



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103781899 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201280042219. 7

C12P 7/16(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 01

C12R 1/145(2006. 01)

(30) 优先权数据

2181/MUM/2011 2011. 08. 01 IN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IN2012/000536 2012. 08. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/072919 EN 2013. 05. 23

(83) 生物保藏信息

MTCC 5587 2011. 03. 31

(73) 专利权人 瑞来斯实业有限公司

地址 印度马哈拉施特拉邦

(72) 发明人 兰加斯瓦米·威贴 伊萨尔·贾思明

乔希·喀什瓦德汗

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 王芝艳

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101932716 A, 2010. 12. 29,

WO 2009087680 A2, 2009. 07. 16,

US 4757010 A, 1988. 07. 12,

US 5192673 A, 1993. 03. 09,

ISAR JASMINE ET AL. Improved n-butanol production by solvent tolerant *Clostridium beijerinckii*. 《BIOMASS AND BIOENERGY》. 2012, 第 37 卷第 9-15 页 .

审查员 姚进孝

权利要求书2页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

用酸预处理的生物质进行丁醇发酵

(57) 摘要

本发明使用酸预处理的生物质(如麻风树籽饼、水黄皮籽饼及香蕉茎秆),作为通过突变体丙酮丁醇梭菌 MTCC587 生产丁醇的可再生原料。进行化学突变是为了改善菌株,使其具有更好的丁醇耐受性和产率。本发明首次报告了一种在单批发酵中获得高产率丁醇的工艺,该工艺使用酸预处理的麻风树籽饼。

1. 一种突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的纯培养菌,与野生型菌株相比,增加了对丁醇的耐受性。

2. 权利要求 1 中的突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的纯培养菌,与野生型菌株相比,具有的丁醇耐受性是 1.5% 至 3.5%。

3. 权利要求 1 中的突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的纯培养菌,与野生型菌株相比,具有的丁醇耐受性是 3.5%。

4. 权利要求 1 中的突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的纯培养菌,其中与野生型菌株相比,丁醇耐受性与膜饱和脂肪酸含量的增加有关。

5. 权利要求 4 中的突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的纯培养菌,其中与野生型菌株相比,增加的膜饱和脂肪酸含量达 4 至 5%。

6. 权利要求 1 中的突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的纯培养菌,其中与野生型菌株相比,在突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 中的丁醇耐受性与对毒性化合物的耐受性增加有关,其中的毒性化合物是罗丹明 6G。

7. 一种从预处理的生物质中生产高产率丁醇的连续高效的工艺,该工艺使用提升丁醇耐受性的突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587。

8. 权利要求 7 中的工艺,其中的生物质选自包括一种香蕉茎秆、水黄皮籽饼和麻风树籽饼的一组物质。

9. 权利要求 7 中的工艺,其中所使用的生物质经过酸预处理。

10. 权利要求 9 中的工艺,其中的酸预处理包括用 1-3% 浓度的盐酸或硫酸处理生物质。

11. 权利要求 9 或 10 中的工艺,其中用酸预处理生物质是在 100°C 以上进行 1-5 小时。

12. 权利要求 9 或 10 中的工艺,该工艺还包括用氢氧化钠中和盐酸处理过的生物质。

13. 权利要求 7 中的工艺,其中与野生型菌株相比,突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的丁醇耐受性从 1.5% 提升到 3.5%。

14. 权利要求 7 中的工艺,其中与野生型菌株相比,突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC 5587 的丁醇耐受性提升到 3.5%。

15. 权利要求 7 中的工艺,其中的丁醇产率在 15 升规模并采用麻风树籽饼水解物时达 19 克 / 升。

16. 权利要求 7 中的工艺,其中的丁醇产率在 50 毫升规模并采用香蕉茎秆水解物时达 18.0 克 / 升。

17. 权利要求 7 中的工艺,其中的丁醇产率在 50 毫升规模并采用麻风树籽饼水解物时达 14.3 克 / 升。

18. 权利要求 7 中的工艺,其中与不加糖的情况相比,在含糖营养培养基中发酵预处理的生物质导致丁醇浓度增加 3 倍。

19. 权利要求 18 中的工艺,其中添加到营养培养基中的糖包括葡萄糖。

20. 权利要求 19 中的工艺,其中在营养培养基中葡萄糖的浓度是 2%。

21. 权利要求 18 中的工艺,其中的发酵是在 33 与 37°C 的温度之间进行。

22. 权利要求 7 中的工艺,其中的丁醇是在存在有毒组分的麻风树籽饼中产生,其中的有毒组分为佛波醇酯。

23. 权利要求7中的工艺,该工艺产生溶剂的比率为丙酮:丁醇:乙醇=2.6:6.6:0.8,类似于一种典型的丙酮丁醇乙醇发酵中获得的比率。

用酸预处理的生物质进行丁醇发酵

[0001] 发明的领域

[0002] 本发明涉及一种生产高产率丁醇的高效工艺,该工艺采用一种来自生物质的丙酮丁醇梭菌 ATCC4259 的突变菌株,具有增强的丁醇耐受性。

[0003] 发明的背景

[0004] 人类使用石油衍生的燃料已经有许多年。但是,近来人们已经认识到,可获得的矿物燃料情况不妙、石油资源有枯竭的危险以及全球都在实施严格的环境保护法,这种觉醒导致了寻找替代能源的努力(Herrera 等人,2004 年;Li 等人,2010 年)。因此,正在调研几种替代燃料,要么能够完全替代石油衍生的燃料(汽油和柴油),要么能够与石油燃料混合成一定的比例,而无需采用专门的汽车发动机。

[0005] 在其他替代燃料中,发现丁醇是最佳选择,因其在替代汽油上具有优势,能够满足社会大众需求。生物丁醇无可争辩地是一种较好的汽油替代燃料,在其他工业中,出于安全理由而成为首选。由于具有再生性,丁醇有助于遏制当前不受欢迎的“碳”排放,以及以碳氢化合物;颗粒物;苯、甲苯、乙苯、二甲苯(苯系物);及其他不想要元素(Sharma 等人,2010 年)形式的其他排放。

[0006] 丁醇或正丁醇(采用生物制取时,有时也称为生物丁醇)是一种具有 4 碳结构的醇,其分子式是 C₄H₁₀O。丁醇主要用作溶剂、化学合成的中间体及燃料。如今,人们对利用微生物发酵生产丁醇和乙醇等燃料有着极大的兴趣,主要是看重该生产模式环保及可再生性。丁醇是一种优质燃料,比乙醇的热值高(Qureshi 和 Blascher,2000 年)。丁醇具有较高的能量含量(110,000 英热每加仑丁醇对比 84,000 英热每加仑乙醇)。丁醇的“蒸发率”比乙醇小六倍,比汽油小 13.5 倍,能够通过现有燃料管道输送,而乙醇必须经铁路、驳船或卡车运输(Jones 和 Woods,1986 年)。

[0007] 丁醇是一种重要的工业溶剂,可能比乙醇燃料更有发展。目前丁醇作为化学品的价格是 3.75 美元每加仑,全球每年市场量为 3.7 亿加仑。如果环保的丁醇能够从低成本生物质中廉价生产,市场需求有望急剧增加。除了其作为燃料的用途,丁醇还能够有机合成中用作各种化学和纺织工艺的溶剂,以及作为化学中间体。丁醇也在其他涂料应用中用作油漆稀释剂,在漆料和常温固化磁漆中用作一种相对缓慢蒸发的助溶剂。丁醇还有其他用途,如作为液压和制动液的一种组分(Mutschlechner 等人,2000 年)/也用作香水的基料,但其本身具有很高的醇香。

[0008] 自 1950 年代以来,美国商业化生产的大部分丁醇来自矿物燃料。大多数常用工艺是由丙烯开始,通过羰基化反应生成丁醛,然后用氢还原成丁醇。从玉米、草、叶子、农业废料和其他生物质中生产丁醇要经过发酵。

[0009] 利用丙酮丁醇梭菌经发酵生产工业丁醇及丙酮始于 1916 年。Louis Pasteur 的学生 Chime Wizemann 将微生物隔离制得丙酮。一直到 1920 年代,寻求的产品都只是丙酮,但每发酵一磅丙酮,就会生成二磅丁醇。汽车油漆工业的增长扭转了市场,到 1927 年,丁醇成了主要产品,而丙酮成为副产品。

[0010] 从 1940 年代到 1950 年代,发酵生产丁醇出现下降,主要是因为石油化学品的价格

下降到低于玉米和糖蜜等淀粉和糖底物的价格。劳动密集型批量发酵系统的开销加上低产率造就了这种情况。发酵制取丙酮和丁醇的生产于 1950 年代末停止。

[0011] 通过丙酮丁醇梭菌进行丙酮丁醇乙醇(ABE)发酵是已知最古老的工业发酵之一。论其过去的生产规模,仅次于通过酵母的乙醇发酵,而目前是世人所知最大的生物技术工艺。但是,实际的发酵相当复杂,难以控制。自 1950 年代以来,ABE 发酵已经连续下降,现在几乎所有的丁醇都是经石油化学品路线生产。在一个典型的 ABE 发酵中,首选通过丙酮丁醇梭菌生产丁酸、丙酸、乳酸和乙酸,培养液 pH 值下降,经过代谢的“蝴蝶”转换,生成丁醇、丙酮、异丙醇和乙醇。在传统的 ABE 发酵中,采用葡萄糖的丁醇产率低,通常是大约 15%,很少超过 25%。

[0012] 丁醇生产相关的关键问题是丁醇的毒性 / 发酵中微生物的抑制,由此造成在发酵液中的低丁醇滴度(Ezeji 等人,2007 年)。丁醇的生产受限于严重的产物抑制。1% 浓度的丁醇能够显著抑制细胞生长及发酵过程。因此,在传统 ABE 发酵中的丁醇浓度通常低于 1.3%。相当低浓度 2% 的丁醇对生物系统就具有很高的毒性(Jones 和 Wood,1986 年)。该毒性可能是由于丁醇位于质膜中,扰乱了一些生理过程,包括膜通透性、溶质输送,以及质子动力的维持、内在膜蛋白的构象和活性。目前正在努力改善在不同梭菌属中丁醇耐受性水平,并取得了不同程度的成功(Evan 和 Wang,1988)。近来对生产丁醇的兴趣已经导致重新研析 ABE 发酵,包括减少或消除丁醇毒害培养菌的策略。

[0013] 在过去 20 多年中,已经做过无数旨在改善 ABE 发酵中丁醇产率的尝试,包括细胞再循环和细胞固定,以增加细胞密度和反应器生产力,用萃取发酵来尽量减少产物抑制。尽管做了许多努力,迄今为止,关于 ABE 发酵获得的最佳成果并不多见。优化 ABE 发酵工艺长久以来都是该工业的一大目标。

[0014] 目前全世界通过化学路线生产的丁醇超过 14 亿加仑 / 年。如果丁醇能够从低成本的生物质中廉价生产,市场需求有望急剧增加。因此,利用木质纤维素作物等可再生能源生产丁醇的工艺正在加速发展(Qureshi 等人,2010 年)。

[0015] 美国专利 4521516 提供了一种新型丙酮丁醇梭菌的无孢子菌株,通过在一种连续培养反应器中生长一种生成孢子的菌株生产。按一种稀释速率进行培养,以防在培养基中聚集丁醇和丙酮。继续在此稀释速率下进行培养,直到获得无孢子菌株。

[0016] 美国专利 5192673 提供了一种丙酮丁醇梭菌的生物纯无孢子突变体,由生长产孢子的丙酮丁醇梭菌 ATCC4259 并用乙烷甲烷磺酸酯处理亲本菌株生产。该突变体已经被标记为丙酮丁醇梭菌 ATCC55025,用于改善的 ABE 发酵工艺中,生产高浓度的丁醇和全溶剂。但本文的发酵包括三级连续发酵,因而使该工艺昂贵及耗时。

[0017] 美国专利 6358717 提供了一种生产高级丁醇的方法,该方法所使用的发酵工艺采用了一种拜氏梭菌的突变体菌株。该突变体是一种超淀粉分解菌,能够在富含葡萄糖 / 淀粉的培养基中生产高滴度丁醇。但是,并未对菌株的溶剂耐受性提出任何主张。

[0018] 美国专利 4757010 和欧洲专利 00111683 提供了一种改善的梭菌株,用于增加丁醇耐受性。日本专利 03058782 提供了巴氏梭菌 CA101 有机体(FERP-10817)作为一种梭菌属细菌的突变体,具有对丁醇的发酵中间体类似的耐受性及丁醇可生产性。美国专利 4539293 显现了使用梭菌属微生物的共培养,其一有利于生产丁酸,其他有助于生成丁醇。日本专利 63157989 提供了丁醇的生产方法,在液体培养基中培养一种不同的巴氏梭菌株变种 1-53

(FERMP-9074),该培养基中含有一种碳源、一种氮源及其他无机盐,处于 28-33°C 和弱酸 pH 条件,并在无氧状态中培养 2-4 天。

[0019] 美国专利 777135 描述了一种通过发酵生产丁醇的方法,其中包括在无氧条件下,在一种含有碳氟化合物的培养基中培养一种产生丁醇的微生物。该工艺无商业规模可行性,原因是碳氟化合物对环境有害。

[0020] 美国专利 4605620 提供了一种丁醇工艺,该工艺使用一种含有碳水化合物和磷酸盐的培养基,实验所用的总磷酸盐含量是 1.0-0.4 毫摩尔。该工艺有一个限制,需要限定培养基中的磷酸盐。

[0021] 美国专利 4560658 提供了一种通过含有丙酮丁醇梭菌化合物的碳发酵来生产丁醇的工艺,发酵是在含有足够溶解的一氧化碳浓度的含水培养基中进行。但是,该工艺使用一氧化碳对环境不好。

[0022] 美国专利 4520104 提供了一种将碳水化合物与丙酮丁醇梭菌一起发酵以连续生产丁醇的工艺。该工艺将高稀释速率下连续产生接种体与通过吸收丁醇的材料循环发酵液相结合,以此在发酵反应器中维持蓬勃的细胞群,延长发酵时间。该工艺是要脱除发酵液中产生的丁醇,预防其毒害细胞。

[0023] 日本专利 62278989 提供了一种生产丙酮和丁醇的工艺,该工艺保持在静止状态下产生丁醇的菌株,给细胞添加碳源,在短时间产生丙酮及丁醇,同时回收并浓缩产生丁醇的菌株,经过热激并添加到发酵罐中。该工艺中需用热激来激活梭菌的芽孢,是相当常规的做法。

[0024] 日本专利提供了一种厌氧纤维素分解菌,例如,将少纤维二糖梭菌 ATCC15832 或白色瘤胃球菌 ATCC27211 和糖丁酸梭状芽胞杆菌噬菌体接种到一种含有纤维素材料(如木材、废纸或纸浆)的培养基中,作为主要碳源,并在 25-45°C 和 4-9 的 pH 值下,在无氧条件下进行大约 2-20 天的培养,旨在收集目标化合物,该化合物含有氧,并主要包括来自所获得培养菌中的丁醇。该工艺很耗时,要花大约 20 天才能完成,因此不适合大规模生产。

[0025] 日本专利 63269988 所公开的丁醇发酵中,酵母需自溶于发酵罐中,并在接种产生丁醇的菌株之前增殖。发酵罐内的空间变得无氧,酵母增殖导致温度升高,以进行丁醇发酵。自溶效率不高会导致培养液受酵母污染。

[0026] 美国专利 20050233031 提供了一种生产丁醇的工艺,其中包括处理植物衍生材料,在发酵过程中提供含糖的水酒,以产生一种发酵产物。该工艺涉及好几个步骤,因而烦琐且乏味。

[0027] 日本专利 200535328801 提供了一种生产丁醇的方法,该方法用食物残渣与日式蒸馏白酒酒糟和水调配,制备得一种培养溶液,丁醇发酵在培养溶液中进行。使用日式蒸馏白酒局限于在日本进行的生产实验。

[0028] 法国专利 2550222 提供了一种二级工艺,其中,第一级为与丙酮丁醇梭菌的晶种,第二级为与酵母晶种产生乙醇,当第一级发酵培养基的 pH 值达到最小值时,第二级才开始。该发明具体应用于从甜菜和菊芋汁中生产丁醇、丙酮及乙醇。

[0029] 印度专利 2544/MUM/2007 提供了一种用丙酮丁醇梭菌 ATCC10132 生产高产率丁醇的工艺。通过操纵各种工艺参数来使用批处理,该工艺能够在较短的时间段完成。该工艺也能够用于基于生物质的丁醇生产。该发明需要商业培养基,而在本发明中,用酸预处理的原

料与丙酮丁醇梭菌的突变体菌株一起使用,导致较高产率的丁醇及增强了丁醇的耐受性。

[0030] 文献中所报道丁醇合成的常用原料是玉米(包谷)、香蕉茎秆(大蕉)、麻风树(膏桐)及卡兰贾(水黄皮)(Liang 等人,2010 年,Pfromm 等人,2010 年)。但是,使用玉米、甘蔗等食用农作物将导致食物与燃料相争状况。为了避免这种情况,亟需探索潜在的非食用原料及其生物丁醇合成的适用性。

[0031] 在可用于生物丁醇生产的许多原料中,发现麻风树和卡兰贾最合适,原因是其优越的属性,如耐寒性质,3 年左右的短生长时间、50 ~ 100 年生产寿命、不被动物咬、适应不同的农业气候条件和土壤类型、抗旱及不与粮食作物竞争土地和水源。

[0032] 本发明使用麻风树籽饼和水黄皮籽饼等木质纤维素生物质,并用酸预处理,旨在打乱其纤维素结构,提取尽量多的还原糖。水解糖与 AnS 培养基组分一起使用,产生生物丁醇。

[0033] 本发明还使用富含纤维素的生物质(即香蕉茎秆),用酸预处理释放糖分,经水解产生生物丁醇。

[0034] 尽管有报道利用微生物发酵生产丁醇,仍需要开发经济可行的生物合成生产丁醇的工艺(Jesse 等人,2002 年)。

[0035] 丁醇生产相关的缺点是丁醇的毒性 / 发酵中微生物的抑制,由此造成在发酵液中的低丁醇滴度。经济分析表明,如果丁醇滴度从 12 克 / 升升至 19 克 / 升,分离成本可能削减到一半(Papoutsakis,2008)。正常情况下,发酵中丁醇的最终滴度不会超过 13 克 / 升,原因是原料抑制(Jones 和 Wood,1986)。超过该水平,丁醇会毒害细菌细胞,扰乱膜流动性及功能(Volherbst-Schneck 等人,1984)。

[0036] 为了消除丁醇毒性效应,耐受菌株过表达某些 GroEL 之类的热激蛋白(HSPs)(Thomas 等人,2003 年,2004 年),并通过获得更多饱和脂肪酸改变其脂质组成。该回应称为“等粘度调节”,被认为是为了抵消环境造成的物理变化,让细胞膜保持适当的粘度和表面离子环境,旨在优化细胞功能(Baer 等人,1987 年)

[0037] 根据文献(Nishino 和 Yamaguchi,2004 年),罗丹明 6G 是 P- 糖蛋白的底物,介导某些有毒化合物从细菌细胞中依靠能量外排。细胞中溶剂外排泵的存在因此能够由细菌细胞中罗丹明 6G 的聚集得到证实(Lazaroaie,2009 年)。本发明的发明人使用上述参考文献来化验溶剂耐受型突变菌株和用于产生丁醇的丙酮丁醇梭菌的野生型菌株。

[0038] 实际应用气提之类的工艺来克服发酵过程中产生丁醇的抑制效应(Ezeji 等人,2007 年)。但是,该工艺受到结果不一致和高能耗的困扰。在本发明中,丁醇的抑制效应通过使用化学突变来改善微生物的丁醇耐受性加以克服。

[0039] 为了消除所引述先有技术中早期发明的缺点,需要一种提升丁醇产率的工艺。有鉴于此,本发明重点研发一种理想的培养梭菌突变菌株的条件,提升丁醇耐受性,从而增加丁醇的产率。

[0040] 发明的目的

[0041] 本发明的目的是提供一种高效工艺,该工艺使用一种丙酮丁醇梭菌的溶剂耐受突变体,从预处理的生物质中生产高产率的丁醇。

[0042] 本发明的目的是用丙酮丁醇梭菌突变体来提供优化发酵条件,旨在增加丁醇产率。

[0043] 本发明的目的是采用化学突变即时生成菌株,以改善丁醇耐受性及产率。

[0044] 本发明的目的是提供一种具有优化发酵条件的工艺,从而增加微生物的丁醇耐受性。

[0045] 本发明的目的是提供一种高产率丁醇发酵的培养条件。

[0046] 本发明的目的是提供一种在单批量发酵条件中增加丁醇产率的工艺。

[0047] 本发明的目的是提供一种丁醇工艺,该工艺使用各种酸预处理的生物质。

[0048] 本发明的目的是提供一种具有成本效益和工业可行的丁醇工艺。

[0049] 发明的概述

[0050] 本发明的第一个方案涉及一种高效工艺,该工艺使用一种丙酮丁醇梭菌的溶剂耐受型突变体,从生物质中生产高产率的丁醇。具体来说,本发明旨在提供优化培养条件,从而增加微生物突变菌株的丁醇耐受性。而且,本发明旨在提供一种具有成本效益和工业可行的生产丁醇的工艺。

[0051] 第二个方案涉及在一种单批处理中高产率丁醇(达 19 克 / 升)的生产,无需气提产生的丁醇。此处工艺不涉及任何补料分批步骤(会涉及添加营养素的额外步骤),也不需要任何溶剂剥离来取得该高产率。不同于许多在公有领域中报道的工艺(采用连续发酵模式,从而增加了污染的机会),本发明包括一种在单批模式中完成的工艺。精心优化培养基、习服及化学突变导致即时生成一种突变菌株,该菌株能够在发酵液中产生并耐受如此高产率的丁醇。

[0052] 因此,所有这些参数都使得本发明的工艺成本效益更好。而且,发明人还能够在 15 升规模上成功表现本工艺。

[0053] 本发明的第三个方案提供了一种通过菌株的化学突变来增加丁醇耐受性的工艺。在一个首选方面,本发明提供了在优化的培养基下,耐受性达大约 3.5% 丁醇浓度;条件的导向是一种由本发明所提供增加丁醇产率的工艺。其对丁醇高耐受性的最可能理由或许是工艺优化造就了最后一组理化条件,在此条件下,上述限定得以缓和。例如,在优化条件下,氧化还原电位、摩尔渗透压浓度、电子流量可能改变。在优化条件下,需要耐受和产生丁醇的某组酶可能已经激活或诱变。在优化过程中,培养菌可能已经调节到高丁醇水平。

[0054] 第四个方案所涉及本发明的方面是评估生物丁醇(使用各种生物质)的流程。在一个首选方面中,使用了麻风树、水黄皮和香蕉茎秆籽饼。使用籽饼和用酸水解预处理茎秆的丁醇产率也做了研究。

[0055] 涉及本发明的最后一个方案是,提供一种能够扩大至大规模生产的工艺。

[0056] 附图的简述

[0057] 下图形成本说明书的一部分,在文中用于进一步表现本公示的某些方面,其中的各个发明需参阅这些图中的一个或多个并结合本文所呈现具体方案的详细描述才能更好理解。

[0058] 图 1:突变菌株(标记为 B90)在不同丁醇浓度中的耐受性及生长。

[0059] 可以看出,野生型菌株丙酮丁醇梭菌 ATCC4259 能够在培养基中耐受达 1.5% 丁醇,高于此浓度将停止生长,突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC5587 (B90)能够在 AT 培养基中耐受达 3.5% (容积比) 丁醇。在这样的丁醇浓度水平下生长极其缓慢,因溶剂的毒性而虚弱无力。更高浓度时,即 3.8% 和 4%,不再有任何生长。

[0060] 图 2:野生型(A)与突变菌株(B)脂肪酸谱的比较

[0061] 提取野生型和溶剂耐受型突变菌株的全部脂肪,用色谱仪进行分析。与野生型菌株比较时发现,突变体丙酮丁醇梭菌 MTCC5587 的脂质组成已经被改变。色谱图(图 2B)显示存在饱和脂肪酸,即肉豆蔻酸(C14:0)和棕榈酸(C16:0),在仅有微量非饱和脂肪酸的溶剂耐受型菌株中,占全部脂肪酸的大约 50%。而在野生型中,非饱和酸即油酸(C18:1)的含量丰富,成分约占全部脂肪酸的 75%,且饱和脂肪酸量低得多(C16:0 的 11%) (图 2A)。

[0062] 图 3:在野生型(A)和溶剂耐受型突变菌株(B)丙酮丁醇梭菌中的罗丹明 G 的聚集。

[0063] 研究时看到,在含有毒色素罗丹明 6G 的板上温育 24 小时发现,在细胞内显示为粉红色菌落的罗丹明 6G 中,突变菌株大量聚集(图 3)。而野生型菌落呈淡粉红色,色素聚集比较低。这表明在突变菌株中,存在针对丁醇等有毒化合物的耐受机制。

[0064] 图 4:标准丁醇(A)和发酵液(B)的 HPLC 色谱图。

[0065] 在使用 7% (重 / 容比) 麻风树籽饼和 2% 葡萄糖的 20 升生物反应器中,本工艺进一步扩大规模至 15 升水平。在 72 小时内取得了 18.6 克 / 升的丁醇滴度。

[0066] 图 5:从麻风树籽饼水解物中生产丁醇的规模扩大图。

[0067] 初始含糖 44 克 / 升,最终含糖 4 克 / 升(图 5)。当产酸相下降和产溶剂相开始时,能够观察到典型的蝴蝶转换。

[0068] 发明的详述

[0069] 定义:

[0070] 本文所使用的术语丁醇或生物丁醇是指正丁醇。

[0071] 本文所使用的术语丁醇耐受性是指细菌在 2.5-3.5% 丁醇的培养基中存活和生长的能力。

[0072] 术语丙酮丁醇梭菌是指细菌,该细菌在厌氧发酵中,能够产生丁醇及丙酮和乙醇。

[0073] 本文所使用的术语产率是指在发酵液中产生以克 / 升表示的丁醇量。

[0074] 术语突变菌株与丙酮丁醇梭菌 MTCC5587 有关。该突变菌株已经根据布达佩斯条约,存于印度昌迪加尔的微生物菌种保藏馆,标记编号为 MTCC5587。

[0075] 影响生长和生长相关的分子产生的重要因素之一是 pH 值,在本发明中,在不同的 pH 时检查丁醇的产生。在本发明中,通过丙酮丁醇梭菌突变体生产丁醇的优化 pH 值是 6.5。这是根据 Robson 和 Jones 的研究结果,他们报告丙酮丁醇梭菌 P262 在 5.0-6.5 的 pH 范围内,显示出良好的溶剂产生水平。类似地, Biehl (1999 年) 报告拜氏梭菌 NCIMB8052 在 pH5.5 时比 5.0 或更小时显示出更好的生长及溶剂产生。

[0076] 影响生长和生长相关的分子产生的另一个重要因素是温度。在本发明中发现,突变体 MTCC5587 在优化生长温度下产生了更高产率的丁醇。这与 McCutchan 和 Hichey (1954 年) 的早先研究结果形成对比,他们报告在 37°C 时,通过梭菌属的溶剂产生下降(达 23%),而在 30°C 和 33°C 时,产率比较稳定。

[0077] 已经非常明确,在营养参数中,碳源是负责细胞生长和生物分子产生的非常重要的因素之一 (Samulov 等人, 1991 年)。在本发明中,所使用的主要碳源是生物质经水解后获得的糖分。但是,为进一步促进细胞生长及增加丁醇的产生,将不同浓度的葡萄糖 (0-2%) 添加到水解物中。结果显示,添加葡萄糖 (2%) 到用酸预处理的麻风树籽饼 (7%) 的水解物中,

帮助在 125 毫升无氧瓶中提升丁醇产率至 14.3 克 / 升。但是,如果不添加任何葡萄糖,获得的丁醇滴度(4.2 克 / 升)非常低。这些结果与 Parekh 等人(1998 年)的研究结果相吻合。他们报告单独的玉米浸渍水(CSW)不是合适的底物,而添加葡萄糖(6%)有助于生长和产生丁醇。几位其他同事针对初始营养限定的效应及溶剂产生的维持也进行了调研。例如,Long 等人(1984)报告,在使用丙酮丁醇梭菌 P262 的批量发酵中,当碳源的浓度受限时,仅产生酸。此外,麻风树籽饼因存在佛波醇酯而被公认有毒。因此,麻风树籽饼水解物单独可能不适合微生物生长和产生丁醇。

[0078] 如早先所做的讨论,丁醇毒性也是影响丁醇产生的一个重要因素,这种毒性是由于其位于质膜中,造成扰乱多个生理过程,包括膜通透性、溶质输送、质子动力的维持、内在膜蛋白的构象和活性(Sikkema 等人,1995)。溶剂耐受细菌通过细胞调节(包括改变细胞膜的脂质组成、主动降低细胞内溶剂浓度的外排系统、溶剂降解或热激蛋白之类的过表达应激蛋白)来规避这些反应(Tomas 等人,2003,2004)。

[0079] 本发明中起关键作用的因素之一是突变菌株的溶剂耐受能力,通过单步工艺,而不采用任何溶剂剥离或发酵液稀释,取得丁醇的高滴度。为了调研耐受性背后的机制,确定了全部脂肪中的脂肪酸组成。与野生型中的 C18:1 相比,在突变体中,高比例饱和脂肪酸 C14:0 和 C16:0 是为存活使脂质组成受刺激改变的指标。

[0080] Baer 等人(1987 年)报告,通过合成一种数量增加的饱和脂肪酸,丙酮丁醇梭菌 ATCC824 的突变体 SA-1 发展出一种消除丁醇应激的机制。

[0081] 另一个研究结果是与野生型相比,突变菌株聚集数量增加的罗丹明 6G 的能力。这表明存在针对毒性化合物(即正丁醇)的耐受机制,这与 Lazaroaie (2009)报告关于革兰氏阴菌耐有机溶剂的机制相吻合。

[0082] 在本发明中使用的突变梭菌株已经显示出耐受 3.5% 丁醇。其对丁醇的高耐受性最可能的理由或许是梭菌株的基因改变诱导的化学突变,以及造就最后一组理化条件的工艺优化,从而克服了在公有领域中所引述工艺的缺点。例如,尽管野生型菌株几乎没有产生任何丁醇,在非优化条件下,在富含营养物的复合培养基中,突变体产生 4-5 克 / 升丁醇。之后,经在含有麻风树指标的培养基中优化,如表 1 所述,突变体产生 14.3 克 / 升丁醇,增加了 3 倍。

[0083] 还进一步研究了在上述条件下,利用各种生物质生产丁醇。具体来说,所研究的生物质是麻风树籽饼、水黄皮籽饼及香蕉茎秆。所有三种类型的生物质都要经过酸水解,并通过二硝基水杨酸法评估总还原糖水平。

[0084] 将麻风树籽饼和水黄皮籽饼脱油干燥,然后磨成细粉。按不同浓度将细磨籽饼用 1-3%HCl 或 H₂SO₄在 100℃以上温度下处理 1-3 小时。经过酸处理后,用细布过滤料浆,然后用 NaOH 中和滤液。在这些酸预处理滤液中补充 AnS 培养基。用浓 H₂SO₄或 NaOH 调整培养基的 pH 值在 6-7 之间。使用麻风树籽饼水解物作为唯一碳源时,在含有 7% 麻风树籽饼水解物的瓶中,丁醇滴度少得可怜,至多 4.2 克 / 升。类似地,单独用 7% 水黄皮籽饼水解物,取得了 2.4 克 / 升的滴度。这表明,若要成功进行丁醇发酵,需要补充其他碳源。无论对于麻风树,还是水黄皮水解物,滴度均会随葡萄糖量的增加而增加(表 1 和表 2)。在含有 7% 麻风树水解物和 2% 葡萄糖的 AnS 培养基中,在 120 小时内产生了滴度 14.3 克 / 升的丁醇(表 1)。而用 2% 葡萄糖和 7% 水黄皮水解物,产生了 8.7 克 / 升的丁醇(表 2)。

[0085] 对香蕉茎秆也做了实验。将香蕉茎秆切成小块,晒干磨粉。按不同浓度将细磨的籽饼用 1-3% HCl 或 H_2SO_4 在 100°C 以上温度下处理 1-3 小时。经过酸处理后,用细布过滤料浆,然后用 NaOH 中和滤液。在这些酸预处理滤液中补充 AnS 培养基。用浓 H_2SO_4 或 NaOH 调整培养基的 pH 值在 6-7 之间。香蕉茎秆能够帮助产生丁醇而无需补充其他碳源,在 10% 水解物浓度时取得 9.1 克 / 升的滴度。但是,用 2% 葡萄糖随香蕉茎秆水解物一起强化,滴度升至 18.0 克 / 升丁醇(表 3)。

[0086] 在本发明中所使用的麻风树籽饼和水黄皮籽饼等原料中富含木质素。麻风树籽饼含有 29.1% 木质素和 15.9% 纤维素。木质素是一种以苯基丙烷为单位的复杂聚合物,通过不同的化学键彼此交联。其生物降解尤其困难,降低了其它细胞壁成分的生物利用度。木质素是植物细胞壁中最顽固的组分;木质素的比例越高,底物的生物利用度越低(Sjostrom, 1993 年)。

[0087] 另一方面,香蕉茎秆含有 63.9% 纤维素和 12.3% 木质素。纤维素是一种多聚糖,容易水解(Zainol 和 Rehman, 2008 年)。因此,需用高效预处理方法来水解这些原料中的木质素。

[0088] 在本发明中,我们对两种木质纤维原料如水黄皮和麻风树籽饼(浓度 2%、5%、7%、10%)进行了酸水解,与纤维物质(即香蕉茎秆)一起进行糖水解。尽管在香蕉茎秆水解(10% 浓度)中获得的糖分最多,仅对麻风树籽饼进行了详细的研究,因其随手可得。当酸水解不同浓度的麻风树籽饼时,从 7% 麻风树籽饼中能够获得最多还原糖(17.2 克 / 升)。

[0089] 以下实例用于表现本发明的首选方案。业内技术人员应理解,在实例中公开的技术遵循本发明人所发现的代表技术,在本发明的实践中功能良好,因此能被视为构成其实践的首选模式。但是,鉴于本公示,业内技术人员应理解,能够在所公开的具体方案中做出许多更改,只要不脱离本发明的精神及范围,仍可获得相似或类似的结果。

[0090] 实例 1:有机体及生长条件

[0091] 丙酮丁醇梭菌 ATCC4259 在 125 毫升瓶中生长,瓶中含有 50 毫升无氧糖(AnS)培养基,具有组成(克 / 升):葡萄糖, 20;蛋白胨, 10;酵母膏, 5.0; K_2HPO_4 , 3.0; NaCl , 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2; 以及 Na_2CO_3 , 1.0, pH 值调整到 6.5。

[0092] 顶空用 N_2 净化,添加 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.02% 重 / 容比) 脱除微量溶解氧(Samuelov 等人, 1991 年; Lee 等人, 2000 年)。玻璃瓶用丁基橡胶盖密封,在 121°C 下灭菌 10 分钟。无菌培养基中接种 1-3% (容积比) 的种子培养菌,在 37°C 下接种并间歇轻摇 132 小时。

[0093] 实例 2:突变研究

[0094] 使用 MNNG (1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍)进行化学突变。可替代巯基乙酸(AT)培养基与来自穿刺培养菌的丙酮丁醇梭菌 ATCC4259 接种。在 37°C 下生长 12 小时,收集培养菌并离心分离。细胞沉淀物用 2 毫升柠檬酸盐缓冲液(pH 值 5.8)洗涤,100:1 MNNG (在无菌蒸馏水中制备原液 100 毫克 / 毫升)添加到细胞中,在 30°C 下接种 70 分钟。诱变的细胞团离心分离,在生物危害容器中适当弃去上清液。用 AT 发酵液洗涤细胞二次,并再悬浮于 1 毫升 AT 发酵液中。突变体在含有 13 克 / 升的 AT 琼脂平板上筛选,并在 37°C 下接种 12-16 小时。

[0095] 实例 3:丁醇耐受型突变体的耐受性和生长图谱

[0096] 耐受 1.3% 丁醇的突变体做进一步耐受性筛选至更高浓度的丁醇,筛选是在含有

(容积比为 1.5%、1.8%、2.0%、2.5% 及 3.0%) 丁醇的 AT 琼脂平板上进行。生长于含有 3.0% 的 AT 琼脂平板上的突变体被转移到 125 毫升密闭瓶中, 瓶中含有 50 毫升培养基, 具有多种丁醇量, 即 2.0%、2.5%、3.0% 及 3.5%。监控突变体的耐受性和生长随时间变化图。

[0097] 野生型菌株丙酮丁醇梭菌 ATCC4259 能够在培养基中耐受达 1.5% 丁醇, 超出时停止生长。而突变菌株丙酮丁醇梭菌 MTCC5587 能够在 AT 培养基中耐受达 3.5% (容积比) 丁醇(图 1)。在这样的丁醇浓度水平下生长极其缓慢,

[0098] 因溶剂的毒性而虚弱无力。更高浓度时, 即 3.8% 和 4%, 不再有任何生长。该突变体已经根据布达佩斯条约, 存于印度昌迪加尔的微生物菌种保藏馆, 标记编号为 MTCC5587。

[0099] 实例 4 : 脂肪提取及分析

[0100] 按照 (Baer 等人, 1987 年) 中所述从细胞中提取全部脂肪。脂肪做酯交换并用色谱仪分析脂肪酸甲酯。

[0101] 提取野生型和溶剂耐受型突变菌株的全部脂肪, 用色谱仪进行分析。与野生型菌株比较时发现, 突变体丙酮丁醇梭菌 MTCC5587 的脂质组成已经被改变。色谱图(图 2B) 显示存在饱和脂肪酸, 即肉豆蔻酸 (C14:0) 和棕榈酸 (C16:0), 在仅有微量非饱和脂肪酸的溶剂耐受型菌株中, 占全部脂肪酸的大约 50%。而在野生型中, 非饱和酸即油酸 (C18:1) 的含量丰富, 成分约占全部脂肪酸的 75%, 且饱和脂肪酸量低得多 (C16:0 的 11%) (图 2A)。

[0102] 实例 5 : 罗丹明 6G 聚集

[0103] 将野生型和溶剂耐受型突变体丙酮丁醇梭菌 MTCC5587 的隔夜培养细胞点在涂有或未涂罗丹明 6G (100 μ g/ml) 的 AT 琼脂板上, 并在无氧室中, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 24 小时。在紫外光下监控罗丹明 6G 的聚集 (Lazaroaie, 2009 年)。

[0104] 在含有毒色素罗丹明 6G 的板上温育 24 小时发现, 在细胞内显示为粉红色菌落的罗丹明 6G 中, 突变菌株大量聚集(图 3)。而野生型菌落呈淡粉红色, 色素聚集比较低。这表明在突变菌株中, 存在针对丁醇等有毒化合物的耐受机制。

[0105] 实例 6 : 批量发酵中的工艺优化

[0106] 所有优化实验都在 125 毫升瓶中, 在 50 毫升 AnS 培养基中进行。不同的生物质 (即麻风树籽饼、香蕉茎秆和水黄皮籽饼) 按下述做酸水解处理。所有实验都进行了至少三次, 确保重现性。

[0107] 实例 7 : 不同原料的酸水解

[0108] a. 麻风树籽饼与水黄皮籽饼

[0109] 将麻风树籽饼和水黄皮籽饼脱油干燥, 然后磨成细粉。按不同浓度将细磨的籽饼用 1-3% HCl 或 H₂SO₄ 在 100 $^{\circ}$ C 以上温度下处理 1-3 小时。经过酸处理后, 用细布过滤料浆, 然后用 NaOH 中和滤液。在这些酸预处理滤液中补充 AnS 培养基。用浓 H₂SO₄ 或 NaOH 调整培养基的 pH 值至 6.5。

[0110] b. 香蕉茎秆

[0111] 将香蕉茎秆切成小块, 晒干磨粉。按不同浓度将细磨的香蕉茎秆以针对麻风树和水黄皮籽饼所述相同的方式进行预处理。

[0112] 所有三种类型的生物质都要经过酸水解, 并通过二硝基水杨酸法评估总还原糖水平。使用麻风树籽饼水解物作为唯一碳源时, 在含有 7% 麻风树籽饼水解物的瓶中, 丁醇滴度少得可怜, 至多 4.2 克 / 升。类似地, 单独用 7% 水黄皮籽饼水解物, 取得了 2.4 克 / 升的

滴度。这表明,若要成功进行丁醇发酵,需要补充其他碳源。

[0113] 无论对于麻风树,还是水黄皮水解物,滴度均会随葡萄糖量的增加而增加(表 1 和表 2)。在含有 7% 麻风树水解物和 2% 葡萄糖的 AnS 培养基中,在 120 小时内产生了滴度 14.3 克 / 升的丁醇(表 1)。而用 2% 葡萄糖和 7% 水黄皮水解物,产生了 8.7 克 / 升的丁醇(表 2)。

[0114] 香蕉茎杆能够帮助产生丁醇而无需补充其他碳源,在 10% 水解物浓度时取得 9.1 克 / 升的滴度。但是,用 2% 葡萄糖随香蕉茎杆水解物一起强化,滴度升至 18.0 克 / 升丁醇(表 3)。

[0115] 表 1 :在不同的葡萄糖和麻风树籽饼水解物的比率时的丁醇产率(克 / 升)

[0116]

葡萄糖	麻风树籽饼			
	2%	5%	7%	10%
0	2.0	3.2	4.2	3.9
0.5	5.2	6.4	8.9	8.1
1.0	7.1	8.9	10.8	10.2
1.5	8.5	10.1	12.2	12.0
2.0	9.1	12.8	14.3	13.8

[0117] 表 2 :在不同的葡萄糖和水黄皮籽饼水解物的比率时的丁醇产率(克 / 升)

[0118]

葡萄糖	水黄皮籽饼			
	2%	5%	7%	10%
0	1.4	1.9	2.4	2.0
0.5	3.3	4.0	4.9	4.3
1.0	4.9	5.8	6.2	6.0
1.5	6.0	7.0	8.0	8.1
2.0	6.6	7.9	8.7	8.4

[0119] 表 3 :在葡萄糖与香蕉茎杆水解物的不同比率时丁醇产率(克 / 升)

[0120]

葡萄糖	香蕉茎杆			
	2%	5%	7%	10%
0	2.7	3.4	5.3	9.1
0.5	5.5	8.9	9.6	10.7
1.0	7.8	11.6	12.4	13.8
1.5	10.3	12.2	15.8	17.8
2.0	11.6	13.7	16.9	18.0

[0121] 实例 8 :丁醇和残糖的评估

[0122] 使用 RI 检测器,用乙腈和 0.5mM H₂SO₄ (1:9) 作为流动相,流率为 1.5 毫升 / 分钟,在 PRP300X 色谱柱(哈密尔顿柱)上应用 HPLC (高效液相色谱法),对培养菌上清液进行

丁醇分析。丁醇洗脱保留 7.3 分钟。用二硝基水杨酸法评估发酵培养基中的残糖 (Tasun 和 Ghen, 1970 年)。

[0123] 实例 9 :在 500 毫升无氧瓶中验证生产工艺

[0124] 在优化的培养基中生产丁醇,在 500 毫升瓶中并在 300 毫升规模得到了验证。发酵进行了 132 小时,对丁醇产率做了评估。在 500 毫升瓶中并在 300 毫升规模的工艺验证做了 96 小时,是在含有 7% 麻风树籽饼水解物和 2% 葡萄糖的 AnS 培养基中进行,得到了 14.8 克 / 升丁醇。

[0125] 实例 10 :工艺规模扩大至 15 升

[0126] 在具有 15 升工作容积的 20 升生物反应器中,在优化的条件下进行丁醇的扩大生产。在 150 转每分钟连续搅拌下,在 37°C 下发酵 108 分钟。培养基的初始 pH 值设定为 6.5。通过添加硅消泡剂来控制起泡。为在整个实验过程中保持无氧状况,将 N₂ 气以 0.5 升 / 分钟的速率通过一个无菌过滤器,连续吹入培养基中。按 12 小时的时间间隔定期采集样本,处理后用于评估发酵液中的残糖、pH 值及丁醇浓度。

[0127] 在使用 7% (重 / 容比) 麻风树籽饼和 2% 葡萄糖的 20 升生物反应器中,本工艺进一步扩大规模至 15 升水平。在 72 小时内取得 18.6 克 / 升的丁醇滴度(图 4 和图 5)。初始含糖 44 克 / 升,最终含糖 4 克 / 升(图 5)。当产酸相下降和产溶剂相开始时,能够观察到典型的蝴蝶转换。

[0128] 实例 11 :评估丙酮、丁醇和乙醇的比率

[0129] 在 ABE 发酵过程中所产生溶剂的比率分析采用 RID 检测器,使用 0.1NH₂SO₄ 作为流动相,速率为 0.6 毫升 / 分钟,在 Rezex 有机酸色谱柱上应用 HPLC。发酵液于 Rezex 有机酸 HPLC 色谱柱上的分析揭示,丙酮 : 丁醇 : 乙醇的比率为 2.6:6.6:0.8,类似于在一种典型的 ABE 发酵中得到的比率。

[0130] 参考文献

[0131] Baer, S. H., Biaschek, H. P., Smith, T. L. (1987 年)。丁醇刺激和温度对丁醇耐受型丙酮丁醇梭菌的脂质组成和膜流动性的影响。应用及环境微生物学。53:2854-2861。

[0132] Ezeji, T. C., Qureshi, N., Biaschek, H. P. (2007 年)。从生物质中生产丁醇 : 从基因到生物反应器。当前生物技术中的观点。18:220-227。

[0133] Herrera, S. (2004 年)。工业生物技术 - 一次救赎的机会。自然生物技术。22 (6) :671-678。

[0134] Jones, D. T., Woods, D. R. (1986 年)。丙酮丁醇发酵再探。微生物学评论。50:484-524。

[0135] King, A. J., He, W., Cuevas, J. A., Freudenberg, M., Ramiarmanana, D., Graham, LA. (2009 年)。麻风树作为可再生油料和动物饲料来源的潜力。实验植物学报。60:2897-2905。

[0136] Lazaroaie, M. M. (2009 年)。革兰氏阴菌耐有机溶剂相关的机制。世界科学院,工程与技术。54:648-658。

[0137] Lee, P. C., Lee, W. G., Kwon, S., Lee, S. Y., Chang, H. N. (2000 年)。为从乳清中产生琥珀酸的批量及连续培养产琥珀酸厌氧螺菌。应用微生物学及生物技术。54:23-27。

[0138] Liang, Y., Siddaramu, T., Yesuf, J., Sarkany, N. (2010 年)。麻风树籽饼经氢氧化

钙预处理和酶水解后释放可发酵糖。生物资源技术。101:6417-6424。

[0139] Li, J., Zhao, J. B., Zhao, M., Yang, Y. L., Jiang, W. H., Yang, S. (2010 年)。丁醇耐受型微生物的筛选及表征。应用微生物学快报。50:373-379。

[0140] Long, S., Long, D. T., Woods, D. R. (1984 年)。在丙酮丁醇梭菌 P262 中溶剂产生开始、梭菌阶段及孢子形成。应用微生物学及生物技术。20:256-261。

[0141] Nishino, K., Yamaguchi, A. (2004 年)。组蛋白样蛋白质 H-NS 在大肠杆菌的多药耐药性中的作用。细菌学杂志。186:1423-1429。

[0142] Papoutysakis, E. T (2008 年)。工程产溶剂的梭菌。当前生物技术中的观点。19:420-429。

[0143] Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H. P. (1998 年)。一种旨在用拜氏梭菌生产丁醇具有成本效益的葡萄糖玉米浸渍培养基的开发。工业微生物学与生物技术杂志。21:187-191。

[0144] Pfromm, H. P., Amanor-Boadu, V., Richard N., Vadlani, P., Madl, R. (2010 年)。生物丁醇对比生物乙醇:用酵母或丙酮丁醇梭菌发酵玉米和柳枝稷的技术和经济性评估。生物质与生物能源。34:515-524。

[0145] Qijreshi, N., Saha C. B., Ronald E. H., Bruce, D., Stephen, H., Siqig, L., Loren, I., Michael J. B., Gaul am, S., Michael, A. C. (2010 年)。从农业残渣中生产丁醇(一种生物燃料):第二部分:玉米秸秆和柳枝稷水解物的使用(2010 年)。生物质与生物能源。34:566-571。

[0146] Samuelov, S., Lamed, R., Lowe, S., Zeikus, J. G. (1991 年)。CO₂/HCO₃⁻水平和 pH 值对产琥珀酸厌氧螺菌的生长、琥珀酸的产生和酶活性的影响。应用及环境微生物学。57:3013-3019。Sharma, Y., Singh B., Korstad, J. (2010)。从非食用原料中高产率转换生物柴油(*Pongamia pinnata*)。农业化学与食品化学杂志。58 (1):242-247。

[0147] Sikkema, J., de Bont, J. A., Poolman, B. (1995 年)。碳氢化合物膜毒性的机制。微生物学评论。59:201-222。

[0148] Sjostrom, E. W (1993 年)。化学:基础与应用。学术出版社:Orlando. 293pp。

[0149] Tasun, K., Chose, P., Ghen, K. (1970 年)。用 DNS 法确定糖分。生物技术与生物能量。12:991-992。

[0150] Tomas, C. A., Welker, N. E., Papoutsakis, E. T. (2003 年)。丙酮丁醇梭菌中 groESL 的过表达导致溶剂的产率和耐受性增加、代谢时间延长及细胞的转录程序改变。应用及环境微生物学。69:4951-4965。

[0151] Tomas, C. A., Beamish, J., Eleftherios (2004 年)。丁醇应激和丙酮丁醇梭菌的转录分析。细菌学杂志。186 (7):2006-2018。

[0152] Volherbst-Schneck, K., Sands, J. A., Montenecourts, B. S. (1984 年)。丁醇对丙酮丁醇梭菌 ATCC824 的脂质组成和流动性的影响。应用及环境微生物学。47:193-194。

[0153] Zainol, N., Rahman, R. A. (2008 年)。从香蕉茎秆废料中回收厌氧纤维素。国际排放贸易文莱网上的第一届国际学术会议论文集, 5 月 26-27 日。

[0154] 因此, 尽管我们描述了本发明的基本新型特征, 应该理解, 在不脱离本发明精神的条件下, 可能会在形式和细节中做各种省略、替换及更改。例如, 我们明确要求, 所有那些元

素及 / 或方法步骤(以几乎相同的方式执行几乎相同的功能,旨在取得相同的结果)应该在本发明的范围内。

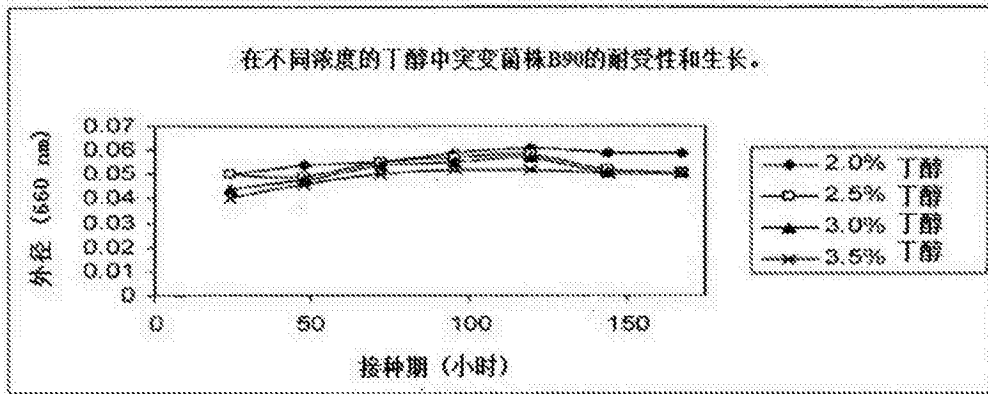


图 1 :在不同浓度的丁醇中突变菌株的耐受性和生长。

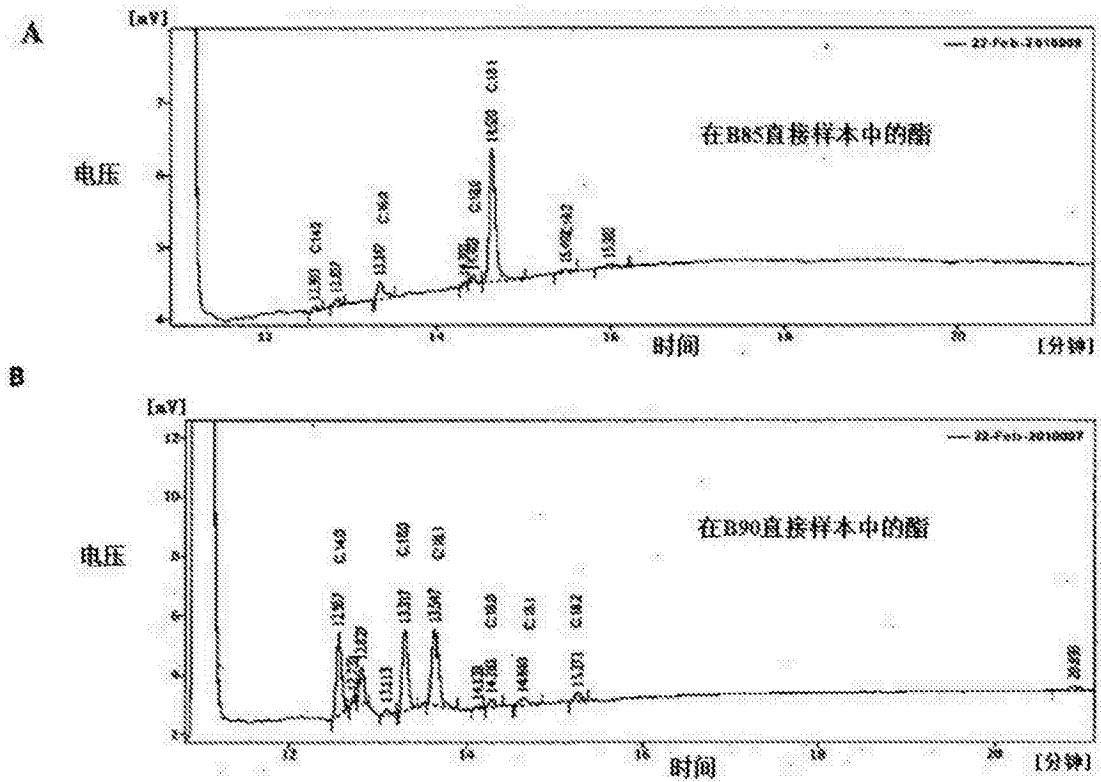


图 2 :野生型菌株 (A) 和突变型菌株 (B) 的脂肪酸图谱的比较

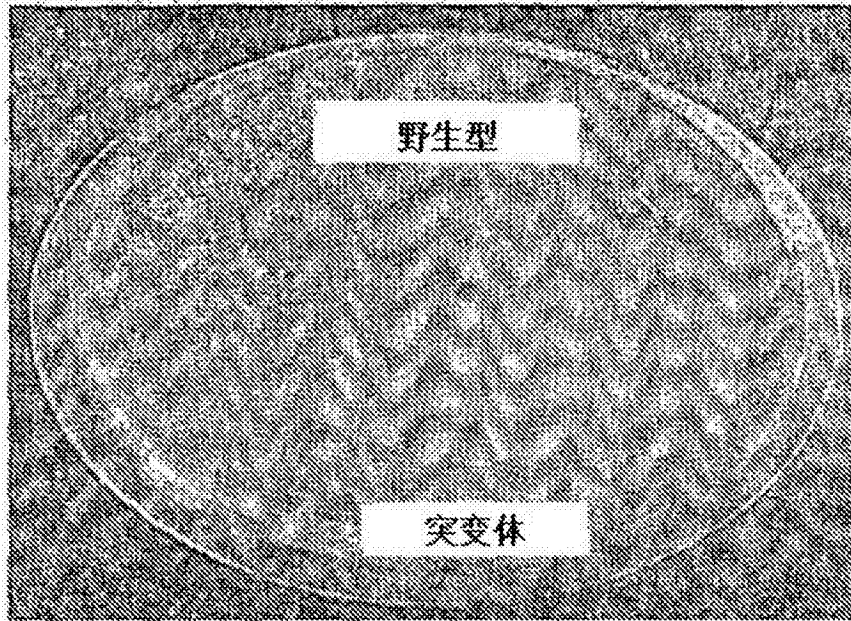


图 3: 在丙酮丁醇梭菌的野生型和溶剂耐受型突变体中罗丹明 G 的聚集

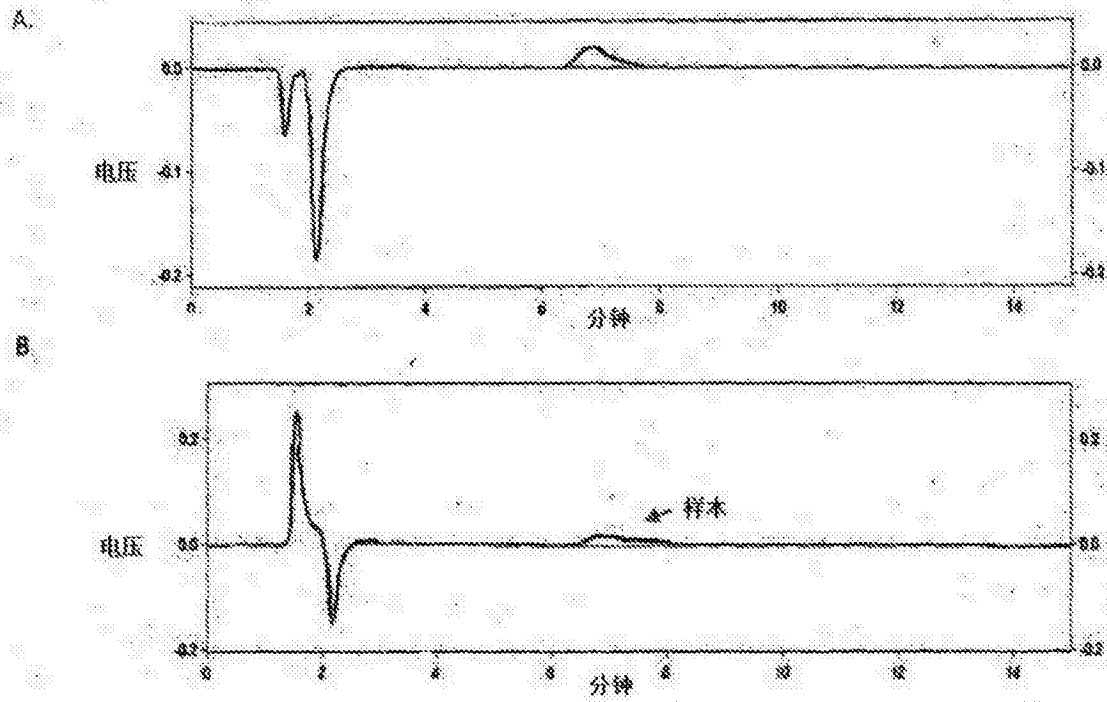


图 4: 标准丁醇 (A) 和发酵液 (B) 的 HPLC 色谱图。

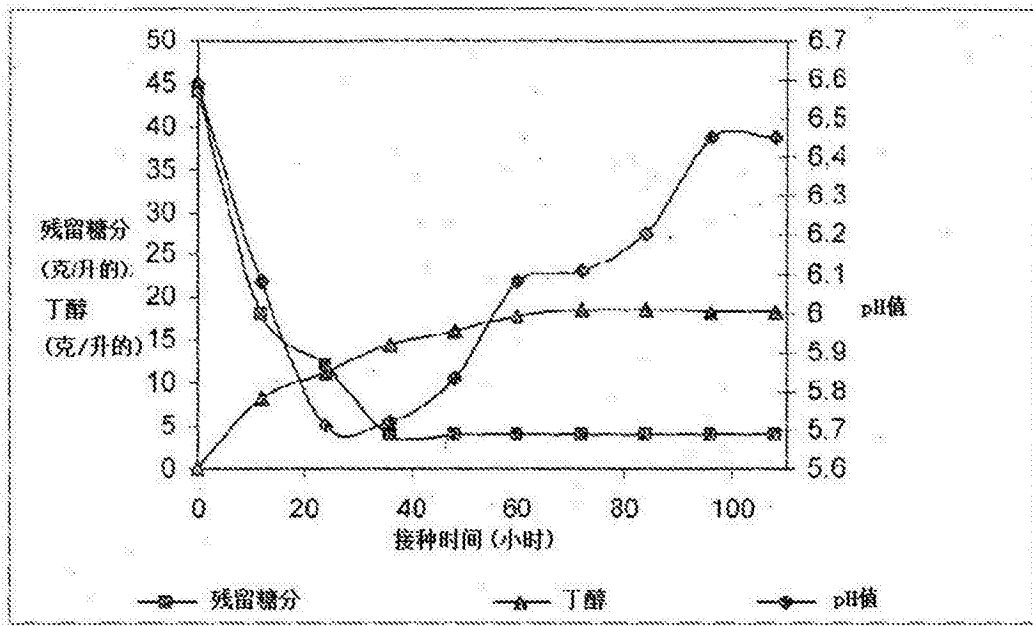


图 5 :从麻风树籽饼水解物进行扩大规模生产丁醇的图请。