

C. pasteurianum 高产 1,3-丙二醇菌株的选育及发酵培养基的研究(I)

迟乃玉^{1,3} 张庆芳¹ 王 圆^{1,3} 李晓艳^{1,3} 李爱民² 谷 瑛² 刘长江²

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

3(大连大学生命科学工作室 大连 116622)

摘 要 以淡水湖泊泥土中分离出的 13 株梭菌(*Clostridium*)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(*Clostridium pasteurianum*)。经 UV、DES、NTG、EMS、LiCl 单独及复合诱变,选育出一株(*CpN-38*) 1,3-PD 高产突变株。该突变株较出发菌株(98-77, 98-108) 1,3-PD 产量提高了 7 倍,产量为 31.00 g/L。通过单因素实验,确定了 *CpN-38* 发酵培养基为:甘油 90 g/L, NH_4Cl 1.70 g/L, Fe^{2+} 0.005%, Co^{2+} 0.004%。

关键词 *Clostridium pasteurianum*, 1,3-丙二醇, 培养基, 选育

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、有机溶剂等领域应用潜力巨大,世界各国争相研究开发^[2]。目前以化学合成法生产 1,3-PD 已有 3 条途径,我国尚处空白。但由于化学合成法费用昂贵及工艺难度大,环境严重污染等问题,限制了 1,3-PD 的应用开发^[3]。从而使得微生物发酵法生产 1,3-PD 成为研究热点^[4]。国外微生物发酵法生产 1,3-PD 的研究起始于 20 世纪 90 年代初,目前处于菌种选育及最适发酵条件等方面研究^[5], *Klebsiella pneumoniae* 和 *Clostridium butyricum* 是被研究最多的菌株,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。而用其他的菌种进行 1,3-PD 发酵法生产还未见报道。本文利用常规筛选方法选出一株 1,3-丙二醇产生菌(*Clostridium pasteurianum*),并对其发酵培养基组成进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌 种

巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*),由淡水湖泊的泥土中分离,共计 13 株。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 基础培养基

巴氏梭状芽孢杆菌合成培养基。

1.2.2 种子培养基和发酵培养基

种子培养基和发酵培养基均为厌氧培养基,制备方法见参考文献[4]。

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 4000 r/min 离心,上清液即为 1,3-PD 混合液,测定 1,3-PD 含量。

1.2.4 诱变方法

常规诱变方法。

1.3 分析方法

第一作者:博士,副教授。

收稿时间 2003-01-19

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 结果与分析

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 株产 1,3-PD 菌株, 实验结果见表 1。

实验结果表明(见表 1), 108 和 77 菌株产 1,3-PD 能力相对较高, 且稳定性好, 发酵液颜色较浅。因此确定 108 和 77 菌株为诱变的出发菌株。该菌株经初步鉴定为巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)。

表 1 1,3-PD 产生菌初筛

菌株	77	107	108	168	194	207	277	296	307	318
1,3-PD/g·L ⁻¹	3.9	0.5	4.3	0.7	0.9	0.3	0.6	0.9	1.2	1.18

2.2 1,3-PD 产生菌选育谱系

77 和 108 菌株为诱变的出发菌株, 经物理、化学及复合诱变, 选育出 1,3-PD 产生能力强的突变株 *CpN-38*, 其 1,3-PD 产量为 36.8 g/L, 比出发菌株产 1,3-PD 能力增加了 4 倍。选育过程见图 1 所示。

13 个菌株	1,3-PD 产量(g/L)
↓ 初筛、复筛	
98-77 和 98-108	3.9, 4.3
↓ UV, DES, NTG(单项)	
98-29	7.8
↓ UV + DES, UV + NTG	
98-101	10.7
↓ DES, NTG	
99-69	12.9
↓ UV, EMS	
99-58	15.6
↓ LiCl	
<i>CpN-38</i>	18.8

图 1 1,3-PD 产生菌选育谱系

2.3 *CpN-38* 菌株产 1,3-PD 遗传稳定性

将 *CpN-38* 菌株连续进行 13 代传代, 每间隔一代, 进行厌氧发酵产 1,3-PD 实际测定。结果表明(见图 2), *CpN-38* 菌株产 1,3-PD 的遗传性是稳定的。

2.4 碳源对 *CpN-38* 菌株 1,3-PD 产量的影响

用 *CpN-38* 菌株进行 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 *CpN-38* 突变株 1,3-PD 产量影响较大, 当发酵液中甘油含量达到 90 g/L 时, 1,3-PD 产量达到 21.80 g/L。因此, *CpN-38* 菌株厌氧 1,3-PD 发酵甘油最适用量为 90 g/L。

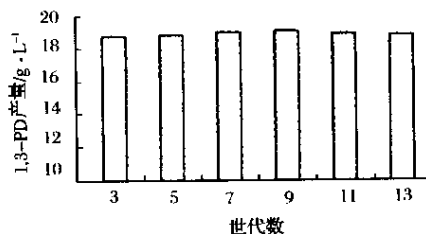


图 2 *CpN-38* 产 1,3-PD 遗传稳定性

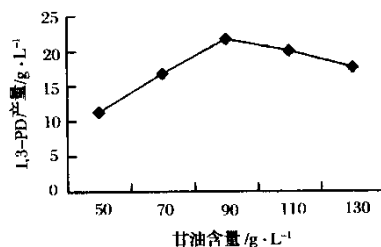


图 3 碳源对 *CpN-38* 菌株 1,3-PD 产量的影响

2.5 氮源对 *CpN-38* 菌株 1,3-PD 产量的影响

碳源含量为 90 g/L 时, 控制 NH_4Cl 含量, 用 *CpN-38* 进行厌氧 1,3-PD 液体发酵, 结果见图 4。

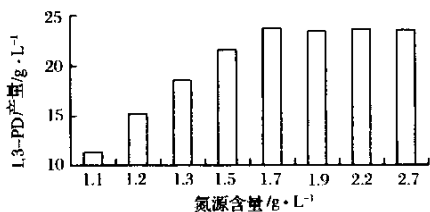


图4 氮源对 *CpN-38* 突变株产 1,3-PD 的影响

实验结果(见图4)表明,当 NH_4Cl 含量达到 1.70 g/L 时,1,3-PD 产量达到最大值 23.70 g/L;之后, NH_4Cl 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 *CpN-38* 液体发酵 NH_4Cl 加入量为 1.7 g/L。

2.6 Fe^{2+} 对 *CpN-38* 菌株产 1,3-PD 的影响

在碳源甘油含量为 90 g/L、氮源 NH_4Cl 含量为 1.70 g/L 的 1,3-PD 液体发酵培养基中,控制 Fe^{2+} 含量(%)进行 *CpN-38* 厌氧 1,3-PD 液体发酵,结果见图5。

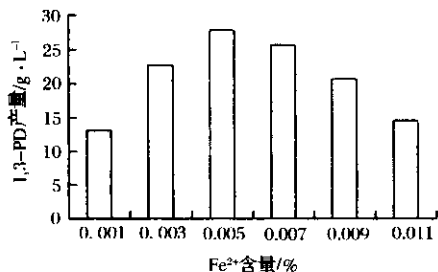


图5 Fe^{2+} 对 *CpN-38* 菌株产 1,3-PD 的影响

图5表明, Fe^{2+} 含量达到 0.005% 时,*CpN-38* 菌株的 1,3-PD 产量达到最大值 27.80 g/L。

CpN-38 厌氧液体发酵 1,3-PD 的 Fe^{2+} 最适添加量为 0.005%。

2.7 Co^{2+} 对 *CpN-38* 菌株产 1,3-PD 的影响

在控制氮源、碳源、 Fe^{2+} 浓度为最优的情况下,调整 Co^{2+} 在发酵培养基中的不同含量,*CpN-38* 菌株发酵 1,3-PD 实验结果见图6。

图6表明,当 Co^{2+} 含量为 0.004% 时,*CpN-38* 菌株产 1,3-PD 达到最大值 31.00 g/L。

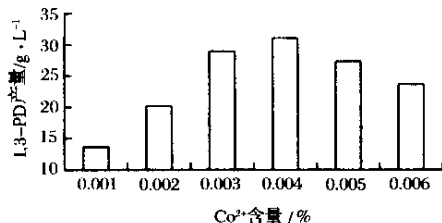


图6 Co^{2+} 对 *CpN-38* 菌株产 1,3-PD 的影响

3 讨论

目前,能将甘油转化为 1,3-PD 的微生物菌株有:*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Ilyobacter* 和 *Pelobacter*。近年来研究最多的菌株为 *Klebsiella pneumoniae*(简称为 *K. pneu*),其次为 *Clostridium butyricum*(简称为 *C. but*)。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^[6,7]。而本研究筛选的 *CpN-38* 菌株 1,3-PD 产量已经超过 *C. but* 菌株的生产能力,是一株很有研究价值和应用潜力的菌株。在上述研究的基础上,又对 *CpN-38* 菌株发酵 1,3-PD 的最适 pH、温度、时间、接种量等因素进行了研究,建立了 *CpN-38* 菌株 1,3-PD 发酵的最适条件。在最适条件下进行了 30 L 放大实验,拟另文报道。

致谢:本研究得到沈阳农业大学刘长江教授的支持和指导,特此致谢!

参考文献

- Deckwer W D. Presented at the International Congress on Chemical from Biotechnology, Hannover, Germany, 1993. 18~20
- Witt U, Mueller R J, Augusta J et al. Macromol Chem Phys, 1994, 195: 793~802
- 姜兴茂. 上海化工, 2000, 23(6): 35~39
- Homan, T, Tag C, Biebl H. Appl Microbiol Biotechnol Lett, 8: 37~42

- 5 Kretschmann J, Carduck F J, Deckwer W D. European Patent, EP.0361082A2. 1991
- 6 Zeng A N, Ross A, Biebl H. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 902 ~ 911
- 7 Homann T, Tag C, Biebl H et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33: 121 ~ 126

The Screening of the 1,3-PD High-production Strain from *Clostridium*s and Studies on Its Fermentation Medium

Chi Naiyu^{1,3} Zhang Qingfang¹ Wang Yuan^{1,3} Li Xiaoyan¹
Li Aimin² Gu Ying² Liu Changjiang²

1 College of Bioengineering, Dalian University, Dalian, 116622

2 College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110161

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

ABSTRACT Two 1,3-PD producing strains were obtained from 13 *Clostridium*s, which were isolated from freshwater marsh. A 1,3-PD producing mutant(*CpN-38*) was bred through multiple mutagenesis (UV, DES, NTG, EMS, LiCl etc). The yield of 1,3-PD was 31.00 g/L, which was 7 times of original strain(*Clostridium pasteurianum* 98-107 and 99-77). Through monofactorial experiment, the optimal medium was obtained for producing 1,3-PD of *CpN-38*. The medium was 90 g/L glycerol, 1.70 g/L NH_4Cl , Fe^{2+} 0.005%, Co^{2+} 0.004%.

Key words *Clostridium pasteurianum*, 1,3-PD, medium, screening

(上接第 9 页)

Mechanism of Improving Eating Quality of Rice Noodles by Lactic Acid Bacteria Fermentation

Min Weihong¹ Li Lite¹ Lu Zhanhui¹ Lou Hubing¹ Eizo Tatsumi²

1 College of Food, China Agricultural University, Beijing, 100083

2 Japan International Research Center for Agricultural, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba

ABSTRACT The mechanism of improving eating quality of rice noodles by lactic acid bacteria fermentation was studied in this paper. The starch molecular profile could be divided into two distinct fractions (Fr I, Fr II), Fr I was the amylopectin fraction and Fr II was the amylose fraction. The number of average molecular polymerization (DPn) of amylopectin decreased from 12676.3 GLU to 11500.4 GLU by lactic acid bacteria fermentation, while DPn of the amylose increased from 2975.3 to 3563.2 GLU. The average chain length of Fr I decreased from 61.2 GLU to 45.0 GLU and Fr II increased from 23.7 GLU to 28.4 GLU. Amylose content increased from 12.33% to 17.37% and protein content decreased from 6.89% to 4.2%. Experiments of extensibility showed that the maximum breaking strain, the maximum breaking stress and stretch ratio/shrink ratio of section increased significantly ($p < 0.01$), but Young's modulus decreased significantly ($p < 0.01$). Sensory evaluation showed that fermented rice noodles had favorite mouth-feel. Conclusively, a relationship between starch structure and functional properties could be built from this study.

Key words rice noodles, GPC, average molecular polymerization, average chain length