

质子自杀法选育克雷伯氏菌产乳酸突变株

王红兵¹ 管桂萍² 田杰生^{3*}

(1. 湖南省畜牧兽医研究所 湖南 长沙 410131)

(2. 湖南农业大学生物工程系 湖南 长沙 410128)

(3. 中国农业大学微生物与免疫学系 北京 10094)

摘要: 以产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) M5al 为出发菌株, 经亚硝基胍诱变处理, 运用质子自杀法选育, 从含 0.17 mol/L NaBr-NaBrO₃ 的初筛平板上选出 44 个具有稳定遗传性的单菌落, 然后结合培养基优化后的摇瓶发酵复筛, 获得 3 个产乳酸突变株, 其乳酸脱氢酶活性分别为出发菌株的 50.6%、58.8%、61.3%。对其中乳酸脱氢酶活性最低的菌株在 5 L 自动发酵罐上进行批式发酵, 结果显示: 突变株乳酸产量大幅降低, 而乙酸、1,3-丙二醇的产量则显著增加。

关键词: 质子自杀, 产酸克雷伯氏菌, 产乳酸突变株, 乳酸脱氢酶

Isolation and Characterization of *Klebsiella oxytoca* M5al Mutants with Proton Suicide Method

WANG Hong-Bing¹ GUAN Gui-Ping² TIAN Jie-Sheng^{3*}

(1. Human Institute of Animal & Veterinary Science, Changsha, Hunan 410131, China)

(2. Colloge of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(3. Department of Microbiology and Immunology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: *Klebsiella oxytoca* M5al was used as the original strain to breed mutants after mutagenesis with NTG, 44 single colony were obtained from medium containing 0.17 mol/L NaBr-NaBrO₃ (proton suicide method) and 3 lactic acid-producing mutants were selected by shaking cultivation in optimized medium, their lactate dehydrogenase activity was only 50.6%、58.8%、61.3% of the parent strain, respectively. The lowest one of them batch-cultured in 5 L fermenter, results indicated that the yield of lactic acid of the mutant was decreased remarkably, reversely, acetic acid and 1,3-propanediol were increased observably.

Keywords: Proton suicide, *Klebsiella oxytoca*, Lactic acid-producing mutant, Lactate dehydrogenase

克雷伯氏菌属为肠杆菌科中一类有荚膜的革兰氏阴性菌, 在动物的呼吸道和肠道正常菌群中、自然界水和谷物中均能分离到克雷伯氏菌, 常见的有产酸克雷伯氏菌、肺炎克雷伯氏菌等^[1]。由于该菌属能发酵甘油产生 1,3-丙二醇(近年来新兴的合成聚酯 PTT 的单体之一)、2,3-丁二醇、乳酸、琥珀酸、

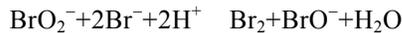
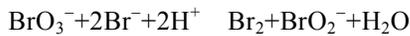
乙酸等重要的化工原料而受到很大的关注, 而克雷伯氏菌属突变株的选育也成为了研究热点^[2]。

Winkelman 等人曾报道质子自杀法在筛选大肠杆菌产酸缺陷型菌株的研究结果, 通过此筛选模型获得了产乙酸、产乳酸、产琥珀酸等类型的突变株。质子自杀指的是溴离子和溴酸根离子在有质子(H⁺)

* 通讯作者: ✉ tianhome@cau.edu.cn

收稿日期: 2008-12-21; 接受日期: 2009-03-09

参与的反应条件下反应生成单质溴(Br₂), 具体反应式如下:



而单质溴对菌体细胞具有致命的毒害作用, 故而把这种方法称为质子自杀^[3,4]。从上可知形成 H⁺ 越少, 也就是产酸越少的细胞就越有可能在含 Br⁻-BrO₃⁻ 的培养基里存活下来, 所以可以认为越是能在高浓度 Br⁻-BrO₃⁻ 环境下生长的菌株, 就越是产酸少的突变株。

1 材料和方法

1.1 菌种

出发菌株为产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) M5a1, 中国农业大学微生物与免疫学系生物固氮研究室保藏。

1.2 培养基^[4]

种子培养基(1 L): K₂HPO₄ 3.4 g, KH₂PO₄ 1.3 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, MgSO₄ 0.2 g, 酵母粉 1.0 g, 甘油 10 g, 葡萄糖 10 g, 铁溶液 2.0 mL, 微量元素溶液 1.0 mL。

发酵培养基(1 L): K₂HPO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, MgSO₄ 0.2 g, 酵母粉 1.0 g, 甘油 45 g, 铁溶液 1.0 mL, 微量元素溶液 1.0 mL。

Rich broth 培养基(1 L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 1 g, NaCl 5 g。

固体筛选培养基(1 L): 种子培养基加入 16 g 琼脂粉, 再分别加入 NaBr-NaBrO₃, 使之终浓度为 0.15 mol/L、0.16 mol/L 和 0.17 mol/L, 磷酸调节 pH 值到 6.0, 其中 NaBrO₃ 溶液单独灭菌。

摇瓶筛选培养基(1 L): 发酵培养基加入 5 g 琥珀酸钠。

铁溶液(1 L): FeSO₄·7H₂O 5 g, HCl(37%) 4 mL。

微量元素溶液(1 L): ZnCl₂ 70 mg, CuCl₂·2H₂O 20 mg, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, NiCl₂·6H₂O 25 mg, H₃BO₃ 60 mg, Na₂MO₄·2H₂O 35 mg, CoCl₂·2H₂O 0.2 g。

以上培养基 pH 值除特别注明外, 皆调节为 7.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 诱变

取隔夜培养菌液 1.5 mL 分装于 3 个 2 mL 灭过菌的小离心管中, 离心, 弃上清, 重悬于 1.5 mL 新鲜种子培养基。向以上 3 管菌液中各加入 50 μL 饱

和 NTG 溶液, 混匀, 置于 37°C 水浴, 分别培养 30 min、60 min、90 min, 然后离心, 弃上清, 用无菌水洗涤 3 次后重悬于 1 mL 无菌水中。

1.4 筛选

1.4.1 平板初筛: 将所得菌液各取 100 μL 涂于含不同浓度 NaBr-NaBrO₃ 的固体筛选平板, 37°C 暗箱培养 48 h, 取长势良好的单菌落, 再一次在含相同浓度 NaBr-NaBrO₃ 的平板上培养, 以获得具有遗传稳定性的突变株。

1.4.2 摇瓶复筛: 摇瓶培养在 300 mL 三角瓶中进行, 装液量为 60 mL, 以无菌牙签蘸菌泥掷入三角瓶接种, 在 180 r/min, 37°C 条件下培养。48 h 后, 取 50 μL 菌液在含 0.17 mol/L NaBr-NaBrO₃ 的平板上培养, 以检验突变株的遗传稳定性, 同时取样做组份分析。

1.5 自动发酵罐培养

发酵在 L.E. Marubishi 公司 MD-300 型 5 L 自动发酵罐中进行, 装液量为 3 L, 发酵温度为 37°C, KOH 控制罐上 pH 7.0, 接种量为 10%, 采用批式培养方法, 初始甘油浓度为 43.5 g/L。发酵过程中采用微好氧培养, 根据罐上情况适时调整其搅拌转速和通气量。

1.6 分析

1.6.1 产物分析^[5]: 发酵液中的甘油、乳酸、琥珀酸、乙酸、2,3-丁二醇、1,3-丙二醇、乙醇都可以通过 HPLC 测定。检测设备: Waters 高效液相色谱仪, 510 泵, 2414 型示差折光检测器, Aminex HPX-87H 色谱柱。检测条件: 柱温 65°C, 流动相为 0.005 mol/L 的稀 H₂SO₄, 流速为 0.8 mL/min。分析软件: CXTH-3000 色谱工作站。发酵液 12000 r/min 离心 10 min 后取上清, 稀释 50~100 倍后进样, 最后将上述条件下 HPLC 测得各物质的出峰面积利用已测得的峰面积与其浓度所对应的标准曲线进行浓度计算, 最后乘上稀释倍数即得。

1.6.2 酶活性分析^[6]: 细菌在 200 mL rich broth 培养基中, 37°C, 振荡培养 12 h, 离心收集菌体;

用 100 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5)悬浮洗涤菌体 2 次;

用 2.5 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5)悬浮菌体, 超声波冰上破碎菌体;

1270×g 离心 1 h, 取上清用于测定酶活。

乳酸脱氢酶反应体系含有: NADH 0.33 mmol/L,

丙酮酸钠 30 mmol/L, 酶液 20 μ L, 磷酸缓冲液补足 1 mL。连续监测反应体系 340 nm 处吸光度的变化可计算出 LDH 的活力。

2 结果与讨论

2.1 菌种初筛结果

经过 NTG 诱变处理的菌液在不同 NaBr-NaBrO₃ 浓度的固体筛选平板上培养, 48 h 后即可见到明显的单菌落, 每个平板内单菌落的数量各有不同, 见表 1。

NaBr-NaBrO ₃ 浓度 NaBr-NaBrO ₃ concentrations (mol/L)	0.15	0.16	0.17
单菌落数 The number of single colony (single colony/plate)	>100	20~40	2~8

收集 0.17 mol/L NaBr-NaBrO₃ 浓度平板上的单菌落 50 个, 在同一浓度的平板上进行 2 次传代后, 获得 44 株具有稳定遗传性的菌株。

运用质子自杀的方法筛选产酸突变株的实验中, 清楚地发现随着 NaBr-NaBrO₃ 含量的增加, 平板上长出来的单菌落也越来越少, 其中的原因在于菌体细胞利用培养基中的碳源生成了有机酸, 有机酸离解出 H⁺, H⁺再与 BrO₃⁻和 Br⁻反应生成单质溴, 进而杀死了细胞, 所以理论上可以认为所得 44 个菌株都是产酸相对较少的突变株。

2.2 菌种复筛结果

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) M5a1 以普通发酵培养基进行摇瓶培养时, 生成的有机酸主要以乙酸为主, 对筛选产乳酸突变株造成不便, 琥珀酸在发酵培养基中的加入能一定程度的改变菌体细胞的产物代谢流向, 引起乳酸产量的大幅增加^[7], 所以对摇瓶筛选培养基进行优化: 加入 5 g/L 的琥珀酸钠。

对所得 44 个突变株在摇瓶筛选培养基中培养, 48 h 时后取样分析, 同时检验其遗传稳定性, 结果显示, 绝大多数菌株的发酵液组相比于亲株都有较大变化, 尤其以 No.9、No.11 和 No.18 3 个菌株变化最大, 见表 2, 它们的乳酸产量分别为亲株的 28.2%、59.5%、50.4%。与此同时, 发酵液中乙酸和

1,3-丙二醇的产量亦大幅上升, 其原因可能与乳酸代谢途径受到影响有关。而 44 个含 0.17 mol/L NaBr-NaBrO₃ 固体筛选平板上也长满了密密麻麻的单菌落, 显示其良好的遗传稳定性。

菌株 Strain	发酵液主要组分浓度 Concentrations of main components in fermentation liquid (g/L)				
	乳酸 Lactic acid	乙酸 Acetic acid	1,3-丙二醇 1,3-Propanediol	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	甘油 Glycerol
No.9	1.83	2.51	8.87	7.55	1.06
No.11	3.86	1.95	7.07	5.89	3.00
No.18	3.27	2.68	7.46	4.86	0.82
Parent strain	6.49	1.88	4.78	5.36	8.48

2.3 突变株乳酸脱氢酶酶活测定结果

乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH, EC1.1.1.27) 又称 NAD 氧化酶, 其催化的反应为: 丙酮酸+NADH $\xrightarrow{\text{LDH}}$ 乳酸+NAD。为了进一步了解以上菌株的产乳酸突变特性, 随后检测了它们的乳酸脱氢酶酶活, 酶活力单位定义为: 最适条件下, 每氧化 1 μ mol 的 NADH 所需要的酶量为 1 个酶活单位(U), 结果见表 3。

菌株 Strain	乳酸脱氢酶酶活 LDH enzyme activity (U/mL)
No.9	162
No.11	188
No.18	196
Parent strain	320

No.9 菌株的乳酸脱氢酶活性最低, 仅为亲株的 50.6%, No.11、No.18 的乳酸脱氢酶活性分别为亲株的 58.8%和 61.3%, 这也许正是这些突变株的乳酸产量大受影响但又依然具备乳酸生成能力的根本原因。

2.4 突变株自动发酵罐上批式培养结果

以亲株为对照, 突变株 No.9 为实验菌株, 在 5 L 自动发酵罐上作不补料批式发酵研究, 初始甘油浓度为 43.5 g/L。发酵过程中初始搅拌转速 300 r/min, 通气为 0.6 vvm, 6 h 后转速调为 450 r/min, 发酵在 21 h~22 h 结束, 测定各项指标, 结果见表 4。

表4 突变株 No.9 和亲株批式发酵结果比较
Table 4 Comparison of batch fermentation results between mutant No.9 and parent strain

菌株 Strain	乳酸 Lactic acid (g/L)	乙酸 Acetic acid (g/L)	1,3-丙二醇 1,3-Propanediol (g/L)	2,3-丁二醇 2,3-Butanediol (g/L)	甘油 Glycerol (g/L)	生物量 Biomass (OD_{600})	发酵时间 Time (h)
No.9	0.36	9.0	21.2	4.6	0	10.1	22
Parent strain	4.8	5.1	11.5	4.2	0.3	8.9	21

自动发酵罐上的发酵培养相比于摇瓶能够提供更优的溶氧和 pH 环境,同时也排除了琥珀酸对发酵结果的影响,所以以上发酵结果更能反映突变株 No.9 的本来特性,从克雷伯氏菌发酵甘油的代谢图可知,需要消耗还原力 $NADH_2$ 才能生成乳酸的合成途径受阻,乳酸和乙酸共同的前体物质丙酮酸势必更多的流向乙酸合成途径,导致发酵产物中乙酸的增多^[5]。另外乙酸的生成并未消耗 $NADH_2$, 反之,生成一个乙酸分子的同时产生两个 $NADH_2$ 分子,这对需要消耗 $NADH_2$ 才能生成 1,3-丙二醇的合成途径来说是极为有利的,所以乳酸合成途径受阻导致乙酸和 1,3-丙二醇产量增加。

3 结论

以产酸克雷伯氏菌为出发菌株,经 NTG 诱变处理,在含 0.17 mol/L NaBr-NaBrO₃ 的固体培养基上选出 44 个单菌落,在添加 5 g/L 琥珀酸钠的培养基中进行摇瓶发酵复筛,获得 3 株较为显著的产乳酸突变株,其中一株的乳酸脱氢酶活性仅为亲株的 50.6%,对其在 5 L 自动发酵罐上进行初始甘油浓度为 43.5 g/L 的批式发酵,结果显示较亲株而言,突变株的乳酸产量从 4.8 g/L 降至 0.36 g/L,而乙酸,1,3-丙二醇的产量则分别由 5.1 g/L、11.5 g/L 增加到 9.0 g/L 和 21.1 g/L。

实验结果表明:对于产酸克雷伯氏菌而言,以合适 NaBr-NaBrO₃ 浓度为关键的质子自杀法初筛,结合以增强乳酸合成代谢为目标的培养基优化后的

摇瓶复筛模型,能快速有效地筛选到产乳酸突变株。此模型不仅对筛选产乙酸,产琥珀酸突变株有借鉴意义,而且对于筛选高产 1,3-丙二醇突变株也有重要的参考价值。

参考文献

- [1] 王剑锋, 修志龙, 刘海军, 等. 克雷伯氏菌微氧发酵生产 1,3-丙二醇的研究. 现代化工, 2001, 21(5): 28-31.
- [2] 王宝光, 刘 铭, 杜晨宇, 等. 微生物法生产 1,3-丙二醇过程的代谢工程研究进展. 过程工程学报. 2006, 6: 144-149.
- [3] Jeffery W, Winkelman, David PC, *et al.* Proton suicide: general method for direct selection of sugar transport-and fermentation-defective mutants. *J Bacteriol*, 1984, 160: 687-690.
- [4] Abbad-Andaloussi S, Manginot-Durr C, Amine J, *et al.* Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 4413-4417.
- [5] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, *et al.* Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52: 289-297.
- [6] Tarmy EM, Kaplan NO. Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, 1968, 271: 2579-2586.
- [7] 管桂萍, 王红兵, 田杰生. 琥珀酸对产酸克雷伯氏菌好氧发酵甘油产 1,3-丙二醇的影响. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 14-17.