

一株 1,3-丙二醇生产菌的分离鉴定及其发酵特性

孟冬冬 王瑞明 马春玲*

(山东轻工业学院食品与生物工程学院 山东省微生物工程重点实验室 山东 济南 250353)

摘要: 从活性污泥中分离筛选得到一株能代谢甘油生产 1,3-丙二醇(1,3-PD)的菌株 2-1, 通过形态学鉴定、生理生化试验、16S rRNA 序列分析对菌株分类学地位进行鉴定, 用 MEGA 4.1 软件构建的系统发育树显示菌株 2-1 与 *Klebsiella pneumoniae* (CP001891)的亲缘关系最近。16S rDNA 序列同源性比较发现, 菌株 2-1 与模式菌株同源率为 95.4%, 疑似为新种。对菌株 2-1 在 5 L 发酵罐中进行发酵特性研究, 分批补料发酵时得到较高的 1,3-PD 终浓度, 达到 63.5 g/L, 此时生产强度为 2.19 g/(L·h), 底物转化率 0.64 mol/mol。

关键词: 1,3-丙二醇生产菌株, 16S rDNA, 发酵特性

Isolation, identification and fermentation characterization of a 1,3-propanediol product bacterial

MENG Dong-Dong WANG Rui-Ming MA Chun-Ling*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Food and Bio-engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan, Shandong 250353, China)

Abstract: A bacterial strain named as 2-1 was isolated from activated sludge, which can product 1,3-propanediol (1,3-PD) from glycerol. Morphologic properties, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analyses were used to identify the strain. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequence indicated that the strain 2-1 closely with *Klebsiella pneumoniae* (CP001891), whereas, the homologous rate was 95.4%. The strain 2-1 might represent a new species. In the fed-batch fermentation at 5 L fermentor: the maximum concentration of 1,3-PD was 63.5 g/L; productivity was 2.19 g/(L·h); substrate conversion rate was 0.64 mol/mol.

Keywords: 1,3-Propanediol product bacterial, 16S rDNA, Fermentation characteristics

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 1,3-PD, 化学式 $\text{CH}_2\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)作为一种重要的化工原料, 以其

二元醇的特性合成的聚酯材料有较大的优越性。其中, 1,3-PD 与对苯二甲酸聚合而成的聚对苯二甲酸

丙二醇酯(PTT)是人们研究较多的一种聚酯。PTT有较好的弹性恢复、良好的着色性、生物易降解性等优点^[1],在纺织、地毯等行业中有着广泛的应用。作为PTT合成单体的1,3-PD,同样存在巨大的市场需求。另外,1,3-PD本身是一种良好溶剂,可用作防冻剂、保护剂和润滑剂^[2]。

厌氧环境下,一些功能微生物可以转化甘油生成1,3-PD、乙醇、2,3-丁二醇、乙酸、乳酸等^[3]。相对于目前化学法生产1,3-PD的高环境污染性,微生物发酵法是一种“绿色环保”的生产方法,逐渐成为人们研究的热点。以甘油作为微生物发酵的能量和碳源,一般底物转化率已超过60%,目的产物1,3-PD的最终质量浓度在50 g/L以上^[1,3]。Saint-Amans等人^[4]和Reimann等人^[5]通过分批补料发酵都获得了相对较高的1,3-PD终浓度,可以达到70 g/L左右。从目前研究报道中可知,利用驯化后的野生型菌株发酵生产1,3-PD仍然较难实现工业化目的。因此,得到生产性能高的菌种仍然是发酵生产1,3-PD的首要问题。本文对一株能代谢甘油生产1,3-PD的野生型菌株进行分类学鉴定和系统发育分析,通过5 L发酵罐初步研究该菌株的发酵特性。

1 实验材料

取自山东济南的活性污泥。

LB培养基、种子培养基、发酵培养基及培养方法参照文献^[6],略有改动。

鉴定培养基:参照文献^[7]。

Taq DNA聚合酶、16S rDNA扩增通用引物合成、PCR产物序列测定均由上海生工生物技术有限公司完成。

2 实验方法

2.1 菌种筛选

取无菌封口袋内保存的活性污泥样1 g,梯度稀释后在固体富集培养基平板上涂布。采取质子自杀^[8]和外源添加高浓度产物相结合的平板筛选策略,以期获得能耐受高浓度1,3-PD且副产物少的菌

株。30 °C恒温培养一段时间后,挑取平板上生长速度快、直径大的菌落。平板分离筛选获得8株菌,其中一株编号为2-1的细菌在三角瓶培养中有较优的发酵特性。经纯化后,4 °C保藏。

2.2 菌种分类学地位鉴定

2.2.1 形态学鉴定:观察菌落特征及光学显微镜、扫描电镜下菌株特征。进行革兰氏染色、芽孢染色和荚膜染色。

2.2.2 生理生化试验:对所分离的菌株进行生理生化试验。主要参考书目为:东秀珠《常见细菌系统鉴定手册》^[7],《伯杰细菌系统鉴定手册(第9版)》^[9]。

2.2.3 16S rRNA序列分析:细菌的16S rDNA序列因其高度保守性常被用于细菌的分类学鉴定。

(1) 细菌总DNA提取:采用CTAB/NaCl法^[7,10]。

(2) 16S rDNA基因序列的PCR扩增:采用16S rDNA通用引物^[7],以提取的细菌总DNA为模板进行扩增。

(3) PCR扩增产物测序:扩增产物克隆后送交上海生工生物技术有限公司测序。

(4) 构建系统发育树:将测序得到的16S rDNA序列在NCBI数据库中进行BLAST同源性比对,采用MEGA软件构建系统发育树。

2.3 菌株2-1发酵特性研究

5 L发酵罐中,装液量3 L,发酵液初始甘油浓度5%,按10%接入种子液。发酵过程通入0.2 vvm的氮气维持厌氧环境。10 mol/L KOH^[11]维持发酵液pH 7.0,37 °C培养。分批补料发酵时,采取底物与碱连续流加策略^[12]。发酵液中残余甘油浓度降到2%,开始连续流加50%甘油浓缩液420 mL,甘油流加结束后6 h停止发酵。

2.4 检测方法

生物量以650 nm下的吸光度值 A_{650} 表示。发酵液离心后经0.2 μm膜过滤,气相色谱法测定残余甘油及产物1,3-PD的量,气相色谱图见图1。

1,3-PD回归方程为:

$$y=357\ 274x-26\ 369, R^2=0.999\ 9。$$

甘油回归方程为:

$$y=307\ 209x-28\ 132, R^2=0.999\ 3。$$

3 结果与分析

3.1 菌种筛选

经过初筛、复筛, 从 5 份活性污泥中分离得到 8 株细菌, 经纯化分离后做进一步的菌种鉴定。其中编号为 2-1 的菌株有较优的发酵性能, 经多次传代稳定性试验以后, 在 5 L 发酵罐中进行发酵特性研究。

3.2 菌种分类学地位鉴定

3.2.1 形态学鉴定: 菌株 2-1 菌落为圆形上凸状、乳白色、不透明、有光泽、边缘整齐。菌株大小 $(0.3-0.8) \mu\text{m} \times (1-3) \mu\text{m}$, 杆状, 不运动, 为无芽孢、

无荚膜的革兰氏阴性菌。菌株 2-1 菌落及菌体形态见图 2。

3.2.2 生理生化试验: 菌株 2-1 最适生长温度为 37°C , 最适 pH 7.0。其生理生化特征见表 1。

3.2.3 16S rRNA 序列分析: 以菌株总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到长约 1.5 kb 的目的片段, 如图 3 所示。将扩增后测得的 16S rDNA 序列提交 GenBank, 菌株 1-3、1-13、1-14、1-15、1-16、2-1、2-16、4-15 登录号分别为: HQ434552、HQ434553、HQ434554、HQ434555、HQ434556、HQ441178、HQ434557、HQ434558。

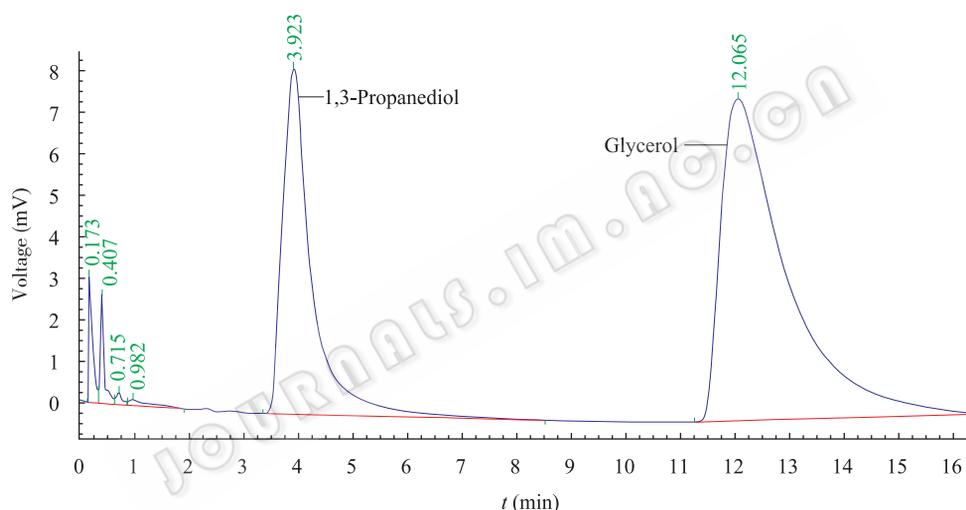


图 1 1,3-PD 及甘油气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatogram of 1,3-propanediol and glycerol

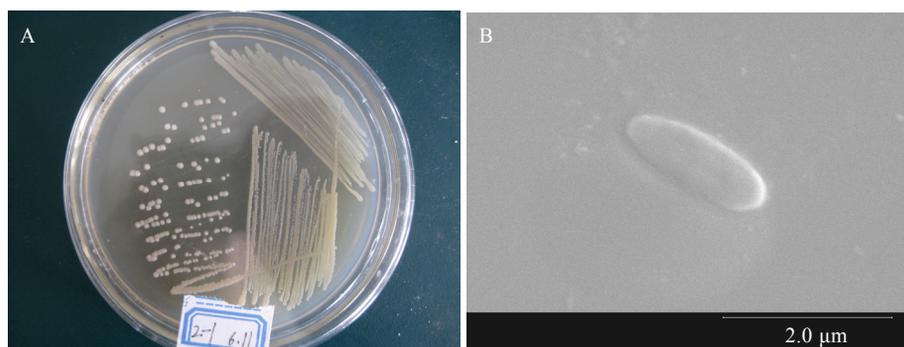


图 2 菌株 2-1 菌落形态(A)及在扫描电镜(B, $\times 24\ 000$)下的细胞形态

Fig. 2 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of strain 2-1 under scanning electron microscopy ($\times 24\ 000$)

表1 菌株 2-1 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain 2-1	
生理生化特征 Physiological characteristics	鉴定结果 Identification results
M.R 试验 M.R test	-
V-P 测定 V-P test	-
柠檬酸盐实验 Citrate test	+
H ₂ S 产生 H ₂ S generation	-
苯丙氨酸脱氢酶 Phenylalanine dehydrogenase	-
色氨酸脱氢酶 Tryptophan tryptophylquinone redox	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
乳糖利用 Lactose utilization	+
蔗糖利用 Sucrose utilization	+
D-果糖利用 D-Fructose utilization	+
D-葡萄糖利用 D-Glucose utilization	+

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

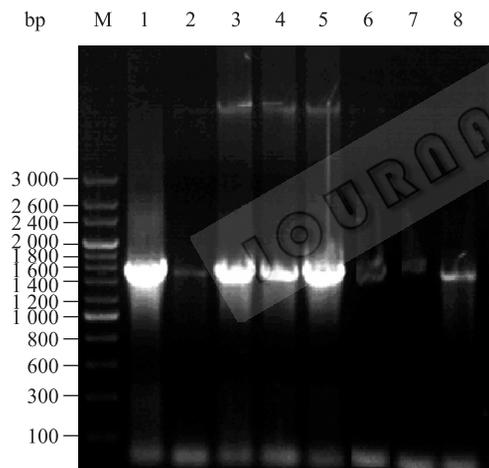


图3 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of 16S rDNA

Note: M: Marker; 1-8: 1-3、1-13、1-14、1-15、1-16、2-1、2-16、4-15.

3.2.4 构建系统发育树: 将目的菌株在 NCBI 中 BLAST 进行同源性比较, 结果显示, 1-3 与多株 *Citrobacter freundii* 的 16S rDNA 序列同源性较高; 1-13、2-1、2-16、4-15 与多株 *Klebsiella pneumoniae*

的 16S rDNA 序列同源性较高; 1-14、1-15、1-16 与多株 *Pseudomonas aeruginosa* 的 16S rDNA 序列同源性较高。应用 ClustalX 进行多序列比对^[13], 用邻接法通过 MEGA 软件构建系统发育树。1 000 次随机抽样进行自举分析检测置信度^[14]。图 4 为基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树。

3.2.5 分类学地位鉴定结果分析: 结合形态特征、菌株生理生化试验和 16S rRNA 序列分析结果, 供试菌株与模式菌株同源性比较见表 2。当前普遍观点认为: 16S rDNA 基因序列同源性大于 97%, 则可以认为属于同一个种^[15]。从表 2 可以看出菌株 2-1 与模式菌株的 16S rDNA 序列同源性为 95.4%, 疑似为一个新种或新属, 结果还有待进一步的形态及生理生化鉴定。其余菌株同源性都大于 98%, 因此可将其与模式菌株划归为一个种。

3.3 菌株 2-1 发酵特性研究

以甘油为唯一碳源, 采用 5 L 发酵罐对菌株 2-1 进行发酵特性研究。实验结果见图 5。

由图 5A 可以看出, 接种发酵 6 h 开始, 产物 1,3-丙二醇开始产生, 至 16 h, 底物甘油耗尽, 产物 1,3-PD 浓度达到最大 35.3 g/L, 生产强度为 1.47 g/(L·h), 底物转化率为 0.66 mol/mol。OD₆₅₀ 及碱的消耗表明, 在 8-16 h 产物积累的过程中, 菌体浓度及发酵过程产酸也急剧增大。底物甘油的消耗、产物 1,3-PD 的产生同菌体的增加呈正相关性。

补料分批发酵结果见图 5B。OD₆₅₀ 从发酵开始 2-11 h 呈对数增加, 此后保持不变。从 9 h 开始按 23 mL/h 流加 50%甘油溶液 420 mL, 在发酵 27 h 时流加结束。25 h 时产物浓度达到较大值, 开始明显抑制底物利用, 且在 25-27 h 仍然在流加甘油, 造成底物浓度急剧上升。发酵液中 1,3-PD 浓度在 9-15 h 急剧增加, 15 h 之后伴随着甘油持续的流加, 1,3-PD 含量增加缓慢。补料分批发酵过程中, 1,3-PD 含量在 29 h 达到最大值 63.5 g/L, 生产强度为 2.19 g/(L·h), 底物转化率 0.64 mol/mol。

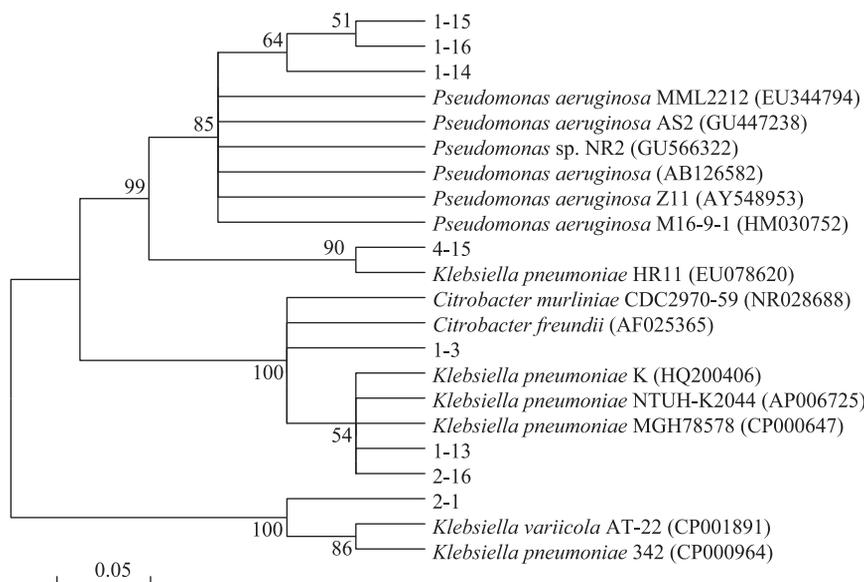


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 16S rRNA gene sequences

表 2 依据 16S rDNA 序列的鉴定结果

Table 2 Identification of the bacterial strains based on sequence analysis of the 16S rDNA

属 Genera	种 Species	菌株 Strain	与模式菌株序列同源性 Sequence similarity to type strain (%)	GenBank accession number
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	1-3	99.4	AF025365
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	1-14	99.4	AB126582
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	1-15	99.7	GU566322
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	1-16	98.3	HM030752
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	1-13	99.3	CP000647
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	2-1	95.4	CP001891
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	2-16	99.2	HQ200406
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	4-15	99.5	EU078620

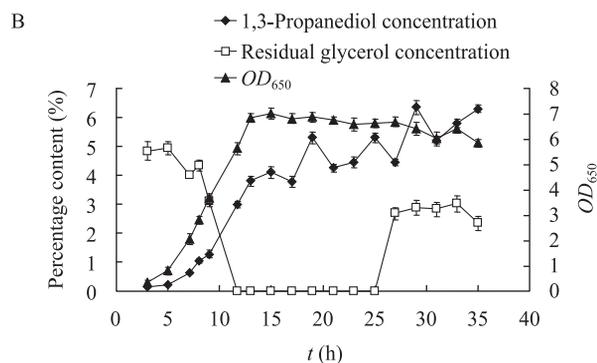
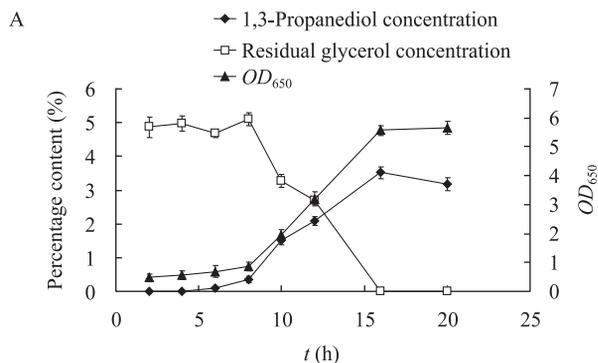


图 5 菌株 2-1 分批及补料分批发酵结果

Fig. 5 Result of batch and fed-batch fermentation of strain 2-1

Note: A: Result of batch fermentation; B: Result of fed-batch fermentation.

4 结论

本文采用质子自杀和外源添加高浓度产物相结合的平板筛选策略,从活性污泥中筛选能代谢甘油的菌株。与目前文献中报道的野生型或简单驯化的菌株发酵水平相比较,本文中筛选的菌株 2-1 底物转化率及 1,3-PD 终浓度都有较高的水平。本文研究结果表明,菌株 2-1 有一定的开发研究前景。因此,对菌株 2-1 进行进一步的生理生化鉴定及驯化培养、诱变育种等后续研究有一定的必要性。

参考文献

- [1] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, et al. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 289-297.
- [2] 修志龙. 1,3-丙二醇的微生物法生产分析[J]. 现代化工, 1999, 19(9): 33-35.
- [3] Homann H, Tag C, Biebl H, et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33: 121-126.
- [4] Saint-Amans S, Perlot P, Goma G, et al. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI3266 in a simply controlled fedbatch system[J]. Biotechnology Letters, 1994, 16(8): 831-836.
- [5] Hartlep SL, Hussmann W, Prayitno N, et al. Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glucose[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60(1/2): 60-66.
- [6] 陈宏文. 生物法合成 1,3-丙二醇的过程工程研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2005.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝玲, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 302-304.
- [8] 王红兵, 管桂萍, 田杰生. 质子自杀法选育克雷伯氏菌产乳酸突变株[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1368-1371.
- [9] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Maryland: Williams&Witkins Baltimore, 1994: 574-590.
- [10] 朱旭芬. 基因工程实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 20.
- [11] 修志龙. 甘油连续生物歧化过程培养基和 pH 调控策略研究[J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(4): 397-402.
- [12] Reimann A, Biebl H. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DMS 5431 and product tolerant mutants in fed-batch culture: feeding strategy for glycerol and ammonium[J]. Biotechnology Letters, 1996, 18(7): 827-832.
- [13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [14] Page RDM. Review: an application to display phylogenetic trees on personal computers[J]. Comput Appl Biosci, 1996, 12(4): 357-358.
- [15] Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens[J]. Curr Microbiol, 1999, 2(3): 229-305.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。