

文章编号:2095-6002(2013)02-0031-06

引用格式:王婧,王昌禄,陈勉华,等. 红曲霉 M1 发酵糙米代谢产物抗 S180 细胞增殖效应研究. 食品科学技术学报,2013,31(2):31-36.

WANG Jing, WANG Chang-lu, CHEN Mian-hua, et al. Studies on Metabolites of *Monascus* M1 Fermented Brown Rice and Anti-proliferation Effect on S180 Ascitic Tumor Cell. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(2):31-36.

红曲霉 M1 发酵糙米代谢产物抗 S180 细胞增殖效应研究

王婧, 王昌禄*, 陈勉华, 杨华, 李素珍, 王玉荣, 李贞景
(天津科技大学 食品工程与生物技术学院/食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要:以红曲霉 M1 分别发酵大米和糙米,比较其代谢产物的变化;采用 MTT 比色法,初步研究了 Monacolin K 标准品、红曲糙米及红曲大米乙醇提取物对 S180 小鼠腹水瘤细胞的抑制作用. 结果表明:在 MBR 乙醇提取物中,可检测到 MK 的酸式构型, MK 含量约为 MR 乙醇提取物的 1.3 倍. 经红曲霉 M1 发酵后, MBR 中 γ -氨基丁酸(GABA)质量浓度达到 2.98 mg/g,是 MR 乙醇提取物的 3.1 倍. MBR 中桔霉素质量浓度低于 MR. MK 标准品、MBR 及 MR 乙醇提取物均对 S180 小鼠腹水瘤细胞具有一定的抑制作用. MK 质量浓度在 3~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,三者抑制 S180 小鼠腹水瘤细胞增殖效应随 MK 质量浓度的增大而增大. 在 MK 含量相同的条件下,MR 和 MBR 乙醇提取物的抑制效果显著大于 MK 标准品($P < 0.01$).

关键词:红曲霉;糙米;大米;S180 小鼠腹水瘤细胞

中图分类号:TS205.5

文献标志码:A

红曲既是中药材又是食品,在我国和东南亚一些国家应用已有上千年的历史^[1]. 红曲霉发酵产品中含有多种功能活性物质,具有降血脂、抑菌防腐、抗癌等功效,备受关注. 红曲色素主要由红、橙、黄三类色素组成,红色素及橙色素具有抑菌和防腐的功效,黄色素有细胞毒活性,可促进癌细胞的凋亡^[2]. Monacolin 类物质对高血脂有控制作用,其中主要功效来源于 Monacolin K(MK),主要通过抑制胆固醇生物合成途径中关键酶——羟甲戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶的作用而起到降血脂的作用^[3]. 红曲中 γ -氨基丁酸(GABA)是降血压的有效成分,也有抗氧化及降血糖的作用^[4]. 红曲中桔霉素是一种真菌毒素,可引起肾脏肿大,尿量增多,肾小管扩张和上皮细胞变性坏死等症状,因此,如何有

效控制桔霉素产生,降低其在食物中的含量,已成为食品健康发展的关键^[5].

发酵基质对红曲霉代谢产物组成及活性有显著影响:红曲霉发酵薏仁显现出更强的抗氧化活性^[6];红曲山药比红曲米表现出更强的降压效果和血管紧张素转换酶(ACE)抑制活性,并且可产生更多的 GABA 和具有抗炎作用的色素组分^[7];红曲霉发酵的当归具有良好的减肥效果^[8].

糙米具有大米所没有的谷粒皮层和胚,含有多种保健功能成分,且皮层中较多的纤维类物质可减少粪便中诱导有机体突变物与肠道上皮细胞的相互作用,从而降低癌症风险^[9-10].

目前,市场中功能性红曲米的发酵基质多为大米,不利于红曲功能性产品的多样性开发. 本实验

收稿日期:2012-12-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171729).

作者简介:王婧,女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术;

*王昌禄,男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究. 通讯作者.

用红曲霉 M1 分别发酵大米(MR)和糙米(MBR),对其主要代谢产物含量进行对比,并通过 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二甲苯基四氮唑溴盐)比色实验,以 MK 标准品为参比,对 MBR、MR 乙醇提取物抗 S180 小鼠腹水瘤细胞增殖效应进行初步研究,分析了功能性红曲对肿瘤细胞的抑制作用,对红曲霉发酵产物中 MK 是否为唯一抑癌因子进行了探讨,为开发特征活性红曲功能性产品提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糙米、大米均为市售;红曲霉 M1 为天津科技大学食品生物技术实验室保藏;乙腈、甲醇(色谱纯),德国 CNW 公司;桔霉素标准品(纯度 $\geq 99\%$),MK 标准品(纯度 $\geq 98\%$),GABA 标准品(纯度 $\geq 99\%$),MTT,均为美国 sigma 公司;MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二甲苯基四氮唑溴盐),美国 sigma 公司;DMSO,北京鼎国昌盛生物技术公司。

1.2 主要设备

8453 型紫外可见分光光度计,美国安捷伦科技有限公司;1200s 型高效液相色谱仪(配有紫外检测器、荧光检测器和 B.04.03.SP1 87 色谱工作站),美国安捷伦科技有限公司;Model 1680 型酶标仪,美国 BIO-RAD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基

斜面培养基(麦芽汁培养基):将一定量的大麦芽粉碎,加 4 倍于麦芽量的自来水,于 55~60℃保温糖化 3~4 h,经 6~8 层纱布过滤除去残渣,煮沸、过滤,加水稀释至糖度为 10~12°Brix,用时添加质量分数为 2% 的琼脂,121℃灭菌 20 min。

种子液培养基(g/L):葡萄糖 60 g,蛋白胨 20 g,NaNO₃ 10 g,MgSO₄·7H₂O 5 g,KH₂PO₄ 10 g,自来水 1 000 mL,121℃灭菌 20 min。

固体发酵培养基:将糙米和大米分别与自来水以 1(g):1(mL)的比例浸泡过夜,分装入 250 mL 三角瓶中,每瓶 20 g 原料,自来水 20 mL,121℃灭菌 20 min。

1.3.2 红曲霉固态发酵条件

将菌种接种于斜面培养基,30℃培养 6~8 d,制成孢子浓度为 2×10^6 个/mL 的孢子悬浮液,以每

瓶 5 mL 接种于固体发酵培养基中,30℃培养 4 d,置于温度 27℃,湿度 75% 时培养,35 d 后取出。

1.3.3 红曲色素色价测定方法

将发酵样品于 40℃烘干至恒重,粉碎,过 40 目筛,根据国标 GB4926—1985^[11]方法测定其色价。

1.3.4 桔霉素测定方法

1.3.4.1 标准曲线绘制

将质量浓度为 500 μg/mL 的桔霉素乙腈标准溶液配制成质量浓度为 0, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 μg/mL 的标准溶液系列。

1.3.4.2 样品处理^[12]

将发酵样品于 40℃烘干至恒重,粉碎,过 100 目筛。准确称取 0.500 0 g 样品,置于 20 mL 离心管中,加入 8 mL 体积分数 75% 的乙醇,超声 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次,合并上清液,定容至 25 mL,静置 30 min,经 0.45 μm 滤膜过滤后待测。

1.3.4.3 色谱条件

色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相 V(乙腈):V(甲醇):V(水) = 70:10:20(用磷酸调 pH 值为 2.66~2.68)。检测器 荧光检测器。检测波长 $\lambda_{\text{ex}} = 331 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ 。柱温 25℃。流速:1 mL/min。进样量 20 μL。

1.3.5 MK 测定方法

1.3.5.1 标准曲线绘制

将质量浓度为 500 μg/mL 的 MK 乙腈标准溶液配制成质量浓度为 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μg/mL 的标准溶液系列。

1.3.5.2 样品处理

同 1.3.4.2。

1.3.5.3 色谱条件

色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 V(乙腈):V(水) = 6:4;检测器 紫外检测器;检测波长 $\lambda = 237 \text{ nm}$;柱温 25℃;流速 1 mL/min;进样量 20 μL。

1.3.6 GABA 测定方法

1.3.6.1 标准曲线绘制

将质量浓度为 500 μg/mL 的 GABA 标准水溶液配制成质量浓度为 0, 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL 的标准溶液系列。

1.3.6.2 样品处理

将发酵样品于 40℃烘干至恒重,粉碎,过 100 目筛。准确称取 0.500 0 g 样品,加入 4 mL 质量分数

为4%的TCA溶液,30℃水浴2h转至离心管中,10 000 r/min离心10 min,用TCA定容至5 mL。吸取200 μL样品溶液,200 μL衍生剂(OPA 80 mg,β-巯基乙醇80 μL,甲醇10 mL)和1 mL硼酸缓冲液(0.4 mmol/mL,pH 10.4),振荡5 min,经0.45 μm滤膜过滤后立刻检测。

1.3.6.3 色谱条件

色谱柱 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 V(NaCOOH·3H₂O(质量分数为1.6%)):V(甲醇):V(乙腈)=3:1:1,pH 7.2;检测器 紫外检测器;检测波长 λ=338 nm;柱温 40℃;流速 1 mL/min;进样量 20 μL。

1.3.7 MTT法体外抑制S180小鼠腹水瘤细胞增殖实验

1.3.7.1 样品制备

分别称取10.0 g MBR、MR,放入50 mL离心管中,加入16 mL 75%乙醇,超声处理30 min,3 000 r/min离心10 min,重复3次,合并上清液,35℃烘干。

为保证细胞实验中 MBR、MR 乙醇提取物中 MK 含量一致,检测提取物中 MK 含量,通过计算,分别称取一定量的 MBR、MR 乙醇提取物,备用。

1.3.7.2 红曲霉 M1 发酵糙米和大米提取物体外抑制 S180 增殖实验

从小鼠体内抽取生长状态较好的 S180 小鼠腹水瘤细胞,先后用红细胞裂解液和培养基清洗干净,配成 1×10^5 个/mL 细胞悬液,加至 96 孔培养板中,每孔 100 μL。设置实验组和对对照组,实验组分别加入不同浓度的 MK 标准品、MR 和 MBR 乙醇提取物(终质量浓度分别为 50, 25, 12, 6, 3 μg/mL),每组 4 个平行,对照组加培养基(DMSO 的质量分数均控制在 0.1% 以下)。分别培养 24, 48, 72 h,实验终止前 4 h 加入 50 μL MTT(5 mg/mL)溶液,继续培养 4 h,离心,弃去上清液,每孔加 100 μL DMSO,490 nm 处测定吸光值,计算抑制率。

细胞抑制率计算公式:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{空白平均值} - \text{样品平均值}}{\text{空白平均值}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 红曲活性物质的检测结果

发酵样品中桔霉素、GABA 和 MK 的液相色谱分析结果见图 1(a)、(b)、(c)。

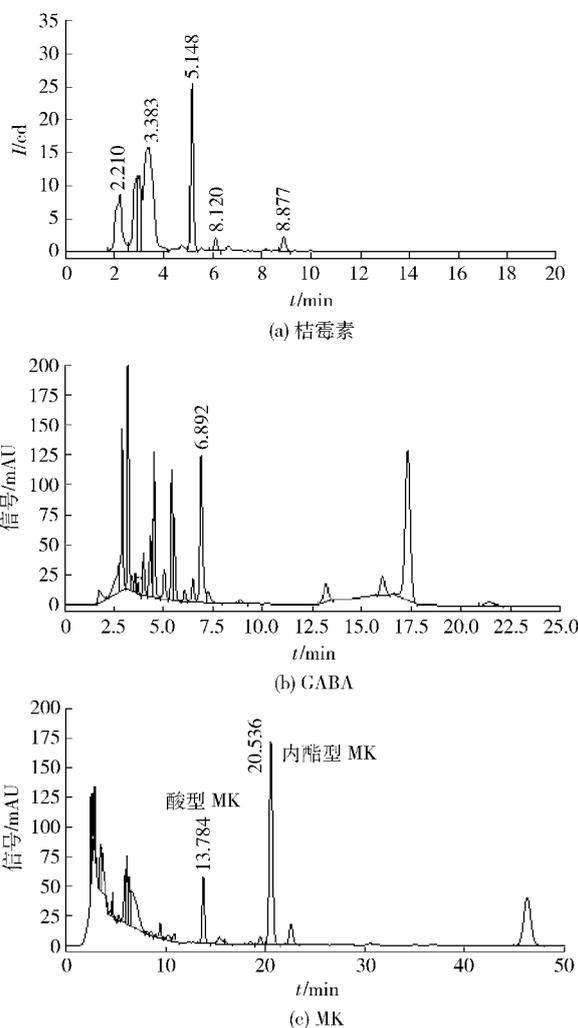


图1 样品中桔霉素、GABA、MK 的高效液相色谱

Fig.1 HPLC of citrinin、GABA、MK in samples

由图 1(a)、(b)、(c) 及标准品保留时间可以得出,样品中各物质的保留时间分别为:桔霉素 5.148 min;GABA 6.892 min;酸型 MK 13.784 min,内酯型 MK 20.536 min。

2.2 不同发酵基质对红曲发酵产物中活性物质的影响

分别以糙米、大米为发酵基质,红曲霉 M1 代谢产物 MK、桔霉素、GABA 产量及色价对比见图 2 和图 3。

由图 2 和图 3 可知,不同发酵基质对红曲霉 M1 固体发酵产物中活性物质的组成及含量均有很大影响。MBR 乙醇提取物中 MK 总质量分数为 292.34 μg/g,是 MR 乙醇提取物的 1.3 倍。在未发酵糙米中,GABA 质量分数为 115.01 μg/g,经红曲霉 M1 发酵后达到 2.98 mg/g,提高了约 25 倍。经红曲霉 M1 发酵的 MBR,产桔霉素和色素能力均低于 MR,分别

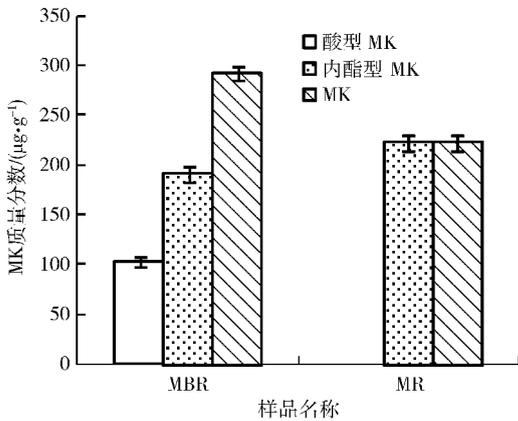


图2 MBR、MR中MK含量对比

Fig. 2 Contrast of MK content between MBR and MR

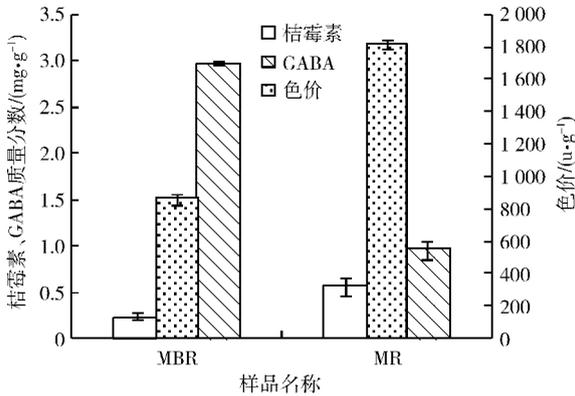


图3 MBR、MR中桔霉素、GABA含量及色价对比

Fig. 3 Contrast of citrinin, GABA and color value between MBR and MR

为MR的44%和47%。

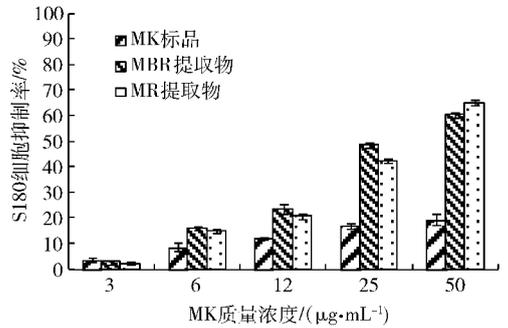
在红曲霉M1发酵产物中, MK主要以开环式酸型、闭环式内酯型以及闭环结构脱水后的酯化型三种形态存在。在人体中, 内酯型MK必须经肝脏转化为酸型结构才能发挥降低血脂的效果, 酯化型MK因与酶结合的部位没有—OH基团而不具有抑制活性。因此, 酸式构型为红曲调脂药物的活性形式, 它无需体内的羟基酯酶参与水解也可直接发挥作用, 从而减少了人体对肝、肾的负担^[13]。由于酯化型MK为无功效结构, 因此, 在本实验中, 仅对MK的酸式构型及内酯构型进行检测。由图2可以看出, 在MBR乙醇提取物中酸型及内酯型MK均可检测到, 而MR乙醇提取物中未检测到酸型MK。因此, 以糙米作为发酵基质更具优势。

在糙米和大米中, 维生素、矿物质元素、蛋白质等营养物质种类和含量各不相同, 支链淀粉及纤维含量的差别影响着发酵过程中培养基的溶氧量和持

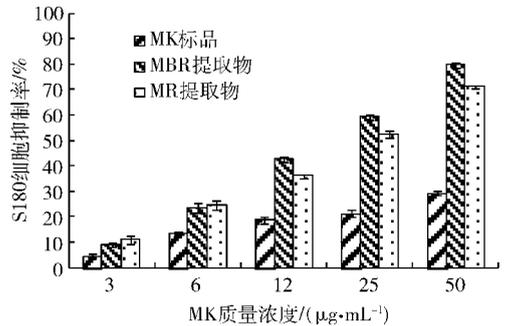
水性, 会对红曲霉生长及代谢造成一定的影响, 从而引起代谢产物的变化。

2.3 MBR和MR乙醇提取物对S180小鼠腹水瘤细胞的体外抑制作用

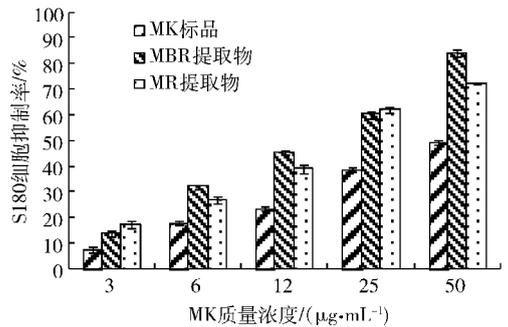
24, 48, 72 h时MK标准品、MBR及MR乙醇提取物对S180小鼠腹水瘤细胞的抑制率见图4(a)、(b)、(c)。



(a) 24 h



(b) 48 h



(c) 72 h

图4 24, 48, 72 h时MK及样品对S180小鼠腹水瘤细胞的抑制作用

Fig. 4 Growth inhibitory effect of MK and samples on S180 cell at 24, 48 h and 72 h

由图4可以看出, 作用时间相同并在一定MK浓度范围内, MK标准品、MBR和MR乙醇提取物对S180小鼠腹水瘤细胞的抑制率随MK浓度的增大而增大; 三者对S180小鼠腹水瘤细胞抑制作用强弱顺序为: MBR > MR > MK, 且MBR和MR的抑制效果显著大于MK标准品 ($P < 0.01$)。

24 h 内,由于作用时间较短,3 种样品对腹水瘤细胞的抑制效果不明显,24 ~ 48 h 内抑制率增长较快,48 ~ 72 h 内抑制作用变化不大. 总之,MK 标准品、MBR 和 MR 乙醇提取物对 S180 小鼠腹水瘤细胞的抑制率随作用时间的延长而增大,呈一定的剂量依赖关系. 48 h 和 72 h 时,MK 质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MBR 抑制率达到最大,约为 80%.

研究表明^[14],胆固醇的产生是肿瘤细胞增殖的必要条件,HMG-CoA 还原酶(HMGCR)对肿瘤细胞的增殖有促进作用. 因此,包括 lovastatin(结构与 MK 完全一致)在内的他汀类药物对肿瘤细胞增殖有抑制作用,可预防性地减少癌症的发病率^[15-16]. 本实验结果显示,红曲霉 M1 发酵产物对 S180 小鼠腹水瘤细胞抑制作用强于 MK 标准品,这可能是由于红曲中除他汀类药物对肿瘤细胞有抑制作用外,红曲色素、酶类及红曲多糖等活性物质也有一定的抗炎调脂、调节免疫功能、抗氧化的作用,可多靶向地对肿瘤细胞起到预防及抑制作用. 在 MK 浓度相同的条件下,MBR 乙醇提取物对 S180 小鼠腹水瘤细胞抑制率高于 MR 乙醇提取物,可能是由于糙米中含有多种大米没有的功能性成分,如米糠脂多糖、胚芽中的肌醇六磷酸等,对肿瘤细胞产生一定的抑制作用,也可能是在糙米发酵过程中产生了新的活性物质,增强了其抑制肿瘤的能力. 因此,当 MK 浓度相同时,红曲霉发酵产物中多种活性物质共同作用于 S180 小鼠腹水瘤细胞,使其具有比 MK 标准品更强的抑制肿瘤细胞增殖的能力,且 MBR 乙醇提取物对 S180 小鼠腹水瘤细胞的抑制作用强于 MR 乙醇提取物.

3 结 论

对红曲霉 M1 发酵糙米(MBR)与大米(MR)代谢产物组成及含量进行了研究,结果表明:在 MBR 提取物中,酸型和内酯型 MK 同时存在,总 MK 和 GABA 含量高于 MR,红曲色素色价及桔霉素含量低于 MR. 两者相比,当以红曲霉为发酵剂,以大米作为发酵基质时,更适合于红曲色素的开发;以糙米作为发酵基质,活性物质的产量与安全性较高,更适用于功能红曲的生产.

由 S180 小鼠腹水瘤细胞体外抑制作用实验可知,MBR、MR 乙醇提取物和 MK 标准品均对其具有一定的抑制作用,当三者 MK 含量相同时,作用强度

依次减小. 可见,MK 并不是红曲霉 M1 发酵产物中唯一的抑癌因子,其对肿瘤细胞的抑制作用是多种活性物质共同作用的结果.

发酵基质的种类、状态及营养成分影响着红曲霉代谢产物的种类和组成,一些未知的生物活性物质也可赋予红曲产品新的功能.

本文研究了以糙米为发酵基质时,红曲功能活性物质组成和产量的变化,为红曲保健产品的开发奠定了基础. 在今后的研究中,还可通过多种肿瘤细胞实验、动物实验对红曲霉代谢产物的抗肿瘤作用进行进一步的验证,探究具有抑制作用的活性因子,并针对这些功能因子对红曲霉代谢产物进行深入研究.

参考文献:

- [1] Ma Jiyuan, Li Yongguo, Ye Qing, et al. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(11): 5220 - 5225.
- [2] Lin Y L, Wang T H, Lee M H, et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice a review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77(5): 965 - 973.
- [3] 孙伟,刘爱英,梁宗琦. 红曲中莫纳可林 K(Monacolin K)的研究进展[J]. *西南农业学报*, 2003, 16(3): 112 - 116.
- [4] 杨涛,林清录,周俊清. 红曲生理活性物质及其开发应用的安全性评价[J]. *中国食物与营养*, 2005(1): 28 - 30.
- [5] 王春玲,戚飞,李颂. 真菌毒素在食品工业中的危害与控制[J]. *北京工商大学学报:自然科学版*, 2012, 30(4): 12 - 14.
- [6] Joan H Y, Yu H T, Yu L L, et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascus rice[J]. *LWT*, 2006, 39(7): 740 - 747.
- [7] Wu C L, Lee C L, Pan T M. Red mold dioscorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(11): 5035 - 5041.
- [8] Cha J Y, Jeong J J, Park C S, et al. Antiobesity activity of fermented *angelicae gigantis* by high fat diet-induced obese rats[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011, 27(5): 758.
- [9] 王赫男,王静. 糙米的综合利用[J]. *北京工商大学学报:自然科学版*, 2012, 30(3): 49 - 52.

- [10] 郭顺堂. 我国全谷物食品的开发及存在的问题[J]. 北京工商大学学报:自然科学版, 2012, 30(5): 11-15.
- [11] 江苏省卫生防疫站, 轻工业部食品发酵工业科学研究所. GB/T 4926—1985 食品添加剂 红曲米[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.
- [12] Li Yongguo, Liu Hong, Wang Zhengtao. A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 39(1-2): 82-90.
- [13] 丘振宇, 王亚琴, 许喜林. 红曲霉中 Monacolin K 的应用研究[J]. 中国酿造, 2007(5): 4-6.
- [14] Notarnicola M, Messa C, Pricci M, et al. Up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in left-sided human colon cancer[J]. Anticancer Research, 2004, 24(6): 3837-3842.
- [15] Mee Y H, Navindra P, Seeram, et al. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19(7): 448-458.
- [16] 邢旺兴, 张梅, 方琅, 等. 中药红曲的药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2006, 24(1): 1-3.

Studies on Metabolites of *Monascus* M1 Fermented Brown Rice and Antiproliferation Effect on S180 Ascitic Tumor Cell

WANG Jing, WANG Chang-lu*, CHEN Mian-hua, YANG Hua, LI Su-zhen,
WANG Yu-rong, LI Zhen-jing

(College of Food and Biology Engineering/Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The production of *Monascus* M1 metabolites with rice and brown rice was compared. The anti-proliferation effect of Monacolin K (MK), the ethanol extracts of fermentation product of red yeast brown rice (MBR) and rice (MR) on S180 ascitic tumor cell in vitro was studied with the MTT colorimetric method. It showed that the acid form MK was presented in MBR, and the total output of MK was higher (30%) than that of MR. The content of GABA was 2.98 mg/g in MBR, which was 2.1-fold higher than that in MR. While the yield of citrinin was lower in MBR. MK alone, ethanol extracts from MR and MBR were all active in inhibiting S180 ascitic tumor cell growth. In a certain range of MK concentration (3 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the capacity of antiproliferation increased gradually with the increase of the concentration. When the concentration of MK was equal, the inhibition effect of MBR and MR was significantly stronger than MK alone ($p < 0.01$).

Key words: *Monascus*; brown rice; rice; S180 ascitic tumor cell

(责任编辑:叶红波)