

# 红曲菌两种荧光代谢产物 与 BSA 相互作用的光谱法研究

黄志兵<sup>1</sup>, 许 杨<sup>1</sup>, 张淑云<sup>1</sup>, 李来生<sup>2</sup>, 李燕萍<sup>1</sup>

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,中德联合研究院,江西南昌 330047;

2.南昌大学分析测试中心,江西南昌 330047)

**摘 要:**运用紫外光谱和荧光光谱法研究了红曲菌两种荧光代谢产物与 BSA 的相互作用,并探讨了其结合类型、结合常数及结合过程中热力学参数。结果表明:红曲菌两种荧光代谢产物(monasfluore A, MFA 和 monasfluore B, MFB)结合 BSA 内源荧光的猝灭是由于红曲菌荧光代谢产物与 BSA 之间形成复合物,符合动态猝灭机理。298、308、318K 下, MFA 与 BSA 和 MFB 与 BSA 的结合常数分别为:  $3.47 \times 10^{12}$ 、 $6.35 \times 10^{12}$ 、 $7.94 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $6.90 \times 10^{12}$ 、 $1.19 \times 10^{13}$ 、 $1.75 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。热力学数据表明红曲菌两种荧光代谢产物与 BSA 之间主要作用力为疏水作用力,且 MFB 与 BSA 作用明显强于 MFA 与 BSA 之间作用,可能由于 MFB 含有辛基侧链,疏水性明显强于含己基侧链的 MFA,故 MFB 通过疏水作用与 BSA 作用更明显。

**关键词:**红曲菌,荧光代谢产物,荧光光谱,荧光猝灭

## Investigation of interaction between two *monascus* metabolites and BSA by spectroscopy

HUANG Zhi-bing<sup>1</sup>, XU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Shu-yun<sup>1</sup>, LI Lai-sheng<sup>2</sup>, LI Yan-ping<sup>1</sup>

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute,  
Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The interaction between two *monascus* metabolites and BSA were investigated using fluorescence and UV spectroscopy. The binding mode and thermodynamic parameters between two *monascus* metabolites and BSA were studied. The results showed that two *monascus* metabolites have the ability to quench the intrinsic fluorescence of BSA, and the quenching mechanism dynamic quenching. The binding constants of MFA-BSA and MFB-BSA were  $3.47 \times 10^{12}$ ,  $6.35 \times 10^{12}$ ,  $7.94 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  and  $6.90 \times 10^{12}$ ,  $1.19 \times 10^{13}$ ,  $1.75 \times 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  at 298, 308, 318K, respectively. MFA was a lower homologue of MFB, with the less lipophilic hexanoyl instead of octanoyl side chain, and these resulted in a less interaction with BSA.

**Key words:** *Monascus*; fluorescence metabolites; fluorescence spectroscopy; fluorescence quenching

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)13-0106-04

红曲是我国的传统发酵产品,在我国一直被认为具有药用和食用双重功效,不仅是祖国宝贵的科学文化遗产,而且在世界微生物史上具有重要意义。近年来,随着对红曲中生物活性物质研究不断发展,各国学者对其进行深入而广泛的研究,发现红曲能产生许多令人瞩目的次级代谢产物,如红曲色素、胆固醇抑制剂、及具有降血压、抗菌、降血氨、抗肿瘤、降血糖等生理活性成分<sup>[1]</sup>,使传统红曲增添新的内涵。一种天然物质能同时具有多项生物活性实属罕

见,因此研究红曲菌新的代谢产物和开发红曲新功能现已成为各国研究热点之一。红曲菌最主要代谢产物为红曲色素,红曲色素是一类聚酮类物质,属于复合色素,主要包括红、橙、黄色素三大类,各大类又分为很多组分。目前,已确定出化学结构的红曲色素有 6 种,其中包括红曲素(Monascin)和红曲黄素(Ankanavin)两种黄色素,红斑红曲素(Rubropunctatin)和红曲玉红素(Monascorabrin)两种橙色素、红斑红曲胺(Monaseorubramine)和红曲玉红胺(Rubropunfamine)两种紫红色素,它们均属 Azaphilone 类真菌代谢物。近年来,越来越多的红曲菌新的 Azaphilone 类代谢产物及其抗癌生物活性被报道<sup>[2-5]</sup>。然而,有关红曲菌 Azaphilone 类代谢产物与 BSA 相互作用的报道甚少。前期实验从红曲中分离纯化出两种荧光代谢产物,分别命名为 monasfluore

收稿日期:2012-11-26 \* 通讯联系人

作者简介:黄志兵(1975-),男,副教授,博士,研究方向:微生物代谢产物的分离与分析。

基金项目:国家自然科学基金(31160308);江西省教育厅项目(GJJ11291)。

A(MFA)和 monasfluore B(MFB)<sup>[6-7]</sup>。采用光谱法研究两种荧光代谢产物与 BSA 的相互作用下的热力学参数和作用力类型等,对进一步研究红曲菌 Azaphilone 类代谢产物的生物活性机制有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

红曲菌两种荧光代谢产物 MFA 和 MFB 自制,纯度大于 95%<sup>[6-7]</sup>;牛血清白蛋白(BSA) Sigma 公司;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH 均为分析纯;实验用水均为超纯水。

FS F-4500 荧光分光光度计 日本日立公司;ULTRASPEC4300 紫外分光光度计 美国 Pharmacia 公司。

### 1.2 实验方法

将一定量的 BSA 和上述两种红曲菌荧光代谢产物分别加入到容量瓶(10mL)中,并用含 50% 乙醇的 PBS 缓冲溶液(pH7.4, 0.01 mol·L<sup>-1</sup>)稀释。准确移取一定量的上述溶液于石英荧光池(1cm)中,进行荧光光谱扫描。BSA 的荧光激发和发射波长分别为 280nm 和 343nm,发射波长扫描范围 400~600nm,狭缝宽度为 5nm。紫外-可见吸收的参比液为含 50% 乙醇的 PBS 缓冲溶液(pH7.4, 0.01 mol·L<sup>-1</sup>),吸收波长扫描范围为 300~450nm。

分别在 25、35、45℃ 温度条件下,固定 BSA 浓度为 3.03 × 10<sup>-6</sup> mol/L,加入一系列浓度的 MFA 或 MFB 后的 BSA 溶液进行荧光光谱扫描,记录荧光强度,计算荧光淬灭常数,推导荧光淬灭机理。

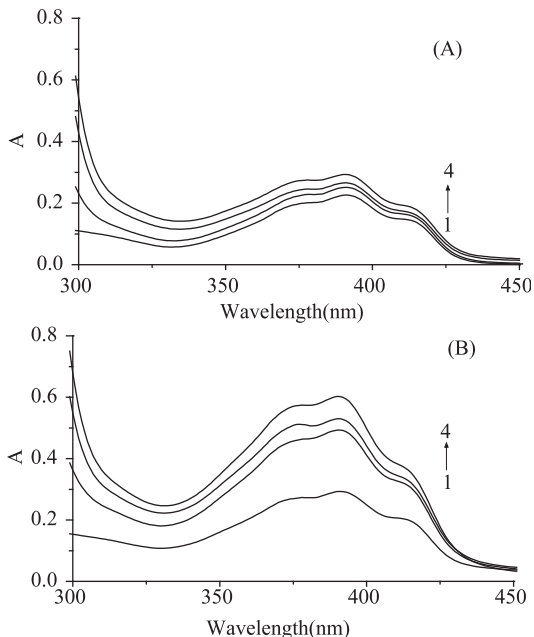


图1 MFA(A)和 MFB(B)分别与 BSA 作用的吸收光谱  
Fig.1 Absorption spectra of MFA(A) and MFB(B) by BSA at different concentration

注: C<sub>MFA</sub> = 1.12 × 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>, C<sub>MFB</sub> = 1.04 × 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>,  
C<sub>BSA</sub>: curves 1→4: 0.0, 6.06 × 10<sup>-5</sup>,  
9.09 × 10<sup>-5</sup>, 12.12 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 吸收光谱

在含 50% 乙醇的 PBS 缓冲溶液(pH7.4, 0.01 mol·L<sup>-1</sup>)条件下,测定了不同浓度的 BSA 对 MFA 和 MFB 紫外吸收谱图的影响,从图 1 可看出,随 BSA 浓度增大, MFA(A) 和 MFB(B) 的最大吸光度值均增加,但 MFB 增加值比 MFA 更明显,说明 MFB 较 MFA 更容易与 BSA 作用。

### 2.2 荧光光谱

红曲菌两种荧光代谢产物(MFA 和 MFB)的激发波长和发射波长分别为 396 和 460nm<sup>[6-7]</sup>,对一系列含相同浓度的 MFA 和 MFB 与不同浓度 BSA 溶液混合后,静置 30min,然后分别记录荧光光谱。由图 2(A)可知,随加入的 BSA 溶液浓度增加, MFA 的荧光强度几乎没有变化,可能原因是 MFA 与 BSA 之间的作用较弱;从图 2(B)可知,随加入的 BSA 溶液浓度增加, MFB 的荧光强度逐渐降低,说明 MFB 与 BSA 之间发生了明显的作用。

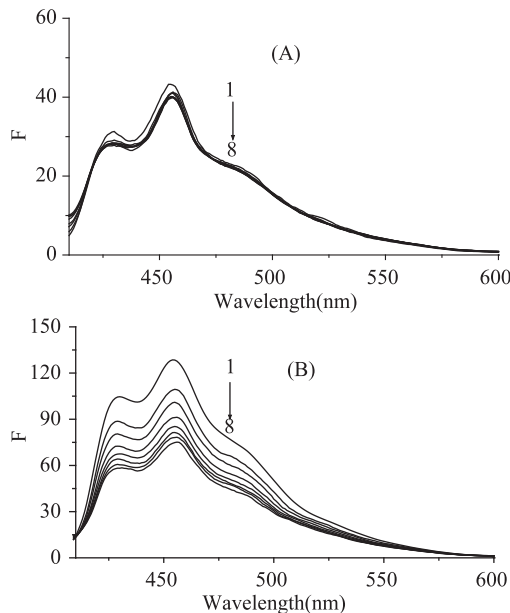


图2 MFA(A)和 MFB(B)分别与 BSA 作用的荧光光谱  
Fig.2 Fluorescence quenched spectra of MFA(A) and MFB(B) by BSA at different concentration

注: C<sub>MFA</sub> = 2.81 × 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>, C<sub>MFB</sub> = 2.6 × 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>,  
C<sub>BSA</sub>: curves 1→8: 0.0, 0.5 × 10<sup>-6</sup>, 1.0 × 10<sup>-6</sup>, 1.5 × 10<sup>-6</sup>,  
2.0 × 10<sup>-6</sup>, 2.5 × 10<sup>-6</sup>, 3.0 × 10<sup>-6</sup>, 3.5 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>。

然后固定 BSA 溶液的浓度,而改变 MFA 和 MFB 溶液的浓度,并进行荧光光谱扫描。由图 3 可知,随加入的 MFA 和 MFB 溶液浓度增加, BSA 的荧光强度不断降低。这说明了 MFA 和 MFB 与 BSA 之间可能存在使得 BSA 的荧光降低的相互作用。

### 2.3 荧光猝灭机理和作用力类型

荧光猝灭过程可分为静态猝灭和动态猝灭<sup>[8]</sup>。若为动态猝灭,其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程, F<sub>0</sub>/F = 1 + K<sub>q</sub>τ<sub>0</sub>[C<sub>monas</sub>] = 1 + K<sub>SV</sub>[C<sub>monas</sub>] 式(1)<sup>[9]</sup>

根据上述方程测定了不同温度(25、35、45℃)时,加入 MFA(图未给出)或 MFB 后 BSA 荧光强度的变化,由实验数据作出 BSA 的 Stern-Volmer 曲线

表1 在 pH7.4 条件下 MFA 和 MFB 与 BSA 作用的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of monasfluoreA and monasfluoreB-BSA interaction at pH7.4

	T/K	$K_{sv}$ ( $L \cdot mol^{-1}$ )	$r$	$Kq$ ( $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $kJ \cdot mol^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $kJ \cdot mol^{-1}$ )
MFA	298	$3.47 \times 10^4$	0.9919	$3.47 \times 10^{12}$		196.30	-25.90
	308	$6.35 \times 10^4$	0.9914	$6.35 \times 10^{12}$	32.61	197.82	-28.32
	318	$7.94 \times 10^4$	0.9920	$7.94 \times 10^{12}$		196.35	-29.83
MFB	298	$6.90 \times 10^4$	0.9987	$6.90 \times 10^{12}$		215.77	-27.60
	308	$1.19 \times 10^5$	0.9919	$1.19 \times 10^{13}$	36.70	216.33	-29.93
	318	$1.75 \times 10^5$	0.9998	$1.75 \times 10^{13}$		215.79	-31.92

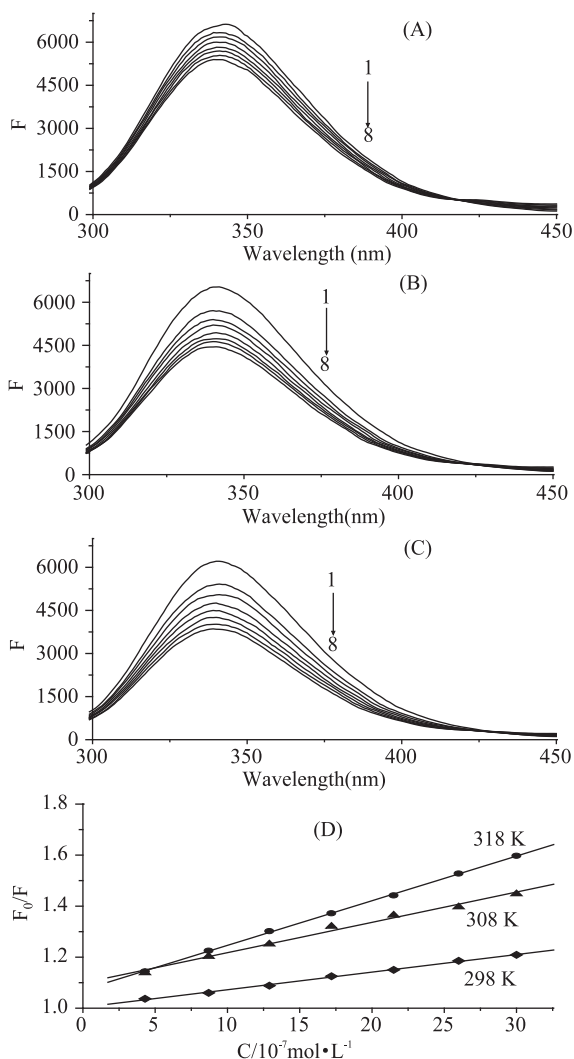


图3 在 25°C (A), 35°C (B) and 45°C (C) 下 MFB 对 BSA 荧光淬灭光谱和 Stern-Volmer (D) 线

Fig.3 Fluorescence quenched spectra of BSA by MFB at different concentration at 25°C (A), 35°C (B) and 45°C (C), and Stern-Volmer plots of fluorescence quenching of BSA by MFB (D)

注:  $C_{BSA} = 3.03 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}$ ,  $C_{MFB}$ : curves 1→8: 0.0,  $4.3 \times 10^{-7}$ ,  $8.7 \times 10^{-7}$ ,  $12.9 \times 10^{-7}$ ,  $17.2 \times 10^{-7}$ ,  $21.5 \times 10^{-7}$ ,  $26.0 \times 10^{-7}$ ,  $30.0 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$ 。

(图 3 (D)), 猝灭常数  $K_{sv}$  和相关系数(表 1)。

从图 3 (D) 可看出, 随温度升高, 直线斜率增大, 即  $K_{sv}$  增大, 表明 MFB 对 BSA 的荧光猝灭是由于分

子间碰撞而引起的动态猝灭, 主要由于升高温度使得荧光猝灭剂分子和荧光体有效碰撞增加, 扩散系数增大, 从而猝灭常数增大; 相反, 静态猝灭随着温度的升高, 荧光猝灭剂分子和荧光体组成的复合物的稳定性下降, 故猝灭常数减小<sup>[10]</sup>。

从表 1 结果可看出,  $Kq$  数量级在  $10^{12} \sim 10^{13}$ , 远远大于扩散碰撞过程中的最大  $Kq$  值, 一般认为, 各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为  $2 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ <sup>[11]</sup>, 从这一点考虑, MFA 和 MFB 对 BSA 的荧光猝灭似乎不应为动态猝灭<sup>[12]</sup>, 但考虑到溶液中离子强度是影响猝灭常数的重要因素<sup>[8,11]</sup>之一, 本实验体系为缓冲溶液, 故本实验中  $Kq$  的增大可能是由离子强度引起的。

当温度变化不大时, 反应的焓变  $\Delta H$  可以看作一个常数, 热力学参数之间的关系如下:

$$\ln(k_2/k_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad \text{式(2)}$$

$$\Delta G = -RT \ln k = \Delta H - T\Delta S \quad \text{式(3)}$$

根据生物大分子与小分子结合力性质和生物大分子自身结合力性质的热力学规律<sup>[13]</sup>, 由表 1 可知,  $\Delta G < 0$ , 表明反应是自发进行的,  $\Delta H > 0$  和  $\Delta S > 0$ <sup>[13]</sup>, 表明 MFA 和 MFB 与 BSA 之间主要是疏水作用力。从 MFA 和 MFB 结构可以看出, 由于 MFB 含有辛基侧链<sup>[6]</sup>, 疏水性明显强于含己基侧链的 MFA, 故 MFB 与 BSA 之间的疏水作用更明显。

### 3 结论

采用光谱法研究了红曲菌两种荧光代谢产物与 BSA 的相互作用, 结果表明红曲菌两种荧光代谢产物(monasfluore A, MFA 和 monasfluore B, MFB) 结合 BSA 内源荧光的猝灭是由于红曲菌荧光代谢产物与 BSA 之间形成复合物, 符合动态猝灭机理。298、308、318K 下, MFA 与 BSA 和 MFB 与 BSA 的结合常数分别为:  $3.47 \times 10^{12}$ 、 $6.35 \times 10^{12}$ 、 $7.94 \times 10^{12} L \cdot mol^{-1}$  和  $6.90 \times 10^{12}$ 、 $1.19 \times 10^{13}$ 、 $1.75 \times 10^{13} L \cdot mol^{-1}$ 。红曲菌两种荧光代谢产物与 BSA 之间的作用力为疏水作用力, 由于 MFB 含有更长的辛基侧链, 具有更强的亲脂性, 因而与 BSA 之间的疏水作用力更强。

### 参考文献

[1] Ma J, Li Y, Ye Q, *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] Knecht A, Humpf H U. Cytotoxic and antimutagenic effects of

(下转第 112 页)

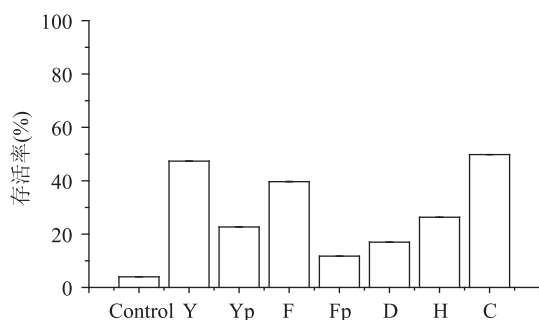


图5 云芝总发酵物与其他天然抗氧化活性成分对酵母细胞氧化损伤保护作用的对比

Fig.5 Comparison of the protective effect of the fermentation products by *Coriolus versicolor* and other natural antioxidant components on oxidative damaged yeast cells

### 3 结论

云芝总发酵物及其多糖对超氧阴离子自由基和羟自由基均具有明显的清除能力。云芝总发酵物对经过  $H_2O_2$  和紫外照射两种氧化应激处理下的酵母细胞具有显著的保护作用,且呈剂量依赖性。云芝总发酵物的抗氧化活性优于云芝多糖以及其他两种真菌发酵物。下一步应对云芝总发酵物化学组成进行研究,进而阐明云芝总发酵物的抗氧化作用机理。

#### 参考文献

- [1] Finkel T, Nikki J, Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408: 239-247.
- [2] Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. Science, 1987, 235: 529.
- [3] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2002, 60: 258-274.
- [4] Fan LP, Li JW, Deng K Q, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87 (2):

1849-1854.

[5] Wang L, Wang GY, Zhang JJ, et al. Extraction optimization and antioxidant activity of intracellular selenium polysaccharide by *Cordyceps sinensis* SU-02 [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86 (4): 1745-1750.

[6] Gao CJ, Wang ZY, Su TT, et al. Optimisation of exopolysaccharide production by *Gomphidius rutilus* and its antioxidant activities in vitro [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87 (3): 2299-2305.

[7] 许锦堂. 中国药用真菌学 [M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1997: 127-128.

[8] Yang QY. History, present status and perspectives of the study of Yun Zhi polysaccharopeptide [J]. Advance research in PSP, 1999: 5-15.

[9] 周海华, 马海乐. 云芝多糖的体外抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29 (3): 44-48.

[10] Santos Arteiro J, Rosa' rio Martins M, Salvador C, et al. Protein-polysaccharides of *Trametes versicolor*: production and biological activities [J]. Medicinal Chemistry Research, 2012, 21 (6): 937-943.

[11] 林晓霞, 熊强, 陆利霞, 等. 云芝糖肽的液体发酵培养基的研究 [J]. 生物加工过程, 2006, 4 (2): 64-68.

[12] 王俊明, 周自云, 胡景江, 等. 云芝液体培养过程中胞外酶与胞外多糖的变化 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19 (2): 22-24.

[13] 王玉. 高渗、低温和氧化条件下酵母细胞应激产生活性物质的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2005.

[14] 程超, 李伟. 几种植物水溶性多糖的体外抗氧化作用 [J]. 食品工业科技, 2006, 27 (9): 63-65.

[15] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (4): 38.

[16] 汤俊, 胡征宇. 3种念珠藻多糖对自由基的清除作用 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24 (1): 63-66.

(上接第 108 页)

N-containing *Monascus* metabolites studied using immortalized human kidney epithelial cells [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2006, 50 (3): 406-412.

[3] Su N W, Lin Y L, Lee M H, et al. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53 (6): 1949-1954.

[4] Hsu L C, Hsu Y W, Liang Y H, et al. Anti-tumor and anti-inflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (4): 1124-1130.

[5] Hsu Y W, Hsu L C, Liang Y H, et al. New bioactive orange pigments with yellow fluorescence from *Monascus*-fermented *dioscorea* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (9): 4512-4518.

[6] Huang Z B, Xu Y, Li L S, et al. Two new *Monascus* metabolites with strong blue fluorescence isolated from red yeast rice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56

(1): 112-118.

[7] 黄志兵. 红曲菌两种新的荧光代谢产物的研究 [D], 南昌, 南昌大学, 2009.

[8] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.

[9] 张小威, 赵凤林, 李克安. 环丙沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究 [J]. 高等学校化学学报, 1999, 20 (7): 1063-1067.

[10] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second ed. [M]. New York: Plenum Press, 1999, 237.

[11] Ware W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process [J]. Journal of Physical Chemistry, 1962, 66: 455-458.

[12] 朱铿, 童沈阳. 荧光黄与蛋白质相互作用的研究 [J]. 高等学校化学学报, 1996, 17 (4): 539-542.

[13] Ross D P, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3102.