

文章编号: 1001-7453(1999)03-0066-04

降胆固醇红曲霉菌种的筛选

马美荣¹, 樊游¹, 方京¹, 诸葛健¹, 周立平²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 浙江工业大学, 浙江杭州 310014)

摘要: 固体培养基培养红曲霉, 并对 4 株红曲霉 Monacolin K 的产生性能进行了研究. 采用薄层层析法进行初筛, 获得了 8 株可能具有 Monacolin K 产生能力的菌株. 再用高压液相色谱法对初筛阳性菌进行检测, 证实其中 3 株具有较强的 Monacolin K 生产能力.

关键词: 红曲霉; Monacolin K; 薄层层析; 高压液相色谱

中图分类号: TQ920.1 **文献标识码:** A

血清胆固醇水平过高是动脉硬化和冠心病的诱因. 生活水平的提高和人口老龄化使该病成为常见病症. 人体胆固醇源于食物和体内生化合成, 后者占全部胆固醇来源的 70%~80%. 因此抑制体内胆固醇的过多合成是防治心血管病的有效途径之一. 在胆固醇合成中, 羟甲基戊二酰辅酶 A (HM G-Co A) 还原酶是控制合成的关键酶. 因此抑制该酶的活性能有效地减少或阻断体内胆固醇的合成, 达到防治高血脂病的目的. 1979 年日本学者远藤章从红曲霉 (*Monascus ruber*) 发酵液中分离出高活性 HM G-Co A 还原酶抑制剂 Monacolin K 和几种它的结构类似物^[1-3]. 筛选高活性降胆固醇红曲霉菌种具有现实意义.

1 材料和方法

1.1 菌种

部分红曲霉 (*Monascus*) 由作者所在实验室保藏, 分离红曲霉的样品采集于自然界.

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 麦芽汁培养基. 按常规方法灭菌.

1.2.2 发酵培养基 将 50 g 米饭放入 500 mL 的三角瓶中, 0.1 MPa 灭菌 30 min.

1.3 培养方法

保藏的菌种接种于斜面培养基, 31℃ 培养 6 d 后, 刮取菌苔悬浮于无菌水中. 取 1 mL 接种于发酵培养基中, 搅拌混匀, 28℃ 培养 10 d 左右.

1.4 Monacolin K 的定性分析

1.4.1 薄层层析法 参见文献 [4, 5];

收稿日期: 1998-10-23; 修订日期: 1999-05-07

作者简介: 马美荣 (1972 年 8 月生), 男, 山东临清人, 博士研究生.

1.4.2 高压液相色谱法 参见文献 [6].

2 结 果

2.1 薄层层析条件的选择

2.1.1 吸附剂的选择 常用的吸附剂有硅胶、氧化铝、硫酸镁、聚酰胺纤维素等.对于不同物质的分离,应选择不同的吸附剂.硅胶既能吸附脂溶性物质,也能吸附水溶性物质,且呈酸性,适于分离酸性及中性的物质.目的活性物质以内酯型和酸型形式存在,因此实验中选用硅胶作为吸附剂.

2.1.2 展开剂的选择 以单一有机溶剂作展开剂,效果常不如混合展开剂效果好,因此选择了几种混合展开剂对红曲霉发酵物提取液进行展开,结果见表 1.环己烷-氯仿-异丙醇作为展开剂的展开效果最好,出现的斑点多且清晰,故选择它为展开剂.

表 1 不同展开剂的展开效果

序号	展开剂	展开效果	结果
1	苯-甲醇-氯仿 (体积比为 2:1:6)	显色剂显色后可见 9 个斑点:即紫色、淡紫色、绿色、淡橙色、淡黄色、青色、淡蓝色、淡青黄色、淡黄色.	斑点多,但内层展开不完全
2	环己烷-氯仿-异丙醇 (体积比为 6:3:1)	显色剂显色后可见 9 个斑点:即淡红、浅棕红、淡青色、青色、紫色、土黄色、淡棕色、棕色、棕色.	斑点多,独立且清晰
3	二氯甲烷-丙酮 (体积比为 5:1)	显色剂显色后可见 6 个斑点:即浅棕红色、浅棕黄色、青色、棕色、淡青黄色、青色.	斑点少,颜色淡

注:上表所用显色剂为浓硫酸-甲醇(体积比为 1:1).

2.1.3 显色剂的选择 以上述实验选定的硅胶做薄层,以环己烷-氯仿-异丙醇作为展开剂,对标准物质及样品展开,选择合适的显色剂,结果见表 2.可知,1号显色剂显色后的斑点颜色与显色时间有关,且不同斑点颜色相同.2号显色剂显色后的斑点稳定且颜色不同,所以选择浓硫酸-甲醇(体积比为 1:1)为显色剂.

表 2 不同显色剂的显色情况

序号	方法	显色时间	显色情况
1	碘熏蒸	15 min	所有斑点均为黄色、棕黄色.随着时间的增加,斑点范围扩大,颜色转为棕红色,逐渐产生拖尾现象.样品的斑点大部分为有色亮斑.若样品的色素含量高,展开剂展开后则出现一条色带,碘熏蒸后该色带呈黄色,不能得到单独的色斑.
2	浓硫酸-甲醇法 (体积比为 1:1)	15 min	有银灰色、青色、淡紫色、紫色斑点生成,随着时间增加少部分斑点将扩大.
3	荧光显色	即刻	标样在紫外光下观察不可见,样品可见部分斑点

2.1.4 薄层层析法 R_f 值的重现性 以硅胶作吸附剂,环己烷-氯仿-异丙醇为展开剂,浓硫酸-甲醇作为显色剂,对标准物质展开,计算其 R_f 值(见表 3).可见 R_f 值的重现性较好.

表 3 薄层层析 R_f 值的重现性

次数	R_f 值		次数	R_f 值	
	Mevinolinic acid的	Monacolin K的		Mevinolinic acid的	Monacolin K的
1	0.397	0.475	4	0.390	0.486
2	0.408	0.484	5	0.388	0.465
3	0.401	0.495	6	0.386	0.486

注:测 R_f 值时,使用同一批薄层,薄层厚度相同,展开剂液面恒定,温度变化尽量小.

2.2 薄层层析法初筛目的菌种

用以上建立的薄层分析法对实验室保藏的 40株红曲霉初筛.以 Monacolin K的两种存在方式做对照,对发酵物提取液检测.检测出 8株可能具有产生目的活性物质能力的红曲霉,其余菌株在同一薄层板上相同或相近 R_f 值处未出现与标样相同的斑点,可初步判断这些菌株不具有产生 Monacolin K生理活性物质的能力.阳性菌株的薄层检测结果见表 4,这些样品有的与两种标样都对应,有的只与一种标样对应.

表 4 阳性菌株的薄层检测结果

R_f 值	菌 株							
	<i>M. H</i>	<i>M. A</i>	<i>M. B</i>	<i>M. C</i>	<i>M. D</i>	<i>M. E</i>	<i>M. F</i>	<i>M. G</i>
R_{f1}	0.355	0.306	0.310	0.207	0.543	0.414	0.523	0.490
R_{f2}	0.436	0.377	0.579	0.283	0.723	0.542	0.652	0.708
R_{f3}	0.616	0.461	0.611	0.424	0.795	0.697	0.721	0.755
R_{f4}	0.663	0.552	0.677	0.516	0.879	0.733	0.792	0.817
R_{f5}	0.673	0.623	0.875	0.542	-	0.789	0.875	0.873
R_{f6}	0.700	0.649	-	0.641	-	0.875	-	-
R_{f7}	0.737	0.677	-	0.781	-	-	-	-
R_{f8}	0.768	0.704	-	0.881	-	-	-	-
$R_{f\text{标样}1}$	0.370	0.374	0.452	0.424	0.452	0.424	0.424	0.373
$R_{f\text{标样}2}$	0.446	0.557	0.558	0.516	0.558	0.516	0.516	0.500

注:标样 1为 Mevinolinoic acid,标样 2为 Monacolin K.

2.3 高压液相色谱法确定目的菌株

以标准物质做对照,对阳性菌株的提取液进行高压液相色谱分析.*M. A*,*M. B*,*M. C*,*M. E*和 *M. H*样品在与标样相同的保留时间处未有洗脱峰出现,可确定这 5株菌株不具有产生目的活性物质的能力.*M. D*,*M. F*和 *M. G*样品在与标样相同的保留时间处有吸收峰出现.可确定这 3个菌株具有产生目的活性物质的能力.*M. D*和 *M. F*的发酵提取液中含有目的物质的两种不同形式,而 *M. G*的发酵提取液中只含有目的物质的酸型形式.标样和 *M. D*发酵提取液的高压液相色谱图如图 1和图 2所示.

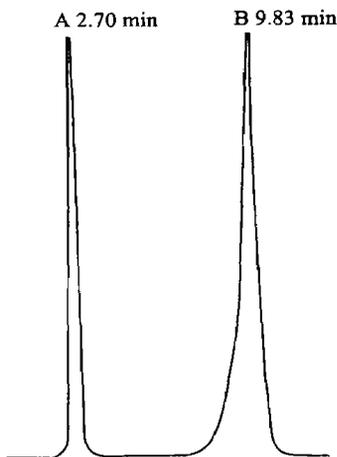


图 1 标样高压液相色谱图

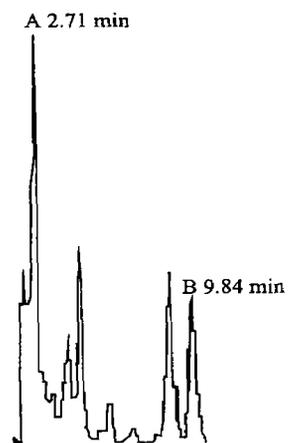


图 2 *M. D* 发酵提取液高压液相色谱图

峰: A为 Mevinolinoic acid B为 Monacolin K;色谱柱: Spherisorb ODS 100 \times 4.6 mm;流动相: 甲醇-18 mmol/L磷酸溶液(体积比为 77.5:22.5);流速: 0.5 mL/min;紫外检测波长: 237 nm.

目的菌株生理活性物质的产量如表 5 所示。可见, 3 个菌株的酸型形式含量均较高, *M. D* 菌株的内酯型形式含量较高。

表 5 生理活性物质的产量

菌株	产量 / (t ² g/g)	
	Mevinolinic acid	Monacolin K
<i>M. D</i>	194.70	111.23
<i>M. F</i>	162.04	20.58
<i>M. G</i>	109.41	—

3 讨 论

Monacolin K 的结构与胆固醇合成的关键中间体——羟甲基戊酸相似, 可抑制 HMG-CoA 还原酶的活性, 减少胆固醇的合成。目前, Monacolin K (又名 Lovastatin) 已作为药品投放市场, 服药 4~8 周后, 可使低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇降低 30% [7]。降胆固醇红曲霉作为红曲中的主要菌种, 可使红曲富含降胆固醇成分。此外, 红曲还含有丰富的碳水化合物及一些人体所需的维生素。因此将降胆固醇红曲霉生产的红曲经过适当的加工处理后, 既可预防和治疗高胆固醇血症, 又可补充人体必需的营养物质。它作为天然保健食品具有较好的开发前景。

参考文献:

- [1] ENDO A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. *J Antibiotics*, 1979, 32(8): 852~ 854
- [2] ENDO A, HASUMI K, NEGISHI S. Monacolin J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber* [J]. *J Antibiotics*, 1985, 38(3): 420~ 422
- [3] ENDO A, HASUMI K, NAKAMURA T, et al. Dihydrimonacolin L and Monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis [J]. *J Antibiotics*, 1985, 38(3): 321~ 327
- [4] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工业学院等. 工业发酵分析 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1994. 224~ 241
- [5] 陈耀祖. 有机分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1981. 51~ 65
- [6] ROMAN KYSILKA. Determination of Lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids [J]. *J Chromatography*, 1993, 630: 415~ 417
- [7] 徐义枢. 国产洛伐他汀治疗高胆固醇血症 [J]. *中国新药杂志*, 1997, 6(1): 428~ 430

Screening *Monascus* for the Production of Monacolin K

MA Mei-rong¹, FAN You¹, FANG Jing¹, ZHUGE Jian¹, ZHOU Li-ping²

(1. School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036; 2 Zhejiang University of Industry, Zhejiang Hangzhou 310014)

Abstract 40 strains of *Monascus* for the production of Monacolin K were studied and were cultivated in solid fermentation on selected substrates. Samples of the fermented rice were examined by TLC for the first screening, 8 strains were possible to produce Monacolin K. The positive results were further evaluated by HPLC analysis, 3 strains were proved to have moderate ability to produce Monacolin K.

Key words *Monascus*; Monacolin K; TLC; HPLC