

基于全基因组数据华根霉产真菌毒素分析

吴荣 王栋 徐岩* 李鸣

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 食品科学技术国家重点实验室
生物工程学院 酿造微生物及应用酶学研究室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】在对中国传统优势浓香型白酒产业中重要功能微生物华根霉菌株 CCTCCM201021 全基因组测序的基础上,以生物信息学的方法和手段主要针对真菌毒素的合成代谢途径及关键基因进行分析,考察微生物在食品工业应用中的安全性。【方法】应用 Illumina 平台 Solexa 测序技术对华根霉进行基因组测序,运用 SOAPdenovo 组装软件进行拼接,并进行一系列生物信息分析,考察根霉素、小孢根霉素及典型丝状真菌毒素代谢的主要途径及相关基因,包括 PKS、NRPS 与 PKS-NRPS 混合代谢途径;萜类化合物代谢和其他代谢途径等,判断华根霉是否具有产真菌毒素的潜在危害性。【结果】测序结果表明华根霉全基因组大小为 45.70 Mb 左右,GC 含量为 36.99%。通过基因预测软件分析得到基因 17 676 个,共注释基因 13 243 个。通过进化树与同源基因比较分析,与目前基因组测序完成的仅有的 3 株接合菌基因组相比,序列相似性普遍偏低,与华根霉存在较为显著的差异,但同源基因的相似性在 60%左右。代谢分析表明,华根霉中仅存在较少聚酮合成、萜类化合物合成途径代谢基因,存在大量异源物质降解途径基因。【结论】华根霉基本不具备产目前已知的真菌毒素的关键基因或合成能力,可以认为其发酵产品是相对安全的。在酿造过程中,不仅可作为糖化菌,在混菌发酵时,对部分具有抑菌能力的抗生物物质具有降解功能,是发酵工业中应用的相对安全的重要生产菌。

关键词: 华根霉, 基因组, 真菌毒素, 安全性

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800); 国家自然科学基金项目(No. 31271920); 江苏省自然科学基金
创新学者攀登项目(No. BK2009003); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. JUSRP211A28);
江苏省高校优势学科建设工程资助项目

*通讯作者: ✉: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-10-17; 接受日期: 2012-12-04

The safety analysis on mycotoxins of *Rhizopus chinensis* based on whole genomic sequences

WU Rong WANG Dong XU Yan* LI Ming

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Based on the bioinformations of the whole genomic sequences, we assessed biosynthetic pathway of mycotoxins and antibiotics in *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021, an important fungus isolated from Daqu, a leaven used in the production of traditional Chinese liquor. **[Methods]** The sequencing was done using Solexa sequencing technology. The genome was assembled by using SOAP de novo software. Key synthetic pathways and genes of rhizoxin and rhizonin, as well as mycotoxins metabolism were analyzed, including PKS, NRPS and PKS-NRPS hybrid metabolic pathways, terpenoid metabolism and other metabolic pathways. **[Results]** The genome of *R. chinensis* has a total size of 45.70 Mb and a GC content of 36.99%. Compared with the genomes of the Zygomycetes, the sequence similarity is low, whereas the similarity of the homologous gene is about 60%. The genome differences between *Rhizopus* and the fungi belonging to the Zygomycete class were significant. By the analysis of typical mycotoxins synthesis pathways and genes based on the genome data, a few polyketide biosynthetic pathway metabolism and terpenoid metabolism genes were found in *R. chinensis*, but there were great quantity genes of xenobiotics biodegradation pathways. **[Conclusion]** *R. chinensis* cannot produce mycotoxins, and its products are generally considered as safe.

Keywords: *Rhizopus chinensis*, Genome, Mycotoxins, Safety

丝状真菌在东方传统食品与现代工业发酵中的应用越来越广泛,作为生产出发菌株^[1-2],其微生物安全性越来越受到重视^[3-4],尤其是部分真菌具有真菌毒素合成能力,对人体健康存在巨大隐患。在传统发酵食品生产中,曲霉(*Aspergillus*)和根霉(*Rhizopus*)是曲中的重要微生物,所使用的菌种通常被认为是安全的,但有些黄曲霉(*A. flavus*)和红曲霉(*Monascus*),鉴于其能产生黄曲霉毒素^[5]和橘霉素^[6]而受到争议。

目前,已报道的真菌毒素超过 400 多种,绝

大部分主要由曲霉、麦角菌(*Claviceps*)、镰刀菌(*Fusarium*)、青霉菌(*Penicillium*)、葡萄穗霉(*Stachybotrys*)和漆斑菌(*Myrothecium*)所产生^[7]。如曲霉中发现的真菌毒素有黄曲霉毒素^[5]、赭曲霉毒素 A^[8]和杂色曲霉毒素^[9]等。而毛霉目中的真菌通常认为仅具有微弱的产毒性^[10]。真菌毒素主要通过聚酮代谢 PKS (Polyketide synthase)、NRPS 非核糖体多肽合成(Nonribosomal peptide synthetase)、PKS-NRPS 混合代谢、萜类化合物代谢、氨基酸相关代谢等单个或多个途径共同作用合

成。根霉中已报道的真菌毒素有根霉素^[11-12](Rhizoxin)与小孢根霉素^[13](Rhizonin)。根霉素对绝大多数真核细胞都有很强的抗有丝分裂活性,主要通过PKS途径合成。小孢根霉素为肝毒素环肽,主要通过NRPS途径进行合成。研究表明^[14-15]:根霉素和小孢根霉素并非由*R. microsporus*产生,而是由其菌丝体内甚至孢子中的内共生菌(Endofungal bacteria) *Burkholderia* 属菌所产生^[15]。Jennessen等^[16]检测了多种根霉菌产根霉素与小孢根霉素的能力,在*R. oligosporus*和*R. chinensis*中都未检测到,但仍不能排除具有产毒素的潜在可能性。

食品安全传统上主要通过对可能的有害物质分别进行针对性仪器检测分析进行考察,存在多指标、对未发现或未检测物质无法做出鉴定等缺点。随着基因组测序手段的进步,基因组学在食品安全的应用也越来越广泛^[17-18],为我们从根本上判断微生物潜在危害和安全性提供了可能,可在基因组层面对生产菌可能存在的毒素代谢途径进行全面分析进而判别其安全性。日本研究者通过米曲霉基因组的分析,根据黄曲霉毒素代谢途径与功能基因簇的研究发现,米曲霉不具备合成黄曲霉毒素的能力,进而说明了其安全性^[19]。在乳品产业中^[20],对重要生产菌株以及病原菌等进行基因组解析,可方便快捷、系统全面的检测食品中可能存在的病原菌和毒素合成关键基因。由于目前针对丝状真菌的研究尚存在各种问题,对传统酿造工业中应用较广的根霉等接合菌纲丝状真菌的了解相对较少,目前仅对米根霉(*Rhizopus oryzae* RA 99-880)、布拉克须霉(*Phycomyces blakesleeanus* NRRL1555)和卷枝毛霉(*Mucor circinelloides* CBS 277.49)完成了基因组解析,尚缺少较深入的分析研究。

华根霉(*Rhizopus chinensis*)是中国传统酿造过程中分离得到的,特别是白酒大曲中的重要功

能菌,经过数百年的应用实践,一般认为是安全的。本研究通过对华根霉基因组测序及数据分析,针对目前已知的其可能产生或典型的真菌毒素主要代谢途径,在基因组信息的基础上进行安全性考察,确定其是否具有产真菌毒素的潜在能力,进而验证其安全性,为安全使用微生物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

菌株:华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCCM 201021,中国著名浓香型白酒大曲中分离,并广泛用于浓香型白酒的生产中。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组提取制备:通过对液态培养获得的华根霉液氮研磨进行破壁,酚仿抽提法进行全基因组提取,达到测序要求进行送样测序。

1.2.2 全基因组数据:华根霉先后委托深圳华大基因研究院与上海生物信息技术研究中心应用Illumina平台Solexa测序技术进行Pair-end结合Mate-pair的方法对华根霉进行基因组测序。运用SOAPdenovo组装软件对Reads数据进行组装,利用Reads的Mapping信息,对软件组装结果进行补洞、单碱基校对。获得的Scaffold序列进行生物信息分析(数据公布:<http://medsino-test.scbit.org/rhizopus/geneBrowse.do>);其他菌基因组获取来自NCBI数据库与Broad Institute和DOE Joint Genome Institute网站公布数据。

1.2.3 基因预测与注释:通过Augustus软件与GeneMark分别对测序后拼接片段进行基因预测与编码区分析,预测基因序列与各数据库(NR、PFAM、CDD、KEGG、COG、SwissProt和TrEMBL)进行比对,获得相应的功能注释信息。

1.2.4 进化树分析:利用NCBI数据库中接合菌纲与子囊菌纲部分丝状真菌线粒体序列中细胞

色素 *b* (Cytochrome *b*, cyt *b*)基因, 运用 MEGA 5.0 软件进行 N-J 法(Neighbor-Joining)分析, 构建进化树。

1.2.5 全基因组比较: 利用 MUMmer 工具包中 Mummer 程序将华根霉与其他菌的全基因组进行比较分析。

2 结果与讨论

2.1 华根霉基因组序列基本特征及初步分析

2.1.1 华根霉全基因组测序拼接结果与注释信息: 通过 Illumina 平台 Solexa 测序后拼接获得的华根霉基因组初步信息, 其基因组大小在 45.70 Mb 左右, GC 含量为 36.99%, 对目前所得的数据进行质量分析发现其基因组覆盖率为 99.64%。使用 Augustus 软件与 GeneMark 分别对测序后拼接片段进行基因预测与编码区分析, 共预测得编码基因 17 676 个(表 1)。预测基因序列转换成蛋白序列与多个数据库(NR、PFAM、CDD、KEGG、COG、SwissProt 和 TrEMBL)进行比对, 获得相应功能注释信息, 最终注释基因 13 243 个。

与其他近源接合菌基因组基本信息相比较, *R. chinensis* 在基因组大小、GC 含量和预测编码蛋白数量等方面与 *R. oryzae* 较为相近。在序列相似性上普遍偏低, 同目前所测得全基因组的接合

菌之间存在的差异明显, 对全基因组拼接的借鉴意义较小。而同源基因所占比例均在 60%左右, 对基因功能注释有一定帮助。

2.1.2 系统发育进化树分析: 由于 *R. chinensis* 所在的根霉属乃至接合菌纲中, 仅 3 株菌的基因组解析完成, 且分布在不同种间, 为分析华根霉与上述 3 株接合菌间的近源性, 进一步通过构建系统发育树进行分析。细胞色素 *b* 因其具有母系遗传、无重组、在线粒体基因组中进化速度适中, 种内相对保守, 种间差异较大等特点^[21], 适合种内到种间的分析, 常应用于真菌的鉴定、分类与系统发育研究。以细胞色素 *b* 基因比较分析, 运用 N-J 法(Bootstrap 1 000)构建华根霉等接合菌分子系统发育树(图 1)。从分析结果来看, 华根霉与上述 3 株接合菌存在的差异较明显, 其中与米根霉 *R. oryzae* 较为接近, 而与之之前报道的真菌毒素产生菌宿主菌 *R. microsporus* 聚为一支, 为 *R. microsporus* 变种。

与目前研究较多的曲霉属丝状真菌相比较, 根霉基因组解析情况与研究存在较大差距。从一定程度上, 华根霉的基因组解析为进一步加深对接合菌纲丝状真菌的理解具有重要价值, 也为其中的未知功能基因与代谢基因组开矿提供了支持。

表 1 华根霉及其他近源接合菌基因组基本特征比较					
Table 1 Basic information of the assembled genomes of <i>Rhizopus chinensis</i> and other fungi belonging to the Zygomycete class					
菌株 Strain	基因组大小 Genome size (Mb)	GC 含量 GC content (%)	蛋白编码基因(个) Protein-coding genes	覆盖率 Query cov- erage (%)	同源基因 Homology gene (%)
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> NRRL1555	55.86	32.61	16 528	9.09	57.79
<i>Mucor circinelloides</i> CBS 277.49	36.58	42.17	11 719	3.01	65.87
<i>Rhizopus oryzae</i> RA 99-880	46.09	35.60	17 459	11.04	64.68
<i>Rhizopus chinensis</i> CCTCCM201021	45.70	36.99	17 676	—	—

注: Query coverage: Query 华根霉序列的平均覆盖率; Homology gene: Query 华根霉编码基因, Coverage >60%的基因所占比例。
Note: Query coverage: The sequence coverage by querying the sequence of *R. chinensis*; Homology gene: The percentage of homology gene by querying the genes of *R. chinensis* and coverage >60%.

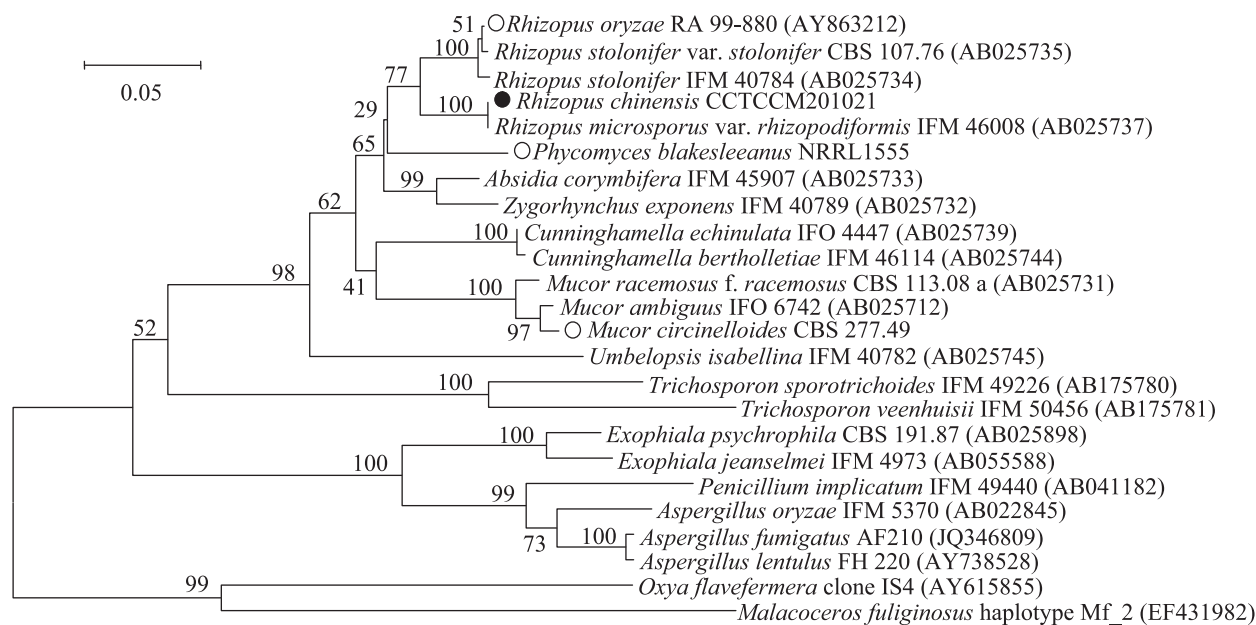


图1 通过 MEGA N-J 法构建的真菌分子系统发育树

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree of fungi constructed by Neighbour-Joining method of MEGA

注: ●: *Rhizopus chinensis* 也称为 *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*; ○: 接合菌纲中基因组已测序菌株。最后括号内为序列 GenBank 登录号。

Note: ●: *Rhizopus chinensis* also named *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*; ○: The genome of fungi belonging to the Zygomycete class that sequenced and assembled. The serial numbers in the brackets are gene sequence accession numbers in GenBank.

2.1.3 基因功能 COGs 分类: 对华根霉基因功能进行初步分析, 选择利用 COGs 进行基因注释与功能分类, 共注释基因 10 634 个, 可分为 24 个功能组(图 2), 其中预测为一般功能基因分组最多。

其中涉及复制重组和修复、转录、翻译, 核糖体结构和生物合成、信号传导机制、翻译后修饰, 蛋白翻转和分子伴侣、氨基酸运输与代谢、碳水化合物转运与代谢的注释基因数相对较多, 在 590–920 之间。碳水化合物和氨基酸的转运及代谢相关的基因也较为丰富, 如在碳源代谢中, 存在淀粉代谢途径, 这与其作为糖化菌的功能相关。其中也存在部分预测基因未有匹配结果, 有 20.0% 以上的基因功能不能确定, 匹配性较差; 2.7% 的基因功能未知, 所具备的生理功能目前了解尚不清楚。而在次级代谢中, 存在较多的降解途径, 主要涉及对芳香族类化合物、萜烯类化合

物等, 这与白酒酿造中丰富的风味物质形成可能相关。

2.2 华根霉真菌毒素相关的安全性分析

虽然目前已报道的真菌毒素有 400 多种, 但许多毒素具有相同或近似的关键合成途径及基因。真菌毒素合成途径主要有 PKS、NRPS、PKS-NRPS 混合代谢、萜类化合物代谢、氨基酸相关代谢等, 通过对这些途径及关键基因的分析, 可以从根本上了解微生物合成真菌毒素的潜在可能性。基于华根霉基因组分析与基因注释结果, 分析了根霉毒素和主要典型真菌毒素的关键合成途径及基因(表 2)。

2.2.1 聚酮代谢与非核糖体多肽类真菌毒素合成途径及基因分析: PKS 途径、NRPS 途径与 PKS-NRPS 混合代谢是大多数真菌毒素合成中的关键代谢途径。在曲霉中, 绝大多数真菌毒素均

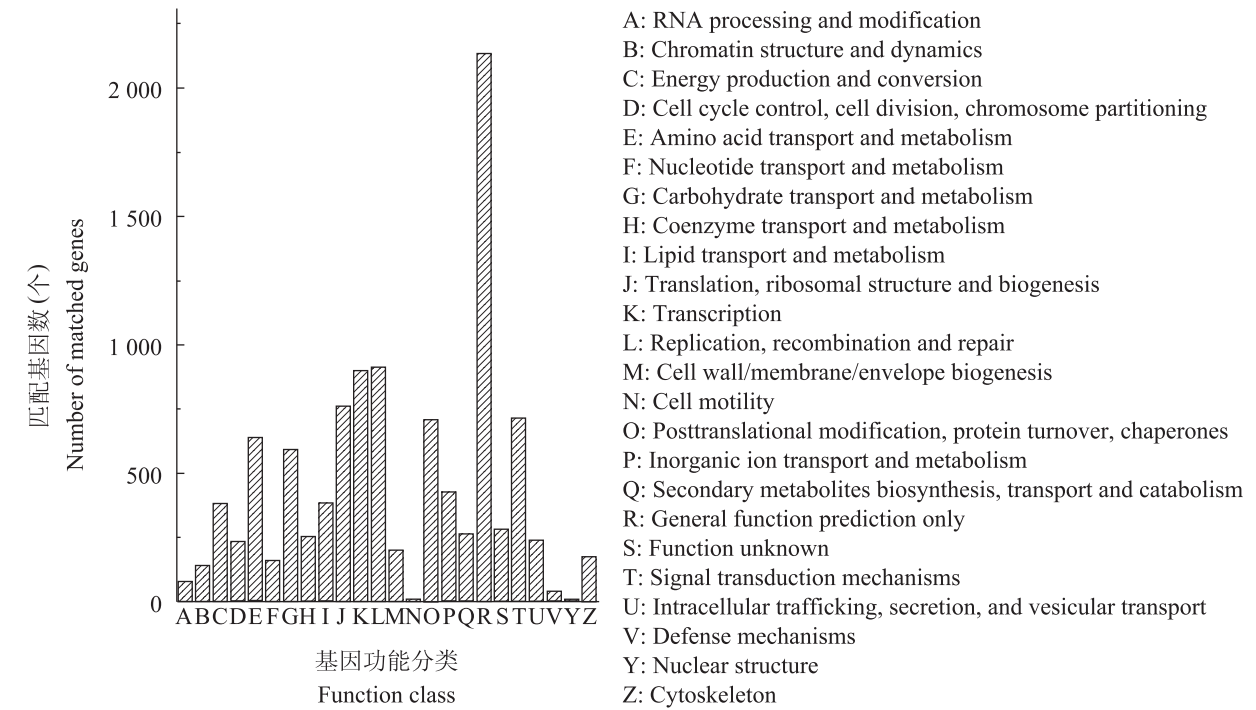


图 2 华根霉预测基因 COGs 功能分类
Fig. 2 COGs functional classification of *Rhizopus chinensis*

是通过这些代谢途径提供前体骨架物质,经催化修饰后进行合成的,如黄曲霉毒素^[22]、杂色曲霉素^[23]等真菌毒素的前体物质都是由 PKS 途径合成。在 *Aspergillus oryzae* 中发现 PKS-NRPS 是环匹阿尼酸(Cyclopiazonic acid, CPA)生物合成的关键途径^[24]。

在中国传统酿造工业中,部分红曲霉产生橘霉素的代谢途径及基因已经比较清楚,也主要通过 PKS 途径进行合成^[25]。而目前在根霉中发现的真菌毒素也是由 PKS 途径和 NRPS 途径合成产生的^[14-15]。表 2 中根据典型真菌毒素主要合成途径与基因对华根霉 *R. chinensis* 基因组进行了分析。*R. chinensis* 基因组注释信息与细菌、真菌中已报道的真菌毒素关键合成酶的比对与注释结果表明,PKS 及 PKS-NRPS 混合代谢途径中 *R. chinensis* 基因组未有相关基因匹配和基因注释信息,可以认为 *R. chinensis* 中不存在 PKS 及 PKS-NRPS 混合代谢合成的相关基因及代谢途

径。对于 NRPS 途径,仅注释到部分铁运载体合成途径中所需的少量 NRPS 相关基因,表明 *R. chinensis* 基本不存在该类物质的合成能力,这一结果与 Jennifer Jennessen 等^[16]的实验结果相一致,基本可以解释多株 *R. chinensis* 未检测到真菌毒素的原因。

有报道称根霉素、小孢根霉素是由根霉 *R. microsporus* 内共生菌 *Burkholderia* 属菌所产生的^[15],而在根霉属^[14](*Rhizopus* spp.)、丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungus, AMF)如球囊霉属^[26](*Glomus* spp.)中,都有存在内共生细菌的报道。为进一步确定在 *R. chinensis* 中是否与 *R. microsporus* 一样,也存在具真菌毒素生产能力的内共生菌,通过对基因组拼接数据测序深度与 GC 含量关联分析(图 3),以此考察在测序数据中是否存在其他生物基因序列的污染,进而判断在 *R. chinensis* 基因组测序数据中是否存在内共生菌基因序列。

表 2 典型真菌毒素主要合成途径与基因及其与华根霉基因组比对结果

Table 2 The comparison of typical mycotoxins synthesis pathways and genes with the genome of *Rhizopus chinensis*

真菌毒素 Mycotoxin	主要来源(微生物) Related microorganism	关键合成途径 Key biosynthetic pathway	关键基因 Key genes	涉及基因数 The number of genes involved in biosynthesis	注释基因数 The number of key biosynthetic pathway genes	华根霉基因组 <i>Rhizopus chinensis</i> genome	
						比对结果 BLAST result	注释结果 Annotation result
Rhizonin	<i>Rhizopus (Burkholderia endofungorum)</i>	NRPS	未知	未知	未知	—	2
Aflatoxin	<i>Aspergillus flavus</i>	PKS	<i>aflC/pksA/pksL1</i>	30	32	—	0
Sterigmatocystin	<i>Aspergillus nidulans</i>	PKS	<i>stcA/pksst</i>	24	27	—	0
Fumonisin	<i>Fusarium</i> spp.	PKS	<i>FUM1</i>	16	未知	—	0
Versicolorin A	<i>Aspergillus flavus</i>	PKS	<i>aflC/pksA/pksL1</i>	14	32	—	0
Citrinin	<i>Monascus purpureus</i>	PKS	<i>pksCT</i>	6	未知	—	0
Rhizoxin	<i>Rhizopus (Burkholderia rhizoxinica)</i>	PKS	<i>rhiC-rhiJ</i>	9	7	—	0
		Hybrid PKS-NRPS	<i>rhiA, rhiB</i>		2	—	0
Cyclopiazonic acid	<i>Aspergillus oryzae</i>	Hybrid PKS-NRPS	<i>pks-nrps/cpaA</i>	7	2	—	0
Trichothecenes	<i>Fusarium</i> spp.	Terpenoid Metabolism	<i>Tir5, Tri1-Tri16</i>	16	未知	—	28
Austinol	<i>Aspergillus nidulans</i>	Meroterpenoids (PKS-Terpenoid)	<i>ausA, ausB-ausN</i>	14	27+18	—	0+28
Dehydroaustinol	<i>Aspergillus nidulans</i>	Meroterpenoids (PKS-Terpenoid)	<i>ausA, ausB-ausN</i>	14	27+18	—	0+28

注: 涉及基因数: 该真菌毒素完整合成的所涉及相关基因数; 注释基因数: 该真菌毒素关键合成途径在主要来源微生物基因组中的注释基因数; 比对结果: 华根霉基因组与该真菌毒素关键合成途径中基因的比对结果(“—”表示未有匹配); 注释结果: 华根霉全基因组注释中可能涉及该真菌毒素关键合成途径的基因数。

Note: The number of genes involved in biosynthesis: The number of genes involved in the whole patway of mycotoxin biosynthesis; The number of key biosynthetic pathway genes: The number of annotated genes belonging to the key biosynthetic pathway of mycotoxin in the related microorganism; BLAST result: The result of BLAST searching against the key biosynthetic pathway genes (“—” no hit); Annotation result: The number of the key biosynthetic pathway genes in the genome annotation of *R. chinensis*.

根据测序深度与 GC 含量关联分析的数据分布结果, 可将数据进行大致分离后单独分析。图 3 的分析结果显示, 根据 GC 含量和覆盖率数据可划分为 4 部分, 分布在 A、B、C、D 4 个区域, 其中主要有 3 组数据。这与在无污染的单菌种全基因组测序数据结果并不一致, 表明可能存在其他基因组测序数据。经过分析, A 区域分布数据主要为华根霉基因组拼接数据, 占 95%以上。B 区域中的数据推测可能为 *R. chinensis* 中的内共生菌基因组测序数据。C 区域的数据 GC 含量较低,

分析可能是由于大量重复序列或是其他低 GC 含量的内共生菌基因组带入所引起的。

结果表明, 在 *R. chinensis* 基因组数据分布中, 可能存在其他微生物基因组。进一步以 *R. oryzae* 基因组数据为参照, 将各部分数据分别与 *Burkholderia rhizoxinica*、*B. multivorans*、*B. pseudomallei*、*B. vietnamiensis* 和 *B. cenocepacia* 5 个 *Burkholderia* 菌(NCBI)全基因组进行对比分析。结果表明在 *R. chinensis* 和 *R. oryzae* 中都且仅存在少量低相似度序列。由此可知, 虽然在中

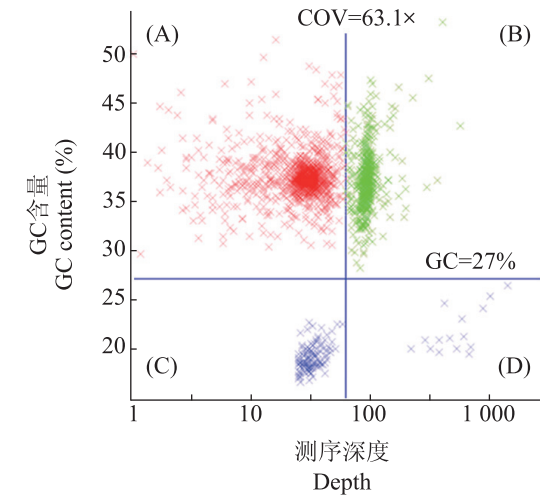


图 3 华根霉拼接数据测序深度与 GC 含量关联分析
Fig. 3 Correlation analysis between sequencing depth and GC content of *Rhizopus chinensis* assembly data

国传统大曲白酒生产过程中, 长年的混种发酵与驯化可能使 *R. chinensis* 中存在某种内共生菌, 但不存在具真菌毒素生产能力的内共生 *Burkholderia* 菌。

2.2.2 萜类化合物代谢合成真菌毒素的途径分析:
在真菌的萜类化合物代谢过程中, 能产生多种真

菌毒素, 如单端孢霉烯族毒素(Trichothecenes)等。此类毒素主要是由 *Fusarium*、*Stachybotrys* 和 *Myrothecium* 等属真菌所产生。目前报道的单端孢霉烯族毒素有近 200 种, 该类真菌毒素的合成主要通过萜类化合物代谢合成前体物质, 经法尼基焦磷酸环化生成 Trichodiene 后, 由多个专一性 C15 细胞色素 P450 单加氧酶和乙酰转移酶等合成酶及相关调控和转运蛋白进行合成^[27]。

通过对 *R. chinensis* 基因组次级代谢部分 KEGG 注释结果进行分析(图 4), 考察其是否具有该类物质合成能力。对萜类化合物合成途径的分析发现: 华根霉基因组中在萜类化合物代谢中共注释到基因 168 个, 其中注释到有关萜类化合物降解的基因 123 个, 而在该类物质合成途径中注释到的基因相对较少, 仅注释到 36 个, 且分布在多个代谢途径中, 仅在萜类物质骨架结构的真菌甲羟戊酸合成途径中注释到相对完整的代谢途径基因, 共 28 个(表 2)。

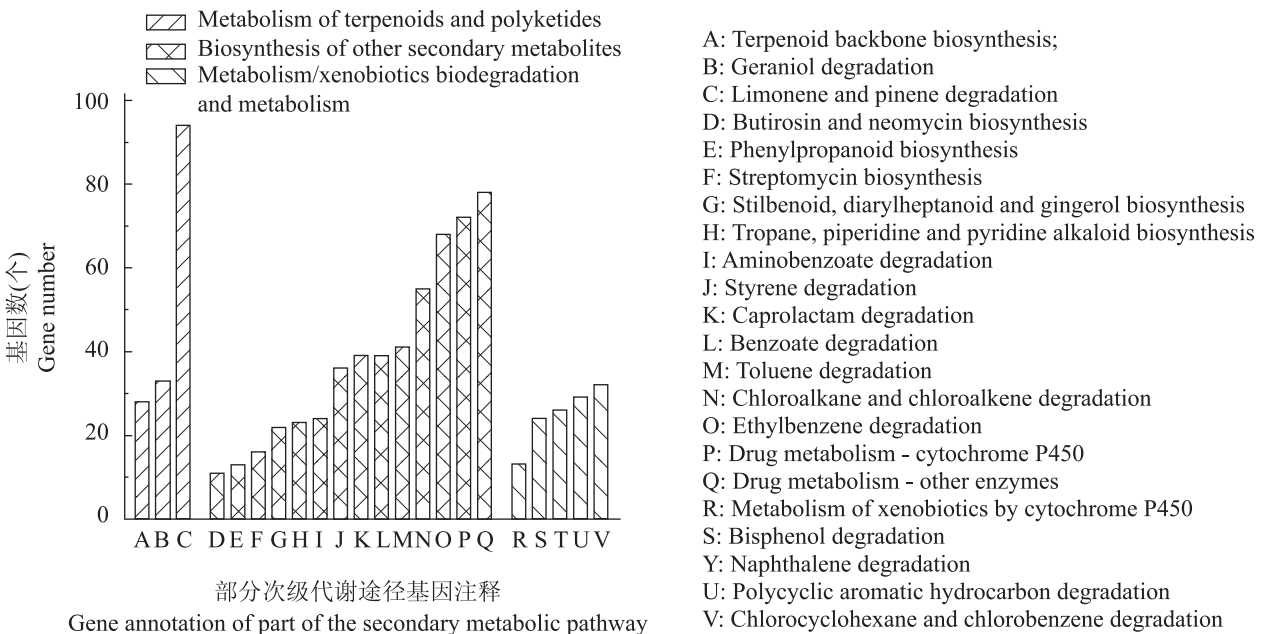


图 4 主要次级代谢途径中 KEGG 所注释基因数(注释基因数>10)
Fig. 4 The mainly secondary metabolic pathways in KEGG annotated results

但是进一步将已报道的该类毒素合成相关酶蛋白序列同 *R. chinenensis* 基因组预测编码蛋白进行比对发现, 虽然在 *R. chinenensis* 基因注释中存在后修饰相关的单加氧酶和乙酰转移酶等合成酶, 多为甾醇、泛醌、类固醇等系列次级代谢产物的相关合成酶, 但与毒素合成相关的关键酶蛋白序列存在较大差异, 未有匹配结果, 不能对骨架物质进行特异性后修饰, 可认为不具有合成该类物质的能力。对于混合代谢途径, 由于 PKS 途径的缺失, 也不可能进行该类物质的合成。

此外, 虽然 *R. chinenensis* 存在萜类化合物合成途径的功能基因相对较少, 而萜类物质的降解途径相对完整, 能够对香叶醇、柠檬烯与蒎烯进行特异性降解。作为中国传统白酒酿造中的重要生产菌, 在长时间的开放体系, 多菌种发酵过程中驯化与选择, 华根霉对一些具有抑菌作用的萜类物质具有降解能力, 而本身不具备其合成能力。可见, 在发酵过程中, 华根霉不仅作为糖化菌, 且在混菌生长时对抑菌物质具有降解作用, 可维持多菌种间的生长与代谢。

2.2.3 其他次级代谢分析: 在其他次级代谢中(图 4), *R. chinenensis* 还存在大量生物异源物质降解途径, 尤其是对芳香族化合物如 1-甲基萘、2-甲基萘、萘和蒽等。而其中完整的细胞色素 P450 药物代谢与异源物质代谢是药物代谢过程中的关键酶。相对来说, 华根霉不具备产青霉素、链霉素、新生霉素等抗生素的能力, 其合成代谢中仅注释到个别的基因与酶, 没有完整的代谢通路。这与华根霉应用于中国白酒生产, 在开放体系多菌种混种发酵的实际情况相符, 对其他细菌等不具备抗生抑菌作用。

真菌毒素的代谢过程中, 还有部分真菌毒素是由氨基酸合成或参与合成的。在有些情况下, 则是多个代谢途径协同作用的结果, 如 *Aspergillus ustus* 和 *A. terreus* 中的 Austin^[28]与

Austinol^[29]是由聚酮代谢同萜类化合物代谢混合作用产生的。真菌毒素的产生还存在其他一些合成途径, 但绝大部分是由以上几类代谢途径单个作用或多个相互作用产生的。通过以上的分析可以发现, 在 *R. chinenensis* 中, 不存在典型真菌毒素合成的完整代谢途径, 缺少其合成能力, 相反对该部分有毒物质可能具有降解能力。

3 结论

通过对 *R. chinenensis* 进行全基因解析, 其基因组大小为 45.70 Mb, GC 含量为 36.99%, 初步注释基因 13 243 个, 并存在大量未知功能基因。通过基因注释信息与特异序列比对可知, 在 *R. chinenensis* 中, 不存在目前已报道的根霉毒素和典型真菌毒素关键代谢途径。本研究利用全基因组信息从根本上分析华根霉产毒素的潜在能力, 验证了该菌株在这方面的安全性。

同时, 华根霉在次级代谢中, 缺少抗生素等抑菌物质的代谢合成能力, 存在较为完整的生物异源物质降解途径, 对具有毒性的芳香族化合物具有潜在降解能力。在白酒生产过程中, 不仅可作为糖化菌, 且在混菌发酵时, 对具有毒性的抑菌物质具有降解功能, 促进菌种的正常生长与代谢, 是发酵工业中应用的相对安全的重要生产菌。

致谢: 感谢深圳华大基因研究院、上海生物信息技术研究中心与上海众信生物技术有限公司郝沛博士、余曜博士及 Dr Zhong Wang 提供的技术支持。

参 考 文 献

- [1] Nout M. Fermented foods and food safety[J]. Food Research International, 1994, 27(3): 291-298.
- [2] Nout MJR, Aidoo KE. Asian fungal fermented food[J]. Industrial Applications, 2010, 10: 29-58.
- [3] Michael JS, Dobson AW. Mycotoxin production by

- Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 43(3): 141–158.
- [4] Yu J, Cleveland TE, Nierman WC, et al. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases[J]. Revista iberoamericana de micología, 2005, 22(4): 194–202.
- [5] Davis ND, Diener UL, Eldridge DW. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium[J]. Applied Microbiology, 1966, 14(3): 378–380.
- [6] Blanc PJ, Loret M, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*[J]. Biotechnology Letters, 1995, 17(3): 291–294.
- [7] Bräse S, Encinas A, Keck J, et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites[J]. Chemical Reviews, 2009, 109(9): 3903–3990.
- [8] van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh[J]. Nature, 1965, 205(976): 1112–1113.
- [9] Brown DW, Yu JH, Kelkar HS, et al. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(4): 1418–1422.
- [10] Reiss J. Biotoxic activity in the Mucorales[J]. Mycopathologia, 1993, 121(2): 123–127.
- [11] Iwasaki S, Kobayashi H, Furukawa J, et al. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VII. Structure of a phytotoxin "rhizoxin" produced by *Rhizopus chinensis*[J]. The Journal of Antibiotics, 1984, 37(4): 354–362.
- [12] Tsuruo T, Oh-hara T, Iida H, et al. Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines[J]. Cancer Research, 1986, 46(1): 381–385.
- [13] Wilson T, Rabie CJ, Fincham JE, et al. Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals[J]. Food and Chemical Toxicology, 1984, 22(4): 275–281.
- [14] Partida-Martinez LP, Hertweck C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production[J]. Nature, 2005, 437(7060): 884–888.
- [15] Lackner G, Partida-Martinez LP, Hertweck C. Endofungal bacteria as producers of mycotoxins[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(12): 570–576.
- [16] Jennessen J, Nielsen KF, Houbraken J, et al. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1833–1840.
- [17] Harlizius B, van Wijk R, Merks JW. Genomics for food safety and sustainable animal production[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 113(1/3): 33–42.
- [18] Brul S, Schuren F, Montijn R, et al. The impact of functional genomics on microbiological food quality and safety[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112(3): 195–199.
- [19] Abe K, Gomi K, Hasegawa F, et al. Impact of *aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites[J]. Mycopathologia, 2006, 162(3): 143–153.
- [20] Maria LM, Wells-Bennik MJ. Impact of bacterial genomics on determining quality and safety in the dairy production chain[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(5): 486–495.
- [21] Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(2): 128–144.
- [22] Chang PK, Cary JW, Yu J, et al. The *Aspergillus parasiticus* polyketide synthase gene *pkSA*, a homolog of *Aspergillus nidulans* *wA*, is required for aflatoxin B1 biosynthesis[J]. Molecular & General Genetics : MGG, 1995, 248(3): 270–277.
- [23] Yu JH, Leonard TJ. Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(16): 4792–4800.
- [24] Tokuoka M, Seshime Y, Fujii I, et al. Identification of a novel polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS) gene required for the biosynthesis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(12): 1608–1615.

- [25] Hajjaj H, Kläbe A, Loret MO, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 311–314.
- [26] Macdonald RM, Chandler MR. Bacterium-Like organelles in the Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus Caledonium*[J]. *New Phytologist*, 1981, 89(2): 241–246.
- [27] Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N, et al. Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71(9): 2105–2123.
- [28] Simpson TJ, Ahmed SA, Rupert MC, et al. Biosynthesis of polyketide-terpenoid (meroterpenoid) metabolites andibenin B and andilesin A in *Aspergillus variegator*[J]. *Tetrahedron*, 1997, 53(11): 4013–4034.
- [29] Lo HC, Entwistle R, Guo CJ, et al. Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(10): 4709–4720.



(上接 p.1383)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>