

一株以葡萄糖为底物产 2,3-丁二醇微生物 菌株的筛选及鉴定

林清 张显 杨套伟 徐美娟 张术聪 夏海锋 饶志明*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 从自然界中筛选出一批以葡萄糖为底物发酵产 2,3-丁二醇的菌株, 经初步发酵测定发酵液中 2,3-丁二醇含量, 其中菌株 6-7 的 2,3-丁二醇产量最高达 49.6 g/L。对其进行常规生理生化鉴定实验, 并结合 16S rDNA 序列分析, 比对结果表明, 菌株 6-7 与 *Bacillus subtilis* strain BIHB332 相似性达 99%。在细菌分类学上属于枯草芽孢杆菌属, 将其命名为 *Bacillus subtilis* 6-7。其特点是属于环境友好和食品安全型菌株, 因此, 利用 *Bacillus subtilis* 6-7 生产 2,3-丁二醇具有良好的工业应用价值。

关键词: 2,3-丁二醇, 分离筛选, 鉴定, 枯草芽孢杆菌

Screening and Identification of a Strain Producing 2,3-Butanediol from Glucose as Substrate

LIN Qing ZHANG Xian YANG Tao-Wei XU Mei-Juan ZHANG Shu-Cong
XIA Hai-Feng RAO Zhi-Ming*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: Most strains with capability of producing 2,3-butanediol (2,3-BDO) from glucose were isolated from different natural environment samples. The Strain 6-7 with high capability of producing 2,3-BDO was screened from the isolated strains and the production of 2,3-BDO reached 49.6 g/L. In addition to general morphological and biochemical characteristics, the strain 6-7 was identified by 16S rDNA sequence and systematic analysis. The results showed that 16S rDNA sequence of strain 6-7 had similarity of 99% with *Bacillus subtilis* strain BIHB332, suggesting that the strain 6-7 is one of *Bacillus subtilis* species. It is an environmentally friendly strain and *Bacillus subtilis* is generally regarded as safe microorganism used for industrial production. This strain showed the potential application in the future.

Keywords: 2,3-BDO, Screening, Identification, *Bacillus subtilis*

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA02Z207); 国家自然科学基金项目(No. 30970056); 霍英东青年基金项目(No. 121020); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. JUSRP31001)

* 通讯作者: Tel: 86-510-85916881; ✉ raozm@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-06-02; 接受日期: 2010-08-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2,3-丁二醇, 英文名为2,3-Butanediol, 简称为2,3-BDO, 是一种手性化合物^[1-2], 同时它也是一种重要的化工原料和医药前体, 可广泛应用于药物、食品、化妆品、洗液等多个领域^[3]。目前只有化学合成法实现了2,3-丁二醇小规模的工业化生产, 但设备成本较高, 污染环境^[2]。微生物法生产2,3-丁二醇较化学法具有反应条件温和、原料利用率高及工艺条件简单等优点, 从长远发展及环境保护角度来看, 微生物发酵法显得更有生命力。因此, 用微生物发酵法来生产2,3-丁二醇并对其衍生物进行开发应用逐渐引起了人们的关注, Olson 和 Johnson 利用产气节杆菌(*A. aerogenes*)将266 g/L 的葡萄糖转化成97 g/L 的2,3-丁二醇和14 g/L 的3-羟基丁酮; Yu 和 Saddler 利用肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)从226 g/L 的葡萄糖得到2,3-丁二醇和3-羟基丁酮共113 g/L^[4-5]。

本实验针对以葡萄糖为底物, 筛选了产2,3-丁二醇的菌种42株, 对其中2,3-丁二醇产量最高的一株6-7进行菌种鉴定及初步发酵的研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 采样与初筛供试菌株: 江苏某制糖厂及无锡某化工厂附近土样。

1.1.2 培养基^[6-7]: 种子富集培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min; 平板分离培养基(g/L): 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 琼脂 18, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min; 斜面保藏培养基(g/L): 酵母膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 琼脂 18, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min; 2,3-丁二醇发酵培养基(g/L): 葡萄糖 150, 玉米浆 6, 尿素 2, 酵母膏 5, pH 6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.1.3 试剂: 2,3-丁二醇(2,3-butanediol)标样购自 Sigma (USA) 公司, 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB) 购自 Sangon, 溶菌酶(Lysozyme) 购自 SeebioBiotechnology, 蛋白酶 K (Proteinase K) 购自 MerckKGaA (Germany), PMD18-T 载体购自 TaKaRa (Japan), 微孔滤膜为孔径 0.22 μm , 购自上海亚东核级树脂有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选^[8-11]: (1) 菌种筛选培养: 将采集到的样品于富集培养基中 37°C、150 r/min 摇床富集培

养 10 h, 取不同稀释度稀释涂布培养。挑取单菌落在平板分离培养基上进行划线分离, 37°C 培养 1-2 d, 镜检, 待试菌株保藏于斜面保藏培养基, 作初筛备用; (2) 三角瓶发酵培养: 从斜面上挑取菌株接种到种子培养基中, 培养至对数期, 按 5%接种量接入发酵培养基中, 然后置于 37°C、150 r/min 条件下振荡培养 96 h。收集发酵液, 离心, 取上清液以备检测。

1.2.2 2,3-丁二醇定性检测方法^[12]: 2,3-丁二醇定性检测采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)检测: 取 2 mL 上清液, 用 2 mL 乙酸乙酯进行萃取, 然后采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)鉴定萃取液中是否含有 2,3-丁二醇。气质联用检测条件: 采用的色谱柱温控程序为: 首先在 60°C 下保温 1 min, 然后以 6°C/min 的升温速率升至 90°C 并保持 2 min, 最后以 30°C/min 的升温速率升至 180°C, 恒温 2 min。进样口温度为 250°C, 进样量为 1 μL , 载气为高纯氦气, 载气流量 1.2 mL/min, 检测器温度为 240°C。

TraceMS 质谱条件: EI⁺轰击源, 全扫描方式, 扫描质量范围为 30-500 amu, 发射电流为 200 μA , 电子能量为 70 eV, 质谱检测谱库为 NIST2003 谱库。

1.2.3 2,3-丁二醇定量分析方法^[13-14]: 高效液相色谱(HPLC)法测定: 色谱条件: 糖柱 Sugarpak1 (6.5 mmid \times 300 mm); 柱温: 85°C; 流动相: 纯水; 流速 0.4 mL/min; 进样量为 10 μL ; 检测器: 示差折光检测器。

1.2.4 生长曲线测定^[9]: 按细菌生长曲线的测定方法, 以 600 nm 处的浊度表示。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 菌株形态学、生理生化特征^[15]: 根据《常见细菌系统鉴定手册》所列菌种鉴定方法进行菌种鉴定。

1.3.2 基因组 DNA 的提取: 采用 SDS-蛋白酶 K 裂解法, 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀细菌碎片和多糖, 再用无水乙醇沉淀提取总 DNA。

1.3.3 16S rDNA 的扩增: 使用细菌 16S rDNA 的通用引物进行扩增。

正向引物 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

反向引物 R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。

反应体系: 取 DNA 模板 1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 引物 1 μ L, dNTPs 4 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L, 总反应体积为 50 μ L。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取扩增产物 10 μ L 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, Goldview 染色, 紫外灯下观测结果。

1.3.4 PCR 产物的克隆与 16S rDNA 序列测定及同源性比较、系统分析: 用胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物, 电泳验证。将纯化后的 PCR 扩增产物连接到 pMD18-T 载体上, 转化 *E. coli* JM109。经氨苄青霉素抗性筛选, 获得阳性克隆。16S rDNA 测序由上海生工生物科技有限公司完成, 将测序结果在 NCBI 中 BLAST 后交送 GenBank 库与数据库已有序列进行比较分析。并以 Neighbor-joining 法构建

了系统进化树。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

从自然界分离出的 106 株菌经发酵采用 HPLC 检测, 得到了 42 株能够利用葡萄糖发酵生产 2,3-丁二醇的菌株。由表 1 可知, 不同菌株产 2,3-丁二醇的能力有很大的差别, 大部分集中于中等及偏下水平, 高水平较少。

通过筛选选取 4 株 2,3-丁二醇产量相对较高的菌株, 进行复筛实验, 利用 HPLC 测定各菌株发酵液中 2,3-丁二醇的含量, 计算摩尔转化率, 其中编号为 6-7 的菌株 2,3-丁二醇产量最高达 49.6 g/L, 结果如表 2 所示。

表 1 菌株初筛结果
Table 1 The result of screening

2,3-丁二醇含量水平 2,3-BDO production levels	2,3-丁二醇含量 2,3-BDO concentration (g/L)	菌株数 Strains	占总菌株数的百分比 Percentage of all strains (%)
高水平 High level	> 30	2	4.76
较高水平 Relatively high level	20-30	2	4.76
中等水平 Middle level	10-20	9	21.43
中等偏下水平 Lower-middle level	5-10	19	45.24
低水平 Low level	0-5	10	23.81

表 2 菌株复筛结果
Table 2 Results of the second screening strain

菌株编号 Strain number	2,3-丁二醇产量 2,3-BDO (g/L)	摩尔转化率 Molar conversion rate (%)
6-7	49.60	66.14
6-8	33.77	45.03
3-10	27.61	36.81
2-5	21.83	29.11

2.2 初步发酵条件研究

将菌株 6-7 在种子培养基中 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床培养 7 h, 以 5% 的接种量分别接种至装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 150 r/min、37 $^{\circ}$ C 发酵 96 h, 测定发酵液中 2,3-丁二醇含量。菌株 6-7 生长曲线如图 1 所示, 当菌体在种子培养基中生长 10 h 时生长量达到最大值, 10 h 后菌体量不再增加。菌株 6-7 产 2,3-丁二醇发酵曲线如图 2 所示, 发酵 72 h 时 2,3-丁二醇的产量达到最大值。

2.3 2,3-丁二醇定性检测

采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)来鉴定产物中是否含有 2,3-丁二醇。结果如图 3-6 所示: 图

3 为以乙酸乙酯为溶剂的 2,3-丁二醇标样 GC-MS 图谱, 图 4 为菌株 6-7 发酵液用乙酸乙酯萃取后的 GC-MS 图谱, 图 5 为在图 4 中 3.37 min 解图后的结果, 图 6 为图 4 中 3.5 min 解图后的结果。从图 3 和图 4 可以看出, 在 3.37 min 和 3.5 min 处均有物质峰出现, 说明发酵液中很可能含有 2,3-丁二醇, 通过图 5 和图 6 结果可以断定, 发酵液中确实含有 2,3-丁二醇。

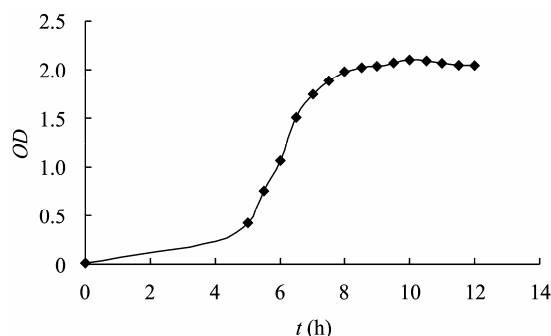


图 1 菌株 6-7 生长曲线

Fig. 1 Growth culture of the strain 6-7

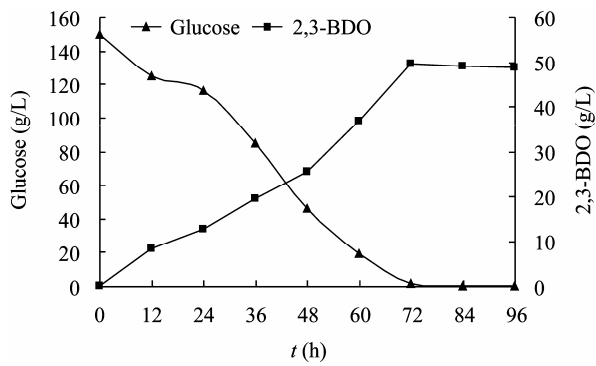


图2 菌株 6-7 发酵产 2,3-丁二醇曲线

Fig. 2 Time courses of the 2,3-BDO production from glucose by strain 6-7

2.4 2,3-丁二醇定量检测

采用 HPLC 来测定菌株 6-7 发酵液中 2,3-丁二醇的含量。结果如图 7、8 所示: 图 7 为 2,3-丁二醇标样 HPLC 图谱(所用 2,3-丁二醇标样纯度 > 99%, 为外消旋体和内消旋体的混合物), 图 8 为发酵液用高氯乙酸去除菌体蛋白后的 HPLC 图谱。

2.5 菌种鉴定

2.5.1 培养特征及形态学鉴定: 菌株 6-7 在平板分离培养基上 37°C 培养 24 h 后的菌落直径达 2 mm, 不透明, 菌落较薄, 圆形, 边缘不光滑, 乳脂色菌落, 菌落中间有微小突起, 菌落易挑起。平板培养细

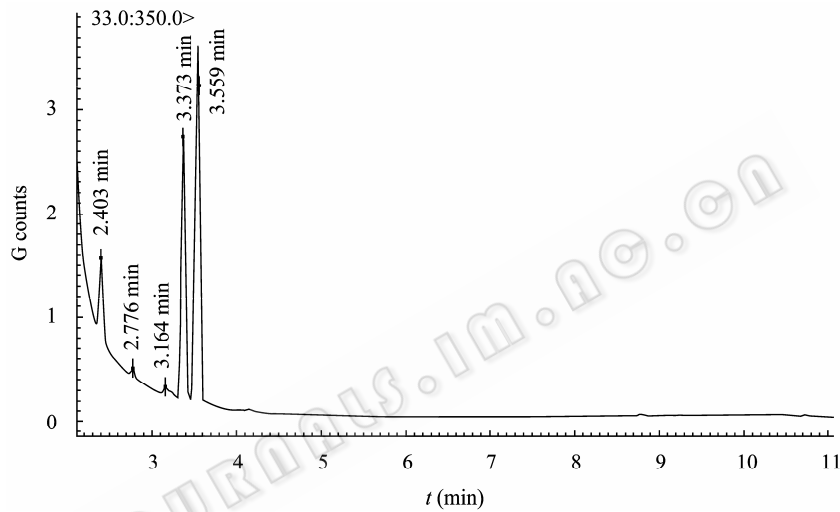


图3 2,3-BDO 标样 GC-MS 图谱

Fig. 3 GC-MS chromatogram of 2,3-BDO standard sample

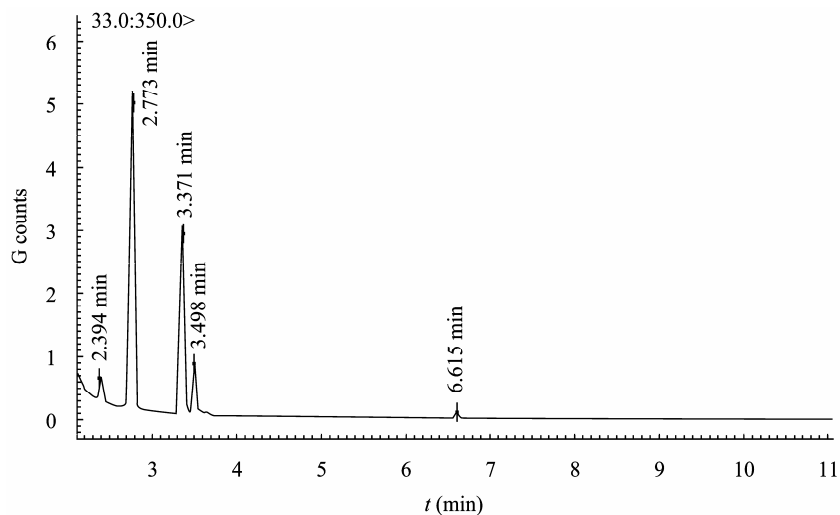


图4 萃取液 GC-MS 图谱

Fig. 4 GC-MS chromatogram of extraction liquid

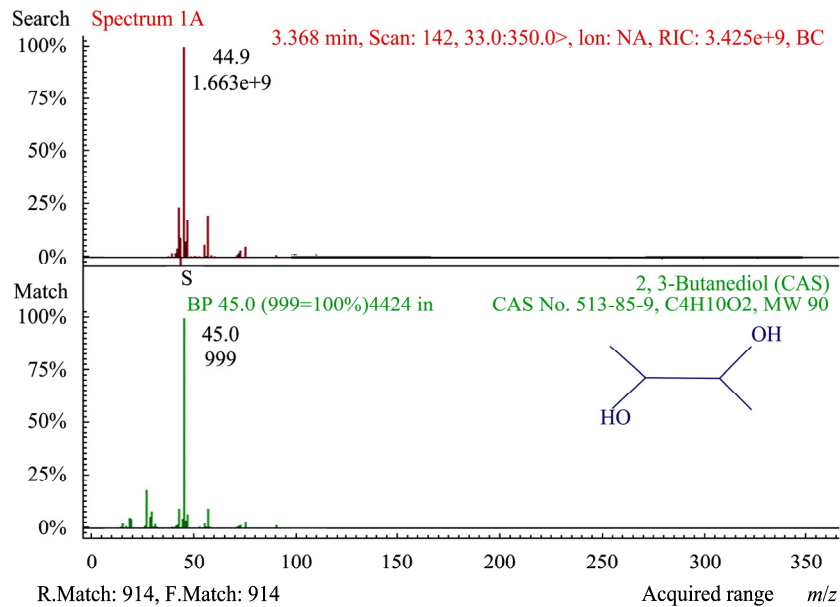


图 5 图 4 中 3.37 min 解图结果

Fig. 5 3.37 min analysis result of extraction liquid chromatogram

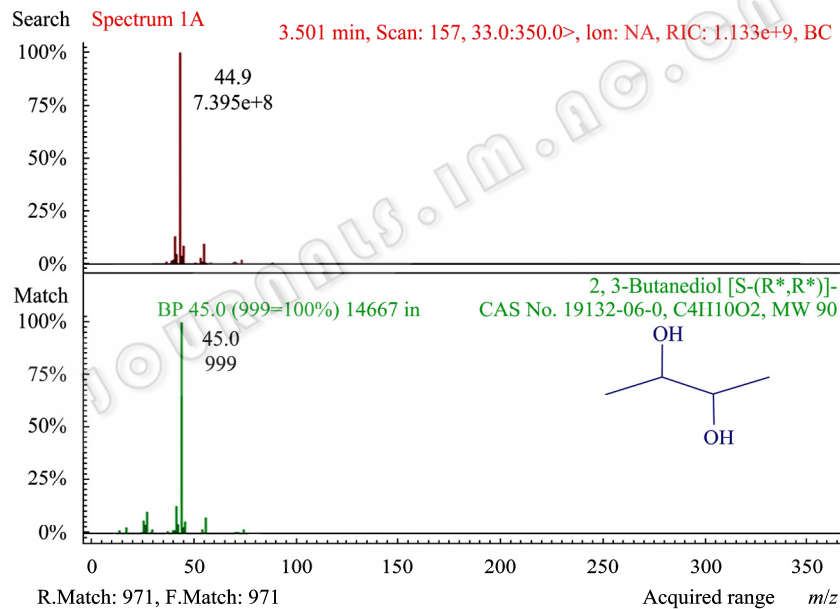


图 6 图 4 中 3.5 min 解图结果

Fig. 6 3.5 min analysis result of extraction liquid chromatogram

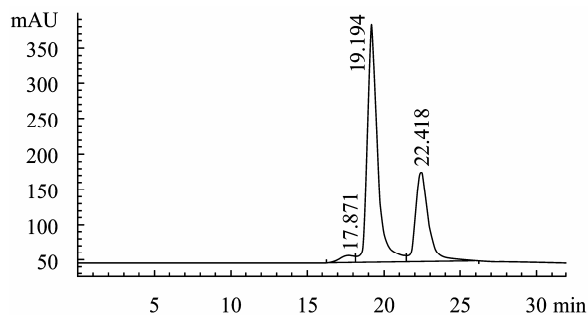


图 7 2,3-BDO 标样 HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC chromatogram of 2,3-BDO standard sample

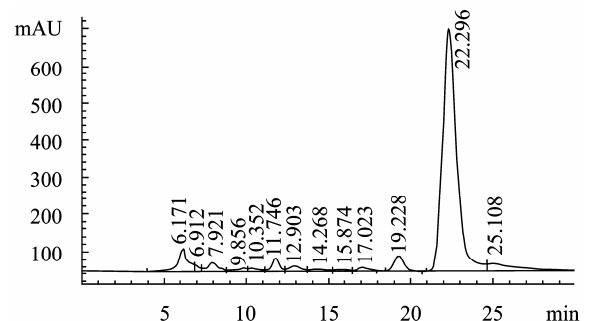


图 8 6-7 发酵液 HPLC 图谱

Fig. 8 HPLC chromatogram of fermentation broth

胞经透射电镜(Hitachi H-7000, Honshu, Japan)观察, 细胞呈杆状或球杆状, 大小不一, (0.3–2.2) μm \times (1.2–7.0) μm , 有芽孢。其电镜照片见图 9。

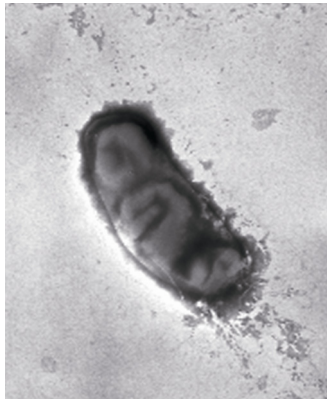


图 9 6-7 菌株在斜面保藏培养基上的细胞电镜图 ($\times 30000$)

Fig. 9 Electron micrographs of the strain 6-7 ($\times 30000$)

2.5.2 生理生化特征: 对该菌株进行常规生理生化特征鉴定, 结果见表 3。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)对枯草芽孢杆菌的描述, 菌株 6-7 与枯草芽孢杆菌生化特征基本一致。

2.5.3 菌株 16S rDNA 序列分析及分子鉴定: 提取菌株 6-7 细胞总 DNA, 以通用引物 F、R 扩增菌株的 16S rDNA 部分基因片段约 900 bp, 产物片段经纯化、测序。通过序列分析获得该片段的 DNA 序列,

利用 BLAST 软件将这些序列与美国国家生物信息中心(NCBI)收录的 DNA 序列进行比对, 并绘制系统进化树(图 10)。结果表明其与 *Bacillus subtilis* strain BIHB332 相似性最高, 达 99%以上, 该序列在 GenBank 数据库中登录号为 HM242217, 将其命名为 *Bacillus subtilis* 6-7。

表 3 菌株 6-7 的生理生化结果
Table 3 Physiological and biochemical characters of the strain 6-7

特征反应 Characterization	结果 Result	特征反应 Characterization	结果 Result
革兰氏染色 Gram staining	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	蛋白酶试验 Protein test	+
蔗糖 Sucrose	+	好气性试验 Aerobic test	+
果糖 Fructose	+	氧化酶 Oxidase	+
乳糖 Lactose	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction test	+
木糖 Xylose	+	V-P 试验 V-P test	+
葡萄糖 Glucose	+	明胶水解 Gelatin hydrolysis	+
麦芽糖 Maltose	+	MP 试验 MP test	-
甘露醇 Mannitol	+	运动性 Mobility	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

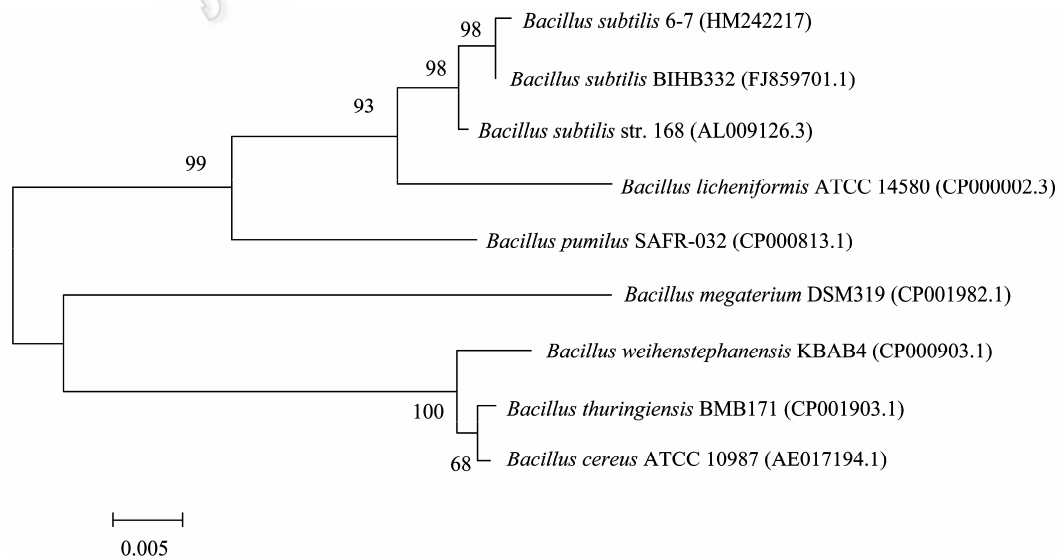


图 10 菌株 6-7 的 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA gene sequence of strain 6-7

Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1000 samplings). The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Bar: 0.005 sequence divergence.

3 讨论

目前, 微生物发酵法生产 2,3-丁二醇已成为国内外研究的热点之一, 菌种以克雷伯氏菌和产气肠杆菌为主, 山东大学的秦加阳等利用克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp. LN145) 将 208 g/L 葡萄糖转化为 84.0 g/L 2,3-丁二醇和 10.5 g/L 3-羟基丁酮, 2,3-丁二醇的摩尔转化率达到理论水平的 91%^[12]。但克雷伯氏菌和产气肠杆菌具有潜在的致病性, 限制了其工业化的应用。

本实验筛选获得的产 2,3-丁二醇 *Bacillus subtilis* 6-7 是环境安全型菌株, 具有良好的工业应用价值。尽管目前本研究中 2,3-丁二醇产量与菌株 *Klebsiella* sp. LN145 相比有一定差距。在发酵过程中, 通过对培养基的优化、发酵过程控制等来提高发酵产物的产量是发酵研究中的主要方向^[16-18], 因此本课题组将通过通过对 *Bacillus subtilis* 6-7 发酵产 2,3-丁二醇的条件进行优化来提高其产量。此外, 国内外对枯草芽孢杆菌的分子改造是食品安全领域的研究热点, 其转化、敲除等方法都已建立, 我们将在 *Bacillus subtilis* 6-7 发酵产 2,3-丁二醇的代谢途径研究的基础上进行分子定向改造。综上所述, 菌株 6-7 的 2,3-丁二醇产量具有很大的提升空间, 相关工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Syu MJ. Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**(1): 10-18.
- [2] Garg SK, Jain A. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresour Technol*, 1995, **51**(2): 103-109.
- [3] 马成伟, 杜彤, 孙亚琴, 等. 生物转化法生产 2,3-丁二醇. *精细与专用化学品*, 2006, **14**(15): 15-18.
- [4] 纪晓俊, 朱建国, 高正, 等. 微生物发酵法生产 2,3-丁二醇的研究进展. *现代化工*, 2006, **26**(8): 23-27.
- [5] Afschar A, Vaz Rossell C, Jonas R, et al. Microbial production and downstream processing of 2,3-butanediol. *J Biotechnol*, 1993, **27**(33): 317-329.
- [6] Cerrutti P, Alzamora SM, Huergo MS. Inhibition of *Bacillus coagulans* growth in laboratory media and in fruit purees. *Rev Argent Microbiol*, 2000, **32**(2): 71-76.
- [7] Wu KJ, Saratale GD. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresource Technology*, 2008(99): 7966-7970.
- [8] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 223-225.
- [9] Ji XJ, Huang H, Li S, et al. Enhanced 2,3-butanediol production by altering the mixed acid fermentation pathway in *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**(4): 761-734.
- [10] Qin JY, Xian ZJ, Ma CQ, et al. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. *Chin J Chem Eng*, 2006, **14**(1): 132-136.
- [11] Yu EK, Saddker JN. Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**(4): 777-784.
- [12] 秦加阳, 肖梓军. 一种简单的高产 2,3-丁二醇发酵生产方法. *生物加工过程*, 2005, **3**(4): 71-73.
- [13] Champluvier B, Decallonne J. Influence of sugar source (lactose, glucose, galactose) on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199. *Arch Microbiol*, 1989(152): 411-414.
- [14] Saha BC, Bothast RJ. Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999(52): 321-326.
- [15] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-795.
- [16] Alam S, Capit F, Weigand WA, et al. Kinetic of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. *Chem Technol Biotechnol*, 1990(47): 71-84.
- [17] Yu EK, Saddker JN. Fed-batch approach to production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high substrate concentrations. *Appl Environ Microbiol*, 1983(46): 630-635.
- [18] Ramachandran KB, Goma G. Effect of oxygen supply and dilution rate on the production of 2,3-butanediol in continuous bioreactor by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol*, 1987(9): 107-111.