

红曲霉 T-DNA 插入转化库中桔霉素突变子的筛选*

丁月娣 邵彦春 许一平 陈福生**

(华中农业大学食品科技学院农业部食品安全评价重点开放实验室 武汉 430070)

摘要:以农杆菌介导法建立的红曲霉 T-DNA 转化库为实验材料,采用抑菌圈法从 5,000 多个转化子中筛选出 200 株桔霉素突变子的候选菌株,用高效液相色谱法进一步筛选得到 53 株与出发菌株相比产桔霉素能力发生显著变化的突变子,其红曲中桔霉素含量介于 0.04 ~ 154.57 $\mu\text{g/g}$ 之间。进一步分析了突变子的红曲色价,发现突变子产桔霉素能力与产色素能力之间有一定的相关性。这些研究结果为进一步从分子水平上探讨红曲霉产桔霉素和色素等次生代谢产物之间的关系提供了材料和基础。

关键词:红曲霉,桔霉素,高效液相色谱,农杆菌介导的 DNA 转化

中图分类号:TS202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654 (2006) 04-0052-06

Screening Citrinin Mutants from the Transformants Library of *Monascus ruber* M-7 by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer*

DING Yue-Di SHAO Yan-Chun XU Yi-Ping CHEN Fu-Sheng

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Lab Food Security
Estimate of Ministry of Agriculture, Wuhan 430070)

Abstracts: 200 citrinin mutants were screened with the inhibition zone method from the transformants library of *Monascus ruber* M-7 by *Agrobacterium*-mediate DNA transfer, which contains more than 5,000 transformants. Then 53 mutants, whose citrinin contents ranged from 0.04 $\mu\text{g/g}$ to 154.57 $\mu\text{g/g}$ in the red fermented rice (RFR), were achieved by high performance liquid chromatography (HPLC). Color values of RFR prepared by these mutants were also detected. The results showed that there was a positive correlation between the citrinin content and the color value among the mutants. These results provide materials and research bases for further studying the relationship between the production of citrinin and pigment of *Monascus ruber* at molecular level.

Key words: *Monascus ruber*, Citrinin, HPLC, *Agrobacterium*-mediated DNA transfer

红曲霉 (*Monascus* spp.) 是制备红曲的微生物菌种^[1]。红曲又称丹曲、神曲和红曲米,是我国传统的特色发酵食品,被广泛应用于中药和多种食品中^[2,3],在我国已经一千多年的生产和应用历史。例如,红曲色素作为一种安全的天然色素,被广泛应用于食品和化妆品中^[4]。另外,红曲霉还能产生 monacolin K、 γ -氨基丁酸等多种具有重要生理活性的物质,从而使红曲被开发成新型的保健食品或药品,为我国的红曲产业带来蓬勃生机^[5,6]。

桔霉素是一种真菌毒素,具有肾毒性^[7]。早在 1931 年,就由 Hetherington 和 Raaijstrick 从桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 的培养物中分离得到^[8]。1981 年,香港中文大学的 Wang 等人从红曲霉的发酵产物中分离出一种黄色的抑菌物质,命名为 monasci-

* 湖北省自然科学基金资助项目 (No. 4006-056050)

新世纪优秀人材资助计划 (No. NCET-05-0667)

** 通讯作者 Tel: 027-87282927, E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2005-10-17, 修回日期: 2005-11-22

din A^[9]。后由法国的 Blanc 教授用质谱、核磁共振、紫外及荧光分析等多种方法对其结构进行了分析和鉴定,发现 monascidin A 就是桔霉素^[10]。桔霉素在红曲中的发现,引起了国际上的关注,使红曲的安全性受到质疑,成为影响我国红曲应用和出口的瓶颈^[11]。

本实验室通过农杆菌介导法将外源 T-DNA 转化到红曲霉中,建立了一个含 5,000 多个转化子的转化库。本研究以该转化库为实验材料,从中筛选得到产桔霉素能力发生显著变化的突变子,并对其产色素能力进行了分析,为进一步采用分子生物学手段研究红曲霉产桔霉素的相关基因以及红曲霉产桔霉素和色素等次生代谢产物在分子水平上的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

采用农杆菌介导法转化红色红曲霉 (*Monascus ruber*) M-7, 得到含有 5,000 多个转化的转化库,作为筛选桔霉素突变子的材料。

枯草芽孢杆菌,由本实验室保存,用于抑菌圈实验。

1.2 试剂

桔霉素标准品购自 Sigma 公司;乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

1.3 培养基

1.3.1 土豆培养基:取 200g 去皮的土豆,切成小块,煮沸 30min。纱布过滤后滤液加 20g 葡萄糖定容至 1,000mL,即为土豆液体培养基 (PDB),用于枯草芽孢杆菌的培养。在 PDB 中加入 1.5% 的琼脂,即为土豆琼脂培养基 (PDA),用于红曲霉菌株的活化和培养。

1.3.2 米饭培养基:取一定量的大米用自来水浸泡 4h,纱布沥干,分装在 250mL 三角瓶中,30g/瓶,灭菌后趁热打散,用于制备固态红曲。

上述培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.4 红曲霉桔霉素突变子的抑菌圈法筛选

参考文献 [12] 的方法,将枯草芽孢杆菌接种于 PDB 培养基中,30℃ 培养 1d,取 200μL 菌悬液涂布于 PDA 平皿中。用直径为 5mm 的打孔器挖取大小相等的两块在 PDA 培养基上 30℃ 培养了 6d 的相邻位置的红曲霉转化子培养物。一块接到 PDA 培养基表面,30℃ 培养 2d,测量抑菌圈的大小;另一块用于桔霉素的提取。

1.5 菌落中桔霉素的提取

参照文献 [12] 的方法,将 1.4 中的另一块红曲霉培养物置于带盖离心管中,加 1mL 氯仿于振荡器 (200 r/min) 上振荡 4h,10,000r/min 离心 5min,取氯仿层。重复上述步骤两次,合并氯仿溶液于通风橱中自然挥发至干,加 100μL 甲醇定容,0.45μm 膜过滤备用。

1.6 红曲米的制备及其桔霉素的提取

红曲米的制备参考文献 [13],将红曲霉接种于 PDA 试管斜面上,30℃ 培养 7d,用无菌水洗下孢子接种于米饭培养基中,30℃ 培养 14d,45℃ 烘干至恒重,即为红曲米。粉碎过 40 目筛,备用。

红曲米中桔霉素的提取:准确称取 2.0g 红曲米粉,加 15mL 蒸馏水,150r/min 摇

床振荡 6h, 5,000 r/min 离心 10min, 取上清。沉淀再加 10mL 蒸馏水浸提, 重复两次, 合并上清液。在上清液中加入 10mL 氯仿, 充分振荡摇匀, 5,000r/min 离心 5min, 取氯仿层, 重复两次, 合并氯仿溶液于通风橱中自然挥干, 用 1.5mL 甲醇溶解固体残留物, 0.45 μ m 滤膜过滤, 备用。

1.7 桔霉素高效液相色谱 (HPLC) 分析

参考文献 [14, 15], 将 1.5 和 1.6 中的桔霉素提取液用 HPLC 分析。色谱条件为如下: 高效液相色谱仪: SPD 10AVP 型 (LC-10ATVP 泵) (日本岛津 shimadza 公司); 色谱柱: chromasil C₁₈ (5 μ m, 250 × 4.6mm); 流动相: 乙腈/水 = 50/50, 用磷酸调 pH2.5; 流速 1.0 mL/min; 柱温为室温; 进样量 10 μ L。检测器: 荧光检测器; 检测波长: λ_{ex} = 325nm, λ_{em} = 512nm。

1.8 红曲米色价的测定

参考 GB4926-1985 和 GB15961-1995 中色价的测定方法, 称取 0.050g 红曲样品, 加 70% 乙醇定容至 10mL, 60℃ 水浴 30min, 5,000r/min 离心 5min, 取 1mL 上清再用 70% 乙醇定容至 10mL, 505nm 测吸光值, 该吸光值乘以 2,000 (稀释倍数) 即为样品色价。

2 结果与分析

2.1 红曲霉桔霉素突变子的抑菌圈法筛选

桔霉素能抑制枯草芽孢杆菌的生长, 因而能形成抑菌圈, 且抑菌圈大小可反映桔霉素含量的高低^[12]。用该方法从 5,000 多株转化子中筛选出 200 株与出发菌株相比抑菌圈发生明显变化的突变子。部分转化子的抑菌圈大小见图 1。

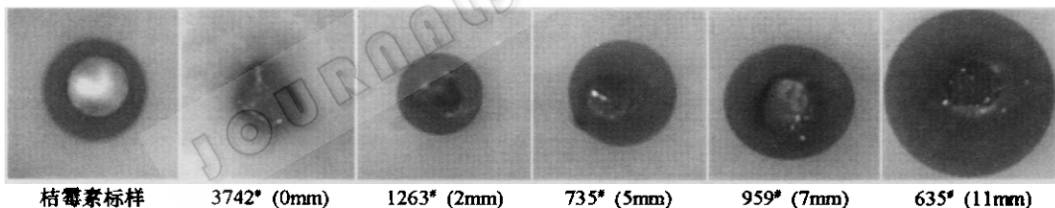


图 1 桔霉素标样和红曲霉转化子的抑菌圈图*

* 桔霉素标样的加样量为 6 μ g, 括号内数据为抑菌圈直径减菌块直径 (5mm) 的差值

实验中发现, 抑菌圈的大小与所挑菌块在红曲霉菌落中的位置有一定关系。在同一菌落, 中间菌块的抑菌圈直径要大于菌落边缘菌块的抑菌圈。这可能是由于菌落中间的菌块生长时间长, 桔霉素积累较多, 因而抑菌圈较大; 而菌落边缘的菌块生长时间短, 桔霉素产生较少, 因此抑菌圈小。但是, 实验发现, 红曲霉培养基的厚度与抑菌圈大小没有关系。

2.2 红曲霉菌落中桔霉素含量的 HPLC 分析

在测定抑菌圈大小的同时, 取同一菌落中与测抑菌圈菌块相邻的另一大小相同的菌块, 用 HPLC 测定菌块中桔霉素的含量。从上述 200 株转化子中筛选得到 53 株桔霉素含量发生显著变化的桔霉素突变子。部分突变子的抑菌圈大小和菌落中桔霉素含量见图 2。

由图 2 可以看出, 这些转化子的抑菌圈大小与菌落中桔霉素含量并不都成正比关系。抑菌圈很小的转化子, 其桔霉素含量也小, 如 805*、3257* 和 3742*。805* 和 3257*

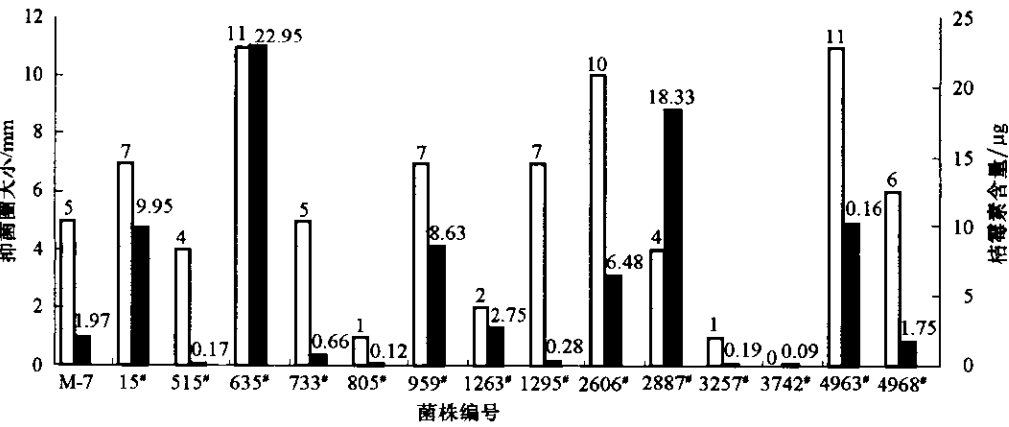


图2 部分突变子的抑菌圈大小与菌落中桔霉素含量
抑菌圈大小为抑菌圈直径减菌块直径 5mm 的差值
□ 抑菌圈大小, ■ 菌落中桔霉素含量

的抑菌圈大小均为 1mm, 3742* 无抑菌圈, 它们菌落中桔霉素含量分别为 0.12 μg 、0.19 μg 和 0.09 μg 。但抑菌圈较大的转化子, 有的桔霉素含量很低, 如 1295*; 有的却很高, 如 959*。两者的抑菌圈大小均为 7mm, 而桔霉素含量分别为 0.28 μg 和 8.63 μg 。这些结果表明桔霉素可能不是红曲霉产生的唯一的抑菌物质, 红曲霉还可能产生其他的抑菌物质。该结果与赵树欣等的研究一致^[16]。

因此在采用抑菌圈法筛选红曲霉的桔霉素突变子时, 特别是有明显抑菌圈的突变子, 应该进一步用 HPLC 进行验证。由于抑菌圈法操作简单快速, 而且能有效地筛选出低桔霉素含量的菌株, 因此对从数目庞大的转化子库中筛选桔霉素突变子, 仍然是一个行之有效的方法。

2.3 红曲中桔霉素含量的 HPLC 分析

将筛选得到的 53 株桔霉素突变子制备成红曲, HPLC 测定其桔霉素含量。图 3 为部分突变子菌落与红曲中桔霉素含量的值。从图中可以看出, 两者有较好的正相关性。

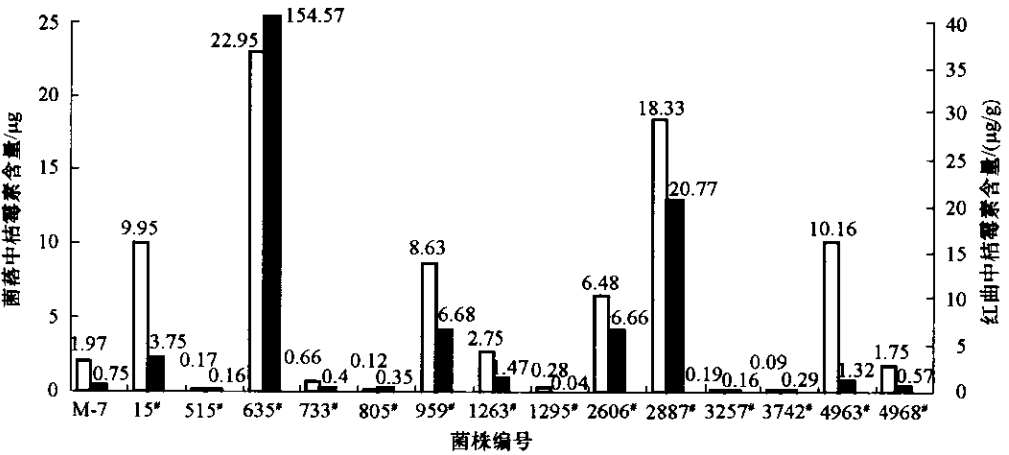


图3 部分突变子菌落与红曲中的桔霉素含量
□ 菌落中桔霉素含量, ■ 红曲中桔霉素含量

53 株桔霉素突变子红曲中的桔霉素含量见表 1。从表中可以看出, 前 16 株突变子

的桔霉素含量低于出发菌株 M-7，其中最低的是 1295[#]，其桔霉素含量为 0.04 μg/g。其余的 37 株突变子，其桔霉素含量均高于出发菌株，其中 635[#]最高，为 154.57 μg/g，是出发菌株的 206 倍。

表 1 53 株桔霉素突变子红曲中的桔霉素含量

菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)	菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)	菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)	菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)
M-7	0.75	2454	0.52	4012	2.20	4210	4.17
1295	0.04	533	0.55	2183	2.26	192	4.35
3725	0.05	4968	0.57	1903	2.34	1335	5.15
130	0.06	2989	1.08	1149	2.37	3892	5.42
4591	0.07	1164	1.25	619	2.41	2606	6.66
3121	0.08	4963	1.32	4425	2.81	959	6.68
3715	0.11	1343	1.38	294	2.82	4120	6.85
515	0.16	1263	1.47	4375	2.86	1358	8.13
3257	0.16	66	1.55	3686	3.57	3906	10.58
161	0.17	4081	1.59	4264	3.63	1132	11.79
4096	0.21	189	1.6	15	3.75	3910	16.68
3742	0.29	4179	1.88	3895	4.04	2887	20.77
805	0.35	4235	2.06	4118	4.06	635	154.57
733	0.40	4301	2.13				

2.4 桔霉素突变子的色价分析

对桔霉素突变子红曲的色价进行分析，结果见表 2。由表 2 可以看出，大部分突变子的色价与桔霉素含量同时降低或升高，说明大部分突变子产桔霉素能力与产色素能力之间存在一定的相关性。但也有 6 株突变子（189[#]、192[#]、294[#]、619[#]、635[#]、1263[#]）色价降低而桔霉素升高，还有 2 株（4096[#]、4968[#]）色价升高而桔霉素降低。这些结果表明外源 T-DNA 在红曲霉 M-7 基因中的插入位置可能不同。

表 2 部分桔霉素突变子红曲中的桔霉素含量与色价

菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)	色价	菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)	色价	菌株 编号	桔霉素含 量 (μg/g)	色价
M-7	0.75	1,128	619	2.41	544	2606	6.66	2,074
15	3.75	2,316	635	154.57	518	2887	20.77	2,477
66	1.55	2,975	733	0.40	534	3257	0.16	254
130	0.06	1,124	805	0.35	54	3742	0.29	132
189	1.60	718	959	6.68	2,712	4081	1.59	1,926
192	4.35	152	1149	2.37	1,436	4096	0.21	2,361
294	2.82	824	1164	1.25	2,479	4591	0.07	84
515	0.16	1,024	1263	1.47	20	4963	1.32	1,537
533	0.55	788	1295	0.04	554	4968	0.57	1,377

3 讨论

自从 1995 年法国 Blanc 教授证实红曲中的抑菌物质 monascidin A 就是真菌毒素桔霉素以来，红曲的安全性就成为国际社会关注的焦点。科研人员通过筛选菌株和优化

发酵条件来控制红曲中桔霉素含量,并取得一定成果^[17,18]。但如果能弄清楚桔霉素的代谢途径,并得到相关的基因,就有可能从根本上控制红曲中桔霉素的含量。1999 年, Hajjaj 通过核磁共振技术发现了红曲霉中桔霉素的部分代谢途径^[19],见图 4。

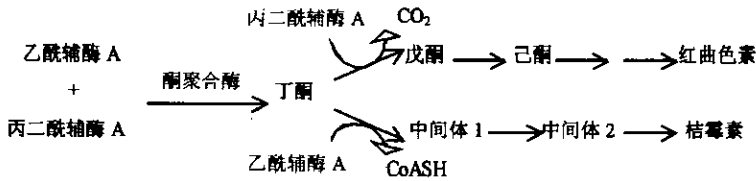


图 4 红曲霉桔霉素和色素的代谢途径

由上图可知,红曲霉色素和桔霉素的合成开始是以共同的代谢途径进行的,直至丁酮形成后,两者分开,分别通过色素分支代谢途径和桔霉素分支代谢途径继续合成红曲色素和桔霉素。如果突变子的色价和桔霉素同时升高或降低,那就有可能是两者共同代谢途径中的调控酶,例如酮聚合酶发生了变化;若是突变子的色价和桔霉素变化不一致,可能就是色素和桔霉素分支代谢途径中的调控酶发生了变化。若能找到调控桔霉素分支代谢途径中的酶基因,使其沉默,就可以破坏桔霉素的产生而不影响红曲色素的产量。

本课题组在 5,000 多株红曲霉转化子中,筛选得到色价与桔霉素含量均降低的 515[#]、805[#]、3257[#],两者都提高的 959[#]、2887[#];以及色价降低桔霉素含量升高的 1263[#]、635[#],色价升高但桔霉素降低的 4968[#],共 8 株突变子。以这些突变子为实验材料,用分子生物学手段获得它们被插入位点的基因序列,从而得到该基因编码的蛋白,就可能进一步完善 Hajjaj 关于红曲霉中桔霉素和色素的代谢途径,并获得不产桔霉素且不影响色素产量的红曲霉菌株。

参考文献

- [1] 方元超,杨 柳. 江苏食品与发酵, 1999, 1: 19~24.
- [2] 傅金泉. 中国红曲及其实用技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] 李 云, 阎雪秋. 食品与发酵工业, 2000, 26 (3): 82~86.
- [4] 雷帮星, 杨国彬, 税小波, 等. 贵州化工, 2004, 29 (5): 12~15.
- [5] 李钟庆, 郭 芳. 红曲菌的形态与分类学. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [6] Wang J J, Lee C L, Pan T M. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 669~676.
- [7] 孟昭赫, 张国柱, 宋圃菊. 真菌毒素研究进展. 北京: 人民出版社, 1979.
- [8] Frisvad J C. Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. London: Academic Press, 1986. 415~457.
- [9] Wong H C, Koehler P E. Food Sci, 1981, 46 (2): 589~592.
- [10] Blanc P J, Laussac J P, Le Bars J, et al. Int J Food Microbiol, 1995, 27: 201~213.
- [11] 赖卫华, 许 杨. 食品科学, 2002, 23 (7): 139~141.
- [12] Wang J J, Lee C L, Pan T M. J Agric Food Chem, 2004, 52: 6977~6982.
- [13] 胡晓清, 袁梦仙, 陈福生, 等. 食品科学, 2003, 24 (5): 126~129.
- [14] Xu B J, Jia X J, Gu L J, et al. Food Control, 2005, 17 (4): 271~285.
- [15] 许赣荣, 陈 蕴, 虞慧玲, 等. 食品与发酵工业, 2002, 28 (10): 59~64.
- [16] 宫慧梅, 赵树欣. 食品研究与开发, 2002, 23 (3): 24~26.
- [17] 许赣荣, 陈 蕴. 无锡轻工大学学报, 2000, 19 (4): 358~360.
- [18] Chen F S, Hu X Q. Int J Food Microbiol, 2005, 103 (9): 331~337.
- [19] Hajjaj H. Appl Envir Microbiol, 1999, 65 (1): 311~314.