

高耐受性拜氏梭菌的离子束诱变选育*

Ion Beam Implantation and Breeding for *Clostridium beijerinckii* Mutant with Highly Inhibitors-tolerance

张九花¹,柳颖¹,曾练强¹,蚁细苗¹,梁达奉^{1,2},郭亭^{1**}

ZHANG Jiu-hua¹,LIU Ying¹,ZENG Lian-qiang¹,YI Xi-miao¹,LIANG Da-feng^{1,2},GUO Ting¹

(1. 广州甘蔗糖业研究所,广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室,广东广州 510316;2. 广西农垦糖业集团股份有限公司,广西糖业研发中心,广西南宁 530002)

(1. Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement & Biorefinery, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou, Guangdong, 510316, China; 2. Guangxi State Farms Sugar Industrial Group Company Limited, Guangxi Sugarcane Industry R&D Center, Nanning, Guangxi, 530002, China)

摘要:【目的】为了优化生物丁醇生产工艺,研究拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)对有毒物质的耐受性。【方法】利用常温等离子束诱变技术选育获得1株突变株*C. beijerinckii* GZ-9,并通过摇瓶发酵对比原始菌株*C. beijerinckii* NCIMB 8052和突变株GZ-9对有毒物质的耐受性。【结果】NCIMB 8052在酚浓度为1.5 g/L的发酵液中已不能生长,而GZ-9在酚浓度2.4 g/L的发酵培养基中生长良好;当可溶性总酚浓度为1.5 g/L时,实验总溶剂产量和丁醇产量分别达9.2 g/L和6.5 g/L。【结论】突变株GZ-9对未脱毒甘蔗渣酸解糖液中毒素物质的耐受性远高于原始菌株NCIMB 8052。

关键词:拜氏梭菌 丁醇 耐受性 等离子诱变

中图分类号:TQ923 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)06-0629-05

Abstract:【Objective】The tolerance to toxic substances of *Clostridium beijerinckii* was studied in order to optimize bio-butanol industrial production. 【Methods】A mutant strain *C. beijerinckii* GZ-9 was obtained by ion beam implantation and screening. Its inhibitors tolerance and butanol production were compared with that of the original strain *C. beijerinckii* NCIMB 8052. 【Results】The results showed the strain NCIMB 8052 could not grow in the fermentation broth with the phenol concentration of 1.5 g/L whereas the mutant GZ-9 grew well in fermentation medium with 2.4 g/L phenol. When the total soluble phenolic concentration was 1.5 g/L, the experiment yields of the total solvents and butanol production reached to 9.2 g/L and 6.5 g/L. 【Conclusion】The mutant strain GZ-9 had strong tolerance to the toxic substances in non-detoxified acid sugar cane bagasse, which was much higher than the original strain NCIMB 8052.

Key words: *Clostridium beijerinckii*, butanol, tolerance, ARTP

收稿日期:2014-10-10

修回日期:2014-11-01

作者简介:张九花(1987-),女,助理工程师,硕士,主要从事生物化工研究。

* 科技部转制科研院所创新能力专项资金项目(2014EG111227),国家自然科学基金青年基金项目(21306032)和广州甘蔗糖业研究所面上基金项目(A201302)资助。

** 通讯作者:郭亭(1981-),男,高级工程师,博士,主要从事生物化工研究,E-mail:gzsiri@163.com。

【研究意义】能源发展与环境保护是全人类共同关注的问题,也是我国社会经济发展中的突出问题。石油资源已出现紧缺状态,价格持续上涨,温室效应

等各种环境问题也日益突出,如何高效利用可再生资源生产能源已成为全球关注的热点。生物丁醇是一种具发展潜力的新型生物燃料,能量密度大,可与汽油混合,可直接用于内燃机,而且运输方便^[1],已成为企业和研究机构关注的一种新型生物燃料^[2]。现阶段,工业发酵制备生物丁醇生产成本低,市场竞争力弱^[3]。虽然,生产所用的木质纤维素原料价格低廉、来源丰富,然而其水解后会产生有机酸、糠醛、酚类等抑制物,而这些抑制物的去除成本较高,并对微生物生长有一定的抑制作用^[4,5]。因此,如何高效利用木质纤维素资源制备燃料丁醇具有现实意义。【前人研究进展】Qureshi等^[6]发现有机酸、糠醛等抑制物不影响丁醇的发酵,而酚类抑制物对丁醇发酵有明显的抑制效果;而且,他们还利用拜氏梭菌突变株 *C. beijerinckii* BA101,以 XAD-4 resin 脱毒的玉米芯酸解和酶解糖液为底物进行发酵,得到的总溶剂产量为 9.30 g/L;然而突变株 BA101 还不能利用未脱毒的酸解糖液发酵产丁醇。目前已经有利用传统技术和目标代谢工程技术来提高拜氏梭菌耐受性的报道,研究者通过粒子束诱变育种得到的 *C. beijerinckii* IB4 对酚类化合物具有较高的抗逆性^[6]。同时,发现玉米芯酸解糖液中的可溶性总酚的浓度提升到 1.5 g/L 以上时,IB4 基本不生长^[7]。【本研究切入点】基于此,木质纤维原料酸解糖液中的毒素抑制物抑制产丁醇梭菌的生长与发酵性能,而诱变育种技术是提高菌株耐受性及丁醇产量的关键手段之一。【拟解决关键问题】采用常温等离子诱变技术对拜氏梭菌 *C. beijerinckii* NCIMB 8052 诱变,并通过初筛、复筛,获得了一株高耐受性且能提升丁醇产量的拜氏突变 *C. beijerinckii* GZ-9。考察突变株 GZ-9 对甘蔗渣酸解液中毒素物质的耐受性,为选育更高耐受性、高产丁醇的工业化菌株提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

Clostridium beijerinckii NCIMB 8052 购于美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.1.2 甘蔗渣酸解糖液的制备

粉碎过 40 目筛后的蔗渣纤维在稀硫酸水解的预处理条件下(2% 的稀硫酸,反应温度 125℃,预处理时间 150 min,20%(W/V)甘蔗渣)得到糖液,并经过氢氧化钙中和至 pH 值为 6.0,再经过 121℃,15 min 灭菌,得糖液含总还原糖约 48.2 g/L,可溶性总酚(TPC)2.5 g/L。

1.1.3 培养基

种子培养基:3g/L 酵母粉,5 g/L 蛋白胨,10 g/L 可溶性淀粉,2 g/L 乙酸铵,2 g/L NaCl,3 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,1 g/L KH_2PO_4 ,1 g/L K_2HPO_4 ,0.1 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,用 NaOH 调节 pH 值至 6.0。

甘蔗渣酸解糖液平板培养基:在种子培养基的基础上,另外添加 2 g/L 刃天青,按体积比 25% 添加甘蔗渣酸解糖液,用 NaOH 调节 pH 值至 6.0。

摇瓶发酵初筛培养基:30 g/L 葡萄糖,2.2 g/L 乙酸铵,0.5 g/L KH_2PO_4 ,0.5 g/L K_2HPO_4 ,0.01 g/L NaCl,0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,0.01 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$,1 g/L 玉米浆,pH 值 6.6。

摇瓶发酵复筛培养基:在发酵初筛培养基基础上,去除 30 g/L 葡萄糖,用甘蔗渣的酸解糖液配置,使其总还原糖为 30 g/L,pH 值 6.6。

发酵培养基 1:同摇瓶发酵复筛培养基,并使其总还原糖为 30 g/L,培养基中可溶性总酚含量为 1.5 g/L,pH 值 6.6。

发酵培养基 2:同发酵培养基 1,并用未脱毒的甘蔗渣的酸解糖液配置,使其总还原糖为 40 g/L,培养基中可溶性总酚含量为 2.0 g/L,pH 值 6.6。

发酵培养基 3:同发酵培养基 1,并用未脱毒的甘蔗渣的酸解糖液配置,使其总还原糖为 48 g/L,培养基中可溶性总酚含量为 2.4 g/L,pH 值 6.6。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的活化

将 *C. beijerinckii* NCIMB 8052 原始菌株活化培养,在 50 mL 肖特厌氧瓶装液 15~20 mL,充氮气 3 min,33~37℃ 培养时间 12~18 h,获得生长旺盛的菌液。

1.2.2 等离子体诱变选育高耐受性突变菌株

将培养至对数期的出发菌株 *C. beijerinckii* NCIMB 8052 种子液用生理盐水稀释到 $OD_{600} = 1$,取 50 uL 菌液滴加在灭菌冷却后的金属载片上,无菌风干,以氦气为放电气体,以 100 W 作为射频功率,以 10SLM 作为气体流量,以 10~240 s(10 s、30 s、60s、120s、180 s、240 s)作为辐照时间对菌株进行等离子体诱变,诱变后,将载体上的菌膜洗脱下来,计算存活率。以等离子体注入时间为横坐标,存活率为纵坐标,绘制存活曲线。

1.2.3 平板筛选等离子体诱变目的拜氏梭菌突变株

将诱变后的载片置于装有 1~2 mL 生理盐水的具塞试管中,剧烈震荡、洗脱,稀释成不同浓度涂布于

甘蔗渣酸解糖液平板培养基上,33~37℃厌氧培养12~36 h,挑选出透明圈和菌落较大的菌落50株,分别编号GZ-1~GZ-50,将其分别用种子培养基进行扩大培养,并保种。

1.2.4 摇瓶发酵初筛

把从平板中筛选的50株菌落和原始菌株接种到摇瓶发酵初筛培养基中,接种量10%(V/V),100 mL肖特厌氧瓶装液量50 mL,35℃发酵72 h后检测各菌株的总溶剂产量和丁醇产量。根据实验结果筛选几株丁醇产量较高的目的突变株。

1.2.5 摇瓶发酵复筛

将摇瓶发酵初筛获得的总溶剂和丁醇产量最高的菌株和原始菌株接种到摇瓶发酵复筛培养基中,接种量10%(V/V),100 mL肖特厌氧瓶装液量50 mL,35℃发酵72 h后检测并比较两个菌株的总溶剂产量和丁醇产量。

1.2.6 目的突变株的传代稳定性考察

在以葡萄糖为碳源的发酵培养基中,检测*C. beijerinckii*突变株的传代稳定性,经过7次连续传代,考察突变株*C. beijerinckii*的总溶剂产量和丁醇产量的稳定性。

1.2.7 目的突变株对甘蔗渣酸解糖液的耐受性

将目的原始菌株*C. beijerinckii* NCIMB 8052和突变株接种到含不同可溶性酚浓度毒性物质(1.5 g/L、2.0 g/L、2.4 g/L)的甘蔗渣酸解糖液的发酵培养基中,接种量为10%(V/V),35℃培养,连续通入氮气,流速为0.3 L/min,在同样的实验条件下发酵培养72 h后,分别检测各组发酵产物中的总溶剂产量和丁醇产量,比较蔗渣酸解液中毒性物质的耐受性。

1.3 检测方法

用紫外可见分光光度计测定菌体浓度:将发酵液用去离子水稀释适当倍数,使 A_{660} 值范围为0.2~1.0。菌体浓度 $OD_{660} = A_{660} \times$ 稀释倍数。还原糖用DNS方法测定

产物检测:取1 mL发酵液,在转速8000 r/min下离心15 min,取上清液注入样品的测试瓶内,加入异丁醇作内标物。检测丙酮、丁醇、乙醇、丁酸、乙酸时,使用浙大智达N2000气相色谱仪,采用火焰离子化检测器(FID),色谱柱为石英毛细管柱,固定相是SE-30,类型为交联;氮气为载气(14 mL/min),氢气和空气流量分别为38 mL/min和252 mL/min;采用三阶段程序升温法(40℃,1 min升温速率3℃/min,终温70℃,1 min升温速率5℃/min,终温140℃,1 min升温速率15℃/min,终温180℃,15 min)进行分

析测定。进样器温度为180℃,检测器温度为180℃。以异丁醇作内标物进行定量。

2 结果与分析

2.1 等离子体诱变对菌株存活率的影响

诱变时间10 s、30 s、60 s、120 s、180 s、240 s,存活率曲线如图1所示。最佳诱变时间根据诱变存活率曲线(或死亡率曲线)来确定的。根据已有的研究报道,当菌株存活率为10%左右时,具有较强的诱变效应^[8],所以通常以该时间作为最佳诱变时间。根据图1,选择180 s为最佳诱变时间。

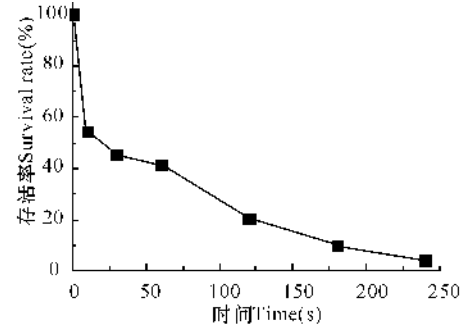


图1 *C. beijerinckii* 8052的离子注入存活率曲线

Fig. 1 Survival rate curve of nitrogen ion beam irradiated *C. beijerinckii* 8052 cells

2.2 甘蔗渣酸解糖液平板筛选突变菌株

诱变后的菌体经生理盐水洗脱后涂布于含有刃天青的筛选培养基上进行初筛,具有较高丁醇产量的菌株会显示较高的还原力,进而会产生较大的透明圈。最终,挑选出50株菌落较大,透明圈明显的突变菌。

2.3 摇瓶发酵初筛

将初筛获得的50株突变菌通过摇瓶发酵实验进行初筛,筛选出丁醇产量较高的3株突变菌,分别为GZ-9、GZ-21、GZ-32。从表1可以看出,突变株GZ-9、GZ-21、GZ-32的总溶剂产量和丁醇产量均高于原始菌株的产量,其中GZ-9发酵结果最好。

表1 突变菌株的总溶剂产量和丁醇产量

Table 1 Comparison of the mutants and the original strain on the yield of solvents and butanol

菌号 Strain	总溶剂产量 Solvents yield (g/L)	丁醇产量 Butanol yield (g/L)
NCIMB8052	10.8	7.4
GZ-9	11.3	7.6
GZ-21	11.1	7.5
GZ-32	11.2	7.5

2.4 摇瓶发酵复筛

从表2可以看出,NCIMB 8052基本不生长,而

突变株均生长良好,其中 GZ-9 的总溶剂和丁醇产量最高,分别为 9.2 g/L 和 6.5 g/L,说明 *C. beijerinckii* GZ-9 不仅可以高效地利用未脱毒的甘蔗渣水解液,还能得到较高的丁醇产量。

表 2 原始菌株和 GZ-9 的总溶剂产量和丁醇产量

Table 2 Comparison of GZ-9 and the original strain on the yield of solvents and butanol

菌号 Strain	总溶剂产量 Solvents yield (g/L)	丁醇产量 Butanol yield (g/L)
NCIMB 8052	/	/
GZ-9	9.2	6.5
GZ-21	8.1	5.7
GZ-32	8.3	5.9

2.5 目的突变株的传代稳定性

由表 3 可以看出,经过 7 次传代实验,突变株 GZ-9 的总溶剂产量和丁醇产量较稳定,具有较好的遗传稳定性。

表 3 拜氏梭菌突变株 GZ-9 的传代稳定性

Table 3 Butanol-producing stability of the GZ-9 mutant during generation

传代次数 Generation	拜氏梭菌 GZ-9 <i>C. beijerinckii</i> GZ-9	
	丁醇产量 Butanol yield (g/L)	总溶剂产量 Solvents yield (g/L)
1	7.6	11.4
2	7.6	11.3
3	7.7	11.6
4	7.6	11.4
5	7.5	11.3
6	7.7	11.5
7	7.6	11.4

2.6 突变株对甘蔗渣酸解糖液的耐受性

从表 4 可以看出,当发酵培养基中的总酚含量为 1.5 g/L 时,原始菌株 *C. beijerinckii* NCIMB 8052 已不能生长,而突变株 *C. beijerinckii* GZ-9 生长良好,且总溶剂产量和丁醇产量分别为 9.2 g/L 和 6.5 g/L;当发酵培养基中的总酚含量为 2.0 g/L 和 2.4 g/L 时,*C. beijerinckii* GZ-9 仍可以良好生长;当总酚含量为 2.0 g/L 时,GZ-9 发酵后总溶剂产量和丁醇产量分别达 6.9 g/L 和 5.0 g/L;当总酚含量达 2.4 g/L 时,GZ-9 产丁醇的能力受到一定的影响,其总溶剂产量和丁醇产量分别降至 4.7 g/L 和 3.3 g/L。

由此可见,通过等离子诱变和筛选技术选育得到 *C. beijerinckii* GZ-9 不仅对毒素物质具有较高的耐受性,且可以提高丁醇产量。

表 4 不同酚浓度的发酵培养基中总溶剂产量和丁醇产量

Table 4 Comparison of the yield of solvents and butanol with different concentration of phenolic compounds

发酵培养基 Medium	酚浓度 Phenol concentra- tions(g/L)	菌种 Strain	生长情况 Growth	总溶剂产量 Solvents yield (g/L)	丁醇产量 Butanol yield (g/L)
1	1.5	8052	差 Poor	/	/
		GZ-9	良好 Well	9.2	6.5
2	2.0	8052	差 Poor	/	/
		GZ-9	良好 Well	6.9	5.0
3	2.4	8052	差 Poor	/	/
		GZ-9	良好 Well	4.7	3.3

3 结论

本研究通过等离子诱变技术筛选获得一株高耐受性拜氏突变株 *C. beijerinckii* GZ-9,考察了稳定性,并在含不同毒性物质的蔗渣酸解液进行耐受性实验。结果显示,GZ-9 对毒性的耐受能力(最高耐受的总酚浓度约为 1.5 g/L)远高于目前的 *C. beijerinckii* NCIMB 8052,即使在 2.4 g/L 的总酚浓度下,仍具有较好的产丁醇能力。但是其利用木质纤维水解液制备丁醇效率相对于淀粉质原料仍然较差,因此,下一步需结合基因组学、转录组学和蛋白质组学,通过分子育种技术进一步提高 *C. beijerinckii* 的抗逆性及其对丁醇生产效率的影响。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Zhu Y, Li Y. The importance of engineering physiological functionality into microbes [J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(12): 664-672.
- [2] Durre P. Biobutanol: An attractive biofuel [J]. Biotechnol J, 2007, 2(12): 1525-1534.
- [3] 刘力强, 李雨萍, 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): 36-38.
- [4] Li L Q, Li L P, Li L Q, et al. Problems of bio-butanol fuel industry manufacturing and development trend [J]. Bio-industry Technology, 2008(5): 36-38.
- [5] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek H P, et al. Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation [J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 97(6): 1460-1469.
- [6] Qureshi N, Ezeji T C, Ebener J, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(13): 5915-5922.

- [6] 姜岷,郭亭,汤艳,等.一株高抗逆性贝氏梭菌及其应用:中国,ZL201110020102.6[P].2011-09-07.
Jiang M, Guo T, Tang Y, et al. A *Clostridium beijerinckii* mutant with highly-resistance and its application[P]. Chinese patent, ZL201110020102.6[P]. 2011-09-07.
- [7] Guo T, Tang Y, Zhang Q Y, et al. *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor tolerance ob-

tained by low-energy ion implantation[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012, 39(3): 401-407.

- [8] Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art[J]. Plasma Proc Polym, 2005, 2(5): 391-400.

(责任编辑:尹 闯)

(上接第 623 页 Continue from page 623)

- [10] 常国炜,林荣珍,曾练强,等.右旋糖酐酸解与酶解产物比较[J].甘蔗糖业,2012(6):33-38.
Chang G W, Lin R Z, Zeng L Q, et al. Comparison of dextran hydrolyzates between acidic and enzymatic hydrolysis[J]. Sugarcane and Canesugar, 2012(6): 33-38.
- [11] 张洪斌,姚日生,朱慧霞,等.发酵法生产右旋糖酐的工艺研究[J].合肥工业大学学报,2004,27(7):783-787.
Zhang H B, Yao R S, Zhu H X, et al. Study on the production of dextran by fermentation[J]. Journal of Hefei University of Technology, 2004, 27(7): 783-787.
- [12] Kim D, Robyt J F, Lee S Y, et al. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose

concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase [J]. Carbohydrate Research, 2003, 338 (11): 1183 - 1189.

- [13] 蓝平,李晓慧,梁明征,等.发酵法制备右旋糖酐菌种培养[J].食品科技,2012,37(8):27-31.
Lan P, Li X H, Liang M Z, et al. The spawn culture conditions for fermentation preparation of dextran [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(8): 27-31.

(责任编辑:陆 雁)