

亚心型四片藻在 CCCP 作用下的光生物 产氢的代谢途径

纪超凡^{1,2,3} 虞星炬² 薛松² 陈兆安² 张卫^{4*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 辽宁 大连 116023)

(2. 中国科学院研究生院 北京 100039)

(3. Université de Nantes, Saint Nazaire 44600, France)

(4. Flinders University, Adelaide 5001, South Australia)

摘 要: 以添加 CCCP (羰基氰化物间氯苯腙, Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) 的海洋绿藻亚心型四片藻光生物制氢为研究体系, 使用作用于光合系统不同位点的抑制剂研究该藻产氢过程不同时间段的代谢途径。结果表明: 四片藻光生物产氢前期电子主要来自 PS II 光解水以及胞内分解代谢, 电子经由光合电子传递链传递至氢酶产生氢气; 而后期释放的氢气则是通过不依赖光合电子传递链的发酵途径产生。产氢过程厌氧发酵代谢途径主要产物是乙酸、乙醇, 其中乙醇代谢途径和氢酶竞争 NAD(P)H, 不利于氢气的积累。

关键词: 亚心型四片藻, 产氢代谢, 厌氧发酵, CCCP

Electron transport pathways of hydrogen photobiological production metabolism in CCCP-treated *Tetraselmis subcordiformis*

Ji Chao-Fan^{1,2,3} YU Xing-Ju² XUE Song² CHEN Zhao-An² ZHANG Wei^{4*}

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

(3. Université de Nantes, Saint Nazaire 44600, France)

(4. Flinders University, Adelaide 5001, South Australia)

Abstract: The CCCP-treated marine microalga *Tetraselmis subcordiformis* could photo-produce hydrogen for several days. Effect of photosynthetic inhibitors on hydrogen production helped to draw the network of hydrogen metabolism by CCCP-treated *T. subcordiformis*: at the beginning of hydrogen production, electrons provided to hydrogenase are mainly from photolysis and photofermentation via PS

I and electron chain; thereafter, fermentative hydrogen production is considered as the most responsible for providing electrons to hydrogenase, which is independent of photosystem electron transfer chain. Fermentative metabolites assay indicated that light and DBMIB inhibited fermentative ethanol production that is the competitive pathway for the cellular reducing power, resulting in higher photo-hydrogen yield.

Keywords: *Tetraselmis subcordiformis*, Hydrogen metabolism, Anerobic fermentation, CCCP

氢是一种高效、洁净的可再生能源。绿藻利用太阳能制氢技术因其培养过程吸收温室气体 CO₂ 同时其产氢代谢的理论光能转化效率高达 10%, 被认为给人类利用太阳能最终解决能源和污染问题带来希望^[1]。

约 70 年前, 研究人员^[2]发现了单细胞绿藻可以在无氧、光照条件下短暂放氢。绿藻氢代谢的铁氢酶在环境中氧分压大于 1.5% 时即失去活性^[3], 因而绿藻无法在光下连续释放氢气。使用两步法间接光生物产氢则可使这一难题得到解决。两步法产氢的核心思想是绿藻首先在光下生长, 积累生物量和胞内底物, 再使用不同策略降低叶绿体光合作用系统 II(PS II)光化学活性, 使得绿藻的光合放氧速度下降低于呼吸耗氧速度, 从而封闭的藻液便在光下处于厌氧状态。基于这一设计思路, Melis 等人^[4]建立了无硫条件下淡水莱茵衣藻两步法间接制氢工艺。管英富等则建立了 CCCP 作用下的海水藻亚心型四片藻的两步法间接制氢工艺路线^[5], 研究表明 CCCP 可以可逆地降低四片藻的 PS II 活性而几乎不会影响其呼吸耗氧能力^[6-7]。

对模式藻莱茵衣藻的产氢电子传递的研究工作显示氢代谢的电子来源于两个途径: 光合系统分解水产生的电子以及细胞内底物分解产生的电子。首先, 绿藻细胞的光合系统分解水^[8-9]产生电子经由分布在叶绿体类囊体膜上的光合电子传递链传至铁氧还蛋白最后传递至氢酶, 氢酶催化氢离子还原产氢, 这一过程通常被称为光水解制氢; 除此之外, 糖酵解等胞内底物分解产生还原力也可以由 NAD(P)H 脱氢酶复合体(NDH)还原质体醌, 电子由此进入光合电子传递链上, 最后传递至氢酶释放氢气, 这一过程通常被称为光发酵制氢^[10-12]。

对海洋绿藻亚心型四片藻而言, 其在 CCCP 调

控下的光生物产氢的电子来源这一关键问题目前尚不明确, 因而拟利用光合电子传递抑制剂研究四片藻产氢过程不同阶段的电子来源和代谢途径。同时, 在厌氧环境中四片藻除了产氢代谢外胞内还同时进行其他厌氧的代谢活动。考察这些代谢活动与产氢代谢的相互作用有助于找出四片藻产氢的竞争性代谢途径, 这对相应代谢途径的改造也有很重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海洋绿藻亚心型四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)由辽宁省水产研究所馈赠, 本实验室复苏和纯化。

1.2 亚心型四片藻的培养基配方

培养基成分(g/L): KNO₃ 1.00, KH₂PO₄ 0.05, Tris 0.81, 冰醋酸 0.33 mL, 康维方营养盐 1.00 mL, 1.00 L 人工海水。人工海水(g/L): NaCl 27.00, MgSO₄·7H₂O 6.60, MgCl₂·6H₂O 5.60, CaCl₂·2H₂O 1.50, NaHCO₃ 0.04。康维方营养盐配方(g/L): FeCl₃ 0.80, MnCl₂·4H₂O 0.40, H₃BO₃ 33.60, EDTA·2Na 45.00, NaH₂PO₄·2H₂O 20.00, NaNO₃ 100.00, CoCl₂·6H₂O 0.02, ZnCl₂ 21 mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 9 mg, CuSO₄·5H₂O 2 mg, 1.00 L 纯水(Millipore 公司的 Synergy water purification 系统制备), 以上化学试剂均为分析纯。培养基 0.12 MPa 高温灭菌 20 min。

1.3 亚心型四片藻的培养

四片藻 600 mL 的气升式光生物反应器(培养藻的反应器装置图见文献[13])内培养(光照 85–110 μmol/(m²·s), 温度 25 °C)。接种密度为 6.0–8.0×10⁶ cells/mL。培养过程通二氧化碳浓度范围为 1%–2%, 以维持藻液的 pH 在 7.0 左右。

1.4 亚心型四片藻的生物量测定

测定细胞干重。取 5–10 mL 的藻液, 使用预先烘干并称重的 Whatman 公司的 GF/C 滤纸过滤藻液, 饱和碳酸氢铵溶液冲洗 3 次, 105 °C 烘干 24 h, 滤纸多出的重量即为藻细胞的重量; 干重(g/L)=藻细胞的重量(g)/藻液体积(L)。

1.5 藻细胞 PS II 光化学活性的测定

参照 Schreiber 的 PS II 活性测定方法^[14]。取 10 μ L 藻液, 加入到 Water-PAM 叶绿素荧光仪的测量杯中, 加入 3 mL 培养基, 关掉光源。搅拌约 30 s 后盖上密封盖, 打开激发光源, 待荧光信号在小幅范围内波动时测量荧光动力学参数, 仪器自动计算出藻细胞 PS II 光化学活性大小。

1.6 亚心型四片藻的产氢过程

取培养至稳定期的四片藻液以 1 500 r/min 离心 2 min 浓缩后去上清, 藻细胞重悬入灭菌后的人工海水中, 调节藻液 pH 到 8.0。取 500 mL 上述藻液到产氢光反应器中(反应器示意图见^[7]), 密闭。藻液用磁力搅拌器搅拌, 转速为 150–200 r/min, 温度控制在 25 °C–28 °C, 密封后通入氮气 5–10 min 以排出系统内的氧气, 暗诱导 16 h, 随后加入终浓度为 15 μ mol/L 的 CCCP 溶液, 10 min 后开始光照。采用日光灯面光源光照, 光照强度为 100–150 μ mol/(m²·s), 用排水取气法收集并测定气体体积。气体分析用上海海欣公司生产的气相色谱仪 GC-960T 检测(5 Å 分子筛柱长 2 m, 柱温 60 °C, 氩气为载气, 流速 25 mL/min, 热导式检测器的检测温度为 90 °C)。

研究光合作用抑制剂 2,5-二溴-6-异丙基-3-甲基-1,4-苯醌(DBMIB)和 N'-(3,4-二氯苯基)-N,N-二甲基脲(DCMU)对四片藻产氢的影响实验中, 添加 CCCP 的同时加入终浓度为 20 μ mol/L 的 DBMIB 或者 DCMU。

研究四片藻暗发酵产氢特征的时候, 添加 CCCP 溶液后产氢装置不加光照, 整个系统处于暗处。

1.7 亚心型四片藻细胞在产氢过程产生的小分子有机酸、醇代谢物的分析

亚心型四片藻产氢过程的代谢产物定性分析由

安捷伦气相色谱-质谱联用仪 GC6890-MS5973N 完成, 柱温由 60 °C 程序升温至 200 °C 保持 10 min, 进样量 1 μ L, 安捷伦 DB-1 毛细管色谱柱, 使用 NIST 98 谱库, 实现质谱解析。小分子有机酸定量分析使用安捷伦 1100 液相色谱仪检测。液相色谱柱为 150×4.6 mm Kromasil C18 柱, 流动相为 10 mmol/L KH₂PO₄ (磷酸调节流动相至 pH 2.0), 检测时流动相流速为 1 mL/min。UV 检测器, 检测波长 214 nm。乙醇的检测使用山东省生物传感器重点实验室生产的 SBA-40C 生物传感分析仪, 检测按照仪器规程操作。

2 结果

2.1 光合系统抑制剂对亚心型四片藻产氢代谢的影响

此前关于亚心型四片藻 CCCP 调控产氢动力学的研究表明, 该藻在产氢过程有 2 个峰值^[15], 根据产氢过程中 PS II 光化学活性的变化趋势和底物消耗的动力学研究结果推测不同时间段的产氢代谢途径可能不同, 在此基础上, 利用针对光合电子传递链不同部位的抑制剂研究四片藻产氢代谢的电子来源和传递途径。

实验中使用的光合作用抑制剂除了 CCCP 外还有抑制光合电子传递链上的细胞色素 b_{6/f} 的 DBMIB^[16], 对 PS II 活性有强烈的抑制作用的 DCMU^[17]。

加入 CCCP、DCMU 以及 DBMIB 的四片藻产氢结果如图 1 所示, 不添加抑制剂的时候 PS II 光化学活性一直保持在 0.6 以上(图 2), PS II 有很强的分解水释放氧气的能力, 光下将无法达到厌氧状态, 因而无法启动氢代谢途径。CCCP 可以可逆的降低 PS II 的活性, 产生氢气^[7]。而 DCMU 则是 PS II 的强效抑制剂, 有效的阻断光合系统类囊体膜上的电子从 Q_A 到 Q_B 的传递, 加入 20 μ mol/L 的 DCMU 后, 绿藻的 PS II 活性在 10 min 内迅速降至 0。同时加入了 DCMU 和 CCCP 的亚心型四片藻与只加入 CCCP 的四片藻相比, 产氢量减少了 84%。

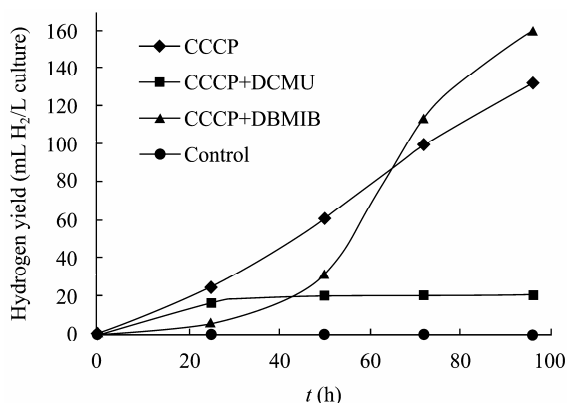


图 1 添加了不同光合抑制剂的亚心型四片藻的产氢特征
Fig. 1 Photohydrogen production by *T. subcordiformis* in the presence of different photosynthetic inhibitors

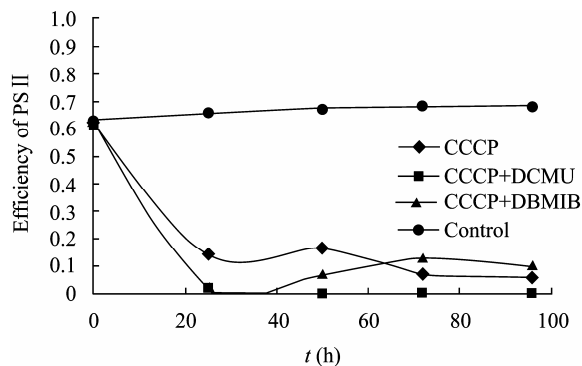


图 2 产氢阶段添加了不同光合抑制剂的亚心型四片藻细胞的 PS II 效率
Fig. 2 Photosystem II efficiency of *T. subcordiformis* in the presence of different photosynthetic inhibitor

产氢初期(添加 CCCP 后的前 25 h 内), 四片藻释放氢气 24.2 mL, 添加 DCMU 后产氢量降低了 33%, 添加 DBMIB 则使产氢量降低了 76%。这一结果表明四片藻产氢初期 33% 的电子由光解水获得, 43% 的电子由藻细胞内糖类分解经由质体醌进入电子传递链传递至氢酶, 剩下 24% 的电子则来源于暂时不明确的途径, 这一存疑将在随后的小节考察。此外产氢后期, 添加了 DBMIB 四片藻的光合电子传递链被抑制的情况下也产生了大量氢气, 说明四片藻有着不依赖光合电子传递链的暗发酵产氢途径。

对四片藻光、暗处产氢情况的考察结果如图 3 所示。藻液中添加 CCCP 后的 24 h 内, 四片藻细胞在暗处没有产生氢气, 而在 24 h 以后, 四片藻即使在暗处也可以释放氢气, 共产氢 195.5 mL H₂/L 藻液。

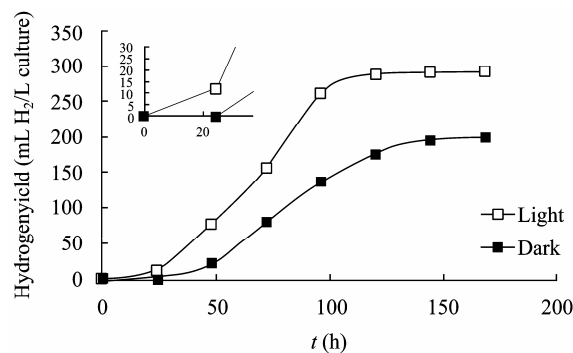


图 3 光、暗处亚心型四片藻产氢特征

Fig. 3 Hydrogen production by *T. subcordiformis* under light and dark condition

2.2 光、暗两种环境下亚心型四片藻产氢过程乙醇、乙酸的产量

亚心型四片藻 CCCP 调控光下产氢是在无氧的环境下进行的, 除了产氢代谢以外, 藻细胞内也同时发生其他的代谢活动; 有些厌氧代谢途径会伴随着氢气的释放, 有些途径则和产氢代谢竞争电子。因此, 对四片藻产氢过程的胞内其他代谢途径的研究是十分必要的。首先, 利用气相色谱-质谱联用的分析方法检测亚心型四片藻产氢过程的液相代谢产物。NIST 98 谱数据库的检索结果显示, 亚心型四片藻厌氧产氢过程细胞分泌的小分子有机物主要是乙醇、乙酸和丙酸。

图 4 和图 5 为亚心型四片藻光、暗处产氢过程不同时段乙酸和乙醇的积累。和暗发酵产氢相比, 四片藻在光下生产乙醇的代谢途径被抑制, 藻细胞

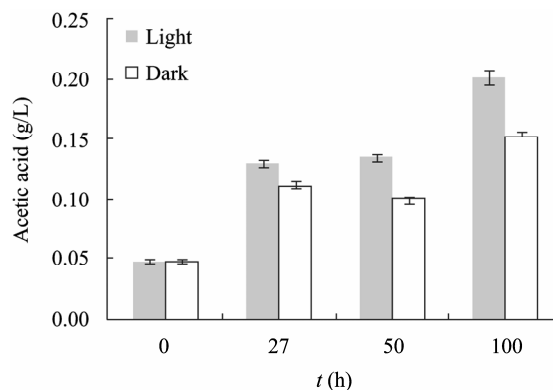


图 4 亚心型四片藻光、暗处产氢过程不同时段乙酸的积累

Fig. 4 Acetic acid content during dark- or light-hydrogen production stage with *T. subcordiformis*

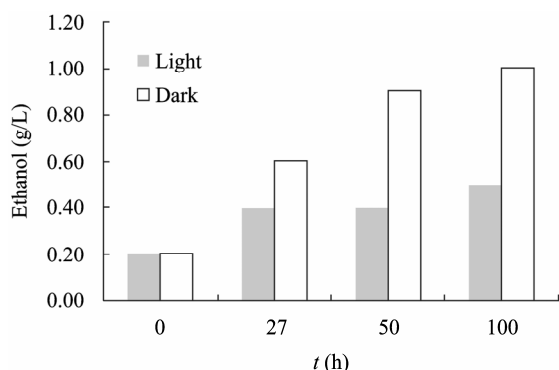


图 5 亚心型四片藻光、暗处产氢过程不同时段乙醇的积累

Fig. 5 Ethanol content during dark- or light-hydrogen production stage with *T. subcordiformis*

在整个产氢阶段四片藻产生乙醇 0.2 g/L, 然而暗处同样密度的藻细胞产生乙醇量是光下的 4.5 倍以上。乙酸代谢与乙醇不同, 产氢 100 h 后, 乙酸产量达到 0.15 g/L, 而暗处乙酸产量不到 0.1 g/L。

2.3 添加 DBMIB 的亚心型四片藻产氢过程乙醇、乙酸的产量

如图 1 所示, 添加了 DBMIB 的四片藻产氢后期不仅没有被抑制, 氢气产量甚至略高。对添加 DBMIB 的四片藻产氢过程发酵产物分析结果如图 6 和 7 所示。四片藻在 CCCP 调控下产氢过程中是否添加 DBMIB 对乙酸的发酵途径的影响很小, 但其抑制乙醇的发酵途径, 在产氢过程没有乙醇的生成。

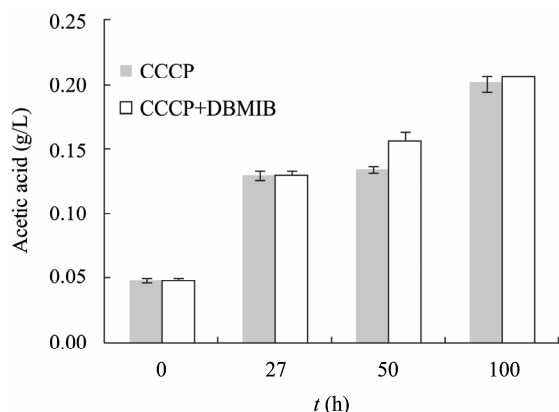


图 6 亚心型四片藻添加 DBMIB 处产氢过程不同时段乙酸的积累

Fig. 6 Acetic acid content during hydrogen production stage with *T. subcordiformis* in presence of CCCP and DBMIB

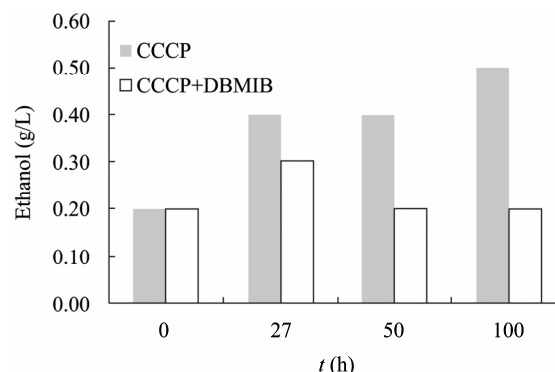


图 7 亚心型四片藻添加 DBMIB 处产氢过程不同时段乙醇的积累

Fig. 7 Ethanol content during hydrogen production stage with *T. subcordiformis* in presence of CCCP and DBMIB

3 分析与讨论

对模式淡水藻莱茵衣藻的光生物产氢机制的研究认为, 电子通过光合电子传递链传递, 而四片藻 CCCP 调控产氢在添加了 DBMIB 后仍然有氢气释放。DBMIB 与质体醌竞争光合电子传递链上细胞色素 b_6/f 的 Q_o 位点结合, 阻断电子传输。倘若四片藻产氢的所需电子全部经由光合电子传递链, 加入 DBMIB 后四片藻制氢应该被严重抑制, 然而如图 1 所示, 在 DBMIB 存在的条件下, 四片藻产氢总量没有像预期的那样大幅降低; 在前 40 h, DBMIB 的添加抑制了四片藻产氢, 其后产氢量则迅速上升, 在产氢 100 h 后甚至超过了只添加 CCCP 的对照组。这一现象说明亚心型四片藻产氢后期细胞内存在不依赖光合电子传递链的产氢途径。

气质联用分析亚心型四片藻产氢过程液相代谢产物为乙酸、乙醇和丙酸。图 8 描绘了这几种产物的代谢途径。四片藻产氢过程添加 CCCP 使得 PS II 活性降低, 封闭藻液处于厌氧环境, 而其代谢途径类似于一些暗发酵厌氧产氢细菌, 这种发酵途径解释了为什么亚心型四片藻在光合电子传递链被阻断的情况下依然可以产生氢气。如图 8 所示, 产生丙酸和乙醇的途径都有还原力的消耗, 这些与氢酶竞争电子的途径将会导致发酵产氢的底物利用能力降低。

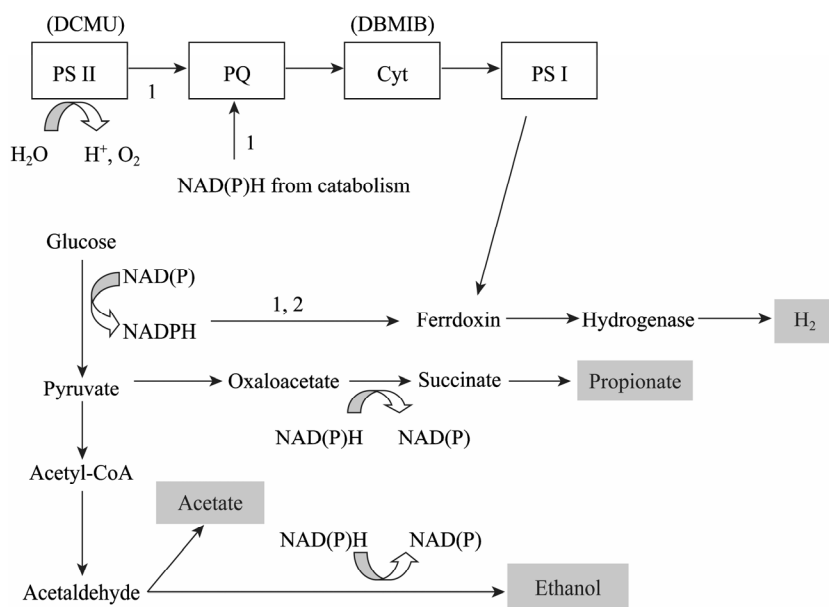


图 8 亚心型四片藻光生物产氢代谢途径

Fig. 8 Electron transport pathways of hydrogen photo-biological production metabolism in CCCP-treated *Tetraselmis subcordiformis*

注: 1: 四片藻光生物产氢初期电子来源; 2: 产氢后期的电子来源.

Note: 1: Electrons provided to hydrogenase at the initial stage; 2: Electrons provided to hydrogenase at the late stage.

光合抑制剂对产氢代谢的作用结果表明四片藻在 CCCP 的作用下产氢前期的电子主要是依赖于光合电子传递链, 而后期则是发酵产氢(图 8)。四片藻暗处无氧的环境下产氢代谢也印证发酵产氢途径的存在。另一方面, 四片藻在光下产氢量与暗处相比高约 100 mL H₂/L 藻液。说明四片藻在 CCCP 作用下产氢后期虽然不依赖光合电子传递链的途径, 但依然受到光的影响。对绿藻来说, 光是影响代谢的一个很重要的因素。比如, Hirt 等人^[18]通过检测 D-乳酸的形成发现光对斜生栅藻的酵解速率有明显影响。Gfeller 等^[10]研究发现莱茵衣藻在光、暗处厌氧代谢方式差异很大。

四片藻发酵产生乙醇的代谢途径与氢酶竞争产氢所需的 NAD(P)H, 因此不利于氢气的产生。四片藻在光下、厌氧环境的乙醇产量远小于暗处, 推断这是 CCCP 作用下亚心型四片藻光下产氢量高于暗处的主要原因。同时, 添加了 DBMIB 的四片藻的产乙醇途径几乎完全被抑制, 因而添加 DBMIB 的亚心型四片藻产氢总量略偏高。若使用基因工程手段敲除乙醇代谢途径中的关键酶则有可能使胞内

酵解等代谢活动产生的电子更多流向氢酶, 产氢量或许将大幅增加。对于暗发酵产氢的细菌而言^[19], 铁氧还蛋白和氢酶定位于细胞质, 这两种酶在亚心型四片藻细胞内则是定位于叶绿体内。四片藻不依赖于光合电子传递链的产氢机制的电子传输可以被假设为: 铁氧还蛋白-NADPH 氧化还原酶将电子传输给铁氧还蛋白, 铁氧还蛋白再将电子传递给氢酶产生氢气。

参考文献

- [1] Kruse O, Hankamer B. Microalgal hydrogen production[J]. Curr Opin Biotech, 2010, 21(3): 238-243.
- [2] Gaffron H, Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae[J]. J Gen Physiol, 1942, 26(2): 219-240.
- [3] Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness PC, et al. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms[J]. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 71-91.
- [4] Melis A, Zhang LP, Forestier M, et al. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Physiol, 2000,

- 122(1): 127–135.
- [5] Guan YF, Zhang W, Deng MC, et al. Significant enhancement of photobiological H₂ evolution by carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone in the marine green alga *Platymonas subcordiformis*[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(13): 1031–1035.
- [6] Renger G. The action of 2-anilinothiophenes as accelerators of the deactivation reactions in the watersplitting enzyme system of photosynthesis[J]. Biochim Biophys Acta, 1972, 256(2): 428–439.
- [7] Ran CQ, Yu XJ, Jin MF, et al. Role of carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone in enhancing photobiological hydrogen production by marine green alga *Platymonas subcordiformis*[J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(2): 438–443.
- [8] Miura Y. Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis[J]. Process Biochem, 1995, 30(1): 1–7.
- [9] Florin L, Tsokoglou A, Happe T. A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain[J]. J Biol Chem, 2001, 276(9): 6125–6132.
- [10] Gfeller RP, Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii* I. Analysis of fermentative products from starch in dark-light[J]. Plant Physiol, 1984, 75: 212–218.
- [11] Cournac L, Guedeney G, Peltier G, et al. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex[J]. J Bacteriol, 2004, 186(6): 1737–1746.
- [12] Mus F, Cournac L, Cardellini V, et al. Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1708(3): 322–323.
- [13] Guo Z, Chen ZA, Zhang W, et al. Improved hydrogen photoproduction regulated by carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone from marine green alga *Platymonas subcordiformis* grown in CO₂-supplemented air bubble column bioreactor[J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(5): 877–883.
- [14] Schreiber U. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications // Garab G. Photosynthesis: Mechanisms and Effects[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998: 4253–4258.
- [15] Ji CF, Legrand J, Pruvost J, et al. Characterization of hydrogen production by *Platymonas Subcordiformis* in torus photobioreactor[J]. Int J Hydrogen Energy, 2010, 35(15): 7200–7205.
- [16] Rich PR, Madgwick SA, Moss DA. The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome *bf* complex[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1058(2): 312–328.
- [17] Draber W, Tietjen K, Kluth JF, et al. Herbicides in photosynthesis research[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 1991, 30(12): 1621–1633.
- [18] Hirt G, Tanner W, Kandler O. Effect of light on the rate of glycolysis in *Scenedesmus obliquus*[J]. Plant Physiol, 1971, 47(6): 841–843.
- [19] Horner DS, Heil B, Happe T, et al. Iron hydrogenases-ancient enzymes in modern eukaryotes[J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(3): 148–153.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名，造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱，这大大影响了本刊在国际上的传播，也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论，以及主办单位批准，本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”，请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。