

液相色谱/四级杆飞行时间质谱分析烟酸芽胞杆菌发酵产物苯乳酸

朱育菁, 刘波*, 郑梅霞, 陈峥

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘要: **目的** 对烟酸芽胞杆菌 *Bacillus niacini* FJAT-14202 来源的苯乳酸成分进行分析与检测。**方法** 采用液相色谱/四级杆飞行时间质谱(liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry)分析烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中胞外代谢物的成分。利用 MassHunter 软件, 对原始数据进行分子特征提取, 通过 Metlin 代谢物质谱数据库检索比对获得代谢物的信息。**结果** 在烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中检测到 811 种代谢物, 通过 Metlin 谱库搜索获得初步鉴定的有 165 种。其中, 发现了具有生物活性的物质苯乳酸, 其匹配得分达到 96.52, 占发酵液总代谢物相对含量的 5.31%, 保留时间分别为 2.1057 min, 精确质量数为 166.0552。**结论** 苯乳酸的发现为烟酸芽胞杆菌的开发与利用提供理论依据。

关键词: 液相四级杆飞行时间质谱; 烟酸芽胞杆菌; 胞外代谢物; 苯乳酸

Analysis on phenyllactic acid from *Bacillus niacini* based on liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry

ZHU Yu-jing, LIU Bo*, ZHENG Mei-xia, CHEN Zheng

(Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and test on active substance from *Bacillus niacini* FJAT-14202. **Methods** Extracellular metabolites of *Bacillus niacini* FJAT-14202 were analyzed by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Molecular feature extraction (MFE) and database retrieval were applied by Agilent Mass Hunter software, for the information overall metabolites. **Results** Totally 811 compounds were detected, and 165 of them were identified by library searching of Metlin database. The match score of phenyllactic acid was 96.52 and its relative content was 5.31%. The retention time of phenyllactic acid was about 2.1057 min, and its accurate mass was 166.0552. **Conclusion** The results provide the theory basis for development and utilization of phenyllactic acid from *Bacillus niacini*.

KEY WORDS: liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry; *Bacillus niacini*; extracellular metabolites; phenyllactic acid

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370059)、福建省种业创新项目“福建芽胞杆菌资源保藏中心”、福建省公益性项目(2015R1018-1, 2015R1018-11)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31370059), Fujian Seeding Industry Innovation Project “Fujian Resource Preservation Center of the Bacillus-like Bacteria”, and the Commonweal Project of Fujian Province (2015R1018-1, 2015R1018-11)

*通讯作者: 刘波, 研究员, 主要研究方向为微生物生物技术与农业生物药物。E-mail: fzliubo@163.com

*Corresponding author: LIU Bo, Professor, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian 350003, China. E-mail: fzliubo@163.com

1 引言

芽胞杆菌由低 G+C 含量、革兰氏阳性、产芽胞的杆状细菌组成, 可以产生多种多样的活性物质, 在工业、农业、医学、环境等领域有着重要的经济价值^[1]。烟酸芽胞杆菌(*Bacillus niacini*)靠占替诺烟酸盐生存^[2,3], 能够产烟酸^[4], Kurata 等^[5]报道烟酸芽胞杆菌能够产透明质酸盐。

苯乳酸(又名 3-苯基乳酸或 2-羟基-3-苯基丙酸, Phenyllactic acid, C₉H₁₀O₃, CAS 号: 828-01-3), 是由微生物如乳酸菌产生的一种新型天然抗菌物质^[6]。它存在于天然蜂蜜^[7]、咸菜^[8]中, 对人和动物安全无毒。苯乳酸对多种食源性致病菌如致病性大肠杆菌^[9,10]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[11], 腐败菌包括产毒素的丝状真菌如疣孢青霉(*Penicillium verrucosum*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)和罗克福尔青霉菌(*Penicillium roqueforti*)^[12], 有很强的抑菌作用, 可作为一种新型生物防腐剂, 在乳品工业中具有广阔的应用前景。目前报道的苯乳酸的产生菌有乳酸菌^[13]、肠系膜明串珠菌^[14]等, 未见从芽胞杆菌产生苯乳酸的报道。

关于烟酸芽胞杆菌的研究报道较少, 其产苯乳酸成分研究未见报道。本研究选用液相四级杆飞行时间质谱(LC-QTOF-MS), 对该菌菌株发酵液中苯乳酸成分进行研究, 旨在为进一步探索烟酸芽胞杆菌生理生化特征提供科学依据, 并为苯乳酸的来源提供了新的途径。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

供试菌株: 烟酸芽胞杆菌(*Bacillus niacini* FJAT-14202), 德国引进, 现保存在福建省农业科学院农业生物资源研究所。

培养基: 活化培养基为 NA 培养基; 种子培养基和发酵培养基均为 TSB 培养基(美国 BD 公司)。

试剂: 色谱纯乙腈(美国 JT Baker 公司), 色谱纯乙酸铵(CNW, 上海安谱科学仪器有限公司), 色谱纯甲醇(美国 JT Baker 公司)。

仪器: 液相四级杆飞行时间质谱联用仪 Agilent 1260/6520(美国安捷伦科技公司); 电子天平 METTLER TOLEDO AL104(瑞士梅特勒-托利多仪器

有限公司); 恒温培养振荡器智城 ZHWY-2102C(上海智城分析仪器有限公司); pH 计 Sartorius PB-10(德国赛托利斯公司)。

2.2 实验方法

发酵液制备: 将保存的烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 菌株取出, 采用平板划线法活化菌种。挑取单菌落, 接种于 TSB 液体培养基中, 于 30 °C, 170 r/min 条件下培养 48 h。

样品制备方法: 取烟酸芽胞杆菌发酵液, 12000 r/min 离心 10 min; 离心后取上清液加入等体积冷甲醇(-20 °C), 漩涡震荡混合。置于 4 °C 冰箱 15 min 后, 14000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 置于 4 °C 冰箱中准备进样。

色谱质谱条件: 色谱柱为 Zorbax SB-Aq C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL; 流动相: A=10 mmol/L 乙酸铵+水, B=甲醇; 流速: 0.3 mL/min; 梯度程序: 0 min 5%B; 8 min 5%B; 38 min 95%B; 45 min 95%B; 47 min 5%B; 55 min 5%B; MS 运行条件: 负离子模式; 干燥气温度: 350 °C, 干燥气流速: 5 L/min; 喷雾压力: 30 psig; 毛细管电压: 3500 V; 碎裂电压: 100 V; 分流电压 65.0 V; 质量数范围 100~3000 *m/z*。MS 运行条件: 负离子模式。

3 结果与分析

3.1 烟酸芽胞杆菌 *Bacillus niacini* FJAT-14202 发酵液 LC-MS 物质成分分析

烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液的总离子流图如图 1 所示, 共有 811 种物质, 在 Metlin 数据库中检索初步鉴定 165 种, 匹配得分(Score)高于 80 的共 18 个, 见表 1。其中含量大于 1% 的有 7 种: (1)苯乳酸(phenyllactic acid), 相对含量为 5.31%; (2)6-羟基己酸(6-hydroxy caproic acid), 相对含量为 4.14%; (3)PS(16:1(9Z)/0:0), 相对含量为 1.42%; (4)N,N-二乙基甘氨酸(N,N-diethylglycine), 相对含量为 1.29%; (5)threonolactone, 相对含量为 1.28%; (6)喷他霉素(fungichromin), 相对含量为 1.24%。

3.2 烟酸芽胞杆菌 *Bacillus niacini* FJAT-14202 发酵液中苯乳酸成分分析

烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中苯乳酸的化合物色谱图及离子色谱图如图 2、3 所示, 其保留时间为 2.1057 min, 峰的相对丰度为 2.34×10⁵。苯乳酸

同位素峰结果见图 4, 质谱图见图 5, 其中同位素峰图提供了同位素峰的相对强度和同位素峰的间距。由于本试验采用负离子模式电离, 负离子模式下产生的不同的分子离子, 如 $[M-H]^-$ 、 $[M+X]^-$ (X 为所有溶剂或缓冲剂阴离子)等, 故判断 165.0552 峰为 $[M-H]^-$ 分

子离子峰, 推测该成分的质量数为 166.0552。根据所预测的分子式结果, 同时参考同位素峰的相对强度和间距, 以及与代谢物质谱数据库 Metlin 库中搜索并通过质量分析进行代谢物鉴定, 根据匹配的分值, 鉴定该成分为苯乳酸。

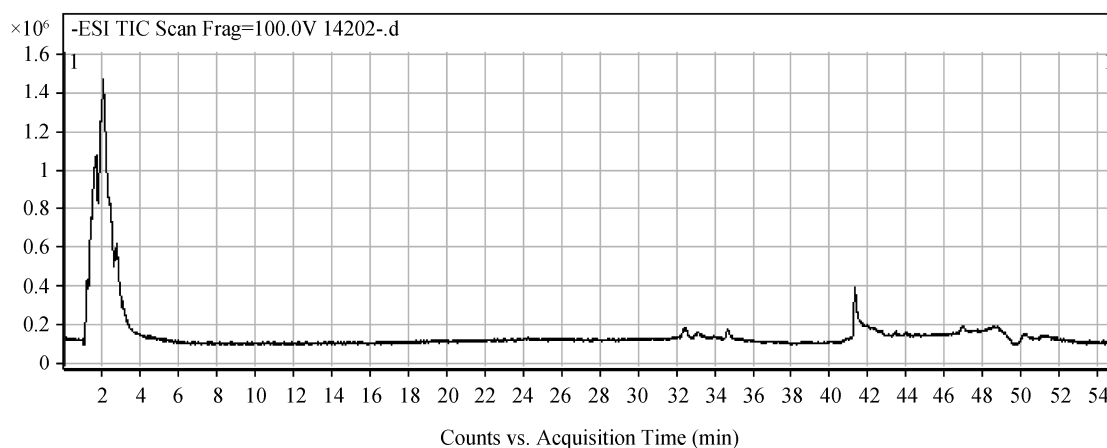


图 1 烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液的总离子流图

Fig. 1 TIC of *Bacillus niacini* FJAT-14202

表 1 烟酸芽胞杆菌 *Bacillus niacini* FJAT-14202 发酵液高匹配成分

Table 1 High matching compositions of fermentation broth from *Bacillus niacini* FJAT-14202

序号 No.	化合物名称	分子式	匹配得分	分子量	质荷比 m/z	保留 时间	相对含 量%	CAS 号	KEGG 号
1	phenyllactic acid	$C_9H_{10}O_3$	96.52	166.0625	165.0552	2.1057	5.31	828-01-3	C01479
2	6-hydroxy caproic acid	$C_6H_{12}O_3$	99.58	132.0787	131.0714	2.0731	4.14		C06103
3	PS(16:1(9Z)/0:0)	$C_{22}H_{42}NO_9P$	84.9	495.2606	494.2535	1.8997	1.42		
4	N,N-diethylglycine	$C_6H_{13}NO_2$	96.74	131.0947	130.0875	1.41	1.29		C16647
5	threonolactone	$C_4H_6O_4$	87.44	118.0268	117.0195	1.4417	1.28	21730-93-8	
6	fungichromin	$C_{35}H_{58}O_{12}$	95.59	670.392	669.385	2.7734	1.24	6834-98-6	C13299
7	5-(3-pyridyl)-2-hydroxytetrahydrofuran	$C_9H_{11}NO_2$	91.51	165.0786	164.0713	1.4797	0.74	53798-73-5	C19578
8	9a-fluoroallotetrahydrocortisol	$C_{21}H_{33}FO_5$	80.03	384.2317	383.2247	1.5609	0.63	2193-81-9	
9	aculeacin A	$C_{51}H_{82}N_8O_{17}$	84.86	1078.5775	1077.5702	1.9737	0.48	58814-86-1	C01776
10	threonolactone	$C_4H_6O_4$	86.21	118.0266	117.0194	2.0193	0.45	21730-93-8	
11	6-hydroxy caproic acid	$C_6H_{12}O_3$	87.5	132.0785	131.0712	3.0639	0.27		C06103
12	oleic acid(d2)	$C_{18}H_{32}D_2O_2$	86.25	284.2683	283.261	45.6401	0.23		
13	vasicinol	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	80.81	204.0889	203.0815	1.5159	0.21	5081-51-6	C10743
14	Ala His His	$C_{15}H_{21}N_7O_4$	81.21	363.165	362.1578	1.6276	0.18		
15	phenyllactic acid	$C_9H_{10}O_3$	82.42	166.0622	165.0549	3.1726	0.14	828-01-3	C01479
16	alpha-hydroxy-isobutyric acid	$C_4H_8O_3$	83.96	104.0479	103.0406	1.4063	0.1		
17	2,4-dihydroxy-butanoic acid	$C_4H_8O_4$	85.8	120.0421	119.0349	1.3049	0.13		
18	(3S,5S)-3,5-diaminohexanoate	$C_6H_{14}N_2O_2$	84.53	146.1051	145.0978	1.1007	0.06	17027-83-7	C01186

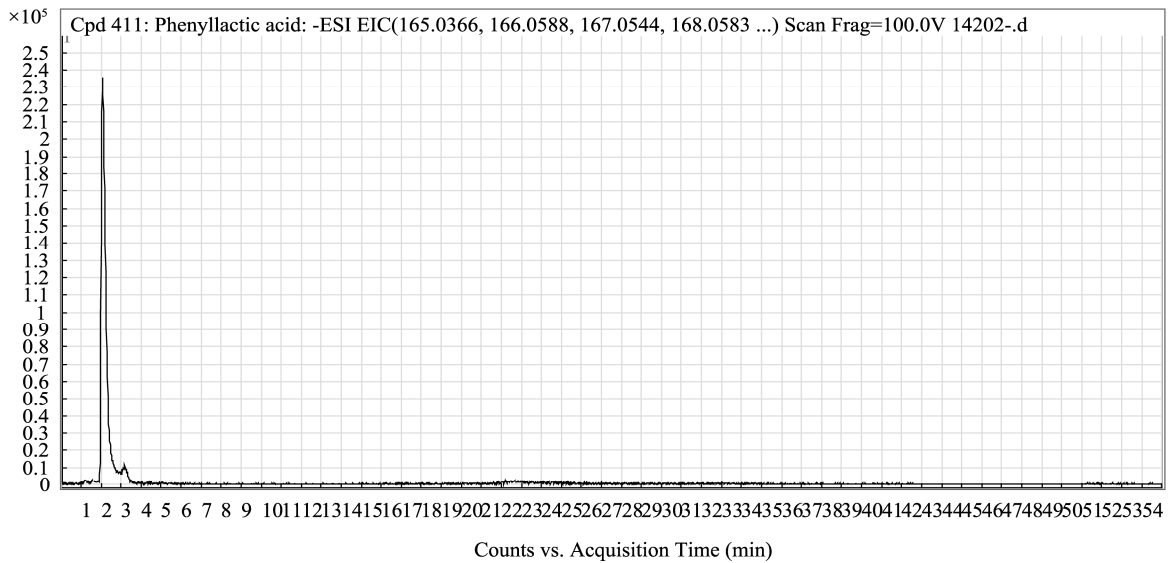


图 2 烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中苯乳酸化合物提取色谱图

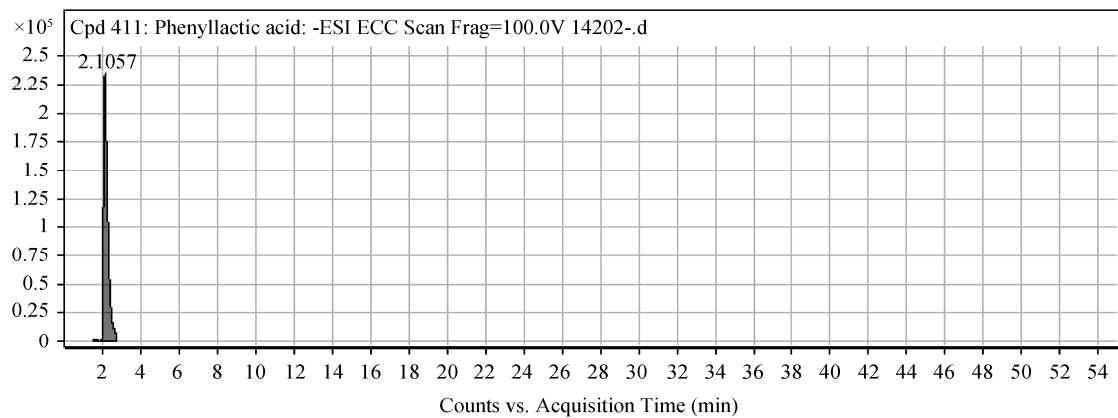
Fig. 2 Extracted compound chromatogram(ECC) of phenyllactic acid in *Bacillus niacini* FJAT-14202

图 3 烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中苯乳酸离子提取色谱图

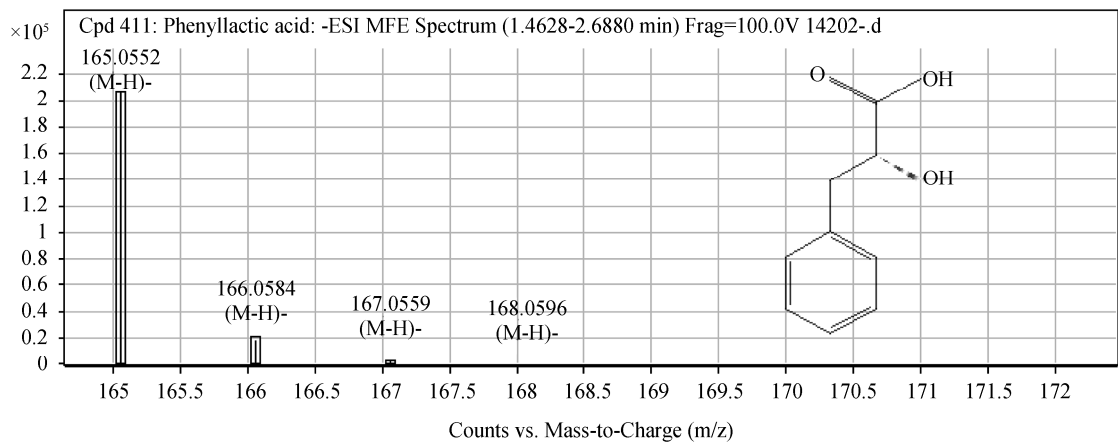
Fig. 3 Extracted ion chromatogram (EIC) of phenyllactic acid in *Bacillus niacini* FJAT-14202

图 4 烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中苯乳酸同位素峰结果

Fig. 4 Isotopic peak of phenyllactic acid in *Bacillus niacini* FJAT-14202

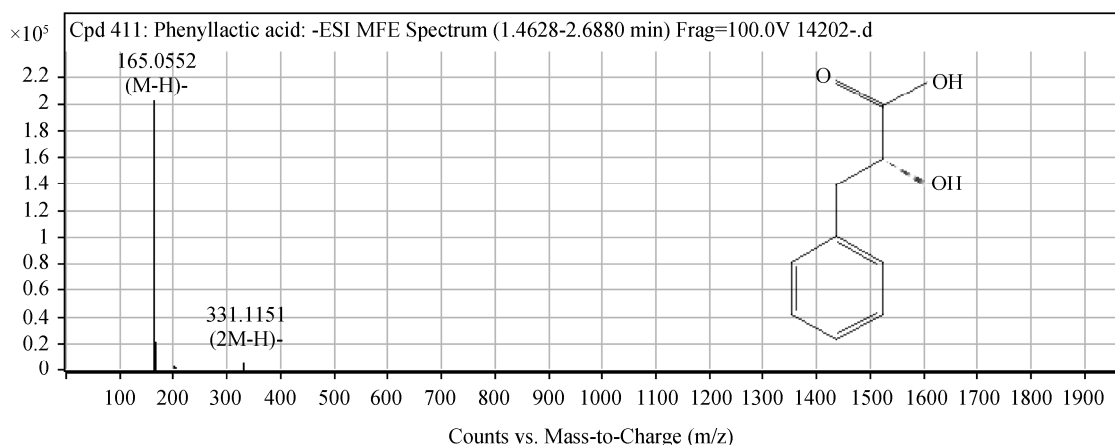


图 5 烟酸芽胞杆菌 FJAT-14202 发酵液中苯乳酸质谱图

Fig. 5 Mass spectrum of phenyllactic acid in *Bacillus niacini* FJAT-14202

4 讨论

苯乳酸分子小, 在高温和低 pH 下具有很好的稳定性, 可以有效抑制革兰氏阴性、阳性细菌和真菌的生长等, 且具有安全性。苯乳酸在食品领域可作为一种新型生物防腐剂^[15]、酸味剂^[16]等, 可用在果酒、饮料、肉类、食品、糕点制作、蔬菜腌制以及罐头加工、粮食加工、水果的贮藏, 具有调节 pH 值、抑菌、延长保质期、调味、保持食品色泽、提高产品质量等作用, 又可增加食物的美味; 苯乳酸在医药领域可用于合成降血糖制剂^[17]、非蛋白氨基酸 statine^[18]、驱肠虫药^[19]等; 使苯乳酸具有很大的应用潜能。

苯乳酸的合成有化学和生物两条途径, 与化学合成相比, 生物合成更安全环保。苯乳酸的生物合成方法主要是通过乳酸菌发酵生产获得^[20], 但是, 芽胞杆菌通过自身发酵产苯乳酸的研究还未见报道。

5 结论

本文报道了烟酸芽胞杆菌能够产苯乳酸, 且在对烟酸芽胞杆菌的发酵液的质谱分析中, 发现苯乳酸相对含量最高, 为 5.31%, 匹配得分为 96.52, 则烟酸芽胞杆菌的发酵液中苯乳酸的含量为 10.62%。该研究为烟酸芽胞杆菌来源的抗真菌抗生素的开发与利用提供了理论依据。

参考文献

[1] Pandey RC, Guenther EC, Aszalos AA, Brajtburg J. Physicochemical and biological comparison of polyene

macrolide antibiotics fungichromin, lagosin and cogomycin [J]. J Antibiot (Tokyo), 1982, 35(8): 988–996.

[2] 芦慧, 魏赛金, 涂晓嵘, 等. 两种新型多烯大环内酯抗生素对四种水稻病原真菌的抗菌活性和毒力测定[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(6):1123–1127.

Lu H, Wei SJ, Tu XQ, *et al.* Studies on antifungal activity and toxicity of new type polyene antibiotics on four kinds of rice pathogenic fungi [J]. Hubei Agric Sci, 2012, 51(6): 1123–1127.

[3] Shih HD, Liu YC, Hsu FL, *et al.* Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani* [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(1): 95–99.

[4] 魏赛金, 张智平, 涂晓嵘, 等. 链霉菌 702 抗尖孢镰刀菌次级代谢产物的分离鉴定及活性研究[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(5): 982–986.

Wei SJ, Zhang ZP, Tu XQ, *et al.* Studies on the isolation, identification and activity of anti-fusarium *ocysporum* secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. 702 [J]. Acta Agric Univ Jiangxi, 2011, 33(5): 982–986.

[5] Vilar VJP, Bothelho CMS, Boaventura RAR. Equilibrium and kinetic modeling of Cd biosorption by algae *Gelidium* and agar extraction algal waste [J]. Water Res, 2006, 40(2): 291–302.

[6] 刘波, 王阶平, 陶天申, 等. 芽胞杆菌属及其近缘属种名目录 [J]. 福建农业学报, 2015, 30(1): 38–59.

Liu B, Wang JP, Tao TS, *et al.* List of Species Mame for the *Aacillus*-like Bacteria [J]. Fujian J Agric Sci, 2015, 30(1): 38–59.

[7] Nagel M, Andreesen JR. *Bacillus niacini* sp. nov., a nicotinatemetabolizing mesophile isolated from soil [J]. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41: 134–139.

[8] Ensign JC, Rittenberg SC. The pathway of nicotinic acid oxidation by a *Bacillus* species [J]. J Biol Chem, 1964, 239: 2285–2291.

- [9] Harvey ZH, Snider MJ. Draft genome sequence of the nicotinate-metabolizing soil bacterium *Bacillus niacini* DSM 2923[J]. Genome Announc, 2014, 2(6): 1–2.
- [10] Kurata A, Matsumoto M, Kobayashi T, *et al.* Hyaluronate lyase of a deep-sea *Bacillus niacin* [J]. Mar Biotechnol (NY), 2015, 17(3): 277–84.
- [11] Zheng Z, Zhao M, Zang Y, *et al.* Production of optically pure L-phenyllactic acid by using engineered *Escherichia coli* coexpressing L-lactate dehydrogenase and formate dehydrogenase [J]. J Biotechnol, 2015, 207: 47–51.
- [12] Wilkins AL, Lu Y, Molan PC. Extractable organic substances from New Zealand unifloral manuka (*Leptosperum scoparium*) honeys [J]. J Apicult Res, 1993, 32:3–9.
- [13] Asa Svanström, Silvio Boveri, Emma Boström, *et al.* The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi [J]. BMC Res Notes, 2013, 6(1): 464–470.
- [14] Li L, Shin SY, Lee KW, *et al.* Production of natural antimicrobial compound D-phenyllactic acid using *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 whole cells involving highly active D-lactate dehydrogenase [J]. Lett Appl Microbiol, 2014, 59(4): 404–411.
- [15] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾. 新型生物防腐剂-苯乳酸在食品中的研究与应用[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 87–91.
- Li XF, Jiang B, Pan BL. Research and application in food of phenyllactic acid as a novel biopreservative: a review [J]. Food Ferment Ind, 2007, 33(5): 87–91.
- [16] 张丽华, 何余堂. 不同防腐剂在酱油保鲜中应用的探讨[J]. 中国制造, 2008, 5(5): 67–68.
- Zhang LH, He YT. Analysis on different anticorrosive agents in soy sauce antistaling [J]. China Brewing, 2008, 5(5): 67–68.
- [17] Urban FJ, Moore BS. Synthesis of optically active 2-benzylidihydrobenzopyrans for the hypoglycemic agent englitazone [J]. J Heterocyclic Chem, 1992, 29(2): 431–438.
- [18] Kano S, Yuasa Y, Yokomatsu T, *et al.* Highly stereocontrolled synthesis of the four individual stereoisomers of statine [J]. J Organic Chem, 1988, (53): 3865–3868.
- [19] Weckwerth W, Miyamoto K, Linuma K, *et al.* Biosynthesis of PF1022A and related cyclooctadepsipeptides [J]. J Biol Chem, 2000, 275(23):17909–17915.
- [20] Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, *et al.* Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 233: 289–295.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



朱育菁, 博士, 研究员, 主要从事农业生物药物与生物防治的研究。
E-mail: zyjingfz@163.com



刘波, 博士, 研究员, 主要从事微生物生物技术与农业生物药物研究。
E-mail: fzliubo@163.com