

# 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)高温逆境代谢产物的 GC-MS 分析\*

徐年军 何艳丽 唐军 严小军

(宁波大学生命科学与生物工程学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室(宁波大学) 宁波 315211)

**提要** 利用固相微萃取(SPME)和气相色谱/质谱联用技术(GC-MS)分析龙须菜在高温逆境中可挥发性代谢产物的变化规律。最优分析条件为样品 60 平衡 30min, 用聚二甲基硅氧烷-二乙烯基苯纤维头(PDMS/DVB)顶空萃取吸附 25min, 在 210 下解吸附 5min 后对解吸物进行 GC-MS 检测。结果表明, 从龙须菜中检测到 56 个挥发性代谢产物, 在高温逆境条件下主要有烯烃(61.67%)、醛(22.47%)、酮(5.98%)、烷烃(1.92%)、卤代物(0.65%)、醇(0.41%)、酯(0.37%)、其它(1.34%)。比较了常温和高温逆境培养条件下龙须菜中代谢产物的相对含量变化规律: 高温胁迫下 E-2-戊烯醛等 7 种代谢产物含量显著减少, 三氯甲烷等 4 种代谢产物含量显著增加。其中 E-2-庚烯醛、E,E-2,4-庚二烯醛、2-正戊基咪喃和三氯甲烷可能与龙须菜高温逆境生理有关。本研究可为龙须菜抗逆生理和抗高温品系选育提供理论依据和指导。

**关键词** 龙须菜, 高温逆境, 挥发性代谢产物, GC-MS

**中图分类号** Q946

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)是红藻门、杉藻目、江蓠属海藻, 在我国广泛分布于黄海、渤海低潮带或潮下带海滩, 是重要的产琼胶江蓠品种。野生龙须菜主要生长在北方, 适温范围为 12—25, 经过改良和品种培育, 养殖龙须菜的适温范围大为提高, 目前已经在浙江南部、福建、广东等地大量养殖。龙须菜的最适合生长季节是春、秋两季, 在夏季气温较高时生长缓慢, 长时间的高温可使藻体严重损伤, 生长期缩短, 产量和品质下降。江蓠属海藻在高温胁迫下的酶和脯氨酸的变化特性都有相关的报道(Lee, 1998; Chang *et al*, 1999), 但龙须菜高温逆境相关的代谢产物的积累变化规律方面的研究不多。

海藻中挥发性代谢产物具有多种重要的生理功能, 在生态上可作为诱食剂、拒食剂、化学防御剂等(Romano *et al*, 2003; Hockelmann *et al*, 2004; Fink *et al*, 2006)。有的化合物还显示出很强的药理活性, 如抗菌、抗虫害、选择性抗肿瘤活性等(Ozdemir *et al*,

2004; Kladi *et al*, 2004; Herrero *et al*, 2006; Karabay *et al*, 2007)。海藻分泌的挥发性卤代化合物还在海洋生态系统中发挥着重要的作用(Gschwend *et al*, 1985), 研究表明海藻挥发性代谢产物与其环境温度密切相关(Abrahamsson *et al*, 2003)。

海藻中挥发性物质的分析一般采用 GC-MS 法, 但提取方法较多, 不同的提取方法获得的代谢产物有所不同。如网翼藻(*Dictyopteris membranacea*)的水蒸馏法提取产物主要是 C11 烃, 微波辅助水蒸馏法获得的主要成分是倍半萜类, 而超临界萃取法获得的主要代谢产物是含硫化合物(Hattab *et al*, 2007)。固相微萃取法(SPME)是近年来发展起来的挥发性物质的快速提取技术, 其具有操作简单、引入杂质少、可重复性强、提取物种类丰富等优点, 如 Lepape 等(2004)用 SPME 提取鉴定了掌状红皮藻(*Palmaria palmata*)中 23 个主要挥发性代谢产物。本实验在优化了 SPME 提取条件的基础上, 研究了龙须菜中挥发性代谢产

\* 教育部长江学者和创新团队支持计划项目, IRT0734 号; 国家自然科学基金资助项目, 40876073 号; 浙江省钱江人才计划项目, 2007R10038 号。徐年军, 博士, 研究员, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2008-02-25, 收修改稿日期: 2008-04-23

物的组成规律,并初步研究了高温逆境条件下代谢产物的变化规律,找到了差异显著的代谢产物,为龙须菜种质选育和抗高温逆境生理研究提供了科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 实验材料** 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)于2007年10月采于浙江温州养殖场,在本实验室进行保种培养半年以上,藻种由宁波大学海洋生物工程重点实验室骆其君副教授鉴定。实验前预培养1周,每2天更换一次海水。正式实验光照强度3000 lx,光周期12h:12h(L:D)。设置25 适温培养组和33 高温胁迫组,每组3个平行样,培养时间为7d。取样时,新鲜海藻用滤纸吸去表面的海水,液氮处理快速冷冻后-20 保存。

**1.1.2 实验仪器** 气质联用仪为日本岛津QP2010型。SPME萃取手动进样手柄、10ml SPME专用萃取瓶、聚二甲基硅氧烷-二乙烯基苯(65 $\mu$ m PDMS/DVB)、碳分子筛-聚二甲基硅氧烷(75 $\mu$ m CAR/PDMS)纤维萃取头均购自美国Supelco公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 挥发性代谢产物的吸附** 取0.05g海藻样品置于10ml SPME专用萃取瓶中,在60 恒温水浴下平衡30min,将固相微萃取装置穿过隔膜插入密封瓶中,推出纤维头顶空萃取25min,之后将固相微萃取装置迅速插入GC-MS进样口,在210 不分流模式下解吸附5min。每个样品做2个平行分析。

### 1.2.2 GC-MS分析条件

**色谱条件** 石英毛细管色谱柱: vocol 60m  $\times$  0.32mm  $\times$  1.8 $\mu$ m;载气:高纯He,不分流进样;流速1.29ml/min,程序升温:起始柱温35 ,保持3min,以3 /min升温至40 ,保持1min,然后以5 /min升温至210 ,保持20min。

**质谱条件:**电子轰击离子源(EI),接口温度210 ,离子源温度200 ,检测电压0.8kV,电子能量70eV,质量扫描范围:m/z 45—500;扫描速度:1000amu/s;扫描间隔:0.5s;离子强度阈值:500。

**1.2.3 化合物结构和含量分析** 运用GC-MS附带的NIST147、WILEY7和NIST27质谱数据库对色谱峰进行检索,根据质谱特征峰进行相似性检索,对重要化合物结合标准品对比和参考文献确认来判断龙须菜中挥发性代谢产物的结构。单个化合物的相对含量用其峰面积相对总峰面积的百分比来表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 两种 SPME 纤维头萃取效果的比较

两种纤维头对龙须菜中挥发性代谢产物的萃取效果有明显差异:同样的积分条件下(slope为1000/min),聚二甲基硅氧烷-二乙烯基苯纤维头(PDMS-DVB)自动积分化合物为87个,总峰面积为 $3.94 \times 10^8$ ,而碳分子筛-聚二甲基硅氧烷纤维头(CAR/PDMS)自动积分化合物仅有34个,总峰面积为 $1.59 \times 10^8$ 。对其中化合物进行结构鉴定和含量分析,PDMS-DVB纤维头萃取样品能够鉴定化合物49个,其中醛20个、烃类12个、酮类9个、酸类2个、醇类2个、其它化合物4个。运用CAR/PDMS纤维头分析样品能够鉴定化合物22个,其中醛2个、烃类16个、酸1个、其它化合物3个。

两种纤维头萃取的各类化合物的峰面积比较见图1,由图可以看出,PDMS-DVB纤维头吸附能力比较强,范围比较宽,萃取量比较大,从含量上看主要包括烃、醛、酮、醇、酸5大类化合物;而CAR/PDMS纤维头的吸附范围较窄,仅有其中的3类化合物。采用PDMS/DVB纤维头检测到的代谢产物无论是种类还是含量都比较高。本实验初期是用CAR/PDMS纤维头进行实验的,在实验过程中发现65 $\mu$ m的PDMS-DVB纤维头效果更好,因此重新进行了实验,取得了较好的实验结果。

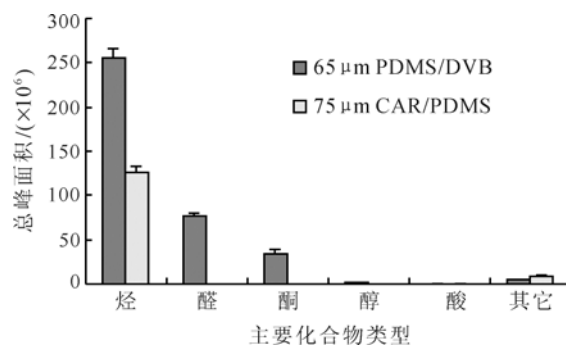


图1 两种纤维头对龙须菜中挥发性代谢产物的提取效果  
Fig.1 The effects of two types of SPME fibers on the extraction of volatile metabolites from *G. lemaneiformis*

### 2.2 萃取时间和萃取温度对响应值的影响

由于挥发性物质中含量最高的化合物对实验条件改变的响应比较明显,因此本实验以龙须菜中含量最高的1,3,5-octatriene的响应值作为参数来优化SPME的条件。图2是60 平衡30min条件下不同萃取时间对1,3,5-octatriene响应值的影响情况,在10—

25 之间, 随着时间的延长其峰高逐渐增大, 萃取时间达到 25min 后响应值基本不变。由于 SPME 是一个不断的吸附和解吸的平衡过程, 纤维头在 25min 达到动态平衡, 而在 30min 基本上与 25min 相同, 考虑到纤维头的使用寿命问题, 对龙须菜的挥发性物质萃取时间使用 25min。

图 3 是样品平衡 30min、萃取 25min 条件下, 不同萃取温度时 1,3,5-octatriene 响应值的变化曲线, 萃取温度从 40—60 响应值随着温度的升高明显增强, 在 60—80 相差不大, 因此本实验萃取温度选为 60 。

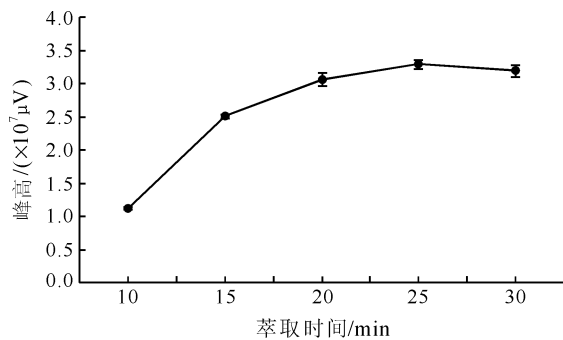


图 2 萃取时间对 1,3,5-octatriene 响应值的影响

Fig.2 The effects of extraction time on the response value of 1,3,5-octatriene

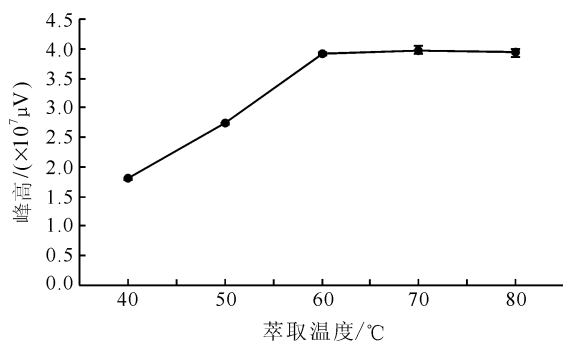


图 3 萃取温度对 1,3,5-octatriene 响应值的影响

Fig.3 The effects of extraction temperature on the response value of 1,3,5-octatriene

### 2.3 萃取方法重复性结果

从龙须菜挥发性代谢产物的成分看, 烯烃、醛类物质含量较高, 而酮类、醇类、酸类和卤代物含量较低。作者运用最优的实验条件, 即用 PDMS-DVB 纤维萃取头, 样品平衡 30min, 萃取 25min, 萃取温度 60 , 对龙须菜中的挥发性物质进行了 5 次平行性实验, 以各物质的峰面积的变化检测其重复性。结果表明: 运用 SPME 萃取和 GC-MS 分析方法得到实验结果重复性很好[相对标准偏差(RSD) = 1.9%—7.4%]。考虑到

经济因素, 正式实验只检测 3 次, 结果其取平均值。

### 2.4 挥发性成分的结构和相对含量

对适温(25 )和高温(33 )培养条件下龙须菜的挥发性代谢产物的结构和相对百分含量进行了分析和比较。结果见表 1, 表中挥发性化合物含量均为 3 次检测的平均值。

实验表明, 在 33 培养条件下, 龙须菜中能鉴别的挥发性代谢产物占总化合物的 94.80%, 其中主要有烯烃(61.67%)、醛(22.19%)、酮(5.98%)、烷烃(1.92%)、卤代物(0.65%)、醇(0.41%)、酯(0.37%)和其它化合物(1.34%)。

烯烃是龙须菜挥发性物质的主要成分, 主要有 1,3,5-octatriene(37.84%) 和 1,3-octadiene(20.72%)。1,3,5-octatriene 存在于许多水产品和海鲜中, 如新鲜太平洋鲑鱼、五大湖区鲑鱼、鲸鱼, 也存在于多种藻类中, 如蓝绿藻生物膜、大型海藻如墨角菜 *Fucus*、马尾藻 *Sargassum*、掌状红皮藻(*Palmaria palmata*)等(Lepape *et al*, 2004)。1,3,5-octadiene 与海藻配子体的性诱导机制相关, 曾被报道为墨角菜和马尾藻雌配子体的性吸引物(Kajiwara, 1980)。1,3-octadiene 是一种香味成分, 具有独特的蘑菇香味和类似腐殖质的味道, 土壤真菌据报道能产生这种 C-8 挥发性物质(Skjevraek *et al*, 2005)。1,3-octadiene 在藻类中普遍存在, 如美丽星杆藻(*Asterionella formosa*)能产生 1,3-octadiene 和多不饱和醛类物质, 该反应是在硅藻脂氧合酶(LOX)参与下形成的, 通过抑制该酶的作用, 能控制藻类产生不饱和醛的种类及其含量(Wendela *et al*, 1996)。

龙须菜挥发性代谢产物中种类最多的是醛类(20 种), 占总挥发性成分的 22.47%, 其中含量排在前三位的依次为 E-2-octenal(7.79%)、nonanal(3.25%)和 E-2-nonenal(2.48%)。还含有 2,4-octadienal、2-heptanal、2,4-heptadienal、heptanal、octanal、decanal、2,4-nonadienal、benzaldehyde 等, 这些化合物在许多藻类中都有报道(Hockelmann *et al*, 2004)。但文献报道这些藻类的醛主要是以饱和醛类和单不饱和醛为主(Kamenarska *et al*, 2002; 2006; Lepape *et al*, 2004), 而本实验中主要醛类以多不饱和醛类为主, 这可能从一个侧面说明龙须菜是一种具有强抗氧化作用的海藻(Sreenivasan *et al*, 2007)。Boonprab 等(2003)研究了海带(*Laminaria angustata*)中花生四烯酸氧化成 E-2-nonenal 等低分子醛类的代谢途径, 它是 LOX 酶催化下的裂解产物。其它醛类物质也具

表 1 25°C 和 33°C 条件下龙须菜中挥发性代谢产物  
Tab.1 The volatile metabolites in *G. lemaneiformis* grown at 25 and 33

保留时间 (min)	化合物	分子量	25		33	
			相对含量 <sup>1)</sup>	相似度 <sup>2)</sup>	相对含量 <sup>1)</sup>	相似度 <sup>2)</sup>
<b>14.900</b>	<b>chloroform<sup>3)</sup></b>	<b>118</b>	— <sup>4)</sup>	—	<b>0.28<sup>5)</sup></b>	<b>98</b>
16.672	3-methyl butanal	86	0.04	94	0.09	96
17.126	2-methyl butanal	86	0.09	97	0.12	96
18.447	2-ethyl furan	96	0.06	93	0.12	94
<b>22.086</b>	<b>E-2-pentenal</b>	<b>84</b>	<b>0.22</b>	<b>95</b>	<b>0.10</b>	<b>93</b>
23.297	1,3-octadiene	110	23.18	96	20.72	96
23.498	2,4-dimethyl-1-hexene	112	0.79	89	0.56	90
26.135	1,3,5-octatriene	108	34.14	95	37.84	95
26.492	4-ethylidene cyclohexene	108	0.27	94	0.39	94
26.936	2-n-butyl furan	124	0.11	95	0.09	95
27.456	E-1,3-nonadiene	124	0.36	93	0.36	94
27.720	n-heptanal	114	0.11	90	0.10	91
28.647	2,4,6-octatriene	108	0.28	96	0.36	95
29.129	2-methyl-1,5-heptadien-4-ol	126	0.15	87	0.09	87
<b>30.342</b>	<b>E-2-heptenal</b>	<b>112</b>	<b>0.70</b>	<b>96</b>	<b>0.24</b>	<b>97</b>
30.684	2,3-octanedione	142	0.20	91	0.17	91
30.812	1-octen-3-one	126	4.69	93	3.42	93
31.593	octanal	128	0.29	95	0.36	97
32.094	benzaldehyde	106	0.33	98	0.28	97
<b>32.194</b>	<b>E,E-2,4-heptadienal</b>	<b>110</b>	<b>0.76</b>	<b>94</b>	<b>0.15</b>	<b>95</b>
32.548	5-methyl-5-hepten-3-one	126	0.18	90	0.13	90
32.703	4-heptenoic acid methyl ester	142	0.10	94	0.11	94
32.823	2-propyl-furan	110	1.63	94	0.90	95
33.362	hexanoic acid methyl ester	130	0.12	82	0.17	81
33.453	1-chloro-2-octene	146	0.13	83	0.17	81
33.530	1-cycloocten-3-ol	126	0.25	86	0.20	86
<b>33.822</b>	<b>2-pentyl-furan</b>	<b>138</b>	<b>0.86</b>	<b>84</b>	<b>0.23</b>	<b>84</b>
34.018	E-2-octenal	126	7.17	97	7.79	97
35.154	nonanal	142	2.71	97	3.25	97
35.351	3-bromo-pentane	150	0.39	89	0.25	89
<b>35.623</b>	<b>E,E-2,4-nonadiene</b>	<b>124</b>	<b>0.73</b>	<b>88</b>	<b>0.27</b>	<b>88</b>
<b>35.964</b>	<b>3,5-dimethyl-cyclohexanol</b>	<b>128</b>	<b>0.22</b>	<b>83</b>	<b>0.05</b>	<b>85</b>
36.245	E,E-2,4-octadienal	124	0.68	92	0.46	93
36.466	dodecane	170	0.14	85	0.17	84
37.211	1,3,5-undecatriene	150	0.39	85	0.50	85
37.406	E-2-nonenal	140	2.78	90	2.48	90
37.557	E,Z-2,6-nonadienal	138	1.45	96	1.82	96
38.450	decanal	156	1.35	95	1.55	95
38.658	nonanoic acid methyl ester	172	0.07	88	0.09	87
<b>39.593</b>	<b>tridecane</b>	<b>184</b>	<b>0.34</b>	<b>90</b>	<b>0.59</b>	<b>94</b>
40.076	2-bromo-octane	192	0.05	91	0.12	88
40.596	E-2-decenal	154	0.23	90	0.32	90
40.776	-cyclocitral	152	1.27	87	1.29	94

续表

保留时间 (min)	化合物	分子量	25		33	
			相对含量 <sup>1)</sup>	相似度 <sup>2)</sup>	相对含量 <sup>1)</sup>	相似度 <sup>2)</sup>
41.645	undecanal	170	0.09	91	0.12	95
41.993	E,Z-2,4-decadienal	152	1.14	93	0.76	93
42.252	4-acetyl-1-methylcyclohexene	138	0.12	85	0.08	83
42.463	(1-butylidene)-cyclohexene	136	0.35	89	0.42	88
43.004	E,E-2,4-decadienal	152	1.03	91	1.09	93
44.917	6-dodecanone	178	0.09	93	0.13	90
45.376	dodecanal	184	0.05	80	0.10	85
<b>46.701</b>	<b>pentadecane</b>	<b>212</b>	<b>0.23</b>	<b>93</b>	<b>0.11</b>	<b>92</b>
48.316	6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one	194	0.21	94	0.23	94
<b>51.717</b>	<b>heptadecane</b>	<b>240</b>	—	—	<b>0.18</b>	<b>97</b>
52.135	-ionone	192	1.69	93	1.90	95
56.461	phytol	296	0.01	82	0.07	81
<b>58.515</b>	<b>nonadecane</b>	<b>268</b>	<b>0.46</b>	<b>96</b>	<b>0.87</b>	<b>96</b>
合计			95.55		95.89	

注: 1) 相对含量: 某化合物的峰面积占总峰面积的百分比; 2) 相似度: 与谱库中标准化化合物的相似度(%); 3) 黑体表示化合物在 25 和 33 相比较有显著差异; 4) “—”表示化合物未检测到; 5) 表中所有化合物含量数据均为 3 次检测的平均值

有各种生理活性, 如 E,Z-2,4-Decadienal 能够抑制桡足动物卵的发育(Pohnert, 2004)。

龙须菜中产生的挥发性酮类化合物含量并不高(5.98%), 主要有 1-octen-3-one (3.42%)和 -ionone (1.90%), 其中 1-octen-3-one 是一种食品添加剂, 具有蘑菇类的香味; 也是一种天然的呈味香料物质, 在沙丁鱼、鲱鱼和鱼油、虾、奶酪等许多食品中存在, 它也是海水生物膜的重要组成部分, 可能来源于海洋真菌(Hockelmann *et al*, 2004)。β-ionone 在多种海洋真菌和藻类中都存在, 其本身也具有抗真菌作用(Abdel-Baky *et al*, 2002; Kamenarska *et al*, 2006)。

本实验中检测到的烷烃含量比较少(1.92%), 特别是长链饱和烷烃, 这与一些文献报道有所不同(Dembitsky *et al*, 1999), 这可能是由于不同的藻类的代谢产物成分有所不同, 如 Kamenarska 等(2006)通过对黑海中 10 种海洋红藻的挥发性成分分析结果表明, 海藻中烃类组成在各种海藻中具有特异性, 可作为海藻化学生态学分类的工具之一。卤代烃是海洋藻类的特征性代谢产物(Laternus *et al*, 2000; Colomb *et al*, 2008), 本实验中龙须菜可以产生三氯甲烷、3-溴戊烷、2-溴辛烷等卤代烃, 其具有令人不愉快的气味, 这些物质可能与藻类更有效的抗拒食藻动物相关(Kladi *et al*, 2004)。海藻在卤代过氧化物酶的作用下产生卤代挥发性化合物(Ohshiro *et al*, 1999), 其具有化学防御作用和化学他感效应, 具有抗细菌、抗真菌

作用, 能够抑制其它藻类发育、诱导动物幼体附着(Masuda *et al*, 1997; Xu *et al*, 2003)。本实验在 25 培养条件下, 没有三氯甲烷的峰; 而 33 条件下检测到了龙须菜中三氯甲烷的存在, 表明三氯甲烷可能与龙须菜的高温抗逆反应有关。

环境条件如温度、营养等对藻类挥发性物质的种类和含量具有较大的影响。如珊瑚藻(*Scenedesmus incrassatulus*)在海水环境中烃类和丙酮途径代谢产物占优势, 而在淡水培养条件下类异戊二烯和芳香族化合物为主要成分(Kambourova *et al*, 2003)。不同海藻的挥发性卤代烃的释放对温度的反应不同, 一些藻类的卤代烃随温度升高而升高, 但藻类群落中挥发性卤代烃的总数量和组成受温度影响更大(Abrahamsson *et al*, 2003)。龙须菜中挥发性代谢产物受温度影响很大。表 1 结果显示: 龙须菜在 33 条件下代谢产物中 E-2-pentenal(E-2-戊烯醛)、E-2-heptenal(E-2-庚烯醛)、E,E-2,4- heptadienal(E,E-2,4-庚二烯醛)、2-pentyl-furan(2-正戊基呋喃)、E,E-2,4-nonadiene(E,E-2,4-壬二烯)、3,5-dimethyl- cyclohexanol(3,5-二甲基-环己醇)和 pentadecane(正十五烷)含量显著减少。其中影响最大的是 E-2-heptenal、E,E-2,4-heptadienal、2-pentyl-furan, 其含量下降值分别是 0.70% 0.24%、0.76% 0.15%、0.86% 0.23%。它们都是亚油酸在高温下的降解产物, 正常条件下温度升高生物体内的亚油酸降解速率加快, 这三种

化合物含量升高, 而龙须菜在温度升高条件下三种亚油酸降解产物含量降低, 提示该品系龙须菜体内可能存在某些复杂的抗氧化系统, 该代谢产物的出现是一种应激反应, 使龙须菜体内脂类成分没有降解的趋势, 能够适应高温的环境。因而可以推测 E-2-heptenal、E,E-2,4-heptadienal、2-pentyl-furan 可能是龙须菜高温逆境的特征代谢产物, 可以通过检测这 3 种代谢产物的变化, 结合三氯甲烷的含量变化来筛选龙须菜抗高温品系。

### 参 考 文 献

- Abdel-Baky H H, Shallan M A, EI-Baroty G *et al*, 2002. Volatile compounds of the microalga *Chlorella vulgaris* and their phytotoxic effect. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(1): 61—65
- Abrahamsson K, Choo K S, Pedersén M *et al*, 2003. Effects of temperature on the production of hydrogen peroxide and volatile halocarbons by brackish-water algae. *Phytochemistry*, 64(3): 725—734
- Boonprab K, Matsui K, Akakabe Y, 2003. Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and Z-3 and Z-2-Cnonenal formation in *Laminaria angustata*. *Phytochemistry*, 63(6): 669—678
- Chang Y C, Lee T M, 1999. High temperature-induced free proline accumulation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40: 289—294
- Colomb A, Yassaa N, Williams J *et al*, 2008. Screening volatile organic compounds (VOCs) emissions from five marine phytoplankton species by head space gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC/MS). *J Environ Monit*, 10(3): 325—330
- Dembitsky V M, Shkrob I, Dor I, 1999. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultured blue-green alga *Nostoc* sp. by gas chromatography-mass spectrometry using serially coupled capillary columns with consecutive nonpolar and semipolar stationary phases. *J Chromatogr A*, 862(2): 221—229
- Fink P, von Elert E, Jüttner F, 2006. Volatile foraging kairomones in the littoral zone: attraction of an herbivorous freshwater gastropod to algal odors. *J Chem Ecol*, 32: 1867—1881
- Gschwend P M, Macfarlane J K, Newman K A, 1985. Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae. *Science*, 227(4690): 1033—1035
- Hattab M E, Culioli G, Piovetti L *et al*, 2007. Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. *J Chromatogr A*, 1143(1—2): 1—7
- Hockelmann C, Moens T, Jüttner F, 2004. Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnol Oceanogr*, 49(5): 1809—1819
- Herrero M, Ibáñez E, Cifuentes A *et al*, 2006. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *J Food Prot*, 69(10): 2471—2477
- Kajiwara T, Kodama K, Hatanaka A, 1980. Male-attracting substance in a marine brown alga *Sargassum horneri*. *Naturwissenschaften*, 67(12): 612—613
- Kambourova R, Bankova V, Petkov G, 2003. Volatile substances of the green alga *Scenedesmus incrassatulus*. *Z Naturforsch*, 58(3—4): 187—190
- Kamenarska Z, Dimitrova-Konaklieva S, Stfanov K *et al*, 2002. Comparative study of the volatile compounds from some black sea brown algae. *Botanica Marina*, 45: 503—509
- Kamenarska Z, Ivanova A, Stancheva R *et al*, 2006. Volatile compounds from some black sea red algae and their chemotaxonomic application. *Botanica Marina*, 49: 47—56
- Karabay N U, Sukatar A, Ozdemir G, 2007. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytother Res*, 21(2): 153—156
- Kladi M, Vagias C, Roussis V, 2004. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry Reviews*, 3: 337—366
- Laternus F, Giese B, Wiencke C *et al*, 2000. Low-molecular-weight organoiodine and organobromine compounds released by polar macroalgae—the influence of abiotic factors. *Fresenius J Anal Chem*, 368(2—3): 297—302
- Lee T M, 1998. Changes in properties of biosynthetic enzymes in relation to high temperature-induced proline accumulation in *Gracilaria tenuistipitata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Phycologia*, 37: 433—438
- Lepape M A, Grua-Priol J, Prost C *et al*, 2004. Optimization of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Palmaria palmata* and identification of the volatile components. *J Agric Food Chem*, 52(3): 550—556
- Masuda M, Abe T, Sato S, 1997. Diversity of halogenated secondary metabolites in red algae *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Phycology*, 33: 196—208
- Ohshiro T, Nakano S, Takahashi Y *et al*, 1999. Occurrence of bromoperoxidase in the marine green macro-alga, *Ulva lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme. *Phytochemistry*, 52(7): 1211—1215
- Ozdemir G, Karabay NU, Dalay M C *et al*, 2004. Antimicrobial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother Res*, 18(9): 754—757
- Pohnert G, 2004. Chemical defense strategies of marine organisms. *Topics in Current Chemistry*, 239: 179—219

- Romano G, Russo G L, Buttino I *et al*, 2003. A marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 3487—3494
- Skjevrak I, Lund V, Ormerod K *et al*, 2005. Volatile organic compounds in natural biofilm in polyethylene pipes supplied with lake water and treated water from the distribution network. *Water Research*, 39(17): 4133—4141
- Sreenivasan S, Ibrahim D, Mohd Kassim M J N, 2007. Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Gracilaria changii*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3): 115—117
- Wendela T, Jüttner F, 1996. Lipoxygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms. *Phytochemistry*, 41(6): 1445—1449
- Xu N J, Fan X, Yan X J *et al*, 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry*, 32(8): 1221—1224

## VOLATILE METABOLITES IN *GRACILARIA LEMANEIFORMIS* AT HIGH TEMPERATURE

XU Nian-Jun, HE Yan-Li, TANG Jun, YAN Xiao-Jun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Minister of Education, College of Life Sciences and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

**Abstract** The volatile metabolites in *Gracilaria lemaneiformis* cultured in high temperature stress is studied with headspace solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques. In optimized analytic conditions, the samples are brought into equilibrium at 60 °C for 30 min and extracted for 25 min with PDMS/DVB fiber coating; after released for 5 min in 210 °C, the volatile compounds are analyzed with GC-MS. A total of 56 types of volatile compounds, including alkenes (61.67%), aldehydes (22.47%), ketones (5.98%), normal paraffin hydrocarbons (1.92%), halogenated compounds (0.65%), alcohols (0.41%), and esters (0.37%) have been identified from the *Gracilaria* cultured in 33 °C. Variations in the culture between high and normal temperature are recorded. Seven metabolites, including E-2-pentenal, E-2-heptenal, E,E-2,4-heptadienal, 2-pentyl-furan, E,E-2,4-nonadiene, 3,5-dimethyl-cyclohexanol, and pentadecane decrease under high temperature stress, while chloroform, tridecane, heptadecane, and nonadecane increase. Among them, the content change of E-2-heptenal, E,E-2,4-heptadienal, 2-pentyl-furan, and chloroform may be related to the high temperature resistance of *G. lemaneiformis*.

**Key words** *Gracilaria lemaneiformis*, High temperature stress, Volatile metabolites, GC-MS