

木糖发酵产氢菌的筛选及其生长产氢特性研究

许继飞 任南琪* 邱 颀 苏东霞

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要: 利用改进的Hungate厌氧技术,从牛粪堆肥中分离出一株能有效利用木糖发酵产氢的中温菌HR-1。通过 16S rRNA系统发育树分析表明,菌株 HR-1 与丙酮丁醇梭菌*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 相似性最高为 96%,结合生理生化 and 生长特性分析表明,HR-1 是梭菌属*Clostridium*的一个新种,命名为*Clostridium* sp. HR-1。菌株HR-1 为单胞生长的规则杆状菌($0.3\ \mu\text{m}\sim 0.6\ \mu\text{m}$) \times ($1.4\ \mu\text{m}\sim 2.3\ \mu\text{m}$),革兰氏染色为阴性,无荚膜、无鞭毛、表面光滑、无明显凸起,专性厌氧菌。HR-1 可在 $10^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$, pH 4.0~10.0 条件下生长; 37°C 和pH 8.0 分别为其最适生长条件。发酵PYG的主要发酵产物有氢气、二氧化碳、乙酸、丁酸及少量乙醇。HR-1 可以利用有机氮源和无机氮源生长并产氢,酵母提取物是其最佳产氢氮源。HR-1 在木糖浓度为 3 g/L和初始pH 6.5 条件下,其比产氢量为 $1.84\ \text{mol-H}_2/\text{mol-木糖}$,最大比产氢速率为 $10.52\ \text{mmol H}_2/\text{h}\cdot\text{g-细胞干重}$ 。HR-1 可以亦利用葡萄糖、半乳糖、纤维二糖、甘露糖和果糖等碳源生长并发酵产氢,发酵葡萄糖时比产氢量为 $2.36\ \text{mol-H}_2/\text{mol-葡萄糖}$ 。

关键词: 发酵产氢, 分离与鉴定, *Clostridium* sp. HR-1, 木糖

Fermentative Hydrogen Production with Xylose by *Clostridium* sp. HR-1 Isolated from Cow Dung Compost

XU Ji-Fei REN Nan-Qi* QIU Jie SU Dong-Xia

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

Abstract: A anaerobic hydrogen-producing strain HR-1 was isolated from compost. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequence similarity indicates that strain HR-1 is the closest relative to *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, with the similarity of 96%. Biological characteristics and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene indicate that HR-1 is a new species named *Clostridium* sp. HR-1. Cells are Gram-positive, mobile rod-shaped. Spores and flagellums were no observed. Temperature range for growth is 10°C to 45°C (optimum temperature $37^{\circ}\text{C}\sim 39^{\circ}\text{C}$), and range pH for growth is 4.0 to 10.0 (optimum pH 7.5~8.0). H_2 , CO_2 , acetate, butyrate and a little ethanol are the end products of PYG fermentation. Strain HR-1 has the ability to use organic nitrogen and inorganic nitrogen sources for growth and hydrogen production, and yeast extract is the optimum nitrogen source for hydrogen production. Strain HR-1 produces hydrogen from xylose (3 g/L) at 37°C and initial pH 6.5, the hydrogen yields and maximal hydrogen production rate are

1.84 mol-H₂/mol-xylose and 10.52 mmol-H₂/h-g-cdw, respectively. Strain HR-1 is able to utilize glucose, galactose, fructose, mannose and cellobiose for hydrogen production and the hydrogen yields from glucose is 2.36 mol-H₂/mol-glucose.

Keywords: Fermentative hydrogen production, Isolation and characterization, *Clostridium* sp. HR-1, Xylose

氢气作为高效、清洁、可再生的能源,越来越受到人们的关注。在多种制氢方法中,利用微生物厌氧发酵生物质(如有机废水、有机垃圾等)制氢,具备治污、环保和产能等多重优越性,开发前景广阔。生物法制氢实现工业化的核心是过程经济性问题。即如何提高底物到氢气的转化率,降低底物成本,实现在生物反应器水平上高效产氢。为了解决这些问题,研究者们做了很多卓有成效的研究工作,其中之一就是扩大底物利用范围。

自然界中大量可再生的木质纤维类物质丰富且廉价,如果能够解决利用木质纤维素作为原材料最终获取氢气这个关键问题,它将使得获取廉价氢气和实现产业化成为可能。木质纤维素主要有木质素、纤维素和半纤维素组成,纤维素和半纤维素的水解成分主要是单糖和少量的简单聚糖,其中单糖主要是以葡萄糖为主的六碳糖约占60%~70%,以木糖为主的五碳糖约占30%~40%^[1],因此研究和筛选能够利用木糖等五碳糖产氢发酵的微生物及其产氢特性,对于扩展底物范围,降低生物制氢成本,实现生物制氢的工业化具有重要的意义。

目前,国内外学者分离得到的产氢菌,基本上都是以葡萄糖和淀粉为底物的产氢菌,有关利用木糖等五碳糖的产氢菌的筛选及其特性的研究鲜有报道^[2-4]。鉴于上述问题,进行了利用木糖高效产氢菌的分离和筛选工作,并对1株产氢能力相对较高的产氢菌进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌种来源和厌氧培养方法

菌种取自牛粪堆肥中半腐熟的部分。细菌培养中无菌水和培养基制备的全部实验操作采用改进的Hungate厌氧技术^[5],以高纯氮气为气相,采用厌氧螺旋滚管液体和固体培养基,37°C±1°C常规培养。

1.2 培养基

液体培养基(L):木糖 8 g, KH₂PO₄ 1.5 g, Na₂HPO₄·12H₂O 4.2 g, NH₄Cl 0.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.18 g, 酵母提取物 2.0 g, 维生素溶液 0.5 mL, 微

量元素 5.0 mL, 刃天青(0.1%) 1.0 mL, 还原性溶液 40.0 mL。维生素液(钴胺素 0.01 g, 抗坏血酸 0.025 g, 核黄素 0.025 g, 柠檬酸 0.02 g, 吡多醛 0.05 g, 叶酸 0.01 g, 对氨基苯甲酸 0.01 g, 肌酸 0.025 g) 10 mL, 微量元素液[MnSO₄·7H₂O 0.01 g, ZnSO₄·7H₂O 0.05 g, H₃BO₃ 0.01 g, N(CH₂COOH)₃ 4.5 g, CaCl₂·2H₂O 0.01 g, Na₂MoO₄ 0.01 g, CoCl₂·6H₂O 0.2 g, AlK (SO₄)₂ 0.01 g]10 mL; 刃天青(0.2%) 1 mL~2 mL; pH 6~6.4。

固体培养基(L):液体培养基+琼脂(1.5%)

1.3 菌株的富集、分离纯化和筛选

将10 g的牛粪堆肥置于装有200 mL的无菌无氧水的血清瓶中,加入数颗玻璃珠,在振荡器上振荡2 h,将牛粪堆肥颗粒打碎,使其充分的溶解在水中。用无菌注射器从中吸取20 mL,注入装有180 mL液体培养基的血清瓶中,置于37°C±1°C的恒温培养箱中培养1周。1周后,从中吸取10 mL菌液注入装有80 mL液体培养基的血清瓶中,置于37°C±1°C的恒温培养箱中培养2 d~3 d,重复培养数次,进行分离。将富集数次的菌液,用无菌无氧水进行倍比稀释,接种于固体滚管培养基上,置于37°C±1°C的恒温培养箱中培养至菌落清晰可见,用无菌毛细管挑取单菌落,转接于液体管中恒温培养24 h~72 h,重复分离纯化数次,直至管内菌落的菌落形态以及显微镜下的细胞形态一致认为是纯菌株。

将分离纯化得到的发酵细菌接于液体管中,在37°C±1°C恒温振荡(135 r/min)培养40 h,用1 mL无菌注射器从其气相中取样,检测其气相成分中是否有氢气存在,如果有,即为产氢菌。

1.4 产气量和产氢能力测定^[6]

产氢能力试验采用间歇试验装置,如图1所示。将产氢细菌按2%的菌量接入盛有145 mL液体培养基(初次优选为100 mL)的锥形瓶中,置于恒温气浴振荡器中,在35°C下以120 r/min振荡培养,定时测其产气量、pH值、菌浊、细胞干重和氢气含量。在产气量测定的数值读取中,平衡瓶液面与气量测定管液面相平,以保证测定数值的准确性。

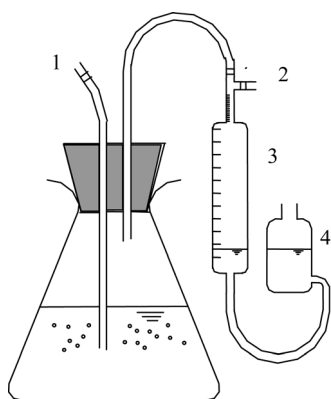


图1 产气间歇试验装置示意图

Fig. 1 Sketch of gas production device of batch test

注: 1: 液体取样和氮气冲洗口; 2: 气体取样口; 3: 气体测量管; 4: 平衡瓶。

Note: 1: Sampling and nitrogen flush place; 2: Gas sampling place; 3: Gas measure tube; 4: Balance bottle.

1.5 细菌的生理生化分析和生长测定

形态学鉴定和生理生化鉴定指标参照文献[7]。细菌的生长状况用紫外分光光度计, 在 600 nm 波长处测定样品的吸光度值, 作为菌浊。不同菌浊的细胞干重测定是将一定量样品 4000 r/min 离心, 弃去上清液, 用无菌纯水清洗细菌沉淀 3 次, 80°C 烘干至恒重, 用电子天平称量其重量以计算其干重。

1.6 16S rDNA 序列分析

细菌 DNA 的提取参照文献[10], 用于 16S rRNA 扩增的 PCR 反应引物为通用引物: 正向引物 BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 BSR1541/1522: 5'-ACGGCTACCTTGTTAC GACT-3', 分别对应于大肠埃希氏菌(*E. coli*) 16S rRNA 的 8-27 和 16S rRNA 的 1522~1541 碱基。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times buffer (Mg^{2+}) 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μ L, 20 pmol/L 引物各 1 μ L, Ex Taq DNA 酶 0.25 μ L。PCR 扩增条件: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 57°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 8 min。用 pMD19-T 载体克隆; 16S rRNA 序列同源性分析采用 NCBI 的 Blastn 软件进行多重序列比对。通过 MEGA 4.0 软件[8], 以 Neighbor-Joining 法和自展评估绘制 16S rRNA 系统发育树[9]。

1.7 发酵产物分析^[10]

气体分析: 使用日本津岛公司 GC-4890 谱仪测定气体的组成, 柱长 2 m, 担体 TDS01, 60~80 目, 热导池检测器, 不锈钢填充柱, 载气氮气, 流速 70 mL/min, 柱和检测室 150°C。

液体分析: 使用日本岛津公司 GC-6890 谱仪, 取

1 mL 培养液, 同时加入 6 mol/L HCl 溶液 2 滴, 离心 5000 r/min, 取上清液 2 μ L 进样, FID 检测器, 柱长 1 m, 不锈钢柱, 担体 GDX401, 60~80 目, 氢火焰检测器, 氮气作载气, 流速 50 mL/min, 氢气流速为 0.5 kg/cm², 空气流速为 0.5 kg/cm², 汽化室 210°C, 柱 150°C 和检测室 250°C。

2 结果与讨论

2.1 产氢菌株的筛选

从牛粪堆肥中, 利用 Hungate 厌氧滚管技术分离出 87 株可以利用木糖作为碳源生长发酵的细菌, 从中筛选出 18 株产氢细菌。从 18 株产氢中选出稳定产氢的 7 株细菌, 通过间歇试验测其产氢能力(图 1)。对比这 7 株菌的产氢情况可知, HR-1 的累积产氢量最高为 275 mL, 菌株 XS-3 和 HR-5 次之。菌株 HR-1 是专性厌氧菌, 其液相末端发酵产物主要是乙酸和丁酸, 伴有少量的乙醇, 气相产物只有氢气和二氧化碳, 其中氢气含量在 55%~65%之间, 末端 pH 约为 4.0 左右。

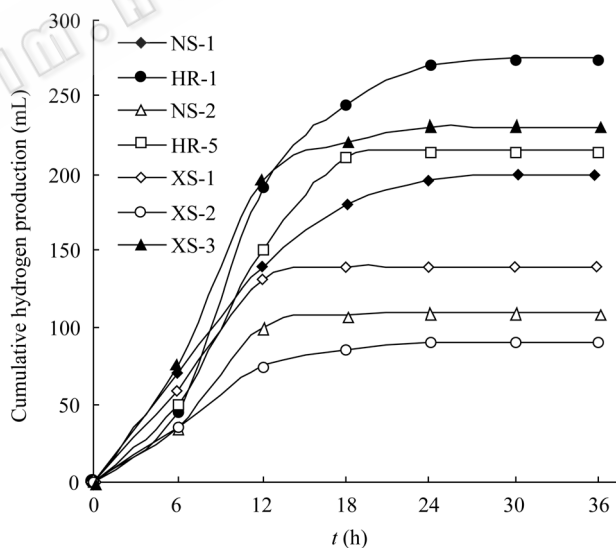


图2 分离出的 7 株菌的产气情况

Fig. 2 Gas production of the strains separated

2.2 产氢菌 HR-1 的形态特征

菌株 HR-1 在固体培养基上生长时为乳白色圆形菌落, 边缘整齐, 表面光滑。革兰氏染色为阴性。扫描电镜(JEM-1220, Hitachi)的观察发现(图 2), 细胞呈杆状, 单个、成对或短链状排列, 无鞭毛, 无芽孢, 菌体大小为(0.2 μ m~0.4 μ m) \times (1.8 μ m~3.2 μ m)。

2.3 基于 16S rRNA 的系统发育分析

扩增 HR-1 的 16S rRNA 序列后进行克隆测序获

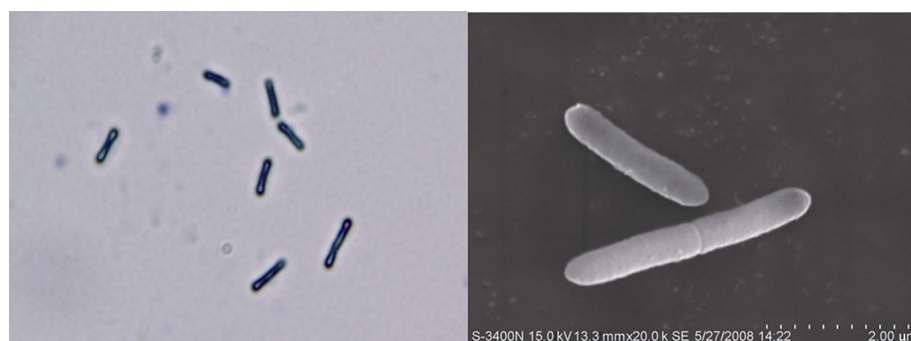
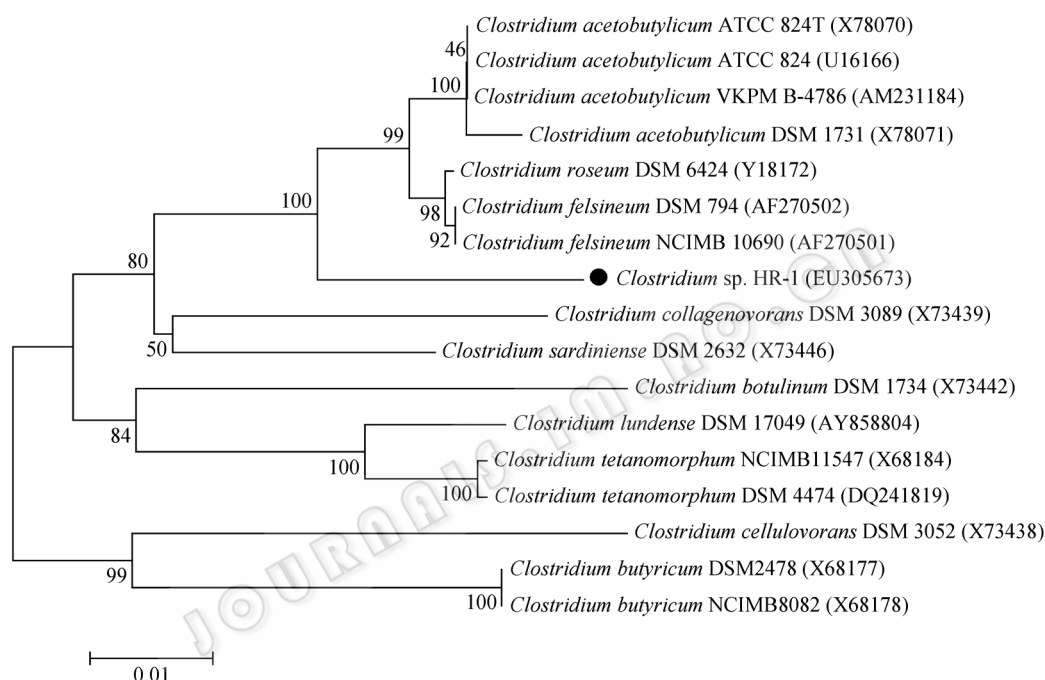


图3 产氢菌 HR-1 的革兰氏染色和扫描电镜形态

Fig. 3 LM with gram-stain and EM of cells of strain HR-1

图4 *Clostridium* sp. HR-1 的系统发育树Fig. 4 Phylogenetic tree of strain *Clostridium* sp. HR-1

注：菌名后括号里的是该菌株在 GenBank 中的核酸序列号。

Note: The numbers at the nodes indicate the level of bootstrap support based on the neighbor-joining analysis of 1000 resample data sets: only the value $\geq 50\%$ is given. The scale bar indicates 0.01 nucleotides substitution per nucleotide position.

得 16S rRNA 全长序列 1520 bp, 在 GenBank 中的核酸序列号为 EU305673, 通过 NCBI 的 Blastn 序列比对进行同源性分析, 与其最相似的是丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824), 相似性为 96%。通常 16S rRNA 相似性小于 97%, 就可以认为可能是一新菌种, 因此初步认为菌株 HR-1 为 *Clostridium* 的一新种, 命名为 *Clostridium* sp. HR-1。

2.4 菌株 HR-1 生理生化及生长测定

对细菌进行生理生化分析发现: 菌株显运动性、没有异染粒、抗酸染色试验显阴性、没有伴胞晶体、

有类脂粒。葡萄糖氧化发酵表明 HR-1 菌为发酵型; 糖醇类发酵、甲基红试验、淀粉水解、纤维素的利用、七叶灵水解、明胶液化均显阳性(表 1)。其中“+”表示可以利用或呈阳性反应, “-”表示不能利用或阴性反应。

氮源利用试验发现 HR-1 可以利用蛋白胨、酵母粉、L-半胱氨酸、氯化铵、硝酸钾, 不利用亚硝酸钠, 有机氮源中生长明显比无机氮源好, 亚硝酸根对菌体有抑制或杀菌作用。耐盐性试验表明该菌能在含 NaCl 低于 2% 的环境中生长, 高于此浓度则会出现明显的抑制作用。生长温度范围是 10°C~

表 1 HR-1 的生理生化特征
Table 1 Biological characters of strain HR-1

检测项目 Project	结果 Result	检测项目 Project	结果 Result
丙二酸盐试验 Malonate test	+	淀粉降解试验 Starch degradation test	+
V.P 试验 Voges-Proskauer test	+	明胶水解试验 Gelatin hydrolysis	-
甲基红试验 Methyl Red test	-	纤维素降解试验 Cellulose degradation test	-
吲哚试验 Indole test	+	硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	-
卵磷脂酶试验 Lecithinase test	-	氮源试验 Nitrogen test	+
石蕊牛奶试验 Litmus milk test	+	七叶灵水解试验 Esculin hydrolysis test	+
柠檬酸盐试验 Citrate test	-	脂酶试验 Lipase test	-
H ₂ S试验 H ₂ S test	+	阿拉伯糖 Arabinose	+
甘露醇 Mannitol	-	甘露糖 Mannose	+
麦芽糖 Maltose	+	松叁糖 Melezitose	+
蔗糖 Sucrose	+	棉子糖 Raffinose	+
乳糖 Lactose	+	山梨醇 Sorbitol	+
水杨苷 Salicin	+	鼠李糖 Rhamnose	+
海藻糖 Fucose	+	木糖 Xylose	+
脲酶 Urease	-	甘油 Glycerol	+
接触酶 Contact enzyme test	-	β-葡萄糖甙酶 β-Glucosidase	+
蛋白酶 Protease	-		

45℃, 最适温度为 37℃~39℃。耐受 pH 范围是 4.0~10.0, 最适 pH 范围是 7.5~8.0。

2.5 产氢菌 HR-1 的产氢特性

2.5.1 产氢菌HR-1 生长曲线分析: 将对数生长期的菌液以 2%的接种量接种至液体培养基中(培养基以木糖为碳源, 3 g/L), 初始pH为 6.5, 于 37℃恒温空气浴摇床中培养, 定时测定菌体生长及产气情况。从图 4 中可以看出, 在 0~6 h, 菌的生长缓慢, HR-1 处于迟缓期, 此时仅有很少量的氢气放出。从第 9 小时开始, 细胞数量迅速增加, HR-1 进入对数生长期, 伴随着物质和能量代谢活动的进行, 产氢量表现出与生长情况一致的增加过程, 生物量的迅速增长和较高的代谢活性直接导致产氢量的增加。15 h 后菌的生长趋于平缓, 进入稳定期, 到第 18 小时细菌数量最大, 之后细菌进入衰退期, 累积产氢量在 21 h达到最大。在此条件下, HR-1 利用木糖的比产氢量

和比产氢速率分别为 1.84 mol-H₂/mol-xylose和 10.52 mmol H₂/h g-细胞干重, 这与目前利用木糖产氢最高的中温菌*Clostridium* sp. No. 2 的产氢能力相当^[2]。

HR-1 发酵木糖生成的挥发性有机物包括乙酸、丁酸和少量的乙醇。图 5 为乙酸和丁酸随发酵时间的变化过程, 乙酸和丁酸的量随着 HR-1 的生长及发酵的进行而逐渐增加。与氢气的释放同时进行, 因此菌株 HR-1 的氢气释放是一个典型的偶联型生物过程。当 HR-1 的生长进入衰亡期后, 挥发酸的量并没有保持不变而是持续增加, 直到 24 h 时乙酸和丁酸的量基本上保持不变。整个培养过程中, 乙酸和丁酸的最大含量分别为 1398 mg/L 和 1165 mg/L, 乙醇量很少, 只有 11.3 mg/L。

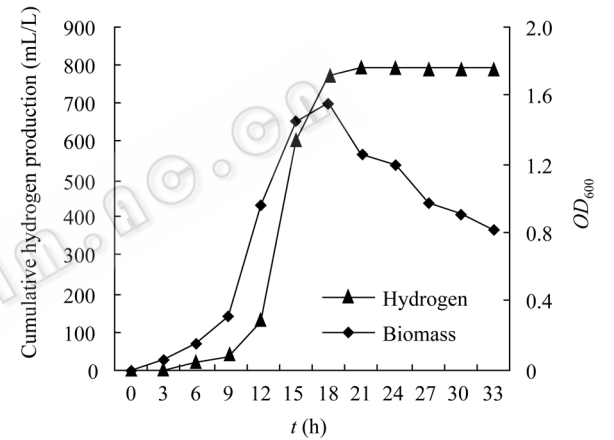


图 5 产氢菌 HR-1 木糖发酵产氢曲线
Fig. 5 The time courses of hydrogen production of *Clostridium* sp. HR-1

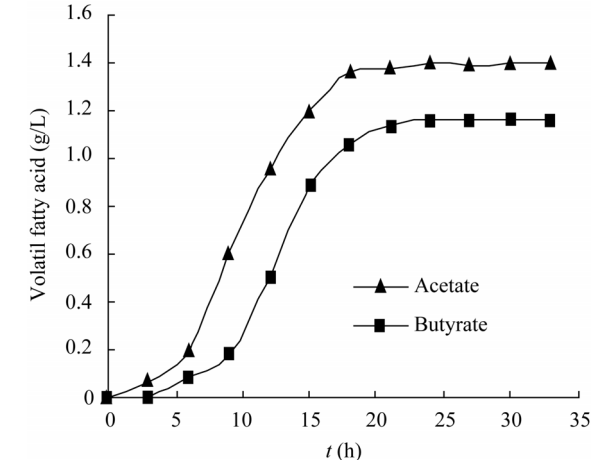


图 6 产氢菌 HR-1 木糖发酵挥发酸的变化
Fig. 6 The time courses of volatile fatty acid of *Clostridium* sp. HR-1

2.5.2 利用不同氮源的产氢分析: 将对数生长期的菌液以 2%的接种量接种至液体培养基中(碳源: 木

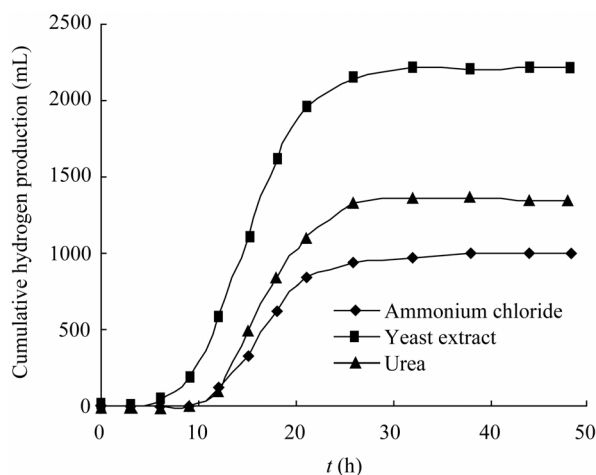


图7 产氢菌 HR-1 在不同氮源下的产氢

Fig. 7 Hydrogen production of *Clostridium* sp. HR-1 under different nitrogen sources

糖 10 g/L; 氮源: C:N=20:1), 初始 pH 为 6.5, 于 37°C 恒温空气浴摇床中培养, 定时测定菌体生长及产气情况。图 6 所示为菌株 HR-1 利用不同氮源的产氢情况。由图可知, HR-1 既可以很好的利用有机氮源(酵母和尿素)和无机氮源(氯化铵)生长并产氢。但是酵母是其产氢的最适氮源, 其产氢迟滞期大约为 6 h 左右, 较氯化铵和尿素短, 而且具有较大的产氢量和产氢速率, 分别为 2208 mL/L 和 245 mL/h。

2.5.3 利用不同碳源产氢分析: 将对数生长期的菌液以 2% 的接种量接种至液体培养基中(碳源: 10 g/L), 初始 pH 为 6.5, 于 37°C 恒温空气浴摇床中培养, 定时测定菌体生长及产气情况。图 7 所示为产氢菌 HR-1 利用不同碳源的产氢情况。由图可知, HR-1 可以利用半乳糖、纤维二糖、葡萄糖、甘露糖、果糖和木糖产氢。其中, 当以葡萄糖为碳源时产氢量最大, 比产氢量约为 2.36 mol-H₂/mol-glucose, 果

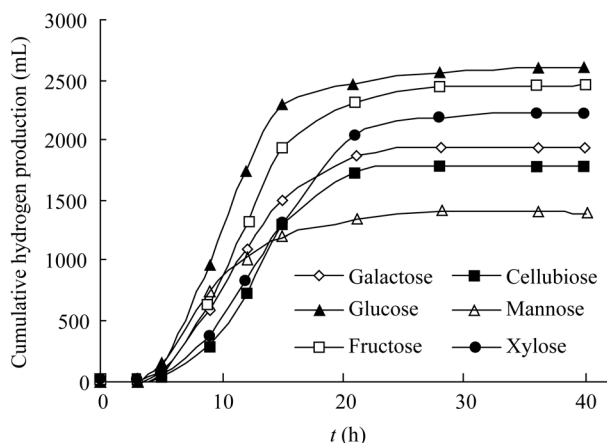


图8 产氢菌 HR-1 在不同碳下的产氢

Fig. 8 Hydrogen production of *Clostridium* sp. HR-1 under different carbon sources

糖次之, 接下来是木糖、半乳糖和纤维二糖, 最少的是果糖。由于这些糖都是木质纤维素水解的主要组成糖类, 因此产氢菌 HR-1 在利用木质纤维素水解液产氢方面应有更大的实际应用价值。

3 结论

1) 采用 Hungate 厌氧滚管技术从牛粪堆肥中分离出一株高效发酵木糖的产氢菌。通过形态特征、生理生化分析和 16S rRNA 鉴定表明是梭菌属(*Clostridium*)一个新菌种, 将其命名为 *Clostridium* sp. HR-1。

2) 菌株 HR-1 是中温丁酸发酵产氢菌, 在 37°C、pH 6.5 条件下, 其比产氢量为 1.84 mol H₂/mol-木糖, 最大比产氢速率为 10.52 mmol H₂/hg-细胞干重。

3) 菌株 HR-1 可以利用有机氮源和无机氮源产氢, 酵母提取物是其产氢的最佳氮源。可以用葡萄糖、半乳糖和甘露糖等发酵产氢, 其中葡萄糖比产氢量最大为 2.36 mol-H₂/mol-葡萄糖。

参考文献

- [1] Sun Y, Cheng JY. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 2002, **83**: 1-11.
- [2] Taguchi F, Mizukami N, Hasegawa K, *et al.* Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No. 2. *Can J Microbiol*, 1994, **40**: 228-233.
- [3] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem*, 2000, **35**: 589-593.
- [4] Lo YC, Chen WM, Hung CH, *et al.* Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Res*, 2008, **42**: 827-842.
- [5] Hungate RE. *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press Inc, 1969.
- [6] 任南琪, 林明, 马沙平, 等. 厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性研究. *太阳能学报*, 2003, **24**(1): 80-84.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**: 1596-1599.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406-425.
- [10] Xing DF, Ren NQ, Li QB, *et al.* *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**: 755-760.