d 和 7 d)的相对转录水平(图 7)。

由图 7 可以看出, 在  $\Delta$ *mr-Bys* 中没有检测到 *mr-Bys* 的转录,  $\Delta$ *mr-hdh* 中没有检测到 *mr-hdh* 的转录, 这再次证明, 相关基因敲除成功。对相同培养天数(3 d 或 7 d)的 4 种菌株, 在

M7::*P<sub>trpC</sub>-mr-hdh* 的 BA 基因簇中, *mr-hdh* 以及簇内绝大部分基因的转录水平都比 M7 的高, 这既说明 *mr-hdh* 基因过表达成功。这与过表达 *mr-hdh* 可促进 BA 及其前体物的产生结果一致(图 5)。对于  $\Delta$ *mr-Bys*, 培养至第 3 天时, 除 *mr-md* 外, BA 基因簇其他基因的转录水平都略高于 M7 的(图 7A), 但培养至第 7 天时, 除 *mr-tf1* 外, 其他基因的转录水平都低于 M7, 这与敲除 *mr-Bys* 后 BA 及其前体物消失的结果一致(图 5)。

这些分析结果表明, *mr-Bys* 作为产生 BA 的核心(PKS)基因, 对 BA 及其中间产物的产生起着决定性作用, 而 *mr-hdh* 对 BA 及其中间产物的产生具有一定正调控作用。

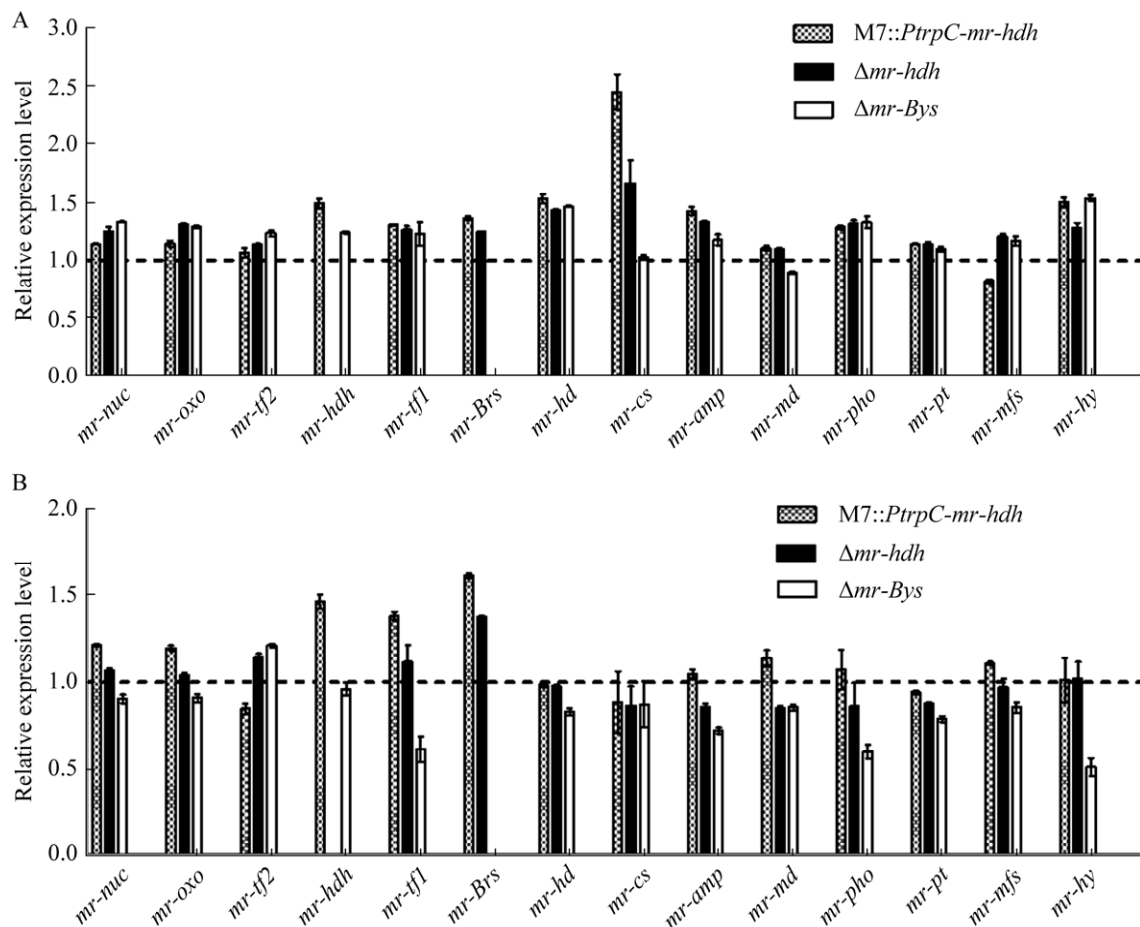


图 7 丝衣霉酸基因簇内基因转录水平的检测

Figure 7 Detection of gene transcription levels in byssochlamic acid gene cluster. A: 3 d. B: 7 d.

### 3 讨论与结论

由图 2 可知,在红色红曲菌 M7 等红曲菌的 BA 基因簇中均没有发现合成 BA 所必需的二聚化相关酮类固醇异构酶(KI)和磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)的类似基因<sup>[26]</sup>,但是 M7 却可产生 BA(图 5 和图 6)。为此,以来自纯黄丝衣霉 BA 基因簇中的 KI (*bfl6* 和 *bfl10*)和 PEBP (*bfl5* 和 *bfl9*)<sup>[26]</sup>为参考,对 M7 的全基因组进行了 BLAST,并在其基因组中发现 1 个 KI 的同源基因 *A5602*,2 个 PEBP 的同源基因 *A5601* 和 *A5605*(表 3)。

丝状真菌中特定 SMs 合成相关的基因存在于基因簇之外是比较常见的现象<sup>[37]</sup>。例如,在拟枝孢镰刀菌(*Fusarium sporotrichioides*)和禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)基因组中,参与合成单端孢菌素(trichothecene)的基因就存在于基因簇外<sup>[38-39]</sup>。因此,我们认为存在于红色红曲菌 M7

的 BA 基因簇之外的 KI 和 PEBP 同源基因(表 3)可能参与了 BA 合成。目前我们正通过基因敲除和过表达方法进一步验证它们的功能。

在本研究中,我们曾尝试过回补和表达红色红曲菌 M7 的 BA 基因簇中的 PKS 基因 *mr-Bys*,但回补一直没有成功,而过表达似乎构建“成功”了(图 8A)。因为以 probe 7 探针(表 1)进行杂交,发现在红曲菌 M7 中无杂交带(泳道 1),而过表达子有一条杂交带(泳道 2);以 probe 8 探针(表 1)进行杂交,在红曲菌 M7 和过表达

表 3 红色红曲菌 M7 基因组中与 KI 及 PEBP 同源的基因

Table 3 Genes homologous to KI and PEBP in the genome of *Monascus ruber* M7

Matching gene	Homologous gene	Query coverage (%)	Identity (%)
<i>A5601</i>	<i>bfl5</i>	72.00	44.97
<i>A5602</i>	<i>bfl6</i>	74.00	52.49
<i>A5605</i>	<i>bfl9</i>	99.00	54.03

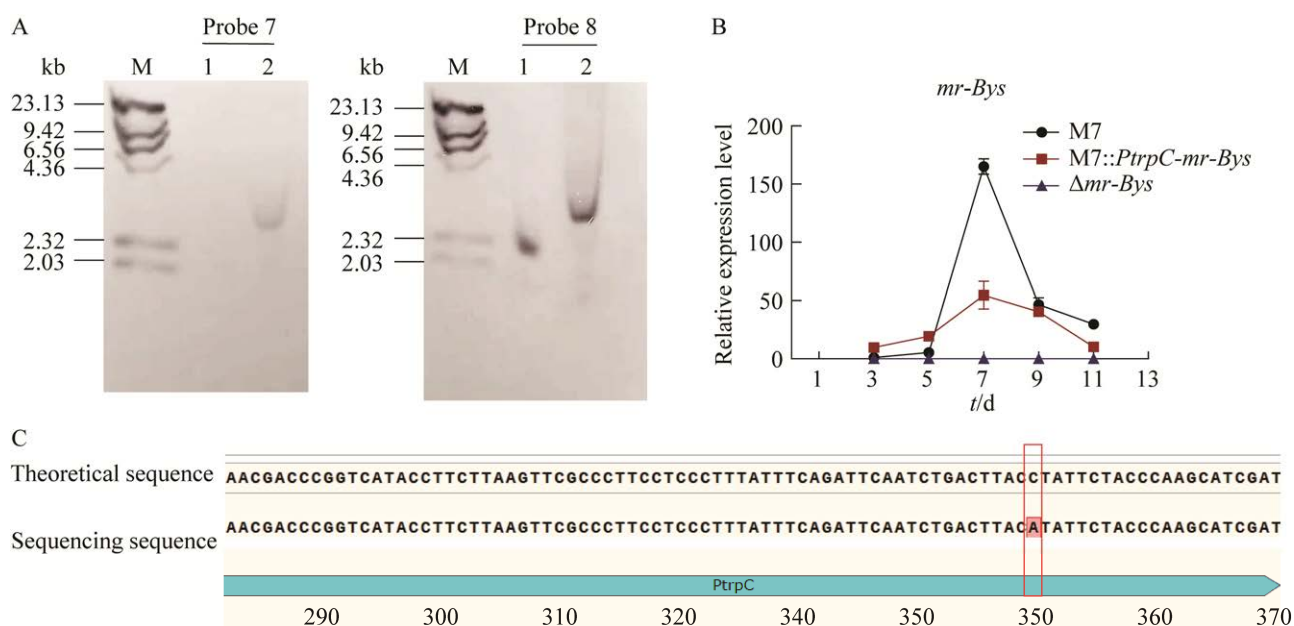


图 8 *mr-Bys* 过表达菌株的验证及分析

Figure 8 Validation and analysis of *mr-Bys* over-expression strains. A: Identification of *mr-Bys* over-expression strain by Southern blotting. Lane 1 and 2 represent *M. ruber* M7 and M7::PtrpC-*mr-Bys* strain, respectively; Probe 7: Digoxin labeled *G418* gene; Probe 8: Digoxin labeled *mr-Bys* gene; M: Marker. B: Transcriptional level analysis of *mr-Bys* in different days. C: Schematic diagram of promoter mutation sites.

子中也均出现一条杂交带, 过表达子的杂交带的分子量大小高于 M7 的, 与预期相符合, 且 *mr-Bys* 为单拷贝(图 8A)。但是, 在“*mr-Bys* 过表达子”的发酵产物中并没有检测到 BA, 且与 M7 相比较, “过表达子”中 *mr-Bys* 的转录水平在第 5 天以后不仅没有升高, 反而降低了(图 8B)。进一步分析发现, 可能是由于“过表达子”中的强启动子(*P<sub>trpC</sub>*)的第 350 个碱基由 C 变成 A 所致(图 8C)。目前我们正更换强启动子基因, 继续构建 *mr-Bys* 基因的过表达子, 以提高 BA 的生产能力。

本研究首次报道了红色红曲菌 M7 可产生 BA, 并发现了其基因簇, 研究结果丰富了红曲菌次级代谢产物的种类, 也为以红曲菌为菌种开发新产品奠定了基础。未来需进一步研究 BA 基因簇内其他基因, 特别是存在于基因簇外的 *KI* 及 *PEBP* 同源基因(表 3)的功能。

## 参考文献

- [1] FENG YL, YU X. Perspectives on functional red mold rice: functional ingredients, production, and application[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 606959.
- [2] LEI M, LIU J, FANG Y, SHAO YC, LI L, YU JH, CHEN FS. Effects of different G-protein  $\alpha$ -subunits on growth, development and secondary metabolism of *Monascus ruber* M7[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1555.
- [3] DARWESH OM, MATTER IA, ALMOALLIM HS, ALHARBI SA, OH YK. Isolation and optimization of *Monascus ruber* OMNRC45 for red pigment production and evaluation of the pigment as a food colorant[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(24): 8867.
- [4] CHEN WP, FENG YL, MOLNÁR I, CHEN FS. Nature and nurture: confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies *Monascus* azaphilone pigments[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(4): 561-572.
- [5] 谢娜娜, 张乙平, 陈福生. 红色红曲菌 M7 中色素聚酮合酶基因敲除突变体的鉴定[J]. *微生物学报*, 2015, 55(7): 863-872.  
XIE NN, ZHANG YP, CHEN FS. Identification of a pigment-polyketide synthase gene deleted mutant of *Monascus ruber* M7[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(7): 863-872 (in Chinese).
- [6] DAI WH, SHAO YC, CHEN FS. Production of monacolin K in *Monascus pilosus*: comparison between industrial strains and analysis of its gene clusters[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 747.
- [7] ZHANG YR, CHEN ZT, WEN QY, XIONG ZX, CAO XH, ZHENG ZH, ZHANG YX, HUANG ZW. An overview on the biosynthesis and metabolic regulation of monacolin K/lovastatin[J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 5738-5748.
- [8] HOU YQ, LIU J, SHAO YC, PENG XT, ZHANG DW, HU LF, CHEN FS, ZHOU YX. Evaluation of the underestimation of citrinin content in Hongqu using hydrolysis treatments and UPLC-FLD[J]. *Food Control*, 2021, 130: 108245.
- [9] OUYANG WB, LIU X, WANG YL, HUANG ZB, LI XJ. Addition of genistein to the fermentation process reduces citrinin production by *Monascus* via changes at the transcription level[J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128410.
- [10] LI YP, WANG N, JIAO XX, TU Z, HE QH, FU JH. The *ctnF* gene is involved in citrinin and pigment synthesis in *Monascus aurantiacus*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2020, 60(10): 873-881.
- [11] 丁晓莉, 陈万平, 陈福生. 红色红曲菌 M7 核型分析与桔霉素、色素基因簇的染色体定位[J]. *菌物学报*, 2016, 35(3): 309-316.  
DING XL, CHEN WP, CHEN FS. Karyotype analysis and chromosome localization of pigment and citrinin biosynthesis gene clusters of *Monascus ruber* M7[J]. *Mycosystema*, 2016, 35(3): 309-316 (in Chinese).
- [12] BLANC PJ, LAUSSAC JP, LE BARS J, LE BARS P, LORET MO, PAREILLEUX A, PROMÉ D, PROMÉ JC, SANTERRE AL, GOMA G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 27(2/3): 201-213.

- [13] YANG XL, XIANG LB, ZHANG C, CAO YP, WANG CT. Promotion of monacolin K production in *Monascus* extractive fermentation: the variation in fungal morphology and in the expression levels of biosynthetic gene clusters[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(13): 5652-5659.
- [14] SHI J, ZHAO W, LU J, WANG WJ, YU X, FENG YL. Insight into *Monascus* pigments production promoted by glycerol based on physiological and transcriptome analyses[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 102: 141-149.
- [15] SHI J, QIN XL, ZHAO YR, SUN XX, YU X, FENG YL. Strategies to enhance the production efficiency of *Monascus* pigments and control citrinin contamination[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 117: 19-29.
- [16] 李培睿, 张晓伟, 曹依曼. 红曲霉桔霉素的检测和控制方法研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(3): 100-105.
- LI PR, ZHANG XW, CAO YM. Progress on detection and control of *Monascus* citrinin[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(3): 100-105 (in Chinese).
- [17] ZHANG HY, AHIMA J, YANG QY, ZHAO LN, ZHANG XY, ZHENG XF. A review on citrinin: its occurrence, risk implications, analytical techniques, biosynthesis, physiochemical properties and control[J]. *Food Research International: Ottawa, Ont*, 2021, 141: 110075.
- [18] CHEN WP, CHEN RF, LIU QP, HE Y, HE K, DING XL, KANG LJ, GUO XX, XIE NN, ZHOU YX, LU YY, COX RJ, MOLNÁR I, LI M, SHAO YC, CHEN FS. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(7): 4917-4925.
- [19] HE Y, COX RJ. The molecular steps of citrinin biosynthesis in fungi[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(3): 2119-2127.
- [20] LI YP, XU Y, HUANG ZB. Isolation and characterization of the citrinin biosynthetic gene cluster from *Monascus aurantiacus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(1): 131-136.
- [21] VIRK MS. Characteristics of gene knockout mutants of three polyketide synthase genes from *Monascus ruber* M7[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019.
- [22] YIN S, FRIEDRICH S, HRUPINS V, COX RJ. *In vitro* studies of maleidride-forming enzymes[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(25): 14922-14931.
- [23] RAISTRICK H, SMITH G. Studies in the biochemistry of micro-organisms: the metabolic products of *Byssoschlamys fulva* Olliver and Smith[J]. *The Biochemical Journal*, 1933, 27(6): 1814-1819.
- [24] SUTHERLAND JK. *The Nonadrides*[M]. Berlin: Springer, 1967.
- [25] WHITE JD, KIM J, DRAPELA NE. Enantiospecific synthesis of (+)-byssochlamic acid, a nonadride from the ascomycete *Byssoschlamys fulva*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(36): 8665-8671.
- [26] WILLIAMS K, SZWALBE AJ, MULHOLLAND NP, VINCENT JL, BAILEY AM, WILLIS CL, SIMPSON TJ, COX RJ. Heterologous production of fungal maleidrides reveals the cryptic cyclization involved in their biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2016, 55(23): 6784-6788.
- [27] COX RJ. Curiouser and curiouser: progress in understanding the programming of iterative highly-reducing polyketide synthases[J]. *Natural Product Reports*, 2022. DOI: 10.1039/D2NP00007E.
- [28] de MATTOS-SHIPLEY KMJ, SPENCER CE, GRECO C, HEARD DM, O'FLYNN de, DAO TT, SONG ZS, MULHOLLAND NP, VINCENT JL, SIMPSON TJ, COX RJ, BAILEY AM, WILLIS CL. Uncovering biosynthetic relationships between antifungal nonadrides and octadrides[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(42): 11570-11578.
- [29] CHEN FS, HU XQ. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(3): 331-337.
- [30] SHAO YC, DING YD, ZHAO Y, YANG S, XIE BJ, CHEN FS. Characteristic analysis of transformants in T-DNA mutation library of *Monascus ruber*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(6): 989-995.
- [31] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0

- for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [32] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN AM, CHARLOP-POWERS Z, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [33] GILCHRIST CLM, CHOOI YH. Clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures[J]. *Bioinformatics*, 2021, 37(16): 2473-2475.
- [34] LI L, HE L, LAI Y, SHAO YC, CHEN FS. Cloning and functional analysis of the *Gβ* gene *Mgb1* and the *Gγ* gene *Mgg1* in *Monascus ruber*[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(1): 35-43.
- [35] LIU QP, XIE NN, HE Y, WANG L, SHAO YC, ZHAO HZ, CHEN FS. *MpigE*, a gene involved in pigment biosynthesis in *Monascus ruber* M7[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 285-296.
- [36] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [37] 陈万平. 基于基因组学解析红色红曲菌 M7 的生物学特性[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2014.
- CHEN WP. Insights into biological characteristics of *Monascus ruber* M7 by genomics approaches[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [38] SEONG KY, PASQUALI M, ZHOU XY, SONG J, HILBURN K, MCCORMICK S, DONG YH, XU JR, KISTLER HC. Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors *Tri6* and *Tri10* reveals adaptations for toxin biosynthesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(2): 354-367.
- [39] KIMURA M, TOKAI T, TAKAHASHI-ANDO N, OHSATO S, FUJIMURA M. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(9): 2105-2123.