

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 Kp VI. 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 Kp VI 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 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<sup>[1]</sup>. 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<sup>[2-4]</sup>. 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<sup>[2, 5]</sup>. 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<sup>[6-7]</sup>. 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,  $1.6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $6.7\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.28\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 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  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  及  $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  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 H PX-87H 型离子交换柱, 柱温为  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 检测器为示差检测器, 温度为室温, 流动相为  $0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流速为  $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量为  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 采用内标法定量. 样品的预处理取 2 mL 样品于  $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  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  $\cdot \text{mL}^{-1}$  稀释度的菌悬液各 0.1 mL 涂布于发酵培养基平板上, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h 后作菌落计数. 结果表明,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  稀释度下单菌落过于密集, 难以计数; 而在  $10^{-5}$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  稀释度下则合适. 故诱变后菌体涂布采用  $10^{-5}$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  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  $\cdot \text{mL}^{-1}$  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  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . 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  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的平板中, 每个诱变条件下涂布 6 个平板, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $90\% \sim 95\%$  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  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 取 0.1 mL 涂布于质量浓度为  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的甘油发酵培养基平板上, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 部分菌株的生长状况如表 2 所示. 表中,  $\rho(\text{甘油})$  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 1 紫外诱变的结果

Tab. 1 Result of UV mutant

$t/\text{min}$	$N_0$	$H/(\%)$	$S/(\%)$
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

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	$\rho(\text{甘油})/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			$t/\text{min}$
	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 Kp I, Kp III Kp IV, Kp V, Kp VI, Kp VII和 Kp IX能在质量浓度为  $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  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,并将其接入到发酵培养基(甘油质量浓度为  $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )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  $\rho$ (甘油)和 1, 3-PD 生成量  $\eta$ (1, 3-PD)的表.菌株 Kp0 中,发酵培养基的甘油质量浓度为  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .从表 3 中可以看出,菌株 Kp V的甘油消耗率  $\sigma$ 和 1, 3-PD 的产量最高,故挑选 Kp V作为诱变的筛选得到的菌株,接入 LB 培养基中,保藏在  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中.对比表 2 和表 3 可见,菌株生长与甘油消耗率高低密切相关.

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 Kp 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,目的突变株的遗传性状稳定,未发生回复突变等情况.并且突变株 Kp VI的 1, 3-PD 产量也稳定,较出发菌株 Kp0 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 Kp V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  $90\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的发酵罐中,搅拌转速  $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,培养温度  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 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  $1.53\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1, 3-PD 产量为  $44.81\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 甘油转化率为 50.4%.

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 Kp 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  $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的甘油消耗率为 88.7%,甘

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	$\rho$ (甘油)/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho$ (1, 3-PD)/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\sigma$ (%)	$\eta$ (%)
Kp0	6.80	18.95	88.7	35.6
Kp I	45.54	11.93	49.4	26.8
Kp III	82.12	2.19	8.8	27.8
Kp IV	13.68	33.96	84.8	44.5
Kp V	74.88	5.95	16.8	39.4
Kp VI	1.70	40.39	98.1	45.7
Kp VIII	36.98	14.23	58.9	26.8
Kp IX	60.47	8.96	32.8	30.3

表 4 遗传稳定性发酵实验

Tab.4 Ferment experiment of inherit stability				
代数	$\rho$ (甘油)/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$D$ / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\sigma$ (%)	$\eta$ (%)
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

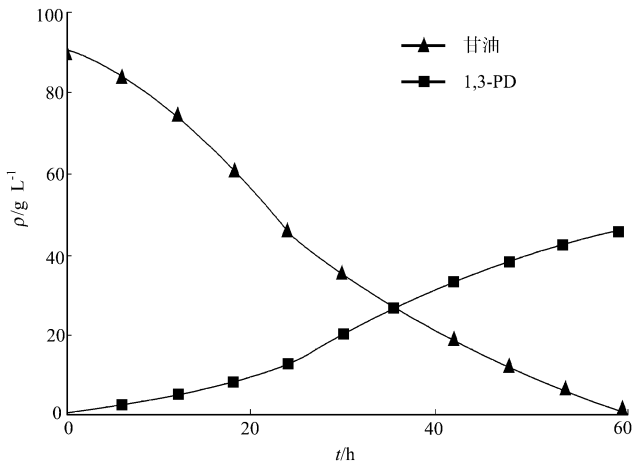


图 1 甘油和 1, 3-PD 浓度与发酵时间关系

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

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 B<sub>12</sub>-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 Yirong, 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 throughput 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)