

大亚湾海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 中的红色素^{*}

李厚金¹, 蔡创华², 周毅频², 林永成¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

摘要: 海洋细菌 *Pseudomonas* sp., 采集于大亚湾, 从该菌的菌体提取物分离得到 2 个红色素: 灵菌红素 A 和新的衍生物二甲基灵菌红素 B。它们的结构通过 NMR, LC-MS 等确定, 并得出灵菌红素是具有强烈抗微生物和细胞毒性的化合物, 同时研究了它的培养条件。

关键词: 海洋细菌; *Pseudomonas* sp.; 灵菌红素; 二甲基灵菌红素

中图分类号: O629.6 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2003) 03-0102-03

近年来, 开展了南海海洋微生物的活性物质研究, 到目前为止, 已分离发现了近 50 个新的化合物, 其结构类型有: 萜类和内酯类^[1,2]、鞘胺醇甙类^[3]、连烯化合物^[4]、缩酮类化合物^[5]、新的杂环类化合物^[6]等; 部分化合物具有明显的药理活性。

Pseudomonas sp. 是从大亚湾表面海水分离到的一株海洋细菌。从形态特征及生理生化活性测定结果来看, 该菌的菌落紫红色, 细胞呈革兰氏阴性, 杆状, 大小为 $(0.7 \sim 0.9) \mu\text{m} \times (2.0 \sim 4.0) \mu\text{m}$, 单生极毛。另外, 该菌还能还原硝酸盐, 接触酶阳性, 分解酪蛋白, 不水解七叶灵。由陈月琴等^[7]对该菌进行核糖体基因的测定与分析, 测定结果显示, 该菌与紫色杆菌 (*C. violaceum*) 同源性较低, 与假单胞菌 (*Pseudomonas*) 很自然组成一群, 有很高的同源性。

本文研究了 *Pseudomonas* sp. 中的红色素, 从菌体提取物中分离得到 2 个红色素: 灵菌红素 A 和新的衍生物二甲基灵菌红素 B。

1 材料与方法

1.1 试剂与实验仪器 美国 Varian 公司 INOVA 500NB 超导核磁共振谱仪; 美国 Finnigan 公司 LCQTM DECA XP 高效液相色谱—质谱联用仪。

葡萄糖为化学纯, 蛋白胨 BR, 酵母膏 BR, 海水取自大亚湾海岸。溶剂均为广州化学试剂厂生产, 化学纯, 使用前重蒸。柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产的 200~300 目硅胶 H, 薄层硅胶为青岛海洋化工厂生产的硅胶 HF254。

1.2 菌种 *Pseudomonas* sp. 是从大亚湾表面海

水分离到的海洋细菌。现保存于南海海洋研究所和中山大学化学与化工学院天然产物研究室。

1.3 菌种发酵 菌种以 GYP ($w=1\%$ glucose, $w=0.5\%$ yeast extract, $w=0.5\%$ peptone, $\rho=100\%$ 海水, pH 7.5) 琼脂培养基, 4℃保存。发酵采用液体培养, 选用同样的培养基。500 mL 三角瓶, 内装培养液 200 mL, 1.25×10^5 Pa 灭菌 15 min。共接种培养 70 L。在 25℃ 120 r/min 摇床培养 3 d。

对 *Pseudomonas* sp. 产红色素的培养条件进行了初步的研究, 发现 GYP 液体培养有利于产红色素; 选用自来水, $\rho=20\%$ 海水, $\rho=50\%$ 海水, $\rho=80\%$ 海水和 $\rho=100\%$ 海水作介质对照, 结果表明, 盐度越高, 细菌菌体的生长和色素的产生速度越快。 $\rho=100\%$ 海水培养, 1~3 d 培养物的红色越来越深, 但从第 4 天开始, 颜色有明显减退的迹象。

1.4 提取和分离 *Pseudomonas* sp. 共培养了 70 L, 培养物 2 000 r/min 高速离心, 菌体沉淀和上层离心液分离, 菌体呈鲜红色, 培养液呈浅红色。菌体用乙醇提取 3 次, 浓缩得深红色提取物约 5 g。离心液浓缩后用乙酸乙酯萃取 3 次, 乙酸乙酯提取液水浴旋转蒸发浓缩得总提物 1.5 g。菌体浓缩物经反复硅胶柱层析, 用石油醚/乙酸乙酯/甲醇梯度洗脱, 合并收集红色组分, 再经多次制备薄层(石油醚/乙酸乙酯, 体积比为 1:1) 分离, 收集 R_f 分别为 0.6 和 0.2 的 2 个红色素, 经结构确定为灵菌红素 A (10 mg) 和二甲基灵菌红素 B (2 mg)。

培养液提取物经分离发现, 其红色素微量, 这表明, 红色素为胞内代谢物, 培养液呈浅红色可能是由

* 收稿日期: 2002-11-13

基金项目: 国家 863 基金资助项目 (2001AA624010); 国家自然科学基金资助项目 (29672053); 广东省自然科学基金资助项目 (980317)

作者简介: 李厚金 (1974 年生), 男, 讲师, 博士; 通讯联系人: 林永成; E-mail: ceslyc@zsu.edu.cn

于细菌自溶或少量的色素排出体外。

2 结果与讨论

2.1 灵菌红素 从该菌菌体的乙醇提取物中分离到一个红色素 A, 经结构鉴定为已知化合物灵菌红素 (Prodigiosin), 即: 4-methoxy-5-[(5-methyl-4-pentyl-2H-pyrrol-2-yliden) methyl]-2, 2'-bi-1H-pyrrole。

红色素 A 的 NMR 数据(表 1)和已知物灵菌红素的数据基本一致^[8,9], 由此确定 A 为灵菌红素。LC-MS⁺ 正离子方式, 测得其[M+1] 为 324; 在全扫描中还得到碎片 309, 292, 267, 252, 236, 226, 203, 192, 185, 160 等。A 的 MS⁺ 实验(正离子方式)结果显示: 选择 324. 30 进行 MS¹ 实验, 得到 309. 2, 这是分子脱掉一个甲基; 选定 309. 2 进行 MS² 实验, 则得到 294. 3, 252. 3, 149. 0; 选择 252. 3 进行 MS³ 实验, 得到了 224. 3, 185. 2, 161. 2 碎片。

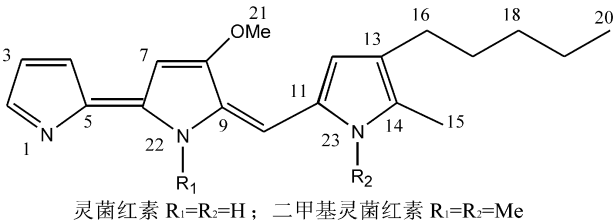


表 1 灵菌红素和二甲基灵菌红素的 NMR 数据
Tab. 1 The NMR data of prodigiosin A and dimethyl prodigiosin B

位号	Prodigiosin A			dimethyl prodigiosin B
	DEPT	δ_c	δ_h	δ_h
1	N			
2	CH	126. 0	7. 17(brs)	7. 24(brs)
3	CH	110. 7	6. 29(brs)	6. 36(brs)
4	CH	116. 0	6. 85(brs)	6. 96(brs)
5	C	121. 2		
6	C	146. 7		
7	CH	91. 6	6. 02(s)	6. 08(s)
8	C	164. 8		
9	C	119. 7		
10	CH	115. 0	6. 89(s)	6. 92(s)
11	C	124. 1		
12	CH	127. 5	6. 62(s)	6. 68(s)
13	C	127. 4		
14	C	146. 0		
15	CH ₃	11. 5	2. 47(s)	2. 55(s)
16	CH ₂	24. 3	2. 33(t, 7. 5 Hz)	2. 40(t, 7. 5 Hz)
17	CH ₂	28. 8	1. 54	1. 56
18	CH ₂	30. 9	(tt, 7. 5, 7. 5 Hz)	(tt, 7. 5, 7. 5 Hz)
19	CH ₂	21. 5	1. 32(m)	1. 33(m)
20	CH ₃	13. 0	1. 26(m)	1. 26(m)
21	CH ₃	57. 7	0. 88(t, 7. 0 Hz)	0. 88(t, 7. 0 Hz)
22	NH		3. 94(s)	4. 01(s)
23	NH		12. 76(brs)	3. 49(s, 22- CH ₃)
			12. 58(brs)	1. 43(s, 23- CH ₃)

2.2 二甲基灵菌红素 红色素 B, 呈紫红色, R_f 值比 A 要小。经¹H NMR(CDCl₃, TMS) 实验, 它的氢化学位移在 δ_h 7. 24, 6. 96, 6. 92, 6. 68, 6. 36, 6. 08, 4. 01, 3. 49, 2. 55, 2. 40, 1. 56, 1. 43, 1. 33, 1. 26, 0. 88。其氢化学位移和 A 大体一致, 只不过是 B 中, δ_h 12. 76 和 12. 58 的 2 个氢不见了, 在 δ_h 3. 49 和 1. 43 处多出了 2 个单峰。其它氢的化学位移和氢的比例 A 和 B 基本一致。

在 MS⁺ 实验中, 测得红色素 B 相对分子质量为 351 [M+1= 352]。选择 352 进行 MS¹ 实验, 能够得到 337 碎片, 断裂一个质量为 15 的碎片, 应该为甲基; 在选择 337 进行 MS² 实验时, 能够得到 322, 同样也断裂一个质量为 15 的碎片; 再选择 322, 以不同的能量进行 MSⁿ 实验, 发现它的碎片离子和 A 的碎片离子差不多。由此推测, B 具有和 A 一样的骨架, 只不过是 B 与 A 相比, 多了 2 个甲基。

从 A 的结构分析, 再加 2 个甲基, 而对其它的氢化学位移又影响较小, 在 MSⁿ 实验中 2 个甲基断裂之后, 其碎片仍然和 A 相似, 2 个甲基的位置只能加在 2 个含有 H 的 N 上。二甲基灵菌红素是一个新的衍生物。

灵菌红素结构独特, 具吡咯亚甲基骨架, 最初从 *Chromobacterium prodigiosu* (serratia marcescens) 中分离得到。它具有抗微生物活性, 小鼠实验表明, 还有细胞毒性, 对 L1210、B16、P388、9KB 的 IC₅₀ 分别为 0. 02, 0. 03, 0. 000 37, 0. 04 μ g/mL。灵菌红素的全合成研究, 已有报道^[9,10]。有关的类似物, 在临床上已作为药物应用。

参考文献:

[1] LIN Y C, LI H J, ZHOU S N, et al. A novel γ -lactone, eutypoid-A and other metabolites from marine fungus *Eutypa* sp (# 424) from the south China sea[J]. Indian J Chemistry, Section B, 2002, 41(7): 1542— 1544.

[2] 李厚金, 林永成, 王力, 等. 南海海洋真菌 *Hypoxylon oceanium* 的代谢产物[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 70— 80.

[3] 李厚金, 林永成, 刘晓红, 等. 南海海洋真菌 *Fusarium* sp (# 2489) 的代谢产物[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 57— 59.

[4] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. A novel N-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp (strain # 2508) from the South China Sea [J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42: 449— 451.

[5] LIN Y C, WU X Y, FENG S, et al. Five unique compounds: Xylolketals from mangrove fungus *Xylaria* sp. from

- the South China Sea coast[J] . J Org Chem, 2001, 66: 6252—6256.
- [6] LIN Y C, SHAO Z Y, JIANG G C, et al. Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5, 6-dihydro-1, 2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (strain # 386) from the South China Sea[J] . Tetrahedron, 2000, 56: 9607—9609.
- [7] 陈月琴, 周世宁, 戴欣, 等. 海洋产灵菌红素细菌的基因分析与鉴定[J] . 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 115—117.
- [8] WASSERMAN H H, McKEON J E, SMITH L A, et al. Studies on prodigiosin and the biopyrrole precursor[J] . Tetrahedron, 1966, 31(Suppl 8): 647—662.
- [9] BOGER D L, PATEL M. Total Synthesis of prodigiosin, prodigiosene and desmethoxyprodigiosin; Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium(II)-promoted 2, 2'-biopyrrole coupling procedure[J] . J Org Chem, 1988, 53(7): 1405—1415.
- [10] BOGER D L, PATEL M. Total synthesis of prodigiosin[J] . Tetrahedron Letters, 1987, 28(22): 2499—2502.

The Red Pigments Isolated from *Pseudomonas* sp. from the South China Sea

LI Hou-jin¹, CAI Chuang-hua², ZHOU Yi-pin², LIN Yong-cheng¹

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

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

Abstract: *Pseudomonas* sp., collected from Daya Bay of the South China Sea, can produce red pigments. The culture media was investigated for its growth and the production of red pigments. Prodigiosin A and a new compound dimethyl prodigiosin B were isolated as the main components of red pigments from the extract of mycelia. Prodigiosin have been reported to possess potent antimicrobial and cytotoxic properties.

Key words: marine bacteria; *Pseudomonas* sp.; prodigiosin; dimethyl prodigiosin

(上接第 96 页)

参考文献:

- [1] ARGYRIS J H, HAASE M, MIEJNEK H P. On an unconventional but natural formation of a stiffness matrix [J] . Computer Methods in Applied Mechanics And Engineering 1980, 22: 1—22.
- [2] SHI Z C. Convergence of TRUNC plate element[J] . Comput Mech Eng, 1987, 62: 71—88.
- [3] 石钟慈, 林群. 有限元方法在中国 // 中国数学六十年 [M] . 长沙: 湖南大学出版社, 1996.
- [4] 葛爱民, 罗恩. 非常规三角形板元(TRUNC) 的新列式方法 // 土木工程计算机应用文集[C] . 北京: 中国铁道出版社, 1999: 312—316.

The New Mass Matrixes of Thin Plate of Element With Applications

GE Ai-min¹, LUO En²

(1. Design Institute of Architecture, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

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

Abstract: In order to apply the element to the analysis of dynamic problems of thin plate, the mass matrixes of TRUNC element are deduced with a new formulation method and are applied to analyze the dynamic problems of thin plate. The numerical results exhibit that two new mass matrixes have higher accuracy and computational efficiency.

Key words: TRUNC element; dynamic problem of thin plate; mass matrix