

文章编号: 0254-0096(2007)06-0632-06

诱变育种选育高效产氢细菌

郑国香, 任南琪, 林海龙, 李永峰

(哈尔滨工业大学市政环境学院, 哈尔滨 150090)

摘 要: 从自行研制的 CSTR 反应器中分离出一株产氢发酵细菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4, 以其为出发菌株, 进行紫外和亚硝酸复合诱变选育, 经过连续传代得到一株遗传稳定性很好的高效产氢突变株 YR-3。在培养条件分别为 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 初始 pH 为 6.0, 葡萄糖浓度为 12g/L, 其单位体积产氢量 (Y_{H_2}) 为 3097.5mL/Lculture, 产氢能力比对照提高 70.5%, 最大产氢速率为 36.6mmol/g·drycell·h, 比对照高出 55.1%; 发酵液相末端产物是以乙醇和乙酸为主的典型乙醇型发酵代谢类型。高效产氢耐酸突变体 YR-3 的释氢能力和产氢速率明显高于野生菌株 ZGX4, 显示了较强的商业应用潜力, 也可为进一步探讨研究乙醇型细菌的制氢机制及代谢途径提供物质材料。

关键词: 生物制氢; 突变体; 紫外线和亚硝酸; 产氢能力

中图分类号: X703

文献标识码: A

0 引 言

发酵法生物制氢问世以来, 发酵过程中无需光照、可实现废物回收、低成本以及无污染等优点, 逐渐引起学者的关注。但反应系统中发酵细菌的产氢能力不高是制约产氢发酵工业发展的影响因素之一。为解决这一难题, 国内外研究者陆续分离和筛选菌株以期获得高效产氢细菌, 如 Kumar(2000)从树叶榨出物中分离到一株阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) II T-BT08, 在 pH6.0 和 36°C 条件下, 最大产氢速率为 $29.63\text{mmolH}_2/\text{g} \cdot \text{drycell} \cdot \text{h}^{[1]}$; Ren 等人(2002)从自行研制的 CSTR 的活性污泥中分离到一株产氢细菌 B49, 其最大产氢速率在 $25 \sim 28\text{mmolH}_2/\text{g} \cdot \text{drycell} \cdot \text{h}^{[2]}$ 。以上提到的菌株都是从自然环境中分离到的具有较高产氢能力的野生型细菌。而以人工诱变基因突变为基础的诱变育种方法, 如利用物理(紫外辐射)和化学(亚硝基胍、亚硝酸等)诱变获得突变体, 一直是发酵工业中的各种优良高产菌株筛选的主要途径, 也是研究微生物生理代谢机制的传统方法。目前, 发酵法生物制氢技术中, 发酵产氢细菌突变体获得的方法主要有质子自杀法^[3,4]和烯丙基乙醇方法^[5,6], 筛出的突变体拥有比野生型更强的产氢能力。国内外关于应用紫外线和亚硝酸复合诱

变方法筛选高效产氢细菌未见报导。本实验针对如何进一步提高细菌的产氢能力进行了诱变育种研究。采用紫外和亚硝酸复合诱变的方法对出发野生菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 进行诱变选育, 经过传代和稳定性考察后得到一株高效产氢突变菌株 YR-3。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

出发菌株 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 由哈尔滨工业大学环境技术中心提供, 革兰氏染色为阳性, 代谢类型为乙醇型厌氧产氢细菌。

1.1.2 液体培养基(g/L)

葡萄糖 12, 蛋白胨 2.0, 牛肉膏 2.0, 酵母汁 1.0, NaCl 4.0, K_2HPO_4 1.5, L-半胱氨酸 0.5, $\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 维生素与微量元素各 10mL; 刃天青(0.2%) 1mL; pH 值调整为 6.0, 参照文献[7]。

分离培养基(g/L): 胰蛋白胨 1.0, 琼脂 20~25, 其他成分如液体培养基。

1.1.3 化学试剂

醋酸缓冲液、亚硝酸钠溶液和磷酸氢二钠溶液无氧无菌; 紫外诱变过程及平板的配制操作及培养在厌氧箱中进行。

收稿日期: 2004-04-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)(G2000026402);
国家自然科学基金项目(30470054)

1.1.4 仪器及设备

上海跃进仪器厂生产的厌氧操作培养箱 YQX-1;752 紫外分光光度计;国产 GC122 型气相色谱仪;低温高速离心机:型号为 SIGMA 3K 30 (SIGMA Laborzentrifugen GmbH)。

1.2 分析方法

挥发酸和醇类测定:使用国产 GC122 型气相色谱仪和 CDP-2S 色谱数据处理机及软件。取 1mL 培养液,同时加入 6mol/HCl 溶液 2 滴,离心 5000r/min,取上清液 2 μ L 进样,气相色谱仪柱为 Φ 5mm $\times$ 2m 不锈钢螺旋柱,内装担体 GDX-103(60~80 目)+2% H₃PO₄,氢火焰检测器,氮气作载体,流速 60mL/min;氢气流速为 50mL/min;空气流速为 490mL/min;汽化室温度 210℃;柱和检测室温度 190℃。

氢气和二氧化碳测定:使用 SC-II 型气相色谱仪,柱长 2m,担体为 TDS-01,60~80 目,热导池检测器,氮气作载气,流速为 70mL/min,柱和检测室温度 150℃。

1.3 产氢量和产氢能力的测定^[8]

产氢能力实验采用间歇试验装置,如图 1 所示。将产氢细菌按 6.5×10^7 浓度接菌,反应有效体积为 50mL。产氢能力用单位体积产氢量(Y_{H_2})和最大产

氢速率(Q_{H_2})来表示。筛出的菌株扩大培养是在恒温空气浴摇床振荡培养,培养条件控制在温度 $36 \pm 1^\circ\text{C}$,摇床转数为 125r/min。

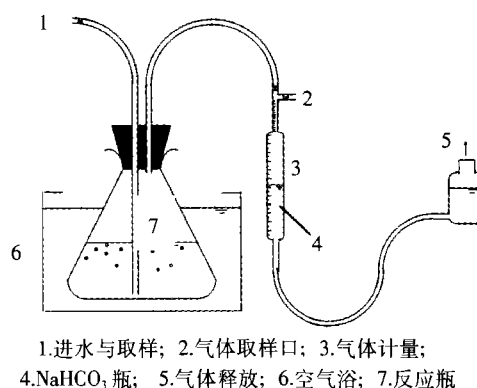


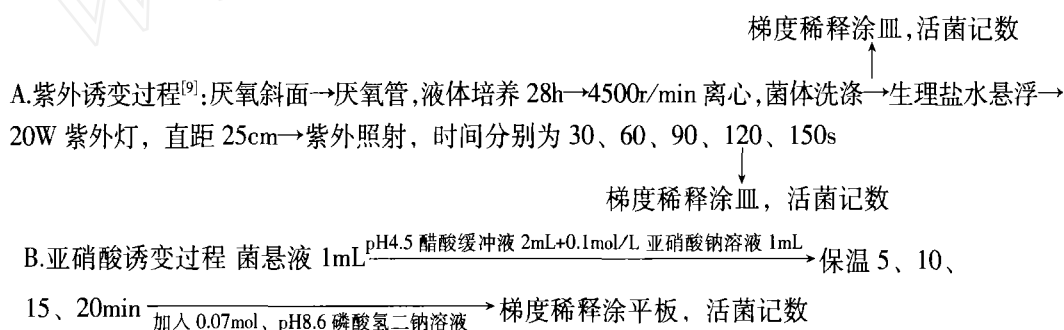
图 1 产气间歇实验装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of H₂-producing fermentation reactor system by batch culture

1.4 菌浊和细胞干重的测定

细胞浓度用 752 紫外分光光度计测定,在 600nm 下测定样品的吸光度值,一单位的光密度相当于 0.24g/L 干物质。葡萄糖含量测定采用氧化酶法(葡萄糖试剂盒)。

1.5 诱变流程



2 结果与讨论

2.1 紫外线辐射后突变株的选择

紫外线是一种使用最早、沿用最久、应用广泛、效果明显的物理诱变剂,能够被 DNA 强烈吸收,从而引起 DNA 构型发生多种多样的变化(如断裂、交联、改变遗传学性质等),进一步引起突变。由于不同菌种对紫外线敏感程度不同,本实验通过不同紫外线辐射时间对产氢细菌 ZGX4 的死亡率和正突变率的双重影响来确定最佳紫外辐射强度,结果见图

2。随紫外线照射时间的增加,细菌死亡率也逐渐增加,当紫外辐射时间达到 120s 时,出发菌株 ZGX4 的死亡率在 77.6%,这时细菌的正突变率相对最大为 22.7%,因此确定紫外线最佳辐射时间为 120s。紫外线诱变筛选突变菌株的过程可参考文献[10],随机挑取直径较大的单菌落放入液体中培养 2~3d,测量总气体及氢气含量,初选出 7 株突变菌株(表 1 所示),经过连续传代后测其产氢能力和产氢速率,考察突变体的遗传稳定性,发现大多数突变菌株显示出稳定的产氢遗传特性,产氢能力和产氢速率

都有所下降。综合对比后,最后筛选出 3 株产氢能力和产氢速率相对稳定的突变株,分别命名为 UV-3,UV-7 和 UV-74。其中,UV-3 的单位体积产氢量和最大产氢速率分别为 2381.9mL/L 和 32.6 mmol/g·drycell·h,分别比野生菌株 ZGX4 的产氢能力和最大产氢速率高出 31.2% 和 38.1%,因此确定 UV-3 作为下一轮诱变的出发菌株。

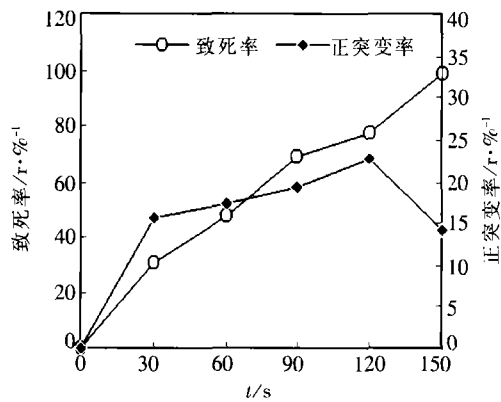


图 2 紫外辐射时间对 ZGX4 死亡率与正突变率的影响
Fig.2 Effect of UV time on death rate and positive mutative rate of strain ZGX4

表 1 紫外筛选突变体产氢能力稳定性

Table 1 Stability of hydrogen production capacity of mutants screened by UV

菌种	复筛产氢能力		二次复筛产氢能力	
	Y_{H_2}	Q_{H_2}	Y_{H_2}	Q_{H_2}
ZGX4	1815.9	23.9	1816.2	23.6
UV-1	2451.8	28.8	2108.4	22.9
UV-3	2385.4	32.2	2381.9	32.6
UV-7	2298.4	30.8	2294.9	31.2
UV-17	2399.8	26.9	1980.7	22.7
UV-34	2469.9	24.1	2199.1	21.0
UV-52	2349.2	27.9	1989.6	23.1
UV-74	2555.8	26.0	2511.4	25.5

注: Y_{H_2} :单位体积产氢量(mL/L); Q_{H_2} :最大产氢速率(mmol/g·drycell·h)

2.2 紫外线与亚硝酸复合诱变高效产氢突变株的选择

2.2.1 亚硝酸最佳处理剂量的选择

亚硝酸是一种常用的毒性较小的诱变剂,可以直接用于正在复制或未复制的 DNA 分子,脱去碱基中的氨基变成酮基,改变碱基氢键的电位,引起转换而发生变异;还可以引起 DNA 两条单链之间的交联作用,阻碍双链分开,影响 DNA 复制,从而导致突变。

经紫外辐射筛选出的 UV-3 为初发菌株,经亚硝酸分别处理 0、5、10、15、20min 后,其致死率和正突变率结果见表 2。随着处理时间的增加,菌体死亡率也增加。当亚硝酸处理时间为 15min 时,野生菌株 ZGX4 的死亡率达到 80.9%,正突变率为 26.8%,菌体的死亡率较高而且可以保障很高的突变菌株的出现,因此确定 15min 是最佳处理剂量。

表 2 亚硝酸处理时间对 UV-3 致死率的影响

Table 2 Effect on the lethal rate of UV-3 by nitrous acid treated time

处理时间/min	0	5	10	15	20
稀释度	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5
平均菌落数/个	35	24	15	9	1
菌浓度/个·mL ⁻¹	3.5×10^6	2.4×10^6	1.5×10^6	0.9×10^6	0.1×10^6
致死率/%	0	37.5	54.3	80.9	98.6
正突变率/%	0	12.9	21.5	26.8	15.8

2.2.2 紫外线与亚硝酸复合处理突变株的选择

将经亚硝酸处理 15min 的菌株 UV-3 悬浮液梯度稀释后,均匀涂布于筛选培养基中,置于厌氧箱中,36±1℃培养 3~5d 后,挑选大且边缘有气泡出现的单菌落富集培养 48h 后转接,进行间歇实验以测定产氢能力和产氢速率,在大量的突变体中筛选出 3 株产氢能力明显高于 UV-3 的突变菌株,分别命名为 YR-3,YR-9 和 YR-28。经过连续的传代进行遗传稳定性考察,YR-3 产氢能力稳定,见表 3。YR-3 的单位体积产氢量和最大产氢速率分别为 3097.6mL/L 和 36.6mmol/g·h,比其出发菌株 UV-3 分别提高了 30.0% 和 12.6%,比野生菌 ZGX4 提高了

表 3 紫外+亚硝酸复合处理筛选突变体产氢能力稳定性

Table 3 Stability of hydrogen production capacity of mutants screened by UV and nitrous acid

菌种	复筛产氢能力		二次复筛产氢能力	
	Y_{H_2}	Q_{H_2}	Y_{H_2}	Q_{H_2}
ZGX4	1815.9	22.7	1816.2	23.6
UV-3	2385.4	32.2	2381.9	32.6
YR-3	3097.0	36.4	3097.6	36.6
YR-9	3011.4	33.9	2587.4	28.5
YR-28	2988.2	34.9	2901.5	26.9

注: Y_{H_2} :单位体积产氢量(mL/L); Q_{H_2} :最大产氢速率(mmol/g·drycell·h)

70.5%和 55.1%, 获得突变株 YR-3 的诱变谱系图见图 3。

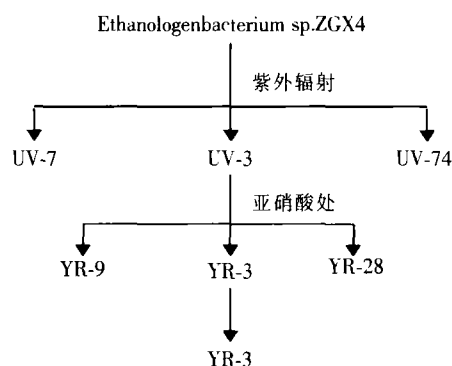


图 3 突变体 YR-3 的诱变谱系

Fig.3 Mutation breeding of mutant YR3

2.3 产氢突变株 YR-3 与野生菌 ZGX4 产氢动力学对比

在葡萄糖浓度为 12g/L, 温度 37℃, 初始 pH = 6.0 的静态培养条件下, 探讨了突变体 YR-3 和对照 ZGX4 的生长释氢行为对比(图 4 和图 5 所示), 在发酵产氢过程中, 定时测定生物气量、氢气含量、发酵液的 pH 值、测取液相末端产物、菌体细胞干重、葡萄糖等参数。对比分析, 发现突变株和对照菌株的生长曲线、pH 变化及液相末端产物浓度随发酵时间的波动变化趋势没有很明显的区别, 即随着发酵时间的进行, 底物(葡萄糖)消耗逐渐增加, 相应地自身细胞浓度增长也逐渐加快, 当菌体生长处于对数生长期时, 细菌代谢旺盛, 通过分解利用大量底物合成物质和提供能量, 以保证菌体的生长繁殖, 这一期间, 乙醇和乙酸的含量增长迅速(图 4b 和图 5b)。随着挥发酸的逐步积累, 发酵液的 pH 值也在逐渐下降, 当 pH 降到 3.33~3.45 时, 细菌的生长和产氢几乎停止。而突变株 YR-3 和对照 ZGX4 的差异在于突变体 YR-3 消耗底物的平均速率(0.413g/(h·L))明显快于对照 ZGX4(0.275g/(h·L)), YR-3 的细胞生长速度和产氢相应地快于对照, 当培养时间为 28h 时, 突变株 YR-3 获得最大生物量 0.446g/L, 同时产氢量也达到最大 155 mL; 而对照菌株明显滞后于 YR-3, 培养 32h 才获得其最大生物量 0.462g/L, 36h 产氢量达到最大 91mL。随着葡萄糖的逐渐消耗, 挥发酸的逐步积累, 导致环境 pH 迅速下降, 当 pH 降为 3.33~3.45 时, 较低的 pH 已经成为 YR-3 和对照 ZGX4 的菌体生长和发酵产氢的限制因子(图 4 和图 5)。代谢活性降低, 菌体生长受到抑制, 相应的液相

末端产物增长缓慢, 培养 40h 后, 葡萄糖并未完全消耗, YR-3 的主要发酵液相末端产物乙醇和乙酸达到最大, 即为 3.981g/L 和 3.501g/L, 分别为总挥发酸总量的 53.2% 和 46.8%, 没有监测到丁酸和丙酸(图 4b)。对比之下, 对照 ZGX4 的液相末端产物的组成除了乙醇和乙酸外, 还有少量丙酸和丁酸(图 5b), 发酵末期, 乙醇和乙酸达到最大值, 分别为挥发酸总量的 50.3% 和 45.3%; 微生物的代谢产物含量及比例可以直接或间接的反映微生物的主要代谢类型及代谢途径。从液相末端产物的组成及比例分析, 突变体的主要代谢类型没有发生根本变化, 仍为典型的乙醇型厌氧发酵产氢菌。突变体 YR-3 产生的生物气中氢气的比例在 55%~81% 之间(图 4b), 平均氢含量是对照 ZGX4(41%~55%)(图 5b)的 1.41 倍, 在发酵 24h, 温度 37℃, 细胞浓度为 0.436g/L, pH = 4.00 时获得最大产氢速率 36.6mmol/g·drycell·h; 对照 ZGX4 的最大产氢速率 23.6mmol/g·drycell·h 是在培养 30h, 温度 37℃, 细胞浓度为 0.483 g/L, pH = 4.04 时获得的, 落后于 YR-3。

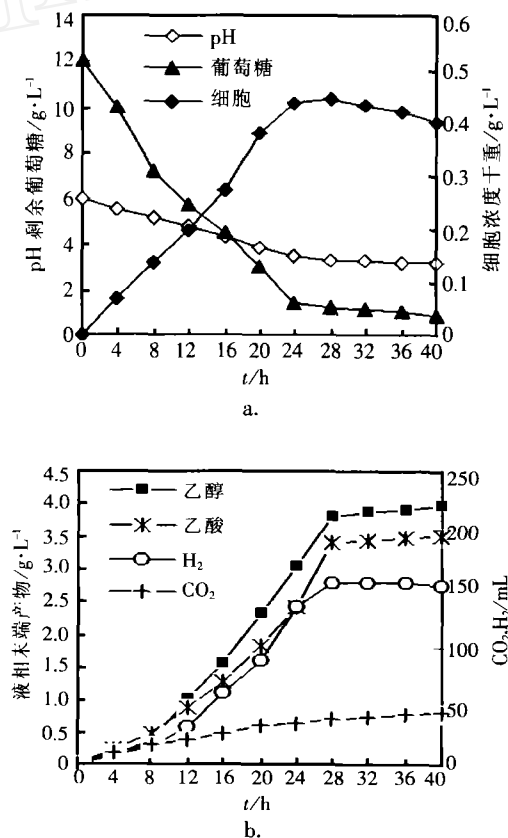


图 4 间歇实验中突变株 YR-3 的发酵生长产氢示意图

Fig.4 Time course of growth and H₂ production of mutant YR-3 in batch test

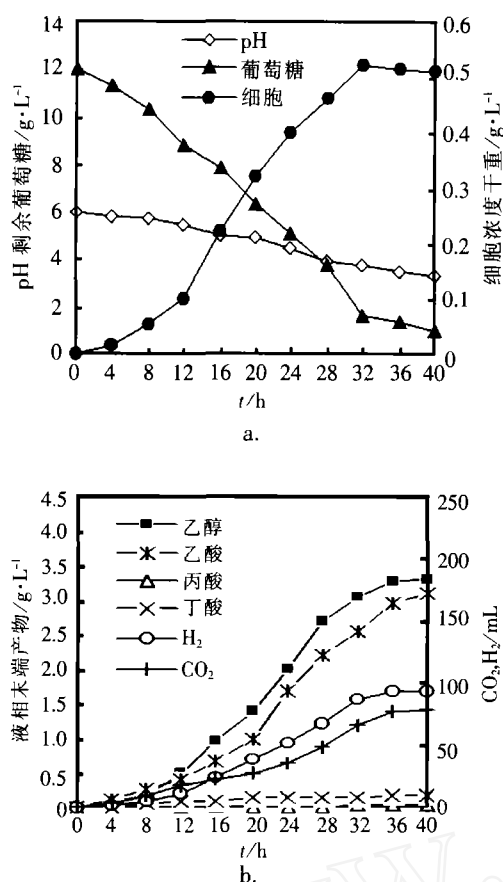


图5 间歇实验中对照 ZGX4 的发酵生长产氢示意图

Fig.5 Time course of growth and H₂ production of control strain ZGX4 in batch test

3 结 论

复合诱变是一种较好的诱变手段,用于微生物菌种改良、植物育种等方面得到了很好的诱变效果。物理、化学交替诱变相结合,使诱变产生的突变体后代遗传基础比较复杂,在世代分离选择中通过优良基因的重组和累加,可能会出现综合性状优良的突变体^[10]。

实验结果证实,利用紫外线和亚硝酸复合处理 *Ethanoligenens* sp. ZGX4, 成功获得一株高效产氢细菌突变体 YR-3。在温度 37℃, 初始 pH = 6.0, 葡萄糖浓度为 12g/L 的间歇培养条件下, 其单位体积最大产氢量 (Y_{H_2}) 可达到 3097.6mL/L-culture, 产氢能力比对照 ($Y_{H_2} = 1816.2\text{mL/L-culture}$) 提高 70.5%; 在 pH = 4.00, 发酵时间为 24h 得到最大产氢速率为 36.6mmol/g·drycell·h, 比对照提高 55.1%。YR-3 是一株典型的以乙醇和乙酸为发酵液相末端产物的产

氢突变菌, 这将为揭示乙醇型发酵细菌的代谢途径和产氢机理, 进一步为特异生物工程菌的构建和改造实现工程上的生物强化, 为提高产氢能力提供重要的物质材料。

[参考文献]

- [1] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT08[J]. *Proc Biochem*, 2000, 35: 589—593.
- [2] 林 明, 任南琪, 王爱杰, 等. 几种金属离子对高效产氢细菌产氢能力的促进作用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 35(2): 147—151.
- [2] Lin Ming, Ren Nanqi, Wang Aijie, et al. Promotion of hydrogen production ability of hydrogen production bacteria by several kinds metal ions[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2003, 35(2): 147—151.
- [3] Winkelman J W, Clark D. Proton suicide general method for direct selection of sugar transport and fermentation defective mutants[J]. *J Bacteriol*, 1987, 160: 687—690.
- [4] Pablo H C, Mendez B S. Direct selection of *Clostridium acetobutylicum* fermentation mutants by a proton suicide method Appl[J]. *Environ Microbiol*, 1990, 56(2): 578—580.
- [5] Rogers P, Palosaari N. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and alter quantities of solvents. Appl[J]. *Environ Microbiol*, 1987, 53(12): 2761—2766.
- [6] Wills C, Phelps J. A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1975, 167: 627—637.
- [7] 林 明, 任南琪, 王爱杰, 等. 产氢发酵细菌培养基的选择和改进[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 35(4): 398—402.
- [7] Lin Ming, Ren Nanqi, Wang Aijie, et al. Selection and improvement on culture of H₂-producing fermentative bacteria [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2003, 35(4): 398—402.
- [8] 林 明, 任南琪, 王爱杰, 等. 高效产氢发酵细菌在不同气相条件下产氢[J]. 中国沼气, 2002, 2(20): 3—7.
- [8] Lin Ming, Ren Nanqi, Wang Aijie, et al. Hydrogen production of hydrogen producing bacteria by fermentation in different Gas Phases[J]. *China Biogas*, 2002, 2(20): 3—7.
- [9] 郑国香, 任南琪, 李永峰, 等. 严格厌氧细菌的厌氧操作与紫外诱变技术[A]. 第八次全国环境微生物学术研讨会[C], 哈尔滨工业大学, 2005.
- [9] Zheng Guoxiang, Ren Nanqi, Li Yongfeng, et al. The anaerobic operation and ultraviolet radiation on obligate anaerobic

fermentative hydrogen-producing bacteria [A]. Articles Collection of the 8th National Symposium on Environmental Microbiology [C], Harbin Institute of Technology, 2005.

[10] Zakour R A. Site-specific mutagenesis by error-directed DNA synthesis [J]. Nature, 1982, 295:708—710.

BREEDING HIGH EFFICIENT HYDROGEN-PRODUCING BACTERIA BY MUTAGENESIS

Zheng Guoxiang, Ren Nanqi, Lin Hailong, Li Yongfeng

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: The fermentative hydrogen bacteria *Ethanoligenens* sp. ZGX4 was separated from a CSTR reactor, and as an original strain, the bacteria was mutated and bred by UV and nitrous acid combined treatment. A high efficient hydrogen-producing mutant YR-3 with better stability was obtained after continuous passages. When temperature, original pH and glucose concentration were $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 6.0 and 12g/L, respectively, the hydrogen-producing capacity (Y_{H_2}) of YR-3 was 3097.65 mL/L-culture, its hydrogen-producing ability increased 70.5% over that the parent strain; The maximal H_2 yield rate Q_{H_2} was estimated to be 36.6 mmol H_2 /g·drycell·h, which was improved 55.1%, the main metabolic end product of mutant YR-3 was ethanol and acetic acid. In each case, YR-3 produced hydrogen at a faster rate and a stronger ability than the wild type, showing a possible potential for commercial hydrogen production and it would also provide useful data for exploring hydrogen-producing mechanism and metabolic pathway of hydrogen-producing bacteria.

Keywords: bio-hydrogen production; mutant; UV and nitrous acid; hydrogen-producing capacity