微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn
研究报告

MAR 20, 2008, 35(3): 336~340
© 2008 by Institute of Microbiology, CAS

一株以甘油为底物产二羟丙酮(DHA)微生物菌种的筛选及鉴定

徐美娟　饶志明*　沈　微　方慧英*　诸葛健

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室　江南大学工业微生物研究中心　无锡　214122)

摘　要: 甘油为微生物可利用的理想碳源，从自然界筛选出 21 株以甘油为唯一碳源产二羟丙酮(DHA)的菌株，经初步发酵测定发酵液中 DHA 含量，其中菌株 6–8 DHA 产量最高达 6.4 g/L。对其进行常规生理生化鉴定实验，并结合 16S rDNA 基因分析，比对结果表明，菌株 6–8 与 *Acinetobacter* sp. 相似性最高，达 99.7%，在细菌分类学上属于假单胞菌目莫拉菌科不动杆菌属。将其命名为 *Acinetobacter* sp.6–8。

关键词: 甘油，二羟基丙酮，分离筛选，鉴定

Screening and Identification of a Strain Producing Dihydroxyacetone During Oxidation of Glycerol

XU Mei-Juan　RAO Zhi-Ming*　SHEN Wei　FANG Hui-Ying*　ZHUGE Jian

(*Key laboratory of Industrial Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Research Center of Industrial Microorganisms*, *Jiangnan University*, *Wuxi* 214122)

Abstract: More than 20 strains capable of producing dihydroxyacetone from glycerol were isolated from 4 different natural environment samples by using two detection methods. The strain 6-8 which could grow on medium containing glycerol as sole carbon source had a higher converting capability. Under a better culture, the highest DHA production of the strain 6–8 reached 6.4 g/L. In addition to general morphological and biochemical characteristics, the strain 6–8 was identified by 16S rDNA sequence and systematic analysis. The results showed that 16S rDNA sequence of the strain 6-8 had similarity of 99.7% with *Acinetobacter* sp. suggesting that the strain 6-8 is one of subspecies of *Acinetobacter* sp.

Keywords: Glycerol, Dihydroxyacetone, Screening, Identification

二羟基丙酮,英文名为dihydroxyacetone，简写为DHA，是最简单的多羟基酮糖，带有甜味的白色粉末状结晶，易溶于水、乙醇、丙酮和乙醚等有机溶剂，在pH 6.0 时稳定。它用途广泛且使用量大，是一个重要的化学合成中间体；用于化妆品中起保湿及防晒作用[1,2]；可作为皮革制品的保护剂；是一种重要的医药中间体[3]。DHA仍有许多其它用途在积极的研究和开发之中。到 20 世纪 60~70 年代，微

基金项目：国家自然科学基金(No. 20676053)；国家“863 计划”(No. 2006AA020103)；江苏省青年科技创新人才(学术带头人)基金 (No. BK2006504)；长江学者和创新团队发展计划资助(No. IRT0532)

*通讯作者：Tel: 0510-85918109；✉: raozm@yahoo.com.cn, fanghuiying@126.com

收稿日期：2007-08-22；接受日期：2007-10-25

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

生物法生产DHA在国外已得到了规模的工业应用, 微生物法生产DHA较之化学法生产有反应条件温和、原料利用率高、产品纯度高及工艺简单、易于控制等优点, 从长远发展及环境保护角度来看, 微生物法显得更有生命力。微生物转化甘油生产二羟基丙酮的机理是利用微生物代谢产生的甘油脱氢酶作用, 使甘油分子结构中 2 位C上的羟基进行脱氢反应, 生成二羟基丙酮(DHA)。目前微生物法多是利用醋酸杆菌生长细胞在完全培养基中批次发酵转化甘油生成DHA, 发酵 60 h~80 h, 产量达 60 g/L [4]。本实验针对以甘油为底物, 筛选得到了可以以甘油为唯一碳源并将其部分转化为二羟基丙酮(DHA)的菌种 20 余株, 对其中DHA产量最高的 1 株 6–8 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: 采集甘油厂附近土样, 柿子园土样及无锡第一调味品厂天然醋醅 1(15 d 发酵)和天然醋醅 2(30 d 发酵)。

1.1.2 培养基[5−9]: 种子富集培养基(%): 甘油 10.0, 酵母膏 1.0, 1×10^5 Pa灭菌 15 min; 平板分离培养基(%): 甘油 10.0, 酵母膏 1.0, $CaCO_3$ 0.3, 琼脂粉 1.8, pH6.0, 1×10^5 Pa灭菌 15 min; 斜面保藏培养基(%): 甘油 10.0, 酵母膏 0.5, $CaCO_3$ 0.3, 琼脂粉 1.8, pH6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min; DHA发酵培养基 1(%): 甘油 6.0, 酵母膏 1.0, 蛋白胨 0.5, $CaCO_3$ 0.3, KH_2PO_4 0.3, pH 5.5–6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min; DHA发酵培养基 2(%): 甘油 6.0, 玉米浆 0.3, 蛋白胨 0.5, 尿素 0.4, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.02, $CaCO_3$ 0.1–0.3, pH 6.8–7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

1.1.3 试剂: 二羟基丙酮(dihydroxyacetone-dimer)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 Seebio Biotechnology, 蛋白酶 K(Proteinase K)购自 Merck KGaA(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。

1.1.4 显色液: 二苯胺 2 g, 乙酸 200 mL, 浓硫酸 20 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选[11−13]: (1)菌种筛选培养: 将采集到的样品在种子培养基中富集, 30℃ 200 r/min摇床 10 h, 取不同稀释度稀释涂布培养。挑单菌落在平板分离培养基上进行划线分离, 30℃培养 1 d~3 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: 由待试斜面接种于 25 mL发酵培养基 1, 30℃ 200 r/min摇床培养初步发酵 60 h。收集发酵液离心, 将上清液进行DHA定性测定, 选出复筛菌株作进一步试验。

1.2.2 **DHA**定性分析方法[9]: DHA定性分析采用显色法直接鉴定: 发酵液离心(5000 r/min, 5 min)取 1 mL上清液与 1 mL显色液在试管中混匀, 置于沸水浴中反应 15 min, 根据显色结果可直接判定发酵液中是否有DHA的存在。

1.2.3 **DHA**定量分析方法[2,14]: (1)显色法测定: 产DHA菌株发酵液离心(2500 r/min, 15 min), 取 1 mL发酵上清液稀释至 10 mL, 取 0.5 mL十倍稀释液与 4.5 mL显色液在试管中混匀, 置于沸水浴中反应 15 min, 流动水冷却 15 min后于 721 分光光度计、620 nm处测定其吸光值, 其中每株菌发酵液做 3 个平行样。(2)HPLC法测定: 色谱分离柱: Alltima ODS-2(5 μm, 250 mm×4.6 mm); 以 0.05%H_3PO_4及 5%甲醇的水溶液为流动相; 流动相流速: 1 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL; 检测波长 300 nm。

1.2.4 甘油定量测定方法: 高碘酸钠-变色酸法[15]。

1.2.5 生长曲线测定[13]: 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[16]: 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 PCR 扩增。

F27(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)

R1522(5′-TTATCCTAGTTTGCGCGCTA-3′)

1.3.4 **PCR** 扩增条件: 反应体系: 取 DNA 模板 1 μL, 10×PCR 缓冲液 2 μL, 引物各 1 μL, dNTPs 2 μL, TaqDNA 聚合酶 0.5 μL, 总反应体系为 20 μL。循环参数: 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 53℃ 90 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。取 PCR 扩

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

增产物 10 μL 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外灯下观测结果。

1.3.5 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。再连接到 pMD18-T 载体上，转化感受态 *E.coli* JM109 宿主菌，最后经抗药性筛选，获得阳性克隆。16S rDNA 测序由上海捷瑞生物工程有限公司完成。将测序结果输入 NCBI 中用 Blast 程序交送 GenBank 库与数据库已有序列进行比较分析。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

由于 DHA 为代谢中产生的有毒物质，所以 DHA 须及时排出胞外，存在于发酵液中，因此可通过显色法或 HPLC 法直接测定发酵液中 DHA 含量。将筛选得到的 104 株菌以甘油为唯一碳源进行发酵实验，测得 21 株菌株可产 DHA。并对 21 株菌进行甘油底物耐受性研究，结果如表 1 所示，菌株 6–8 等能在甘油浓度为 25%的条件下生长。

表 1 初筛结果
Table 1 The results of screening

产 DHA 菌株 Strains	DHA 产量(平行样平均值) Average production of DHA	5%甘油底物生长情况 Growth on 5% glycerol	15%甘油底物生长情况 Growth on 15% glycerol	25%甘油底物生长情况 Growth on 25% glycerol
1–1	1.8 g/L	++	++	–
1–2	0.5 g/L	++	+	–
2–2	1.3 g/L	++	+	+
2–4	2.1 g/L	++	+	–
2'–3	1.2 g/L	++	+	–
3–1	1.4 g/L	++	+	+
3–5	0.9 g/L	+++	++	+
3–9	1.5 g/L	++	+	–
3–4	2.0 g/L	++	+	+
3–14	2.4 g/L	+	+++	++
3–4	1.6 g/L	++	+	+
3–5	2.3 g/L	+	+	+
3'–6	1.0 g/L	+	−	–
4–1	1.3 g/L	++	−	–
4–4	3.2 g/L	++	+	–
5–3	3.5 g/L	++	++	+
5–10	3.0 g/L	+++	+	–
5'–2	2.6 g/L	++	+	–
6–6	1.7 g/L	++	+	–
6–8	4.3 g/L	+++	+++	++
6–11	3.1 g/L	++	++	+

+: 阳性; –: 阴性

+: Positive; –: Negative

2.2 初步发酵条件研究

将得到的 21 株菌在种子培养基中 30℃，150 r/min 摇床培养 24 h，以 10%的接种量分别接种至装有 40 mL 发酵培养基 1 和发酵培养基 2 的 250 mL 三角瓶中，200 r/min、30℃发酵 60 h，测定发酵液中 DHA 含量。根据结果可知 15 株菌在发酵培养基 1 中 DHA 含量较高，其中菌株 6–8 最高达 6.4 g/L，且生长速度较快。说明发酵培养基 1(天然培养基)较发酵培养基 2(半合成培养基)更适合 DHA 的发酵。菌株 6–8 生长曲线如图 1 所示。当菌体在发酵培养基 1 生长 14 h 时生长量达到最大值，14 h 后菌体量不再增加。菌株 6–8 产 DHA 发酵曲线如图 2

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

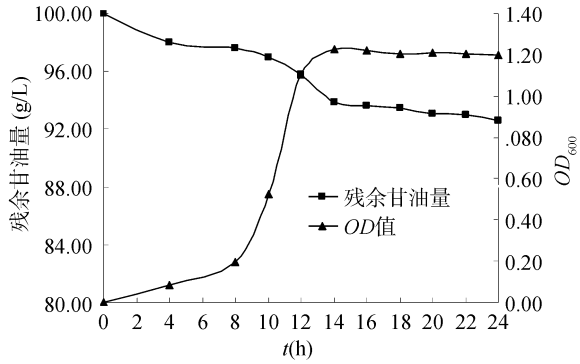

图 1　菌株 6–8 生长曲线

Fig. 1　Growth culture of the strain 6–8

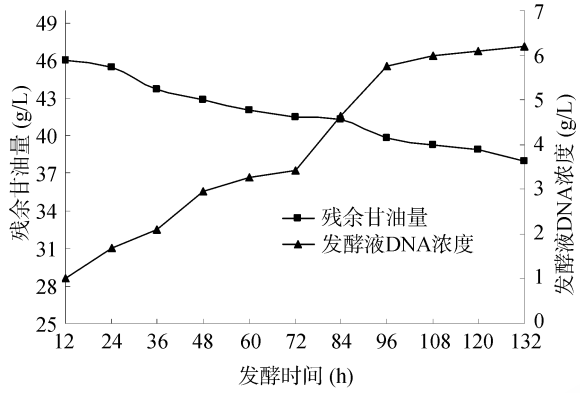

图 2　菌株 6–8 发酵产 DHA 曲线

Fig. 2　Effect of the strain 6–8 growth stage on the production of DHA

所示。发酵 96 h 后 DHA 的积累量基本不变。

2.3　菌种鉴定

2.3.1　培养特征及形态学鉴定：将 6–8 在平板分离培养基上 30℃培养 24 h 后的菌落直径达 2 mm，透明，菌落较薄，圆形，边缘不光滑，微黄色菌落，菌落中间有微小突起，菌落易挑起。平板培养细胞经透射电镜(Hitachi H-7000, Honshu, Japan)观察，细胞呈杆菌或球杆状，(0.9–1.6) μm×(1.5–2.5) μm，无芽孢。其电镜照片见图 3。

图 3　6–8 菌株在斜面保藏培养基上的细胞电镜图(20000×1.5)

Fig. 3　Electron micrographs of the strain 6-8(20000×1.5)

2.3.2　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 2。

表 2　菌株 6–8 的生理生化鉴定结果

Table 2　Physiological and biochemical characteristics of the strain 6–8

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
革兰氏染色 Gram staining	–	*D*-甘露醇 *D*-mannitol	+
D-半乳糖 *D*-galactose	+	葡萄糖产气 Pruduce gas	–
蔗糖 Sucrose	–	V.P	+
D-阿拉伯糖 *D*-arabinose	+	甲基红 Methyl red	–
乳糖 Lactose	+	吲哚 Indole	+
葡萄糖 Glucose	+	触酶 Catalase	–
L-鼠李糖 *L*-rhamnose	+	葡萄糖产酸 Producing acid	–
海藻糖 Trehalose anhydrous	–	酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	+
D-木糖 *D*-xylose	+	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanineammonialyase	+
明胶 Glutin	+	硝酸盐还原 Nitrate Reduction Test	+
可溶性淀粉 Solubel starch	–	运动性 Mobility	–
D-纤维二糖 *D*-cellobiose	–	脲酶 Urease	+

＋：阳性; –：阴性　Negative

+: Positive; –: Negative

2.3.3　菌株 **16S rDNA** 序列分析及分子鉴定：提取菌株 6–8 细胞总 DNA，以通用引物扩增菌株的 16S rDNA 部分基因片段约 1.2 kb，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，结果表明其与

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

Acinetobacter sp.相似性最高，达 99%以上，该序列在 GenBank 数据库中登录号为：EU085032，将其命名为 *Acinetobacter* sp.6–8。

3 讨论

本实验利用两种不同的 DHA 测定方法从自然界筛选得到了以甘油为唯一碳源产二羟基丙酮(DHA)的 21 株菌，进一步考察了产 DHA 菌株的甘油耐受性，最终选择产 DHA 量相对较高，能在甘油底物浓度达 25%的条件下生长良好的菌株 6–8 作为研究对象。该菌分别以发酵培养基 1(天然培养基)和发酵培养基 2(半合成培养基)进行发酵条件的初步研究，结果发现天然培养基更有利于菌体的生长和 DHA 的合成，测得 DHA 产量为 6.4 g/L。经 16S rDNA 序列分析法鉴定为不动杆菌属，这与常规生理生化鉴定结果相一致,定名为 *Acinetobacter* sp. 6–8。本研究筛选得到的 *Acinetobacter* sp. 6–8 DHA 产量与国内外文献报道仍有较大的差距，但该菌具有较高的甘油耐受性，这为进一步高底物浓度发酵研究及以该菌为宿主构建基因工程菌打下了良好的基础，相关的工作正在进行中。

参 考 文 献

[1] 张育川. 二羟丙酮(DHA). 精细与专用化学品, 2003, **22**: 21.

[2] Rosaria C, Giovanni P, Cristina DP, *et al*. One-pot electroactalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron letters*, 2006, **47**(39): 6993–6995.

[3] Flickineger MC, Perlman D. Application of oxygen-enriches aeration in the conversion of glycerol to dihydroxyacetone by Gluconobacter nelanogenus IFO3293. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **33**(3): 706–712.

[4] Green SR, Whalen EA, Molokie E. Dihydroxyacetone: production and uses. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1961, **3**(4): 351–355.

[5] 郑裕国, 张 霞, 沈寅初, 等. 微生物转化甘油生产 1, 3-二羟基丙酮的菌株筛选. 浙江工业大学学报, 2001, **29**(2): 124.

[6] Claret C, Salmon JM, Romieu C, *et al*. Physiology of Gluconobacter oxydans during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **41**: 359–365.

[7] Claret C, Bories A, Soucaille P. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by Gluconobater oxydans. *Cerrent Microbiology*, 1992, **25**: 149–155.

[8] Yamada S, Nabe K, Izuo N, *et al*. Enzymatic Production of dihydroxyacetone by Acetobacter suboxydans ATCC 621. *J Ferment Technol*, 1979, **57**(3): 221–226.

[9] 陈宏文, 吴雅红, 吴振华, 等. 克雷伯杆菌甘油脱氢酶的分离纯化及性质. 无锡轻工大学学报, 2005, **24**: 1–5.

[10] Bories A, Claret C, Soucaille P. Production of dihydroxyacetone by cultivation of Acetobater suboxydans. *J Ferment Technol*, 1980, **58**(3): 221–226

[11] Batzing BL, Claus GW. Biphasic growth of Acetobacter suboxydans on a glycerol-limiting medium. *Journal of Bacteriology*, 1971, **108**(1): 592–595.

[12] 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, pp. 223–225.

[13] Hekmat D, Bauer R, Neff V. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of Gluconobacter oxydans. *Process Biochemistry*, 2006, **42**(1): 71–76.

[14] Lambert M, Neish AC. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. *Can J Res*, 1956, **28**: 83–89.

[15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp. 188–192.

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