



红曲霉抑菌成分糖肽类物质的分离纯化及稳定性

曾露燕, 赵树欣, 李 焱

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 红曲霉菌丝体经高压均质机破碎后用 75%乙醇溶液提取胞内物质,提取液经脱色、浓缩、透析后冷冻干燥得粗品,再经硅胶柱层析和 HPLC 分析检验得到较纯的红曲霉抑菌成分糖肽类物质。以金黄色葡萄球菌为指示菌,对抑菌成分的稳定性作了初步研究,结果表明:糖肽类物质在 100 ℃处理 12 h 其抑菌活性没有明显变化;抑菌成分在 pH 2~11 时稳定,在 pH 12 时抑菌活性下降;胃蛋白酶和木瓜蛋白酶能完全酶解糖肽类物质;Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺对糖肽类物质的抑菌活性有促进作用,而 Mg²⁺对糖肽类物质的抑菌活性有抑制作用。

关键词: 糖肽类物质; 抑菌物质; 稳定性

中图分类号: Q51

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)04-0018-04

Separation, Purification and Stability of the Antibacterial Compounds Glycopeptide from *M. Purpureus*

ZENG Lu-yan, ZHAO Shu-xin, LI Yi

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education,
College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: After *Monascus* mycelium being homogenized by super high-pressure homogenization technology antibacterial compounds Glycopeptide in cell was extracted by 75% ethanol. Unpurified product was obtained by decoloration, concentration and freeze-drying after dialyses. The relatively purified product was obtained by using silica gel column layer and HPLC. The result showed that the glycopeptides could keep activity constantly when treated at temperature 100 ℃ for 12 h and at pH 2 to 11. However, the inhibitory activity decreased when the pH reached 12. In the meantime, the glycopeptide can be hydrolysed by pepsin and chymopapain thoroughly. It was also found that the inhibitory activity was improved by Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ but inhibited by Mg²⁺.

Keywords: glycopeptides; antibacterial compounds; stability

红曲是红曲霉接种在大米上发酵而得的产品,在我国历史悠久,应用广泛。红曲霉在发酵期间能产生许多次级代谢产物。红曲霉的早期研究主要集中在其产生的红曲色素和淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、酯化酶、果胶酶等各种酶类的应用上,如着色剂、传统的酿酒、制醋等。1979 年日本东京农工大学远藤章^[1]从红色红曲霉的代谢产物中分离得到了能降胆固醇的 Monacolin K,因此掀起了国内外学者研究红曲霉所产生的生理活性物质的热潮,不同学者分别对红曲霉的功能性、抑菌性、安全性及活性物质的作用机理及

结构等都作了研究。1981 年香港中文大学的 Wong 等人^[2]从红曲中分离出一种抑菌因子命名为 Monascidin A。1993 年法国 Blanc 等人^[3]用质谱、核磁共振、紫外及荧光分析等多种方法对 Monascidin A 进行结构鉴定、定性分析发现,Monascidin A 即为真菌毒素桔霉素,使得学者们对红曲霉的安全性提出了质疑,但是随着深入的研究发现,红曲霉的抑菌物质除了桔霉素以外,还存在其他的抑菌物质,如 Ankalactone、红曲色素、橙色素和几丁质酶,以及本研究室^[4]从红曲提取液中发现的抑菌成分糖肽类物质。本文旨在

对红曲霉中的抑菌成分糖肽类物质进行分离纯化, 并对其稳定性作初步研究.

1 材料与方法

1.1 供试菌株与培养基

紫色红曲霉菌丝体, 广东省东莞天益生物工程公司; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) TQ16075, 天津科技大学工业微生物菌种保藏室.

细菌用培养基 (g/L): 肉汤培养基 (牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.2~7.4, 121℃ 灭菌 20 min).

1.2 红曲霉抑菌成分糖肽类物质粗品的制备

取一定量的红曲霉菌丝体, 用粉碎机粉碎, 然后用 75% 的乙醇溶液调成液态, 再将其用超高压均质细胞破碎机在 70 MPa 的压力下进行破碎、抽滤、弃菌体, 在滤液中加入 10% 的活性炭, 45℃、160 r/min 水浴脱色 1 h 后抽滤得滤液. 用旋转蒸发器将滤液浓缩, 将浓缩液依次用截留相对分子质量为 10 000、8 000、1 000 的透析袋进行透析, 再分别将其透过液和保留液以金黄色葡萄球菌为供试菌作抑菌实验. 并用薄板层析法鉴定结合性糖肽类物质^[4].

1.3 硅胶柱层析

将柱层析硅胶在 110℃ 的烘箱中活化 2 h, 取干燥的样品和柱层析用硅胶按 1 : 2.5 的比例研磨均匀制备样品胶.

采用点滴实验法^[5]选择洗脱剂 (即 TLC 的展开剂). 采用常规柱 (2.5 cm × 30 cm), 柱层析硅胶 200 ~ 300 目, 样品与硅胶按 1 : 70 的比例称取. 采用干法装柱, 在柱底部加上薄层脱脂棉, 底部接真空泵, 一边抽真空一边匀速地加入硅胶, 并轻轻地震荡硅胶柱身, 使硅胶分布匀实, 最后加入样品胶, 顶部垫上一薄层脱脂棉. 用选定的展开剂作为硅胶柱层析的洗脱剂, 将洗脱剂混合均匀后吸取 10 mL 沿着装好样品的硅胶柱内慢慢加入, 之后随着洗脱剂的减少慢慢补加, 调节流量为 0.5 mL/min, 8 min 收集一个馏分.

1.4 薄层层析检测分析

将 0.3% 的羧甲基纤维素钠 (CMC) 溶液与薄层层析用硅胶 G254 按 1 : 3 (mL : g) 的比例在研钵中顺时针慢慢研磨均匀后铺板, 过夜干燥, 使用前在 110℃ 烘箱中活化 1 h. 将硅胶柱层析收集到的馏分用薄板层析分析检测, 展开剂同 1.3 节中的洗脱剂, 层析结束后分别用茚三酮和萘酚硫酸显色剂显色, 测定样品点的迁移率 R_f ^[6].

1.5 HPLC 分析

检测硅胶柱层析馏分条件: 色谱柱安捷伦 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 7 : 3$; 紫外检测器; 检测波长 210 nm; 柱温 28℃; 流量 0.5 mL/min.

1.6 红曲霉代谢产物抑菌成分糖肽类物质的稳定性

1.6.1 热稳定性

将抑菌物质溶液分别放在 50℃、75℃ 和 100℃ 的水浴锅中加热处理 0、2、4、6、8、10、12 h, 120℃ 处理 20 min, 再将这些溶液作抑菌实验.

1.6.2 酸碱稳定性

分别用盐酸和氢氧化钠调节抑菌物质溶液的 pH 在 2 ~ 12 之间, 再用不同 pH 的糖肽类物质溶液作抑菌实验.

1.6.3 酶解稳定性

分别用酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味酶和复合蛋白酶等酶对抑菌溶液进行酶解, 用酶解液作抑菌实验.

1.7 金属离子对糖肽类物质抑菌活性的影响

分别称取 30 mg 的 KCl、NaCl、CaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、ZnSO₄、MgSO₄, 溶解于 1 mL 的糖肽类物质溶液中, 作用 2 h 以后, 用各离子溶液作抑菌实验.

2 结果与讨论

2.1 红曲霉抑菌成分糖肽类物质粗品的制备

醇提样品溶液脱色前后的色价对比见表 1. 由表 1 可以看出, 溶液中的黄色素和红色素分别减少了 99.7% 和 99.9%. 抑菌实验结果发现, 截留相对分子质量为 1 000 的透过液有抑菌效果, 说明其中有抑菌物质存在, 且相对分子质量小于 1 000. 旋转蒸发浓缩该透过液至溶液的物质含量为 10% ~ 15% 时进行冷冻干燥, 得黄色的膏状物质.

表 1 样品溶液脱色前后色价的比较
Tab.1 Compared with the color of the sample and decolorant

样品溶液	黄色色价	红色色价
脱色前	12.8	17.1
脱色后	0.036	0.016

2.2 硅胶柱层析纯化糖肽类物质

2.2.1 洗脱剂的选择

糖肽类物质的水溶性较好, 根据相似相溶原理, 可以推断出糖肽类物质的极性也较强, 所以在选择洗脱剂的时候优先考虑正丁醇等强极性溶剂, 采用点滴

实验法对糖肽类物质的分离效果作对比,结果见表 2.

表 2 不同有机溶剂对糖肽类物质的分离效果

Tab.2 Effect of organic solvents on separating glycopeptide

有机溶剂的种类	展开情况
石油醚	样品在原地不动,不能展开
正己烷	样品在原地不动,不能展开
正丁醇	可展开小圆环
丙酮	呈圆环状展开,效果较好
甲醇	展开速度较快,将样品随溶剂展开至前沿
乙腈	样品在原地不动,不能展开
$V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氨水}}=10:5:1$	拖尾现象严重,待分离物随溶剂展开至前沿,需减少甲醇的含量
$V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{氨水}}=12:3:3$	样品在原地不动,不能展开
$V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氨水}}=3:1:1:0.2$	能分开,但是拖尾现象严重
$V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{醋酸}}:V_{\text{氨水}}:V_{\text{水}}=4.5:1.5:1:1:2$	能较好地分开所要分离的物质

注:氨水的体积分数为 5%.

由于单一溶剂的展开效果不佳,因此可以选择几种有机溶剂作为合成展开剂的溶剂,正丁醇、丙酮和醋酸,在作薄层层析时往往会加入少量氨水用来饱和硅胶,而醋酸可以减少拖尾现象,所以最后选定展开效果最好的合成展开剂为: $V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{醋酸}}:V_{\text{氨水}}:V_{\text{水}}=4.5:1.5:1:1:2$.

2.2.2 硅胶柱层析

TLC 检测硅胶柱层析收集的馏分,分别用茚三酮和茚酮硫酸显色剂显色.茚三酮显色结果发现,从第 4~15 馏分的 $R_f=0.58$,第 15~22 馏分的 $R_f=0.37$;茚酮硫酸显色结果发现,从第 4~15 馏分的 $R_f=0.58$,第 15~20 馏分的 $R_f=0.22$. 分别合并馏分 4~15 及 16~22,将有机溶剂蒸发后加入 2 mL 蒸馏水溶解,作抑菌实验,结果发现馏分 4~15 的溶液有抑菌效果,馏分 16~22 的溶液没有抑菌效果.而且茚三酮和茚酮显色的 R_f 相同,说明它们是一个物质,既能发生糖显色反应也能发生肽显色反应,可以判定这种物质是糖与小肽通过糖肽类物质键相连的糖结合性肽,即糖肽类物质.

2.3 紫外光谱扫描

将硅胶柱层析分离纯化得到的抑菌成分糖肽类物质溶液进行紫外扫描,如图 1 所示,发现糖肽类物质在 210 nm 处有强烈吸收峰,氨基酸的侧链基团和肽链在 200~300 nm 之间产生紫外吸收^[7],说明含有肽键.

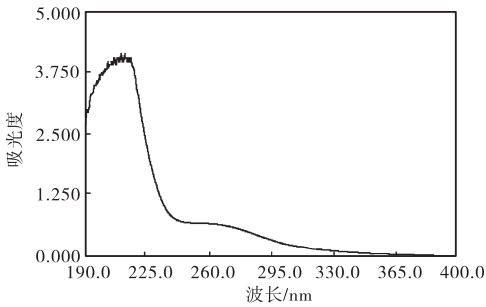


图 1 糖肽类物质溶液的紫外扫描图谱

Fig.1 Spectrum of the glycopeptide

2.4 HPLC 检测分析硅胶柱层析馏分

将硅胶柱层析收集到的馏分用色谱纯甲醇稀释 10 倍后进样,从图 2 可以看出,馏分 4~15 出现了比较一致的两个峰,出峰时间分别为 5.78 min 和 6.37 min,而出峰时间为 6.37 min 的峰是洗脱剂中的丙酮.糖肽类物质从硅胶柱层析的第 4 馏分开始出现至第 15 馏分结束,将馏分用 HPLC 检测分析表明,硅胶柱层析分离所得到的组分为一种物质.

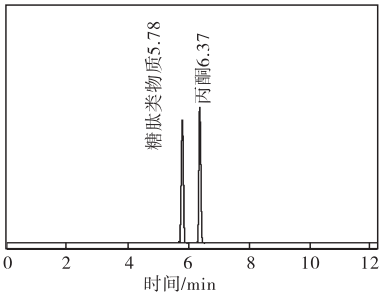


图 2 经硅胶柱层析分离得到的馏分 HPLC 检测图谱

Fig.2 HPLC chromatogram of the glycopeptides from silica gel column layer

2.5 抑菌成分糖肽类物质的稳定性分析

2.5.1 热处理对糖肽类物质抑菌活性的影响

热处理抑菌实验结果见表 3,糖肽类物质经过 100 ℃加热处理 12 h 和 120 ℃加热处理 20 min 后,其抑菌活性没有明显的变化,说明糖肽类物质具有较好的热稳定性.

表 3 热处理对糖肽类物质抑菌活性的影响

Tab.3 Effect of thermal on the antibiotic activity of glycopeptide

温度/ ℃	抑菌圈/mm							
	20 min	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
50	-	10.0	10.0	10.0	9.7	10.0	10.0	10.0
75	-	10.1	10.0	9.8	9.5	10.0	10.0	10.0
100	-	10.0	10.0	10.0	10.0	9.8	10.2	10.0
120	9.9	10.0	-	-	-	-	-	-

注:滤纸片的大小为 6~6.5 mm;-表示未作抑菌实验.

2.5.2 酸碱处理对糖肽类物质抑菌活性的影响

用酸碱调节糖肽类物质溶液的 pH 为 2~12,抑菌实验结果发现糖肽类物质在 pH 2~11 时抑菌效果没有发生变化,当溶液的 pH>12 时抑菌活性减弱,说明糖肽类成分抑菌物质耐酸、碱的能力强.

2.5.3 酶解对糖肽类物质抑菌活性的影响

酸处理对糖肽类物质抑菌活性的影响见表 4. 从

表 4 可以看出,中性蛋白酶、碱性蛋白酶和复合蛋白酶对糖肽类物质没有酶解作用,而酸性蛋白酶和风味酶部分水解了糖肽类物质,胃蛋白酶和木瓜蛋白酶完全酶解了糖肽类物质或者是破坏了起抑菌作用的关键基团. 胃蛋白酶^[8]具有较强的专一性,能催化具有苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸以及色氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺等肽键的断裂.

表 4 酶处理对糖肽类物质抑菌活性的影响
Tab.4 Effect of enzymes on the antibiotic activity of glycopeptides

酶的种类	空白液	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	胃蛋白酶	木瓜蛋白酶	复合蛋白酶	风味酶
抑菌圈/mm	10.0	7.5	10.0	10.0	-	-	10.0	8.3

注: -表示没有抑菌圈.

2.5.4 金属离子对糖肽类物质抑菌活性的影响

由图 3 可以看出,金属离子 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 对糖肽类物质的抑菌活性没有影响, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 对红曲霉代谢产物抑菌成分糖肽类物质的抑菌活性有促进作用,而 Mg^{2+} 对抑菌成分糖肽类物质的抑菌活性有抑制作用.

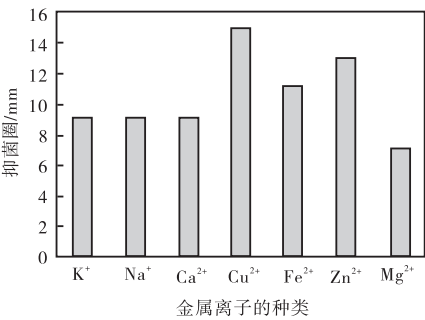


图 3 金属离子对糖肽类物质抑菌活性的影响
Fig.3 Effect of metallic ion on the antibiotic activity of glycopeptide

3 结 论

红曲霉中的抑菌成分糖肽类物质经过透析、硅胶柱层析分离提纯,并经 HPLC 检测分析以后得到了纯度较高的糖肽类物质. 以金黄色葡萄球菌为供试菌检验糖肽类物质的抑菌活性,发现糖肽类物质具有较好的热稳定性,且能在较宽的 pH 范围内保持抑菌活性不变,其热稳定性和酸碱稳定性表明它具有进一步

开发应用的潜能. 糖肽类物质能被胃蛋白酶和木瓜蛋白酶完全酶解,表明进入人体后可被人体所吸收,进而说明糖肽类物质作为食品防腐剂的潜在优越性.

参考文献:

[1] Endo A. Monacolin K,a new hypocholesterolemic agent produced by a Monascus species[J]. The Journal of Antibiotics,1979,32:852-854.

[2] Wang H C,Koehler P E. Production and isolation of an antibiotic from Monascus purpureus and its relationship to pigment production [J]. Food Sci,1981,46 (2) :589-592.

[3] Blanc P J,Laussac J P,Le B J ,et al. Characterization of monascidin A from Monascus as citrinin [J]. Food Microbiol,1995,27 (2-3) :201-213.

[4] 赵树欣,李凤美,曾露燕. 红曲中的一种糖肽类抑菌物质的研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33 (8) :42-44.

[5] 杜斌,张振中. 现代色谱技术[M]. 郑州:郑州大学出版社,2001:118-119.

[6] Boubekeur B,Abdellah M,Nasserdine S,et al. Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain Nonomuraea sp. NM94[J]. Microbiol Biotechnol,2007,34:403-412.

[7] 樽井庄一. 红麴素材の開発利用[J]. 食品の開発, 1993,28:47-50.

[8] 童耕雷. 实用生物化学与分子生物词典[M]. 北京:科学出版社,2003:588-589.