

文章编号: 1000-5013(2007)04-0399-04

耐高浓度甘油的1,3-丙二醇生产菌的诱变选育

兰琳, 林锡煌, 彭益强, 方柏山

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 利用紫外线对克雷伯杆菌进行诱变, 筛选出耐高浓度甘油且1,3-丙二醇(1,3-PD)产量较高的突变株KpVI。实验结果表明, 在距离34 cm, 功率30 W的紫外灯垂直照射下, 最佳紫外诱变时间为6 min, 此时, 致死率为90.9%。克雷伯杆菌经过紫外诱变后, 菌落明显增大, 是原始菌株的2~4倍; 变异菌株KpVI经过6代遗传稳定性考察, 甘油消耗率和1,3-PD产量稳定, 且保持了较高水平。在甘油质量浓度为 $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下, 变异菌株KpVI的甘油消耗率为98.3%, 甘油转化率为50.4%, 1,3-PD产量为 $44.81\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 生产能力达到 $0.75\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ 。

关键词: 克雷伯杆菌; 1,3-丙二醇; 紫外诱变; 甘油

中图分类号: TQ 923; Q 93-335

文献标识码: A

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的化工原料, 主要的作为聚酯、聚醚和聚亚氨酯的单体^[1]。利用微生物歧化甘油生产1,3-PD, 是一种对环境有益的生产工艺。甘油发酵生产1,3-PD的菌种已发现了许多种, 目前国内外采用较多的菌种是肺炎克雷伯氏菌^[2-4]。微生物发酵法生产1,3-PD较化学合成法有很多优点, 但是发酵过程中存在多种物质的抑制作用^[2,5]。甘油为微生物发酵法生产1,3-PD的底物, 原始菌株批式发酵适宜的甘油初始质量浓度为 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 若初始质量浓度的过高会对细胞产生毒性, 抑制细胞生长和1,3-PD的生成。目前, 国内关于耐高浓度甘油的1,3-丙二醇生产菌的选育研究还鲜见报道, 且筛选得到的菌株耐甘油质量浓度不高, 1,3-PD产量和转化率均较低^[6-7]。本实验主要通过对克雷伯杆菌进行多次紫外诱变, 逐步提高甘油浓度来获得耐高浓度甘油且高产1,3-丙二醇的菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae* DSM 2026, 德国生物技术中心)。

1.1.2 培养基 种子(LB)培养基参见文[8]配方。发酵培养基: 甘油, $60.0\sim 90.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; KCl, $1.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; NH_4Cl , $6.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.28\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 酵母浸膏, $2.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; pH = 7.0。固体培养基在此基础上加1%琼脂。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外诱变处理 (1) 菌悬液的配制。将保存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 的原始菌株1 mL接入50 mL种子培养基中, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的旋转式摇床中培养24 h, 用去离子水稀释至 $10^8\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。(2) 紫外线处理。打开石英紫外光管预热20 min, 使光波稳定。诱变过程在自制的暗箱中进行, 照明采用红色灯泡。取15 mL制备好的菌悬液, 放于直径9 cm 无菌的平皿内, 用磁力搅拌器进行搅拌, 在30 W紫外灯, 照射距离为34 cm, 分别照射0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 min, 将其稀释成 $10^{-1}\sim 10^{-5}\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$, 分别取 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 3个稀释度菌悬液各0.1 mL涂平板, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养24 h后作菌落计数, 并计算不同照射时间的致死率。

收稿日期: 2006-12-12

作者简介: 兰琳(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物反应工程和分离工程的研究; 通信作者: 方柏山(1957-), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: fangbs@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20276026, 20446004); 福建省科技计划重点项目(2003J020)

1.2.2 目的突变菌株的筛选 (1) 平板初筛. 将诱变后的菌株稀释至 10^{-5} 个 \cdot mL $^{-1}$, 取 0.1 mL 涂布于含高质量浓度甘油的发酵培养基平板上, 于 37 °C 下培养 24 h, 从中挑选能生长的菌株. 然后, 再接入种子培养基中, 于 37 °C 下培养 24 h, 进行下一轮诱变, 并逐步提高发酵培养基平板的甘油质量浓度. (2) 摇瓶复筛. 将初筛得到的菌株接入到发酵培养基中, 于 37 °C 及 200 r \cdot min $^{-1}$ 振荡培养 24 h, 测定其残余甘油质量浓度和 1,3-PD 生成量, 从中筛选 1,3-PD 的产量较高的菌株.

1.2.3 甘油和 1,3-丙二醇质量浓度的测定 采用 Agilent 1100 高效液相色谱系统, 测定甘油残余量与 1,3-PD 的生成量. 色谱柱为 Aminex HPLC-87H 型离子交换柱, 柱温为 40 °C, 检测器为示差检测器, 温度为室温, 流动相为 0.005 mol \cdot L $^{-1}$ 的 H₂SO₄, 流速为 0.5 mL \cdot min $^{-1}$, 进样量为 20 μ L, 采用内标法定量. 样品的预处理取 2 mL 样品于 13 000 r \cdot min $^{-1}$ 下, 离心 10 min 后取上清液进样.

2 结果与分析

2.1 诱变条件的选择

2.1.1 诱变后菌体稀释度的选择 将未经过紫外(UV)诱变的菌株培养后, 分别取 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 个 \cdot mL $^{-1}$ 稀释度的菌悬液各 0.1 mL 涂布于发酵培养基平板上, 于 37 °C 下培养 24 h 后作菌落计数. 结果表明, 10^{-3} , 10^{-4} 个 \cdot mL $^{-1}$ 稀释度下单菌落过于密集, 难以计数; 而在 10^{-5} 个 \cdot mL $^{-1}$ 稀释度下则合适. 故诱变后菌体涂布采用 10^{-5} 个 \cdot mL $^{-1}$ 稀释度.

2.1.2 紫外光诱变最佳照射时间的确定 将制备好的 10^8 个 \cdot mL $^{-1}$ 的菌悬液, 用紫外线分别照射 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 min, 然后, 稀释至 10^{-5} 个 \cdot mL $^{-1}$. 取 0.1 mL 菌悬液涂布于含有 20 mL 发酵培养基(甘油质量浓度为 60 g \cdot L $^{-1}$) 的平板中, 每个诱变条件下涂布 6 个平板, 于 37 °C 下培养 24 h 后作菌落平均数计数, 结果如表 1 所示. 表 1 中, t 为诱变时间, H 为存活率($H = N/N_0 \times 100\%$), S 为致死率($S = 1 - H$), N_0 为对照平板上的菌落数, N 为

表 1 紫外诱变的结果
Tab. 1 Result of UV mutant

t/min	N_0	$H/(\%)$	$S/(\%)$
0	407	100.0	0
0.5	359	88.2	11.8
1.0	308	75.7	24.3
2.0	221	54.3	45.7
4.0	126	31.0	69.0
6.0	37	9.1	90.9
8.0	13	3.2	96.8
10.0	0	0	100.0

经紫外线照射后平板上的菌落数. 由表 1 可以看出, 克雷伯杆菌经紫外线照射后, 致死率明显增加. 一般认为致死率在 90%~95% 之间, 诱变效果最好. 所以采用 6 min 作为紫外克雷伯杆菌诱变的最佳作用时间, 此时致死率为 90.9%.

2.2 诱变后菌落形态的变化

经过紫外诱变后, 菌落形态没有变化, 呈现圆形、白色、表面湿润、饱满. 菌落的直径明显增大, 是原始菌株的 2~4 倍.

2.3 目的突变菌株的筛选

目的突变菌株通过测定底物、产物的质量浓度的高低来进行筛选. 将诱变后的菌株稀释至 10^{-5} 个 \cdot mL $^{-1}$, 取 0.1 mL 涂布于质量浓度为 60 g \cdot L $^{-1}$ 的甘油发酵培养基平板上, 于 37 °C 培养 24 h, 从中挑选出菌落直径较大、生长饱满的菌株. 然后, 将挑选的菌株接入种子培养基中, 于 37 °C 培养 24 h, 按相同条件进行下一轮诱变, 并逐步提高发酵培养基平板的甘油质量浓度至 90 g \cdot L $^{-1}$, 部分菌株的生长状况如表 2 所示. 表中, ρ (甘油) 为甘油质量浓度; “+++” 表示生长良好, 菌落数多于 100; “++” 表示生长一般, 菌落数在 20~100 之

表 2 部分菌株诱变后的生长情况

Tab. 2 Growth situation of partly bacterium after mutant

菌株	ρ (甘油) / g \cdot L $^{-1}$			t/min
	60	75	90	
Kp0	+++	+	-	0
KpI	++	+	+	6
KpII	+++	+	-	6
KpIII	++	++	+	6
KpIV	+++	+++	++	6
KpV	+	+	+	6
KpVI	+++	+++	+++	6
KpVII	+++	+	+	6
KpVIII	+	+	-	6
KpIX	+++	++	+	6
KpX	++	+	-	6

间;“+”表示生长较差,菌落数少于 20;“-”表示不生长.从表 2 中可以看到,菌株 K_p I, K_p III K_p IV, K_p V, K_p VI, K_p VII和 K_p IX能在质量浓度为 90 g · L⁻¹的甘油中生长,故挑选其作为我们诱变的初步筛选得到的菌株,并将其接入到

表 3 初筛菌株残余甘油质量浓度和 1,3-PD 生成量

Tab.3 Remainder glycerol mass concentration and 1,3-PD production of first screened bacterium

菌株	ρ (甘油) / g · L ⁻¹	ρ (1,3-PD) / g · L ⁻¹	σ / (%)	η / (%)
K _p 0	6.80	18.95	88.7	35.6
K _p I	45.54	11.93	49.4	26.8
K _p III	82.12	2.19	8.8	27.8
K _p IV	13.68	33.96	84.8	44.5
K _p V	74.88	5.95	16.8	39.4
K _p VI	1.70	40.39	98.1	45.7
K _p VIII	36.98	14.23	58.9	26.8
K _p IX	60.47	8.96	32.8	30.3

发酵培养基(甘油质量浓度为 90 g · L⁻¹)中培养,测定其残余甘油质量浓度和 1,3-PD 生成量.表 3 为初筛菌株残余甘油质量浓度 ρ (甘油)和 1,3-PD 生成量 ρ (1,3-PD)的表.菌株 K_p0 中,发酵培养基的甘油质量浓度为 60 g · L⁻¹.从表 3 中可以看出,菌株 K_p VI的甘油消耗率 σ 和 1,3-PD 的产量最

2.4 目的菌株的遗传稳定性

在传代培养时,诱变菌株的性状常常不稳定,为了验证所得到的突变株的遗传性状是否稳定,将菌株 K_p VI进行了 6 代遗传稳定性实验,每传代 2 次进行发酵液中甘油和 1,3-PD 产量的测定,如表 4 所示.由表 4 可以看出,目的突变株

表 4 遗传稳定性发酵实验

Tab.4 Ferment experiment of inherit stability

代数	ρ (甘油) / g · L ⁻¹	D / g · L ⁻¹	σ / (%)	η / (%)
2	1.75	37.98	98.1	43.0
4	1.60	41.08	98.2	46.5
6	1.63	42.36	98.2	47.9
平均值	1.66	40.47	98.2	45.8

的遗传性状稳定,未发生回复突变等情况.并且突变株 K_p VI的 1,3-PD 产量也稳定,较出发菌株 K_p0 有较大幅度的提高.

2.5 5L 发酵罐间歇发酵实验

为了使目的突变株的性能更好的发挥出来,我们将较好的目的突变株 K_p VI进行了 5L 发酵罐规模的试验.按 5% 的接种量,将 150 mL 种子液接入装有 3 L 发酵培养基(甘油质量浓度为 90 g · L⁻¹)的发酵罐中,搅拌转速 200 r · min⁻¹,培养温度 37 °C, pH 值为 7.0,发酵时间(t)为 60 h,用高效液相色谱测定残余甘油和 1,3-丙二醇随时间变化量,试验结果如图 1 所示.从图 1 中代谢曲线可以看出,在 48 h 后,甘油消耗与 1,3-PD 的生成渐趋平缓,60 h 分别达到最大值.最终甘油的残余量为 1.53 g · L⁻¹,1,3-PD 产量为 44.81 g · L⁻¹,甘油转化率为 50.4%.

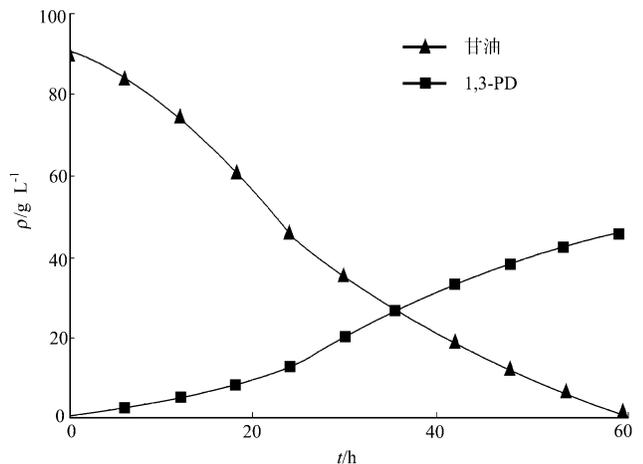


图 1 甘油和 1,3-PD 浓度与发酵时间关系

Fig.1 The relationship of glycerol concentration and 1,3-PD concentration during ferment

3 结束语

通过改变紫外诱变的时间来调节紫外诱变的剂量,并根据致死率的变化确定了最佳诱变剂量.即在 30 W 紫外灯(预热 20 min),垂直照射距离 34 cm 的条件下,紫外诱变的时间 6 min 为最佳,此时致死率为 90.9%,紫外诱变的半致死量为 2 min.克雷伯杆菌经过紫外诱变后,菌落明显增大,是原始菌株的 2~ 4 倍.紫外诱变筛选到的变异菌株 K_p VI 经过了 6 代遗传稳定性考察,甘油消耗率和 1,3-PD 产量稳定,且保持了较高水平.原始菌株(甘油质量浓度 60 g · L⁻¹)的甘油消耗率为 88.7%,甘

油转化率为 35.6%, 1,3-PD 的产量 $18.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生产能力 $0.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$. 由 5L 发酵罐实验结果可以看出, 在耐较高甘油浓度的条件下, 变异菌株 Kp VI 的甘油消耗率为 98.3%, 甘油转化率为 50.4%, 1,3-PD 产量为 $44.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 生产能力为 $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$, 比原始菌株均有了较大提高.

德国生物技术中心曾安平博士赠送实验用克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* DSM 2026), 特此致谢.

参考文献:

- [1] 刘德华, 刘宏娟, 程可可. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇研究进展[J]. 合成纤维, 2005, 34(9): 11-15
- [2] BIELK H, MENZEL K, ZENG A P, et al. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 289-297.
- [3] ZHU M M, LAWMAN P D, CAMERON D C. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-Glycerol-3-phosphate[J]. Biotechnol Prog, 2002, 18(4): 694-699.
- [4] SEIFERT C, BOWIEN S, GOTTSCHALK G, et al. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*[J]. Eur J Biochem, 2001, 286: 269-278.
- [5] ZENG A P, ROSS A. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation [J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 902-911.
- [6] 赵红英, 张 建, 刘宏娟, 等. 1,3-丙二醇发酵过程中底物抑制及其对策的研究[J]. 现代化工, 2002, 22(7): 34-38.
- [7] 李凤梅, 刘长江, 郑 艳, 等. 产 1,3-丙二醇菌株丁酸梭菌的诱变育种[J]. 生物技术, 2005, 15(1): 34-35.
- [8] 陈宏文, 王 蔚, 方柏山, 等. 克雷伯杆菌生产 1,3-丙二醇关键酶发酵条件研究[J]. 高校化学工程学报, 2004, 18(5): 621-627.

Breeding of Strain Producing 1,3-Propanediol in High Concentration of Glycerol

LAN Lin, LIN Xirhuang, PENG Yiqiang, FANG Baishan

(Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: A mutant *Klebsiella pneumoniae* (KpVI) strain that endure high glycerol concentration and had high 1,3-PD yield was screened by ultraviolet (UV). The optimal mutation time was 6 min when 30 W ultraviolet plumb irradiation from 30 cm distance, the lethal ratio was 90.9%. The *Klebsiella pneumoniae* strain was enlarged distinctly after ultraviolet mutation, 2~4 times than original strain. The mutant strain KpVI had showed steady glycerol consumption rate and high 1,3-PD yield via 6 generation inherit stability review. The mutant strain's glycerol consumption rate was 98.3%, glycerol transformation rate was 50.4%, 1,3-PD yield was $44.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the through put was $0.75 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ when glycerol concentration was $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-propanediol; ultraviolet mutagenesis; glycerol

(责任编辑: 黄仲一)