

红曲中的一种糖肽类抑菌物质的研究

赵树欣, 李凤美, 曾露燕

(天津工业微生物重点实验室 天津科技大学生物工程学院, 天津, 300457)

摘 要 采用活性炭脱色法将红曲的色素脱去, 对脱色后的样品进行抑菌实验, 发现脱色后的样品仍有抑菌性。又经高效液相色谱法检测该脱色液, 确认脱色后有抑菌作用的样品中不含桔霉素。实验证明, 红曲中除了色素和桔霉素之外, 还有其他的抑菌物质。通过糖和氨基酸定性实验, 以及葡聚糖凝胶柱色谱分离确认该抑菌物中含有小肽和糖类物质, 并且通过薄层层析确定了该抑菌物属于结合性糖肽。

关键词 红曲霉, 抑菌物质, 桔霉素, 色素, 糖肽

红曲是我国传统的发酵产品, 人们对红曲的抑菌性很早就有了认识。笔者曾对目前国内生产的 3 类主要红曲: 酿酒红曲、色素红曲和功能红曲进行了抑菌性试验, 结果显示这几种红曲都有抑菌功能^[2]。这就说明红曲中存在着有抑菌作用的物质, 并且这种抑菌物是不同种类的红曲在发酵过程中产生的共有代谢产物。

目前, 国内外的研究已经证实的红曲中具有抑菌作用的物质主要是桔霉素和色素^[2~4]。许多红曲专家认为, 红曲发酵产物成分复杂, 可能还存在其他未被发现的抑菌物质^[5]。笔者在研究中发现, 红曲提取液中一种糖肽类物质也具有抑菌作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 红曲样品

功能红曲; 色素红曲; 酿酒红曲(文中简称为功能曲、色曲、酒曲), 由武汉佳成生物制品有限公司惠赠。

1.1.2 抑菌试验供试菌

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) TQ16075, 由天津科技大学菌种保藏室提供。

1.1.3 培养基

肉汤培养基(质量分数, %): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH 值为 7.2~7.4, 121℃ 灭菌 20 min。

1.1.4 主要试剂

桔霉素标准品, 美国 Sigma 公司; Sephadex G-25, Pharmacia 进口分装; 薄层层析专用硅胶 G254, 青岛海洋化工厂; 粉末活性炭, 天津化学试剂厂。其

余试剂均为国产分析纯。

1.1.5 仪 器

Agilent TC-C₁₈ 柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 美国安捷伦公司; 安捷伦 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; UV-PC 9110 紫外分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; 真空旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 方 法

1.2.1 红曲提取液的制备

取红曲米适量, 粉碎过 80 目筛, 按料液比 1 : 10 加入 70% 乙醇, 150 r/min, 45℃ 浸提 12 h。离心提取液, 收集上清液, 备用。

1.2.2 滤纸片抑菌法^[6]1.2.3 红曲色价的测定^[7]

1.2.4 红曲活性炭脱色法及脱色后的抑菌实验

将功能曲、色曲、酒曲的 70% 乙醇提取液中加入活性炭, 45℃ 振荡 2 h 观察。离心后液体颜色是否全部脱去变为无色。

分别取 3 种未脱色和已脱色的红曲提取液等量, 对照作抑菌实验, 以金黄色葡萄球菌为供试菌, 观察抑菌结果。

1.2.5 红曲中桔霉素的检测

反相高效液相色谱法(RP-HPLC)。色谱柱 Agilent TC-C₁₈ 柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 荧光检测器, 检测波长 $E_x = 331 \text{ nm}$, $E_m = 500 \text{ nm}$; 流动相组成为 $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 50 : 50$; 柱温 28℃; 流速: 1 mL/min。

1.2.6 红曲样品中氨基酸和糖类的定性试验^[8]

1.2.7 红曲样品组分的分离

将红曲样品用 Sephadex G-25 凝胶柱层析, 并进行洗脱, 将洗脱液用分步收集器定时收集。然后在 210 nm 处测定洗脱液的紫外吸收, 同时采用蒽酮-硫

第一作者: 学士, 教授。

收稿日期: 2007-03-24, 改回日期: 2007-07-18

酸法测定每管洗脱液中糖的含量。根据所得的数据做分布曲线,并收集不同的组分。

1.2.8 薄板层析法鉴定结合性糖肽

将样品溶于少量乙醇中,在硅胶板距底部约 2.0 cm 处点样。然后将硅胶板置于预先饱和的层析缸中进行展开。展开完毕后,用显色剂显色。肽显色剂:茚三酮-氯化亚锡显色剂;糖显色剂:萘酚-硫酸显色剂。

2 结果与讨论

2.1 红曲脱色前后色价的比较

采用活性炭脱色法将红曲中的色素脱去。脱色效果见表 1。从表 1 中可以看出,活性炭对红曲提取液的脱色效果很明显,3 种红曲提取液经过活性炭脱色处理后脱色率都在 98% 以上,从表观上看脱色后

的溶液无色。

表 1 脱色前后色价比较

红曲类别	波长	脱色前色价 /u · g ⁻¹	脱色后色价 /u · g ⁻¹	脱色率/%
色曲	A ₅₁₀	1 100	0.4	99.9
	A ₄₁₀	1 239	1.2	99.9
酒曲	A ₅₁₀	75	0.2	99.7
	A ₄₁₀	76	0.8	98.9
功能曲	A ₅₁₀	36	0.2	99.4
	A ₄₁₀	30	0.5	98

2.2 脱色前后的抑菌性对比

将 3 种红曲提取液已脱色和未脱色的样品进行抑菌实验,以金黄葡萄球菌为供试菌,结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,当红曲中的色素类物质被完全除去以后,红曲仍然具有抑菌性,并且抑菌效果没有变化。

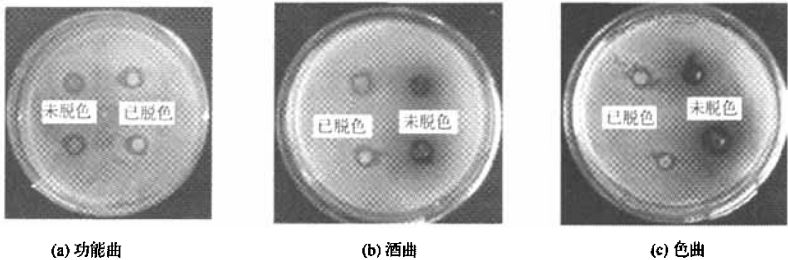


图 1 红曲脱色前后的抑菌性对比

由于实验中所选的提取溶剂是 70% 乙醇,为了防止该溶剂对实验的干扰,在采用滤纸片法作抑菌实验时,都会先将沾有样品的滤纸片放入烘箱中干燥,目的是将乙醇溶剂全部挥发干净,然后再贴片作抑菌实验。由于提取溶剂在干燥过程中都已挥发掉了,所以提取溶剂对本试验并没有影响,说明起抑菌作用的物质是红曲中的组分,并且这种组分不属于色素类物质。

2.3 红曲脱色液中桔霉素的检测

采用高效液相法分别对脱色后的酒曲、功能曲、色曲提取液进行检测,在脱色液中没有检测到桔霉素。实验说明,红曲中除了色素和桔霉素之外还存在其他的抑菌物质。

2.4 抑菌组分的定性试验

该抑菌物样品与茚三酮试剂反应,溶液显蓝紫色,茚三酮反应为阳性。由于茚三酮反应是氨基酸的定性反应,说明红曲提取物中存在氨基酸或由氨基酸组成的肽类物质。

样品在与萘酚硫酸溶液反应时产生绿色环带,后

转变为蓝绿色,萘酚实验为阳性,说明红曲提取物中含有糖类物质。

2.5 抑菌组分的 Sephadex G-25 凝胶色谱分离

将该抑菌物进行凝胶色谱分离,洗脱曲线如图 2 所示,对凝胶过滤组分中肽含量和糖含量分析表明,混合物中糖分布的峰在位置上与肽的分布峰相一致,大部分集中在 P 组分中,糖和小肽类物质的洗脱曲线一致,说明该组分可能是结合性糖肽。

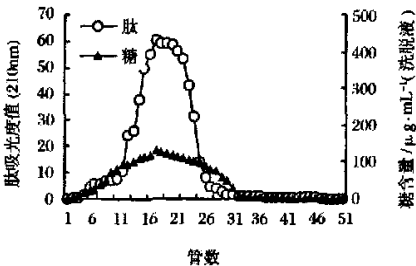


图 2 抑菌物经 sephadex G-25 凝胶过滤后的图谱

2.6 抑菌组分的薄层层析分析

采用薄层层析法对凝胶色谱得到的组分 P 作进

一步分析。制作完全相同的2块硅胶板,点样并展开后对2块板用不同的显色剂显色,a板用肽显色剂显色,b板用糖显色剂显色,结果如图3所示。从a板可以看出样品被分为2个组分 a_1 、 a_2 ,其 R_f 值分别为0.21,0.51,2组分在茚三酮显色剂下显蓝紫色。同样b板喷洒茚酮-硫酸后,在薄板的上端也有2处显色 b_1 和 b_2 ,其 R_f 值分别为0.21,0.46,2组分在茚酮显色剂下显墨绿色。其中 a_1 和 b_1 的 R_f 值完全一致。这说明组分 a_1 和 b_1 是同一种物质,而这种物质既能发生糖显色反应又有肽显色反应,从而可以推断这种物质是糖与小肽通过糖肽键相联的糖结合性肽,即糖肽。

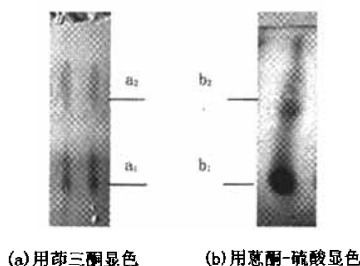


图3 抑菌物的薄层色谱图谱

3 结论

采用活性炭将红曲中的色素完全脱去后,并通过HPLC检测证实该脱色液中无桔霉素存在。抑菌试验显示该样品仍然具有抗菌作用,从而证实了红曲中除桔霉素和色素之外,还存在其他的抗菌物质。经试

验初步认定该物质属于糖肽类物质。对该糖肽物进行抑菌实验,结果显示有抑菌作用;说明红曲中存在一种糖肽类的抗菌物。由于糖肽类物质所包含的范围很广,种类繁多,关于这种物质的结构、官能团、糖肽键类型及抑菌机理等性质还在进一步的研究中。

参考文献

- 1 赵树欣,李凤美.酿酒红曲、色素红曲、功能红曲的对比及抑菌性研究[J].中国食品添加剂,2007,(1):96~99
- 2 Hin Chung Wong, Philip E. Production and isolation of an Antibiotic from *Monascus purpureus* and its Relationship to pigment production[J]. Food Sei, 1981, 46: 589~592
- 3 Blanc P J. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin[J]. Food Microbiology, 1995, 27(2~3): 201~213
- 4 童群义.红曲色素抑菌作用的研究[J].食品工业科技, 1997(5): 5~6
- 5 Wang SL, Hsiao W S, Chang W T, et al. Purification and characterization of Antimicrobial Chitinase Extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC 31499 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium[J]. Agric Food Chem, 2002, 50(8): 2 249~2 255
- 6 宫慧梅.红曲抑菌物质橙色素与桔霉素的研究[D].天津轻工业学院研究生学位论文, 2001. 18
- 7 中华人民共和国国家标准《GB4926-85, 食品添加剂红曲米国家标准》[S]
- 8 李建武.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社, 2000

A Glycopeptides with Antibiotic Characteristic in Red Koji

Zhao Shuxin, Li Fengmei, Zeng Luyan

(The Key Laboratory of Industrial Microbiology of Tianjin, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science and Technology, Tianjing 300457, China)

ABSTRACT In order to investigate the compounds with antibiotic character of Red koji, citrinin-free Redkoji was used. As a first step we decolor the pigment of Red koji by active carbon. Then the decolored sample was surveyed by HPLC to eliminate citrinin. The surveyed decolored sample was carried out to identify antibiotic activity. The result showed that this sample still had antibiotic activity. This experiment demonstrated that there is other compounds with antibiotic character except the citrinin and pigment in Red koji. The compound was isolated and partially purified by Sephadex G-25 column and thin-layer chromatograph, and was identified as glycopeptides.

Key words Red koji, glycopeptides, antibiotic compound, citrinin, pigments