

赭曲霉毒素 A 的生物合成和调控机制研究进展

王薇薇, 闫 静, 李 军*, 朱凤妹*

(河北科技师范学院食品科技学院, 秦皇岛 066600)

摘 要: 赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 是一种由曲霉或青霉产生的次级代谢产物。赭曲霉毒素 A 不仅有肾毒性、肝毒性、免疫毒性、致畸致癌致突变性, 还有肠道毒性, 对人体有多种毒害作用。赭曲霉毒素 A 的合成途径已取得了一定的研究进展, 但一些中间产物和相关酶仍然需要进一步验证。本文对 OTA 的毒性、与 OTA 合成有关的基因、生物合成途径、全局调控因子、途径特异性调控因子和环境信号、防控策略和脱毒等进行了综述, 以期对 OTA 的合成途径有更进一步的认识, 对 OTA 的产生和防控提供科学的理论参考。

关键词: 赭曲霉毒素 A; 合成途径; 调控机制; 全局调控因子

Research progress on biosynthesis and regulation mechanism of ochratoxin A

WANG Wei-Wei, YAN Jing, LI Jun*, ZHU Feng-Mei*

(College of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China)

ABSTRACT: Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by *Aspergillus* or *Penicillium*. OTA not only has nephrotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, teratogenicity, carcinogenicity and mutagenicity, but also has intestinal toxicity, which has many toxic effects on human body. The synthetic pathway of OTA has made some progress, but some intermediate products and related enzymes still need further verification. This paper reviewed the toxicity, genes related to OTA synthesis, biosynthetic pathways, global regulatory factors, pathway-specific regulatory factors and environmental signals, prevention, control strategies and detoxification of OTA, in order to have a further understanding of OTA synthesis pathway, and provide scientific theoretical reference for OTA generation and prevention and control.

KEY WORDS: ochratoxin A; synthetic pathway; regulation mechanism; global regulatory factor

0 引 言

赭曲霉毒素(ochratoxin)是由曲霉属和青霉属产生的一类次级代谢产物, 该类物质以异香豆素交联 L-苯丙氨酸为基

本结构, 在此基础上可衍生出 20 多种化合物, 其中以赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 含量最高、分布最广且毒性最强^[1]。1965 年, VAN 等^[2]首次发现 OTA 是赭曲霉的一种有毒真菌代谢产物。OTA 的分子式为 C₂₀H₁₈ClNO₆, 其物理化学性质稳

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570374、31470542)、河北省重点研发计划项目(21372801D)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570374, 31470542), and the Key Research and Development Program Project of Hebei Province (21372801D)

*通信作者: 李 军, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: spgcx@163.com

朱凤妹, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: zhufengmei0714@163.com

*Corresponding author: LI Jun, Ph.D, Professor, Hebei Normal University of Science & Technology, Hebei, Qinhuangdao 066600, China. E-mail: spgcx@163.com

ZHU Feng-Mei, Ph.D, Professor, Hebei Normal University of Science & Technology, Hebei, Qinhuangdao 066600, China. E-mail: zhufengmei0714@163.com

定, 很难降解。OTA 天然存在于各种人类食物中, 如谷物、谷类产品、水果、蔬菜、肉、蛋、乳制品、干制品、葡萄酒, 甚至婴儿配方奶粉中^[3-5], 对人类健康产生威胁。大量研究发现, 巴尔干地方病肾病(Balkan endemic nephropathy, BEN)的发生就与 OTA 有关^[6]。OTA 主要由曲霉属和青霉属产生, 根据气候条件, 它们以不同的分布方式污染不同的作物。曲霉属物种在温带地区占优势, 而青霉属菌株则在寒冷地区更常见^[6-8]。我国是真菌毒素污染最严重的国家之一, OTA 是仅次于黄曲霉毒素的第二大污染物, 联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)估计每年有高达 25%的粮食受到真菌毒素的污染, 而实际真菌毒素污染发生率远高于这一数值^[9-10]。

1993 年, 国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将 OTA 划为人类可能的致癌物(2B 类)^[11]。OTA 具有肾毒性、肝毒性、胚胎毒性、致畸性、神经毒性、免疫毒性、遗传毒性和致癌性以及肠道毒性等, 并存在物种和性别差异^[6]。OTA 诱导毒性机制主要包括: 诱导氧化应激、破坏转录调控、抑制蛋白质合成、干扰代谢酶、干扰细胞信号传导、诱导细胞凋亡、周期停滞, 激活细胞自噬以及各机制之间的相互作用, 这些作用共同导致了 OTA 的毒性。

鉴于 OTA 的危害性, 世界各国都对各种食品中的 OTA 含量制定标准进行了限定^[9]。目前针对 OTA 的检测研究已较为成熟^[12-15], 其检测技术多样, 快速检测技术发展迅猛, 但在检出限和灵敏度方面还需进一步提高。只有对其合成机制进行深度探究, 才能从根本上阻断 OTA 的产生。随着分子生物学的发展, 有研究发现所有产 OTA 的真菌中都存在着一条一致的 OTA 生物合成途径。控制真菌毒素 OTA 合成的基因往往在同一条基因簇上, 目前发现其基因簇中包含一个聚酮合酶基因(polyketone synthase, *PKS*), 一个非核糖体肽合成酶基因(non-ribosomal peptide synthetase, *NRPS*), 一个 *p450* 单加氧酶基因, 一个卤代酶基因和一些全局调控因子^[16]。其中聚酮化合物合酶和非核糖体肽合成酶是参与细菌、真菌等微生物产生的代谢产物生物合成的大型多调节酶^[17-19]。还有一些全局调控基因控制着 OTA 的生成, 但这个过程因菌株种类不同, 或许存在些许差异。本研究通过综述赭曲霉毒素 A 的毒性、真菌中赭曲霉毒素 A 的产生菌株、生物合成途径、合成过程中特异性调控和全局性调控途径, OTA 的防控和脱毒, 以期研究赭曲霉毒素 A 的生物合成和调控机制提供理论参考。

1 赭曲霉毒素 A 毒性研究

1.1 肾毒性和肝毒性

肾脏是 OTA 毒性作用的主要靶器官, 肝脏是次要靶器官^[20]。哺乳动物肾毒性临床表现一般为少尿、尿频、蛋白尿等, 对实验动物解剖可见肾脏肿大或萎缩, 肾小球变

形以及肾小管坏死等病变。饲喂 OTA 污染的饲料可导致动物肝细胞损伤, 肝脏肿大^[21-23]。

1.2 免疫毒性

OTA 在动物饲料中广泛存在, 可诱发机体产生严重的免疫毒性, 对动物危害严重, 但具体机制尚不完全清楚^[24]。OTA 的免疫毒性可导致重要的免疫器官如胸腺、淋巴结等重量减轻, 导致特异性和非特异性免疫功能障碍。

1.3 OTA 的致癌致畸致突变作用

OTA 还具有致畸、致癌和致突变的三致作用^[25]。这些作用的发生与 OTA 诱导氧化应激、细胞凋亡、干扰细胞信号转导等有关^[26-31]。

1.4 肠道毒性

最近的研究表明, OTA 具有肠道毒性^[32-33]。胃肠道对人体健康至关重要, 可能接触到许多受污染的食物和高浓度的霉菌毒素, 是人体内部环境和外部环境之间的一道屏障。但具体毒性机制与上述毒性类似, 可导致肠道细胞凋亡等。

综上所述, 赭曲霉毒素 A 除了具有肾毒性、肝毒性、免疫毒性、致癌致畸致突变作用外, 还具有肠道毒性, 具体致毒途径有待进一步研究。

2 赭曲霉毒素 A 的分子生物学合成机制研究

2.1 曲霉中与 OTA 合成相关基因的发现

真菌中合成次级代谢产物的基因通常在染色体上成簇存在。在 OTA 生物合成基因簇中, *PKS* 和 *NRPS* 是簇中的核心基因, 在次级代谢产物 OTA 的合成中起关键作用, 另外还包括一个 *p450* 单加氧酶基因, 一个卤代酶 *HAL* 基因和一些全局调控因子。目前关于 OTA 生物合成相关基因的克隆、敲除与分析工作多是针对 *PKS* 和 *NRPS* 和一些全局性调控基因展开^[34]。以下是已发现的和 OTA 产生有关的一些基因, 如表 1。

通过这些基因的发现, 可以找到与 OTA 合成有关的关键基因, 对研究 OTA 的生物合成途径提供指导。此外还存在一些全局性的调控因子, 通过控制生物合成基因簇中的基因进而控制赭曲霉毒素 A 的产生, 但具体机制尚不完全清楚。通过表 1 也可看出, 不同曲霉和青霉中与 OTA 有关的基因大致相同, 且位于同一基因簇中, 只是在不同种属之间存在些许差异, 这也为 OTA 的合成途径的研究提供理论基础。

2.2 OTA 生物合成途径

近年来, 人们对 OTA 生物合成方面进行了大量的研究, 但对 OTA 簇的长度和组成的研究还不够完善。关键酶如 *PKS*、*NRPS*、卤素酶及其作用已被确定在几个 OTA 生物物种中存在且起到关键作用。截至目前, 已经提出了几种 OTA 的生物合成途径。

表 1 曲霉和青霉中和 OTA 产生有关的基因
Table 1 Genes related to OTA production in *Aspergillus* and *Penicillium*

实验菌株	相关基因及 NCBI 序列号	作者	参考文献
<i>Aspergillus ochraceus</i> HP99	<i>PKS</i> (AY272043)	O'CALLAGHAN 等	[35]
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	假定的 OTA 簇(An15g07880~An15g07920)	PEL 等	[36]
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> NRRL 3174	<i>PKS</i> (aoks1) (AY583209)	NAFEES 等	[37]
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> NRRL 3174	<i>PKS</i> (aolc35-12) (AY583208)	BACHA 等	[38]
<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM5010	<i>AcOTApks</i>	GALLO 等	[39]
<i>Penicillium nordicum</i> BFE487	<i>otapksPN</i> (AY196315)、 <i>otanpsPN</i> (AY534879)、 <i>aspPN</i> (AY557343)	GEISEN 等	[40]
<i>Aspergillus westerdijkia</i> CBS 112803	一个基因簇: <i>PKS</i> 、 <i>NRPS</i> 、细胞色素 <i>p450</i> 单加氧酶、 <i>HAL</i> 和 <i>bZIP</i> 转录调节因子(awe04182~awe04186)	HAN 等	[41]
<i>Penicillium verrucosum</i> BT 22713	<i>otapksPV</i>	O'CALLAGHAN 等	[42]
<i>Aspergillus niger/Aspergillus welwitschiae</i>	假定的 OTA 簇 <i>ota1~ota5</i> (An15g07880~An15g07920)	ANTONIA 等	[43]
<i>Aspergillus ochraceus</i> fc-1	<i>AoOTApks-1</i> 、 <i>AoOTApks-2</i>	WANG 等	[44]
<i>Penicillium nordicum</i>	<i>otapksPN</i> 、 <i>otanpsPN</i> 、 <i>aspPN</i>	KAROLEWIEZ 等	[45]
<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>otanpsPN</i> 、 <i>aspPN</i>	GEISEN 等	[46]

最早, 根据 HUFF 等^[47]的推测, OTA 作为一种聚酮化合物, 其合成方式类似于脂肪酸合成的碳链延长途径。OTA 合成开始于乙酰辅酶 A (acetyl CoA)和丙二酰辅酶 A (melonyl CoA)在 *PKS* 催化下的缩合反应, 进而形成蜂蜜曲霉素(mellein)。蜂蜜曲霉素可以经羧酸化形成赭曲霉毒素 β (OT β)。接下来 OT β 在氯化物过氧化物酶的作用下转变为赭曲霉毒素 α (OT α)。OT α 经磷酸化后连接苯基丙氨酸的乙酯形成赭曲霉毒素 C (OTC)。最终 OTC 经脱脂后形成 OTA^[48]。但这一过程中有些过程只是猜测, 在后来证实并不完全正确。

如 HARRIS 等^[49]认为, 在前文所述途径中 OT α 可直接与苯丙氨酸结合生成 OTA, 且 OTC 并非是合成 OTA 的中间代谢物, 同时他们还提出了另外一种合成途径, 即从 OT β 到 OTB 最后到 OTA 的生物转化过程。随后 HUFFMAN 等^[50]阐述了聚酮化合物在 OTA 的生物合成中的作用。GALLO 等^[51]通过培养和检测 *A. carbonarius* 及其突变菌株培养过程中化合物的产生状况, 推断新的 OTA 生物合成路径, 首次加入了 *NRPS* 在 OTA 合成中的催化作用。并且认为 OT α 是 OTA 水解的副产物。OT β 可与 *L*-苯丙氨酸通过 *NRPS* 催化生成 OTB, 然后经卤化酶催化加氯生成 OTA。

GALLO 等^[52]进一步对 OTA 的生物合成途径进行研究, 称 OTA 是由聚酮二氢异香豆素通过酰胺键与氨基酸苯丙氨酸连接而成的杂化分子。从戊酮类化合物的结构出发, 推测由乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 形成异香豆素五酮类化合物需要 *PKS* 酶, *NRPS* 对于二氢异香豆素和通过莽草酸途径合成的苯丙氨酸之间的联系是必不可少的。最后, 需要卤化步骤将氯原子添加到分子中。可能还涉及到其他酶,

如氧化酶、酯酶、转运体和转录因子, 并且明确 OT α 不在此途径中起作用。

WANG 等^[53]假设 OTA 生物合成始于 *PKS* (记为 OtaA), 它结合了乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 来合成 7-甲基蜂蜜曲霉素。然后用细胞色素 P450 单加氧酶(记为 OtaC)氧化 7-甲基蜂蜜曲霉素生成 OT β 。OT β 和 *L*-苯丙氨酸被 *NRPS*(记为 OtaB)结合形成酰胺键和 OTB。OTB 由卤代酶(记为 OtaD)氯化, 得到最终产物 OTA, 并再次证实了 OTC 和 OT α 并非 OTA 生物合成的中间体, OTB 和 OT β 才是合成 OTA 的关键中间代谢物, 如图 1^[53]。这是目前提出的一个单一的用于合成 OTA 生化途径。对研究 OTA 的合成具有重要意义。

在此基础上, FERRARA 等^[54]通过比较基因组分析证明, 在所有分析物种的集群中, 聚酮化合物和非核糖体合酶基因之间可能还存在一个以前未描述的额外基因。该基因序列中存在一个 *SnoAL* 环化酶(记为 OtaY)结构域, 支持其在 OTA 生物合成途径初始步骤中的聚酮环化反应中的假定作用。系统发育分析显示, 在物种和区域水平上, OTA *SnoAL* 结构域的聚集与 OTA 生产种的系统发育一致。该文章首次报道了这种新的 OTA 基因的特征, 并通过比较基因组分析说明产 OTA 的菌种基因簇的差异, 如图 2。

OTA 的生物合成步骤最初是由它的结构组成预测的。近 10 年来, 关于 OTA 生物合成途径及其分子机制的研究受到了广泛关注, 也取得了一定的进展。如其合成步骤大概可分为 4 步, 一些中间产物虽然已被证明, 但一些酶的作用还需进一步证明。因此 OTA 生物合成途径所涉及的基因簇和酶促步骤仍需进一步研究。

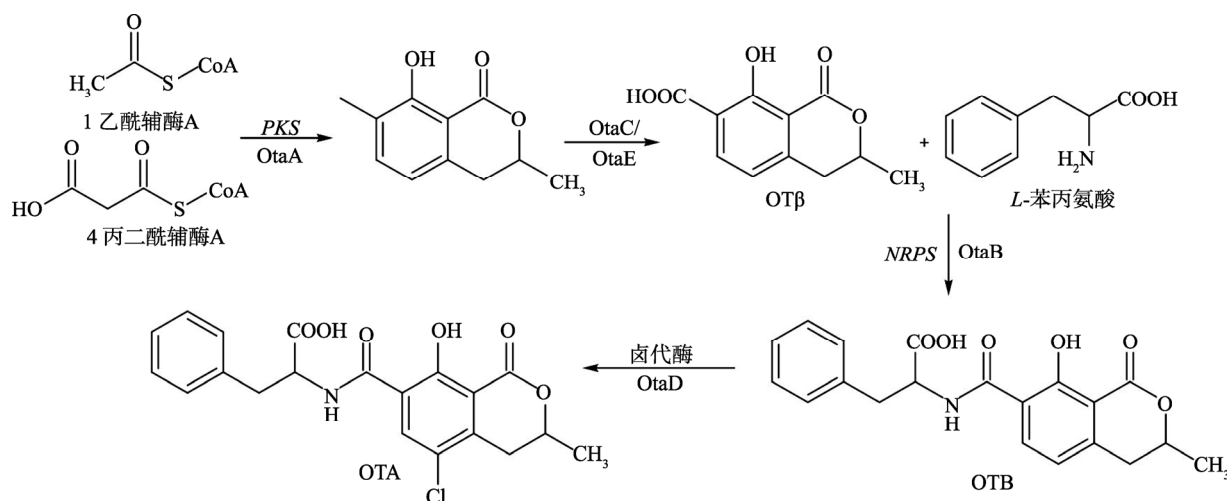
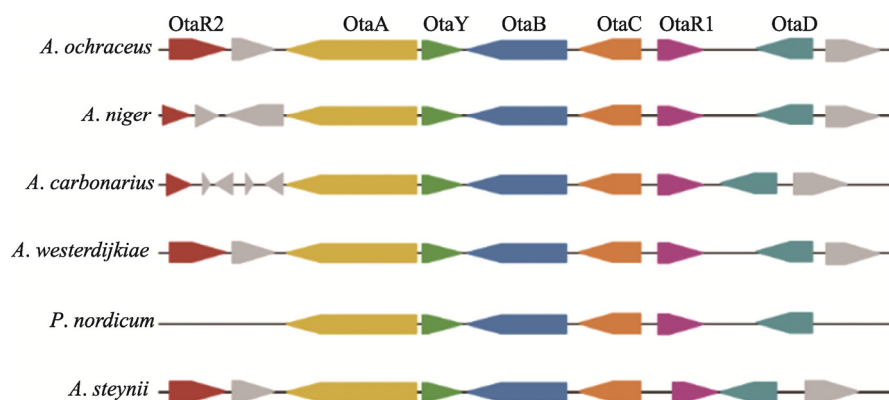


图 1 假设的 OTA 生物合成途径
Fig.1 Hypothetical OTA biosynthetic pathway



注: OtaR1 为途径特异性调控基因; otaR2 为锌指 DNA 结合蛋白。

图 2 根据基因的作用预测了 OTA 生物合成基因簇

Fig.2 OTA biosynthetic gene cluster predicted according to gene action

3 赭曲霉毒素 A 合成的调控机制研究

除了一些关键酶基因外, 一些调控因子也会影响赭曲霉毒素 A 的产生。本节将从特异性调控、全局性调控和环境信号 3 个方面讨论 OTA 合成过程中的调控途径。

3.1 OTA 产生的途径特异性调控

途径特异性调控是指参与调控的基因位于次级代谢物生物合成基因簇内, 其编码产物直接调控基因簇内基因的转录。途径特异性调控较全局调控相对简单和直接。例如, 在黄曲霉毒素生物合成基因簇中, *aflR* 通过与除 *aflJ* 以外的所有生物合成基因的启动子区结合并激活它们的转录来正向调节黄曲霉毒素和杂色曲霉毒素(柄曲霉素)的合成^[55-56]。此外, 伏马菌素、玉米赤霉烯酮、T-2 毒素的产生都受相应基因的调控^[57]。总的来说, 一种或多种生物合成途径特异性调节剂位于许多真菌毒素生物合成基因簇中, 控制其生物

合成基因的表达并影响真菌毒素产生。因此猜测可能存在一种途径特异性调节基因, 通过调节 OTA 生物合成基因的表达谱来控制 OTA 的产生。

3.2 OTA 生物合成的全局性调控

3.2.1 Velvet 复合控制 OTA 生产

真菌的次级代谢是一个复杂的、多层次的调控过程, 其生物合成不仅受途径特异性转录因子的调控, 还受到全局性调控因子的控制^[58]。它们并不以基因簇的形式存在, 却可以调控次级代谢途径中某些关键基因的表达。在诱导丝状真菌产生次级代谢物时, 外界环境刺激是一个很重要的因素, 而全局性调控因子在其中起着关键作用^[59]。全局性调控因子通过调控相关基因的转录激活影响多种次级代谢物的产生, 包括降血脂药物洛伐他汀等有益次级代谢产物和赭曲霉毒素等有害次级代谢产物^[60]。BOK 等^[61]首次从构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中分离鉴定到了 *LaeA* 基因, 它是一种全局性的调控因子, 它的发现对丝状真菌的

生长发育和次级代谢产物的研究具有重要意义。大量研究表明, *LaeA* 可以调节多个次级代谢基因簇的表达和次级代谢产物的产生, URIEL 等^[62]通过对 *LaeA* 进行敲除, 并与野生型菌株 OTA 产量进行对比发现 *LaeA* 突变型菌株可大大减少 OTA 的产生。

BAYRAM 等^[63]在构巢曲霉中发现 *VeA* 作为桥梁可连接 *LaeA* 和 *VelB*, 使其成为异源三聚体, 命名为 Velvet 复合物。光照条件下, *VeA* 大部分存在细胞质中, 无法作为桥梁连接 *LaeA* 和 *VelB* 形成 Velvet 复合物, 而处于黑暗条件时, *VeA* 进入细胞核, *VelB* 也随着 *VeA* 进入核内并增多, 从而形成影响次级代谢物基因簇表达的 Velvet 复合物, 进而促进次级代谢产物的生成^[64-65], 如图 3^[63]。

综上, *LaeA* 在 OTA 的生物合成中作为全局性调控基因可以影响 OTA 的生成, 且受光照影响较大, 但具体作用机制有待于进一步研究。

3.2.2 全局调控因子 *McrA*

与 *LaeA* 的作用相反, 在真菌中还存在着一种次级代谢产物负调节子 *McrA*, 全称 multicluster regulator A, 已在某些真菌中证实 *McrA* 基因的缺失会促进次级代谢物的产生^[64], 因此是一种负调节因子。且无论 *LaeA* 是否存在、缺失或过表达, *McrA* 都会发挥作用, 证明 *McrA* 独立于 *LaeA* 表达。

3.3 环境信号参与的 OTA 次级代谢调控

3.3.1 氧化应激

氧化应激是由于细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量高, 使细胞内氧化还原状态失衡, 进而引起菌体的一系列应激反应。低浓度的 ROS 可以刺激次级

代谢物的合成; 而高浓度的 ROS 则对细胞有毒, 甚至会导致细胞死亡。真菌通过激活相关基因的表达来降解活性氧, 从而修复和维持细胞的动态平衡, 同时也不利于次级代谢物的产生。研究发现, *LaeA* 的缺乏会导致黑曲霉对 H_2O_2 的耐受性降低, 抗氧化酶活性降低, 导致氧化应激下黑曲霉细胞内抗氧化酶活性低于正常活性水平, 表明 *LaeA* 蛋白可调节黑曲霉的氧化耐受性^[66]。

氧化应激的调节与真菌毒素生物合成之间存在内在联系, 如氧化应激相关转录因子 *Yap1* 会影响 OTA 或黄曲霉毒素的合成^[67-68]。REVERBERI 等^[69]的研究揭示 OTA 的产生与脂质过氧化高度相关, 脂肪氧合酶(lipoxygenase, LOX)基因(*AoloxA*)的失活在菌落形态、分生孢子形成和菌核产生方面表现出不同的表型, LOX 活性较低, 亚油酸衍生的一些氧化脂质水平也降低, 并显著抑制 OTA 的产生。

3.3.2 碳源和氮源影响 OTA 的产生

营养物质的可利用性通常是为了适应真菌的环境因素而调节的。ANGEL 等^[70]发现在不同碳源条件下, 从葡萄中分离的 3 个曲霉属菌株的 OTA 产量存在显著差异, 并且 OTA 水平与碳源含量呈正相关, 但氮源对 OTA 的产生并没有显著差异。碳源和氮源作为主要的营养源, 被认为会影响 OTA 的产生。氮代谢已被定义和证实^[71]。如在构巢曲霉中, 氮分解代谢的调节已被详细描述为一个由几个转录因子 *AreA*、*NmrA* 和 *MeaB* 组成的复杂网络。

综上, 除了碳源和氮源其他营养源对 OTA 生产的调控报道较少, 有待进一步研究。

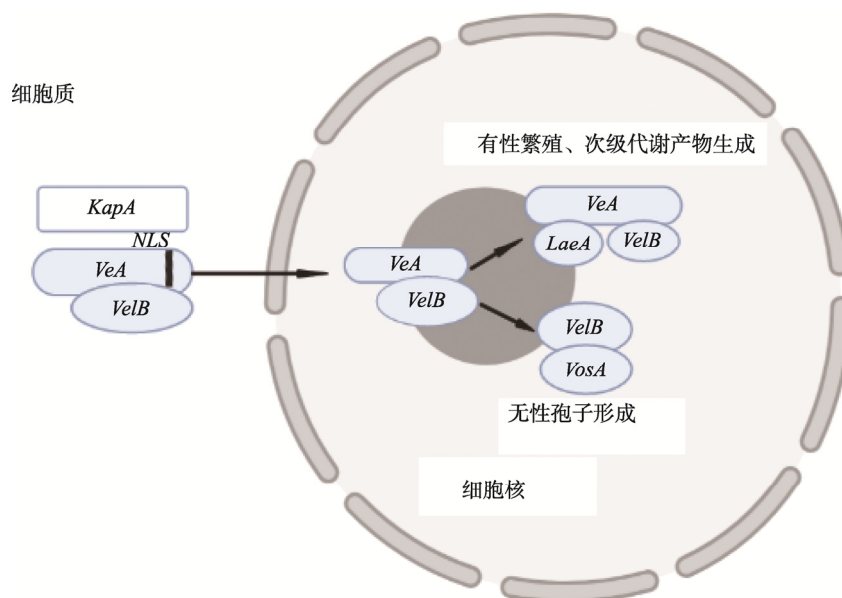


图 3 Velvet 复合体中全局转录因子之间的协同作用

Fig.3 Synergy among global transcription factors in Velvet complex

3.3.3 pH 调节 OTA 的生物合成

pH 被认为是影响真菌生长、发育和次生代谢物合成的关键因素。许多真菌可以在很宽的酸碱度范围内生长良好, 其中某些基因的表达与环境酸碱度有关^[72]。WANG 等^[73]研究发现与中性条件下相比, 在 pH 4.5 和 10.0 条件下, 赈曲霉产生 OTA 的量分别降低 71.6% 和 79.8%, 其中 *AopacC* 是响应环境 pH 变化的调控因子, 当环境中 pH 升高时, *AopacC* 表达量升高, 当 *AopacC* 基因被敲除后, 结构基因 *Aopks* 表达量降低, OTA 产量降低。由此可见, pH 会影响基因的表达进而影响 OTA 的合成。

3.3.4 温度和水分活度影响 OTA 的产生

温度是环境影响 OTA 形成的重要因素之一。25~30 °C 之间被认为是最佳的 OTA 产生温度^[74]。低于或高于这一温度都不会产生, 其他真菌毒素类似。而水分活度也是重要环境因素之一, 通常水分活度 0.9 以上且温度适宜才可产生 OTA。温度和水分活度之间还可以相互影响, 某一因素达不到也会阻断真菌毒素的产生。

3.3.5 渗透胁迫

研究表明, 一些信号级联途径可以通过激活生物合成基因在真菌毒素产生中发挥重要作用。青霉中赈曲霉毒素 A 的生物合成依赖于氯化钠浓度, 并通过高渗透压甘油 (high osmolarity glycerol, HOG) 的磷酸化途径进行调节^[75]。虽然实验似乎证实了 HOG 和 OTA 产生之间的相关性, 但在高渗透胁迫下 OTA 产生菌和非产生菌之间存在差异的原因以及不同的机制是否参与通过信号转导调节 OTA 产生的问题需要进一步研究。

4 赈曲霉毒素 A 防控策略和脱毒

目前, 粮食、水果及其制品中真菌毒素污染时常发生, OTA 污染的风险控制至关重要。抑制产毒菌的侵染是污染防控的关键前提。控制策略可分为物理、化学和生物方法^[76-77]。生物脱毒主要是通过生物吸附或酶促反应降解毒素或修饰毒素分子结构从而达到脱毒的目的, 具有环保、无残留、效果好等优势。对于已经被 OTA 污染的样品, 辐照处理可大大提高 OTA 的降解率^[78]。

5 结论和展望

赈曲霉毒素 A 是曲霉和青霉的次级代谢产物, 对人和动物有多重毒性作用, 研究 OTA 的生物合成途径和调控机制意义重大。目前为止, 已发现一些关键基因和全局性调控因子和 OTA 的生成有关, 并通过基因敲除技术得到了验证, 如 *PKS*、*NRPS* 等, 但具体合成途径和某些致毒机制还有待进一步研究。实验研究证明, 真菌毒素的产生可能是霉菌对保护自身做出的正常反应, 且真菌毒素 OTA 在不同菌种中的合成途径大体一致, 但在不同种属间存在些许差异。未来在延续传统研究方法的同时从基因组学、转录

组学和蛋白组学的方法上挖掘新的 OTA 合成调控的关键基因对现有合成途径进行补充是未来研究 OTA 生物合成机制的重点。

参考文献

- [1] 朱柳杨, 陈浩宇, 李敏, 等. 黑曲霉产赈曲霉毒素 A 合成培养基的设计及产毒优化[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 127-130.
- [2] ZHU LY, CHEN HY, LI M, *et al.* Design of synthetic medium for ochratoxin A produced by *Aspergillus niger* and optimization of its production [J]. *Chin Brew*, 2017, 36(2): 127-130.
- [3] VAN D, STEYN PS, FOURIE L, *et al.* Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh [J]. *Nature*, 1965, 205(4976): 1112-1113.
- [4] BUI-KLIMKE TR, WU F. Ochratoxin a and human health risk: A review of the evidence [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(13). DOI: 10.1080/10408398.2012.724480
- [5] LIANG ZH, HUANG KL, LUO YB. Ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi on cereal grain in China: A review [J]. *Food Addit Contam A*, 2015, 32(4): 461-470.
- [6] RAIOLA A, TENORE GC, MANYES L, *et al.* Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015. DOI: 10.1016/j.fct.2015.08.023
- [7] FRANTISEK M, VLADIMIR O, ANNIE PL, *et al.* Ochratoxin A: 50 years of research [J]. *Toxins*, 2016, 8(7): 191.
- [8] JESSICA GS, BELÉN P, LAURA C, *et al.* *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates [J]. *Food Microbiol*, 2015, 46: 168-175.
- [9] ZHANG XY, LI YL, WANG HY, *et al.* Screening and identification of novel ochratoxin a-producing fungi from grapes [J]. *Toxins*, 2016, 8(11): 333.
- [10] 尚艳娥, 杨卫民. CAC、欧盟、美国与中国粮食中真菌毒素限量标准的差异分析[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(1): 10-15.
- [11] SHANG YE, YANG WM. Analysis on the difference of limit standard of mycotoxin in grain of CAC, EU, USA and China [J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 37(1): 10-15.
- [12] ESKOLA M, KOS G, ELLIOTT CT, *et al.* Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25% [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2019.1658570
- [13] OCHRATOXIN A. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constitutions, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [Z]. 1993.
- [14] 孔德莉, 罗思, 彭瑞晨, 等. 基于无标记金纳米簇的新型荧光生物传感器在赈曲霉毒素 A 快速检测中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 263-270.
- [15] KONG DL, LUO S, PENG RC, *et al.* Application of a new fluorescent biosensor based on unlabeled gold nanoclusters in rapid detection of ochratoxin A [J]. *Food Sci*, 2021, 42(4): 263-270.
- [16] ZHAO H, XIANG XY, CHEN MJ, *et al.* Aptamer-based fluorometric ochratoxin A assay based on photoinduced electron transfer [J]. *Toxins*, 2019, 11(2): 65.
- [17] ZHU CX, LIU D, LI YY, *et al.* Ratiometric electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of Ochratoxin A based on a dual signal

- amplification strategy: Engineering the binding of methylene blue to DNA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111814.
- [15] WU KF, MA CB, ZHAO H, *et al.* Sensitive aptamer-based fluorescence assay for ochratoxin A based on RNase H signal amplification [J]. *Food Chem*, 2019, 277(30): 273–278.
- [16] 陈美榕, 张梦薇, 刘舒雯, 等. 黑曲霉中生物合成赭曲霉毒素 A 的非核糖体肽合成酶基因的鉴定[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 556–565.
CHEN MR, ZHANG MW, LIU SW, *et al.* identification of non-ribosomal peptide synthetase gene for biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus niger* [J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 556–565.
- [17] 薛永常, 张成锁, 李根. 非核糖体肽合成酶基因腺苷酰化结构域序列克隆及分析[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(1): 20–25.
XUE YC, ZHANG CS, LI G. Cloning and analysis of adenylation domain sequence of non-ribosomal peptide synthetase gene [J]. *J Microbiol*, 2019, 39(1): 20–25.
- [18] 贾晓迪, 李力. 真菌聚酮酶及相关化合物的应用[J]. *精细与专用化学品*, 2020, 28(5): 6–10.
JIA XD, LI L. Application of fungal polyketide synthase and related compounds [J]. *Fine Spec Chem*, 2020, 28(5): 6–10.
- [19] GALLO A, FERRARA M, PERRONE G. Phylogenetic study of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins [J]. *Toxins*, 2013, 5(4): 717–742.
- [20] 何随彬, 李好磊, 李步社, 等. 赭曲霉毒素 A 的毒性作用及致毒机理研究进展[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2020, (4): 9–12.
HE SB, LI HL, LI BS, *et al.* Research progress on toxicity and mechanism of ochratoxin A [J]. *Shanghai Anim Husband Vet Commun*, 2020, (4): 9–12.
- [21] DIANA R, ABALO C, YVES-JACQUES S, *et al.* Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update [J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 159(1): 18–46.
- [22] SHIN HS, LEE HJ, MIN CP, *et al.* Ochratoxin A-induced hepatotoxicity through phase I and phase II reactions regulated by AhR in liver cells [J]. *Toxins*, 2019, 11(7): 377.
- [23] GAN F, ZHOU YJ, HOU LL, *et al.* Ochratoxin A induces nephrotoxicity and immunotoxicity through different MAPK signaling pathways in PK15 cells and porcine primary splenocytes [J]. *Chemosphere*, 2017, 182: 630–637.
- [24] MARIN DE, TARANU I. Ochratoxin A and its effects on immunity [J]. *Toxin Rev*, 2015, 34(1): 11–20.
- [25] DIANA H, PETER M. Rat tumour histopathology associated with experimental chronic dietary exposure to ochratoxin a in prediction of the mycotoxin's risk for human cancers [J]. *Toxins*, 2021. DOI: 10.3390/toxins13030205
- [26] TAO YF, XIE SY, XU FF, *et al.* Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 112: 320–331.
- [27] YANG Q, HE X, LI X, *et al.* DNA damage and S phase arrest induced by Ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK 293) [J]. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2014. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.001
- [28] WANG Y, LIU J, CUI JF, *et al.* ERK and p38 MAPK signaling pathways are involved in ochratoxin A-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 209(2): 186–192.
- [29] LIU J, WANG Y, CUI JF, *et al.* Ochratoxin A induces oxidative DNA damage and G1 phase arrest in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 211(2): 164–171.
- [30] LIANG R, SHEN XL, ZHANG BY, *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 promotes ochratoxin A-induced renal cytotoxicity [J]. *Sci Rep-UK*, 2015. DOI: 10.1038/srep08078
- [31] LI X, GAO J, HUANG K, *et al.* Dynamic changes of global DNA methylation and hypermethylation of cell adhesion-related genes in rat kidneys in response to ochratoxin A [J]. *World Mycotoxin J*, 2015. DOI: 10.3920/wmj2014.1795
- [32] WANG H, ZHAI NH, CHEN Y, *et al.* OTA induces intestinal epithelial barrier dysfunction and tight junction disruption in IPEC-J2 cells through ROS/Ca²⁺-mediated MLCK activation [J]. *Environ Pollut*, 2018, 242: 106–112.
- [33] CHEN Y, WANG H, ZHAI NH, *et al.* Nontoxic concentrations of OTA aggravate DON-induced intestinal barrier dysfunction in IPEC-J2 cells via activation of NF- κ B signaling pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 311: 114–124.
- [34] 王小霞. 赭曲霉毒素 A 及其产生菌的检测方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
WANG XX. Study on the detection method of ochratoxin A and its producing strain [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.
- [35] O'CALLAGHAN J, CADDICK MX, DOBSON ADW. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* [J]. *Microbiology*, 2003, 149(12): 3485–3491.
- [36] PEL HJ, WINDE JD, ARCHER DB, *et al.* Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 [J]. *Nat Biotechnol*, 2007. DOI: 10.1038/nbt1282
- [37] NAFEES B, ALI A, FLORENCE M, *et al.* *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene 'aoks1' is involved in the biosynthesis of ochratoxin A [J]. *Fungal Genet Biol*, 2008, 46(1): 77–84.
- [38] BACHA N, MATHIEU F, LIBOZ T, *et al.* Polyketide synthase gene aoc35-12 controls the differential expression of ochratoxin A gene aoks1 in *Aspergillus westerdijkiae* [J]. *World Mycotoxin J*, 2012, 5(2): 177–186.
- [39] GALLO A, KNOX BP, BRUNO KS, *et al.* Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.013
- [40] GEISEN R, SCHMIDT-HEYDT M, KAROLEWIEZ A. A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium* [J]. *Mycotoxin Res*, 2006, 22(2): 134–141.
- [41] HAN X, CHAKRABORTTI A, ZHU J, *et al.* Sequencing and functional annotation of the whole genome of the filamentous fungus *Aspergillus westerdijkiae* [J]. *BMC Genom*, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2974-x
- [42] O'CALLAGHAN J, COGLAN A, ABBAS A, *et al.* Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 161(3): 172–181.
- [43] ANTONIA S, PROCTOR RH, MASSIMILIANO M, *et al.* Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1412.
- [44] WANG LQ, WANG Y, WANG Q, *et al.* Functional characterization of new polyketide synthase genes involved in ochratoxin A biosynthesis in

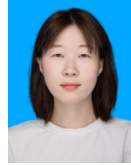
- Aspergillus ochraceus* fc-1 [J]. *Toxins*, 2015, 7(8): 2723–2738.
- [45] KAROLEWIEZ A, GEISEN R. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2005, 28(7): 588–595.
- [46] GEISEN R, SCHMIDT-HEYDT M, TOUHAMI N, *et al.* New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium* [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 23: 23–31.
- [47] HUFF WE, HAMILTON PB. Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: Ochratoxins-metabolites of combined pathways [J]. *J Food Protect*, 1979, 42(10): 815–820.
- [48] 韩晓龙. 赭曲霉全基因组测序和功能注释及其重要次级代谢产物生物合成基因簇的预测[D]. 广州: 南方医科大学, 2017.
- HAN XL. Genome sequencing and functional annotation of *Aspergillus ochraceus* and prediction of biosynthesis gene cluster of its important secondary metabolites [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2017.
- [49] HARRIS JP, MANTLE PG. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(5): 709–716.
- [50] HUFFMAN J, GERBER R, DU L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins [J]. *Biopolymers*, 2010, 93(9): 764–776.
- [51] GALLO A, BRUNO KS, SOLFRIZZO M, *et al.* New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius* [J]. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(23): 8208–8218.
- [52] GALLO A, FERRARA M, PERRONE G. Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2017, 2(4): 461–93.
- [53] WANG Y, WANG L, FAN W, *et al.* A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: Insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis [J]. *Appl Environ Microb*, 2018: 84(19): e01009–18.
- [54] FERRARA M, GALLO A, PERRONE G, *et al.* Comparative genomic analysis of ochratoxin A biosynthetic cluster in producing fungi: New evidence of a cyclase gene involvement [J]. *Front Microbiol*, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.581309.eCollection
- [55] 高亚男, 朱凤妹, 李军. 耐热黑曲霉 3.316 菌株全基因组测序及分析[J]. *菌物学报*, 2021, 40(7): 1–14.
- GAO YN, ZHU FM, LI J. Genome sequencing and analysis of thermostable *Aspergillus niger* 3.316 strain [J]. *Mycosystema*, 2021, 40(7): 1–14.
- [56] FERNANDES M, KELLER NP, ADAMS TH. Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 28(6): 1355–1365.
- [57] BROWN DW, BUTCHKO R, BUSMAN M, *et al.* The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production [J]. *Eukaryot cell*, 2007, 6(7): 1210–1218.
- [58] 王亚萍, 谭玉梅, 周国庆, 等. 丝状真菌全局性调控因子 *LaeA* 的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(2): 712–718.
- WANG YP, TAN YM, ZHOU GQ, *et al.* Research progress of global regulatory factor *LaeA* of filamentous fungi [J]. *Genom Appl Biol*, 2017, 36(2): 712–718.
- [59] 潘园园, 刘钢. 中国丝状真菌次级代谢分子调控研究进展[J]. *遗传*, 2018, 40(10): 874–887.
- PAN YY, LIU G. Research progress on molecular regulation of secondary metabolism of filamentous fungi in China [J]. *Genetics*, 2018, 40(10): 874–887.
- [60] 薛鲜丽, 刘博雅, 高紫君, 等. 丝状真菌全局转录调控因子研究现状及发展[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(21): 199–207.
- XUE XL, LIU BY, GAO ZJ, *et al.* Research status and development of global transcriptional regulatory factors of filamentous fungi [J]. *Food Res Dev*, 2020, 41(21): 199–207.
- [61] BOK JW, KELLER NP. *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. [J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(2): 527–535.
- [62] URIEL M, OMER B, SUDHARSAN S, *et al.* Functional roles of *LaeA*, polyketide synthase, and glucose oxidase in the regulation of ochratoxin A biosynthesis and virulence in *Aspergillus carbonarius* [J]. *Mol Plant Pathol*, 2020, 22(1): 117–129.
- [63] BAYRAM Ö, KRAPPMANN S, NI M, *et al.* *VelB/VeA/LaeA* complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism [J]. *Science*, 2008, 320(5882): 1504–1506.
- [64] ELIZABETH OC, MANMEET A, WEI-WEN S, *et al.* Discovery of *McrA*, a master regulator of *Aspergillus* secondary metabolism [J]. *Mol Microbiol*, 2017, 103(2): 347–365.
- [65] 陈浩宇. 黑曲霉中 *veA* 及 *laeA* 基因功能的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.
- CHEN HY. Study on the functions of *veA* and *laeA* genes in *Aspergillus niger* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.
- [66] 徐瑞涛, 陈浩宇, 陈美榕, 等. *LaeA* 调控黑曲霉形态发展、赭曲霉毒素合成和氧化耐受[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(6): 179–185.
- XU RT, CHEN HY, CHEN MR, *et al.* *LaeA* regulates morphological development, ochratoxin synthesis and oxidative tolerance of *Aspergillus niger* [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(6): 179–185.
- [67] REVERBERI M, GAZZETTI K, PUNELLI F, *et al.* *Aoyap1* regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2012, 95(5): 1293–1304.
- [68] REVERBERI M, ZJALIC S, PUNELLI F, *et al.* *Apyap1* affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds [J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(10): 1070–1075.
- [69] REVERBERI M, PUNELLI F, SCARPARI M, *et al.* Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds [J]. *Appl Microbiol Bio*, 2010, 85(6): 1935–1946.
- [70] ANGEL M, MATEO EM, VALLE-ALGARRA FM, *et al.* Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 122(1–2): 93–99.
- [71] WILSON RA, ARST-HN JR. Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the ‘STreetwise’ GATA family of transcription factors [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 586–596.
- [72] PEÑALVA MA, TILBURN J, BIGNELL E, *et al.* Ambient pH gene regulation in fungi: Making connections [J]. *Trends Microbiol*, 2008, 16(6): 291–300.

- [73] WANG Y, LIU F, WANG LQ, *et al.* The pH signaling transcription factor AopacC regulates ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(17): 4394–4401.
- [74] 王刚, 王玉龙, 张海永, 等. 真菌毒素形成的影响因素[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 477–491.
WANG G, WANG YL, ZHANG HY, *et al.* Influencing factors of mycotoxin formation [J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 477–491.
- [75] STOLL D, SCHMIDT-HEYDT M, GEISEN R. Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments [J]. *Toxins*, 2013. DOI: 10.3390/toxins5071282
- [76] 王刘庆, 姜冬梅, 王瑶, 等. 果品及其制品中赭曲霉毒素 A 污染的发生、控制和检测[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 289–298.
WANG LQ, JIANG DM, WANG Y, *et al.* Occurrence, control and detection of ochratoxin A pollution in fruits and their products [J]. *Food Sci*, 2018, 39(23): 289–298.
- [77] PALMIRA DDB, MARIANA T, MIRIAM H, *et al.* Biodegradation of ochratoxin A by bacterial strains isolated from vineyard soils [J]. *Toxins*, 2015, 7(12): 5079–5093.
- [78] 张太, 毛丹, 王少敏, 等. 赭曲霉毒素 A 的研究进展[J]. *分析科学学报*, 2021, 37(5): 699–705.
ZHANG T, MAO D, WANG SM, *et al.* Research progress of ochratoxin A

[J]. *J Anal Sci*, 2021, 37(5): 699–705.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



王薇薇, 硕士研究生, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: 1647031812@qq.com



李军, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: spgex@163.com



朱凤妹, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: zhufengmei0714@163.com