

文章编号:0254-0096(2016)12-3240-06

# *Clostridium acetobutylicum* 的亚硝基胍和 钴-60 复合诱变

冯鸿燕<sup>1,2</sup>, 李 东<sup>1,3</sup>, 闫志英<sup>1</sup>, 袁月祥<sup>1</sup>, 傅 舒<sup>1,2</sup>, 刘晓风<sup>1</sup>, 廖银章<sup>1</sup>

(1. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;  
3. 中国科学院可再生能源重点实验室, 广州 510640)

**摘 要:** 利用化学诱变剂亚硝基胍及物理诱变剂钴-60对丙酮丁醇梭菌YBD(*Clostridium acetobutylicum* YBD)进行复合诱变,结合多次传代培养,筛选获得一株编号为500-1的突变株。该菌株经6代培养后丁醇产量为15.40 g/L;且能耐受15 g/L的丁醇;在10%玉米醪培养基中,丁醇产量为15.57 g/L,较出发菌株提高27.62%;在10 L发酵罐发酵实验中,以玉米粉为发酵原料,36 h时突变株丁醇产量可达14.24 g/L,生产速率为0.40 g/(L·h),较出发菌株的生产速率提高207.69%。

**关键词:** 丙酮丁醇梭菌; 复合诱变; 丙酮-丁醇-乙醇发酵; 稳定性; 丁醇耐受性

**中图分类号:** TQ923

**文献标识码:** A

## 0 引 言

丁醇可作为一种石油替代燃料,其能量密度比乙醇高、腐蚀性低且与汽油有更高的混合比<sup>[1]</sup>。因此在作为燃料方面显现出更大的优势。然而,分批式发酵生产生物丁醇面临丁醇产率慢(<0.3 g/(L·h))、产量低(<13 g/L),且对菌株有毒害性等问题<sup>[2,3]</sup>。诱变育种是提高丙酮-丁醇-乙醇(ABE)发酵中丁醇产量、生产速率及菌株对丁醇的耐受性的一种简单且行之有效的方法。张益葵<sup>[4]</sup>利用亚硝基胍(NTG)和甲基磺酸乙酯(EMS)化学诱变剂处理从土壤中分离得到的产丁醇菌株,经过抗性筛选获得了几株丁醇比例高的菌株。高 凯等<sup>[5]</sup>利用亚硝基胍对丙酮丁醇梭菌(*C. acetobutylicum* ATCC 824)进行诱变,结合外源添加丁醇的平板筛选,获得一株高产菌株。Annous等<sup>[6]</sup>使用亚硝基胍化诱变剂处理出发菌株 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 获得了 *Clostridium beijerinckii* BA 101 突变株,该菌株能利用80 g/L葡萄糖发酵生产丁醇20.9 g/L。

亚硝基胍对丙酮丁醇梭菌诱变效果较好,而钴-60(<sup>60</sup>Co)辐照诱变技术在该菌中的应用极少,两者

复合诱变丙酮丁醇梭菌尚未见报道。本研究将这两种诱变技术结合,对丙酮丁醇梭菌YBD(*Clostridium acetobutylicum* YBD)进行复合诱变,获得一株高效突变株,编号为500-1,研究其丁醇耐受性、生长周期等特性,以期获得稳定、高效产丁醇梭菌,降低丁醇生产成本,提高生产效益。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验菌株

*Clostridium acetobutylicum* YBD 由本实验室分离获得。

### 1.2 培养基及其制备方法

液体种子培养基(g/L):葡萄糖 10,磷酸氢二钾 0.5,磷酸二氢钾 0.5,硫酸锰 0.01,对氨基苯甲酸 0.001,硫酸镁 0.2,硫酸亚铁 0.01,生物素 0.000002,维生素 B<sub>1</sub> 0.001,水解络蛋白 4,自然 pH 值。在圆底烧瓶中煮沸加两滴 0.2%刃天青指示剂煮至培养基颜色变为棕黄色,边通高纯氮气边分装于 20 mL 厌氧管中或 150 mL 厌氧瓶中,115 °C 灭菌 30 min 备用。

分离培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 10,酵母

收稿日期:2014-12-19

基金项目:中国科学院可再生能源重点实验室(y407k11001)

通信作者:刘晓风(1964—),男,硕士、研究员,主要从事微生物学方面的研究。liuxf@cib.ac.cn

粉 3, 葡萄糖 5, 可溶性淀粉 1, 氯化钠 5, 醋酸钠 3, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, 琼脂 20, pH 值 6.8。培养基制备方法同上。

发酵培养基(g/L): 10%玉米醪, 玉米粉 100, 糊化 60 min, 自然 pH 值分装于 20 mL 厌氧管中或 150 mL 厌氧瓶中, 通氮气除氧, 115 °C 灭菌 30 min 备用。

### 1.3 培养条件

厌氧 37 °C 恒温培养箱中培养。分离筛选按照 Hungate<sup>[7]</sup> 厌氧操作方法, 利用滚管法分离获得单菌落, 菌株保存采用厌氧管斜面法。

### 1.4 诱变处理

#### 1.4.1 菌悬液的制备

将活化的菌株以 3% 的接种量接种于盛有液体种子培养基的厌氧管中, 37 °C、120 r/min 振荡培养 12~14 h, 取出于 4 °C、4000 r/min 的条件下离心 5 min, 弃上清液, 加入除氧无菌水混匀制成菌悬液, 稀释至菌悬液浓度为每毫升  $10^8$  个。

#### 1.4.2 NTG 诱变

NTG 母液配制: 参考文献[8], 将水改为 pH 值为 7.5 的磷酸盐(PBS)缓冲液。

取不同量的菌悬液及 NTG 母液(1.2 mg/mL)于已灭菌并无氧的厌氧管中, 使 NTG 的终浓度分别为 0、50、100、150、200、300、400  $\mu\text{g/mL}$ , 放入 28 °C 水浴锅中, 反应 30 min 后各取 1 mL 菌悬液, 用除氧的 PBS 缓冲液逐级稀释至  $10^{-3}$ , 滚管, 黑暗中培养 48 h 后计数, 由式(1)和式(2)计算亚硝基胍诱变的致死率和正突变率。

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照菌落数} - \text{处理后菌落数}}{\text{对照菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{正突变率} = \frac{\text{产量提高的突变株数目}}{\text{突变株总数}} \times 100\% \quad (2)$$

#### 1.4.3 <sup>60</sup>Co 诱变

将亚硝基胍诱变后筛选的高效突变株制成的菌悬液于 0、10、50、100、300、500、800 Gy 6 个剂量下辐照, 辐照剂量率为 5.95 Gy/min。辐照结束后用无氧 PBS 缓冲溶液适当稀释, 滚管, 于黑暗中培养 48 h 后计数, 计算 <sup>60</sup>Co 诱变的致死率和正突变率。

### 1.5 高产丁醇突变株筛选

诱变后, 挑取滚管后生长较好的单菌落于装有 10 mL 10% 玉米醪培养基的厌氧管中, 37 °C 培养

72 h, 测丙酮、丁醇及乙醇(溶剂)的产量, 以此选取丁醇产量有较大提高的正突变株。初筛后获得的正突变株以 10% (v/v) 接种量接种到装有 50 mL 10% 玉米醪培养基的厌氧瓶中, 37 °C 培养 72 h 后测丁醇产量, 筛选高产丁醇菌株进行传代培养, 经反复筛选, 获得稳定高产突变株。

### 1.6 高效突变株特性研究

#### 1.6.1 丁醇耐受性

将出发菌株及高产突变菌株的菌悬液按 3% 的接种量接种至含有不同浓度丁醇的液体种子培养基中, 37 °C 恒温培养 48 h。

#### 1.6.2 生长周期

将出发菌株和高产突变株的菌悬液以 3% 接种量接种至液体种子培养基中, 37 °C 恒温培养箱中培养, 每隔 2 h 各取 3 支测  $OD_{600}$ , 以未接种的液体种子培养基作空白对照。

#### 1.6.3 放大实验

将出发菌株和高产突变株以 10% 接种量接种至 10 L 发酵罐中, 37 °C 静置发酵 72 h, 每隔 12 h 取样测各溶剂产量、挥发酸及残还原糖浓度。

### 1.7 测量方法

#### 1.7.1 丙酮、乙醇、丁醇溶剂测定方法

气相色谱法, 以 0.24% 异丁醇为内标, 氢火焰离子化检测器, 色谱柱为 GDX-101 填充柱, 柱箱温度 80 °C, 检测器温度 200 °C, 进样器 210 °C,  $N_2$  为载气。

#### 1.7.2 还原糖浓度测定方法

3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[9]</sup>。

#### 1.7.3 乙酸、丁酸浓度测定

气相色谱法, 样品经离心后取上清液, 加入甲酸使 pH 值小于 3.0, 用等体积乙醚萃取, 离心后取上层液体。测定条件选用程序性升温, 初始温度 70 °C, 保持 10 min, 以 30 °C/min 速率升温至 120 °C, 保持 0.5 min, 再以 10 °C/min 速率升温至 160 °C, 保持 1 min, 最后以 35 °C/min 速率升温至 250 °C, 保持 2 min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 NTG 诱变结果

出发菌株 YBD(*Clostridium acetobutylicum* YBD) 在不同 NTG 浓度下反应 30 min, 致死率和正突变率结果如图 1 所示, 其致死率随 NTG 浓度的增大而增

大。当 NTG 浓度为 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,致死率为 82.00%;正突变率达到最大,为 13.75%。这与目前研究报道结论一致,在致死率约 80% 的范围内,正突变率最高<sup>[10,11]</sup>。

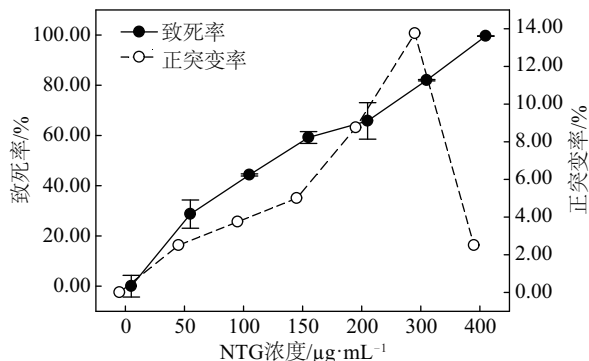


图1 不同NTG浓度对丙酮丁醇梭菌诱变效应的影响

Fig. 1 The effect of different NTG concentration on mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum*

从分离培养基中共挑取 160 株诱变株,经初筛及发酵试验后获得一株编号为 300-25 的高效突变株,其丁醇产量为 14.34 g/L,将其作为  $^{60}\text{Co}$  辐照诱变试验的出发菌株。

## 2.2 $^{60}\text{Co}$ 诱变结果

在不同  $^{60}\text{Co}$  辐照剂量下,菌株的致死率和正突变率见图 2。从图 2 可知,随着  $^{60}\text{Co}$  辐照剂量的增大,菌株的致死率逐渐增大,而正突变率先增大后减小。当剂量达到 500 Gy 时,致死率为 84.90%,正突变率最高,为 10.10%。 $^{60}\text{Co}$  诱变后,获得 223 株

诱变株,从中筛选获得 8 株丁醇产量有较大提高的突变株,编号分别为 50-4、50-7、300-5、500-1、500-26、500-27、500-28、800-2。

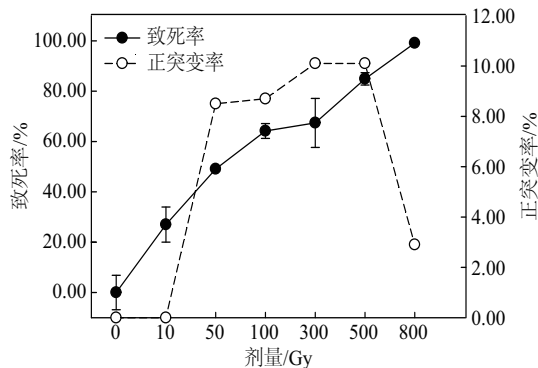


图2 不同 $^{60}\text{Co}$ 剂量对丙酮丁醇梭菌诱变效应的影响

Fig. 2 The effect of different dosage of  $^{60}\text{Co}$  on mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum*

## 2.3 突变株稳定性试验结果

将复合诱变筛选获得的 8 株突变株进行传代培养,各代丁醇产量及较出发菌株的提高率见表 1。8 株突变株中 500-1 经 6 代培养后,丁醇产量较稳定,第 6 代丁醇产量为 15.40 g/L。在传代培养过程中除 500-1 外,其余突变株丁醇产量波动较大,这是诱变剂进入生物体内时,菌株为了生存进行了自我修复,能力较弱的菌株对已形成的突变进行复制而被遗传下来,表型上成为突变体,而修复能力较强的菌株,在世代中不断地修复,最终可能恢复到原始状态<sup>[11]</sup>。

表 1 8 株突变株 6 代的丁醇产量及较出发菌株的提高率

Table 1 The butanol production and increasing rate of eight mutants during six generations

培养代数	指标	出发菌株	诱变株							
			50-4	50-7	300-5	500-1	500-26	500-27	500-28	800-2
1	丁醇/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	12.20	14.82	14.27	14.57	15.57	14.98	14.41	14.40	14.25
	提高率/%		21.46	16.94	19.46	27.62	22.80	18.13	18.04	16.78
2	丁醇/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	12.15	14.27	12.06	13.47	13.78	13.66	11.40	11.89	13.82
	提高率/%		17.45	-0.71	10.85	13.42	12.44	-6.18	-2.10	13.75
3	丁醇/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	12.24	12.67	12.06	11.95	14.45	12.25	11.72	11.41	11.57
	提高率/%		3.53	-1.45	-2.34	18.07	0.10	-4.24	-6.77	-5.48
4	丁醇/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	12.18	12.41	12.30	13.36	14.07	12.62	12.16	12.61	13.15
	提高率/%		1.87	0.95	9.72	15.56	3.61	-0.16	3.56	7.96
5	丁醇/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	12.13	10.89	12.05	13.25	15.23	13.38	12.76	12.80	13.89
	提高率/%		-10.21	-0.68	9.21	25.55	10.33	5.22	5.53	14.51
6	丁醇/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	12.16	11.23	13.45	14.22	15.40	12.98	13.38	13.99	13.42
	提高率/%		-7.61	10.63	16.94	26.63	6.75	10.06	15.06	10.39

### 2.4 突变株 500-1 特性研究

#### 2.4.1 丁醇耐受性

丁醇的亲脂性比其他产物在破坏细胞膜的磷脂组分和增强膜流动性方面显示出更强的作用<sup>[12]</sup>。因此对丁醇的耐受性决定最终溶剂产量。如图 3 所示,突变株在不同丁醇浓度下的生物量均比出发菌株高;低浓度的丁醇对丙酮丁醇梭菌的生长有一定促进作用。Kathryn 等<sup>[13]</sup>用电子自旋共振法和自旋标记法分析表明,低浓度丁醇对 *C.acetobutylicum* 中提取的膜流动性无影响,可能是菌株将低浓度的丁醇作为碳源加以利用。当丁醇浓度达到 6 g/L 后两株菌的  $OD_{600}$  均有缓慢下降的趋势,表明菌株开始对丁醇敏感。当丁醇浓度达到 12 g/L 后出发菌株的生物量急剧下降,这是因为高浓度的丁醇严重破坏了细胞质膜的结构,从而破坏细胞内外的 pH 值梯度,降低了胞内 ATP 水平和影响葡萄糖的吸收,继而抑制菌株的生长繁殖乃至杀死细胞<sup>[12]</sup>。当丁醇浓度达到 15 g/L 时,出发菌株的  $OD_{600}$  仅为 0.4,而突变株在含有 13~15 g/L 丁醇的培养基仍能较好生长,  $OD_{600}$  维持在 1.0 以上。由此可知,突变株较出发菌株对丁醇有更高的耐受性。

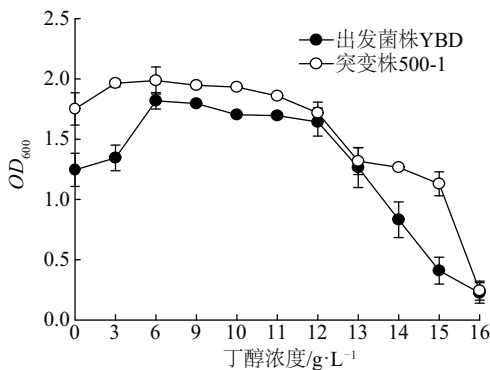


图3 出发株与突变株耐受丁醇对比

Fig. 3 Compared initial strain with mutant strain of tolerance of butanol

#### 2.4.2 生长周期

通过突变株和出发株在液体种子培养基中生长情况绘制生长曲线(如图 4)。从图 4 可看出,突变株的延滞期仅有 2 h,而出发菌株有 4 h;突变株的对数生长期为 2~12 h,出发菌株为 4~18 h;突变株稳定期长达 14 h,出发菌株仅有 6 h;突变株的衰亡期出现在 26 h 后,出发菌株在 24 h 后就开始进入衰亡期。可见突变株不仅在生长速度和生物量

方面较出发菌株有较大提高,而且活菌数保持稳定的时间也更长。

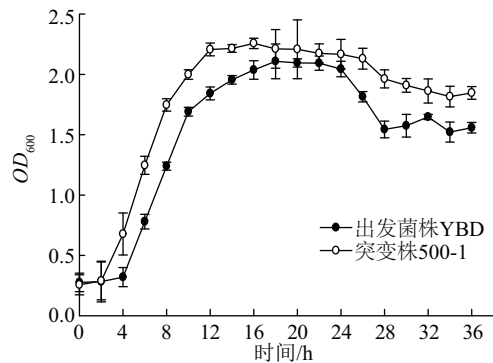
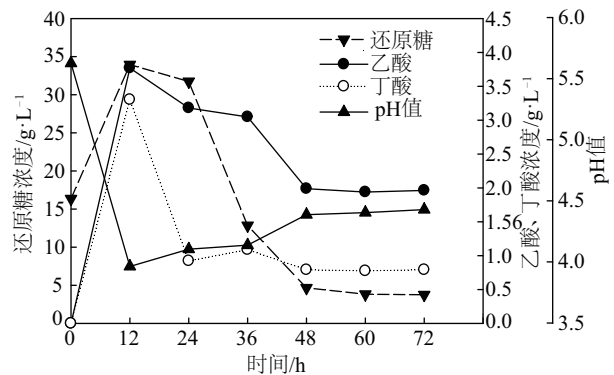


图4 出发菌株与突变株生长周期对比

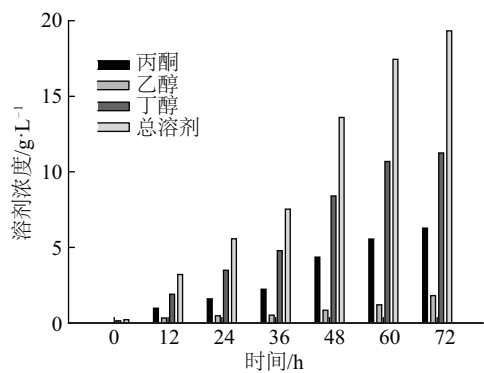
Fig. 4 Compared initial strain with mutant strain of growth cycle

#### 2.4.3 放大实验

将突变菌株 500-1 和出发菌株 YBD 在 10 L 发酵罐中以玉米粉为培养基进行发酵试验,每隔 12 h 取样测定各指标,结果见图 5 和图 6。从图 6 可知,0~12 h 为 ABE 发酵的产酸阶段,在此阶段期间发酵



a.



b.

图5 突变株 500-1 发酵时间曲线

Fig. 5 Time course of ABE fermentation of mutant strain 500-1

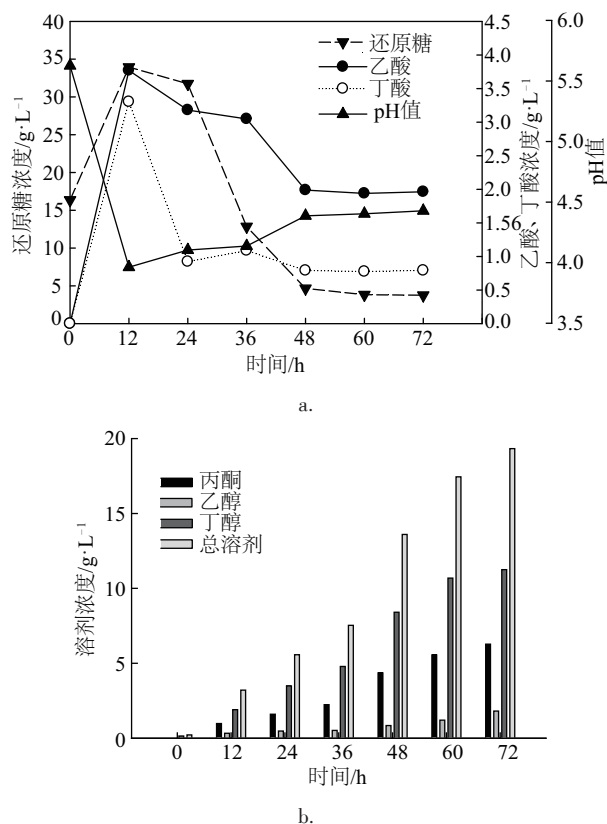


图6 出发菌株YBD发酵时间曲线

Fig. 6 Time course of ABE fermentation of initial strain YBD

液 pH 值迅速降低,淀粉得到充分水解,还原糖浓度迅速增大,乙酸和丁酸大量累积,丁醇等溶剂产量极低。12 h 后,发酵体系由产酸阶段向产溶剂阶段转变,表现为发酵液 pH 值缓慢回升,还原糖、乙酸、丁酸浓度均急剧下降,各溶剂浓度有较大幅增大。突变株 500-1 在 36 h 后,丁醇等溶剂产量趋于稳定。从经济角度考虑,可视为发酵结束;而出发菌株 YBD 此时正处于产溶剂的高峰期。36 h 时诱变株 500-1 的丁醇产量为 14.24 g/L,生产速率 0.40 g/(L·h);此时出发菌株 YBD 的丁醇产量为 4.78 g/L,生产速率为 0.13 g/(L·h)。72 h 时,突变株 500-1 的 pH 值为 4.62,残还原糖为 3.75 g/L,丁醇、丙酮和乙醇产量分别为 14.86、9.48、1.25 g/L;出发菌株 YBD 的 pH 值为 5.06,残还原糖为 12.10 g/L,丁醇、丙酮和乙醇产量分别为 11.25、6.27、1.81 g/L。

### 3 结 论

1)利用 NTG 诱变丙酮丁醇梭菌,最高正突变率发生在 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下;<sup>60</sup>Co 诱变最高突变率发

生在 500 Gy 剂量下。实验结果可为诱变育种提供参数。

2)利用 NTG 和 <sup>60</sup>Co 复合诱变丙酮丁醇梭菌,选育的突变株 500-1,在 50 mL 发酵体系中,丁醇产量 15.57 g/L,较出发菌株提高了 27.62%。

3)从 10 L 发酵罐发酵试验中可看出,突变株 500-1 在发酵 36 h 后丁醇产量趋于稳定,从经济角度考虑,可视为发酵结束,此时的生产速率为 0.40 g/(L·h),较出发株提高了 207.69%。

### [参考文献]

- [1] Gheshlaghi R, Scharer J M, Moo-Young M, et al. Metabolic pathways of *Clostridia* for producing butanol [J]. *Biotechnol*, 2009, 27(6): 764—781.
- [2] Lee S, Park J, Jang S, et al. Fermentative butanol production by *Clostridia* [J]. *Biotechnology and Bioenergy*, 2008, 101(2): 209—228.
- [3] Bowles L K, Ellelson W L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50 (5) : 1165—1170.
- [4] 张益菜. 高丁醇比丙酮丁醇梭菌的选育与应用[J]. *工业微生物*, 1996, (4): 1—6.
- [4] Zhang Yifen, Breeding and application of high butanol ratio *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Industrial Microorganism*, 1996, (4): 1—6.
- [5] 高 凯, 李 云, 田 沈, 等. 高产丙酮丁醇梭菌的诱变筛选及特性研究[J]. *太阳能学报*, 2014, 35(1): 36—40.
- [5] Gao Kai, Li Yun, Tian Shen, et al. Screening and characterization of a mutant of *Clostridium acetobutylicum* with increased butanol tolerance and production [J]. *Acta Energiæ Solaris Sinica*, 2014, 35 (1): 36—40.
- [6] Annous B A, Blaschek H P. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(9): 2544—2548.
- [7] Hungate R E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes [J]. *Methods Microbiol*, 1969, 3(17): 117—132.
- [8] 于 鹏, 张兰威, 许 倩, 等. 亚硝基胍诱变选育丁二酮高产菌 [J]. *乳业科学与技术*, 2006, (5): 218—220.

- [8] Yu Peng, Zhang Lanwei, Xu Qian, et al. Screening mutagenized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetyl strains overproducing diacetyl[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2006, (5): 218—220.
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chemical, 1959, 31(3): 426—428.
- [10] Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological process: A survey of literature[J]. International Journal Hydrogen Energy, 2001, 26(1): 13—28.
- [11] Bowles L K, Ellefson W L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(5): 1165—1170.
- [12] 孙晓杰. 丙酮丁醇梭菌诱变育种及丁醇发酵研究[D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [12] Sun Xiaojie. Study on the mutation breeding of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and butanol fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University, 2009.
- [13] Kathryn V S, Jeffrey A S, Bland S M. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47(1): 193.

## COMPOUND MUTATION OF *Clostridium acetobutylicum* WITH NITROSOGUANIDINE AND COBALT-60

Feng Hongyan<sup>1,2</sup>, Li Dong<sup>1,3</sup>, Yan Zhiying<sup>1</sup>, Yuan Yuexiang<sup>1</sup>, Fu Shu<sup>1,2</sup>,  
Liu Xiaofeng<sup>1</sup>, Liao Yinzhang<sup>1</sup>

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Renewable Energy, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** *Clostridium acetobutylicum* YBD was mutated by chemical mutagens nitrosoguanidine (NTG) and physical mutagens cobalt-60, and a mutant strain, recorded 500-1 with multiple generations culture was acquired. After six generations culture, the mutation strain could produce butanol of 15.40 g/L and tolerate butanol of 15 g/L. The mutant strain could produce the butanol quantity reached 15.57 g/L. Compared with the original strain, the butanol quantity increased by 27.62%, respectively. In the 10 L-fermentation experiment with corn flour as the raw material, the butanol quantity of mutant strain of 14.24 g/L was achieved after 36 hours, and the yield was 0.40 g/(L·h) which was increased by 207.69% than the yield of initial strain.

**Keywords:** *Clostridium acetobutylicum*; compound mutation; ABE fermentation; stability; tolerance of butanol