

# 一株分离自鳊鱼肠道的粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) HFUT 1301 的鉴定及灵菌红素的分析

张丹峰, 杨培周, 姜绍通

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 农产品加工研究院, 安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽合肥 230009)

**摘要:** 灵菌红素是粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)产生的具有抗癌功效的一种色素。本研究从鳊鱼肠道中筛选出一株高产红色素的菌株, 根据形态学特征、生理生化性质、16S rDNA 对其进行鉴定, 采用紫外可见光全波长扫描、LC-MS 和 FT-IR 图谱鉴定该菌种产红色素的结构, 研究表明: 在基础培养基上菌落呈圆形、直径 1-3 mm、中间红色不透明, 呈隆起状、边缘整齐, 16S rDNA 片段大小为 1445 bp, 与粘质沙雷氏菌同源性为 99%, 将该菌株命名为 *S.marcescens* HFUT 1301; 通过超声波辅助乙醇浸提及硅胶色谱分离纯化, 获得纯度超过 95% 的红色素; 在 pH 3 和 pH 10 的甲醇溶液中, 该色素分别在 535 nm 和 470 nm 波长处存在明显吸收峰; LC-MS 图谱主要离子峰为 323.5486 和 324.8468; FT-IR 图谱的主要吸收波数为 3396  $\text{cm}^{-1}$ 、2923  $\text{cm}^{-1}$ 、2851  $\text{cm}^{-1}$ 、1710  $\text{cm}^{-1}$ 、1465  $\text{cm}^{-1}$  和 1164  $\text{cm}^{-1}$ 。根据已有报道灵菌红素结构特征, 推测该红色素为灵菌红素。在发酵培养基上灵菌红素产量达到 3.22 g/L。

**关键词:** 粘质沙雷氏菌; 灵菌红素; 鳊鱼肠道; 液质联用; 红外光谱

文章编号: 1673-9078(2015)6-78-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.013

## Identification of Prodigiosin-producing *Serratia marcescens* HFUT1301

### Strain Isolated from Mandarin Fish Intestine

ZHANG Dan-feng, YANG Pei-zhou, JIANG Shao-tong

(School of Biotechnology and Food Engineering, Institute of Agricultural Products Processing Technology, Key Laboratory for Agriculture Processing of Anhui Province, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** Prodigiosin, a pigment with anti-cancer effects, is produced by *Serratia marcescens*. A strain producing a red pigment was screened from the intestinal canal of mandarin fish and identified on the basis of colony morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA analysis. The structural characteristics of the red pigment was determined using ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The results showed that it appeared round colonies on basic medium, the diameter was within 1 to 3mm, the middle of the colony was red and opaque with a slight bulge in the center, and with smooth edges, while 16S rDNA fragment (1445 bp in size) showed 99% similarity with *S. marcescens*. This isolated strain was designated as *S. marcescens* HFUT1301. The purity of the red pigment exceeded 95% after ultrasound-assisted ethanol extraction and silica gel column chromatography. In pH 3- and pH 10-methanol solutions, there were significant absorption peaks at 535 and 470 nm, respectively. LC-MS showed that the main ion peaks were 323.5486 and 324.8468. The main absorption wavenumbers for FT-IR were 3396, 2923, 2851, 1710, 1465, and 1164  $\text{cm}^{-1}$ . Red pigment production reached 3.22 g/L in the fermentation medium. Based on previously reported structural characteristic of prodigiosin, the red pigment produced from *S. marcescens* HFUT1301 was speculated to be prodigiosin.

**Key words:** *Serratia marcescens*; prodigiosin; mandarin fish intestine; liquid chromatography-mass spectrometry; Fourier transform infrared spectroscopy

灵菌红素是由粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)

收稿日期: 2014-10-09

基金项目: 安徽省重大科技攻关项目 (13z03042); 安徽省自然科学基金 (1408085MC67)

作者简介: 张丹峰(1988-), 男, 硕士研究生; 杨培周, 博士, 硕士生导师, 研究方向为发酵微生物及酶工程, 为并列第一作者

通讯作者: 姜绍通(1954-), 男, 博士生导师, 研究方向为食品科学

产生的一种红色素, 含有 3 个吡咯环组成的甲氧基吡咯骨架结构, 具有抗菌、抗癌、抗原生动物、抗疟疾等功效<sup>[1]</sup>。因其具有癌组织的高针对性以及对正常细胞表现的低毒害作用, 灵菌红素有望被用来代替癌症及免疫治疗中对人体有毒副作用的化学药物, 而成为一种非常有潜力的抗癌物质<sup>[2-4]</sup>。

采用化学合成方法和微生物代谢调节均能够

生成灵菌红素<sup>[5]</sup>。在化学合成研究方面,早在 20 世纪 60 年代, Rapoport 等描述了灵菌红素化学合成的全过程,但由于受到试验条件的限制实施起来比较困难;1996 年, Alessio 等提出了新的制备灵菌红素 PG (Prodigiosin) 类似物的方案,先得灵菌红素前体物质,步骤简单,合成效率明显提高,但不能用来合成天然的灵菌红素; Dairi 等利用市售商品 4-methoxy-3-Pyrroline-2-one 经两步反应得到了灵菌红素的前体物质,然后将不同的吡咯及其派生物与其相连接得到了不同的 PG 类似物<sup>[6]</sup>,反应容易形成异构体,稳定性较差,控制难度大,成本较高;粘质沙雷氏菌等微生物能够在体内高效生产灵菌红素,与化学合成技术比较,微生物代谢方法合成灵菌红素具有的优势包括:(1)通过严格控制原料和生产环境,能够有效避免化学合成法中存在的重金属及其它残留化学物质的污染;(2)采用发酵罐生产灵菌红素具有发酵稳定、条件温和、易于控制、不受季节和环境影响的优点;(3)采用发酵罐生成便于大批量生产,有效降低生产成本。目前灵菌红素的生产主要是以大豆粉末、花生粉末、甘油等为碳源进行发酵,当原料为粉末状时,不利于色素的分离,原料为挥发性甘油、酒精时容易造成碳源的挥发流失,增加生产成本。除了个别粘质沙雷氏菌突变菌株外,大多粘质沙雷氏菌的灵菌红素产量比较低<sup>[7]</sup>。因此寻找稳定、廉价的碳源和筛选一株高产灵菌红素的粘质沙雷氏菌,对提高灵菌红素产量和降低其价格的问题有很重要的指导意义。

本研究从鳊鱼的肠道中筛选出一株产红色素的菌株,通过形态学特征、生理生化性质、16S rDNA 对其进行分析及同源进化树的构建等技术鉴定该菌株;通过紫外全波长扫描、液质联用技术及傅里叶红外光谱技术分析鉴定该红色素的结构特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 试验材料

本研究选用的鳊鱼来自长江流域铜陵段。

#### 1.1.2 培养基

筛选培养基 (g/L): 马铃薯 200、琼脂 18、葡萄糖 2。

富集培养基 (g/L): 蛋白胨 10、牛肉膏 20、NaCl 2、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>[2]</sup>。

基础培养基 (g/L): 蛋白胨 10、牛肉膏 20、NaCl 2、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、琼脂 18<sup>[7]</sup>。

种子培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母膏 20、NaCl 2、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>[7]</sup>。

发酵培养基 (g/L): 蛋白胨 10、大豆油 30、NaCl 2、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O。

所有培养基 pH 均为 8, 121 °C 灭菌 15 min。

### 1.1.3 试剂

金龙鱼大豆油, 益海嘉里安徽粮油工业公司; 95% 乙醇、NaCl、NaOH、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (分析纯), 无锡市展望化工试剂公司; 甲醇 (色谱纯), 无锡市展望化工公司; 牛肉膏、蛋白胨 (分析纯), 北京奥博星公司; 盐酸 (色谱纯), 北京中试化工、DNA 胶回收试剂盒、Taq 酶和 dNTP 等药品购于上海生工生物工程有限公司。

## 1.2 主要仪器设备

CR22GII High-Speed Refrigerated Centrifuge, 日本日立公司; Hei-VAP Advantage G3 Hei-dolph 旋转蒸发器, 德国海道夫公司; PCR 仪和凝胶成像系统, 伯乐公司; ACQUITY UP 液相色谱-飞行时间质谱仪, Waters 公司; Nicolet 67 傅里叶红外光谱仪, Thermo Nicolet 公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 菌种的筛选和鉴定

#### 1.3.1.1 菌种的分离纯化和筛选

本研究采用的鳊鱼长约 25 cm, 重约 300 g, 解剖取其肠道, 在超净台内用无菌水将肠道外表面冲洗干净、切碎。以无菌水浸泡 5 h, 取其浸泡液在无菌操作台上进行浓度梯度稀释, 分别选择稀释浓度 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 的样液。取 200 μL 滴加于富集培养基中<sup>[8]</sup>, 30 °C 恒温培养, 培养 24 h 后得红色菌落, 挑取红色菌落, 用连续划线法在筛选培养基上纯化, 观察菌株的生长形态, 获本研究所需菌株<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.1.2 菌株的形态观察

将连续划线得到的菌株接种到基础培养基上, 30 °C 恒温培养, 观察其菌落大小、形态、颜色、光泽度、边缘特征等, 对筛选的菌株进行革兰氏染色, 通过显微镜观察经美蓝染色后的微生物细胞形态。

#### 1.3.1.3 菌株的生化鉴定实验

采用培养 20 h 后的微生物进行生理生化反应, 具体鉴定方法和依据参照《伯杰细菌鉴定册》<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.1.4 菌株的 16S rDNA 序列分析

采用酚:氯仿:异戊醇法抽提细菌的基因组 DNA, 异丙醇沉淀 DNA, 酒精洗涤沉淀 DNA。对获得的总基因组 DNA 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 采用的引

物分别为:正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',扩增条件 94 °C 3 min; 94 °C 30 s; 50 °C 45 s; 72 °C 100 s; 35 cycles; 72 °C 7 min<sup>[10]</sup>。将 PCR 扩增片段回收,送至上海生物工程公司测序。将测序结果与 NCBI 数据库对比,绘制进化树,确定菌株在系统分类学上的归属菌株。

### 1.3.2 菌种的扩大培养及接种

取一定量的实验菌株接入灭菌后冷却的种子培养基中,30 °C、200 r/min 恒温振荡培养 24 h。按接种量 1% 进行接种到发酵培养基内,装液量 80 mL/250 mL、30 °C、240 r/min 恒温振荡培养 30 h。

### 1.3.3 色素的提取与分离

取 300 mL 发酵后 30 h 的发酵液于 500 mL 离心瓶中,4 °C、8000 r/min 离心 20 min,将得到的菌体沉淀加入 300 mL 乙醇进行超声波辅助浸提(超声波工作参数为工作时间 2 s、工作间隙 3 s、超声时间 8 s、工作次数 10 次、工作最大功率 200 W),将乙醇浸提物 8000 r/min 离心 10 min,取上清液 70 °C 抽真空浓缩,用 2 倍体积的正己烷对浓缩物进行萃取、浓缩。将得到的色素粗品进行硅胶柱层析,洗脱剂为乙酸乙酯,洗脱速度为 1.5 mL/min。收集含红色素的色素带,并对收集到的洗脱液进行浓缩、真空冷冻干燥。

### 1.3.4 紫外全波长扫描

以 pH 3 和 pH 10 的甲醇溶液为溶剂分别将红色素配制成不同 pH 体系,采用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计在 300~700 nm 波长段扫描,扫描间隔 1 nm。

### 1.3.5 色素的液质联用

液相色谱仪 ACQUITY UP 型;色谱柱 Agilent Zorbax SBC-18 (规格 50 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相甲醇:0.1% 甲酸水溶液(70:30, V/V),分析时间 10 min;柱温 25 °C;流速 0.35 mL/min。质谱条件:飞行时间质谱仪 Agilent G6220A;离子化方式 ESI(+);质量扫描范围 100~1000;毛细管电压 4000 V;雾化气压力 30 psi(1psi=6894.8 Pa);干燥气流速度 10 L/min;干燥温度 350 °C;碎片电压 180 V;以参比液作实时质量数校正<sup>[11]</sup>。

### 1.3.6 红外光谱扫描条件

采用液膜法测定灵菌红素的红外光谱,红外波数范围为 400-4000 cm<sup>-1</sup>,光谱能量为 40 mW<sup>[12]</sup>。

### 1.3.7 灵菌红素标准曲线绘制

以纯化后的灵菌红素为标准样品,在酸性(pH 3)条件下,根据测定 OD<sub>535</sub> 下的吸光度,绘制如图 1 所示的灵菌红素标准曲线, R<sup>2</sup> 达到 0.9997,表明吸光度

和灵菌红素浓度线性关系明显。可以作为灵菌红素含量测定的标准曲线。

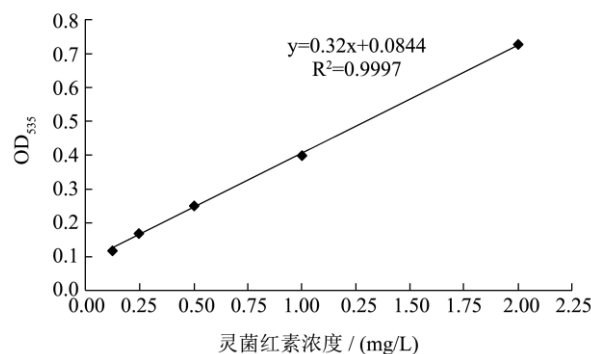


图 1 灵菌红素在 OD<sub>535</sub> 下的标准曲线

Fig.1 Standard curve of prodigiosin in acidic methanol (pH 3) based on absorption at 535 nm wavelength

### 1.3.8 灵菌红素含量测定

采用比色法测定,通过比较浸提液在 OD<sub>535</sub> 下的吸光度,比较各溶液中的灵菌红素含量。

### 1.3.9 菌体生物量的测定

对粘质沙雷氏菌菌体生物量的测定时,从每瓶培养基中取 5 mL 培养液,12000 r/min 离心 20 min,将沉淀放入干燥箱中烘干,一段时间后称重,直至其质量不在发生变化为止。

### 1.3.10 进化树的构建

进化树分析是通过将 16S rDNA 核苷酸序列 NCBI 数据库对比后的结果,在进行“系统进化树”的生成。

### 1.3.11 数据处理

采用 Origin7.5 和 Excel 2003 对试验数据进行分析处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株鉴定

在固体培养基上,菌落直径大小 1~3 mm,整个菌落呈圆形,中间微微隆起,边缘整齐,中间红色不透明,表面湿润(图 2),革兰氏染色为阴性。生理生化鉴定结果如下表 1 所示。

采用酚:氯仿:异戊醇法抽提试验菌种的总基因组 DNA,以设计扩增 16S rDNA 的引物进行 PCR 扩增,扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,扩增片段大小约为 1500 bp(图 3),与预期结果相近。通过 PCR 产物回收,基因测序,获得菌株的 16S rDNA 核苷酸序列大小为 1445 bp(图 4)。将该序列与 NCBI 基因数据库序列进行比对,与 *S.marcescens* WW4 strain、*S.marcescens* subsp. *sakuensis* strain、*S.nematodiphila*

strain、*S.marcescens* subsp. *marcescens* strain 的 RNA-16S ribosomal 序列的同源性为 99%。16S rDNA 核苷酸序列进化树分析表明，该菌株与 *Serratia marcescens* 的同源性较近（图 5）。

表 1 HFUT1301 生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain HFUT1301

生理生化实验	粘质沙雷氏菌	HFUT1301
V P 试验	+	+
甲基红试验	-	-
葡萄糖发酵产气试验	+	+
葡萄糖发酵产酸试验	d	-
甘油发酵产酸试验	+	+
乳糖发酵产酸试验	-	-
乳糖发酵产气试验	-	-
麦芽糖发酵试验	+	+
蔗糖发酵试验	+	+
七叶灵试验	-	+
硝酸盐还原试验	+	+
吲哚试验	-	-

注：“+”表示90%以上菌株阳性，“-”90%以上菌株阴性，“d”11%~89%的菌株阳性。

结合细胞菌落的形态学观察、生理生化性质及 16S rDNA 分子鉴定，该菌株属于粘质沙雷氏菌，本研究将该菌株命名为 *S. marcescens* HFUT 1301。



图 2 *S. marcescens* HFUT1301 的菌落形态

Fig.2 Colony morphology of *S. marcescens* HFUT1301

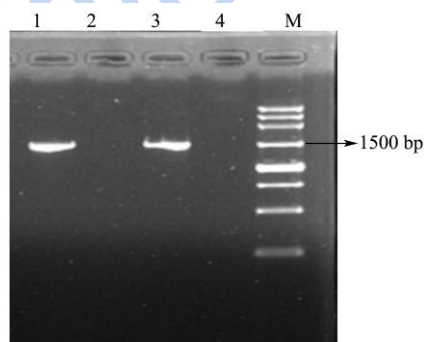


图 3 16S rDNA 扩增电泳

Fig.3 Electrophoresis of amplified 16S rDNA

注：泳道1、3-扩增产物；泳道2、4-空白；M-Marker

GGCAGGCGTAGCTACCATGCAGTCGAAGCGGTAGCA  
 CAGGGGAGCTTGCTCCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGG  
 GTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGATA  
 ACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAA  
 GACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCAGAT  
 GTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCT  
 CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC  
 CAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTAC  
 GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA  
 GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC  
 GGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGA  
 ACTTAATACGTTTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAG  
 CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA  
 GGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGC  
 ACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGG  
 CTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAG  
 TCTCGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAA  
 ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG  
 CCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT  
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCT  
 GTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT  
 GGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGA  
 GTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGG  
 GCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGC  
 AACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAC  
 TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGAC  
 AGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATG  
 TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT  
 GTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGC  
 CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT  
 CATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA  
 TGCGGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGC  
 GGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG  
 CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTA  
 GATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGAC  
 ACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGA  
 AGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACCACTTGG  
 ATTCATTGTTT

图 4 *S. marcescens* HFUT1301 的 16S rDNA 核苷酸序列

Fig.4 The nucleotide sequences of *S. marcescens* HFUT1301 16S rDNA

2.2 紫外全波长扫描分析

经发酵培养基发酵、浸提、分离纯化后的色素进

行紫外-可见光吸收图谱分析(图6),该色素在pH 3的甲醇溶液中呈现红色,在300~700 nm全波长扫描试验中在535 nm处有明显吸收峰;在pH 10的甲醇溶液中呈现黄色,对470 nm的波长吸收较强。由该色素紫外-可见光吸收图谱与文献中已报道的灵菌红素紫外吸收图谱一致<sup>[9]</sup>。

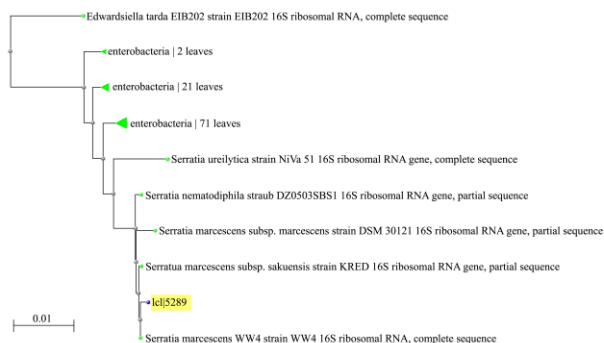


图5 *S. marcescens* HFUT1301 16S rDNA 核苷酸序列的NCBI在线进化树分析(lcl5289为*S. marcescens* HFUT1301)

Fig.5 Evolutionary tree analysis of the of *S. marcescens* HFUT1301 16S rDNA nucleotide from NCBI online

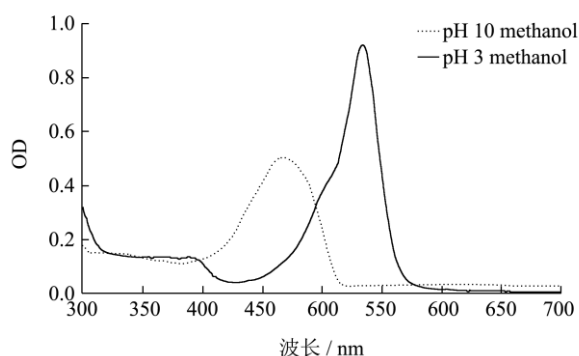


图6 不同波长条件下红色素的紫外-可见光图谱

Fig.6 UV spectrum of red pigment at different wavelengths

### 2.3 色素的LC-MS 图谱分析

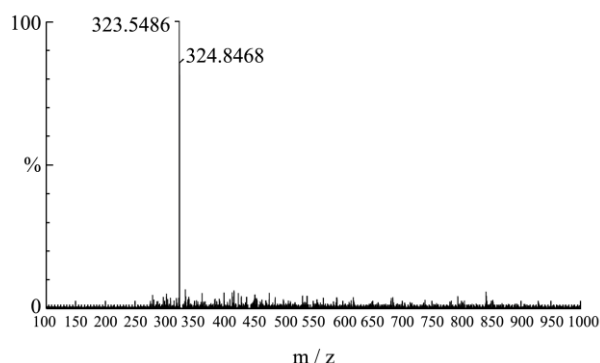


图7 红色素的LC-MS 图谱

Fig.7 LC-MS spectrum of the red pigment

对红色素进行LC-MS 图谱分析(图7),该色素主要产生两个碎片离子峰,对应的质荷比分别是

323.5486和324.8468。前者为灵菌红素的分子量,后者为[M+H]的分子量。由上述两个分子量通过计算得到色素的分子式为C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O,与已报道的灵菌红素分子量保持一致<sup>[12]</sup>。由LC-MS 图谱峰值分析可知,该物质只有两个特别明显的离子峰,基本不存在杂离子峰,说明样品纯度相对较高。

### 2.4 色素的FT-IR 图谱分析

对红色素进行FT-IR 图谱分析(图8),该色素的红外图谱主要吸收波数为:3396 cm<sup>-1</sup>、2923 cm<sup>-1</sup>、2851 cm<sup>-1</sup>、1710 cm<sup>-1</sup>、1465 cm<sup>-1</sup>、1164 cm<sup>-1</sup>。其中3396为吡咯环中的“-NH-”伸缩峰、2923为亚甲基“-CH<sub>2</sub>-”反对称伸缩峰、1710为酮基伸缩峰,1465为亚甲基“-CH<sub>2</sub>-”的变形振动峰,1164为“-C-N-”伸缩振动峰。这与文献中报道的灵菌红素红外色谱主要吸收峰保持一致<sup>[12]</sup>。

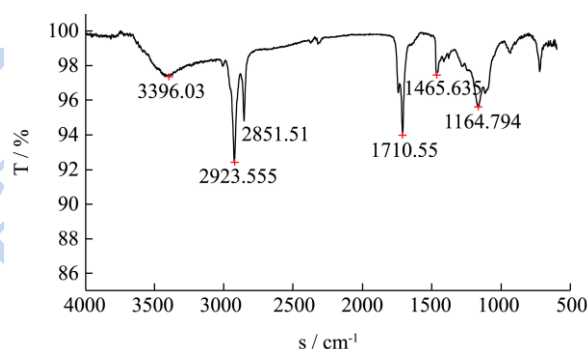


图8 红色素的FT-IR 图谱

Fig.8 FT-IR spectrum of the red pigment

综上所述,该菌株的鉴定结果为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),通过对粘质沙雷氏菌所产红色素分离纯化后的紫外-可见光图谱、LC-MS 图谱及FT-IR 图谱进行解谱分析,并结合关于灵菌红素的结构特征鉴定方面的已有报道<sup>[13]</sup>,确定红色素为灵菌红素。

### 2.5 发酵培养基所产灵菌红素及生物量含量的连续测定

在发酵培养基的基础上,考察接种量、温度和转速对灵菌红素产率的影响,通过正交试验,获得最优的参数:接种量2%、温度30℃、转速200 r/min。并对发酵过程中灵菌红素和菌体生物量进行实时监控测定,平行对照为未接种种子液的试验。平行对照结果如图9所示,0~24 h之间OD<sub>535</sub>和生物量几乎没有变化,随着试验时间的延长,由于发酵液的长时间晃动和振荡,发酵液发生乳化现象,逐渐呈乳白色,

对应 OD<sub>535</sub> 吸收很微弱,生物量的变化也很小<sup>[4]</sup>。实验组结果如图 10 所示,当发酵时间达到 48 h 时, OD<sub>535</sub> 达到 0.6, 对应色素含量达到最大值 3.22 g/L。

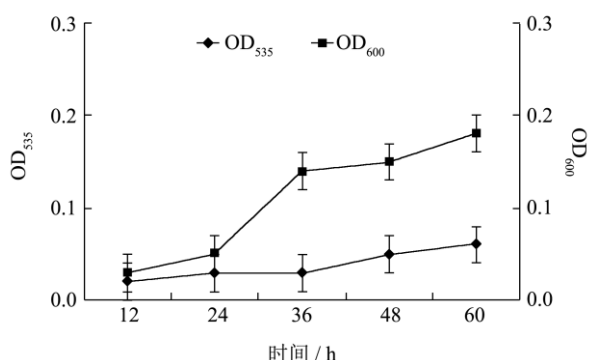


图9 未接种粘质沙雷氏菌的发酵培养基中灵菌红素量及生物量的连续测定

Fig.9 Time course of prodigiosin production and *Serratia marcescens* biomass in fermentation medium

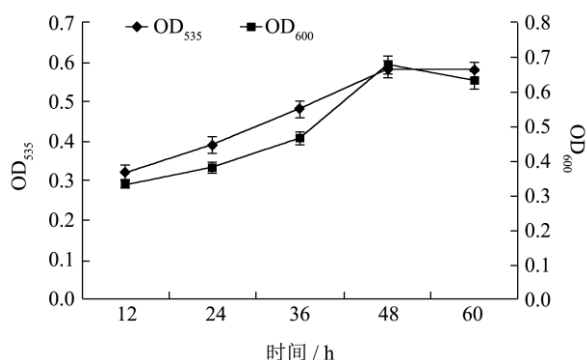


图10 发酵培养基中粘质沙雷氏菌所产灵菌红素量及生物量的连续测定

Fig.10 Time course of prodigiosin production and *Serratia marcescens* biomass in fermentation medium

### 3 结论

本研究从鳊鱼肠道中分离出一株产红色素的微生物,通过菌落形态学观察、生理生化性质分析以及 16S rDNA 序列分析,结果表明,该菌株在形态学以及生理生化性质与粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 吻合,该菌种 16S rDNA 与 *S.marcescens* 16S rDNA 的序列同源性达到 99%, 确定该菌株属于粘质沙雷氏菌,将其命名为 *S. marcescens* HFUT 1301; 该菌能够以油脂为碳源的液体培养基中发酵产红色素;采用紫外-可见光谱扫描、LC-MS、FT-IR 光谱分析等方法,分析 *S. marcescens* HFUT 1301 表达的红色素的主要特征基团和结构特征,结合已有报道的灵菌红素结构特征,该红色素为灵菌红素。在简单发酵培养基上,灵菌红素产量达到 3.22 g/L, 该菌株属于产灵菌红素单一且产量大的菌株,为工业上大规模发酵产灵菌红素提供了

一株优良的菌株。

### 参考文献

- [1] Williamson NR, Fineran PC, Gristwood T, et al. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines [J]. *Future Microbiol Year*, 2007, 2(6): 605-618
- [2] 韦凤.产灵菌红素粘质沙雷氏菌发酵条件优化及色素性质的研究[D].金华市:浙江师范大学,2012  
WEI Feng, Studies on fermentation optimization and pigments qualities of prodigiosins production *Serratia marcescens* [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2012
- [3] James E Fender, Cody M Bender, Nicholas A Stella, et al. *Serratia marcescens* quinoprotein glucose dehydrogenase activity mediates medium acidification and inhibition of prodigiosin production by glucose [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 17: 1778-1789
- [4] Fang Xu, Shunxiang Xia, Qiyin Yang. Strategy for obtaining inexpensive prodigiosin production by *Serratia marcescens* [C]//2011 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, IACSIT Press, Singapore, 2011
- [5] 朱雄伟,翟莉莉,张楠,等.产灵菌红素菌株的分离鉴定[J].湖北大学学报,2012,4:384-386  
ZHU Xiong-wei, ZHAI Li-li, ZHANG Nan, et al. Isolation and identification of producing strains prodigiosin [J]. *Journal of Hubei University*, 2012, 4: 384-386
- [6] 刘同军,杨海龙,唐华,等.灵菌红素的研究进展[J].食品与药品,2007,8:47-51  
LIU Tong-jun, YANG Hai-long, TANG Hua, et al. Progress on prodigiosin [J]. *Food and Drug*, 2007, 8: 47-51
- [7] 周围.粘质沙雷氏菌此生代谢产物灵菌红素的生理和生物学活性的研究[D].重庆:西南大学,2014  
ZHOU Wei. The physiological and biological activities of prodigiosin, the secondary metabolites of *Serratia marcescens* [D]. Chongqing: Southwest University, 2014
- [8] 韦凤,蒋冬花,蔡琪敏,等.一株高产灵菌红素粘质沙雷氏菌的筛选与鉴定[J].浙江师范大学学报,2011,3:339-344  
WEI Feng, JIANG Dong-hua, CAI Qi-min, et al. Screening and identification of high-producing prodigiosin [J]. *Journal of Zhejiang Normal University*, 2011, 3: 339-344
- [9] Lewis S M, Corpe W A. Prodigiosin producing bacteria from marine sources [J]. *App Micro-biol*, 1963, 12(1): 13-17
- [10] 杨培周,钱静,姜绍通,等.臭鳊鱼的质构特性、特征气味及发酵微生物的分离鉴定[J].现代食品科技,2014,30(4):55-62  
YANG Pei-zhou, QIAN Jing, JIANG Shao-tong, et al. Texture

- properties, characteristic smell, microbial isolation and identification of smelly mandarin fish [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 55-62
- [11] 李子武,张显,徐美娟,等.一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件[J]. *食品科学与生物技术杂志*, 2012, 10:1018-1024
- LI Zi-wu, ZHANG Xian, XU Mei-juan, et al. Screening and Identification a *Serratia marcescens* strain producing red-pigment and preliminary study of fermentation conditions [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 10: 1018-1024
- [12] 傅奇.灵菌红素产生菌的筛选鉴定及其发酵条件优化[D],南昌:南昌大学,2011
- FU Qi. Screening and identification of a prodigiosins-producing strain and optimization of its fermentation conditions [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011
- [13] 朱雄伟,徐智鹏,张楠,等.粘质沙雷氏菌代谢产物灵菌红素的鉴定[J]. *化学与生物工程*, 2012, 11(22):80-82
- ZHU Xiong-wei, XU Zhi-peng, ZHANG Nan, et al. Identification of metabolites of *Serratia marcescens* prodigiosin [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2012, 11(22): 80-82
- [14] 王春玲.灵菌红素生物合成和分离纯化研究[D].合肥:合肥工业大学,2004
- WANG Chun-ling. The biosynthesis and purification of prodigiosin [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2004