

方亚坤,周 配,张 磊,等. 1 株高产甘油酸菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):224-227.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.066

# 1 株高产甘油酸菌株的筛选与鉴定

方亚坤<sup>1</sup>,周 配<sup>1</sup>,张 磊<sup>1</sup>,赵不思<sup>2</sup>,刘宇鹏<sup>1</sup>

(1. 河南大学生命科学学院生物工程研究所,河南开封 475004; 2. 河南大学淮河医院,河南开封 475000)

**摘要:**利用平板显色法,从腐烂的水果中筛选出 1 株能够转化甘油产生甘油酸的菌株。根据生理生化、形态学鉴定以及 16S rDNA 基因序列结果的分析,确定该菌株的生物学分类地位。该菌株属于醋酸杆菌科(Acetobacteraceae)葡萄糖酸杆菌属(*Gluconobacter*)日本葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter japonicus*),将其命名为 HD1025。初步发酵试验表明,该菌株能够以 150 g/L 甘油为底物生产 49.47 g/L 的甘油酸。

**关键词:**甘油酸;甘油;生理生化;醋酸杆菌;平板显色法

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0224-03

甘油酸(2,3-二羟基丙酸)存在于自然界各种各样的植物中,它作为一种中间代谢物同样也存在于人体内。甘油酸及甘油酸的衍生物具有很多生物学功能:在人体内 D-甘油酸能使胃部细胞在一定剂量乙醇刺激后增强活力从而促进乙醇分解代谢,因此它可以作为解酒药成分<sup>[1]</sup>;据报道,在狗体内的甘油酸具有胆固醇活性和肝兴奋剂的功能,甘油酸衍生的酯类低聚物能表现出抗胰蛋白酶活性<sup>[2]</sup>。同时,甘油酸由于自身生物可降解性优于其他的一些高聚物,可用作药物的运输载体。在食品方面,甘油酸同样具有很多用途。

甘油酸的生产方法有化学法和生物法 2 种,目前市场上销售的甘油酸大部分是通过化学方法生产而来的,化学方法与生物法相比,具有成本高、耗能大、产量低并且不具有立体选择性等缺点。利用微生物发酵法生产甘油酸,环境温和、产量高、方法简便而且产物具有立体选择性,因此被广泛关注。但是,目前国外关于生产甘油酸菌株的报道较少,1987 年日本报道泰国葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter thailandicus* NBRC 3172、氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* NBRC 3292、氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* NBRC 3294、弗拉托葡萄糖酸杆菌 *G. frateurii* NBRC 3262 生产甘油酸产量分别为 27.2、36.0、32.6、57.2 g/L<sup>[3-5]</sup>。Sato 等报道利用热带醋酸杆菌 *Acetobacter tropicalis* NBRC 16470、弗拉托葡萄糖酸杆菌 *G. frateurii* NBRC 103465 等菌株生产甘油酸,其中部分菌株产量可达 100 g/L 以上<sup>[6]</sup>。然而,到目前为止国内还未见有关甘油酸发酵方面的报道。

本研究在国内首次报道从腐烂的水果中筛选到 1 株能够利用甘油发酵生产甘油酸的菌株,并对其进行形态学、生理生化鉴定以及 16S rDNA 基因序列分析,确定它属于醋酸杆菌科葡萄糖酸杆菌属,将其命名为 HD1025。

收稿日期:2015-12-22

基金项目:河南省科技厅攻关项目(编号:132102210387)。

作者简介:方亚坤(1990—),男,河南商丘人,硕士,主要从事发酵工程研究。E-mail:1282874636@qq.com。

通信作者:刘宇鹏,博士,教授,主要从事发酵工程和生物催化研究。

Tel:(0371)23887799;E-mail:liuyupenglw@126.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

1.1.1 菌株 日本葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter japonicus*) HD1025 由笔者所在实验室从腐烂的水果中分离获得。

1.1.2 培养基 平板筛选培养基:甘油 15%、蛋白胨 0.9%、酵母粉 0.1%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.09%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%、溴甲酚紫 0.05%、琼脂 2%,pH 值 6.5~7.0。

斜面保藏培养基:葡萄糖 0.5%、蛋白胨 0.5%、酵母粉 0.5%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%、琼脂 2%,pH 值 6.5~7.0。

种子培养基:葡萄糖 0.5%、蛋白胨 0.5%、酵母粉 0.5%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%,pH 值 6.5~7.0。

发酵培养基:甘油 15%、蛋白胨 0.9%、酵母粉 0.1%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.09%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%、CaCO<sub>3</sub> 2%,pH 值 6.5~7.0。

上述培养基中种子培养基和斜面培养基是在 115℃下灭菌 30 min,筛选培养基和发酵培养基在 121℃下灭菌 30 min。每个试验做 3 个重复,取平均值并计算误差。

发酵罐培养条件:400 r/min,装液量为 3 L,通气量为 1 L/(L·min),30℃。

### 1.2 菌株的分离与筛选

在河南省开封市区内取样,样品包括污水、淤泥、腐烂的水果和蔬菜、地表土样、蜂蜜等。将取得的样品粉碎,取 10 g 样品加入到 90 mL 无菌水中,在摇床中振荡 1 h。取菌悬浮液,稀释成一系列浓度梯度。取 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 等 3 个梯度 0.2 mL 悬浮液涂布于平板筛选培养基上,30℃培养 3~4 d。挑取菌落周围培养基颜色由紫色变成黄色的菌株,分别接种于斜面培养基和发酵罐发酵培养基进行初筛,220 r/min、30℃,好氧培养 72 h。取 72 h 后的发酵液,测定甘油酸含量。选取初筛产量较高的菌株接种在发酵培养基进行复筛,培养条件和初筛相同。取 72 h 发酵液测定甘油酸和残留的甘油含量。选取甘油酸高产菌株进行斜面保存,进行下步试验。

### 1.3 分析测定

采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatog-

raphy,简称 HPLC)测定发酵液中甘油酸、甘油含量<sup>[7-8]</sup>。

检测条件: 1515 泵、2489 紫外检测器(检测波长 210 nm)、2414 示差检测器、1500 柱温箱、2707 自动进样器。色谱柱型号: Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 9 μm);柱温 60 ℃;流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20% 乙腈;流速 0.3 mL/min;进样量 20 μL。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 细胞形态特征 菌落形态观察:取试管斜面上的菌体平板划线制备单菌落,挑取单菌落接在种子培养基上,30 ℃ 摇瓶好氧培养 24 h,取种子培养液梯度稀释至合适倍数后,将稀释液涂布于平板培养基上,30 ℃ 培养 4 d 得到单菌落,观察菌落外形及特征。

扫描电镜观察:取试管斜面上的菌体平板划线制备单菌落,挑取单菌落样品制成菌悬液然后制片,制作方法如下:(1)将菌液在 6 000 r/min 下离心 6 min 后,用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次;(2)将菌体经火焰固定于盖玻片上;(3)将盖玻片置于盛有 2.5% 戊二醛溶液的染盆中,固定 1.5 h;(4)取出盖玻片用乙醇(30%、50%、70%、90%、100%,依次脱水 15 min;(5)喷金仪中喷金;(6)扫描电镜观察及拍照。

1.4.2 生理生化特征鉴定 根据《伯杰氏手册》《常见细菌系统鉴定手册》,选取几种特征性生理生化项目进行鉴定<sup>[9-10]</sup>。

1.4.3 16S rDNA 基因序列分析 委托宝生物工程(大连)有限公司进行 DNA 测序;在 NCBI 网站上用 BLAST 检索 GenBank 中相关菌株的 16S rDNA 基因序列,下载同源性最高的序列,用 BioEdit 7.0 软件编辑后再使用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析,确定该菌的分类地位。

1.5 遗传稳定性试验

采用群体传代的方法,传接 10 代后,检测摇瓶发酵液中甘油酸的含量,与第 1 代相比,观察菌株发酵性能的变化,确定遗传稳定性,是否适用于工业生产。

2 结果与分析

2.1 甘油酸产生菌株的分离和筛选

按照“1.2”节的方法采集样品分离纯化菌株,根据“1.3”节的检测方法,检测发酵液中甘油酸的含量。初步分离共得到 25 株能够氧化甘油产生甘油酸形态各异的菌株,不同菌株形成的变色圈大小不同,初步表明它们产酸能力的大小,再利用

用摇瓶发酵对 25 株菌株进行复筛。检测发酵液中产物甘油酸、副产物二羟基丙酮和剩余底物甘油的含量。在腐烂的水果中筛选出 1 株产量较高的菌株,其产量初步发酵达到 22.03 g/L,将其命名为 HD1025。

2.2 培养特征和形态观察

按照“1.4.1”节的方法,将菌悬液涂布于筛选培养基上,30 ℃ 培养 4~5 d,菌落的培养特征:菌落较小,湿润,圆形,不透明,白色,直径可达 0.5~1.0 cm(图 1)。扫描电镜观察细胞形态特征:细胞呈短圆柱状,无鞭毛,不运动(图 2)。

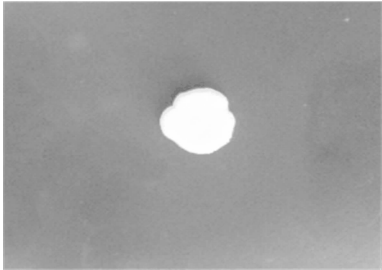


图1 HD1025 菌落形态

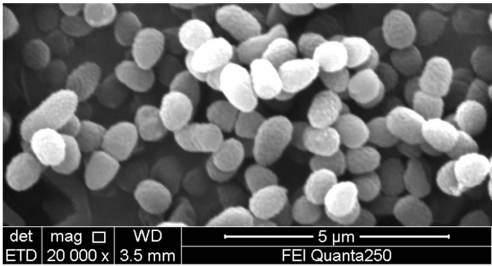


图2 HD1025 菌株扫描电镜结果(20 000×)

2.3 生理生化鉴定

由表 1 中 HD1025 菌株的生理生化试验结果可见:革兰氏染色、接触酶、氧化酶、还原硝酸盐、液化明胶、产吡嗪、氧化乙醇到乙酸、氧化乙酸盐生成 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O、多醇类生酮、水解淀粉、D-木糖产酸、形成 5-酮基葡萄糖酸、D-葡萄糖产酸等属间特征生理生化反应结果鉴定该菌株属于葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*),根据形成 5-酮基葡萄糖酸、甘油产甘油酸、利用 D-阿拉伯糖醇生长、利用赤藓糖醇生长等种间生理生化特性鉴定该菌株与弗拉托葡萄糖杆菌(*Gluconobacter frateurii*)存在一定的区别,与日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*)类似<sup>[11-14]</sup>。

表 1 菌株 HD1025 生理生化鉴定指标

| 鉴定项目                                       | HD1025 | <i>G. japonicus</i><br>NBRC 3271 | <i>G. frateurii</i><br>ATCC49207 | 鉴定项目               | HD1025 | <i>G. japonicus</i><br>NBRC 3271 | <i>G. frateurii</i><br>ATCC49207 |
|--|--------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------|----------------------------------|----------------------------------|
| 革兰氏染色                                      | -      | -                                | -                                | 水解淀粉               | -      | -                                | -                                |
| 接触酶  | +      | +                                | +                                | D-木糖产酸             | +      | +                                | -                                |
| 氧化酶  | -      | -                                | -                                | 形成 5-酮基葡萄糖酸        | +      | +                                | +                                |
| 还原硝酸盐                                      | -      | -                                | -                                | D-葡萄糖产酸            | +      | +                                | +                                |
| 液化明胶                                       | -      | -                                | -                                | 利用甘油产甘油酸           | +      | +                                | w                                |
| 产吡嗪  | -      | -                                | -                                | GYC(葡萄糖碳酸钙培养基)上产色素 | -      | -                                | -                                |
| 氧化乙醇到乙酸                                    | +      | +                                | +                                | 麦芽糖产酸              | +      | +                                | w                                |
| 氧化乙酸盐生成 CO <sub>2</sub> 和 H <sub>2</sub> O | -      | -                                | -                                | 利用 D-阿拉伯糖醇生长       | +      | +                                | +                                |
| 多醇类生酮                                      | +      | +                                | +                                | 利用赤藓糖醇生长           | +      | +                                | +                                |

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;“w”表示弱阳性。

2.4 基因序列分析及其系统发育分析

经过对 HD1025 的 16S rDNA 基因测序,获得 1 398 bp 长度的基因序列,将该序列提交 GenBank (登记号为 KT964237),对相关数据进行相似性分析,然后采用 BioEdit 7.0 软件编辑后再使用 MEGA 4.0 软件构建进化树分析。由图 3 可知,HD1025 与日本葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter japoni-*

*cus*) (相似度 100%) 和弗拉托葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter frateurii*) (相似度 99.86%) 的亲缘关系较近,然而试验表明,HD1025 与弗拉托葡萄糖酸杆菌菌株在部分生理生化试验上仍有不同,而与日本葡萄糖酸杆菌亲缘关系最接近。因而,最终将该菌种确定为日本葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter japonicus*),拟将该菌株命名为 HD1025。

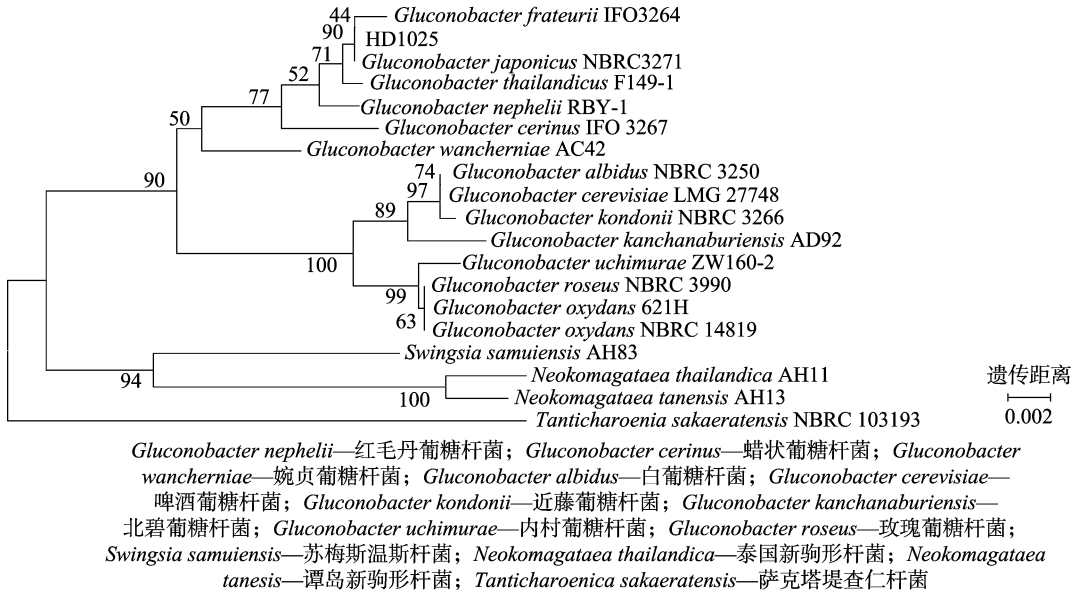


图3 基于菌株 HD1025 和参比菌株的 16S rRNA 基因同源性的系统发育树

2.5 遗传稳定性试验

按照“1.5”节方法检测菌株的遗传稳定性。由表 2 可知,第 10 代甘油酸产量为 22.31 g/L,与第 1 代相比,发酵性能没有明显变化,说明该菌具有良好的遗传稳定性,适用于工业生产。

表 2 菌株 HD105 的遗传稳定性试验结果

| 传代次数<br>(次) | 甘油酸产量<br>(g/L) |
|-------------|----------------|
| 1           | 22.80 ± 0.89   |
| 2           | 22.34 ± 0.67   |
| 3           | 22.80 ± 1.11   |
| 4           | 22.30 ± 1.10   |
| 5           | 22.71 ± 0.87   |
| 6           | 22.41 ± 1.07   |
| 7           | 22.42 ± 0.92   |
| 8           | 22.51 ± 0.71   |
| 9           | 22.46 ± 0.96   |
| 10          | 22.31 ± 0.81   |

2.6 菌株 *G. japonicus* HD1025 发酵罐发酵曲线

在“1.1.2”节给出的条件将菌株 HD1025 发酵 72 h,甘油酸产量达到 49.47 g/L,残余底物含量为 92.22 g/L(图 4)。

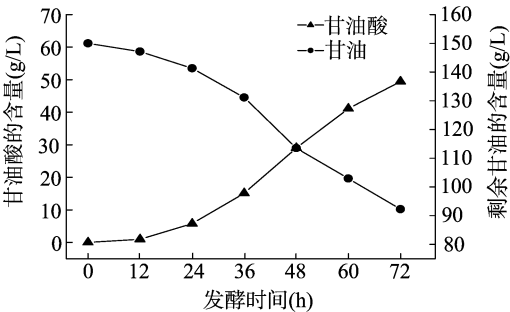


图4 菌株 *G. japonicus* HD1025 发酵过程曲线

酸的过程中会受到底物甘油的抑制。到目前为止,国内外尚未有利用日本葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter japonicus*) 菌株进行甘油酸生产的报道。

本试验从腐烂水果中筛选出 1 株能够氧化甘油生产甘油酸的菌株。经形态学鉴定、生理生化试验和 16S rDNA 基因序列分析,将该菌株命名为日本葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter japonicus*)。该菌株可以耐高浓度甘油,在 150 g/L 的初始甘油浓度下生长良好。该菌株分批发酵 72 h 可产甘油酸 49.47 g/L,预计经菌种选育及发酵工艺优化后甘油酸的产量会有较大的提升,具有很好的工业化应用价值。

3 讨论

目前,国外关于微生物法生产甘油酸报道较多的是弗拉托葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter frateurii*)、弱氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter suboxydans*)、氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 等菌株,其中弗拉托葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter frateurii*) 菌株产甘油酸的能力较强,但在生产甘油

参考文献:

[1] 卢英华,陈慧敏,蒲 洋,等. 一种用于生产甘油酸的热带醋杆菌的驯化方法:CN104263689A[P]. 2015-01-07.  
[2] Habe H, Fukuoaka T, Kitamoto D, et al. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(3): 445-452.

刘德锋, 彭琳, 郜鲁涛, 等. 基于全球定位系统(GIS)的云南省铁皮石斛种植适宜性区划[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 227-230.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.067

# 基于全球定位系统(GIS)的云南省 铁皮石斛种植适宜性区划

刘德锋<sup>1</sup>, 彭琳<sup>1</sup>, 郜鲁涛<sup>1</sup>, 刘建阳<sup>2</sup>, 盛立冲<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学基础与信息工程学院, 云南昆明 650000; 2. 云南省信息技术发展中心, 云南昆明 650000)

**摘要:**云南省是我国石斛的主产区, 其中铁皮石斛是在云南全省乃至全国范围种植面积最大的品种。而有关云南省铁皮石斛种植适宜性区划的研究还不多。为了研究铁皮石斛在云南省的适宜生长区域, 根据云南省的气候资源特点及铁皮石斛对生长环境的要求, 分析确定影响铁皮石斛生长分布的适宜性区划指标, 选取年平均温度、年极端最低温度、年极端最高温度、全年 $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 活动积温、年降水量、海拔、年平均相对湿度 7 个气象因子作为种植区划指标, 利用云南省 109 个气象台站 1981—2010 年的气候资料及云南省地理信息数据, 采用全球定位系统(GIS)空间分析技术对区划指标进行细网格推算。结果得到云南省  $1\text{ km} \times 1\text{ km}$  网格化气候资源的空间分布情况, 并按照最适宜生长区、次适宜生长区、不适宜生长区对云南省铁皮石斛进行了种植区域划分, 并给出了区划专题图, 为云南省铁皮石斛的合理种植提供了一定的科学依据。

**关键词:**铁皮石斛; 适宜生长区域; 全球定位系统(GIS); 气候资源; 区域划分

**中图分类号:** S127      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0227-04

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 别称黑节草、云南铁皮, 主要分布于安徽西南部、浙江东部、福建西部、广西西北部, 以及四川、云南东南部<sup>[1]</sup>。云南省是目前全国种植铁皮石斛面积最大的地区。铁皮石斛茎可以入药, 具

有养胃生津、益气补血、抗肿瘤、防治癌症等功效, 是中草药种类中极其珍稀的中药材<sup>[2]</sup>。

光照、湿度、气候等条件稍有不便会就对铁皮石斛的生长发育造成影响。由于铁皮石斛对生长环境要求苛刻, 导致在自然条件下只有极少的环境适宜铁皮石斛生长, 加上森林砍伐、土地开发等导致的生态环境破坏, 以及长期无节制的掠夺式采挖, 铁皮石斛野生资源已经濒临枯竭<sup>[3]</sup>。目前, 市场上的铁皮石斛产品主要来源于人工栽培。由于铁皮石斛生长环境的特殊性, 人工栽培往往投入大、产量低, 加上铁皮石斛极高的药用价值, 市场供不应求, 其价格也在不断攀升。在经济利益的驱使下, 铁皮石斛的种植面积也在不断地扩大, 这往往又造成了一种盲目引进的现象, 使云南省铁皮石斛产业呈现一种“大面积小产业”的现状<sup>[4]</sup>。在这种背景下, 开展云南省

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 国家农村信息化示范省省级综合信息资源中心建设项目(编号: 2014AB017); 云南高原特色农业产业生产服务平台建设项目(编号: 2014AB019); 云南高原特色农业产业物联网示范工程(编号: 2014AB026)。

作者简介: 刘德锋(1989—), 男, 安徽宿州人, 硕士研究生, 研究方向为物联网技术及应用。E-mail: ldfdf120@163.com。

通信作者: 郜鲁涛, 讲师, 主要从事物联网技术研究。E-mail: gaolutao\_11@163.com。

[3] Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, et al. Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 81(6): 1033-1039.

[4] Habe H, Shimada Y, Fukuoka T, et al. Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2009, 73(8): 1799-1805.

[5] Habe H, Shimada Y, Yakushi T, et al. Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(24): 7760-7766.

[6] Sato S, Morita T, Fukuoka T, et al. Microbial resolution of DL-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(5): 554-557.

[7] 刘宇鹏, 郑璞, 孙志浩, 等. 采用离子排斥色谱法分析发酵液中的琥珀酸等代谢产物[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12): 119-123.

[8] 方亚坤, 靳魁奇, 刘宇鹏, 等. 离子排斥色谱法分析发酵液中甘油

酸等代谢产物[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 171-174.

[9] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 325-329.

[10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001.

[11] 李华, 刘宇鹏, 孙杨, 等. 一株高产二羟基丙酮菌株的筛选及鉴定[J]. 工业微生物, 2013, 43(4): 23-28.

[12] 冯静, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 葡糖杆菌属分类及其主要应用的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(2): 86-90.

[13] Malimas T, Yukphan P, Takahashi M, et al. *Gluconobacter kondonii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria* [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2007, 53(5): 301-307.

[14] Malimas T, Yukphan P, Takahashi M, et al. *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the *Alpha proteobacteria* [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2008, 54(4): 211-220.