

综述

光合细菌产氢研究进展

杨素萍^{1,2} 赵春贵² 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)

PROGRESS IN THE RESEARCH ON HYDROGEN PRODUCTION BY PHOTOSYNTHETIC BACTERIA

YANG Siping^{1,2}, ZHAO Chungen², QU Yinbo¹ and QIAN Xinmin¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100;

2. School of Life Science and Technology, Key Laboratory of Bioengineering, Shanxi University, Taiyuan 030006)

关键词: 光合细菌; 产氢机制; 影响因素; 存在问题; 应用前景

Key words: Photosynthetic bacteria; Affecting factor of hydrogen Production; Mechanism; Problem; Prospects of application

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0085-007

光合细菌产氢不放氧、产氢纯度高、对太阳光谱的宽的响应范围及可与多种生物组建形成良好微生态体系的特点, 被认为是很有希望的绿色氢来源之一, 因而倍受国内外研究者的关注。日本、美国、欧洲等国家对蓝细菌、光合细菌、绿藻和发酵细菌的产氢进行了较多研究, 我国学者对光合细菌和蓝细菌的放氢也进行了探索和研究^[1-7]。光合细菌能利用有机废水(废弃物)转化太阳能产生氢能, 故应作为环保产业新能源开发的一个重要研究方向。近年来, 光合细菌光反应中心、光合基因和固氮基因的研究取得了令人欣喜的成果^[8], 这必将大大推动光合细菌产氢研究进程。本文概括介绍了光合细菌产氢研究领域中的研究方向和最新进展, 并就光合细菌产氢机制, 探讨了影响光合细菌产氢的主要因素, 评述了光合细菌走向实用化尚待解决的问题和应用前景。

1 光合细菌产氢研究动态

Gest 发表在 Science 上的一篇研究论文首次证明, 光合细菌(*Rhodospirillum rubrum*)具有在光照厌

氧条件下转化有机物产生氢气的特性^[9]。70年代的能源危机使沉默近 25 年的光合细菌产氢研究再度兴起^[2], 相继有许多学者在各种不同的刊物上发表了光合细菌的产氢研究报告。80 年代以来, 各种新生物技术的渗入, 使光合细菌产氢研究不断向实用化方向发展。90 年代的温室效应和环境污染使人们的目光再一次投向可对环境作出贡献的生物制氢技术。目前, 国外已在产氢的生理生化特性研究基础上, 开始了基因水平上的产氢研究, 但仍处于起步阶段。研究方向主要集中在以下几个方面。

1.1 采用各种技术筛选具有高产氢活性的菌株

这是研究者始终关注和研究的课题。迄今为止, 已研究报道的菌株类群包括有 *Rhodospirillum*、*Rhodobacter*、*Rhodopseudomonas*、*Chromatium*、*Rhodomicrobium* 和 *Ectothiorhodospiralia* 属的不同菌株, 其中, *Rhodobacter sphaeroides* 和 *R. capsulata* 菌株的苹果酸或乳酸产氢研究最为深入和详细。Willison^[10] 化学诱变 *Rhodopseudomonas capsulata* B10 菌株筛选到的膜结合氢酶缺陷株, 生长迅速, 产氢量明显提高。变

收稿日期: 2002-01-14; 修订日期: 2002-07-20

作者简介: 杨素萍(1966—), 女, 山西太原人; 博士生, 副教授; 主要从事光合细菌的研究和应用

通讯作者: 曲音波。E-mail: lifezds@sdu.edu.cn

异株在 L-苹果酸、DL-苹果酸和 D-苹果酸中的产氢量分别比野生型菌株提高 10%—20%、20%—50% 和 70%。Hustade^[11]筛选获得的 *R. sphaeroides* PHB 缺陷株在乙酸基质中的产氢量比野生型有大幅度提高。John^[12]插入诱变 *R. capsulata* B10 的 *hupL* 基因, 这种变异株在限氮光异养生长时, 产氢量是野生株的 1—2 倍。目前, 除采用传统遗传诱变和选择培养技术之外, 遗传工程技术改造产氢菌株和构建多功能基因工程菌是未来发展的方向。但 H₂ 的释放和能量代谢密切相关, 使用单一基因产物以增加产氢并不那么简单。

1.2 寻找光合产氢的最经济的合适底物

各种糖类(包括葡萄糖和果糖)、糖醇(乙醇、甘油、山梨醇等)、有机酸(包括低分子直链脂肪酸、羟酸、酮酸等三羧酸循环中的各种有机酸)和或芳香类化合物(包括苯甲基乙醇、香草醛、苯甲酸等)被选用进行光合细菌产氢研究^[2]。有机废水含有大量的可被光合细菌利用的有机物成分, 以有机废水制氢, 可大大降低氢能生产成本, 既回收能量又净化废水, 集经济效益、环境效益和社会效益于一体, 可谓一举多得, 方案更为合理和经济, 前景十分诱人。Zurre^[13]曾利用 *R. rubrum* 进行了乳酸、乳清和酸乳酪废物的连续光照产氢试验, 产氢效率达到 20mL H₂/h/g (dry wet)。刘双江等^[14]用海藻酸钠固定 *Rhodopseudomonas sp.* H 菌株进行了豆制品废水产氢研究, 氢气含量达 60% 以上, 废水 COD 去除率达 41%—60.3%。

1.3 产氢工艺的研究

固定化技术、连续培养技术和混合培养技术都被应用于产氢研究中^[13—16]。Seon 用海藻酸钠固定 *R. rubrum* KS-301 菌株产氢率达 91mL H₂/h。徐向阳认为, 琼脂包埋 *R. capsulata* 菌株的产氢效果比海藻酸钙好。与游离细胞相比, 固定化可使苹果酸反应体系产氢能力在 120h 内由 11.4mL H₂•L⁻¹•h⁻¹ 提高到 21.4mL H₂•L⁻¹•h⁻¹。Weetall^[17]琼脂固定化 *R. rubrum* 和肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)的混合培养物进行了纤维素产氢研究, 产氢量达 6mol H₂/mol 葡萄糖。Odom^[18]利用 *Cellulomonas sp.* ATCC21399 和 *R. capsulata* 野生型和 *hup*⁻ 变异株分别共培养进行纤维素产氢研究, 野生型产氢量只有 1.2—4.3 mol H₂/mol 葡萄糖, 而变异株产氢量达 4.6—6.2 mol H₂/mol 葡萄糖。Miyake^[19]固定化丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)和 *Rhodopseudomonas sp.* 混合培养物降解葡萄糖产氢可达 7 mol H₂/mol glucose。Miyamoto^[20]用绿藻和光合细菌共培养组建的新的生物光解系统可在无有机物条件下持续产氢。Ike^[21]将微藻消化后再用于光合细菌产氢以期减少温室效应。Yokio^[22]利用 *C. butyricum* 和 *R. sphaeroides* 从淀粉产氢效率比单一菌株要高出 2—3 个数量级。

domonas sp. 混合培养物降解葡萄糖产氢可达 7 mol H₂/mol glucose。Miyamoto^[20]用绿藻和光合细菌共培养组建的新的生物光解系统可在无有机物条件下持续产氢。Ike^[21]将微藻消化后再用于光合细菌产氢以期减少温室效应。Yokio^[22]利用 *C. butyricum* 和 *R. sphaeroides* 从淀粉产氢效率比单一菌株要高出 2—3 个数量级。

1.4 光合放氢限制性影响因素的研究

光照强度、温度、pH 和培养基组成均对光合产氢有重要影响。Miyake 采用光照和黑暗交替的方法, 并在黑暗开始时提供少量的 NH₄⁺, 使 *Rhodopillum rubrum* 菌株产氢时间延长至 25d 以上。另外, Miyake 等还发现, *R. sphaeroides* 8703 高产氢活性菌株分别以氙灯和太阳能模拟器为光源时太阳能转化效率为 7.9% 和 6.2%, 高于此光照强度则转化效率降低。Wakayama^[23]用卤灯作光源, 当光照和黑暗交替的时间为 30min 时, 获得的最高产氢率为 22L/m²/24h。由此看来, 光源、光强和光照时间对提高光转化效率十分重要。

1.5 产氢酶的研究

研究固氮酶和氢酶活性或合成的调节机制。另外, 研究利用工程技术选育具有组成型 nif⁻ 和 hup⁻ 基因缺失的突变株, 从而得到固氮酶合成去抑制而吸氢酶缺失的高效产氢菌或塑造更多的 nif 基因拷贝的菌株均是未来产氢研究中努力的方向^[26]。

能源和环境问题的日益突出和加剧, 使光合细菌利用各种有机物(有机废水)的产氢研究更加活跃。目前, 国际上对光合细菌产氢应用研究热点是利用有机物(包括有机废水)光合产氢。少量耗能即能制取洁净能源氢气和寻求到一种更为经济的生物制氢方法, 一直是国际科学界追求的目标。将有机废水废弃物(含碳水化合物)、农业有机废弃物(淀粉和纤维素)和各种可再生生物资源通过光合细菌和其他生物的共同转化产生氢能意义深远而重大, 但仍需进一步探求其切实可行的新的制氢技术。

2 光合细菌产氢机制

2.1 光合放氢机制

Gest 研究发现, 光合细菌裂解有机物产生分子氢是经厌氧柠檬酸循环途径产生, 并从 N₂ 和 NH₄⁺ 对光合放氢的抑制现象中(H₂ 的产生出现在 NH₄⁺ 消耗完之后), 发现了光合细菌的光合产氢过程与氮代谢(固氮酶)有关, 自此之后的大量研究也均证明, 光合细菌中的光合放氢过程是由固氮酶催化进行。

产氢过程需要提供 ATP 和还原力。光合细菌因只含有光合色素系统 I, 且电子供体不是水而是有机物或还原态硫化物, 所以光合磷酸化过程不放氧, 且只产生 ATP 而不产 NAD(P)H。与蓝细菌和绿藻相比, 这种产氢不放氧的特性, 可大大简化生产工艺, 不存在产物氧气和氢气的分离问题, 也不会造成固氮酶的失活。结合光合作用研究最新进展, 图 1 给出了光合磷酸化产生 ATP 过程^[24-25]。但产氢所需还原力是有机物经何种途径产生目前还不十分清楚。Gest 认为, 有机物经厌氧柠檬酸循环产生还原力。还原力也可能是有机物经反向电子传递形成,

因为这些有机物的氧化还原电位都接近 NAD⁺/NADH, 其氧化不能直接与 NAD⁺ 的还原相偶联而产生 NADH。为使 NAD⁺ 还原, 则必须耗能以进行反向电子传递, 使电子从氧化还原电位高的载体流向氧化还原电位低 NADH/NAD⁺, 使 NAD⁺ 还原为 NADH。在某些绿硫细菌中, 还原力来自自由细菌叶绿素释放出的高能电子经最初电子载体 (Fd) 去还原 NAD(P)⁺。在有 N₂ 等底物存在时, 固氮酶进行 N₂ 的还原反应: $N_2 + 12ATP + 6e^- \rightarrow 2NH_3 + 12(ADP + Pi)$ 。在无 N₂ 等合适底物时, 固氮酶行使固氮放氢功能: $2H^+ + 4ATP + 2e^- \leftrightarrow H_2 + 4(ADP + Pi)$ 。

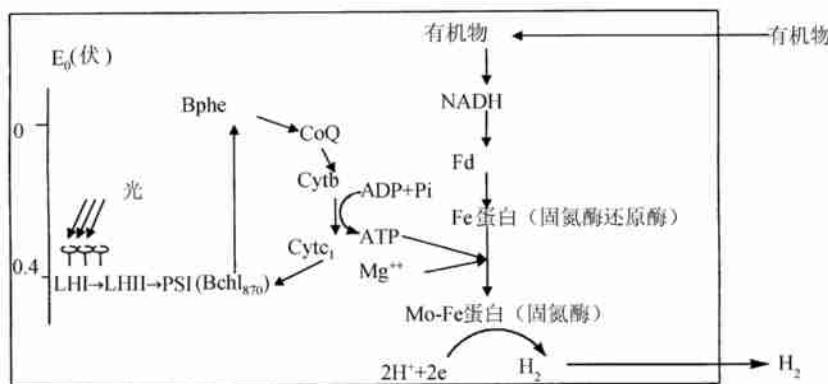


图 1 光合细菌的光合放氢途径

Fig. 1 Pathway of H₂ photoproduction of photosynthetic bacteria

PSI: 光反应中心 RC. LH: 光合色素复合体;

Bchl: 细菌叶绿素; Bphe: 细菌脱镁叶绿素; CoQ: 泛醌; Cytb/c: 细菌色素 b 或 c

2.2 黑暗产氢机制

早在 1949 年, Gest 就研究发现适应了甲酸环境的 *R. rubrum* 能够黑暗产生 CO₂ 和 H₂。以后研究又发现红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*) 中的某些菌株例如 *R. sphaeroides*、*R. rubrum*、*R. palustris*、*Blastochloris viridis* 以及 *T. roseopersicina* 均可在黑暗厌氧条件下以葡萄糖、有机酸、醇类产生 H₂ 和 CO₂, 吴永强研究也发现, *R. sphaeroides* 黑暗发酵休止细胞在暗处有较高的放氢活性, 光照时放氢活性下降 25% 左右; 铵和 N₂ 并不抑制放氢活性, 但使放氢总量减少; 丙酮酸和苹果酸的产氢可被光照抑制 40%, 但又可被抗霉素光抑制剂恢复产氢的活性。CO 抑制发酵休止细胞的放氢, 20% CO 几乎完全抑制放氢, 这些实验数据均证明了黑暗条件下的产氢不是由固氮酶催

化, 而是由氢酶催化。现研究证实, 黑暗厌氧发酵产氢机制更相似于严格厌氧细菌, 是由丙酮酸-甲酸氢解酶 (FHL) 代谢丙酮酸, FHL (甲酸氢解酶系统) 的活性相似于 *E. coli*^[28-29]。北村博也认为光合细菌在黑暗条件下的产氢作用与厌氧菌厌氧发酵时的产氢现象十分相似。但是该酶从未在光合细菌中被分离到。利用有机废弃物中大量的碳水化合物黑暗产氢, 其技术工艺上要比光合产氢更简单, 但产氢效率较低。

2.3 与产氢有关的酶

氢酶和固氮酶是催化产氢的主要酶类。氢酶催化分子氢的产生与利用。固氮酶除进行固氮反应外, 还催化光合放氢反应。氢酶和固氮酶主要性能见表 1。

表 1 固氮酶和氢酶的性能比较

Tab. 1 Comparison of nitrogenase and hydrogenase

| 种类 | 抑制剂 | 功能 | 反应方向性 | 能量需求 | 电子受体 |
|-----|--|--|---|-----------|--|
| 氢酶 | CO C ₂ H ₂ (可逆) | H ₂ 还原 CO ₂ H ₂ 的再循环 | 2H ⁺ + Fdred ← H ₂ + Fdox | 否 可逆反应 | K ₃ Fe(CN) ₆ MB BV KNO ₃ NAD ⁺ NADP ⁺ 延胡索酸 |
| 固氮酶 | N ₂ NH ₄ ⁺ O ₂ | 固氮 固氮放氢 | 2H ⁺ + Fdred + ATP → H ₂ + Fdox + ADP + Pi | ATP 不可逆 | N ₂ C ₂ H ₂ |

Siefert^[30]通过对 *Rhodopseudomonas acidophilla* DSM 137nif⁻ 突变株的研究发现, 所有 nif⁻ 突变株既没有乙炔还原活性和放氢活性, 也无氢酶活性和利用氢进行光自养生长能力。而 nif⁻ 恢复株则恢复了乙炔还原和光自养生长能力。这说明二者遗传上的相关性。另外, 吸氢酶能将固氮产生的分子氢重新吸收再为固氮酶提供能量和电子供体表明了二者在功能上是相关的。

2.3.1 固氮酶 迄今为止, 几乎所有被报道的紫色非硫细菌均具有固氮能力。同氢酶一样, 固氮酶对氧极为敏感, 到目前也仅有少数菌的固氮酶被分离。深红红螺菌(*R. rubrum*)和荚膜红杆菌(*R. capsulata*)是研究较为详细的种类。物化性质研究表明, 光合细菌的固氮酶也是铁硫蛋白, 是一个氧不稳定的双分子, 但分子更大更复杂。活性中心除了含有 Fe-S 外, 还含有 Mo-Fe 活性中心原子簇。大蛋白组分是一个 α₂β₂ 四聚体, 称为 Mo-Fe 蛋白, 含有 2 个 Mo, 20—30 个 Fe, 以及 20—30 个 S。分子量为 230kD。*R. capsulata* 小蛋白组分是二聚体, 称为 Fe 蛋白(固氮酶还原酶), 含有 4 个 Fe 和 4 个 S, 分子量为 33.5kD。当 Fe 蛋白被钝化时, 其两个亚基的分子量不同, 这是由于一个亚基被 ADP 核糖修饰的结果, 但钝化和活化的 Fe 蛋白的含铁量相同^[31]。不同种类的光合细菌, 其固氮酶两个组分在固氮酶活性表达时所需要的比例不同, 同源性相差也较远。遗传学研究表明, 光合细菌 *R. capsulata* 的 nif 基因(固氮酶基因)是以连锁群形式存在于染色体上, 但呈分散状态存在而不是紧密连锁, 从而与经典的肺炎克氏杆菌不同。固氮酶结构基因 nif HDK 构成一个单一的操纵子而且和 nifAB 以多拷贝形式存在, 这些重复的结构基因在正常情况下是沉默的, 突变时才被激活。

现有研究证明, 某些种类的光合细菌在黑暗厌氧条件下也具有固氮酶活性。光合细菌的光合基因、固氮基因和氢酶基因不仅在遗传上相连, 在功能

上也是偶联的, 这种功能上的联系可能是光合细菌适应不同环境下的能量交替调节机制。由此看来, 光合细菌的光合放氢是既复杂而又饶有兴趣的研究课题。

2.3.2 氢酶 氢酶现已被发现存在于大多数具氢代谢的原核生物和一些真核生物中^[32]。自 1931 年 Stickland 首次报道细菌存在氢酶以来, 由于种类的差异和对氧的敏感性, 纯化工作存在的困难给氢酶的研究带来一定难度, 所以 60 年代氢酶研究发展缓慢。70 年代能源危机, 生物制氢技术第一次被认为具有实用的可能, 因而氢酶及其产氢机理的研究受到高度重视, 此期间氢酶第一次从 *C. pasteurianum* 中分离提纯。80 年代开始了氢酶性质和基因结构的研究。90 年代中期 Ni-Fe 氢酶和 Fe 氢酶的晶体结构的阐明使氢酶的铁硫蛋白活性中心结构、参与电子传递的 Fe-S 簇的结构以及催化机理的研究成为许多物理、化学和生物学家关注的焦点^[33, 34]。据最新报道, 氢酶按结构或所含金属种类可分为 Ni-Fe 氢酶、Fe 氢酶、NiFeSe 氢酶和不含任何金属的氢酶。按催化特性可分为催化放氢的氢酶和催化吸氢的氢酶。按细胞定位可分为膜结合氢酶和可溶性氢酶, 有的菌株可同时含有这两种酶。Ni-Fe 氢酶通常为膜结合酶并与细胞膜上的电子传递系统相联以储存氢氧化产生的能量。它除了具有 Fe-S 原子簇外, 还含有 Ni-S 原子簇, 其生理功能主要是进行氢的氧化以提供能量。相反, 只含有 Fe 的氢酶一般是可溶性氢酶, 其活性位点明显含有有机金属双核铁亚簇, Fd 或低电位的细胞色素往往是其电子供体。

许多光合细菌都具有氢酶^[35, 36], 但在不同种属之间, 其结构、催化特性, 生理电子载体及细胞定位都有一定程度的差异。其功能的体现与生长时的生理条件密切相关, 一般认为, 当细胞处于自养条件时, 氢酶主要催化氢的光还原反应。由于大多数氢酶对氧敏感或以膜结合状态存在, 获其纯酶比较困难。*R. capsulata* 的氢酶研究较为详细。该菌株存

在有两种类型的氢酶: 膜结合氢酶和可溶性氢酶, 与甲烷微生物不同, 这两种氢酶在表现吸氢和放氢活性以及其他一些物化性质上例如氧敏感性和热稳定性等方面存在有某些差异。现研究表明 *R. capsulata* 的氢酶是组成型的, 其基因成簇存在于染色体上, 编码吸氢酶大亚基的 *hupL* 基因和小亚基 *hupS* 基因已被克隆和测序^[37]。最近研究结果又进一步表明, 该酶由 *hupR* 基因调控, *hupS* 基因表达直接和 H₂ 的激活有关, *hupT* 基因抑制氢酶基因的表达。目前, *Chromatium vinosum* 的两种状态的氢酶已被分离纯化, 其大小亚基基因已被克隆, 由于具有对氧不敏感和放氢功能的独特优点, 故有将其氢酶基因转移至产氢蓝细菌, 利用氢酶实现从自然界最丰富的资源水产氢的愿望。

光合细菌放氢研究中, 科学家们希望吸氢酶无活性或缺失。而在农业共生固氮研究中, 则希望与植物共生的细菌拥有氢酶或使氢酶具有较高的酶活。因为在共生固氮反应中, 总有 25%—30% 的能量用于放氢, 降低了固氮效率。如果固氮菌含有氢酶, 而氢酶可回收固氮放出的氢, 以再为固氮反应提供充足的能量和电子, 从而提高共生固氮效率。对于不含氢酶的固氮菌, 有研究者提出, 可将克隆到的吸氢酶基因转移到无吸氢酶的植物固氮菌中以构建新的遗传工程菌从而实现农业的高产和丰产。但由于氢酶的复杂性, 对其基因的结构, 尤其是调节基因的种类和调节方式还了解甚少, 遗传转移系统的建立以及活性的表达还有许多问题亟待解决, 对其基因调控机理目前正在进一步深入研究之中。

近年来, Woodward^[38] 等利用葡萄糖脱氢酶和嗜热古细菌的氢酶转化葡萄糖产氢方法又为利用氢酶产氢开辟了一种新思路, 但这样一种产氢系统受到酶源和辅酶再生等因素限制。

3 影响光合细菌产氢的因素

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, 凡与产氢过程有关的因素可调控光合放氢过程, 除光照强度、温度、pH 等环境影响因子, 菌株所处的生理状态、培养基组成(包括供氢体和氮源的种类和数量)等生物因子也是影响产氢活性的重要因素。光是影响光合放氢的主要因素。将光产氢细胞转移到黑暗条件下时, 细胞既没有产氢反应也无固氮酶活性。选育能在较宽光照强度范围内生长和产氢的菌株更具有实用价值。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酶类和途径有关。虽然不同的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。菌龄和接种量也是影响菌株产氢活性的重要因素。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。本实验室研究还发现, 对于不同菌龄的接种物, 光照强度成为产氢的限制性影响因素。另外, 培养基中供氢体和氮源的数量是产氢的主要限制性影响因素, 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。

固氮酶催化光合放氢, 但凡抑制或钝化固氮酶的成分也同样抑制光合放氢(表 2), 这里主要讨论 N₂ 和 NH₄⁺ 对产氢的影响。

表 2 光合放氢调节因子

Tab. 2 Regulator of H₂ photoproduction of photosynthetic bacteria

| 调节剂 | 调节机制 |
|---|---------------------|
| N ₂ 、C ₂ H ₂ | 作为固氮酶底物与固氮放氢竞争电子 |
| NH ₄ ⁺ 、Gln、Asn、Urea、NO ₃ ⁻ | 迅速可逆抑制固氮酶合成 |
| 甲胺 | 弱光下加剧对固氮酶的抑制 |
| Arg、His | 抑制固氮酶合成。 |
| MSX | GS 的抑制剂, 可解除固氮酶的抑制 |
| DON | 通过抑制 Gln 代谢而抑制固氮酶合成 |
| 双豆香素、五氯苯酚 | 光合磷酸化解偶联剂 |
| 抗霉素 A | 光合磷酸化抑制剂 |

N₂ 作为固氮酶底物, 可竞争性抑制固氮酶催化的光合放氢活性, 它们的存在将使固氮酶的电子用于氮气还原而抑制了固氮酶催化质子的还原。*R. capsulata* 在以 N₂ 为氮源时, 放氢总量减少 90% 左右, 但这种抑制是可逆的, 可用氢气相和 CO₂ 恢复^[34]。NH₄⁺ 对固氮酶的抑制表现为“瞬间关闭”效应。现有研究表明, 铵对固氮酶活性的钝化是 Fe 蛋白(固氮酶还原酶)上的第 100 位 Arg 残基被腺苷二磷酸核糖共价修饰所致。在限氮条件下, 钝化的 Fe 蛋白上的 ADP-核糖基键被水解, 酶蛋白重新活化。铵对固氮酶合成的阻遏是以 GS 为中介, 调节

方式同 *K. pneumoniae*, 但 gln(编码氮调节基因产物 Ntr) 相关基因在遗传结构上与肺炎克氏杆菌不同。现有遗传学研究证明, 光合细菌的氮调节方式与肠细菌不同, 并不是由 Gln 对 Uptase 的腺苷化与脱腺苷化进行调节, 也远较经典的肺炎克氏杆菌的基因的组织结构和调控方式复杂。迄今对 *R. capsulata* 的固氮调节方式知之甚少, 关于光合细菌 nif 基因的精细结构及其表达调控和生理意义仍处于进一步研究之中^[31,39]。关于固氮酶的调节机制目前仍是生物固氮研究中非常关心并且继续千方百计探索的研究课题。研究光合细菌固氮酶的 NH₄⁺ 阻遏的信号传递及其应答系统不仅对光合固氮具有重要意义, 而且在光合产氢研究中具有参考价值。

4 尚待解决的问题及应用前景

目前, 光合细菌的产氢研究仍然处于初级探索阶段, 大多仍采用纯培养和细胞固定化的技术路线, 研究规模大多仍局限在实验室水平。廉价电子供体、反应器设计、培养的最适化、寻找谷氨酸的替代物以规模产氢等问题都亟待解决, 经济可行生物工艺(例如高效率), 仍需要进一步开发。今后长期的基础研究重点应放在如何在户外高光照强度条件下持续产氢, 并获得高的太阳能转化效率。

固定化技术在一定程度上可提高反应器内的生物量, 使单位反应器的产氢率和运行稳定性有所提高, 但包埋材料的价格或毒性、包埋颗粒对光的透过性、传质阻力及等都是实际生产运行中必须考虑和解决的问题。

采用单一菌种大规模制氢有很多困难, 因为很多生物过程, 尤其是有机废水降解过程, 是单一菌株不能完成或能力很弱, 必须依靠两种或多种微生物共同完成。正是基于这一理论, 人为的、自觉的微生物混合培养或混合发酵已越来越受到人们的重视。新的分子微生态技术的诞生, 又为研究特定条件下微生物之间相互作用的基本方式、过程和机理提供了强有力的工具, 因此, 将不同营养类型和不同性能的菌株组建形成高效立体混合生态群, 通过提高群体光能利用率和生长量以大幅度提高产氢量是有可能的, 对这种群落进行分子水平上的研究不仅具有深远的理论意义, 而且对实践具有重大的指导意义。

光合细菌的产氢研究已从对现象的认识角度转向了获取氢能。人们已在认识产氢过程轮廓的基础上, 开始了解它各部反应的详细反应。光合细菌的光合放氢涉及细胞的光合作用、固氮作用、氢的代

谢、碳和氮代谢等, 目前只了解其大体结构与功能的相互衔接, 而对产氢过程中的每一个机构的精巧结构和其特殊功能联系的认识还处于入门阶段。光合产氢的碳代谢途径还不十分清楚, 光合基因和固氮基因以及其调控机理还知之甚少。这些具有完全不同功能的机构在运转时是如何进行相互协调和密切配合还几乎是个未知数。另外, 这些产氢机构的运转是如何与细胞其他生命活动相协调, 又是如何适应外界环境条件的变化等这些问题都是急需解决的。这些与生命起源有关的有趣生命现象现正吸引人们对其进行发掘和研究。

参考文献:

- [1] Asada Y, Miyake J. Photobiological hydrogen production [J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, **88**(1): 1—6
- [2] Nandi R, Sengupta S. Microbial production of hydrogen: An overview [J]. *Crit Rev Microbiol*, 1998, **24**(1): 61—84
- [3] Miyamoto K. Hydrogen production by photosynthetic bacteria and microalgae [M]. In *Recombinant microbes for industrial and agricultural application*. Ed by Yoshikatsu M, et al. New York. Basel. Hong Kong. 1994
- [4] Li Q S, Wei X. Comparison of growth of photosynthetic bacteria in axenic cultures and in co cultures [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1998, **22**(2): 101—105. [李勤生, 卫翔. 混合培养对光合细菌生长量的影响[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 101—105]
- [5] Xu X Y, Yu X E, Zheng P. Research on hydrogen production from organic compounds with immobilized cells of photosynthetic bacteria [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1994, **10**(4): 362—368. [徐向阳, 余秀娥, 郑平. 固定化光合细菌利用有机物产氢的研究[J]. 生物工程学报, 1994, 10(4): 362—368]
- [6] Wu Y Q, Chen B J, Chou Z. Studies on Nitrogenase activity, Hydrogenase activity and Mechanism of hydrogen production in the dark by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Microbiology*, 1991, **18**(2): 71—74. [吴永强, 陈秉俭, 仇哲. 浑球红假单胞菌在暗处发酵生长时的固氮酶、吸氢酶以及放氢机制研究[J]. 微生物学通报, 1991, 18(2): 71—74]
- [7] Zhu H G, Zhao Y L, Shi J L. Affecting factors on hydrogen production by photosynthetic bacteria [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1997, **8**(2): 194—198. [朱核光, 赵琦琳, 史家梁. 光合细菌 *Rhodopseudomonas* 产氢的影响因子的试验研究[J]. 应用生态学报, 1997, 8(2): 194—198]
- [8] Chen Y D, Li L B. 11th the international symposium on photosynthesis [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 1999, **15**(1): 232—235. [陈耀东, 李良壁. 第十一届国际光合作用研究会议情况简介[J]. 生物物理学报, 1999, 15(1): 232—235]
- [9] Gest H, Ormerod, JG, Ormerod, KS. Photometabolism of *R. rubrum*. Light dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1962, **97**: 21
- [10] Willison JC, Madern D, Vignais, P. M. Increased photoproduction of hydrogen by non autotrophic mutants of *Rhodopseudomonas capsulata* [J]. *Biochem J*, 1984, **219**: 583

- [11] Hustade E, Steinbuchel A, Schlegel, HG. Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non sulfur bacteria [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, **39**: 87
- [12] Jahn A, Keuntje B, Dorffler M, Klipp W, et al. Optimizing Photo-heterotrophic H₂ production by *Rhalobacter capsulatus* upon insertion mutagenesis in the *hypL* gene [J]. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 1994, **40**, 687
- [13] Seon YH, Lee CG, Park DH, et al. Hydrogen production by immobilized cells in the nozzle loop bioreactor [J]. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**, 1275
- [14] Liu S J, Yang H F, Zhou P J. Hydrogen production from toufu wastewater with immobilized cells of photosynthetic bacteria [J]. *Environmental Science*, 1995, **16**(1): 42. [刘双江, 杨惠芳, 周培瑾. 固定化光合细菌处理豆制品废水产氢研究[J]. 环境科学, 1995, **16**(1): 42]
- [15] Zurrer H, Bachofen R. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* [J]. *Appl Environ. Microbiol*, 1979, **37**, 789
- [16] Xu X Y, Yu X E, Zheng P. Kinetics of substrate utilization for hydrogen production with immobilized cells of photosynthetic bacteria [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1995, **11**(1): 51—57. [徐向阳, 余秀娥, 郑平. 固定化光合细菌产氢过程的基质利用动力学[J]. 生物工程学报, 1995, **11**(1): 51—57]
- [17] Weetall H, Shama BP, Detar CC. Photometabolic production of H₂ from organic substrates by free and immobilized mixed cultures of *Rhodospirillum rubrum* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1981, **23**, 605
- [18] Odum J. M., Wall JD. Photoproduction of H₂ from cellulose by an anaerobic bacterial coculture [J]. *Appl. Environ Microbiol*, 1983, **45**, 1300
- [19] Miyake J. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum* [J]. *J Ferment Technol*, 1984, **62**(6): 531—535
- [20] Miura Y, Matsuo S, Miyamoto K, Saitoh C. Stably sustained hydrogen production with high molar yield through a combination of a marine green alga and a photosynthetic bacteria [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56**, 751—754
- [21] Ike A, Saimura C, Hirata K, Miyamoto K. Hydrogen photo production from CO₂ fixing microalgal biomass: application of halotolerant photosynthetic bacteria [J]. *J Ferment. Bioeng*, 1997, **84**, 606—609
- [22] Yokio H, Shingo M, Hirose J, Sachio H, Yoshiyuki T. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sp.* M-19 [J]. *Biotechnology Letter* 1998, **20**(9): 895—899
- [23] Wakayama T, Asada Y, Miyake J. Effect of light/dark cycle on bacterial hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* RV from hour to second range [J]. *Applied Biochem Biotech* 2000, **84** 86: 431—440
- [24] Wu D Q, Qian X M. Advance in regulation and expression of photosynthesis gene in purple non sulfur bacteria [J]. *Microbiology*, 1996, **23**(2): 115—121. [吴大庆, 钱新民. 紫色非硫细菌光合基因表达调控研究进展[J]. 微生物学通报, 1996, **23**(2): 115—121]
- [25] Zhang C X, Fan H J, Li L B, Kuang T Y. Studies on primary reaction of photosynthetic bacteria [J]. *Science in China*, 1999, **29**(3): 276—280. [张纯喜, 樊红军, 李良壁, 匡廷云. 光合细菌原初反应的理论研究[J]. 中国科学C辑, 1999, **29**(3): 276—280]
- [26] Chen S P. *Environmental Biotechnology* [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1994, 230—233. [程树培. 环境生物技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994, 230—233]
- [27] Jouanneau Y, Kelley BC, Berlier Y, Lespinat PA, Vignais PM. Continuous monitoring by mass spectrometry of H₂ production and recycling in *Rhodopseudomonas capsulata* [J]. *J Bacteriol*, 1980, **143**(2): 628—36
- [28] Gorrell TE, Uffen R L. fermentative metabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* after anaerobic growth in darkness [J]. *J Bacteriol*, 1977, **131**, 533
- [29] Gorrell TE, Uffen R. L. Photoproduction of hydrogen gas and catabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* grown anaerobically in the dark and in the light [J]. *Photochem. Photobiol*, 1978, **27**, 351
- [30] Siebert E, et al. Hydrogen metabolism and nitrogen fixation in wild type and nif mutants of *Rhodopseudomonas acidophila* [J]. *Biochimie*, 1978, **60**, 261
- [31] Wu Y Q, Song H Y. Advance in the study on molecular biology of nitrogen fixation in photosynthetic bacteria [J]. *Plant Physiolog Communication*, 1991, **27**, 161. [吴永强, 宋鸿遇. 光合细菌固氮分子生物学研究进展[J]. 植物生理学通讯, 1991, **27**, 161]
- [32] Adams MWW, Edward S. Biological hydrogen production: Not so elementary [J]. *Science*, 1998, **4**: 282, 1842—1843
- [33] Anne V., Marie HC Frontecilla JC. Crystal structure of the nickel iron hydrogenase from *Desulfourobrio gigas* [J]. *Nature*, 1995, **373**: 580—587
- [34] John W P. Structure and mechanism of iron only hydrogenases [J], *Current Opin Stru Biol*, 1999, **9**: 670—676
- [35] Zhang M, Shi J L. Mechanism of hydrogen production by photosynthetic bacteria [J]. *Chinese Journal of Applied Environment of Biotechnology*, 1999, **5**(sup): 25—29. [张明, 史家梁. 光合细菌光合产氢机理研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(sup): 25—29]
- [36] Long M N, Zhang F Z, Xu L S. Gene cloning of small subunit of soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum* [J]. *Journal of Xiamen University Science*, 2000, **39**(2): 247—252. [张凤章, 许良树. 光合细菌可溶性氢酶小亚基的克隆[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, **39**(2): 247—252]
- [37] Koch HG, Kern M, Klemme, JH. Reinvestigation of regulation of biosynthesis and subunit composition of nickel-dependent Hup hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* [J]. *FEMS Microbiol. Lett*, 1992, **91**, 193
- [38] Woodward J, Mattingly SM, Danson M, Hough D, Ward N, Adams M. In vitro hydrogen production by glucose dehydrogenase and hydrogenase [J]. *Nature Biotechnol*, 1996, **14**(7): 872—4
- [39] Liang L, Zhu M Z, Wu Y Q. Studies on the construction and expression of gln B LacZ fusion [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1999, **25**(3): 149—2552. [梁莉, 朱美珍, 吴永强. 光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* gln B LacZ融合子的构建与表达[J]. 植物生理学报, 1999, **25**(3): 149—2552]
- [40] You C B, Jiang Y M, Song H Y. Biological fixation of nitrogen [M]. Science Press, 1987. [尤崇杓, 姜涌明, 宋鸿遇. 生物固氮[M]. 科学出版社, 1987]