國立臺東大學生命科學系 Department of Life Science National Taitung University

碩士論文

Master Thesis 指導教授:林志輝 博士 Advisor: Chih-Hui Lin, Ph.D.

市售紅麴米的紅麴菌種調查與紅麴菌種快速鑑定 方法的開發

Investigation of *Monascus* species in red mold rice and establishment of rapid identification method

研究生: 黃聖權 撰

Graduate student: Sheng-Chiuan Huang

中華民國 104 年 7 月

July 2015



附件十二

88

## 國立臺東大學

# 學位論文考試委員審定書

系所别:生命科學系碩士班



附註:1.本表一式二份經學位考試委員會簽後,送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。 2.本表為日夜學制通用,請依個人學制分送教務處或進修部辦理。



## 國立臺東大學博、碩士學位論文授權書

論文名稱:予告紅處米的紅翅菌種調查與紅翅菌種快速鑑更了或时開發

本人具有著作財產權之論文全文資料,授權予下列單位:

同意	不同意	單位
$\overline{\mathbf{V}}$		國家圖書館
		本人畢業學校圖書館
	$\square$	與本人畢業學校圖書館簽訂合作協議之資料庫業者

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或 上載網站,藉由網路傳輸,提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下 載或列印。

電子檔公開時程

立即公	- 開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
		· · · · · · ·		

□本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一,申請 日期:<u>年月日</u>,文號為:\_\_\_\_\_,請將紙本全文資料延後半年再公 開。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行 權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與 不同意之欄位若未勾選,本人同意視同同意授權。

指導教授	姓名	: 777	志之	2	(親筆)	簽名)		
研究生簽	名二	黃聖權	ł		(親筆.	正楷)		
學	號:	10200810			(務必:	填寫)		
日	期:	中華民國	104	年	2	月	>1	В

1. 本授權書(得自http: //www.lib.nttu.edu.tw/theses/下載)請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

 2. 依據 91 學年度第一學期第一次教務會議決議:研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化,並至遲於三年後 上載網路供各界使用及校內瀏覽。」
 *授權書版本:2013/11/14*







### 中文摘要

紅麴菌 (Monascus spp.) 為當今保健食品與傳統中藥材研究的熱門題材,特別 是作為傳統中藥材的紅麴米。紅麴米的製備方法與功效雖已流傳數百年,但其主 要菌種仍不清楚,因此探討傳統中藥材紅麴米中的主要紅麴菌種,將有助於了解 中藥材紅麴米的功效主要來自於哪一種紅麴菌。另一方面,紅麴菌種於鑑定上因 紅麴菌株外觀多樣性高及現今分子分型方法的分辨力仍有侷限,目前尚未能快速 有效的進行紅麴菌種分型。因此本研究對臺灣市售紅麴米中的紅麴菌種進行調 查,同時利用紅麴的二次代謝物生合成基因進行紅麴菌種的分型引子設計,並結 合具有鑑別力的引子以複式 PCR 進行菌種快速鑑定方法的建立。本研究自臺灣市 售中藥材紅麴米中共分離出 66 株紅麴菌株。紅麴菌種鑑定結果顯示臺灣市售紅 麴米的菌種大多為 M. purpureus (87.8%), 而 M. pilosus 和 M. ruber 分別有 7 株 (10.6%) 和 1 株 (1.5%), 推測過去文獻上所記載紅麴米的功效很可能來自於 M. purpureus。本研究於紅麴菌種的分型引子測試結果顯示具有鑑別力的引子為 pksδ、pksθ 以及 RubPil。將 pksδ、pksθ 以及 RubPil 引子合併應用於 multiplex PCR, 其結果顯示能有效區分 M. pilosus、M. ruber、M. kaoliang、M. purpureus、 M. barkeri、M. albus 和 M. sanguineus。本研究所開發的 multiplex PCR 方法具有 應用於紅麴產品常態性的監測篩檢的潛力。

**關鍵字:**紅麴菌、紅麴米、複式聚合酶鏈鎖反應、二次代謝物生合成基因

## 英文摘要

Currently *Monascus* spp. is a popular subject of health food and traditional Chinese medicine research, especially the traditional Chinese herbal medicines-red mold rice. The preparation and bioactivity of red mold rice were known for centuries, but the species responsible for red mold rice remains unclear. Due to the variability of morphology and underdevelopment of rapid molecular method for Monascus, the accurate identification of *Monascus* is limited at a small scale. Thus, we investigated the major species of Monascus in Taiwan red mold rices in this study. Besides, we proposed to use secondary metabolite biosynthesis genes for rapid identification of *Monascus*. Sixty-six Monascus strains were isolated from Taiwan red mold rice in this study. There were three species includes Monascus purpureus (69.7%), M. pilosus and M. ruber strains, 7 (10.6%) and 1 (1.5%) were isolated from red mold rice. Thus we propose that the bioactivities of traditional Chinese herbal medicines-red mold rice were mainly contributed by M. purpureus. Genotyping primer test of Monascus showes that the combination of pks $\delta$ , pks $\theta$  and RubPil has maximum identification power. The pks $\delta$ , pks0 and RubPil primer sets were merge into a multiplex PCR. The results of multiplex PCR showed that M. pilosus, M. ruber, M. kaoliang, M. purpureus, M. barkeri, M. albus and M. sanguineus could be clearly distinguished. It showed that the multiplex PCR method developed in this study is a potential rapid Monascus identification method for routine screening and regulation of *Monascus* products.

**Key words**: *Monascus* spp., red mold rice, multiplex PCR, secondary metabolite biosynthesis genes.

圖目錄	v
表目錄	viii
中文摘要	i
英文摘要	ii
一、前言	1
(一)文獻回顧	1
1.紅麴菌	1
(1)紅麴菌特性	1
(2)紅麴米	3
(3)紅麴菌之二次代謝物生合成基因研究	11
2.紅麴菌的菌種鑑定	20
(1)外觀形態與生長特性	20
(2)紅麴菌的分子分型	22
3.紅麴菌種快速鑑定方法開發策略	
(二)研究動機與目的	
二、材料與方法	
(一)實驗材料	
1. 儀器設備	
2.藥品	
(1)培養基	
(2) DNA 抽取試劑	
(二)紅麴菌株鑑定	30
1.紅麴菌株來源	30
(1)參考菌株	30
(2)未知菌株	30
2.紅麴菌株繼代培養與 DNA 萃取	30
3.以現行紅麴菌鑑定法進行分離株鑑定	
(1)菌落外觀	
(2) ITS 序列的 PCR 擴增與比對	
(3)β-tubulin 序列的 PCR 擴增與比對	
(4)序列比對分析	
(三)紅麴菌種鑑定方法開發	35
1.分子分型方法之策略與候選基因比對分析	35
2.分子分型方法之建立	
(1)複式 PCR (multiplex PCR)	
三、結果	

(一)紅麴菌株鑑定	46
1.參考菌株	46
2.未知菌株	62
(二)引子測試與 multiplex PCR 分析	73
1.各候選引子的測試結果	73
2. Multiplex PCR 分析結果	87
四、討論	92
五、結論	94
六、參考文獻	95
Y錄一1	09

圖	目	錄
---	---	---

国口外
圖一、紅麴菌之生活史。4
圖二、主要紅麴色素。6
圖三、次要紅麴色素。7
圖四、Monacolin K 與其類似物的化學結構。14
圖五、在 M. purpureus YY-1 中六個 PKS 基因的基因表現。16
圖六、在 M. purpureus YY-1 中色素生合成基因簇的基因表現。 17
圖七、在 M. pilosus 和 M. purpureus 中色素生合成基因簇的共線性分析。.18
圖八、可能為紅麴色素的生合成路徑,包括橘色素 (rubropunctatin)、黃色素
(monascin)、紅色素 (rubropunctamine) 以及水溶性色素。
圖九、紅麴菌的形態分類。21
圖十、早期紅麴菌的分類依據。23
圖十一、研究架構。
圖十二、M. pilosus 的 monacolin K 生合成基因簇。(accession no. DQ176595)37
圖十三、M. purpureus 的 citrinin 生合成基因簇。 (accession no. AB243687;
accession no. AB167465; accession no. EU309474)
圖十四、M. pilosus 的色素生合成基因簇。(accession no. KC148521)
圖十五、候選 PKS 基因及引子放大區域。40
圖十六、M. purpureus 菌種專一性引子 mkH 的設計。
圖十七、Citrinin 生合成基因簇的 pksCT 基因與引子放大區域。
圖十八、Citrinin 生合成基因簇中的 ctnR1 基因與引子放大區域。
圖十九、M. pilosus 和 M. ruber 的保守性序列引子 RubPil 的設計。
圖二十、M. pilosus BCRC 31502 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外
觀形態。
圖二十一、M. kaoliang BCRC 31506 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌
落外觀形態。
圖二十二、M. ruber BCRC 31532 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外
觀形態。
圖二十三、M. purpureus BCRC 31542 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌
落外觀形態。
圖二十四、M. floridanus BCRC 33310 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌
落外觀形態。
圖二十五、M. sanguineus BCRC 33446 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的
菌落外觀形態。
圖二十六、M. lunisporas BCRC 33640 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌
落外觀形態。
圖二十七、M. pallens BCRC 33641 <sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落

圖二十八、M. argentinensis BCRC 33998<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 圖二十九、利用最大概率法所建立的紅麴標準菌株 ITS 序列親緣關係樹。.. 58 圖三十、利用最小演化法所建立的紅麴標準菌株 ITS 序列親緣關係樹。..... 59 圖三十一、利用最大概率法所建立的紅麴標準菌株 β-tubulin 序列親緣關係樹。 圖三十二、利用最小演化法所建立的紅麴標準菌株 β-tubulin 序列親緣關係樹。 圖三十三、利用最大概率法所建立的紅麴菌分離株 ITS 序列親緣關係樹。..66 圖三十四、利用最小演化法所建立的紅麴菌分離株 ITS 序列親緣關係樹。.. 67 圖三十五、利用最大概率法所建立的紅麴菌分離株 β-tubulin 序列親緣關係樹。 圖三十六、利用最小演化法所建立的紅麴菌分離株 β-tubulin 序列親緣關係樹。 圖三十六、引子 mkH 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖三十七、引子 pksa 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖三十八、引子 pksβ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖三十九、引子 pksγ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖四十、引子 pksδ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測 圖四十一、引子 pkse 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖四十二、引子 pksθ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖四十三、引子 pksκ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖四十四、引子 pks1 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖四十五、引子 pksCT 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 圖四十六、引子 ctnR1 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 

圖四十七、引子 Rubl	il 對紅麴標準菌	株與其他]	BCRC 紅麴菌利	锺的專一性
PCR 测試結果。				85
圖四十八、紅麴標準菌	株與其他 BCRC	紅麴菌種的	multiplex PCR	分析。.88



表一、	國際公認的紅麴菌種	2
表二、	紅麴發酵產物在醫學預防的應用 (Hsu and Pan, 2012)	9
表三、	本研究所使用的參考菌株3	1
表四、	紅麴菌分離株3	2
表五、	文獻中在 25℃ 下培養 7 天後, 紅麴菌各菌種的菌落外觀與生長特性	
		4
表六、	本研究所設計的引子4	5
表七、	在 25℃ 下培養 7 天後所觀察到的紅麴菌菌落外觀與直徑大小 5	6
表八、	在 25℃ 下培養 7 天後紅麴菌分離株的菌落外觀與菌落直徑大小 6	3
表八、	在 25℃ 下培養 7 天後紅麴菌分離株的菌落外觀與菌落直徑大小 (續」	F
頁)		4
表八、	在 25℃ 下培養 7 天後紅麴菌分離株的菌落外觀與菌落直徑大小 (續」	E
頁)		5
表九、	以紅麴菌分離株的 ITS、β-tubulin 序列和菌落外觀進行菌種判斷7	1
表九、	以紅麴菌分離株的 ITS、β-tubulin 序列和菌落外觀進行菌種判斷 (續上	-
頁)		2
表十、	各引子之 PCR 反應條件	6
表十一	· 、各引子對標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的測試結果	9
表十二	、Multiplex PCR 結果	0
表十三	、Multiplex PCR 反應條件	1

表目錄

### 一、前言

#### (一) 文獻回顧

#### 1. 紅麴菌

(1) 紅麴菌特性

紅麴菌屬 (Monascus) 是由法國學者 Van Tieghem (1884) 依據在馬 鈴薯培養基上所分離的兩種真菌所建立的,兩種菌株分別為 M. ruber Tiegh 和 M. mucoroides Tiegh (Van Tieghem, 1884)。紅麴菌廣泛存在於穀 類、澱粉、新鮮牧草、泥土、魚乾、河床表面沉積物及松樹根組織中 (陳 和莊, 2003)。紅麴菌的特徵是菌絲呈無色、紅色或褐色,具有橫隔 (septa),於末端會產生一個大型的有性厚壁子囊 (ascocarp),無性生殖是 由菌絲頂端往下切割,形成鏈狀分生孢子,與同一目的麴菌 (Aspergillus) 與青黴菌 (Penicillium) 有所區別,故被獨立為單一個屬 (林, 1983)。紅 麴菌目前的分類地位為真菌界 (Fungi)、子囊菌門 (Ascomycota)、散囊菌 綱 (Eurotiomycetes)、散囊目 (Eurotiales)、紅麴菌科 (Monascaceae) (Patakova, 2013)、紅麴菌屬 (Monascus)。

在早期文獻中曾被命名的紅麴菌約有 20 個不同的物種, Hawksworth 和 Pitt 雨位學者根據紅麴菌在不同培養基上的生長速度、 菌落顏色大小以及閉囊果 (cleistothecia) 與分生孢子的大小顏色等特 性,將紅麴菌分成 M. pilosus、M. purpureus 和 M. ruber 三個物種 (Hawksworth and Pitt, 1983),其後又有 M. floridanus、M. sanguineus、M. lunisporas、M. pallens 和 M. argentinensis (Barnard and Cannon, 1987; Cannon et al., 1995; Udagawa and Baba, 1998; Stchigel et al., 2004) 等陸續 被命名發表。表一為目前國際上公認的紅麴菌種有九種 (Shao et al., 2014)。紅麴菌為雌雄同體 (homothallic),其營養菌絲呈不規則狀分歧, 內有大型液泡與隔膜結構,可產生子囊果進行有性生殖或藉由分生孢子 (conidium) 行無性生殖。有性生殖時,位於菌絲頂端之精子器 (antherdium) 會延長為一多核管狀細胞,雌性母細胞也同時分裂為受精絲 (trichogyne) 與造囊果(ascogonium),精子器內核藉由受精絲移入造囊果而 融合。結合後,造囊果發育成直徑約 20-40 μm 之子囊果,待成熟後從子 囊果裂口處釋出,再開始其新的生活史(圖一)(蘇等, 1970)。

表一、國際公認的紅麴菌種

Table 1. Internationally accepted species of *Monascus* spp.

Taxon	BCRC <sup>1</sup> ID	ATCC <sup>2</sup> ID	CBS <sup>3</sup> ID
Monascus pilosus	31502 <sup>T</sup>	16363 <sup>T</sup>	286.34 <sup>T</sup>
Monascus ruber	31532 <sup>T</sup>	15670 <sup>T</sup>	135.60 <sup>T</sup>
Monascus purpureus	31542 <sup>T</sup>	16365 <sup>T</sup>	109.07 <sup>T</sup>
Monascus floridanus	33310 <sup>T</sup>	64205 <sup>T</sup>	-
Monascus sanguineus	33446 <sup>T</sup>	200613 <sup>T</sup>	123568*
Monascus lunispora	33640 <sup>T</sup>	204397 <sup>T</sup>	113675*
Monascus pallens	33641 <sup>T</sup>	200612 <sup>T</sup>	
Monascus argentinensis	33998 <sup>T</sup>		109402*
Monascus eremophilus	-	62925 <sup>T</sup>	123361 <sup>T</sup>

\*: No type strain present.

-: Not in collection.

1: Bioresource Collection and Research Center.

2: American Type Culture Collection.

3: Netherlands Culture Collection.

#### (2) 紅麴米

過去文獻上常用於發酵以生產紅麴米的主要菌種為 M. pilosus、M. ruber 和 M. purpureus (Patakova, 2013)。在許多東方國家對於紅麴米有不 同的名稱,如在日本稱為 beni koji 或 anka koji,而在其他地方是以 Hongqu、red yeast rice、Hon-Chi、Anka、red koji、red Chinese rice、或 red fermented rice 來稱呼,實際上應以 red mold rice (RMR) 較為恰當。紅麴 菌是亞洲地區發酵食品的重要菌種,可見於紅麴米、米酒、高粱酒白蘭 地 (Hesseltine, 1965; Lin, 1973; Lin, 1975)、黃豆奶酪 (Tsai et al., 1978) 和 食品著色顏料 (Su et al., 1973; Hosono et al., 1977) 等。紅麴米在中國除了 是一種傳統發酵食品,同時也是用來治療消化不良、止痛和痢疾的傳統 藥物 (Li and Guo, 2003; Lin et al., 2008)。

紅麴的食用記錄最早於三國時代<u>王粲</u> 《七釋》 中就有提及:「西旅 遊梁,御宿秦粲,瓜洲紅麴,參揉相拌軟滑膏潤,入口流散」(蘇,2001)。 西元 960 年,北宋初期有更多的典籍記載,如<u>陶谷</u>雜採隋、唐、五代典 故所撰寫的 《清異錄》 中已提及「紅麴煮肉」; <u>胡佰</u>的 《苕溪漁隱叢 話》則有:「江南人家造紅酒,色味兩絕」; <u>李之儀</u>的 《姑溪居士集》 述 及:「紅糟筍」; 莊綽的 《雞肋編》 亦有「江南閩酒中公私醞釀皆紅麴 酒」的記載 (蘇,2001)。

元朝後紅麴的使用更為普遍,許多調理食物的書與藥典上均有紅麴 的記載,飲膳太醫<u>忽思慧</u>在《飲膳正要》 中記錄紅麴之製法:「選擇土 壤為暗紅色的地方,挖一深坑,上下周圍鋪以篾席,把粳米倒入其中, 上壓以重石,使其發酵而變為紅色」,並提及紅麴具有「健脾、益氣、溫 中」功效(忽,1330)。元朝<u>吴端</u>的《日用本草》則敘述「紅麴釀酒, 破血行藥勢」。到了明朝,紅麴的製法改為用蒸熟的米飯作為培養基質以 縮短培養時間,<u>李時珍</u>所著作的《本草綱目》中所記述紅麴的功效:「紅 麴主治消食活血,健脾燥胃,治赤白痢,下水穀。釀酒,破血行藥勢, 殺山嵐瘴氣,治打撲傷損,治女人血氣痛及產後惡血不盡」(Li,1596)。 明末<u>宋應星</u>所著作的 《天工開物》 的「丹麴」一節中,除了指出製紅 麴要選用精白在來米外,其中還記載蒸飯及接種後的管理方法,均是目 前國人製造紅麴的重要管理依據(蘇,1978)。

3



圖一、紅麴菌之生活史。(蘇等,1970)

Figure 1. Life cycle of Monascus species.

1, 2: ascospore germination is formed vegetative hyphae; 3-7: genital formation and development of ascogenous hyphae; 8, 9 : mature ascocarp; 10: asexual conidia of a single cell.

除此之外在本草 《衍義補遺》、《本草備要》 和 《醫林纂要》 等 也均有紅麴藥效之記載。臺灣紅麴的起源則相傳於明末清初鄭成功光復 台澎後,由福建渡海來台的製酒匠人所帶入。臺灣早期民間流傳,紅麴 用來治小孩和老人夜尿及輕微氣喘的功效極為良好 (陳,2000)。紅麴米 除了是歷史悠久的中藥材,紅麴菌與其發酵產物也成為近年熱門的保健 食品原料,根據經濟部工業局 「保健食品工業技術推廣與輔導計畫」-「2011 年國內保健食品產值暨產業概況分析」,真菌類及其代謝物 (包 括紅麴、靈芝、樟芝等之粉末、膠囊和錠劑等相關產品) 產值約 41 億元。 (經濟部工業局,2011)

隨著科學的進步,由紅麴菌所分離出的活性成分已經得到許多的研 究證實而成為國際矚目的經濟真菌。圖二為紅麴屬所產生的主要色素化 合物,可分為黃色素 (monascin 和 ankaflavin)、橘色素 (rubropunctatin 和 monascorubrin) 和紅色素 (rubropunctamine 和 monascorubramine) (Patakova, 2013)。除了這六個主要色素之外,還有許多從不同的紅麴菌種 所分離出來的次要色素 (圖三),包括 xanthomonasin A、yellow II pigment  $\cdot$  monascopyridines A/B  $\cdot$  monascusones A/B  $\cdot$  xanthomonasin B  $\cdot$ ompounds R3/Y3、monasfluor A/B、monafilones A/B/C、monarubrin 和 rubropunctin、purpureosone、monasnicotinates A/B/C/D、新紅色素以及 monapurpyridine A (Akihisa et al., 2005a; Campoy et al., 2006; Cheng et al., 2011; Hsu et al., 2010; Hsu et al., 2012; Huang et al., 2008; Jongrungruangchok et al., 2004; Loret and Morel, 2010; Mukherjee and Singh, 2011; Sato et al., 1992; Wild et al., 2003; Wu et al., 2011; Yongsmith et al., 1993)等。橘色素是經由一連串酵素反應合成的對胺基酸有高度親和 力的化合物。紅色素 (monascorubramine 和 rubropunctamine) 是由橘色 素與胺基酸、胺基多醣和胺基醇進行氧化反應所形成的 (Carels and shepherd, 1977; Carels and shepherd, 1978) , 而黃色素則可能為橘色素的 還原產物。紅麴色素通常是紅麴菌於營養菌絲 (vegetative hyphae) 階段所 產生,並堆積在菌絲體內,由菌絲尖端的微孔或細胞壁之破裂部分擠出 色素結晶 (蘇,1970)。目前紅麴色素類物質已知的生物活性有抗微生物、 抗人類免疫缺陷病毒、抗腫瘤、抗氧化和抗發炎等等。其中 monascin 和



red



0 0 C 0

ankaflavin



monascorubrin





rubropunctamine

rubropunctatin

圖二、主要紅麴色素。(Patakova, 2013)

Figure 2. Major *Monascus*-produced pigments.



圖三、次要紅麴色素。(Akihisa *et al.*, 2005a; Campoy *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2008; Jongrungruangchok *et al.*, 2004; Loret and Morel, 2010; Mukherjee and Singh, 2011; Sato *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2011; Yongsmith *et al.*, 1993)

Figure 3. Minor Monascus-produced pigments.

BF: blue fluorescent, R: red, Y: yellow.

其中 monascin 和 ankaflavin 具有抗發炎、抗腫瘤、降血脂和抗肥胖等 生物活性 (Patakova, 2013)。Monascorubin 和 rubropunctatin 具有抗發 炎、抗氧化、抗細菌、抗酵母菌和抗真菌等生物活性 (Martinkova *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1997)。Rubropunctamine 和 monascorubramine 具有抗有 絲分裂的生物活性 (Knecht and Humpf, 2006)。過去的研究發現除了黃、 橘、紅以及螢光藍等色素活性物質之外,還有無色的活性物質,如 ankalactone (3-unsaturated-7- lactone derivative) (Jůzlová *et al.*, 1996) 和 monascopyridine A-D (Daigle *et al.*, 1999)。Ankalactone 是由 *M. anka* 培 養濾液中所分離出來,該物質具有抗菌活性,尤其是對 *Escherichia coli* 和 *Bacillus subtilis* (Nozaki *et al.*, 1991),而 monascopyridine A-D 的功效 目前尚待確認。

除了上述的功效之外,表二為近年來紅麴菌的發酵產物所具有的功 效,如有降血清膽固醇、抗疲勞、降低 amyloid β peptide 的累積、預防 肥胖的發展、預防糖尿病的發展和抗癌等功效 (Hsu and Pan, 2012)。另外 Mostafa 和 Abbady 學者於 2014 年將紅麴的代謝物根據生物活性分為 八大類 (Mostafa and Abbady, 2014),包括抗癌物質、抗心血管疾病物質、 人類營養補充物質、免疫調節物質、香氣和風味物質、抗微生物物質、 抗氧化物質和降膽固醇物質 (Lin and Iizuka, 1982; Zhu *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004; Pattanagul, 2007; Anese, 1997; Moharram, *et al.*, 2012)。簡述如 下:

I. 抗癌物質:

紅麴菌有許多代謝物被用於治療和預防人類癌症疾病,包含 ergosterol、ergothioneine、essential fatty acids、eicosanoids、α-glucan、 glycoproteins、lectins、monacolin K、pyran derivatives、phenols 和 triterpenoids。另外有 88 個代謝物曾被分離鑑定,包括 25 個丁酸的 衍生物、19 個脂肪酸與其衍生物、22 個吡喃 (pyran) 與其衍生物和其 他 22 代謝物。其中吡喃、丁酸、亞油酸 (linoleic acids) 和其他衍生物 具有抗乳腺癌、抗結腸癌和抗前列腺癌的活性。有研究發現類黃酮 (flavonoid) 可做為抗肺癌物質 (Kaur *et al.*, 2009),而 monacolin K 可 抑制體內腫瘤生長,其活性在於抑制類異戊二烯化合物的合成如多萜 表二、紅麴發酵產物在醫學預防的應用 (Hsu and Pan, 2012)

Beneficial properties	Functional ingredients	References
Cholesterol lowering	Monacolin K	Endo, 1979
Cholesteror lowering	Monascin/ankaflavin	Lee et al., 2010
Uvnolinidamia offecto	RMR	Lee et al., 2006a
Hypolipideniic effects	RMD	Lee et al., 2007b
Dlood pressure lowering	GABA	Kohama <i>et al.</i> , 1987
Blood pressure lowering	RMD/RMR	Wu et al., 2009
Immunomodulation	Monascin/ankaflavin	Martinkova et al., 1999
Hepatoprotection	Dimerumic acid	Aniya <i>et al.</i> , 2000
Anti-oxidation	Dimerumic acid	Taira et al., 2002
Anti-fatigue properties	RMR	Wang <i>et al.</i> , 2006
Alzheimer's disease	RMRE	Lee et al., 2007a
prevention	RMR	Lee et al., 2008
Obasity provention	RMR	Chen et al., 2008
Obesity prevention	Monascin/ankaflavin	Jou et al., 2010
		Shi and Pan, 2010a
Anti-diabetic effects	RIVID/ RIVIR	Shi and Pan, 2010b
1	Monascin	Lee et al., 2011
Anti-cancer activity		
	Pigments	Yasukawa et al., 1994
Skin	Orange pigments	Yasukawa et al., 1996
	Monascin	Akihisa <i>et al.</i> , 2005a
Liver	Ankaflavin	Su et al., 2005
Colon	RMR	Hong <i>et al.</i> , 2008a
Colon	RMRE	Lin et al., 2007
	Monacolin K	Ho and Pan, 2009
Lung	RMR	Chen et al., 2010
	RMRE	Ho et al., 2010
	RMRE	Tsai <i>et al.</i> , 2009
Oral	RMDE	Hsu <i>et al.</i> , 2010a
Ofai	RMDE	Hsu et al., 2010b
	Monascin/ankaflavin	Hsu et al., 2011
Amyloid & pentide	RMR	Lee et al., 2007d
accumulation	RMR	Lee et al., 2010a
accumutation	RMR	Lee et al., 2010b
Anti-fatigue	RMR	Wang <i>et al.</i> , 2006

Table 2. Applications of *Monascus*-fermented products on iatrical prevention.

RMR: red mold rice, RMD: red mold dioscorea, GABA: γ-aminobutyric acid, RMRE: ethanol extract of red mold rice, RMDE: ethanol extract of red mold dioscorea.

醇 (dolichol)、ubiquinone 和 isopentenyl-tRNA (Jůzlová *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2008a)。

II. 抗心血管疾病物質:

紅麴色素代謝物包含類黃酮、monacolins、脂肪酸、萜類化合物和 吡喃衍生物在過去研究中被發現具有抗心血管疾病活性 (Jůzlová *et al.*, 1996; Radu *et al.*, 2011)。

III. 人類營養補充物質:

脂肪酸類物質具有支撐皮膚、抗發炎、皮膚保溼劑以及增強腎功 能等功用,因此能用於治療關節炎、狼瘡和哮喘。此外 γ-aminobutyric acid 或氨基甲酸脂 (carbamate) 具有降高血壓、肌肉鬆弛劑、免疫系 統激活和維持肝功能的活性。Dimerumic acid 具有抗脂質過氧化活 性。萜類化合物的麥角甾醇 (Ergosterol) 是維他命 D2 的前驅物,具有 抗真菌和抗腫瘤活性。類黃酮物質可作為抗過敏、抗發炎和抗腹瀉劑 (Kaur *et al.*, 2009)。

IV. 免疫調節物質:

醣蛋白、多醣、甾醇和脂肪酸(特別是油酸、棕櫚酸、硬脂酸、花 生油酸和 γ-linolenic acid)等化合物可能具有免疫調節活性(Kaur *et* al., 2009)。

V. 香氣和風味化合物:

目前紅麴菌中有 42 個芳香化合物,包括 4 個醇類、2 個苯甲醛、27 個酯類、3 個內酯、1 個苯酚、1 個萜類、2 個硫醇和1 個巯基化合物被鑑定出來。這些代謝物被應用於食品、香料、化妝品和製藥工業上。

VI. 抗微生物物質: 麥角甾醇 (Moharram *et al.*, 2012)、類黃酮 (Kaur *et al.*, 2009; Wong and Bau, 1977) 和 monascidin A (citrinin) 有抗細菌以及抗真菌活性, 而 ankalactone 和黃色色素 (rubropunctatin 和 monascorubrin) 具有抗細菌活性。

VII. 抗氧化物質:

Xanthomonasin A/B、glycylrubropunctatin、laccaia acid A/B/C、 glycylmonascorubrin、curcumin 和 dimerumic acid 具有抗氧化和預防 肝損傷的活性 (Radu *et al.*, 2011)。

### VIII.降膽固醇物質:

Monacolins 具有抑制 HMG-CoA 還原酶的合成,進而達到降低膽 固醇的效果 (Lian *et al.*, 2007; Ishiwata *et al.*, 1974; Endo *et al.*, 1985a; kimura *et al.*, 1990; komagata *et al.*, 1989; Endo *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2008; Wong and Bau, 1977; Yongsmith, 1999; Daigle *et al.*, 1999; Palo *et al.*, 1960)。

除上述的紅麴色素與代謝產物外,蘇等 (1970) 以葡萄糖為碳源培 養 *M. anka*,經七天後發現有琥珀酸 (succinic acid)、檸檬酸 (citric acid)、葡萄糖酸 (gluconic acid)、草酸 (oxalic acid) 及乙醇等一級代謝 產物的產生。紅麴也會產生不飽和脂肪酸、醇和酯等芳香物質 (Jůzlová *et al.*, 1996; Rasheva *et al.*, 1997) 以及多種水解酵素,如澱粉分解酵素 (amylase、glucoamylase)、蛋白分解酵素 (protease) (Lakshman *et al.*, 2010)、半乳糖分解酵素 (galactosidase) 和核糖核酸分解酵素 (ribonuclease) 等,因此被視為製造多種酵素食品的重要材料。

#### (3) 紅麴菌之二次代謝物生合成基因研究

絲狀真菌可以產生多種二次代謝物,主要包括 polyketides (PKs)、
non-ribosomal peptides (NRPs)、terpenes (TPs) 和 indole terpenes (ITPs) 等
(Staunton and Weissman, 2001; Fox and Howlett, 2008; Brakhagea and
Schroeckha, 2011; Wiemann *et al.*, 2013),這些化合物的生合成基因通常是

聚集成為基因簇 (Fox and Howlett, 2008; Brakhagea and Schroeckha, 2011; Brakhage, 2013)。紅麴菌屬的二次代謝物因具有多種生理活性 (Feng *et al.*, 2012; Patakova, 2013; Dufosse *et al.*, 2014) 而備受矚目。隨著紅麴基因 操作技術的進步,許多紅麴菌的二次代謝物基因已逐漸被選殖出來,其 中最為重要的是 citrinin、monacolin K 和色素生合成基因。

#### I. Citrinin :

Citrinin 是第一個在紅麴菌中被發現的抗菌物質,早先被命名為 monascidin A (Wong and Koehler, 1981)。隨後 Blanc 等人證實 monascidin A 與 citrinin 為相同的化合物 (Blanc *et al.*, 1995a; Blanc *et al.*, 1995b)。為了降低 citrinin 的含量,許多學者一直注重紅麴米的發 酵條件優化以及紅麴菌育種 (Chen and Hu, 2005; Lee *et al.*, 2007; Pattanagul *et al.*, 2008;Hajjaj *et al.*, 2012),但成效有限。因此目前許多研 究主要集中在 citrinin 的生合成基因剔除。

在 2005 年, Shimizu 等人在 M. purpureus 中首次選殖出 citrinin 生合成的主要基因 pksCT (accession no. AB167465), 並於研究中將菌株 的 pksCT 基因剔除,結果顯示 pksCT 基因被剃除的菌株無法產生橘 黴素,但對色素的生產沒有影響。由此可知 pksCT 基因是直接負責 citrinin 的生合成 (Shimizu et al., 2005)。接著在 2007 年, Shimizu 等 人將包含轉錄調控因子基因 ctnA 在內的 21 kbps pksCT 基因周邊片 段 (5 個 open reading frames (ORFs) orf1、orf2、orf3、orf4 和 orf5) 選 殖並定序 (accession no. AB243687) (Shimizu et al., 2007)。Fu 等人在研 究中構築缺少 pksCT 基因的 M. aurantiacus 突變株,導致 citrinin 的 產量減少 97.2%,而紅色素和黃色素的產量分別增加 49.4% 和 28.8% (Fu et al., 2007)。 隨後, Li 等人則在 2012 年分離出 M. aurantiacus 的 citrinin 生合成基因簇, 全長 43 kbps 的序列中包含 pksCT 等 16 個 相關基因 (pksCT 的同源性基因、15 個 ORFs (ctnD、ctnE、orf6、orf1、  $ctnA \circ orf3 \circ orf4 \circ orf5 \circ ctnF \circ orf7 \circ ctnR \circ orf8 \circ ctnG \circ ctnH \neq ctnI)$ (accession no. EU309474.1), 並於研究中將菌株的 orf4 基因 (ctnB) 剔 除,結果顯示 orf4 基因被剔除的菌株幾乎沒有產生 citrinin,由此可

知 orf4 基因是 citrinin 生合成所必须的 (Li et al., 2012)。

II. Monacolin K :

在 1970 年代,日本遠藤學者在 M. ruber 的發酵液中發現 monacolin K,該化合物擁有和 lovastatin 和 compactin 相近的結構 (圖四),後兩者分別由 Aspergillus terreus 和 Penicillium citrinum 產 生,且都具有降膽固醇的生物活性 (Endo, 1979)。隨後遠藤學者進一步 從紅麴菌屬分離出一系列的類似物,包括 monacolin L、X和J等 (圖 四) (Endo et al., 1985a; Endo et al., 1986)。

現今 monacolin K 已成為安全的降膽固醇藥物之一,使得許多學 者對於提升 monacolin K 的生合成產生濃厚興趣 (Grabley and Thiericke, 1998), 其中 Aspergillus spp. 中的 lovA、lovB、lovC、lovD 和 lovF 基因已被選殖出來 (Kennedy et al., 1992; Hutchinson et al., 2000; Sorensen et al., 2003a; Sorensen et al., 2003b)。Monacolin K 生合成基因 cluster 是由 Chen 等人於 2008 年 (Chen et al., 2008b) 利用 Aspergillus terreus 的 lovastatin 生合成基因序列中的保守區域,由 M. pilosus BCRC38072 所選殖出 (accession no. DQ176595)。Monacolin K 生合成基因 cluster 片段全長 42 kbps,其中 9 個基因與 lovastatin 以 及 compactin 相關生合成基因具有高度的同源性 (Chen et al., 2008b)。將 mokA 基因加以剃除 (負責 nonaketide 骨架的合成基因) 會導致 M. pilosus BCRC38072 完全喪失 monacolin K 生合成能力, 顯 示 mokA 為 monacolin K 生合成的必須基因 (Chen et al., 2008b)。 Sakai 等人於 2009 年將 mokB 基因剔除也會造成 monacolin K 生合 成能力喪失,但中間產物 monacolin J 的產量則會大幅提升,顯示 mokB 基因負責的是 monacolin K 的 diketide 側鏈合成 (Sakai et al., 2009)。此外 mokH 基因被證實與 monacolin K 生合成調控有關,過度 表現 mokH 基因能夠提升 monacolin K 的生合成產量 (Chen et al., 2010) •



圖四、Monacolin K 與其類似物的化學結構。(Endo *et al.*, 1985a; Endo *et al.*, 1986) Figure 4. Chemical structure of monacolin K and it analogs.

III. 色素:

紅麴色素是天然的食用色素,主要包括黄色、橘色和紅色色素, 已廣泛應用於食品工業中,特別是東南亞國家 (Feng *et al.*, 2012; Patakova, 2013)。近年來紅麴色素被證明具有多種生理活性,如抗突 變、抗癌特性、抗微生物活性和潛在的抗肥胖等。紅麴色素在不同領 域有應用的潛力,尤其是黃色素 monascin 與 ankaflavin 備受重視 (Feng *et al.*, 2012)。紅麴色素的生合成通常被認為與 citrinin 以及 monacolin K 的生合成近似,但紅麴色素的生合成路徑爭議了很長一段 時間 (Turner, 1971; Jůlová *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 2012)。

在 2013 年 Xie 等人利用 T-DNA insertion 的方式找出 M. ruber 色素生合成基因以及其鄰近 53 kbp 片段,其中包含 PKS 基因、脂肪 酸合成酶基因、esterase 基因、脫氫酶基因 (dehydrogenase) 以及調控 蛋白 pigR 基因,其中 pigR 基因的剔除會造成產生色素的能力完全喪 失 (Xie et al., 2013)。Liu 等學者在 2014 年將 M. ruber 中的 MpigE 基因(推測功能為 alfatoxin aldehyde reductase) 剔除, 剔除 MpigE 基 因的轉型株只會產生四種黃色素和極少量的紅色素,這樣的結果顯示 MpigE 基因可能參與不同色素之間的轉換 (Liu et al., 2014)。Yang 等 人於 2015 年研究中對紅麴色素生合成路徑做全面性的分析。研究中 發現 M. pilosus 與 M. purpureus YY-1 的 PKS-FAS 基因簇具有同源 性,並於轉錄體分析的結果顯示,在高色素生產的條件下,PKS-FAS 基 因簇中許多基因的表現量非常高 (圖五和圖六),特別是 PKS 基因 (C5.137),這進一步證實 PKS-FAS 基因簇在色素生合成中扮演重要的 角色。M. purpureus YY-1 的 PKS-FAS 基因簇比 M. pilosus 小,其中 有些功能不明的基因並不存在於 M. purpureus YY-1 (如在 M. pilosus 中的 2373-2379 區域)(圖七),這表示那些功能不明的基因對於色素合 成可能是不必要的。其中 PKS 和 FAS 基因序列之間具有高度保守 性,顯示其可能為色素生合成的核心基因。Yang 等人根據預測的基因 功能和轉錄體分析推論出紅麴色素的生合成路徑,包括橘色素、黃色 素、紅色素和水溶性色素 (圖八) (Yang et al., 2015)。



圖五、在 M. purpureus YY-1 中六個 PKS 基因的基因表現。(Yang et al., 2015) Figure 5. Gene expression of six PKS genes in M. purpureus YY-1.





圖六、在 *M. purpureus* YY-1 中色素生合成基因簇的基因表現。(Yang *et al.*, 2015) Figure 6. Gene expression of the pigment biosynthetic gene cluster in *M. purpureus* YY-1.



圖七、在 M. pilosus 和 M. purpureus 中色素生合成基因簇的共線性分析。(Yang et al., 2015)

Figure 7. Synteny analysis of the pigment biosynthetic gene clusters in *M. pilosus* and *M. purpureus*.

The upper panel shows the gene cluster in the *M. pilosus* genome. The bottom panel shows the gene cluster in the *M. purpureus* genome.



圖八、可能為紅麴色素的生合成路徑,包括橘色素 (rubropunctatin)、黃色素 (monascin)、紅色素 (rubropunctamine) 以及水溶性色素。(Yang *et al.*, 2015) Figure 8. The proposed biosynthetic pathway for *Monascus* pigments, including orange pigment (rubropunctatin), yellow pigment (monascin), red pigment (rubropunctamine) and water-soluble pigments.

#### 2. 紅麴菌的菌種鑑定

#### (1) 外觀形態與生長特性

早期紅麴菌是基於分離源、培養基上的形態及色素產生等特徵來分類。過去曾有兩位日本學者依菌絲及菌叢顏色之不同將紅麴分成兩大類,A 類菌絲為無著色孢子,菌叢全為白色;B 類菌絲為具有著色孢子,因而菌叢成紅色 (中澤和佐藤,1930)。目前紅麴的分類以 Hawksworth 等 學者的分類依據為大多數人所接受,依據紅麴在不同培養基是否生長、 顏色、生長速度、菌落大小和顏色等外觀形態特徵進行分類 (圖九) (Hawksworth and Pitt, 1983; Barnard and Cannon, 1987; Hocking and Pitt, 1988; Cannon *et al.*, 1995; Stchigel *et al.*, 2004; Li and Guo, 2004; Pitt and Hocking, 2009)。

圖九是以未知紅麴菌株培養於 25% glycerol nitrate agar (G25N)、malt extract agar (MEA) 以及 CYA (Czapek yeast extract agar) 培養基上,於 25 ℃ 下培養 7 天後觀察菌株的生長情況、菌落大小及顏色來進行菌種鑑 定的流程。鑑定過程首先依據未知紅麴菌株於 G25N 培養基上菌落生長 的有無做區分。若未知紅麴菌株於 G25N 培養基上有菌落生長,則觀察 未知紅麴菌株於 G25N 和 MEA 培養基上的菌落顏色。若未知紅麴菌株 於 G25N 培養基上菌落顏色為白或淡紅色且在 MEA 培養基上菌落顏 色為橙紅色,則該菌株為 *M. purpureus*。若未知紅麴菌株於 G25N 培養 基上之菌落中心顏色為橄欖色,邊緣為灰黃色且在 MEA 培養基上之菌 落中心顏色為橄欖色,邊緣為友黃色且在 MEA 培養基上之菌 落中心顏色為橄欖色,邊緣為白色,則該菌株為 *M. floridanus*。若未知 紅麴菌株於 G25N 培養基上菌落顏色為灰黃色且在 MEA 培養基上之菌 落中心顏色為暗綠色,邊緣為白色,則該菌株為 *M. floridanus*。若未知 紅麴菌株於 G25N 培養基上菌落顏色為灰黃色且在 MEA 培養基上之 菌落顏色為橘灰色,則該菌株為 *M. lunisporas*。若未知紅麴菌株於 G25N 培養基上之菌落顏色為白色與 MEA 培養基上之菌落顏色為柔和的紅色 或橙褐色,則該菌株分別為 *M. pilosus* 和 *M. ruber*。

若未知紅麴菌株於 G25N 培養基上無法生長,則根據未知菌株於 MEA 是否生長、菌落直徑大小和菌落顏色加以區分。若未知菌株於 MEA 上無法生長,則該菌株為 M. eremophilus。若未知菌株於 MEA 培養基上 之菌落顏色為白色或透明,菌落直徑為 9-10 mm,則該菌株為 M. pallens。若未知菌株於 MEA 培養基上之菌落顏色為淺灰色,菌落直徑


圖九、紅麴菌的形態分類。(Hawksworth and Pitt, 1983; Barnard and Cannon, 1987; Hocking and Pitt, 1988; Cannon *et al.*, 1995; Stchigel *et al.*, 2004; Li and Guo, 2004; Pitt and Hocking, 2009)

Figure 9. Morphological classification of Monasucs species.

為 20-22 mm,則該菌株為 M. argentinensis。若未知菌株於 MEA 培養 基上之菌落顏色為柔和的紅色至灰紅色,菌落直徑為 8-10 mm,則該菌 株為 M. sanguineus。

除了外觀形態之外,部分紅麴菌株需藉由額外的生化測試進行區分,如 M. purpureus 和 M. kaoliang 需分別以含有 6% 的 PDA 培養基 和含有 30% 酒精的 PDA 培養基觀察是否會生長才能區分 (圖十) (飯 塚,1987)。若於上述兩種培養基中皆有生長,則該菌株為 M. kaoliang。 若於上述兩種培養基中皆無生長,則該菌株為 M. purpureus。

#### (2) 紅麴菌的分子分型

紅麴菌屬自 1983 年至 2003 年有超過 20 個菌種曾被發表 (Li and Guo, 2003; Park and Jong, 2003)。而現今只有 9 個紅麴菌種被國際所公認,大多數過去被提出的其他菌種都被證明是同種異名的菌株。過去已 有許多分子分型技術如隨機擴增多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、LSU rRNA 的 D1/D2 區域 (LSU rRNA) 序列、內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS)、β-tubulin 基因、紅麴 反轉錄跳動子 (*Monascus* retrotransposon, MRT)、簡單序列重複區間 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 和 相 關 序 列 增 幅 多 型 性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 曾被用於紅麴菌分類和 親緣關係的研究,這些技術都免於受到外觀形態不穩定的影響,可提供 區別紅麴菌的替代方法 (Park et al., 2004)。

RAPD 分子分型技術是第一個被用於研究紅麴菌株的親緣關係。 Lakrod 等人將 25 株紅麴菌以 RAPD 分子分型技術研究不同的紅麴菌 種之間的遺傳岐異度,結果顯示在亞洲地區不同的紅麴菌種之間遺傳岐 異度非常有限 (Lakrod et al., 2000)。在 2009 年 Shinzato 等人以 RAPD 分子分型技術與微晶片電泳來分辨紅麴菌株並繪製親緣關係樹,結果顯 示每一株菌皆有獨特的 RAPD 圖譜,但缺乏對 M. pilosus 與 M. ruber 及 M. kaoliang 與 M. purpureus 的鑑別力 (Shinzato et al., 2009)。Park 和 Jong 將 65 株紅麴菌和 Xeromyces 屬 的 LSU rRNA 的 D1/D2 區域序 列以 PCR 擴增並定序。將定序結果以 maximum-parsimony analysis (最



Relation between keys for classification and species of the genus *Monascus* Abbreviation and symbols : formation of organ, production of pigment and tolerance to NaCl. ethanol : -, not formed or not produced : +, formed or produced.

圖十、早期紅麴菌的分類依據 (飯塚,1987)。

Figure 10. Early classification of Monascus spp.

大簡約分析)後繪製成保守性親緣關係樹,結果顯示 M. lunisporas、M. floridanus、M. pallens 和 X. bisporus 分別在不同的分支上,但 M. eremophilus、M. ruber、M. pilosus、M. purpureus 和 M. sanguineus 被分 在同一分支,由此可知 LSU rRNA 的 D1/D2 區域序列對於 M. eremophilus、M. ruber、M. pilosus、M. purpureus 和 M. sanguineus 缺乏 鑑別力 (Park and Jong, 2003)。在 2004 年的研究當中, Park 等人將 17 個參考紅麴菌株以 ITS 和 β-tubulin 基因來推斷親緣關係。親緣關係樹 的結果顯示, ITS 序列對於紅麴菌的分型效果不佳, 且缺乏對 M. pilosus 與 M. ruber 的鑑別力,同時也不易分離 M. sanguineus、M. kaoliang 與 M. purpureus, 而 partial β-tubulin 的分辨力雖然較 ITS 序列佳, 但仍存 在 M. pilosus 與 M. ruber 無法鑑別的情況 (Park et al., 2004)。 Chen 等 人藉由南方墨點法確認紅麴菌種的紅麴反轉錄跳動子存在與否,並結合 β-tubulin 序列所建立的親緣關係樹來將紅麴菌種分群,結果顯示紅麴反 轉錄跳動子存在於 M. pilosus、M. ruber、M. sanguineus 和 M. barkeri, 而 M. pilosus 和 M. ruber 於親緣關係樹屬於同一分支,此方法亦缺乏對 M. pilosus 與 M. ruber 的鑑別力且非常耗時 (Chen et al., 2007)。在 2011 年 Shao 等學者將 37 個紅麴分離株與 14 個標準菌株針對 ISSR 和 SRAP 進行分析,其分析比對結果顯示紅麴菌物種間的基因體變異度不 大,並推測紅麴菌種間的基因體岐異度不高,可能是造成紅麴菌種不易 區分的原因之一 (Shao et al., 2011)。上述這些分子分型方法是紅麴菌屬在 種間和種內分型的替代方法,但目前文獻中所使用分子分型方法皆有其 限制和適用範圍 (Shao et al., 2014), 尚無以單一方法就可以完全分辨所有 紅麴菌種。因此目前要獲得可靠的菌種鑑定結果,必須同時結合形態與 分子分型分析 (Shao et al., 2014)。

3. 紅麴菌種快速鑑定方法開發策略

在過去文獻中缺乏能有效快速的紅麴菌種分子分型技術,因此大多需 仰賴外觀形態鑑定方法。建立有效且快速的紅麴菌種分子分型方法,對於 紅麴產業的永續發展有其必要性。Serrano 等學者提到過去臨床研究中發現 許多真菌因外觀形態與 Aspergillus fumigatus 相似而被誤認為同一種菌。雖 然目前已有分子技術能將 A. fumigatus 與 section Fumigati 的部分菌種區 分開來,如 multilocus sequence typing、RAPD、RFLP 和 microsphere-based Luminex asssy。但因耗時、勞動力高和價格昂貴而無法用於大量樣本的臨 床研究中。因此需要一個快速、實用且廉價的方法來區分 A. fumigatus 與 section Fumigati 內的菌種。Serrano 等學者利用過去已用於區分 A. fumigatus 與相關菌種的基因,如 rodA 和 β-tubulin 來設計引子,並以 multiplex PCR 進行快速的菌種鑑定,結果顯示能區分 13 個獨立的種,並 能將 A. fumigatus 與 section Fumigati 內的部分物種區分開來 (Serrano et al., 2011)。Rashmi 等學者於 2013 年的研究中,為了從食物中檢測四大產 毒真菌 (mycotoxingenic fungi),利用其黴菌毒素的生合成基因,包括 nor1 (aflatoxin)、Tri6 (trichothecene)、FUM13 (fumonisin) 和 otanps (ochratoxin A),並以 multiplex PCR 來同時檢測此四大產毒真菌,結果顯示能快速、 可靠且靈敏檢測出產黃麴毒素的 Aspergillus 菌株、新月毒素和伏馬毒素的 Fusarium 菌株以及赭麴毒素的 Penicillium 菌株 (Rashmi et al., 2013)。

本研究擬採取近似的策略,利用紅麴的二次代謝物基因來設計引 子,並選出具有鑑別力的引子以 multiplex PCR 來達成快速鑑別紅麴菌 種的目標。

#### (二)研究動機與目的

紅麴於三國時期就已有食用記錄,元朝後更有許多藥典提及其功效並作為中 藥材使用。現今隨著紅麴產業的的發展,紅麴已成為當今保健食品與傳統中藥材 研究的熱門焦點。紅麴菌是亞洲發酵食品的重要菌種,特別是作為傳統中藥材的 紅麴米。在過去文獻中所記載的紅麴米之常見紅麴菌種包括 M. purpureus、M. pilosus 與 M. ruber 三種菌株,其製備方法與功效雖已經流傳數百年,但其主要的 紅麴菌種仍不清楚。探討傳統中藥材紅麴米中的主要紅麴菌種,將有助於了解中 藥材紅麴米的功效主要來自於哪一種紅麴菌或二次代謝物。現今市面上中藥行所 販賣的散裝紅麴米大多是由中國進口,其所使用的紅麴菌種與其來源均缺乏相關 資訊,使得藥效或功效無法獲得保障,亦無法分辨以染色的方式所製的劣質品, 形成中藥材與保健食品安全的管理漏洞。

現今紅麴菌鑑定方法須結合外觀形態與分子鑑定,但因紅麴菌株外觀多樣性 高及目前常用於真菌的 ITS 與 β-tubulin 基因序列進行分子分型的方法在鑑別力 方面尚有不足,因此現行的紅麴菌種鑑定方法皆有其受限之處,也使得目前現行 的紅麴菌種鑑定流程所需要的時間較長 (完成整個流程至少 15-25 天)。若要處理 大量的樣品,分析效率不足以作為常態性的監測篩檢使用。因此建立有效且快速 的紅麴菌種分子分型方法,對於紅麴產業的永續發展有其必要性。紅麴菌的二次 代謝物基因是紅麴菌最受矚目的功能性基因,過去的研究顯示 citrinin 生合成基因 cluster 中的 ctnA 基因僅出現在 M. purpureus 中,而 pksCT 基因只出現在 M. purpureus 與 M. sanguineus 中。由此推論,如果針對 pksCT 與 ctnA 進行 PCR 增 幅,可以根據 PCR 產物的有無鑑別紅麴菌種是否為 M. purpureus 或 M. sanguineus。因此本研究認為紅麴菌的二次代謝物基因應該是相當有潛力的分子分 型依據。本研究中對臺灣市售紅麴米中的紅麴菌種進行調查,同時利用紅麴菌的 二次代謝物基因進行紅麴菌種的分型引子設計。最後希望能結合有鑑別力的引子 以複式 PCR (multiplex polymerase chain reaction, multiplex PCR) 進行菌種快速鑑 定方法的建立 (圖十一)。

26





Figure 11. Framework of this study.

# 二、材料與方法

### (一) 實驗材料

#### 1. 儀器設備

- i. 滅菌釜 (Speedy Autoclave)
  Model TM-328, Tomin Medical Equipment Co., Ltd, Taipei, Taiwan
- ii. 熱風循環烘箱 (Forced Convection Oven)Model DK600D, Yihder Co., Ltd, Taipei, Taiwan
- iii. 真空烘箱 (Vacuum Drying Oven)Model VO 30L, Channel Business Co, Ltd, Taipei, Taiwan
- iv. 電磁攪拌器 (Magnetic stirrers) Model MGS-1001, LMS, Taipei, Taiwan
- v. 紫外光燈箱 (UV light box) Model UV2020-2, Top Bio Co., Taipei, Taiwan
- vi. 照相系統 (Digital Gel Image System) Model DGIS-8, Top Bio Co., Taipei, Taiwan
- vii. 無菌操作臺 (Laminar flow) Model JW-5N, Lian Shen Enterprise Co., Ltd, Taichung, Taiwan
- viii. 迴轉式振盪恆溫培養箱(Orbital Shaking Incubator)Model S300R, Firstek Scientific Co., Ltd, Taipei, Taiwan
  - ix. 振盪器 (Vortex-Genie 2) Model G560, Scientific Industries Inc, New York, NY, USA
  - x. PCR 反應器 (PCR Machine) Model RoboCycler<sup>®</sup> Gradient 96, Stratagene, La, CA, USA
  - xi. PCR 反應器 (PCR Machine) Model 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
- xii. 精密天平 (Precision Balance) Model ML203, Mettler-Toledo International Inc, Leicester, UK
- xiii. 離心機 (Centrifuge) Model Refrigerated table top centrifuge Z326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany

xiv. 電泳槽 (Electrophoresis)

Model Mupid-2, Cosmo Bio Co., Ltd, Tokyo, Japan

- xv. 螢光定量儀 (Qubit fluorometer) Model Qubit 2.0, Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA
- 2. 藥品
  - (1) 培養基
    - i. Agar (Focus Bio-Inova, Inc) (Herndon, VA, USA)
    - ii. Copper (II) sulfate pentahydrate (Kanto Chemical Co., Inc) (Tokyo, Japan)
    - iii. Glycerol (Kanto Chemical Co., Inc) (Tokyo, Japan)
    - iv. Iron (II) sulfate heptahydrate (Showa Chemical Co.,Ltd) (Tokyo, Japan)
    - v. Magnesium Sulfate, Anhydrous (Kanto Chemical Co., Inc) (Tokyo, Japan)
    - vi. Malt Extract Agar Base (MEA) (Himedia Laboratories) (Mumbai, India)
    - vii. Potassium Chloride (Bionovas Biotechnology Co., Ltd) (Toronto, ON, Canada)
  - viii. Potassium Phosphate Dibasic (BioShop Canada Inc) (Burlington, ON, Canada)
    - ix. Potato Dextrose Broth (PDB) (Becton, Dickinson Co) (Franklin Lakes, NJ, USA)
    - x. Sodium nitrate, 98+% (Alfa Aesar<sup>®</sup> A Johnson Matthey Co)(Ward Hill, MA, USA)
    - xi. Sucrose (Taisugar) (Taitung, Taiwan)
  - xii. Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company) (Franklin Lakes, NJ, USA)
  - xiii. Zinc sulfate heptahydrate (Sigma-Aldrich Co) (Saint Louis, MO, USA)

(2) DNA 抽取試劑

- Cetyl Dimethylethyl Ammonium Bromide (BioShop<sup>®</sup>) (Burlington, ON, Canada)
- ii. Ethylenediaminetetraacetic acid (BioShop<sup>®</sup>) (Burlington, ON, Canada)

- iii. EtOH absolute (Panreac Chemicals) (Barcelona, Spain)
- iv. Hydrochloric (Kanto Chemical Co., Inc) (Tokyo, Japan)
- v. 2-propanol (Kanto Chemical Co., Inc) (Tokyo, Japan)
- vi. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture (PCI, SIGMA) (MO, USA)
- vii. Sodium hydroxide (Panreac Chemicals) (Barcelona, Spain)
- viii. Sodium Chloride (Kanto Chemical Co., Inc) (Tokyo, Japan)
- ix. TRIS Base (Bioman Scientific Co., Ltd) (Taipei, Taiwan)
- (3) 電泳試劑
  - i. Agarose Low EEO (Focus Bio-Inova, Inc) (Herndon, VA, USA)
  - ii. Tris-Acetate-EDTA buffer (TAE Buffer) (Gene Star Biotechnology Co., Ltd) (Shanghai, China)

#### (二) 紅麴菌株鑑定

- 1. 紅麴菌株來源
  - (1) 參考菌株

參考紅麴菌株購自食品工業發展研究所之生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 以及由國立臺灣大學 生化科技學系潘子明教授研究室提供 (表三)。

(2) 未知菌株

包含由國立臺灣大學潘子明教授研究室、晨暉生物科技股份有限公司 (SunWay Biotech Co., Ltd) 提供以及本研究自紅麴米中所分離得到的 菌株 (表四)。

2. 紅麴菌株繼代培養與 DNA 萃取

本研究中紅麴菌株接種於 potato dextrose agar (PDA) 培養基上,於28 ℃ 下培養 7-14 天進行繼代培養。將培養於 PDA 培養基上的菌株接種於 含有 100 mL PDB 培養基的 500 mL Hinton's 三角瓶中,於 28℃ 下震盪 培養 10 天後,以不鏽鋼濾網收集菌體。將菌體的水份擠乾後放置於研缽

表三、本研究所使用的參考菌株

Table 3. Reference Monascus strains used in this study

Strain ID	Speices	Remark
BCRC 31499	M. purpureus	
BCRC 31502 <sup>T</sup>	M. pilosus	Type strain
BCRC 31506 <sup>T</sup>	M. kaoliang	Type strain
BCRC 31526	M. pilosus	
BCRC 31530	M. purpureus	
BCRC 31532 <sup>T</sup>	M. ruber	Type strain
BCRC 31534	M. ruber	
BCRC 31540	M. purpureus	
BCRC 31542 <sup>T</sup>	M. purpureus	Type strain
BCRC 31615	M. purpureus	
BCRC 32808	M. purpureus	
BCRC 33309	M. barkeri	
BCRC 33310 <sup>T</sup>	M. floridanus	Type strain
BCRC 33372	M. albus	
BCRC 33446 <sup>T</sup>	M. sanguineus	Type strain
BCRC 33640 <sup>T</sup>	<u>M.</u> lunisporas	Type strain
BCRC 33641 <sup>T</sup>	M. pallens	Type strain
BCRC 33998 <sup>T</sup>	M. argentinensis	Type strain
NTU568	M. purpureus	
NTU301	M. purpureus	
YM1	M. purpureus	

表四、紅麴菌分離株

Table 4. Monascus isolates

1a0le 4. MO	nuscus 180	lates									
Isolates ID	Source	Isolates ID	Source	Isolates ID	Source	Isolates ID	Source	Isolates ID	Source	Isolates ID	Source
CA-A		СН		TST	.0	YF	-	China	NTU	860	
CA-B		JS		TYT		DHT-A		BM		A-1	
CA-B-1		MD		SJ		DHT-B		НЈТ		A-2	
CA-C		HRT-A-1	Taitung	J-SIN		DHT-C	Taipei	HS		SW3	Current
DYH	HRT-A-2		1	JD		DHT-D		JFC		SW4	Sunway
TY-A	Taitung	HRT-B-1	$\langle \rangle$	S-YUAN	Taipei	DHT-E		LC	Sunway	803	
TY-B	HRT-B-2			TPN-A		LA		SL	Sullway	430	
TY-C		DS		TPN-B		M13		ST		CA505	
TY-D		SA	Tainai	TPN-C		DH	NTLI	SY		BS	
GH-A	STS		Taiper	AB-A		NiB	NIU	TW		HJY	Tainan
GH-B		SJY		AB-B		Ch30		UN		Hong-JT	

CA:賜安; DYH:東英行; TY:調元; GH:冠惠; CH:存厚; JS:忠興; MD:明德; HRT:和仁堂; DS:德興; SA:杏安; STS:杏泰蔘; SJY:新建源; TST:同生堂; TYT:同元堂; SJ:修濟; J-SIN:九信; JD:種德; S-YUAN:笙源; TPN: Taipei unknow; AB:安保; YF:永豐; DHT:德慧堂; M 13: *M. anka* M13; DH: *Monascus* sp. DH; NiB: *Monascus* sp.NiB; Ch30: *Monascus* sp. Ch30; China: *Monascus* sp. China; BM:大紅曲; HJT:懷結堂; HS:鴻翔; JFC:金豐春; LC:聯盛; SL:樹林; ST:協泰; SY:勝益; TW:臺灣產地; UN:未知; BS:寶樹; HJY:黃正一; Hong-JT:宏進堂。 中,加入液態氮進行研磨。研磨後的菌粉裝入 50 mL 離心管中並以真空烘 箱抽乾水份。

DNA 萃取以 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 法進行 (Winnepenninckx *et al.*, 1993),首先秤取 0.05 克的乾燥菌體粉末並放置於 2 mL 微量離心管中,加入 0.8 mL CTAB extraction buffer 混合均匀後於 60 °C 下反應 1 小時 (每 15 分鐘震盪一次,每次震盪 5 秒)。反應完後,加 入 0.8 mL phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) 於室溫中混合均匀後 離心 10 min (14,000 x g, 4°C)。取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管中 (約 0.6 mL),加入 0.6 mL isopropanol 混合均匀後離心 15 min (14,000 x g, 4 °C),去除上清液。沉澱以冰過的 95% 酒精清洗 2 次。去除酒精並於抽風 櫃中將殘餘酒精抽乾。以 50 µL 的無菌水回溶 DNA 樣品,並保存於 -20 °C 中。DNA 濃度以 Qubit<sup>®</sup> dsDNA BR Assay Kit 進行定量。

- 3. 以現行紅麴菌鑑定法進行分離株鑑定
  - (1) 菌落外觀

將分離菌株和標準菌株分別培養於 malt extract agar (MEA)、25% glycerol nitrate agar (G25N) 和 czapek yeast extract agar (CYA) 培養基上,於 25℃ 下培養 7 天後,以掃描器記錄菌落形態並測量菌落大小。 根據菌落的生長與否、正反面顏色與大小,進行分離菌株的菌種判定 (圖 九與表五)。

(2) ITS 序列的 PCR 擴增與比對

PCR 反應的總體積為 25 µL,其中包含 1 倍 PCR 緩衝液 (S-T Exsel buffer with 20 mM MgSO<sub>4</sub>)、1 U Exsel high fidelity DNA polymerase、0.1 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)、50 ng 紅麴菌 株 DNA 以及 0.12 µM primer ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990)。PCR 反 應條件為起始 denaturation 95°C,5 分鐘。接著以 95°C 45 秒;62°C 45 秒;72°C 1 分鐘為一循環,進行 35 循環,最後進行 72°C 10 分鐘後保 存於 4°C。產物大小 (500-600 bp) 經由電泳確認後,交由明欣生物科技

### 表五、文獻中在 25℃ 下培養 7 天後,紅麴菌各菌種的菌落外觀與生長特性

Table 5. Colony size and morphology of *Monascus* spp. incubated at 25°C for 7 days in previous reports.

			CYA			MEA		G25N			
Species	BCRC ID	Diameter,	Colony color obverse reverse		Diameter,	Colony color		Diameter,	Colony color		
		mm			mm	obverse	reverse	mm	obverse	reverse	
M. pilosus	31502 <sup>T</sup>	15.0-25.0	R	P to PR	30.0-40.0	LO to PR	DO	14.0-18.0	W	U/W	
M. ruber	31532 <sup>T</sup>	20.0-32.0	W	U/B	30.0-42.0	B to OB	K/BO	16.0-22.0	W	U/B	
M. purpureus	31542 <sup>T</sup>	12.0-18.0	R/W	PR/OR	15.0-22.0	RO	O to DO	8.0-15.0	W/R	PR/OR	
M. floridanus	33310 <sup>T</sup>	14.0-15.0	OW	OW	16.5-18.5	PB to DG	GG	3.0-6.0	YG	OLB	
M. sanguineus	33446 <sup>T</sup>	7.5-8.5	PR to GR	PR to GR	8.0-10.0	PR to GR	DB		No growth		
M. lunisporas	33640 <sup>T</sup>	ND	ND	ND	13.0-15.0	OG	PB	10.0-12.0	GY	GY	
M. pallens	33641 <sup>T</sup>	9.0-10.0	Н	Н	9.0-10.0	Н	Н		No growth		
M. argentinensis	33998 <sup>T</sup>	22.0-25.0	H to PB	H to PB	20.0-22.0	PG	PG		No growth		
M. eremophilus	-		No growth			No growth			No growth		

B: Brown, BO: brownish orange, DB: dark brown, DG: dull green, DO: dark orange, GR: greyish red, GG: greenish grey, GY: greyish yellow, H: hyaline, K: khaki, LO: light orange, O: orange, OB: orange brown, OG: orange grey, OLB: olive brown, OR: orange red, OW: orange white, P: pale, PR: pastel red, PG: pale grey, PB: pale brown, R: reddish, RO: reddish orange, U: uncoloured, W: white, YG: yellowish grey.

34

有限公司進行定序。

(3) β-tubulin 序列的 PCR 擴增與比對

PCR 反應的總體積為 25 μL,其中包含 1 倍 PCR 緩衝液、1 U Exsel high fidelity DNA polymerase、0.1 mM dNTPs、20 ng 紅麴菌株 DNA 以 及 0.12 μM primer β-tubulin F (5'-CAAGATCCGTGAGGAGT-3') 和 β-tubulin R (3'-GTGAACTCCATCTCGTCCATA-5') (Park *et al.*, 2004)。PCR 反應條件為起始 denaturation 95°C,5 分鐘。接著以 95°C 45 秒;55°C 2 分鐘;72°C 2 分鐘為一循環,進行 30 循環,最後進行 72°C 10 分鐘後 保存於 4°C。產物大小 (800-900 bp)經由電泳確認後,交由明欣生物科技 有限公司進行定序。

(4) 序列比對分析

定序完成的紅麴菌分離株序列與標準菌株序列進行比對,序列比對 分析以 Geneious R8 (Biomatters Limited) 軟體進行,比對演算法為 MAFFT alignment (Katho *et al.*, 2002)。菌種之間的親緣關係是以 Tamura-Nei 演算法 (Tamura and Nei, 1993) 估計遺傳距離,並以 molecular evolutionary genetics analysis 軟體 (MEGA6) (Tamura *et al.*, 2013) 進行 Maximum Likelihood (ML) 和 Minimum Evolution (ME) (Rzhetsky and Nei, 1992) 建立 ITS 和 β-tubulin 序列親緣關係樹,並進 行 1000 次 bootstrap 檢驗 (Felsenstein, 1985)。

### (三) 紅麴菌種鑑定方法開發

1. 分子分型方法之策略與候選基因比對分析

本研究以紅麴菌二次代謝物相關基因包含 citrinin、monacolin K 以及 色素生合成基因作為紅麴菌分子分型方法的基礎。首先以已知的重要二次 代謝物相關基因包含 monacolin K (*M. pilosus*, accession no. DQ176595) (圖 十二)、citrinin (由三組序列組合而成,分別為 *M. purpureus*, accession no. AB243687; *M. purpureus*, accession no. AB167465; *M. aurantiacus*, accession no. EU309474) (圖十三) 與色素生合成基因 (*M. pilosus*, accession no. KC148521) (圖十四) 對 *M. purpureus* NRRL1596 (BCRC31542<sup>T</sup>) 與 *M. ruber* NRRL1597 基因體進行交叉比對,找出二次代謝物相關基因在這三個 菌種之間的分布。

比對方式為先以 M. purpureus NRRL1596 與 M. ruber NRRL1597 基因 體序列 (JGI project 1006097 以及 1006101) 建立 custom BLAST databases,再將上述已知的二次代謝物相關基因序列分別針對此二基因體進 行 discontinuous megablast 以搜尋相對應的 scaffold 片段。找到相對應的 scaffold 片段之後,再以 map to reference 的方式將二次代謝物相關基因序 列的位置進行標記,以找出特定基因的有無。PKSs 基因是以 PKS 基因的 核心保守性區域-β-ketoacyl synthase domain 針對 M. purpureus NTU568 全 基因體進行收尋比對之後所得到的 8 個候選基因,其中 pksa 與 pksβ 已 知為黃色素生合成基因。另外以 M. pilosus 和 M. ruber 的色素生合成基因 簇中的保守性序列設計 RubPil 作為兩菌種辨識之用。

2. 分子分型方法之建立

本研究針對不同菌種間特定基因的有無或是種保守性差異區域(如 PKSs、mokH、pksCT、ctnR1 基因和 RubPil 保守性序列)進行引子設計(圖 十五和圖十六),其引子序列列於表六。

(1) 複式 PCR (multiplex PCR)

首先將針對二次代謝物生合成相關基因所設計的引子對,引子對 Tm 值範圍為 60±4℃, PCR 產物的大小差別至少 20%。設計完成的引子以 紅麴菌標準菌株進行 PCR 測試。在 PCR 測試完成後挑選具有菌種鑑別力 的引子對,進行複式 (multiplex) PCR 的設計與組合測試,目標為可以藉 由單一複式 PCR 反應的結果,區分最多種類的紅麴菌種,尤其是常見的 *M. purpureus、M. pilosus* 以及 *M. ruber*。複式 PCR 引子組合先以紅麴菌 標準株進行測試,並且依據測試結果做必要的調整,以驗證分子分型方 法的鑑別力。



圖十二、*M. pilosus* 的 monacolin K 生合成基因簇。(accession no. DQ176595)

Figure 12. Monacolin K biosynthetic gene cluster of *M. pilosus*.

37

1 8,078	200 8,277	400 8,477	600 8,677	800 8,877	1,000 9,077	1,200 9,277	1,400 9,477	1,600 9,677	1,800 9,877	2,000 10,077	2,200 10,277	2,400 10,477	2.600 10.677	2.800 10,877	3,000 11,077	3,200 11,277	3,400 11,477	3,600 11,677	3,800 11,877	4,000 12,077
		-				ctnD CDS	ctnD gene			<u> </u>				c	thE CDS		Glyoxalas	e/bleomvcin resis	stance protein/di	oxygenase
	4,200 12,277	4,400 12,477	4,600 12,677	4,800 12,877	5,000 13,077	5,200 13,277	5,400 13,477	5,600 13,677	5,800 13,877	6,000 14,077	6,200 14,277	6,400 14,477	6.600 14.677	6,800 14,877	7,000 15,077	7,200 15,277	7,400 15,477	7,600 15,677	7,800 15,877	8,000 16,077
					-2			aldehyde dehydrogen	e dehydrogenase ase CDS	•		<u> </u>			ctnR	gene, 20G-Fe(II	i) oxygenase fan	nily oxidoreductas ctnR CDS	e 5	<b>_</b>
Glyoxalase	bleomycin resi: 8,200	stance protein/o 8,400	dioxygenase 8,600	8.800	9,000	9,200	9,400	9,600	9,800	10,000	10,200	10,400	10,600	10,800	11,000	11,200	11,400	11.600	11,800	12,000
	16,277	16,477	16,677	16,877	17,077	17,277	17,477 ctnA ge	17.677	17,877	18,077	18,277	18,477	18,677	18,877 ctnB gene	19,077	19,277	19,477	19,677	19,877	20,077
ctnB	ctnR CDS	l) oxygenase fa	mily oxidoreduct	ase			ctnA Cl	DS						ctnB CDS						
ount	12,200	12,400 20,477	12,600	12,800	13,000	13,200	13,400	13,600	13,800	14,000	14,200	14,400	14,600	14,800	15,000	15,200	15,400	15,600	15,800	16,000
	10,111	>	Lolori	20,011	Lipit	a. 1, a. 17	2.1911	1.00	21,011	Citrinin polyketic	de synthase gene	, PKS	22,011	ale OT ODO	10,011	20,217	10000	20,017	20,011	
								_						pksCT CDS						
	16,200 24,277	16,400 24,477	16,600 24,677	16,800 24,877	17,000 25,077	17,200 25,277	17,400 25,477	17,600 25,677	17,800 25,877	18,000 26,077	18,200 26,277	18,400 26,477	18,600 26,677	18,800 26,877	19,000 27,077	19,200 27,277	19,400 27,477	19,600 27,677	19,800 27,877	20,000 28,077
5									Citrinin poly	pksCT CDS	gene, PKS									
	20,200 28,277	20,400 28,477	20,600 28,677	20,800 28,877	21,000 29,077	21,200 29,277	21,400 29,477	21,600 29,677	21,800 29,877	22,000 30,077	22,200 30,277	22,400 30,477	22,600 30,677	22,800 30,877	23,000 31,077	23,200 31,277	23,400 31,477	23,600 31,677	23,800 31,877	24,000 32,077
>	Citrinin poly	ketide synthase	gene, PKS				_		ctnC	C gene								343		
	24,200	24,400	24,600	24,800	25,000	25,200	25.400	25,600	25,800	26,000	26,200	26,400	26,600	26,800	27,000	27,200	27,400	27,600	27,800	28,000
	32,277	32,477	32,677	32,877	33,077	33,277	33,477	33,677	33,877 ctnF	34,077 gene	34,277	34,477	34,677	34,877	35,077	35,277 Hypertheti	35,477 cal conserved pi	35,677 otein	35,877	36,077
							ctnF CDS			-										
	28,200 36,277	28,400 36,477	28,600 36,677	28,800 36,877	29.000 37.077	29,200 37,277	29,400 37,477	29,600 37,677	29,800 37,877	30,000 38,077	30,200 38,277	30,400 38,477	30,600 38,677	30,800 38,877	31,000 39,077	31,200 39,277	31,400 39,477	31,600 39,677	31,800 39,877	32,000 40,077
>		Hyperthetical	conserved protei	in					-	2				ctr	nR1 gene		ctnR1	CDS		
	32,200	32,400	32,600	32,800	33,000	33,200	33,400	33,600	33,800	34,000	34,200	34,400	34,600	34,800	35,000	35,200	35,400	35,600	35,800	36,000
> >	40,277	40,477	40.677	40,877	41,077	41,277	41,477	41,677	41,877	42,077	42,277	42,477	42,677 ctnG g	42,877 gene	43,077	43,277	43,477	43,677	43,877	44,077
ctnR1 ger	e ctnR1 CDS																ctnG CDS	8		
	36,200 44,277	36,400 44,477	36,600 44,677	36,800 44,877	37,000 45,077	37,200 45,277	37.400 45.477	37,600 45,677	37,800 45,877	38,000 46,077	38,200 46,277	38,400 46,477	38,600 46,677	38,800 46,877	39,000 47,077	39,200 47,277	39,400 47,477	39,600 47,677	39,800 47,877	40,000 48,077
				U	and gene		ctnG CDS						c	tnH CDS			ydrogenase/red		<b>—</b>	
	40,200 48,277	40.400 48.477	40.600 48.677	40,800 48,877	41,000 49,077	41,200 49,277	41.400 49.477	41,600 49,677	41,800 49,877	42,000 50,077	42,200 50,277	42,400 50,477	42,600 50,677	42,800 50,877	43,000 51,077	43,200 51,277	43,400 51,477	43.600 51.677	43,800 51,877	43,995 52,072
						ctnl CDS	ctnl gen	e, bifunctional fa	atty acid transpor	ter/acyl-CoA syn	thetase								smc protein	

圖十三、*M. purpureus* 的 citrinin 生合成基因簇。 (accession no. AB243687; accession no. AB167465; accession no. EU309474) Figure 13. Citrinin biosynthetic gene cluster of *M. purpureus*.

38



1,600 1,800 2,000 2,200 2,400 2,600 2,800 3,000 3,200 3,400 3,600 3,800 4,000 4,200 4,400 4,600 4,800 5,000 5,200 5,400 5,600 5,800 6,000

圖十四、M. pilosus 的色素生合成基因簇。(accession no. KC148521)

Figure 14. Pigment biosynthetic gene cluster of *M. pilosus*.

200

400

600

800

1,000

1,200

1,400



圖十五、候選 PKS 基因及引子放大區域。

Figure 15. Candidate PKS gene and it's amplicon (A)  $pksa \cdot$  (B)  $pks\beta \cdot$  (C)  $pks\gamma \cdot$  (D)  $pks\delta \cdot$  (E)  $pkse \cdot$  (F)  $pks\theta \cdot$  (G)  $pks\kappa$  and (H) pks1

40



Figure 16. Design of *M. purpureus* species specific primer set mkH.



圖十七、Citrinin 生合成基因簇的 pksCT 基因與引子放大區域。

Figure 17. Amplicon and primer design of primer set pksCT according to the *pksCT* gene in the citrinin biosynthesis gene cluster.



圖十八、Citrinin 生合成基因簇中的 ctnR1 基因與引子放大區域。

Figure 18. Amplicon and primer design of primer set ctnR1 according to the *ctnR1* gene in the citrinin biosynthesis gene cluster.



圖十九、M. pilosus 和 M. ruber 的保守性序列引子 RubPil 的設計。

Figure 19. Design of primer set RubPil according to the conserved sequence in the pigment biosynthesis gene cluster.

表六、本研究所設計的引子

Table 6. Primers	designed	in	this	stud	y.
------------------	----------	----	------	------	----

Oligo ID	Target gene	Sequence $(5' \rightarrow 3')$	Amplicon		
	Tunger gene		size		
pksa F	nkaa	GACTGCGGTCATCCGGCCC	1290 hr		
pksa R	ркза	TGCGTGTCCCCGGAGCTACA	1380 bp		
pksβ F	10	CGCAAGGCTGTCGCCTCGAT	1250 ha		
pksβ R	ркѕр	GCCGTTCGTCGGCTGGGTAG	1250 бр		
pksy F	n kau	CGGGCCAGCCTGCAGTGAG	1252 hr		
pksy R	ркѕү	GCCATCCCGGGAAAGTCTGC C	1252 бр		
pksð F	1.5	GCGAGCCAACCGTCTGGACC	1024 h =		
pksð R	pkso	CGAGACGACCACCGTTGCCC	1024 bp		
pkse F	CGCCTCCCTCGTCCCAGTCA		10701		
pkse R	pkse	GGGTTTCAGAAGCCGCCGCA	1270 bp		
pks0 F	AGCACCTCGGAGCAACGGTTC		10061		
pks0 R	pkst	AGCACTGTGGCCCTGTCACG	1296 bp		
pksк F	CTGGCAACGGCAATGCGAGC		11/01		
pksĸ R	ркѕк	TAGGATGCGGTTCGCGGGGA	1160 bo		
pks1 F	1 1	GCCGGTCTGAGCAAAGGCCA			
pks1 R	pks1	AGCCCAGAGGCGAGTGAGGG	1191 бр		
mkH F	1	TCTTCTCCTTCAGCTTCTTCACC			
mkH R	mkH	GGGTTGAAGAGGGGTATGGTATC	804 bp		
ctnR1 F		GATTTCAATGGCATCACAACCCA			
ctnR1 R	ctnR1	GATCTCCCCGAAGAAATCATGGA	537 bp		
RubPil F		CGTGCCGCTTTGATCTTTTGG			
RubPil R	RubPil	AGGGGAGTTGGTGGGCA	158 bp		
pksCT F		CATATCAGGCCGTCGAACAAT			
pksCT R	pksCT	CAGTACCCATCCCCCTTAGC	406 bp		

## 三、結果

#### (一) 紅麴菌株鑑定

1. 參考菌株

以紅麴準菌株包括 M. pilosus BCRC 31502<sup>T</sup>、M. ruber BCRC 31532<sup>T</sup>、M. purpureus BCRC 31542<sup>T</sup>、M. floridanus BCRC 33310<sup>T</sup>、M. sanguineus BCRC 33446<sup>T</sup>、M. lunisporas BCRC 33640<sup>T</sup>、M. pallens BCRC 33641<sup>T</sup>、M. argentinensis BCRC 33998<sup>T</sup> 和 M. eremophilus ATCC 62925<sup>T</sup>, 加上已知菌種的紅麴菌株 M. purpureus NTU 568、M. purpureus NTU 301 和 M. purpureus YM1 與其他 BCRC 菌株進行外觀形態觀察與建立 ITS 和 β-tubulin 序列的親緣關係樹。由 於標準菌株中的 M. eremophilus 需在 MY50G (malt extract yeast extract 50% glucose) 培養基上培養八週才能觀察外觀形態,且在一般用於菌落外觀判斷的 培養基,如 MEA、CYA 與 G25N 中皆不生長,屬於罕見的紅麴菌種。加上 M. eremophilus 目前尚無出現在紅麴米中的文獻記載,且食品工業發展研究所之 生物資源保存及研究中心並不提供此菌株,因此不列入鑑定目標。此外由於食 品工業發展研究所之生物資源保存及研究中心將 M. kaoliang BCRC 31506<sup>T</sup> 正式列為紅麴菌種,因此列入本研究當中。將紅麴菌株接種於 MEA、G25N 和 CYA 培養基上,於 25°C 下培養 7 天後,以掃描器記錄菌落形態並測量菌落 直徑大小並與過去文獻做比較 (圖九和表五)。

圖二十至圖二十八為標準菌株的菌落外觀圖,表七為參考菌株培養於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落直徑大小與正反面顏色,結果發現除了 *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup> 因無文獻可比對之外,其餘標準菌株的顏色或者是 生長情況皆與過去文獻有所差異。*M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> 在 CYA 和 G25N 培養基上的菌落直徑大小 (45.33 mm 和 25.51 mm) 比文獻記錄大 1.5 倍 (15-25 mm 和 14-18 mm),而菌落正反面顏色在 MEA 和 CYA 培養基上皆為 白色,文獻記錄則是淡紅色 (MEA) 和紅色 (CYA)。*M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup> 在 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落直徑大小分別為 19.29 mm、24.57 mm 和 2.28 mm;而菌落正反面顏色皆為白色,除了 MEA 背面顏色為粉桃紅 色。*M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> 在 CYA 和 G25N 培養基上的菌落直徑大小 (47.68 mm 和 31.92 mm) 比文獻記錄大 1.5-2 倍 (20-32 mm 和 16-22 mm), 而菌落正反面顏色在 MEA 培養基上為白色,文獻記錄則是棕色至棕橙色。



圖二十、M. pilosus BCRC 31502<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態。

Figure 20. Colonies morphology of *M. pilosus* BCRC  $31502^{T}$  on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十一、M. kaoliang BCRC 31506<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀 形態。

Figure 21. Colonies morphology of *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B): reverse.



圖二十二、*M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態。

Figure 22. Colonies morphology of *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十三、M. purpureus BCRC 31542<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外 觀形態。

Figure 23. Colonies morphology of *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十四、M. floridanus BCRC 33310<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外 觀形態。

Figure 24. Colonies morphology of *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十五、M. sanguineus BCRC 33446<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外 觀形態。

Figure 25. Colonies morphology of *M. sanguineus* BCRC  $33446^{T}$  on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十六、*M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外 觀形態。

Figure 26. Colonies morphology of *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十七、M. pallens BCRC 33641<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀 形態。

Figure 27. Colonies morphology of *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.



圖二十八、*M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup> 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落 外觀形態。

Figure 28. Colonies morphology of *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup> on MEA, CYA and G25N medium. (A) obverse. (B) reverse.

	DCDC	СҮА			- 3 N	MEA		G25N			
Species	BCKC	Diameter,	Colony	y color	Diameter,	Colony	y color	Diameter,	Colony color		
	ID	mm	obverse	reverse	mm	obverse	reverse	mm	obverse	reverse	
M. purpureus	31499	25.18	R	PR	20.82	0	0	3.16	0	OR	
M. pilosus	$31502^{T}$	21.83	W	W	16.32	W	W	6.13	W	W	
M. kaoliang	31506 <sup>T</sup>	24.57	W	W	19.29	W	PP	2.28	W	W	
M. pilosus	31526	47.30	W	W	44.95	W	W	27.91	W	W	
M. purpureus	31530	31.68	R	PR	30.19	Ο	DO	6.42	Ο	OR	
M. ruber	$31532^{T}$	47.68	W	W	48.45	W	В	31.92	W	W	
M. ruber	31534	44.95	W	W	45.74	W	В	27.27	W	W	
M. purpureus	31540	25.91	R	PR	26.68	Ο	0	8.30	Ο	PR	
M. purpureus	$31542^{T}$	27.12	R	PR	27.89	PP	RO	8.95	Ο	OR	
M. purpureus	31615	25.62	R	PR	23.00	Ο	Ο	8.37	Ο	OR	
M. purpureus	32808	36.23	R	PR	29.52	PP	Ο	19.58	W	LO	
M. barkeri	33309	31.46	W	NW	31.76	W	K	27.10	W	W	
M. floridanus	33310 <sup>T</sup>	21.12	OW	GG	20.53	OW	DK	6.26	Н	W	
M. albus	33372	22.61	W	W	26.93	PP	PP	8.71	NW	LO	
M. sanguineus	33446 <sup>T</sup>	15.76	PP	DB	15.54	PP	PR	12.79	LO	RO	
M. lunisporas	33640 <sup>T</sup>	15.63	PG	GG	16.68	PG	GG	18.26	W	YG	
M. pallens	33641 <sup>T</sup>	20.25	Н	W	23.89	Н	PGE	8.72	Н	W	
M. argentinensis	33998 <sup>T</sup>	16.29	PG	GG	17.09	PG	GG	17.05	W	W	
M. purpureus	NTU568	26.52	R	PR	25.79	PP	RO	7.45	Ο	OR	
M. purpureus	NTU301	42.09	R	PR	46.95	PP	RO	28.79	PP	LO	
M. purpureus	YM1	22.71	OR	LO	20.67	PP	PP	7.19	W	Ο	

Table 7. Colony size and morphology of *Monascus* spp. incubated at  $25^{\circ}$ C for 7 days.

表七、在 25℃ 下培養 7 天後所觀察到的紅麴菌菌落外觀與直徑大小

B: Brown, DB: dark brown, DK: dark khaki, DO: dark orange, GG: greenish grey, H: hyaline, K: khaki, LO: light orange, NW: navajo white, O: orange, OR: orange red, OW: orange white, PR: pastel red, PG: pale grey, PGE: palegoldenrod, PP: peachpuff, R: reddish, RO: reddish orange, W: white, YG: yellowish grey.
M. purpureus BCRC 31542<sup>T</sup> 在 MEA 培養基上的菌落正反面顏色為粉桃紅 色和紅橙色,文獻記錄則是紅橙色和橘色至深橘色。M. floridanus BCRC 33310<sup>T</sup> 在 G25N 培養基上的菌落正反面顏色為透明和白色, 文獻記錄則是 黄灰色和橄欖褐色。M. sanguineus BCRC 33446<sup>T</sup> 於三種培養基上的菌落正 反面顏色皆不符合過去文獻記載,且過去文獻在 G25N 培養基上無法生 長,而在本研究中 G25N 培養基上有菌落生長且菌落直徑大小為 12.79 mm。M. lunisporas BCRC 33640<sup>T</sup> 於三種培養基上的菌落正反面顏色皆不符 合過去文獻記載,此外在 CYA 培養基上的菌落直徑大小與正反面顏色於 文獻上皆無記載,因此無法比較。M. pallens BCRC 33641<sup>T</sup> 在 MEA 和 CYA 培養基上的菌落直徑大小 (23.89 mm 和 20.25 mm) 皆比文獻記錄大 2 倍 (9-10 mm),且過去文獻在 G25N 培養基上無法生長,而在本研究中 G25N 培養基上有菌落生長且菌落直徑大小為 8.72 mm。M. argentinensis BCRC 33998<sup>T</sup> 在過去文獻中的 G25N 培養基上無法生長,而本研究在 G25N 培 養基上有菌落生長且菌落直徑大小為 17.05 mm 且菌落正反面顏色只有 CYA 培養基上的菌落正反面顏色 (淺灰色和灰綠色) 不符合過去文獻所記 載 (皆為透明至淺棕色)。其他 BCRC 紅麴菌株與已知菌種的紅麴菌株 M. purpureus NTU 568、M. purpureus NTU 301 和 M. purpureus YM1 的菌落形 態請參見附錄一。

親緣關係是以 MEGA6 軟體 (Tamura *et al.*, 2013) 建立紅麴標準菌株 的 ITS 和 β-tubulin 序列親緣關係樹,使用的方法為 maximum likelihood 和 minimum evolution,並進行 1000 次 bootstrap 檢驗 (圖二十九至圖三 十二)。圖二十九是使用 maximum likelihood 建立紅麴標準菌株的 ITS 序 列親緣關係樹,結果顯示標準菌株分為五群,分別為 (1) *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup> 和 *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup>。(2) *M. eremophilus* ATCC 62925<sup>T</sup> 和 *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>。(3) *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> 和 *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup>。(4) *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>、*M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup> 和 *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>。(5) *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup> 自成一群。 圖三十是使用 minimum evolution 建立紅麴標準菌株的 ITS 序列親緣關係 樹,分群結果與圖二十六相同。圖三十一是使用 maximum likelihood 建立 紅麴標準菌株的 β-tubulin 序列親緣關係樹,結果顯示標準菌株分為五群,



圖二十九、利用最大概率法所建立的紅麴標準菌株 ITS 序列親緣關係樹。

Figure 29. Phylogenetic tree of *Monascus* type strain ITS sequence using by maximum likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-1096.1227) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 10 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 396 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.



## 0.01

圖三十、利用最小演化法所建立的紅麴標準菌株 ITS 序列親緣關係樹。

Figure 30. Phylogenetic tree of *Monascus* type strain ITS sequence using by minimum evolution method. The optimal tree with the sum of branch length = 0.27387873 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method and are in the units of the number of base substitutions per site. The ME tree was searched using the Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm at a search level of 1. The Neighbor-joining algorithm was used to generate the initial tree. The analysis involved 10 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 396 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6



圖三十一、利用最大概率法所建立的紅麴標準菌株  $\beta$ -tubulin 序列親緣關係樹。 Figure 31. Phylogenetic tree of *Monascus* type strain  $\beta$ -tubulin sequence using by maximum likelihood method. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-1483.2834) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 10 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 477 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6.



圖三十二、利用最小演化法所建立的紅麴標準菌株  $\beta$ -tubulin 序列親緣關係樹。 Figure 32. Phylogenetic tree of *Monascus* type strain  $\beta$ -tubulin sequence using by minimum evolution method. The evolutionary history was inferred using the Minimum Evolution method. The optimal tree with the sum of branch length = 0.35134234 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method and are in the units of the number of base substitutions per site. The ME tree was searched using the Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm at a search level of 1. The Neighbor-joining algorithm was used to generate the initial tree. The analysis involved 10 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 477 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6. 分別為 (1) *M. pilosus* BCRC  $31502^{T} \times M.$  ruber BCRC  $31532^{T} 和 M.$ sanguineus BCRC  $33446^{T} \circ (2) M.$  kaoliang BCRC  $31506^{T} \pi M.$  purpureus BCRC  $31542^{T} \circ (3) M.$  floridanus BCRC  $33310^{T} \times M.$  argentinensis BCRC  $33998^{T} \pi M.$  lunisporas BCRC  $33640^{T} \circ (4) \pi (5)$ 分別為 *M.* eremophilus ATCC  $62925^{T} \pi M.$  pallens BCRC  $33641^{T}$ , 雨種紅麴菌各自為一群。 圖 三 +二是使用 minimum evolution 建立紅麴標準菌株的  $\beta$ -tubulin 序列親緣 關係樹,結果顯示標準菌株分為五群,分別為 (1) *M.* kaoliang BCRC  $31506^{T} \times M.$  purpureus BCRC  $31542^{T} \pi M.$  sanguineus BCRC  $33446^{T} \circ (2) M.$ pilosus BCRC  $31502^{T} \pi M.$  ruber BCRC  $31532^{T} \circ (3) M.$  floridanus BCRC  $33310^{T} \times M.$  argentinensis BCRC  $33998^{T} \pi M.$  lunisporas BCRC  $33640^{T} \circ (4)$  $\pi (5)$ 分別為 *M.* eremophilus ATCC  $62925^{T} \pi M.$  pallens BCRC  $33641^{T}$ , 雨種紅麴菌各自為一群  $\circ$ 

2. 未知菌株

表八為紅麴菌分離株培養於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落直 徑大小與正反面顏色,其菌落外觀形態請參見附錄一。將紅麴標準菌株與 未知菌株的 ITS 和 β-tubulin 序列以 MEGA6 軟體建立親緣關係樹 (圖 三十三至圖三十六)。圖三十三是使用 maximum likelihood 建立紅麴標準菌 株與未知菌株的 ITS 序列親緣關係樹,結果顯示未知菌株 430、CA505、 860、Ch30、DH、NiB、DYH 和 China 與 M. pilosus BCRC 31502<sup>T</sup> 和 M. ruber BCRC 31532<sup>T</sup> 屬於同一分支,其餘未知菌株與 M. kaoliang BCRC 31506<sup>T</sup>、*M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup> 和 *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup> 屬於同 一分支。圖三十四是使用 minimum evolution 建立紅麴標準菌株與未知菌株 的 ITS 序列親緣關係樹,結果顯示未知菌株 430、CA505、860、Ch30、 DH、NiB、DYH 和 China 與 M. pilosus BCRC 31502<sup>T</sup> 和 M. ruber BCRC 31532<sup>T</sup> 屬於同一分支,其餘未知菌株與 M. kaoliang BCRC 31506<sup>T</sup>、M. purpureus BCRC 31542<sup>T</sup> 和 M. sanguineus BCRC 33446<sup>T</sup> 屬於同一分支。圖 三十五是使用 maximum likelihood 建立紅麴標準菌株與未知菌株的 β-tubulin 序列親緣關係樹,結果顯示未知菌株 430、CA505、860、Ch30、 DH、NiB、DYH 和 China 與 M. pilosus BCRC 31502<sup>T</sup> 和 M. ruber BCRC

		CYA		2	MEA		G25N			
Isolates ID	Diamator mm	Colon	y color	- Diamotor mm	Colon	y color	- Diamatar mm	Colon	y color	
	Diameter, mm	obverse	reverse	- Diameter, mm	obverse	reverse	Diameter, mm	obverse	reverse	
CA-A	29.62	R	PR	29.84	0	RO	9.41	LO	0	
CA-B	22.91	W	W	27.23	PP	PP	9.01	NW	LO	
CA-B-1	20.08	W	W	27.33	Н	W	10.42	Н	W	
CA-C	26.34	0	PR	27.31	Ο	0 _	6.65	NW	RO	
DYH	39.29	W	W	39.95	W	В	26.98	W	Κ	
TY-A	28.19	R	PR	31.63	0	0	7.07	LO	RO	
TY-B	24.32	PP	0	24.23	PP	PP	10.92	LO	Ο	
TY-C	25.05	W	W	28.83	PP	PP	9.12	W	LO	
TY-D	26.09	W	W	30.95	PP	PP	9.17	W	DO	
GH-A	29.59	PP	PP	30.52	PP	PP	9.83	Ο	OR	
GH-B	36.12	R	PR	32.87	0	PP	6.24	LO	OR	
CH	31.69	R	PR	33.59	Ο	RO	6.83	LO	DO	
JS	24.69	0	PR	29.49	Ο	0	6.88	LO	DO	
MD	28.24	PP	PR	27.98	PP	PP	5.50	W	Ο	
HRT-A-1	27.42	W	W	28.85	PP	LO	6.46	W	OR	
HRT-A-2	25.85	W	W	32.98	W	PP	8.58	W	W	
HRT-B-1	27.48	PP	PP	30.19	PP	PP	7.04	W	Ο	
HRT-B-2	24.28	W	W	28.83	PP	PP	11.57	W	DO	
DS	27.13	Ο	PR	30.65	0	0	6.72	LO	DO	
SA	21.96	R	PR	25.84	0	0	8.70	LO	Ο	
STS	33.35	0	PR	42.02	Ο	OR	4.10	LO	DO	
SJY	28.00	R	PR	30.62	0	OR	7.82	LO	0	

Table 8. Colony size and morphology of *Monascus* spp. incubated at 25°C for 7 days.

表八、在 25℃ 下培養 7 天後紅麴菌分離株的菌落外觀與菌落直徑大小

B: Brown, DO: dark orange, H: hyaline, K: khaki, LO: light orange, NW: navajo white, O: orange, OR: orange red, PR: pastel red, PP: peachpuff, R: reddish, RO: reddish orange, W: white.

63

(接下頁)

		CYA		3	MEA			G25N	
Isolates ID	Diamatan mm	Colon	y color	Diamatan mm	Colony	y color	Diamatan mm	Colon	y color
	Diameter, mm	obverse	reverse	- Diameter, mm	obverse	reverse	- Diameter, mm	obverse	reverse
TST	24.07	0	PR	26.21	0	OR	7.49	LO	DO
TYT	29.62	0	PR	33.04	0	OR	5.37	LO	DO
SJ	27.72	0	PR	29.87	0	0	4.87	LO	0
J-SIN	27.37	PP	PP	30.44	PP	0 _	7.28	W	0
JD	28.30	R	PR	30.56	0	0	8.94	LO	RO
S-YUAN	30.09	0	PR	33.05	0	0	7.10	LO	DO
TPN-A	26.94	0	PR	27.83	0	0	5.04	О	DO
TPN-B	24.00	W	W	29.26	W	PP	5.08	W	W
TPN-C	27.35	PP	PR	25.67	Ο	0	7.12	LO	0
AB-A	27.77	PP	PP	33.23	PP	PP	7.17	LO	0
AB-B	24.67	PP	PP	32.09	W	W	6.08	LO	DO
YF	32.46	0	PR	28.44	Ο	RO	7.96	LO	0
DHT-A	22.56	W	W	27.66	W	PP	7.34	W	W
DHT-B	27.92	PP	PP	29.45	PP	PP	7.95	W	0
DHT-C	27.59	0	PR	23.78	0	RO	8.78	LO	DO
DHT-D	27.12	PP	PP	31.64	PP	0	7.92	W	OR
DHT-E	32.06	PP	PP	35.03	PP	PP	5.56	W	0
M13	26.05	PP	PP	26.08	Ο	0	7.80	LO	OR
DH	39.90	PP	PR	48.79	PP	RO	29.13	W	OR
NiB	41.15	PP	PR	48.11	PP	RO	28.08	W	OR
Ch30	43.00	PP	PR	48.07	PP	RO	29.69	W	OR
China	42.64	PP	PR	47.28	PP	RO	30.16	W	OR

表八、在 25℃ 下培養 7 天後紅麴菌分離株的菌落外觀與菌落直徑大小 (續上頁)

Table 8. Colony size and morphology of *Monascus* spp. incubated at 25°C for 7 days. (continued)

B: Brown, DO: dark orange, H: hyaline, K: khaki, LO: light orange, NW: navajo white, O: orange, OR: orange red, PR: pastel red, PP: peachpuff, R: reddish, RO: reddish orange, W: white.

64

(接下頁)

		CYA		3	MEA			G25N	
Isolates ID	Diamatan mm	Colony	y color	Diamatan mm	Colon	y color	Diamatan mm	Colon	y color
	Diameter, mm	obverse	reverse	- Diameter, mm	obverse	reverse	- Diameter, mm	obverse	reverse
BM	26.60	R	PR	21.74	0	0	13.33	W	0
HJT	27.74	Ο	PR	28.01	0	RO	9.65	LO	OR
HS	24.98	Ο	PP	25.52	Ο	PP	9.58	LO	Ο
JFC	27.25	Ο	PR	28.28	Ο	RO	5.96	LO	OR
LC	33.29	Ο	PR	33.61	Ο	RO	6.23	LO	OR
SL	29.46	Ο	PR	31.81	0	RO	5.71	LO	OR
ST	29.76	0	PR	29.89	Ο	RO	3.77	LO	OR
SY	29.26	0	PR	31.11	Ο	RO	6.79	LO	OR
TW	26.91	Ο	PR	28.72	Ο	RO	7.39	LO	OR
UN	23.04	PP	PP	22.96	Ο	Ο	9.28	LO	OR
860	37.55	PP	PR	44.99	PP	RO	27.48	W	OR
A-1	27.33	Ο	PR	26.99	Ο	RO	7.20	LO	OR
A-2	25.77	0	PR	27.74	0	RO	10.52	LO	OR
SW3	25.18	Ο	PR	28.21	0	Ο	6.83	LO	OR
SW4	26.08	Ο	PR	28.78	Ο	RO	5.44	LO	Ο
803	24.01	Ο	PR	25.53	Ο	Ο	7.55	LO	OR
430	36.19	PP	PR	36.67	PP	RO	8.30	W	W
BS	26.28	Ο	PR	30.04	Ο	RO	9.91	LO	OR
HJY	31.74	Ο	PR	33.16	Ο	RO	6.95	LO	OR
Hong-JT	29.14	Ο	PR	31.24	Ο	OR	5.05	LO	DO
LA	28.05	R	PR	27.96	Ο	RO	8.82	LO	Ο
CA505	43.13	PP	PR	46.42	PP	RO	29.23	W	OR

表八、在 25℃ 下培養 7 天後紅麴菌分離株的菌落外觀與菌落直徑大小 (續上頁)

Table 8. Colony size and morphology of *Monascus* spp. incubated at 25°C for 7 days. (continued)

B: Brown, DO: dark orange, H: hyaline, K: khaki, LO: light orange, NW: navajo white, O: orange, OR: orange red, PR: pastel red, PP: peachpuff, R: reddish, RO: reddish orange, W: white.



圖三十三、利用最大概率法所建立的紅麴菌分離株 ITS 序列親緣關係樹。 Figure 33. Phylogenetic tree of *Monascus* isolates ITS sequence using by maximum likelihood method.



圖三十四、利用最小演化法所建立的紅麴菌分離株 ITS 序列親緣關係樹。 Figure 34. Phylogenetic tree of *Monascus* isolates ITS sequence using by minimum evolution method.



圖三十五、利用最大概率法所建立的紅麴菌分離株  $\beta$ -tubulin 序列親緣關係樹。 Figure 35. Phylogenetic tree of *Monascus* isolates  $\beta$ -tubulin sequence using by maximum likelihood method.



圖三十六、利用最小演化法所建立的紅麴菌分離株  $\beta$ -tubulin 序列親緣關係樹。 Figure 36. Phylogenetic tree of *Monascus* isolates  $\beta$ -tubulin sequence using by minimum evolution method.

31532<sup>T</sup> 屬於同一分支,其餘未知菌株與 *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>、*M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup> 屬於同一分支。圖三十六是使用 minimum evolution 建立紅麴標準菌株與未知菌株的 β-tubulin 序列親緣關係樹,結 果顯示未知菌株 430、CA505、860、Ch30、DH、NiB、DYH 和 China 與 *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> 和 *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> 屬於同一分支,其餘未 知菌株與 *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>、*M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup> 屬於同一 分支。

將未知菌株的 ITS 和 β-tubulin 序列 BLAST 後記錄可能的菌種,同 時依照未知菌株的外觀形態判斷其菌種,再結合三者的判斷結果確認其菌 種後並列於表九。表九的結果顯示共有 54 個紅麴菌分離株可辨識其菌 種,其中有 46 株為 *M. purpureus*、7 株為 *M. pilosus* 以及 1 株為 *M. ruber*。另外有 12 個紅麴菌分離株無法依據 ITS、β-tubulin 和外觀形態的 判斷結果來辨識其菌種,包含紅麴菌分離株 CA-A、CA-B-1、TY-B、GH-A、 HRT-A-2、HRT-B-1、TPN-B、AB-A、AB-B、DHT-A、DHT-B 和 DHT-E。 上述 12 個紅麴菌分離株只能確定為 *M. purpureus* 或 *M. kaoliang* 其中一 種。

colony morpholo	gy.			
Isolates ID	ITS	β-tubulin	Colony morphology	Final
CA-A	PP/K	PP/K	PP	PP
CA-B	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
CA-B-1	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
CA-C	PP/K	PP/K	PP	PP
DYH	R/P	R/P	R	R
TY-A	PP/K	PP/K	PP	PP
TY-B	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
TY-C	PP/K	PP/K	PP	PP
TY-D	PP/K	PP/K	PP	PP
GH-A	PP/K	PP/K	P/PP//K	PP/K
GH-B	PP/K	PP/K	PP	PP
CH	PP/K	PP/K	PP	PP
JS	PP/K	PP/K	PP	PP
MD	PP/K	PP/K	PP	PP
HRT-A-1	PP/K	PP/K	PP	PP
HRT-A-2	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
HRT-B-1	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
HRT-B-2	PP/K	PP/K	PP	PP
DS	PP/K	PP/K	PP	PP
SA	PP/K	PP/K	PP	PP
STS	PP/K	PP/K	PP	PP
SJY	PP/K	PP/K	PP	PP
TST	PP/K	PP/K	PP	PP
TYT	PP/K	PP/K	PP	PP
SJ	PP/K	PP/K	PP	PP
J-SIN	PP/K	PP/K	PP	PP
JD	PP/K	PP/K	PP	PP
S-YUAN	PP/K	PP/K	PP	PP
TPN-A	PP/K	PP/K	PP	PP
TPN-B	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
TPN-C	PP/K	PP/K	PP	PP
AB-A	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
AB-B	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
YF	PP/K	PP/K	PP	PP

表九、以紅麴菌分離株的 ITS、β-tubulin 序列和菌落外觀進行菌種判斷

Table 9. Strain identification of *Monascus* isolates with the ITS,  $\beta$ -tubulin sequence and

UD: undeterminalde, PP: M. purpureus, K: M. kaoliang, R: M. ruber, P: M. pilosus.

(接下頁)

表九、以紅麴菌分離株的 ITS、β-tubulin 序列和菌落外觀進行菌種判斷 (續上頁) Table 9. Strain identification of *Monascus* isolates with the ITS, β-tubulin sequence and colony morphology. (continued)

Isolates ID	ITS	β-tubulin	Colony morphology	Final
DHT-A	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
DHT-B	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
DHT-C	PP/K	PP/K	PP	PP
DHT-D	PP/K	PP/K	PP	PP
DHT-E	PP/K	PP/K	P/PP/K	PP/K
M13	PP/K	PP/K	PP	PP
DH	R/P	R/P	Р	Р
NiB	R/P	R/P	Р	Р
Ch30	R/P	R/P	Р	Р
China	R/P	R/P	Р	Р
BM	PP/K	PP/K	PP	PP
HJT	PP/K	PP/K	PP	PP
HS	PP/K	PP/K	PP	PP
JFC	PP/K	PP/K	PP	PP
LC	PP/K	PP/K	PP	PP
SL	PP/K	PP/K	PP	PP
ST	PP/K	PP/K	PP	PP
SY	PP/K	PP/K	PP	PP
TW	PP/K	PP/K	PP	PP
UN	PP/K	PP/K	PP	PP
860	R/P	R/P	Р	Р
A-1	PP/K	PP/K	PP	PP
A-2	PP/K	PP/K	PP	PP
SW3	PP/K	PP/K	PP	PP
SW4	PP/K	PP/K	PP	PP
803	PP/K	PP/K	PP	PP
430	R/P	R/P	Р	Р
BS	PP/K	PP/K	PP	PP
HJY	PP/K	PP/K	PP	PP
Hong-JT	PP/K	PP/K	PP	PP
LA	PP/K	PP/K	PP	PP
CA505	R/P	R/P	Р	Р

UD: undeterminalde, PP: M. purpureus, K: M. kaoliang, R: M. ruber, P: M. pilosus.

## (二) 引子測試與 multiplex PCR 分析

#### 1. 各候選引子的測試結果

將 M. purpureus 與 M. pilosus 兩者的 monacolin K 生合成基因簇進 行比對,結果發現 M. purpureus 的 monacolin K 生合成的主要基因 mokH 並不在 monacolin K 的生合成基因簇內,反而出現在其他位置上,因此本 研究推測 M. purpureus 的 monacolin K 生合成基因簇有可能是損壞的。因 此利用此損壞的基因序列作為菌種專一性引子 (mkH) 的設計目標 (表六 和圖十六),並對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種進行測試 (圖三十 七),結果顯示只有 M. purpureus、M. albus 和 M. kaoliang 具有此一損壞 的 mokH 基因。

針對 polyketide synthases (PKSs) 基因設計的引子,其中包括色素生合 成基因  $pks\alpha$  (type II polyketide synthase) 和  $pks\beta$  (type I polyketide synthase), 還有 pksy、pksδ、pksε、pksθ、pksκ 和 pks1。將這些引子對標 準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種進行測試 (圖三十八至圖四十五)。另外針對 citrinin 生合成基因簇中的 pksCT、ctnR1 基因以及 M. pilosus 和 M. ruber 的保守性序列所設計的引子 (pksCT、ctnR1 和 RubPil) 對標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種進行測試 (圖四十六至圖四十七)。各引子之 PCR 條件列 於表十。上述引子的測試結果顯示 M. pilosus 能被 pksβ、pksδ、pksε、pksθ、 pksk、pks1、ctn R1 和 RubPil 引子偵測到。M. ruber 能被 pksβ、pksδ、 pksε、pksκ、pks1、ctn R1 和 RubPil 引子偵測到。M. kaoliang 能被 pksα、 pksβ、pksγ、pksδ、pksε、pksθ、pksκ、pks1、mkH、ctn R1 和 pksCT 引子 偵測到。*M. purpureus* 能被 pksa、pksβ、pksγ、pksε、pksθ、pksκ、pks1、 mkH、ctn R1 和 pksCT 引子偵測到。M. barkeri 能被 pksδ、pksε、pksθ、 pksκ、pks1、ctn R1 和 RubPil 引子偵測到。M. albus 能被 pksa、pksy、 pksε、pksθ、pksκ、pks1、mkH、ctn R1 和 pksCT 引子偵測到。M. sanguineus 能被 pksa、pksβ、pksγ、pksδ、pksε、pksκ 和 ctn R1 引子偵測到。M. lunisporas 能被 pks1 引子偵測到。M. floridanus、M. pallens 和 M. argentinensis 無法 被任一引子偵測到。



圖三十六、引子 mkH 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 36. Specificity test of primer mkH to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>. Lane 2-8: *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31615, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31615, *M. purpureus* BCRC 32808 and NTU568. Lane 9-10: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 11-12: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 13-19: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.





圖三十七、引子 pksa 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測 試結果。

Figure 37. Specificity test of primer pksα to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.



圖三十八、引子 pksβ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測 試結果。

Figure 38. Specificity test of primer pksβ to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.





圖三十九、引子 pksy 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測 試結果。

Figure 39. Specificity test of primer pksγ to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.



圖四十、引子 pksð 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 40. Specificity test of primer pksδ to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.



圖四十一、引子 pkse 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 41. Specificity test of primer pksɛ to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.



圖四十二、引子 pksθ 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測 試結果。

Figure 42. Specificity test of primer pksθ to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.





圖四十三、引子 pksk 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測 試結果。

Figure 43. Specificity test of primer pksk to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 31542, *M. purpureus* BCRC 31615 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.





圖四十四、引子 pks1 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 44. Specificity test of primer pks1 to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 31542, *M. purpureus* BCRC 31615 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.





圖四十五、引子 pksCT 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 45. Specificity test of primer pksCT to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.



圖四十六、引子 ctnR1 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 46. Specificity test of primer ctnR1 to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.

1 2 M 3 4 M 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13 14 15 16 17 18



圖四十七、引子 RubPil 對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的專一性 PCR 測試結果。

Figure 47. Specificity test of primer RubPil to reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. Lane 1-2: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup> and *M. pilosus* BCRC 31526. Lane 3-4: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup> and *M. ruber* BCRC 31534. Lane 5-11: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530, *M. purpureus* BCRC 31540, *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31515 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 12-18: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.

# 表十、各引子之 PCR 反應條件

Table 10. PCR reaction condition of each primer.

	pksa	pksβ	pksγ	pksð	pkse	pksθ	pksĸ	pks1	mkH	ctnR1	RubPil
PCR buffer				8	0	1X	1				
dNTPs				10		0.1 mM					
Primer F&R				$(\mathbf{O})$		0.08 µM					
DNA polymerase			1	14		1 U					
DNA			1			10 ng					
Total (volume)		1	0			25 μL					
				PCR	annealing o	condition					
A 1'	64°C,	60°C,	63°C,	63°C,	65°C,	63°C,	63°C,	63°C,	66°C,	61°C,	66°C,
Annealing	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min

98

### 2. Multiplex PCR 分析結果

表十一為上述各引子的結果,從結果可知合併 pks1、pksδ、pksθ 以及 RubPil 引子對 M. pilosus、M. ruber、M. kaoliang、M. purpureus、M. barkeri、 M. albus、M. sanguineus 和 M. lunisporas 具有鑑別力,因此本研究將 pks1、pksδ、pksθ 以及 RubPil 引子進行組合後進行 multiplex PCR。圖四 十八與表十二為 pksδ、pksθ 以及 RubPil 引子組合後應用於 multiplex PCR,並對紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種進行測試結果,結果顯示 將紅麴菌種區分為五群,出現 band ABC 為 M. pilosus 和 M. barkeri。Band BC 則為 M. ruber。Band AB 為 M. kaoliang。僅出現 band A 為 M. purpureus 和 M. albus。僅出現 band B 代表 M. sanguineus。M. pallens、 M. argentinensis 和 M. floridanus 無法以此方法進行分類。表十三為 multiplex PCR 反應條件,起始 denaturation 95℃,5 分鐘。接著以 95℃45 秒;63℃1 分鐘;72℃1 分鐘為一循環,進行 35 循環,最後進行 72℃10 分鐘。



圖四十八、紅麴標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的 multiplex PCR 分析。 Figure 47. Multiplex PCR analysis of reference *Monascus* strains and other BCRC *Monascus* species. M: 100 bp maker. A、B and C: band. Lane 1-3: *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31615 and *M. purpureus* BCRC 32808. Lane 4-8: *M. barkeri* BCRC 33309, *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, *M. albus* BCRC 33372, *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup> and *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>. Lane 9-16: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup>, *M. pilosus* BCRC 31526, *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup>, *M. ruber* BCRC 31534, *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, *M. purpureus* BCRC 31499, *M. purpureus* BCRC 31530 and *M. purpureus* BCRC 31540. Lane 17-18: *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup> and *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.

	P1	P2	<b>R</b> 1	R2	K	PP1	PP2	PP3	PP4	PP5	PP6	В	F	А	S	L	Pa	Ar
pksα	-	-	-	-	+	+	+	+/	+	+	+		-	+	+	-	-	-
pksβ	+	+	+	+	+	+	+	14	÷	+	+	-	-	-	+	-	-	-
pksy	-	-	-	-	+	+	Y	1	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
pksð	+	+	+	+	+	1	1	) -	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
pksɛ	+	+	+	+	+	÷	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
pksθ	+	+	-	-	+	+	/ +	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
pksĸ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	-	-	-
pks1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
mkH	-	-	-	. 4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
ctnR1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
RubPil	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
pksCT	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

表十一、各引子對標準菌株與其他 BCRC 紅麴菌種的測試結果

Table 11. Specificity test of each primer to reference Monascus strains and other BCRC Monascus species.

P1: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup>, P2: *M. pilosus* BCRC 31526, R1: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup>, R2: *M. ruber* BCRC 31534, K: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, PP1: *M. purpureus* BCRC 31499, PP2: *M. purpureus* BCRC 31530, PP3: *M. purpureus* BCRC 31540, PP4: *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, PP5: *M. purpureus* BCRC 31615, PP6: *M. purpureus* BCRC 32808, B: *M. barkeri* BCRC 33309, F: *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, A: *M. albus* BCRC 33372, S: *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, L: *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, Pa: *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup>, Ar: *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.

68

表十二、Multiplex PCR 結果

Table 12. Multiplex PCR assay.

	P1	P2	R1	R2	K	PP1	PP2	PP3	PP4	PP5	PP6	В	F	А	S	L	Pa	Ar
pksð	+	+	+	+	+	-	-	1	7,	1	~	+	-	-	+	-	-	-
pksθ	+	+	-	-	+	+	1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
RubPil	+	+	+	+	-	(- <sup>1</sup>	12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

P1: *M. pilosus* BCRC 31502<sup>T</sup>, P2: *M. pilosus* BCRC 31526, R1: *M. ruber* BCRC 31532<sup>T</sup>, R2: *M. ruber* BCRC 31534, K: *M. kaoliang* BCRC 31506<sup>T</sup>, PP1: *M. purpureus* BCRC 31499, PP2: *M. purpureus* BCRC 31530, PP3: *M. purpureus* BCRC 31540, PP4: *M. purpureus* BCRC 31542<sup>T</sup>, PP5: *M. purpureus* BCRC 31615, PP6: *M. purpureus* BCRC 32808, B: *M. barkeri* BCRC 33309, F: *M. floridanus* BCRC 33310<sup>T</sup>, A: *M. albus* BCRC 33372, S: *M. sanguineus* BCRC 33446<sup>T</sup>, L: *M. lunisporas* BCRC 33640<sup>T</sup>, Pa: *M. pallens* BCRC 33641<sup>T</sup>, Ar: *M. argentinensis* BCRC 33998<sup>T</sup>.

表十三、Multiplex PCR 反應條件

Table 13. Multiplex PCR reaction condition .

PCR buffer	1X
dNTPs	0.4 mM
Primer RubPil F&R	0.06 µM
Primer pks0 F&R	0.04 µM
Primer pkso F&R	0.06 µM
DNA polymerase	1.5 U
DNA	20 ng
Total (volume)	25 μL

## 四、討論

紅麴菌從 1884 年被發現以來,其菌種的鑑定判斷一直處於不完全可靠的 狀態。近年來雖已利用各種分子分型技術,如 LSU rRNA 的 D1/D2 區域、ITS、 β-tubulin 和 RAPD 等等,但仍有多個重要菌種無法區分或是具有爭議 (M. ruber 和 M. pilosus 以及 M. purpureus 和 M. kaoliang) (Park and Jong, 2003; Park et al., 2004; Hong et al., 2004)。過去有學者曾建議 M. purpureus 和 M. kaoliang 應為同一菌種,因為在 ITS 和  $\beta$ -tubulin 與外觀形態上無法區分,而 M. ruber 和 M. pilosus 兩個菌種雖然在 ITS 和 β-tubulin 無法區分,但在外觀 形態上卻有明顯差異 (Naoya et al., 2009),與本研究所觀察到的結果一致,顯示 紅麴菌種的分類地位仍有需解決釐清的部分。Alberto 等學者曾提出依照細胞形 態,如孢子囊的分隔及子囊孢子的大小形狀等,或利用生理生化特徵如選擇性 培養基的生長外觀以及是否產生色素等進行紅麴菌種的區分 (Alberto et al., 2004)。在本研究中若單以外觀形態作為判斷依據,同為 M. purpureus 的菌株於 MEA、CYA 和 G25N 三種培養基上會出現幾種不同的外觀形態,可能會造成 過去研究中所提到的同種異名 (Hawksworth and Pitt, 1983)。以紅麴菌分離株 DHT-A/B/C/D/E 為例,只有紅麴菌分離株 DHT-C/D 於三種培養基上的外觀形 態較符合過去文獻所描述,而 紅麴菌分離株 DHT-A/B/E 的外觀形態與 M. pilosus 或其他菌種較為相符。在 ITS 和 β-tubulin 親緣關係樹中, 紅麴菌分離 株 DHT-A/B/C/D/E 與 M. purpureus 和 M. kaoliang 的親緣關係較近,所以單 以外觀形態作為判斷依據有相當的誤判風險。本研究中有 18% 的紅麴菌分離株 (12/66) 無法依據外觀形態、ITS 和  $\beta$ -tubulin 的結果來判定菌種。

在本研究中從傳統中藥材紅麴米上所發現的紅麴菌種有 M. ruber、M. pilosus 和 M. purpureus 三種,與過去文獻所描述的相符 (Patakova, 2013),但 過去文獻中並無提及紅麴米的主要菌種。本研究中從紅麴米分離出來的 66 株 紅麴菌的菌種大多為 M. purpureus (69.7%),而 M. pilosus 和 M. ruber 分別有 7 株 (10.6%) 和 1 株 (1.5%)。由此得知市面上的紅麴米所使用的菌種大多是 以 M. purpureus 為主,因此可以推論目前市面上的中藥材紅麴米或甚至是古書 上所記載的紅麴米功效很可能來自於 M. purpureus。M. purpureus 於過去的研究 中最常被提出具有降膽固醇的功效成分為 monacolin K、monascin 和 ankaflavin (Endo, 1979; Ho and Pan, 2009)。然而 Zhang 等學者於 2014 年的研究顯示由
M. purpureus 所發酵的產物中發現 monacolin K 的產量極低 (Zhang et al., 2014)。本研究將 M. purpureus 與 M. pilosus 兩者的 monacolin K 生合成基因 簇進行比對,結果發現 M. purpureus 的 monacolin K 生合成的主要基因 mokH 並不在 monacolin K 生合成基因簇內,且基因序列呈現退化失去功能的狀態。 由於 mokH 為 monacolin K 生合成的必須基因 (Chen et al., 2010),因此 M. purpureus 應該已失去 monacolin K 的生合成能力。這樣的結果顯示 M. purpureus 在過去研究中被發現的生理活性很可能不是來自於 monacolin K,而 是其他化合物如黃色素。

在過去文獻中尚未發現以紅麴二次代謝物生合成基因作為紅麴菌種的分類 方式。目前只有 Aspergillus、Penicillium 和酵母菌等真菌以代谢物生合成基因 設計成引子並組合後以 multiplex PCR 進行快速鑑定,以代謝物生合成基因作 為菌種分類依據,其再現性、實用性和鑑定效率都相當好 (Elias et al., 2012; Serrano et al., 2011; Luo and Mitchell, 2002)。本研究所開發的 multiplex 方法能 有效區分 M. pilosus、M. ruber、M. kaoliang、M. purpureus、M. barkeri、M. albus 和 M. sanguineus。雖然 M. pallens、M. argentinensis 和 M. floridanus 三種紅麴 菌無法被任一引子所偵測到,但這三種紅麴菌並無食用或應用的記錄,較無快 速鑑定的需求。現行的紅麴菌的形態分類依據相當依賴菌落的顏色,尤其是在 ITS 和 β-tubulin 的親緣關係樹無法區分的 M. pilosus 和 M. ruber 這兩種紅麴 菌過去僅能依據顏色來區分。目前已知紅麴菌的色素生合成是由 PKS 基因所負 責 (Shao et al., 2014),因此本研究認為 PKS 基因可能能作為有效的紅麴分類依 據。候選引子的測試結果顯示 pksθ 引子能成功作為區分此 M. pilosus 和 M. ruber 的依據。此外 M. albus 和 M. purpureus 以及 M. kaoliang 和 M. *purpureus* 可分別由 pksβ 和 pksδ 引子來區分。*pksβ* (type I polyketide synthase) 為已知的色素生合成基因,M.albus 無法被偵測到可能是因為缺少 pksβ 基因或 是色素生合成基因簇有損壞。然而 M. albus 在 ITS 與  $\beta$ -tubulin 序列上和 M.purpureus 極為相近,因此本研究推測 M. albus 可能為 M. purpureus 的白化 種。M. kaoliang 和 M. purpureus 於本研究所建立的 multiplex 方法雖然可區分 開來,但由於兩者的其他生理特性幾乎相同,因此 M. kaoliang 的分類地位仍有 待進一步研究。

93

## 五、結論

本研究於臺灣市售紅麴米的紅麴菌種調查結果得知,目前市面上的中藥材紅 麴米的主要菌種為 M. purpureus,因此過去文獻上所記載紅麴米的功效很可能來自 於 M. purpureus。本研究結果確認以現行的紅麴菌種鑑定方法 (ITS、β-tubulin 和 外觀形態) 無法將部分的分離菌株確實區分,如 M. ruber 和 M. pilosus 以及 M. purpureus 和 M. kaoliang。因此現行的紅麴菌種鑑定方法有其受限之處,也使得目 前現行的紅麴菌種鑑定流程所需要的時間較長。本研究所設計的 pksδ、pksθ 以及 RubPil 引子對 M. pilosus、M. ruber、M. kaoliang、M. purpureus、M. barkeri、M. albus、M. sanguineus 和 M. lunisporas 具有鑑別力且 multiplex PCR 的結果顯示可 快速準確的鑑定。Multiplex PCR 分析效率足以作為紅麴常態性的監測篩檢使用, 可有助於中藥材與保健食品的管理成效。

## 六、參考文獻

- 中澤亮治,佐藤喜吉。1930。台灣產紅麴中の Monascus に就て。日本農藝化學 會誌。6:352-356。
- 林讚峰。1983。紅麴菌的鑑定及實驗分類法。製酒科技專論彙論。5:104-113。

忽思慧。1330。飲膳正要。中國。

- 陳彥霖,李昭蓉,陳建州,袁國芳。1998。紅麴菌種的研究開發與應用。食品工 業月刊。30:1-10。
- 陳彥霖。2000。紅麴與高血壓。科學與技術。32:54-59。

陳慶源,莊淑惠。2003。綜論紅麴產品之開發與應用。食品工業。35:1-2。

- 經濟部工業局。2011。2011 年國內保健食品暨產業概況分析。中華穀類食品工業 技術研究所。
- 飯塚廣。1987。世界菌株保存與微生物資源的開發及分類。Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 61: 323-330。
- 蘇遠志,陳文亮,方鴻源,翁浩慶,王文祥。1970。紅麴菌 (Monascus anka) 之菌 學研究。中國農業化學會誌。8:45-58。
- 蘇遠志。1978。紅麴色素之生產研究。食品科學。5:4-17。
- 蘇遠志。2001。奇妙的紅麴。元氣齋。
- Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Kiyota A, Yasukawa K, Sakamoto N, Kimura Y, Suzuki T, Takayasu J, Nishino H. 2005a. Anti-tumor initiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). Chem Biodivers. 2: 1305-1309.
- Alberto MR, Gómez-Cordovés C, Manca de Nadra MC. 2004. Metabolism of gallic acid and catechin by *Lactobacillus* hilgardii from wine. J Agric Food Chem. 52: 6465-6469.
- Anese M, Manzano M, Nicoli MC. 1997. Quality of minimally processed apple slices using different modified atmosphere conditions. J Food Qual. 20: 359-370.
- Aniya Y, Ohtani II, Higa T, Miyagi C, Gibo H, Shimabukuro M, Nakanishi H, Taira J. 2000. Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. Free Radic Biol Med. 28: 999-1004.
- Barnard EL, Cannon PF. 1987. A new species of Monascus from pine tissues in Florida.

Mycologia. 79: 479-484.

- Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. 1995a. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. Int J Food Microbiol. 27: 201-213.
- Blanc PJ, Loret MO, Goma G. 1995b. Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnol Lett. 17: 291-294.
- Brakhage AA, Schroeckha V. 2011. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. Fungal Genet Biol 48: 15-22.
- Brakhage AA. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. Nat Rev Microbiol. 11: 21-32.
- Campoy S, Rumbero A, Martin JF, Liras P. 2006. Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. Appl Microbiol Biotechnol. 70: 488-496.
- Cannon PF, Abdullah SK, Abbas BA. 1995. Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus. Mycol Res. 99: 659-662.
- Carels M, Shepherd D. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture. Can J Microbiol. 23: 1360-1372.
- Carels M, Shepherd D. 1978. The effect of pH and amino acids on condition and pigment production of *Monascus* major ATCC 16362 and *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. Can J Microbiol. 24: 1346-1357.
- Chen FS, Hu XQ. 2005. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. Int J Food Microbiol. 103: 331-337.
- Chen MJ, Chen JJ, Wu MD, Yan PS, Yuan GF. 2010. Isolation and structure determination of one new metabolite isolated from the red fermented rice of *Monascus purpureus*. Nat Prod Res. 24: 979-988.
- Chen WP, Ho BY, Lee CL, Lee CH, Pan TM. 2008. Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. Int J Obes. 32: 1694-1704.

- Chen YP, Tseng CP, Liaw LL, Wang CL, Yuan GF. 2007. Characterization of MRT, a new non-LTR retrotransposon in *Monascus* spp. Bot Stud. 48: 377-385.
- Chen YP, Tseng CP, Cheien IL, Wang WY, Liaw LL, Yuan GF 2008. Exploring the distribution of citrinin biosynthesis related genes among *Monascus* species. J Agric Food Chem 56: 11767-11772.
- Chen YP, Tseng CP, Liaw LL, Wang CL, Chen IC, Wu WJ, Wu MD, Yuan GF. 2008. Cloning and characterization of monacolin K biosynthetic gene cluster from *Monascus pilosus*. J Agric Food Chem. 56:5639-5646.
- Chen YP, Yuan GF, Hsieh SY, Lin YS, Wang WY, Liaw LL, Tseng CP. 2010 Identification of the *mok*H gene encoding transcription factor for the upregulation of monacolin K biosynthesis in *Monascus pilosus*. J Agric Food Chem. 58: 287-293.
- Cheng MJ, Wu MD, Chen IS, Tseng M, Yuan GF. 2011. Chemical constituents from the fungus *Monascus purpureus* and their antifungal activity. Phytochem Lett. 4: 372-376.
- Daigle P, Gélinas P, Leblanc D, Morin A. 1999. Production of aroma compounds by *Geotrichum candidum* on waste bread crumb. Food Microbiol. 16: 517-522.
- Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SA, Sutthiwong N. 2014. Filamentous fungi arelarge-scale producers of pigments and colorants for the food industry. Curr Opin Biotechnol. 26: 56-61.
- Elías NA, Cuestas ML, Sandoval M, Poblete G, Lopez-Daneri G, Jewtuchowicz V, Iovannitti C, Mujica MT. 2012. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. Mycopathologia. 174: 451-456.
- Endo A. 1979. Monacolin K, a new hypercholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. J Antibiot. 32: 852-854.
- Endo A, Hasumi K, Nakamura T, Kunishima M, Masuda M. 1985a. Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites which inhibit cholesterol biosynthesis. J Antibiot. 38: 321-327.
- Endo A, Hasumi K, Yamada A, Shimoda R, Hiroshi T. 1986. The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. J Antibiot. 39: 1609-1616.

- Endo A, Komagata D, Shimada H. 1986. Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis. J Antibiot. 39: 1670-1673.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Feng YL, Shao YC, Chen FS. 2012. *Monascus* pigment. Appl Microbiol Biotechnol 96:1421-1440.
- Fox EM, Howlett BJ. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. Curr Opin Microbiol 11: 481-487.
- Fu GM, Xu Y, Li YP, Tan WH. 2007. Construction of a replacement vector to disrupt pksCT gene for the mycotoxin citrinin biosynthesis in *Monascus aurantiacus* and maintain food red pigment production. Asia Pac J Clin Nutr. 16: 137-142.
- Grabley S, Thiericke R. 1998. Drug discovery from nature. Springer, Berlin, Germany.
- Hajjaj H, Francois JM,GomaG, Blanc PJ. 2012. Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. J Food Sci. 77: 156-159.
- Hawksworth DL, Pitt JI. 1983. A new taxonomy for *Monascus* based on cultural and microscopical characters. Aust J Bot. 31: 51-61.
- Hesseltine CW. 1965. A millenium of fungi and fermentation. Mycologia 57: 149-97.
- Ho BY, Pan TM. 2009. The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. J Agric Food Chem. 57: 8258-8265.
- Ho BY, Wu YM, Hsu YW, Hsu LC, Kuo YH, Chang KJ, Pan TM. 2010. Effects of *Monascus*-fermented rice extract on malignant cell-associated neovascularization and intravasation determined using the chicken embryo chorioallantoic membrane model. Integr Cancer Ther. 9: 204-212.
- Hocking AD, Pitt JI. 1988. Two new species of xerophilic fungi and a further record of *Eurotium halophilicum*. Mycologia. 80: 82-88
- Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, Chin Y, Heber D. 2008a. Anti-cancer effects of Chinese red yeast rice beyond monacolin K alone in colon cancer cells. J Nutr Biochem. 19: 448-458.
- Houng G, Park, Jong SC. 2004 Molecular characterization of Monascus strains based on

the D1/D2 regions of LSU rRNA genes. Mycoscience. 44: 25-32.

- Hosono A, Ezoe D, Shimada K, Itoh JI, Hiroi T, Shima T, Tokita F. 1977. Basic studies on the utilization of *Monascus anka* and red pigment produced by this strain. J Dairy Sci. 26: 93-99.
- Huang Z, Xu Y, Li L, Yanping L. 2008. Two new *Monascus* metabolites with strong blue fluorescence isolated from red yeast rice. J Agric Food Chem. 56: 112-118.
- Hutchinson CR, Kennedy J, Park C, Kendrew S, Auclair K, Vederas J. 2000. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. Antonie Van Leeuwenhoek. 78: 287-295.
- Hsu LC, Hsu YW, Liang YH, Liaw CC, Kuo YH, Pan TM. 2012. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma cells MCF-7 by monapurpyridine A, a new azaphilone derivative from *Monascus purpureus* NTU 568. Molecules. 17: 664-673.
- Hsu WH, Lee BH, Pan TM. 2010a. Red mould dioscorea-induced G2/M arrest and apoptosis in human oral cancer cells. J Sci Food Agric. 90: 2709-2715.
- Hsu WH, Lee BH, Pan TM. 2010b. Protection of *Monascus*-fermented dioscorea against DMBA-induced oral injury in hamster by anti-inflammatory and antioxidative potentials. J Agric Food Chem. 58: 6715-6720.
- Hsu WH, Lee BH, Pan TM. 2011. Effects of red mold dioscorea on oral carcinogenesis in DMBA-induced hamster animal model. Food Chem Toxicol. 49: 1292-1297.
- Hsu WH, Pan TM. 2012. Monascus purpureus-fermented products and oral cancer: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 93: 1831-42.
- Hsu YW, Hsu LC, Liang YH, Kuo YH, Pan TM. 2010. Monaphilones A-C, three new antiproliferative azaphilone derivatives from *Monascus purpureus* NTU 568. J Agric Food Chem. 58: 8211-8216.
- Ishiwata H, Watanabe M, Tanimura A. 1974. Studies on the hygienic chemistry of *Monascus* pigment. I. Digestion of *Monascus* pigment-protein in complex with protease in Japanese. J Food Hyg Soc Jap. 15: 36-41.

- Jongrungruangchok S, Kittakoop P, Yongsmith B, Bavovada R, Tanasupawat S, Lartpornmatulee N, Thebtaranonth Y. 2004. Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. Phytochemistry. 65: 2569-2575.
- Jou PC, Ho BY, Hsu YW, Pan TM. 2010. The effect of *Monascus* secondary polyketide metabolites, monascin and ankaflavin, on adipogenesis and lipolysis activity in 3T3-L1. J Agric Food Chem. 58: 12703-12709.
- Jůzlová P, Martínková L, Lozinski J, Machek F. 1994. Ethanol as substrate for pigment production by the fungus *Monascus purpureus*. Enzyme Microb Technol. 16: 996-1001.
- Jůzlová P, Martínková L, Křen VK. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. J Ind Microbiol. 16: 163-170.
- Katho K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucl Acids Res. 30: 3059-3066.
- Kaur BD, Chakraborty H, Kaur H. 2009. Production and evaluation of physicochemical properties of red pigment from *Monascus purpureus* MTCC 410. Internet J Microbiol. DOI: 10.5580/d4a.
- Kennedy J, Auclair K, Kendrew SG, Park C, Vederas JC, Hutchinson CR 1992. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science. 284: 1368-1372.
- Kimura K, Komagata D, Murakawa S, Endo A. 1990. Biosynthesis of monacolins conversion of monacolin-J to monacolin-K (mevinolin). J Antibiot (Tokyo). 43: 1621-1622.
- Knecht A, Humpf HU. 2006. Cytotoxic and antimitotic effects of N-containing *Monascus* metabolites studied using immortalized human kidney epithelial cells.
- Kohama Y, Matsumoto S, Mimura T, Tanabe N, Inada A, Nakanishi T. 1987. Isolation and identification of hypotensive principles in red mold rice. Chem Pharm Bull. 35: 2484-2489.

- Komagata D, Shimada H, Murakawa S, Endo A. 1989. Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin L to monacolin J by a monooxygenase of *M. ruber*. J Antibiot (Tokyo). 42: 407-412.
- Lakrod K, Chaisrisook C, Yongsmith B, Skinner DZ. 2000. RAPD analysis of genetic variation within a collection of *Monascus* spp. Isolated from red-rice (ang-kak) and sofu. Mycol Res. 104: 403-408.
- Lakshman PLN, Toyokawa Y, Toyama H, Taira T, Yasuda M. 2010. Purification and characterisation of two extracellular acid proteinases from *Monascus pilosus*. Food Chem. 121: 1216-1224.
- Lee BH, Hsu WH, Liao TH, Pan TM. 2011. The Monascus metabolite monascin against TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance via suppressing PPAR- $\gamma$  phosphorylation in C2C12 myotubes. Food Chem Toxicol. 49: 2609-2617.
- Lee CH, Lee CL, Pan TM. 2010a. A 90-D toxicity study of Monascus-fermented products including high citrinin level. J Sci Food Agric. 75: 91-97.
- Lee CL, Hung HK, Wang JJ, Pan TM. 2007. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. J Agric Food Chem. 55: 6493-6502.
- Lee CL, Hung HK, Wang JJ, Pan TM. 2007b. Red mold dioscorea has greater hypolipidemic and antiatherosclerotic effect than traditional red mold rice and unfermented dioscorea in hamsters. J Agric Food Chem. 55: 7162-7169.
- Lee CL, Kuo TF, Wang JJ, Pan TM. 2007d. Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation. J Neurosci Res. 85: 3171-3182.
- Lee CL, Kung YH, Wu CL, Hsu YW, Pan TM. 2010. Monascin and ankaflavin act novel hypolipidemic and high density lipoprotein cholesterol-raising agents in red mold dioscorea. J Agri Food. Chem. 58: 9013-9019.
- Lee CL, Kuo TF, Wang JJ, Pan TM. 2007a. Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid β-infused rat by repressing amyloid β accumulation. J Neurosci Res. 85: 3171-3182.

- Lee CL, Kuo TF, Wu CL, Wang JJ, Pan TM. 2010b. Red mold rice promotes neuroprotective sAPPalpha secretion instead of Alzheimer's risk factors and amyloid beta expression in hyperlipidemic Aβ40-infused rats. J Agric Food Chem. 58: 2230-2238.
- Lee CL, Tsai TY, Wang JJ, Pan TM. 2006a. In vivo hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. Appl Microbiol Biotechnol. 70: 533-540.
- Lee CL, Wang JJ, Pan TM. 2008. Red mold rice extract represses amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect. Appl Microbiol Biotechnol. 79: 829-841.
- Li SC. 1596. Pen Tsao Kang Mu (Compendium of Materia Medica, Systematic Pharmacopoeia). China.
- Li YP, Xu Y, Huanf ZB. 2012. Isolation and characterization of the citrinin biosynthesis gene cluster from *Monascus aurantiacus*. Biotechnol Lett. 34: 131-136.
- Li ZQ, Guo F. 2003. Morphology and taxonomy of *Monascus*. Chinese Light Industry Press, Beijing.
- Li ZQ, Guo F. 2004. A further studies on the species of *Monascus*. Mycosystema. 23: 1-6.
- Lian X, Wang C, Guo K. 2007. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. Dyes Pigments. 73: 121-125.
- Lin CF. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. J Ferment Technol. 51: 407-414.
- Lin CF. 1975. Studies on the *Monascus* isolated from the starter of kaoliang brandy. Chin J Microbiol. 8: 152-160.
- Lin CF, Iizuka H. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. Appl Environ Microbiol. 43: 671- 676.
- Lin WY, Hsu WY, Hish CH, Pan TM. 2007. Proteome changes in Caco-2 cells treated with *Monascus*-fermented red mold rice extract. J Agric Food Chem. 55: 8987-8994.
- Lin YL, Wang TH, Lee MH, Su NW. 2008. Biologically active components and

nutraceuticals in the *Monascus*- fermented rice: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 77: 965-973.

- Liu Q, Xie N, He Y, Wang L, Shao Y, Zhao H, Chen F. 2014. *MpigE*, a gene involved in pigment biosynthesis in *Monascus ruber* M7. Appl Microbiol Biotechnol. 98: 285-96.
- Loret MO, Morel S. 2010. Isolation and structural characterization of two new metabolites from *Monascus*. J Agric Food Chem. 58: 1800-1803.
- Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 40: 2860-2865.
- Martinková L, Jùzlová P, Veselý D. 1995. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. J Appl Biotechnol. 79: 609-616.
- Martinková L, Jùzlová P, Kren V, Kucerova Z, Havlicek V, Olsovsky P, Hovorka O, Rihova B, Vesely D, Vesela D, Ulrichova J, Prikrylova V. 1999. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. Food Addit Contam. 16: 15-24.
- Moharram MA, Eman Mostafa M, Ismail MA. 2012. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. Food Technol Biotechnol. 50: 490-499.
- Mostafa ME, Abbady MS. 2014. Secondary metabolites and bioactivity of the *Monascus* pigments review article. Global J Biotechnol Biochem. 9: 1-13.
- Mukherjee G, Singh SK. 2011. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. Process Biochem. 46: 188-192.
- Naoya S, Tomoyuki N, Yasutomo T, Masatoshi T, Toru M. 2009. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis coupled with microchip electrophoresis for high-resolution identification of Monascus strains. Appl Microbiol Biotechnol. 82: 1187-1193.
- Nozaki H, Date S, Kondo H, Kiyohara H, Takaoda D, Tada T, Nakayama M. 1991. Ankalactone, a new  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone from *Monascus anka*. Agric Biol Chem. 55: 899-900.
- Palo MA, Vidal-adeva L, Maceda L. 1960. Study on angkak and its production, Philipp.

J Sci Soc. 89: 1-22.

- Park HG, Jong SC. 2003. Molecular characterization of *Monascus* strains based on the D1/D2 regions of LSU rRNA genes. Mycoscience. 44: 25-32.
- Park HG, Elena KS, Jong SC. 2004. Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial  $\beta$ -tubulin gene. Bot Bull Acad Sin. 45:325-330.
- Patakova P. 2013 *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. J Ind Microbiol Biotechnol. 40: 169-181.
- Pattanagul P. 2007. Effect of *Monascus* strains and their nutrients on the production of alday ankak, PhD. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S. 2008. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. Int J Food Microbiol. 126: 20-23.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. Fungi and Food Spoilage. Springer. USA.
- Radu N, Marianthi S, Ferdes M, Voicescu M. 2011. Therapeutic effect of *Monascus* metabolites. Proceeding of the 4rd International Symposium NEW Research in Biotechnology Usamv Bucharest, Romania.
- Rasheva T, Kujumdzieva A, Hallet JN. 1997. Lipid production by *Monascus purpureus* albino strain. J Biotechnol. 56: 217-224.
- Rashmi R, Ramana MV, Shylaja R, Uppalapati SR, Murali HS, Batra HV. 2013. Evaluation of a multiplex PCR assay for concurrent detection of four major mycotoxigenic fungi from foods. J Appl Microbiol. 114: 819-27.
- Rzhetsky A, Nei M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. Mol Biol Evol. 9: 945-967.
- Sakai K, Kinoshita H, Nihira T. 2009. Identification of *mok*B involved in monacolin K biosynthesis in *Monascus pilosus*. Biotechnol Lett. 31: 1911-1916.
- Sato K, Iwakami S, Goda Y, Okuyama E, Yoshikira K, Ichi T, Odake Y, Noguchi H, Sankawa U. 1992. Novel natural colorants from *Monascus anka* U-1. Heterocycles. 34: 2057-2060.
- Sato K, Goda Y, Sakamoto SS, Shibata H, Maitani T, Yamada T. 1997 Identification of

major pigments containing d-amino acid units in commercial *Monascus* pigments. Chem Pharm Bull 45: 227-229.

- Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araujo R. 2011. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. BMC Microbiol. 11: 82.
- Shao Y, Xu L, Chen F. 2011. Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. Mycoscience 52: 224-233.
- Shao YC, Lei M, Mao ZJ, Zhou YX, Chen FS. 2014. Insights into *Monascus* biology at the genetic level. Appl Microbiol Biotechnol. 98: 3911-3922.
- Shi YC, Pan TM. 2010a. Anti-diabetic effects of *Monascus purpureus* NTU 568 fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats. J Agric Food Chem 58: 7634-7640.
- Shi YC, Pan TM. 2010b. Antioxidant and pancreas-protective effect of red mold fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats. J Sci Food Agric. 90: 2519-2525.
- Shimizu T, Kinoshiota H, Ishihara S, Saikai K, Nagai S, Nihira T. 2005. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. Appl Environ Microbiol. 71: 3453-3457.
- Shimizu T, Kinoshita H, Nihira T. 2007. Identification and in vivo functional analysis be gene disruption of *ctn*A, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. Appl Environ Microbiol. 71: 5097-5103.
- Shinzato N, Namihira T, Tamaki Y, Tsukahara M, Matsui T. 2009. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis coupled with microchip electrophoresis for high-resolution identification of *Monascus* strains. Appl Microbiol Biotechnol 82: 1187-1193.
- Sorensen JL, Auclair K, Kennedy J, Hutchinson CR, Vederas JC. 2003a. Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the *lov A* and *lov C* genes. Org Biomol Chem .1: 50-59.
- Sorensen JL, Vederas JC, Monacolin N. 2003b. A compound resulting from derailment of type I iterative polyketide synthase functionen route to lovastatin. Chem Commun. 13: 1492-1493.

- Staunton J, Weissman KJ. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. Nat Prod Rep. 18: 380-416.
- Stchigel AM, Cano JF, Abdullah SK, Guarro J. 2004. New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. Stud Mycol. 50: 299-306.
- Su YC, Chen WL, Lee YH. 1973. Studies on the anka pigment produced by a mutant of Monascus anka. Res Rep Coll Agric Nat Taiwan Univ. 14: 41-56.
- Su NW, Lin YL, Lee MH, Ho CY. 2005. Ankaflavin from *Monascus* fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. J Agric Food Chem. 53: 1949-1954.
- Taira J, Miyagi C, Aniya Y. 2002. Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation. Biochem Pharmacol. 63: 1019-1026.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 10: 512-526.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30: 2725-2729.
- Tsai MS, Hseu TH, Shen YS. 1978. Purification and characterization of an acid protease from *Monascus kaoliang*. Int J Pept Protein Res. 12: 293-302.
- Tsai RL, Ho BY, Pan TM. 2009. Red mold rice mitigates oral carcinogenesis in 7,12-dimethyl-1,2-benz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in hamster. Evid Based Complement Alternat Med. (http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep215)
- Turner, WB. 1971. Polyketides. In: Fungal metabolites. Academic Press, London, England.
- Udagawa S, Baba H. 1998. *Monascus lunisporas*, a new species isolated from mouldy feeds. Cryptogam. Mycol. 19: 269-276.
- Van Tieghe P. 1884. *Monascus* genre nouveau de l'ordre des Ascomycètes. Bulletin de la Société Botanique. 31: 226-231.
- Wang JJ, Shieh MJ, Kuo SL, Lee CL, Pan TM. 2006. Effect of red mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance

exercise. Appl Microbiol Biotechnol. 70: 247-253.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, New York, USA: 315-322.
- Wiemann P, Guo CJ, Palmer JM, Sekonyela R, Wang CC, Keller NP. 2013. Prototype of an intertwined secondary metabolite supercluster. Proc Natl Acad Sci USA 110: 17065-17070.
- Wild D, Toth G, Humpf HU. 2003. New *Monascus* metaboliteswith a pyridine structure in red fermented rice. J Agric Food Chem. 51: 5493-5496.
- Winnepenninckx B, Backeljau T, Wachter R. 1993a. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. Trends Genet. 9: 407.
- Wong HC, Bau YS. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron-ray and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus* went. Plant Physiol. 60: 578-581.
- Wong HC, Koehler PE. 1981. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. J Food Sci. 46: 589-592.
- Wu CL, Lee CL, Pan TM. 2009. Red mold dioscorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats. J Agric Food Chem. 57: 5035-5041.
- Wu MD, Chen MJ, Yech YJ, Chen YL, Chen KP, Chen IS, Yang PH, Yuan GF. 2011.
   Monasnicotinates A-D, four new pyridine alkaloids from the fungal strain Monascus pilosus BCRC 38093. Molecules. 16: 4719-4727.
- Xie NN, Liu QP, Chen FS. 2013. Deletion of *pig*R gene in *Monascus ruber* leads to loss of pigment production. Biotechnol Lett 35: 1425-1432.
- Yang Y, Liu B, Du X, Li P, Liang B, Cheng X, Du L, Huang D, Wang L, Wang S. 2015. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. Sci Rep. 5:8331.
- Yasukawa K, Akihisa T, Oinuma H, Kaminaga T, Kanno H, Kasahara Y, Tamura T, Kumaki K, Yamanouchi S, Takido M. 1996. Inhibitory effect of taraxastane-type

triterpenes on tumor promotion by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Oncology. 53: 341-344.

- Yasukawa K, Takahashi M, Natori S, Kawai K, Yamazaki M, Takeuchi M, Takido M.
  1994. Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 2-stage carcinogenesis in mice. Oncology. 51: 108-112.
- Yongsmith B, Tabloka W, Yongmanitchai W, Bavavoda R. 1993. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp KB10 grown on cassava medium. World J Microbiol. Biotechnol. 9: 85-90.
- Yongsmith B. 1999. Fermentative microbiology of vitamins and pigments. Kasetsart University Press, Bangkok, Thailand.
- Zhang J, Wang YL, Lu LP, Zhang BB, Xu GR. 2014 Enhanced production of Monacolin K by addition of precursors and surfactants in submerged fermentation of *Monascus purpureus* 9901. Biotechnol Appl Biochem. 61: 202-207.
- Zhang, X., Wang J, Chen M, Wang C. 2013. Effect of nitrogen sources on production and photostability of *Monascus* pigments in liquid fermentation. IERI Procedia. 5: 344-350.
- Zhu Y, Wang, Zhu J, Chang J, Kritchevsky D. 1998. *Monascus purpureus* fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hyper cholesterolemia. Nutr. Res. 18: 71-81.

附錄一

圖一至圖六為參考菌株的菌落外觀。M. purpureus BCRC 31499 在 G25N 培 養基上的菌落直徑大小 (3.16 mm) 比文獻記錄小 2 倍 (8-15 mm)。M. pilosus BCRC 31526 在 G25N 培養基上的菌落正反面顏色符合過去文獻記載,而在 MEA 和 CYA 培養基上的正反面菌落顏色 (正反面顏色皆為白色) 不符合過去文 獻記載 (MEA 和 CYA 的菌落正面顏色分別為淺橘色至粉彩紅色和淡紅色,菌落 反面顏色分別為深橘色和蒼白色至粉彩紅色)。 M. purpureus BCRC 31530 在 CYA 培養基上的菌落直徑大小 (31.68 mm) 比文獻記錄大 2 倍 (12-18 mm)。M. ruber BCRC 31534 在 CYA 和 G25N 培養基上的菌落直徑大小 (44.95 mm 和 27.27 mm) 比文獻記錄大 1.5-2 倍 (20-32 mm 和 16-22 mm)。M. purpureus BCRC 31540 和 M. purpureus BCRC 31615 的菌落正反面顏色和菌落直徑大小皆與過去 文獻相符合。M. purpureus BCRC 32808 在 CYA 培養基上的菌落直徑大小 (36.23 mm) 比文獻記錄大 2 倍 (12-18 mm)。M. barkeri BCRC 33309 在 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落直徑大小分別為 31.76 mm、31.46 mm 和 27.1 mm, 而菌 落正面顏色皆為白色,菌落反面顏色則分別為黃褐色、納瓦白色和白色。M. purpureus NTU568 的菌落正反面顏色和菌落直徑大小皆與過去文獻相符合。M. purpureus NTU301 於三種培養基上的菌落直徑大小皆比文獻記錄大 2 倍。M. purpureus YM1 在 G25N 培養基上的菌落正反面顏色符合過去文獻記載,而在 MEA 和 CYA 培養基上的正反面菌落顏色不符合過去文獻記載,文獻記錄上 MEA 和 CYA 的菌落正面顏色分別為紅橋色和淡紅色,菌落反面顏色分別為橘色 至深橘色和粉彩紅色或橘紅色,本研究在 MEA 和 CYA 上所觀察到的菌落正面 顏色分別粉桃紅色和橘紅色,菌落反面顏色分別為粉桃紅色和淺橘色。圖七至圖 三十九為紅麴菌分離株的菌落外觀,共有 12 個紅麴菌分離株無法依照外觀形態 來判斷其菌種。



圖一、M. purpureus BCRC 31499 (A 和 B) 和 M. pilosus BCRC 31526 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態。

Figure 1. Colonies morphology of *M. purpureus* BCRC 31499 (A and B) and *M. pilosus* BCRC 31526 (C and D) on MEA 
CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二、*M. purpureus* BCRC 31530 (A 和 B) 和 *M. ruber* BCRC 31534 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 2. Colonies morphology of *M. purpureus* BCRC 31530 (A and B) and *M. ruber* BCRC 31534 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三、M. purpureus BCRC 31540 (A 和 B) 和 M. purpureus BCRC 31615 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 3. Colonies morphology of M. purpureus BCRC 31540 (A and B) and M. purpureus BCRC 31615 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖四、*M. purpureus* BCRC 32808 (A 和 B) 和 *M. purpureus* BCRC 33309 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 4. Colonies morphology of *M. purpureus* BCRC 32808 (A and B) and *M. barkeri* BCRC 33309 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖五、M. albus BCRC 33372 (A 和 B) 和 M. purpureus NTU568 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 5. Colonies morphology of M. albus BCRC 33372 (A and B) and M. purpureus NTU568 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖六、M. purpureus NTU301 (A 和 B) 和 M. purpureus YM1 (C 和 D) 於 MEA、 CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 6. Colonies morphology of M. purpureus NTU301 (A and B) and M. purpureus YM1 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖七、CA-A (A 和 B) 和 CA-B (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 7. Colonies morphology of CA-A (A and B) and CA-B (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖八、CA-B-1 (A 和 B) 和 CA-C (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 8. Colonies morphology of CA-B-1 (A and B) and CA-C (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖九、DYH (A 和 B) 和 TY-A (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 9. Colonies morphology of DYH (A and B) and TY-A (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十、TY-B (A 和 B) 和 TY-C (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 10. Colonies morphology of TY-B (A and B) and TY-C (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十一、TY-D (A 和 B) 和 GH-A (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 11. Colonies morphology of TY-D (A and B) and GH-A (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十二、GH-B (A 和 B) 和 CH (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 12. Colonies morphology of GH-B (A and B) and CH (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十三、JS (A 和 B) 和 MD (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌 落外觀形態 (A 和 C):正面; (B 和 D):反面

Figure 13. Colonies morphology of JS (A and B) and MD (C and D) on MEA 
CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十四、HRT-A-1 (A 和 B) 和 HRT-A-2 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培 養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 14. Colonies morphology of HRT-A-1 (A and B) and HRT-A-2 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十五、HRT-B-1 (A 和 B) 和 HRT-B-2 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 15. Colonies morphology of HRT-B-1 (A and B) and HRT-B-2 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十六、DS (A 和 B) 和 SA (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌 落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 16. Colonies morphology of DS (A and B) and SA (C and D) on MEA、CYA and

G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十七、STS (A 和 B) 和 SJY (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 17. Colonies morphology of STS (A and B) and SJY (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十八、TST (A 和 B) 和 TYT (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 18. Colonies morphology of TST (A and B) and TYY (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖十九、SJ (A 和 B) 和 J-SIN (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 19. Colonies morphology of SJ (A and B) and J-SIN (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.


圖二十、JD (A 和 B) 和 S-YUAN (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 20. Colonies morphology of JD (A and B) and S-YUAN (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十一、TPN-A (A 和 B) 和 TPN-B (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養 基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 21. Colonies morphology of TPN-A (A and B) and TPN-B (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十二、TPN-C (A 和 B) 和 AB-A (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養 基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 22. Colonies morphology of TPN-C (A and B) and AB-A (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十三、AB-B (A 和 B) 和 YF (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 23. Colonies morphology of AB-B (A and B) and YF (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十四、DHT-A (A 和 B) 和 DHT-B (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養 基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 24. Colonies morphology of DHT-A (A and B) and DHT-B (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十五、DHT-C (A 和 B) 和 DHT-D (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養 基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 25. Colonies morphology of DHT-C (A and B) and DHT-D (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十六、DHT-E (A 和 B) 和 M13 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基 上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 26. Colonies morphology of DHT-E (A and B) and M13 (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十七、DH (A 和 B) 和 NiB (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 27. Colonies morphology of DH (A and B) and NiB (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十八、Ch30 (A 和 B) 和 China (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基 上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 28. Colonies morphology of Ch30 (A and B) and China (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖二十九、BM (A 和 B) 和 HJY (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 29. Colonies morphology of BM (A and B) and HJY (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十、HS (A 和 B) 和 JFC (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的菌 落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 30. Colonies morphology of HS (A and B) and JFC (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十一、LC (A 和 B) 和 SL (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 31. Colonies morphology of LC (A and B) and SL (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十二、ST (A 和 B) 和 SY (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 32. Colonies morphology of ST (A and B) and SY (C and D) on MEA、CYA and

G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十三、TW (A 和 B) 和 UN (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 33. Colonies morphology of TW (A and B) and UN (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十四、860 (A 和 B) 和 A-1 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 34. Colonies morphology of 860 (A and B) and A-1 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十五、A-2 (A 和 B) 和 SW3 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 35. Colonies morphology of A-2 (A and B) and SW3 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十六、SW4 (A 和 B) 和 803 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 36. Colonies morphology of SW4 (A and B) and 803 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十七、430 (A 和 B) 和 BS (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上的 菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 37. Colonies morphology of 430 (A and B) and BS (C and D) on MEA、CYA and

G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十八、HJY (A 和 B) 和 Hong-JT (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養 基上的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 38. Colonies morphology of HJY (A and B) and Hong-JT (C and D) on MEA、 CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.



圖三十九、LA (A 和 B) 和 CA505 (C 和 D) 於 MEA、CYA 和 G25N 培養基上 的菌落外觀形態 (A 和 C): 正面; (B 和 D): 反面 Figure 39. Colonies morphology of LA (A and B) and CA505 (C and D) on MEA、CYA and G25N medium. (A and C): obverse; (B and D): reverse.