

一株高效产氢突变体 RF-9 的筛选与产氢特性

郑国香,任南琪*,李永峰,林海龙 (哈尔滨工业大学市政环境工程学院,黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:以从连续流搅拌槽式反应器(CSTR)内的活性污泥中分离出的厌氧产氢菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 为出发菌株,经过紫外线和亚硝酸复合诱变,从大量的突变体中筛选出一株稳定的高效产氢菌株 RF-9.磷酸盐浓度在 120mmol/L、温度 37°C、初始 pH 6.0、葡萄糖浓度 10g/L 培养条件下,RF-9 的单位体积产氢量和氢气产率为 139.7mmol/L 和 2.52mol H₂/mol 葡萄糖,分别是对照的 1.50 倍和 1.43 倍.在发酵时间为 15h、pH 4.1、细胞干重 0.722g/L 时,RF-9 获得其最大产氢速率 345mL H₂/(h·L),是对照 ZGX4 的 1.41 倍.RF-9 的主要液相末端产物为乙醇和乙酸,为典型的乙醇发酵细菌,与对照相似.

关键词:生物制氢;复合诱变;突变体;产氢性能

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1000-6923(2007)02-0184-05

Screening and H₂-producing characters of a high efficient H₂-producing mutant RF-9. ZHENG Guo-xiang, REN Nan-qi*, LI Yong-feng, LIN Hai-long (School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China). *China Environmental Science*, 2007,27(2):184~188

Abstract: *Ethanoligenens* sp. ZGX4 the anaerobic hydrogen producing (HP) bacterium isolated from a continuous stirred tank reactor (CSTR) was used as wild parent strain, through UV and nitrous acid combined mutation, a stable highly effective HP strain RF-9 was screened from large amount of mutant. At cultural condition of phosphate of 120mmol/L, temperature of 37°C, original pH of 6.0 and glucose concentration of 10g/L, unit volume HP amount and hydrogen yield were 139.7mmol/L and 2.52mol H₂/mol glucose, being 1.50 and 1.43 times of the contrast respectively. At fermentation time of 15h, pH 4.1 and cell dry weight of 0.722g/L, RF-9 obtained its maximal HP rate of 345mL H₂/(h·L) being its contrast 1.41times. The main liquid end products of RF-9 were ethanol and acetic acids, being the typical ethanol fermentation bacteria, similar to the contrasts.

Key words: bio-hydrogen production; combined mutation; mutant; hydrogen-producing (HP) function

氢能作为一种清洁、高效、安全、可持续的新能源,极具发展潜力.氢也是石油、化工、化肥和冶金工业中的重要原料和物料.利用生物发酵方法制氢,在简化工艺流程、调控运行参数、拓宽底物利用种类、降低原料成本以及筛选具有较高产氢能力和较大效率的产氢菌种等方面的研究都取得了很大进展^[1-7].其中,优良的菌种是发酵生产技术的因素之一,利用诱变育种及现代生物技术手段改良菌种是提高菌种产氢能力的主要手段.目前,在生物制氢领域中,得到突变体的主要方法是质子自杀法^[8-9]和烯丙基乙醇方法^[10-12],筛出的突变体拥有比野生型更强的产氢能力.关于利用亚硝酸和紫外线复合诱变的方法筛选高效产氢细菌还鲜有报道.本实验利用紫外线和亚硝酸复合诱变野生型厌氧产氢细菌

Ethanoligenens sp. ZGX4,经过传代考察其产氢能力及遗传稳定性,得到一株高效产氢突变体,命名为 RF-9,并对其发酵生长释氢行为进行探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

出发菌株 *Ethanoligenens* sp. ZGX4 取自本实验室连续流搅拌槽式反应器(CSTR)内的厌氧活性污泥,采用改进后的 Hungate 厌氧滚管技术^[13]和培养瓶平板法^[14]分离纯化得到,是一株严格厌氧乙醇型产氢细菌.

收稿日期:2006-08-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470054);国家“973”项目(G2000026402)

* 责任作者,教授,rmq@hit.edu.cn

液体培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 2.0,牛肉膏 1.0,酵母汁 1.0,NaCl 4.0,K₂HPO₄ 1.5,L-半胱氨酸 0.5,FeCl₂·H₂O 0.1, MgCl₂·6H₂O 0.1.维生素与微量元素各 10mL;刃天青(0.2%)1mL;pH6.0.

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

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.

仪器与设备: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;SC- II 型气相色谱仪;SIGMA 3K 30 低温高速离心机.

1.2 产氢量和产氢能力的测定

试验装置、产氢能力、氢、CO₂ 含量及液相末端产物分析见参考文献[14].反应有效体积为 50mL,产氢能力用单位体积产氢量(Y_{H_2})和氢气产率($A_{H_2/s}$)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,培养温度 37°C,摇床转速为 120r/min.

1.3 菌浊和细胞干重的测定

测定方法见文献[14].

1.4 诱变过程

菌体培养至对数期,4500r/min 离心 10min,弃上清,生理盐水洗涤悬浮后,取 5mL 菌悬液(10^7 个/mL)放于直距 25cm,20W 紫外灯下照射 120s 后,接入液体培养基中,37°C 避光培养 28h,4500r/min 离心 10min,弃上清,制成菌悬液,约 10^7 /mL 个,取 1mL 紫外处理后的菌悬液加入 2mL pH 4.5 醋酸缓冲液和 1mL 0.1mol/L 亚硝酸钠溶液,37°C 振荡保温处理 15min,加入 0.07mol pH 8.6 的磷酸氢二钠溶液终止反应,用无菌无氧生理盐水梯度稀释涂平板,未经亚硝酸钠溶液处理的菌液稀释涂平板做对照,置于 37°C 厌氧箱中培养.

2 结果与讨论

2.1 突变体的筛选

初筛是利用微型厌氧管生物制氢装置^[15],随机挑取较大的菌落于厌氧管中,液体培养 2~3d 后,

通过氢气产量和氢气含量的增幅来确定是否进行下一步的扩大培养.通过筛选获得 10 株产氢能力增幅在 40.1%~59.9%之间的突变菌株.进一步利用静态实验考察突变体的稳定性.在葡萄糖浓度为 10g/L,初始 pH6.0,温度 37°C, 120r/min 条件下振荡培养,10 株突变体经过传代二次复筛.

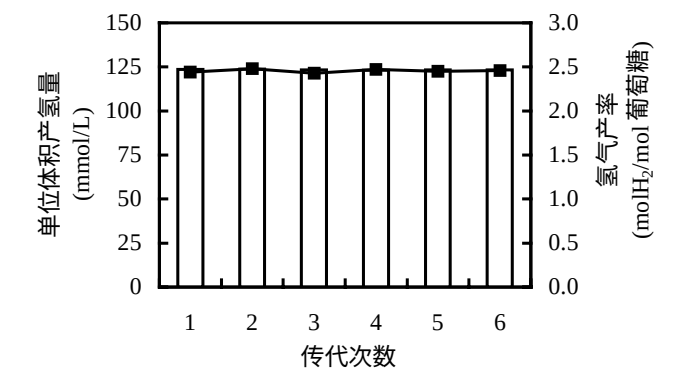


图 1 RF-9 的产氢稳定性
Fig.1 Hydrogen production stability of mutant RF-9
□ 单位体积产氢量 —■— 氢气产率

表 1 紫外+亚硝酸复合筛选突变体产氢能力稳定性
Table 1 Hydrogen production stability of mutants screened by UV and nitrous acid

菌株	复筛产氢能力		二次复筛产氢能力	
	Y_{H_2}	$A_{H_2/s}$	Y_{H_2}	$A_{H_2/s}$
ZGX4	81.0	1.69	81.1	1.69
RF-9	113.5	2.41	113.7	2.42
RF-63	115.9	1.99	91.0	1.78
RF-129	120.4	2.18	93.6	1.72
RF-248	129.5	2.32	102.7	1.96
RF-364	117.2	2.37	97.8	1.62
RF-510	113.1	2.27	100.1	2.21
RF-853	119.1	2.08	91.3	1.71
RF-1010	129.5	2.45	80.7	1.72
RF-1491	123.9	2.22	98.4	1.73
RF-2199	129.0	2.36	96.0	1.84

注: Y_{H_2} :单位体积产氢量(mmol/L); $A_{H_2/s}$:氢产率(mol H₂/mol 葡萄糖)

由表 1 可见,多数突变体单位体积产氢量和氢产率都有所下降,有的降幅很大,如 RF-1010 和 RF-2199,显示出不稳定的产氢遗传特性.通过对比分析,得到一株稳定的高效产氢突变体 RF-9,对其进行连续的传代和复筛考察(图 1),连续传代 6 次,单位体积产氢量和氢产率(无磷酸盐缓冲液

条件下)分别维持在 113.4mmol/L 和 2.42mol H_2 /mol 葡萄糖左右,即比对照菌株 ZGX4 分别增加 40.2%和 43.2%,显示很稳定的产氢遗传特性.

2.2 磷酸盐对 RF-9 生长产氢行为的影响

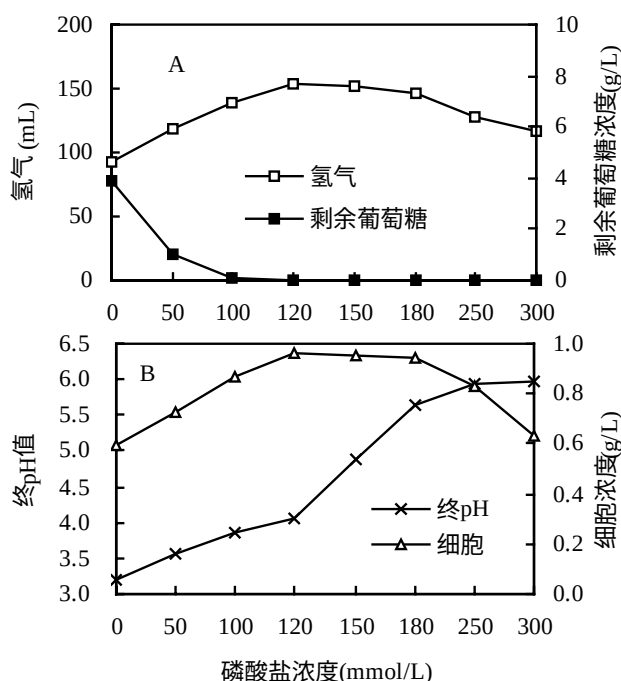


图2 磷酸盐缓冲液对发酵 24h 的 RF-9 的产氢行为的影响

Fig.2 Effect of phosphate concentration on hydrogen production behavior of mutant RF-9 after 24h incubation

通常乙醇型产氢细菌在发酵培养过程中产生大量有机酸,有机酸的大量积累导致环境 pH 值迅速降低,对菌种的生长以及释氢行为产生了明显的抑制.利用具有一定缓冲能力的磷酸盐溶液可减缓这种抑制效应,李永峰^[15],C-Y^[16]等分别探讨了磷酸盐对产氢纯菌和混合菌种的生长和释氢行为影响.在初始 pH6.0,葡萄糖浓度 10g/L,温度为 37°C 的培养条件,磷酸盐浓度对 RF-9 的菌体生长和产氢量影响较大.当磷酸盐浓度低于 30mmol/L,培养 24h 后测取的发酵液终 pH 值大约为 3.37(图 2A),产氢量和细胞浓度分别为 130mL 和 0.577g/L,而葡萄糖没有被完全利用(图 2B).当初始磷酸盐浓度在 110~150mmol/L 时,发酵液的终 pH 值维持在 4.0 以上,葡萄糖完全被利用,得到较高的细胞浓度(0.726~0.801)g/L(图 2A)

和较大的产氢量(142~153)mL(图 2B).磷酸盐浓度超过 180mmol/L,细胞浓度和产氢量有所降低,这表明适当浓度的磷酸盐对产氢突变体 RF-9 的生长发育和产氢具有很大的作用,而超出一定的浓度限度将会反馈抑制产氢发酵细菌的生长及释氢.因此,在实际应用过程中,应针对不同的菌种和目的,选择适度的缓冲液浓度,方可获得较理想的实验效果.

2.3 突变体 RF-9 与对照 ZGX4 产氢性能的对比

温度 37°C,初始 pH 6.0,葡萄糖浓度 10g/L,磷酸盐浓度 120mmol/L 培养下,对比突变体 RF-9 和对照 ZGX4 的生长产氢行为,见图 3 和图 4.突变体 RF-9 和对照 ZGX4 的生长速度、底物利用速率以及产氢量存在着明显差异.图 3A 所示,培养 24h,RF-9 消耗碳源的平均速度是对照菌株的 1.22 倍.随着发酵时间的延长,葡萄糖消耗速度加快,菌体生长也逐渐加快,当菌体生长处于对数生长期时,细菌代谢旺盛,通过分解利用大量的底物(葡萄糖)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 3B 和图 4B).当发酵时间为 12h 时,细胞浓度达到最大(0.801g/L),而对照菌 ZGX4 需要培养 20h 以后才可消耗尽底物,细胞浓度在 21h 时达到最大.随着葡萄糖的逐渐消耗,菌体逐渐进入衰亡期后,代谢产物和营养物质成为细菌种内竞争的生长限制因子,代谢活性降低,细胞浓度有所降低,相应的液相末端产物增长缓慢,培养 20h 后 RF-9 的主要发酵液相末端产物乙醇和乙酸达到了最大,分别为总挥发酸总量的 57.2%和 42.1%,还有微量的丁酸,未监测到丙酸,突变体 RF-9 液相末端产物中乙醇比例明显提高,这在某种程度上有利于产氢细菌缓解发酵产酸对自身产氢的影响.在整个发酵过程中,突变体 RF-9 的释氢速度也明显快于对照菌 ZGX4,平均产氢速率为 188.8ml H_2 /(h·L),是对照的 2.2 倍.培养 15h,温度 37°C,pH4.1,细胞干重为 0.722g/L 时获得其最大产氢速率 345mL H_2 /(h·L),而对照 ZGX4 的最大产氢速率明显滞后于 RF-9,培养 20h,pH 4.0,细胞干重

为 0.742g/L 时获得了最大产氢速率 245mL/(h·L)。突变体 RF-9 所产的混合生物气体组成与对照相似,主要是氢气和 CO₂,其中氢气的比例在 59%~81% 之间,其平均值是对照 ZGX4 的氢含量的 1.55

倍。RF-9 的氢气产率为 2.52mol H₂/mol 葡萄糖,是对照 ZGX4 的 1.43 倍,从底物转换的角度来分析,RF-9 是一株高效率的产氢突变菌,对进一步的乙醇型代谢途径的研究提供了材料来源。

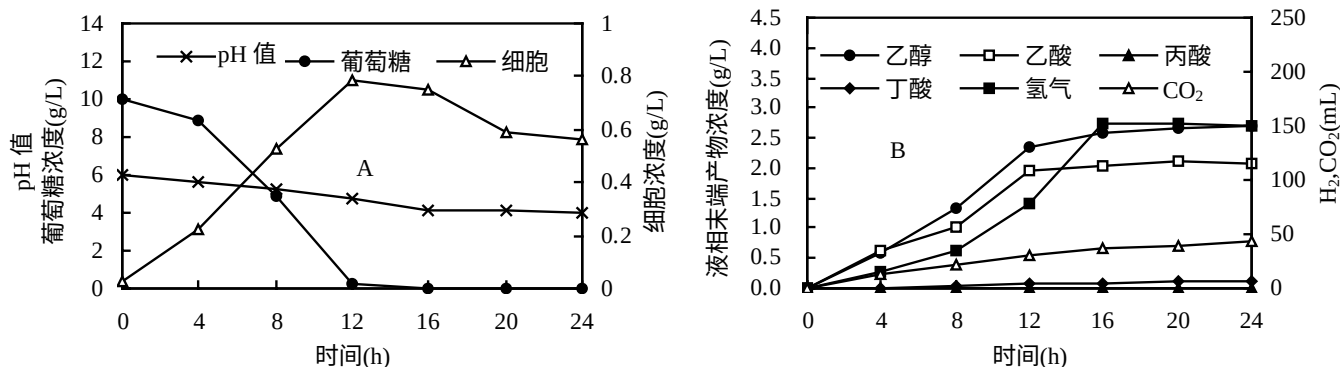


图3 突变体 RF-9 的生长情况与产氢能力

Fig.3 The cell growth and H₂-producing ability of mutant RF-9 in batch fermentation

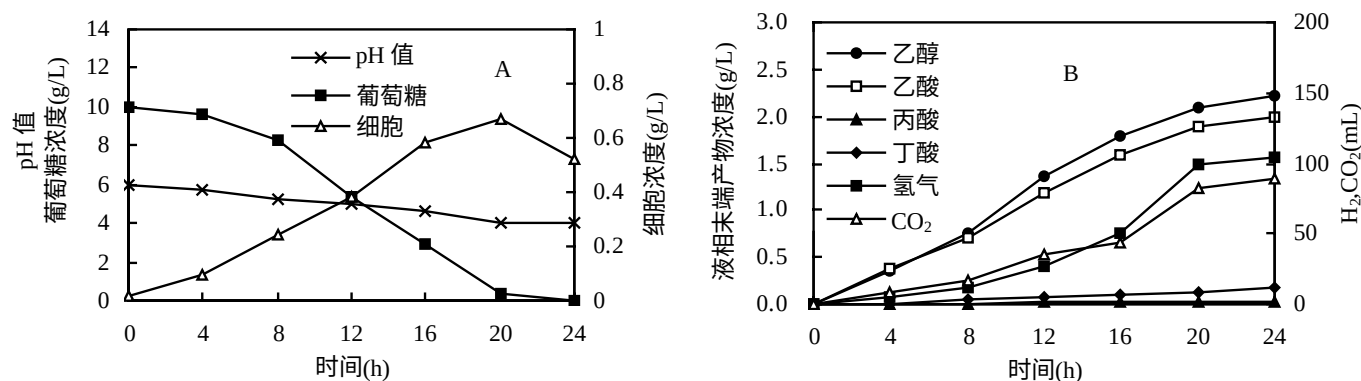


图4 ZGX4 的生长情况与产氢能力

Fig.4 The cell growth and H₂-producing ability of wild parent ZGX4 in batch fermentation

3 结语

利用人工诱变野生产氢细菌 *Ethanoligenens* sp. ZGX4, 得到一株稳定高效产氢突变体, 命名为 RF-9, 表明紫外线和亚硝酸复合诱变的方法在筛选厌氧产氢突变体的研究中是可行的。在温度 37°C、初始 pH 6.0、磷酸盐浓度 120mmol/L 和葡萄糖浓度 10g/L 的静态培养条件下, RF-9 的单位体积产氢量和氢气产率分别为 139.7mmol/L 和 2.52mmolH₂/mol 葡萄糖, 分别为对照菌株 ZGX4 产氢能力(93.7mmol/L)和氢气产率(1.76mmolH₂/mol 葡萄糖)的 1.50 倍和 1.43 倍。无论是从产氢能力还是氢气产率来分析, 突变菌

株 RF-9 都是一株具有应用价值的突变株, 它的液相末端产物是乙醇和乙酸, 而且乙醇的比例高于乙酸, 这将为乙醇型发酵产氢细菌的代谢途径的研究提供物质材料, 也为将来的菌种投加强化混合反应系统的产氢能力提供菌种资源。

参考文献：

- [1] Ren Nanqi, Chen Xiaolei, Zhao Dan. Control of fermentation types in continuous-flow acidogenic reactors: effects of pH and redox potential [J]. Journal of Harbin Institute of Technology [J]. 2001, 8(2): 116-119.
- [2] Li Jianzheng, Ren Nanqi, Qin Zhi, et al. Rapid start-up of acidogenic reactor and acclimatization of dominant ethanol-type fermentation population [J]. Journal of Harbin Institute of

- Technology, 2002,34(5):591-594.
- [3] 李永峰,任南琪,杨传平,等.一株高效产氢产酸细菌的鉴定与产氢特性 [J]. 中国环境科学,2005,25(2):210-213.
- [4] Chen W M, Tseng Z J, Lee K S H, *et al.* Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2005(3):1063-1070.
- [5] Nakashimada Y, Rachman M A, Kakizono T, *et al.* Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states [J]. Int. J. Hydrogen Energy, 2002,27(11):1399-1405.
- [6] Lee Y J, Miyahara T, Noike T. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation [J]. Bioresour. Technol., 2001,80(3):227-231.
- [7] Fang H H, Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture [J]. Bioresour. Technol., 2002,82(1):87-93.
- [8] Winkelman J W, Clark D. Proton suicide: general method for direct selection of sugar transport and fermentation defective mutants [J]. J. Bacteriol., 1984,160(2):687-690.
- [9] Pablo H C, Mendez B S. Direct selection of *Clostridium acetobutylicum* fermentation mutants by a proton suicide method [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990,56(2):578-580.
- [10] Rogers P, Palosaari N. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and alter quantities of solvents [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1987,53(12):2761-2766.
- [11] Clark D, Cronan J E Jr. Acetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of *Escherichia coli* [J]. J. Bacteriol., 1980,144(1):179-184.
- [12] Mat-Jan F, Kiswar Y A, Clark D. Mutants of *E. coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase [J]. J. Bacteriol., 1989, 171(1):342-348.
- [13] Hungate R E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes [A]. Methods in microbiology (volume 2) [C]. New York: Academic Press, 1969.117-132.
- [14] 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.
- [15] 李永峰.发酵产氢新菌种及纯培养生物制氢工艺研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 2005.
- [16] Lin C-Y, Lay C H. Effects of carbonate and phosphate concentrates on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora [J]. Int. J. of Hydrogen Energy, 2004,29(3):275-281.
- 作者简介:郑国香(1972-),女,黑龙江省大庆市人,工程师,哈尔滨工业大学市政环境工程学院博士研究生,主要研究方向为废水处理及生物技术.发表论文 11 篇.

重新认识早期地球大气组成

长期以来公认的 2 个关于地球早期大气组成的理论可能都会受到质疑.根据研究人员发布的最新报告(Nature, 2006,442,908)认为早期地球大气可能已存在较高浓度的氧,也就是说,现在地球大气层中的氧并非完全来自生物进化和光合作用.此外,上次冰河时代甲烷浓度上升也不一定是由于海底甲烷水合物的突然喷发,而可能由植物和湿地产生(Science, 2006,313,1109).科学家们曾经相信直到 24 亿年以前地球大气中不存在明显数量的氧.现在,美国宾夕法尼亚州立大学的地球化学教授 Hiroshi Ohmoto 和他的同事在研究了有 27~29 亿年历史的古老岩石中的硫同位素以后,指出这些岩石和比它年轻的岩石相似,而后者是在富含氧气的大气中生成的.关于甲烷,大家都知道地球大气中的甲烷水平在上次冰河时代后期是一直稳定上升的,这使得地球气候变暖.而在 Corvallis 的俄勒冈州立大学的 Hinrich Schaefer 和他的同事发现,从冰核中来的甲烷碳同位素信息表明甲烷气体很可能是由热带湿地和植物稳定释放出来的.

江 英 摘自《Chemical & Engineering News》, August 28, 29(2006)