

筛选生物转化 H₂/CO₂ 气体产乙酸的同型产乙酸菌混培物

罗衍, 符波, 张丽娟, 刘宏波, 刘和

江南大学环境与土木工程学院 环境生物技术研究室, 江苏 无锡 214122

罗衍, 符波, 张丽娟, 等. 筛选生物转化 H₂/CO₂ 气体产乙酸的同型产乙酸菌混培物. 生物工程学报, 2014, 30(12): 1889–1899.

Luo K, Fu B, Zhang LJ, et al. Screening of homoacetogen mixed culture converting H₂/CO₂ to acetate. Chin J Biotech, 2014, 30(12): 1889–1899.

摘要: 同型产乙酸菌是一类具有巨大工业应用潜力的微生物类群, 可利用合成气生成乙醇和乙酸等燃料和化学品。本研究采集城市污泥样品利用 Hungate 滚管法进行同型产乙酸菌的筛选, 并利用其进行 H₂/CO₂ 气体的生物转化, 研究了 pH 对其乙酸和乙醇生成情况的影响。结果表明, 所获得的同型产乙酸菌混培物组成为永达尔梭菌, 纺锤形赖氨酸芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌等。该混培物最适 pH 为 5–7。pH 为 7 时混培物利用 H₂/CO₂ 气体得到乙酸浓度可达到 31.69 mmol/L。本研究获得了一种可利用 H₂/CO₂ 合成乙酸的同型产乙酸菌混培物, 为合成气生物转化的工业应用提供了有效的微生物资源。

关键词: 同型产乙酸菌, 筛选, 生物转化, pH, 酵母提取物

Screening of homoacetogen mixed culture converting H₂/CO₂ to acetate

Kan Luo, Bo Fu, Lijuan Zhang, Hongbo Liu, and He Liu

Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Homoacetogens are a group of microorganisms with application potential to produce chemicals and biofuels by

Received: March 21, 2014; **Accepted:** April 11, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21206056), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2012121).

Corresponding author: He Liu. Tel/Fax: +86-510-85326670; E-mail: liuhe@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21206056), 江苏省自然科学基金 (No. BK2012121) 资助。

the bioconversion of synthesis gas. In this study, we collected waste activated sludge samples to screen homoacetogens by Hungate anaerobic technique, and studied the effect of pH on acetate and alcohol production from H_2/CO_2 gas. The mixed culture contained *Clostridium ljungdahlii*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Bacillus cereus*. Acetate concentration achieved 31.69 mmol/L when the initial pH was 7. The mixed culture containing homoacetogen could converting H_2/CO_2 to acetate, which provides an efficient microbial resource for the bioconversion of synthesis gas.

Keywords: homoacetatogen, screen, biological conversion, pH, yeast extract

随着化石能源的逐渐枯竭, 利用微生物生产液体燃料和基本化学品, 部分替代化石能源和石化产品是许多国家可持续发展的战略目标之一。合成气(主要由 CO 、 H_2 、 CO_2 组成的混合气体)是一种燃料和化学制品生产的主要原料, 可由煤、可再生的生物质和有机废物等制得, 并能通过化学催化法合成乙醇^[1]。相比于化学转化法, 微生物转化技术则更具吸引力^[2]。因此, 合成气生物转化是一项具有巨大应用前景的新兴技术, 对我国大力开发可再生能源具有非常重要的意义, 且有利于国家的可持续发展。目前, 国外在这一领域的研究处于试验阶段, 投入日益加大致力于其商业化规模应用, 而国内研究刚刚起步^[3]。

同型产乙酸菌(Homoacetogen, HOMA)是一类能够通过乙酰辅酶 A 途径将 2 分子的 CO_2 还原为乙酸的厌氧微生物, 无论在自养还是异养生长方式下, 外源的 CO_2 对同型产乙酸菌的生长都是必不可少的^[4]。同型产乙酸菌是一种极具发展潜力的工业微生物, 具有诸多工业化生产的优势, 例如代谢底物广, 既能异养生长又能利用厌氧乙酰辅酶 A 途径还原部分二氧化碳, 厌氧生长但又耐受一定的氧气, 其代谢终产物有乙酸、乙醇、丁酸和丁醇等。混合培养生物技术已成为一个非常有前景的发展方向, 其理念是从生物工程学的角度出发, 结合环境

生物技术的传统元素, 在处理废弃物的同时又像工业生物技术那样使产品最大化^[5], 与基于纯培养的工业生物技术相比较, 混合培养技术拥有微生物多样性带来的适应能力。

因此, 在研究同型产乙酸菌的工业应用技术时, 分离获得同型产乙酸菌的混合菌群以及了解其 H_2/CO_2 气体生物转化特性具有重要意义。本文对筛选获得的混合菌群的结构进行了解析, 并研究了其 H_2/CO_2 气体生物转化效果。

1 材料与方法

1.1 培养基成分

富集培养基的成分如下^[6](g/L): 甲酸钠 3.25, NH_4Cl 0.5, KH_2PO_4 0.25, K_2HPO_4 0.25, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3; 微量元素(mg/L): $FeCl_3$ 25, $NiSO_4$ 16, $CaCl_2$ 25, $ZnCl_2$ 11.5, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.5, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 5, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 15。50 mmol/L 的 2-溴乙烷磺酸盐($BrCH_2CH_2SO_3$, BES)作为特异性产甲烷抑制剂^[7]。

筛选培养基主要成分如下^[8-10](g/L): NH_4Cl 0.5, K_2HPO_4 0.25, KH_2PO_4 0.25, $MgSO_4$ 0.3, $NaHCO_3$ 4.0, 半胱氨酸-HCl· H_2O 0.5, 微量元素溶液 10 mL/L, 维生素溶液 10 mL/L, pH 6.8-7.2; 刃天青(0.2%) 0.2 mL/L, 固体培养基再添加 1.5%-2.0%的琼脂粉。微量元素溶液(g/L): $CaCl_2$ 0.025, $NiSO_4$ 0.03, $ZnCl_2$ 0.07, $FeSO_4$ 0.1,

CoCl₂·6H₂O 0.19 ,CuCl₂·2H₂O 0.01 ,MnCl₂·4H₂O 0.1 , H₃BO₃ 0.02 ; 维生素溶液 (mg/L) : 生物素 2.0 , 叶酸 2.0 , 维生素 B₆ 10.0 , 维生素 B₁ 5.0 , 维生素 B₂ 5.0 , 烟酸 5.0 , 泛酸钙 5.0 , 维生素 B₁₂ 0.1 , 对氨基苯甲酸 5.0 , 硫辛酸 5.0 (生工生物工程 (上海) 公司)。培养基的配制要保证过程的厌氧, 配制培养基时通过对培养基加热煮沸和 N₂ (99.9%) 曝气的方式 (15 min) 去除培养基中的溶解氧, 并趁热分装到容器中, 最后高压蒸汽灭菌 30 min ,待培养基冷却到 50 °C 左右时, 将过滤除菌的维生素溶液加入到培养基中, 混匀待用。

1.2 同型产乙酸菌的筛选和形态观察

采集无锡太湖新城污水处理厂的二级沉淀池剩余污泥样品, 将样品接种于厌氧瓶中富集培养基, 充入 99.9%纯度的 N₂ (15 min) 密封后置于 110 r/min , 37 °C 恒温摇床进行培养, 利用实时荧光定量 PCR 检测 *FTHFS* 基因来检测同型产乙酸菌的富集情况^[11]。

采用 Hungate 厌氧滚管法^[12]对上述富集物中的同型产乙酸菌进行筛选。利用去氧无菌水将富集液进行 10¹-10⁵ 梯度稀释, 厌氧管中分别加入 5 mL 50 °C 的含有 1 g/L 酵母提取物的筛选培养基, 取 0.2 mL 稀释菌液依次加入到厌氧管中, 快速轻轻混匀, 然后在冰面上匀速滚动, 待厌氧管的管壁上有一层薄的固体培养基的时候将厌氧管立起, 使多余的培养基流到管底^[13]。用 H₂/CO₂ 混合气体 (H₂ :CO₂=80% :20% , V/V) 置换厌氧管中的气体 3 次, 密封后竖直放置于 37 °C 恒温培养箱中培养 8 d。观察到有菌落形成后, 用自制的弯头管将菌落分别挑出, 放入装

有液体筛选培养基的厌氧瓶中扩培, 将厌氧瓶置于 110 r/min、37 °C 的恒温摇床上培养 8 d。重复以上操作。以上实验操作均在 Bactron anaerobic SL 厌氧手套箱 (Sheldon, 美国) 中进行。利用相差光学显微镜 (Olympus, 日本) 观察混培物的微生物形态。

1.3 混合菌的功能基因检测和组成分析

利用 PowerSoil DNA 提取试剂盒 (MOBIO, USA) 提取样品 DNA, 以含同型乙酸菌菌液的 DNA 为阳性对照, 以无菌水为阴性对照, 利用 PCR 技术扩增其功能基因 *FTHFS*。PCR 引物分别为 *fhfF* 和 *fhfR*, 详细见表 1。 *FTHFS* 基因扩增 PCR 反应体系和反应条件参考本实验之前建立的方法进行^[11]。

混培物的微生物组成利用克隆文库技术进行分析。提取的 DNA 利用引物 27F 与 1401R (表 1) 进行 PCR 扩增。电泳后割胶回收 PCR 产物, 连接至载体 pGEM T-Easy 后, 转化到 *E. coli* JM109 (TaKaRa) 中进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆测序, 将测序结果在 NCBI 上进行 Blast 同源比对分析, 并构建系统发育树。克隆测序由生工生物工程 (上海) 公司完成。16S rRNA 基因 PCR 扩增条件: 25 μL 反应体系, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 正反向引物 (10 mmol/L) 各 0.25 μL, DNA 模板 2 μL, TaKaRa *Taq* HS 聚合酶 0.14 μL, 加无菌水至 25 μL; PCR 反应程序: 4 °C 预冷 5 min, 95 °C 预变性 10 min, 随后 95 °C 变性 1 min, 60 °C 复性 50 s, 72 °C 延伸 1 min 共 35 个循环, 循环结束后 72 °C 充分延伸 10 min。

表 1 细菌 16S rRNA 和同型乙酸菌 *FTHFS* 功能基因 PCR 引物

Table 1 Primer sequences used for molecular characterization of mixed homoacetogen population

Target	Primer name	Primer sequence (5'-3') ^a	Size of product (bp)	Literature
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500	[14]
	1401R	CGGTGTGTACAAGACCC		
<i>FTHFS</i>	<i>fhsF</i>	GTWTGGGCWAARGGYGGMGAAGG	250	[11]
	<i>fhsR</i>	GTATTGDGTYTTRGCCATACA		

^aBase: Y=C/T, W=A/T, M=A/C, R=A/G, H=A/C/T, D=A/G/T

1.4 混培物生长曲线和生长 pH 值

菌浓度与 *OD* 值标准曲线的建立:取生长达到稳定状态后的菌液 50 mL 于 10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 菌体用无菌水清洗 3 次后再次离心, 于 105 °C 烘干至恒重; 分别取 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mg 菌体于干净的离心管中, 加入 3 mL 新鲜的筛选培养基制成菌液, 于 600 nm 处测定 *OD* 值; 以 *OD* 值作为横坐标, 细胞干重作为纵坐标绘制标准曲线。

生长曲线: 250 mL 厌氧瓶中加入 100 mL 含有 1 g/L 酵母提取物的筛选培养基 (2 g/L 甲酸钠为碳源), pH 为 7, 顶空以 99.9% 的 N₂ 置换 3 次, 接种 5% (V/V) 的混培物菌液, 将厌氧瓶置于 110 r/min、37 °C 的恒温摇床上培养。每 4 h 取样测 *OD* 值: 以未接种的筛选培养基作为空白对照, 每 4 h 取样利用玻璃比色皿在紫外可见分光光度计 UV-1600 (上海美谱达, 中国) 于 600 nm 波长下测定 *OD* 值。

生长 pH 值: 250 mL 厌氧瓶中加入 100 mL 含有 1 g/L 酵母提取物的筛选培养基 (2 g/L 甲酸钠为碳源), pH 梯度设置为 4、5、6、7、8、9、10 和 11, 上部空间以 99.9% 的 N₂ 置换 3 次, 接种 5% (V/V) 的混培物菌液, 将厌氧瓶置于 110 r/min、37 °C 的恒温摇床上培养, 间隔 48 h 取样测定 *OD* 值。

1.5 H₂/CO₂ 气体转化特性研究

以接种量为 5% 接种菌液至含有 1 g/L 酵母

提取物的筛选培养基中, pH 分别设置为 5、7、9、11, 以 H₂/CO₂ 为唯一碳源, 实验组厌氧瓶的上部空间用 H₂/CO₂ 混合气体 (H₂:CO₂=80%:20%, V/V) 置换 3 次, 对照组为 N₂, 并加压至 150 kPa。

以接种量为 5% (V/V) 接种菌液至筛选培养基中, 实验分别设置酵母提取物浓度为 0、0.05、0.1、0.5 和 1 g/L, pH 设置为 7, 以 H₂/CO₂ 为唯一碳源, 实验组厌氧瓶的上部空间用 H₂/CO₂ 混合气体 (H₂:CO₂=80%:20%, V/V) 置换 3 次后同样加压至 150 kPa, 对照组为 N₂。以上每组实验均设置 3 个平行实验。

实验过程中利用气相色谱 GC-2010 (岛津, 日本) 检测上部空间气体中 H₂/CO₂ 消耗情况以及液相中产物产生情况^[15-16]。挥发性有机酸浓度 (VFA) 测量: 用一次性灭菌注射器于厌氧瓶中取一定量的液体, 将其经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取 0.5 mL 过滤后的样品加入 3 mol/L H₃PO₄ 0.5 mL 进行酸化处理, 然后加入 0.5 mL 四甲基戊酸作为内标, 充分混匀后以 10 000 r/min 离心 10 min, 最后取 1 mL 离心后的样品加入到 GC 小瓶中, 置于 GC-2010 测 VFA 成分和浓度。GC2010 配置和测定程序设置为: 采用火焰离子型检测器 (FID) 和毛细管柱 (PEG-20M, 30 m × 0.32 mm × 0.5 μm, China), 99.99% 的高纯 N₂ 作为载气, 柱箱初始温度为 80 °C, 保留 3 min, 之后以每分钟 15 °C 升高至 210 °C, 进样口和检

测器温度均为 250 °C。H₂/CO₂ 气体浓度测量：每天测量时先测定 H₂/CH₄/CO₂ (34.62% : 30.26% : 35.12%, V/V/V) 标准气体，每个样品测定之前需要用待测气体样品“润洗”进样针 3 次，之后用进样针取 50 μL 气体样品注入进样口进行测量样品成分和含量。GC-2010 配置和测定程序设置为：采用热导检测器 (TCD) 和不锈钢填充柱 (porapak Q, 2 m × 4 mm, China)，99.99% 的高纯 N₂ 作为载气，柱箱温度为 80 °C，进样口和检测器温度为 150 °C。

2 结果与分析

2.1 混培物的筛选

通过 Hungate 厌氧滚管法获得了一种混培物，命名为 Ca1。厌氧管中的菌落呈白色、圆形，直径大约 1 mm (图 1A)。再经过革兰氏染色观察到几种不同形状的细菌，其中大部分是呈现革兰氏阳性的梭状 (长 1.5–1.9 μm，宽 0.8–0.9 μm) 和杆状菌 (长 1.5–2.0 μm)，还有少量的革兰氏阴性球菌 (图 1B)。

同型产乙酸菌不是系统发育学上一个确定的类群，而是一类具有相同代谢能力，即能利用 H₂/CO₂ 合成乙酸的微生物类群。甲基四氢叶酸合成酶是同型乙酸菌乙酰辅酶 A 途径的关键酶，乙酰辅酶 A 途径中甲基四氢叶酸合成酶基因 (*FTHFS*) 是同型产乙酸菌一段高度保守的基因，有学者据此设计引物研究了同型产乙酸菌种群在不同自然生境中的多样性和分布状况^[17]。许科伟等^[11]设计出特异性和灵敏度更高的引物，并对引物扩增产物进行系统发育分析后，证明了 *FTHFS* 引物对同型产乙酸菌的特异性识别。目前环境样品中同型产乙酸菌的检测和定量多通过测定 *FTHFS* 基因进行，因此，根据 PCR 方法扩增 *FTHFS* 基因的阳性和阴性可反

映同型产乙酸菌存在与否。本实验混培物 DNA 样品的 *FTHFS* 基因 PCR 扩增产物呈阳性，这表明了混培物中同型产乙酸菌的存在。

2.2 混培物的微生物组成

克隆测序结果登陆 NCBI 进行序列比对，发现混培物中序列相似性大于 97% 的细菌至少有 3 种，分别命名为 Ca1-1、Ca1-2 和 Ca1-3，相对应的细菌分别为永达尔梭菌 *Clostridium ljungdahlii* (97%)、纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* (98%) 和蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* (99%)。根据测序结果构建系统发育树如图 2 所示，将 Ca1-1 序列上传至 GenBank，

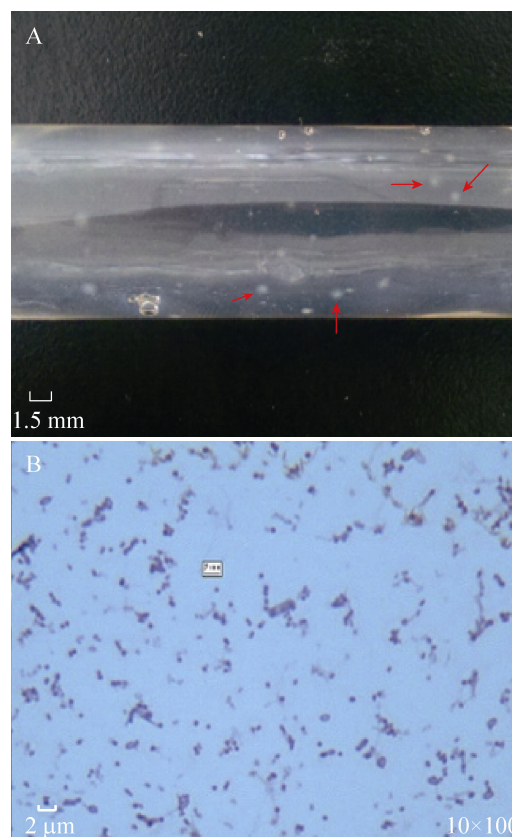


图 1 同型产乙酸菌混培物 Ca1 菌落图 (A) 和显微镜照片 (B)

Fig. 1 The photograph of colony (A) and microscope image of mixed culture Ca1 (B).

获得登陆号 KJ094502。

根据 Drake 等的研究结果,环境中的绝大部分同型产乙酸菌都分布在 Firmicutes 和 Spirochaetes 菌门,共包含 21 个属,而 *Clostridium* 和 *Acetobacterium* 是最常见的同型产乙酸菌属,其中 *Clostridium ljungdahlii* 是 *Clostridium* 中一种典型的同型产乙酸菌^[18-19]。*C. ljungdahlii* 是梭菌中第一个被认定为 rRNA 同源性 I 组的产乙酸菌,其他还包括 *Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii* 等;*C. ljungdahlii* 是一种革兰氏阳性、产芽胞的厌氧杆菌,能够利用 H_2/CO_2 、CO 自养生长,同样能够利用葡萄糖、果糖、木糖、甲酸盐、丙酮

酸盐、乙醇等异养生长,主要产物为乙酸,也产生少量乙醇,最适温度和最适初始 pH 分别为 37 °C 和 6^[10]。

2.3 混培物生长曲线和生长 pH 值

图 3A 是混培物随时间变化的生长浓度,可见经过 4 h 的迟缓期后进入对数生长期,32 h 后基本达到稳定状态,细菌生长浓度能达到 550 mg/L (以细胞干重计) 以上。根据 Cotter 等^[20]的报道,*C. ljungdahlii* 的合成气纯培养中,8 h 进入对数生长期,40 h 后达到稳定期,可能由于是利用气体 H_2/CO_2 作为底物,因此迟缓期较长。而本研究是以可溶性的甲酸钠作为底物,微生物利用性更高。

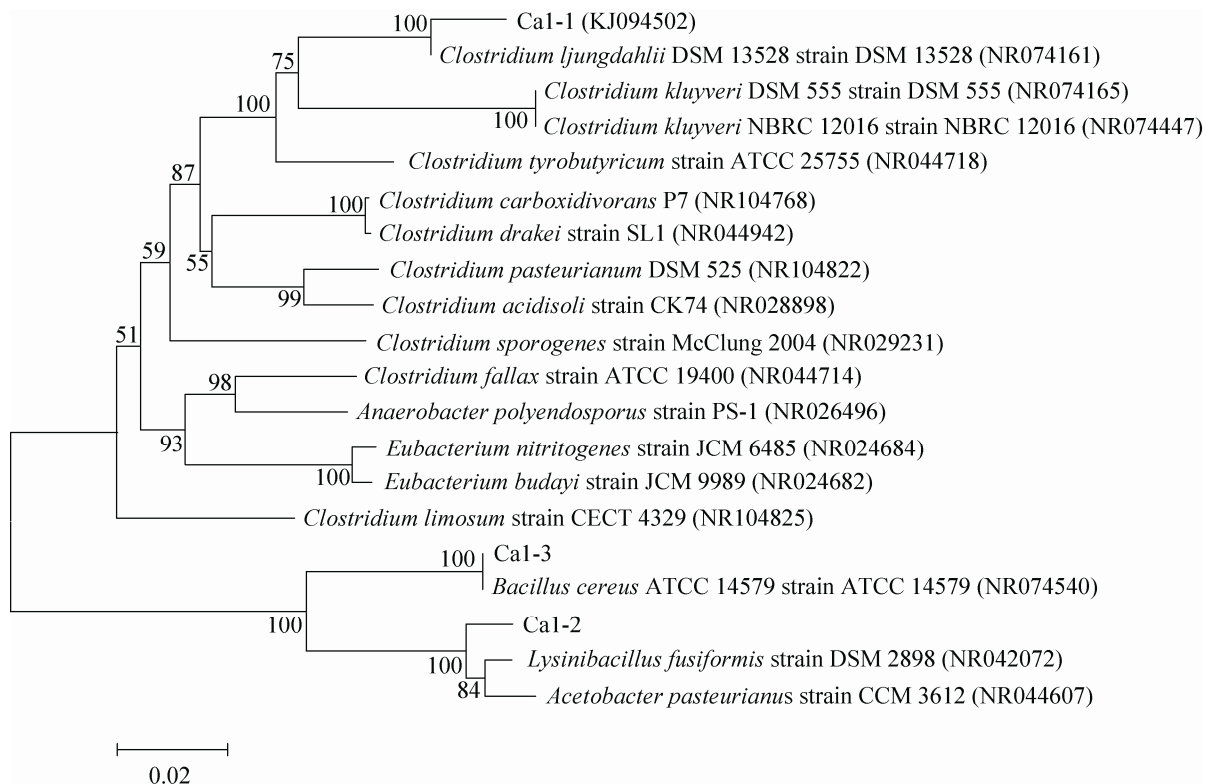


图 2 基于 16S rRNA 序列和邻接法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences and Neighbor-Joining analysis.

混培物 Ca1 能够在 pH 5–10 的范围内生长, pH 5–7 时混培物菌浓度较高, 达到 529 mg/L 以上 (图 3B)。 *C. ljungdahlii* 的 pH 生长范围一般在 5–7^[3]。混培物生长的 pH 区间更大, 且细菌浓度较高, 这可能是混培物中几种细菌相互协调的结果, 使得混培物能更好地适应 pH 的变化。

2.4 初始 pH 对 H₂/CO₂ 气体转化的影响

H₂ 和 CO₂ 上部空间气体消耗情况见图 4 所示, 初始 pH 9、11 条件下, 上部空间气体 CO₂ 会有一部分被培养基中 NaOH 所吸收, 因此在培养的第一天会急剧下降。因酵母提取物中有机碳被利用产生 CO₂, 使得此后的 1–2 d 上部空间气体中 CO₂ 小幅回升, 与此同时同型产乙酸菌利用 H₂/CO₂ 气体使得 CO₂ 和 H₂ 浓度降低。结果如图 5 所示, 初始 pH 7 和 pH 9 时乙酸浓度均较高, 并无显著性差异 ($P>0.05$), 乙酸浓度大约为 32 mmol/L。初始 pH 9 时有机酸生成使得反应体系的 pH 随着反应的进行而降低, 逐

渐稳定在 pH 为 6.1–6.9, 可见, 中性初始 pH 值适宜该混培物利用 H₂/CO₂ 气体产乙酸。Cotter 等^[20]的研究也显示中性条件 (pH 6.8) 比酸性条件 (pH 5.5) 更有利于菌的生长和乙酸的产生。



根据公式 (1) 计算理论情况下同型产乙酸菌利用 H₂/CO₂ 产乙酸的浓度。pH 7 时气体消耗量经过物料衡算可以得出与气体消耗值相对应的乙酸产量为 11.86 mmol/L, 而空白实验组得到的乙酸产量经计算大约为 8.60 mmol/L (图 5)。实际测定得到的乙酸浓度为 31.69 mmol/L (图 5), 可见乙酸浓度要高于由 H₂/CO₂ 气体转化与对照空白两者乙酸浓度的加和, 这可能微生物利用酵母提取物的同时会释放一定量的 CO₂, 这可由图 4 中 CO₂ 气体在第一天降低后回升显示, 有机物转化产生的 CO₂ 被同型产乙酸菌利用合成乙酸。

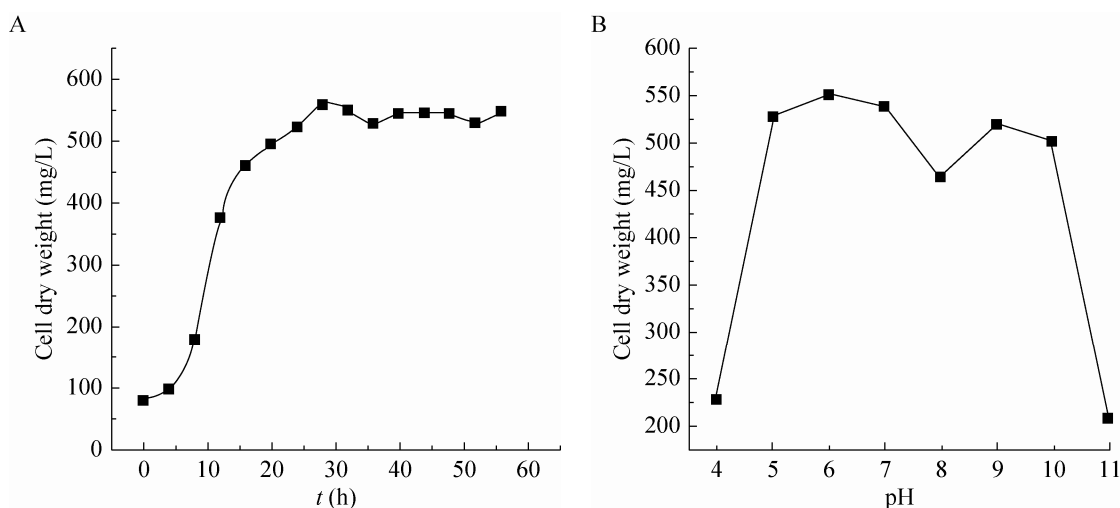


图 3 混培物的生长曲线 (A) 和不同 pH 时细菌生长浓度 (B)

Fig. 3 The growth trends of mixed culture (A) and the culture density under different pH (B).

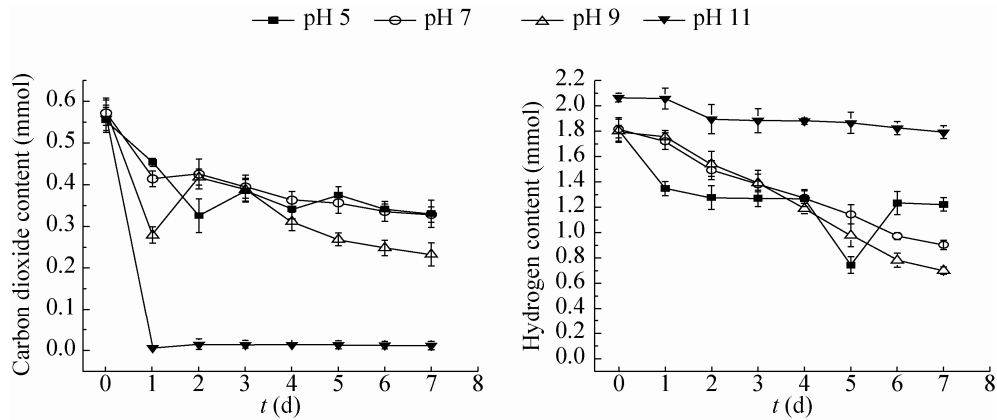


图 4 不同初始 pH 时 CO_2 和 H_2 气体含量变化

Fig. 4 Variations of carbon dioxide and hydrogen concentration at different initial pH.

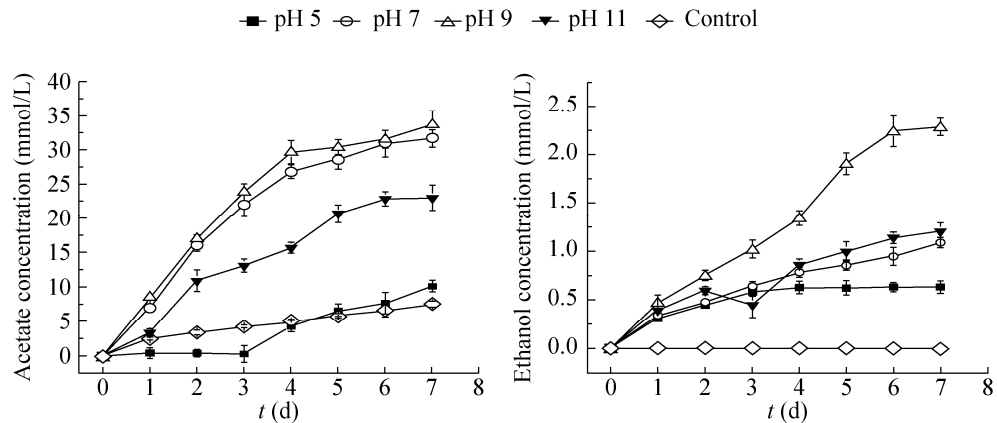


图 5 不同初始 pH 时混合菌转化 H_2/CO_2 生成乙酸和乙醇浓度变化

Fig. 5 Changes in acetate and ethanol concentrations during bioconversion of H_2/CO_2 at different initial pH.

本实验中乙酸浓度与 Cotter 等的报道相比基本一致^[20], 乙醇产量则较低, 但是理论计算由 H_2/CO_2 气体贡献得到的乙酸量比 Cotter 报道的要低。这可能是 Cotter 等学者对整个反应体系进行持续曝气合成气, 这极大地增加了气液传质效率, 合成气转化效率更高, 导致产物产量就更高。Younesi 等^[21]利用 *C. ljungdahlii* 纯菌培养转化合成气 CO 、 CO_2 和 H_2 时, 乙酸浓度为大约 1.0 g/L (即 16.7 mmol/L)。相比之下, 混

培物转化 H_2/CO_2 气体乙酸浓度更高。

2.5 酵母提取物浓度对 H_2/CO_2 气体转化的影响

如图 6 所示, 无酵母提取物和酵母提取物浓度为 0.05 g/L 的实验组中 H_2 几乎没有消耗, CO_2 的降低可能是由于碱性溶液的吸收。酵母提取物浓度为 0.5 g/L 和 1 g/L 的上部空间 H_2 消耗比较明显, 分别减低了大约 0.6 mmol 和 0.9 mmol。

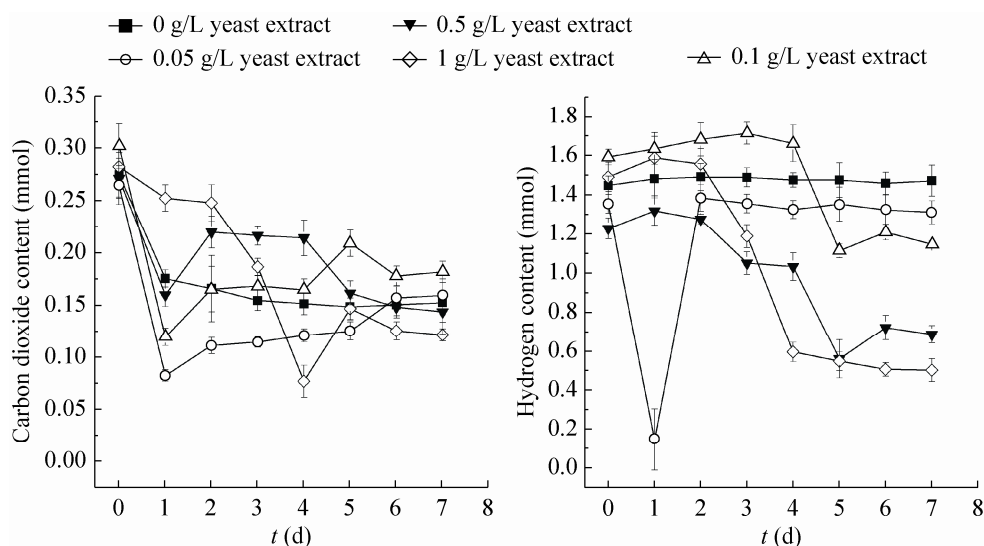


图 6 不同酵母提取物浓度时 CO₂ 和 H₂ 气体浓度变化

Fig. 6 Variations of carbon dioxide and hydrogen concentration at different yeast extract concentrations.

如图 7 所示, 无酵母提取物添加时, H₂ 消耗较少, 相应的乙酸生成量很少, 而添加酵母提取物时乙酸浓度相应升高, 这表明酵母提取物可能对同型产乙酸菌的生长是必不可少的^[22]。酵母提取物浓度为 0.05 g/L 时, 乙酸浓度较低为 1.5 mmol/L, 相应于氢气消耗量较少, 乙酸的生成可能主要来源于酵母提取物中有机碳的降解。酵母提取物浓度大于 0.5 g/L 时乙酸浓度明显提高, 这与 CO₂ 气体作为唯一碳源时酵母提取物的浓度 0.5 g/L 乙酸浓度升高的报道相一致^[23]。而在 Cotter 等^[20]的研究中把酵母提取物浓度提高到 3 g/L, 并在连续注入合成气的实验中, 乙酸的最终浓度能达到 35 mmol/L 以上, 高于本实验仅由 H₂/CO₂ 贡献得到的乙酸浓度 (24.19 mmol/L), 说明提高酵母提取物浓度对产乙酸是有利的。

添加酵母提取物有利于促进同型产乙酸菌的生长, 而乙酸是同型产乙酸菌生长偶联型产物, 因此对乙酸浓度的提高有一定的促进作用。

但目前对于酵母提取物的研究大都集中在产乙醇, Guo 等^[24]的研究表明, 酵母提取物对于同型产乙酸菌产乙醇有显著影响, 低浓度时有利于产生更多的乙醇。而酵母提取物浓度过低不

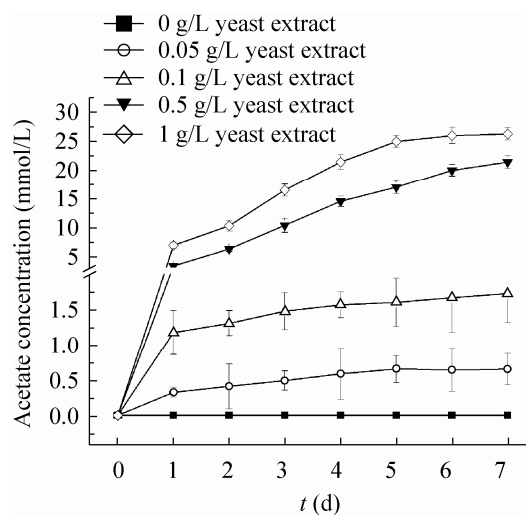


图 7 酵母提取物浓度不同时转化 H₂/CO₂ 产生乙酸浓度变化

Fig. 7 Changes in acetate concentrations during bioconversion of H₂/CO₂ at different yeast extract concentrations.

利于细菌的生长, 因此有人提出添加酵母提取物促进同型产乙酸菌生长, 然后降低酵母提取物浓度或是去掉酵母提取物造成营养缺陷使得同型产乙酸菌积累其非生长偶联产物—乙醇^[2]。

3 结论

本研究以 CO₂/H₂ 作为底物从城市污泥中筛选得到一个同型乙酸菌混培物, 其组成包含 *Lysinibacillus fusiformis*、*Bacillus cereus* 和 *Clostridium ljungdahlii*。该混培物初始 pH 生长范围为 5–10, 最适初始 pH 为 5–7。适宜 pH 值条件下混培物转化 CO₂/H₂ 生成乙酸的浓度达到 30 mmol/L 以上。酵母提取物对同型产乙酸菌生长必不可少, 当酵母提取物在培养基中浓度 ≥ 0.5 g/L 时, 混培物转化 CO₂/H₂ 气体生成乙酸的浓度随着酵母提取物浓度增加而提高, 酵母提取物浓度为 1 g/L 时, 乙酸浓度为 26 mmol/L 以上。

REFERENCES

- [1] Subramani V, Gangwal SK. A review of recent literature to search for an efficient catalytic process for the conversion of syngas to ethanol. *Energy Fuels*, 2008, 22(2): 814–839.
- [2] Mohammadi M, Najafpour GD, Younesic H, et al. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: a review. *Renew Sustain Energy Rev*, 2011, 15: 4255–4273.
- [3] Xu HJ, Xu JL, Guo Y, et al. Anaerobic fermentation of synthesis gas for organic acids and alcohols production. *Chin Biotechnol*, 2010, 30(3): 112–118 (in Chinese).
徐慧娟, 许敬亮, 郭颖, 等. 合成气厌氧发酵生产有机酸和醇的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(3): 112–118.
- [4] Guo W, Liu C, Zou SL, et al. Progress in research and application of homoacetogen. *Chin J Appl Environ Biol*, 2006, 12: 874–877 (in Chinese).
郭蔚, 刘成, 邹少兰, 等. 同型乙酸菌研究进展及应用前景. *应用与环境生物学报*, 2006, 12: 874–877.
- [5] Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18: 207–212.
- [6] Oh SE, Van Ginkel S, Logan BE. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol*, 2003, 37: 5186–5190.
- [7] Xu KW, Liu H, Chen J. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 2600–2607.
- [8] Stams AJM, van Dijk JB, Dijkema C, et al. Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 1114–1119.
- [9] Grech-Mora, Fardeau ML, Patel BKC, et al. Isolation and characterization of *Sporobacter termitidis* gen. nov., sp. nov., from the digestive tract of the wood-feeding termite *Nasutitermes ljuae*. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(2): 512–518.
- [10] Tanner RS, Miller LM, Yang D. *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43(2): 232–236.
- [11] Xu KW, Liu H, Du GC, et al. Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe*, 2009, 15: 204–213.
- [12] Hungate RE. *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press, 1969: 117–132.
- [13] Li YF, Ren NQ, Chen Y, et al. The experimental anaerobic operation of isolation and culture on hydrogen-producing and fermentative bacteria. *J Harbin Inst Technol*, 2004, 36(12): 1589–1592 (in Chinese).

- 李永峰, 任南琪, 陈瑛, 等. 发酵产氢细菌分离培养的厌氧实验操作技术. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(12): 1589–1592.
- [14] Wei L, Ma F, Wang XY, et al. Influence of different 16S rDNA target sequence on analysis of microbial diversity in anaerobic ABR reactor. Chin J Envir Sci, 2008, 29(3): 776–780 (in Chinese).
魏利, 马放, 王欣宇, 等. 基于 16S rDNA 不同靶序列对厌氧 ABR 反应器微生物多样性分析的影响. 环境科学, 2008, 29(3): 776–780.
- [15] Michael KR. Production of acetic acid from waste biomass [D]. Colledge Station: Texas A&M University, 1998.
- [16] Steed J, Hashimoto AG. Methane emissions from typical manure management systems. Bioresour Technol, 1994, 50: 123–130.
- [17] Leaphart AB, Friez MJ, Lovell CR. Formyltetrahydrofolate synthetase sequences from salt marsh plant roots reveal a diversity of acetogenic bacteria and other bacterial functional groups. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 693–696.
- [18] Drake HL, Göbner AS, Daniel SL. Old acetogens, New light. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1125(1): 100–128.
- [19] Drake HL, Küsel K, Matthies C. The Prokaryotes. New York: Springer, 2006: 354–420.
- [20] Cotter JL, Chinn MS, Grunden AM. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. Enzyme Microb Technol, 2009, 44: 281–288.
- [21] Younesi H, Najafpour G, Mohamed AR. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. Biochem Eng J, 2005, 27: 110–119.
- [22] Kamlage B, Gruhl B, Blaut M. Isolation and characterization of two new homoacetogenic hydrogen-utilizing bacteria from the human intestinal tract that are closely related to *Clostridium coccooides*. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(5): 1732.
- [23] Allen TD, Caldwell ME, Lawson PA, et al. *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil. Int J Syst Evol Micr, 2010, 60: 2483–2489.
- [24] Guo Y, Xu JL, Zhang Y, et al. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. Bioresour Technol, 2010, 101: 8784–8789.

(本文责编 陈宏宇)