

# 光合细菌产氢研究(一)

## —光合细菌和梭状丁酸菌混合从葡萄糖产氢的研究

三宅淳

毛醒一

川村杉生

(日本通产省工技院微工所)

(无锡轻工业学院发酵系)

(日本通产省工技院微工所)

### 引 言

光合细菌从有机酸例如乳酸盐<sup>[1-3]</sup>苹果酸盐<sup>[1,4]</sup>进行产氢具有高的速度和效率,从酒精也能产氢<sup>[5]</sup>。

分离获得的 *Rhodopseudomonas Sphaeroides* 变种能从葡萄糖产氢,但速度较慢<sup>[6]</sup>。葡萄糖的生产可广泛利用农产品资源,因而以葡萄糖为原料研究高速、高效产氢是很有意义的。

光合细菌和嫌气细菌混合,从葡萄糖和其它碳水化合物可以形成光合产氢体系。Weetall 等曾报告<sup>[1]</sup>: 固定的 *R. rubrum* 菌和 *Klebsiella Pneumoniae* (肺炎克氏杆菌) 混合,能从 1 M 葡萄糖产生 5.25 M 氢。Odom 和 Wall<sup>[8]</sup> 指出: *Rps. Capulata* 和 *Cellulomonas* (纤维单孢菌) 混合,从纤维素以 1 M 葡萄糖单位计可产 4.6~6.2 M 氢。

为了和光合细菌混合,嫌气细菌自身应有高的产氢能力,才能增加总的产氢速度。嫌气细菌中已知 *Clostridium butyricum* 具有较高的产氢能力<sup>[9-11]</sup>。Karube 等<sup>[9,11]</sup> 指出, *C. butyricum* 固定在凝胶中产氢较稳定,固定化细胞用废液产氢并转变为电能<sup>[10]</sup>,但和光合细菌混合培养尚没有被研究过。假如光合细菌能利用 *C. butyricum* 所产生的物质,那末,产氢能力高的 *C. butyricum* 和光合细菌混合,将形成一个从葡萄糖或其它碳水化合物的有效的产氢体系。丁酸是丁酸菌在嫌气条件下的主要分解产物,但是人们通常还没有注意到光合细菌从丁酸光合产氢。近年来 Stevens<sup>[12]</sup> 等报告用九个 *Rps. Capulata* 菌株从丁酸产氢,但其产氢效率只有 50%。

本研究以 *C. butyricum* 菌和 *Rhodopseudomonas* 菌混合,所用的光合细菌是新分离的 *Rhodopseudomonas. SP. RV* 菌株,该菌从丁酸产氢的效率为 75%。将该菌和 *C. butyricum* IFO13949 菌株一起固定在琼脂凝胶中混合培养,结果 1 M 葡萄糖可得到 7 M 氢,而且从蔗糖也能产氢。

### 二、材料和方法

#### 1. 菌种及其生长条件

1) 菌种 从日本筑波地区泥水样中分离得到。用苹果酸为碳源进行分离,并以丁酸为碳

源进行产氢试验。该菌能在丙酸盐、甘露糖醇和山梨糖醇培养基上生长,但不能在硫代硫酸盐上生长。颜色为褐绿色,形态呈杆状或长椭圆形,没有螺旋状。试验中该菌命名为: *Rhodospirillum rubrum* SP. RV。 *Clostridium butyricum* 菌是从IFO买来(IFO13949)。

2) 基础培养基 每升培养基中含有下列物质:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  866mg,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  733mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200mg,  $\text{CaCl}_2$  75mg, EDTA 20mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  11.8mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.8mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2.1mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  750 $\mu\text{g}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  240 $\mu\text{g}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  40 $\mu\text{g}$ , 以及生物素、维生素 $\text{B}_1$ 、对氨基苯甲酸盐、尼古丁、烟酰胺各0.15 $\mu\text{g}$ 。

3) *Rps. sp. PV* 培养基 “aBy” 基础培养基中加入丁酸 50mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10mM,  $\text{NaHCO}_3$  0.1%, 酵母膏 0.1%。pH = 7。

4) *C. butyricum* 培养基 “Gmpy” 基础培养基中加入葡萄糖 50mM, 牛肉膏 0.2%, 蛋白胨 0.4%, 酵母膏 0.4%。pH = 7。

5) 混合前培养基的培养基 “gGmpyp8” 基础培养基中加入谷氨酸盐 10mM, 葡萄糖 20~50mM, 牛肉膏 0.01%, 蛋白胨 0.02%, 酵母膏 0.02%, 磷酸缓冲液 0.1M。pH = 8。

6) 混合培养产氢培养基 “gGp8” 基础培养基中加入谷氨酸盐 2.5mM, 葡萄糖 20~30mM, 磷酸缓冲液 0.1M。pH = 8。

7) *RPS. SP. RV* 在 aBy 培养基上, 30℃ 用钨灯 1 Klux 光照射条件下嫌气培养。*C. butyricum* 在嫌气箱中 Gmpy 培养基上 32℃ 培养。

8) *Rps. SP. RV* 菌用悬浮液和固定化细胞两种方法在几种底物上产氢 底物有苹果酸盐、乳酸盐、醋酸盐、丁酸盐、葡萄糖、谷氨酸盐。

以丁酸为例:

① *Rps. SP. RV* 在悬浮液中产氢: 在扁平培养瓶中盛 aBy 培养基 70ml, 接种液体试管的菌液约 1ml, 于 1 Klux 光照下前培养二天, 将菌体离心分离出, 然后悬浮在产氢培养基中, (以 10mM 谷氨酸盐代替 aBy 中的  $\text{NH}_4^+$  及酵母膏) 起始菌的悬浮液光密度  $\text{OD}_{660}$  为 1.0 左右, 培养基表面用液体石蜡进行液封, 瓶口塞上橡皮塞, 塞子扎入注射针排气口, 产生之气体用排水法收集<sup>[3]</sup>。

② 固定化细胞产氢: 在 24cm<sup>2</sup> 扁平培养瓶中(瓶体积 70ml) 加入 4mg 左右菌体细胞和 45℃ 的琼脂液, 琼脂先溶在 aBy 培养基中, 混合后琼脂浓度为 2%, 体积为 10ml, 放平, 待冷凝后再用 aBy 培养基充满瓶子。于 1 Klux 光照下前培养二天, 弃去瓶内前培养基, 换为产氢培养基, 仍以 10mM 谷氨酸盐代替  $\text{NH}_4^+$  及酵母膏。

上述两种方法所用产氢培养基中的碳源均与前培养时相同, 但若以葡萄糖及谷氨酸盐为底物作产氢试验时, 前培养的碳源用乳酸。

9) *Rps. sp. RV* 和 *C. butyricum* 混合固定化和产氢 在 76cm<sup>2</sup> 扁平培养瓶中(瓶体积 200ml) 加入 *Rps. sp. RV* 菌液 10ml (干重约 10mg) 和 *C. butyricum* 菌液 3ml (干重约 2mg) 及 45℃、27ml 琼脂混合液, 琼脂先溶在 gGmpyp8 培养基中, 放平, 冷凝后再加入 gGmpyp8 培养基, 于 1 Klux 光照下 30℃ 培养 48 小时, 然后换成 gGp8 培养基在 10Klux 光照下产氢。

## 2. 分析方法

蛋白质分析用 Lowry 法<sup>[4]</sup>, 以牛血清蛋白作标准。苹果酸、乳酸用液相色谱测定。葡萄糖、蔗糖和醋酸用酶法分析。其它有机酸、醇类和丙酸用气相色谱仪测定。

### 三、结 果

#### 1. *Rps.sp.RV*产氢

*Rps.sp.RV* 能从苹果酸盐、乳酸盐、醋酸盐和丁酸盐产氢,但从葡萄糖产氢很少,不能从谷氨酸盐产氢(表1)。最近将其和丁酸菌混合培养,则*Rps.sp.RV*可从丁酸菌的产物产氢。

用固定化细胞法从乳酸、醋酸、丁酸进行产氢试验的结果见表2。

*Rps.sp.RV*用固定化细胞法从丁酸产氢比用悬浮液法具有较高的产氢速度和产氢效率,从丁酸可得到75%转化率。

表1 *Rps.sp.RV*在几种底物上产氢

| 底 物      | 最大产氢速度                                 |                                        | 细胞浓度<br>(mg/ml) |
|----------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------|
|          | ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) | ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) |                 |
| D,L-苹果酸盐 | 188                                    | 46                                     | 1.6(21h)        |
| D,L-乳酸盐  | 259                                    | 32                                     | 2.8(21h)        |
| 醋 酸 盐    | 42                                     | 12                                     | 1.5(21h)        |
| 丁 酸 盐    | 57                                     | 6.6                                    | 3.4(21h)        |
| 葡 萄 糖    | 2.6*                                   | 1.7*                                   | 0.6(45h)        |
| L-谷氨酸盐   | 0*                                     | 0*                                     | /               |

\*注:为葡萄糖及谷氨酸盐两种底物取0~45小时的平均值。

上表中:光强度10Klux,细胞起始浓度0.5mg干重/ml左右,最大产氢速度为接种后16~24小时观察得到。

表2 用琼脂固定*Rps.sp.RV*产氢

| 底 物   | 初始浓度<br>(mM) | 终浓度<br>(mM) | 产 氢            |                                                | 收 率<br>(%) | 细胞密度<br>(mg/g凝胶) |
|-------|--------------|-------------|----------------|------------------------------------------------|------------|------------------|
|       |              |             | 总 量<br>(ml/ml) | 最大速度<br>( $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) |            |                  |
| 醋 酸 盐 | 16.3         | 0           | 0.65           | 37                                             | 40.2       | 7.3              |
| 乳 酸 盐 | 52.5         | 0           | 3.59           | 145                                            | 45.6       | 6.4              |
| 丁 酸 盐 | 46.2         | 0           | 8.62           | 205                                            | 75.1       | 9.4              |

上表中试验瓶用70ml(24cm<sup>2</sup>)或200ml(76cm<sup>2</sup>),细胞密度指最终细胞密度。

#### 2. *C.butyricum*和*Rps.sp.RV*混合培养产氢

由表1知:*Rps.sp.RV*从葡萄糖产氢很少,为此必须将葡萄糖降解。表3中列出丁酸菌降解葡萄糖的产物,其中丁酸是主要的产物。而*Rps.sp.RV*从丁酸产氢具有高速度和高效率(表2),为此将*Rps.sp.RV*菌和丁酸菌混合产氢是适宜的。

表3中数量指1M葡萄糖的转化量。试验时用23mM葡萄糖750mM加入10cm<sup>2</sup>固定化丁酸菌琼脂凝胶中进行。

*C.butyricum*和*Rps.sp.RV*在对细菌安定的琼脂凝胶中混合培养,并于1Klux光照下前

表3 *C. butyricum* IFO 13949  
对葡萄糖嫌氧转化

| 产 物   | 数 量 (mM) |
|-------|----------|
| 甲 酸 盐 | 痕 迹      |
| 醋 酸 盐 | 381      |
| 乳 酸 盐 | 156      |
| 丙 酸 盐 | 痕 迹      |
| 丁 酸 盐 | 592      |

表4 混合培养从葡萄糖产氢  
的最终基质

| 基 质   | 数 量 (mM) |
|-------|----------|
| 葡 萄 糖 | 4.60     |
| 醋 酸 盐 | 0.15     |
| 乳 酸 盐 | 0.22     |
| 丁 酸 盐 | 0.64     |

培养,不经前培养光合细菌不能产氢,这可能由于固定化过程中有氧或热的影响。在前培养期间由丁酸菌产生的有机酸被附着在凝胶中(表4),将gGp8培养基加入到凝胶中,于10 Klux光照下产氢过程和葡萄糖消耗的关系见图1。从4.6mM葡萄糖和附着在凝胶中的有机酸可得到958ml氢,减去前培养时期所消耗有机酸部份的产量,则4.6mM葡萄糖可产氢804ml,即1 M葡萄糖产7.03M氢。

表4中醋酸盐、乳酸盐、丁酸盐是丁酸菌在前培养期间产生的,附着在凝胶上,甲酸盐、丙酸盐和醇类(甲醇、乙醇、丙醇和丁醇)痕量或未测出,葡萄糖由产氢培养基gGp8供给。

### 3. 不用光照混合培养产氢

此时仅获得130ml氢。从而可知80%以上的氢是由光合作用产生的。实际上嫌气条件下从葡萄糖产生的主要产物是丁酸(表3),因此上述结果理所当然。

### 4. *C. butyricum*和*Rsp. sp. RV*先后分开产氢

先将固定化丁酸菌用含有4.6mM葡萄糖的gGp8培养基(160ml)培养产氢(产氢105ml),再将丁酸菌菌液加入固定化*Rsp. sp. RV*琼脂凝胶中,(*Rps. sp. RV*先用aBy培养基进行前培养)。又可产氢342ml,(如前面混合培养计算一样,减去附着在凝胶里的丁酸部份的产氢量)合计从4.6mM葡萄糖产氢447ml,即1 M葡萄糖产氢3.9M,比混合培养的产氢效率要低很多。

### 5. 从蔗糖产氢

先在gGmpyp8培养基上混合培养,于1 Klux光照下48小时,再换成蔗糖培养基,(2.5 mM谷氨酸盐、蔗糖15.6mM、0.1M磷酸缓冲液、基础培养基。pH=8)。同样进行产氢,延续300小时,结果1 M葡萄糖产氢8.3M,平均产氢速度为25 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>/h,比葡萄糖产氢速度慢。

作者曾试图用改变肉膏、蛋白胨和酵母膏的浓度或改变最初丁酸菌的量来调节*Rps. sp. RV*和*C. butyricum*的比例,实际上由于氧的量难以控制使前培养期间*C. butyricum*菌生长经常不同,因此两种菌的比例总不能调整准确,*C. butyricum*常常过量。使葡萄糖消耗太快而降低pH,而pH的降低又对光合细菌产氢不利。由图1可知:减慢葡萄糖的消耗速度有利于产氢,因此虽然调节两种菌的比例较困难,丁酸菌常常过量,但可以用连续或间歇追加少量葡萄糖的方法以稳定pH。

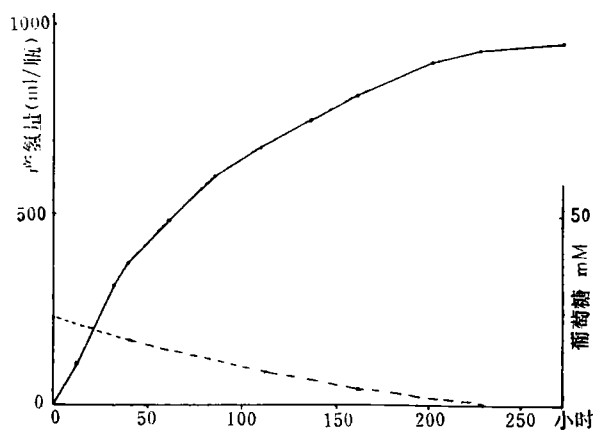
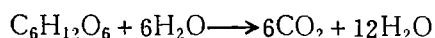


图1 Rps.sp.RV和C.butyrlicum混合培养产氢

#### 四、讨 论

从反应能量观点看,不补给能量,很难将葡萄糖完全转化为氢。



$$\Delta G = -7.6 \text{ KCal}^{[5]}$$

光合细菌利用光能促进反应是一种途径,但光合细菌不能直接从葡萄糖产生氢,即使采用Rps.sphaeroides变种,其产氢速度也相当慢,(8 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{h}$ 蛋白质<sup>[4]</sup>)能期望改变细菌的遗传特性直接从葡萄糖或其他碳水化合物产氢当然是理想的,但目前遗传技术在光合细菌上应用尚未见实效。

研究结果应考虑到兼具产氢速度和产氢效率。光合细菌产氢要求光照射,在地球上可获取的最大光源是太阳光,这在白天可行,但在夜间如仅用光合细菌显然不能产氢。如能在夜间产氢,则每天的总产氢量必然增加。嫌气细菌和光合细菌混合即可以满足上述速度和效率的要求。C.butyrlicum将葡萄糖转化成有机酸和氢,光合细菌进而利用酸产氢。而光合细菌消耗有机酸又使pH稳定。由此可见,将一个直接从葡萄糖产氢的光合细菌新种混以Clostridia或其它嫌气细菌用以产氢是较理想的方法。

本研究中,C.butyrlicum用于降解葡萄糖,虽然C.butyrlicum能从葡萄糖产生多种物质<sup>[6]</sup>,但丁酸是IFO13949菌株的主要产物。光合细菌Rps.sp.RV能与C.butyrlicum混合并利用丁酸产氢,在10Klux光照下324小时,其平均产氢速度为38.9 $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{h}$ ,这比Rps.sphaeroides变种直接从葡萄糖产氢的速度更高<sup>[6]</sup>。而其转化效率是59%(1M葡萄糖产7.03M氢)。用蔗糖为底物进行混合培养时转化效率为36%(1M蔗糖产8.3M氢)。可见我们选择的C.butyrlicum是和光合细菌混合适宜的嫌气细菌,而且对多种作用基质均具有较高的产氢能力。

为了进一步提高在夜间产氢的速度,可以用C.cutyricum在嫌气条件下分解的另一主要产物—醋酸盐,1M葡萄糖转化为醋酸时比转化为丁酸时能产生更多氢<sup>[7]</sup>。(待续)

## 参 考 文 献

- [1] Hillmer, P., Gest, H.: "J. Bacteriol." 129, 724, 1977.
- [2] Zürrer, H., Bachofen, R.: "Appl. Environ. Microbiol." 37, 789, 1979.
- [3] Kim, J.S., Ito, K., Takahashi, H.: "Agric. Biol. Chem." 46, 937, 1982.
- [4] Miyake, J., Tomizuka, N., Kawamura, S.: "The Report of Fermentation Research Institute" 58, 25, 1982.
- [5] Fujii, T., Nakazawa, A., Sumi, N., Tani, H., Ando, A., Yabuki, M.: "Agric. Biol. Chem." in press, 1983.
- [6] Macler, B.A., Pelroy, R.A., Bassham, J.A.: "J. Bacteriol." 133, 446, 1979.
- [7] Weetall, H.H., Sharma, B.P., Detar, C.C.: "Biotechnol. Bioeng." XXIII, 605, 1981.
- [8] Odom, J.M., Wall, J.D. "Appl. Environ. Microbiol." 45, 1300, 1983.
- [9] Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., Suzuki, S.: "Biochim. Biophys. Acta," 444, 338, 1976.
- [10] Suzuki, S., Karube, I., Matsunaga, T.: "Biotechnology and bioengineering symp." 8, 501, 1978.
- [11] Karube, I., Urano, N., Matsunaga, T., Suzuki, S.: "Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol." 16, 5, 1982.
- [12] Stevens, P., Van Der Sypt, H., De Vos, P., De Ley, J.: "Biotechnol. Lett." 5, 369, 1983.
- [13] Miyake, J., Tomizuka, N., Kamibayashi, A.: "J. Ferment. Technol." 60, 199, 1982.
- [14] Lowry, O.H., Rowebrough, N. J., Farr, A., Randall, R.J.: "J. Biol. Chem." 193, 265, 1951.
- [15] Sakata, T.: "Kagaku." 51, 744, 1981.
- [16] Zeikus, J.G.: "Ann. Rev. Microbiol." 24, 423, 1980.
- [17] Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., Decker, K.: "Biochim. Biophys. Acta." 305, 268, 1973.