

沼泽红假单胞菌乙酸光合放氢研究

杨素萍^{1,2} 赵春贵² 刘瑞田¹ 曲音波^{1*} 钱新民¹

¹(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

²(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘 要 依据光合细菌生长代谢特性和有机废水降解主要产物类型, 11 种有机物被用于沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) Z 菌株的光合产氢研究, 其中, 乙酸反应体系产氢活性最高。在此基础上, 研究了该菌株的生长与产氢动力学行为, 探求了影响该菌株光合放氢的主要限制性影响因素。结果表明, 该菌株产氢与生长部分相关。种子培养基和菌龄对产氢活性有明显影响。细胞最适产氢和生长所需要的光照强度和温度基本一致。当种子来源于硫酸铵高菌龄预培养物或谷氨酸钠对数期预培养物时, 该菌株产氢活性显著增加, 产氢延滞期明显缩短。氧浓度和接种量对产氢活性也有显著影响。供氢体和氮源浓度直接决定细胞的生长与光放氢活性。在低于 70 mmol/L 乙酸钠和 15 mmol/L 谷氨酸钠时, 产氢活性随底物浓度的增加而增强。谷氨酸钠浓度高于 15 mmol/L 时, 由于游离 NH_4^+ 的出现, 产氢活性受到抑制, 但却明显刺激细胞的生长。在标准状况下, 该菌株的最大产氢速率可达 $19.4 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

关键词 乙酸, 光合放氢, 沼泽红假单胞菌

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0486-06

光合细菌从有机物产生分子氢是由固氮酶催化的依赖光的厌氧电子传递过程。近年来, 光合细菌的光合作用和固氮作用研究取得了可喜成就^[1,2]。而由光合作用和固氮作用联合催化进行的光合细菌的放氢研究则有待深入。将太阳能利用、氢能开发和有机废水净化处理有机结合的制氢技术, 被认为是一种低成本、低能耗的氢能生产绿色技术^[3,4]。乙酸是微生物代谢, 尤其是有机物厌氧发酵中的一个重要中间产物, 它可被几乎所有的紫色非硫细菌类群所同化, 但被认为不是球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 和荚膜红杆菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 的有效氢供体, 或认为其产氢效率较低^[5-9]。为此, 研究开发能利用乙酸光合放氢体系, 探索合理可行的产氢技术路线, 将为有机废水光合产氢提供理论依据。沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 菌株的乙酸产氢鲜有研究。作为产氢研究中重要的限制性影响因素——接种物来源, 氢供体和谷氨酸浓度对细胞生长、产氢和培养基 pH 的影响, 氧浓度对产氢的影响等还未见系统报道。本文就此展开

了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

Z 试验菌株为本实验室分离所得。以本实验室保存的 *Rhodospseudomonas palustris* 为对照^[10], Z 菌株鉴定为沼泽红假单胞菌。该菌株可在 20 ~ 40℃ 范围内, 利用乙酸、丙酸、丁酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、苯甲酸等有机物生长。细胞内光合色素组分齐全, 可有效吸收太阳光谱中的可见光和红外光。

1.2 培养基和培养条件

生长培养基 (GM)^[11] 含有 1.64 g/L 乙酸钠和 1.32 g/L 硫酸铵。光照厌氧培养在 2000 ~ 3000 lx, 30℃ 条件下。产氢培养基 (HM) 用谷氨酸钠代替 GM 中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。调 pH 至 6.8。作为接种物, 其培养条件同 GM。光照强度和培养温度等条件详见文中说明。每个处理均作 2 次重复。

1.3 产氢试验

离心收集细胞菌体, 重新悬浮于无碳源和氮源

的新鲜培养基中。然后接种于盛有 100 mL 产氢培养基的 130 mL 玻璃瓶中,用加有铝盖的橡皮塞密封。按照下列装置连接后,置于卤钨灯下光照培养。以排水取气法定时记录产氢量。产氢量均以标准状况下气体的体积表示。氢含量用 103 型气相色谱仪测定。检测器为热导池,氩气为载气。以外标法计算氢气的浓度和含量。

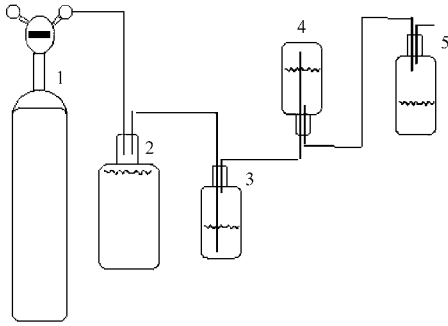


图 1 产氢试验装置

Fig. 1 The system configuration for hydrogen photoproduction

1. Argon gas ; 2. Photobioreactor ; 3. CO₂ absorption container ;
4. Hydrogen gas collector ; 5. H₂ volume measuring bottle

1.4 细胞生长的测定

在 Spectra Max 190 型微孔板分光光度计上测定波长 660nm 处的吸光度值。

1.5 有机酸分析

用 GC9800 型气相色谱仪分析。检测器为 FID, 氮气为载气。进样量 2 μ L。

1.6 NH₄⁺ 测定

离心样品,收集上清液,在室温下添加 NaOH 后,马上插入 PNH₃-1 型电极(上海大中仪器厂),搅拌 5min 后读数。从标准曲线上查找相应的 NH₄⁺ 浓度。

2 结果

2.1 不同种类供氢体中细胞生长与产氢能力的比较

选用有机酸钠盐及葡萄糖作为电子供体进行细胞生长与产氢能力测试(表 1)。结果表明,乳酸、苹果酸、琥珀酸和柠檬酸是该菌株生长合适底物,培养液 pH 由 6.8 很快上升至 7.5~8.0,但产氢速率较低。丙酮酸也是该菌生长的良好碳源和供氢体,其产氢速率也较低。但培养液 pH 几乎一直维持在中性。以葡萄糖和葡萄糖酸作为氢供体,反应体系约在 16 h 即出现产气现象,pH 很快由 6.8 分别降至 6.5 和 4.5 左右,这可能是底物降解产酸所致。虽有大量气体产生,但氢气含量较低。只有在乙酸和丁

酸氢供体产氢体系中,该菌株表现出高产氢活性,其产氢速率分别为 13.5 mL(L \cdot h)和 10.6 mL(L \cdot h)。由此可见,供氢体种类在某种程度上直接影响着产氢活性的高低,选择廉价易得氢供体用于产氢可降低成本。该菌株能利用乙酸和丁酸产氢的特性具有潜在应用价值。

表 1 *Rhodospseudomona palustris* 在不同有机物中的生长与产氢能力比较

Table 1 Hydrogen photoproducity and cell growth of *R. palustris* in various organic substrates under the standard conditions

Hydrogen donor (20 mmol/L)	Rate of H ₂ production (mL \cdot L ⁻¹ ·h ⁻¹)	OD _{660nm} (120h)	pH (120h)
Formate	4.9	0.963	8.54
Acetate	13.5	1.213	7.81
Propionate	4.4	0.686	7.76
Butyrate	10.6	0.872	7.0
Pyruvate	2.7	1.182	7.0
Lactate	4.0	1.280	8.02
Malate	3.5	1.238	7.55
Citrate	1.7	0.859	7.48
Succinate	4.4	1.293	8.06
Gluconate	8.8	0.580	6.43
Glucose	7.5	0.948	4.46

2.2 生长与产氢动力学

为探求批式培养中该菌株光合放氢与生长的关系,首先对乙酸体系进行了生长与产氢动力学研究。结果表明(图 2),当培养基起始 OD 为 0.2~0.3、种子来源于 HM 72 h 预培养物,细胞很快进入对数生长期,产氢现象则出现于接种 30 h 后。产氢高峰发生在 36~96 h 间。96 h 后产氢速率开始下降,但总产氢量仍呈增加趋势。

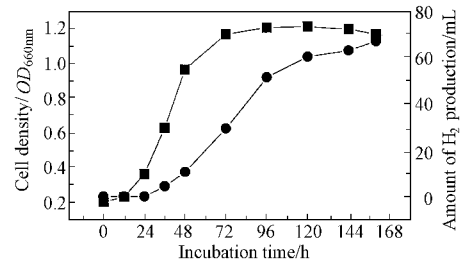


图 2 *R. palustris* Z 菌株生长与产氢动力学
Fig. 2 Dynamics of hydrogen production(●) and cell growth(■) of *R. palustris*

2.3 种子培养基和菌龄对产氢的影响

以 GM 预培养 18 h、48 h、65 h、72 h、96 h、120 h,及 HM 预培养 24 h、65 h(以 hy24h 和 hy65h 表示)的

细胞做为种子来源,研究了接种物来源和菌龄对产氢的影响。培养基起始 OD 为 $0.2 \sim 0.3$ 。从图 3 明显看出,以 18 h 和 48 h 菌龄细胞作为接种物,产氢量低,延滞期也较长 48h 后才开始产氢。以 65 h、96 h 和 120 h 菌龄细胞作为种源,产氢量明显提高,产氢延滞期也缩短,24 h 即开始产氢,反应体系总产氢量基本一致。与 18 h 和 48 h 接种物相比,高菌龄接种物的产氢量和产氢效率增加近 50% 左右。与 GM 预培养物相比,来自 HM 同样菌龄细胞的产氢延滞期明显缩短,但产氢能力基本处于同一水平。

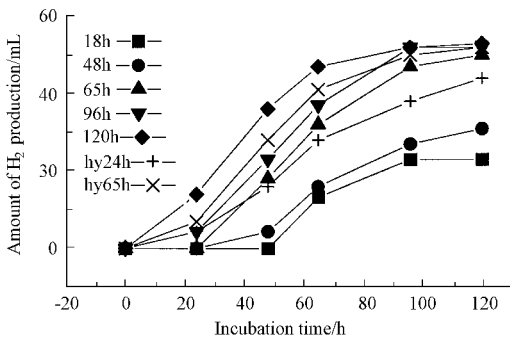


图 3 种子培养基和菌龄对产氢的影响

Fig. 3 Influence of medium composition and preculture time on hydrogen production

2.4 接种量对产氢的影响

调整种子液 OD 为 $0.5 \sim 0.6$, 分别进行 1%、5%、10%、15%、20% 接种量的产氢研究。结果表明(图 4), 接种量直接影响菌株产氢活性。随接种量增加, 产氢量显著提高, 产氢延滞期也明显缩短。以 10% 接种, 产氢量在 96h 后仍呈上升趋势。故 10% 接种量为本实验条件下合适的选择。

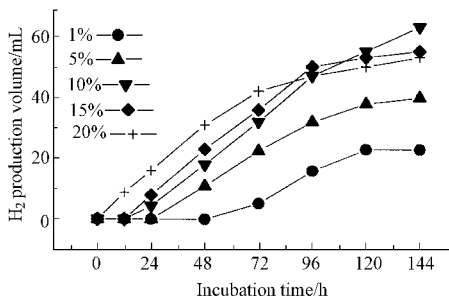


图 4 接种量对产氢的影响

Fig. 4 Effect of inoculation volume on hydrogen production

2.5 温度对菌体生长和产氢的影响

实验设置 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 37°C 和 40°C 6 种测试温度。培养 120 h 后测定 OD 和产氢量。由图 5 可知, 在光照强度 5000 lx , 温度 $20 \sim 37^\circ\text{C}$ 范围内, 细胞的生长和产氢活性均随温度的上升而上升。

$30 \sim 37^\circ\text{C}$ 范围内, 细胞生长旺盛, 产氢量也逐渐接近峰值, 从而表现出生长与产氢温度的一致性。 40°C 条件下, 接种初期细胞生长良好, 也具有产氢能力。但细胞在较高温度和光照下长时间培养后, 光合色素会发生“漂白”, 产氢速率为零。最适生长温度和产氢温度基本一致的特性可大大简化工艺, 实用性较强。

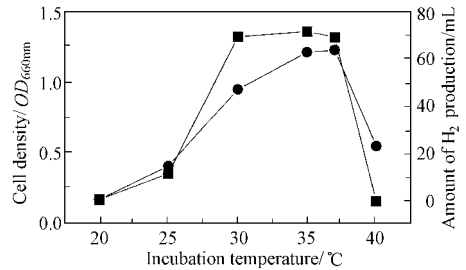


图 5 温度对生长和产氢的影响

Fig. 5 Influence of temperature on cell growth and hydrogen production

■ Cell density ; ● Amount of H_2 production

2.6 光照强度对产氢的影响

实验设置 1000 lx 、 3000 lx 、 4000 lx 、 5000 lx 、 5500 lx 、 6000 lx 、 10000 lx 和 14000 lx 8 种光照强度。起始 OD 为 $0.2 \sim 0.3$ 。接种物为 65 h 菌龄细胞。结果表明(图 6), 在温度为 35°C , 光强为 $2000 \sim 6000 \text{ lx}$ 范围内, 细胞产氢量随光强的增加而提高。最适光照强度范围为 $4000 \sim 9000 \text{ lx}$ 。大于 9000 lx 光强时, 产氢量开始下降。较高温下的 14000 lx 的光照强度成为光合放氢的限制性条件。光合细菌的光合放氢是一种与光合磷酸化偶联的固氮酶催化过程。当光强超过极限值时, 光合器官吸收了超过光合作用所需要的能量会引起 PSI 系统的过量激发, 使光合效率下降, 产生光抑制。

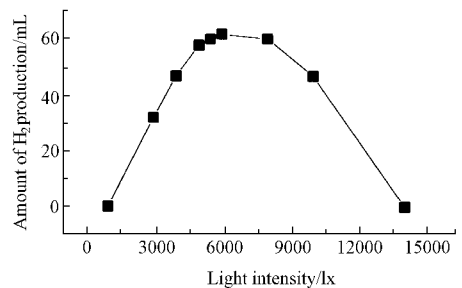


图 6 光照强度对产氢的影响

Fig. 6 Effect of light intensity on hydrogen production

2.7 氧对产氢的影响

实验设置 5 个梯度, 130 mL 容器分别分装培养

基 10 mL、20 mL、50 mL、70 mL、100 mL。结果表明(图 7),微量氧的存在有助于提高产氢活性。装样量为 10 mL 时无产氢现象。30 mL 的装样量,产氢活性有提高,但产氢延滞期较长,总产氢量较低。70 ~ 120 mL 的装样量,细胞产氢延滞期明显缩短,产氢量显著提高。而当反应器完全充满培养基时,产氢起始较晚,总产氢量也稍有下降。这可能是因为微量氧的存在使细胞以呼吸的方式代谢产生更多的 ATP。当氧耗尽细胞进入厌氧状态产氢时,代谢多余的能量则用于产氢。但氧可阻遏或钝化固氮酶,所以含氧高的反应体系不出现产氢现象。

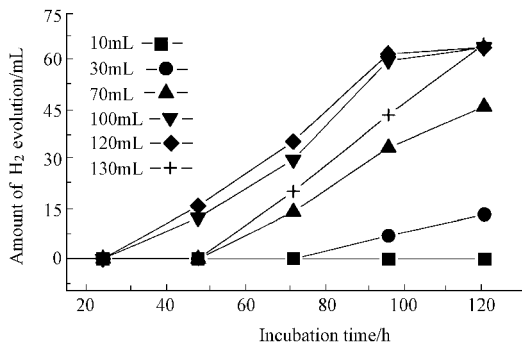


图 7 氧对产氢的影响

Fig.7 Effect of oxygen on hydrogen production

2.8 供氢体浓度对生长、产氢和 pH 的影响

设置乙酸钠浓度分别为 10 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L、70 mmol/L 和 100 mmol/L,谷氨酸钠浓度为 5 mmol/L 进行了基质利用动力学、产氢动力学和生长动力学测定。结果表明(图 8,9),当供氢体浓度为 10 mmol/L 时,底物在 72 h 内完全消耗,表现为 pH 的快速上升,生长速率和产氢速率均因底物的耗尽和 pH 的增加而下降。当乙酸钠浓度在 30 ~ 50 mmol/L 之间时,反应体系表现出最高产氢活性,产氢速率的增加与底物消耗速率呈正相关关系。但 30 mmol/L 的乙酸钠对培养液的 pH 影响大于 50 mmol/L, pH 上升速度明显,细胞生长速率在 120 h 也开始下降,这可能是由于底物完全消耗所需要的时间不同所致。大于 70 mmol/L 的乙酸钠添加量成为该体系产氢的限制性影响因素,但却促进了细胞的生长,表现在培养 96 h 后底物消耗速率曲线有明显下降。由此可知,30 ~ 50 mmol/L 的乙酸钠是该反应体系产氢适宜底物浓度。为保证反应体系正常产氢,应控制底物浓度来调整细胞还原力在产氢与生长之间的分配,达到持续产氢的目的。也可通过调整 pH 来连续产氢。

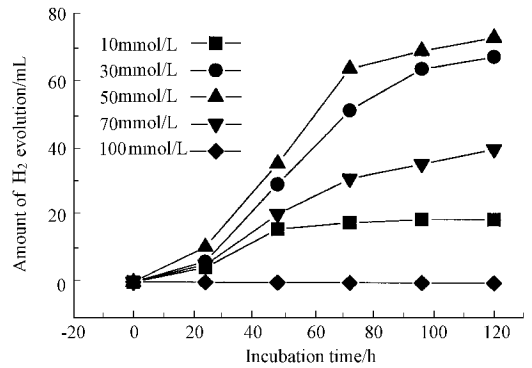


图 8 不同浓度乙酸钠对产氢的影响

Fig.8 Effect of acetate concentration on hydrogen evolution

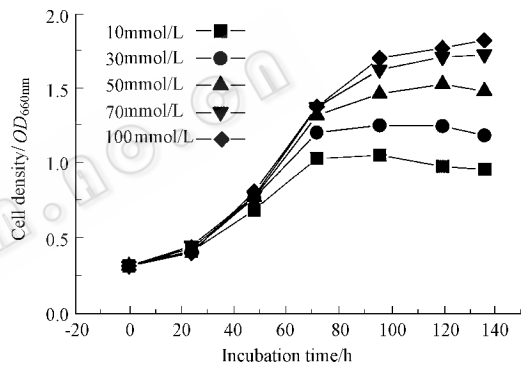


图 9 不同浓度乙酸钠对细胞生长的影响

Fig.9 Effect of acetate concentration on cell growth

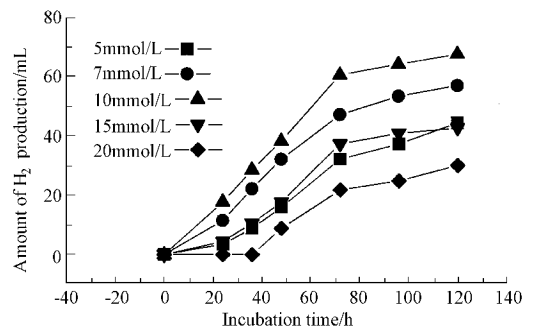


图 10 不同浓度氮源对产氢的影响

Fig.10 Influence of glutamate concentration on H₂ evolution

2.9 不同氮源浓度对生长与产氢的影响

设置谷氨酸浓度分别为 5 mmol/L、7 mmol/L、10 mmol/L、15 mmol/L 和 20 mmol/L,乙酸钠浓度为 30 mmol/L 研究了氮源浓度对细胞生长和产氢的影响。

结果表明(图 10) 5 ~ 10 mmol/L 范围内的谷氨酸浓度为产氢适宜浓度,在这一范围内,随氮源浓度的增加,产氢活性和产氢量均有明显增加,即使是在产氢高峰过后,产氢量仍然在缓慢增加。与此同时,细胞得率也随氮源浓度的增加而增加。当谷氨酸浓度为 15 mmol/L 时,产氢体系中出现了游离 NH_4^+ , NH_4^+ 的出现会抑制固氮酶活性,从而使依赖于固氮酶的光放氢作用受到抑制,表现为产氢活性开始下降,但细胞生物量却显著增加。

3 讨 论

光合细菌的光合放氢是在光合磷酸化提供能量和有机物降解提供还原力情况下,由固氮酶催化完成。所以,但凡影响光合磷酸化和固氮反应的因素均可调控光合放氢过程,诸如 NH_4^+ 、光照强度、供氢体种类、温度、pH 等。pH 对产氢的影响在所有产氢微生物几乎是一致的。供氢体种类对产氢的影响因种而异,这可能与菌株选择吸收不同有机物能力及代谢途径有关。虽然不同菌株对光照强度和温度有选择性,但选育生长和产氢所需光照和温度一致的产氢菌株可大大简化工艺。除此之外,接种物来源、菌龄和接种量也是影响菌株产氢活性的重要因素。来自 GM 高菌龄和来自 HM 对数期菌龄的接种物,可使产氢延滞期明显缩短,显著提高产氢活性和总产氢量。这是因为菌龄和接种量直接影响菌株的生理状态、生长状态和代谢产物组成。这一点往往在许多研究中被忽略。本文研究还发现,菌龄对光照强度的敏感性问题和产氢活性有直接关系。对于同一菌龄的接种物,光照强度成为产氢的限制性影响因素。微量氧的存在有助于提高产氢活性。另外,培养基中供氢体和氮源的浓度是产氢的主要影响因素,是产氢工艺中应重点探讨的问题。由此看出,光合细菌的光合放氢和调控精密而复杂。由于产氢是机体营养不平衡条件下产物,所以,对其产氢条件的探求有其独特性和复杂性,单从某种因素着

手进行研究并不能完全反映真正的产氢代谢活动。本文从生物因素和环境因子两方面进行了乙酸光合放氢条件的研究,旨在为富含乙酸的有机废水光合产氢技术提供合理可行的工艺参数和理论依据。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Jurgen O, Gsine K. Control of nitrogen fixation by oxygen in purple nonsulfur bacteria. *Arch Microbiol*, 1996, **165**: 219 ~ 225
- [2] ZHANG C X(张纯喜), FAN H J(樊红军), LI L B(李良璧), KUANG T Y(匡廷云). Studies on primary reaction of photosynthetic bacteria. *Science in China(中国科学)*, 1999, **29**(3): 276 ~ 280
- [3] SUN Q(孙琦), XU X Y(徐向阳), JIAO Y W(焦杨文). Studies on the conditions of hydrogen-photoproduction by photosynthetic bacteria. *Acta Microbiol Sinica(微生物学报)*, 1995, **35**(1): 65 ~ 73
- [4] LIU S J(刘双江), SUN Y(孙燕), YANG H F(杨惠芳), ZHOU P J(周培瑾). Hydrogen photoevolution by growing cultures of *Rhodospseudomonas* sp. H. *Microbiology(微生物学通报)*, 1994, **21**(5): 259 ~ 263
- [5] Wakayama T, Nakada E, Asada Y, Miyake J. Effect of light /dark cycle on bacterial hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* RV. from hour to second range. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, **84** ~ 86: 431 ~ 440
- [6] Hillmer P, Gest H. H_2 Metabolism in the photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*: H_2 production by growing culture. *J Bacteriol*, 1977, **129**(2): 724 ~ 731
- [7] Nandi R, Sengupta S. Microbial production of hydrogen: An overview. *Crit Rev Microbiol*, 1998, **24**(1): 61 ~ 84
- [8] Murooka Y, Imanaka T. *Recombinant microbe for industrial applications*. New York: Marcel Dekker Inc, p771, 1994
- [9] Barbosa M J, Rocha J M, Tramper J, Wijffels R H. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *J Biotechnol*, 2001, **85**(1): 25 ~ 33
- [10] ZHANG Z M(张肇铭), YANG S R(杨素萍), ZHAO C Q(赵春贵). Isolation and identification of *Rhodospseudomonas palustris*. *Journal of Shanxi University(山西大学学报)*, 1992, **15**(4): 379 ~ 385
- [11] YANG S R(杨素萍), ZHANG Z M(张肇铭), ZHAO C Q(赵春贵). Isolation and identification of *Rhodospseudomonas viridis* and *Rhodospseudomonas sulfoviridis*. *Acta Microbiol Sinica(微生物学报)*, 1995, **35**(2): 91 ~ 96

Hydrogen Photoproduction from Acetate by *Rhodospseudomonas palustris*

YANG Su-Ping^{1, 2} ZHAO Chun-Gui² LIU Rui-Tian¹ QU Yin-Bo^{1*} QIAN Xin-Min¹

¹(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

²(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Based on the characteristics of metabolism of photosynthetic bacteria and the major kinds of organic compounds pro-

duced in wastewater degradation, eleven kinds of organic compounds were chosen for hydrogen photoproduction using *Rhodospseudomonas palustris* Z strain. The maximal volumetric H₂ productivity was obtained using acetate as the sole carbon source and electron donor. The kinetics of cell growth and H₂ liberation, and the influences of several major limiting factors on photoevolution of H₂ were examined using acetate as carbon source. It was shown that hydrogen production was partially correlated with cell growth. The medium composition of the preculture, the preculture time, and inoculation volume were confirmed to have big effects on hydrogen photoevolution. The time delay of H₂ production was evidently shortened using the inoculum of late exponential growth phase or stationary phase using ammonium sulfate as nitrogen source or with the inoculum of middle exponential growth phase using glutamate as the nitrogen source. The identity of temperature and light intensity for H₂ evolution and cell growth has significant potential application in the technology of splitting organic acid into H₂ by photosynthetic bacteria. The concentrations of acetate and glutamate in the medium affected hydrogen photoevolution and cell growth significantly. The productivity of H₂ increased with substrate concentrations when substrate concentrations of sodium acetate and sodium glutamate were lower than 70 mmol/L and 15 mmol/L, respectively. Hydrogen production was inhibited but the cell growth was faster when the concentration of sodium glutamate over 15 mmol/L due to forming free NH₄⁺. The highest rate of hydrogen production was 19.4 mL·L⁻¹·h⁻¹ using 30 mmol/L of sodium acetate as hydrogen donor under the standard conditions, respectively. The optimal conditions for hydrogen production were 35 ~ 37 °C, 6000 ~ 8000 lx and pH 7.3 ~ 8.3. The effects of oxygen and inoculation volume on photoproduction of hydrogen were also discussed.

Key words acetate, hydrogen photoproduction, *Rhodospseudomonas palustris*

Received: 01-23-2002

* Corresponding author. Tel: 86-531-8564429; Fax: 86-531-8565234; E-mail: Lifezds@sdu.edu.cn