

一株琥珀酸产生菌的筛选及鉴定*

朱蕾蕾 刘宇鹏 郑璞** 孙志浩

(江南大学生物催化研究室 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 从牛的瘤胃中筛选获得一株能发酵生产琥珀酸的兼性厌氧菌。对其进行生理生化特性鉴定及 16S rRNA 基因分析。该菌株短杆状, 无鞭毛, 革兰氏染色阴性, V-P 反应阴性, 能发酵多种糖类产酸; 其 16S rRNA 基因与琥珀酸放线杆菌的同源性高达 99.8%, 认为属于琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*), 并将其命名为琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) SW0580, 保藏号 CGMCC 1593。初步发酵试验表明该菌能发酵 60 g/L 葡萄糖产生 25.8 g/L 的丁二酸。

关键词: 琥珀酸放线杆菌, 琥珀酸, 分离筛选, 鉴定, 厌氧发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0080-05

Screening and Identification of a Strain of *Actinobacillus succinogenes* Producing Succinic Acid by Anaerobic Fermentation*

ZHU Lei-Lei LIU Yu-Peng ZHENG Pu** SUN Zhi-Hao

(Laboratory of Biocatalysis, School of Biotechnology, Southern Yangtze University; The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: A strain, *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593, producing succinic acid was isolated from bovin rumen, which could produces succinic acid by anaerobic fermentation. A series of morphological and biochemical characteristics and sequence analysis of 16S rDNA reveal that it belongs to *Actinobacillus succinogenes*. When cultured anaerobically in medium containing 60 g/L glucose as carbon source, the strain produces 25.8 g/L of succinic acid.

Key words: *Actinobacillus succinogenes*, Succinic acid, Screening, Identification, Anaerobic fermentation

琥珀酸 (succinic acid) 又名丁二酸, 是一种用途广泛的有机化工原料。在医药工业中用于合成镇静剂、避孕药及癌症治疗药物。在化学工业中广泛用于生产染料、醇酸树脂、玻璃纤维增强塑料、离子交换树脂。琥珀酸还可用于分析试剂、食品铁质强化剂、清酒添加剂等。近年来, 琥珀酸的应用领域不断拓展, 国际市场需求量迅猛增加^[1]。

目前, 全球工业级琥珀酸的年需求量超过 15,000 吨, 售价约为 15,000 ~ 16,000 元/吨, 主要通过顺丁烯二酐的水解生产。化学合成的琥珀酸由于依赖于石化原料, 存在生产成本增高的趋

势, 从而使微生物发酵可再生原料生产琥珀酸的方法倍受重视^[2,3]。发酵法生产琥珀酸利用可再生糖源 (如葡萄糖) 和二氧化碳作为主要原料, 成本低廉且开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径, 显示了环境友好的特征。国外在上世纪 90 年代就开始发酵法生产琥珀酸的研究, 其中研究 *Anaerobiaspirillum succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens* 和基因工程菌 *E. coli* 发酵法生产琥珀酸的报道较多, 琥珀酸产量在 10 ~ 110 g/L 之间, 但鲜见成功工业化生产的报道^[4-8]。国内在这方面的研究尚处于起步阶段, 白冬梅等对琥珀酸放线杆菌的发酵液用高效液相色谱

* 国家 973 项目资助 (No. 2003CB716008)

江苏省自然科学基金 (No. BK2005201)

长江学者和创新团队发展计划资助 (No. IRT0532)

** 通讯作者 Tel: 0510-85808498, E-mail: zhengpu@sytu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-12, 修回日期: 2006-06-26

谱进行分析检测, 48 h 发酵液中含有琥珀酸 9.58 g/L^[9]。

本文主要报道了从牛的瘤胃中分离筛选到一株能发酵生产琥珀酸的细菌 SW0580, 并对其进行了生理生化特性鉴定与 16S rRNA 基因序列分析, 确定其属于琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

1.1.1 菌株: 琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) SW0580, 保存号: CCGMC 1593, 由本实验室从牛的瘤胃中分离获得^[10]。

1.1.2 培养基: 富集培养基: 玉米浆 20 g, 葡萄糖 15 g, 富马酸钠 5.88 g, CaCl₂ 0.2 g, K₂HPO₄ 3.0 g, NaCl 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, MgCl₂ 0.2 g, 定容至 1 L, pH 6.5; 筛选平板培养基: 富马酸钠 25 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 5 g, NaHCO₃ 2 g, 半胱氨酸盐酸盐 1 g, 琼脂 20 g。种子培养基: 葡萄糖 5 g, 酵母膏 5 g, 玉米浆 5 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.5 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.5 g, 混合维生素 1 mL, 定容至 1 L, pH 6.5; 发酵培养基: 葡萄糖 20~80 g, 酵母膏 15 g, 玉米浆 10 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.1 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.9 g, NaCl 1 g, MgCl₂ 0.2 g, CaCl₂ 0.2 g, 乙酸钠 1 g, 定容至 1 L, pH 6.5; 保藏培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母膏 5 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 5 g, NaCl 2 g, MgCl₂ 2 g, 葡萄糖 5 g, 可溶性淀粉 2 g, 定容至 1 L, pH 7.0。

1.1.3 培养条件: 在充满 CO₂ 的厌氧环境下, 37℃ 静止培养。

1.2 菌株分离与筛选

1.2.1 样品采集及预处理: 从无锡某养牛场获得牛的瘤胃, 将牛的瘤胃内容物悬浮于适量生理盐水中, 用无菌纱布滤去固体内容物 (粗纤维物质), 得到的悬浮液用作富集培养的接种物。

1.2.2 菌株分离培养: 将过滤得到的悬浮液接于富集培养基中, 在充满 CO₂ 的厌氧环境中, 37℃ 培养 48 h, 再将富集培养物稀释一定倍数涂布于筛选平板, 同样条件下培养 2~3 d 后, 挑取不同形态的单菌落接种至发酵培养基, 同样条件下培养 2~3 d。

1.3 分析测定

1.3.1 残糖测定: DNS 法, 方法见参考文献 [11]。

1.3.2 有机酸测定: TLC 法, 方法见参考文献 [11]。HPLC 法: 色谱分离柱: Eclipse XDB-C8 柱, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相: 50 mmol/L H₃PO₄ 水溶液, pH 2.8 (用 NaOH 溶液调节), 然后加入 3% 的色谱甲醇作为流动相; 流动相流速: 0.5 mL/min; 检测器: 紫外检测器, 检测波长为 210 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 室温。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 细胞形态: 将在 TSB 平板培养基上培养得到的菌体首先用戊二醛固定, 用磷酸缓冲液漂洗后, 将其固定在铜网上, 然后用磷钨酸染色, 干燥后, 置于透射电镜下观察。

1.4.2 生理生化特征鉴定: 鉴定方法见参考文献 [12~14]。

1.4.3 16S rRNA 基因分析: 细菌总 DNA 的提取见参考文献 [15]。以细菌染色体 DNA 为模板, 引物 P1 (5' - ATTGAACGCTGGCGGCAGGC - 3') 和 P2 (5' - CGGGCGGTGTGTACAAGGCC - 3') 进行 PCR 扩增 (PE 公司, PE9700 型扩增仪), 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 循环参数为 95℃ 变性 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 60℃ 复性 30 s, 共 30 个循环。PCR 产物直接委托博采生物工程 (上海) 有限公司测序。所得的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中相关种属的序列比较后, 进行系统发育分析, 确定该菌的分类地位。

1.5 发酵产琥珀酸试验

将保藏的 SW0580 接入种子培养基, 培养 22 h, 然后以 5% 的接种量接入发酵培养基中, 培养 60 h 后, 将发酵液处理后进行 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 琥珀酸产生菌筛选

按方法 1.3 采集样品, 初筛共分离得到 72 株能够产生琥珀酸的形态各异的单菌落菌株, TLC 法测定发现, 它们产生琥珀酸的水平差别较大, 代谢产物中有机酸的种类较多。由此可知, 微生物发酵产生琥珀酸的途径较多, 琥珀酸是以代谢终产物或中间代谢产物的形式出现。然后, 对上述产生琥珀酸的 72 株菌进行复筛, 以 HPLC 法精确测定琥珀酸及其它杂酸的含量, 其中生成琥珀

酸最多的一株菌命名为 SW0580，浓度达到 10.55 g/L，且该菌产生的杂酸种类相对较少，以乙酸为主，乳酸含量少（图 1），这有利于丁二酸的分离提取。

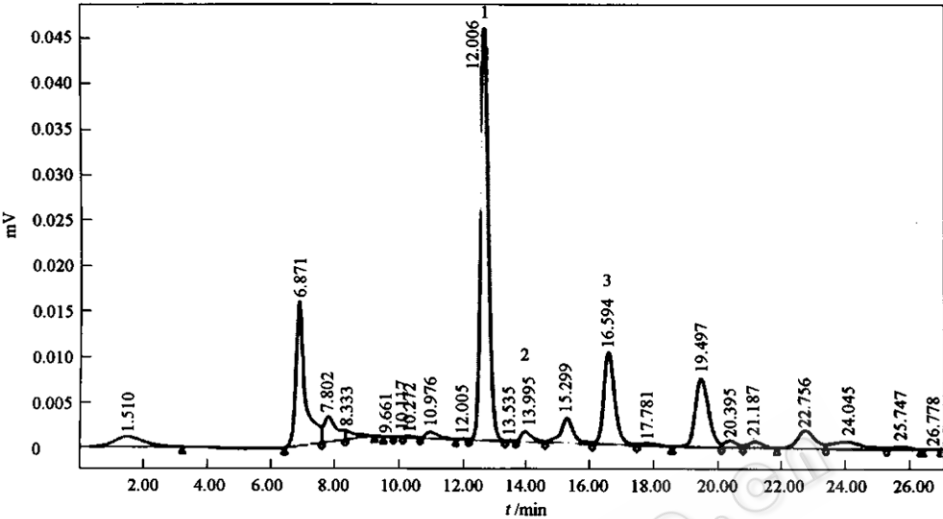


图 1 SW0580 发酵液中有有机酸高效液相色谱图
1 Succinic acid, 2 Lactic acid, 3 Acetic acid

2.2 培养特征与形态观察

将菌株 SW0580 通过稀释涂布在 TSB 平板上，置于充满 CO₂ 厌氧环境中，37℃ 培养 1 d 后，开始形成淡黄色直径约 1 mm 的菌落，2 d 后菌落直径可达 2 mm，透明，菌落较薄，圆形，边缘光滑，菌落中间有微小的突起；置于好氧环境 37℃ 培养 1~2 d 后，形成淡黄色 1 mm~2 mm 的圆形不透明菌落，菌落中间也有微小突起，且菌落易黏在 TSB 平板培养基上。TSB 液体培养的细胞经透射电镜（Hitachi H-7000, Honshu, Japan）观察，细胞呈杆状或球杆状，1.6 μm × 0.5 μm，细胞粘连在一起，无鞭毛，无芽孢。其电镜照片见图 2。

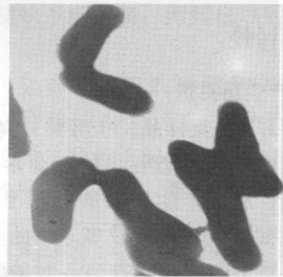


图 2 SW0580 的细胞形态 (17,000 × 1.5)

2.3 生理生化鉴定

生理生化特征鉴定见表 1，SW0580 为革兰氏

阴性，VP 反应阴性，氧化酶及过氧化氢酶阳性，能消耗硝酸盐，且能发酵多种糖类产酸，多数生理生化特征与琥珀酸放线杆菌（ATCC 55618）相似。但 SW0580 可以利用柠檬酸盐，分解 H₂S，分解蛋白质中的色氨酸，与 ATCC 55618 有所不同。

表 1 生理生化鉴定结果及对照表

生理生化特性	SW0580	琥珀酸放线杆菌 ⁽⁴⁾
革兰氏染色	-	-
过氧化氢酶	+	+
氧化酶	+	+
利用柠檬酸盐	+	-
H ₂ S	+	-
脲酶	-	-
色氨酸（吲哚）	+	-
V-P	-	-
凝胶水解	-	-
葡萄糖产气	-	-
消耗硝酸盐	+	+
β-半乳糖苷酶	+	+
精氨酸双水解酶	+	-
赖氨酸脱羧酶	+	-
鸟氨酸脱羧酶	+	-
发酵葡萄糖产酸	+	+
发酵甘露糖产酸	+	+
发酵甘露醇产酸	+	+
发酵 D-山梨醇产酸	+	+

续表 1

发酵果糖产酸	+	+
发酵麦芽糖产酸	+	+
发酵 D-木糖产酸	+	+
发酵蔗糖产酸	+	+
发酵乳糖产酸	+	+
发酵半乳糖产酸	+	+
发酵 D-阿拉伯糖产酸	+	+
发酵淀粉产酸	-	-
发酵甘油产酸	-	-

• 菌株在鉴定培养基中不生长

2.4 16S rRNA 基因序列分析及其系统发育分析
提取细胞总 DNA, 以引物 P1 和 P2 扩增菌株

表 2 序列相似性分析表

Strain	Strain number	GenBank No.	Sequence similarity to <i>Actinobacillus succinogenes</i>
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	CGUG 43843	AY362898	99.8%
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	ATCC 55618	AF024525	99.8%
<i>Actinobacillus indolicus</i>	H1271	AF268963	93.9%
<i>Actinobacillus minor</i>	H1275	AF268944	93.6%
<i>Mannheimia</i> sp.	R19.2	AF053894	93.5%
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	NCTC 8479T	AJ295746	93.4%
<i>Mannheimia</i> sp.	BJ3956.1	AY425295	93.3%
<i>Mannheimia</i> sp.	MCCM 00145	AF224286	93.2%
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		AF359941	93.2%
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	IIIM570-6	AJ290758	93.2%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	MCCM 00189	AF224283	93.2%
<i>Mannheimia</i> sp.	NCTC 11313	AY362914	93.2%
<i>Pasteurella haemolytica</i>	PH704	U57072	93.2%
<i>Mannheimia</i> sp.	M14.4	AY425294	93.2%
<i>Actinobacillus minor</i>	H1474	AF268950	93.1%
<i>Actinobacillus minor</i>	H1473	AF268949	93.1%
<i>Mannheimia</i> sp.	HPA121.	AF053898	93.1%
<i>Histophilus somni</i>	90-1574	AB176900	93.0%
<i>Histophilus somni</i>	2336	AB176897	93.0%
<i>Histophilus somni</i>	606	AB176896	93.0%
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	F 127	AF247722	92.8%
<i>Actinobacillus genom</i> sp. 1	52418-03	AY749139	92.8%
<i>Actinobacillus genom</i> sp. 1	24593-01	AY749137	92.5%

2.5 *Actinobacillus succinogenes* SW0580 发酵葡萄糖产生琥珀酸的初步试验
琥珀酸放线杆菌 SW0580 以葡萄糖为碳源

SW0580 的 16S rRNA 基因, 获得 1,289 bp, 将该序列 (已提交 GenBank, No. DQ458786) 与 GenBank 中相关数据进行相似性分析, 结果见表 2。选择 BLAST 比对结果中相似性最高的 23 条 16S rDNA, 利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对并绘制进化树, 图 3 表明, SW0580 与 *Actinobacillus succinogenes* 的两株菌位于同一分支, 且 SW0580 与琥珀酸放线杆菌的同源性最高, 为 99.8%, 因此认为 SW0580 是琥珀酸放线杆菌, 拟命名为琥珀酸放线杆菌 SW0580 (*Actinobacillus succinogenes* SW0580)。保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC 1593。

37℃ 在充满 CO₂ 的厌氧条件下发酵 60 h, 由图 4 可以看出: 当培养基中葡萄糖的浓度为 60 g/L 时, 琥珀酸含量最高, 为 25.8 g/L。

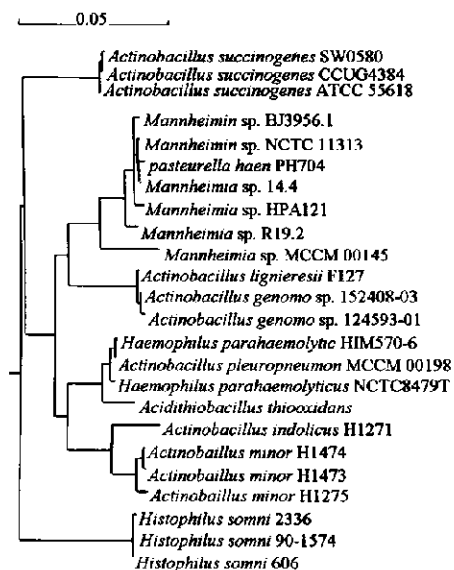


图 3 菌株 SW0580 在巴斯德科中的系统发育地位

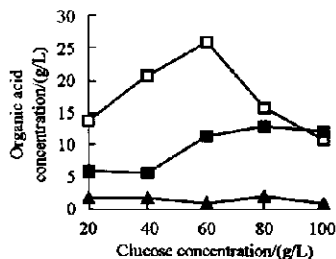


图 4 SW0580 发酵不同浓度的葡萄糖产琥珀酸情况

—□— Succinic acid concentration, —■— Acetic acid concentration,
—▲— Lactic acid concentration

3 结论

本文报道了从牛瘤胃中筛选得到一株可产琥珀酸的菌 SW0580, 经鉴定为琥珀酸放线杆菌, 命名为琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) SW0580, 保存于北京中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物保藏中心, 保藏号 CGMCC1593。CGMCC1593 能发酵 60 g/L 葡萄糖产生 25.80 g/L 的琥珀酸, 琥珀酸水平较稳定, 经过发酵条件优化, 目前在 5 L 发酵罐中 48 h 产琥珀酸已达到 60.21 g/L (另文发表), 其发酵过程与代谢调控的进一步研究正在进行中。

致谢 感谢江南大学生物工程学院沈 微博士帮助设计 PCR 引物, 并对实验结果提供宝贵意见, 特此致谢。

参考文献

- [1] Zeikus J, Jain M, Elankovan P. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51 (5): 545 ~ 552.
- [2] 张洪勋, 罗海峰, 庄绪亮. 微生物学通报, 2003, 30 (5): 102 ~ 106.
- [3] 詹晓北, 朱一晖, WANG D H. 食品科技, 2003, 29 (2): 44 ~ 49.

- [4] Guettler M V, Ruml D, Jain M K. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49 (1): 207 ~ 216.
- [5] Lee P C, Lee W G, Kwon S, et al. Process Biochem, 1999, 35 (1): 49 ~ 55.
- [6] Lee P C, Lee W G, Lee S Y, et al. Biotechnol Bioprocess Eng, 2000, 5 (5): 379 ~ 381.
- [7] Van der Werf M J, Guettler M V, Jain M K, et al. Arch Microbiol, 1997, 167 (6): 332 ~ 342.
- [8] Donnelly M, Millard C S, Stols L. US Patent, 2001, RE37393.
- [9] 白冬梅, 杜国民, 沈 菲, 等. 分析实验室, 2004, 23 (3): 15 ~ 18.
- [10] 孙志浩, 郑 璞, 刘宇鹏, 等. 中国专利. 申请号: 200610038113. 6.
- [11] 王福来, 张永华. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [12] Fergus C P, Michael G, Carole T. J Gen Microbiol, 1988, 134 (7): 1847 ~ 1882.
- [13] 东秀珠, 秦妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E 编. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰氏细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984.
- [15] Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Short Protocols in Molecular Biology. (4th Edition). John Wiley & Sons, Inc., 1999.