

利用糖蜜发酵生产丁醇菌株的分离筛选及鉴定

裴建新¹ 左文朴¹ 庞浩¹ 黄志明¹ 黎贞崇¹ 韦宇拓² 黄日波^{1,2}

(1. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西 南宁 530007;

2. 广西大学微生物及植物遗传工程教育部重点实验室, 广西 南宁 530003)

摘要: 高效利用糖蜜产生丁醇的菌株是低成本生产丁醇的基础。本研究从自然环境(牛粪、沼气池、土壤)中筛选具有利用糖蜜产生丁醇能力强的菌株。采样通过玉米培养基富集初筛分离获得 12 株生产丁醇能力较强的菌株。用 8 度糖蜜发酵复筛, 有 2 株菌株丁醇产量较高, 分别为 8.57 g/L 和 8.45 g/L, 丁醇比高达 75 %。将菌株分别命名为 gxzp-5 和 gxzp-9 经过 16S rDNA 基因序列同源性分析初步鉴定 2 株菌株都为拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)。

关键词: 微生物; 糖蜜; 生物丁醇; 鉴定; 拜氏梭菌

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TQ920

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2010)05-0032-04

Isolation, Screening & Identification of Butanol-producing Strains by Molasses Fermentation

PEI Jian-xin¹, ZUO Wen-pu¹, PANG Hao¹, HUANG Zhi-ming¹, LI Zhen-chong¹, WEI Yu-tuo² and HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. Non-food Biomass Energy Engineering Technology Research Center of Guangxi Scientific Academy, Nan'ning, Guangxi 530007;

2. Microbial and Plant Genetic Engineering Key Lab of Ministry of Education, Guangxi University, Nan'ning, Guangxi 530003, China)

Abstract: The strains capable of using molasses efficiently to produce butanol is the base for low-cost butanol production. In this study, such strains were isolated from natural environment (dairy manure, biogas, and soil). 12 strains with strong butanol-producing capability were preliminarily isolated through corn accumulation culture. And two strains were subsequently obtained by 8 Bx molasses fermentation and their butanol-producing yield were 8.57 g/L and 8.45 g/L respectively. The two strains were named as gxzp-5 and gxzp-9 respectively and they were confirmed as *Clostridium beijerinckii* through 16S rDNA gene sequence homology analysis.

Key words: microbes; molasses; bio-butanol; identification; *Clostridium beijerinckii*

随着石化资源的枯竭,石油价格的不断攀升,微生物发酵生产丁醇受到了人们的普遍关注。丁醇是一种重要的有机化工原料,主要应用于溶剂、抗氧化剂、增塑剂、合成药物精细化工等^[1]。而在能源危机日益凸显的今天,由于丁醇具有能量密度高、亲水性低、蒸汽压低、辛烷值高等特点,被认为是最有发展潜力的新型液体燃料之一^[2]。

国内生产生物丁醇(ABE 发酵)主要是以玉米为原料,利用丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)发酵。这个发酵过程的生产成本为 8000~10000 元人民币/吨生物丁醇,过高的成本约束了生物丁醇作为燃料的推广使用,而其中原料成本占了总成本的 75 %^[3]。从 2006 年起,我国已经开始限制利用粮食来生产生物能源,鼓励发展非粮食的生物质能源。利用糖蜜、木薯、农业废弃物和纤维素等原料生产丁醇是一种趋势,但由于原料前处理技术不成熟、发酵菌株产总溶剂较低、丁醇比不高等问题

成为生产生物丁醇的瓶颈^[4]。分离筛选性能优良的新菌株^[5];诱变育种^[6];过量表达菌株代谢网络的相关蛋白^[1];敲除合成代谢副产物基因或转录阻遏蛋白的基因^[7];构建合成丁醇新的代谢途径和改造工艺设备等是提高丁醇生产效率的有效技术手段^[8]。

糖蜜是食糖生产的副产品。我国是产糖大国,2008 年糖蜜产量达 300 多万吨,价格 700~800 元/吨,以廉价的糖蜜为原料发酵生产丁醇,可降低生物丁醇的成本,具有市场竞争力^[9]。本研究从自然界分离筛选获得 12 株可以利用糖蜜发酵生产丁醇的菌株,其中 2 株为丁醇高产菌株。经 16S rDNA 基因序列分析初步鉴定为 *Clostridium beijerinckii*。很多研究表明,拜氏梭菌的原料谱和适宜 pH 范围更广^[10],在丁醇发酵产业上具有更大的应用潜力^[11]。

基金项目: 桂科攻 0992022-1(桂科转 09321071) 广西大学开放课题 J0804(科学院基本业务费 09YJ17SW05)。

收稿日期: 2010-03-15

作者简介: 裴建新(1982-),男,硕士,研究方向:微生物学。

通讯作者: 黄日波,教授,博士生导师, E-mail: rbhuang@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

采集南宁市郊区沼气池发酵液、牛粪、土壤为实验样本。

1.1.2 培养基

玉米醪培养基(用于厌氧菌培养):玉米粉 60 g, 刃天青 0.3 g, 蒸馏水 1000 mL。配制时将以上成分充分混合, 自然 pH 值, 加热 10 min 成糊状, 分装于 30 mL 的试管中, 胶塞密封, 121 °C 高压灭菌 20 min。

分离培养基(用于滚管分离单菌落):葡萄糖 40 g, 牛肉膏 2 g, 酵母粉 2 g, 蛋白胨 6 g, 醋酸铵 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.5, 121 °C 高压灭菌 20 min。

种子培养基(TYA 培养基):葡萄糖 40 g, 牛肉膏 2 g, 酵母粉 2 g, 蛋白胨 6 g, 醋酸铵 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.5, 121 °C 高压灭菌 20 min。

糖蜜发酵培养基:80 度的糖蜜(含糖 45 % 左右) 100 g; 酵母粉 5 g, 碳酸钙 3.0 g, 过磷酸钙 0.7 g, 硫酸铵 3.0 g, 用蒸馏水定容到 1000 mL, pH 6.2~6.5。将以上成分混合均匀, 分装于 30 mL 试管中, 胶塞密封, 115 °C 高压灭菌 20 min。

1.1.3 酶和化学试剂

实验所用 Taq 聚合酶、PMD18-T vector、dNTP Mixture 等均为 TaKaRa 公司产品, 质粒提取试剂盒、小量 PCR 产物试剂盒购自天根生化公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 筛选方法

1.2.1 富集培养

取 1 g 采集的样品放入 30 mL 玉米培养基的试管中, 在沸水锅中热激 90 s, 用水冷却后置于 37 °C 恒温培养箱富集培养 3 d, 挑选有大量气泡和醪盖生成的培养液进行气相色谱分析检测。将有丁醇生成的发酵液转接到玉米粉培养基继续发酵培养。

1.2.2 分离纯化

取富集培养的发酵液在厌氧培养箱里梯度稀释到 10^{-8} , 利用滚管技术方法分离单菌落。挑取单菌落于 TYA 培养基的试管中, 放置 37 °C 恒温培养箱培养 2 d, 15 % 甘油保存于 -80 °C 冰箱。

1.3 利用糖蜜发酵丁醇的研究

将初步筛选获得的生产丁醇的菌株用糖蜜为原料发酵的复筛实验。取甘油保存的菌株接入 TYA 培养基中 80 °C 热激 10 min, 冷却后置 37 °C 恒温培养箱培养活化

20 h, 然后转接到 TYA 培养基中培养到 OD_{600} 为 1 左右作为种子液。将种子液按 10 % 接种量转到糖蜜发酵培养基中, 在 37 °C 静止发酵 72 h 后, 进行产物分析。

1.4 发酵产物分析及残糖测定

用 Agilent6890 气相色谱仪测定产物。

色谱条件: 色谱柱:phenomen ZB-WAXplus; 检测器:FID(220 °C)进样量 0.2 μL ; 进样口压力:16.92 psi; 柱箱温度:100 °C; 氢气流量:30 mL/min。正丙醇作为内标进行定量分析。

残糖测定采用 DNS 法^[12]。

1.5 菌株的分子鉴定

提取菌株的总 DNA 作为 PCR 模板, 利用细菌 16S rDNA 基因通用引物扩增得到菌株的 16S rDNA 基因序列, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物片段长度与产量, PCR 产物纯化并连接 pMD18-T 载体后测序, 测序委托上海鼎安生物科技有限公司完成。测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对分析。应用 MEGA4.1 生物软件构建系统进化树。

16S rDNA 引物序列:

16s-F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

16s-R:5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

本研究从 60 个样品中用玉米培养基富集和分离纯化获得 12 株生产丁醇较高的菌株, 把菌株进行菌种保藏, 进行下一步的糖蜜发酵复筛实验。

2.2 糖蜜发酵实验

经 8 度糖蜜发酵产物用气相色谱分析和残糖测定, 结果见表 1。

表 1 分离株菌株发酵糖蜜生产丁醇、丙酮和乙醇

菌株	丙酮 (g/L)	乙醇 (g/L)	丁醇 (g/L)	总溶剂 ABE(g/L)	丁醇比例 (%)	残糖 (%)
1	1.43	0.30	8.18	9.91	82.5	6.17
2	0.16	2.31	7.96	10.43	76.3	6.29
3	0.04	0.03	1.7	1.77	96.1	59.74
4	1.67	0.52	8.13	10.32	78.8	5.82
5	0.84	1.92	8.57	11.33	75.6	5.56
6	0.53	0.17	5.90	6.6	89.3	17.55
7	0.82	0.26	6.13	7.21	85	10.08
8	0.58	1.04	4.37	5.99	72.9	19.22
9	0.47	2.33	8.45	11.25	75.1	4.17
10	0.28	0.15	5.17	5.6	92.3	25.21
11	0.43	0.19	4.34	4.96	87.5	41.74
12	0.32	0.18	5.45	5.95	91.5	23.87

由表 1 的复筛结果表明, 菌株 5 和菌株 9 对糖蜜的发酵能力相对于其他的菌株高, 而且在不同批次中发酵

稳定,丁醇产量平均值分别为 8.57 g/L 和 8.45 g/L,而且丁醇占总溶剂的比例达 75 %,将菌株分别命名为 gxzp-5 和 gxzp-9。

另外,值得注意的是传统的丙酮丁醇发酵菌株发酵产物比例一般是丙酮:丁醇:乙醇=3:6:1^[13-14],而 gxzp-5 和 gxzp-9 菌株的发酵产物中丙酮含量<乙醇含量(产物比例图 1)。所以本实验选择这两个菌株进行 16S rDNA 菌种鉴定。

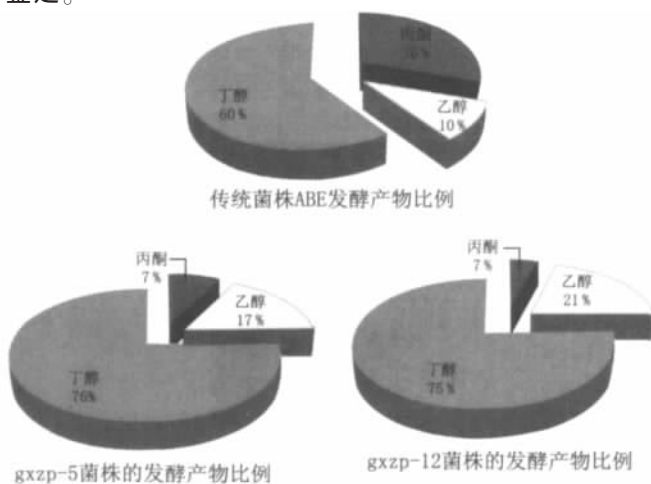


图 1 丙酮丁醇乙醇的比例

2.3 gxzp-5 和 gxzp-9 菌株的分子鉴定结果及构建进化树

gxzp-5 和 gxzp-9 菌株的 16S rDNA 序列测序结果用 Blast 在线软件进行相似性分析,这两株菌株都与 *Clostridium beijerinckii* 具有 98 % 的同源性,初步鉴定为拜氏梭菌。16S rDNA 序列构建的系统进化树,见图 2。

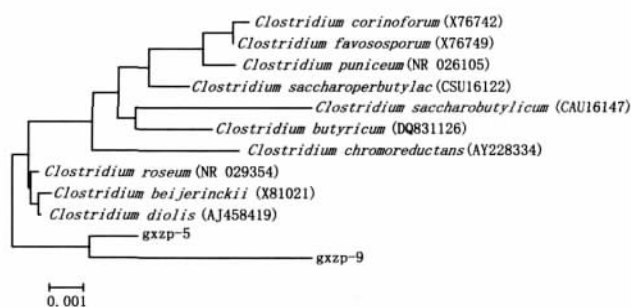


图 2 gxzp-5 和 gxzp-9 菌株的系统发育树

这两个菌株发酵糖蜜,丁醇产量较高,丁醇比高达 75 %。丁醇比高,便于发酵产物丙酮、丁醇、乙醇的分离,具有一定工业应用的优势。

3 讨论

目前,生产丁醇的菌种主要有 *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium sacchabutylicum*^[16]。在国

内生产丁醇主要以玉米为原料,使用丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*),而国外使用的菌种则主要是拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*),利用糖蜜发酵生产丁醇^[16]。1991 年 Blaschek H P 等利用 N-甲基-N 亚硝基胍诱变获得的新突变菌株 *Clostridium beijerinckii*-BA101,丁醇产量高达 18.6 g/L,并可以在简单、廉价的培养基中较好的生长,适于工业应用^[17]。2008 年 Qureshi 等研究 *Clostridium beijerinckii* 260 可直接发酵小麦秸秆水解液总溶剂可达 16.59 g/L^[18]。*Clostridium beijerinckii* 的研究将受到更多科学家的关注。

本研究经过初筛和复筛获得两株利用糖蜜生产丁醇的菌株 gxzp-5 和 gxzp-9,经 16S rDNA 基因序列分析初步鉴定为 *Clostridium beijerinckii*,这两菌株发酵产物比例与传统菌株有所不同,丁醇比高达 75 %,更重要的是乙醇产量高于丙酮产量。可能是糖蜜发酵培养基中的一些成分对代谢网络的影响,导致碳代谢流方向的改变;也有可能是菌株自身代谢所致,这个现象有待进一步研究。据估算,利用糖蜜生产丁醇产量达 12 g/L,就可工业化生产,经济效益高于玉米生产丁醇。本研究筛选获得的菌株离工业化生产还具有一定的差距,需要对菌株继续改造。本课题组将围绕两个方面来开展工作:一方面对菌株生理生化特性深入研究,通过优化发酵条件,提高丁醇产量;另一方面借鉴 *Clostridium acetobutylicum* 基因工程菌的改造策略来进行改造,以期获得发酵糖蜜性能更优良的工程菌株。

参考文献:

- [1] Lee S Y, Park J H, Jang S H, Nielsen L K, et al. Fermentative butanol production by *Clostridia*[J]. Biotechnology and Bioengineering [J]. 2008. 101(2): 209-228.
- [2] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek H P. Production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and insitu recovery by gas stripping. Microbiology. Biotechnology [J]. 2003, 19: 595-603.
- [3] 刘力强, 杨丽萍, 李立强, 等. 生物丁醇燃料产业化制造中的问题及发展趋势[J]. 生物产业技术, 2008, (5): 36-44.
- [4] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek H P. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18: 220-227.
- [5] 王凤芹, 谢慧, 楚乐然, 等. 产丁醇芽孢杆菌的分离、筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 7-11.
- [6] Annous B A, Blaschek H P. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amylolytic activity[J]. Applied and environmental Microbiology, 1991, 9: 2544-2548.
- [7] Tummala S B, Junne S G, Papoutsakis E T. Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predomi-

- nantly alchologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations [J]. J Bacteriol, 2003, 185 (12):3644–3653.
- [8] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek. Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping[J]. Microbiology. Biotechnology, 2007, 34: 771–777.
- [9] 陈陶声, 陆祖祺. 发酵法丙酮和丁醇生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991. 110–114.
- [10] Qureshi N, Ezeji TC, Ebener J, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*: Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5915–5922.
- [11] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek H P. Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii* [J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 34–39.
- [12] 张陞杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 南京: 浙江大学出版社, 1994. 13–14.
- [13] Christian K. Applied acetone-butanol fermentation [J]. Microbiology and Biotechnology, 2000, 2(1): 3–4.
- [14] Zverlov V, Berezina O, Velikodvorskaya G, et al. Bacterial
- acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: Use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 587–597.
- [15] Ranad Shaheen, Matt Shirley, and David T. Jones. Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent producing *Clostridia* [J]. Microbiology Biotechnology, 2000, 2(1): 115–124.
- [16] Qureshi N, Lolas A, Blaschek HP. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA10 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 26: 290–295.
- [17] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation [J]. Biotechnol Bioeng, 2007, (97): 1460–1469.
- [18] Qureshi N, Saha B C, Hectors R E, et al. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I: batch fermentation [J]. Biomass and Bioenergy, 2008, 32(2): 168–175.

(上接第 31 页)

浓度增加, 吸光度变化略有下降; 蔗糖浓度在 3%~15% 时, 随着浓度增加, 吸光度缓慢增加; 淀粉浓度在 0.4%~3.2% 范围内, 随着浓度增加, 吸光度变化不明显。几种碳水化合物对苹果皮色素的稳定性没有不良影响。

2.2.8 氧化剂和还原剂对苹果皮红色素稳定性的影响

在一定浓度色素溶液中, 加入将氧化剂、还原剂至终浓度为 0.2%, 测其吸光度, 结果见表 8。

表 8 氧化剂、还原剂对苹果皮红色素稳定性的影响

项目	氧化剂、还原剂					
	H ₂ O (对照)	NaClO	H ₂ O ₂	K ₂ S ₂ O ₈	Vc	Na ₂ S ₂ O ₃
吸光度 (536 nm)	0.368	0.401	0.355	0.386	0.371	0.308
颜色	红色	黄绿	淡红	红色	红色	红色

表 8 结果表明, NaClO 使色素溶液变为黄绿色, H₂O₂ 使色素溶液变淡。而 K₂S₂O₈、Vc、Na₂S₂O₃ 对苹果皮色素的颜色没有明显的影响, 但都使吸光度有所改变。

3 结论

用 70% vol 乙醇 (pH3) 提取紫红色苹果皮色素, 获得鲜艳的红色色素溶液。苹果皮红色素在碱性条件下不

稳定, 在酸性条件下稳定性较好, 适宜在酸性条件下使用。苹果皮色素耐热性好, 在贮存、应用过程中, 应尽量避免长时间的高温、太阳光与紫外线照射。葡萄糖、蔗糖、淀粉等碳水化合物对苹果皮色素均无不良影响。除了 Fe³⁺ 金属离子对苹果皮色素有明显的影响外, 其他金属离子对苹果皮色素稳定性没有不良影响。在提取与应用过程中, 应尽量避免使用铁制容器。苹果皮色素对氧化剂比较敏感, 都使色素的吸光度和色泽有明显变化, 还原剂对苹果皮色素的色泽无明显不良影响。苹果皮色素原料资源丰富, 提取方便, 色素为水溶性色素, 稳定性好, 具有广阔的开发前景。

参考文献:

- [1] 周立国. 食用天然色素及其提取应用[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1993. 192–196.
- [2] 夏洁如, 向晨茜, 王洪伟. 食用天然色素功能应用及发展趋势[J]. 中国酿造, 2008, (22): 1–4.
- [3] 代同现, 王中兴. 干式苹果酒的酿造[J]. 酿酒科技, 1999, (4): 55–56.

白云边新年度成曲开始入库

本刊讯 随着酿造车间扩班生产, 白云边公司下一年度酿造生产的酒曲用量较上年需增加 2000 余吨, 为此该公司将新年度制曲生产较往年提前了 10 天。经过员工们的精心操作及 45 天的发酵周期, 白云边新年度成曲日前通过技术质量部检验, 产品优良, 于 4 月 23 日开始陆续入库储存待用。(屈万山)