

磷酸缓冲液对丁酸梭菌 A69 酶活力及产氢量的影响

彭玉麟 史延茂

(河北省科学院生物研究所, 石家庄 050051)

摘要 分别在不同浓度 pH 7.0 的磷酸缓冲液中培养 *Clostridium butyricum* A69, 随着磷酸盐缓冲液浓度的增高, 培养过程中 pH 值下降减慢, 放氢氢酶较长时间地维持在较高的酶活水平上。而吸氢氢酶活力基本保持不变, 因而导致氢气产量有较大幅度的提高。在 10mmol 和 70mmol 磷酸盐缓冲液中, 最终氢气产量几乎相差一倍, 说明控制溶液的 pH 能大幅度地提高氢气产量。

关键词 丁酸梭菌; 氢酶

随着世界性能源供应的不足, 人们越来越重视再生能源的开发和利用。用微生物生产氢气就是其中一个重要的研究领域^[1-4]。氢气是一种无污染的理想能源, 用梭菌产氢具有十分明显的优点: 在工农业生产的废弃物中所存在的多种单糖、多糖都可以较高的速率发酵成酸、酒精、二氧化碳及氢气^[5,6]。丁酸梭菌能利用葡萄糖等多种碳源产生乙酸、丁酸、二氧化碳和氢气^[7,8]。在有铵盐存在的情况下, 丁酸梭菌产氢

主要是由于放氢氢酶的作用^[9]。对细菌来说, 在代谢过程中放氢是一种能量上的损失^[10], 因此丁酸梭菌还具有一种吸氢氢酶, 能够催化吸收氢气的反应, 将氢气再循环利用, 这两种酶活力的高低直接影响到丁酸梭菌的氢气产量, 为提高其氢气产量, 人们做过一些研究工作^[11-13], 但是对丁酸梭菌中两种氢酶活力的变化研究较

国家自然科学基金课题。

少。

为了解环境 pH 值对丁酸梭菌的两种氢酶活力的影响以及酶活力的变化与氢气产量的关系，我们研究了在不同浓度的磷酸盐缓冲液中丁酸梭菌的生长、两种氢酶活力的变化及其与氢气产量的关系。

材料和方法

(一) 菌株

丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) A69 由中国科学院微生物研究所提供。

(二) 培养基 (g/L)

葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 3, 柠檬酸钠 0.33, MgSO₄ 0.1, NaCl 0.1, Na₂MoO₄ 0.01, CaCl₂

0.01, MnSO₄ 0.015, FeSO₄ 0.015, 生物素 0.2 mg, 对氨基苯甲酸 2mg, 维生素 B₁ 2mg, 泛酸钙 2mg, 尼克酸 2mg, 盐酸吡哆醛 2mg, 维生素 B₁₂ 0.2mg, 叶酸 0.5mg, 酵母膏 1。

(三) 培养条件

培养基用 10—70 mmol 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 配制。10ml 螺口试管装 7ml 培养液，充氢气 5 分钟，使管内保持厌氧环境，于 35℃ 静置培养 24 小时作为接种物，然后按接种量 1:30 转接于 250ml 发酵瓶中，内装发酵液 200 ml，充氢气 10 分钟，使其处于厌氧环境，于 35℃ 水浴中培养，用 5ml 注射器定时取样测定，氢气用圆柱形玻璃筒收集^[4]。

(四) 分析方法

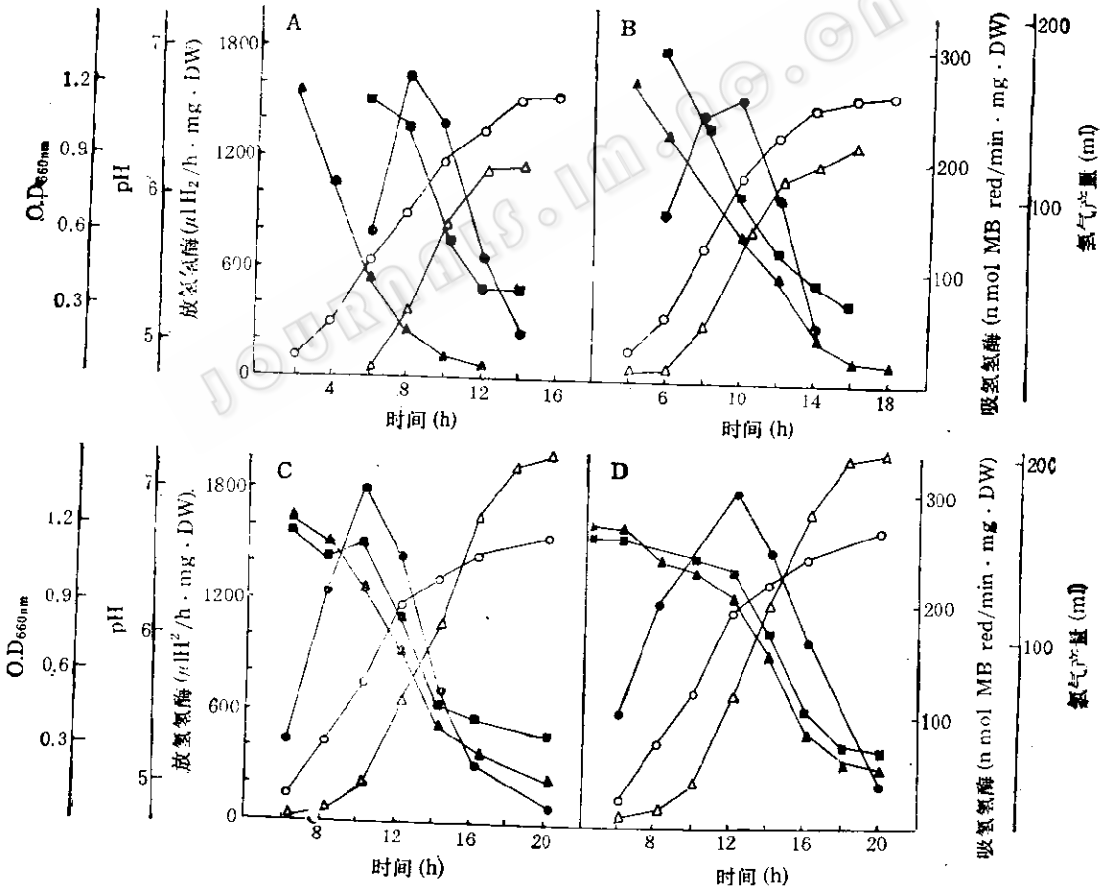


图1 不同浓度磷酸缓冲液中 *C. butyricum* 生长、氢气产量、pH 及酶活力变化曲线

A. 10mmol 缓冲液 B. 30mmol 缓冲液 C. 50mmol 缓冲液 D. 70mmol 缓冲液

●吸氢氢酶； ■放氢氢酶； ▲pH； ○生长曲线； △氢气产量

1. 吸氢氢酶用甲烯蓝还原法测定^[15]。
2. 放氢氢酶用氧化甲基紫精法测定^[15]。
3. 氢气用气相色谱法测定。热导检测器、柱温及检测温度为 50℃, 汽化室温度为室温, 色谱柱担体 porapak Q, 柱长 3 米, 载气 N₂ 30 ml/min, 用 250 μ l 气密注射器取气体 200 μ l, 注入气相色谱中, 用纯氢气作标准曲线。
4. 细胞干重用滤膜法测定^[16]。

结果与讨论

(一) 不同浓度的缓冲液对细菌生长的影响

将细菌分别培养在 10、30、50、70mmol 的磷酸缓冲液培养基中, 结果表明, 在不同浓度的磷酸缓冲液培养基中, 细菌的生长曲线都基本相似、在进入对数生长期约 16 小时后, OD_{660nm} 值均能达到 1.2 左右, 只是当缓冲液浓度较低 (10mmol 和 30mmol) 时, 细菌生长的延滞期稍短一些, 在培养 2 小时后即进入对数生长期, 而当缓冲液浓度较高 (50mmol 和 70mmol) 时, 在培养 4 小时后才进入对数生长期 (图 1), 说明该菌对高浓度的磷酸盐有一适应过程。

(二) 不同浓度缓冲液对两种氢酶活力的影响

丁酸梭菌 A69 在发酵过程中将葡萄糖转化为乙酸和丁酸, 导致溶液 pH 值的下降。而细菌本身的代谢, 尤其是各种酶的活力, 容易受到环境 pH 的影响。由图 1 可以看出, 放氢氢酶活力与溶液的 pH 值变化密切相关, 随着缓冲溶液浓度的提高, pH 值下降速度减慢, 同时放氢氢酶活力的下降也减慢。在 10mmol 磷酸缓冲液中, 在 12 小时内培养液 pH 值由 6.7 降至 4.8, 同时放氢氢酶活力由 1600 μ l H₂/h · mg · DW 降至 480 μ l H₂/h · mg · DW。在 30 mmol 磷酸缓冲液中, 在 4—16 小时的培养过程中 pH 值由 6.7 降至 5.0, 放氢氢酶活力由 1800 μ l H₂/h · mg · DW 降至 420 μ l H₂/h · mg · DW, 两条曲线下降斜率都明显变小。在 50mmol 磷酸缓冲液中, 在 4—20 小时的培养过程中 pH 值由 6.8 降至 5.0, 放氢氢酶活力由 1600 μ l H₂/h · mg · DW 降至 430 μ l H₂/h · mg · DW, 两

条曲线的变化都更为平缓。在 70mmol 磷酸缓冲液中, 20 小时的培养过程中 pH 值由 6.8 降至 5.1, 放氢氢酶活力由 1550 μ l H₂/h · mg · DW 降至 400 μ l H₂/h · mg · DW。由图 1 也可以看出, 在低浓度的缓冲液中, 细菌开始生长, 放氢氢酶活力就开始下降。而在 50 mmol 缓冲液中, 培养 10 小时后放氢氢酶活力才开始明显下降。在 70mmol 的磷酸缓冲液中培养 12 小时后, 放氢氢酶活力才开始明显下降, 也就是说, 随着缓冲液浓度的提高, 发酵过程中溶液 pH 值的降低速率减慢, 使细菌放氢氢酶活力较长时间地维持在一个较高的水平上。

吸氢氢酶的变化与放氢氢酶不同, 其规律都是由低→高→低, 大约在培养 8—12 小时后酶活力出现峰值, 并随着磷酸缓冲液浓度的提高, 峰值出现的时间有略往后推移的趋势, 在 10mmol 磷酸缓冲液中, 培养 8 小时后, 吸氢氢酶出现峰值, 而在 30、50 和 70mmol 的磷酸缓冲液中, 吸氢氢酶活力峰值出现的时间分别为 10、10、12 小时, 其最高酶活力也有所增加, 在 10mmol 和 30mmol 缓冲液中分别为 260 和 250 nmol MB red/min · mg · DW, 而在 50mmol 和 70mmol 缓冲液中为 300 nmol MB red/min · mg · DW。同时除了在 70mmol 的缓冲液中吸氢氢酶活力由最高值下降较慢一些外, 在其它不同浓度的缓冲液中, 吸氢氢酶活力变化曲线基本相同, 因此, 与放氢氢酶相比较, 吸氢氢酶活力的变化受 pH 值的影响较小。

(三) 不同浓度的缓冲液对氢气产量的影响

由图 1 可以看到, 提高缓冲液的浓度, 对提高氢气产量有明显作用, 在 10、30、50 和 70 mmol 的磷酸盐缓冲液中, 最终氢气产量分别为 118、130、188 和 218ml。由放氢氢酶和吸氢氢酶的变化可以看到这一结果是理所当然的, 因为吸氢氢酶活力受溶液 pH 值的影响不大, 而放氢氢酶的活力则随着溶液 pH 值的稳定较长时间地维持在较高的水平上。放氢氢酶所催化的反应导致丁酸梭菌 A69 产氢, 因此较高的放氢氢酶活力使得有较多的氢气产生。由

图1也可以看出,培养2—4小时细菌进入对数生长期后就开始产氢,细菌生长进入稳定期后停止产氢,在整个对数生长期细菌都是产氢的。随着培养基中磷酸盐缓冲液浓度的提高,细菌的对数生长期也逐渐延长,由10mmol磷酸缓冲液时的12小时延长到50mmol磷酸缓冲液时的16小时,因此,细菌产氢时间的增长也是氢气产量增高的另一原因。

要提高丁酸梭菌 A 69 的氢气产量就必须设法提高其放氢氢酶的活力,并尽量抑制吸氢氢酶的活力。由实验结果可以看出,溶液 pH 值的变化对放氢氢酶有较大的影响,在发酵过程中若能控制溶液的 pH 值,可以使放氢氢酶较长时间地维持在较高水平上,从而达到提高氢气产量的目的。

参 考 文 献

1. Stephen R H et al.: *Biotechnology and Bioengineering*

- 28: 585—602, 1986.
2. Leonard E Morten et al.: *Biochimie*, 60: 219—223, 1978.
3. Kidman A D et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 191: 173—176, 1969.
4. Kelley B C et al.: *FEBS Letters*, 8: 281—285, 1977.
5. Kellum R et al.: *J. Bacteriol.*, 160: 466—469, 1984.
6. Drake H L: *J. Bacteriol.*, 150: 702—709, 1982.
7. Gerhard Gottschalk: *Bacterial metabolism*, 182—188, Springer-Verlag New York Inc., 1979.
8. Henydrickx M et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 8: 239—244, 1986.
9. Peck H D JR et al.: *J. Bacteriol.*, 71: 70—80, 1955.
10. Michael W W Adams et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 594: 165—176, 1981.
11. Henydrickx M et al.: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 323—328, 1989.
12. Henydrickx M et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 9: 163—168, 1987.
13. Gogotov N et al.: *Mikrobiologiya*, 45: 28—32, 1976.
14. Vos P De et al.: *Biotechnology Letters*, 5: 69—74, 1983.
15. 史延茂等: *太阳能学报*, 12(4): 418, 1991.
16. Stevens P et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 8: 19—23, 1986.

EFFECT OF DIFFERENT PHOSPHATE BUFFER CONCENTRATIONS ON HYDROGENASE ACTIVITY AND HYDROGEN PRODUCTION OF *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* A69

Peng Yulin Shi Yanmao

(Institute of biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhang 050051)

Clostridium butyricum was incubated in 10m mol, 30 m mol 50m mol and 70m mol phosphate buffer medium (pH 7.0). With the high concentration buffer, the pH value decreased more slowly. The H_2 evolution hydrogenase kept on high activity level for a longer time, While the H_2 uptake hydrogenase kept constant. So more hydrogen was produced. The hydrogen production nearly doubled in 70m mol phosphate buffer than in 10m mol phosphate buffer. The result shows that to keep pH constant can increase the H_2 production of *C. butyricum*.

Key words *Clostridium butyricum*; Hydrogenase