

文章编号:1009-038X(2004)01-0071-04

产 1,3-丙二醇菌株的筛选、改良及发酵

李琛, 孙金凤, 诸葛健

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 从自然界筛选得到了 9 株可发酵甘油生产 1,3-丙二醇的肠道细菌, 经鉴定均为肺炎克雷伯氏菌. 经化学诱变, 菌株的 1,3-丙二醇产量有所提高, 其最终产量达到 2% 左右.

关键词: 1,3-丙二醇; 克雷伯氏菌; 甘油

中图分类号: TQ 923

文献标识码: A

Screening, Modification and Fermentation of Strains Producing 1,3-Propanediol

LI Chen, SUN Jin-feng, ZHUGE Jian

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Nine strains of enteric bacteria, capable of converting glycerol to 1,3-PD were screened. All of the strains were identified as *Klebsiella pneumoniae*. After chemical mutation, the production of 1,3-PD was improved. After beering optimized the fermentation the yield of 1,3-propanediol is up to 2%.

Key words: 1,3-propanediol; *Klebsiella pneumoniae*; glycerol

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的化工原料, 它可直接用于防冻剂, 也是多种增塑剂、洗涤剂、防腐剂和乳化剂的合成原料, 广泛用于食品、化妆品和制药等行业. 但它最主要的消费领域是用作新型聚酯 PTT 的主要原料^[1].

利用微生物歧化甘油生产 1,3-丙二醇是一种对环境友善的生产工艺, 它克服了单纯化学合成^[2]带来的诸多不利. 国内外发酵法生产 1,3-丙二醇采用最多的菌种, 是肺炎克雷伯氏菌^[3~5]. 杜邦、杰能科联合美国一些高校^[6,7]将其关键酶基因克隆并转化进大肠杆菌中, 表达取得了成功. 同时申请利用基因工程菌一步法发酵生产 1,3-丙二醇的专利^[8], 并已经工业化生产^[9], 产品 Sorona 已经上市. 据报

道, 国际上利用生物转化法生产 1,3-丙二醇的最高产量已经达到 65~70 g/L^[10].

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

人体肠道细菌: 无锡市卫生防疫站搜集的野生型菌株; LB 培养基; 以甘油为惟一碳源的培养基^[14]等.

1.2 方法

将从无锡市卫生防疫站搜集的野生型人体肠道细菌用无菌牙签挑至以甘油为惟一碳源培养基的平板上, 将长出的菌落接入装液量为 30 mL 的

收稿日期: 2003-06-10; 修回日期: 2003-07-22.

作者简介: 李琛(1979-), 男, 江苏南京人, 发酵工程硕士研究生.
万方数据

250 mL 盐水瓶中,用橡皮塞塞紧,置 37 ℃ 恒温箱中培养 100 h.

1.3 检测

取发酵液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中于 3 000 r/min 离心 15 min,气相色谱检测上清液中 1,3-PD 的质量分数^[12,13].

1.3.1 色谱参数 安捷伦 1490 型气象色谱仪;氢火焰离子化检测器;内径 3 mm,长 2 m 的不锈钢柱,填充国产高分子微球 GDX-401(60~80 目)为固定相;1,3-丙二醇色谱标准物.

1.3.2 色谱条件

1) 色谱柱老化:自室温至 240 ℃ 分段恒温饱和 20 h.

2) 柱温:起始温度为 150 ℃,恒温 5 min;以 15 ℃/min 的速率升温至 180 ℃,恒温 10 min;再以 15 ℃/min 的速率升温至 220 ℃,恒温 10 min.

3) 汽化室温度:280 ℃;检测室温度:260 ℃;载气为氮气,体积流量 45 mL/min,辅助气为氢气,体积流量 50 mL/min,空气体积流量 400 mL/min.

4) 将色谱标准 1,3-丙二醇精确配成质量分数为 1%,1.5%,2%,2.5% 及 3% 的水溶液,测定标准曲线;1,3-丙二醇的保留时间为 3.8 min 左右.

5) 用外标法将发酵液用气相色谱检测,所得峰面积与标准曲线比较得到发酵液中 1,3-丙二醇的质量分数.

1.4 筛选

挑选出产 1,3-丙二醇的菌株共 16 株,从中挑选出产量较高的 9 株菌分别为:201#,202#,203#,256#,494#,787#,790#,1192#,1193#.

1.5 菌种鉴定

鉴定步骤:显微镜镜检菌体形态,再进行革兰氏染色,最后进行生理生化试验^[14].

1.6 化学诱变育种

选取 1192# 菌为化学诱变的出发菌株进行亚硝基胍诱变.诱变后共挑得 271 个菌落,对其分别进行发酵,并进行气相色谱检测.

2 结果与分析

2.1 菌种初筛结果

从无锡市卫生防疫站搜集的野生型菌株中筛选出可发酵产 1,3-丙二醇且产量较高的菌株共 9 株,见表 1. 1,3-丙二醇标准曲线见图 1.

万方数据

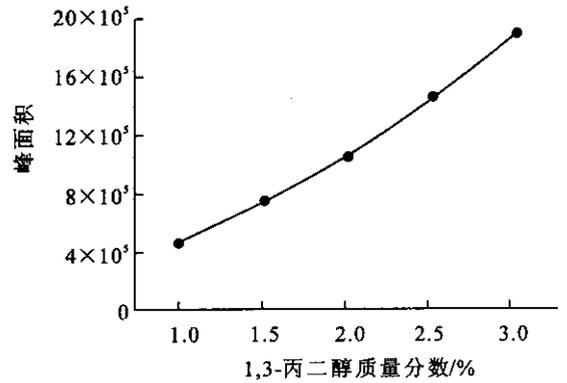


图 1 1,3-丙二醇标准曲线

Fig. 1 The standard curve of 1,3-propanediol

表 1 菌株生产 1,3-丙二醇性能

Tab. 1 1,3-PD production performance of the strains

试样	峰面积	质量分数/%	试样	峰面积	质量分数/%
790#	195 141	0.42	494#	236 957	0.51
787#	232 310	0.50	260#	246 249	0.53
1193#	227 665	0.49	556#	223 018	0.48
1192#	260 188	0.56	793#	246 249	0.53
202#	255 542	0.55	544#	223 018	0.48
201#	241 602	0.52	495#	218 372	0.47
203#	246 249	0.53	1060#	148 679	0.32
256#	227 665	0.49	1101#	153 325	0.33

2.2 菌落形态及显微镜镜检结果

在 LB 平板上,201#,202#,203#,256#,494#,787#,790#,1192#,1193# 菌落圆形隆起,边缘整齐,呈粘液状,显微镜下呈短杆菌.

2.3 革兰氏染色

所有菌株均为革兰氏阴性菌.

2.4 生理生化试验

通过生理生化试验可知,在 LB 平板上筛选得到的 1192# 等菌株的菌落呈圆形隆起,边缘整齐,呈粘液状.吲哚试验和甲基红试验呈阴性;V-P 试验、西蒙氏柠檬酸盐试验呈阳性;硫化氢试验呈阴性;尿素酶试验呈阳性,苯丙氨酸脱氨酶呈阴性;动力(鞭毛染色)试验呈阴性;20 ℃ 不能液化明胶;可利用 D-葡萄糖产酸产气;可以乳糖、蔗糖、D-甘露醇、D-山梨醇、L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-木糖、纤维二糖为惟一碳源.不能利用 α -甲基-D-葡萄糖苷为惟一碳源生长;DNA 酶试验(37 ℃)呈阴性;硝酸盐试验呈阳性;Kovas'氧化酶试验呈阴性; β -半乳糖苷酶试验(ONPG)呈阳性;不产生黄色素;葡萄糖法代谢为发酵型.

根据以上鉴定结果,对照伯杰斯细菌分类学手册^[14],确定 201 #,202 #,203 #,256 #,494 #,787 #,790 #,1192 #,1193 # 为肺炎克雷伯氏杆菌,且产酸较少,试验结果见表 2。

2.5 1192 # 诱变后发酵产 1,3-丙二醇性能测定

1192 # 菌株经亚硝基胍化学诱变后共得到 271 个菌落经过气相色谱检测,发酵生产 1,3-丙二醇产

量较高的见表 3。结果表明,1192 # 菌株经亚硝基胍化学诱变后共得到 271 个突变株,其中产量提高 200% 以上的共有 13 株,产量提高 100%~200% 的有 35 株,产量提高 0~100% 的有 198 株,负突变的有 25 株。由此可知,化学诱变对提高该菌种产量还是很有效的,但由于出发菌株的产量很低,所以诱变后的最终产量不是很高。

表 2 菌株的生理生化反应并与伯杰斯细菌分类学手册对照表

Tab. 2 The biochemical identification of the strains and their comparison with Bergey's manual of systematic bacteriology

反应	待鉴定菌株	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^[15]	反应	待鉴定菌株	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^[15]
吲哚试验	-	-	肌醇	+	+
甲基红试验	-	[-]	D-山梨醇	+	+
V-P 试验	+	+	L-阿拉伯糖	+	+
西蒙氏柠檬酸盐	+	+	L-鼠李糖	+	+
硫化氢试验	-	-	D-木糖	+	+
尿素酶试验	+	+	纤维二糖	+	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	α -甲基-D-葡糖苷	-	[+]
动力(鞭毛染色)	-	-	蜜二糖	+	+
明胶液化(20 °C)	-	-	DNA 酶(37 °C)	-	-
丙二酸钠利用	+	+	硝酸盐试验	+	+
D-葡萄糖,产酸	+	+	氧化酶(Kovas')	-	-
D-葡萄糖,产气	+	+	β -兰乳糖苷酶试验	+	+
乳糖	+	+	黑色素	-	-
蔗糖	+	+	甘露糖	+	+
D-甘露醇	+	+			

注: + 表示 90%~100% 的菌株为阳性; [+] 表示 76%~89% 的菌株为阳性; d 表示 26%~75% 的菌株为阳性; [-] 表示 11%~25% 为阳性; - 表示 0~10% 为阳性。

表 3 1192 # 菌株诱变后生产 1,3-丙二醇性能

Tab. 3 1,3-PD production performance of the strains 1192 # after chemical mutation

试样	峰面积	质量分数/%	比诱前变提高/%	试样	峰面积	质量分数/%	比诱前变提高/%
1192-121	865 136	1.99	232.5	1192-161	813 159	1.75	212.5
1192-148	855 334	1.97	228.7	1192-164	808 442	1.74	210.7
1192-155	840 977	1.93	223.2	1192-202	808 439	1.74	210.7
1192-120	828 054	1.90	218.3	1192-8	803 796	1.73	208.9
1192-141	815 831	1.88	213.6	1192-75	720 164	1.55	176.8
1192-151	810 070	1.86	211.3	1192-79	655 117	1.41	151.8
1192-201	910 738	1.96	250.1	1192-62	552 900	1.19	112.5
1192-163	831 673	1.79	219.6	1192 出发菌株	260 186	0.56	0
1192-199	817 735	1.76	214.3				

2.6 发酵条件的初步优化

2.6.1 培养基组成 在文献[11]报道的培养基基础上将无机盐进行了重组,得到试验所用的培养基。培养基中含有:3.4 g/L K_2HPO_4 , 1.3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L $CaCl_2$, 2 g/L $CaCO_3$, 用 2 mol/L KOH 调 pH 值,其他成分与文献报道一致。

2.6.2 发酵条件初步优化 对 1192-121# 菌株进行发酵条件优化,结果见图 2。

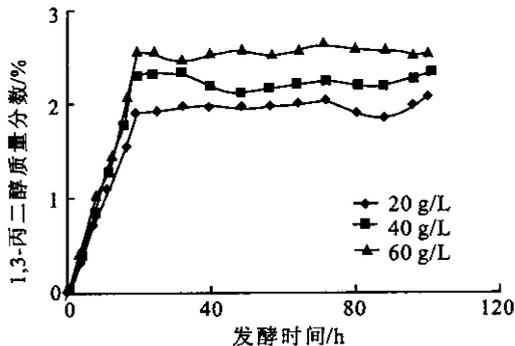


图2 1192-121# 不同甘油质量分数发酵曲线

Fig. 2 The fermentation time course under different glycerol content for the strain 1192-121#

3 讨论

从研究结果可以看出,人体肠道细菌中能歧化甘油产生 1,3-丙二醇的微生物几乎都是肺炎克雷伯氏菌。作者采用传统诱变育种方法提高了野生菌株 1,3-丙二醇的产量,但作用非常有限,所获突变株产 1,3-丙二醇仅能达到 2% 左右,因此用传统育种方法获得 1,3-丙二醇高产菌株的可能性很小。代谢甘油生产 1,3-丙二醇途径中的关键酶(甘油脱水酶 dhaB、1,3-丙二醇氧化还原酶 dhaT)等只在肺炎克雷伯氏菌和柠檬酸杆菌等少数微生物中发现,由于有关代谢途径并不为菌体生长所必需,因此有关基因的表达水平较低。将获得的菌种作为基因供体菌,将其整合后转入大肠杆菌,用外源强启动子高表达上述基因是大幅度提高 1,3-丙二醇产量,获得高产菌株更便捷的途径。

参考文献:

- [1] 修志龙. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2000, (4): 300-302.
- [2] 邵敬伟, 刘长江. 1,3-丙二醇发酵生产的研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(1): 57-60.
- [3] H Biebl K, Menzel A P Zeng, W D Deckwer. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 52: 289-297.
- [4] Zhu M M, Lawman P D, Cameron D C. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-Glycerol-3-phosphate[J]. **Biotechnol Prog**, 2002, 18(4): 694-699.
- [5] C Seifert, S Bowien, G Gottschalk, *et al.* Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂ - dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii* [J]. **Eur J Biochem**, 2001, 286: 2369-2378.
- [6] D C Cameron, N E Altaras. Metabolic engineering of propanediol pathways[J]. **Biotechnol Prog**, 1998, 14: 116-125.
- [7] F A Skraly, B L Lytle, D C Cameron. Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon[J]. **Appl and Environ Microbiol**, 1998, 64(1): 98-105.
- [8] 何晓青. 卫生防疫细菌检验——兼论医学细菌分类学基础[M]. 北京: 新华出版社, 1989.
- [9] McCoy M. Chemical makers try biotech paths[J]. **Chemical Engineering News**, 1998, 22(6): 13-19.
- [10] 修志龙. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 2000, (4): 300-302.
- [11] Kirsten Menzel, An-Ping Zeng, Hanno Biebl, *et al.* Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture; I. the phenomena and characterization of oscillation and hysteresis [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1996, 52: 549-560.
- [12] 龙云, 王润华, 陆安. 丙二醇产品及其杂质的气相色谱测定研究[J]. 高师理科学刊, 1998, 18(2): 39-41.
- [13] 姜虹, 田景芝, 张欲非. 气相色谱法测定丙二醇产品及其杂质[J]. 化学工程师, 1999, (1): 53-54.
- [14] Williams, Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*[M]. New York: Springer Verlag, 1984.