

氢细菌的研究和应用

居乃琥

(上海市工业微生物研究所, 上海)

氢细菌是一类化能营养型的兼性自养微生物。它能以二氧化碳为碳源, 无机物为氮源, 通过氧化氢来获得能量。近年来, 由于能源开发和环境保护的需要, 氢细菌的研究和应用受到人们越来越大的重视。本文拟就有关问题作一概要介绍。

氢细菌的一般特性

早在 1839 年, Saussure 就发现氢气在土壤中的消失现象。本世纪初 Kaserer 和 Niklewski 分别发现这是由细菌引起的。Kaserer 利用 H_2 、 O_2 和 CO_2 的混合气体, 最先从自然界分离出一株氢细菌, 当时命名为泛养芽孢杆菌 (*Bacillus pantotrophus*), 后来一般称为泛养氢单胞菌 (*Hydrogenomonas pantotropha*)。由于氢细菌需要培养在处于氢气爆炸限度内的上述混合气体中, 因此人们称它为“爆鸣气细菌 (Knallgasbakterien)”。这类细菌在自然界分布相当广泛。

一、分类

关于氢细菌的分类, 以往主要从营养特性考虑, 所以将能利用氧化 H_2 的能量来同化 CO_2 的细菌都归入氢单胞菌属。近来发现氢细菌是兼性自养菌, 因此在《伯杰氏鉴定细菌学手册》第八版中, 已将氢单胞菌属取消, 该属中各个种, 根据形态学和生理学特性, 被归在假单胞菌属、产碱菌属、黄杆菌属、副球菌属、棒杆菌属、分枝杆菌属、节杆菌属、诺卡氏菌属等属中。不过目前有些研究工作者仍沿用氢单胞菌这个名称。

大多数氢细菌是革兰氏染色阴性菌, 少数是阳性菌。

二、分离和选育^[1]

氢细菌可在琼脂平板上直接分离, 但一般

需用无机合成培养基增菌培养后才能分离到。增菌培养时将盛培养基和分离样品的容器放在密封容器内, 通入 $H_2(70\%)$ 、 $O_2(20\%)$ 和 $CO_2(10\%)$ 的混合气体, 在 $30^\circ C$ 培养, 也可进行振荡培养。

从自然界分离的氢细菌不一定能满足人们的应用需要, 常需要进行诱变选育。例如 Schlegel 等^[2] 用亚硝酸盐和 1-亚硝基-3-硝基-甲基胍处理氢单胞菌 H16 菌株, 获得了少产或不产无营养价值的聚 β -羟基丁酸的突变菌株。还有人^[3,4] 诱变选育了能积聚异亮氨酸和缬氨酸的突变菌株。

三、培养

培养氢细菌的关键问题是使其在较短时间内生成较多的菌体。为此必须采用适当的培养基、培养设备和培养方法。

(一) 培养基成分^[1,5]

氢细菌的营养需要简单, 除 H_2 、 O_2 、 CO_2 三种气体外, 只须再在培养基中加入某些无机盐, 就能很好地生长。无机盐中, 需要量在常量范围内的有 NH_4^+ (或 NO_3^-), PO_4^{3-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Fe^{2+} (或 Fe^{3+}) 等; 在微量范围内的有 Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} 和 Co^{2+} 等。一般用 CO_2 -碳酸盐缓冲体系维持 pH 在 6.5—7.5。 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 等离子对氢细菌菌体的增长影响最大。

一般氢细菌不能直接利用气态氮。但有人曾从自然界分离到有固氮能力的氢细菌, 并提出了新的培养方法: 以 CO_2 为碳源, 以空气中的 N_2 为氮源, 电解水供给 H_2 和 O_2 , 再供给无机盐即可培养。但目前固氮氢细菌的生长速度还比较慢。

在培养初期, 菌体浓度低, 生长停滞期较

长,如加入少量糖、有机酸、氨基酸等,可大大缩短培养时间^[5]。

至于 H₂、O₂、CO₂ 的混合比例,目前认为当 H₂:O₂:CO₂ = 4:1:1 时能量利用效率最高^[5]。但实际应用时常将 H₂ 的比例大大提高,为 6:2:1 到 16:3:1。这是因为高压的氧会抑制氢细菌的生长。在培养初期尤其如此。因此必须在菌体生长的不同阶段作适当调整。

在培养基中,气体的溶解度受 pH 影响。中性 pH 时,CO₂ 在水中的溶解度很大,但 H₂ 和 O₂ 在水中的溶解度却很小,成为限制菌体生长速度的关键因素。除溶解度外,还应考虑到物质移动的容量系数以及气相中气体的分压。

(二) 培养温度

绝大多数氢细菌是中温菌,生长温度为 25—38℃,最适为 30—35℃。McGee^[6] 等与 Emnova 等^[7] 分别从自然界分离到生长适温为 50℃ 的嗜热氢单胞菌 (*H. thermophilus*)。儿玉彻等分离到的嗜氢嗜热假单胞菌 (*Pseudomonas hydrogenthermophila*) 和自养嗜热黄杆菌 (*Flavobacterium autothermophilum*) 可在 50℃ 生长,前一种菌据称是所有同化 CO₂ 微生物中生长最快的^[8]。

(三) 培养设备

由于气体供应速度可能成为氢细菌生长的限速因子,因此设备一定要保证供应尽可能多的气体。然而迄今未见专用设备。Шмелев-Шампанов 等^[9] 设计了一种喷射式的发酵装置(见图 1),总体积为 10 升,当以 2.0—4.5 克(干重)/升·小时的菌体生长速度培养氢细菌时,菌体浓度可高达 51 克(干重)/升。

(四) 连续培养时的培养特性^[1,5]

这方面的报道还不太多。最近有人在气体恒化器内连续培养产碱杆菌,发现当改变 H₂/O₂ 克分子比时,菌体对 O₂ 计算的得率是恒定的,而对 H₂ 计算的得率却随之改变。当 H₂/O₂ 克分子比在 3.6 附近,而 CO₂/O₂ 克分子比在 0.4 附近时,各种气体的吸收效率最高,可达 80%。

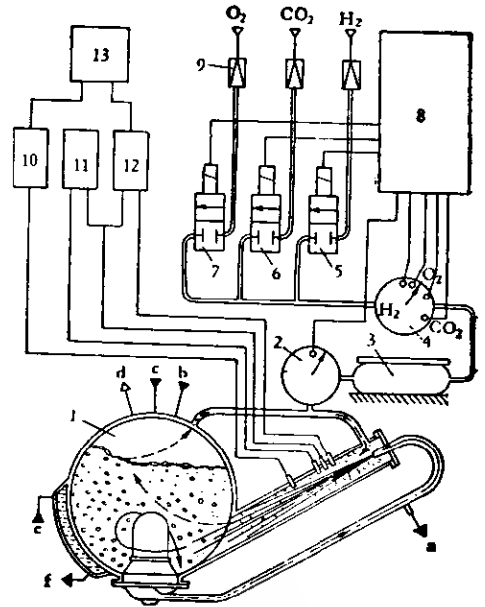


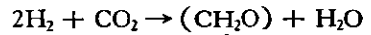
图 1 喷射式连续培养设备

1. 培养罐, 2, 4. 气体流量计, 3. 贮气罐, 5, 6, 7. 转换阀, 8. 断流, 9. 节流阀, 10. pH 控制器, 11. Eh 控制器, 12. 氧分压控制器, 13. 自动记录仪; a. 采样器, b. 氨水入口, c. 进料口, d. 气体出口, e. f. 接恒温器。

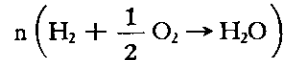
四、生长曲线和生长过程中的物质平衡^[5,10,11]

一般氢细菌在对数生长期结束时菌体浓度可达 10—12 克/升(干重)。Шмелев-Шампанов 用上述喷射式发酵装置培养真氧氢单胞菌 (*Hydrogenomonas entrophia*)^[9], 当装液量为 7 升时, 菌体浓度从开始的 8 克/升增加至 51 克/升。

氢细菌生长过程中, 菌体生物合成反应可表示为^[10,11]:

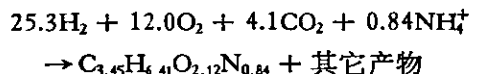


能量供应的反应式可表示为:



式中 n 值随菌体收得率的不同而异, 一般取 n = 2, 4 等。当 n = 4 时, 每生产 1 公斤菌体, 需消耗标准状态下的氢气 3.3 米³。菌体对 CO₂ 计的得率为 68%。

儿玉彻最近新分离到的嗜氢嗜热氢单胞菌的物质平衡反应式为:



菌体对 CO₂ 计的得率为 55%, 每生成 1

公斤菌体,需要 5.7 米³的氢。

氢细菌的发酵产品

一、单细胞蛋白^[1,5,10,11,12]

氢细菌与其它化能营养微生物相比,生长速度快,ATP 和菌体的收得率高^[5]。单细胞蛋白是氢细菌的主要发酵产品,目前研究得最多。氢细菌的菌体成分,与用糖质原料培养的普通细菌相比没有太大差别。氢细菌菌体蛋白质含量可高达 65.9—78.7%。蛋白质中赖氨酸、蛋氨酸含量高,亮氨酸和异亮氨酸也不少。蛋白质的消化率高达 93.8%,生物价值与酪蛋白相同。

氢细菌菌体内含核酸一般在 10% 以上,这不宜直接供人食用,但作饲料却无妨。关于氢细菌作为饲料的安全性,正在进行多方面的研究。由于培养基简单、精制菌体较容易,不会含多环芳烃等致癌物质,加之菌种不致病和无毒,估计氢细菌作为饲料应是安全可靠的。

二、氨基酸^[13]

氢细菌在自养条件下能产生多种氨基酸。如利用短杆菌属细菌 AJ3588 或分枝杆菌属细菌 AJ3589 两株氢细菌,可以产生 17 种氨基酸,产率从每升几毫克到几百毫克。

三、有机酸、维生素和多糖^[2,13]

利用 AJ3588 菌株和分枝杆菌属的 AJ3589 菌株还能生成丙酮酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸,5-酮葡萄糖酸等有机酸,以及维生素 B₁₂、叶酸等。有机酸产率可达每升几十毫克,维生素可达每升几十微克。

Трубацев 等^[14]报道,氢单胞菌 Z-1 菌株在发酵液中能积聚糖类,有机氮化物和脂肪。儿玉彻发现^[5],嗜氢单胞菌可在菌体外生成大量多糖类物质。后来发现它们是由鼠李糖组成的,对烟草花叶病毒有很好的防治效果。氢细菌产生某些生理活性物质的可能性,将是人们今后的研究课题。

氢细菌的代谢途径

氢细菌是兼性化能自养微生物,在自养条

件和异养条件下,代谢途径不大相同。

一、自养条件下对二氧化碳的同化

氢细菌在自养条件下同化 CO₂ 所需要的能量来自 H₂ 氧化时产生的化学能。同化 CO₂ 的机制与高等植物同化 CO₂ 基本相同;只是个别细节上有差异。这个过程是由一系列独立反应组成的循环反应,称 Calvin 循环。其中氢细菌和高等植物所特有的两个反应是:(1) 5-磷酸核酮糖在 5-磷酸核酮糖激酶的催化下生成 1,5-二磷酸核酮糖;(2) 1,5-二磷酸核酮糖在羧化歧化酶的催化下,和 CO₂ 反应生成 6 个碳原子的中间化合物,再水解成 2 分子的 3-磷酸甘油酸。3-磷酸甘油酸经过一系列反应又重新生成 5-磷酸核酮糖,完成整个循环。循环一次的结果是由 3 分子 CO₂ 合成 1 分子 3-磷酸甘油醛,同时消耗了 2 分子 ATP 和 6 分子 NADH₂。如合成己糖则需循环二次。

二、异养条件下的代谢

氢细菌在异养条件下也能生长,甚至生长速度更快。果糖是许多氢细菌可以利用的唯一糖类,此外还可利用有机酸、氨基酸等作碳源。

氢细菌对果糖的吸收是通过活性运输途径,而极少数利用葡萄糖的氢细菌突变株,对葡萄糖的吸收是通过细胞的扩散作用。果糖通过 Entner-Doudoroff 途径降解。降解产物再通过通常的中间代谢途径进一步被氧化。氢细菌在异养条件下的基本代谢途径与其它异养型的需氧细菌没有什么不同。在厌氧条件下,氢细菌能用硝酸盐作为 H₂ 的受体进行呼吸,能以果糖为碳源作为反硝化细菌生长。但在自养条件下,未发现氢细菌的厌氧生长。

三、自养型与异养型代谢的关系^[15]

当有 H₂ 和 CO₂ 时,氢细菌的主要代谢方式是自养型代谢。在自养型代谢中所需要的酶,有些是诱导酶,有些是组成酶。当有 H₂ 作为供体时,Entner-Doudoroff 途径中的酶受阻遏,果糖的利用受 H₂ 抑制。这种抑制作用是由 ATP,最终是由氢的氧化过程中产生的 NADH₂ 引起的。ATP 作为果糖降解途径中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的变构抑制剂起作用。这种调控机制

保证了在有 H_2 和 CO_2 存在时自养型代谢占主要地位。这时 H_2 和 CO_2 对有机物的消耗起了“节约”作用。

Aragno 等人^[5]从正常营养的淡水湖中,分离出一株好氧氢细菌,并详细地研究了其生理特性。他们发现,氢化酶是诱导酶,位于细胞内颗粒部分。在无细胞抽提物中,氢化酶对氧敏感。在自养条件下生长的细胞内,存在核酮糖二磷酸羧化酶,但在异养条件下生长的细胞中,却没有这种酶。氧和 D-葡萄糖酸阻遏氢化酶的合成,而柠檬酸、DL-乳酸和丙酮酸能刺激该酶的形成。上述结果表明,氢化酶合成的控制发生在促进转录水平上,组成氢化酶密码的 mRNA 有一个相当长的生活周期。D-葡萄糖酸通过 Entner-Doudoroff 途径被降解,有关的酶都是组成酶。戊糖磷酸途径和 Embden-Meyrhopf 途径的酶(除磷酸果糖激酶外)也都存在。氢并不抑制该菌的异养生长。

展 望

以氢和二氧化碳为原料生产发酵产品,与用粮食及其它原料相比,具有很多突出的优点。首先是氢和二氧化碳可由水和空气中获得,是取之不尽的原料,同时又可减少大气中二氧化碳含量,保护环境。目前这方面的研究主要集中在美国宇航局(NASA)、西德的 Göttingen 大学,以及日本和苏联的某些大学和研究单位。NASA 曾提出过一个利用氢细菌解决宇宙飞船

和空间站食物自给的方案^[5]。随着利用太阳能、原子能等电解水的成功,氢的价格将进一步降低;发酵设备也定会不断改良,以氢和二氧化碳代替粮食进行发酵,乃至“从空气和水中取得食物”的美好理想,将会成为光辉的现实。

参 考 文 献

- [1] Schlegel, H. G., R. M. Lafferty: *Adv. in Biochem. Eng.*, 1: 143—168, 1971.
- [2] Schlegel, H. G. R. M. Lafferty; I. Kreuss: *Arch Mikrobiol.*, 71: 283—294, 1970.
- [3] Hill, F. and H. G. Schlegel: *ibid.*, 68: 1—17, 1969.
- [4] Hill, F. and H. G. Schlegel: *ibid.*, 68: 18—31, 1969.
- [5] 兒玉徹: 石油と微生物, No. 18, 32—41, 1977.
- [6] McGee, J. M., L. R. Brown, R. C. Tischer: *Nature*, 214: 715—716, 1967.
- [7] Емнова, Е. Е. и Г. А. Заварзин: *Микробиол.*, 46: 405—408, 1977.
- [8] Goto, E., T. Kodama, Y. Minoda: *Agr. Biol. Chem.*, 41: 685—690, 1977.
- [9] Шмелев-Шампанов, О. А., Ю. В. Редикульцев, Я. В. Семенов и др.: *Микробиол.*, 45: 389—393, 1976.
- [10] Schlege., H. G.: *From Electricity via Water Electrolysis to Food, Fermentation Advances* (ed. by Perlman, D.) Academic Press, New York and London, 1969, pp. 807—832.
- [11] 養田泰治: 発酵と工業, 34 578—588, 1976.
- [12] Repaske, R., A. C. Repaske: *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 585—591, 1976.
- [13] 味の素株式会社: 公開特許公報, 昭50-42095, 1975.
- [14] Трубанев, И. Н., Г. С. Калацева, Р. И. Андреева и др.: *Микробиол.*, 40: 424—427, 1971.
- [15] Aragno, M. and H. G. Schlegel: *Arch Mikrobiol.*, 116: 221—229, 1978.
- [16] Foster, J. F. and J. H. Litchfield: *Biotechnol. Bioeng.*, 6: 441—456, 1964.