

积累 PHB 菌种隐藏嗜酸菌 DX1-1 的诱变改良

徐爱玲 张 帅 张燕飞 历 丽 杨 宇* 夏金兰*

(中南大学 生物冶金教育部重点实验室 资源加工与生物工程学院 长沙 410083)

摘 要: 采用紫外线照射和放射性元素钴 60 辐射诱变方法, 对分离纯化的一株可积累聚 β -羟基丁酸酯(PHB)的 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 进行了诱变改良, 以获得 PHB 高产菌。结果显示钴 60 诱变最佳诱变剂量为 100 Gy, 紫外诱变的最佳剂量为 15 W、30 cm、60 s, 紫外诱变的效果比钴 60 诱变的效果好。诱变后筛选得到的一株菌 UV60-3, PHB 含量达到 28.56 g/L, 是原菌株的 1.45 倍, 并且可稳定遗传。对菌株 UV60-3 积累 PHB 的碳氮比进行了探索, 结果显示在碳源浓度 60 g/L, 氮源浓度 30 g/L, C/N 为 3.76 时 PHB 含量最高, PHB 含量达到 30.57 g/L。

关键词: 紫外线, 钴 60, 诱变, 隐藏嗜酸菌, 聚 β -羟基丁酸酯

The Mutagenic Effect on PHB Accumulation of *Acidiphilium cryptum* DX1-1

XU Ai-Ling ZHANG Shuai ZHANG Yan-Fei LI Li YANG Yu* XIA Jin-Lan*

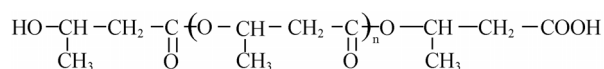
(Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education of China, School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083)

Abstract: The strain *Acidiphilium cryptum* DX1-1 producing PHB was irradiated respectively by UV and Co^{60} to raise PHB production. The results indicated that the effect of UV better than using Co^{60} . One strain of the UV mutagenized called UV60-3 has the highest PHB production yield, showing final PHB concentration of 28.56 g/L, 1.45 times higher than that of original strain. FT-IR spectroscopy analysis shows that the polymers obtained from the strain DX1-1 have the same IR spectra of standard PHB. Further research about the best appropriate C/N ratio of the mutant was done. The optimum ratio of C/N was about 3.76, the final PHB concentration reaches to 30.57 g/L.

Keywords: UV, Co^{60} , Mutagenesis, *Acidiphilium cryptum*, PHB

聚 β -羟基丁酸酯(poly- β -hydroxybutyrate, 以下简称为 PHB)具有良好的生物可降解性, 其分解产物可全部为生物利用, 对环境无任何污染^[1]。PHB 是微生物在碳、氮营养失衡(如碳源过剩、而其它如氮、磷、硫等营养限制)的情况下, 作为其营养和能量物质积累在体内的天然产物, 其分子量在 5000~

1000000 之间^[2]。其结构为:



PHB 除了具有与化学合成高分子相似的性质外, 还具有一般化学合成高分子不具有的性质, 如光学活性好、透氧性低、抗紫外线辐射、生物可降解性、

生物组织相容性、压电性和抗凝血性等, 拥有广阔的应用前景, 越来越受到人们的关注。目前, 国内外许多研究室和科研人员在致力于 PHB 的研究^[3], 但总的来说生产 PHB 的成本较高。为了降低成本, 国外做了许多这方面的工作, 如克隆 PHB 合成基因在大肠杆菌中表达^[4]; 利用核磁共振来研究 PHB 的合成等等^[5]。国内有关 PHB 研究的报道主要见于清华大学、中科院成都生物所和中科院微生物所^[6-8], 山东大学微生物系也偶有 PHB 研究的信息^[9-11]。就国内当前的研究来看, 实验中所研究菌株的 PHB 含量与国外已进行的 PHB 工业化生产的菌株相比, 存在一定差距。

产生 PHB 颗粒或 PHB 类似物的原核生物既有革兰氏阴性菌、也有革兰氏阳性菌^[12], 实验出发菌株(DX1-1)由江西德兴铜矿的酸性矿坑废水中分离得出, 中国典型培养物保藏中心将其定为隐藏嗜酸菌(*Acidiphilium cryptum*), 该菌可在细胞内大量积累 PHB^[13]。本实验采用了紫外线和 Co^{60} 作为物理诱变手段, 选育得到了几株可稳定遗传的正突变菌株, 较原始菌株在 PHB 产量上有较大提高。

1 材料和方法

1.1 菌种

Acidiphilium cryptum DX1-1, 中南大学生物冶金教育部重点实验室从取自江西德兴铜矿的酸性矿坑废水中分离出, 保藏于武汉大学微生物菌种保藏中心, 保藏号为: CCTCC M 208056。

1.2 仪器

透射电镜(Hitachi, H2600), 傅立叶红外(FT-IR)光谱仪(Nexus640, Nicolet, USA), 紫外分光光度计 UV2300 (美国莱伯泰科公司), Co^{60} 诱变设备由湖南农科院提供。

1.3 培养基

9K 基础培养基^[14]: 1000 mL 溶液中包含以下组分: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g。

固体培养基: 9K 基础培养基+1.5%葡萄糖+1%琼脂粉, pH 4.5;

发酵培养基(9K 葡萄糖液体培养基): 9K 基础培养基+6%葡萄糖液体培养基, pH 3.0;

菌株产 PHB 碳氮比培养基: 9K 葡萄糖液体培

养基+不同量硫酸氨, pH 3.0。

1.4 方法

1.4.1 出发菌株生长曲线和 PHB 生产曲线测定: 生长曲线测定采用血球计数板法进行测定^[15]; PHB 含量采用硫酸法测定: 利用浓硫酸在 100°C 加热条件下会分解菌体和菌体内的 PHB, 使其降解为巴豆酸, 巴豆酸在 235 nm 紫外光谱区有吸收峰, 通过紫外分光光度计测定其吸收值, 对照 PHB 标准曲线来判断 PHB 含量^[13]。

1.4.2 菌悬液制备: 菌株在发酵培养基里扩培, 收集对数生长期的菌体, 洗涤, 用 pH 3.0 无菌水制备成菌悬液, 浓度约 10^8 个/mL^[16]。

1.4.3 紫外线照射: 取 10 mL 菌悬液放入 9 cm 平皿中, 磁力搅拌置于 15 W 紫外灯下 30 cm 处进行照射, 照射时间分别为 0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 180 s, 240 s, 做 3 组平行对照。发酵培养基中 30°C 避光培养 36 h。

1.4.4 放射性元素 Co^{60} 辐射: 浓缩菌悬液到浓度 10^{11} 个/mL, 用离心管密封进行诱变。诱变剂量分别为 0 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy, 200 Gy, 250 Gy, 发酵培养基中 30°C 培养 36 h。

1.4.5 致死率测定: 将菌液稀释至 10^6 、 10^5 、 10^4 涂平板, 根据长出菌体数量计算致死率。同时采用镜检计数的方法辅助测定致死率。

1.4.6 诱变菌株初筛: 将 1.4.2 和 1.4.3 得到的菌液, 分别稀释到 10^6 、 10^5 、 10^4 涂在固体培养基上, 30°C 培养箱中培养 48 h, 挑取较大的菌斑接液体培养基, 选取生长较快, 相同体积菌液 PHB 积累量较高的菌株进行复筛。

1.4.7 诱变菌株复筛: 在相同条件下, 以细胞量和 PHB 含量变化为指标, 将原菌株和经过初筛的优良菌株分别接入 20 mL 液体培养基中, 每 8 h 取样, 测定细菌总量和 PHB 含量, 绘制生长曲线和 PHB 含量曲线。

1.4.8 稳定性检测: 诱变菌株连续传 8 代, 测定每一代的细胞量和 PHB 含量, 比较其变化。

1.4.9 诱变优势菌种积累 PHB 所需氮源量的检测: 采用 9K 葡萄糖液体培养基, 改变硫酸铵的终浓度, 使其分别为 3 g/L, 10 g/L, 30 g/L, 60 g/L, 培养 80 h 后测定 PHB 含量。

1.4.10 胞内聚合物颗粒成分变化的分析: 用红外光谱法。

2 结果与分析

2.1 出发菌 DX1-1 生长和 PHB 积累

透射电子显微镜结果显示细胞内存在大量颗粒, 初步鉴定为 PHB 颗粒^[13]。出发菌于发酵培养基摇瓶培养, 每 12 h 取样, 测定细菌和 PHB 含量, 做平行实验取平均值, 绘制生长曲线, 所得结果如图 1 所示。

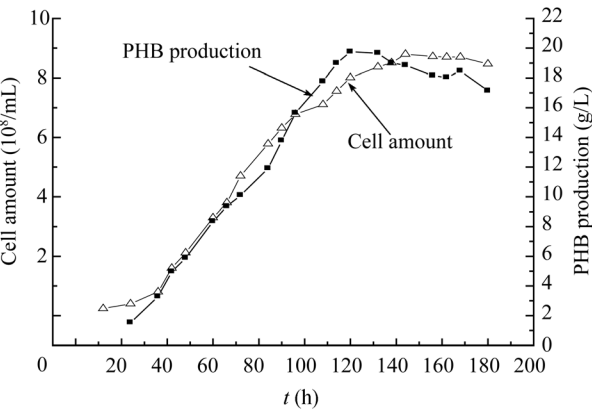


图 1 DX1-1 生长和 PHB 产量曲线
Fig. 1 Cell growth &PHB production curves

结果表明, 该菌株在前 24 h 处于延滞期, 24 h 后进入对数生长期, 同时 PHB 开始积累, 稳定期细胞量和 PHB 积累为最大, 即该菌的 PHB 积累与菌体细胞的生长是同步的, 属于一步发酵类型^[17]。120 h 时 DX1-1 的细胞量为 8×10^8 个/mL, PHB 产量为 19.75 g/L。

2.2 紫外线诱变

将照射后的菌悬液分别稀释, 涂布于固体培养基平板上进行培养, 根据菌斑的数量计算致死率, 发现紫外线照射的致死率随照射时间的增加而增加, 照射时间和致死率如表 1 所示。

从照射时间不同的平板上分别随机挑取 30 个菌落进行发酵培养并测定细菌量和 PHB 产量。以细胞量高于 9×10^8 个/mL, PHB 含量高于 19.75g/L 的为正突变株, 其中, 照射 60 s 后存活的编号为 UV60-3 菌株产量最高, 细胞量为 9.5×10^8 个/mL, PHB 含量为 28.56 g/L, 符合正突变指标, 并且可稳定遗传(见表 2)。对其进行发酵培养, 测定其生长曲线和 PHB 积累曲线, 结果见图 2。

表 1 紫外线诱变结果
Table 1 The result of UV mutated strain

| 诱变时间 Radiation time(s) | 致死率 UV kill rate (%) | 挑选菌株数(株) Number of colony(Strain) | 正突变株数(株) Number of positive mutated colony (Strain) | 正突变率(%) Positive mutation rate (%) |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| 30 | 50 | 30 | 2 | 6.7 |
| 60 | 75 | 30 | 5 | 16.7 |
| 120 | 98 | 30 | 3 | 10 |
| 180 | 99 | 30 | 0 | 0 |
| 240 | 100 | 0 | — | — |

表 2 UV60-3 稳定性遗传结果
Table 2 The genetic stability of UV60-3

| 代数 Generation number | PHB 最高产量(g/L) The highest production of PHB(g/L) | PHB 积累达最大量时的时间 The time of PHB accumulation (h) |
|-------------------------|---|--|
| 1 | 25.23 | 75 |
| 2 | 27.34 | 83 |
| 3 | 29.21 | 85 |
| 4 | 27.93 | 76 |
| 5 | 28.42 | 81 |
| 6 | 28.56 | 80 |

通过比较原菌株和诱变后 UV60-3 的生长及 PHB 产量曲线, 可以看出 UV60-3 进入对数期的时间明显缩短, 相同体积 PHB 含量达到最高值的时间

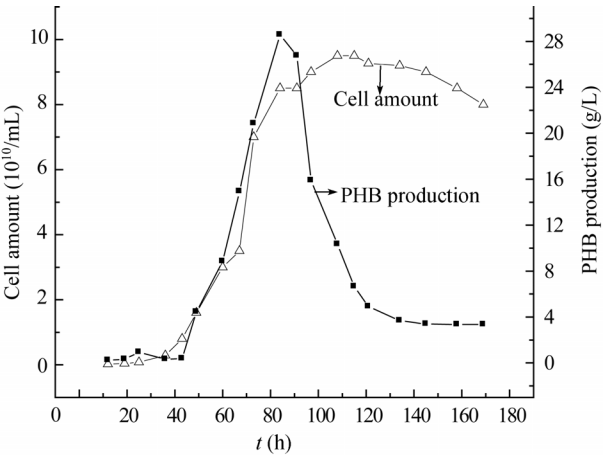


图 2 UV60-3 生长和 PHB 产量曲线
Fig. 2 UV60-3 growth &PHB production curves

也大大缩短, 大约在培养 80 h 后达到峰值, 比原菌株提前了 40 h, 同时在细胞内积累时间减少, 并迅速降低。原因可能是紫外线照射导致的 DNA 突变提高了菌株 PHB 代谢途径中的某些降解酶的活性。

2.3 Co^{60} 诱变作用

Co^{60} 辐射剂量和致死率关系见表 3。结果表明, Co^{60} 照射的致死率随辐射剂量的增加而增加, 在 200 Gy 的实验照射剂量中, 能得到最多数量的正突变菌株。

从 Co^{60} 辐射剂量不同的平板上分别随机挑取 30 个菌落进行摇瓶液体培养, 选出单位体积 PHB 积累量较高的 11 株进行复筛, 经过辐射的菌株比原菌

株进入对数期的时间有明显缩短, PHB 含量有所提高, 但是这一突变并不能稳定遗传, 经过 3~4 次传代后产量基本恢复到原菌株情况, 可能是 Co^{60} 辐射对细胞生长具有刺激作用, 使该菌的初级代谢旺盛, 加快了细胞增殖速率^[18], 但对细菌 DNA 分子的结构没有造成或造成较小的改变, 所以很快得到了修复, 并没有从根本上促进 PHB 的合成。

2.4 诱变菌积累 PHB 的碳氮比

诱变菌株 UV60-3 积累 PHB 的最佳葡萄糖浓度为 15 g/L, 硫酸铵浓度 30 g/L, 即 C/N 为 3.76 (碳源氮源中碳氮两种元素所占质量比)时, PHB 积累量最大, 可以达到 30.57 g/L(结果见表 4)。

表 3 Co^{60} 诱变结果
Table 3 The result of Co^{60} mutated strain

| 诱变剂量 Radiation dosage (Gy) | 致死率 UV kill rate (%) | 挑选菌株数(株) Number of colony (Strain) | 正突变株数(株) Number of positive mutated colony (Strain) | 正突变率 Positive mutation rate (%) |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|------------------------------------|
| 50 | 60 | 30 | 1 | 3.3 |
| 100 | 68 | 30 | 2 | 6.7 |
| 150 | 78 | 30 | 3 | 10 |
| 200 | 80 | 30 | 5 | 16.7 |
| 250 | 100 | 0 | — | — |

表 4 UV60-3 硫酸铵浓度与 PHB 产量
Table 4 PHB production of UV60-3 using different nitrogen concentration

| 硫酸铵浓度 Concentration of ammonium sulfate (g/L) | 3 | 10 | 30 | 60 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| PHB 产量 Production of PHB (g/L) | 28.56 | 29.22 | 30.57 | 25.39 |

出发菌 DX1-1 的最适 C/N 为 37.2, 葡萄糖浓度为 60 g/L, 氮源浓度 3 g/L 时, PHB 积累量最大, 为 19.56 g/L, 与 DX1-1 相比 UV60-3 对氮源浓度要求增加, 但是过大的氮源浓度会抑制细菌生长^[17]。

2.5 红外光谱分析 PHB 成份

提取 PHB, 以 PHB 标准品(Sigma-Aldrich, USA)为参照, 分别对提取物和标准品进行了红外光谱分析。红外光谱分析结果如图 3 所示, 在 1724 cm^{-1} 处存在羰基($\text{C}=\text{O}$)振动, 3436 cm^{-1} 处存在含 O-H 伸缩振动, 2976 cm^{-1} 、 2935 cm^{-1} 、 2874 cm^{-1} 处存在 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}$ 振动, 这些都是 PHB 的特征峰; 此外在 1058 cm^{-1} ~ 1287 cm^{-1} 间存在大量 C-O 振动, 为聚酯的特征峰。此图与标准品的几乎完全相同。说明诱

变后, 胞内聚合物的依然是 PHB。

3 讨论

实验室前期采用 ARDRA(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)技术, 对我国多个硫化矿区酸性矿坑废水(Acid Mine Drainage, AMD)进行了微生物群落分析, 并分离出 *Acidiphilium cryptum* DX1-1, 该菌的 16S rRNA 基因序列登录号为 DQ168464^[13]。该菌既可以氧化低价态硫获取能量进行自养生长, 又可以利用有机质进行异养生长。同时, 发现该菌异养生长时, 不仅生长迅速, 而且胞内能产生大量聚合物颗粒, 该聚合物经红外和紫外光谱检测证实为 PHB, 具有进一步开发成 PHB 新型生产菌的潜力。为了提高 PHB 的产率, 我们采用了紫外线和 $\text{Co}^{60}\gamma$ 射线诱变的方法对菌种进行诱变筛选, 并对改良后的菌株进行了发酵条件的探索。

紫外诱变是一种有效的育种方法, 越来越受到人们的关注。本实验表明紫外诱变的最佳剂量为在距离 15 W 紫外灯 30 cm 处照射 60 s, 即致死率在 70%~80%诱变效果最佳, 这与祁红兵等人^[18]的报道

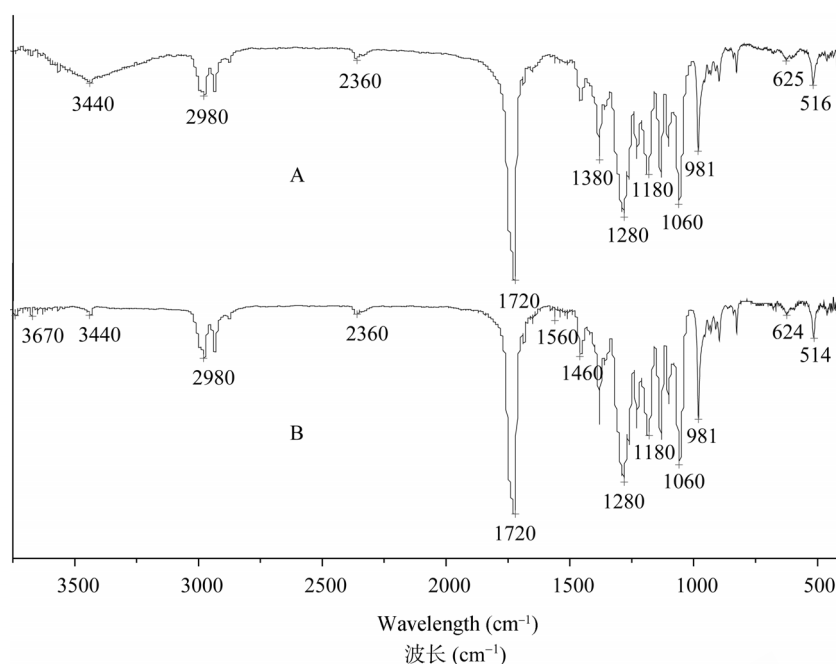


图3 红外吸收光谱

Fig. 3 Fourier transform infrared spectroscopy

注：A: UV60-3 菌株胞内 PHB; B: 标准品 PHB

Note: A: Extraction of UV60-3; B: Standard

相吻合。紫外诱变的方法可以提高 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 的 PHB 积累量,得到的菌株 UV60-3 在适宜的 C/N 条件下最终积累 PHB 的量可达到 30.57 g/L, 比出发菌的产量 19.6 g/L 有了明显提高。Bormann EJ^[19]等人报道利用 *Ralstonia eutropha* 菌生产 PHB 的最大积累量可达到 38.2 g/L, 与此相比 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 积累 PHB 的量并不算高, 这主要是由于该菌的菌浓比较低造成的。但是前者有利用蛋白水解产物作为碳源, 而 DX1-1 利用葡萄糖就可以积累 PHB, 因此该菌在 PHB 生产中也有一定的优势。放射性元素 Co^{60} 对菌株 DX1-1 的诱变实验能提高 PHB 的积累, 最佳诱变剂量为 200 Gy, 即致死率在 80% 左右时诱变效果最好。但是 Co^{60} 诱变的效果在菌株 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 中并不能稳定遗传。因此就 *Acidiphilium cryptum* DX1-1 而言, 紫外诱变比 Co^{60} 诱变的效果好。

通过比较诱变前后菌株的特性变化可以发现 UV60-3 对氮源的需求量增加, 由原来的 3 g/L 提高到 30 g/L。菌株 DX1-1 生长和代谢速率加快, 周期缩短, PHB 产量也显著提高。这是由于起始时培养基中高氮源含量会提供菌体生长繁殖充足的能源, 导致细菌生长进入对数期的时间明显缩短。由于单

位体积的细胞量迅速增加并超过了氮源浓度为 3 g/L 时的细胞量, 所以单位体积的 PHB 含量也明显增加。PHB 是微生物在碳、氮营养失衡(如碳源过剩、而氮营养限制)的情况下, 积累在体内的天然产物, 所以当氮的含量高过 30 g/L 时反而不利于 PHB 的积累。另一方面盐度升高会影响细菌的生长, 使单位体积细胞的数量降低, 直接影响单位体积 PHB 的积累量。诱变后 PHB 积累量达到最大值后迅速降低, 如图 3 所示。这可能是诱变促使原菌株 PHB 降解酶在胞内 PHB 达到一定量时大量表达或活性增加所致。

目前的研究还没涉及基因或蛋白表达差异, 所以上述的结论还不能从基因和蛋白的水平得到证实。有待于进一步从生物化学与分子生物学的角度进行分析^[20], 以期阐明 *Acidiphilium* 属菌积累 PHB 的机理, 并找到相关基因或蛋白。

参 考 文 献

- [1] Hånggi UJ. Requirements of bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumers good. *FEMS Microbiology Review*, 1995, 16: 213–220.
- [2] Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of

- poly(β -Hydroxyalkanoates): from DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, **63**(1): 21–53.
- [3] Rytff ID. Phymersynthesis by microorganism: technology- and economerics. *Trend In Biotechnology*, 1987, **5**: 246–248.
- [4] Schubert P. Cloning of the *Alcallgenes eutroghus* genes for synthesis of Poly- β -Hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1988, **12**: 5837–5847.
- [5] 钱新民, 王宇新, 常 钟. 球形杆菌积累聚 β -羟基链烷酸(PHA)的研究. *微生物学报*, 1995, **35** (6): 428–441.
- [6] 宋树铭, 赵树杰. 微生物法制取聚羟基丁酸酯塑料. *科技开发动态*, 1994, **28**(1): 45–46.
- [7] 徐 浩, 江慧修, 周惠玲. 一株具有工业应用潜力的聚 β -羟基丁酸产生菌. *微生物学报*, 1991, **31**(5): 333–337.
- [8] 王 丽, 清水浩. 真养产碱菌由丁酸积累聚 β -羟基丁酸的研究. *微生物学报*, 1993, **33**(1): 48–53.
- [9] 文 欣, 庄国强, 郑士民. 真养产碱菌利用高果糖浆积累聚 β -羟基丁酸的研究. *微生物学报*, 1995, **35**(2): 115–120.
- [10] 刘 欣, 陈 琦. 真养产碱菌利用甜菜糖蜜发酵产聚 β -羟基丁酸的研究. *微生物学通报*, 1994, **21**(2): 71–75.
- [11] Flustede E. Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in nonsulphur purple bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, **39**: 87–93.
- [12] Misra AK, Thakur MS, Srinivas P, *et al.* Screening of poly- β -hydroxybutyrate -producing microorganisms using fourier transform infrared spectroscopy. *Biotechnology Letters*, 2000, **22**: 1217–1219.
- [13] 杨 宇, 徐爱玲, 张燕飞, 等. 酸性矿坑水中一株兼性菌及其胞内聚合物的分离及表征. *武汉大学学报(自然科学版)*, 2007, **6**(53): 753–758.
- [14] Yang Y, Wang MX, Shi WY, *et al.* Bacterial diversity and community structure in acid mine drainage from Dabaoshan mine China. *Aquatic Microbial Ecology*, 2007, **47**: 141–151.
- [15] 杨 宇, 徐爱玲, 张燕飞, 等. 生物合成材料聚 β -羟基丁酸(PHB)的研究进展. *生命科学研究进展*, 2006, **12**(4): 62–67.
- [16] Hughes A, Mott IEC, Dunnill P. Studies with natural rapeseed and microbially derived polyhydroxybutyrate to simulate extraction of plastic from transgenic material. *Bioprocess Engineering*, 2000, **23**: 257–263.
- [17] Purushothanman M, Anderson RKL, Narayana S, *et al.* Industrial by products as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates-biodegradable plastics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2001, **24**: 131–136.
- [18] 祁红兵, 陈 钧. PHB 高产菌株的选育信阳师范学院学报(自然科学版), 2007, **20**(1): 48–51.
- [19] Bormann EJ, Leissner EM, Roth EM, *et al.* Production of polyhydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* from protein hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, **50**: 604–607.
- [20] 于慧敏, 沈忠耀. 可生物降解塑料聚-羟基丁酸酯(PHB)的研究与发展. *生物化工*, 2001, **8**: 11–14.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材, 两种商品等。