

多轮次胁迫驯化及多因子复合筛选丁醇高产菌

刘小波 罗玮 顾秋亚 余晓斌*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】从陕西省石泉县玉米地土壤中分离获得一株产丁醇菌株并提高其丁醇耐受性和丁醇产量。【方法】采用自行设计的多因子复合筛选方法和丁醇胁迫驯化处理,在获得丁醇高产菌株的同时提高菌株的丁醇耐受性。【结果】野生菌株 D64 经多轮次丁醇胁迫驯化处理和多因子复合筛选,分离获得突变株 T64,其丁醇耐受性明显提高,能在丁醇浓度为 20 g/L 的复合筛选培养基上正常生长,发酵 7% 玉米醪丁醇产量由 13.35 g/L 提高到 15.18 g/L,总溶剂(丙酮、丁醇、乙醇)达到 21.8 g/L。【结论】采用长时间且丁醇浓度呈梯度渐进增加的胁迫驯化方式,可使菌种在丁醇的环境中不断进化并有效地提高菌株对丁醇的耐受性。多因子复合筛选方法较其他单一因子筛选方法更为有效,能较快获得丁醇高产菌。

关键词: 丁醇高产菌,胁迫驯化,多因子复合筛选,丁醇耐受性

Multi-repeat stress acclimation and butanol high-yielding strain screening by multi-factor complex medium

LIU Xiao-Bo LUO Wei GU Qiu-Ya YU Xiao-Bin*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to isolate a butanol-producing strain from the soil of corn field in Shiquan County, Shaanxi Province, China, and to improve its

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21176105); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. JUSRP111A24)

*通讯作者: ✉: xbyu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-02-16; 接受日期: 2012-05-11

butanol tolerance and butanol yield. [Methods] Using the multi-factor complex screening and the treatment of butanol stress acclimation, the strain with a high yield and butanol tolerance was obtained. [Results] The results showed that through several batches of acclimation and screening, the mutant T64 was derived from isolated wild-type strain D64, its butanol tolerance was significantly improved and could grow well in the complex screening medium containing 20 g butanol/L. It produced 21.8 g/L total solvent (acetone, butanol, ethanol) and a butanol yield reached 15.18 g/L using 7% corn mash as fermentation medium, which was higher than that of the wild-type strain D64 (13.35 g/L). [Conclusion] In conclusion, the designed multi-factor complex screening is more effective than the mono-factor screening for obtaining high-producing butanol strain. In addition, the stress acclimation of increasing butanol concentration in long term provides new ideas to research the tolerance of butanol.

Keywords: Butanol high-yielding strain, Stress acclimation, Multi-factor complex screening, Butanol tolerance

由于石油资源的枯竭,利用可再生资源生产能源物质和化工原料越来越受到人们的重视。丁醇是一种优良有机溶剂、重要化工原料和新型生物燃料,广泛应用于橡胶、塑料、树脂、油漆、涂料、医药及国防等工业中,生物法合成丁醇的研究对现代工业具有重要意义^[1]。丙酮丁醇发酵产业曾是仅次于酒精发酵的第二大发酵工业^[2],但从20世纪60年代开始,由于受到化学合成法的冲击,逐渐走向衰落^[3-4]。随着石油资源的大量消耗及其价格的不断攀升,生物丁醇迎来复兴的机遇。英国石油公司(BP)与杜邦公司联手开发、生产和销售新一代生物丁醇,以缓解石油资源枯竭带来的压力,清洁可再生生物能源的开发和利用成为公众关注热点之一^[5]。然而,目前发酵法生产丁醇产量较低,生产成本相对较高,这限制了丁醇发酵产业的发展。Eric P. Knoshaug 等认为丁醇生产菌对丁醇的耐受性是影响其产量的关键因素,大部分丁醇生产菌只能耐受不到14.8 g/L 的丁醇溶液,因此提高菌种对丁醇的耐受能力很可能会提高丁醇的产量^[6]。

Shaoming Mao 等曾通过化学诱变方法获得一株可以在含19 g/L 丁醇的培养基上生长的Rh8

突变菌株,丁醇的产量达到15.3 g/L^[7]。王鑫昕等根据一般胁迫反应的原理,分别从溶剂污染区域、油田以及盐湖土壤中分离到几株高浓度丁醇耐受型菌株,其中一株耐受丁醇浓度最高可达20 g/L^[8]。研究表明在丙酮丁醇梭菌发酵生成的产物中,丁醇对细胞的毒性最强,当发酵液中丁醇浓度达到11 g/L 时,细胞的生长就会受到抑制,细胞开始产生芽孢并停止丁醇的合成^[9]。因此筛选能耐受高浓度丁醇且高产丁醇的优良菌株是解决目前生物丁醇产量低、生产成本高的有效方法之一。本文从自然界中筛选获得一株高产丁醇菌株,采用丁醇胁迫驯化的方法,结合多因子复合筛选技术,提高其对丁醇的耐受性,进一步增加丁醇产量,为丁醇发酵提供菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 菌种

产丁醇菌 D63、D64、D65、R2,从石泉县玉米地土壤中分离筛选获得。

丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* CICC8016,购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基: 马铃薯茎块。

1.2.2 分离纯化培养基(TYA 改进培养基)(g/L): 可溶性淀粉 30, 葡萄糖 20, 酵母膏 2, 胰蛋白酶 6, 乙酸铵 3, K_2HPO_4 0.50, KH_2PO_4 0.50, $MgSO_4$ 0.20, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 琼脂 20, 水 1 000 mL, pH 6.5–7.0, 1.0×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2.3 复合筛选培养基: TYA 改进培养基加入刃天青(质量浓度为 0.002%), 1.0×10^5 Pa 灭菌 30 min 后, 加入正丁醇(最终浓度为 14–20 g/L)。

1.2.4 发酵培养基: 质量浓度为 7% 的玉米糵。

1.3 菌种分离与筛选

1.3.1 热处理与富集培养: 将马铃薯切成大小为 0.5 cm 左右小块, 先添加少量马铃薯于厌氧试管底部, 挖取 3–5 g 混合均匀的土样装入厌氧试管, 再加入马铃薯小块至试管体积的 2/3, 使土样夹在中间。将浓度为 12 g/L 的正丁醇溶液注入厌氧试管中(抑制或杀死不产丁醇的杂菌), 使马铃薯和土样完全浸泡于溶液中, 盖上橡皮塞。最后, 将试管置于沸水浴中, 热处理 30 s, 淘汰土样中不产芽孢杂菌, 冷却后于 38 °C 恒温箱培养。

1.3.2 分离纯化: 丁醇产生菌在生长过程中一般都会生成气体副产物, 将固体培养基顶起形成醪盖^[10]。根据这一原理, 挑取富集培养后明显产气的厌氧试管, 用灭过菌的 1 mL 移液管插入到试管底部吸取 0.5 mL 培养液。稀释涂布在分离纯化培养基平板上, 置于 38 °C 恒温厌氧培养至长出单菌落。

1.3.3 初筛: 利用淀粉水解能力越强的菌株, 产生的淀粉酶活力较高, 可将分离纯化培养基中的可溶性淀粉水解而形成透明圈^[11]。挑选平板中透明圈大的单菌落接种至玉米糵发酵培养基, 38 °C 厌氧发酵 72–96 h, 测定发酵液中丁醇的产量。

1.3.4 复筛(遗传稳定性): 将初筛得到的产量较

高的菌株发酵液原液涂布于复合筛选培养基平板, 复合培养基中刃天青浓度保持不变, 正丁醇的起始浓度为 14 g/L。38 °C 恒温厌氧培养至长出单菌落, 挑选长势良好、健壮、淀粉透明圈和刃天青褪色圈大的单菌落接入 7% 玉米糵的厌氧试管(总体积 25 mL, 装液量 18 mL)中, 38 °C 厌氧发酵 72–96 h 后, 测定发酵产物的产量, 并连续传代多次, 测定每一代发酵产物产量。

1.4 胁迫驯化与多因子复合筛选

1.4.1 驯化温度的选择和丁醇溶液浸泡处理: Baer S. H. 等曾研究了不同丁醇浓度下温度对梭菌细胞膜中脂肪酸变化的影响, 结果表明温度在 22 °C 和 37 °C 时, 细胞膜内的不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸将迅速发生变化, 细胞会启动胁迫反应机制并通过改变细胞膜中脂肪酸的比例等方式来适应这种不良环境^[12], 37 °C 丁醇对细胞的毒性要远大于 22 °C 丁醇对细胞的毒性。38 °C 是丁醇菌生长和发酵的最适温度, 因此本文采用 38 °C 作为整个驯化过程中的温度条件, 既可大量淘汰掉 38 °C 条件下不耐受丁醇的菌株, 又可减少因驯化温度与菌种生长、发酵温度不一致对试验造成的影响。取复筛后丁醇产量较高菌株的发酵液 0.5 mL 于装有 4.5 mL 起始丁醇浓度为 15 g/L 丁醇溶液的试管中, 摇匀密封, 静置在 38 °C 的恒温培养箱内, 浸泡处理 1 个月。

1.4.2 丁醇胁迫驯化方法: 取 15 g/L 丁醇浸泡 1 个月后的菌液, 涂布于对应丁醇浓度的复合筛选培养基平板上, 38 °C 下恒温厌氧培养至长出单菌落, 挑取淀粉透明圈和刃天青变色圈大的单菌落接入发酵培养基, 38 °C 下厌氧发酵 72–96 h, 测发酵液中丁醇等产物的产量。取产量较高菌株发酵液涂布于复合筛选培养基, 培养基中同一个丁醇浓度重复做 3 代, 再逐步提高复合筛选培养基中丁醇的浓度, 直到达到抑制其生长的下一个丁

醇浓度阈值(18、20 g/L)后,再采用该浓度的丁醇溶液浸泡处理即下一轮次的丁醇胁迫定向驯化。通过长时间且丁醇浓度呈梯度渐进增加的驯化方式,可使菌种在一个有丁醇的环境不断进化,最终适应高浓度丁醇的生存环境。

1.5 测定方法

使用GC-2010气相色谱仪测定产物组成和含量^[13]。色谱柱:DB-FFAP(30 m×0.32 mm×1 μm);检测器:FID(250 °C);进样温度:240 °C;柱温:90 °C;氮气:25 mL/min;氢气:40 mL/min;空气:45 mL/min;采用内标定量法,内标物:异丁醇。

2 结果与分析

2.1 分离与初筛

经过热处理、富集培养和分离纯化获得9株丁醇生产菌,其中D63、D64、D65、R2四株菌的淀粉酶活力较高,能在分离纯化培养基平板上产生较大的淀粉水解圈,如图1所示。

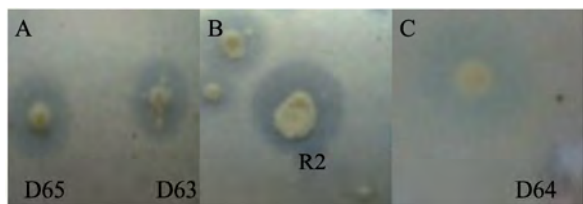


图1 4株菌在淀粉平板38 °C厌氧培养48 h菌落形态及形成的淀粉水解圈

Fig. 1 Clear zones and colony morphologies of the four strains cultured on the soluble starch plate at 38 °C for 48 hours

将分离纯化得到的D63、D64、D65和R2四株淀粉酶活力较高的菌接种到7%的玉米糵发酵培养基,38 °C恒温厌氧发酵92 h后,丁醇、丙酮、乙醇及总溶剂的产量见表1。

由表1可以看出,4株菌发酵玉米糵,丁醇产量均在12.5 g/L以上,总溶剂均超过20 g/L,丁

醇占总溶剂比例平均值为64%,与文献报道的ABE发酵丙酮:丁醇:乙醇=3:6:1(W/W/W)的比例较接近^[9]。

2.2 复筛

将初筛得到的产量较高的D64、R2和D63三株菌的发酵液原液分别涂布于复合筛选培养基平板上,复合培养基中刃天青浓度保持不变,正丁醇的起始浓度为14 g/L。38 °C恒温厌氧培养至长出单菌落,挑选长势良好、健壮、淀粉水解透明圈和刃天青褪色圈大的单菌落接入发酵培养基发酵。将3株菌分别传代30次,其中D64菌株的产量较其他两株菌更为稳定。再将复筛得到的D64菌株与D63、R2和CICC8016菌株在相同的培养条件,发酵7%的玉米糵,进行对比试验,结果见表2。

由表2可知,同等条件下发酵,8016菌株的丁醇产量只有10.68 g/L,总溶剂为16.58 g/L;而D64菌株的丁醇产量达到13.51 g/L,总溶剂达到20.55 g/L,丁醇和总溶剂的产量分别要比CICC8016菌株高出近3 g/L和4 g/L。说明菌株D64优于CICC8016菌株,同时在丁醇的产量上也高于另外两株菌。

2.3 丁醇胁迫驯化与复合筛选

关于提高菌株丁醇耐受性的研究较多,但大多是将菌种涂布于含丁醇的平板培养基中,挑选可耐受所添加丁醇浓度的生长菌株。对D64菌株也曾做过类似的处理,但其丁醇产量和耐受性并未得到有效提高。因此,可考虑对野生菌D64采取逐级提高丁醇浓度驯化处理方法,从丁醇浸泡浓度15 g/L的起始胁迫驯化浓度,提高到18 g/L,再提高到20 g/L,通过3轮次胁迫驯化,结合复合筛选技术,获得了最佳菌株T64,每轮次驯化后其溶剂产量见表3。

表 1 分离菌株发酵玉米醪产丙酮、乙醇和丁醇的比较
Table 1 Comparison of ABE (acetone, butanol, ethanol) production by the isolates

菌株 Strains	丙酮 Acetone (g/L)	乙醇 Ethanol (g/L)	丁醇 Butanol (g/L)	总溶剂 ABE (g/L)	丁醇比 Butanol proportion (%)
D63	5.02	2.11	12.91	20.05	64.38
D64	5.34	2.65	13.35	21.34	62.56
D65	5.22	2.09	12.74	20.05	63.53
R2	4.91	2.17	13.04	20.11	64.83

表 2 D64 菌株与 D63、R2 和 8016 菌株发酵结果的比较
Table 2 ABE production of D64 compared with that of D63, R2 and 8016

菌株 Strains	丙酮 Acetone (g/L)	乙醇 Ethanol (g/L)	丁醇 Butanol (g/L)	总溶剂 ABE (g/L)	丁醇比 Butanol proportion (%)
CICC8016	5.12	0.78	10.68	16.58	64.41
D64	5.34	1.71	13.51	20.55	65.73
D63	4.79	2.08	12.44	19.31	64.42
R2	4.96	2.55	12.99	20.51	63.35

表 3 不同丁醇浓度浸泡驯化处理后发酵结果的比较
Table 3 Comparison of ABE production with different butanol concentration immersion

丁醇处理浓度 Treatment of butanol concentration (g/L)	丙酮 Acetone (g/L)	乙醇 Ethanol (g/L)	丁醇 Butanol (g/L)	总溶剂 ABE (g/L)	丁醇比 Butanol proportion (%)
0	5.34	1.71	13.51	20.55	65.73
15	5.06	2.29	13.82	21.17	65.27
18	5.22	1.82	14.16	21.20	66.78
20	5.11	1.51	15.18	21.80	69.62

根据表 3 可知, 通过逐级提高丁醇浸泡驯化浓度, 丁醇的耐受性也得到逐级提高, 从 15 g/L 提高到 20 g/L, 同时丁醇、总溶剂和丁醇比都有相应的提高。所设计的驯化方法能使菌株在逐级提高丁醇浓度的环境胁迫下, 不断实现“人工进化”, 同时通过多因子复合筛选方法, 又可淘汰大量的负突变菌株, 获得高产丁醇和高浓度丁醇耐受性的优良菌株。

2.4 驯化前后菌落形态和发酵性状比较

在 38 °C 恒温厌氧培养条件下, 比较 D64 和 T64 两株菌在含有 20 g/L 的复合筛选培养基上的生长情况。驯化前, D64 菌株在丁醇浓度为 20 g/L

的复合筛选培养基上需要 6 d 才能长出单菌落, 而且长出的菌落数量较少(约 15 个/平板), 菌落较瘦小; 驯化后, 所获得的突变株 T64 菌株在丁醇浓度为 20 g/L 的复合筛选培养基上只需要 3 d 就可以长出饱满又健壮的单菌落, 菌落颜色为乳白色, 菌落数量(200 个左右/平板)明显多于驯化前, 具体情况如图 2 所示。结果表明, 驯化后的突变株 T64 不仅能在高浓度丁醇的平板上正常生长, 而且菌落长出时间比野生菌 D64 缩短了近一倍, 长出的菌落数量约为野生菌株 D64 的 100 倍。这说明通过长时间反复驯化, T64 菌株对丁醇的耐受性得到明显提高。

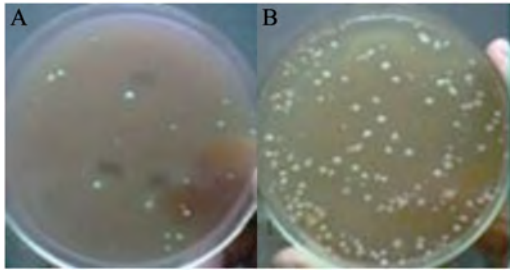


图 2 两菌株在丁醇浓度 20 g/L 复合筛选培养基上生长情况

Fig. 2 Growth of strains in the complex screening medium containing 20 g/L butanol

注: A: D64; B: T64.

Note: A: D64; B: T64.

比较驯化前 D64 菌和驯化后 T64 菌对 7% 玉米糨的利用情况, 如图 3 所示。D64 菌发酵 7% 的玉米糨, 产生大量的气体, 有大量的醪盖生成, 发酵周期一般在 72 h; 驯化后, 突变菌株 T64 发酵比较缓慢, 产生的气体明显减少, 生成的醪盖不明显, 发酵周期延长至 96 h。驯化后突变株 T64 对玉米糨的液化程度较驯化前更加充分, 残留发酵固形物干重较驯化前明显减小。由表 3 可知, 3 轮次驯化后, 最终丙酮和乙醇的产量有所降低, 而丁醇的产量达到 15 g/L 以上, 比驯化前提高了将近 2 g/L, 丁醇比提高了近 4%, 驯化后总溶剂达到 21.8 g/L, 比驯化前提高了 1.3 g/L。



图 3 驯化前后两株菌液化玉米糨情况的比较

Fig. 3 Liquefaction of corn mash by the two strains

注: 从左到右依次为未发酵 7% 玉米糨、D64 和 T64 发酵液。

Note: It is the mash of 7% corn, D64 and T64 from left to right.

驯化后, 突变株 T64 对玉米糨的利用更充分, 发酵周期比驯化前有所延长。一方面, Shaoming Mao 等认为高产丁醇突变株发酵周期较野生菌株长的原因在于突变株会在发酵的后期产生更多的丁酸从而导致 pH 下降抑制了菌株生长^[7]。另一方面, 驯化前的野生菌 D64 对丁醇的耐受性较驯化后的突变菌 T64 低, 所以当发酵液中丁醇浓度达到 13.51 g/L 时, 发酵较早停止。而驯化后的突变株 T64 对丁醇的耐受性比原始菌株更高, 当发酵液中丁醇达到此浓度时还可以缓慢地利用剩余的玉米糨继续发酵直到丁醇浓度达到 15.18 g/L 后, 发酵才停止, 因此发酵周期较发酵驯化前有所延长而产量却有所升高。

3 讨论

一直以来, 高产丙酮丁醇菌的筛选缺少一种较为有效的方法。文献曾报道的方法主要有采用刃天青平板褪色反应检测还原力^[14], 丁醇平板检测丁醇耐受性^[15], 可溶性淀粉平板测定淀粉的利用能力^[11], 但这些方法都只能筛选到某一方面性状较优的菌株, 并不一定能筛选获得高产丁醇菌株。靳孝庆等首次根据丙酮-丁醇发酵代谢途径中先产酸后产溶剂及高活力厌氧发酵细胞具有较强还原力的特点, 设计了溴甲酚绿和刃天青两种筛选平板, 筛选得到较高还原力的菌株, 但丁醇的产量只有 13 g/L 左右^[14]。本实验设计了丁醇-刃天青-生淀粉三因子复合筛选平板, 通过判断淀粉水解透明圈、刃天青褪色圈的大小及菌落大小, 为筛选淀粉利用能力强、高还原力、高丁醇耐受性的高产丁醇优良菌株提供了一个有效的方法和思路。

通过对土壤中分离获得的产丁醇野生菌 D64, 在 38 °C 恒温下长时间丁醇浸泡且丁醇浓度呈梯度增加的驯化方式, 使菌种在有丁醇的环境不断人工进化, 适应高浓度丁醇的菌种获得生

存, 再结合所设计的多因子复合筛选方法。最终获得丁醇的耐受性提高、丁醇产量增加的菌株 T64, 发酵 7% 玉米醪丁醇平均产量达到 15 g/L, 最高达到 18.88 g/L, 总溶剂为 28.01 g/L, 与目前报道产量最高的菌 *Clostridium beijerinckii* BA101 相当^[16], 与丙酮丁醇梭菌 CICC8016 等国内报道的其他菌种相比, 有非常大的潜力和前景。

参 考 文 献

- [1] 林有胜, 王旭, 王竞, 等. 生物燃料丁醇的研究与前景[J]. 现代化工, 2008, 28(4): 84-87.
- [2] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(6): 1460-1469.
- [3] Durre P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(6): 639-648.
- [4] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations[J]. The Chemical Record, 2004, 4(5): 305-314.
- [5] 朱跃钊, 卢定强, 万红贵, 等. 工业生物技术的研究现状与发展趋势[J]. 化工学报, 2004, 55(12): 1950-1956.
- [6] Knoshaug E P, Zhang M. Butanol tolerance in a selection of microorganisms[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 153(1/3): 13-20.
- [7] Mao SM, Luo YM, Zhang TR, et al. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(6): 3046-3061.
- [8] 王鑫昕, 王少华, 王维, 等. 细菌的有机溶剂耐受机制[J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 161-169.
- [9] Lee SY, Park JH, Jang SH, et al. Fermentative butanol production by *Clostridia*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 101(2): 209-228.
- [10] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations[J]. The Chemical Record, 2004, 4(5): 305-314.
- [11] 谢慧玲, 阮森林, 刘亮伟, 等. 酸性生淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 85-87.
- [12] Baer SH, Blaschek HP, Smith TL. Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(12): 2854-2861.
- [13] 徐芳. 丙酮丁醇梭菌生产丁醇及代谢调控的初步研究[D]. 江南大学硕士学位论文, 2009.
- [14] 靳孝庆, 周华, 吴薛明, 等. 丙酮-丁醇发酵生产菌的快速筛选方法[J]. 过程工程学报, 2008, 8(6): 1185-1189.
- [15] Lin YL, Blaschek HP. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(3): 966-973.
- [16] Formanek J, Mackie R, Blaschek HP. Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(6): 2306-2310.