

产氢菌的复合诱变选育及突变株 HCM-23 的产氢特性

宋 丽 刘培旺 袁月祥 闫志英 刘晓风 贺蓉娜 廖银章*

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘 要: 以厌氧产氢细菌 *Clostridium* sp. H-61 为原始菌株, 先后经亚硝基胍(NTG)、紫外(UV)诱变, 选育得到 1 株高产突变株 HCM-23。在葡萄糖浓度为 10 g/L 的条件下, 其产氢量为 3024 mL/L, 比原始菌株提高了 69.89%; 其最大产氢速率为 33.19 mmol H₂/g DW·h, 比原始菌株(19.74 mmol H₂/g DW·h)提高了 68.14%。经过多次传代试验, 稳定性良好。其发酵末端产物以乙醇和乙酸为主, 属于典型乙醇型发酵代谢类型。其最适产氢初始 pH 为 6.5, 最适生长温度为 36℃, 以蔗糖为最佳碳源。与原始菌株相比, 突变株 HCM-23 的产氢特性发生了改变, 如生长延滞期延长, 可利用无机氮源等。

关键词: 生物制氢, 复合诱变, 突变株, 产氢特性

Combined Mutation Breeding of H₂-producing Strain and Hydrogen Producing Characterization of a H₂-producing Mutant HCM-23

SONG Li LIU Pei-Wang YUAN Yue-Xiang YAN Zhi-Ying LIU Xiao-Feng
HE Rong-Na LIAO Yin-Zhang*

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, 610041)

Abstract: The fermentative H₂-producing strain *Clostridium* sp. H-61 was isolated from anaerobic sludge, was used as an original strain which was induced by NTG and UV for increasing and the hydrogen production ability. One of the highest efficient H₂-producing mutants was named as HCM-23 with its stable hydrogen production ability. which was measured in the batch culture experiments. With the condition of 10 g/L glucose, its cumulative hydrogen yield and hydrogen production rate was 3024 mL/L and 33.19 mmol H₂/g DW·h, 69.89% and 68.14% higher than that of the original strain, respectively. The terminal liquid product compositions showed that the mutant HCM-23 fermentation was ethanol type, while the original strain H-61 fermentation was butyric acid type. Varieties of parameters of hydrogen production fermentation studied, including time, carbon source, nitrogen source, glucose concentration, glucose utilization, initial pH and incubation temperature had been studied, indicated the optimum condition of hydrogen production for the mutant

HCM-23 as initial pH 6.5, temperature 36°C, and the favorite substrate was sucrose. The hydrogen production characters of the mutant and the original strain were different, such as, the growth lag phase and the utilization of inorganic nitrogen source, etc. This work shows a good application potential of NTG-UV combined mutation in the biohydrogen production. And the hydrogen production mechanism and metabolic pathway should be explored furthermore.

Keywords: Biohydrogen production, Compound mutation, Mutant, Hydrogen production characters

氢气是高效、清洁的新能源,受到世界各国的普遍重视。氢在燃烧时只生成水,不产生任何污染物,可以实现真正的污染物“零排放”。氢能的制备来自于矿石燃料、生物质和水。工艺主要有电解制氢、热解制氢、光化制氢、放射能水解制氢、等离子电化学法制氢和生物制氢等。除了生物制氢技术外,其它制氢技术都要消耗大量的化石能源,而且要在生产过程中造成环境污染。采用生物制氢技术,可减少环境污染,节约不可再生能源^[1,2]。在各种生物制氢方式中,微生物厌氧发酵产氢具有产氢能力高、产氢细菌生长速度快、底物利用广泛、系统易启动,操作管理简单方便等优点,比较适合工业生产,我国在这方面取得了较好的进展^[3,4]。国外学者对生物制氢也进行了较多的研究,Ueno等以制糖厂废水为底物,研究了在CSTR反应器进行连续流厌氧发酵制氢^[5],Han等利用食品残渣发酵产氢^[6]。而高效产氢菌种的获取是成为了厌氧发酵生物产氢研究的重要内容之一。

微生物的诱变选育方法有物理诱变、化学诱变和复合诱变,已有报道采用激光和紫外诱变选育高效产氢菌,卢文玉等采用激光诱变选育耐酸产氢菌产气肠杆菌^[7],任南琪等利用紫外诱变选育高效产氢菌^[8-10]。本文采用亚硝基胍和紫外诱变相结合的方法,对原始菌株*Clostridium* sp. H-61进行复合诱变,筛选得到1株产氢能力较高的突变株HCM-23,对其进行了遗传稳定性试验及产氢特性研究。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

原始菌株*Clostridium* sp. H-61是由本实验室取自四川大学荷花池淤泥,采用Hungate厌氧操作方法^[11]分离得到,是1株严格厌氧产氢细菌。分离和培养的培养基参照文献^[12],其中葡萄糖浓度为1%。均在厌氧条件(100%N₂)下,于35℃培养。菌的

分离筛选于厌氧管中进行,产氢特性的研究于装有25 mL液体培养基的厌氧瓶(50 mL)中培养,接种量为5%。

1.2 测定方法

氢气含量和液相末端产物的分析见文献^[13]。菌体浊度OD₆₀₀值的测定采用722型分光光度计测定。细胞干重(DW)的称量参照文献^[14]。pH值采用psH-25型pH计测定;剩余还原糖采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)测糖法^[15]。

1.3 诱变剂量及方法

1.3.1 菌悬液的制备:将活化的菌株H-61接种于盛有5 mL液体培养基的厌氧管中,振荡培养8 h后,加入5 mL新鲜的无菌无氧液体培养基继续振荡培养4 h~5 h,取出离心,弃去上清液,往沉淀中加入5 mL无菌水悬浮打匀,再离心并弃去上清液,最后往沉淀中加入5 mL无菌水制成菌悬液。

1.3.2 亚硝基胍诱变处理:精确称量20 mg亚硝基胍放入灭菌的小烧杯中,加入2 mL 40%的丙酮溶解,加入8 mL 0.1 mol/L pH 6.5的磷酸缓冲液,然后倒入制备好的菌悬液中,使亚硝基胍的终浓度为1 mg/mL,分别在0 min、10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min和70 min各取2 mL菌悬液,同时用磷酸缓冲液离心洗涤3次,定容至2 mL,然后稀释、滚管,黑暗中培养48 h后计数,计算亚硝基胍诱变的致死率和正突变率。

1.3.3 紫外诱变处理:选取上述经NTG诱变后产氢能力有显著提高且稳定的突变株,制成菌悬液。在暗室中,将9 cm直径的灭菌平皿放在磁力搅拌器上,使平皿与紫外灯的距离为28 cm,紫外灯功率为20 W,波长为253.7 nm。预热后,将5 mL菌悬液倒入平皿中,打开搅拌器开关,去掉平皿盖,分别于0 s、20 s、40 s、60 s、80 s、100 s、120 s、140 s和160 s时各取0.1 mL菌悬液,稀释、滚管,黑暗中培养48 h后计数,计算紫外诱变的致死率和正突变率。

2 结果与讨论

2.1 NTG 诱变筛选突变株

将亚硝基胍作用后的菌悬液分别稀释、滚管。其诱变效应如图 1(A)所示, 随处理时间延长, 致死率增大, 当处理 70 min 时致死率为 100%, 当处理 40 min 时获得最大的正突变率。从处理时间不同的滚管培养基上分别随机挑取 90 个菌落, 经过处理的菌株较原始菌株产氢能力增强, 对产氢量较高的 6 株进行复筛, 表 1 为 6 株菌的产氢能力比较及其稳定性, 可见经多次传代后, 突变株 HNTG-31、HNTG-48 和 HNTG-89 的产氢能力相对较稳定, 其中突变株 HNTG-31 的产氢量和最大产氢速率最高, 分别为 2381 mL/L 和 25.35 mmol H₂/g DW·h, 较原始菌株提高了 33.76% 和 28.42%, 因此将其作为 UV 诱变的出发菌株。

2.2 UV 诱变筛选突变株

将突变株 HNTG-31 作为出发菌株进行紫外诱变处理, 照射后的菌悬液分别稀释、滚管之后培养。如图 1(B)可知, 紫外线照射的致死率随照射时间的增加而增加, 照射 160 s 时, 致死率达到 99.7%, 照射 120 s 时获得最大的正突变率。从不同照射时间的滚管固体培养基上分别随机挑取 60 个菌落, 进一步以产氢量作为指标复筛, 其中有 8 株突变株的产氢量显著高于 HNTG-31, 表 2 为各突变株的产氢能力

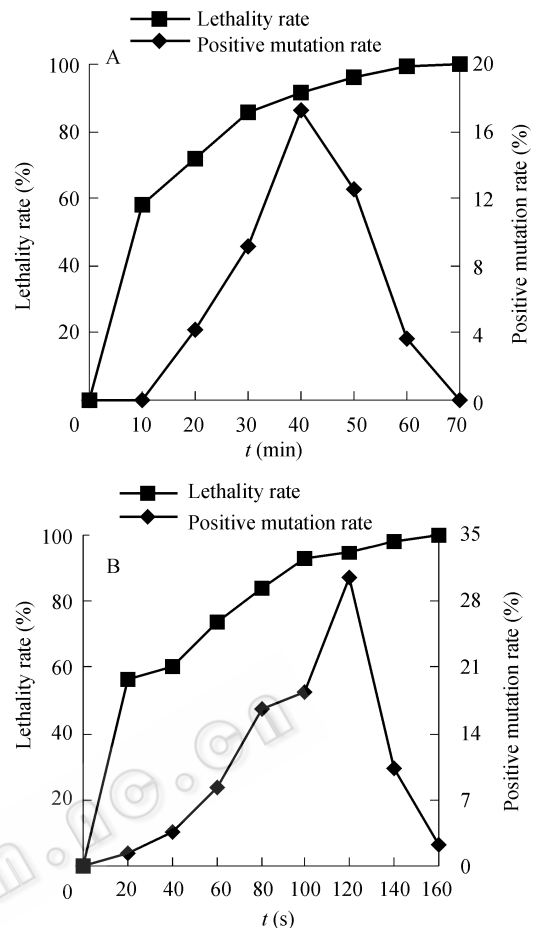


图 1 NTG(A)和 UV(B)诱变效应

Fig. 1 Impact of NTG(A) and UV(B) mutation

表 1 NTG 诱变后突变株的筛选及产氢能力稳定性
Table 1 Screen and stability of H₂-producing ability of the mutants after NTG mutation

Mutant	Hydrogen production ability of the first multiplex screen		Hydrogen production ability of the second multiplex screen	
	Y	Q	Y	Q
H-61	1780	19.74	1791	20.05
HNTG-11	2415	27.07	1907	20.19
HNTG-31	2381	25.35	2377	25.01
HNTG-48	2038	21.75	2019	21.07
HNTG-51	1943	20.98	1653	16.62
HNTG-89	2100	23.01	2104	22.85
HNTG-91	1855	20.52	1674	15.89

Note: Y: Cumulative hydrogen yield (mL/L); Q: Hydrogen yield rate (mmol H₂/g DW·h)

表 2 UV 诱变后突变株的筛选及产氢能力稳定性
Table 2 Screen and stability of H₂-producing ability of the mutants after UV mutation

Mutant	Hydrogen production ability of the first multiplex screen		H ₂ -producing ability of the second multiplex screen	
	Y	Q	Y	Q
HNTG-31	2370	25.35	2364	25.21
HCM-4	2433	26.03	1907	20.97
HCM-23	3024	33.19	3031	33.21
HCM-28	2701	28.12	2723	27.80
HCM-48	2811	30.81	2759	28.81
HCM-74	2616	27.54	2625	27.15
HCM-97	2535	26.38	2055	19.94
HCM-102	2750	29.84	2168	22.56
HCM-119	2580	27.57	2005	21.04

Note: Y: Cumulative hydrogen yield (mL/L); Q: Hydrogen yield rate (mmol H₂/g DW·h)

及其稳定性。其中, 突变株 HCM-23 产氢量和最大产氢速率最高, 分别为 3024 mL/L 和 33.19 mmol H₂/g DW·h, 比 HNTG-31 高出了 27.59% 和 30.93%, 比原始菌株 H-61 高出 68.89% 和 68.14%, 显示出较大的正突变性。并且经多次传代后其产氢能力几乎与第 1 代一致, 说明了突变株 HCM-23 有较好的稳定性。

2.3 突变株 HCM-23 和原始株 H-61 产氢特性的比较研究

2.3.1 培养时间对菌体生长及产氢的影响: 将对数期的菌液接种至液体培养基中培养, 每 4 h 取样, 测定产氢量和细胞量, 共培养 48 h, 绘制突变株 HCM-23 和原始菌株 H-61 的生长和产氢过程曲线 (见图 2)。结果表明, 原始株在 4 h 前处于延滞期, 4 h 后进入生长对数期, 而突变株在 8 h 前都处于延滞期, 8 h 后才进入对数生长期, 进入对数生长期后, 同时产氢量开始增加, 稳定期产氢量和细胞量为最大, 即产氢与菌体细胞的生长是同步的, 培养 48 h 后, 突变株的细胞量 OD₆₀₀ 为 1.634, 较原始菌株的 1.178 提高了 38.71%。在进入了稳定期之后, 突变株的产氢量仍然在继续增加, 从图 4 可以看出, 在培养 16 h 之后, 突变株产氢量的增加速率明显高于原始菌株。

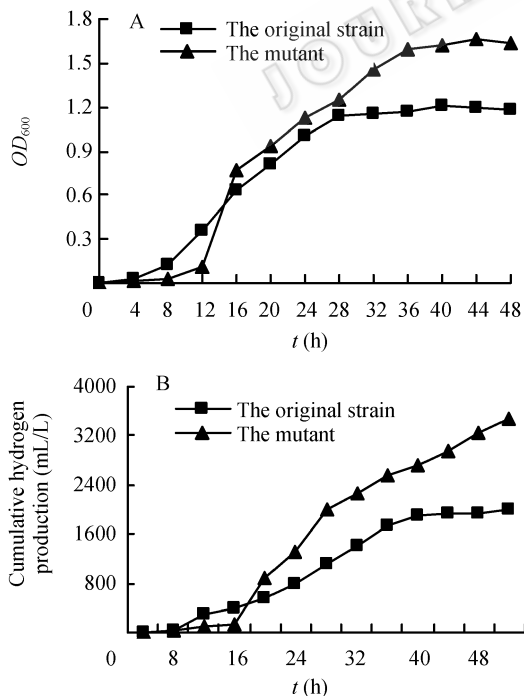


图 2 突变株(A)和原始株(B)的生长及产氢过程曲线
Fig. 2 Growth curve and Hydrogen producing profile of the mutant (A) and the original strain (B)

2.3.2 不同碳源和氮源对产氢的影响: 分别以不同的糖作为碳源, 其中淀粉浓度为 2%, 其他均为 1%, 测定其总产氢量, 结果如图 3(A)所示, 对不同糖的利用, 突变株产氢量均比原始菌株产氢量高; 此外原始菌株以葡萄糖作为碳源时产氢量最高, 而突变株则是以蔗糖为底物时产氢量最高, 为 3186 mL/L, 说明了突变株对蔗糖更易于利用。以 1% 的葡萄糖作为碳源, 分别以不同的氮源作为单一氮源, 其加入量以使 C:N 为 20 : 1, 结果如图 3(B)所示, 原始菌株和突变株皆能利用蛋白胨、牛肉膏、酵母粉等有机氮源, 其中均以酵母粉为最佳氮源, 原始菌株不能利用无机氮源, 而突变株则能利用无机氮源, 并有一定的产氢量, 这可能是因为诱变作用使其中的某些酶发生了改变。

2.3.3 葡萄糖浓度对产氢的影响以及葡萄糖降解率的比较: 配制不同葡萄糖浓度的液体培养基, 接种后培养 2 d, 测定氢浓度, 计算不同底物浓度条件下突变株和原始菌株的总产氢量。图 4(A)表明, 突变株在葡萄糖浓度为 1.5% 时可得到最高的产氢量 3015 mL/L, 此时产氢率为 2.66 mol H₂/mol 葡萄糖; 而葡萄糖浓度由 1.5%~2% 递增时, 浓度越高, 产氢率越低; 原始菌株在 1% 的葡萄糖浓度培养时, 得到

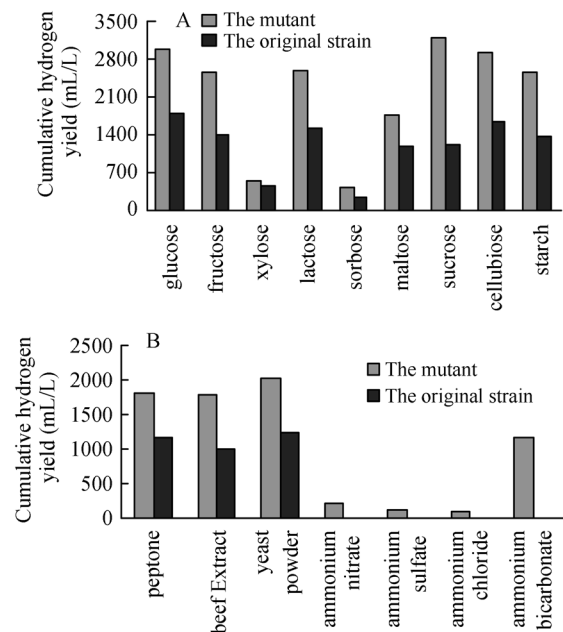


图 3 碳源(A)和氮源(B)对原始菌株和突变株产氢性能的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources (A) and nitrogen sources (B) on hydrogen production by the mutant and the original strain

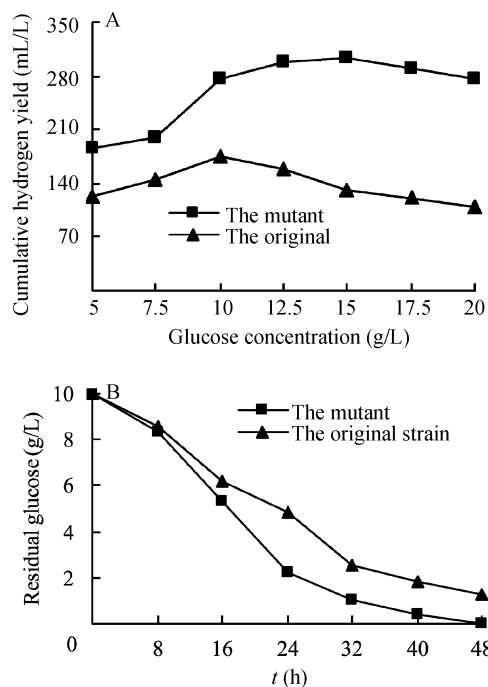


图 4 原始菌株和突变株对葡萄糖的产氢效应(A)和利用进程(B)

Fig. 4 Hydrogen production (A) and utilization profile (B) by glucose of the mutant and the original strain

始菌株能适应更高的底物浓度。以 1% 的葡萄糖为底物时, 每 8 h 测其剩余还原糖的含量, 共培养 48 h, 其剩余糖的变化曲线如图 4(B) 所示。到第 48 h 时, 原始株发酵液的剩余糖为 1.240 g/L, 葡萄糖利用率为 87.6%, 突变株发酵液的剩余糖为 0.026 g/L, 葡萄糖利用率为 99.74%, 较原始菌株有了明显提高。

2.3.4 pH 和温度对产氢的影响: 分别接种于不同初始 pH 的液体培养基(葡萄糖浓度为 1%), 培养 2 d, 测定总产氢量。如图 5(A) 结果表明, 突变株和原始菌株均是在初始 pH 为 6.5 时可获得最大产氢量, 初始 pH 在 6.5~8 之间, 产氢量略有下降, 但下降的幅度不如初始 pH 在 6.5~4.5 之间大, 这表明菌株对较低的初始 pH 更为敏感。将原始株 H-61 和突变株 HCM-23 分别接种后, 在不同温度下培养 2 d, 测定其总产氢量, 如图 5(B), 结果显示, 突变株和原始菌株的最适生长温度均为 36, 在 36 时可得最大的产氢量, 突变株 HCM-23 在 30~36 之间产氢量差异不大, 表明了突变株较原始菌株有较宽的适宜生长温度范围。

2.3.5 液相末端产物的测定: 分别将原始菌株和突变株接种于液体培养基(葡萄糖浓度为 1%), 培养 2 d, 每 6 h 测定其液相末端产物的浓度。由图 6(A) 可知,

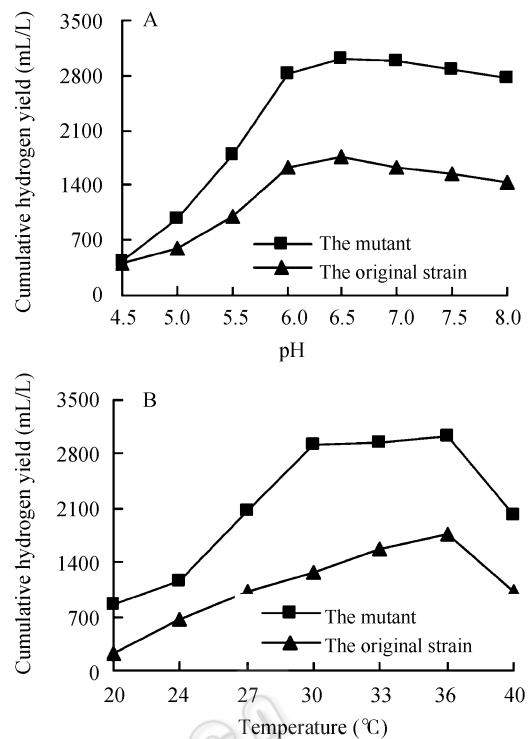


图 5 pH(A)和温度(B)对突变株和原始株产氢性能的影响
Fig. 5 Effect of initial pH (A) and temperature (B) on hydrogen production by the mutant and the original strain

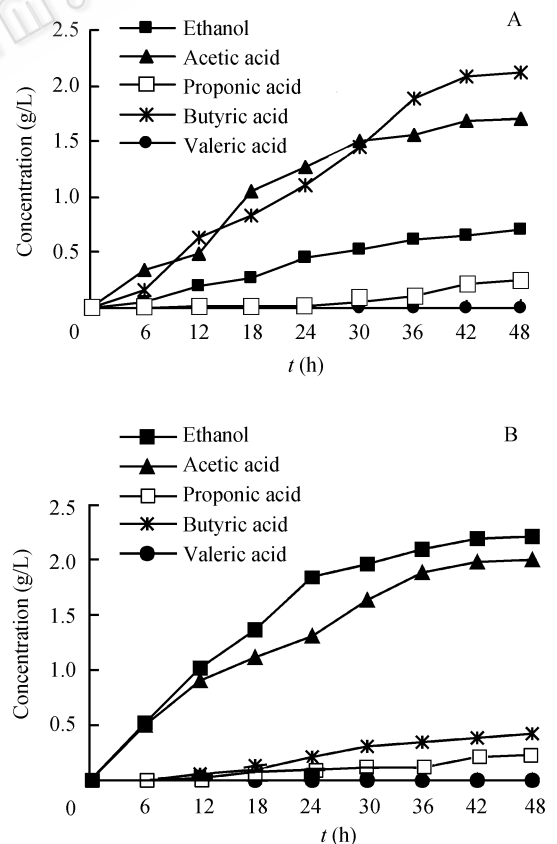


图 6 原始菌株(A)和突变株(B)液相末端产物的比较
Fig. 6 Liquid end products of the original strain (A) and the mutant (B)

原始菌株的主要液相末端产物是乙酸和丁酸, 其次是乙醇, 还有少量的丙酸, 未检测到戊酸, 在培养 48 h 后乙酸和丁酸分别达到 2.116 g/L 和 2.711 g/L, 两者之和为总液相末端产物的 79.51%, 表明了原始菌株为丁酸型发酵。由图 6(B)可知, 突变株的主要液相末端产物是乙醇和乙酸, 还有少量的丁酸和丙酸, 未检测到戊酸, 在培养 48 h 后乙醇和乙酸分别达到 2.205 g/L 和 2.004 g/L, 分别为总液相末端产物的 45.43%和 41.29%, 表明了突变株为乙醇乙酸型发酵。经过诱变之后, 突变株的代谢可能发生了某些改变, 可能酶活的改变导致液相末端产物中组分的含量发生改变。

参 考 文 献

- [1] Momirlan M, Veziroglu T. Recent directions of world hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 1999, **3**: 219–231.
- [2] Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological process: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*, 2001, **26**: 13–28.
- [3] 李建政, 任南琪, 林 明, 等. 有机废水发酵法生物制氢中试研究. *太阳能学报*, 2002, **23**(2): 252–256.
- [4] Yu HQ, Zhu ZH. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1359–1365.
- [5] Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82**(2): 194–197.
- [6] Han SK, Shin HS. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int J Hydrogen Energy*, 2004, **29**(6): 569–577.
- [7] 卢文玉, 闻建平, 陈 宇, 等. 激光诱变选育耐酸产氢菌产气肠杆菌. *化工进展*, 2006, **25** (7): 799–802.
- [8] Ren NQ, Zheng GX, Li YF, *et al*. Mutagenesis and selection of high efficiency hydrogen-producing mutants by ultraviolet radiation. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2006, **13**(6): 635–639.
- [9] 任南琪, 郑国香. 高效产氢突变体UV-d48 的筛选及释氢行为. *化工学报*, 2007, **58**(3): 755–758.
- [10] 郑国香, 任南琪, 林海龙, 等. 诱变育种选育高效产氢细菌. *太阳能学报*, 2007, **28**(6): 632–637.
- [11] Hungate RE. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol*, 1969, **3B**: 117–132.
- [12] 任南琪, 林 明, 马汐萍, 等. 厌氧高效产氢细菌的筛选及其耐酸性研究. *太阳能学报*, 2003, **24**(1): 80–84.
- [13] 陈双雅, 牛莉莉, 东秀珠. 厌氧细菌 *Acetanaerobacterium elongatum* 从葡萄糖的产氢特性研究. *微生物学报*, 2006, **46**(2): 233–237.
- [14] 任南琪, 王爱杰, 马 放, 等. 产酸发酵微生物生理生态学. 北京: 科学出版社, 2005, p.273.
- [15] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **311**: 426–427.