

学校编码: 10384
学号: 200225028

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

海洋微藻类分泌铁载体的粗分离
及分析技术的新应用

Coarse Isolation of Siderophores Secreted by Marine
Microalgae and New Application of Analytical
Technologies

王颜萍

指导教师姓名: 王小如 教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2005年5月

论文答辩时间: 2005年6月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2005年5月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其它个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式表明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

| | |
|--------------------------|----|
| 摘 要 | I |
| 第一章 文献综述 | 1 |
| 1.1 铁载体 | 1 |
| 1.1.1 铁载体的研究状况、特点与分类 | 1 |
| 1.1.2 铁载体对海洋铁限制研究的意义 | 6 |
| 1.2 国内外对铁载体的研究状况 | 8 |
| 1.2.1 铁载体提取技术的应用状况 | 8 |
| 1.2.2 铁载体定量测定的应用状况 | 13 |
| 1.2.3 铁载体性质表征技术的应用状况 | 16 |
| 1.3 工作立题背景和研究内容 | 19 |
| 参考文献 | 21 |
| 第二章 藻种的筛选及铁载体的粗分离 | 31 |
| 2.1 引言 | 31 |
| 2.2 CAS 实验的验证 | 32 |
| 2.2.1 仪器与试剂 | 32 |
| 2.2.2 操作与方法 | 33 |
| 2.2.3 结果与讨论 | 33 |
| 2.3 筛选藻种 | 35 |
| 2.3.1 仪器与试剂 | 35 |
| 2.3.2 选用的藻种 | 36 |
| 2.3.3 藻种的培养及生长状况 | 36 |
| 2.3.4 培养液中铁含量的测定 | 36 |
| 2.3.5 培养液的配制 | 36 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 2.3.6 分泌铁载体的实验 | 38 |
| 2.3.7 结果与讨论 | 38 |
| 2.4 铁载体分离条件的选择 | 46 |
| 2.4.1 仪器与试剂 | 46 |
| 2.4.2 选用的藻种 | 46 |
| 2.4.3 藻种的培养及生长状况 | 46 |
| 2.4.4 培养液中铁含量的测定 | 46 |
| 2.4.5 培养液的配制 | 46 |
| 2.4.6 分泌铁载体的实验 | 46 |
| 2.4.7 结果与讨论 | 47 |
| 2.5 铁载体的粗分离 | 51 |
| 2.5.1 仪器与试剂 | 52 |
| 2.5.2 操作与方法 | 52 |
| 2.5.3 结果与讨论 | 54 |
| 2.6 小结 | 58 |
| 参考文献 | 58 |
| | |
| 第三章 HPLC-MS 在铁载体与金属结合研究中的应用 | 63 |
| 3.1 引言 | 63 |
| 3.2 仪器与试剂 | 66 |
| 3.3 操作与方法 | 66 |
| 3.3.1 溶液配制 | 66 |
| 3.3.2 HPLC-MS 检测条件 | 66 |
| 3.4 结果与讨论 | 67 |
| 3.4.1 色谱条件的选择 | 67 |
| 3.4.2 铁载体与不同金属结合的分析 | 70 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 3.4.3 金属铝对铁载体与铁结合的影响 | 78 |
| 3.5 小结 | 81 |
| 参考文献 | 82 |
| 第四章 共振瑞利散射技术在儿茶酚测定中的初探 | 86 |
| 4.1 引言 | 86 |
| 4.2 仪器与试剂 | 89 |
| 4.3 操作与方法 | 90 |
| 4.4 结果与讨论 | 90 |
| 4.4.1 共振瑞利散射光谱 | 90 |
| 4.4.2 适宜的反应条件 | 91 |
| 4.4.3 CAS 反应液各组分比例关系的影响 | 95 |
| 4.4.4 CAS 反应液加入量的影响 | 95 |
| 4.4.5 pH 值的影响 | 96 |
| 4.4.6 反应时间的影响 | 97 |
| 4.4.7 共振瑞利散射光强度与儿茶酚浓度的关系 | 97 |
| 4.5 小结 | 99 |
| 参考文献 | 99 |
| 第五章 结论与展望 | 102 |
| 5.1 研究结论 | 102 |
| 5.2 研究工作的创新 | 104 |
| 5.3 研究展望 | 104 |
| 在学期间发表论文 | 105 |
| 致 谢 | 106 |

CONTENT

| | |
|--|----|
| Abstract | I |
| Chapter 1. Prolegomenon | 1 |
| 1.1 Siderophore | 1 |
| 1.1.1 Reasch status, characteristics and classifies of siderophore | 1 |
| 1.1.2 Investigative significance of siderophore to marine iron-limited research | 6 |
| 1.2 International research and development of siderophore | 8 |
| 1.2.1 Development of separation technology..... | 8 |
| 1.2.2 Development of quantifying..... | 13 |
| 1.2.3 Development of characteristic identification..... | 16 |
| 1.3 Objective, significance and main contents of the thesis | 19 |
| References | 21 |
| | |
| Chapter 2. Choice of microalgae and coarse isolation of siderophores | 31 |
| 2.1 Introduction | 31 |
| 2.2 Confirmation of CAS experiment | 32 |
| 2.2.1 Apparatus and materials..... | 32 |
| 2.2.2 Operation and methods | 33 |
| 2.2.3 Results and discussions..... | 33 |
| 2.3 Choice of microalgae | 35 |
| 2.3.1 Apparatus and materials..... | 35 |
| 2.3.2 Different microalgae | 36 |
| 2.3.3 Culture and growth of microalgae | 36 |
| 2.3.4 Determination of iron in culture mediums | 36 |
| 2.3.5 Preparation of culture mediums | 36 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| 2.3.6 | Detection of siderophores secreted by microalgae..... | 38 |
| 2.3.7 | Results and discussions..... | 38 |
| 2.4 | Choice of optimally separate conditions | 46 |
| 2.4.1 | Apparatus and materials..... | 46 |
| 2.4.2 | Different microalgae | 46 |
| 2.4.3 | Culture and growth of microalgae | 46 |
| 2.4.4 | Determination of iron in culture mediums | 46 |
| 2.4.5 | Preparation of culture mediums | 46 |
| 2.4.6 | Detection of siderophores secreted by microalgae..... | 46 |
| 2.4.7 | Results and discussions..... | 47 |
| 2.5 | Coarse isolation of siderophores | 51 |
| 2.5.1 | Apparatus and materials..... | 52 |
| 2.5.2 | Operation and methods | 52 |
| 2.5.3 | Results and discussions..... | 54 |
| 2.6 | Conclusions | 58 |
| References | | 58 |
| | | |
| Chapter 3. | Application of HPLC-MS to the research of siderophore combined with metals | 63 |
| 3.1 | Introduction | 63 |
| 3.2 | Apparatus and materials | 66 |
| 3.2.1 | Apparatus..... | 66 |
| 3.2.2 | Materials | 66 |
| 3.3 | Operation and methods | 66 |
| 3.3.1 | Preparation of solution..... | 66 |
| 3.3.2 | Experimental conditions of HPLC-MS | 66 |
| 3.4 | Results and discussions | 67 |
| 3.4.1 | Choice of chromatogram conditions | 67 |
| 3.4.2 | Characteristic analysis of siderophores combined with different | |

| | |
|--|---------|
| metals..... | 70 |
| 3.4.3 Effect of aluminum on siderophores combined with iron | 78 |
| 3.5 Conclusions | 81 |
| References | 82 |
| | |
| Chapter 4. Preliminary investigation of resonance rayleigh scattering technique (RRS) to the quantification of catechol ... | 86 |
| 4.1 Introduction | 86 |
| 4.2 Apparatus and materials | 89 |
| 4.3 Operation and methods | 90 |
| 4.4 Results and discussions | 90 |
| 4.4.1 Resonance rayleigh scattering spectrum | 90 |
| 4.4.2 Optimally reactive conditions | 91 |
| 4.4.3 Effect of proportion between components in CAS solution | 95 |
| 4.4.4 Effect of quantity of CAS solution..... | 95 |
| 4.4.5 Effect of pH | 96 |
| 4.4.6 Effect of reactive time..... | 97 |
| 4.4.7 Relation between RRS intensity and catechol concentration | 97 |
| 4.5 Conclusions | 99 |
| References | 99 |
| | |
| Chapter 5. Conclusions and Future Work | 102 |
| 5.1 Conclusions | 102 |
| 5.2 Innovations | 104 |
| 5.3 Future work | 104 |
| Publication During Master Study | 105 |
| Acknowledgements | 106 |

摘 要

在铁限制的条件下,海洋微型生物会释放一些低分子量并与铁有极强亲和力的配位体—铁载体。它可以在细胞外的环境中夺取 Fe (III), 满足生物体对铁的需求。而铁对海洋生物的生长起着十分重要的作用。因此, 铁载体的研究对于解释 HNLC 海区以及铁限制假说都具有十分重要的意义。基于此, 本论文工作对微藻类分泌的铁载体进行了粗分离, 探索了 HPLC-MS 联用技术用于铁载体与金属结合的分析以及共振瑞利散射法的含量测定技术。其意义在于为海洋生物可利用铁的形态研究打下铺垫, 为分析技术开辟更广阔的应用领域。

第一章通过大量文献, 对铁载体的有关理论知识、研究意义以及国内外对铁载体的研究状况进行了归纳和总结。在此基础上, 归纳了本论文研究课题的立题背景、研究目的及主要内容。

第二章对 5 种不同种属的微藻类进行了连续检测, 确定了研究对象; 又对东海原假藻的生长过程进行了观察, 确定了最佳的分离条件; 采用柱层析技术和液—液萃取技术分别对两种藻类分泌的铁载体进行了粗分离。

第三章采用 HPLC-MS 联用技术建立了铁载体与金属结合分析的新方法。考察了色谱条件对不同类型铁载体与其金属络合物分离的影响, 确定了最佳色谱分离条件; 在优选出的色谱条件下, 联合质谱技术分析了铁载体与铁、铝的结合, 同时还研究了铝对铁载体与铁结合的影响。

第四章采用共振瑞利散射技术建立了几茶酚定量测定的新方法。运用正交实验设计法确定了 CAS 反应的最佳条件; 在此优选条件下, 确定了最适意的共振发光峰, 并以此为依据获得了较为满意的标准曲线。

第五章总结了本论文的主要结论和创新, 并提出了今后工作的设想。

关键词: 铁载体; HPLC-MS 联用技术; 共振瑞利散射技术

Abstract

Under iron-limited conditions, marine microorganisms are able to secrete low-molecular-weight, highly specific iron chelators termed siderophores. These compounds scavenge iron from protein complexes or insoluble hydroxides in the extracellular environment and transport it to the cell cytosol via a membrane-bound receptor protein in the microorganism. Iron is a necessary requirement in marine ecosystems. Therefore research on siderophores is very significant to interpretation of high nitrate low chlorophyll (HNLC) regions and iron hypothesis. Besides, siderophores can be widely applied to medication, agriculture, environmental protection and so on. In this thesis, coarse isolation was carried out for siderophores secreted by microalgae. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) was applied to analysis of siderophores combined with metals. Simultaneously, resonance rayleigh scattering technique (RRS) was adopted to catechol determination. It will provide the foundation for speciation of available iron in marine ecosystems. It will also exploit wider fields for analytic technologies.

Chapter 1 was an overview of the academic knowledge, investigative significance, and the current research status about siderophores. It summarized investigative background, purpose and contents.

In Chapter 2, appropriate microalgae were ascertained on the basis of investigation for siderophore secreted by different microalgae. A systematic investigation about the growth of *Prorocentrum donghaiense* Lu made sure of the optimally separate conditions. The coarse isolation of the siderophores

secreted by *P. donghaiense* Lu and *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech were carried on respectively by column chromatography and liquid-liquid extraction.

In chapter 3, HPLC-MS method was developed for the analysis of siderophores combined with metals. The effect of chromatogram conditions was detected on the separation of siderophores and metal chelator. Thereout, the optimal conditions was achieved. Under the optimal conditions, the analysis of siderophores coupled with iron and aluminum was investigated. Furthermore, the effect of aluminum on siderophores combined with iron was surveyed.

RRS technique for the catechol determination was discussed in detail in chapter 4. The appropriate conditions of CAS reaction recurred to orthogonal test. The adaptively resonance luminescence wavelength was attained. Standard curve was also obtained.

Major conclusions and recommendations for future research were summarized in chapter 6.

Keywords: Siderophore; High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS); Resonance Rayleigh Scattering Technique (RRS)

第一章 文献综述

1.1 铁载体

1.1.1 铁载体的研究状况、特点及分类

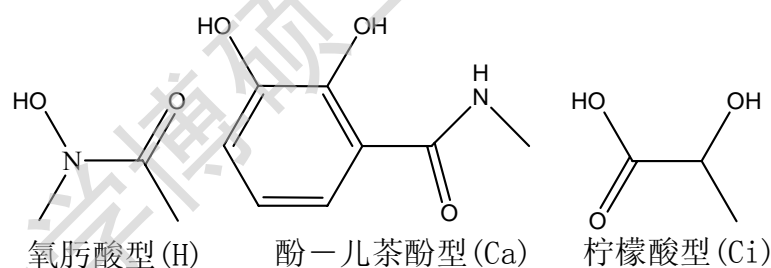
“铁载体”一词来源于希腊语，译为铁的转运体（Iron Bearer），它是微生物在铁限制条件下分泌的一种非卟啉、非蛋白质而又与铁具有极强亲和能力的配位化合物^[1]。1952年，美国科学家从真菌蘑菇（*Ustilago Sphaerogena*）中分离得到第一个铁载体——铁色素（Ferrichrome）；随后，又有人从细菌中分离得到粪生素（Coprogen）和分枝杆菌素（Mycobactin）。在50年代中期，人们发现可键合铁的一些配位化合物（如铁色素）在进行生物合成时易受到缺铁条件的限制，但对这些分泌物的通称还一直存在争论。到了60年代，瑞士研究人员从放线菌中提取到了又一个铁载体——铁草胺（Ferrioxamine），并建议将那些可与铁结合并呈红褐色的化合物命名为铁铬（Siderochrome）。此外，将那些具有生长促进作用和抗生活性的化合物分别命名为含铁胺（Sideramine）和含铁抗生素（Sideromycin）。但是，由于这两种称为是针对所测试生物体的独特特性而命名的，所以应用范围受到了限制。相比之下，“铁铬”一词被广泛采用，指代那些由微生物在铁限制下分泌的低分子量的铁配位化合物。随着研究不断深入，考虑到这些配位化合物具有某种生物活性，“铁铬”逐渐被“铁载体”所代替，并沿用至今。

铁在微生物的生长过程中起着十分重要的作用，因此在微生物体内存在多种获取铁的途径^[2-4]，其中就包含铁载体这一高亲和体系^[5-7]。铁载体是一种低分子量的铁配位化合物，在铁限制条件下可以由微生物分泌到体

外，与周围环境中的铁相结合，再通过细胞膜上特定的铁载体受体，有效的将铁运输进入微生物体内，以满足生物体对铁的需求。因此，铁载体具有以下几个方面的特点：

- (1) 在铁限制的条件下，由微生物分泌的一些低分子量（400~1200 Da）配位体。
- (2) 铁载体具有多齿配位基（一般为 2 或 3 个），可与铁形成六齿配位的八面体化合物。
- (3) 对铁具有特殊的螯合能力，一般螯合稳定常数为 10^{30} 甚至更高。
- (4) 铁载体的生物分泌情况会受到周围环境铁含量的影响。
- (5) 在微生物的生活环境中，铁载体可以循环进行、重复利用。

根据官能团的不同，铁载体通常可分为两大类：酚-儿茶酚型（如肠菌素 Enterobacin、土壤杆菌素 Agrobactin）、氧肟酸或异羟肟酸型（如铁色素 Ferrichrome、分枝杆菌素 Mycobactin）。此外，还存在为数不多的柠檬酸型铁载体。因此，铁载体的分子结构可表示如下：



虽然不同微生物分泌的铁载体类型不完全相同，但都是经氨基酸缩合而成的一些多肽化合物。因此，与蛋白质、核酸相比铁载体的分子量较小（400~1200 Da），同一种群微生物分泌的铁载体具有结构上的相似性。细菌家族分泌的铁载体多是氧肟酸型化合物，它通过鸟氨酸上 δ -氨基的酰化作用和羟基化作用实现对铁的配位络合^[8-9]。在真菌家族中，铁载体大体分为三类：粪生素类^[10-14]、铁色素类^[15-22]和镰孢酸类^[23-26]。粪生素类一

般含有两个氧肟酸官能团，通过两个酰化的羟基鸟氨酸基团缩合成环状的二聚肽（见图 1-1 及表 1-1）。铁色素类由三个羟酰鸟氨酸形成一个三聚肽，此三聚肽与其它三个中性氨基酸相联合形成一个六齿配位基，其中一个氨基酸必为甘氨酸，另外两个可以是丝氨酸或丙氨酸（见图 1-2 及表 1-2）。镰孢酸类是由多个羟酰鸟氨酸基团首尾相连形成链状多聚物或环状三聚物（见图 1-3 及表 1-3）。

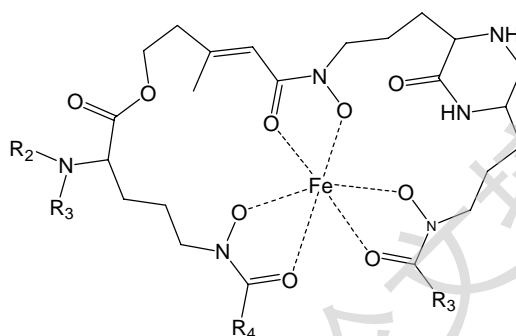


图 1-1 粪生素类铁载体的结构示意图

表 1-1 粪生素类铁载体结构中对应取代基

| Siderophore | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|---------------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
| Coprogen | H | -COCH ₃ | a | a |
| Coprogen B | H | H | a | a |
| Neocoprogen I | H | -COCH ₃ | CH ₃ | a |
| Isonocoprogen I | H | -COCH ₃ | a | CH ₃ |
| Neocoprogen II | H | -COCH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| N ^α -Dimethylcoprogen | CH ₃ | CH ₃ | a | a |
| N ^α -Dimethylneocoprogen | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | a |
| N ^α -Dimethylisonocoprogen | CH ₃ | CH ₃ | a | CH ₃ |
| Hydroxycoprogen | H | -COCH ₃ | a | g |
| Hydroxyneocoprogen I | H | -COCH ₃ | CH ₃ | a |
| Hydroxyisonocoprogen I | H | -COCH ₃ | g | CH ₃ |

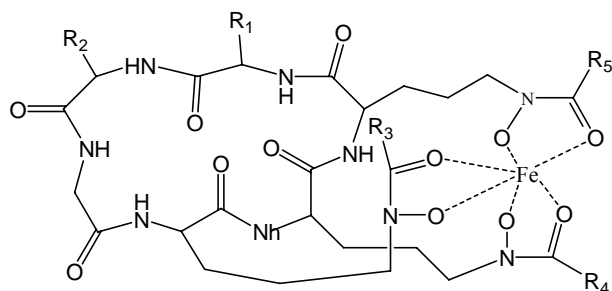


图 1-2 铁色素类铁载体的结构示意图

表 1-2 铁色素类铁载体结构中对取代基

| Siderophore | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ |
|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ferrichrome | H | H | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Ferrichrome A | CH ₂ OH | CH ₂ OH | c | c | c |
| Ferrichrome C | H | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Sake Colorant A | CH ₂ OH | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Ferricrocin | H | CH ₂ OH | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Ferrichrysin | CH ₂ OH | CH ₂ OH | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Malonichrome | H | CH ₃ | d | d | d |
| Ferrichrysin | CH ₂ OH | CH ₂ OH | a | a | a |
| Ferrirhodin | CH ₂ OH | CH ₂ OH | e | e | e |
| Asperchrome A | CH ₂ OH | CH ₃ | a | a | a |
| Asperchrome B1 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | CH ₃ | a | a |
| Asperchrome B2 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | a | CH ₃ | a |
| Asperchrome B3 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | a | a | CH ₃ |
| Asperchrome C | CH ₂ OH | CH ₂ OH | b | a | a |
| Asperchrome D1 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | a | CH ₃ | CH ₃ |
| Asperchrome D2 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | CH ₃ | a | CH ₃ |
| Asperchrome D3 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | CH ₃ | CH ₃ | a |
| Asperchrome E | CH ₂ OH | CH ₂ OH | e | a | a |
| Asperchrome F1 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | f | a | a |
| Asperchrome F2 | CH ₂ OH | CH ₂ OH | a | f | a |

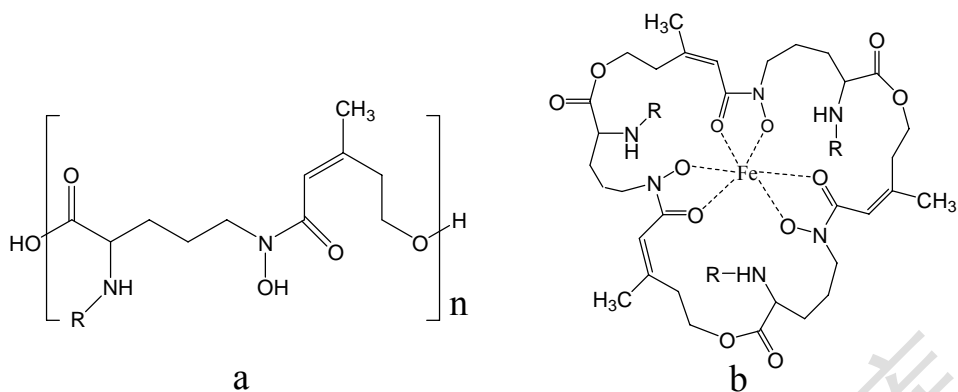


图 1-3 镰孢氨酸类铁载体链状 (a) 及环状 (b) 结构示意图

表 1-3 镰孢氨酸类铁载体链状 (1~6) 及环状 (7~9) 结构对应取代基

| Siderophore | R | n |
|---|--------------------|---|
| (1) cis-Fusarinine | H | 1 |
| (2) N ^α -Acetyl-cis-fusarinine | -COCH ₃ | 1 |
| (3) Fusarinine A | H | 2 |
| (4) N ^α -Diacetylfusarinine | -COCH ₃ | 2 |
| (5) Fusarinine B | H | 3 |
| (6) N ^α -Triacetylfusarinine B | -COCH ₃ | 3 |
| (7) Fusarinine C(fusigen) | H | |
| (8) N ^α -Triacetylfusarinine C | -COCH ₃ | |
| (9) Neurosporin | -COCH ₃ | |

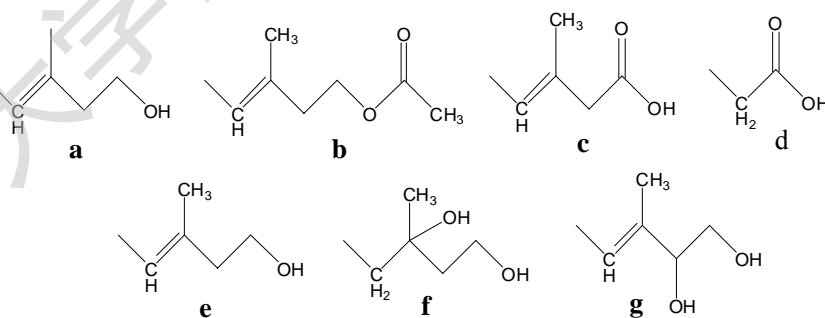


图 2-4 表 1-1~表 1-2 中 a~g 代表的取代基

表 1-1~表 1-3 资料来源: 参考文献[27]

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库