

# 荧光假单胞菌株 SE-6 产铁载体的发酵条件

王伟, 彭珺, 张琳, 肖明

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

**摘要:** 在摇瓶发酵条件下, 研究了荧光假单胞菌 SE-6 在各种培养条件下的铁载体分泌量, 确定了适合铁载体分泌的最佳培养条件: 起始 pH6.5, 装瓶量 200/500(mL), 接种量 2%, 最佳培养时间为 46h 左右,  $Fe^{3+}$  浓度为 0.8mg/L. 在此条件下, 铁载体在发酵液中含量最高, 为大规模发酵提供了有价值的依据.

**关键词:** 荧光假单胞菌 SE-6; 铁载体; 发酵

**中图分类号:** Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2006)02-0067-04

## 0 引言

铁载体(siderophore)是微生物在低铁条件下产生的一类小分子物质,它与 $Fe^{3+}$ 具有高度亲和性,能够螯合环境中的铁并以特异的转运系统转移至体内,为微生物提供铁元素<sup>[1]</sup>. 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是广泛存在于土壤中的一种植物益生菌,它所产生的胞外的、水溶性的、黄绿色荧光色素就是一类铁载体. 1942年, Turfnejer把这种黄绿色素命名为绿脓菌荧光素 pyoverdine(PVD)<sup>[2]</sup>. 现在人们已经知道 PVD 由 3 部分组成: 一个保守的喹啉衍生物发色基团; 一条由 6-12 个氨基酸组成的肽链, 其中一些是非蛋白氨基酸或修饰过的氨基酸; 还有一条侧链, 通常是二羧酸或二羧酸酰胺<sup>[3,4]</sup>. 荧光假单胞菌产生的 PVD 可用于生物防治, PVD 螯合了环境中的铁, 这样植物的病原微生物就由于缺铁而不能生长繁殖, 铁载体近年来在药物方面的研究也越来越多了. 由于铁载体的主要作用是结合 $Fe^{3+}$ , 并通过铁载体受体把铁复合物转入微生物体内, 因此可以把铁载体和抗生素结合在一起, 使药物更容易地进入靶向微生物体内, 从而更有效地杀死靶向病原菌, 这是一种特洛伊木马(Trojan Horses)策略<sup>[5]</sup>. Herbert budzikiewicz 设计用绿脓菌荧光素和 $\beta$ -内酰胺抗生素结合, 形成绿脓菌荧光素- $\beta$ -内酰胺复合物, 用这种复合物来解决机遇致病菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的多药物抗性<sup>[6]</sup>. 本实验研究 SE-6 菌株在不同培养条件下分泌铁载体 PVD 的情况, 为进一步的分离纯化及其工业化生产奠定基础, 以便使它能更广泛地应用于生物防治、医药等领域.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

荧光假单胞菌 SE-6 由本实验室分离.

收稿日期: 2006-01-08

基金项目: 上海市教委重点项目(05ZZ14); 上海市科委重大项目(04DZ19304).

作者简介: 王伟(1973-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生; 肖明(1961-), 男, 上海师范大学生命与环境科学学院教授.

## 1.2 试剂和仪器

铬天青(CAS),北京瀛海精细化工厂;8-羟基喹啉,上海化学试剂采购供应站;752型紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司.

## 1.3 培养基

### 1.3.1 液体种子培养基(1L)

King'sB培养基:蛋白胨20g,甘油15mL, $K_2HPO_4$  0.3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,pH7.0.

### 1.3.2 固体种子培养基(1L)

King'sB培养基基础上加20g琼脂.

### 1.3.3 发酵标准培养基(1L)

$K_2HPO_4$  6g, $KH_2PO_4$  5g, $(NH_4)_2SO_4$  1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g,succinic acid 4g,pH7.0.

### 1.3.4 液体抗生素培养基(1L)

在King'sB培养基基础上加抗生素 Amp 50mg,用以保持种子的纯度.

上述培养基均在121℃灭菌20min,备用.

## 1.4 培养方法

### 1.4.1 一级种子培养

SE-6菌种在King'sB平板上28℃活化24h后,用铂金接种环挑取单菌落接入5mL液体培养基中,置于摇床中,28℃,150r/min条件下培养24h,然后接种到固体种子培养基中,在28℃下培养24h.

### 1.4.2 二级种子培养

将培养好的一级种子用铂金接种环挑取一环,接入50mL(150mL摇瓶)液体培养基中,在摇床中28℃,150r/min条件下培养24h.

### 1.4.3 发酵

将二级种子按1%的接种量接于150mL(500mL摇瓶)发酵培养基中,培养基预先用8-羟基喹啉处理除去痕量铁,起始pH6.5,温度控制在28℃,摇床150r/min,发酵时间46h左右.

## 1.5 铁载体的定量检测

发酵液4000r/min离心15min,取上清液用CAS分析法检测铁载体的相对含量,按文献进行<sup>[7]</sup>.

## 2 主要结果

### 2.1 起始pH的影响

培养基的起始pH直接影响到荧光假单胞菌的菌体生长,进而影响到PVD铁载体的分泌量.用发酵培养基调整为不同的起始pH进行实验,实验结果(图1)表明,pH=6.5时PVD分泌量最大.

### 2.2 装瓶量的影响

装瓶量的多少关系到发酵时的通气量,通气量是影响微生物菌体生长和代谢物生成的重要因素,在500mL的三角瓶中取装瓶量分别为50,100,150,200,250mL的发酵培养基进行

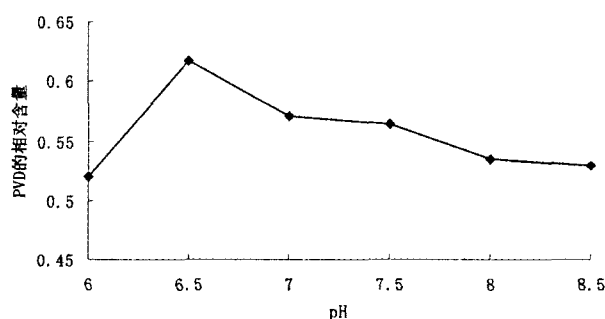


图1 起始pH对PVD分泌的影响

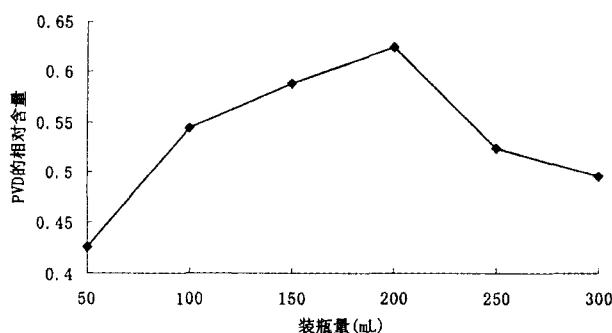


图2 装瓶量对PVD分泌的影响

实验. 取样结果表明(图2),装瓶量为200mL时,最有利于PVD的分泌.

### 2.3 接种量的影响

接种量的大小对发酵单位有较大的影响,接种量小的时候,延迟期变长,使发酵时间延长;接种量变大时,菌体迅速生长,通风条件恶化,从而降低发酵单位. 实验中以接种量1%,1.5%,2%,3%,4%分别进行,由图3可以看出,2%接种量为最佳.

### 2.4 发酵时间的影响

由图4可见,在0~4h,菌体不分泌PVD,6h后开始分泌PVD,至46h时PVD的量达到最大值,即为最佳发酵时间.

### 2.5 $Fe^{3+}$ 的影响

发酵培养基用8-羟基喹啉处理除去痕量铁,然后分别加入适量的氯化铁,溶解后,使铁离子浓度分别为0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.6,3.2,16,32,80,120,128mg/L,pH保持在6.5,灭菌.然后接入SE-6菌种,发酵培养后,用CAS检测液检测,测得的部分数值如表1.

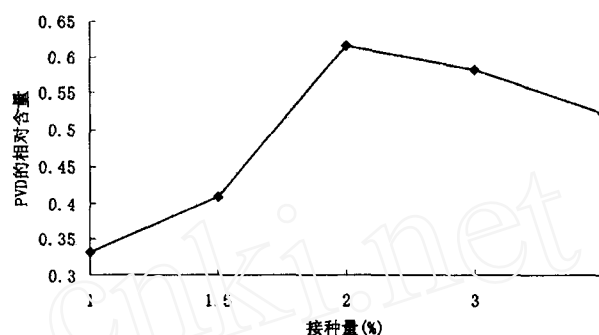


图3 接种量对PVD分泌的影响

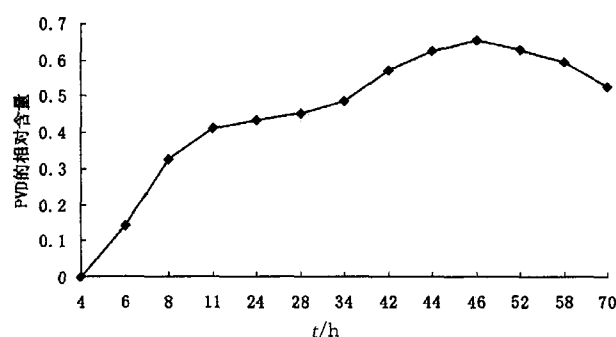


图4 PVD的含量随时间的变化

表1 PVD分泌量随 $Fe^{3+}$ 浓度的变化

$Fe^{3+}$ 浓度 (mg/L)						
0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
PVD 量						
0.412	0.422	0.431	0.436	0.441	0.438	0.430
$Fe^{3+}$ 浓度 (mg/L)						
1.6	3.2	16	32	80	120	180
PVD 量						
0.422	0.383	0.321	0.282	0.085	0	0

PVD的合成受 $Fe^{3+}$ 浓度影响大, $Fe^{3+}$ 浓度越高,合成越少,反之则越多;但 $Fe^{3+}$ 过少时,细胞生长受抑制,PVD的合成反而减少.当培养基中的 $Fe^{3+}$ 浓度为0.8mg/L时,PVD的产量最高;当 $Fe^{3+}$ 浓度达到或超过120mg/L时,SE-6不再产生PVD铁载体.

## 3 结论

对铁载体的测定方法,杨合同等人用分光光度计测发酵液上清液400nm的吸收值<sup>[8]</sup>,然后换算成

色素合成量. 本实验中用了 CAS 检测法, 考察了几种发酵条件对荧光假单胞菌株 SE-6 分泌 PVD 的影响, 结果表明发酵生产 PVD 的最佳条件是: 起始 pH 6.5, 装瓶量 200/500 (mL), 接种量 2%, 最佳培养时间为 46 h 左右,  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为 0.8 mg/L. 由于培养基的组成已有资料报道, 本实验中未对培养基的优化进行实验, 还有一些金属离子如  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  等对 PVD 分泌的影响有待进一步的研究.

## 参考文献:

- [1] NEILANDS J B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 26723 - 26726.
- [2] TURFREIJEN A. Pyoverdinen de groene fluorescende kleurstoffen van *Pseudomonas fluorescens* [D]. Thesis, University of Amsterdam. British Abstracts, 1942, 16: 16578.
- [3] FUCHS R, SCHAFFER M, GEOFFROY V, et al. Siderotyping - a powerful tool for the characteric of pyoverdines [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2001, 1: 31 - 57.
- [4] CORNELIS P, MATTHIJS S. Diversity of siderophore - mediated iron uptake system in fluorescent *Pseudomonads*; not only pyoverdines [J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(12): 787 - 798.
- [5] ROSENBERG J M, LIN Y M, LU Y, et al. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs potential drug delivery agents [J]. Current Medicinal Chemistry, 2000, 7: 159 - 197.
- [6] BUDZIKIEWICZ H. Siderophore - antibiotic conjugates used as Trojan Horses against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Current Topics in Chemistry, 2001, 1: 73 - 82.
- [7] SCHWYN B, NEILANDS J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160: 47 - 56.
- [8] 杨合同, 王少杰, 王建平, 等. 荧光假单胞菌噬铁素的性质研究 [J]. 山东科学, 1994, (7): 53 - 56.

## Preliminary study on fermentation condition for siderophores product by *Pseudomonas fluorescens* SE - 6

WANG Wei, PENG Jun, ZHANG Lin, XIAO Ming

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

**Abstract:** Under the condition of flask fermentation, the potential ability of Siderophores produced by *Pseudomonas fluorescens* SE - 6 was studied at different conditions. The optimized culture condition is: original pH 6.5, media amount 200/500 (mL), inoculation amount 2%, culture time about 46h,  $\text{Fe}^{3+}$  concentration 0.8 mg/L. Under the above condition, the production of Siderophores is the highest. The above optimized condition provided valuable data for large scale fermentation.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens* SE - 6; siderophores; fermentation