

合成气发酵生产乙醇菌株的筛选*

Screening of a Microbial Strain Capable of Producing Ethanol from Syngas Fermentation

郭 铃, 黄艳燕, 潘丽霞, 李检秀, 孙菲菲, 孙 靛, 黄日波**

GUO Ling, HUANG Yan-yan, PAN Li-xia, LI Jian-xiu, SUN Fei-fei, SUN Liang, HUANG Ri-bo

(广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】从动物粪便样品中分离能利用合成气生产乙醇的菌株, 并对其进行鉴定及初步发酵实验, 为工业利用合成气生产乙醇奠定理论基础。【方法】利用富集驯化培养技术, 以合成气为唯一碳源, 分离筛选合成气利用菌, 通过形态观察、生理生化实验及 16S rRNA 序列分析鉴定菌株, 并利用菌株进行初步发酵实验。【结果】分离到 1 株可以发酵合成气生产乙醇的菌株, 分子鉴定结果表明, 该菌株为 *Clostridium ljungdahlii*。生理生化分析结果显示: 该菌是严格厌氧型革兰氏阳性菌, 短杆状, 有运动性, 芽孢很少见, 生长必须因子包括酵母粉和维生素 B 族; 最适碳源为果糖, 最适生长温度 35~37℃, 最适 pH 值为 6.0~7.0。合成气发酵实验结果显示: 37℃, 厌氧静止发酵 30d, 乙醇最高产量达到 2.58g/L, 添加 BESA、莫能菌素、丁基橡胶颗粒可以使乙醇产量分别提高 49%、70%、4.3%, 最大产量达到 4.31g/L。【结论】从动物粪便中分离到 1 株 *Clostridium ljungdahlii*, 该菌能够利用合成气生产乙醇, 为进一步研究和开发新型生物质材料提供了基础资料。

关键词: 合成气 厌氧发酵 梭状芽孢杆菌 乙醇

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2014)02-0124-05

Abstract:【Objective】To isolate and identify a microbial strain capable of producing ethanol from syngas fermentation from animal waste.【Methods】The enrichment culture using syngas as the sole carbon source was utilized to isolate the strain, which was identified according to the observation of morphology, physiological and biochemical tests, and analysis of 16S rRNA gene sequences. The isolated strain was utilized for preliminary fermentation.【Results】A strain capable of fermenting syngas into ethanol was isolated successfully. The strain was identified as

Clostridium ljungdahlii, which is a strict anaerobe and gram-positive. The cells are rod-shaped and show motility; spores are formed infrequently; the strain requires a minimum level of yeast extract (0.1%) and B-vitamins for growth; substrate optimum is fructose; temperature optimum range is 35~37℃; pH optimum range is 6.0~7.0; batch fermentation reveals that under anaerobic conditions the highest yield of ethanol in serum bottles at 37℃ was 2.58g/L after 30d; by addition of BESA, monensin and butyl rubber particles yields of ethanol can in-

收稿日期: 2013-11-29

修回日期: 2014-01-24

作者简介: 郭铃(1983-), 男, 硕士, 主要从事微生物发酵与酶工程研究。

* 广西科学院基本科研业务费项目(11YJ24SW12、11YJ24SW01), 广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019089)资助。

** 通信作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事分子酶工程研究。Email: rbhuang@gxas.ac.cn

crease 49%, 70% and 4.3%, respectively, with the highest yield of ethanol at 4.31g/L. **【Conclusion】** *Clostridium ljungdahlii* was capable of producing ethanol from syngas fermentation.

Key words: syngas, anaerobic fermentation, *Clostridium ljungdahlii*, ethanol

【研究意义】随着化石能源日益枯竭,寻找新的可再生替代能源就成为全世界最关注的热点。乙醇是一种优质的液体燃料,单位质量的乙醇完全燃烧时可释放约 30KJ 的热量,是目前为止最有效的化石能源替代品。目前,燃料乙醇的生产方法主要有化学合成与微生物发酵两种方式,化学合成法主要是乙烯直接水合法;微生物发酵法主要有以糖质原料和淀粉质原料为底物直接发酵和以纤维素原料水解发酵两种方式。利用微生物发酵合成气生产乙醇是以生物质为原料生产乙醇的新工艺^[1],即先将生物质完全气化成以 CO、CO₂、H₂、N₂ 等为主要成分的生物合成气,再利用一些特殊的微生物将合成气转化为乙醇,该新工艺发酵条件简单,原料来源广泛,且大大降低了废液废渣的排放^[2],属于环保型新技术。**【前人研究进展】**20 世纪 80 年代以来,国外研究人员相继在鸡粪、兔粪等动物粪便以及农业泄湖、沼气池中发现了一些可利用合成气生产乙醇的菌株^[3,4],主要研究的微生物有以下几种: *Clostridium ljungdahlii*^[5], *Clostridium autoethanogenum*, *Moorella thermo-philic* sp. HUC22-1^[6], *Clostridium scatologenes* - strain SL1^[7], *Clostridium carboxidivorans* P7, 这些菌株都是严格厌氧菌,可以在高浓度合成气条件下生长并产生乙醇。**【本研究切入点】**目前,国内尚未见有关利用合成气发酵生产乙醇菌株的相关报道。**【拟解决的关键问题】**从广西象州家禽养殖场、沼气池等地采集到的鸡、牛等动物粪便中筛选到 1 株能够利用合成气生产乙醇的菌株,对其进行生理生化分析及初步发酵实验,摸索菌株的生长发酵条件,为工业化发酵合成气生产乙醇提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

样品: *Clostridium ljungdahlii* 由本研究筛选获得。

培养基:本研究所用培养基参考文献[5~12],略有修改。

合成气:购自南宁国信气体有限公司,含 73% CO, 10% CO₂, 15% H₂, 2% CH₄, 或者 80% H₂, 20% CO₂。

1.2 菌株的富集与筛选

在厌氧条件下称取 1.0g 新鲜的动物粪便,溶于 10mL 富集培养基中,37℃ 厌氧静止培养 24~48h,摇

匀后取 1mL 培养物接种到含有 40mL 筛选培养基的血清瓶中,以合成气为唯一碳源,37℃ 厌氧静止培养 30d,取有生长趋势的培养物,稀释 1×10³ 倍后接种到新鲜的筛选培养基中,重复培养 30d,重复以上步骤 3 次后,取培养物稀释 1×10³ 倍后涂布于固体 CLM 培养基上,以果糖为唯一碳源,37℃ 厌氧静止培养 3d 后,挑取单克隆于液体 CLM 培养基中,以果糖为唯一碳源,37℃ 厌氧静止培养 24~36h,用甘油保存菌种。

1.3 菌株的鉴定

提取菌株基因组 DNA,PCR 扩增 16S rRNA(引物 27f: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 和 1492r: TACGGCTACCTTGTTACGACTT),送上海生工测序公司测序。

1.4 菌株生理生化分析

菌株生理生化分析的具体方法参见文献[13]。

1.5 菌株生长曲线的测定

分别挑取 *Clostridium ljungdahlii* 单菌落于 RCM 培养基和 CLM 培养基中,37℃ 厌氧静止培养 24h,次日按 1% 的接种量接种于 10mL RCM 培养基和 CLM 培养基中,以果糖为唯一碳源,37℃ 厌氧静止培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.2 时,按 2% 的接种量接种到 50mL 的相应培养基中,37℃ 厌氧静止培养 50h,每 2~4h 取样检测 OD₆₀₀ 值。

1.6 菌株初步发酵实验

挑取 *Clostridium ljungdahlii* 单菌落于 CLM 培养基中,以果糖为唯一碳源,37℃ 厌氧静止培养 24h,按 1% 的接种量接种于 10mL CLM 培养基中,以果糖为唯一碳源,37℃ 厌氧静止培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.6 时,按 5% 的接种量接种到发酵培养基中,抽出空气,充入合成气,密封血清瓶后,37℃ 厌氧静止培养 30d,每 3~7d 补气 1 次。

1.7 乙醇测定

用注射器抽取 2.5mL 发酵液,12000r/min 离心 10min,取上清,以 0.1% 的乙腈为内标,气相检测乙醇产量,根据乙醇和乙腈峰面积比计算乙醇含量。

乙醇含量(g/L) = (乙醇峰面积/乙腈峰面积) × 1.020,式中 1.020 为换算常数,根据同一条件下测定乙醇和乙腈的标准曲线回归方程求得。

测定乙醇含量采用 Agilent technologies 6890N GC system 气相色谱,检测器采用 FID,柱型号: Agilent ZB - WAXPLUS Zebron 30.0m × 250μm ×

0.3 μ m,载气为氮气,载气流率 20mL/min,氢气流率 40mL/min,分流比 1:50,色谱进样口和柱子的温度分别为 250 $^{\circ}$ C 和 100 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

提取菌株基因组 DNA 后,PCR 扩增 16S rRNA,测序结果经 Genebank 比对,比对结果(表 1)显示与 *Clostridium ljungdahlii* 同源率为 99%,可以初步判定该菌株为 *Clostridium ljungdahlii*。

表 1 菌株 16S rRNA 片段序列比对结果

Table 1 Comparison of 16S rRNA sequence of strain by sequencing and Blast analysis

编号 No.	基因文库编号 Genbank Accession No.	最相似菌株 Most similar strain	相似度 Maximum identity(%)
1	NR_074161.1	<i>Clostridium ljungdahlii</i> sp. 13528	99
2	GU139552.1	<i>Clostridium ljungdahlii</i> sp. 55383	99
3	Y18178.1	<i>Clostridium autoethanogenum</i> sp. 10061	99

2.2 菌株生理生化分析

2.2.1 菌落特征

菌落为白色或灰白色,边缘呈不规则状,中间凸起有光泽。显微镜下呈棒状或短杆状,有运动性,芽孢很少见,严格厌氧菌,革兰氏染色后显紫色(图 1 和图 2),表明为革兰氏阳性菌,与文献[5]的报道一致。



图 1 显微镜下菌体情况

Fig.1 Electron microscopy of the strain

2.2.2 菌株生长必须因子

(1) 酵母粉

从表 2 可以看出, *Clostridium ljungdahlii* 菌株的生长需要酵母粉,当酵母粉含量低于 0.06% 时,在含有碳源的情况下,菌株也不生长;但当酵母粉含量大于等于 0.2% 后,即使不另外添加碳源也能微弱生长,所以酵母粉使用量控制在 0.1%。

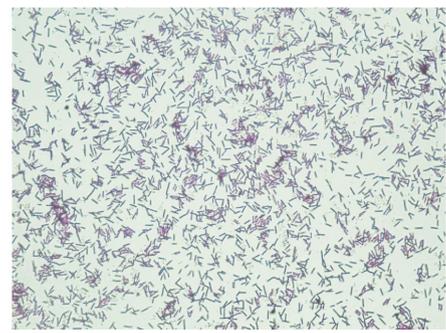


图 2 革兰氏染色后镜检结果

Fig.2 Electron microscopy of the strain after gram staining

表 2 不同酵母粉含量对菌株生长的影响

Table 2 Effect of different yeast powder on strain growth

碳源 Carbon source	酵母粉 Yeast extract (%)							
	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.5
果糖 Fructose	-	-	-	-	w	+	+	+
不添加果糖 Without fructose	-	-	-	-	-	-	w	+

+ : 生长; - : 不生长; w : 微弱生长。+ : Positive growth; - : No growth; w : Weak growth.

(2) 维生素 B 族及氨基酸

从表 3 可以看出, *Clostridium ljungdahlii* 菌株在添加维生素 B 族的条件下生长良好,在添加氨基酸的条件下生长很微弱,因此可以初步判定维生素 B 族是 *Clostridium ljungdahlii* 生长必须因子,氨基酸对 *Clostridium ljungdahlii* 的生长不起到决定性的作用。

表 3 维生素 B 族及氨基酸对菌株生长的影响

Table 3 Effect of B-Vitamins and amino acid on strain growth

添加情况 Adding condition	维生素 B 族 B-vitamin solution	氨基酸 Amino acid solution
添加 Adding	+	w
不添加 Without adding	-	-

+ : 生长; - : 不生长; w : 微弱生长。+ : Positive growth; - : No growth; w : Weak growth.

(3) 可用碳源

从表 4 可以看出, *Clostridium ljungdahlii* 在 CLM 培养中可以利用合成气、木糖、果糖、阿拉伯糖、丙酮酸盐及乙醇作为碳源,生长良好,果糖生长最快,而葡萄糖为唯一碳源时生长非常缓慢。

2.2.3 菌株最适生长条件

图 3 和图 4 表明,菌株的最适生长温度为 35~37 $^{\circ}$ C,最适 pH 值为 6.0~7.0。

2.2.4 菌株耐氧实验

菌株耐氧实验发现,当空气含量为 0.1% 或 0.2% 时,菌株可以生长;当空气含量为 0.5% 时,菌株微弱生长;当空气含量为 0.75% 或 1.0% 时,菌株不生长。这表明当空气含量低于 0.2% 时,菌株能正

常生长;当空气含量超过 0.75%时,菌株生长受到抑制,不能正常生长。

表 4 *Clostridium ljungdahlii* 在单一碳源下的生长状况

Table 4 Growth of *Clostridium ljungdahlii* on substrates as the sole carbon

碳源 Carbon source	生长状况 Growth situation	碳源 Carbon source	生长状况 Growth situation
合成气 Syngas	+	CO ₂ /H ₂	+
木糖 Xylose	+	果糖 Fructose	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	葡萄糖 Glucose	w
蔗糖 Sucrose	-	甘油 Glycerol	-
L-乳酸盐 L-lactate	-	丙酮酸盐 Pyruvate.	+
柠檬酸盐 Citrate	-	麦芽糖 Maltose	-
甲醇 Methanol	-	乙醇 Ethanol	+
淀粉 Starch	-	山梨醇 Sorbitol	-
乳糖 Lactose	-		

+: 生长; -: 不生长; w: 微弱生长。+: Positive growth; -: No growth; w: Weak growth.

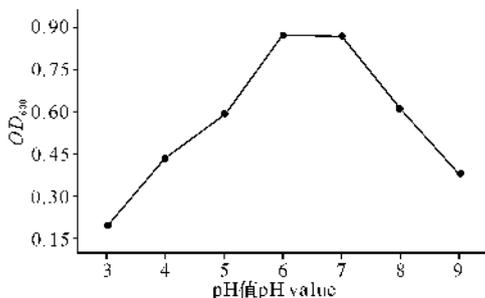


图 3 *Clostridium ljungdahlii* 最适 pH 值

Fig. 3 Optimum pH of *Clostridium ljungdahlii*

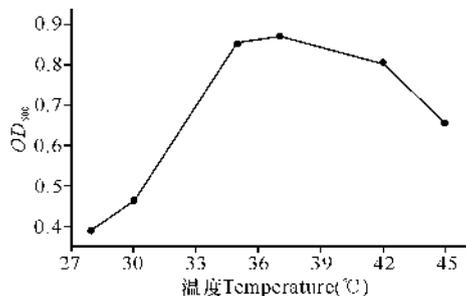


图 4 *Clostridium ljungdahlii* 最适生长温度

Fig. 4 Optimum temperature of *Clostridium ljungdahlii*

2.3 *Clostridium ljungdahlii* 生长曲线

按照 1.7 方法测定 *Clostridium ljungdahlii* 在不同培养基中的生长曲线,结果(图 5)表明,在 RCM 培养基中,菌株几乎没有延滞期,2h 后菌株 OD₆₀₀ 达到 0.2,然后迅速进入对数期,28h 后生长速度开始减缓进入稳定期,OD₆₀₀ 最大值达到 1.93 左右;而 *Clostridium ljungdahlii* 在 CLM 培养基中,前 2~8h 菌株几乎不生长,20h 左右,OD₆₀₀ 达到 0.2,24~38h 内为菌株生长的对数期,40h 后菌株生长趋于稳定,OD₆₀₀ 最大值达到 0.89。从结果中可以看出, *Clostridium ljungdahlii* 在两种不同培养基中的生

长状况有较大差异,在 RCM 培养基中生长迅速,且菌体密度大,在 CLM 培养基中生长相对缓慢,且菌体密度低,其原因是由于 RCM 培养基是完全培养基,营养丰富更适合菌株的生长复苏。

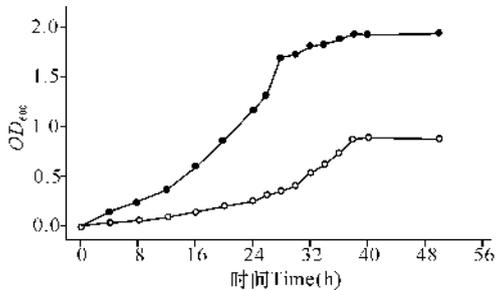


图 5 *Clostridium ljungdahlii* 生长曲线

Fig. 5 Growth curve of *Clostridium ljungdahlii*

●: RCM, ○: CLM.

2.4 合成气发酵乙醇的初步实验

气相色谱检测结果(图 6)显示,发酵液中有乙醇生成,乙醇产量在 0.68~2.58g/L 之间,其中 20mL 血清瓶中几乎没有乙醇生成,250mL 血清瓶中普遍较高,推测血清瓶体积越大,所能容纳的合成气越多,乙醇产量越高。

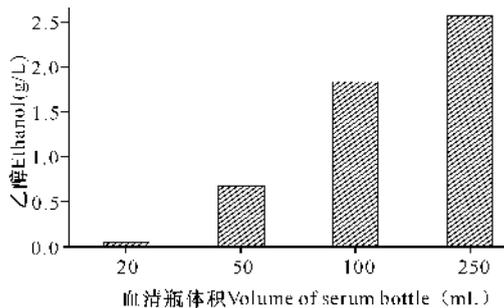


图 6 乙醇产量分析

Fig. 6 Yield analysis of ethanol

2.5 乙醇产量优化实验

从表 5 可以看出,添加 BESA、莫能菌素及丁基橡胶颗粒后,乙醇平均产量均有所提高,分别提高了 49%、70%、4.3%,其中莫能菌素提高最多,BESA 次之,丁基橡胶颗粒最低,这是由于莫能菌素和 BESA 都可以抑制甲烷的生成,促进乙醇和乙酸的生成,而丁基橡胶颗粒的主要作用是吸附气体,提高气体在培养基中的溶解度,从而提高乙醇的产量,但是由于发酵过程是静止的,丁基橡胶颗粒大多沉到底部,导致吸附气体量减少,对乙醇产量提高所起的作用不大。

3 讨论

本研究成功地从动物粪便中筛选到 1 株可以发酵合成气生产乙醇的菌株,经菌株生理生化分析以及 16S rRNA 鉴定为 *Clostridium ljungdahlii*,我们利用 *Clostridium ljungdahlii* 进行了合成气发酵乙醇

表 5 添加 BESA、莫能菌素和丁基橡胶颗粒对乙醇产量的影响(g/L)

Table 5 Effect of adding BESA, monensin and butyl rubber particles on yield of ethanol(g/L)

添加情况 Adding condition	BESA	莫能菌素 Monensin	丁基橡胶颗粒 Butyl rubber particles
添加 Adding	3.79	4.31	2.65
不添加 Without adding	2.54	2.54	2.54

的初步实验,实验结果显示该菌株能够在以合成气为唯一碳源的培养基中生长并产生乙醇,经 30d 血清瓶发酵,乙醇产量达到 2.58g/L,添加 BESA、莫能菌素、丁基橡胶颗粒可以分别使乙醇产量提高 49%、70%、4.3%,最高产量达到 4.31g/L。

在实验过程中,研究发现不同组分含量的合成气会导致乙醇产量的不同^[14],同时合成气中除了 CO、CO₂、H₂等主要成分外,还含有硫化氢、焦油、NO 等不可利用的有毒有害气体,也会在发酵过程中影响菌株的生长和代谢。另外,发酵产物检测结果显示,菌株发酵合成气最主要的产物是乙酸和乙醇,当 pH 值为 4~5 时,发酵主产物是乙醇,当 pH 值为 6~7 时,发酵主产物是乙酸,然而 *Clostridium ljungdahlii* 最适 pH 值是 6~7,pH 值过低会影响菌株的生长,实验结果也表明在 pH 值为 4~5 范围内,单位菌体密度的乙醇产量更高,但是由于菌株生长受到抑制,导致乙醇总产量较低。因此,提高菌株的耐酸性也是后续研究过程中亟待解决的问题。此外,合成气的通入方式也是制约乙醇产量的一个关键因素,本研究主要采用间隙补气,无法保证稳定的气压和气液接触,影响了菌株的转化效率,致使乙醇产量保持在一个较低的水平。Vel Berzin 等^[15]采用高压连续通气法,乙醇产量最高达到 27.2g/L,这也为我们的后续发酵实验提供了新的思路。

本研究结果表明,利用 *Clostridium ljungdahlii* 发酵合成气生产乙醇的工艺是可行的,但由于受到菌株生长条件、合成气组分以及发酵设备等条件的限制,目前乙醇产量还很低。在接下来的工作中,将主要着力于改进发酵设备以及利用分子手段改造菌株两方面,以期获得一种高效、快速、环保的乙醇生物发酵新工艺。

参考文献:

[1] Klasson K T, Ackerson M D. Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels[J]. Enzyme Microbiology Technology, 1992, 14: 602-608.
 [2] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H. The path

forward for biofuels and biomaterials[J]. Science, 2006, 311(27): 484-489

[3] Vega J L, Prieto S, Elmore B B, et al. The biological production of ethanol from synthesis gas[J]. Appl Biochem Biotech, 1989, 20-21(1): 781-797.
 [4] Hurst K M, Lewis R S. Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation[J]. Biochem Eng J, 2010, 48(2): 159-165.
 [5] Gaddy J L, Clausen E C. *Clostridium ljungdahlii*, an anaerobic ethanol and acetate producing microorganism; US: 5173429[P]. 1992-12-22.
 [6] Sakai S, Nakashimada Y, Yoshimoto H. Ethanol production from H₂ and CO₂ by a newly isolated thermophilic bacterium, *Moorella* sp. HUC22-1 [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 1607-1612.
 [7] Kusel K, Dorsch T, Acker G, et al. *Clostridium scato-logenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 537-546.
 [8] Gaddy J L, Ark F. Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*; US: 6136577 [P]. 2000-10-24.
 [9] Najafpour G, Younesi H. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38: 223-228.
 [10] Younesi H, Najafpour G, Mohamed A R. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 27: 110-119.
 [11] Cotter J L, Chinn M S, Grunden A M. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2009, 32: 369-380.
 [12] McInerney M J, Bryant M P, Pfennig N. Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with Methanogens[J]. Arch Microbiol, 1979, 122: 129-135.
 [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
 Dong X Z, Cai M Y. Scientific identification manual of comom acteria[M]. Beijing: Science Press, 2001.
 [14] Liu K, Atiyeh H K, Tanner R S, et al. Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi* [J]. Bioresour Technol, 2012, 104: 336-341.
 [15] Berzin V, Kiriukhin M, Tyurin M. Elimination of acetate production to improve ethanol yield during continuous synthesis gas fermentation by engineered biocatalyst *Clostridium* sp. MTEtOH550 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167(2): 338-347.

(责任编辑: 陈小玲)