

紅麴菌 *Monascus purpureus* 與 *M. pilosus*/*M. ruber* 菌種專一性 PCR 檢測方法的建立與紅麴食品中的菌種鑑別

Methods for *Monascus purpureus* and *M. pilosus*/*M. ruber* species-specific PCR detection and the discrimination of *Monascus* species in foods

摘要:

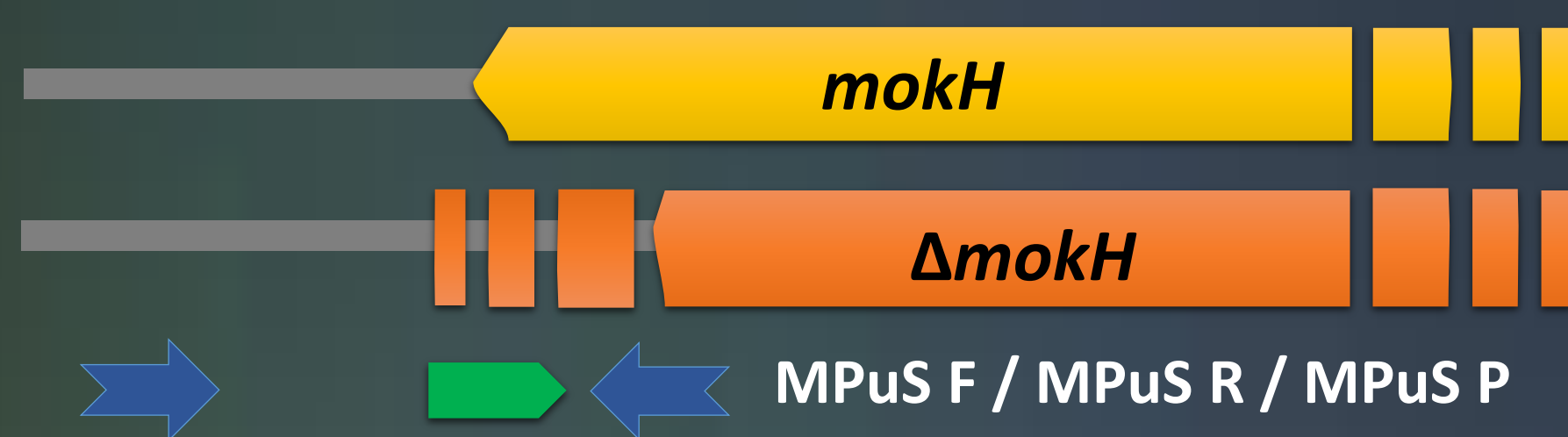
紅麴菌 (*Monascus* spp.) 常用於發酵、防腐與食物上色，是一種天然的食品添加劑與熱門保健食品素材。市面上常用於食品紅麴菌種主要為：*Monascus purpureus* 與 *M. pilosus*/*M. ruber* (同物異名)。過去研究指出紅麴菌的二次代謝物 monacolin K 具有降血膽固醇等多重生理功效，而真菌毒素 citrinin 則具有安全性的疑慮，因此目前法規以此二種代謝物做為紅麴食品的管理的憑據。過去本研究室發現 *M. purpureus* 具有生合成 citrinin 的能力，但其 monacolin K 的生合成能力已佚失。然而 *M. pilosus*/*M. ruber* 的這兩種代謝物生合成能力則與 *M. purpureus* 相反，也就是這兩種紅麴菌種有其鑑別區分的必要。本研究針對 *M. purpureus* 與 *M. pilosus*/*M. ruber* 分別建立種專一性 PCR 方法，結果顯示這兩種 PCR 方法皆有足夠的菌種專一性，並且能應用於多種形式紅麴食品的菌種鑑別。進一步的即時定量 PCR 方法建立與測試結果顯示，本研究所開發的菌種專一性 PCR 具有進一步開發成為即時定量 PCR 方法的潛力，在能對 *M. purpureus* 進行菌種鑑別之外，亦能滿足定量分析需求。本研究希望藉由填補紅麴食品菌種管理的必要環節，能消除紅麴食品安全管理的潛在疑慮，對於相關的產業發展作出貢獻。

結果:

表一、本研究所設計的引子對

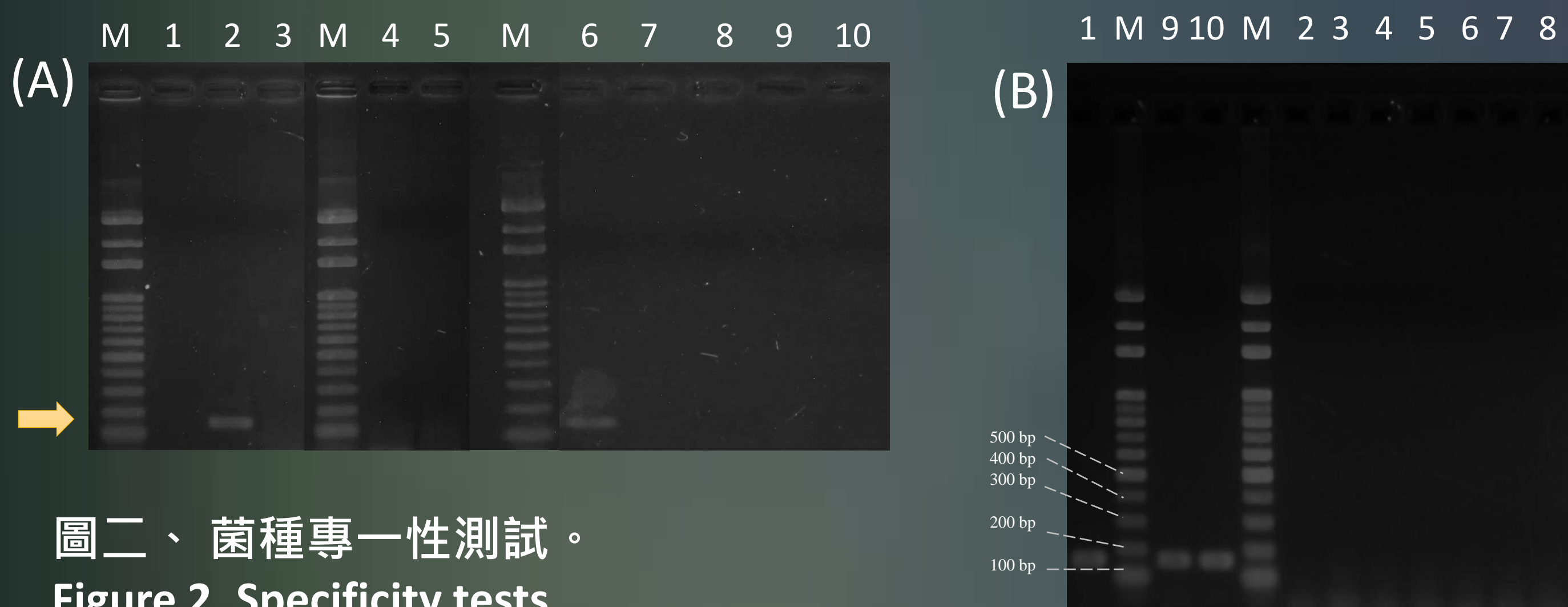
Table 1. Primer sets designed in this study

Oligo ID	Target gene	Sequence (5'→3')	Amplicon size
MPus F	<i>ΔmokH</i>	TCTTCTCCTTCAGCTTCTTCACC	804 bp
MPus R		GGGTTGAAGAGGGGTATGGTATC	
RubPil F	<i>FAS</i>	CGTGCCGCTTTGATCTTTTGG	158 bp
RubPil R		AGGGGAGTTGGTGGGCA	



圖一、引子對 MPus 在 *mokH* 與 *ΔmokH* 序列上的相對位置。綠色部分為 TaqMan probe。

Figure 1. Relative positions of primer set MPus on *mokH* and *ΔmokH* sequences. The TaqMan probe is in green. MPus P: 5'-FAM-GATTGTGTGGTCAATGGGG-BHQ1-3'



圖二、菌種專一性測試。

Figure 2. Specificity tests.

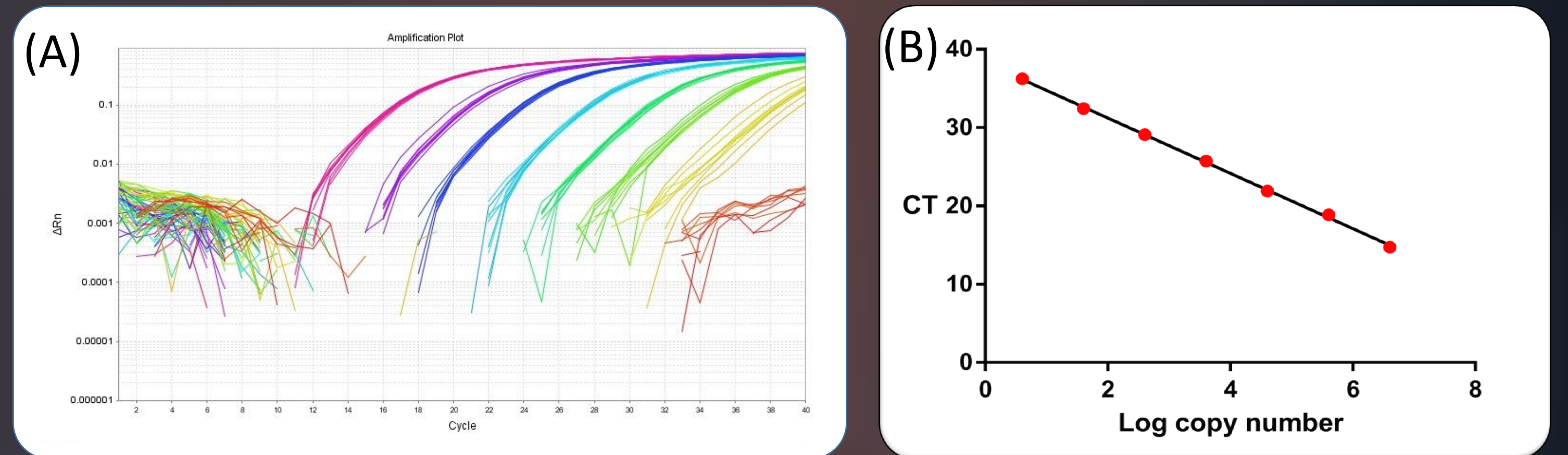
(A) MPus. (B) Rubpil. M: 100 bp marker. 1: *M. barkeri* BCRC 33309^T. 2: *M. kaoliang* BCRC 31506^T. 3: *M. sanguineus* BCRC 33446^T. 4: *M. lunisporas* BCRC 33640^T. 5: *M. argentesis* BCRC 33998^T. 6: *M. purpureus* BCRC 31542^T. 7: *M. pallens* BCRC 33641^T. 8: *M. floridanus* BCRC 33310^T. 9: *M. pilosus* BCRC31502^T. 10: *M. ruber* 31532^T.



圖三、紅麴食品的菌種專一性 PCR 分析

Figure 3. Species-specific PCR analysis of *Monascus* foods

(A) *M. purpureus* specific PCR. (B) *M. pilosus/ruber* specific PCR. M: 100 bp marker. 1: *M. purpureus* BCRC 31542^T. 2: *M. pilosus* BCRC 31502^T. 3: *M. ruber* BCRC 31532^T. 4: 紅麴米. 5: γ -ray殺菌紅麴米. 6: 微波殺菌紅麴米. 7: 銀杏納豆紅麴膠囊. 8: 微庫醇膠囊. 9: 益淨麴膠囊. 10: 鴻鵠香穗錠. 11: 台糖膠囊. 12: 科達膠囊. 13: 統欣膠囊. 14: 桂格紅麴蕎麥健康大燕麥片. 15: 江記紅麴豆腐乳. 16: 元氣家紅麴納豆. pu+: *M. purpureus* 膠囊對照。



圖四、*M. purpureus* 菌種專一性即時定量PCR 檢測方法 (引子對MPus)。

Figure 4. *M. purpureus* species-specific real-time qPCR detection method.

(A) TaqMan qPCR 增幅曲線。(B) 以質體標準品 pJM-MP42 所建立的檢量線。質體標準品範圍 $4 \times 10^0 - 4 \times 10^6$ copies。R² = 0.999。PCR efficiency 92.01%。

表二、*M. purpureus* 種專一性即時定量 PCR 重複性與再現性測試 (TaqMan)

Table 2. Reproducibility and repeatability of *M. purpureus* species-specific real-time qPCR method (TaqMan).

copy number	Mean Ct	RSD _r ^a , %	RSD _R ^b , %
4000000	14.74	0.98 ± 0.08	0.52
400000	18.87	1.47 ± 0.07	0.37
40000	21.93	0.63 ± 0.06	0.25
4000	25.74	0.41 ± 0.09	0.33
400	29.12	0.59 ± 0.08	0.27
40	32.45	0.87 ± 0.15	0.47
4	36.23	1.93 ± 0.24	0.67

試驗數據由三次獨立試驗所得，每個獨立試驗均為三重複。本研究所建立的定量方法線性範圍為 $4 \times 10^0 - 4 \times 10^6$ copies，定量與偵測極限均為 4 copies*。

a: 重複性-單次試驗中三重複 C_t 值的變異係數。

b: 再現性-三次獨立試驗中三個 mean C_t 值的變異係數。

*: 根據 CODEX 所定義食品分析方法的定量需求，定量分析方法的線性範圍內 RSD_r 與 RSD_R 須小於 25%，在此範圍內最低濃度即為該分析方法的定量極限 (limit of quantification, LOQ) 與偵測極限 (limit of detection, LOD)。

表三、紅麴菌 *M. purpureus* 菌種專一性即時定量 PCR 的紅麴食品測試

Table 3. *M. purpureus* species-specific real-time qPCR test on *Monascus* foods

樣品	qPCR Ct	菌種	與預期結果是否相符
紅麴米	34.89 ± 0.99	<i>M. purpureus</i>	Yes
紅麴米- γ 射線殺菌	33.55 ± 0.92	<i>M. purpureus</i>	Yes
紅麴米-微波殺菌	ND*	<i>M. purpureus</i>	No
微庫醇紅麴膠囊	37.56 ± 0.02	<i>M. purpureus</i>	Yes
益淨麴紅麴膠囊	34.58 ± 1.99	<i>M. purpureus</i>	Yes
鴻鵠紅麴錠	ND	<i>M. pilosus/ruber</i>	Yes
台糖紅麴膠囊	ND	<i>M. pilosus/ruber</i>	Yes
科達紅麴膠囊	ND	<i>M. pilosus/ruber</i>	Yes
統欣紅麴膠囊	ND	<i>M. pilosus/ruber</i>	Yes
紅麴燕麥片	ND	<i>M. pilosus/ruber</i>	Yes
紅麴豆腐乳	31.36 ± 0.29	<i>M. purpureus</i>	Yes
元氣家紅麴納豆	37.16 ± 0.30	<i>M. purpureus</i>	Yes
銀杏納豆紅麴膠囊	ND	unknown	unknown

*ND: not detectable, Ct>40

結論:

- 本研究所建立的紅麴菌菌種專一性 PCR 鑑別方法，能有效鑑別紅麴食品中的 *M. purpureus* 與 *M. pilosus*/*M. ruber*，並可加以延伸成為即時定量 PCR 分析方法，滿足微量檢測與定量分析的需求。
- 紅麴食品分析的結果顯示少數的加工製程 (如微波殺菌) 或是配方 (銀杏納豆膠囊內含物幾乎都是魚油) 可能因為 DNA 破壞得較為嚴重或是含量很低，無法使用 PCR 進行檢測。
- 未來將繼續延伸 *M. pilosus*/*M. ruber* 菌種專一性 PCR 方法成為即時定量 PCR 系統，以釐清更為靈敏的即時定量 PCR 是否能克服上述問題，評估使用種專一性即時定量 PCR 進行食品中菌種鑑別的應用極限。