

C/N 比对嗜酸细菌 X-29 产氢能力及其酶活性的影响

李秋波¹, 邢德峰¹, 任南琪^{1*}, 赵丽华², 宋业颖³

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080; 3. 哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150080)

摘要: C/N 比影响细菌的物质和能量代谢, 为了提高产氢细菌的产氢效能, 通过间歇产氢实验和酶活性分析方法, 分析了在不同 C/N 比下嗜酸产氢细菌 X-29 的产氢能力以及氢化酶和乙醇脱氢酶的活性表达情况. 研究表明, C/N 比对产氢细菌的代谢及其相关酶的表达有显著的影响. 虽然在不同 C/N 比下单位生物量的液相末端发酵产物差异不大, 但是产氢能力存在显著的差异, 当 C/N 比为 14 时产氢细菌 X-29 具有最大累积产氢量 2 210.9 mL/g. 在不同 C/N 比下氢化酶的表达活性不同, 氢化酶活性随着发酵的进行达到高峰后迅速降低, 氢化酶的表达周期较短. 乙醇脱氢酶活性随着代谢进程逐渐升高后而趋于平稳, 不同 C/N 比时表达活性差异较小, 表达周期较长. 在 C/N 比为 14 时, 氢化酶和乙醇脱氢酶的活性最高, 分别为 $2.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ 和 $33.2 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$.

关键词: C/N 比; 产氢细菌; 氢化酶; 乙醇脱氢酶; 酶活性

中图分类号: X382 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)04-0810-05

Hydrogen Production and Enzyme Activity of Acidophilic Strain X-29 at Different C/N Ratio

LI Qiubo¹, XING Defeng¹, REN Nanqi¹, ZHAO Lihua², SONG Yeying³

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 3. College of Life and Environmental Science, Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

Abstract: Some fermentative bacteria can produce hydrogen by utilizing carbohydrate and other kinds of organic compounds as substrates. Hydrogen production was also determined by both the limiting of growth and related enzyme activity in energy metabolism. Carbon and nitrogen are needed for the growth and metabolism of microorganisms. In addition, the carbon/nitrogen (C/N) ratio can influence the material metabolized and the energy produced. In order to improve the hydrogen production efficiency of the bacteria, we analyzed the effect of different C/N ratios on hydrogen production and the related enzyme activities in the acidophilic strain X-29 using batch test. The results indicate that the differences in the metabolism level and enzyme activity are obvious at different C/N ratios. Although the difference in liquid fermentative products produced per unit of biomass is not obvious, hydrogen production is enhanced at a specifically determined ratio. At a C/N ratio of 14 the accumulative hydrogen yield of strain X-29 reaches the maximum, 2 210.9 mL/g. At different C/N ratios, the expression of hydrogenase activity vary; the activity of hydrogenase decrease quickly after reaching a maximum along with the fermentation process, but the time of expression is short. The activity of alcohol dehydrogenase (ADH) tend to stabilize after reaching a peak along with the fermentation process, the difference in expression activity is little, and the expression period is long at different C/N ratios. At a C/N ratio of 14 hydrogenase and ADH reach the maximum $2.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ and $33.2 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$, respectively. It is shown that the C/N ratio has an important effect on enhancing hydrogen production and enzyme activity.

Key words: C/N ratio; hydrogen producing bacteria; hydrogenase; alcohol dehydrogenase; enzyme activity

生物制氢以其环境友好性成为世界各国普遍关注的一种新兴能源生产技术^[1~5], 其中发酵法生物制氢以产氢稳定、无需光照以及对生产条件要求低等优点^[6,7]显示出广泛的应用前景. 为早日实现工业化, 提高产氢效率、降低生产成本是目前生物制氢所面临的关键问题^[8]. 在生物制氢系统中微生物是产氢的主体. 系统中产氢细菌的数量直接影响着产氢效率, 但是产氢细菌的生长状况和代谢水平也会决定系统的处理效果和产氢能力.

微生物的生长和代谢离不开碳和氮这 2 种重要的营养元素, 两者在量上的比例关系为碳氮比 (C/N)^[9]. C/N 比影响微生物的生长、代谢途径、代

收稿日期: 2005-04-07; 修订日期: 2005-05-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (G2000026402); 国家杰出青年科学基金项目 (50125823); 国家自然科学基金项目 (30470054); 黑龙江省自然科学基金攻关课题 (GZ03C314)

作者简介: 李秋波 (1980~), 女, 硕士研究生, 主要从事环境生物技术和微生物分子生态学研究, E-mail: liqiubo.cn@163.com

* 通讯联系人, E-mail: rnq@hit.edu.cn

谢产物的积累、基因表达以及酶活性水平等等。毛连山等^[10]研究了碳氮比对里氏木霉合成木聚糖酶的影响,吴光学等^[11]研究了碳源和氮源对紫色非硫光合细菌积累 PHB 的影响,王勇等^[12]研究了 C/N 比对厌氧活性污泥产氢发酵类型和产氢能力的影响。然而, C/N 比对产氢细菌的生长、产氢能力及其相关酶活性表达的影响还不是十分清楚,鲜见报道。合理利用碳源和氮源,在实现碳源和氮源最高利用率的同时提高细菌产氢效能,这是降低生物产氢成本的有利途径之一。本文利用嗜酸产氢细菌 X-29 作为出发菌株,研究了 C/N 比对其产氢能力的影响,分析了与物质代谢相关的乙醇脱氢酶以及与能量代谢相关的氢化酶表达情况,确立了最佳 C/N 比,为反应器的快速启动和实际工程运行提供指导。

1 材料与方法

1.1 菌株

嗜酸产氢细菌 X-29 (*Ethanoligenens harbinense*) 为本实验室所保存,从厌氧活性污泥中分离得到。

1.2 实验方法

1.2.1 间歇产氢实验

采用改进的 Hungate 方法进行厌氧操作培养。挑取菌株 X-29 的单菌落,振荡培养活化,当菌体处于对数生长期时以 1:20 的比例接种到不同 C/N 比的培养基中,在间歇实验装置上进行厌氧发酵产氢实验,35℃条件下 130r/min 振荡培养。培养基组分:蛋白胨 4g/L,牛肉膏 2g/L,酵母粉 1g/L,NaCl 4g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L, L-半胱氨酸 0.5g/L,刃天青 (0.2%) 1~2mL/L^[13]。以葡萄糖为碳源,调整碳源浓度使 C/N 比值分别为 7、8.4、11.2、14、16.8、21、28。

1.2.2 碳氮浓度的测定

总碳(TC)测定采用日本岛津公司的总有机碳测定仪 TOC-V_{CN}(Total Organic Carbon Analyzer)。总氮(TN)测定采用文献[14]中的测定方法。

1.2.3 发酵产物的分析

挥发酸和醇类测定:GC122 型气相色谱仪,不锈钢柱,柱长 2m,担体 GCX103,60~80 目,氢火焰检测器,氮气作载气,流速 50mL/min,氢气流速 50mL/min,空气流速 500mL/min。取 1mL 培养液,加入 6mol/L HCl 溶液,在 5000 r/min 下离心 15min,取上清液 2μL 进样。

氢气和二氧化碳测定:SC-II 型气相色谱仪,热导池检测器,不锈钢柱,柱长 2m,担体 TDS-01,60~80 目,氮气作载气,流速 70mL/min,室温下测定,进样量 500μL。

1.2.4 菌体生物量的测定

发酵结束后,将发酵液在 4000r/min 下离心收集菌体,80℃下烘干至恒重,称重。

1.2.5 酶活性分析

粗酶液的提取:在不同 C/N 比下的发酵实验结束后,将发酵液在 5000r/min 4℃条件下离心 10min 收集菌体,用 67mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.9,其中包含 1% NaCl)清洗 2 遍,再用含 50mmol/L 连二亚硫酸钠、50mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2mmol/L $MgCl_2$ 和 1mmol/L DTT 的缓冲液重悬,向悬浮液中加入 1mmol/L PMSF(体积分数),超声波破碎细胞,在 13000r/min 4℃条件下离心 20min,收集上清液作为粗酶液。在厌氧环境中完成全部操作过程。

氢化酶染色液包括 5mmol/L 甲基紫精和 5mmol/L 连二亚硫酸钠,在混合气(90% N_2 +10% H_2)中染色,25℃显色 30min,甲基紫精被还原后,加入 1mg/mL 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑固定。乙醇脱氢酶染色方法参照文献[15]。利用气相色谱测定氢气和乙醇转化率。蛋白质浓度测定用 Bradford 法^[16]。用 Junelles^[17]和 Ueno^[18]等报道的方法进行酶比活性的测定。

2 结果与分析

2.1 C/N 比对 X-29 生长和产氢能力的影响

以葡萄糖为唯一碳源,在不同 C/N 比下进行菌株 X-29 的产氢发酵实验。在发酵过程中定时测定总产气量、氢气含量,发酵结束后测定菌体生长量、TOC、发酵液 pH 值和液相发酵产物浓度等。在不同 C/N 比条件下嗜酸产氢细菌 X-29 的生长量存在差异,从图 1 可以看出,生长量随着 C/N 比的提高先增加然后减少。随着 C/N 比的提高(7~14),每 g 干细胞嗜酸产氢细菌 X-29 的累积产氢量随之增加,从 1515.9mL/g 增加到 2210.9mL/g。C/N 比为 14 时,嗜酸产氢细菌 X-29 获得了最大生长量 0.828g/L。C/N 比继续提高时(16.8~28),累积产氢量最低降至 1973.5mL/g。C/N 比为 14 时产氢细菌 X-29 获得了单位细菌最大累积产氢量 2210.9mL/g(图 1),此时虽然细菌的生物量达到了最大,但是其单位细胞的产氢能力也是最大,可见其产氢量的提高不仅仅是生物量提高的结果,而是由细菌产氢活性决

定的。

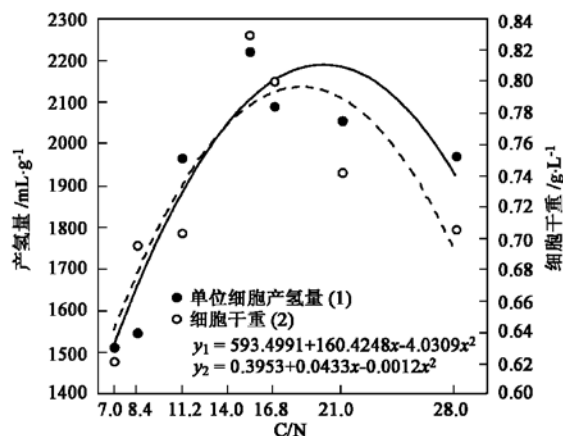


图1 不同 C/N 比下 X-29 生长量和单位细胞产氢量

Fig. 1 Biomass and hydrogen production per cell of strain X-29 at different C/N ratio

每 L 培养基嗜酸产氢细菌 X-29 的累积产氢量随时间的变化情况如图 2 所示, 0~8h 细菌氢气产量较少; 8~20h 细菌氢气产量迅速增加; 20h 以后细菌氢气产量增加缓慢。其中 C/N 比为 14 时, 氢气的产生速率要高于其它 C/N 比的产生速率。

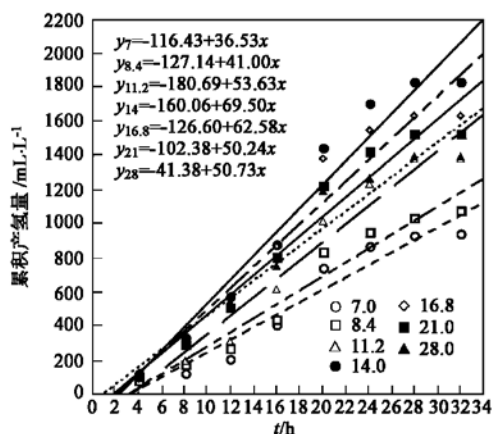


图2 不同 C/N 比下 X-29 累积产氢量

Fig. 2 Cumulative hydrogen yield of strain X-29 at different C/N ratio

随着 C/N 比的提高, 嗜酸产氢细菌 X-29 的累积产氢量先增加后减少。这是由于当 C/N 比较低时, 碳源底物浓度没有使与发酵产氢相关的酶达到饱和状态, 代谢速率随着底物浓度的增大而提高。由于此细胞迅速生长, 产能代谢过程中的能量和中间发酵产物主要用于自身的合成代谢, 所以细菌不能很好地释放能量物质。当 C/N 比较高时, 与发酵产氢相关的酶代谢速率在达到最大后, 产氢细菌因氮

源底物不足而生长缓慢, 对有机物质的生物氧化也随之减弱, 细菌不能释放出能量物质产氢, 所以当 C/N 比大于 14 时, 产氢细菌 X-29 的累积产氢量存在下降趋势。以上的过程说明当 C/N 比发生改变时, 代谢底物的浓度和代谢产物对产氢相关酶的活性有影响, 从而导致产氢细菌 X-29 的生长和代谢情况发生了改变。

2.2 C/N 比对 X-29 液相发酵产物的影响

C/N 比影响微生物的代谢速率和发酵产物的积累。微生物在以葡萄糖为碳源进行厌氧发酵产氢过程中, 产生大量挥发酸, 从而形成不同的发酵类型。嗜酸产氢细菌 X-29 在利用葡萄糖发酵后, 液相末端发酵产物主要为乙醇和乙酸。图 3 显示了在不同 C/N 比条件下嗜酸产氢细菌 X-29 的液相末端发酵产物。乙醇和乙酸的含量占液相末端发酵产物总量的 89% 以上, 乙醇含量与乙酸含量的比值在 0.97~1.30 之间变化。发酵产物取决于细菌的生长量和代谢活性, 菌株 X-29 在不同 C/N 比时液相发酵产物的变化规律与生长量、累积产氢量的变化规律一致, 都是先增加后减少。C/N 比小于 14 时, 微生物的生长量和代谢活性处于不断上升阶段; C/N 比为 14 时, 液相末端发酵产物总量最大, 乙醇含量最高, 生长量和代谢活性也分别达到了最大; C/N 比大于 14 时, 微生物的生长和代谢活性受到抑制, 液相末端发酵产物总量有所降低。

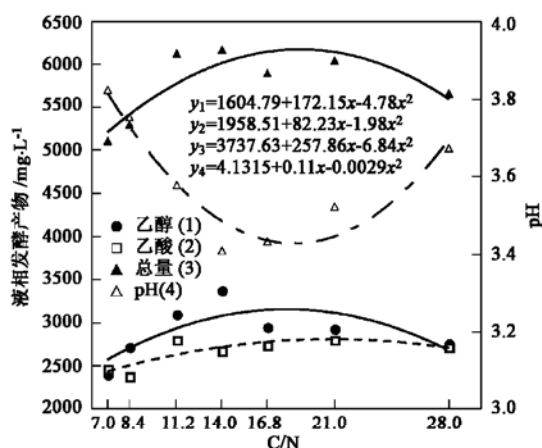


图3 不同 C/N 比下 X-29 液相发酵产物和 pH

Fig. 3 Liquid fermentation products and pH of strain X-29 at different C/N ratio

2.3 C/N 比对 pH 值的影响

菌株 X-29 在不同 C/N 比下产氢, 培养基的初始 pH 值为 6.5, 发酵结束后 pH 值各不相同。随着 C/N 比的提高, pH 值降低的幅度先由小到大, 再由

大到小. C/N 比为 14 时, pH 值下降的幅度最大, 降至 3.41 (图 3), 此时液相末端发酵产物的总量达到了最大值 5 109.8 mg/L. 这与液相发酵产物中挥发酸量越大, 发酵液 pH 值越低是一致的. 同时碳源的利用情况也表明, C/N 比为 14 时, 嗜酸产氢细菌 X-29 对碳源已不能完全利用, 利用率为 96.5% (图 4). 这可能是由于随着 C/N 比的提高, 碳源浓度增加, 底物浓度已经不再是微生物生长的限制因子, 而挥发酸类的大量产生逐渐使发酵液呈过酸状态, 较低的 pH 值逐渐抑制微生物的活性, 成为嗜酸产氢细菌 X-29 生长和产氢的限制因子.

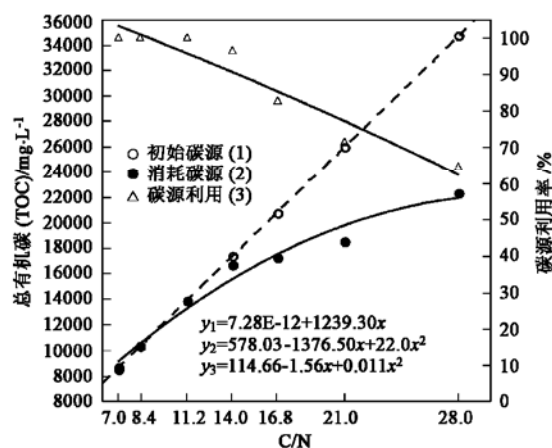


图 4 不同 C/N 比下总有机碳及其碳源利用率

Fig. 4 TOC and consuming rate of carbon resource of strain X-29 at different C/N ratio

2.4 C/N 比对酶表达活性的影响

氢化酶是能量代谢过程中氢释放的最后限速酶系, 与非产氢细菌相比产氢微生物存在着特殊的氢代谢系统, 其中氢化酶在产氢代谢过程中发挥着重要作用^[19-20]. 氢化酶活性的高低以及表达周期的长短直接影响产氢细菌的能量代谢, 从而影响氢气的释放速度和产量. 在实验 8h 后开始检测氢化酶的活性, 从氢化酶比活性的测定结果中发现, 不同 C/N 比下氢化酶比活性的变化都呈现先上升后下降的趋势. 8~20h 在产氢速率不断提高的同时, 氢化酶的活性也随之增强; 20h 至发酵结束, 氢化酶的活性又迅速下降, 这与氢气产量趋于平稳直至停止的结论保持了一致 (图 5). C/N 比为 14 时, 氢化酶的活性相对较高, 表达周期较长, 尤其在 8~16h 瞬时表达增强, 因此导致细菌产氢能力迅速提高. 可见 C/N 比与氢化酶的合成和表达存在密切的关系. C/N 比过低时, 微生物因氮源过多而生长过旺, 碳源消耗也就

相对较快, 导致产氢细菌 X-29 在碳源浓度低时, 不能满足其物质代谢的营养物需求, 能量代谢水平低下, 而与能量代谢相关的氢化酶合成水平也下降. C/N 比过高时, 微生物因碳源浓度高而过量生长, 提前进入衰亡期, 或因氮源不足而生长缓慢, 生命力减弱, 同样也不利于嗜酸产氢细菌 X-29 氢化酶的长期表达. 可见 C/N 比是通过影响氢化酶的合成与表达而影响产氢细菌的产氢能力的, 探寻合适的 C/N 比, 提高氢化酶的活性, 延长表达的周期是提高产氢细菌产氢能力的重要途径.

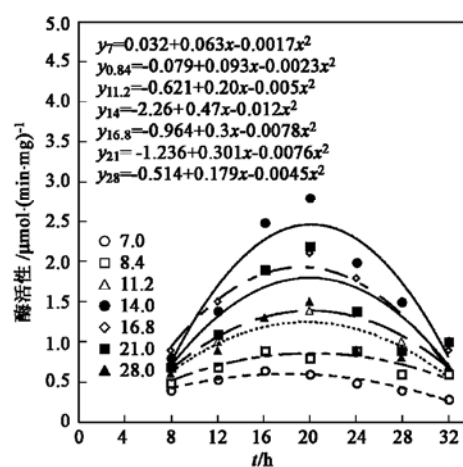


图 5 在不同 C/N 比下 X-29 的氢化酶活性

Fig. 5 Activity of hydrogenase of strain X-29 at different C/N ratio

由于在以葡萄糖为碳源进行发酵时, 乙醇是菌株 X-29 的主要发酵产物之一, 所以监测菌株 X-29 在产氢发酵过程中乙醇脱氢酶的活性变化, 可以表征其物质代谢活性. 随着发酵的进行, 产氢细菌 X-29 的乙醇脱氢酶比活性逐渐增强, 大量产生乙醇, 缓解了发酵过程中, 因挥发酸大量产生和 pH 值过低而导致的毒性和代谢反馈抑制, 因此该菌株能够在低 pH 值下良好的生长和产氢, 这也是菌株 X-29 的一种嗜酸代谢产能方式. 乙醇脱氢酶活性随着代谢进程逐渐升高后而趋于平稳, 不同 C/N 比时, 表达活性差异较小, 表达周期较长. C/N 比为 14 时, 产氢细菌 X-29 获得了乙醇最高量 3 364.7 mg/L, 与此同时乙醇脱氢酶比活性也为最高 33.2 $\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$ (图 6). 乙醇脱氢酶表现出高活性, 所以液相发酵产物中乙醇占挥发酸和醇总量的 50% 以上, 这可能是与嗜酸产氢细菌 X-29 在厌氧条件下进行发酵相适应的. C/N 比影响乙醇脱氢酶的合成与表达从而影响产氢细菌的代谢进程.

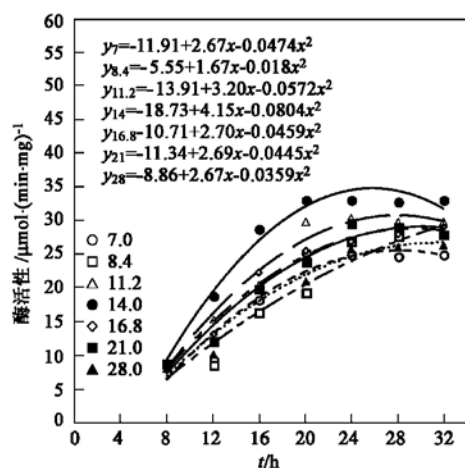


图 6 在不同 C/N 比下 X-29 的乙醇脱氢酶活性

Fig. 6 Activity of alcohol dehydrogenase of strain X-29 at different C/N ratio

3 结论

(1) C/N 比影响了嗜酸产氢细菌 X-29 的物质和能量代谢, 在提高细菌的产氢能力时增强单位细胞的能量代谢活性比增加生物量更为有效. 在不同 C/N 比下与能量代谢相关的氢化酶表达活性存在差异, 氢化酶活性随着发酵的进行达到高峰后迅速降低. 在不同 C/N 比下与物质代谢相关的乙醇脱氢酶表达活性随着代谢进程逐渐升高后而趋于平稳.

(2) C/N 比为 14 时, 产氢细菌 X-29 获得最大累积产氢量 2 210.9 mL/g, 其他 C/N 比下产氢量都有所下降, 与此同时 X-29 获得了最大生长量 0.828 g/L. C/N 比为 14 时, 氢化酶的表达周期延长, 酶活性最高; 乙醇脱氢酶瞬时表达增强, 表达周期延长. 合适的 C/N 比为产氢细菌提供了良好的生长和产氢条件.

(3) 随着发酵的进行嗜酸产氢细菌 X-29 的乙醇脱氢酶比活性逐渐增强, 大量产生乙醇, 缓解了发酵过程中, 因挥发酸大量产生和 pH 值过低而导致的毒性和代谢反馈抑制, 因此该菌株能够在低 pH 值下良好的生长和产氢, 这也是菌株 X-29 的一种嗜酸代谢产能方式.

参考文献:

[1] Hansel A, Lindblad P. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, 50: 153~160.

[2] Das D, Veziroglu T N. Hydrogen production by biological process: a survey of literature[J]. Int. J. Hydrogen Energy, 2001, 26: 13~28.

[3] Momirlan M, Veziroglu T N. Current status of hydrogen energy[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2002, 6: 41~179.

[4] 王艳辉, 吴迪镛, 迟建. 氢能及制氢的应用技术现状及发展趋势[J]. 化工进展, 2001, (1): 6~8.

[5] 李建政, 任南琪. 生物制氢技术的研究与发展[J]. 能源工程, 2001, (2): 18~20.

[6] Hallenbeck P C, Benemann J R. Biological hydrogen production: fundamentals and limiting process[J]. Int. J. Hydrogen Energy, 2000, 27: 1185~1193.

[7] Hawkes R, Dionsdale D L, Hawkes I, et al. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization[J]. Int. J. Hydrogen Energy, 2002, 27: 1339~1347.

[8] Levin D B, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospect and limitations to practical application[J]. Int. J. Hydrogen Energy, 2004, 29: 173~185.

[9] 李云政, 蔡博伟, 朱鹤孙, 等. 影响塑料生物降解速度因素的研究[J]. 塑料, 1999, 28(1): 42~46.

[10] 毛连山, 宋向阳, 勇强, 等. 碳氮比对里氏木酶合成木聚糖酶的影响[J]. 林产化学与工业, 2002, 22(3): 41~44.

[11] 吴光学, 管运涛, 王剑秋, 等. 碳源及氮源对紫色非硫光合细菌积累 PHB 的影响[J]. 环境科学, 2004, 25(6): 102~107.

[12] 王勇, 孙寓姣, 任南琪, 等. C/N 对细菌产氢发酵类型及产氢能力的影响[J]. 太阳能学报, 2004, 25(3): 375~378.

[13] 林明, 任南琪, 马沙平, 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.

[14] GB 11894-89, 水环境分析方法标准工作手册(上册)[S].

[15] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 117~120.

[16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248~254.

[17] Junelles A M, Janati-Idrissi R, Petitdemange H, et al. Iron effect on acetone-butanol fermentation[J]. Curr. Microbiol., 1988, 17: 299~303.

[18] Ueno Y, Kurano N, Miyachi S. Purification and characterization of hydrogenase from the marine green alga, *Chlorococcum littorale*[J]. FEBS Lett., 1999, 443: 144~148.

[19] Fernando A, Lopes P, Olga T, et al. A brief look at three decades of research on cyanobacterial[J]. Int. J. Hydrogen Energy, 2002, 29: 1209~1215.

[20] 朱章玉, 俞吉安, 林志新, 等. 光合细菌的研究及其应用[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1991.