

吴孔阳,朱闪闪,和朝军,等. 1 株产 3-羟基丙酸菌株的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):381-383.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.121

1 株产 3-羟基丙酸菌株的分离和鉴定

吴孔阳¹, 朱闪闪¹, 和朝军¹, 董文雅¹, 杨同香²

(1. 洛阳师范学院生命科学学院,河南洛阳 471022; 2. 河南科技大学食品与生物工程学院,河南洛阳 471023)

摘要:通过平板筛选,从土壤中分离出 1 株菌株 Y31,并对该菌株进行形态观察、生理生化试验、16S rDNA 序列分析以及产物的薄层层析鉴定。结果表明,Y31 菌株初步鉴定为短乳杆菌变种,能够以丙酸为唯一碳源发酵生产 3-羟基丙酸。

关键词:3-羟基丙酸;分离;鉴定;短乳杆菌;薄层层析

中图分类号:Q939.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0381-03

3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 别称 β -hydroxypropionic acid, 简写 3-HP)是一种重要的化工平台产品,被美国能源部列为当今世界 12 种最具潜力的化工产品之一^[1]。目前,3-HP 主要通过丙烯酸水合法、 β -丙内酯水解法等化学合成方法制备,在生产过程中依赖一些特殊条件,且具有一定的危险性^[2]。而微生物技术方法逐渐成为当前 3-HP 生物合成的研究热点^[3-6],主要是通过自然选育、基因工程或代谢工程技术选育优良的 3-HP 产生菌。从自然环境中选育的 3-HP 菌株主要有克雷伯氏菌、假丝酵母、假单胞

菌、罗伊氏乳杆菌和红串红球菌等^[2,7-10]。为了获得其他具有潜在应用价值的 3-HP 产生菌,本研究从不同的土壤环境中分离产 3-HP 菌株,并通过形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析等方法对分离菌株进行初步鉴定,以期丰富产 3-HP 的微生物资源提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 土壤样品采集自果园、耕田、化工厂周边污水环境。

1.1.2 培养基 (1)初筛培养基:葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L、琼脂 20 g/L,pH 值自然,高压灭菌后加入 0.1%~1.0% 丙酸。(2)复筛培养基:蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L、琼脂 20 g/L,pH 值自然,高压灭菌后加入

收稿日期:2014-08-26

基金项目:洛阳师范学院省部级以上项目培育基金(编号:10001423);洛阳师范学院博士科研启动基金(编号:10001399)。

作者简介:吴孔阳(1985—),男,河南商城人,博士,讲师,主要从事食品微生物研究。E-mail:kywu2007@126.com。

[2] Ali H, Muhammad S K. Biosorption of crystal violet from water on leaf biomass of *Calotropis procera* [J]. Journal of Environmental Science and Technology, 2008, 1(3): 143-150.

[3] Mondal P K, Ahmad R, Usmani S Q. Anaerobic biodegradation of triphenylmethane dyes in a hybrid UASFB reactor for wastewater remediation [J]. Biodegradation, 2010, 21(6): 1041-1047.

[4] Wu J, Li L G, Du H W, et al. Biodegradation of leuco derivatives of triphenylmethane dyes by *Sphingomonas* sp. CM9 [J]. Biodegradation, 2011, 22: 897-904.

[5] Chen C C, Liao H J, Cheng C Y, et al. Biodegradation of crystal violet by *Pseudomonas putida* [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(3): 391-396.

[6] Chen C Y, Kuo J T, Cheng C Y, et al. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandoraea pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172(2/3): 1439-1445.

[7] Wu J, Jung B G, Kim K S, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* WL-13 and its capacity to decolorize triphenylmethane dyes [J]. Journal of Environmental Sciences - China, 2009, 21(7): 960-964.

[8] 都林娜, 泮琇, 李刚, 等. 孔雀石绿高效脱色菌株的筛选、鉴定与脱色特性研究 [J]. 环境科学学报, 2014, 34(1): 143-151.

[9] Ayed L, Cheriaa J, Laadhari N, et al. Biodegradation of crystal violet by an isolated *Bacillus* sp. [J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(2): 267-272.

[10] 胡起靖, 林玉满, 甘莉, 等. 一株嗜麦芽寡养单胞菌对结晶紫的脱色条件研究 [J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2008, 24(2): 75-79.

[11] Cheriaa J, Triphenylmethanes B A. Malachite green and crystal violet dyes decolorisation by *Sphingomonas paucimobilis* [J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(1): 57-61.

[12] Yatome C, Yamada S, Ogawa T, et al. Degradation of crystal violet by *Nocardia coralinae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 38: 565-569.

[13] 譙建军, 姚秉华, 田萍, 等. 结晶紫生物共降解的动力学研究 [J]. 中国环境科学, 2005, 25(6): 664-668.

[14] Parshetti G K, Telke A A, Kalyani D C, et al. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 176(1/3): 503-509.

[15] Khataee AR, Dehghan G, Ebadi A, et al. Biological treatment of a dye solution by macroalgae *Chara* sp.: effect of operational parameters, intermediates identification and artificial neural network modeling [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 2252-2258.

0.5% 丙酸。(3) 发酵培养基: 蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L, pH 值自然, 高压灭菌后加入 0.5% 丙酸。(4) 斜面培养基: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L、琼脂 20 g/L, pH 值自然。菌落形态特征和生理生化试验所用培养基参考《微生物学实验教程》和《微生物学实验技术》等相关资料^[11-12]。

1.1.3 主要试剂 DNA Marker 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; *Taq* 酶、dNTP 购自 TaKaRa 公司; 3-HP 标准品购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 细菌生理生化微量鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司; TLC Silica gel 60 F254 硅胶薄层层析板购自 Merck 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌株初筛与复筛 分别将样品少许放入 100 mL 含有玻璃珠的无菌水中, 轻轻混匀后静置 2 h, 然后吸取 0.1 mL 悬浮液涂布于含有不同浓度丙酸的初筛培养基上。涂布完毕后, 将平板倒置于 30 ℃ 培养箱中放置 24 ~ 72 h, 用无菌牙签将初筛平板上的单个菌落转接到复筛培养基上, 继续培养 24 ~ 48 h, 初步得到能够在复筛培养基中生长的菌株。将复筛的菌株分别接种于 10 mL 发酵培养基中, 在 30 ℃、160 r/min 的摇床中发酵 48 h。发酵结束后, 离心去除菌体得到发酵上清液以备用。另外, 通过薄层层析初步鉴定产 3-HP 的菌株进行纯培养, 纯化后的菌株接种于斜面培养基中保存。

1.2.2 菌株的形态学观察和生理生化试验 参考《微生物学实验教程》和《微生物学实验技术》等相关资料对产 3-HP 菌株进行形态学观察和生理生化试验。本研究所进行的生理生化试验主要包括糖发酵试验、淀粉水解试验、脲酶测定、吡啶试验、过氧化氢酶试验、乙酰甲基甲醇试验(VP 试验)以及甲基红试验(MR 试验)等。

1.2.3 菌株的 16S rDNA 序列测定及系统发育树构建 菌株总 DNA 提取方法参考《精编分子生物学实验指南》^[13]。16S rDNA 的 PCR 扩增条件如下: 引物使用细菌通用引物(27 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492 R: 5'-TACGGT-TACCTTGTTACGACTT-3'), 20 μL 的 PCR 扩增体系包括 10 × PCR buffer 2 μL、dNTP 0.8 μL、27 F 和 1492 R 引物各 0.5 μL、模版 DNA 1 μL、*Taq* 酶 0.3 μL、无菌水 14.9 μL。PCR 反应条件包括: 94 ℃ 变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 进行 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序, 并将测得结果经由 GenBank 进行序列相似性搜索, 然后采用 Clustal X 进行序列联配分析, 系统发育分析通过软件 MEGA 6.0 完成。

1.2.4 产物的薄层层析 为初步确认所筛选的菌株是否产 3-HP, 通过薄层层析的方法进行检测分析, 参照李冰等方法^[14]并稍作修改, 展开剂由正丁醇、甲酸和水按照 19:1:10 的体积比所构成, 显色剂为 0.1% 溴甲酚绿, 点样体积为 2 μL。

2 结果与分析

2.1 菌株的初步分离和形态观察

将采集的样品进行多轮分离, 最终得到 1 株能够在复筛培养基中生长良好菌株, 将其命名 Y31, 划线分离出单菌落后进行发酵验证。从 Y31 菌落特征上看呈现乳白色、中间微凸起,

48 h 后呈淡黄色, 不透明, 直径小于 0.5 mm(图 1-A)。菌株 Y31 革兰氏染色结果呈阳性, 油镜观察到的显微形态见图 1-B, 单个细胞呈棒球形杆状, 两端钝圆, 单个或成链状排列。

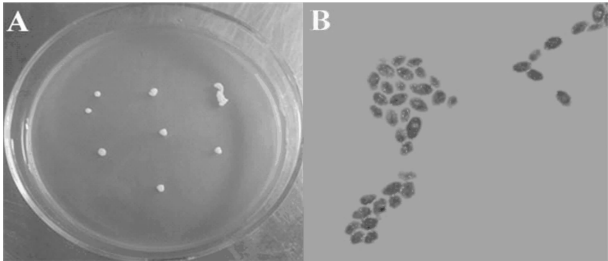


图1 菌株的形态特征

2.2 菌株的生理生化特性

2.2.1 糖发酵测试 通过一系列生理生化试验指标对 Y31 菌株进行测定。结果表明, 该菌可利用乳糖、葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖且不产气, 能液化明胶, 不能利用棉籽糖、甘露醇(表 1)。

表 1 糖发酵测试结果

| 糖类 | 结果 |
|-----|----|
| 乳糖 | + |
| 葡萄糖 | + |
| 麦芽糖 | + |
| 棉籽糖 | - |
| 鼠李糖 | + |
| 甘露醇 | - |
| 明胶 | + |

注: “+”表示能利用或能液化;“-”表示不能利用。

2.2.2 其他方法测试 淀粉水解试验、吡啶试验、乙酰甲基甲醇试验呈现阴性; 脲酶测定试验、接触酶试验、甲基红试验为阳性(表 2)。生理生化测定结果结合形态学观察, 并对照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)发现 Y31 菌株与短杆菌相似。

表 2 其他方法测试结果

| 试验 | 结果 |
|-------|----|
| 淀粉水解 | - |
| 脲酶测定 | + |
| 吡啶 | - |
| 过氧化氢酶 | + |
| VP | - |
| MR | + |

注: “-”表示该试验为阴性;“+”表示该试验为阳性。

2.3 菌株分子生物学鉴定

按照《精编分子生物学实验指南》所述方法, 提取 Y31 菌株的基因组 DNA, 然后利用细菌通用引物扩增该菌株的 16S rDNA, 经测序获得该菌株 16S rDNA 序列, 片段大小为 1 430 bp。选择 Genbank 中与 Y31 菌株 16S rDNA 序列相似性较高的已知菌株的 16S rDNA 序列, 并构建邻接树(N-J 法)。结果表明, 菌株 Y31 的 16S rDNA 序列与短乳杆菌具有较高的同源性, 二者在以 N-J 法构建的系统发育树上聚为同一簇群(图 2), 而通过生理生化试验指标分析发现, 该菌株能够利用鼠李糖, 不能够利用棉籽糖, 另外该菌株能够在以丙酸为唯一碳源的培养基中生长, 这与多数短乳杆菌有所不同, 结合《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版), 初步鉴定菌株 Y31 为短乳杆菌变种, 命名为 *Lactobacillus brevis* Y31。

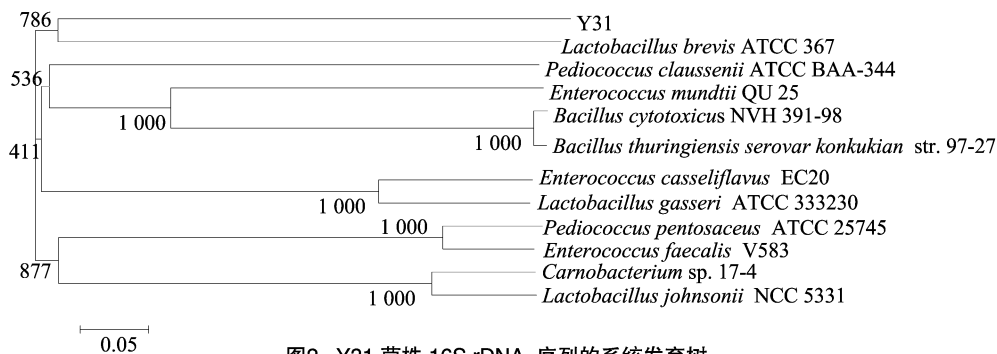
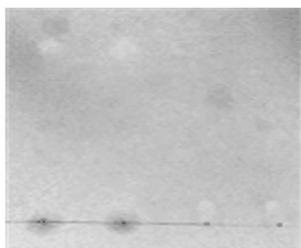


图2 Y31 菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

2.4 发酵产物的鉴定

将发酵液离心后获取发酵上清液,然后进行薄层层析分析,结果见图3。通过测量点样原点处到显色斑点中心距离与原点至溶剂前沿距离,得出每个斑点的比移值 R_f 。计算得出发酵液和对照 3-HP 的 R_f 值接近,符合薄层层析定性要求,因此,初步确定 Y31 菌株所产的酸为 3-HP。



1~4—对应发酵液、3-HP、乙酸、丙酸

图3 发酵液的薄层层析结果

3 结论与讨论

目前,化学法合成 3-HP 具有经济可行的优势,但从长久考虑,微生物法生产 3-HP 更加绿色环保。从相关文献来看,微生物源 3-HP 的研究主要通过基因工程和代谢工程技术构建 3-HP 的生物合成途径,并证实了某些微生物体内存在的 3-HP 代谢途径^[1,15]。相关试验尚处于试验阶段,与生产应用还有一定距离。另外,从自然环境中分离的产 3-HP 菌株几乎都面临产物的毒性、耐受性问题,甚至构建的工程菌也存在相同的难题,有些基因工程菌还需依赖价格高昂辅酶 B_{12} ^[16]。

迄今已发现多种微生物能够利用不同的碳源产生 3-HP,本试验从自然环境中分离出 1 种新发现的产 3-HP 菌株 Y31,为该菌株的进一步选育创造了条件。通过形态观察、生理生化试验、分子生物学技术初步鉴定 Y31 菌株为短乳杆菌变种,为微生物源 3-HP 代谢网络研究提供一定的技术参考。

参考文献:

[1] Kumar V, Ashok S, Park S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(6): 945-961.
[2] Lee S H, Park S J, Park O J, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from acrylic acid by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* LG12[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(5): 474-

481.

[3] Thorgersen M P, Lipscomb G L, Schut G J, et al. Deletion of acetyl-CoA synthetases I and II increases production of 3-hydroxypropionate by the metabolically-engineered hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 22: 83-88.
[4] Lee P, Subramanian M R, Zhou S F, et al. 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase - I from *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 degrades 3-hydroxypropionic acid[J]. Biotechnology and Bio-process Engineering, 2014, 19: 1-7.
[5] Kim K, Kim S K, Park Y C, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by modulation of glycerol metabolism in recombinant *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2014, 156: 170-175.
[6] Jung W S, Kang J H, Chu H S, et al. Elevated production of 3-hydroxypropionic acid by metabolic engineering of the glycerol metabolism in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 23: 116-122.
[7] Dishisha T. Microbial production of bio-based chemicals[D]. Lund: Lund University, 2013.
[8] Arasu M V, Sarkar R, Sekar B S, et al. Isolation of a novel *Pseudomonas* species SP2 producing vitamin B_{12} under aerobic condition[J]. Biotechnology and Bio-process Engineering, 2013, 18(1): 43-51.
[9] 范俊英, 方慧英, 诸葛斌, 等. 3-羟基丙酸高产菌株的筛选及诱变选育[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1355-1362.
[10] Wang X, Sa N, Wang F H, et al. Engineered constitutive pathway in *klebsiella pneumoniae* for 3-Hydroxypropionic acid production and implications for decoupling glycerol dissimilation pathways[J]. Current Microbiology, 2013, 66(3): 293-299.
[11] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
[12] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
[13] 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008.
[14] 李冰, 裴疆森. 3-羟基丙酸产生菌株的筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 28-31.
[15] Valdehuesa K N, Liu H W, Nisola G M, et al. Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3-hydroxypropionic acid as C3 platform chemical[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(8): 3309-3321.
[16] Bisaria V S, Kondo A. Microbial production of 3-hydroxypropionic acid from renewable sources; a green approach as an alternative to conventional chemistry[M]//Kumar V, Ashok S, Park S. Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts. Hoboken, USA: Wiley, 2014: 381-407.