

厌氧产氢微生物研究进展

马诗淳^{1,2} 罗辉^{1,2} 尹小波^{1,2} 张辉^{1,2} 邓宇^{1,2*}

(1. 农业部沼气科学研究所 四川 成都 610041)
(2. 能源微生物与利用重点开放实验室 四川 成都 610041)

摘要: 微生物是生物制氢的核心。本文论述了通过厌氧代谢途径产氢的微生物种类及高效产氢微生物选育和应用的研究趋势, 其中重点论述了中温和嗜热厌氧产氢微生物的产氢能力、底物利用范围及代谢特性, 简述了嗜热一氧化碳营养型产氢菌的种类及代谢特点。

关键词: 厌氧, 嗜热产氢微生物, 超嗜热产氢古菌, 一氧化碳营养型产氢菌, 生物制氢

Progress in Microorganisms Producing Hydrogen by Anaerobic Metabolism

MA Shi-Chun^{1,2} LUO Hui^{1,2} YIN Xiao-Bo^{1,2} ZHANG Hui^{1,2} DENG Yu^{1,2*}

(1. Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 610041, China)
(2. Key Laboratory of Energy Microbiology and Application, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Microorganisms play a key role in bio-hydrogen producing. Progress in microorganisms producing hydrogen by anaerobic metabolism is reviewed in recent years in the present paper. The species of microorganisms producing hydrogen by anaerobic metabolism, and current status of breeding and application of efficient hydrogen-producing microorganisms were summarized. The hydrogen-production capability, substrates utilization, and metabolic characteristics of anaerobic and thermophilic hydrogen-producing microorganisms were summarized especially, the species and metabolic characteristics of thermophilic carboxydophilic hydrogenogenic bacterium were introduced briefly.

Keywords: Anaerobic, Thermophilic hydrogen-producing, Microorganisms, Hyperthermophilic hydrogenogenic archaea, Carboxydophilic hydrogenogenic bacterium, Bio-hydrogen

作为未来理想的替代能源之一, 氢气具有燃烧值高、可以在燃料电池中被转换成电能或燃烧后转换为机械能且不产生二氧化碳等优势。

微生物产氢是一种在好氧和厌氧条件下普遍存在的自然现象。多种光合细菌及化能异养微生物在厌氧条件下都具有一定的产氢能力, 以厌氧发酵方式产氢的化能异养微生物生长温度范围宽、可利用

的产氢基质类型多, 代谢途径多样, 在固体废弃物、有机和无机废水等资源化利用及降低生物制氢成本方面具有显著的优势。光合细菌可以在厌氧条件下利用还原态无机物或有机物还原 CO₂, 因此可用于污水净化。厌氧产氢发酵分为中温发酵和高温发酵, 中温微生物种类多、分布广泛, 发酵技术成熟, 发酵成本较低; 而嗜热微生物以代谢活跃、可产生多种

胞外酶、能水解多种有机物、转化率高等特点成为目前产氢微生物的研究焦点。本文主要综述了厌氧产氢微生物种类、产氢能力、酶学及代谢特性,并分析了当前的研究现状和趋势。

1 厌氧产氢微生物的种类

1.1 厌氧发酵产氢微生物

1.1.1 严格厌氧产氢微生物: 1) 中温厌氧产氢微生物: 厌氧发酵制氢的纯培养物多数为中温菌,梭菌是中温厌氧发酵产氢的优势微生物。某些甲基营养型细菌(*Methylomonas albus*, *M. trichosporium*)、瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*, *R. flavefacien*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)和产甲烷菌(*Methanothrix soehngenii*, *Methanosarcina barker*)也具有一定的产氢能力。

Fang 等^[1]通过 DGGE 分析利用蔗糖产氢的粒状淤泥渣发现其中 69.1% 的微生物属于梭菌属。梭菌不仅能够利用葡萄糖、果糖、淀粉产氢,还可以利用纤维素、半纤维素、木糖、木聚糖、几丁质等难降解的底物厌氧发酵产氢(表 1),其产氢过程由碳水化合物化合物的中间代谢产物丙酮酸的厌氧代谢所驱动。Taguchi 等^[2]报道了目前梭菌中温厌氧发酵己糖的最大氢气产率为 2.36 mol/mol 葡萄糖。

目前已清楚地阐述了 *C. cellulolyticum* 水解纤维素产生氢气的代谢途径(图 1)。当 *C. cellulolyticum* 快速水解纤维素时会引起丙酮酸积累,从而抑制其生长,降低其他代谢产物的产量。但当丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶过量表达时可以解除丙酮酸的积累,同时提高 H₂ 产量^[8]。

2) 嗜热厌氧产氢微生物: 与中温微生物相比,嗜热微生物产氢的最大优势是代谢快、产量高,这

可能与微生物在高温条件下通常以乙酸作为主要发酵产物,而中温条件下多产生混合产物(如乳酸、乙醇、丁醇等)有关。

a. 兼性及专性嗜热产氢细菌: 嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacterium*)、嗜热产氢菌属(*Thermohydrogenium*)、栖热分支菌属(*Thermobrachium*)和嗜热的梭菌是研究较多的嗜热产氢细菌。

T. thermosaccharolyticum PSU-2 于 60°C, pH 6.25 时氢气产率为 2.53 mol/mol 己糖^[9]。*Thermobrachium* sp. 在最佳产氢条件下(62°C, pH 7.2)氢气产率为 1.06 mol/mol 葡萄糖^[10]。

C. thermocellum 是最受瞩目的嗜热梭菌,它可以将纤维素迅速分解为葡萄糖,产生乙酸或乙醇、H₂ 和 CO₂ 等。*C. thermocellum* 以脱木质素的木纤维发酵产氢,氢气产率为 1.6 mol/mol 葡萄糖^[11]。*C. thermocellum* 的代谢通量反映碳同化速率,不同碳流量可以改变 pH、氧化还原电势和代谢终产物的积累。在低营养条件下,分解代谢与合成代谢紧密联系,可获得较高生物产量。反之,在富营养时可以通过分解代谢产生高碳通量速率、低生物量、低生长效率和“代谢溢流”。所以,以低营养条件利于 *C. thermocellum* 代谢途径向产氢方向进行。

另外, *C. thermolacticum* 利用乳糖产氢的代谢途径已基本阐述清楚,氢气产率为 2.1 mol/mol 乳糖 ~3.0 mol/mol 乳糖^[12, 13]。

b. 极端嗜热产氢细菌: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 和热胞菌属(*Thermotoga*)在厌氧发酵葡萄糖产氢时,氢气产率可达理论产氢量的 90% 左右。*C. saccharolyticus* 通过 EM 途径每水解 1 mol 葡萄糖最多可以产生 3.6 mol H₂^[14]。

表 1 转化不同底物产氢的梭菌
Table 1 *Clostridium* sp. producing hydrogen by converting different substrates

菌种 Strains	底物 Substrates	转化率 Conversion rate	参考文献 Reference
<i>Clostridium</i> sp. strain no 2	纤维素、半纤维素、木聚糖和木糖	2.06 mol H ₂ /mol 木糖, 2.36 mol H ₂ /mol 葡萄糖	[2]
<i>C. paraputrificum</i> M-21	几丁质类	1.9 mol H ₂ /mol 乙酰葡萄糖胺	[3]
<i>C. butyricum</i>	蔗糖	2.78 mol H ₂ /mol 蔗糖	[4]
<i>C. Saccharoperbutylacetonicum</i> ATCC 27021	粗乳酪乳清(ca.41.4 g 乳糖/L)	2.7 mol H ₂ /mol 乳糖	[5]
<i>C. populeti</i>	纤维素	1.6 mol H ₂ /mol 己糖	[6]
<i>C. cellulolyticum</i>	纤维素	1.7 mol H ₂ /mol 己糖	[6]
<i>C. beijerinckii</i>	餐厨垃圾	1.79 mol H ₂ /mol 己糖	[7]

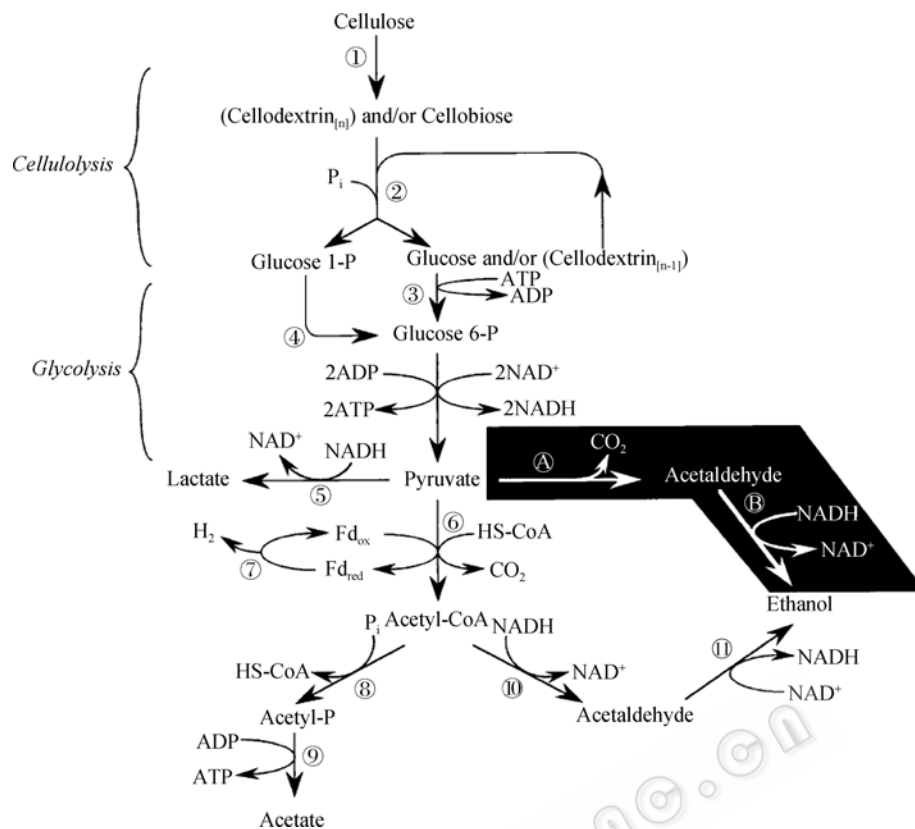


图 1 *C. cellulolyticum* 中纤维素转化为发酵产物的代谢途径^[8]

Fig. 1 Conversion of cellulose into fermentation products by *C. cellulolyticum*^[8]

注: 1: 纤维素水解; 2: 纤维糊精磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶; 3: 葡糖激酶; 4: 磷酸葡萄糖变位酶; 5: L-乳酸脱氢酶; 6: 丙酮酸-铁氧还蛋白氧化还原酶; 7: 氢酶; 8: 磷酸转乙酰酶; 9: 乙酸激酶; 10: 乙醛脱氢酶; 11: 醇脱氢酶; A: 丙酮酸脱羧酶; B: 醇脱氢酶。

Note: 1: Cellulosome hydrolysis; 2: Cellodextrin phosphorylase and cellobiose phosphorylase; 3: Glucokinase; 4: Phosphoglucosmutase; 5: L-LDH; 6: PFO; 7: Hydrogenase; 8: Phosphotransacetylase; 9: Acetate kinase; 10: Acetaldehyde dehydrogenase; 11: ADH (EC 1.1.1.1); A: PDC; B: ADH.

热杆菌属的所有成员都具有一定的产氢能力。*T. elfii* 的氢气产率为 3.3 mol/mol 葡萄糖^[15]。*T. neapolitana* 发酵以离子液体预处理的纤维素时, 氢气产率为 2.2 mol/mol 葡萄糖^[16]。

将比较基因组学和功能基因组学引入到热杆菌属代谢功能多样性研究中发现, 热杆菌属不仅含有编码淀粉酶及其水解产物转运蛋白的基因, 还含有编码纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶及其水解产物转运蛋白的基因和基因簇^[17]。由此可推断, 热杆菌属不仅能够降解由 α -1,4, α -1,6 糖苷键连接的寡糖和多聚糖(如麦芽糖、淀粉、普鲁兰多糖等), 还具有利用由 β -1,4, β -1,3 和 β -1,6 糖苷键连接的寡糖和多聚糖(如纤维素、纤维二糖、胶质、海带多糖、木聚糖等复杂的碳水化合物)产生氢气的潜力^[17]。van Ooteghem 等^[18]对 *T. neapolitana* 利用纤维素、纤维二糖、可溶性淀粉和蛋白质等不同底物产氢进行了研究。*T. elfii* 和 *C. saccharolyticus* 已经用于转化废纸浆、富含木质纤维的物质产氢研究^[19,20], *T.*

maritima 和 *T. neapolitana* 已用于优化产氢工艺的分批发酵实验^[21]。

另外, *T. neapolitana* 和 *T. maritima* 在微好氧条件下发酵时的氢气产量通常高于其厌氧发酵的产量。据推测, 在代谢过程中一部分葡萄糖利用分子氧作为电子受体被氧化, 以满足微生物的能量需求, 另一部分葡萄糖则通过可以增加 H_2 产量的途径进行代谢。同时, 由于这类微生物的氧化还原酶铁硫中心的合成或修复途径以及半胱氨酸合成途径过量表达, 解除了氧气的毒害作用^[22, 23]。

深入了解微生物的代谢途径可以指导调控产氢代谢, 目前已对 *T. maritima* 中糖代谢途径的很多细节(如 ABC 转运系统)进行了预测, 但是其中一些局部和整体调控机制还需要深入研究^[24, 25]。

c. 嗜嗜热产氢古菌: 能够产生氢气的极端嗜热古菌多属于热球菌目(Thermococcales), 可以利用糖类或多肽进行产氢代谢。

热球菌目包括火球菌属(*Pyrococcus*)和热球菌

属(*Thermococcus*)2 个主要的属, 其中多数成员主要以硫元素(S⁰)做为末端电子受体在厌氧条件下产生 H₂S, 少数异养的种类可以在不存在硫元素的条件下利用碳水化合物生长, 并产生唯一还原性终产物氢气。Tamotsu Kanai 等^[26]研究了 *T. kodakaraensis* KOD1 的产氢特性并对其产氢代谢途径(图 2)进行了探讨, *T. kodakaraensis* KOD1 在稀释速率为每小时 0.8 时连续发酵丙酮酸的最大产氢速率为 59.6 mmol/(gdw·h)。 *T. kodakaraensis* KOD1 发酵淀粉产氢时, 通过修饰的 EM 途径将葡萄糖转化为丙酮酸, 丙酮酸经氧化途径生乙酸和氢气, 同时丙酮酸通过还原途径生成丙氨酸。丙氨酸的生成与氢气的生成具有竞争作用^[27]。因此, 抑制丙氨酸的生成可以增加氢气产量。

P. furiosus 以麦芽糖作为底物连续发酵产氢, 在稀释率为每小时 0.40~65 时, 产氢速率为 80 mmol/(gdw·h)^[28]。通过比较基因组学和功能基因组学研究发现, *P. furiosus* 具有可以降解纤维素的 β-葡萄糖苷酶、内切-β-1,3-葡萄糖苷酶和摄取纤维二糖的 ABC 转运子, *T. kodakaraensis* KOD1 可以通过

胞外几丁质酶(具有双重催化结构域)、N-乙酰壳二糖脱酰酶和外切-β-D-氨基葡萄糖苷酶组成的一种新的几丁质代谢途径同化几丁质和相关的低聚物。*T. litoralis* 可以利用蛋白质和其他难以降解的底物, 目前已成功地应用于动物角蛋白废弃物两步发酵法生物制氢^[29]。

与超嗜热古菌产氢密切相关的氢酶还需要深入研究。目前, 已鉴定了 *P. furiosus* 中存在 2 种可溶性 NAD(P)还原性(Hyh1, Hyh2)氢酶^[30]和 1 种耗能的多亚基膜结合[NiFe]氢酶。*T. litoralis* 中确定了 1 种胞质[NiFe]氢酶(Hyh1)的存在, 但是已有另一种可溶性氢酶(Hyh2)和膜结合氢酶基因存在于 *T. litoralis* 中的证据。最近报道 *T. litoralis* 中存在一种特殊的操纵子, 该操纵子可以编码与 *E. coli* 中甲基氢解酶系统的组分具有高度序列相似性的亚基组成的复合体。该复合体虽然也是由甲基脱氢酶亚基与氢酶联合并结合于膜上, 但是与 *E. coli* 中的甲基氢解酶复合体在糖代谢中发挥作用不同, 在 *T. litoralis* 中它可能与多肽的代谢相联系^[31]。

d. 嗜热一氧化碳营养型产氢菌: 自然界存在

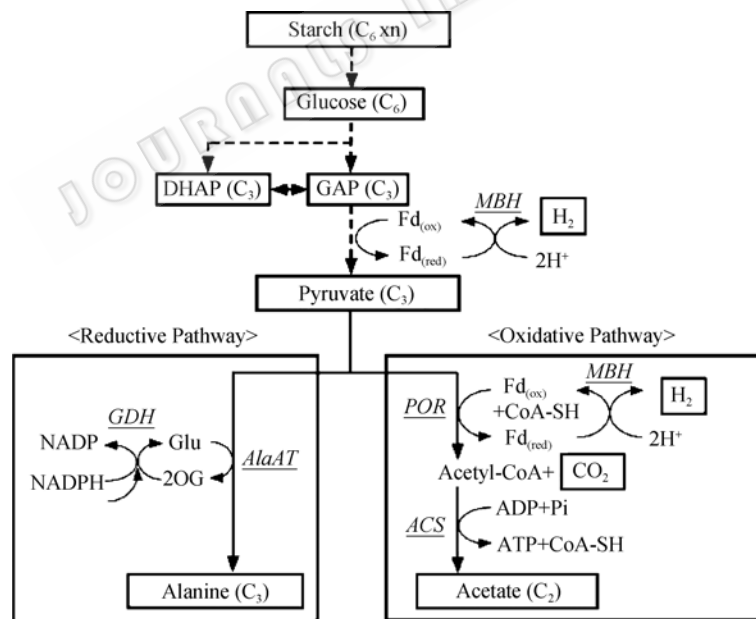


图 2 *T. kodakaraensis* 中淀粉和丙酮酸的代谢途径^[26]

Fig. 2 Proposed metabolic pathway of starch and pyruvate degradation in *T. kodakaraensis*^[26]

注: 虚线箭头表示由复合酶催化的转化反应。DHAP: 磷酸二羟丙酮; GAP: 甘油醛-3-磷酸; 2OG: 2-酮戊二酸; Pi: 无机磷酸盐; Fd(ox): 氧化铁氧还蛋白; Fd(red): 还原性铁氧还蛋白; GDH: 谷氨酸脱氢酶; AlaAT: 丙氨酸转氨酶; POR: 丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶; ACS: 乙酰-CoA 合成酶; MBH: 膜结合氢酶。底物的碳原子数如括号中所示。

Note: Dotted arrows indicate reactions covered by multiple enzymes. Abbreviations used are: DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; 2OG: 2-Oxoglutarate; Pi: Inorganic phosphate; Fd(ox): Oxidized ferredoxin; Fd(red): Reduced ferredoxin; GDH: Glutamate dehydrogenase; AlaAT: Alanine aminotransferase; POR: Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase; ACS: Acetyl-CoA synthetase; MBH: Membrane-bound hydrogenase. For some substrates, the numbers of carbon atoms are described inside the parentheses.

表 2 目前分离到的嗜热—氧化碳营养型产氢菌
Table 2 Carboxydrotrophic hydrogenogenic bacterium and their isolation locales

微生物 Organism	GenBank Accession No.	分离地点 Isolation site	生境 Habits	参考文献 Reference
<i>Carboxydothemus hydrogenoformans</i>	NC_002972	Kunashir, Kuril Islands Kamchatka	高温沼泽, 68°C, pH 5.5	[32]
<i>Carboxydothemus restrictus</i>	Not available	Raoul Island, Kermadec Archipelago	海底热液	[33]
<i>Carboxydocella thermautotrophica</i>	AY061974	Gezyer Valley, Kamchatka	陆地温泉, 60°C, pH 8.6	[34]
<i>Thermosinus carboxydivorans</i>	AY519200	Norris Basin, YNP, USA	陆地温泉, 50°C, pH 7.5	[35]
<i>Thermococcus</i> sp. AM4	AJ583507	East Pacific Rise	海底热液喷口	[36]
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>Pacificus</i> (formerly <i>Carboxydibrachium</i> <i>pacificum</i>)	AF120479	Okinawa Trough	海底热液喷口, 110°C~130°C	[37, 38]
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> strain 2707	EF554599	Kunashir, Kuril Islands	陆地温泉	[38]
<i>Thermincola carboxydiphila</i> strain 2204	AY603000	Baikal Lake region	温泉 55°C, pH 8.0	[39]
<i>Carboxydocella sporoproducens</i> sp. nov.	AY673988	Karymskoe Lake	温泉 60°C, pH 6.8	[40]
<i>Thermolithobacter carboxydivorans</i> Strain JW/KA-2	DQ095862	Calcite Spring, Yellowstone N.P.	温泉 73°C, pH 7.3	[41]
<i>Thermincola ferriacetica</i> strain Z-0001	AY631277	Kunashir Island	富含 Fe ³⁺ 的陆地热泉 57°C~60°C, pH 7.0~7.2	[42]

着一类可以通过 $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$ ($\text{DG}^0 = -20 \text{ kJ}$) 厌氧氧化—氧化碳产生等量氢气和二氧化碳的微生物。由于氢气是其代谢中唯一还原性产物, 故称之为“产氢菌”。目前已发现 11 种“产氢菌”(表 2), 其中既包括嗜热细菌又包括嗜热古菌。目前唯一一个从海洋中分离到的超嗜热—氧化碳营养型产氢菌 *Caldanaerobacterium subterraneus* subsp. *pacificus* 除了能够利用 CO 生长外, 还可以利用几种单糖、二糖、纤维素和淀粉有机营养生长。

一氧化碳脱氢酶和氢酶是一氧化碳代谢的关键酶。通过对分离自深海热泉的极端嗜热古菌 *Thermococcus* sp. AM4 的研究, 第一次证实了厌氧—氧化碳的氧化与氢气的产生相耦联^[36]。通过对 *C. hydrogenoformans* 基因组序列的分析, 推测其一氧化碳脱氢酶(CooS)是一种含 Ni 的、具有 4 个[4Fe-4S]簇、由 5 个蛋白质亚基组成的电子转移蛋白; 氢酶为膜结合[Ni-Fe]氢酶, 它与一类[Ni-Fe]氢酶(该酶与一种储能的 NADH: 醌氧化还原酶具有序列相似性)具有高度的序列相似性。在 *C. hydrogenoformans* 中, CO 可能通过乙酰-CoA 途径由一氧化碳脱氢酶催化, 氧化为 CO₂, 同时在氢酶的作用下将质子还原为 H₂。“产氢菌”的一氧化碳脱氢酶并不属于目前已知

的 4 种厌氧微生物—氧化碳脱氢酶中的任何一种, 是一种只负责 CO/CO₂ 氧化还原作用的单功能酶^[43]。另外, 由于“产氢菌”的代谢反应不同于经典的底物水平磷酸化和氧化磷酸化, 所以其氢酶应该通过一种目前未知的能量储存机制储存能量。

嗜热—氧化碳营养菌的发现, 使水汽转化氢气从化学法向生物法转变时, 除了光合细菌及产甲烷菌以外又多了一种可选择的资源。

1.1.2 兼性厌氧产氢微生物: 埃希氏菌属(*Escherichia*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)是典型的具有产氢能力的兼性厌氧微生物, 它们含有细胞色素体系, 通过分解甲酸的厌氧代谢途径产氢。

E. coli 是研究的最透彻的产氢微生物, 它通常作为基因工程改造的对象在厌氧产氢中深入研究^[44, 45]。

E. aerogenes 是肠杆菌属中报道的第一个发酵产氢的种, 它在 100% H₂ 气压下可表现出非抑制性生长。分离自产甲烷污泥中的 *E. aerogenes* HU-101 可用于发酵含甘油的生物柴油废弃物生产 H₂ 和乙醇^[46]。*E. cloacae* DM11 是迄今肠杆菌属 H₂ 产率最大的种(连续发酵产氢率为 3.8 mol/mol 葡萄糖^[47])。

1.2 光合产氢微生物

光合细菌是一类厌氧自养微生物, 它可以利用

多种无机或有机底物作为电子供体, 在厌氧、光照条件下生长, 也可以在厌氧、暗条件下利用发酵产生的有机酸, 通过 TCA 循环克服正向自由能反应生成氢气。红螺菌属和红假单胞菌属是目前常用的光合产氢细菌。目前, 已深入研究了红细菌 (*Rhodobacter*), 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*), 嗜酸红细菌 (*Rhodobacter acidophilla*), 荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*), 桃红荚硫菌 (*Thiocapsa roseopersicina*), 类球红细菌 (*Rhodobacter sphaerooides*), 胶状红长命菌 (*Rubrivivax gelatinosus*), 沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) 的产氢代谢机制、酶学特性、产氢动力学及应用等^[48-50]。

2 高效厌氧产氢微生物选育及应用的研究趋势

尽管现在已发现多种不同代谢类型的产氢微生物, 但是由于对其代谢途径尚未彻底了解清楚, 生物转化效率较低等方面的障碍, 限制了生物制氢的应用。通过改进传统的菌种筛选方法, 结合生物信息学、代谢组学和基因工程手段筛选和构建产氢新菌种, 以及根据不同产氢微生物的特点利用混合培养物制氢是目前产氢微生物的主要研究方向。

2.1 新菌种的筛选

改进传统产氢微生物筛选方法, 同时借助分子生物学及生物信息学研究方法, 尽可能扩大产氢微生物的筛选范围, 从而获得高产氢效率、底物利用范围较广的菌株。

随着大量遗传和代谢信息的公开使用, 通过采集基因组信息筛选新菌种已广泛用于产氢微生物中。将基因组数据库中的完全或部分基因组序列与产氢代谢相关序列(目前已有 176 个测序的产氢微生物的基因组)进行分析和比对, 从而鉴定具有产氢潜力的微生物^[51]。通过这种方法发掘的一些产氢微生物不仅产氢效率较高, 可利用的基质范围广泛, 还具有有一些特殊功能, 如降解高氯酸盐工业废水; 修复被污染的土壤和地下水; 作为植物根际益生菌, 在碳循环中发挥作用; 降解芳香烃(如甲苯、二甲苯、甲酚、萘等)。

2.2 产氢工程菌株改造

氢酶、产氢代谢相关功能酶及特殊功能酶基因的过量表达或敲除是提高产氢量、增加底物利用范围的关注点。

E. coli 中与甲基代谢相关的基因及 4 种氢酶已研究得较为清楚。甲基代谢所需的酶都在甲基操纵子上编码, 通过敲除与甲基操纵子的转录负调控子表达相关的基因可以获得高效产氢的突变体。不参与氢气产生的甲基脱氢酶 N、O, 以及氢酶 I 和 II 在代谢中与参与氢气产生的甲基脱氢酶 H 和氢酶 III 竞争甲基, 因此通过敲除与精氨酸转移蛋白 [Twin arginine translocation (Tat) protein, 参与位于周质空间的氢酶 I 和 II 的活化] 表达相关的基因可获得高效产氢的 Tat 缺陷型突变体^[52]。氢酶在 *E. coli* 中的基因操作技术已经比较成熟, Yoshida 等^[53]通过将 *hycA* 失活与 *fhlA* 过量表达相结合构建了甲基氢解酶系统 (FHL) 过量表达的菌株, 氢气产率与野生型相比增加了 2.8 倍。目前已成功的将蓝细菌的氢酶基因座 *hoxEFUYH* 在 *E. coli* 中表达, 氢气产率为不含该基因的菌株的 3 倍^[44]。

梭菌在产氢代谢途径中涉及 2 种酶: 铁氧还蛋白-NAD 还原酶 (FNR) 和 [Fe]-氢酶 (FR)。增加梭菌氢气产量的常用方法是过量表达编码 FR 的 *hydA* 基因。过量表达 *hydA* 基因的 *C. paraputrificum* 重组体与野生型产氢量相比提高了 1.7 倍^[54]。Harada 等^[51]提出一种改善氢气产率的新的策略——破坏编码硫解酶 (THL) (*C. butyricum* 中参与丁酸形成的酶) 的 *thl* 基因, 但是, 由于 THL 突变体不能吸收 NADH, 所以该方法只能用于通过 FNR 产氢的微生物中。在梭菌中, 通过下调 FR 中相关基因表达而控制代谢电子流也是提高氢气产量的一种方法。Nakayama 等^[55]通过克隆 *C. saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4 的氢酶的 *hupCBA* 基因簇并以反义 RNA 下调其表达, 使反义转化子的氢气产量提高了 3.1 倍。另外, 从理论上讲, FNR 过量表达也可以提高氢气产量, 但是现在尚未见到关于 FNR 过量表达菌株产氢的报道。

随着对古菌全基因组信息研究的深入, 也可以利用基因工程手段将特殊功能基因转入古菌, 同时保持和发挥其自身的特性。有人提出可以将嗜嗜热古菌 *P. furiosus* 和 *T. litoralis* 中编码麦芽糖转运蛋白的基因导入 *T. kodakaraensis* KOD1, 从而使其利用麦芽糖快速产氢^[26]。

在光合细菌中, 氢酶(包括单向和双向氢酶)和固氮酶之间在遗传和功能上存在耦联关系, 单向氢酶基因缺失或抑制吸氢作用可以提高氢气转化率。

2.3 产氢混合培养物的利用

混合培养物产氢不仅具有与纯培养物相当的底物转化率、氢气产率及运行负荷,同时,与纯培养物相比,混合培养物还具有更广的底物利用范围、对发酵条件要求相对较低、生产成本低等优势。

混合培养物不仅来源广泛(如各种厌氧污泥、土壤、湖底沉积物及不同来源的堆肥等),而且可以利用餐厨垃圾、固体废弃物、农作物秸秆和各种废水等发酵产氢,产氢率为 1.80 mol/g 底物~3.83 mol/g 底物^[56-58]。

目前混合培养物产氢的研究多数都是在中温(25°C~40°C)或高温(45°C~60°C)条件下进行, *Clostridium* 和 *Thermoanaerobacterium* 分别为其优势产氢菌种。根据热力学的特性,嗜热条件利于产氢反应的进行,然而,现在只有 4 项利用混合培养物在不低于 60°C 的条件下产氢的研究报道,在 60°C 和 75°C 下以牛粪发酵产氢时,优势菌分别为 *C. thermocellum* 和 *Caldanaerobacter subterraneus*^[58-61]。

3 总结与展望

生物制氢技术尚不成熟。尽管人们已经在改进发酵装置和发酵工艺等方面已取得了一定的成果,但是解决应用问题最关键、最直接的方法应该从“产氢反应器”——微生物本身入手。

虽然国内外对分离产氢微生物的研究已较多,但是对其代谢机制研究尚不够深入,尤其对可以利用特殊基质的嗜热或极端嗜热产氢微生物的研究还比较少。目前,农作物秸秆、城市垃圾等大量堆积,不但造成环境污染,也是极大的资源浪费,针对这类难以水解的化合物,本研究团队在利用纤维素产氢微生物的研究中开展了一定的工作,如中温和高温纯培养物的分离及混合培养物的组合、驯化。在产氢微生物的分离过程中,可以在传统分离方法的基础上,结合宏基因组学分析,通过荧光探针等跟踪分离含有特殊功能基因的产氢微生物。

应用混合培养物产氢是目前的研究热点,但是混合培养物的反应动力学、各种群的代谢机制及不同微生物种群之间的代谢关系还需要进一步探索。在深入了解产氢微生物代谢机制的基础上,通过基因工程和代谢工程改造产氢微生物,使代谢通路向产氢方向转换,减少代谢副产物,解除终产物的反馈抑制作用,从而提高氢气产率。另外,将具有不同

代谢机制、不同中间产物和终产物的微生物联合用于生物产氢过程,发挥不同微生物的优势,可以在提高底物转化率的同时增加氢气产量。

参考文献

- [1] Fang H, H Liu, T Zhang. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **78**(1): 44-52.
- [2] Taguchi F, K Yamada, K Hasegawa, *et al.* Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. strain No. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, **82**(1): 80-83.
- [3] Evvyernie D, S Yamazaki, K Morimoto, *et al.* Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, **89**(6): 596-601.
- [4] Chen W, Z Tseng, K Lee, *et al.* Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005, **30**(10): 1063-1070.
- [5] Ferchichi M, E Crabbe, W Hintz, *et al.* Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, **21**(6): 855-862.
- [6] Ren Z, T Ward, B Logan, *et al.* Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, **103**(6): 2258-2266.
- [7] Kim J, L Nhat, Y Chun, *et al.* Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnology and Bio-process Engineering*, 2008, **13**(4): 499-504.
- [8] Guedon E, M Desvaux, H Petitdemange. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(1): 53-58.
- [9] O-Thong S, P Prasertsan, D Karakashev, *et al.* Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, **33**(4): 1204-1214.
- [10] 牛莉莉, 刘晓黎, 陈双雅, 等. 一个新的高温产氢菌及产氢特性的研究. *微生物学报*, 2006, **46**(002): 280-284.
- [11] Levin D, R Islam, N Cicek, *et al.* Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, **31**(11): 1496-1503.
- [12] Collet C, N Adler, J Schwitzguébel, *et al.* Hydrogen pro-

- duction by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, **29**(14): 1479–1485.
- [13] Collet C, L Girbal, P Péringier, *et al.* Metabolism of lactose by *Clostridium thermolacticum* growing in continuous culture. *Archives of Microbiology*, 2006, **185**(5): 331–339.
- [14] de Vrije T, A Mars, M Budde, *et al.* Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **74**(6): 1358–1367.
- [15] van Niel E, M Budde, G de Haas, *et al.* Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**(11-12): 1391–1398.
- [16] Nguyen T, S Han, J Kim, *et al.* Hydrogen production by the hyperthermophilic eubacterium, *Thermotoga neapolitana*, using cellulose pretreated by ionic liquid. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, **33**(19): 5161–5168.
- [17] Connors S, E Mongodin, M Johnson, *et al.* Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, **30**(6): 872–905.
- [18] van Ooteghem S, S Beer, P Yue. Hydrogen production by the thermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, **98**(1): 177–189.
- [19] Kádár Z, T de Vrije, G van Noorden, *et al.* Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, **114**(1): 497–508.
- [20] De Vrije T, G De Haas, G Tan, *et al.* Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, **27**(11-12): 1381–1390.
- [21] Nguyen T, J Pyo Kim, M Sun Kim, *et al.* Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, **33**(5): 1483–1488.
- [22] Eriksen N, T Nielsen, N Iversen. Hydrogen production in anaerobic and microaerobic *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology Letters*, 2008, **30**(1): 103–109.
- [23] Le Fourn C, M Fardeau, B Ollivier, *et al.* The hyperthermophilic anaerobe *Thermotoga Maritima* is able to cope with limited amount of oxygen: insights into its defence strategies. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(7): 1877–1887.
- [24] Connors S, C Montero, D Comfort, *et al.* An expression-driven approach to the prediction of carbohydrate transport and utilization regulons in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, 2005, **187**(21): 7267–7282.
- [25] Comfort D, S Chhabra, S Connors, *et al.* Strategic biocatalysis with hyperthermophilic enzymes. *Green Chemistry*, 2004, **6**(9): 459–465.
- [26] Kanai T, H Imanaka, A Nakajima, *et al.* Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biotechnology*, 2005, **116**(3): 271–282.
- [27] Verhees C, S Kengen, J Tuininga, *et al.* The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal*, 2003, **375**(2): 231–246.
- [28] Schfer T, P Schönheit. Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Archives of Microbiology*, 1993, **159**(4): 354–363.
- [29] Balint B, Z Bagi, A Toth, *et al.* Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **69**(4): 404–410.
- [30] Hedderich, R. Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2004, **36**(1): 65–75.
- [31] Takács M, A Tóth, B Bogos, *et al.* Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *BMC Microbiology*, 2008, **8**(1): 88.
- [32] Svetlichny VA, TG Sokolova, M Gerhardt, *et al.* *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing thermophilic anaerobic bacterium from hydrothermal environments of Kunashir Island. *Systematic and Applied Microbiology*, 1991, **14**(3): 254–260.
- [33] Svetlichny VA, TG Sokolova, N Kostrikina, *et al.* A new thermophilic anaerobic carboxydrotrophic bacterium *Carboxydotherrmus restrictus* sp. nov. *Mikrobiologiya*, 1994, **63**: 294–297.
- [34] Sokolova TG, N Kostrikina, N Chernyh, *et al.* *Carboxydocella thermautotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, CO-utilizing thermophile from a Kamchatkan hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**(6): 1961–1967.
- [35] Sokolova TG, J Gonzalez, N Kostrikina, *et al.* *Thermosinus carboxydivorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, carbon-monoxide-oxidizing, hydrogenogenic bacterium from a hot pool of Yellowstone National Park. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004, **54**(6): 2353–2359.
- [36] Sokolova TG, C Jeanthon, N Kostrikina, *et al.* The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles*, 2004, **8**(4): 317–323.
- [37] Sokolova TG, J Gonzalez, N Kostrikina, *et al.* *Carboxydotherrchium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**(1): 141–149.
- [38] Fardeau M, M Salinas, S L'haridon, *et al.* Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phyloge-

- netically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**(2): 467–474.
- [39] Sokolova TG, N Kostrikina, N Chernyh, *et al.* *Thermincola carboxydiphila* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, carboxydrotrophic, hydrogenogenic bacterium from a hot spring of the Lake Baikal area. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005, **55**(5): 2069–2073.
- [40] Slepova T, T Sokolova, A Lysenko, *et al.* *Carboxydocella sporoproducens* sp. nov., a novel anaerobic CO-utilizing/H₂-producing thermophilic bacterium from a Kamchatka hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(4): 797–800.
- [41] Sokolova TG, J Hanel, R Onyenwoke, *et al.* Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov. and *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. *Extremophiles*, 2007, **11**(1): 145–157.
- [42] Zavarzina D, TG Sokolova, T Tourova, *et al.* *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe (III) reduction. *Extremophiles*, 2007, **11**(1): 1–7.
- [43] Lindahl P. The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel. *Biochemistry*, 2002, **41**(7): 2097–105.
- [44] Maeda T, G Vardar, W Self, *et al.* Inhibition of hydrogen uptake in *Escherichia coli* by expressing the hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 25.
- [45] Bisailon A, J Turcot, P Hallenbeck. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, **31**(11): 1504–1508.
- [46] Sakai S, T Yagishita. Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **98**(2): 340–348.
- [47] Nath K, D Das. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, **65**(5): 520–529.
- [48] Mahakhan P, C Chobvijuk, M Ngmjarearnwong, *et al.* Molecular hydrogen production by a thermotolerant *Rubrivivax gelatinosus* using raw cassava starch as an electron donor. *ScienceAsia*, 2005, **31**(2005): 415–424.
- [49] Rey FE, Y Oda, CS Harwood. Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol*, 2006, **188**(17): 6143–6152.
- [50] Rey F, E Heiniger, C Harwood. Redirection of metabolism for biological hydrogen production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(5): 1665–1671.
- [51] Harada M, Kaneko T, Tanisho S. Improvement of H₂ yield of fermentative bacteria by gene manipulation. Proceedings of the 16th world hydrogen energy conference, 2006, p.211.
- [52] Sawers R. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 2005, **33**(1): 42–46.
- [53] Yoshida A, T Nishimura, H Kawaguchi, *et al.* Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11): 6762–6768.
- [54] Morimoto K, T Kimura, K Sakka, *et al.* Overexpression of a hydrogenase gene in *Clostridium paraputrificum* to enhance hydrogen gas production. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **246**(2): 229–234.
- [55] Nakayam S, T Kosaka, H Hirakawa, *et al.* Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster *hupCBA* in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **78**(3): 483–493.
- [56] Wu S, C Hung, C Lin, *et al.* Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, **93**(5): 934–946.
- [57] Shin H, J Youn, S Kim. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, **29**(13): 1355–1363.
- [58] Yokoyama H, H Ohmori, M Waki, *et al.* Continuous hydrogen production from glucose by using extreme thermophilic anaerobic microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, **107**(1): 64–66.
- [59] Yokoyama H, N Moriya, H Ohmori, *et al.* Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **77**(1): 213–222.
- [60] Kapdan I, F Kargi. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **38**(5): 569–582.
- [61] Yokoyama H, M Waki, A Ogino, *et al.* Hydrogen fermentation properties of undiluted cow dung. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, **104**(1): 82–85.