

红曲菌产生的 DPPH 自由基捕捉物质的筛选*

吴根福 吴雪昌

(浙江大学生命科学院 杭州 310012)

摘 要: 从浙江长兴县农村传统家酿红酒的小曲中分离出一红曲菌菌株(*Monascus* sp.) ,对它产生的 DPPH 自由基捕捉物质进行了筛选。结果表明 :自由基捕捉活性和得率以醋酸乙酯的中性提取物较高 ,培养时间以 30℃ ,100r/min 摇床 5d 为好 ,对醋酸乙酯的中性提取物进一步进行了硅胶柱层析、LH-20 柱层析、MPLC、HPLC 分部收集 ,并用 HPLC 检验其纯度 ,获得收量在 2mg 以上 ,纯度在 85% 以上的自由基捕捉物质 15 个 ,对其中有代表性的 B1-3、C3-1-7 进行了¹H-NMR 和¹³C-NMR 分析 ,确定它们的大致结构为苯的三取代衍生物 ,C3-1-7 很可能是 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸 ;并对 B1-3、C3-1-7 的自由基捕捉活性进行了测定 ,40μmol/L 的 B1-3 其自由基捕捉活性约为 65% ,40μmol/L 的 C3-1-7 其自由基捕捉活性小于 56% ,均略低于 V_c 和 V_e。

关键词: 红曲, 自由基, 捕捉, 筛选

中图分类号 :Q949.32 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2000)04-0394-99

生命在代谢过程中或受外来因素刺激后 ,会产生活性氧自由基 ,自由基攻击生命大分子造成组织、细胞损伤 ,从而引起机体衰老 ,或诱发肿瘤等恶性疾病的发生^[1]。自由基捕捉物能够清除机体代谢过程中产生的过多自由基 ,因而可增进人体健康^[2,3]。

红曲菌自古以来就作为我国的食物及酿造菌种。本草纲目及天工开物中有对它“消食活血”“健脾燥胃”、“杀菌防腐”等功能的描述 ,近年又发现它产生的莫纳可林类物质有降胆固醇、降血脂的作用^[4] ,产生的 γ -氨基丁酸和乙酰胆碱有降血糖、降血压作用^[5]。但对它产生的自由基捕捉物的研究工作尚未见正式报道。我们利用 DPPH 作为自由基 ,筛选了一批红曲菌产生的自由基清除剂。

1 材料和方法

1.1 菌种

分离自浙江省长兴县民间红酒生产用小曲。

1.2 培养基

葡萄糖 30g ,NaNO₃ 3g ,酵母提取物 1g ,K₂HPO₄ 1g ,MgSO₄·7H₂O 0.5g ,KCl 0.5g ,FeSO₄·7H₂O 0.01g ,pH6.7。用蒸馏水定容至 1L。固体培养基添加 20g 琼脂。

1.3 红曲菌的分离纯化

取红曲少许 ,放入 100mL 无菌水中 ,振荡 ,将上层孢子悬液置于 60℃ 水浴中保温 30min ,用稀释涂平板法分离 ,30℃ 培养 5d 后挑取单菌落 ,经进一步稀释涂平板法纯化。

作者简介 :吴根福(1965-)男 ,浙江余姚人 ,浙江大学生命科学院副教授 ,硕士 ,主要从事微生物学方面的研究

收稿日期 :1999-03-09 ,修回日期 :1999-09-06

1.4 红曲菌的扩大培养

挑取平板培养的红曲菌菌苔 3 环, 接入 100mL 培养基中, 30℃, 100r/min 振荡培养 3d 后, 全量接入装有 900mL 培养基的 2000mL 三角瓶中, 同法振荡培养 5d。

1.5 代谢产物的浓缩

将红曲菌培养物过滤, 滤液调 pH 至 3, 用醋酸乙酯抽提, 然后按下图分离碱性组分、中性组分和酸性组分。

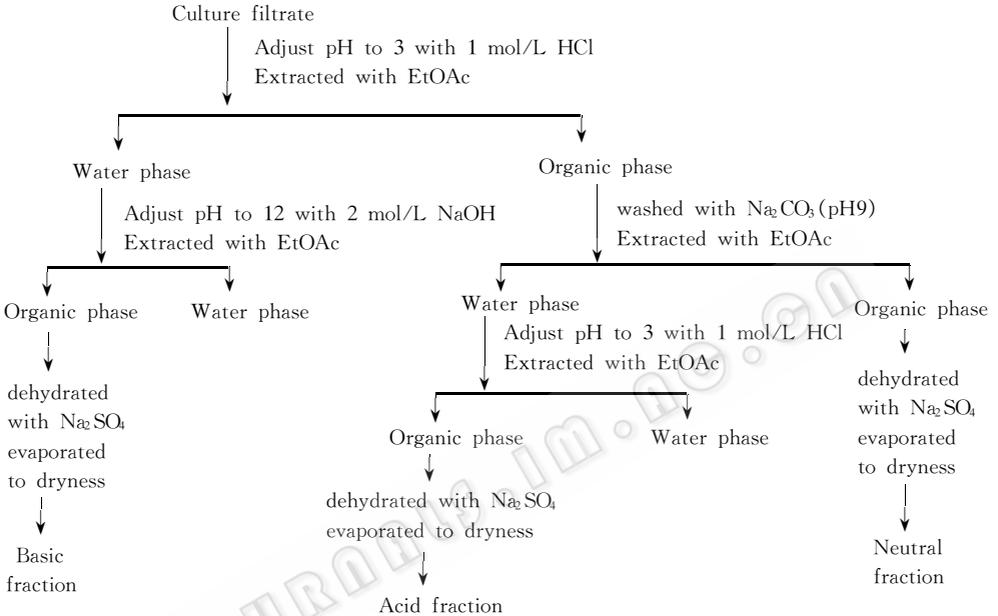


图 1 红曲菌产生的碱溶性、中性和酸溶性组分的分离方法

Fig. 1 The separating method of basic, neutral and acid fraction from *Monascus* sp.

1.6 自由基捕捉物的单离

将 1.5 分离所得的中性组分用硅胶柱层析, 流动相依次为 75% Hexane/25% EtOAc, 50% Hexane/50% EtOAc, 25% Hexane/75% EtOAc, EtOAc, MeOH。将各层析液减压蒸发后分别得到样品 A、B、C、D、E, 再将各个样品用硅胶柱层析(流动相为氯仿/甲醇), LH-20 柱层析, MPLC, HPLC 等方法单离, 用 HPLC 检验单离物的纯度(260nm 吸收)。

1.7 自由基捕捉物的鉴定

将分离物进行薄层层析, 风干后, 喷上 DPPH 溶液, 褪色组分为自由基捕捉物。

1.8 化学量论的脂质自由基捕捉实验

按表 4 加入试剂后, 盖上塞子, 室温下放置 30min, 于 517nm 处测吸光度。

2 结果和分析

2.1 红曲菌的形态及生理生化特性

对分离得到的红曲菌菌株进行了形态观察, 菌丝培养前期为无色, 分枝, 直径 3~5 μ m, 平板(30℃)培养 3d 后逐渐转红, 并产水溶性色素, 分生孢子白色, 长于菌丝分枝顶

端,一个或一串(常 2~3 个连结)圆形或椭圆形,直径 5~12 μm ,表面光滑。根据戴芳澜的分类体系^[6],初步归为子囊菌纲真菌子囊菌亚纲散囊菌目散囊菌科的红曲菌属。

2.2 培养滤液中碱性、酸性、中性提取物含量

取培养 96h 的培养物 2000mL,提取脂溶性物质,其得率和抗氧化性能见表 1。由于碱性和酸性部分得率低,对自由基的捕获性能不很强,因此以后实验中以提取中性部分为主。

表 1 培养滤液中碱性、酸性、中性提取物的得率和抗氧化性能

Table 1 Yield and anti-oxidizing ability of culture filtrate

Culture filtrate	Weight/mg	Yield/%	Anti-oxidizing ability *
Basic fraction	34.2	10	+
Acid fraction	85.3	24.9	++
Neutral fraction	223.8	65.4	+++

* Evaluated with decolouring of DPPH in TLC.

2.3 培养时间对中性提取液得率的影响

将红曲菌摇瓶培养 3、4、5、6d 后,分别取下 2 瓶(共 2000mL)提取中性的脂溶性部分,发现以培养 5d 收率最大(234.6mg)。

2.4 中性提取物的分部分离

取培养 5d 的培养液 18,000mL,同上法提取,得到中性提取液 2177.8mg。用不同比例的己烷/醋酸乙酯层析,得到 A、B、C、D、E 五个组分,其得率与部分性质见表 2。

表 2 分部分离物的得率及物理性状

Table 2 The yield and physical characteristics of substances getting from partition separation

Fraction	Weight/mg	Yield/%	Anti-oxidizing	Physical characteristics
A	145.6	6.7	++	Brown oily liquid
B	1312.4	60.3	++++	Yellowish powder
C	379.4	17.4	+++	Yellowish oily liquid
D	64.5	3.0	++	Brown oily liquid
E	250.9	11.5	++	Red liquid with crystal

2.5 自由基捕捉物的单离

将分部分离收集到的 A、B、C、D、E 组分进一步层析单离,共获得纯度较高,收率较大的自由基捕捉物样品 15 个。其收率和部分性质见表 3。

表 3 几个单离到的自由基捕捉物的收获量和部分性质

Table 3 The yield and characteristics of free-radical scavengers

Sample	Weight/mg	CH ₃ CN/H ₂ O proportion	Time	Purity/%	Scavenging ability	Physical characteristics
A1-1	5.8	3/7	3.333	97	++++	Yellowish amorphous
A2-4	6.4	5/5	7.512	98	++	Yellowish amorphous
A4-8	2.3	4/6	13.70	94	+++	Yellowish amorphous
A5-1	23	7/3	5.594	86	+	Red amorphous
A5-3	6.4	7/3	10.12	75	+	Red amorphous
B1-3	184.1	1/9	4.784	95	+++	Yellowish oil liquid
B2-3	8.5	2/8	3.930	94	++++	White powder
B3-1	2.3	2/8	5.424	98	++	Yellowish amorphous
B4-1-5	4.7	55/44	8.282	88	+	Yellow amorphous

续表 3

B4-2-4	4.2	3/7	10.45	93	++	Yellow amorphous
B4-2-8	2.5	7/3	4.485	85	++	Yellow amorphous
C1-4	4.0	5/5	17.86	90	+++	Yellowish amorphous
C3-1-7	12.6	2/8	8.212	92	++	Yellowish powder
C3-5-6	6.1	5/95	6.565	91	+	Brown amorphous
E2-1*	3.1				++	Red liquid

* Sample E2-1 has lower absorption under 260 nm, it was valuated as puritier under TLC.

2.6 B1-3、C3-1-7 结构的初步同定

对分离所得的 B1-3、C3-1-7 进行了¹H-NMR 和¹³C-NMR 的测定,结果见图 2。从图中可以看出 C3-1-7 是一种三取代的苯衍生物,通过对各同分异构体进行比较,根据 Savitsky 法则^[7],最可能是 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸,其结构式为:

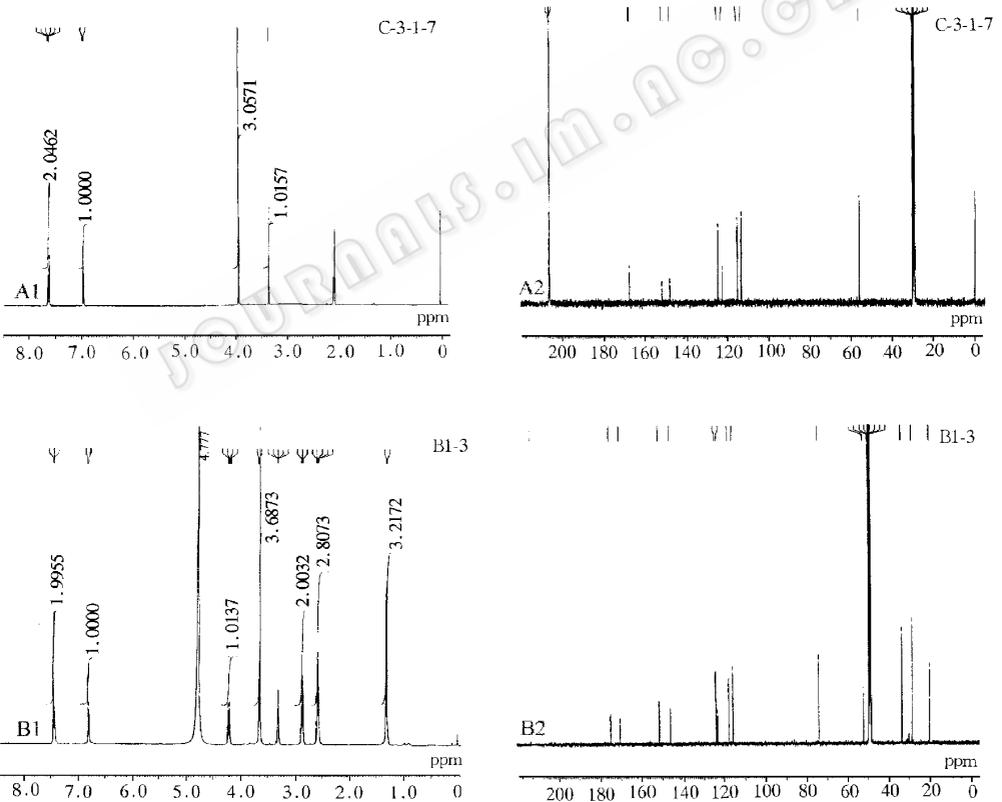
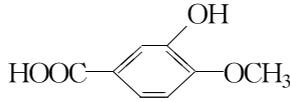


图 2 B1-3 及 C3-1-7 的¹H-NMR 和¹³C-NMR 图谱

Fig. 2 The ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum of B1-3 and C3-1-7

A1. ¹H-NMR spectrum of C3-1-7 (in CD₃OD); A2. ¹³C-NMR spectrum of C3-1-7 (in CD₃OD);

B1. ¹H-NMR spectrum of B1-3 (in CD₃OD); B2. ¹³C-NMR spectrum of B1-3 (in CD₃OD).

B1-3 与 C3-1-7 相似,也是一个三取代苯衍生物,只不过取代基较为复杂,具有三个脂肪族碳原子(δ19,28,33),两个与 O 相连的醚或酯碳原子(δ52,74),两个酯或酸的羰基原子(δ170,175)以及一个饱和脂肪族酮基碳原子(δ213);从氢谱中可见共有 16 个氢,除了 3 个苯环氢外,似乎还有两个 CH₃,三个 CH₂ 和一个 CH,及一个 OH。总之,氢谱及其峰裂分很复杂,要确定它的结构尚需与其它分析方法配合。

2.7 B1-3、C3-1-7 的化学量论的脂质自由基捕捉实验

将 B1-3(1840μg/mL,用 EtOH 配制),C3-1-7(1940μg/mL,用 EtOH 配制)连同对照 α-To(Vc 860μg/mL,用 EtOH 配制),ASA(Vc 350μg/mL,用 pH5.5 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液配制)按表 4 加量后,30℃ 反应 30min,于 517nm 处测吸光度。结果见表 4。遗憾的是样品 B1-3、C3-1-7 的分子量尚未最后确定,不能与维生素 C、维生素 E 进行等摩尔浓度的比较(反应系统维生素 C、维生素 E 的最终浓度皆为 40μmol/L)。如果不考虑其它取代基(N,P,Cl 等),根据¹H-NMR 和¹³C-NMR 推算,B1-3 的分子量大约为 300,C3-1-7 的分子量大约为 168,则它们的自由基捕捉活性按捕捉百分率(1-样品 OD₅₇₁/对照 OD₅₇₁)×100% 计算,如图 3 所示。其中 B1-3 的摩尔浓度依次为 31,61,123,245μmol/L,C3-1-7 的摩尔浓度依次为 58,116,231,462μmol/L。可见 40μmol/L B1-3 的自由基捕捉活性介于 62.8% 与 76.9% 之间,约为 65%,而 40μmol/L C3-1-7 的自由基捕捉活性小于 56.8%,两者都不及维生素 C 和维生素 E。

表 4 B1-3、C3-1-7 的自由基捕捉活性

Table 4 The free-radical scavenging activity of B1-3、C3-1-7

0.1mol/L Acetate buffer/mL	EtOH/mL	0.5mmol/L DPPH/mL	Vc/mL	Ve/mL	Sample/mL	OD ₅₇₁ (B1-3)	OD ₅₇₁ of C3-1-7
2.0	2.0	1.0				0.403	
1.9	2.0	1.0	0.1			0.079	
2.0	1.9	1.0		0.1		0.087	
2.0	1.975	1.0			0.025	0.150	0.174
2.0	1.95	1.0			0.050	0.093	0.138
2.0	1.9	1.0			0.100	0.089	0.105
2.0	1.8	1.0			0.200	0.083	0.091

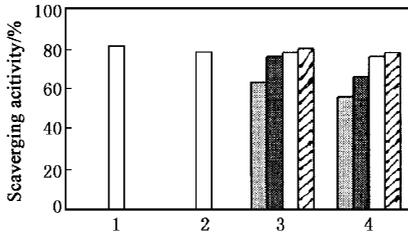


图 3 几种物质的自由基捕捉活性

Fig. 3 The free-radical scavenging activity of several substances

1. Vc; 2. Ve; 3. B1-3; 4. C3-1-7.

□ 0.025mL; ■ 0.05mL; ▒ 0.1mL; ▨ 0.2mL.

section 提供费用 感谢静冈县立大学及其所属的微生物生产学研究室提供研究条件 感谢广田阳教授和阿部尚澍先生给予的悉心指导。

参 考 文 献

- [1] Slaga T J. Radioprotectors and Anticarcinogens , Academic press , New York ,1983.
- [2] Kim S M , Kikue Kubota , Akio Kobayashi , et al . *Biosci Biotech Biochem* ,1997 **61**(9) :1482~1485.
- [3] Chiaki Sanbongi , Naomi Osakabe , Midori Natsuma , et al . *J Agric Food Chem* ,1998 **46** :454~457.
- [4] Endo A , Hasumi K , Antibiot J . 1985 **38**(3) :321~327 **420**~422.
- [5] Kohama Y , Matsumoto S , Nakanishi T , et al . *Chem Pharm Bull*(Tokyo) ,1987 **35**(6) :2484~2499.
- [6] 戴芳澜 . 真菌的形态和分类 . 北京 :科学出版社 ,1987.
- [7] 赵瑶兴 孙祥玉 . 光谱解析与有机结构鉴定 . 合肥 :中国科学技术大学出版社 ,1992.

SCREENING DPPH RADICAL SCAVENGERS FROM *MONASCUS* SP.

Wu Genfu Wu Xuechang

(College of Life Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310012)

Abstract : A strain belongs to *Monascus* sp. was separated from hongqu(Chinese beni-coji) which was used to brew red wine in Changxin county , Zhejiang province , and its DPPH radical scavenging metabolites were studied. Results showed that the yield and radical scavenging activity of neutral extract with EtOAc were higher than that of acid and basic extract. After shaken at 30°C , 100r/min for 5 days , this strain produced largest amount of neutral extract. Further partitioning the neutral fraction with silica gel column chromatograph , LH-20 column chromatograph , MPLC and HPLC , we screened 15 free radical scavengers whose yield was more than 2 mg and purity was higher than 85% in HPLC(260 nm absorption). Several of them were analyzed with ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrum from which we concluded that B1-3 and C3-1-7 were two kinds of substitute of benzene , and C3-1-7 may be 3-OH-4-OCH₃-benzoic acid. The scavenging activity of 40μmol/L B1-3 was about 65% , and that of C3-1-7 was lower than 56% , while as the control the scavenging activity of 40μmol/L Vc and Ve was 80.4% and 78.4% respectively.

Key words : *Monascus* , DPPH , Free radical , Scavenger , Screening