

红树林内生海洋细菌 CⅢ-1 菌株胞外代谢产物 GC/MS 分析*

黄 甫¹ 胡汉桥² 何 红^{2**} 符史良¹ 张兴锋² 陈振明²

(广东海洋大学理学院 湛江 524088) (广东海洋大学农学院 湛江 524088)

摘要 红树林内生海洋细菌 CⅢ-1 菌株胞外代谢产物的二氯甲烷萃取物 GC/MS 分析结果表明,该菌株胞外代谢产物的二氯甲烷萃取物的主要化学成分及相对含量为:花生酸(10.12%)、角鲨烯(7.33%)、12-二十三酮(7.07%)、2-(2-羟基乙氧基)乙基硬脂酸酯(6.21%)、四甲基环氧乙烷(4.67%)、吡咯-2-乙酸-4-(1-氯-1-癸烯基)-3-5-二甲基乙基酯(4.63%)、3-甲基-3-十一碳烯(3.55%)等。其中角鲨烯具有重要的应用价值。

关键词 海洋细菌 胞外代谢产物 气相色谱/质谱法 分析

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0875-05

GC/MS Analysis of the Extracellular Metabolism of the Endophytic Marine Bacterium CⅢ-1 from Mangrove*

HUANG Fu¹ HU Han-Qiao² HE Hong^{2**} FU Shi-Liang¹ ZHANG Xing-Feng² CHEN Zhen-Ming²

(College of Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088)

Abstract The extracellular metabolism products of the marine bacterium CⅢ-1, a endophytic marine bacterium isolated from mangrove (*Bruguiera gymnorhiza*), were extracted with dichloromethane and then analyzed by GC/MS technique. The results showed that the mainly chemical composition and their concentrations of the extracellular metabolism of this strain were arachic acid(10.12%), all-trans-squalene(7.33%), 12-tricosanone(7.07%), 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl stearate(6.21%), tetramethyl-oxirane(4.67%), pyrrole-2-carboxylic acid-4-(1-chlorodec-1-enyl)-3-5-dimethyl-ethyl ester(4.63%), 3-methyl-3-undecene(3.55%) and so on. Among them the all-trans-squalene has an important value of application.

Key words Marine bacterium, Extracellular metabolism, GC/MS, Analysis

海洋占地球表面的 71%,是人类赖以生存与发展的资源宝库,其中蕴藏着大量的动植物和微生物。由于生长环境特殊,这些生物形成了与陆生生物不同的生理性状及特征,并可产生许多结构新颖、作用特殊的活性物质。自 20 世纪 70 年代以来,已从海洋生物中获得 30000 多种海洋天然产物,其中大多具有独特新颖的化学结构,并有重要生物活性。海洋微生物作为海洋生物的重要成员,其种类高达 100 万种以上,而目前已研究报道的还不到总数的 1%,以分离代谢产物为目的的被分离培养的海洋微生物就更少。研究发现,海洋共附生微生物有可能是其宿主中天然活性物质的真正生产者。

此外,由于微生物可经发酵培养大量获得代谢产物,因此普遍认为,海洋微生物可能是新型生物活性物质极为重要的来源,在医药及农业动植物病虫害新型药物的开发和应用中将发挥主导性作用^[1,2,3]。本研究用 GC/MS 法对从红树体内分离筛选获得的一株对多种植物病原真菌和细菌均具有较强拮抗作用的海洋细菌 CⅢ-1 菌株的胞外代谢产物的二氯甲烷萃取物的化学成分进行了分析。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试 CⅢ-1 菌株为本实验室从木榄(*Bruguiera*

* 广东省自然科学基金资助项目(No. 05011780) 教育部科学技术研究重点项目(No. 206106)

** 通讯作者 Tel 0759-2382084, E-mail: hehong893@163.com

收稿日期:2006-12-28,修回日期:2007-03-18

gymnorrhiza 叶片中分离获得的海洋细菌,经测定,该菌株对植物青枯病菌等多种病原菌具有较强的拮抗作用,经常规法初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[4]。

1.2 菌株培养

菌株经活化后,用改良 NA 培养基(pH7.0 ~ 7.5),在转速 180r/min、25℃ 下培养 96h 得菌株培养液,经 10000r/min 离心 20min 取其上清液并过滤,即得菌株培养液。

1.3 菌株胞外代谢产物的萃取

取菌株培养液,用二氯甲烷在中性、酸性、碱性条件下萃取,对照为空白改良 NA 培养基的二氯甲烷萃取物,处理条件及提取方法,与菌株培养液的完全相同。

1.4 分析仪器与试剂

日本岛津 QP5050A 型气相色谱-质谱联用仪。二氯甲烷、H₂SO₄、NaOH 等试剂均为分析纯。

1.5 分析条件

色谱条件:DB-5MS(30m × 0.25mm × 0.25μm)弹

性石英毛细管柱;载气为高纯氦气,柱流量:1.0mL/min,分流比:10:1,进样口温度 250℃,接口温度 260℃,柱温 60℃,保持 5min,以 3℃/min 的速率升至 280℃,保持 25min,进样量:1μL。质谱条件:电离源为 EI,电子能量 70eV,离子源温度 260℃,全扫描,扫描间隔:0.5s,扫描质量范围为 40amu ~ 400amu,溶剂延迟 2.5min,倍增器电压 1.20kV。

2 结果与分析

2.1 空白培养基二氯甲烷萃取物的 GC/MS 分析结果

空白培养基用二氯甲烷萃取后,其萃取物用 GC/MS 法分析得其总离子流图和化学成分分别见图 1 和表 1。由表 1 可知,本研究空白培养基的二氯甲烷萃取物中主要含:2-[1-(4-氯苯基)-1,4-二氢吡啶-4-烯内鎗盐]二氢茚-1,β-二酮、瓢儿菜基酰胺、邻苯二甲酸二异辛酯、正-十六酸、2,6,10,14,18-五甲基-2,6,10,14,18-二十碳五烯等化合物。

表 1 空白培养基二氯甲烷萃取物的化学成分表

序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	分子量	相对含量(%)	相似度(%)
1	33.46	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	206	6.55	92
2	47.00	邻苯二甲酸单丁基酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	2.45	83
3	49.43	3-异丁基六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210	1.24	88
4	50.33	邻苯二甲酸二异丁基酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	4.25	92
5	51.19	正-十六酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	9.31	86
6	56.19	1-异丁基硫烷基甲基-2,8,9-三噁-5-吡-1-硅-双环[3.3.3]十一烷	C ₁₁ H ₂₃ NO ₃ Si	277	1.27	82
7	57.48	15-溴十五酸	C ₁₅ H ₂₉ BrO ₂	321	3.32	81
8	63.80	15-溴十五烷基酰胺	C ₁₅ H ₃₀ BrNO	320	0.94	76
9	67.77	邻苯二甲酸二异辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	11.32	91
10	68.44	双(2-羟基-3-叔丁基-5-乙基苯氧基)甲烷	C ₂₅ H ₃₆ O ₂	368	2.45	86
11	74.27	瓢儿菜基酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	337	21.00	88
12	74.36	十三酸 噻吩-2-基甲烷酰胺	C ₁₈ H ₃₂ N ₂ OS	324	2.35	81
13	75.03	2,6,10,14,18-五甲基-2,6,10,14,18-二十碳五烯	C ₂₅ H ₄₂	342	8.06	91
14	76.86	2-[1-(4-氯苯基)-1,4-二氢吡啶-4-烯内鎗盐]二氢茚-1,β-二酮	C ₂₁ H ₁₄ ClNO ₂	347	22.61	87
15	78.11	二(邻辛基苯)胺	C ₂₈ H ₄₃ N	393	2.52	83

2.2 CⅢ-1 菌株培养液二氯甲烷萃取物的 GC/MS 分析结果及菌株胞外代谢产物的化学成分

按 2.1 中的条件和方法,对 CⅢ-1 菌株培养液的二氯甲烷萃取物进行分析,获得满意分离,其总

离子流图和化学成分分别见图 2 和表 2。比较表 2 和表 1 可以看出,由于菌株的生长、分解转化及新产物合成和代谢作用,在表 2 菌株培养液中原空白培养基(表 1)的部分成分消失或相对含量降低了,而出

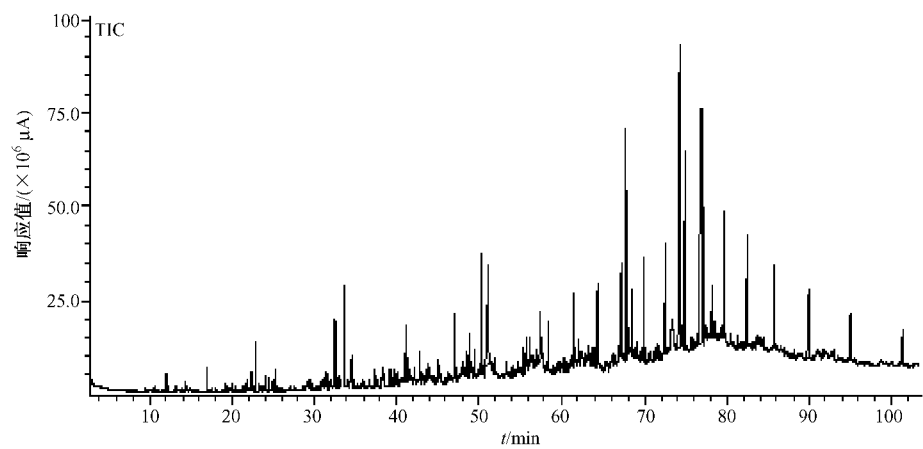


图 1 空白培养基二氯甲烷萃取物的 GC/MS 总离子流图

表 2 CⅢ-1 菌株培养液二氯甲烷萃取物的化学成分表

序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	分子量	相对含量(%)	相似度(%)
1	3.18	2,3-丁二醇	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	1.61	97
2	3.43	四甲基环氧乙烷	C ₆ H ₁₂ O	100	4.67	90
3	3.52	2-羟基-3-戊酮	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	2.43	89
4	6.03	3-甲基-2-己酮	C ₇ H ₁₄ O	114	1.82	90
5	6.80	4-乙氧基-2-丁酮	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	1.11	84
6	13.04	1,2,4,5-四嗪-3,6-二胺	C ₂ H ₄ N ₆	112	2.17	85
7	13.90	7-甲基-1,4-二噁烷-2,4,5-庚酮	C ₆ H ₈ O ₃	128	1.20	89
8	18.18	5,6-二甲基四氢-2H-吡喃-2-酮	C ₇ H ₁₂ O ₂	128	1.08	94
9	31.54	3-甲基-3-十一碳烯	C ₁₂ H ₂₄	168	3.55	83
10	33.44	2,4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	206	2.68	95
11	46.83	十四酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	1.85	82
12	46.99	邻苯二甲酸单丁基酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	1.25	83
13	50.33	邻苯二甲酸二异丁基酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	4.25	92
14	51.09	正-十六酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	5.70	94
15	51.24	花生酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	10.12	90
16	51.37	4-甲基(亚戊基)甲硅氧基十四烷	C ₂₀ H ₄₂ SiO	326	2.78	78
17	51.43	吡咯-2-乙酸 4-(1-氯-1-癸烯基)-3,5-二甲苯基酯	C ₁₉ H ₃₀ ClNO ₂	339	4.63	81
18	53.62	12-二十三酮	C ₂₃ H ₄₆ O	338	7.07	74
19	53.85	异丙基硬脂酸酯	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	2.75	77
20	57.57	15-溴十五酸	C ₁₅ H ₂₉ BrO ₂	321	3.56	81
21	57.71	2-(2-羟基乙氧基)乙基硬脂酸酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₄	372	6.21	95
22	60.12	15-溴十五烷基酰胺	C ₁₅ H ₃₀ BrNO	320	1.67	76
23	67.70	邻苯二甲酸二异辛酯	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	1.66	91
24	74.20	瓢儿菜基酰胺	C ₂₂ H ₄₃ NO	337	9.39	88
25	74.99	2,6,10,14,18-五甲基-2,6,10,14,18-二十碳五烯	C ₂₅ H ₄₂	342	4.76	91
26	76.69	2-[1-(4-氯苯基)-1,4-二氢吡啶-4-烯内鎓盐]-2-氢茚-1,3-二酮	C ₂₁ H ₁₄ ClNO ₂	347	2.70	86
27	92.88	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	410	7.33	90

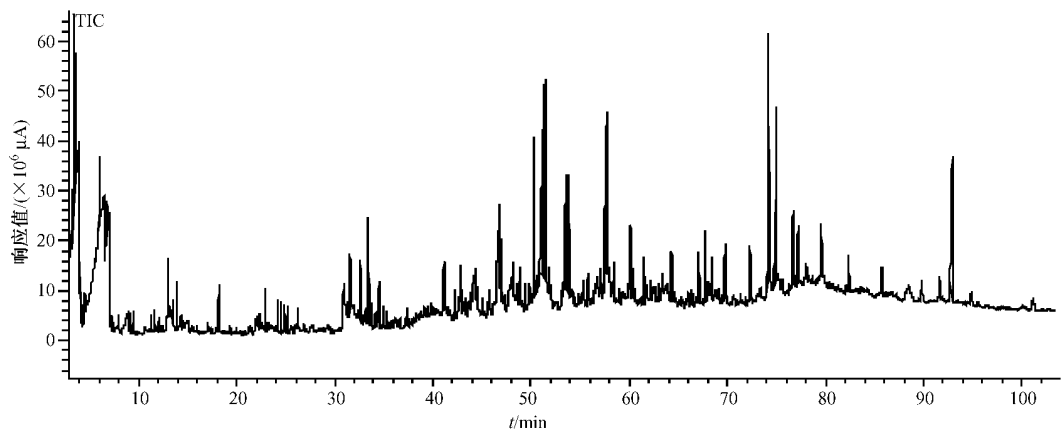


图 2 CⅢ-1 菌株培养液的二氯甲烷萃取物的 GC/MS 总离子流图

现了一些新的化合物。这些新出现的化合物便是菌株胞外代谢产物的化学成分,主要有花生酸、角鲨烯、12-二十三酮、2(2-羟基乙氧基)乙基硬脂酸酯、四甲基环氧乙烷、吡咯-2-乙酸、4(1-氯-1-癸烯基)-3,5-二甲基乙基酯、3-甲基-3-十一碳烯等(见表 3)。

表 3 CⅢ-1 菌株胞外代谢产物的化学成分表

序号	保留时间(min)	化合物名称	分子式	分子量	相对含量(%)	相似度(%)
1	3.18	2,3-丁二醇	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	1.61	97
2	3.43	四甲基环氧乙烷	C ₆ H ₁₂ O	100	4.67	90
3	3.52	2-羟基-3-戊酮	C ₅ H ₁₀ O ₂	102	2.43	89
4	6.03	3-甲基-2-己酮	C ₇ H ₁₄ O	114	1.82	90
5	6.80	4-乙氧基-2-丁酮	C ₆ H ₁₂ O ₂	116	1.11	84
6	13.04	1,2,4,5-四嗪-3,6-二胺	C ₂ H ₄ N ₆	112	2.17	85
7	13.90	7-甲基-1,4-二噁烷-2,4-二酮	C ₆ H ₈ O ₃	128	1.20	89
8	18.18	5,6-二甲基四氢-2H-吡喃-2-酮	C ₇ H ₁₂ O ₂	128	1.08	94
9	31.54	3-甲基-3-十一碳烯	C ₁₂ H ₂₄	168	3.55	83
10	46.83	十四酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	1.85	82
11	51.24	花生酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	10.12	90
12	51.37	4-甲基(亚戊基)甲硅氧基十四烷	C ₂₀ H ₄₂ SiO	326	2.78	78
13	51.43	吡咯-2-乙酸、4(1-氯-1-癸烯基)-3,5-二甲基乙基酯	C ₁₉ H ₃₀ ClNO ₂	339	4.63	81
14	53.62	12-二十三酮	C ₂₃ H ₄₆ O	338	7.07	74
15	53.85	异丙基硬脂酸酯	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	2.75	77
16	57.71	2(2-羟基乙氧基)乙基硬脂酸酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₄	372	6.21	95
17	92.88	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	410	7.33	90

3 讨论

研究结果表明,红树林内生海洋细菌 CⅢ-1 菌株胞外代谢产物的二氯甲烷萃取物主要化学成分及相对含量分别为:花生酸(10.12%)、角鲨烯(7.33%)、12-二十三酮(7.07%)、2(2-羟基乙氧基)

乙基硬脂酸酯(6.21%)、四甲基环氧乙烷(4.67%)、吡咯-2-乙酸、4(1-氯-1-癸烯基)-3,5-二甲基乙基酯(4.63%)、3-甲基-3-十一碳烯(3.55%)等,其中花生酸和角鲨烯,尤其是角鲨烯具有较高的应用价值。花生酸可进一步加工用于制造低泡洗衣粉、润滑脂和合成蜡等。角鲨烯是一种无毒无害具有杀菌、增

强机体免疫能力、抗衰老等功能的活性物质,广泛用于功能食品及化妆品等产业。目前角鲨烯主要从深海鲨鱼的肝油中分离提取^[5,6],用微生物发酵生产的研究报道还较少^[7]。本研究发现 CⅢ-1 菌株胞外代谢物中含有角鲨烯,对此值得进一步研究。

参考文献

- [1] 徐 赤,顾谦群,崔承彬.中国海洋药物 2001 **6**:44~49.
[2] 刘全永,胡江春,薛德林,等.应用生态学报 2002 **13**(7):901~

905.

- [3] 田 黎,顾振芳,陈 杰,等.植物病理学报 2003 **33**(1):77~80.
[4] 陈振明,何进坚,何 红,等.微生物学通报 2006 **33**(3):18~23.
[5] Kalogeropoulos N, Andrikopoulos NK. International journal of food sciences and nutrition 2004 **55**(2):125~129.
[6] 赵振东,孙 震.林产化学与工业 2004 **24**(3):107~112.
[7] Bhauaehe rjee P. J Microbiol Biotech 2001 **17**(8):811~815.