

海洋细菌 *Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio vulnificus* 对 单萜柠檬烯的生物转化产物分析*

蓝文健¹, 李厚金², 蔡创华³, 周毅频³, 林永成²

(1 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

2 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275

3 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

摘 要: 研究了南海海洋细菌嗜水性气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* (5-213) 和创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* (13-203) 在培养基中添加单萜 (*D*)-柠檬烯后提取产物的组成变化情况。经 GC-MS 分析发现该两细菌对 (*D*)-柠檬烯有显著的生物催化转化作用, 能对底物进行不同程度的氧化、还原、水解、酯化、开环等反应, 并产生丰富的系列结构不同的其它萜类化合物: 包括单萜、倍半萜、二萜、以及三萜等。通过单萜微生物转化和生物合成必将获得新的活性萜类产品, 也为丰富的天然单萜资源的开发与利用提供新的途径和方法。

关键词: 海洋细菌; 嗜水性气单胞菌; 创伤弧菌; 柠檬烯; 生物转化

中图分类号: O 656 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 02-0126-03

萜类化合物, 一直是天然产物化学研究的一个重要内容, 它广泛存在于自然界, 到目前为止, 已发现的天然萜类化合物超过了 22 000 个, 其中很多有重要用途, 如: 在脊椎动物和无脊椎动物中的各种萜类激素和信息素, 类维生素 A, 辅酶 Q, 维生素 A、D 和 E, 胆固醇等; 在植物中广泛存在的萜类生长调节剂和防摄食的防卫剂; 有些还是重要的医药产品, 如: 紫杉醇 (taxol) 用作抗肿瘤剂, 银杏内酯 (ginkgolide) 用于治疗老年痴呆症, 青蒿素 (artemisinin) 用于抗疟疾。

在海洋生物代谢产物的研究中, 人们也发现了大批结构新颖的萜类化合物, 在继续不断发现新的萜类化合物的同时, 人们也将专注于这些萜类化合物是如何产生的。随着研究的不断深入, 发现很多萜类化合物的真正生产者海洋微生物, 动物和植物则靠与微生物的附生或寄生, 以及摄食微生物从而在体内积累萜类化合物。这就预示着海洋微生物拥有独特的萜类合成的基因, 有丰富的萜类合成酶^[1]。

单萜化合物, 是一类重要而丰富的天然资源, 广泛存在于植物的精油中。本文报道 2 株南海海洋细菌嗜水性气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* (编号 5-213) 和创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* (13-203) 对单萜 (*D*)-柠檬烯的生物转化, 并在转化产物中发现了

丰富的萜类化合物。

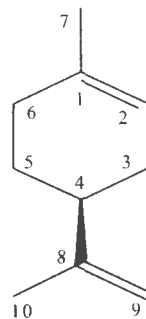


图 1 (*D*)-柠檬烯的结构

Fig 1 Structure of (*D*)-limonene

1 实验部分

1.1 细菌培养与转化产物制备 嗜水性气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* (5-213) 和创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* (13-203), 采自南海大亚湾海岸底泥。细菌以 2216E 为培养基, 120 °C 灭菌 20 min。每株细菌培养 6 瓶, 其中 3 瓶做空白对照, 在 120 r/min 28 °C 条件下培养 1 d (*D*)-柠檬烯溶解于 DM SO 中, 灭菌处理, 平均接入细菌培养瓶中, 使柠檬烯含量为 200 mg/L, 继续培养 2 d。对照组不加柠檬烯, 其余培养条件与实验组相同。培养液用乙酸乙酯提取, 旋转蒸发浓缩得到提取物。

1.2 GC-MS 分析实验条件 HP25MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 弹性石英毛细管柱。程序升温: 初

* 收稿日期: 2006-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20502036); 广东省自然科学基金资助项目 (05300667); 中山大学青年教师科研启动基金资助项目 (2004 36000 1131072)

作者简介: 蓝文健 (1976 年生), 女, 讲师; 通讯联系人: 李厚金; E-mail: ceslh@mail.sysu.edu.cn

始柱温 50℃, 5℃/min 升至 250℃。进样口温度 230℃, He 气为载气, 流速 0.5 mL/min, 分流比 20:1。质谱条件: 离子源为 EI 源, 温度 230℃, 质量范围 40~500 amu。

2 结果与讨论

2.1 实验结果 (D)-柠檬烯的细菌转化提取物经 GC/MS 分析, 化合物的结构确定根据保留时间以及质谱图与图谱库的检索确定。在添加柠檬烯的实验组中, 鉴定到丰富的单萜转化产物和萜类代谢产物 (表 1); 而在空白对照组中, 鉴定出的化合物几乎全是饱和和不饱和脂肪酸 (酯)。细菌 *Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio vulnificus* 能在柠檬烯的不同位置进行氧化, 还原、水解、酯化、开环等反应, 并产生丰富的系列结构不同的其它萜类化合物: 包括单萜、倍半萜、二萜、以及三萜等。*Aeromonas hydrophila* 在 (D)-柠檬烯的 1 位, 2 位, 3 位, 6 位, 7 位等多个位置发生加氧反应, 得到羟基化或酮基化产物, 表明该菌有丰富的加氧酶。在转化产物中, 还发现系列不规则萜类化合物, 而这些化合物用化学反应的方法是难以得到的。

2.2 讨论 对这些丰富萜类化合物的产生, 一个初步的解释是: 亲脂性的单萜类化合物, 与微生物细胞膜磷脂疏水端有亲合作用, 对细胞产生“毒性”, 而引起细胞膜的过氧化应激反应, 结合在膜上的多种酶, 活性得到提高或者抑制, 但部分氧化酶活性提高, 导致产生丰富的氧化单萜。单萜的生物转化是细胞为维持自身稳定结构的一种动态调节^[2-3]。

深入研究单萜的微生物转化, 以及其对微生物代谢产物的影响, 将能够发现系列新结构的萜类化合物, 对微生物活性代谢产物的研究具有重要的指导作用, 对丰富的天然单萜产品的综合开发与利用也将提供新的思路和方法。

参考文献:

[1] 林永成. 海洋微生物及其代谢产物 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003

[2] Van der WERF M J, De BONT J A M, LEAK D J. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes [J]. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology 1997, 55: 148-177.

表 1 海洋细菌对 (D)-柠檬烯的转化所产生的萜类化合物

Tab. 1 The terpenoids of biotransformed products of (D)-limonene by marine bacteria

菌种	转化产物 (含量 ≥ 1%)
嗜水性气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i> (5-213)	
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i> (13-203)	

[3] ZUNINO M B, ZYGADLO J A. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize [J]. Plant 2004, 19: 303-309

Biotransformation of (*D*)-Limonene by Marine Bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio vulnificus*

LAN Wen-jian¹, LI Hui-jin², CAI Chuang-hua³, ZHOU Yi-pin³, LIN Yong-deng²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

3. South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract The biotransformation products of (*D*)-limonene by marine bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio vulnificus* which collected from the Daya Bay of the South China Sea were investigated. A series of mono-, sesqui-, di- and tri-terpenoids with various structural types which produced by bio-oxidation, hydrogenation, hydrolyzation, esterification and cyclic cleavage toward (*D*)-limonene were analyzed by GC-MS. Microorganism biotransformation of monoterpene will provide the endless opportunities to obtain some significant bioactive terpenoids and to utilize the abundant monoterpene resource.

Key words marine bacteria, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, limonene, biotransformation

(上接第 120 页)

- | | |
|---|---|
| <p>[3] MIYAMOTO A, TEIK NAKAMURA H, et al. Behavior of prestressed beam strengthened with external tendons[J]. Journal of Structural Engineering, ASCE, 2000, 126(9): 1033–1044.</p> <p>[4] ABRAHAM M A, PARK S Y, STUBBS N. Loss of prestress prediction on nondestructive damage location algorithms[J]. SPIE Smart Structures and materials, 1995, 2446: 60–67.</p> <p>[5] BATHE K J. Finite Element Procedures in Engineering Analysis[M]. New Jersey: Prentice Hall, 1982.</p> | <p>[6] GERADIN M, RIKEN D. Mechanical Vibration: Theory and Application to Structural Dynamics[M]. New York: John Wiley and Sons, 1994.</p> <p>[7] NEWMARK N W. A method of computation for structural dynamics[J]. Journal of Engineering Mechanics Division, ASCE, 1959, 85(3): 67–94.</p> <p>[8] TSE F S, MORSE I E, HINKLE R T. Mechanical Vibrations: Theory and Applications[M]. Boston: Allyn and Bacon Inc, 1978.</p> |
|---|---|

Effects of Prestress Force on Vibration of a Prestressed Beam

LÜ Zhong-rong¹, LAW Sit-seong², LU Ji-ke¹

(1. Department of Applied Mechanics and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2. Civil and Structural Engineering Department, The Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Kowloon, Hong Kong)

Abstract Prestressing force has been used widely with long span structure and it is the most important factor to describe the load-carrying capacity of the structure. Free and forced vibrations of the beam are studied. The prestressed bridge is modeled as a simply supported Euler-Bernoulli beam and it is discretized using finite element method. The effects of the prestress force on the modal frequencies and dynamic responses are discussed. It is found that the effects of prestress force on the lower natural frequencies and the dynamic displacement response of the beam are large.

Key words vibration, prestress force, dynamics, dynamic response