

分子生物学技术在厌氧发酵产氢中的应用

An Application of Molecular Biotechnologies to Anaerobic Fermentation for Hydrogen Production

肖本益* (东莞宝丽美化工有限公司, 东莞 523581)

Xiao Benyi* (Dongguan Proamine Chemicals Co. Ltd., Dongguan 523581)

刘俊新 (中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

Liu Junxin (Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

林佳侃 (东莞宝丽美化工有限公司, 东莞 523581)

Lin Jikan (Dongguan Proamine Chemicals Co. Ltd., Dongguan 523581)

摘要 厌氧发酵产氢是目前制氢方法中的 1 个研究热点。文章综述了对分子生物学技术(电泳、核酸分子杂交、多聚酶链式反应、DNA 序列测定、基因重组等技术)在厌氧发酵产氢中的应用技术。分析表明,以 DNA 序列和相关结构基因为基础的分子生物学技术已逐渐开始应用于厌氧发酵产氢中,随着应用力度的加大,必将对厌氧发酵产氢的实际应用和工业化生产起重大的推动作用。

关键词: 分子生物学 厌氧发酵 产氢 应用

Abstract Anaerobic fermentation is a focus topic in the hydrogen production methods. An application of molecular biotechnologies such as electrophoresis, nucleic acid hybridisation, polymerase chain reaction (PCR), DNA sequence analysis and gene recombination to the anaerobic fermentation for hydrogen production was systemically reviewed. The analyses showed that the molecular biotechnologies based on DNA sequence and correlative structure gene have gradually been applied in the anaerobic fermentation for hydrogen production and will play an important role in its application industrialization.

Key words: Molecular biotechnology Anaerobic fermentation Hydrogen production Application

1 引言

氢气作为 1 种清洁无污染的能源,正日益受到人们的重视,氢能源的开发和利用已成为人们关注的 1 个焦点。与传统的制氢方法相比,厌氧发酵产氢因其具有环境友好、能耗低及其有效地有机废弃物处理与资源化等优点,而成为目前 1 个研究热点。然而,厌氧发酵产氢目前仍处于实验室研究阶段,虽然在国内任南琪等^[1]已成功地进行了中试,但目前还没有关于工业化的报告。厌氧发酵产氢分为纯菌发酵和混合菌发酵 2 种。混合菌发酵(如采用活性污泥作为产氢菌来源)由于其操作简单、方便,在运行过程中易于操作和管理,提高了厌氧发酵产氢技术工业化的可行性,且氢产

率较高,而成为目前研究中主要应用的 1 种方法。在混合菌厌氧发酵产氢技术中,混合菌群具协同和制约的复杂生态学效应,故对系统内微生物群落结构、功能和动态过程进行快速检测和预测,有利于实现系统快速启动和稳定运行、提高系统的产氢效能,并对厌氧发酵产氢的工业化生产具有十分重要的现实意义。传统的纯培养分离技术在研究混合菌发酵时存在着很多天然的缺陷和不足,例如不能充分提示反应器中微生物的实时信息,难以获得微生物群落结构与空间分布等有

第一作者肖本益,男,1976 年生,1998 年毕业于南昌大学,博士。该文作者还有曲久辉。

*通讯联系人, xybi7683@126.com

1) <http://www.ocn.com.cn/free/2006ny103.htm>

关信息。而分子生物学技术[如多聚酶链式反应(PCR)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、荧光原位杂交(FISH)等]的开发和应用,为达到以上目的提供了可能。此外,采用重组脱氧核糖核酸(DNA)技术构建基因工程菌对于培育优良产氢功能菌群、提高发酵产氢效率、节省成本和工业化生产等方面均具有重要意义。但是,目前没有关于分子生物学技术在厌氧发酵产氢方面应用的综述性文献,随着厌氧发酵产氢技术的进一步发展,有必要对厌氧发酵产氢中应用的分子生物学技术进行分析和总结,以便为后来者提供一些帮忙,避免犯类似的错误。

2 电泳技术

带电荷的物质在电场中的趋向运动称为电泳。1937年首创纸电泳技术后,电泳的种类和应用在深度和广度两方面均发展迅速,已成为分子生物学技术中分离生物大分子的重要手段。其中凝胶电泳由于其操作简单、快速、灵敏等优点,成为分离、鉴定和提纯核酸的首选标准方法^[1]。除我们熟知的琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法外,还有一些通过特殊的电泳分离技术而建立的分子标记。如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE),单链构象多态性(SSCP)等,通过实施一些变性条件来改变DNA(脱氧核糖核酸)双螺旋结构(如添加线性梯度的变性剂或建立变性温度梯度等),由于序列不同的DNA片段,其部分解链程度也不同,不同的结构对DNA在凝胶中迁移速率影响很大,结果不同序列的DNA片段在凝胶上得以高分辨率的分离。

变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis,简称DGGE)是目前研究微生物群落遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术。DGGE的基本原理是:在碱基序列上存在差异的不同DNA双链解链时,需要不同的变性剂浓度,DNA双链一旦解链,其在凝胶中的电泳速度将会急剧下降。DNA样品中核酸序列的不同,其在电泳胶中的移动速度也有所不同,这使得部分变性的DNA会在相同时间内,在胶体上跑出不同的距离,形成分离的条带。由于凝胶中变性剂呈梯度分布,变性DNA分子会留在其相应的不同变性剂梯度位置,形成分离的条带,每一条带都代表1个不同的微生物种群,仅分析条带就能得到有用的信息。与普通凝胶电泳相比,DGGE技术具有更高的准确性和精确度,能够将分子大小相同,但碱基顺序不同的DNA分子进行分离,且快速、灵

敏,可以直接用来分析细菌染色体基因。

1993年,Muyzer^[2]首次将该技术应用于微生物生态的研究之后,迅速被广泛应用于各种环境微生物生态的研究,如生物膜、活性污泥、土壤、沙丘、根际、热泉、湖泊和海洋等。目前,国内外已开始将DGGE应用于研究厌氧发酵产氢过程中微生物群落多样性,Ueno等^[3]应用DGGE研究了静态试验中活性污泥经过人工富集培养后的产氢微生物多样性,Fang等^[4]应用DGGE研究了产氢颗粒污泥的微生物组成,邢德峰等^[5]应用双梯度-DGGE对生物制氢反应器微生物种群的动态变化及多样性进行监测,并应用DGGE对连续流制氢反应器CSTR运行过程中微生物群落结构和演替进行了监测。另外,Fang等^[4]应用DGGE技术对产氢菌的核糖体核糖核酸(16S rRNA)进行研究,已获得了一些有关此类微生物重要的遗传学和分类学上的信息,并在此基础上开展了探针合成的研究工作。

然而,DGGE作为1种分子生物技术,除了多数分子技术固有的缺点之外,还有一些自身很难克服的缺点。如DGGE最多能分离1 kb的DNA片段,故这些序列只能提供有限的系统发育信息。如果选用的条件不是特别适宜,不能保证可以将有一定序列差异的DNA片段完全分开,从而会出现序列不同的DNA迁移到胶的同一位置^[6]。Muyzer^[2]的研究表明,只有占整个群落细菌总数1%左右的种群能够通过DGGE检测到。为了克服以上不足,要对电泳进行优化,并与其它技术方法结合,从而更客观地从不同方面反映系统中微生物多样性。

3 核酸分子杂交技术

核酸分子杂交技术是1种20世纪70年代发展起来的、最常用的分子生物学技术之一,它是基于DNA分子碱基互补配对的原理,用特异性的cDNA(互补脱氧核糖核酸)探针与待测样品的DNA或RNA形成杂交分子的技术^[1]。由于核酸分子杂交的高度特异性及检测方法的高度灵敏性,使得核酸分子杂交技术被广泛应用于基因克隆、菌种筛选和酶切图谱制作、基因组中特定基因序列的定量和定性测定、微生物的检测和定性、定量分析微生物的存在、分布、丰度及适应性等方面。根据所用的探针和靶核酸的不同,杂交可分为DNA-DNA杂交,DNA-RNA(核糖核酸)杂交,RNA-RNA杂交3类。被标记(放射性或非放射性的)的探针以原位杂交、膜上印迹杂交、斑点印迹和狭缝印迹杂交等不同方法,可直接用来探测溶液中、细胞组织

内或固定在膜上的同源核酸序列。不需要进行 RNA 提取的荧光原位杂交法是目前常用的方法。

荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization, 简称 FISH)的基本原理是通过荧光标记的探针在细胞内与特异的互补核酸序列杂交,通过激发杂交探针的荧光来检测信号,从而对未知的核酸序列进行检测^[1]。FISH 克服了同位素标记的一些缺点,可以在 1 个样品上同时标记几种探针,而且操作相对简单,探针标记后稳定,可以直接在荧光显微镜下观察。探测的灵敏度可达到 10~20 个 mRNA 拷贝/细胞。这种技术能有效对环境微生物样品进行定量。Zhang 等^[7]采用 FISH 技术分析了废水中淀粉的高温厌氧发酵产氢时厌氧污泥中微生物的结构。在分析过程中,采用了 2 种寡核苷酸探针:在 5' 末端带有 6-羧基-荧光素(FAM)标记的真细菌通用靶探针 EUB 338(1 种基因片段)和在 5' 末端带有 Cy3 标记(1 种染料标记)的多数 *C. histolyticum* 适用靶探针 Chis150。结果表明,在中温种泥和高温淀粉降解污泥中都含有丰富的真细菌,但高温淀粉降解种泥中缺少中温种泥中含量丰富的 *C. histolyticum*。Syutsudo 等^[8]研究了 UASB(上流式厌氧污泥床)反应器中高温颗粒污泥的厌氧微生物随着底物变化的种群动态变化规律,认为 FISH 技术能揭示更多厌氧细菌微生物学方面的信息及它们种群结构,有利于提高、改进生物系统的工艺。FISH 技术检测的精确性和可靠性都依赖于寡核苷酸探针的特异性,因此探针的设计和评价十分重要^[9],而且针对某种群微生物设计的探针并不一定能特异地代表该种类微生物。微生物的结构,如细胞壁会影响探针的渗透力,可能会导致杂交信号强度降低,从而造成假阴性。另外,当细胞呈现不规则形状或形成链状和紧密的群体时,微生物的定量可能会很困难。因此,针对不同情况,应选择合适的探针、荧光标记,提高杂交效果,尽量避免 FISH 的这些不足。

4 多聚酶链式反应技术(PCR)

多聚酶链式反应技术(Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR)是 Mullis 等发明的 1 种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法,是利用针对目的基因所设计的一对特异性寡核苷酸引物,以目的基因为模板进行的 DNA 体外合成反应的技术^[1]。此技术的目的是将 DNA 片段经过若干次解链和复性循环,大量扩增,以便对已知 DNA 片段进行分析,如基因分析、序列分析、进化关系分析等。PCR 扩增产物可通过琼脂糖凝

胶电泳来检验和纯化,也可以被用来克隆、转化和测序。在具体应用中往往采用经过修正的或与其它技术联合应用的 PCR 衍生技术,如竞争 PCR(C-PCR)、PCR-限制性片段长度多态性技术(RFLP)、PCR-DGGE、PCR-SSCP、PCR-随机扩增多态性技术(RAPD)等等。其中用 RAPD 技术分析所得到的基因组指纹图谱,已被用于研究中试规模的反应器中微生物在一段时间内种群结构的变化情况。邢德峰等^[10]从制氢反应器中取得厌氧产氢污泥,并通过细胞裂解直接提取其基因组 DNA,以细菌 16S rDNA 基因通用引物 F338GC/R534 进行 V3 高变异区域 PCR 扩增,得到长约 200 bp 的 PCR 产物,然后采用其它分子生物学技术(如 DGGE)分析了制氢反应器中微生物的多样性。Shin 等^[11]采用引物 EUB 357f(1 种基因片段)(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和带鸟嘌呤-胞嘧啶(GC)夹板(GC clamp)的 UNIV518r(一种基因片段)(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),对 16S rDNA 进行 PCR 扩增,然后通过 DGGE 分析了 pH 值变化对餐厨垃圾厌氧发酵过程中产氢微生物的影响。

当然,PCR 技术也存在着一些问题^[12]。当不相关的核酸分子中有非常相似的序列时,PCR 很可能给出假阳性的结果。由于 PCR 技术灵敏度非常高,试剂、实验设备等可能会造成污染,操作过程要十分小心。要得到较好的 PCR 的重复性,试剂的选择十分重要。另外,PCR 在样品处理、DNA 提取、引物选择、核酸扩增等一系列过程中存在的误差。所有这些问题都应该在实际试验过程中,不断摸索,找到适合于自己实验室的解决方法。

5 DNA 序列测定技术

DNA 序列测定技术是在高分辨率变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的基础上发展起来的 1 种技术,是区分个体间遗传差异及揭示 DNA 多样性的最彻底的 1 种方法^[1]。随着荧光标记核酸自动测序仪的普遍使用和分子信息学的发展,目前已有许多功能基因及特定 DNA 序列数据库软件可供序列比较,从而使 DNA 序列测定技术可以揭示更高水平多态性。DNA 序列测定技术主要测定 16S rDNA 序列、ERIC 序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence, 肠细菌基因间共有重复序列)或 ITS 序列(16S-23S rDNA Intergenic Transcribed Sequences, 核糖体大小亚基基因间隔序列)等。如 RISA 法(Ribosomal Inter-genic Spacer Analysis, 核糖体基

因间隔序列分析方法)就是以 ITS 为研究对象、利用细菌群落概览图谱间的相似度对生态系统的空间异质程度进行定量分析的^[13]。

16S rDNA 为原核生物核糖体中 1 种核糖体 DNA,大小约 1.5 kb 左右,其种类少,含量大(约占细菌 RNA 含量的 80%),存在于所有的生物中,在结构与功能上具有高度的保守性,素有“细菌化石”之称^[14]。16S rDNA 既能体现不同菌属之间的差异,又能利用测序技术来较容易地得到其序列,故被细菌学家及分类学家所接受。目前,16S rRNA 基因序列分析已广泛应用于微生物多样性的研究^[15]。邢德峰等^[16]采用 16S rDNA 和 16S-23S rDNA ITS 序列同源性分析,结合形态学特征和生理生化指标等,对 1 种新的高效产氢菌进行了分离鉴定。结果表明,该株细菌与最相近的种属 *C. cellulosi* 和 *Acetanaerobacterium elongatum* 等的 16S rDNA 基因序列同源性为 94% 以下,16S-23S rDNA 间隔区基因序列比对分析显示保守区域仅为 tDNA-A1a(调动脱氧核糖核酸-丙氨酸)和 tDNA-Ile(调动脱氧核糖核酸-异亮氨酸)序列,其它可变部位没有同源性区域,该株细菌为新属 *Ethanologenbacterium* sp. Wang 等^[17]自污泥中分离得到 1 株产氢菌,通过 PCR 和 16S rDNA 序列分析鉴定,发现该株菌为 *C. bifermentans*。Oh 等^[13]利用 RISA 方法分析了膜生物产氢反应器中微生物种类随时间的变化,发现在过程中增加的产氢菌属于 *Clostridium* sp. 和 *Flexibacteraceae* sp.,并分析了产氢变化与反应器中微生物变化之间的关系。另外, DNA 序列分析也可用于氢酶的分析^[18]。

6 基因重组技术

利用 DNA 体外重组或扩增技术从供体生物基因组中分离所需基因或 DNA 片段,或经人工合成的方法获得基因,然后经一系列切割,加工修饰,连接反应产生重组 DNA 分子,再将其转入适当的受体细胞,以期获得基因表达的过程,称为基因重组。在厌氧发酵产氢的研究中,可通过此技术构建出各种高效产氢菌,用于提高底物的氢产率、微生物产氢速率和扩大可利用底物的范围。Woodward^[19]应用商业酶使戊糖磷酸盐循环与氢酶产氢过程相耦合,使产氢达到 11.6mol/mol 葡萄糖,充分展示了人工构建代谢途径对于产氢的巨大潜力。但是这一方法目前还只能在体外进行,成本相当高。目前已知的发酵制氢的产氢途径包括甲酸途径、丙酮酸途径和 NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)途径

等,其中 NADH 途径是最具开发潜力的方向。基因重组的核心问题是如何将细胞代谢过程中产生大量 NADH,通过代谢途径的导向直接为氢酶提供还原力进行产氢。另外,通过基因重组技术构建新的产氢微生物、对产氢过程关键酶-氢酶的改造、在目标菌株中表达降解不同生物体高分子的酶,扩大可利用底物的范围,将会是改变厌氧发酵产氢低转化率和工业化生产进展缓慢的重要突破口^[20]。

在厌氧发酵产氢过程中仅靠分离和筛选功能性产氢微生物是不够的,在混合微生物体系中筛选特定产氢微生物时,往往不达到预期的结果,而且特定的产氢微生物可能难以培养,从而无法应用于实际中。因此,有必要通过基因重组技术,根据具体的需要构建有效的基因工程菌。中国科技大学¹⁾利用等离子辐射、电穿孔和分子生物学技术,通过诱变和选育,得到了高效产氢菌种,对其进行了优化及代谢功能和活性表达的研究,并通过基因工程技术对优势产氢菌种进行改造,得到了产氢效率更高、可利用底物范围更大、遗传性能稳定的新菌株。

7 应用前景

应用分子生物学技术,结合各个领域的研究成果,能够更准确地揭示厌氧发酵产氢微生物的种群结构及其动态变化规律,加速了对产氢反应器中微生物的种群结构和代谢过程了解,使反应器的调控更有依据和效率,并对全面揭示厌氧发酵产氢机理起重要作用。通过构建新的产氢微生物,可以提高厌氧发酵的转化率,加速厌氧发酵产氢的工业化进程。但这类技术还有其自身的缺点,如前所述的 PCR 的重复性问题、污染问题和核酸杂交技术的假阴性问题等。针对上述问题,应探索更加优化的实验条件、设计更具代表性的探针、结合其它实验手段,以便更好地发挥分子生物学手段在揭示厌氧发酵产氢反应机理、调控生物反应器和构建工程菌等方面的优势,从而加速厌氧发酵产氢的实际应用,推动其工业化。

8 参考文献

- 1 卢圣栋主编. 现代化分子生物学实验技术. 第二版,北京:中国协和医科大学出版社,1999,12.
- 2 Muyzer G, Waal E C, Uittlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

(下转第 274 页)

1) http://www5.ustc.edu.cn/zh_CN/article/7b/42f76d32/

表2 固定化微生物小球的耐久性随时间的变化

运行时间 (d)	物理特性					相对活性	降解有机物能力 (以COD _{Cr} 去除率表征,%)
	直径 (cm)	密度 (g/cm ³)	形状	颜色	硬度		
7	0.51	0.962	不规则球形	银白色	软	0.40	34.0
15	0.64	1.02	规则球形	灰白	很软	0.81	89.1
30	0.54	1.155	规则球形	暗灰	稍硬	0.85	87.3
60	0.53	1.102	规则球形	暗灰	硬度更强	0.87	85.2
180	0.50	1.110	规则球形	暗灰	较硬	0.81	79.8
365	0.46	1.099	规则球形	暗灰	较硬	0.86	83.8

4 结论

实验表明,包埋固定化微生物小球在反应器中运行时,其物理特性、微生物活性、降解能力及载体本身都要有一定程度的变化,对这些特性的探讨不但能为研究固定化后微生物微观特性打下基础,同时能为工程应用提供理论指导。

5 参考文献

1 王宝贞. 水污染控制工程. 北京:高等教育出版社,1991.
2 王建龙.生物固定化技术与水污染控制. 北京:科学出版社,2002.
3 沈耀良. 固定化微生物污水处理技术. 北京:化学工业出版社,2002.

责任编辑 唐东雄 (收到修改稿日期:2007-06-18)

(上接第 270 页)

reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1993,59(3):695~700.
3 Ueno Y, Haruta S, Ishii M, et al. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing mciroflora enriched from sludge compost. Appl Microbiol Biotechnol, 2001,57:555~562.
4 Fang H H P, Liu H, Zhang T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. Biotechnol Bioeng, 2002,78:44~52.
5 邢德峰,任南琪,宋业颖,等. DG-DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性. 生态学报, 2005,25(7):1818~1823.
6 Vallaey T, Topp E, Muyzer G, et al . Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. FEMS Microbiol Ecol, 1997,24:279~285.
7 Zhang T, Liu H, Fang H H P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. J Environmental Management, 2003,69:149~156.
8 Syutsubo K, Sinthurat N, Ohashi A, et al . Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change. Wat. Sci. Technol., 2001,43(1):59~66.
9 邢德峰,任南琪,王爱杰. FISH技术在微生物生态学中的研究及进展. 微生物学通报, 2003,30(6):114~119.
10 邢德峰,任南琪,宫曼丽. PCR-DGGE技术解析生物制氢反应器微生物多样性. 环境科学, 2005,26(2):172~176.

11 Shin H S, Youn J H. Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. Biodegradation, 2005,16:33~44.
12 李 凤,刘世贵. 分子生物学技术在环境微生物研究中的应用. 世界科技研究与发展, 2003,25(4):88~92.
13 Oh S E, Iyer P, Bruns MA, et al. Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. Biotech Bioeng, 2004,87(1):695~700.
14 焦振泉. 16S rRNA 序列同源性分析与细菌系统分类鉴定. 国外医学卫生学分册, 1998,25(1):12~16.
15 卢莉琼,徐亚同,梁 俊. 分子生物学方法在微生物多样性及微生物生态研究中的应用. 应用与环境生物学报, 2004,10(6):826~830.
16 邢德峰,任南琪,李秋波. 高效产氢细菌新种——*Ethanolobacterium* sp. X21的分离鉴定及其产氢效能. 微生物学报, 2004,44(6):724~727.
17 Wang C C, Chang C W, Chu C P, et al. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. J Biotechnol, 2003,102:83~92.
18 Rákhely G, Zhou Z H, Adams M W W, et al. Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. Eur J Biochem, 1999,266: 1~9.
19 Woodward J, Orr M, Cordray K, et al. Enzymatic production of biohydrogen. Nature, 2000,405:1014~1015.
20 邢新会,张 冲. 发酵生物制氢研究进展. 生物加工过程, 2005,3(1):1~8.

责任编辑 钟月华 (收到修改稿日期:2007-05-16)