

# 一种新型丁醇产生菌的鉴定及发酵条件初探

郑炬,曹广丽,杨谦\* (哈尔滨工业大学生命科学与技术学院,黑龙江哈尔滨 150080)

**摘要** [目的]对一株新型丁醇产生菌进行鉴定,并研究其发酵条件。[方法]通过富集培养、分离筛选纯化微生物菌株,利用气相色谱仪检测分离菌株的丁醇产量,并利用形态学观察、生理生化分析及 16S rDNA 分子鉴定确定分离菌株的种类。[结果]试验得到一株高产丁醇菌 HIT1,其发酵时适宜的葡萄糖浓度为 25 g/L,适宜的发酵初始 pH 为 6.5,且与酵母粉相比,其能更好地利用蛋白胨作为氮源;试验确定 HIT1 为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。[结论]该研究在一定程度上拓宽了产丁醇菌种的资源库,为综合开发利用生物丁醇奠定了菌种多样性基础。

**关键词** 丁醇产生菌;多粘类芽孢杆菌;分离;鉴定

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)10-04259-03

**Isolation and Identification of A New Butanol-producing Strain**

**ZHENG Ju et al** (School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150080)

**Abstract** [Objective] The paper was to isolate and identify a new butanol-producing strain and to study its fermentation conditions. [Method] Through enrichment culture, isolation and screening to get pure microbial strains, and butanol concentrations were detected by gas chromatograph. Finally, the type of isolate strain was identified by the use of morphological observation, physiological and biochemical analysis and 16S rDNA molecular identification. [Result] A bacteria HIT1 with high-yield butanol production was obtained. The suitable glucose concentration was 25 g/L, and the suitable initial pH was 6.5 in its fermentation; compared with the yeast powder, the strain could make better use of peptone as nitrogen source. The HIT1 was identified as *Paenibacillus polymyxa* in the test. [Conclusion] The study broadened the butanol-producing strain resources in a certain extent, and laid the microbial diversity foundation for the comprehensive development and utilization of biological butanol.

**Key words** Butanol production strain; *Paenibacillus polymyxa*; Isolation; Identification

丁醇是一种在能量密度上与汽油相近,可直接用于现有发动机,且燃烧后不产生污染环境的硫氧化物和氮氧化物的新型燃料,被认为一种理想的生物能源,有望在不远的将来在一定程度上替代传统的化石燃料。生物发酵生产丁醇的主要产物为丙酮、丁醇和乙醇,简称 ABE 发酵,是最古老的发酵工业之一,曾在生产规模上仅次于乙醇发酵。但自 20 世纪 60 年代后,由于化学合成丁醇的竞争,ABE 发酵工业逐渐萎缩,直到近几年,随着石油价格的持续上涨及基于石油资源不可再生性的共识,发酵法生产丁醇技术重新引起了广泛关注。

目前,可用于生物发酵生产丁醇的微生物主要有 4 大类<sup>[1]</sup>:丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、丁酸梭菌(*Clostridium saccharobutylicum*)和糖丁酸梭菌(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*),这 4 大类微生物都属于梭状芽孢杆菌,严格厌氧。研究表明,除这 4 大类微生物外,其他种属也存在能够产丁醇的菌株,如 *Bacillus*<sup>[2]</sup>。为拓宽产丁醇微生物的遗传基础,挖掘潜在的产丁醇微生物菌种,笔者开展了产丁醇菌种的筛选鉴定,获得了一株产丁醇的多黏类芽孢杆菌,并从生理生化、形态学以及 16S rDNA 分子层面对其进行了鉴定。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试材料。土壤样品为哈尔滨市郊区柏树底部土壤。

**基金项目** 国家自然科学基金(No. 31100095);国家 863 项目(2011-AA10A205);黑龙江自然科学基金(C201118)。

**作者简介** 郑炬(1987-),男,广西玉林人,硕士研究生,研究方向:微生物生物技术,E-mail:zhju0411@gmail.com。\* 通讯作者,E-mail:yangq@hit.edu.cn。

**收稿日期** 2013-03-09

**1.1.2 培养基。**

(1)富集培养基:65 g 玉米粉,1 500 ml 去离子水,电磁炉煮沸至糊状。

(2)分离培养基。液体分离培养基:葡萄糖 20 g,酵母粉 2 g,蛋白胨 2 g,磷酸二氢钾 0.5 g,磷酸氢二钾 2.5 g,硫酸镁 0.2 g,氯化钠 1 g,半胱氨酸 0.5 g,0.1% (W/V) 刃天青 0.2 ml,去离子水 1 000 ml,pH 6.5。向液体培养基中加入 15~20 g 琼脂即为固体分离培养基。

(3)发酵培养基:葡萄糖 40 g,酵母粉 2 g,蛋白胨 6 g,磷酸二氢钾 0.5 g,磷酸氢二钾 2.5 g,硫酸镁 0.2 g,氯化钠 1 g,半胱氨酸 0.5 g,0.1% (W/V) 刃天青 0.2 ml,去离子水 1 000 ml,pH 6.5。

(4)生理生化鉴定用培养基。将液体分离培养基中的葡萄糖 20 g 改成鉴定用的各种碳源 20 g,其他的条件与分离液体培养基相同。

## 1.2 菌种分离与纯化

**1.2.1 富集培养。**采用玉米醪液培养基对不同的菌源进行产丁醇富集培养,详细的富集过程见参考文献[3]。

**1.2.2 菌种分离纯化。**富集转接 8 次后,用气相色谱仪检测各富集液中丁醇的含量,取丁醇含量相对较高的富集培养液用于分离,即将富集培养液经梯度稀释后涂于固体分离培养基内表面,固体培养基采用 hungate 滚管技术配制<sup>[4]</sup>。挑取具不同形态特征的单菌落至液体分离培养基中,待菌液长至浑浊时再经稀释涂到固体分离培养基内表面,如此反复 5 次,镜检菌体形态一致,检测各单菌发酵液丁醇含量,选取丁醇产量最高者作为研究对象。

**1.3 菌种鉴定**

**1.3.1 生理生化指标。**参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[5]</sup>和《常

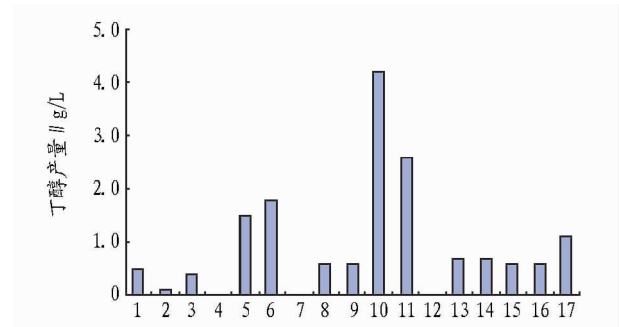
用细菌系统鉴定手册》<sup>[6]</sup> 进行检测。

**1.3.2 16S rDNA 分子生物学鉴定。**用原平皓生物试剂盒提取细菌基因组 DNA,并设计引物扩增其 16S rDNA,正向引物为 BSF8/27;5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 BSR1492/1474: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', PCR 反应体系 (50 μl) 包含: 10 × buffer (Mg<sup>2+</sup>, 10 μmol/L) 5 μl、dNTPs(2.5 mmol/L)5 μl、引物(10 μmol/L)各 2 μl、DNA 模板(0.05 ~0.10 μg/μl)0.5 μl,DNA Taq 酶(5 U/μl)0.5 μl,去离子水补足至 50 μl。反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,62 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 最终延伸 10 min。PCR 产物利用琼脂糖凝胶电泳检测并进行胶回收与 DNA 纯化,将扩增产物连接至 pEASY-T3 质粒中,转化到 Trans1-T1 中,经筛选扩增后,送博仕生物测序公司测序。

将测序后得到的序列在 GenBank 上进行比对,选取同源性较高的菌株及相关菌株的 16S rDNA(表 1)进行序列比对,采用 MEGA5.1 软件构建系统发育树。

| 表 1 用于构建系统发育树微生物的菌株及 GenBank 登录号           |             |
|--------------------------------------------|-------------|
| 菌株                                         | 登录号         |
| <i>Paenibacillus jamilae</i> CECT 5266     | NR_042009.1 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> NRS-1105     | NR_037006.1 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> M1           | FR727737.1  |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2-4-X      | EF488174.1  |
| <i>Paenibacillus peoriae</i> DSM 8320      | NR_042092.1 |
| <i>Paenibacillus kribbensis</i> AM49       | NR_025169.1 |
| <i>Paenibacillus daejeonensis</i> AM141    | NR_025170.1 |
| <i>Paenibacillus borealis</i> KK19         | NR_025299.1 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> SMt02        | JX897987.1  |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | U16166.1    |
| <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB9362  | X68180.1    |
| <i>Clostridium saccharobutylicum</i> P262  | U16147.1    |

**1.4 丁醇含量测定** 发酵液中丁醇含量采用福立 GC-9790 气相色谱仪测定,色谱条件为:色谱柱为毛细色谱柱(FFAP,键和改性的交联聚乙二醇)30 m,柱温 110 ℃,2 min,升温速率为 10 ~170 ℃/min,检测温度为 300 ℃,汽化室温 205 ℃,氢气 0.1 MPa,空气 0.1 MPa,氮气 0.04 MPa。



注:1~17 为分离菌株编号。

图 1 分离菌株发酵生产丁醇能力比较

2 结果与分析

**2.1 目标菌株的获得** 经过筛选分离得到 17 个未知菌株,检测这 17 个菌株的产丁醇能力,结果见图 1,其中 10 号菌株

丁醇产量为 4.208 g,产丁醇能力远超其他菌株,将其选为后续的研究对象,并编号为 HIT1。

**2.2 形态特征** HIT1 菌株在固体培养基上能形成圆盘状乳白色菌落,菌落中间不透明,周边能形成透明圈,边缘光滑;菌落表面中央突起,有光泽,培养 48 h 后菌落大小可达 1.5 ~3.0 mm(图 2)。菌体为杆状细菌,大小约为 0.5 ~1 μm ×3 ~5 μm(图 3)。HIT1 菌株为兼性厌氧菌,产芽孢,且芽孢为卵圆形,革兰氏阳性,有鞭毛。



图 2 HIT1 在固体培养基上形成的单菌落

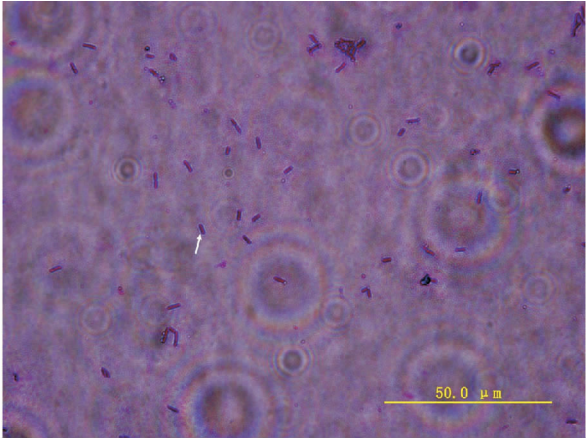


图 3 HIT1 的菌体形态

**2.3 生理生化特征** 菌株 HIT1 能水解利用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、水杨苷、甘露糖、山梨醇、淀粉,能降解果胶、支链淀粉、木聚糖,不能利用核糖、脂酶和吡啶,与多黏类芽孢杆菌的鉴别特征相吻合。

**2.4 16S rDNA 系统发育分析** 从分离菌株 HIT1 的 16S rDNA 基因中克隆出来的片段长 1 515 bp,其序列已提交到数据库 GenBank 上,登录号为 KC189948。

将克隆出来的碱基序列在 GenBank 上进行比对,其中同源性为 99% 的菌株主要有 *Paenibacillus*,*bacillus* 2 个属下的不同种,其中以 *Paenibacillus polymyxa* 居多,利用软件 Mega5.1 采用邻接法绘制系统发育树(图 4),其自展值为 1 000 次。从图中可看出,菌株 HIT1 与 *Paenibacillus polymyxa* 亲缘关系最近。

**2.5 菌株 HIT1 产丁醇特性研究** 通过发酵条件优化,确

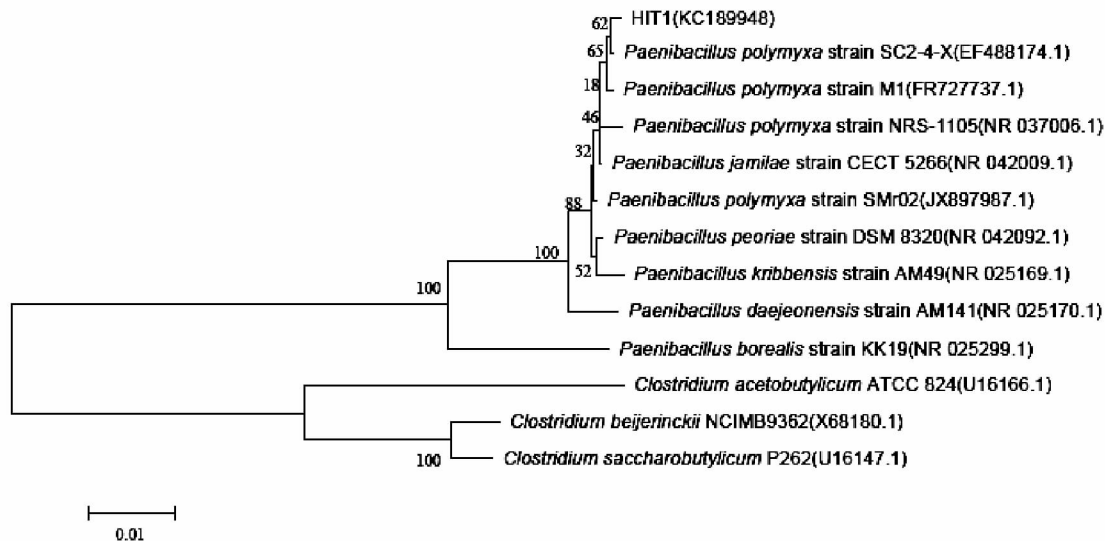


图4 菌株 HIT1 与类芽孢杆菌及梭状芽孢杆菌属相关菌株 16S rDNA 比对所构建的系统发育树

定发酵适宜的葡萄糖浓度,由图 5 可看出,随着葡萄糖浓度的增加,丁醇产量也随之提高,但在葡萄糖浓度为 25 g/L 之后,丁醇产量的提高已不太明显,可能是由于在高葡萄糖浓度条件下,丁醇代谢流已接近饱和,从而导致丁醇产量的提高不再明显,结合经济节约的原则,将发酵时葡萄糖浓度设定为 25 g/L。

从初始 pH 对丁醇产量的影响试验可看出,其最佳的发酵初始 pH 值介于 6.5 到 7.0 之间(图 6),初始酸性环境和碱性环境可能对 HIT1 菌体生长产生影响,进而进一步影响后续菌体产丁醇的过程。

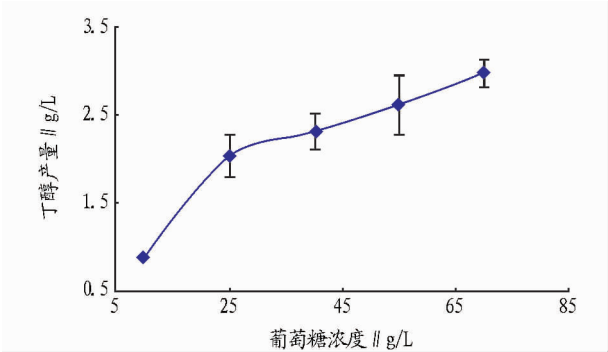


图5 不同葡萄糖浓度下菌株 HIT1 的丁醇产量

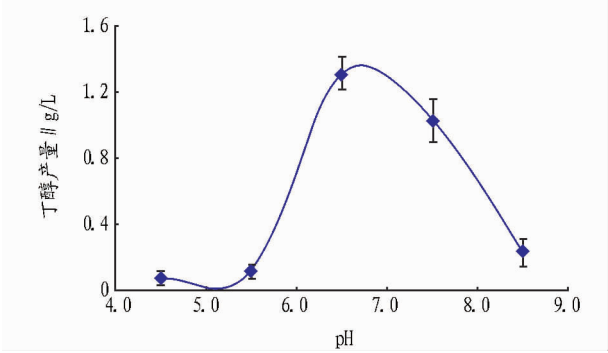
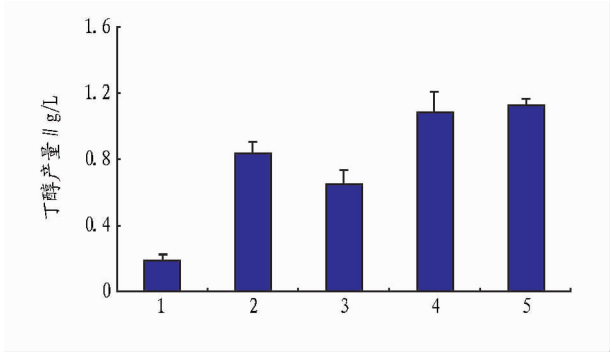


图6 初始 pH 对菌株 HIT1 丁醇产量的影响

试验分别比较了不同有机氮源及其组合对丁醇产量的

影响(图 7),结果表明在酵母粉和蛋白胨之间,HIT1 能更好地利用蛋白胨作为氮源来进行发酵,同时,两者的组合利用能进一步提高丁醇产量,但组合的添加量由各添加 2 g/L 增加到各 4 g/L 时,丁醇产量却没有增加,这可能是由于过量的有机氮源仅促进了菌体的生长,而丁醇的合成能力在代谢的其他环节已被限制。



注:1. 不加蛋白胨也不加酵母粉;2. 只添加 2 g/L 的蛋白胨;3. 只添加 2 g/L 的酵母粉;4. 同时添加 2 g/L 的蛋白胨和酵母粉;5. 同时添加 4 g/L 的蛋白胨和酵母粉。

图7 有机氮源对菌株 HIT1 丁醇生产的影响

3 结论

该研究经过一系列的富集培养和分离纯化,以及发酵比较生产丁醇能力试验,获得了一株产丁醇的菌株 HIT1,通过形态学观察及生理生化特性分析,结合《伯杰细菌鉴定手册》及《常见细菌系统鉴定手册》鉴别特征,以及 16S rDNA 分子鉴定,确定菌株 HIT1 为类芽孢杆菌科多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)。

*Paenibacillus terrae* HPL-003<sup>[7]</sup> 以及 *Paenibacillus polymyxa* E681<sup>[8]</sup> 全基因组测序都表明,在类芽孢杆菌基因组中存在众多与产丁醇相关的基因,如丁醇脱氢酶 1 等,但目前尚未有类芽孢杆菌产丁醇的研究报道,该研究所发现的新型丁醇产生菌株类芽孢杆菌 HIT1 为首次发现,在一定程度上拓宽了产丁醇菌种宝贵的资源库,为综合开发利用生物丁醇

2.42%。2 个品种含 2 种类型的抗白粉病基因,占 1.62%; 124 个品种中未发现 *Pm21* + *Pm30* 和 3 个基因同时存在的材料;3 种类型抗白粉病基因均不携带的品种有 97 个,占 78.23%。

### 3 讨论

分子标记辅助选择技术与常规育种紧密结合有助于加快小麦抗病性育种的进程。在常规抗病育种过程中,必须在病害发生条件下进行抗病后代选择,费时费力,且受病原菌毒力变异和环境条件等因素的影响,时常造成选择错误。亲本组合若具有多个抗病基因时,根据植株抗病表现型对后代进行常规选择,因抗病基因的分离,无法确定被选择的单株所含的抗病基因的归属,而且不断选择还会造成抗病基因丢失,最终很难育成预期的聚合多基因品种,且育成品种的抗病基因也很难确定。应用分子标记辅助选择进行抗病育种不仅能极大地缩短抗病育种进程,而且能大幅提高选择的准确性。王心宇等<sup>[14]</sup>对杂交育种高代群体进行分子标记辅助选择,筛选到了聚合基因型 *Pm21* + *Pm4a*、*Pm21* + *Pm8* 等的后代植株,而且发现聚合抗病基因的抗病性能得到极大改善。张增艳等<sup>[4]</sup>利用 *Pm4*、*Pm13*、*Pm21* 的特异标记筛选了 *Pm4b* + *Pm13* + *Pm21*、*Pm4b* + *Pm21*、*Pm13* + *Pm21* 等聚合多个基因的抗病植株。桑大军等<sup>[8]</sup>用与 *Pm2*、*Pm4*、*Pm8*、*Pm13*、*Pm21* 和 *Pm24* 紧密连锁的 PCR 标记对 50 年来河南省大面积推广的 30 个小麦品种的抗白粉病基因进行鉴定。笔者在该研究中利用 STS、SCAR 和 SSR 等标记对 124 份小麦品种资源中 *Pm21*、*Pm30*、*Pm34* 抗白粉病基因进行鉴定,明确了绝大部分品种(系)所含的抗病基因,为这些材料快速而有效地利用奠定了基础,为更有效地进行小麦抗白粉病育种提供了理论指导。

分子标记技术已成功应用于育种工作中,但分子标记辅助选择仍依附于常规育种,故应将分子标记辅助选择纳入常规育种计划中,同时应建立相应的分子标记辅助育种体系,对小麦育种和生产的可持续发展具有深远意义。目前,在多基因聚合体的分子标记检测中,一个材料需要对逐个基因单独进行分子检测,不仅比较费时,而且成本高昂。因此,为进

(上接第 4261 页)

奠定了菌种多样性基础。此外,由于传统产丁醇 4 大类菌株面临着严格厌氧、产量难以进一步提高等的瓶颈,兼性厌氧菌的引入,有效地提高了丁醇产生菌的耐氧能力,兼性厌氧菌在不同的氧环境下产丁醇的代谢机理值得进一步深入研究,因为丁醇产生菌耐氧能力的提高是提高丁醇产量的关键之一<sup>[9]</sup>。

### 参考文献

[1] KEIS S, SHAHEEN R, JONES D T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. [J] International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(6): 2095–2103.

[2] 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

步提高分子标记辅助选择的效率,可深入研究能一个扩增体系(一个扩增管)同时检测多种目的基因的技术和方法。

### 参考文献

[1] 刘万才, 邵振润. 我国小麦白粉病大区流行的气候因素分析[J]. 植保技术与推广, 1998, 18(1): 3–5.

[2] 陈涛, 隋建枢, 彭昕, 等. 小麦抗白粉病基因 *Pm13* 和 *Pm21* 的多重 PCR 检测[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(1): 31–35.

[3] 谢超杰, 杨作民, 孙其信. 小麦抗白粉病基因[J]. 西北植物学报, 2003, 23(5): 822–829.

[4] 张增艳, 陈孝, 张超, 等. 分子标记选择小麦抗白粉病基因 *Pm4b*、*Pm13* 和 *Pm21* 聚合体[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 789–793.

[5] 王长有, 王耀勇, 张改生, 等. 小麦抗白粉病和条锈病基因的分子标记辅助鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(3): 181–186.

[6] 高安礼, 何华纲, 陈全战, 等. 分子标记辅助选择小麦抗白粉病基因 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 的聚合体[J]. 作物学报, 2005, 31(11): 1400–1405.

[7] 董建力, 张增艳, 王敬东, 等. 3 个小麦抗白粉病基因聚合体的 STS 和 SCAR 标记[J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 64–67.

[8] 桑大军, 许为钢, 胡琳, 等. 河南省小麦品种白粉病抗性基因的分子鉴定及分子标记辅助育种[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 86–91.

[9] CAO A Z, WANG X E, CHEN Y P, et al. A sequence-specific PCR marker linked with *Pm21* distal regions chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of *Triticum aestivum* L. and 6VS of *Haynaldia villosa* [J]. Plant Breeding, 2006, 125(3): 201–205.

[10] LIU Z, SUN Q, NI Z, et al. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat [J]. Plant Breeding, 1999, 118(3): 215–219.

[11] LIU Z Y, SUN Q X, NI Z F, et al. Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer [J]. Euphytica, 2002, 123(1): 21–29.

[12] MIRANDA L M, MURPHY J P, MARSHALL D, et al. *Pm34*: A new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(8): 1497–1504.

[13] DEVOS K M, GALE M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84(5/6): 567–572.

[14] 王心宇, 陈佩度, 张守忠. 小麦白粉病抗性基因的聚合及其分子标记辅助选择[J]. 遗传学报, 2001, 28(7): 640–646.

[15] NIU J S, LIU J, MA W B, et al. The relationship of methyl jasmonate enhanced powdery mildew resistance in wheat and the expressions of 9 disease resistance related genes [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(4): 504–508.

[16] 沈红霞, 辛明明, 梁荣奇, 等. 野生二粒小麦导入普通小麦抗白粉病基因的分子标记[J]. 华北农学报, 2012(4): 7–11.

生物学通报, 2010, 37(1): 7–11.

[3] 陈军, 杨蕴刘. 高丁醇比丙酮丁醇梭菌的选育与应用[J]. 工业微生物, 1996, 26(4): 1–6.

[4] HUNGATE R, MACY J. The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes [J]. Bulletin of the Ecological Research Committee, 1973, 17: 123–126.

[5] GARRITY G M, BELL J A, LILBURN T G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Second edition. New York: Springer-Verlag, 2004.

[6] 东秀珠, 陈妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[7] SHIN S H, KIM S, KIM S, et al. Genome Sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003, a Xylanase-Producing Bacterium Isolated from Soil Found in Forest Residue [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(5): 1266.

[8] KIM J F, JEONG H, PARK S Y, et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22): 6103–6104.

[9] PAPOUTSAKIS E T. Engineering solventogenic clostridia [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 420–429.