

文章编号:1673-1689(2007)05-0071-04

钴的配合物对甲烷发酵和 产甲烷过程中关键酶的影响

赵阳¹, 李秀芬¹, 堵国成¹, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在甲烷发酵过程中, 微量金属元素钴必须以充足的量和生物学有效的形式存在才能为产甲烷菌利用。本研究分别以甲烷产率和辅酶 F_{420} 为甲烷发酵过程的评价指标, 着重考察了钴及其配合物对甲烷发酵的影响。通过比较添加 Co^{2+} 和配合钴对产甲烷的促进效果, 得出在相同摩尔浓度下配合钴更能促进甲烷发酵的结论。不同配体的研究结果表明, 在甲烷发酵过程中, 丝氨酸是能与 Co^{2+} 配合、提高 Co^{2+} 生物可用性的最佳配体。当丝氨酸-钴配合物的添加剂量为 $2 \mu mol/L$ 时, 甲烷产率为 $313 mL/gCOD$, 相对空白样提高幅度为 60% , 此时, 辅酶 F_{420} 的含量由空白样的 $0.375 \mu mol/gVSS$ 提高到 $0.516 \mu mol/gVSS$, 辅酶 M 的含量由空白样的 $92.9 \mu mol/gVSS$ 提高到 $102.6 \mu mol/gVSS$ 。

关键词: 甲烷发酵; 微量元素; 钴; 配合物

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Effect of Cobalt and Its Complexation on Methane Fermentation and Some Unique Coenzymes in Methanogenesis

ZHAO Yang¹, LI Xiu-fen¹, DU Guo-cheng¹, CHEN Jian^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cobalt plays an important role in the growth and the metabolism of anaerobic microorganism. To evaluate the effect of cobalt and its complexation, the methane fermentation was investigated by the indicators of methane productivity and the coenzyme F_{420} . The complexation of cobalt was proved to be the positive status of cobalt in methane fermentation. The results obtained in this study indicated that the best complexant was serine, and its addition of $2 \mu mol/L$ led to the highest methane production of $313 mL/gCOD$ with an increase of coenzyme F_{420} from $0.375 \mu mol/gVSS$ to $0.516 \mu mol/gVSS$. The results obtained in this study indicated that the best complexant was serine, and its addition of $2 \mu mol/L$ led to the highest methane production of $313 mL/gCOD$ with an increase of coenzyme F_{420} from $0.375 \mu mol/gVSS$ to $0.516 \mu mol/gVSS$.

Key words: methane fermentation; trace metals; cobalt; complexant

收稿日期: 2006-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50678073)

作者简介: 赵阳 (1982-), 女, 浙江诸暨人, 工学硕士.

通讯作者: 李秀芬 (1968-), 女, 河北滦南人, 副教授, 工学博士, 主要从事废物资源化方面的研究. Email: xfli@jiangnan.edu.cn

在厌氧消化产甲烷的过程中,微量金属元素是产甲烷菌生长所必需的^[1-2]。其中,微量金属元素钴的存在不仅有利于微生物细胞的合成^[3-4],还可促进酶的合成或激活在生化反应中起催化作用的酶^[5],相反,钴元素的缺乏不仅对微生物的生长不利,而且会影响细菌的活力,并影响整个反应器的运行效果和稳定性,因此在厌氧反应器中维持一定量的生物可用的钴元素是十分重要的^[6]。化学配合作用可以保持微量金属元素的溶解状态,从而提高添加钴的生物有效性。本文以甲烷产率为甲烷发酵过程的评价指标,考察了钴及其配合物对甲烷发酵的影响,并获得了最佳配体及其添加量。在获得的最佳配体以及最佳添加量条件下,考察了最佳配合物对产甲烷过程中关键酶—辅酶 F₄₂₀,辅酶 M 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验用水

本实验采用合成配水。其配方如下:葡萄糖 5 g/L,氮、磷分别以 NH₄Cl 和 KH₂PO₄ 及 Na₂HPO₄ 的形式提供,满足 $m(\text{COD}) : m(\text{N}) : m(\text{P}) = 200 : 5 : 1$ 。为保证体系有足够的 pH 缓冲能力,配水中加入 5 g/L 的 NaHCO₃^[3,6]。

常量元素:NaCl 5 mmol, MgCl₂ 0.5 mmol, CaCl₂ 0.5 mmol, Na₂S 1 mmol。

微量元素溶液(1 mL/L):(Na₂SeO₃, Na₂WO₄, Na₂MoO₄, H₃BO₄, ZnCl₂, CuCl₂, MnCl₂)的浓度为 1 mmol; NiCl₂ 浓度为 1 mmol; FeCl₂ 浓度为 10 mmol。

1.2 实验污泥

实验所用的颗粒污泥取自启动成功的 UASB 反应器(COD 5 g/L, HRT 1 d)。在实验室用 1L 的 UASB 反应器驯化 10 d 后 COD 去除率稳定在 85% 左右。污泥 TS 为 10.76% (湿污泥), VSS 为 80.93% (TS)。

1.3 实验装置

实验装置如图 1 所示。史式发酵管内装有 2 mol 的 NaOH 溶液,以去除沼气中的 H₂S、CO₂ 等酸性气体。

1.4 实验方法

1.4.1 甲烷体积的测量 取驯化好的湿污泥 6 g, 置入 125 mL 血清瓶中,然后加入 100 mL 实验用水,并按要求添加 Co²⁺ 或钴的配合物, pH 调至 7±0.2,充氮气 10 min,迅速密封,置于 35 °C 恒温室中,定时记录甲烷的累积产量,直至甲烷累积产量

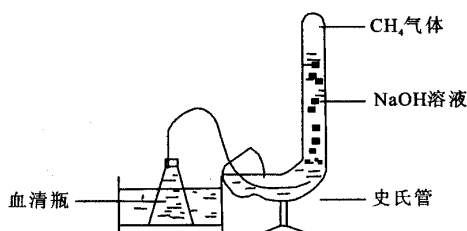


图 1 间歇实验装置

Fig. 1 The equipment for intermittert experiment

停止增加时,结束实验。期间,为使污泥和基质充分接触,每 12 h 摇动血清瓶一次。

1.4.2 厌氧污泥中辅酶 F₄₂₀ 含量的测定 取湿污泥 10 g 两份。其中一份用于测 VSS。另一份用蒸馏水洗 3 遍,每次洗后离心(5 000 r/min)分离。去除上清液,再用生理盐水浸泡 0.5 h,离心,去上清液。再用蒸馏水洗 3 遍。每次洗后都离心去上清液。加蒸馏水至 30 mL,在 95 °C 水浴中煮 30 min,不断搅拌使污泥受热均匀,然后冷却,再离心(10 000 r/min)分离。取上清液加入两倍体积的乙醇(或异丙醇),搅拌均匀后沉淀 2 h,再离心(10 000 r/min)分离,上清液即为辅酶 F₄₂₀ 的测定样。采用紫外—可见分光光度计,测定试样在 420 nm 下的吸光光度值。^[6]

1.4.3 厌氧污泥中辅酶 M 含量的测定 取 5 g 湿污泥和 2 mL 1% 三正丁基膦混合在室温下反应 1 h,然后样品在 12 000 r/min 下离心 2 min。取 1 mL 上清液和 20 μL 邻苯二甲醛(质量浓度:20 mg/mL 甲醇)、20 μL 乙醇胺(体积分数:20 μL / mL 硼酸缓冲液 pH=9.0)衍生。衍生条件为好氧下在室温条件下反应 5 min。然后取样通过 HPLC 分析。

HPLC 检测条件:Beckman 型号的 157 荧光检测器(装备 338 nm 激发滤光片和 450 nm 发射滤光片, HPLC 分析采用 Econosphere C18 柱,流动相为 50 mmol 乙酸钠缓冲液(pH=5.7)—乙腈(70 : 30),体积流量为 1 mL/min,进样量为 2 μL^[7]。

2 结果与讨论

2.1 Co²⁺ 对甲烷发酵的影响

已有文献认为^[8],反应器中的 Co²⁺ 易以碳酸盐、磷酸盐和硫化物沉淀的形式存在,而沉淀形式的钴无法被产甲烷菌所利用的,因此,首先考察了 Co²⁺ 的添加剂量对甲烷发酵的影响。如图 2 所示,随体系中 Co²⁺ 浓度的增大,产气量和产甲烷速率相应增加,其中,添加 1 μmol/L 浓度的 Co²⁺ 甲烷产量

为 93.95 mL, 相对空白提高了 8.16%。添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 Co^{2+} 的甲烷产量无明显的差别, 分别为 115.23 mL 和 110.80 mL, 但是, 与空白样对比, 提高幅度较大, 分别为 32.66% 和 27.56%。

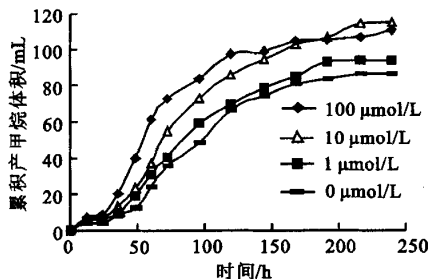


图2 Co^{2+} 对甲烷发酵的影响

Fig. 2 The effect of Co^{2+} on methane fermentation

2.2 配合钴对甲烷发酵的影响

为筛选到最佳的配体, 本研究选择了 5 种氨基酸进行配合实验, 不同钴配合物的添加浓度均为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。5 种氨基酸选择的理由是: 甘氨酸(氨基乙酸)是最简单的氨基酸也是最简单的配合物; 赖氨酸能与钴形成比较稳定的 1:4 的配合物^[9]; 半胱氨酸和甲硫氨酸里面含有硫, 并且可以被微生物利用^[4], 具有双重营养作用; 丝氨酸的结构和辅酶 M 类似^[10], 或许能对微生物的生长起到促进作用, 因此也具有双重营养作用。

图 3 给出了不同氨基酸-钴配合物对甲烷发酵的影响。从图中结果可以看出, 5 种配体氨基酸均能促进甲烷发酵, 最终甲烷产量均增加。除甲硫氨酸-钴的配合物外, 其它氨基酸-钴配合物均能缩短甲烷发酵的延迟时间, 配合形式的钴可以增强其生物有效性。无论是最终甲烷产量还是反应开始阶段的延迟期, 5 种氨基酸配体中以丝氨酸最佳, 对甲烷发酵促进作用最为明显, 累积产甲烷量为 145.45 mL, 是空白样的 1.5 倍。赖氨酸虽然在累积产甲烷量方面与丝氨酸相差不多, 与空白样相比提高幅度为 1.45 倍, 但在缩短产甲烷的延迟期方面则明显不如丝氨酸。因此, 认为丝氨酸是厌氧消化产甲烷体系中可以提高钴的生物有效性的最佳配体。

2.3 配合钴的添加量对甲烷发酵的影响

以丝氨酸为配体, 考察了配合钴的最佳添加量。以丝氨酸-钴配合物浓度为横坐标, 以添加不同丝氨酸-钴浓度的污泥的累积产甲烷量与空白样的污泥产甲烷量的差值(既相对产甲烷体积)为纵坐标, 如图 4。由图可以看出, 随着丝氨酸-钴配合物浓度的升高, 产气量先增加后降低。添加 1 $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴的配合物产气量达到 129.5

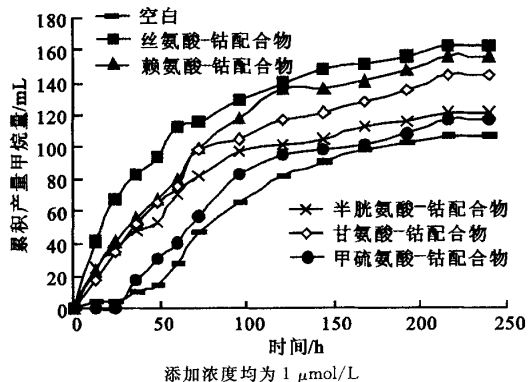


图3 不同氨基酸-钴配合物对甲烷发酵的影响

Fig. 3 The effect of different Co^{2+} -aminoacids complexation on methane fermentation

mL, 相比空白增加 33.64%。当丝氨酸-钴配合物浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 产气量达到最大, 为 154.76 mL, 相比空白增加了 60%。当钴浓度继续增加时, 产气量反而下降。当添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴配合物时, 产气量下降到 125.71 mL, 这可能是因为过量的微量元素钴容易与细菌蛋白质相结合而发生变性或沉淀从而使酶失去活性。因此认为丝氨酸-钴配合物添加的最佳添加浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 。

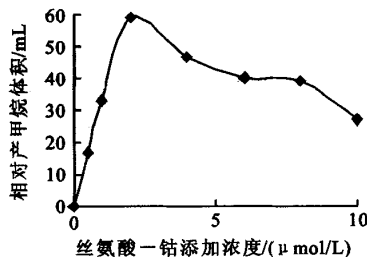


图4 丝氨酸-钴的添加剂量对甲烷产量的影响

Fig. 4 Effect of serine- Co^{2+} concentration on the methane yield

2.4 丝氨酸-钴配合物的添加对辅酶的影响

通常厌氧消化的限速阶段是产甲烷阶段, 故厌氧污泥的活性就是指产甲烷菌的活性。辅酶 F_{420} 是产甲烷菌特有的物质, 主要是作为低电位电子转移载体, 在甲烷形成过程中起着重要的作用, 可以用来反应厌氧污泥的活性。在丝氨酸-钴配合物添加量为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下, 试验结束时空白样 F_{420} 浓度为 0.375 $\mu\text{mol/gVSS}$, 添加 2 $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴配合物样品的 F_{420} 浓度为 0.516 $\mu\text{mol/gVSS}$, 相比空白样提高了 37.6%。由此可见, 丝氨酸-钴配合物的添加, 能够提高厌氧污泥的活性, 促进产甲烷过程。

McBride 和 Wolfe 在甲烷杆菌 *M. O. H* 菌株中发现了一种参与甲基转移的辅酶, 并将其命名为辅酶 M^[11]。辅酶 M 是已知的所有辅酶中相对分子

质量最小的辅酶,具有渗透性的,含硫量高,对酸和热稳定的辅助因子。Gunsalus 和 Wolfe 发现嗜热自养甲烷杆菌的细胞粗提取液中加入甲基辅酶 M 后,产甲烷速率提高 30 倍^[12]。这种现象被称为 RPG 效应。它表明辅酶 M 在产甲烷过程中起着极为重要的作用。本研究在丝氨酸-钴配合物添加量为 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的条件下,考察了整个甲烷发酵过程中辅酶 M 的变化情况。如图 5 所示。在甲烷发酵初期,空白和添加 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴样品中辅酶 M 的含量基本相同,分别为 $32.2\text{ }\mu\text{mol/gVSS}$ 和 $31.3\text{ }\mu\text{mol/gVSS}$ 。随着发酵时间的增加,辅酶 M 的浓度逐渐增加,添加配合物的辅酶 M 的含量增加明显快于空白样。其中发酵到 24 h 时,空白和样品的辅酶 M 含量分别为 $46.3\text{ }\mu\text{mol/gVSS}$ 和 $56.7\text{ }\mu\text{mol/gVSS}$ 。发酵到 50 h 左右,辅酶 M 浓度增加趋于平缓。到发酵结束,测得空白样辅酶 M 浓度为 $92.9\text{ }\mu\text{mol/gVSS}$,添加配合物样品辅酶 M 浓度为 $102.6\text{ }\mu\text{mol/gVSS}$,相比空白样提高了 10.44%。由此可见,丝氨酸-钴配合物的添加,能够提高厌氧污泥辅酶 M 含量,促进辅酶 M 的产生。

辅酶 F_{420} 为产甲烷菌产甲烷代谢途径中电子传递链中的独特酶类,而辅酶 M 为甲基传递链中的独特酶类,这 2 种酶均为产甲烷菌所特有的辅酶,在产甲烷过程中均起到极为重要的作用。丝氨酸-

钴配合物的添加刺激产甲烷菌所特有的 2 种辅酶的分泌,使污泥的产甲烷活性得到提高。具体促进机理将在下一步研究中继续深入探讨。

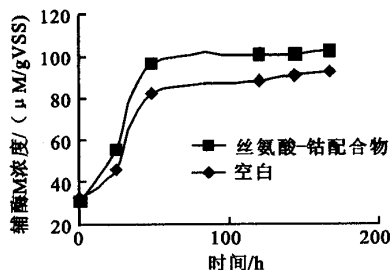


图5 添加 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴对辅酶 M 含量的影响
Fig. 5 The effect of $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ serine- Co^{2+} on the CoM content

3 结 语

在甲烷发酵中,微量金属元素钴的剂量要求和剂量策略是非常重要的。直接投加大量的微量元素并不能保证它的生物有效性,而以氨基酸-钴的配合物的形式添加钴元素却很好的解决这个问题。其中丝氨酸-钴的配合物最有利于甲烷发酵,最佳投加浓度为 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$,此时,产甲烷量比空白提高了 60%,辅酶 F_{420} 浓度比空白提高了 37.6%,辅酶 M 浓度比空白提高了 10.44%。

参考文献(References):

- [1] Speece R E. Anaerobic biotechnology for industrial waste waters[J]. USA: Archae Press, 1996.
- [2] 陈坚,卫功元. 新型高效废水厌氧生物处理反应器研究进展[J]. 无锡轻工大学学报:食品与生物技术, 2001, 20(3): 323-329.
CHEN Jian, WEI Gong-yuan. Research progress of advanced high-rate anaerobic reactor for the treatment of wastewater [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2001, 20(3): 323-329. (in Chinese)
- [3] Florencio L, Field JA, Lettinga G. Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994(60): 227-234.
- [4] Zhang Yasheng, Zhang Zhenya. Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2003(25): 427-433.
- [5] Jens E. Schmidt, Birgitte K Ahying. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket(UASB) reactors[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996(49): 229-246.
- [6] 胡纪莘. 废水厌氧生物处理理论与技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2003. 5.
- [7] Dwayne A Elias, Lee R Krumholz, Ralph S Tanner, et al. Estimation of methanogen biomass by quantitation of coenzyme M[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(12): 5541-5545.
- [8] 李亚新. 厌氧消化过程中甲烷菌的无机营养需求[J]. 中国沼气, 1996, 14(1): 1-5.
LI Ya-xin. Mineral nutrition requirement of methanogens for anaerobic digestion[J]. *China Biogas*, 1996, 14(1): 1-5. (in Chinese)
- [9] 李聪,钟惠明,袁瑾. 钴盐-氨基酸配合物的研制[J]. 云南化工, 1993(3): 4-5.
LI Cong, ZHONG Hui-ming, YUAN Jing. Study on cobaltic salt-amino acid ligand[J]. *Yunnan Chemical Industry*, 1993 (3): 4-5. (in Chinese)
- [11] Wolfgang Grabarse, Felix Mahlert, Seigo Shima. Comparison of three methyl-coenzyme M reductases from phylogenetically distant organisms: unusual amino acid modification[J]. *Conservation and Adaptation JMB*, 2000(303): 329-344.
- [12] McBride B C, Wolfe R S. A new coenzyme of methyl transfer coenzyme M[J]. *Biochemistry*, 1971(10): 2317-2324.
- [13] Gunsalus R P, Wolfe R S. Structure and methylation of coenzyme M ($\text{HSCH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3$) [J]. *J Biol Chem*, 1974(249): 4879-4885.

(责任编辑:杨萌)