

E. aero 高产 1,3-丙二醇菌株选育及发酵培养基研究 (I)

迟乃玉^{1,3} 张庆芳¹ 邢福有¹ 郑学仿^{1,3} 刘长江²

(大连大学生物工程学院 大连 116622)¹ (沈阳农业大学食品学院 沈阳 110161)²

(大连大学生命科学工作室 大连 116622)³

摘要: 以淡水湖泊泥土中分离出的 300 多株肠杆菌 (*Enterobacter*) 为出发菌株, 利用常规筛选方法选出 2 株 1,3-丙二醇产生菌 (*Enterobacter aerogenes*)。经 UV、DES、NTG、EMS、LiCl 单独及复合诱变, 选育出一株 (*E. aero*-N-56) 1,3-PD 高产突变株。通过单因素实验, 确定了 *E. aero*-N-56 菌株 1,3-PD 发酵培养基为: 甘油 90 g/L, NH₄Cl 1.50 g/L, Fe²⁺ 0.005% , Co²⁺ 0.004% , 微量元素液 12 mL/L。该突变株 1,3-PD 产量为 36.8 g/L。

关键词: *Enterobacter aerogenes*, 1,3-丙二醇, 选育, 培养基

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0020-05

THE SCREENING OF THE 1, 3-PD HIGH-PRODUCTION STRAIN FROM *ENTETOBACTERS* AND ITS OPTIMAL FERMENTATION MEDIUM

CHI Nai-Yu^{1,3} ZHANG Qing-Fang¹ XING Fu-You¹ ZHENG Xue-Fang^{1,3} LIU Chang-Jiang²

(College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622)¹

(College of Food, ShenYang Agricultural University, Shenyang 110161)²

(Work Room of Life Science, Dalian University, Dalian 116622)³

Abstract: Two 1,3-PD producing strains were obtained from more than 300 *Enterobacters*, which isolated from freshwater marsh. A 1,3-PD producing mutant (*E. aero*-N-56) was bred through multiple mutagenesis (UV, DES and NTG

收稿日期: 2002-10-24, 修回日期: 2002-12-28

etc). Through orthogonal experiment, The optimal condition was given for producing 1,3-PD of *E. aero-N-56*. The suitable medium was that glycerol, 90 g/L; NH_4Cl 1.50 g/L; Fe^{2+} 0.005%, Co^{2+} 0.004%, trace element solution, 12 mL/L. The production of 1,3-PD was 36.8g/L.

Key words: *Enterobacter aerogenes*, 1,3-PD, Screening, Medium

1,3-丙二醇(1,3-PD)是生产多聚纤维及制造多氨基甲酸乙酯及环状化合物的单体^[1]。利用1,3-PD生产的新型聚酯材料,具有优良的回弹性、染色性、抗污性等,在服装、工程塑料、地毯、药剂、有机溶剂等应用领域潜力巨大,世界各国争相研究开发1,3-PD的生产途径^[2]。目前,1,3-PD的化学合成法国外(法国、美国等国)已有3条途径可以完成,我国尚处空白。但由于化学合成法昂贵的费用及工艺难度大,造成严重环境污染等问题,限制了1,3-PD应用的开发^[3]。为降低生产成本,避免环境污染等问题,英、美、法、日等国争先研究微生物发酵法生产1,3-PD^[4],以取代化学合成法生产1,3-PD。微生物液体发酵法生产1,3-PD研究起始于20世纪90年代初,目前处于菌种选育及最适发酵条件方面研究^[5],而我国1,3-PD微生物发酵法生产的研究处于起步阶段,并且主要研究甘油为底物的1,3-PD发酵。本项研究是针对以玉米淀粉糖为底物微生物连续发酵(二步法)生产1,3-PD的第二阶段工作,促使1,3-PD生产由高成本、造成严重环境污染的化学合成法向无污染、低成本的生物化方向转化方面进行了深入研究^[7],本文就1,3-PD生产菌株选育及最适发酵培养基方面的研究结果作以报道。

1 材料与方法

1.1 菌种

10株肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)由淡水湖泊泥土中分离,沈阳农业大学食品学院。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2.2 种子培养基和发酵培养基:均为厌氧培养基,制备方法参考文献[7]。

1.2.3 培养方法:在100 mL厌氧瓶中,装入50 mL种子培养基,接入厌氧斜面菌种,28℃下培养48 h,作为厌氧液体种子。在250 mL厌氧三角瓶中,装入200 mL发酵产1,3-PD的培养基,28℃厌氧培养2 d,取培养液4,000 r/min离心,上清液即为1,3-PD混合液,测定1,3-PD含量。

1.3 分析方法

1.3.1 1,3-PD测定方法:气相色谱法。

1.3.2 生物量测定:100 mL发酵液,4,000 r/min离心20 min,蒸馏水清洗2次,60℃烘干,称重。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离

将湖泊湿泥土用0.85%的生理盐水逐级稀释,涂平板,分离得到300多菌株,经厌氧发酵初筛,复筛,选出10株具有1,3-PD产生能力的菌株,经初步鉴定,为肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),其中有2株产1,3-PD能力相对较高,且稳定性好,发酵液颜色较浅(见表1)。因此,以99-132和99-56为诱变的出发菌株。

表1 1,3-PD产生菌初筛

菌株	99-56	99-107	99-132	99-168	99-194	99-232	99-277	99-296	99-307	99-318
1,3-PD (g/L)	6.9	0.5	7.6	0.7	0.9	0.3	0.6	0.9	1.2	1.18

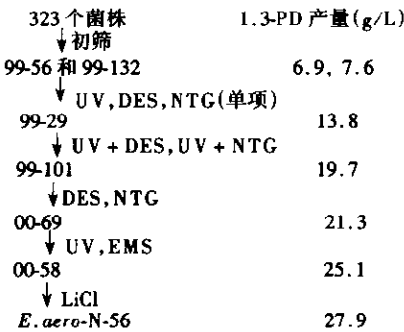


图1 1,3-PD产生菌选育谱系

2.2 1,3-PD产生菌选育谱系

以99-56和99-132菌株为诱变的出发菌株,经物理(UV),化学(DES、NTG、EMS、LiCl)及复合诱变,选育出1,3-PD产生能力达27.90g/L的高产菌株*E. aero-N-56*。

从图1可以看出, *E. aero-N-56* 突变株较出发菌株(99-56, 99-132)产1,3-PD能力分别增加了4倍和3.7倍。

2.3 *E. aero-N-56* 菌株产1,3-PD遗传稳定性

将*E. aero-N-56*菌株连续进行13代传代,每隔一代,在250mL厌氧瓶中,装入200mL培养基,进行厌氧发酵产1,3-PD实际测定,结果见图2。

实验结果表明(图2), *E. aero-N-56* 菌株产1,3-PD遗传性能是稳定的。

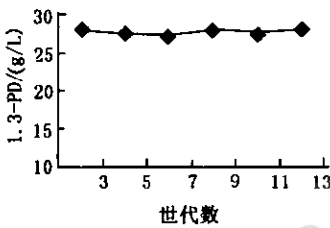


图2 *E. aero-N-56* 产1,3-PD遗传稳定性

2.4 碳源对*E. aero-N-56*菌株1,3-PD产量的影响

*E. aero-N-56*菌株1,3-PD发酵,控制甘油含量,实验结果见图3。

由图3可以看出,甘油含量对*E. aero-N-56*突变株1,3-PD产量影响较大,当发酵液中甘油含量达到90g/L时,1,3-PD产量达到29.70g/L。因此,*E. aero-N-56*菌株厌氧1,3-PD发酵甘油最适用量为90g/L。

2.5 氮源对*E. aero-N-56*菌株1,3-PD产量的影响

碳源含量为90g/L时,控制NH₄Cl含量,*E. aero-N-56*厌氧1,3-PD液体发酵,结果见图4。

实验结果(图4)表明,当NH₄Cl含量达到1.50g/L时,1,3-PD产量达到最大值31.80g/L;之后NH₄Cl含量再增加,1,3-PD产量开始下降,这是由于碳氮比例失调所致。因此,确定*E. aero-N-56*厌氧1,3-PD液体发酵NH₄Cl加入量为1.5g/L。

2.6 Fe²⁺对*E. aero-N-56*菌株1,3-PD产量的影响

在碳源甘油含量为90g/L、氮源NH₄Cl含量为1.70g/L的1,3-PD液体发酵培养基中,控制Fe²⁺含量*E. aero-N-56*厌氧1,3-PD液体发酵,结果见图5。

实验结果(图5)表明,Fe²⁺含量达到0.005%时,*E. aero-N-56*菌株1,3-PD产量达到最大值34.20g/L。因此,*E. aero-N-56*厌氧1,3-PD液体发酵Fe²⁺最适添加量为0.005%。

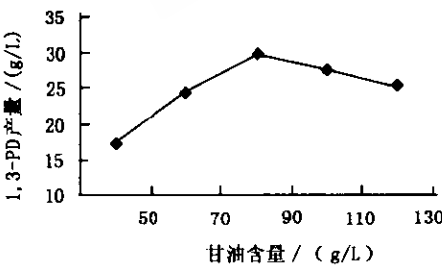


图3 碳源对*E. aero-N-56*菌株1,3-PD产量的影响

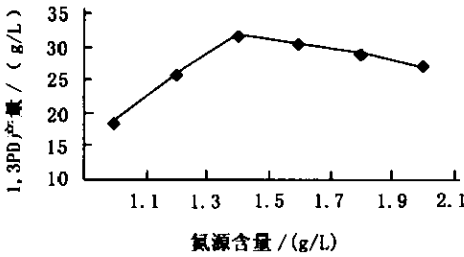


图4 氮源对 *E. aero*-N-56 突变株产 1, 3-PD 的影响

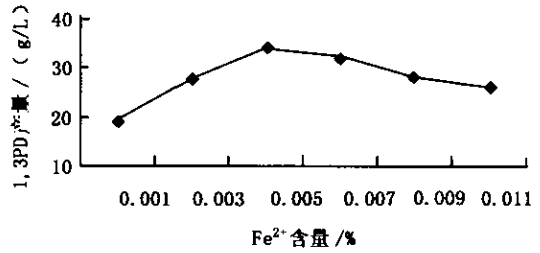


图5 Fe²⁺ 对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量的影响

2.7 Co²⁺ 对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量的影响

在控制氮源、碳源、Fe²⁺ 浓度为最优的情况下, 调整 Co²⁺ 离子在发酵培养基中的不同含量, *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 发酵, 实验结果见图 6。

实验结果(图 6)表明, 0.004% 的 Co²⁺ 含量时, *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 发酵产量达到最大值 35.30 g/L。因此, *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 发酵 Co²⁺ 添加量为 0.004%。

2.8 微量元素混合液对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量的影响

在控制氮源、碳源、Fe²⁺ 和 Co²⁺ 浓度为最优的情况下, 调整发酵培养基中微量元素液不同添加量, *E. aero*-N-56 厌氧 1, 3-PD 发酵实验, 结果见图 7。

实验结果(图 7)表明, 微量元素液不同添加量, 对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 发酵影响较大。当微量元素液添加量达到 12 mL/L 时, *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量达到最大值 36.80 g/L。

3 讨论

近年来, 研究甘油转化为 1, 3-PD 的微生物菌株主要有: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Illyobacter* 和 *Pelobacter*。其中 *Klebsiella pneumoniae* 和 *Clostridium butyricum* 菌株研究的最多。在分批培养中得到 1, 3-PD 的最大浓度是 50~60 g/L, 在常规连续培养中, *C. but* 只能获得 *K. pneu* 菌株 1, 3-PD 最大产量

(大约为 48.75 g/L) 的一半, 但由于前者是病原菌而逐渐被淘汰, 鉴于 *C. but* 菌株的安全性, 在国外它是最具有工业使用潜力的菌株^[2,4]。而我们筛选的 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量已经超过 *C. but* 菌株的生产能力, 并且该菌株为兼气性, 是一株很有研究价值和潜力的菌株。在上述研究的基础上, 我们又对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 发酵的最适 pH、温度、时间、接种量等因素进行了研究, 建立了 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD

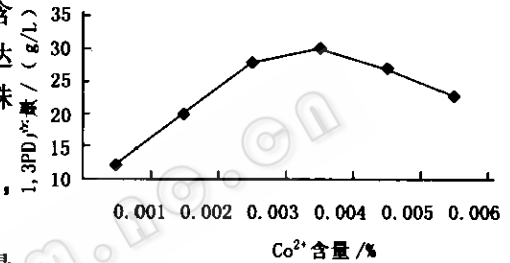


图6 Co²⁺ 对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量的影响

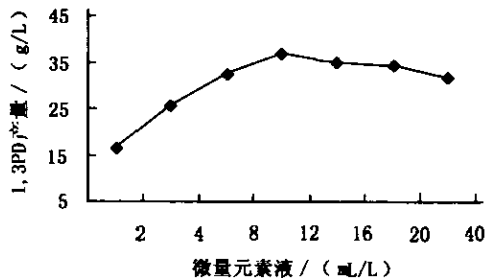


图7 微量元素液对 *E. aero*-N-56 菌株 1, 3-PD 产量的影响

发酵的最适条件, 在最适条件下进行了 30 L 放大实验, 拟在另文中报道。

致谢 本项研究工作是在沈阳农业大学刘长江教授的资助与指导下完成, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Barbirato F. *Ind Crops Prod*, 1998, 7 (2, 3): 281 ~ 289.
- [2] Biebl H, Marten S, Hippe H, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 44 (1 ~ 2): 15 ~ 19.
- [3] 姜兴茂. *上海化工*, 2000, 23 (6): 35 ~ 39.
- [4] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 38: 453 ~ 457.
- [5] Kretschmann J, Carduck F J, Deckwer W D, *et al.* 1991, European patent no. EP.0361082A2.
- [6] Saint A S. *Biotechnology Letters*, 1995, 17 (2): 211 ~ 216.
- [7] Zeng A N, Ross A, Biebl H, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 902 ~ 911.