

学校编码

分类号_____ 密级_____

学号:

UDC_____

学 位 论 文

构建蓝藻光合产氢受体细胞的初步研究

Preliminary study on the construction of cyanobacterial receptors for biophotohydrogen production

张 平

指 导 教 师 : 杨 盛 昌 副教授

龙 敏 南 副教授

申 请 学 位 级 别 : 硕 士 专 业 名 称 : 植 物 学

提 交 日 期 : _____ 论 文 答 辩 日 期 : _____

学 位 授 予 单 位 和 日 期 : 厦 门 大 学 2004 年 9 月 22 日

答 辩 委 员 会 主 席 : 黄 维 南 研 究 员

评 阅 人 : _____

2004 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

学位论文作者签名：

摘要

蓝藻在生物光解水制氢领域中担当重要的角色。本文从选择并改造光合产氢受体蓝藻细胞入手，探索通过蓝藻光合电子传递链上还原力的重新分配，提高外源耐氧氢酶光合放氢活性的能力。

首先，采用溶菌酶处理法分离获得无菌、纯种的野生型聚球藻 *Synechococcus* PCC 7942 培养物，观察到该藻株在自然生长条件下是离散度较高的单细胞蓝藻；进一步测定了聚球藻 PCC 7942 细胞的基础发酵产氢活性，优化了野生株产氢的条件 ($OD_{730} = 1.5$ ， 0.15 mol/l 蔗糖， $\text{pH } 8.7$ ， 30

)。上述结果表明，聚球藻 PCC7942 适合外源耐氧氢酶基因的转入和活性表达。其次，从蓝藻的 CO_2 浓缩机制(简称 CCM)着手，构建质粒 pUC-HATK 并与聚球藻 PCC 7942 发生同源整合，将卡那霉素抗性标记基因成功插入聚球藻 PCC 7942 的 HCO_3^- 高亲和转运蛋白操纵子基因 *CMPABCD* +1508~+1509 区(*cmpB* 基因的起始编码框为 +1)，获得聚球藻 PCC 7942 CCM 突变株。最后，对聚球藻 PCC 7942 野生株和突变株的生长和放氢活性进行比较研究，发现聚球藻 PCC 7942 突变株因外源基因的插入，生长和放氢活性都有明显的差异。在低浓度 CO_2 (0.05%) 的条件下，突变株生长速率明显低于野生株，间接地说明突变株 CO_2 的固定效率比野生株细胞低。因而在蓝藻光解水制氢时，调节生长和放氢培养环境的 CO_2 浓度，可能实现蓝藻光合系统电子流有利于耐氧氢酶催化放氢的方向重新分配。

本文确定了光合蓝藻受体细胞研究的起始藻株，并通过构建同源整合载体 pUC-HATK 与聚球藻 PCC7942 进行同源整合、筛选，获得聚球藻 PCC7942 CCM 突变株，然后对突变株的应用性进行了分析和讨论，为进一步的构建可调控的蓝藻光解水制氢受体系统提供了理论依据。

关键词：聚球藻 PCC7942；光合产氢； CO_2 浓缩机制；同源整合

ABSTRACT

Cyanobacteria play an important role in the bio-photohydrogen production. To improve biophotohydrogen production activity of cyanobacteria by reallocating the electron of photosystem, we conducted the tentative research.

First, the pure and sterile *Synechococcus* PCC7942 wild strain were obtained by lysozyme treatment. Microscopic observation suggested that unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 distributed dispersively. Then hydrogen production activity of *Synechococcus* PCC7942 was determined and its hydrogen production conditions was optimized ($OD_{730} = 1.5$, 0.15 mol/l sugar ,pH 8.7,30). All these results indicated *Synechococcus* PCC7942 wild strain was very suitable for the gene of foreign O_2 -tolerant hydrogenase to transform and express. Second, we constructed the homogenetic integration plasmid vector pUC-HATK. By homogenetic integration, the kanamycin gene was inserted into the coding region of operon gene *CMPABCD* (+1508 ~ +1509 district, with respect to the translation start site of *CMPB* gene) and a *Synechococcus* PCC7942 mutant strain was obtained successfully. Finally, by the comparative research between the *Synechococcus* PCC7942 wild strain and mutant strain, obvious difference in their growth and the hydrogen producing activities was found between them. Especially, in the low CO_2 concentration (0.05%) condition, the growth rate of the wild strain is greater than that of mutant strain distinctly, which indicated the insertion might interfere the Calvin cycle in the mutant cells indirectly. Thus it is possible to fulfill the redistribution of the reductant from photosystem of the mutant cells by controlling the CO_2 concentration and to improve the hydrogen producing activity of the mutant strain when it is applied in biophotohydrogen production.

In this study, we selected *Synechococcus* PCC7942 as the original cell, obtained *Synechococcus* PCC7942 CCM mutant stain by homogenetic integration and discussed the feasibility of the mutant to be applied in

biophotohydrogen production. It offered a basic knowledge for the related research fields.

Key words: *Synechococcus*PCC7942 ; biophotohydrogen production ; CO₂ concentrating mechanism(CCM) ; homogenetic integration

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

中文摘要.....	1
ABSTRACT.....	2
1 前言	5
1.1 概述.....	5
1.2 氢能.....	5
1.3 氢的制备.....	7
1.4 生物制氢.....	7
1.5 蓝藻 CO ₂ 浓缩机制.....	19
1.6 本研究的目的及意义.....	21
2 材料与方法	24
2.1 材料.....	24
2.2 仪器与试剂.....	25
2.3 常用生物软件.....	26
2.4 实验方法.....	27
3 结果和分析	35
3.1 聚球藻 PCC7942 无菌培养物的分离和形态特.....	35
3.2 聚球藻 PCC7942 野生株放氢条件的优化.....	35
3.3 同源整合质粒 pUC - HATK 的构建.....	40
3.4 聚球藻 PCC7942 CCM 突变株的构建.....	51
3.5 聚球藻 PCC7942 野生株与突变株生长及放氢的比较.....	52
4 讨论	59
参考文献	64
致谢	70

1. 前言

1.1 概述

能源,是人类社会发展的支柱。石油、煤、天然气等石化能源是支撑现代社会发展的主要能源。随着社会的发展,能源的需求量日益增长,由能源带给自然和人类社会的问题也日渐突出。一方面:传统化石能源是有限的,不可再生的。占世界能源供给 90%的化石燃料其储量日益枯竭。已探明世界原油可供再利用 50~80 年,煤可供再利用 200~300 年,天然气可供再利用 100 年^[1]。而考虑到目前社会发展的速度和趋势,要通过减少能源的消耗来实现降低能源需求的目的是不切实际的。另一方面:化石燃料的使用导致了严重的环境污染。化石燃料燃烧放出的烟尘、和多种有害气体如 CO₂、SO₂、NO 等,使地球环境受到了严重的破坏。以主要的温室气体 CO₂ 为例,据资料显示自工业化革命以来,全球的 CO₂ 增长了 25%,如继续下去,到 2025 年,CO₂ 水平加倍。据计算,全球温度上升 1~5℃,海平面将上升 0.3~1 米^[2],人类的生存也将受到威胁。可见人类社会的可持续发展与传统化石能的利用之间存在着不可调和的矛盾,因而寻求可清洁替代能源引起了全球关注。许多国家将清洁能源的开发列入国家重点发展项目,希望以此有效的解决目前面临的能源和环境危机。

1.2 氢能

目前,在众多的清洁能源当中,氢能已经成为新能源舞台上举足轻重的角色。早在第二次世界大战期间,氢即用作 A—2 火箭发动机的液体推进剂。1960 年液氢首次用作航天动力燃料。1970 年美国发射的“阿波罗”登月飞船使用的起飞火箭也是用液氢作燃料。现在氢已是火箭领域的常用燃料了。对现代航天飞机而言,减轻燃料自重,增加有效载荷变得更为重要。氢的能量密度很高,是普通汽油的 3 倍,这意味着燃料的自重可减轻 2/3,这对航天飞机无疑是极为有利的。在宇宙中氢是最丰富的物质,氢在自然界多以化合物形态出现。化合态氢的最常见形式是水和有机物(如石油、

煤炭、天然气及生命体等)。然而,在地球上自然存在的氢的单质(如氢气)数量极少。因此,欲获得大量的单质氢只有依靠人工制取。其中,天然气、石油、煤炭、生物质能及其他富氢有机物等,都是氢的有效来源。而氢的最大来源是水,特别是海水,根据计算,9 T 水可以生产出 1 T H_2 (及 8 T O_2),而 H_2 与 O_2 的燃烧产物又是 H_2O ,因而,水可以重复利用。由此可见,以水为原料制氢,可使氢的制取和利用实现良性循环,做到取之不尽,用之不竭。氢燃烧后只生成 H_2O ,没有碳氢化合物、一氧化碳和二氧化碳等污染物。虽然氢在空气中燃烧会像其他燃料一样产生氮氧化物,但是极其微量。氢能不仅是一种清洁能源而且也是一种优良的能源载体,具有可储的特性。储能是合理利用能量的一种方式。太阳能、风能都可以转化为氢能储存,供需要时再使用,这种储能方式分散灵活。此外,氢的能量密度高(见表 1-1),与其他燃料相比,同等重量下燃烧反应所放出的能量最高。由于氢的运动粘度,扩散系数和导热系数都较其他燃料高出许多,并且它的密度又很小,所以氢具有独一无二的扩散和热传播性质。氢燃烧后的残余能量很少,能量基本都被释放出来。

表 1-1 几种物质的燃烧值^[3]Tab. 1-1 Fuel value of several materials^[3]

名称	氢气	甲烷	汽油	乙醇	甲醇
燃烧值 / $kJ \cdot kg^{-1}$	121061	50054	44467	27006	20254

氢能的独特还在于氢的化学简单性。它在发生反应时,破坏和形成的键相对来说很少,具有高的反应速率常数,能量释放非常快,燃烧的持续时间非常短,因此具有高的输出效率。随着燃料电池技术的进步,可以实现把氢能直接转化为电能,制氢技术的研究颇具潜力。

1.3 氢的制备

煤气化：煤在高温高压下与气化剂转化成气体产物。气体产物中含有氢气等组分，氢气占所产生气体总体积的 30 ~ 39%。但是煤气法制氢能耗高，需要消耗大量的原煤。而且得率相对较低。

天然气 / 烃类物质的氧化重整：该法是在催化剂存在下与水蒸气反应制得氢气。此法需要外部供热，热效率较低。反应过程中水过量，能耗高。

重油部分氧化：重油原料包括有常压、减压渣油及石油深度加工后的燃料油。重油与水蒸气及氧气反应制得含氢的气体产物。部分重油燃烧提供转化吸热反应所需热量及一定的反应温度。气体产物中氢气体积占 46%，纯度不高。

水电解制氢：水电解制氢是氢与氧燃烧反应生成水的逆过程。提供电能使水分解制得氢气效率一般为 75 ~ 80%，制得的氢气纯度较高，工艺过程简单并且无污染，但是耗电量大，浪费能源，因此应用受到一定的限制。近年来水电解的工艺、设备不断改进，如使用固体高分子离子交换膜作为电解质，替换原来使用的强碱性电解液；在电解工艺上采用高温高压参数以利于反应进行等，但是水电解制氢的能耗仍然较高，一般每立方米氢气电耗为 4.5 ~ 5.5 kWh 左右。

虽然目前已有多样制备氢气的途径，但是传统的制氢方法都有一个不足之处即需要消耗大量的能量或化石原料，而且生产成本普遍较高。因此寻找低成本、大规模的清洁制氢技术已成为人们研究的热点。

1.4 生物制氢

1931 年, Stephenson 等^[4]首次报道了在细菌中含有氢酶(Hydrogenase), 这种酶可逆催化氢的氧化还原反应。1949 年 Gest 等^[4]证明, 光合细菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 具有在光照厌氧条件下分解有机物产生氢气的特性。1966 年 Lewis 最先提出了生物制氢课题。20 世纪 70 年代由于能源危

机的出现^[5]和传统制氢方法的局限性,生物制氢技术作为一个符合可持续发展战略的课题,在世界上引起了广泛的关注。到20世纪90年代,全球气候与环境的恶化使世界上许多包括发达国家在内的国家都更加重视生物制氢技术的研究。如美国、德国、日本、葡萄牙、俄罗斯、瑞典、英国、以色列等都投入了大量的人力物力对该项技术进行的研究开发。美国每年用于生物制氢技术研究的费用平均为几百万美元,而日本在这一方面研究领域的每年的投资则是美国的5倍左右,由日本能源部主持的氢行动计划中,预计在21世纪中叶使生物制氢实现商业化生产,该计划确立的最终目标是建立一个世界范围的能源网络,以实现可再生能源--氢的有效生产、运输和利用^[6]。经过半个世纪的研究和探索,生物制氢在理论和应用性研究上都有了长足的发展,积累了丰富的经验。目前用于生物制氢研究的微生物主要有:绿藻、蓝细菌、光合细菌、厌氧和兼性厌氧细菌等。部分微产氢生物效果比较见表1-2。

表 1-2 不同生物产氢效率比较^[7]

Tab.1-2 Comparision of hydrogen predicting of various microorngnisms^[7]

生物类群 代表种属	培养基	最大产氢速率 (mmol H ₂ /g dry cell . h)	主要产物
蓝细菌			
<i>Oscillatoria sp.Niami</i>	BG7 培养基 A 除去 NH ₄ Cl	0.3	H ₂ /CO ₂ /O ₂ =6:3:1
<i>Anabaena CA</i>	ASP-2	2.14	H ₂ , O ₂
光合细菌			
<i>Rhodopseudomonas capsulate</i>	乳酸盐和其它氮源	5.3	H ₂ , CO ₂ , O ₂ 和少量有机酸
<i>dopseudomonas palustris</i>	糖精废水	1.2	H ₂ , CO ₂ , O ₂ 和少量有机酸
<i>Rhodobacter spHaeroides</i>	含乳酸的废水	5.9	H ₂ , CO ₂ , O ₂ 和少量有机酸
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	有机物	2.5	H ₂ , CO ₂ , O ₂ 和少量有机酸
厌氧/兼性厌氧细菌			
<i>stridium butyricum</i>	细菌培养基中添加葡萄糖	7.3	H ₂ , CO ₂ 和高含量的有机酸
<i>Citrobacter intermedius</i>	纤维素、淀粉、葡萄糖	9.5	H ₂ , CO ₂ 和高含量的有机酸
<i>Enterobacter cloacae IIT</i>	培养基中含有蔗糖	29.63	H ₂ , CO ₂ 和高含量的有机酸

按照微生物产氢的特点来分，生物制氢主要有非光合微生物发酵制氢和光合微生物太阳能制氢。

1.4.1 非光合微生物发酵制氢

非光合微生物发酵制氢主要是兼性厌氧和专性厌氧的产氢细菌以葡萄糖，污水，纤维素等为发酵产氢的底物进行发酵产氢。目前这方面的研究工作主要是高效产氢细菌的分离和筛选及操作条件和工艺流程的不断改进，从而实现高效产氢的目的。我国在这方面研究也取得了一些进展，任南琪等^[8]1990 年就开始开展生物制氢技术的研究，并于 1994 年提出了以厌氧活性污泥为主要原料的有机废水发酵法制氢技术；这种利用碳水化合物为原料的发酵法生物制氢技术，突破了生物制氢技术必须采用纯菌种和固定技术的局限，开创了利用非固定化菌种生产氢的新途径，并首次实现了中试规模连续流长期生产持续产氢。在此基础上，他们又先后发现了产氢能力很高的乙醇发酵类型，发明了连续流生物制氢反应器，初步建立了生物产氢发酵理论，提出了最佳工程控制对策。该项技术和理论成果在中试研究中得到了充分的验证：中试产氢能力达 $5.7 \text{ m}^3\text{H}_2/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ ，制氢规模可达 $500 \sim 1000 \text{ m}^3/\text{m}^3$ ，且生产成本明显低于目前广泛采用的水电解法制氢成本^[8, 9, 10]。

1.4.2 光合微生物制氢研究

光合微生物制氢是利用一些可以将太阳能转化为氢能的微生物来进行生物制氢。其最大的特点就是可以利用太阳能。微生物光合制氢主要有两个途径：(1) 光合细菌 (PSB) 光分解有机化合物制氢法；(2) 微藻 (主要是蓝藻及绿藻) 光解水制氢法。有些光合细菌具有利用有机物或还原硫化物产生氢气的的能力。光合细菌产氢具有产氢过程不放氧、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^[11]。但是光合产氢细菌没有光合系统，不能利用太阳光和水产氢^[12]，同时由于可用于产氢的有机物的产地和数量等因素也决定了其应用范围有限，研究规模大多仍局限在实验室水平，难以进行大规模工业化的氢生产。

微藻太阳能光水解制氢是通过微藻光合作用系统及其特有的产氢酶系裂解水生成氢气（见图 1-1）。当前研究的较多的是蓝藻和绿藻的太阳能光解水制氢。

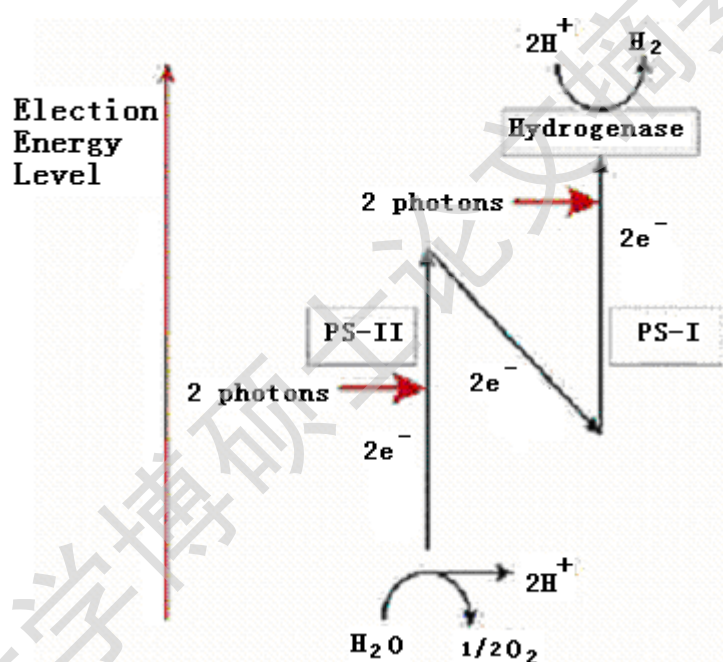


图 1-1 光生物制氢电子传递示意图^[13]

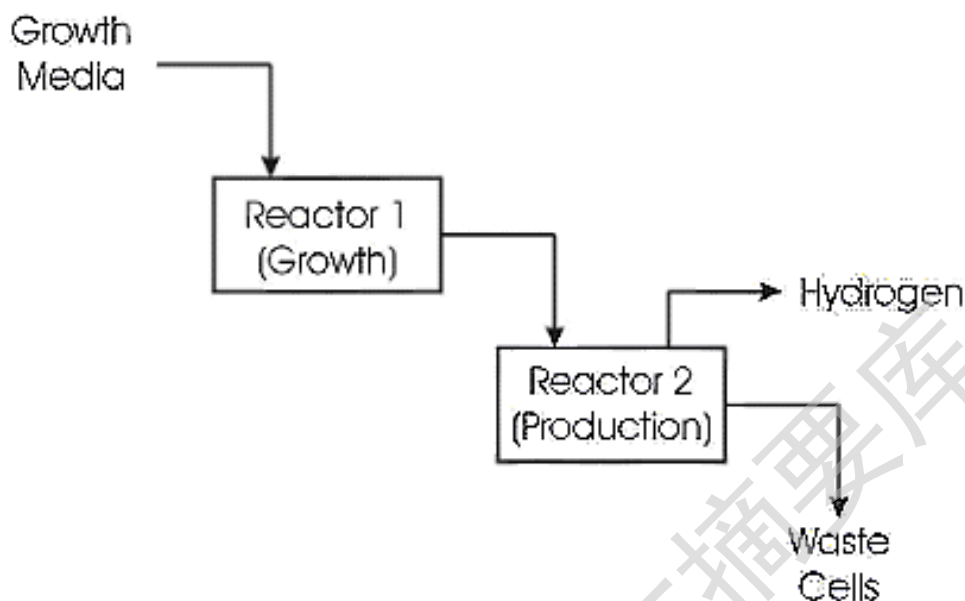
Fig.1-1 Diagram of electron pathway of photobiological hydrogen production^[13]

多数藻类的光合作用系统与高等植物类似，是由两个相互独立又紧密协同作用的部分即光系统（产生并传递用于 CO_2 固定的还原力）和光系统（裂解水并产生 O_2 ）构成。藻类产氢的过程是以太阳能为能源、以水为原料，具有相对较高的催化效率，和能量转化率。在目前可以达到的培养条件下，微藻能够将可见光中的 22%（约为太阳能的 10%）的能量转化并储

存为化学能，这其中也包括其产生的氢气^[14]。而且利用微藻制氢的生产过程清洁，具有可以实现光能收集系统的自组织、能量的自发积累、定向快速转化等诸多优点。

1.4.2.1 绿藻光解水生物制氢研究：

到目前为止利用微藻进行光裂解水制氢的研究主要以蓝藻和绿藻为主。1942年 Gaffron 等^[15]首先发现绿藻 *Scenedesmus obliquus* 既能在固定 CO₂ 时氧化分子氢提供还原力又可以在光照的时候产生分子氢。这在光生物制氢史上是一个非常重要的发现，引起了许多科学工作者对绿藻光生物制氢研究这一领域的兴趣。在过去的十年里，应用传统的生理生化方法，为绿藻的氢酶研究积累了丰富的数据^[15,16]。2000年 Melis 等^[17,18,19]发现光照及脱硫的培养条件，有助于消除 O₂ 对氢酶的抑制作用。进一步研究表明当处于无硫培养基中，外源 Fe-氢酶可以在绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中被诱导长时间表达，持续时间与在厌氧条件下持续的时间相同。在随后的工作中，他们又采用两步光合产氢系统 (two-stage photosynthesis and H₂ production system) (见图 1-2) 使绿藻的放氢效率进一步提高。目前，在绿藻中分离获得的三种氢酶基因均属于 Fe-氢酶类型^[20-22]，而在蓝藻中尚未发现有 Fe-氢酶的存在，这是一个非常有趣的现象^[23]。但是在国内尚未见到绿藻光解水制氢的研究报道。

图 1-2 两步法光水解连续产氢示意图^[17]Fig. 1-2 Two steps method in continuous hydrogen production^[17]

1.4.2.2 蓝藻光解水生物制氢研究进展

蓝藻又称蓝绿藻，在地球最早期的历史中就可以发现其进化及多样性存在的痕迹。而且它被普遍认为在前寒武纪时期，是大气中氧气的主要贡献者之一。蓝藻分布非常的广泛，在包括淡水、海水、陆地、甚至一些极端的环境中，都可以发现蓝藻的存在。它以叶绿素 a 作为主要光合色素，通过 Calvin 循环固定 CO_2 ，光合作用过程中释放氧。蓝藻之所以会被认为是良好的生物制氢微生物，主要原因是蓝藻本身所具有的独特的优势。蓝藻是为数不多的既可以产氢又可以进行光合作用的原核微生物。它所要求的培养条件粗放，在光照条件下，只需要水，和简单的无机盐成分，就可以生长良好。这对蓝藻的大规模培养，低成本运转是十分有利的。

在蓝藻中，已知的与氢代谢相关的氢酶有：

(1) 固氮酶 (nitrogenase)。现今有关固氮酶的研究结果表明，所有的固氮酶在它们固氮的过程中均会释放氢气，并且消耗 ATP， H_2 是固氮酶催

化固氮过程中的副产物^[24]。催化过程中通过固氮酶的 25% 的电子流被用来催化还原质子为氢。所以固氮酶又被称为是特殊的氢酶（反应式如下）：



蓝藻中最早被研究的可以放氢的酶是具有异形胞的丝状蓝藻 *Anabana cylindrical* B629 中的固氮酶。1974 年，Beneman 等^[25]采用乙炔还原法对 *A. cylindrical* 中固氮酶产氢的需光性，氧敏感性进行了研究和讨论。1977 年，Daday 等^[25]提出光密度、氧浓度、吸氢酶和反应体系的气相组成是影响 *A. cylindrical* B629 产氢的关键因素。同年，蓝藻固氮酶产氢标准培养条件被确立。在这个标准下，最高的产氢量可以达到 32 $\mu\text{l}/\text{mg wt}/\text{h}$ ^[26]。现已确定：光饱和条件下固氮培养物的光合作用为固氮作用提供还原力，并且两者之间维持着一个良好稳定的线性关系。蓝藻中固氮酶催化固氮产氢的过程中需要的 ATP、还原力和电子是由光合作用系统或糖酵解途径提供。固氮酶是一个金属酶复合体，由 nitrogenase（MoFe 蛋白， $\alpha_2\beta_2$ ）和固氮酶还原酶（Fe 蛋白， α_2 ）组成。复合体中的这三个蛋白亚基分别是由 *niFD*（ α 亚基）和 *niFK*（ β 亚基），*niFH*（ α 亚基）三个基因编码的（见图 1-3）。固氮酶对氧敏感，当固氮酶暴露在有氧的环境中时，它会迅速的失活。但是蓝藻具有多种天然策略来防止固氮酶暴露在 O_2 中。这主要体现在时间性差异（固氮过程和光合作用在不同时间进行）及空间性的隔离（形成氧难以进入的异形胞）将固氮过程和 O_2 分隔开，使固氮酶在无氧的条件下催化固氮^[27-32]并释放氢气。

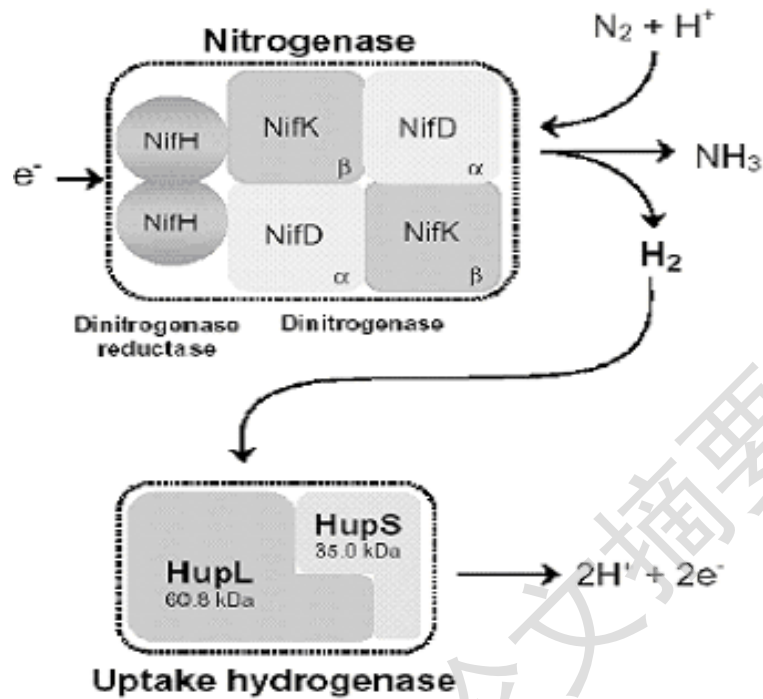
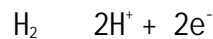


图 1-3 参与氢代谢的固氮酶和吸氢酶^[33]

Fig.1-3 Nitrogenase and uptake hydrogenase involved in hydrogen metabolism in cyanobacteria^[33]

(2) 吸氢酶 (uptake hydrogenase)。该酶在固氮蓝藻中的主要生理功能是吸收固氮酶催化固氮过程中产生的 H_2 (见图 1-3), 反应式如下:



已有的研究资料表明, 所有固氮蓝藻中均存在吸氢酶。目前虽然有人提出在单胞非固氮蓝藻, 聚球藻 PCC 6301 中也有吸氢酶存在的可能, 但是在非固氮蓝藻中, 吸氢酶存在与否还有很大的争议^[34, 35]。吸氢酶吸收固氮酶释放的 H_2 具有三个主要的功能: 通过氧化 H_2 获得 ATP; 除去固氮酶周围的 O_2 , 防止固氮酶遇氧失活; 为固氮酶或者体内其它代谢提供还原力^[37-39]。吸氢酶在蓝藻细胞中的定位仍是个颇有争议的问题。有人认为是位于异形胞中的内囊体膜上^[40], 也有人提出在异形胞和一般生长细胞中都有吸氢酶存在, 并且与质膜有特别的联系^[41-44]。1995 年 Carrasco 等^[45] 首先报道了蓝藻

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库