

文章编号 :1009-038X(2000)01-0058-04

部分红曲霉菌株产桔霉素的研究^{*}

许赣荣, 卢 晨, 穆晓青, 陈记亮, 陈 蕴,
吴燕萍, 顾玉梅, 吴苗叶, 沈 飞
(无锡轻工大学生物工程学院 江苏无锡 214036)

摘 要 对全国各地收集到的数十个红曲米样品中的桔霉素进行了定性及定量测定,测定结果表明,除少数几个红曲米样品中未测出桔霉素外,其它红曲米样品都测出桔霉素,红曲红产品中也发现含有桔霉素.用酵母膏蔗糖培养基(能检测霉菌是否产生真菌毒素)培养了近 40 株红曲霉,从菌落形态特征看,大多数是 *Monascus anka*,定性检测结果表明,大多数菌株的培养液中都检测出桔霉素,说明这些红曲菌种本身具有产生桔霉素的能力.初步总结了定性和定量测定高色价红曲米中桔霉素的方法.

关键词 红曲霉菌 桔霉菌 红曲米 红曲红 高效液相色谱 板层析

中图分类号:TS29.3 **文献标识码**: A

Investigation of Citrinin Production by Some *Monascus Spp*

XU Gan-rong, LU Chen, MU Xiao-qing, CHEN Ji-liang, CHEN Yun,
WU Yan-ping, GU Yu-mei, WU Mio-ye, SHEN Fei
(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: Citrinin contents of red rice samples which were collected from various manufacturers and markets had been detected. The determination results obtained by employing TLC and HPLC methods indicated that most of the red rice samples detected contain citrinin ranged 0.2~140 $\mu\text{g/g}$. Some products of *Monascus Red* (the extracts of *Monascus* products) also contain citrinin. Some isolated *Monascus* strains (most are *Monascus anka* according to their colony appearance) were cultivated in YES medium. The supernatants of these *Monascus* culture were found to contain citrinin by TCL method, indicating the *Monascus* strains tested are potential citrinin producers. In this paper, we also summarize the methods of TLC and HPLC determination of citrinin for high color value red rice samples.

Key words: *Monascus spp*; citrinin; red rice; *Monascus red*; HPLC; TLC

1995 年,法国 BLANC 教授证实某些红曲菌株产生毒性物质桔霉素.据 Durackva 等的研究^[2],根

据其 LC_{50} 值的大小,认为桔霉素的毒性与黄曲霉毒素 B_1 的毒性处于同一水平(LC_{50} 位于 $10 \mu\text{g/mL}$ ~

* 收稿日期:1999-05-10;修订日期:1999-11-08.

作者简介:许赣荣(1957 年 1 月生),男,江西南康人,工学硕士,副教授.

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间)。

桔霉素在大白鼠和小鼠皮下注射和腹腔内注射的 LD_{50} 分别为 67 mg/kg 和 35 mg/kg 其毒性属中等偏剧毒性^[3], 桔霉素作用的靶器官是肾脏, 如在猪饲料中每天按 200 mg/kg 的用量加入桔霉素, 在 1~2 个月内会出现肾病。桔霉素毒性虽然不如黄曲霉毒素 B_2 , 但在国外, 仍将其作为食品污染的严格控制指标。最新研究结果表明, 桔霉素还对基因有毒性效应。关于桔霉素的毒性及法国科学家对红曲桔霉素的测定结果, 可参考有关文献^[2,4]。我国红曲米及红曲红国家标准^[5]中, 还未建立检测方法^[4]及控制指标^[4]。

红曲是我国传统发酵产品, 虽然我国的毒理学实验已证明了红曲产品的食用安全性^[2], 但那时并没有考虑桔霉素这一问题。近年来, 红曲生产及应用行业都在密切关注两个问题: 我国红曲产品中是否含有桔霉素? 我国红曲生产普遍使用的生产菌种(大多为安卡红曲霉)是否产生桔霉素?

值得注意的是, 我国红曲产品出口开始受到国际市场上的压力。据悉, 红曲产品已受到日本卫生部门的严格检验, 认定为不含桔霉素才允许生产和出口。而德国也明确提出今后若从中国进口红曲, 必须有安全生产菌种及产品不含桔霉素的证明。这说明, 桔霉素问题可能影响到红曲的应用及红曲产品的出口。因此, 开展这方面的研究很有必要。

桔霉素的定性及定量测定方法可参考文献^[6]和^[7]。但不同科学家所采用的方法各不相同, 有的不经预处理而直接用 HPLC 测定, 有的采用 TLC 或柱层析初步分离后, 再用高效液相色谱定量(有紫外检测和荧光检测)。德国人采用了酶免疫法检测桔霉素, 对食品中桔霉素的最低检测质量分数甚至可达到 2 ng/kg ^[8]。这是目前最为灵敏的方法, 但此法需要专用的抗体, 我国无法生产, 且测定费用昂贵。作者较早开展了红曲桔霉素课题的研究。初步建立了红曲样品中桔霉素的测定方法, 并开展了无桔霉素红曲菌种筛选的研究。从 1998 年开始, 受有关部门的委托, 对国内部分红曲米中的桔霉素进行了定性及定量分析测定。针对我国固态红曲产品高色价的特点, 建立了一套行之有效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

红曲样品 中国各地收集的红曲米及红曲红。

红曲霉菌种: 筛自各地市售红曲米、送检红曲米样品, 本校菌种保藏中心。根据有关资料^[9]及对

麦汁培养基上菌落的初步观察, 发现大多数菌种是安卡红曲(*Monascus abka*)安卡菌种的变种或突变株。

主要试剂: 乙腈, 乙酸乙酯, 甲醇, 异辛烷, 甲酸分析纯或色谱纯; 桔霉素(Citrinin)标准品 购自 Sigma 公司。

1.2 桔霉素测定

1.2.1 定性测定

1) 液态培养红曲萃取液桔霉素定性测定 红曲培养液中, 调 pH 值至 4.5, 加入适量乙酸乙酯, 60 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 研磨后离心或抽滤, 上清液中再加入适量乙酸乙酯或三氯甲烷萃取, 待分层后, 取上层乙酸乙酯相或下层三氯甲烷相, 水浴加热将其大部分溶剂蒸发掉, 再用甲醇溶解, 点板(同时点标准样), 展开后, 在紫外分析仪下(365 nm)用肉眼观察。

2) 固态红曲米或红曲桔霉素定性测定 称取一定量红曲米粉或红曲红, 用乙腈或甲醇直接萃取, 离心, 取上清液, 浓缩, 点板, 展开后, 在紫外分析仪下用肉眼观察。

1.2.2 桔霉素的定量测定

1) 预处理富集 红曲米研成粉末, 加入乙腈萃取, 超声波处理, 离心, 收集上清液; 残渣再用乙腈或甲醇萃取并离心两次。上清液合并, 水浴 80 $^{\circ}\text{C}$ 蒸发浓缩, 最后用甲醇溶解定容, 此为含桔霉素的浓缩液。另一种预处理方法基本相同, 但采用冻干机真空浓缩干燥。但由于甲醇在 -50 $^{\circ}\text{C}$ 并不能形成冰晶, 故实际上仍是在低温下真空抽干, 而非升华作用所致。

2) 板层层析初步分离 展开剂: 采用 ZKJ-4 薄板: 15 cm $\times$ 18 cm, 自制。经比较, 采用青岛海洋化工集团生产的薄层层析硅胶效果较好; 点样: 将上述浓缩样品点于板上, 在同一块板上点标准桔霉素, 以确定试样中的桔霉素的位置。展开后, 对照标准桔霉素的上行位置, 将样品中同一高度上的硅胶用小刀铲下。用甲醇溶解含桔霉素的硅胶, 至硅胶洗至发白为止。滤液合并, 水浴蒸发浓缩, 最后用流动相定容, 此样品用于 HPLC 测定。

3) 高效液相色谱定量测定: 流动相: $V_{\text{纯水}} : V_{\text{甲醇}} = 45:55$; 用磷酸调 pH 值为 2.5; 高压液相色谱仪: HP100 或 Waters; 紫外检测: 波长 254 nm; 色谱柱: 5 μm ; 流速: 0.8~1.0 mL/min ; 温度: 28 $^{\circ}\text{C}$; 样品上柱量 50 μL 。

1.3 色价的测定

红曲米色价测定按照国家红曲米标准中的方法^[5], 采用日立(U-3000)扫描式分光光度计测定;

$R = OD_{505}/OD_{410}$.

1.4 红曲霉菌的酵母膏蔗糖 (YES) 培养基液态培养

斜面培养基 麦汁培养基 6 g/dL,琼脂 2 g/dL ;
YES 液态培养基 根据文献[9] 配制. 可确定红曲霉菌是否产桔霉素. 培养时间 5 d 左右,培养温度 30 ℃ .

2 结果与讨论

2.1 红曲米或红曲红桔霉素定量测定结果

红曲浓缩液在硅胶板上点样展开后,桔霉素上行, R_f 值约在 0.65~0.7.

数十个红曲样品的定量测试结果见表 1. 仅有少数几个样品在板层析时未发现桔霉素,其它样品从板层析上就可断定含有桔霉素,但桔霉素质量分数相差非常悬殊,有的仅为 0.2 mg/kg 左右. 桔霉素的含量与红曲霉菌种有关,与培养工艺条件有关,还与培养时间长短有关. 此次分析仅涉及到产品中桔霉素定量分析.

2.2 部分红曲菌株产桔霉素特性的进一步验证

为进一步证实作者所收集的红曲菌种是否产桔霉素,对 40 株红曲霉菌种实验室的保藏菌种、外单位索取的菌株及在各地红曲米样品中筛选到的红曲菌株用 YES 培养基培养,定性检测了其培养液中的桔霉素,板层析分析结果表明,所有的红曲霉菌种培养液中都含有桔霉素. 值得一提的是 *Monascus pilosus* 菌株,日本某公司认为用该菌株所生产的红曲米不含桔霉素,但作者的测定结果表明,该菌株也产生桔霉素,但含量很低,其色价也非常低. 最近德国科学家证实,该公司用这种菌种生产的红曲米含桔霉素为 50 ng/kg 左右. 因此,作者认为,红曲霉菌产桔霉素是普遍性的问题,桔霉素是红曲霉菌固有的次级代谢产物,这是菌种本身特性(基因)所决定的.

3 讨 论

3.1 关于固态红曲产品桔霉素的测定方法

国外测定桔霉素原本是分析某些食品或饲料中被微生物污染后所产生的桔霉素,对于采用液态发酵培养的红曲,其测定桔霉素方法与作者所采用的有很大的不同. 我国的红曲产品主要是固态发酵法生产的高色价红曲米. 对于高色价红曲米中的桔霉素的测定,难度很大,主要问题是桔霉素的含量相对很低,而色素丰富,不经过预处理(桔霉素的富

表 1 我国部分红曲产品桔霉素的定量数据

Tab.1 Color values and citrinin contents of some red rice sample

样品编号	测定批号	色价		桔霉素质量分数/	
		OD ₅₀₅	OD ₄₁₀	R 值	(mg/kg)
ZH1	99-1-29-1	2 645	2 531	1.05	38.5
ZH2	99-1-29-2	1 816	1 603	1.13	5.8
ZH3	99-1-25-3	1 838	1 750	1.05	2.7
ZH4	99-1-29-4	1 253	1 032	1.24	62.5
ZH5	99-1-29-5	5 000	6 125	0.82	102.7
ZH6	99-1-25-6	4 408	5 025	0.88	40.0
ZH7	99-1-29-6	3 185	4 013	0.79	98.2
ZH8	99-2-25-8	1 605	1 660	0.97	6.0 *
ZH11	99-1-29-11	1 775	1 888	1.03	5.1
ZH12	99-1-29-12	1 582	1 473	1.07	39.0
ZH13	99-1-29-13	675	678	1.00	1.5
ZH14	99-2-25-14	1 313	1 325	0.99	32.3
ZH15	99-2-25-15	580	488	1.19	22.0
ZH16	99-2-25-16	995	1 010	0.99	27.1 *
ZH17	99-2-25-17	1 128	1 290	0.87	16.3 *
ZH18	S-99-3-6-18	440	438	1.00	8.7 *
ZH19	S-99-3-6-19	510	498	1.03	0.2 *
ZH20	S-99-3-6-20	533	513	1.04	4.2 *
ZH21	S-99-3-6-21	485	495	0.98	3.3 *
ZH22	S-99-3-6-22	575	550	1.04	0.7 *
ZH24	S-99-3-6-24	200	125	1.6	0.7 *
ZH25	S-99-3-6-25	725	645	1.13	0.4 *
ZK0					0 ◎
ZK1	99-1-25-1				4.2
ZK2	99-1-25-2				4.6
ZK12	99-1-17-12				88
ZK13	99-1-18-13				117
ZK14	99-1-18-14				139
ZK15	99-1-29-15				(红曲红)359.6
ZK16	99-1-29-16				(红曲红)89.6
JH2(WZ)	99-2-25-3-2				8.2 *
BJ1	99-2-25-4				61.8
SDMM1	99-1-25-8				27.3

注 :1) * 表示采用测试中心 Waters 2690 Separation Module, Waters 996 Photodide Array 测定. 其余都用 HP 1100 检测.

2) ◎表示板层析结果未发现桔霉素.

集和板层析的初步分离),简单地采用 HPLC 测定几乎不可能. 作者的测定过程分为 3 个阶段:1)样品预处理,以富集桔霉素,得到含桔霉素浓缩液(同时也富含色素) 2)用板层析初步分离 3)用 HPLC 分离及定量测定桔霉素. 作者在预处理富集时,当外加标准桔霉素后,无论是采用水浴蒸发溶剂或冻干法蒸发溶剂,都发现桔霉素有一定的损失率,回收率难于达到较高的水平;而在 TLC 和 HPLC 过程中,桔霉素的员失率较小. 冻干法及水浴法蒸干溶剂总的损失率较高的主要原因可能是红曲米的预处理过程中,桔霉素与红曲中的某些成分发生反应而损失. 在板层析过程中,也有部分损失.

对于高色价的红曲,由于色素含量高,相对于色素而言,桔霉素含量很低,故选用合适的展开剂是非常重要的.对 6 种展开剂进行了比较,根据色素的分离程度及桔霉素在层析板上与其它色素的相对位置,选定了 ZKJ-4 这种展开剂,经展开后,桔霉素能与大部分色素(橙红、深黄、淡黄、紫红、红)分离开来.

采用 Waters 工作站软件处理数据及图形后,红曲中桔霉素质量分数最低可测至 0.2 mg/kg ;低于此数,则只能看到很小的峰,但无法显示数据.而采用 HP1100 测试,由于没有装配工作站,桔霉素最低检测质量分数仅达到 1 mg/kg .

采用 YES 培养基培养红曲,板层析定性测桔霉素,可用于快速鉴别红曲菌种是否产桔霉素.

3.2 关于红曲霉菌株产桔霉素的潜在能力

红曲霉分属于 3 个种:*Mianscus ruber*、*Monascus purpureus* 和 *Monascus pilosus*^[10].前两种的部分菌株均发现产桔霉素,作者经过实验,发现 *Monascus pilosus* 也产微量桔霉素,但这一菌种产色

素能力很差,在土豆培养基上菌落色调为桃红色.在米培养基上,虽有少量色素产生,但色价很低.红曲霉菌种一部分是用于色素生产的,一般来说,色素产量高者,在 YES 培养液中都测出桔霉素.桔霉素的产生与色素的产生有某种关联性,这可能是红曲色素的生成代谢途径与桔霉素的生成代谢途径在某一阶段是相同的.

从上述测定结果可以看出,作者所收集的大部分红曲米样品都含有桔霉素,安卡红曲霉菌种本身具有合成桔霉素的能力是产桔霉素的内在原因.从红曲霉较新分类体系来看,安卡红曲属紫色红曲霉,我们的研究结果与法国 BALNC 教授的研究结果相同^[9].

致谢 本课题得到上海华东理工大学生物反应器国家重点实验室及无锡轻工大学生物工程学院的资助或支持,对桔霉素测定工作提供帮助的还有无锡轻工大学分析测试中心的戴军、陶冠军,中国食品发酵工业研究所提供了部分红曲米样品,作者在此表示衷心的感谢.

参考文献

[1] BLANC P J, LAUSSAC J P,BARS J, et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin[J]. **International Journal of Food Microbiology**,1995. 27 201~213

[2] VLADIMIR BETINA,CITRININ. Mycotoxin-Chemical[A]. Edited by Vladimir Betina. Biological and Environmental Aspects [C]. Elsevier :Amsterdam,1989.

[3] 中国食品添加剂生产应用工业协会,食品添加剂手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.

[4] 许赣荣. 浅谈红曲霉菌桔霉素[J]. **酿酒科技**,1999(3) 20~22

[5] GB 4926—85,食品添加剂红曲米国家标准[S].

[6] WOOD G M, MANN P J. Detection of selected mycotoxins in foods by fluorescence, *Fluorescence Analysis in Foods*[M]. New York :Longman Scientific & Technical ,1989.

[7] FRANCO C M,FENTE C A, VAZQUEZ B, et al. Simple and sensitive highperformance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin,Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts [J]. **J of Chromatography**,1996,723 69~75

[8] DIETRICH R, USLEBE E,MARTLBUER E. Nachweis des nephrotoxischen Mykotoxins Citrinin in Lebensmittein und mit *Monascus* spp, hergestellten Lebensmittelfarbstoffen[J]. **Archiv fur Lebensmittelhygiene** ,1999,50 :17~27

[9] HAWKSWORTH D L, PITTJ I. A new taxonomy for *Monascus* species based on the cultural and microscopical characters[J]. **Aust J Bot**,1983,31 51~61

(责任编辑 朱明)