

产丁醇芽孢杆菌的分离、筛选与鉴定

王凤芹 谢慧 楚乐然 原欢 续钊 宋安东*

(河南农业大学生命科学学院 河南 郑州 450002)

摘要: 通过富集培养和分离纯化等过程, 从种植怀地黄的土壤中分离得到一株产丁醇兼性厌氧细菌菌株 C2。以 7% 的玉米醪液为原料总溶剂(丙酮、丁醇、乙醇, ABE)产量可达 17.17 g/L, 其中丁醇 11.2 g/L, 占 65.2%; 发酵玉米秸秆糖化液(总糖浓度为 25 g/L)产总溶剂量为 3.64 g/L, 其中丁醇 2.63 g/L, 占 72.3%。形态学、生理生化及系统发育研究表明该菌株为革兰氏阳性芽孢杆菌(*Bacillus*), 与 *B. vallismortis*、*B. atrophaeus* 和 *B. mojavensis* 亲缘关系最近。

关键词: 丁醇发酵, 分离筛选, 芽孢杆菌

Screening and Identification of a *Bacillus* Strain Producing Butanol

WANG Feng-Qin XIE Hui CHU Le-Ran YUAN Huan XU Zhao SONG An-Dong*

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: A facultative anaerobic butanol producing bacteria named C2 was isolated from soil planted with rehmanniae. C2 could produce 17.17 g/L total solvent (acetone, butanol and ethanol, ABE) in a 7% corn mash and the butanol yield reached 11.2 g/L amounting to 65.2% of the total solvent. Using corn straw hydrolysate as raw material (total sugar 25 g/L), 3.64 g/L total solvent was produced, among which 72.3% was butanol, reached to 2.63 g/L. According to the analysis of morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, this bacteria strain was identified as *Bacillus* sp., and was most related to *B. vallismortis*, *B. Atrophaeus* and *B. mojavensis*.

Keywords: Butanol fermentation, Screening, Identification, *Bacillus*

随着石化资源的耗竭和温室效应等环境问题的日益突出, 新型、洁净、可再生能源开发迫在眉睫, 利用可再生资源生产化工原料和能源物质受到高度重视。丙酮丁醇发酵曾是仅次于乙醇发酵的第二大发酵过程^[1], 自 19 世纪 50 年代以后, 由于石油工业的发展而受到冲击, 逐渐走向衰退。然而因丙酮丁醇发酵的主要成分丁醇具有良好的燃料性能, 使得

该发酵过程在能源危机日益加重的今天重新受到世界各国相关研究者及企事业单位的关注。

目前能进行丙酮丁醇发酵的微生物主要有 *Clostridium acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、*C. saccharoperbutylacetonicum* 和 *C. saccharobutylicum* 4 个种^[2], 这些菌株均为专性厌氧的梭状芽孢杆菌^[3]。但在厌氧环境中, 溶剂产生梭菌发酵过程中产生的

能量较少, 细胞物质合成代谢缓慢, 再加上发酵过程中产生的发酵产物丁醇、有机酸等的抑制作用, 菌体密度低、细胞活力低, 使得产物浓度非常低(丁醇浓度一般不超过 12–13 g/L)^[3]。本研究旨在从土壤分离筛选出能够产丁醇的兼性好氧微生物, 为丙酮丁醇发酵的高密度菌体发酵和基础研究提供宝贵的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 土壤样品: 河南焦作温县种植怀地黄的土壤。

1.2 菌种: 丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) 8016, 购自中国食品工业发酵研究院。

1.3 培养基

1.3.1 富集培养基: 马铃薯块茎。

1.3.2 分离纯化培养基: KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, MgSO_4 0.2 g/L, NaCl 0.01 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 葡萄糖 30 g/L, 琼脂 20 g/L, 1000 mL 蒸馏水, 0.7×10^5 Pa 灭菌 15 min^[4]。

1.3.3 活化培养基(5%玉米醪液): 全玉米粉调制糊状, 慢慢倒入沸水中, 不断搅拌, 煮 10 min。将制成的浆糊状玉米醪装入 18 mm × 180 mm 试管中 (12 mL/支), 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3.4 发酵培养基: (1) 7%玉米醪液: 配制方法见 1.3.3。(2) 秸秆糖化液: 玉米秸秆糖化液(含糖量 25 g/L), 0.1 g/L 酵母浸膏, 0.7×10^5 Pa 灭菌 15 min 后加入经过滤除菌的 10 mL/L stock solution(组成成分见文献[1])。

玉米秸秆糖化液的制备: 称取粉碎 100 目的玉米秸秆粉 100 g 于 1000 mL 的三角瓶中, 加入 0.5% 盐酸 600 mL, 待瓶内的秸秆粉全部浸湿后于 1×10^5 Pa 灭菌 1 h。冷却至室温后用 2 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 4.8, 并添加 3 mL 纤维素酶(杰能科、4500 IU/mL)和 0.5 mL 木聚糖酶(杰能科、43000 IU/mL), 48℃糖化 48 h, 过滤备用。

1.4 菌种分离

1.4.1 富集培养: 采用马铃薯块茎和 5%玉米醪液进行丁醇产生菌的富集培养, 具体方法参见文献[5]。

1.4.2 分离纯化: 将玉米醪培养液经梯度稀释后涂布分离纯化培养基平板, 37℃ 培养至菌落长出, 单菌落镜检纯度后再次挑入玉米醪培养基中进行连续热激(100℃ 热激 45 s)传代培养、活化。

1.4.3 复筛: 将活化的菌种以 10%的接种量接种到

装有 7%玉米醪培养基或玉米秸秆糖化液的三角瓶中(总容积 130 mL, 装液量 100 mL), 于 37℃恒温箱中静置发酵 72 h 后进行溶剂含量测定。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 生理生化试验: 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[6]。

1.5.2 系统发育研究: (1) 主要试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTP 和凝胶回收纯化试剂盒购自天根生化科技有限公司。(2) DNA 提取方法见文献[7]。(3) 16S rDNA 引物: 正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAGAACGAACGCT-3'。其序列对应于 *E. coli* 第 8–37 碱基位置; 反向引物: 5'-TACGGCTACCTTGT TACGACTTCACCCC-3'。其序列对应于 *E. coli* 第 1479–1506 碱基位置。由北京博尚生物技术有限公司合成。(4) PCR 反应体系: 10 × Reaction Buffer 5.0 μL, dNTPs (10 mol/L) 1.0 μL, 正向引物 (35 μmol/L) 0.5 μL, 反向引物 (35 μmol/L) 0.5 μL, Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 模板 DNA (50 ng/μL) 2.0 μL, 补加超纯水至 50 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 3 min; 94℃ 45 s, 59.5℃ 45 s, 72℃ 75 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物片段长度与产量, 经凝胶回收纯化后送北京华大中生科技发展有限公司直接进行测序。

1.5.3 数据处理: 将测序所得序列及 GenBank 中获得的参比菌株的相应基因序列经 Clustal X 序列比对后, 采用 TREECONW 中的邻接法(Neighbor-joining)进行系统发育树的构建, 自展值(Bootstrap) 为 1000。

1.6 测定方法

使用 Agilent 气相色谱仪测定溶剂组成。色谱柱: DB-FFAP (30 m × 0.32 mm × 1 μm); 检测器: FID (250℃); 进样温度: 200℃; 柱温: 60℃; 氮气: 25 mL/min; 氢气: 40 mL/min; 空气: 45 mL/min; 内标物: 异丁醇。

总糖测定采用 DNS 法^[8]。

2 结果与分析

2.1 初筛

通过土豆块茎和玉米醪富集培养、分离纯化得到 10 株可以发酵玉米醪产丁醇的菌株, 其中菌株 C2、C3、L3 液化玉米醪的能力最强, 其液化玉米醪的情况如图 1 所示。

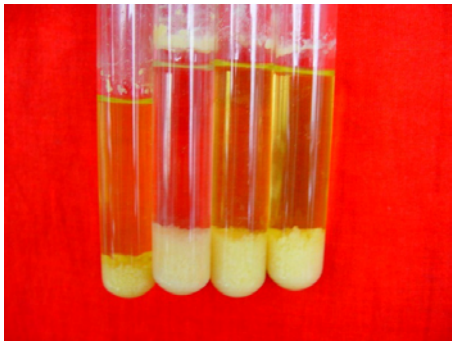


图 1 产丁醇菌株液化玉米醪情况比较图(从左到右依次为 8016、L3、C2、C3)
Fig. 1 Liquefaction of corn mash by butanol producing strains (from left to right : 8016, L3, C2, C3)

2.2 复筛

C2、C3 和 L3 发酵玉米醪产丙酮、丁醇和乙醇的结果见表 1。由表 1 可以看出, 3 株菌发酵产生的剂都超过了 10 g/L, 且丁醇比例均大于 60%, 符合文献上报道的丙酮: 丁醇: 乙醇=3: 6: 1 (M/M/M) 的比例。其中 C2 的总溶剂产量最大, 达到 13.82 g/L, 产生的丁醇的量也最多, 达到 8.33 g/L。

将 C2 菌株连续热激活化传 50 代后与 8016 在相同的兼性厌氧条件下进行玉米醪和秸秆糖化液发酵对比试验(表 2)。由表 2 可以看出, 发酵玉米醪液时, 8016 的总溶剂产量为 16.54 g/L, 丁醇比例为 65%; C2 的总溶剂产量为 17.17 g/L, 丁醇比例为 66%。发酵玉米秸秆糖化液时, 8016 的总溶剂产量为

4.15 g/L, 丁醇比例为 70%; C2 的总溶剂产量为 3.64 g/L, 丁醇比例为 72%。表明 C2 利用玉米醪液的能力较 8016 好, 而 C2 利用糖化液的能力不如 8016 强。两株菌发酵秸秆糖化液时都表现出较高的丁醇比例。

2.3 菌种鉴定

2.3.1 菌落形态: 将 8016 和 C2 菌株分别稀释涂布于分离平板上, 好氧条件下 37℃ 培养 24 h, 其菌落形态见图 2。由图 2 可知, 在好氧条件下, 8016 长势较差, 菌落扁平、光滑, 直径 1.9 mm, 而 C2 菌株菌落较大, 长势饱满、凸起, 表面皱褶, 直径 2.7 mm, 表明该菌株对氧气的耐受能力远远强于 8016。

2.3.2 菌体形态: C2 菌株为 G⁺ 的产芽孢杆菌, 在好氧分离平板上生长到 18 h 左右开始形成芽孢, 芽孢为端生, 芽孢直径与菌体直径相当, 菌体不膨大(图 3)。

2.3.3 生理生化特征: 生理生化试验结果(表 3)表明, 除了甲基红和乙醇利用试验 C2 和 8016 结果不同外, 在其他方面两株菌都具有相似的生理生化特征, 且具有广泛的糖利用范围, 可同时利用五碳糖和六碳糖。

2.3.4 系统发育研究: 对 C2 菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增、序列测定, 得到长度为 1359 bp 的 16S rDNA 部分基因序列。对 C2 菌株及相关参比菌株的 16S rDNA 序列进行比对, 并构建系统发育树

表 1 新分离菌株发酵玉米醪产丙酮、丁醇和乙醇比较 Table 1 Production of acetone, butanol and ethanol by the isolates with corn mash as raw material					
菌株 Strain	丙酮 Acetone (g/L)	乙醇 Ethanol (g/L)	丁醇 Butanol (g/L)	总溶剂 ABE (g/L)	丁醇比例 Butanol proportion (%)
L3	3.64	0.78	6.65	11.07	60.07
C2	4.78	0.71	8.33	13.82	60.27
C3	4.31	0.80	7.83	12.95	60.46

表 2 C2 菌株与丙酮丁醇梭菌 8016 丁醇发酵结果比较 Table 2 ABE production of C2 compared with that of <i>C. acetobutylicum</i> 8016							
菌株 Strain	培养基 Medium	丙酮 Acetone (g/L)	乙醇 Ethanol (g/L)	丁醇 Butanol (g/L)	总溶剂 ABE (g/L)	残糖 Residue sugar (g/L)	糖利用率 Sugar utilization rate (%)
8016	Corn mash	5.11	0.73	10.70	16.54	1.38	94.5
	Corn straw hydrlyzate	1.03	0.21	2.91	4.15	4.29	77.5
C2	Corn mash	5.19	0.78	11.20	17.17	1.26	95.0
	Corn straw hydrlyzate	0.77	0.24	2.63	3.64	5.39	71.7

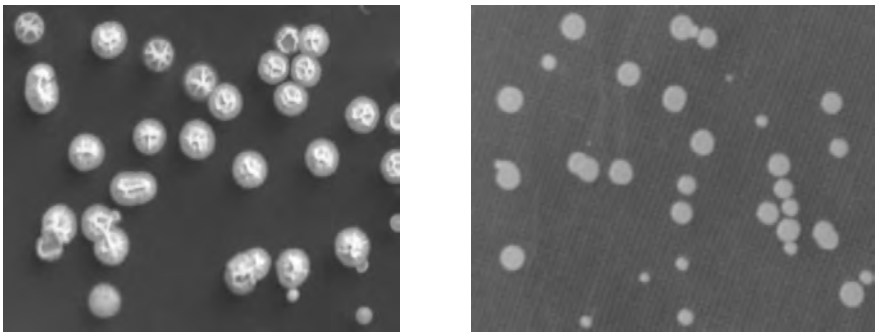


图 2 C2(左)和丙酮丁醇梭菌 8016(右)的菌落形态
Fig. 2 Colony morphology of C2 (left) and *C. acetobutylicum* 8016 (right)

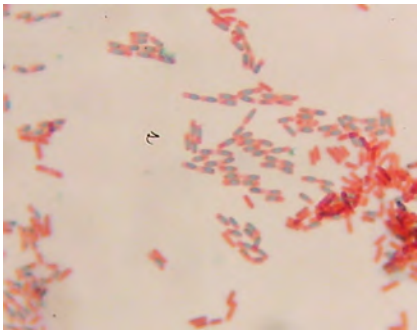


图 3 C2 菌株芽孢染色图
Fig. 3 Spore staining of C2

表 3 C2 和丙酮丁醇梭菌 8016 的生理生化特征 Table 3 The physiological and biochemical characteristics of C2 and <i>C. acetobutylicum</i> 8016		
特征 Characteristics		
	8016	C2
Gram staining	+	+
Spore staining	+	+
Ammonia Secretion	+	+
M.R	+	-
V.P	+	+
Indole	+	+
Amylohydrolysis	+	+
Catalase	+	+
Fluorescein	-	-
H ₂ S Producing	+	+
Carbon source	Citrate	-
	Cellulose	-
	Glucose	+
	Fructose	+
	Xylose	+
	Lactose	+
	Saccharose	+
	Maltose	+
	Ethanol	-

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

(图 4), 由图 4 可以看出 C2 菌株属于芽孢杆菌属, 与 *B. vallismortis* DSM111031^T、*B. atrophaeus* JCM9070^T 和 *B. mojavensis* IFO1571^T 位于同一个系统发育亚分支, 序列同源性为 99%。

3 讨论

目前所报道的丁醇产生菌均为专性厌氧的梭状芽孢杆菌, 主要有 *Clostridium acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、*C. saccharoperbutylacetonicum* 和 *C. saccharobutylicum* 4 个种^[2-3]。Kanyisi 和 Dulky 研究了氧气对一株产丁醇梭菌生长的影响, 发现在好氧的条件下菌体的生长完全受到抑制^[9]。O'Brien 和 Morris 曾经研究了氧气对 *C. acetobutylicum* 生长和代谢的影响, 发现将 *C. acetobutylicum* 短期与氧气接触是非致命的, 但是当氧气的浓度达到一定值后, 葡萄糖的消耗速率下降, DNA、RNA 和蛋白质的合成停止, 同时也导致芽孢形成的加剧^[10]。在厌氧发酵过程中, 溶剂产生梭菌菌体密度低, 产物浓度低。酵母菌乙醇发酵研究结果表明: 部分通氧, 可以使菌体产生较多的能量, 细胞结构物质得以合成和更新, 细胞活力可以长久维持, 同时, 酵母细胞在高菌体浓度环境中处于厌气状态和“反巴斯德效应”对酵母代谢起作用, 可具有较高的发酵活力^[11]。何向飞进行“酒精发酵过程控制的研究”过程中也发现, 适量通氧是高密度和高强度酒精发酵所必须的^[12]。因此提高丁醇产生菌的耐氧能力是提高丁醇产量的关键措施之一^[3,13]。

本研究首次分离得到一株可以进行丁醇发酵的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.), 在好氧分离平板上可以良好生长, 该菌株的发现拓宽了丁醇产生菌的范围, 为高密度、高强度丁醇发酵提供了宝贵的菌种资源。

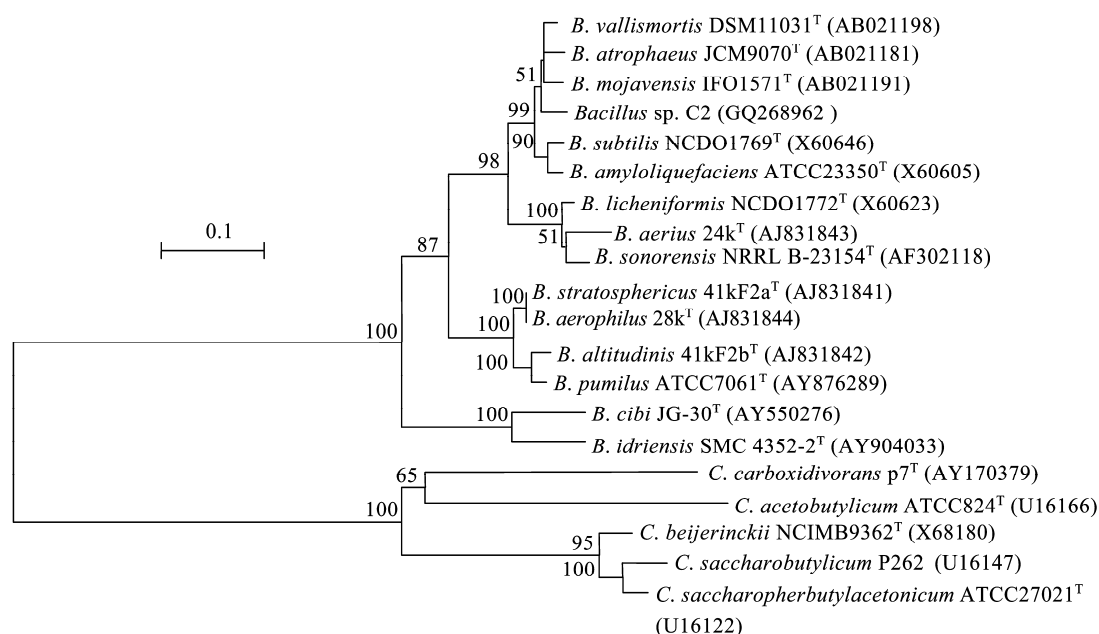


图 4 C2 菌株与芽孢杆菌属及芽孢梭菌属相关参比菌株的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of C2 and the related reference strains of *Bacillus* and *Clostridium* based on the partial sequence of 16S rDNA

Note: Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated at the internodes. GenBank accession numbers are shown in the parentheses. Bar = 10% nucleotide divergence.

秸秆糖化液发酵试验及碳源利用试验表明, 与其他丁醇产生菌一样, 新分离得到的产丁醇芽孢杆菌具有广泛的碳源利用范围, 可以同时利用五碳糖和六碳糖, 可大大提高纤维质原料的利用效率。与丙酮丁醇梭菌 8016 相比, *Bacillus* sp. C2 利用玉米秸秆糖化液的能力较低, 应通过驯化培养、基因工程等手段提高其对秸秆糖化液的耐受能力和利用效率。

参 考 文 献

- [1] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2007(97): 1460–1469.
- [2] Keis S, Shaheen R, Jones DT. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001(51): 2095–2103.
- [3] Papoutsakis ET. Engineering solventogenic clostridia. *Curr Opin Biotechnol*, 2008(19): 420–429.
- [4] 陈陶声, 陆祖祺. 发酵法丙酮和丁醇生产技术. 北京: 化学工业出版社, 1991: 18–20.
- [5] 张益莱, 陈军, 杨蕴刘, 等. 高丁醇比丙酮丁醇梭菌的选育与应用. *工业微生物*, 1996, 26(4): 1–4.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 349–398.
- [7] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. *微生物学报*, 2003, 43(2): 276–282.
- [8] 齐香君, 苟金霞, 韩成, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究. *纤维素科学与技术*, 2004, 12(3): 17–20.
- [9] Kanys G, Dulky SR. The growth of a butanol clostridium in relation to the oxidation-reduction potential and oxygen content of the medium. *J Bacteriol*, 1936(31): 137–149.
- [10] O'Brien RW, Morris G. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *J Gen Microbiol*, 1971(68): 307–318.
- [11] 管斌, 丁友芳, 谢来苏, 等. 酵母菌株和发酵条件对酒精联系发酵的影响. *微生物学杂志*, 1997, 17(1): 1–5.
- [12] 何向飞. 酒精发酵过程控制的研究. 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [13] Hillmann F, Fischer RJ, Saint-Prix F, et al. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol*, 2008(68): 848–860.