

GC-MS 分析氧化硫硫杆菌培养液的挥发性成份

乐长高 谢宗波 姜国芳 廖夫生

(东华理工学院应用化学系 江西抚州 344000)

摘 要 采用 GC-MS 联用技术对耐强辐射微生物氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*, 简称 T.t 菌)的代谢产物进行了初步研究, 从氧化硫硫杆菌的培养液中发现了 32 种代谢物, 通过 GC-MS 和标准谱图鉴定了其中的 26 种化合物。

关键词 CS-MS 氧化硫硫杆菌(T.t 菌) 挥发性代谢物

Volatility Ingredients in the inoculum of *Thiobacillus thiooxidans* Analyzed by GC-MS

Le Zhanggao, Xie Zongbo, Jiang Guofang, Liao Fusheng

(Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou Jiangxi 344000)

Abstract In this paper, Gas chromatography /mass spectrometry was used to study the metabolites of strong radiation resistant thiobacillus thiooxidans (T.t), 32 compounds were isolated from the inoculum of T.t, and 26 compounds were elucidated based upon the results of GC-MS and standard figures.

Key words Gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS), *Thiobacillus thiooxidans* (T.t), Volatility metabolites

在自然界, 环境条件、微生物种类和代谢途径的多样性提供了多种多样的生物活性物质^[1]。微生物代谢产物的多样性以及许多代谢产物显著的药理活性使得微生物代谢产物的研究成为当代生物学和药理学研究的热点。对陆生细菌和真菌的大量研究表明, 微生物是具有独特结构生理活性物的丰富资源, 在过去的 60、70 年中大约有 50000 种天然产物来自微生物, 而其中 10000 多种具有生理活性, 8000 多种是抗菌和抗肿瘤药物^[2]。从微生物菌体或培养基中分离的活性物质有抗生素类、酶制剂类、生物碱、甾体、萜类、皂苷、蒽醌类、大环内脂以及含硫、卤、溴等元素的结构复杂的化合物^[3,4]。极端环境具有高盐、高压、低温、寡营养、强辐射等特点, 为了适应这样的生存环境, 极端环境的微生物具有不同的代谢系统和机体防御系统, 在其代谢产物中发现了许多结构特异、新颖的生物活性物质^[5]。

氧化硫硫杆菌(T.t)是利用微生物浸矿的主要菌种, 呈革兰氏阴性, 棒状、无色, 嗜酸、好氧、中等嗜温的矿质化能无机营养菌^[6], 以氧化元素硫或还原态硫化物为高价的硫化物来获得自身生长所需要的能量, 最终形成硫酸。氧化硫硫杆菌在强酸 pH=1~5 的环境中存活, 在浸矿的过程中形成大量的胞外多聚物^[7,8]。采自强辐射铀矿区的氧化硫硫杆菌由于生长环境不同、营养物质不同以及与基质作用的特殊机理, 其代谢物也可能不同。然而, 到目前为止笔者还没有

乐长高 男, 37 岁, 博士。从事生物、有机化学研究。E-mail:lezhang_ecit@163.com

江西省自然科学基金资助项目(0120019)

2003-11-15 收稿, 2004-01-20 接受

发现对微生物氧化硫硫杆菌代谢产物研究的具体报道。从氧化硫硫杆菌中提取、分离新的具有药理活性的化合物成为我们研究的兴趣。本文采用 GC/MS 联用技术对氧化硫硫杆菌的代谢物进行了初步研究,由氧化硫硫杆菌培养液的有机溶剂浓缩提取液中检出 32 个峰,确认了其中的 26 个化合物。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

T.t 菌种由本学院土木与环境工程系微生物实验室提供。Waksmen 培养基为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.0g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L; CaCl_2 0.126g/L; S 5g/L。所用实验试剂均为分析纯,层析用硅胶 G、 HF_{254} 由青岛海洋化工厂生产。GC-MS 是 Agilent 公司的 HP-5MS 气相色谱/质谱联用仪。

1.2 实验操作

1.2.1 发酵培养 采用文献报道的 T.t 实验室最佳生长条件^[7,8],采用 Waksmen 培养基,150mL 三角瓶接种(20%),用硫酸(体积比 1/1)调至 $\text{pH}=4.45$,30℃恒温振荡培养,然后采用充气连续发酵培养 10L,收集发酵培养液。

1.2.2 代谢产物的提取与分离 培养液 50℃下减压浓缩至 1L,用乙酸乙酯萃取,硅胶柱层析,用 50%乙酸乙酯-石油醚洗脱,洗脱液减压浓缩,密封存于冰箱备用。用 GC-MS 联用技术测定其成分,色谱条件为:色谱柱 0.15mm×30m×0.25μm;载气 Ar;载气流量 10mL/min;进样口温度 220℃;进样量 1μL;分流比 50/1;程序升温 60℃ $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$ 160℃ $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280℃;质谱条件为:电离方式 EI;电离电压 70eV;离子源温度 230℃;扫描质量范围:30~550amu(m/Z)。

2 结果与讨论

用乙醚稀释提取的氧化硫硫杆菌的培养液中代谢物,经 GC-MS 测定,在气相色谱上发现 32 个成分,鉴定了其中的 26 个化合物,并用归一化法确定了各组分以及各组分的百分含量,结果见表 1。

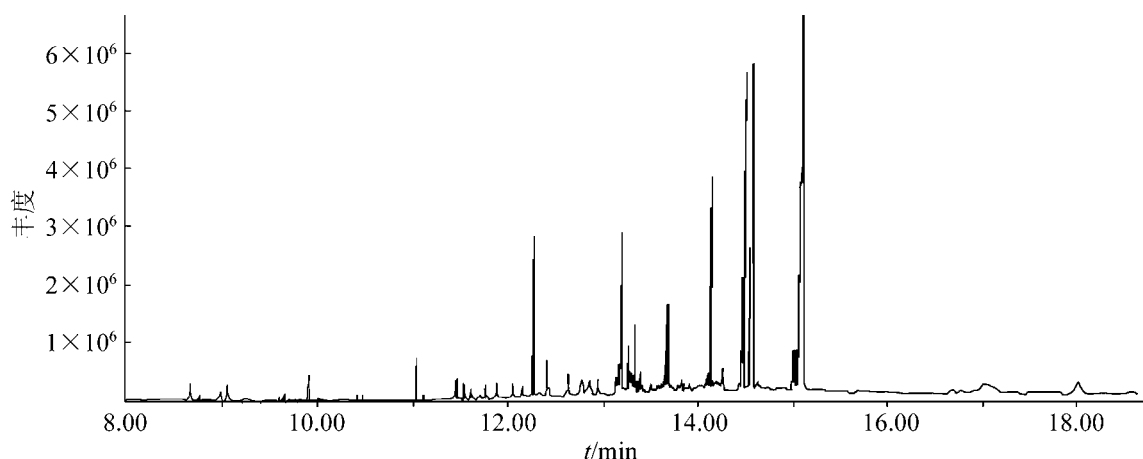


图 1 氧化硫硫杆菌培养液的 GC-MS 总离子流图

Fig.1 The total ion stream of volatile metabolites of *Thiobacillus thiooxidans*

表 1 氧化硫硫杆菌的挥发性代谢物

Tab.1 The volatile metabolites from the inoculum of *Thiobacillus thiooxidans*

编号	出峰时间/min	化合物名称	相对含量/%
1	8.655	2,6-双(1,1-二甲ethyl基)-1,4-二酮-2,5 环己二烯	0.729
2	8.975	2,4-双(1,1-二甲ethyl基)-苯酚	0.748
3	9.047	2,6-二叔丁基对甲基苯酚	0.731
4	9.908	二甲硫基苯并噻唑	1.125
5	11.034	3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸	1.684
6	11.461	3,5-二叔丁基-4-羟基乙酸苯甲酯	0.838
7	11.539	十五烷酸乙酯	0.579
8	11.768	2-十七烷酮	0.627
9	11.888	14-甲基十五烷酸甲酯	0.718
10	12.058	十六烷酸甲酯	0.471
11	12.159	邻苯二甲酸丁酯辛酯	0.545
12	12.257	十六烷酸乙酯	5.930
13	12.417	十六烷酸异丙酯	1.484
14	12.632	十七烷酸乙酯	0.824
15	12.935	16-甲基十七烷酸甲酯	0.634
16	13.180	油酸乙酯	5.995
17	13.255	十八烷酸乙酯	1.686
18	13.324	乙酸十八烷酯	2.524
19	13.288	2-辛基环丙烷辛酸甲酯	0.892
20	13.389	L-抗坏血酸-6-十八烷酸酯	0.804
21	13.676	18-十九碳烯酸乙酯	3.355
22	14.129	1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氢-1,4-二甲ethyl-一7 (1-甲基ethyl基)-1-菲羧酸甲酯	8.738
23	14.250	17-三十五碳烯	1.098
24	14.472	2,4-双(1-苯ethyl基)苯酚	14.471
25	14.550	(2-乙基苯基)-二苯基膦	15.478
26	15.075	1,2-邻苯二甲酸单(2-ethyl基)己酯	22.286

GC-MS 分析结果表明, T.t 的挥发性代谢产物组分较多, 已检出的化合物约占总化合物的 95%。检出的化合物中含有较多的酯类化合物, 酯类化合物占总化合物的 60%, 其中 1,2-邻苯二甲酸单(2-ethyl基)己酯的含量较高, 占总化合物的 22.286%。另外有两种酚类化合物的含量也较高, 分别为: 2,4-双(1-苯ethyl基)苯酚占 14.471%, 2,4-双(1-苯ethyl基)苯酚占 15.478%, 以及有少量的烯烃、酮类、噻唑化合物。从已经检测出的部分中, 可知酮类和噻唑类化合物具有一定的药理活性, 二甲硫基苯并噻唑可以作为药物中间体。其它化合物没有发现具有显著的药理活性。

另外从氧化硫硫杆菌代谢物的较高极性部分已经分离出固体化合物, 其成分有待进一步鉴定。

参考文献

- [1] 方金瑞, 黄维真. 中国海洋药物, 1995, 56(4): 21~25.
- [2] W Fenical. Chem. Rev., 1993, 93(5): 1673~1683.
- [3] J W Blunt, B R Copp, M H G Munro et al. Natural Product Reports, 2003, 20(1): 1~48.
- [4] K Liberra, U Lindequist. Pharmazie, 1995, 50(9): 583~588.
- [5] 韩妍妍, 张亚娟, 王维娜 等. 海洋科学, 2002, 26(9): 7~12.
- [6] A Schippers, H Von Rege, W Sand. Minerals Engineering., 1996, 9(10): 1069~1079.
- [7] D Santhiya, S Subramanin, K A Natarajan. Minerals Engineering, 2000, 13(7): 747~763.
- [8] C Knickerbocker, D K Nordstrom, G Southam. Chemical Geology, 2000, 169: 425~433.