

海洋热带假丝酵母菌株中角鲨烯的分析与鉴定^{*}

Analysis and Identification of Squalene from Marine Strain of *Candida Tropicalis*

雷 富¹, 何碧娟¹, 姜发军¹, 郑娟梅^{1,2}, 许铭本¹, 张荣灿¹

LEI Fu¹, HE Bi-juan¹, JIANG Fa-jun¹, ZHENG Juan-mei^{1,2}, XU Ming-ben¹, ZHANG Rong-can¹

(1. 广西科学院, 广西南宁 530007; 2. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

(1. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要:从红树林白骨壤 (*Avicennia reacecosa*) 生长的高潮带土壤中分离得到 1 株热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*), 用 YPD 培养基培养 48h, 离心收集菌体细胞, 用正己烷萃取菌体中的脂溶性成分并用傅里叶红外光谱仪和气相色谱-质谱仪对其进行检测分析。结果表明菌株脂溶性成分傅里叶红外光谱与数据库中角鲨烯的红外光谱匹配度达到了 91%。菌株脂溶性成分气相色谱-质谱与数据库中角鲨烯的质谱匹配度达 99%, 显著高于角鲨烯标准品的匹配度 (95%)。热带假丝酵母细胞的角鲨烯最高含量达 2.38mg/g(w/dw), 表明该菌株中富含角鲨烯这种生物活性物质。

关键词: 热带假丝酵母 海洋菌株 角鲨烯

中图分类号: TQ95 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)02-0161-03

Abstract : A strain named *Candida tropicalis*, isolated from the soil of the mangrove *Avicennia* growth area in the high-tide of marina, was cultured in YPD medium for 48h. The yeast cells were extracted with hexane. The extract was analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy and gas-mass chromatography. The results showed that the matching of fat-soluble component isolated from the strain with the squalene spectral library was 91% analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. The matching of fat-soluble component isolated from the strain with the squalene spectral library was 99% analyzed by GC-MS, which was significantly higher than the matching of standard squalene samples. The strain cells (dry weight) had 2.38 mg/g of squalene analyzed by mass spectrometry. This strain was rich in squalene marine active substance.

Key words: *Candida tropicalis*, Marine strains, Squalene

角鲨烯是一种重要的生物活性物质, 化学名为 2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯, 分子式为 $C_{30}H_{50}$, 分子量为 410^[1]。

角鲨烯最早在霞鲨的肝油中被发现^[2], 属价值极高的生物活性物质, 目前主要用于医药和化妆品生产。在医药生产方面, 已证实该物质具有抗肿瘤^[3,4]、增强机体免疫力和抗衰老^[5]等生理活性, 所以

角鲨烯已被作为药物广泛用于医学领域; 在化妆品生产方面, 角鲨烯一直是美容类化妆品传统名贵油性基质的原料, 赋予皮肤光泽、抑制皮肤水分挥发, 而且上妆后无油腻感。此外, 角鲨烯还是治疗痤疮、护发和抗紫外线等化妆品的功能成分^[6]。近年来, 人们一直在寻找新的角鲨烯资源, 发现大型生物的含量较低, 几乎没有利用价值。目前, 角鲨烯主要从深海鲨鱼的肝油中提取, 资源匮乏。本研究利用傅里叶红外光谱仪、气相色谱-质谱仪对从海洋潮间带筛选到的 1 株热带假丝酵母进行检测分析, 发现其含有相当丰富的角鲨烯成分。

收稿日期: 2010-11-23

修回日期: 2011-04-06

作者简介: 雷 富(1975-), 男, 助理研究员, 主要从事海洋活性物质提取、海洋环境调查和检测工作。

* 广西科学院基本科研业务费项目(编号: 09YJ17HY01)资助。

1 材料与amp;方法

1.1 分析仪器与试剂

Nicolet FTIR-5700 傅立叶变换红外光谱仪 (DTGS 检测器); Agilent6890N 气相色谱仪; Agilent5975C 质谱仪; 角鲨烯标准样品来自中国药品生物制品检定所, 标称含量 99.5%, 0.5ml/支, 批号 140721-200601; 正己烷为色谱纯。

1.2 供试菌株

供试菌株为本实验室从红树林白骨壤 (*Avicennia reacecosa*) 生长的土壤中分离获得, 经鉴定为热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)。

1.3 菌株培养

菌株经活化后, 用 YPD 培养基 (1% 酵母膏, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖), 200rpm, 25℃ 培养 48h 至菌数达 2×10^8 /ml 以上, 取菌液 5000rpm 离心 15min, 收集菌体细胞, 冷冻干燥备用。

1.4 角鲨烯的萃取

称取约 2g 的干燥菌体细胞, 加入 3ml 正己烷, 在摇床以 200rpm 下浸提 12h, 取正己烷浸提物, 10000rpm 离心 10min, 取上清用于检测分析。

1.5 红外光谱分析

将待测液滴加到 CaF_2 上, 吹干正己烷, 将膜片放入红外光谱仪样品室中, $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 中红外区扫描, DTGS 检测器, 扫描累加 64 次。

1.6 气相色谱-质谱分析

色谱柱: HP-5 毛细管柱 (30m \times 0.320mm); 升温程序: 200℃, 以 40℃ /min 升温至 280℃, 保持 10min; 进样口温度: 280℃; 载气: 高纯氦气; 载气流速: 1.0ml/min; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 1 μ l。

EMV: 1200V; 离子源: 230℃; 四极杆: 150℃; 发射电源: 34.6 μ A; 电子能量: 70.0eV; 全扫描, 扫描质量范围为 20amu \sim 450amu; 溶剂延迟 3.0min。

2 结果与分析

2.1 红外光谱分析结果

热带假丝酵母菌株细胞用正己烷萃取后, 用傅里叶红外光谱仪测得光谱图 (图 1), 同时测得角鲨烯标准样品光谱 (图 2)。利用 Nicolet Condensde 红外数据库得出被测样品可能的化合物 (表 1), 从表 1 可以看出, 匹配度从高到低依次是: Decane (癸烷), Octane (辛烷), Tetrabutylammonium bromide (四丁基溴化铵), Squalene (角鲨烯), Heptane (庚烷) 以及 Eosin B (曙红 B)。考虑到溶剂为正己烷, 所以可以排除样品中含癸烷、辛烷和庚烷等物质。

通过比较红外谱图可知, 在波数 $4000 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 之间, 菌株样品和标准样品有相同的吸收波数, 分别是 2970 cm^{-1} 、 2930 cm^{-1} 、 2858 cm^{-1} 、 2359 cm^{-1} , 且吸收峰最强; 在波数小于 2000 cm^{-1} 时, 菌株样品和标准样品大部分吸收峰基本一致, 但有一部分吸收峰表现出差异, 这可能是菌株本身产生多个不同化合物所致。因此, 根据红外光谱检索结果可知该样品含角鲨烯的可能性比较大。

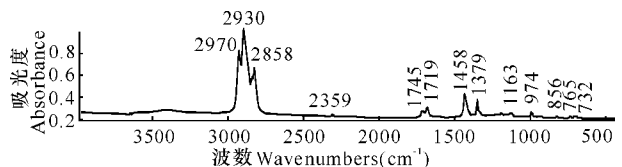


图 1 菌株细胞萃取液红外光谱

Fig. 1 IR chromatogram of cell extract

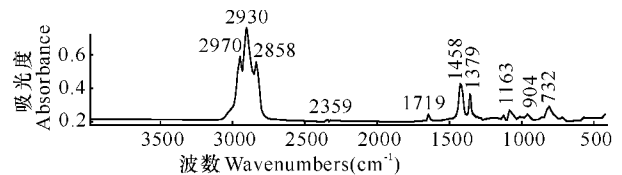


图 2 角鲨烯标准样品红外光谱

Fig. 2 IR chromatogram of standard squalene samples

表 1 菌株细胞萃取液红外数据库检索结果

Table 1 Access results of cell extract from infrared database

序号 Number	化合物名称 Compound Name*	检索号 Search Number	分子量 Molecular Weight	匹配度 Matching (%)
1	癸烷 Decane	6	164	94
2	辛烷 Octane	4	114	93
3	四丁基溴化铵 Tetrabutylammonium bromide	523	322	92
4	角鲨烯 Squalene	18	410	91
5	庚烷 Heptane	18	100	90
6	曙红 B, Eosin B	839	624	90

*: 表示纯度为 99%。

2.2 GC-MS 鉴定分析结果

菌株细胞用正己烷萃取后, 其萃取物用 GC-MS 进行检测分析得出总离子流图 (图 3) 及质谱图 (图 4)。从质谱图和 NIST08.L 质谱数据库检索结果看 (表 2), 当样品保留时间为 5.756min 时, 检索结果中匹配度高的 (匹配度 99% \sim 90%) 均为角鲨烯物质, 说明该样品中含有角鲨烯活性物质。

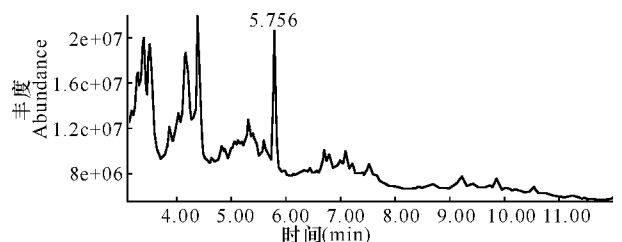


图 3 菌体细胞萃取液总离子流

Fig. 3 Total ion chromatograms of cell extract

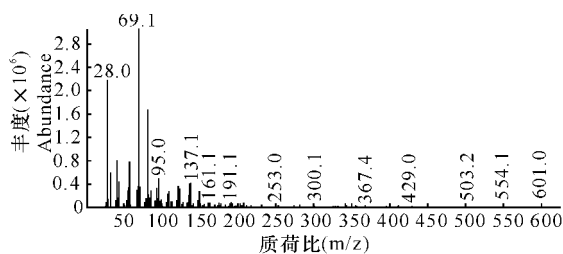


图 4 菌株细胞萃取液质谱

Fig. 4 Mass spectrum of cell extract

表 2 菌株细胞萃取液质谱数据库检索结果

Table 2 Access results of cell extract from MS database

序号 Number	化合物名称 Compound Name	检索号 Search Number	分子量 Molecular Weight	匹配度 Matching (%)
1	角鲨烯 Squalene	198715	410	99
2	角鲨烯 Squalene	198698	410	97
3	角鲨烯 Squalene	198700	410	96
4	角鲨烯 Squalene	198717	410	96
5	角鲨烯 Squalene	198699	410	94
6	角鲨烯 Squalene	198716	410	90

2.3 菌株中角鲨烯含量 GC-MS 分析结果

2.3.1 分析条件

角鲨烯是一种高度不饱和烃类化合物,分子量较大,沸点高(280℃),难挥发,本实验选用的色谱柱温度为 280℃,并根据角鲨烯质谱图选择 SIM 模式,选择检测离子的质荷比(m/z)为 69.1,95.0,137.1。

2.3.2 方法的线性范围和最低检出限

准确称取 0.0880g 角鲨烯置 10ml 容量瓶中,加正己烷至刻度,混匀,得到浓度为 8.80mg/ml 的标准储备液。移取适量储备液,用正己烷稀释成浓度为 0.02640mg/ml、0.05280mg/ml、0.07920mg/ml 的标准使用液。取 1μl 进样,以峰面积对浓度进行线性回归,结果表明,在上述范围内线性良好,回归方程为 $Y = 0.03352X - 0.01367$, $R = 0.9999$ 。在测定条件下,当信噪比为 3 时,角鲨烯的最低检出限为 0.6 ng/ml。

2.3.3 方法准确度和回收率

采用直接测量标准样品的方法,用正己烷准确配制 6 个浓度为 0.0864mg/ml 的已知标准样,取 1μl 进样,并计算回收率,6 个样检测结果为 0.088mg/ml、0.087mg/ml、0.084mg/ml、0.083mg/ml、0.085mg/ml、0.084mg/ml,检测平均值为 0.085mg/ml,平均回收率为 98.7%,相对标准偏差为 5.9%。

2.3.4 热带假丝酵母含量分析

用所建立的方法对热带假丝酵母菌株脂溶性成

分进行分析,得出该菌株角鲨烯含量在 2.30mg/g~2.38mg/g 之间,平均含量为 2.35mg/g。

3 结束语

角鲨烯是一种稀有且昂贵的生物活性物质,由于国际上相继出台深海鲨鱼捕杀禁令,势必导致角鲨烯来源越来越少。为了解决角鲨烯来源问题,有机化学家曾探索了多种化学合成途径,但由于中间体及其合成路线复杂,难以实现产业。目前,国际上开展了一些海洋生物研究,希望能从海洋极端微生物中筛选出高效、高产的角鲨烯菌种。本研究从红树林生长土壤中筛选获得的热带假丝酵母菌株中检测到角鲨烯,而且产量高达 2.38mg/g,远远高于目前国际上利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)生产角鲨烯的含量水平(0.43mg/g)^[7]。本研究成果使利用菌株产业化生产角鲨烯活性物质成为可能,并对保护深海鲨鱼这一海洋珍稀物种具有十分重要意义。

参考文献:

- [1] Takahira O, Ichiro K, Norio T, et al. Microbial production of squalene by a nicotinic acid-resistant mutant derived from *Fusarium* sp No. 5-128B[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering(Japan), 1994, 77(4): 436-438.
- [2] 赵振东,孙震. 化学及生物学方法合成角鲨烯研究现状[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(4): 95-98.
- [3] Yamaguchi T, Nakagawa M, Hidaka K, et al. Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in a murine tumor system[J]. Jpn J Cancer Res, 1985, 76(10): 1021-1026.
- [4] Nakagawa M, Yamaguchi T, Fukawa H, et al. Potentiation by squalene of the cyto-toxicity of anticancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor[J]. Jpn J Cancer Res, 1985, 76(4): 315-520.
- [5] Ohkuma T, Otagiri K, Tanaka S, et al. Intensification of host's immunity by squalene in sarcoma 180 bearing ICR mice[J]. J Pharmacobio-dyn, 1983, 6(2): 148-151.
- [6] 吴时敏. 角鲨烯开发利用[J]. 粮食与油脂, 2001(1): 36.
- [7] Bhattacharjee P, Shukla V B, Singhal R S, et al. Studies on fermentative production of squalene[J]. World Journal of Microbiol and Biotechnol, 2001, 17(8): 811-816.

(责任编辑:陈小玲 邓大玉)