

# 酒色着色菌利用产酸克雷伯氏菌发酵废液产氢<sup>\*</sup>

席丽明 徐惠娟<sup>\*\*</sup> 邬小兵 龙敏南

(厦门大学生命科学学院厦门大学生物能源中心 厦门 361005)

**摘要:** 研究了酒色着色菌(*Chromatium vinosum* DSM185)利用产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca* HP1)发酵产氢废液进行光发酵和暗发酵产氢的可行性,以达到对产氢底物的充分利用和对产氢废液的进一步处理。研究结果表明 *C. vinosum* 可以利用 *K. oxytoca* 的发酵废液进行光发酵产氢和暗发酵产氢。*C. vinosum* 发酵产氢后废液中残余还原糖和主要有机酸(丁酸)的含量明显降低,发酵产氢的最佳 pH 为 6.5,添加 0.1%(W/W)NH<sub>4</sub>Cl 能促进产氢。在光照条件下丁酸利用率可达 54.38%,产氢量达 36.97 mL/mg;在黑暗条件下丁酸利用率可达 36.01%,产氢量达 37.50 mL/mg。

**关键词:** 酒色着色菌, 发酵废液, 产氢

中图分类号: Q935; Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0252-2654(2007)04-0663-04

## Hydrogen Production by *Chromatium vinosum* with Fermentation Waste Produced by *Klebsiella oxytoca*<sup>\*</sup>

XI Li-Ming XU Hui-Juan<sup>\*\*</sup> WU Xiao-Bing LONG Min-Nan

(School of Life Sciences, Bio-energy Center, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** Photosynthetic bacteria (PSB) showed great promise in bihydrogen production. *Chromatium vinosum* was able to utilize the fermentation waste of *Klebsiella oxytoca* for both photo-fermentative and dark-fermentative hydrogen production. The content of residual sugars and main organic acids decreased obviously after hydrogen production by *C. vinosum*. The maximal hydrogen production of *C. vinosum* was obtained at pH 6.5 adding extra 0.1%(W/W) NH<sub>4</sub>Cl. Under photo-fermentative conditions, the content of butyric acid decreased by 54.38%, and the maximal hydrogen yield was 36.97 mL/mg cell. Under dark-fermentative conditions, the content of butyric acid decreased by 36.1% and the maximal hydrogen production was achieved as 37.50 mL/mg cell.

**Key words:** *Chromatium vinosum*, Fermentation waste, Hydrogen production

可再生能源将成为未来可持续发展能源系统的主体,其中清洁无污染的生物能源具有广阔的前景。美国能源部在 1993 年和 1997 年的两次规划中都将生物能源作为重点发展方向。欧盟在 2000 年 11 月提出了清洁能源“绿皮书”,又于 2002 年 4 月启动了“欧洲聪明能源计划”,计划 2010 年生物能源在总能源中的比例至少达到 12%以上<sup>[1]</sup>。氢被认为是一种最佳能量载体。生物制氢由于具常温、常压、耗能低、环保等优点而成为目前国内外研究的热点之一。生物制氢所用微生物主要包括:蓝细菌、发酵细菌(厌氧菌和兼性厌氧菌)及光合细菌

等<sup>[2-4]</sup>。

光合细菌(PSB)是地球上最早出现的一类具有原始光能合成系统的原核生物,属于水圈微生物的一种,能在厌氧条件下进行不放氧的光合作用<sup>[5]</sup>,其产氢速率和效率都较高,产氢纯度高、可利用碳源广,是生物制氢研究的一个重要方面<sup>[6,7]</sup>。

产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca* HP1)是本实验室筛选到的一株具有较高产氢活性的菌株。本文研究了光合细菌(*Chromatium vinosum* DSM185)利用 *K. oxytoca* 发酵废液产氢,为进一步提高底物的氢转化效率和减少产氢反应废物提供一条可行的

<sup>\*</sup> 国家 863 计划项目(No. 2006AA05Z111),福建省科技项目(No. 2006H0091),厦门大学创新项目(No. 2002xjkt033)。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 Tel: 0592-2185731, E-mail: hjxu@xmu.edu.cn

收稿日期: 2006-10-31, 修回日期: 2007-03-08

途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

菌株: *K. oxytoca* HP1 为本实验室保存<sup>[8]</sup>; *C. vinosum* DSM185 由荷兰阿姆斯特丹大学 E C Slater 研究所提供。

*K. oxytoca* 生长培养基: 酵母粉 10g, 蛋白胨 10g, 葡萄糖 10g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.37g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 14.33g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.63g, 加水至 1L pH7.0。

*K. oxytoca* 产氢缓冲液: 葡萄糖 15g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.37g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 14.33g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.63g, 加水至 1L pH7.0。

*C. vinosum* 生长培养基: 参见文献[9]。

### 1.2 菌体的培养

*K. oxytoca* 的培养: 按 1% 的接种量接种 *K. oxytoca* 于生长培养基中, 在恒温摇床中 (37℃, 120r/min), 振荡培养至对数生长期。

*C. vinosum* 的培养: 按 10% 的接种量接入 *C. vinosum*, 于光照下厌氧 (1700Lux, 37℃) 培养至对数生长期。

### 1.3 产氢实验

将培养至对数生长期的 *K. oxytoca* 菌液离心, 去除上清液, 将菌泥移入产氢培养基中, 抽气充 Ar 后密封, 放置于 37℃ 恒温摇床中, 定时测量放氢量。放氢结束后离心去菌体, 得到 *K. oxytoca* 的发酵废液。

向 *K. oxytoca* 发酵废液中加入一定的氮源, 调节 pH 后高压蒸汽灭菌, 之后加入一定量的 *C. vinosum* 菌泥, 充分悬浮后抽充 Ar 或 N<sub>2</sub><sup>[10]</sup>, 密封, 放置于不同条件下培养, 每天测量放氢量。

### 1.4 氢含量、还原糖及有机酸含量的测定

氢含量测定: 用微量进样器抽取反应瓶中的上层气相注入 102G 气相层析仪 (上海分析仪器厂), 以高纯 Ar 为载气, 热导池检测, 记录峰高, 按外标法计算氢含量。

还原糖的测定: 采用 DNS 法, 参见文献[11]。

有机酸含量的测定: Agilent 6890 气相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 弹性石英毛细管柱, 制备标准样按内标法计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 有机和无机氮源对 *C. vinosum* 产氢的影响

Gest 等<sup>[12]</sup> 在研究 *Rhodospirillum rubrum* 产氢中发现以谷氨酸为氮源可以产大量的氢气, 本文用 *C. vinosum* 生长培养基的氮源 NH<sub>4</sub>Cl 作为无机氮源进行对比, 考察有机和无机氮源对 *C. vinosum* 产氢的影响。将 *K. oxytoca* 发酵废液分装, 其中一部分加入 NH<sub>4</sub>Cl (终浓度 1g/L), 另一部分加入谷氨酸 (终浓度 2.75g/L), 分别调节 pH 为 5.9 和 7.5, 高压蒸汽灭菌后加入等量的 *C. vinosum* 菌泥, 抽气充 N<sub>2</sub>, 放置于光照下 (37℃, 1700Lux) 进行放氢实验。取产氢量最高值, 结果如表 1 所示。

表 1 不同氮源对 *C. vinosum* 产氢的影响

序号	氮源	pH 值	总放氢量 (mL H <sub>2</sub> / mg dw)
1	谷氨酸	7.5	0
2	NH <sub>4</sub> Cl	7.5	0
3	谷氨酸	5.9	0
4	NH <sub>4</sub> Cl	5.9	6.3

从表 1 得知 pH7.5 时均无氢的产生, 表明在该 pH 下不利于产氢。当 pH 为 5.9 时, 以 NH<sub>4</sub>Cl 为氮源可产氢, 而以谷氨酸为氮源则无氢气的产生, 表明谷氨酸不适合做 *C. vinosum* 产氢的氮源。

在光照条件下, 光合细菌产氢主要由固氮酶催化, 某些研究认为 NH<sub>4</sub>Cl 是固氮酶的底物抑制剂<sup>[13,14]</sup>, 但低浓度的铵对某些光合细菌, 例如对红假单胞菌的固氮有促进作用, 高浓度时则抑制固氮<sup>[15]</sup>。本实验中 1g/L 的 NH<sub>4</sub>Cl 对 *C. vinosum* 固氮酶产氢抑制效果不明显。

### 2.2 pH 值对 *C. vinosum* 产氢的影响

将 *K. oxytoca* 发酵废液 (pH 为 4.9) 用 NaOH 分别调节 pH 值至 5.5、6.0、6.5、7.0, 不添加氮源, 高压蒸汽灭菌后接入 *C. vinosum* 菌泥, 抽气充 N<sub>2</sub>, 光照下 (1700Lux, 37℃) 培养, 定时测量放氢量。放氢结束后离心去菌体, 测上清液中的还原糖含量。结果如图 1 所示。

当 pH6.5 时产氢量最高, pH4.9 时不能产氢, pH5.5 和 pH7.0 时产氢速度慢而且产量小。此外, 产氢量越高剩余还原糖浓度越低, 说明 *C. vinosum* 能利用 *K. oxytoca* 发酵废液中的残糖来产氢。还原糖利用率最高可达 92.04%。

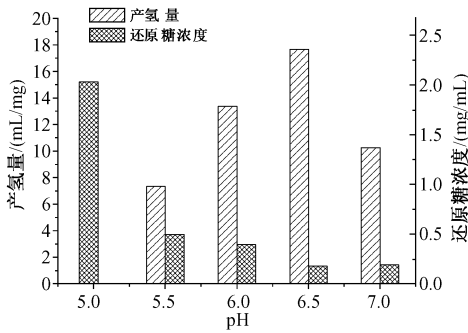


图1 pH 值对产氢量及剩余还原糖含量的影响

2.3 *C. vinosum* 产氢条件的研究

在 *K. oxytoca* 发酵废液中加入  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1g/L) 或不加氮源, 调节 pH 值至 6.5。接入 *C. vinosum* 的菌泥, 抽气充 Ar 或  $\text{N}_2$ , 在光照 (1700Lux, 37°C) 或黑暗条件下 (37°C 恒温培养箱中) 培养。定时测量放氢量, 结果如表 2 所示。

表 2 *C. vinosum* 在不同条件下的产氢

序号	氮源	光照条件	气相环境	总放氢量 (mL $\text{H}_2$ / mg dw)	终 pH 值
1	$\text{NH}_4\text{Cl}$	暗	$\text{N}_2$	36.30	4.78
2	$\text{NH}_4\text{Cl}$	暗	Ar	37.50	4.61
3	$\text{NH}_4\text{Cl}$	光	$\text{N}_2$	30.90	4.70
4	$\text{NH}_4\text{Cl}$	光	Ar	36.97	4.78
5	无	暗	$\text{N}_2$	17.78	5.89
6	无	暗	Ar	33.46	5.67
7	无	光	$\text{N}_2$	15.88	6.03
8	无	光	Ar	25.12	5.01

光合细菌产氢是在光合磷酸化提供能量和有机物降解提供还原力的情况下, 由固氮酶和氢酶共同催化完成<sup>[4]</sup>。在光照条件下, 光合细菌主要由固氮酶催化放氢, 而固氮酶在有  $\text{N}_2$  的条件下, 电子流向 N 而进行固氮作用, 因而氢气的产生受到抑制。在黑暗条件下, 光合细菌主要由氢酶催化放氢<sup>[16, 17]</sup>。

实验发现 *C. vinosum* 在含 1g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的产氢培养基中比不含氮源时更快达到产氢高峰且产氢量更高。补充少量氮源有利于菌体生长和提高产氢量。在含  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的产氢培养基中, 第二天就可达到产氢高峰, *C. vinosum* 无论置于光照还是黑暗、 $\text{N}_2$  还是 Ar 环境下产氢量都较高且差别不大。在无氮源产氢培养基中, 光照条件下产氢较快, 而黑暗条件

下的产氢量稍高于光照条件, Ar 环境下产氢较慢, 而  $\text{N}_2$  环境下产氢量低。 $\text{N}_2$  或 Ar 环境下氢酶的作用应该是一样的, 但实验显示  $\text{N}_2$  环境下产氢量低, 因此黑暗条件下是否存在固氮酶的作用有待进一步验证。此外, 实验还表明在产氢量高时 pH 值一般下降的比较多, 当 pH 值下降到一定值后产氢就停止。

从 *K. oxytoca* 发酵废液 pH 值明显下降推测其产氢过程中产生大量的酸, 实验结果表明 *K. oxytoca* 产氢废液中存在多种有机酸, 主要成份是丁酸。表 3 所列为 *K. oxytoca* 的发酵废液及不同条件下 *C. vinosum* 最终发酵液中有机酸的成分及含量。不同发酵条件下光合细菌的代谢可能有差异, 所以各种有机酸的变化也有差异。经过 *C. vinosum* 产氢后, 丁酸明显地减少了, 最高利用率可达 54.38%, 说明 *C. vinosum* 可以利用 *K. oxytoca* 发酵废液中主要的有机酸。

表 3 *C. vinosum* 发酵产氢后的废液中有机酸成分及其含量

有机酸成分及含量 (mg/mL)	<i>C. vinosum</i> 发酵液				
	<i>K. oxytoca</i> 产氢废液	<i>C. vinosum</i> 发酵液 <sup>1</sup>	<i>C. vinosum</i> 发酵液 <sup>2</sup>	<i>C. vinosum</i> 发酵液 <sup>3</sup>	<i>C. vinosum</i> 发酵液 <sup>4</sup>
乙酸	1.00	2.02	1.70	2.27	0.71
丙酸	2.39	1.84	21.62	2.06	1.16
正丁酸	591.67	269.92	320.00	477.23	378.27
正戊酸	0.27	0.65	0.34	0.66	0.62
正己酸	3.25	0.67	2.00	0.81	1.42
正庚酸	13.57	1.51	2.01	3.85	20.01
正辛酸	0.75	1.93	0.42	1.32	1.51
正壬酸	0.42	2.60	0.29	1.00	0.38
正癸酸	0.44	0.86	0.23	1.53	1.07
十二酸	1.19	5.17	0.69	8.85	3.98
十四酸	3.13	7.27	2.44	7.48	6.11
十五酸	0.38	2.41	0.24	2.08	0.91
十六酸	4.31	8.44	2.93	8.40	7.45
十七酸	4.35	4.35	3.26	4.35	4.35
十八酸	1.64	2.37	0.65	2.58	1.85

<sup>1</sup>pH6.5, 添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、光照、 $\text{N}_2$  环境 <sup>2</sup>pH6.5, 不添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、黑暗、 $\text{N}_2$  环境 <sup>3</sup>pH6.5, 添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、光照、Ar 环境 <sup>4</sup>pH6.5, 不添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、黑暗、Ar 环境

3 结论

*C. vinosum* 在有或无氮源、光照或黑暗、Ar 或

$N_2$  环境条件下都可以利用 *K. oxytoca* 的发酵废液继续产氢。pH 值是发酵产氢中一个重要因子, 在 pH 为 5.5~7.0 之间, *C. vinosum* 能利用 *K. oxytoca* 的发酵废液继续产氢, 残糖浓度也进一步降低, 其最高利用率可达 92.04%。*C. vinosum* 发酵产氢最佳 pH 为 6.5。在含 1g/L  $NH_4Cl$  的产氢培养基中, *C. vinosum* 放置于光照或黑暗、Ar 或  $N_2$  环境下, 都具有较高的产氢量, 最高产氢量可达 37.50 mL  $H_2$ /mg dw。此外, 研究发现 *C. vinosum* 可以利用 *K. oxytoca* 产氢废液中主要的有机酸丁酸, 最高利用率可达 54.38%。

本研究表明, 可以将光合细菌的发酵产氢和其它细菌的暗发酵产氢整合为一体, 从而进一步提高生物制氢的整体效率, 减少生物制氢的废弃物。

### 参考文献

- [1] 谭天伟, 颜芳, 邓利. 现代化工, 2003, 23(9): 8~12  
[2] 任南琪, 李建政. 太阳能, 2003, 2: 4~6

- [3] 李建昌, 张无敌, 宋洪川, 等. 能源工程, 2001, 15~19.  
[4] 尤希凤, 郭新勇. 河南化工, 2003, 10: 4~6.  
[5] 朱章玉, 俞吉安. PSB 的研究及其应用. 上海: 上海交通大学出版社, 1991.  
[6] 杜近义, 秦际威. 生物学通报, 1998, 33(11): 15~18  
[7] 何剑丹, 龙炳清, 刘长根, 等. 四川师范大学学报(自然科学版), 2005 28(1): 114~116  
[8] L. Minran, H. Jinli, W. Xiaobing, X. Huijuan, et al. Research in Microbiology, 2005, 156: 76~81  
[9] Coremans J M C C, JW van der Zwaan, S P J Albracht. Biochim Biophys Acta, 1992, 1119: 157~168.  
[10] Sasikala K, Ramana V, Raghuvier Rao P, et al. Hydrogen Energy, 1990 15(11): 795~797  
[11] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册). 高等教育出版社, 施普林格出版社, 2001. pp. 5~7  
[12] Gest H, Kanen M D. Science, 1949, 109: 558~559.  
[13] 张明, 史家梁. 应用与环境生物学报, 1999, 5(sup): 25~29  
[14] 刘灵芝, 孙军德, 韩梅, 等. 生态科学, 2004, 23(2): 184~186.  
[15] 陈声明, 徐均焕, 胡勤海. 微生物学报, 1995, 35(5): 386~389  
[16] Weaver P F, Lien S, Senbert M. Solar Energy, 1980, 24: 3~45.  
[17] 朱建良, 冯有智. 南京工业大学学报, 2003, 25(1): 102~104.

### 新书推介

## 科学出版社生命科学编辑部新书推介

### 微生物遗传学(第三版)

盛祖嘉 编著 978-7-03-015597-9 定价: 75.00 2007年1月出版

本书是现代遗传学丛书之一。第三版中除删去第二版中的经典遗传学概论一章, 把遗传的物质基础一章并入绪论, 把形态建成和分化发育一章的内容归并入有关章节, 并在非孟德尔式遗传学一章增加转座因子和遗传工程概要两节的内容以外其余部分基本上保持原貌, 作为本书的上篇。下篇包括新增的三章(特殊类型的微生物的遗传学研究, 普遍细胞功能的遗传学研究, 微生物基因组学)以及在原有基础上更新扩充的进化一章。除了上述扩充更新之处以外本书还采取了一些技术性的更新, 包括索引、中英对照、章节安排、目录编排等。

本书在系统地介绍微生物遗传学的基础知识, 基本原理的基础上反映近年来这一领域的研究成果。它可以作为大专院校微生物遗传学课程的教材; 作为分子生物学、微生物学、遗传工程学等学科的教学参考书, 也可以作为科研人员和有关专业的研究生的参考书。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社, 联系人: 阮芯

联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目