

一种嗜热厌氧杆菌及利用其生产乙醇的方法

技术领域

一种生产乙醇的菌株和其高浓度糖耐受提高的驯化方法，以及利用该菌株生产乙醇的方法。本发明涉及以葡萄糖、木糖为主要原料，利用嗜热厌氧杆菌（*Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27/ Δ ldh）突变株发酵生产乙醇的方法。

背景技术

乙醇是一种新型清洁燃料，是可再生能源开发利用的重要方向。发展生物乙醇是大势所趋。第二代生物乙醇利用植物纤维经过预处理、无机酸或纤维素酶水解再通过生物发酵方式生产。而氢能因其清洁、能量密度高、制取方法多样等特点，吸引着研究者的关注。

以纤维质类物质为原料发酵生产乙醇的主要障碍在于成本过高。采用嗜热厌氧菌（*Thermoanaerobacterium*）发酵能够较好的解决该困难。以其为发酵菌株生产化学品具有如下几方面的优势（O-Thong, S. et al., International Journal of Hydrogen Energy, 2008. 33(4): 1204-1214）：（1）降低以纤维质类原料发酵过程中的纤维素酶添加量。这是因为该类菌株本身即是一类半纤维素分解微生物，其能够在高温下水解木聚糖发酵产生多种化学品，从而减少了纤维素酶的需求量。（2）高温连续发酵生产过程，有利于乙醇的分离纯化。（3）可以生料发酵生产乙醇。由于工业规模发酵生产乙醇过程中，纯种发酵对于设备的无菌要求较高，因此大幅增加了经济成本。但采用嗜热菌发酵生产，由于绝大部分常温微生物较难在高温下生产，因此对发酵过程的无菌要求不高，从而进一步降低了生产成本。（4）能够利用高温有机废水为发酵原料，这一方面降低了生产成本，另一方面也减轻了环境压力。

申请人前期研究中筛选到一株嗜热厌氧杆菌（Li, S., et al., Bioresource Technology, 2010,101(22): 8718-8724, Cai, Y., et al., Enzyme and Microbial Technology, 2011. 48(2): p. 155-161），该菌株能够有效利用葡萄糖、木糖等底物

发酵积累乙醇、氢气等。通过对其进行基因改造，敲除乳酸脱氢酶基因，代谢途径改造后，突变体 H₂ 和乙醇产量分别提高了 2.7 和 2.4 倍。但该菌株在高浓度糖底物情况下，受到高糖渗透应激的影响，导致生长迟滞期过长，导致发酵周期过久，生产成本大幅度增加。而高浓度糖底物耐受是实现纤维素类生物质同步糖化发酵生产乙醇所必须的。

从工业化角度来看，如果能够筛选到一株耐高糖的嗜热厌氧杆菌菌株，提高嗜热厌氧杆菌糖底物浓度耐受性，且性状稳定，可应用于高浓度糖底物发酵，缩短发酵迟滞期，减少工艺放大成本，这样才能更适合工业化生产。

发明内容

本发明的目的在于提供一种生产乙醇的菌株及利用该菌株生产乙醇的方法。

将出发菌株嗜热厌氧杆菌（*Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27/ Δ ldh）P8G0（红霉素抗性）按照逐步提高糖底物浓度的方法进行培养，重复数代，直到得到在此浓度下能够在接种 6 h 后菌体 OD₆₀₀ 长至 0.6 而且性状稳定。取 1 mL 菌液加到分离培养基中，在厌氧培养箱中培养 2-3 天，挑取单菌落，在发酵培养基中培养 240 h 后，乙醇终浓度达 28.11 g/L，转化率达 1.22 mol/mol，最后得到能在高浓度底物下能够正常生长、传代的突变株 P8G3#4（红霉素抗性）。

上述突变株为长白云嗜热厌氧杆菌（*Thermoanaerobacterium aotearoense*）P8G3#4，已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏（简称 CGMCC），保藏编号为 CGMCC NO. 9000，保藏日期为 2014 年 4 月 3 日，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所。

所述 P8G3#4 菌株为：革兰氏阳性菌，长杆状，直径约 0.6-1.0 μ m，长约 2-15 μ m，显微镜下观察其可翻滚运动。为严格厌氧菌，最适生长温度为 55 $^{\circ}$ C，pH 6.3，可利用多种糖底物生长，如葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖、阿拉伯糖、海藻糖、木聚糖、葡聚糖等。该菌株的遗传特性为：乳酸代谢阻断型突变株，具有红霉素抗性，红霉素抗性浓度为 20-100 ng/ μ l。能耐受 120-150 g/L 糖底物浓度，细胞内 UDP-Gal（UDP- α -D-半乳糖）和 1-(5-磷酸-D-核糖)-5-氨基-4-咪唑羧酸（CAIR）积累增加；甘油磷脂代谢途径中的 mtGDP 的表达下调。

利用权利要求 1 所述菌株生产乙醇的方法：首先配制嗜热厌氧杆菌 CGMCC9000 的种子液，然后将嗜热厌氧杆菌 CGMCC9000 种子液以 10-15% w/w 接种量转接到发酵培养基中，在厌氧条件下搅拌培养，培养温度 45-60°C，培养时间为 50-250 小时，最后从发酵液分离出乙醇。

所述发酵培养基的总糖浓度为 80-150 g/L。

所述发酵培养基的初始 pH 为 5.5-6.5，所述搅拌转速为 120-200 rpm。

所述发酵培养基的初始 pH 为 6.3。

所述发酵培养基成分为：葡萄糖 80-100，木糖 40-60，尿素 1-10，酵母抽提物 1-5，氯化铵 0.5-3，单位 g/L。

所述发酵培养基还包括如下成分：柠檬酸三钾盐 1-4，一水柠檬酸 0.5-3，硫酸钠 0.5-3，磷酸二氢钾 0.5-3，碳酸氢钠 1-4，六水氯化镁 0.5-3，四水氯化亚铁 0.05-0.5，二水氯化钙 0.05-0.4，一水半胱氨酸盐酸 0.5-3，二盐酸吡哆胺 0-0.1，对氨基苯甲酸 0-0.01，D-生物素（D-biotin） 0-0.01，维生素 B12 0-0.01，维生素 B1 0-0.01，单位 g/L。

所述种子液的配制：将嗜热厌氧杆菌 CGMCC9000 置于种子培养基中，在 45-60 °C，转速为 100 -250 rpm，培养 8-24 h。

所述种子培养基为：葡萄糖 2-4，木糖 2-4，其它组分与发酵培养基相同。主要为尿素 1-10，酵母抽提物 1-5，氯化铵 0.5-3，单位 g/L。优选地，还包括如下成分：柠檬酸三钾盐 1-4，一水柠檬酸 0.5-3，硫酸钠 0.5-3，磷酸二氢钾 0.5-3，碳酸氢钠 1-4，六水氯化镁 0.5-3，四水氯化亚铁 0.05-0.5，二水氯化钙 0.05-0.4，一水半胱氨酸盐酸 0.5-3，二盐酸吡哆胺 0-0.1，对氨基苯甲酸 0-0.01，D-生物素（D-biotin） 0-0.01，维生素 B12 0-0.01，维生素 B1 0-0.01，单位 g/L。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

（1）以本实验室筛选、构建得到的嗜热厌氧杆菌 P8G0 为亲株，按常规方法进行高糖底物耐受性驯化，得到突变株 P8G3#4。该突变株具有以下遗传特性：L-乳酸脱氢酶缺陷型，红霉素抗性，糖底物浓度耐受范围超过 120-150 g/L，细胞内 UDP-Gal（UDP- α -D-半乳糖）和 1-(5-磷酸-D-核糖)-5-氨基-4-咪唑羧酸（CAIR）积累增加；甘油磷脂代谢途径中的 mtGDP 的表达下调。

（2）以 120 g/L 葡萄糖、木糖混合糖为底物在 5 L 发酵罐发酵生产乙醇，迟滞期缩短至原来的约 1/4，乙醇终浓度达 28 g/L，转化率达 1.2 mol/mol。本发明

提供筛选的突变体，能够利用高糖底物快速发酵积累目标产品乙醇，且产生的副产物少，工艺放大较为容易，适合于工业化生产。

附图说明

图 1 为驯化后的耐高糖菌株 P8G3#4 与出发菌株 P8G0 的生长曲线图。a) P8G0 在不同碳源浓度下的生长情况，-■- 30 g/L，-●- 81 g/L，-▲- 120 g/L；b) P8G3#4 在不同碳源浓度下的生长情况，-□- 30 g/L，-○- 81 g/L，-△- 120 g/L；其中糖底物为葡萄糖和木糖（2:1，g:g）。

图 2 为 P8G3#4 与 P8G0 的细胞代谢通路功能显著性富集示意图。

A) ABC 转运蛋白系统，右图为低聚糖和多元醇转运系统中乳糖/L-阿拉伯糖转运蛋白，左图为磷酸盐和氨基酸转运系统中的支链氨基酸转运蛋白；B) 双组份调控系统（Two-component system），GlnL 调控系统；C) 磷酸转移酶系统（PTS）中的 Lac 家族，右图为乳糖的转运，左图为纤维二糖的转运；D) DNA 复制相关元件。灰色方框表示累积的代谢物。

具体实施方式

实施例 1

菌株的驯化与分离

本发明的耐高糖嗜热厌氧杆菌菌株可以这样得到：

本发明中，用于筛选的出发菌株为实验室筛选、突变并保存的嗜热厌氧杆菌（*Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27/ Δ ldh），此处记为 P8G0。

筛选培养基：葡萄糖：80-100 g·L⁻¹；木糖：40-60 g·L⁻¹；(NH₄)₂SO₄：1-5 g·L⁻¹；MgCl₂·6H₂O：1-5 g·L⁻¹；KH₂PO₄：0.5-5 g·L⁻¹；K₂HPO₄：0.5-5 g·L⁻¹；CaCl₂·2H₂O：0.1-2.0 g·L⁻¹；Na-β-glycerophosphate：2-10 g·L⁻¹；FeSO₄·7H₂O：0.0001-0.001 g·L⁻¹；酵母提取物：2-10 g·L⁻¹；一水半胱氨酸盐酸（C₃H₇NO₂S·HCl·H₂O）：0.1-2.0 g·L⁻¹；刃天青：0.001-0.01 g·L⁻¹；琼脂粉：5-20 g·L⁻¹；红霉素：20-100 ng/μl。

出发菌株 P8G0 首先是经过 81 g/L 筛选培养基（葡萄糖和木糖质量比为 2:1）厌氧摇瓶培养，待菌株生长吸光值 OD₆₀₀ 为 2.0 或以上，转接新的厌氧摇瓶培养基，重复数代，直到得到在此浓度下能够在接种 6 h 后菌体 OD₆₀₀ 长至 0.6，并且性状稳定的菌株 P8G1；

与步骤(1)方法一样,在102 g/L 葡萄糖和木糖(2: 1, g: g)条件下得到菌株 P8G2;

与步骤(1)方法一样,在120 g/L 葡萄糖和木糖(2: 1, g: g)条件下得到菌株 P8G3;

通过平板培养,得到单菌落 P8G3#4。

实施例 2

P8G3#4 驯化后菌株鉴定

为了鉴定驯化前后菌株的差异,采用转录组学方法分析 P8G0 和 P8G3#4 代谢基因差异,并对差异基因进行聚类分析,鉴定导致 P8G0 和 P8G3#4 两个菌株生长代谢差异的基因表达层面上的原因。

将出发菌株嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27/ Δ ldh) P8G0 以及筛选得到能在高浓度底物下正常生长的突变株 P8G3#4,进行转录组测序分析。分析两个样本中的差异表达基因,筛选标准为 $|\log FC| \geq 1$ (即两倍差异),分析两个样本中的差异表达基因, P8G0 和 P8G3#4 共有 69 个基因在表达丰度上存在显著差异,与出发菌株 P8G0 相比,分别有 35 和 24 个基因在菌株对数生长前期出现表达上调和下调, P8G3#4 在转录组上与 P8G0 存在差异性。

通过 KEGG 代谢通路分析(图 2),共有 27 条基因注释到 20 个信号通路当中,其中注释到嘌呤代谢途径(Purine metabolism)、ABC 转运蛋白系统(ABC transporters)、半乳糖代谢途径(Galactose metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢途径(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、氮代谢途径(Nitrogen metabolism)、磷酸转移酶系统(Phosphotransferase system)、氯烷烃和氯烯烃的降解途径(Chloroalkane and chloroalkene degradation)、丙氨酸,天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径(Alanine, aspartate and glutamate metabolism)以及甘油磷脂代谢途径(Glycerophospholipid metabolism)的基因较多,分别为 5、5、4、4、4、4、3、3 和 2 条。

根据差异基因的表达分析有以下发现:(1)相比于驯化前的出发菌株,突变株 P8G3#4 细胞内 UDP-Gal (UDP- α -D-半乳糖)和 1-(5-磷酸-D-核糖)-5-氨基-4-咪唑羧酸(CAIR)积累增加(图 2B);(2) P8G3#4 细胞内甘油磷脂代谢途径中的 mtGDP 的表达下调(图 2C),导致胞内甘油含量增加(3)以及 ABC 转运蛋

白上调（图 2A），导致胞内几种小分子溶质，如乳糖和支链氨基酸等含量增加；
（4）DNA 复制能力降低(图 2D)，磷酸转移酶系统（PTS）Lac 家族中的纤维二糖的转运系统下调。这些差异基因表达是上调或下调，其生理基础是为了维持细胞内外渗透压平衡而作出的应激反应，通过提高细胞内水活度，使细胞体积和膨压达到正常水平，维持细胞的正常生理代谢。

实施例 3

摇瓶发酵培养比较驯化后的耐高糖菌株与出发菌株的生长差异
种子液的配制：

种子培养基采用 MTC 改良培养基，其中的各种组合可分为 A、B、C、D、E 液，分别高温灭菌后，再按 45：2：1：1：1 的比例混合后使用。具体各液组成成分见表 1。

组分标号	组成成分	浓度（g/L）
A	葡萄糖	2
	木糖	2
B（25×）	柠檬酸三钾盐	50
	一水柠檬酸	31.25
	硫酸钠	25
	磷酸二氢钾	25
	碳酸氢钠	62.5
C（50×）	尿素	250
	氯化铵	75
	酵母提取物	50
D（50×）	六水氯化镁	50
	四水氯化亚铁	5
	二水氯化钙	10
	一水半胱氨酸盐酸	50
E（50×）	二盐酸吡哆胺	1
	对氨基苯甲酸	0.2
	D-生物素	0.1
	维生素 B12	0.1
	维生素 B1	0.2

具体的，种子培养基的配制方法为：分别配制 A、B、C、D 液装于血清瓶中，抽真空，充氮气，115 °C 灭菌 20 min，保存备用；E 液过滤除菌直接注射入已充好氮气并灭菌的血清瓶中保存备用；取已装有 A 液的血清瓶，采用注射器

分别注入相应体积上述配制好的 B、C、D、E 液至工作浓度，即得种子培养基。

发酵培养基的配制：

发酵培养基组成成分中，A 液中碳源浓度分别为 30 g/L，81 g/L 或 120 g/L，其中葡萄糖与木糖质量比为 2:1，其余组成成分与种子培养基成分一致。其具体配制过程与种子培养基配制、灭菌等操作处理方法一致。

将过夜培养的 P8G0 以及 P8G3#4 分别按 1:10 比例接种至含有 50 mL 新鲜配制发酵培养基的血清瓶中。发酵液在温度 55 °C，转速 150 rpm 的摇床里培养 84 h，每隔 6-12 小时取样测定菌体 OD₆₀₀，计算菌体细胞干重（图 1）：

$$Y=0.421X-0.006 \quad (R^2=0.99)$$

其中，Y 为细胞干重（DCW），g/L；X 为 OD₆₀₀。

从图1a 可以看出，在正常的培养基浓度下，出发菌株P8G0 的DCW 到 0.5 所需要的时间为8 h，培养24 h 后DCW 可以达到1.5，在60 h 达到最高值 2.3。当底物浓度提升至81 g/L 时，菌株DCW 到0.5 所需要的时间延长至42 h，同样在120 g/L 下需要更长的时间82 h。相比较之下，耐高糖菌株P8G3#4 在三个浓度下的生长（图 1b）与出发菌株在正常的培养基浓度下生长趋势基本一致，表明了耐高糖菌株 P8G3#4 已经克服了在高浓度底物下生长迟滞期长的缺点。

实施例 4

发酵罐培养比较驯化前后菌株代谢产物差异

发酵条件：按 10%接种量，将种子液接入装有 3 L 培养基（120 g/L 混合糖底物）的 NBS 公司 5 L 全自动反应釜。在接种前，反应釜先通入氮气 30 min，接种后再通入氮气 30 min，以保证发酵环境无氧。

代谢产物乙醇、乙酸、乳酸及糖耗的检测采用 Waters 2695 高压液相色谱（HPLC）测定。

1. 葡萄糖、木糖消耗的检测

色谱柱：Aminex HPX-87P（Biorad）

流动相：超纯水

流速：0.6 ml/min

柱温：60 °C

检测器温度：40 °C

样品制备：2 ml 发酵液加入 1 g CaCO_3 ，振荡 1 min，在 16,000 g 下离心 5 min，取上清用 0.22 μm 膜过滤。用于检测残糖。

进样量：10 μl

检测器：示差检测器

2. 代谢产物乙醇、乙酸、乳酸的检测

色谱柱：Aminex HPX-87H (Biorad)

流动相：5 mM H_2SO_4

流速：0.6 ml/min

柱温：60 °C

检测器温度：40 °C

样品制备：1.9 ml 发酵液加入 100 μl 10% H_2SO_4 ，在 16,000 g 下离心 5 min，取上清用 0.22 μm 膜过滤。用于检测酸和乙醇。进样量：10 μl

检测器：示差检测器。

3、测定发酵产物中的乳酸、乙酸和乙醇（表 1）。结果表明，相比于出发菌株 P8G0，驯化后的菌株 P8G3#4 的生长迟滞期从原来的 100 h 缩短至 24 h，且发酵末期细胞干重也从 1.98 g/L 增加至 4.26 g/L，提高了约 2 倍。且乙醇产量和转化率也都有相应的提高，即最终乙醇浓度达到 28.11 g/L，乙醇最大转化率达 1.22 mol/mol。

表 1 驯化前后菌株以 120 g/L 混合糖为底物上罐发酵结果比较

菌株	迟滞期 (h)	DCW (g/L)	乙醇		乙酸	乳酸	氢气 产量 (L)	发酵 时间 (h)
			浓度 (g/L)	转化率 (mol/mol)				
P8G0	100	1.98	14.87	0.97	5.12	0	2.15	250
P8G3#4	24	4.26	28.11	1.22	5.02	0	3.09	200

权 利 要 求 书

1、一种嗜热厌氧杆菌，其特征在于，该菌株为长白云嗜热厌氧杆菌（*Thermoanaerobacterium aotearoense*）P8G3#4，已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏编号为 CGMCC NO. 9000，保藏日期为 2014 年 4 月 3 日。

2、一种利用权利要求 1 所述菌株生产乙醇的方法，其特征在于，首先配制嗜热厌氧杆菌 CGMCC9000 的种子液，然后将嗜热厌氧杆菌 CGMCC9000 种子液以 10-15% w/w 接种量转接到发酵培养基中，在厌氧条件下搅拌培养，培养温度 45-60°C，培养时间为 50-250 小时，最后从发酵液分离出乙醇。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述发酵培养基的总糖浓度为 80-150 g/L。

4、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述发酵培养基的初始 pH 为 5.5-6.5，所述搅拌转速为 120-200 rpm。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述发酵培养基的初始 pH 为 6.3。

6、根据权利要求 2 或 3 或 4 或 5 所述的方法，其特征在于，所述发酵培养基成分为：葡萄糖 80-100，木糖 40-60，尿素 1-10，酵母抽提物 1-5，氯化铵 0.5-3，单位 g/L。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述发酵培养基还包括如下成分：柠檬酸三钾盐 1-4，一水柠檬酸 0.5-3，硫酸钠 0.5-3，磷酸二氢钾 0.5-3，碳酸氢钠 1-4，六水氯化镁 0.5-3，四水氯化亚铁 0.05-0.5，二水氯化钙 0.05-0.4，一水半胱氨酸盐酸 0.5-3，二盐酸吡哆胺 0-0.1，对氨基苯甲酸 0-0.01，D-生物素 0-0.01，维生素 B12 0-0.01，维生素 B1 0-0.01，单位 g/L。

8、根据权利要求 2 或 3 或 4 或 5 所述的方法，其特征在于，所述种子液的配制：将嗜热厌氧杆菌 CGMCC9000 置于种子培养基中，在 45-60 °C，转速为 100 -250 rpm，培养 8-24 h。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述种子培养基为：葡萄糖 2-4，木糖 2-4，尿素 1-10，酵母抽提物 1-5，氯化铵 0.5-3，单位 g/L。

10、根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述种子培养基还包括如

下成分：柠檬酸三钾盐 1-4，一水柠檬酸 0.5-3，硫酸钠 0.5-3，磷酸二氢钾 0.5-3，碳酸氢钠 1-4，六水氯化镁 0.5-3，四水氯化亚铁 0.05-0.5，二水氯化钙 0.05-0.4，一水半胱氨酸盐酸 0.5-3，二盐酸吡哆胺 0-0.1，对氨基苯甲酸 0-0.01，D-生物素 0-0.01，维生素 B12 0-0.01，维生素 B1 0-0.01，单位 g/L。