

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.030

不同阳极电势驯化对于丁酸梭菌 葡萄糖代谢影响研究

代 凤^{1,2}, 刘 建^{1,2}, 孙 霞^{1,2}, 高 平¹, 李大平²

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 中国科学院成都生物所环境与应用重点实验室, 成都 610041)

摘要: 构建丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 生物化学反应器, 以研究不同驯化电势对其活性的影响. 电池性能测试表明该菌具有良好的电活性. 在该菌的生物电解池中, 控制阳极电势 (+0.6 V、+0.2 V 和 -0.2 V, vs Ag/AgCl), 电驯化菌株, 结果显示该菌的电活性及葡萄糖代谢呈现出明显差异. 0.6 V 和 0.2 V 组的最大输出电流分别为 1.8 mA 和 1.2 mA, 而 -0.2 V 组为 0.02 mA. 高电势组内, 乳酸、丁二酸和乙醇的含量逐渐减少, 同时生成少量乙酸和丁酸. 但 -0.2 V 组则生成了大量丁酸 (345 mg/L) 和生物质, 伴随少量 CO₂ 生成 (4 %). 实验结果表明高阳极电势促进生物膜的电极呼吸代谢, 抑制其发酵代谢, 从而表现出高生物电活性.

关键词: 生物电化学系统; 丁酸梭菌; 阳极电势; 葡萄糖代谢

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0399-06

The glucose metabolism variation of clostridium butyricum during domestication with different anode potentials

DAI Feng¹, LIU Jian¹, SUN Xia¹, GAO Ping¹, LI Da-Ping²

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: *Clostridium butyricum* was used for studying its glucose metabolism and bioelectrical activity with different anode potentials (+0.6, +0.2 and -0.2 V, vs Ag/AgCl). The cell performance test showed a good bioelectrical activity of the strain. During the domestication of the strain with three different anode potentials, the performances were quite different. At the end of domestication, the maximum output current of group 0.6 V and 0.2 V were ca. 1.8 mA and 1.2 mA, while the group -0.2 V was only ca. 0.02 mA. The content of lactate, succinate and ethanol of different groups were decreased with the increasing of acetate and butyrate. Lots of butyrate (345 mg/L) and biomass were generated in group -0.2 V, while the content of CO₂ (4 %) was much less. The glucose metabolism analysis showed a transformation of metabolism from fermentation to anode-respiration with the bioelectrical activity.

Keywords: Bioelectrochemical system, *Clostridium butyricum*, Anode potential, Glucose metabolism

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270166)

作者简介: 代凤(1989-), 女, 吉林松原人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学. E-mail: daisyfen@outlook.com

通讯作者: 高平. E-mail: gaop@scu.edu.cn; 李大平. E-mail: lidp@cib.ac.cn

1 引言

生物电化学技术是一种独特的技术,它利用具有电活性的微生物进行化学能与电能之间的直接转化.在生物电化学系统中,电活性微生物进行着与电极相耦合的半反应.阳极半反应是阳极呼吸菌氧化离子导体(电解质)中的高电密度物质(乙酸、丙酸、丁酸和葡萄糖等),将电子传递给电子导体(电极)^[1-3].阴极半反应是电极将外源性的电子传递给阴极电活性微生物或其他无生物活性物质,进行的还原反应.

在生物电化学系统的研究中,电势控制技术对电化学作用机理的研究有着广泛而重要的应用.研究人员可以控制不同的阳极电势,从而研究电活性微生物所具有的特殊电化学性质.先前关于控制电势研究微生物燃料电池的文献,主要集中在电势对电池启动时间、最大电流密度和生物质生成的影响^[4-10].由于生物电化学系统的复杂性,这些研究结果存在相冲突性.一些研究结果支持高电势对于微生物燃料电池性能有提高作用,而另外一些研究则支持低电势可以促进微生物燃料电池的运行.支持高电势的研究主要以 *Geobacter sulfurreducens* 为研究对象,在高电势下,*G. sulfurreducens* 迅速占据电极表面形成电活性的生物膜^[9, 10].支持低电势的文章主要使用混合菌作为研究对象,在高电势下,混合菌中无电活性的菌可能先占据电极表面从而阻止电活性生物膜的形成^[6].

上述的研究主要利用乙酸作为反应底物,以此避免发酵作用使反应系统复杂化,同时只关注系统的电能输出.他们忽略了与电能输出相关的胞内代谢情况,特别是使用葡萄糖等可发酵的底物时,胞内代谢与电流输出的关系情况.在未来的微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)应用中,利用一些复杂的糖类作为底物进行产电是不可避免的.而且他们也忽略了不同电势下,微生物从无电活性到有电活性整个驯化过程中,其代谢与阳极电势间的变化关系,这对于我们理解微生物对于不同电势的适应以及其最终的电化学行为有着重要的帮助.本文从实验室菌种中选出一株具有电化学活性的菌株 *Clostridium butyricum*,在对其进行初步的电化学特性表征后,研究其在不同阳极电势下驯化期内葡萄糖代谢变化,其中包括生物质、代谢产物与最大输出电流的分析.此研究讨论了阳极电势对于微生物代谢的影响,并将发酵代谢、电流输出与微

生物电活性三者相联系,进一步解释电驯化微生物的形成机制.

2 材料与方 法

2.1 材 料

2.1.1 菌种 本研究使用的菌种(*Clostridium butyricum*、*Klebsiella pneumoniae* BF8-1、*Klebsiella oxytoca*)来自中国科学院成都生物研究所,于2008年保藏于中国微生物菌种保管委员会普通微生物保藏中心.

2.1.2 培养基 LB培养基的组分(1 L):10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,5 g NaCl,9.12 g Na₂HPO₄·12H₂O,1.75 g KH₂PO₄·2H₂O.

阳极室电解液的组成(1 L):1.8 g C₆H₁₂O₆,5.45 g Na₂HPO₄·12H₂O,1.5 g NaH₂PO₄·2H₂O,5 g NaCl,0.1 g KCl,0.25 g NH₄Cl,10 mL 维生素培养液,10 mL 矿质元素培养液.

维生素培养液的组成(1 L):2 mg 生物素,2 mg 叶酸,10 mg 吡哆素,5 mg 硫胺素,5 mg 烟酸,5 mg 核黄素,5 mg 泛酸,0.1 mg 钴胺素,5 mg 对氨基苯甲酸,5 mg 硫辛酸.

矿质元素培养液的组成(1 L):1.5 g N(CH₂COOH)₃,3 g MgSO₄·7H₂O,0.5 g MnSO₄,1 g NaCl,0.1 g FeSO₄·7H₂O,0.18 g CoSO₄·7H₂O,0.1 g CaCl₂,0.18 g ZnSO₄·7H₂O,0.01 g CuSO₄·5H₂O,0.02 g KAl(SO₄)₂·12H₂O,0.01 g H₃BO₃,0.01 g Na₂MoO₄·2H₂O,0.03 g NiCl₂·6H₂O,0.003 g Na₂SeO₃·5H₂O.

阴极电解液使用 K₃[Fe(CN)₆]替代阳极电解液中的 C₆H₁₂O₆,其余组分保持一致,K₃[Fe(CN)₆]的终浓度为 30 g/L.

2.1.3 电化学反应器 本实验使用 H 型玻璃电化学反应器.阳极室与阴极室液体体积为 125 mL,顶空体积为 50 mL.用 3 cm×3 cm×0.15 cm 的碳毡作为阳极,用 3 cm×3 cm×200 目的钛网作为阴极,用钛丝和钛螺丝固定碳毡并作为导线,用饱和氯化银电极作为参比电极(0.197 V, vs SHE).反应器阴、阳极两室之间使用 CMI 7000 阳离子交换膜(Membranes International Inc.)进行隔离.

2.2 方 法

2.2.1 菌体的培养 菌种接种至 LB 培养基中,置于摇床(30 °C,120 r/min)活化 48 h 后,取 0.25 mL 菌液接入新的 LB 培养基,活化 24 h,连续活化 3 次.

2.2.2 电化学反应器的运行 反应器组件经高温蒸汽灭菌(121℃, 30 min), 在超净台中完成构建, 并向其中注入活化后的菌液 1 mL, 然后在阴、阳极之间连接 1000 Ω 电阻, 进行驯化反应. 运行前, 阳极室使用氩气曝气 15 min, 以除去其中的氧气. 通过 CHI 1000 型恒电位仪设置实验所需的不同电势(-0.2 V、+0.2 V 和 +0.6 V, vs Ag/AgCl). 下文中所出现的电势如无注明, 都是相对于氯化银参比电极.

2.2.3 采样与分析 通过 USB 数据采集器(北京瑞博华控制技术有限公司, 北京), 每隔 5 min 采集 1 次 MFC 两端输出电压, 并记录在联机的电脑中. 生物电化学反应器的电化学表征主要通过循环伏安法(CV). CV 测试主要表征生物的电化学活性, 测试条件设置如下: 起始电势为 -0.3 V, 向正向以 10 mV/s 的速度扫描, 第一顶点电位为 +0.8 V, 第二顶点电位为 -0.6 V^[4]. 电化学反应器中气体组分使用气相色谱测定[安捷伦气相色谱仪 7890B, 美国安捷伦公司, 匹配系统自带填充柱和热导检测器(TCD)], 主要检测反应器顶空气体中的 H₂、O₂ 和 CH₄ 的含量. 反应液的组分使用高效液相色谱测定[安捷伦高效液相色谱仪 1260, 美国安捷伦公司, 配有示差检测器和 Hi-plex H(300 × 6.5 mm) 有机酸柱], 主要检测液体中葡萄糖、乙醇、丁醇、甲酸、乙酸、乳酸、丁酸、丁二酸和己酸的含量. 测试条件为: 柱温 50℃, 用 0.5 mmol/L H₂SO₄ 作为淋洗液, 流速 0.6 mL/min. 样品经 10000 rpm 离心 5 min, 取上清液, 用 0.22 μm 的过滤器过滤, 然后进样. 反应液中游离菌体的表征用分光光度法测定 OD₆₀₀ (北京谱析 720 型分光光度计)^[11].

3 结果与分析

3.1 *C. butyricum* 生物电活性的表征

将 3 种不同菌株(*C. butyricum*, *K. pneumoniae* BF8-1, *K. oxytoca*) 接入电化学反应器中, 连接上 1000 Ω 的电阻, 通过数据采集器采集输出电压. 图 1 显示驯化 3 个星期之后, 反应器输出电压的情况. 以葡萄糖作为底物的情况下, *C. butyricum* 最大输出电压将近 0.09 V, 其余 2 个菌株的输出电压一直维持在极低的水平(0.007 V). *C. butyricum* 相较于其他 2 株菌株表现出了明显的电化学活性. 通过 CV 测试, 可得出 *C. butyri-*

cum 电活性生物膜与对照组的 CV 测试结果. 对照组使用 *C. butyricum* 的 MFC 中的离心除菌反应液, 以无菌碳毡为工作电极进行 CV 测试. *C. butyri-* *cum* 电活性生物膜的 CV 结果中分别在 0.1 V 和 -0.2 V 处有 1 个明显的氧化峰和还原峰, 该对氧化还原峰与已报道的 *Aeromonas hydrophila*^[12] 和 *Shewanella putrefaciens* 所具有的氧化还原峰的位置很类似^[13]. 在对照组中, 并未发现有这 1 对氧化还原峰, 同时 CV 的响应电流明显的降低了. 结合该实验结果可以推测 *C. butyricum* 是通过细胞膜上的细胞色素 c, 与阳极进行直接的电子传递.

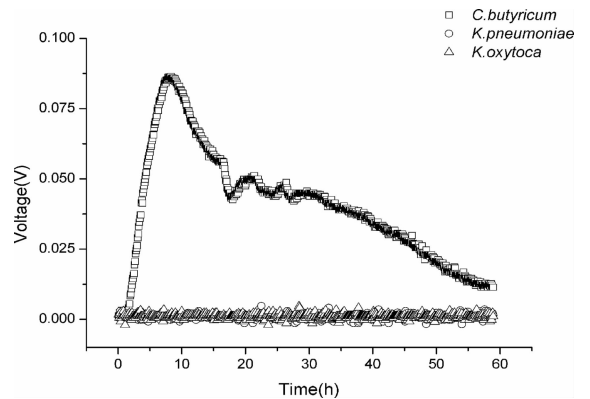


图 1 驯化 3w 后 *C. butyricum*, *K. pneumoniae* BF8-1, *K. oxytoca* 的输出电压

Fig. 1 The output voltage of *C. butyricum*, *K. pneumoniae* BF8-1, *K. oxytoca*, after 3 weeks domestication

3.2 不同阳极电势驯化对于 *C. butyricum* 电化学活性的影响

为了研究 *C. butyricum* 对于不同电势的代谢响应, 组建了 3 个电解池, 通过恒电位仪设定了不同的阳极电势分别为 -0.2 V、+0.2 V 和 +0.6 V. 将 *C. butyricum* 接入其中进行驯化, 每隔 72 h 更换 1 次阳极培养基. 图 3 记录了 5 个驯化期内不同组别的最大输出电流和菌液 OD₆₀₀ 的结果. *C. butyricum* 在大于 0 V 的阳极电势下, 在第 3 驯化期时最大电流开始快速的攀升分别达到了 1.8 mA(+0.6 V) 和 1.2 mA(+0.2 V). 在 -0.2 V 的阳极电势下, *C. butyricum* 的最大输出电流虽然也在上升, 但与其他 2 个电势的相比, 相差了近 2 个数量级. 随着各组最大输出电流的增加, 其培养液 OD₆₀₀ 的值呈现下降趋势. 从中看出各组电活性的变化与电极生物膜的形成是相关的. 图 4 分别显示了第 3 驯化期时不同阳极电势下 CV 测试结果. 在 +0.2 V 的驯化条件下, 阳极生物膜

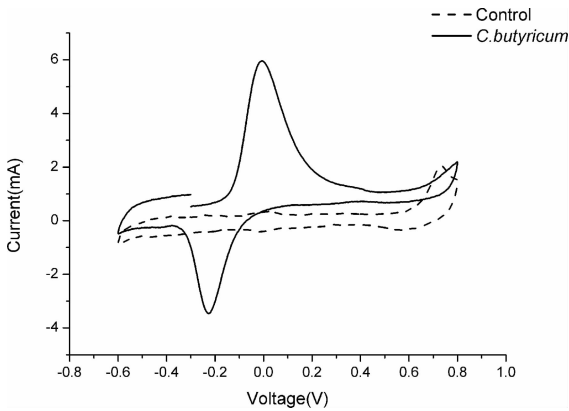


图 2 具有生物电活性的 *C. butyricum* 与对照组的循环伏安扫描

Fig. 2 The cyclic voltammety curve of *C. butyricum* and control

表现出了与 MFC 相类似的氧化还原峰,而且氧化峰相对于还原峰更明显.在 -0.2 V 条件下,并未出现有明显的氧化还原峰,结合其输出电流,可以推知在 -0.2 V 条件下在 3 个驯化期内 *C. butyricum* 的电化学活性并不高.在 $+0.6\text{ V}$ 的驯化条件下,阳极生物膜除了表现出与 $+0.2\text{ V}$ 的驯化条件相同的氧化还原峰外,整个曲线变的更宽. CV 测试是半定性半定量的技术手段^[14], $+0.6\text{ V}$ 与 $+0.2\text{ V}$ 驯化下生物膜的氧化还原峰位置相似,说明在这两种驯化条件下, *C. butyricum* 传递电子的通道蛋白没有因阳极电势不同而改变,这与 *G. sulfurreducens* 不同^[4]. $+0.6\text{ V}$ 的生物膜 CV 曲线相对于 $+0.2\text{ V}$ 具有更大的响应电流,这意味着 $+0.6\text{ V}$ 组阳极上附着了更多的 *C. butyricum* 或者 $+0.6\text{ V}$ 组的生物阳极具有更高的电催化性^[9]. 通过对比各电势驯化组最大输出电流与 CV 测试,可以

得出以下的结论: $+0.6\text{ V}$ 与 $+0.2\text{ V}$ 相对于 -0.2 V 更有利于激发 *C. butyricum* 的电化学活性. $+0.6\text{ V}$ 与 $+0.2\text{ V}$ 虽然都能在短时间内驯化出有电活性的 *C. butyricum* 生物膜,但是 $+0.6\text{ V}$ 的电活性比 $+0.2\text{ V}$ 更高.

3.3 不同阳极电势对于 *C. butyricum* 葡萄糖代谢的影响

表 1 记录了 3 个组别在第 1 周期与第 5 周期结束时反应液中有有机酸与醇类物质的分析结果. 3 个不同的电势下的主要代谢产物是乳酸、乙酸和乙醇. 实验初期 *C. butyricum* 的代谢类型是发酵. 通过乳酸的形成, *C. butyricum* 可以存储 2 个电子. 通过乙醇的形成, *C. butyricum* 可以存储 4 个电子. 乙酸形成的过程中不会发生电子的转移,但产生 ATP. 这 3 个产物的形成说明了 *C. butyricum* 利用乳酸和乙醇的形成来调节胞内的电子受体的缺失. 同时通过乙酸的形成,获取直接的能量. 随着驯化的进行,乳酸和乙醇都不再作为 *C. butyricum* 调节胞内电子受体的产物而存在. 乙酸的生成过程所产生的 ATP 依然是具有电活性 *C. butyricum* 生物膜能量主要来源. 作为电活性不高的 -0.2 V 组形成更多的丁酸. 丁酸的形成不仅可以产生 ATP 同时也可以存储电子. 随着 *C. butyricum* 电活性的增强,其代谢从发酵转向了电极极呼吸型.

C. butyricum 的代谢产物还包括 H_2 和 CO_2 . 表 2 展示了不同组在第 1 周期与第 5 周期结束时顶空气体组成. 在未形成电活性生物膜时, 3 个组别产生了大量的 H_2 (30% 左右) 和少量的 CO_2 (3%). *C. butyricum* 发酵代谢过程中,甲酸裂解酶可以将甲酸裂解为 H_2 和 CO_2 . 所以在第 1 周期结

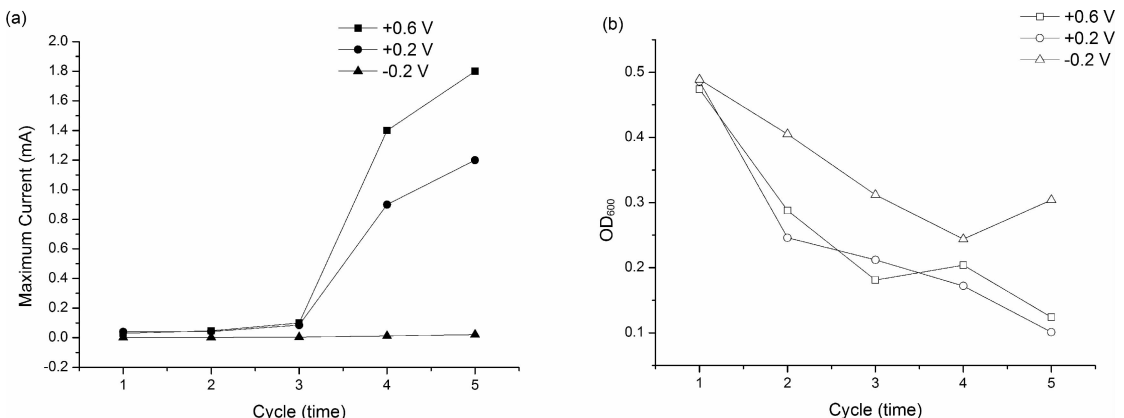


图 3 驯化周期内各处理组的最大输出电流和 OD_{600} 的值

(a) 最大输出电流; (b) OD_{600}

Fig. 3 Maximum output current and OD_{600} of groups within domestication cycles

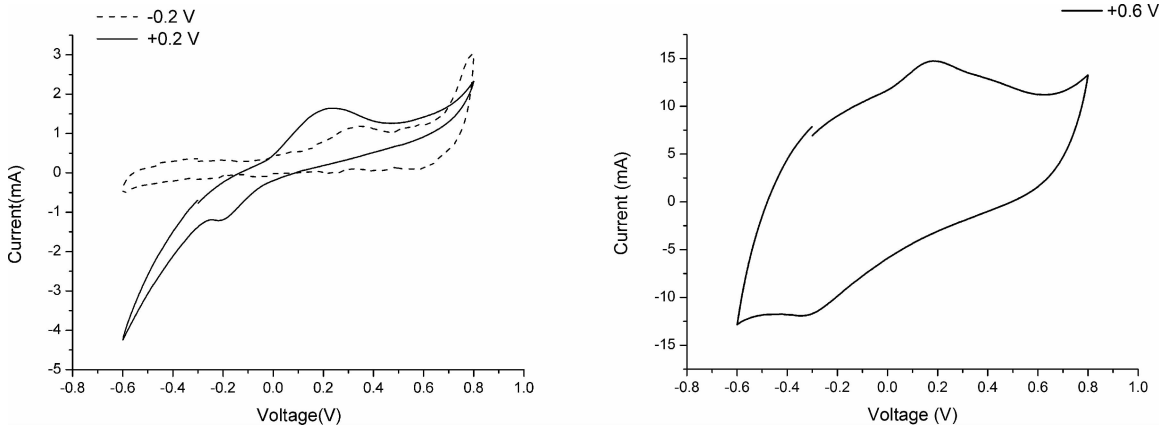


图 4 第 3 驯化周期的循环伏安扫描曲线

Fig. 4 The cyclic voltammetry curve of groups in the 3rd domestication cycle

表 1 第 1 驯化期和第 5 驯化期结束时有机酸和醇类物质的含量(mg/L)

Tab. 1 The content(mg/L) of organic acid and ethanol at the end of the 1st and 5th domestication cycle

	The First Cycle			The Fifth Cycle		
	+0.6 V	+0.2 V	-0.2 V	+0.6 V	+0.2 V	-0.2 V
Succinate	137	101	231	0	12	31
Lactate	603	541	381	66	42	21
Formate	13	22	5	0	0	0
Acetate	327	437	349	362	251	438
Ethanol	210	254	308	29	83	34
Butyrate	103	92	112	131	121	345

表 2 第 1 和第 5 驯化期内各组 H₂ 和 CO₂ 含量(%)Tab. 2 The content of H₂ and CO₂ in groups in the 1st and 5th cycle

	The 1st Cycle			The 5th Cycle		
	+0.6 V	+0.2 V	-0.2 V	+0.6 V	+0.2 V	-0.2 V
H ₂	31	35	28	0.1	0.4	5
CO ₂	0.9	2	0.7	31	29	4

束时,反应液中存在少量的甲酸.同时发现是即使存在高浓度的 H₂ 以及高设定的阳极电势的情况下,反应后期的电流依然很微弱.说明在本试验的反应体系下,H₂在电极处直接氧化产生的电流是很微弱的,不会对实验结果产生干扰.在形成电活性生物膜后,H₂的含量急剧的减少到 1%左右,而 CO₂的含量却上升至 26%左右.从气体组成的变化角度,C. butyricum 也从发酵代谢转向了电极呼吸.

4 讨论

本文中的 C. butyricum 与电极间的电子传递方式为直接型.其在阳极表面形成的生物膜的性质

将影响最终输出电流的大小.在高阳极电势驯化条件下,溶液中游离生物质量快速减少同时输出电流增加.这意味着高电势下在电极表面快速的形成电活性生物膜.使用葡萄糖作为底物时,发酵和电极呼吸同时出现在反应体系中.将不同电势下 C. butyricum 代谢产物与其电活性相联系,可以发现高电势下乳酸,丁二酸,甲酸和乙醇这类主要的发酵型产物大量降低.但对于葡萄糖这中典型的发酵型底物来说,电活性 C. butyricum 对其的降解依然混合着发酵代谢,特别是乙酸和丁酸的大量生成.这与菌体获得 ATP 这种能量所需的代谢方式相关.这种通过阳极电势影响胞内的还原力从而改变微生物代谢产物的现象与先前其他菌株的研究相类似^[15].最终高电势使得 C. butyricum 生物膜迅速形成,成型的电活性生物膜使得系统整个代谢过程从发酵型向电极呼吸型转移.先前关于控制电势研究微生物燃料电池的文献,主要集中在电势对电池启动时间、最大电流密度和生物质生成的影响^[4-10],缺乏对于菌体在不同阳极电势下其代谢的差异比较,且在这些研究中没有讨论电极电势与葡萄糖代谢间的相互影响.相对于先前较为单一的研究^[5-8],此研究从一个新的角度讨论了阳极电势对于微生物的电化学活性的影响,同时将发酵代谢,电流输出与微生物电活性三者相联系讨论.本研究有助于进一步地开发利用微生物燃料电池技术.

参考文献:

- [1] Lovley D R, Nevin K P. Electrobiocommodities: powering microbial production of fuels and commodity chemicals from carbon dioxide with electrici-

- ty[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013,24(3): 385.
- [2] Lovley D R. Electromicrobiology[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2012,66: 391.
- [3] Harnisch F, Schroder U. From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(11): 4433.
- [4] Busalmen J P, Esteve-Nunez A, Feliu J M. Whole cell electrochemistry of electricity-producing microorganisms evidence an adaptation for optimal exocellular electron transport[J]. *Environ Sci Technol*, 2008,42(7): 2445.
- [5] Wang X, Feng Y, Ren N, *et al.* Accelerated start-up of two-chambered microbial fuel cells; Effect of anodic positive poised potential[J]. *Electrochim Acta*, 2009,54(3): 1109.
- [6] Torres C I, Krajmalnik-Brown R, Parameswaran P, *et al.* Selecting anode-respiring bacteria based on anode potential: phylogenetic, electrochemical, and microscopic characterization[J]. *Environ Sci Technol*, 2009,43(24): 9519.
- [7] Yi H N, Nevin K P, Kim B C, *et al.* Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009,24(12): 3498.
- [8] Finkelstein D A, Leonard M, Zeikus J G. Effect of electrode potential on electrode-reducing microbiota [J]. *Environ Sci Technol*, 2006,40(22): 6990.
- [9] Wei J C, Liang P, Cao X X, *et al.* A new insight into potential regulation on growth and power generation of *Geobacter sulfurreducens* in microbial fuel cells based on energy viewpoint [J]. *Environ Sci Technol*, 2010,44(8): 3187.
- [10] Marsili E, Sun J, Bond D R. Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed electrode potential[J]. *Electroanalysis*, 2010,22(7-8): 865.
- [11] Lee H S, Rittmann B E. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009,102(3): 749.
- [12] Pham C A, Jung S J, Phung N T, *et al.* A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell [J]. *FEBS Microbiol Lett*, 2003,223(1): 129.
- [13] Kim B H, Kim H J, Hyun M S, *et al.* Direct electrode reaction of Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 1999,9(2): 127.
- [14] Zhao F, Slade R C T, Varcoe J R. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective[J]. *Chem Soc Rev*, 2009,38(7): 1926.
- [15] Wang Y F, Masuda M, Tsujimura S. Electrochemical regulation of the end-product profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an endogenous mediator [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(3): 579.