



ISSN 1000-5013
CN 35-1079/N
CODEN HDZIEF

华侨大学学报

(自然科学版)

JOURNAL OF HUAQIAO UNIVERSITY
(NATURAL SCIENCE)

华侨大学化工学院
建院 60 周年专刊

第 45 卷 第 5 期
Vol. 45 No. 5

2024

中国·泉州/厦门
CHINA·QUANZHOU/XIAMEN



公众微信号 官网二维码



《 华 侨 大 学 学 报 (自 然 科 学 版) 》

第 七 届 编 辑 委 员 会

The Seventh Editorial Committee of
Journal of Huaqiao University (Natural Science)

主 任 (Director of Editorial Committee)

张云波 (ZHANG Yunbo)

副主任 (Vice Director of Editorial Committee)

陈国华 (CHEN Guohua)

黄仲一 (HUANG Zhongyi)

编 委 (Members of Editorial Committee) (按姓氏笔画为序)

刁 勇 (DIAO Yong)

王士斌 (WANG Shibin)

刘 堉 (LIU Gong)

江开勇 (JIANG Kaiyong)

孙 涛 (SUN Tao)

肖美添 (XIAO Meitian)

吴季怀 (WU Jihuai)

宋秋玲 (SONG Qiuling)

张认成 (ZHANG Rencheng)

张云波 (ZHANG Yunbo)

陈国华 (CHEN Guohua)

苑宝玲 (YUAN Baoling)

周树峰 (ZHOU Shufeng)

郑力新 (ZHENG Lixin)

徐西鹏 (XU Xipeng)

郭子雄 (GUO Zixiong)

黄仲一 (HUANG Zhongyi)

黄华林 (HUANG Hualin)

葛悦禾 (GE Yuehe)

蒲继雄 (PU Jixiong)

蔡绍滨 (CAI Shaobin)

主 编 (Editor in Chief)

黄仲一 (HUANG Zhongyi)

华侨大学化工学院简介

华侨大学创办于1960年,是中央统战部直属高校,中央统战部、教育部与福建省人民政府共同建设的综合性大学,中共中央确定的“国家重点扶植大学”,福建省“双一流”建设A类高校、福建省重点建设的高水平大学。

华侨大学化工学院是基于1964年成立的化工系,在1998年7月3日由化工与生化工程系、应用化学系和材料物理化学研究所合并成立化工学院,2000年9月8日原化工学院更名为材料科学与工程学院,2008年6月16日由化工与制药工程系、生物工程与技术系和环境科学与工程系成立新的化工学院,迄今已有60年的办学历史。现下设化工与制药工程系、生物工程与技术系、环境科学与工程系和园艺系。

目前学院拥有一个国家一级学科博士授权点:化学工程与技术(下设生物化工、生物材料化工、化学工程与工艺及环境化工四个博士研究方向,以及化学工程、化学工艺、生物化工、应用化学、工业催化、制药工程六个硕士研究方向);一个一级学科博士后流动站:化学工程与技术;两个一级硕士授权点:环境科学与工程(下设环境监测与评价、水处理工程、大气污染控制工程三个研究方向),生物学(下设微生物学、生物化学与分子生物学、酶学与绿色制造三个研究方向);一个国务院侨办重点学科:生物化工;两个专业学位授权点:材料与化工(化学工程领域),资源与环境(环境工程领域)。一个福建省特色重点学科和福建省重点学科:化学工程与技术。5个本科专业:化学工程与工艺、制药工程、生物工程、环境工程、环境生态工程。环境工程、化学工程与工艺、制药工程等三个专业入选国家级“双万计划”一流专业建设点,且均通过教育部工程教育专业认证,实现《华盛顿协议》的“国际实质等效”。环境工程专业为福建省高等学校服务产业特色专业。

学院拥有福建省生物化工技术重点实验室、福建省生物医用材料闽台科技合作基地、化学生物学与分子工程福建省高校重点实验室、福建省工业废水生化处理工程技术研究中心、厦门市海洋生物资源综合利用工程技术研究中心以及省级实验教学示范中心“基础化学化工实验中心”等多个省、市级教学科研平台,以及“新一代物质转化研究所”等10个校、院级研究机构。

学院汇聚了一批学缘结构合理、教学经验丰富、具有科研潜力的教学科研人员,现有教职工153人,其中专任教师114人,教授35人,副教授51人,博士生导师21人。拥有一批具有较高学术声誉的领军人才,其中院士1人、双聘院士1人、国家百千万人才工程入选者1人、国家有突出贡献中青年专家1人、国家优秀青年科学基金项目入选者2人、教育部“新世纪优秀人才支持计划”1人、福建省百千万人才工程入选者1人、福建省“百人计划”2人、福建省“外专百人计划”2人、国家高端外国专家2人、闽江学者特聘教授3人、福建省自然科学基金杰青项目入选者2人,厦门市双百计划4人。多人入选国家级、省部级人才项目。

学院面向全国和境外招生。面向境内通过全国高考本科一批或提前批招生，面向境外通过两校(与暨南大学)联招、参加教育部的全国联招或单独招生。目前全日制在校生约 2 069 人,其中本科生约 1 645 人,硕士生约 364 人,博士生 60 人。

学院紧密结合国家和海峡西岸经济区经济社会发展的重大需求开展创新研究,成果显著。5 年来共承担了国家自然科学基金区域联合基金重点项目、优青项目、面上项目以及国家重点研发计划一级课题等国家级项目 50 余项;高校博士点基金博导项目,福建省重大、重点和自然科学基金等省部级课题 49 项;服务地方企事业合作横向课题 241 项;厅级、校级及其他各类科研项目 158 项;累计科研经费 1 亿余元;发表的论文被 SCI,EI 收录 500 余篇;申请中国发明专利获授权 142 项;获福建省、厦门市及泉州市科学技术奖等近 10 项。

学院的国际交流不仅包括与国(境)外高校合作办学、互派交换生,邀请专家来访交流合作,派出教师参加学科主流国际会议、到国外名校访学进修等,目前学院还致力于组建中外联合实验室、申报中外合作项目等工作。2013 年,学院与瑞典乌普萨拉大学签署合作交流协议,开展生物教育合作;泰国农业大学、台湾联合大学、中原大学来访开展教学与科研合作交流。连续两年邀请美国三院院士哈佛大学 David Weitz 教授来访讲学并颁发荣誉教授证书,近五年来累计邀请美国科学院、工程院、艺术与科学学院院士,澳大利亚工程院院士,法国国家药学科学院院士,捷克科学院院士,华盛顿大学波音教授等 20 余名国(境)外专家来访讲学交流。近五年来派出学院骨干教师连续参加美国化学工程师协会(AIChE)年会、国际化工与过程工程大会(CHISA)、美国化学学会(ACS)年会、世界生物材料大会(WBC)等国际主流会议并做口头报告或邀请报告等 20 余人次,与美国哈佛大学、麻省理工学院、密西根大学、伊利诺伊大学香槟分校、佐治亚理工学院、MD 安德森癌症中心,加拿大滑铁卢大学、拉瓦尔大学,瑞典于默奥大学及瑞士农科院等成功建立了良好的国际合作交流关系。

华侨大学化工学院的办学定位是扎根厦门,立足福建,同时面向海内外,打造为省内一流,国内外有一定影响力,具有本、硕、博三个层次的人才培养以及博士后研究的教学研究型学院。在新的发展时期,学院将秉承和实践“科学,民主,拼搏,创新”的理念,励精图治,团结奋斗,不断提高教学、科研、管理水平和人才培养水平,实现“科学建院,民主治院,拼搏兴院,创新强院”,为国家的繁荣昌盛做出更大的贡献。

地址:福建省厦门市集美区集美大道 668 号 E 区

邮编: 361021

电话(传真): 0592-6162300

工作邮箱: 71108588@qq.com

学院网站: <https://hgxy.hqu.edu.cn>

微信公众号: HQU 化时代

目次

综述

外场强化作用下分子筛合成的研究进展

..... 许浪, 王银亮, 齐婷婷, 初广文, 邹海魁, 孙宝昌 (543)

超临界 CO₂ 流体技术制备脱细胞外基质材料及其生物医学应用

..... 吴冰, 段又愈, 陈爱政 (551)

微生物-电极修饰及影响电合成转化 CO₂ 过程的研究进展

..... 解一诺, 李逸鑫, 王远鹏 (559)

纳米结构石墨相氮化碳用于 CO₂ 催化转化的研究进展

..... 王文栋, 王轶楠, 饶海彬, 郭芳松, 詹国武 (575)

维生素 B₆ 的合成代谢及其生产应用

..... 李丹妮, 郑忠亮 (588)

学术论文

马来松香聚乙二醇酯表面活性剂的制备及性能分析

..... 王翰文, 杨斌, 苏江波, 饶小平 (596)

一例钙金属-有机骨架的合成及其结构与性质分析

..... 王伟娟, 黄丽丽, 林知秋, 卢冬飞, 史荣会, 刘耀, 洪俊明 (603)

多拷贝 *pucBA* 基因在沼泽红假单胞菌光合生长中的作用

..... 林若欣, 赵晓岚, 赵春贵, 杨素萍 (610)

沼泽红假单胞菌 CGA009 砷调控蛋白(ArsR)的调控作用

..... 金春英, 崔亮, 陈勇男, 杨素萍, 赵春贵 (618)

产灵菌红素沙雷氏菌 R18 的鉴定及基因组特性

..... 陈明霞, 邢元军, 李和阳, 施俊豪 (626)

金线莲多糖通过抑制 NF-κB 信号通路对糖尿病小鼠肾损伤的改善作用

..... 盛世美, 张建刚, 陈焯, 戴招龙, 李乐, 刘青 (635)

乙二醇对低共熔溶剂改性木质素制酚醛树脂胶黏剂的影响

..... 甘林火, 湛云, 严思恩, 何昌雍 (642)

纤维素对活性炭孔结构的影响

..... 宋磊, 夏嘉誉, 丁闻军 (649)

红树林来源细菌抑菌活性及其增肥潜力评估

..... 杨道茂, 周钰焯, 李嘉欣, 易家乐, 杨勤伟, 黄康隆 (654)

三峡库区源头溪流湾滩河浮游植物群落特征

..... 陈焯焯, 孙荣, 杨瑛, 胡家榕, 代晓涵 (661)

鹿茸菇液体菌种培养过程中生理指标的变化规律

..... 彭汇涵, 于海玲, 王明元, 杨苗, 万雨欣 (667)

不同干燥方式对鹿茸菇品质的影响

..... 于海玲, 汪依霓, 万雨欣, 杨苗, 彭汇涵, 王明元, 刘建福 (673)

膜分离精度对再造烟叶提取液的截留影响

..... 赖傲楠, 武士杰, 李淑纯, 周树锋 (681)

华侨大学厦门校区鸟类多样性的时空分布格局

..... 罗湘, 孙荣, 陈焯焯 (688)

CONTENTS

COMPREHENSIVE REVIEW

Research Progress of Molecular Sieves Synthesis Under External Field Intensification

..... XU Lang, WANG Yinliang, QI Tingting,
CHU Guangwen, ZOU Haikui, SUN Baochang (543)

Supercritical CO₂ Fluid Technology-Assisted Fabrication of Decellularized Extracellular
Matrix Materials and Biomedical Applications

..... WU Bing, DUAN Youyu, CHEN Aizheng (551)

Advances in Microbial-Electrode Modification and Influence on Process of Electrosynthesis
to Convert CO₂

..... XIE Yinuo, LI Yixin, WANG Yuanpeng (559)

Progress of Nanostructured Graphitic Carbon Nitride for CO₂ Catalytic Conversion

..... WANG Wendong, WANG Yinan, RAO Haibin,
GUO Fangsong, ZHAN Guowu (575)

Synthesis Metabolism and Production Application of Vitamin B₆

..... LI Danni, ZHENG Zhongliang (588)

ACADEMIC PAPERS

Preparation and Performance Analysis of Malay Rosin Polyethylene Glycol Ester Surfactants

..... WANG Hanwen, YANG Bin, SU Jiangbo, RAO Xiaoping (596)

Preparation and Evaluation of Astaxanthin Composite Nanoparticles Pickering Emulsion

..... WANG Weijuan, HUANG Lili, LIN Zhiqiu,
LU Dongfei, SHI Ronghui, LIU Yao, HONG Junming (603)

Role of Multiple Copy *pucBA* Genes in Phototrophic Growth of *Rhodospseudomonas palustris*

..... LIN Ruoxin, ZHAO Xiaolan, ZHAO Chungui, YANG Suping (610)

Regulatory Role of Arsenic Regulatory Protein (ArsR) in *Rhodospseudomonas palustris*
CGA009

..... JIN Chunying, CUI Liang, CHEN Yongnan, YANG Suping, ZHAO Chungui (618)

- Identification and Genomic Characterization of Prodigiosin-Producing *Serratia* sp. R18
 CHEN Mingxia, XING Yuanjun, LI Heyang, SHI Junhao (626)
- Improvement Effects of *Anoectochilus roxburghii* Polysaccharose on Renal Injury in
 Diabetic Mice by Inhibiting NF- κ B Signaling Pathway
 SHENG Shimei, ZHANG Jiangang, CHEN Ye,
 DAI Zhaolong, LI Le, LIU Qing (635)
- Effect of Ethylene Glycol on Preparation of Phenolic Resin Adhesive Using Modified
 Lignin *via* Deep Eutectic Solvent
 GAN Linhuo, ZHAN Yun, YAN Sien, HE Changyong (642)
- Influence of Cellulose on Pore Structure of Activated Carbon
 SONG Lei, XIA Jiayu, DING Wenjun (649)
- Evaluation of Antibacterial Activity and Fertilization Potential of Bacteria Derived
 From Mangrove Forests
 YANG Daomao, ZHOU Yuye, LI Jiaxin,
 YI Jiale, YANG Qinwei, HUANG Kanglong (654)
- Phytoplankton Community Characteristics of Headstream Wantan River in Three
 Gorges Reservoir Area
 CHEN Yanyao, SUN Rong, YANG Ying, HU Jiarong, DAI Xiaohan (661)
- Change Laws of Physiological Indexes of *Lyophyllum decastes* Liquid Strains Cultivation
 Process
 PENG Huihan, YU Hailing, WANG Mingyuan, YANG Miao, WAN Yuxin (667)
- Effect of Different Drying Methods on Quality of *Lyophyllum decastes*
 YU Hailing, WANG Yini, WAN Yuxin,
 YANG Miao, PENG Huihan, WANG Mingyuan, LIU Jianfu (673)
- Interception Effects of Membranes With Different Pore Sizes for Reconstituted Tobacco
 Extract
 LAI Aonan, WU Shijie, LI Shuchun, ZHOU Shufeng (681)
- Spatial and Temporal Distribution Pattern of Bird Diversity in Xiamen Campus of
 Huaqiao University
 LUO Xiang, SUN Rong, CHEN Yanyao (688)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407041



外场强化作用下分子筛合成的研究进展

许浪¹, 王银亮², 齐婷婷¹, 初广文¹, 邹海魁¹, 孙宝昌¹

(1. 北京化工大学 化学工程学院, 北京 100029;
2. 新疆天业(集团)有限公司, 新疆 石河子 832000)

摘要: 综述了各种外场作用(包括微重力技术、超重力技术、旋转液膜技术、超声波技术、微波技术、紫外和电场)对分子筛合成过程、结构特性和催化/吸附应用性能影响,以及作用机制等方面的研究进展。结果表明:外场作用下有利于合成小粒径、大比表面积、高孔隙率和多活性位点的分子筛吸附/催化材料,结合自身应用前景,超重力技术、微波技术和旋转液膜技术为高效绿色合成高性能分子筛提供了新的技术支持。

关键词: 分子筛; 外场强化; 超重力技术; 微波技术; 旋转液膜技术

中图分类号: TQ 424.25; TQ 426.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2024)05-0543-08

Research Progress of Molecular Sieves Synthesis Under External Field Intensification

XU Lang¹, WANG Yinliang², QI Tingting¹,
CHU Guangwen¹, ZOU Haikui¹, SUN Baochang¹

(1. School of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;
2. Xinjiang Tianye Company Limited, Shihezi 832000, China)

Abstract: In this paper, the effects of various external field conditions (including micro-gravity technology, high-gravity technology, rotating liquid film technology, ultrasonic waves technology, microwave technology, ultraviolet radiation technology, and electric fields) on molecular sieves synthesis processes, structural properties, catalytic/adsorption performance, as well as the mechanisms are reviewed. The results show that the application of external fields promotes the production of molecular sieve adsorbents/catalysts with smaller particle sizes, larger specific surface areas, higher porosities, and more active sites. Considering the promising applications of these technologies, high-gravity technology, rotating liquid film technology and microwave technology provide new technical supports for the efficient synthesis of high-performance molecular sieves.

Keywords: molecular sieve; external field intensification; high-gravity technology; microwave technology; rotating liquid film technology

分子筛是一类具有催化、吸附和离子交换功能的多孔晶体材料,广泛应用于石油化工、煤化工、精细化工、环境保护等国家重大支柱产业和新兴产业^[1]。分子筛的合成方法主要包括水热法、溶剂热法、离子热法、无溶剂法和干凝胶转换法等^[2]。其中,水热法是主要合成方法,包括预混和晶化两个关键步骤。

收稿日期: 2024-07-28

通信作者: 孙宝昌(1984-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事超重力强化技术与高效催化剂制备的研究。E-mail:sunbaoc@buct.edu.cn.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFA1507700); 国家自然科学基金资助集成项目(U22B6011)

在预混和晶化过程中,硅源和铝源等围绕水合阳离子快速缩聚成无定形凝胶,凝胶在碱性环境下解聚和溶解,进一步在水合阳离子周围缩合成核和生长晶体^[3]。预混过程中的凝胶相粘度高,与水相易分层,使得硅源、铝源和结构导向剂等物质之间的混合效果差。同时,高温晶化涉及到气液固三相,其内部受热复杂,均会影响成核和晶体生长过程。

针对分子筛合成过程中的传质、传热和反应过程存在的问题,许多研究者从引入外场强化技术方面进行了改善。本文综述了近几年来微重力、超重力、旋转液膜、超声波、微波、紫外和电场这几类外场强化技术在分子筛合成领域的研究进展。

1 外场强化技术

1.1 微重力技术

微重力环境是指在重力的作用下,系统的表观质量远小于其实际质量的环境($10^{-3}g \sim 10^{-6}g$)。除了在太空外,地面模拟获得微重力环境的技术主要包括落塔法、抛物飞行法、水浮法、悬吊法、气浮法等^[4]。基于在空间实验室的研究成本过高,Noemí等^[5]利用定制的微流体装置模拟空间微重力环境,合成了高度可控的二维多孔晶体分子框架材料,证明了微重力环境对二维功能材料的晶体取向、致密性、形态和无裂纹生成的控制作用。

对于分子筛的合成,Warzywoda等^[6]报道了在STS-40航天任务中进行的A分子筛和X分子筛的合成结果,相比于地面环境,在微重力环境下合成的A分子筛和X分子筛晶粒尺寸增大了25%~70%。Akporiaye等^[7]报道的在EURECA-1任务中合成的分子筛晶粒尺寸也得到了显著的增长。在微重力环境中可以阻止密度驱动的自然对流和沉降过程发生,并使晶核和晶体长时间停留在反应溶液中,抑制二次成核,从而获得粒径更大且无缺陷的分子筛^[8-9]。

然而,微重力环境下进行晶化合成的分子筛尺寸更大,并不是对所有体系均成立,有些分子筛尺寸的增长几乎可以忽略,甚至出现了减小^[7]。同时,微重力环境下很难对物料进行混合,若想获得结晶度高的分子筛,需要在地面环境下对前驱体凝胶进行充分混合。尽管如此,微重力环境下静水压力的降低和表面张力的突出会阻止所有固体表面的成核,相对于地面环境,其合成分子筛将需要更长的时间^[6,10]。因此,在微重力反应装置中晶化合成分子筛具有两面性。

1.2 超重力技术

与微重力相反,超重力是指在高于地球重力加速度环境下物质所受到的力(包括引力和排斥力)^[11]。1979年,Colin等^[12]提出的“Higee”标志了超重力技术的诞生。超重力技术作为一种典型的过程强化技术,通常利用旋转填充床(rotating packed bed, RPB)转子旋转产生的离心加速度来模拟超重力环境,如图1所示^[13]。

超重力技术广泛用于吸收、精馏、萃取、纳米材料制备等领域,在脱硫脱硝、甲醇/乙醇回收、二氧化碳捕集和纳米碳酸钙合成等应用上已实现工业化^[13,15]。与传统技术相比,超重力技术具有以下特点:1)传质效率高,其相间传质系数和微观混合效果可提高1~3个数量级;2)物料在设备内停留时间极短;3)设备尺寸小,占地面积小^[16-17]。

目前,超重力技术多用于分子筛合成预混阶段。相比于传统搅拌反应釜(stirring tank reactor, STR),Qi等^[18]采用“RPB预混+STR晶化”合成的ZSM-5分子筛具有更高结晶度、更小平均粒径、更窄粒径分布、更大比表面积和更高酸量等优点,且增加了介孔体积,其在C4烯烃催化裂解(olefins catalytic cracking, OCC)反应中获得了更高的转化率和丙烯收率。何万仁等^[19]利用RPB预混合成的片状ZSM-5分子筛也在OCC反应中表现出了更高的转化

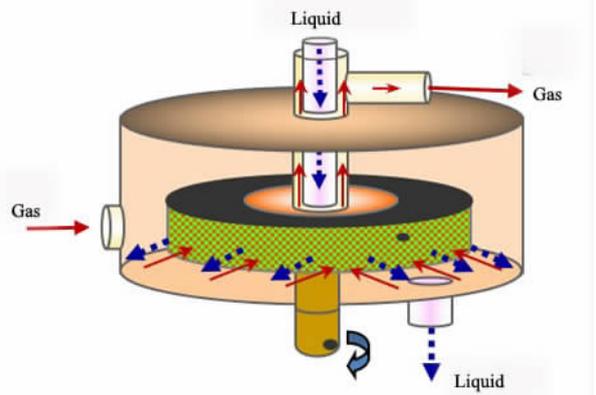


图1 旋转填充床装置示意图^[14]

Fig. 1 Schematic diagram of rotating packed bed device^[14]

率和稳定性。同时,超重力技术在 Y 型、A 型等分子筛合成上也具有正面影响^[20-21]。

此外,采用 RPB 进行分子筛高温晶化也得到了研究。侯文慧^[22]利用 RPB 进行预混和晶化,原位合成了稀土 Y 分子筛。相较于在 STR 中预混和晶化,该工艺合成周期短,稀土利用率更高。进一步地,超重力技术与微波和超声等技术耦合形成的反应系统在分子筛合成中也展示出了应用潜力^[23-24]。因此,超重力技术用于合成分子筛的优势包括:1) 显著缩短晶化时间;2) 大幅改善分子筛的物理化学性能,包括粒径、酸量、孔结构、比表面积和催化/吸附性能等;3) 提高结构导向剂利用率,节约了成本。

针对超重力技术在合成分子筛方面的促进作用,Qi 等^[25]提出了凝胶分散强化机制和气泡诱导成核机制。在混合过程中,硅源和铝源同时加入 RPB,受到转子旋转产生的巨大剪切力而被分散或撕裂成细小的液滴、液膜或液丝,从而实现前驱体中的水相和凝胶相的分散,这将有利于硅源、铝源、助剂和结构导向剂等物质之间充分接触反应^[14,26]。同时,在液体的分散和聚并过程中可以产生大量纳微气泡,气泡的存在可以降低成核势垒,这均有利于分子筛的成核生长^[25]。但是针对分子筛合成高黏体系,仍需通过进一步改进 RPB 结构来解决内部堵塞问题。结合工业化应用优势,超重力技术在分子筛领域上的高效合成和性能优化仍展示出了良好的发展前景。

1.3 旋转液膜技术

作为改进后的胶体磨反应器,旋转液膜反应器(rotating liquid film reactor,RLFR)主要由加料漏斗、转子、定子和回流装置组成(图 2),物料在转子和定子间的狭缝空间内混合,混合空间宽度通常在几十微米至几毫米的范围内,相较于传统反应器具有更小的反应空间^[27-28]。在电机带动下,转子旋转可与定子之间产生高剪切力和离心力,从而强化传质、传热和动量传递以及反应过程^[29]。旋转液膜反应器已广泛用于水滑石及其衍生物、硫酸钡、电池级碳酸锂等无机材料的合成^[29-32]。Zhao 等^[33]利用旋转反应器进行快速的混合和成核过程,合成了晶体粒径更小、尺寸分布更窄的类水滑石层状双氢氧化物(LDHs)。

进一步地,Feng 等^[34]将研究工作扩展到了体系更为复杂的 Cu-Ni-Al-CO₃ LDHs 和 Cu-Ni-Mg-Al-CO₃ LDHs 的合成,也取得了相同的效果。同时,段雪等^[28]

还成功将旋转液膜反应器扩大到工业规模,建立了示范工厂。目前,旋转液膜反应器在分子筛合成领域上未曾报道过。但 LDHs 的共沉淀合成方法中的沉淀过程和高温老化与分子筛的预混和晶化过程具有高度的相似性,分别涉及成核和晶体生长两个阶段,这对旋转液膜反应器强化分子筛的合成仍具有指导意义。

1.4 超声波技术

超声波是频率为 20~106 kHz 的机械波,其波长(10~0.01 cm)远大于分子尺寸,无法对分子本身产生作用,而是通过物理作用或者化学效应来改变周围环境,从而影响某一过程^[35]。由于单一的超声波不具备强烈的剪切作用,无法实现物质之间的充分混合,且单一使用超声波作用于分子筛合成过程,反而由于过热温升会导致颗粒碰撞团聚^[36]。因此,超声主要是作为一种辅助手段来参与到分子筛的合成过程中。

郭红等^[37]将超声震荡结合磁力搅拌合成了结晶度更高的 X 分子筛,且有效地降低了晶化温度。贺勇等^[37]将超声联合机械搅拌引入到 NaY 分子筛的合成预混过程中,并探究了超声波作用时间和作用功率的影响,获得了较之常规水热合成或者单一超声波法性能更佳的分 子筛。Han 等^[38]使用超声辅助预处理得到了选择性催化还原(selective catalytic reduction,SCR)活性大于 95% 的 SSZ-13 分子筛,与常规水热合成相比,缩短了 12 h 晶化时间。Chen 等^[39]采用微波耦合超声技术,以粉煤灰为原料,合成了高纯度和高结晶度的 Y 分子筛。孙宝昌等^[24]提出了一种超重力耦合超声的反应装置,能够强化分子筛前驱体液固两相体系均匀分散混合,从而促进成核结晶反应过程发生。因此,与传统工艺相比,超声

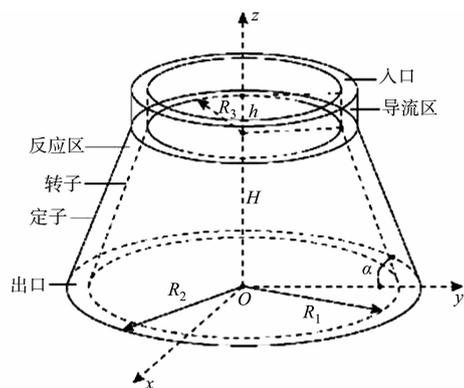


图 2 旋转液膜反应器装置示意图^[27]

Fig. 2 Schematic diagram of rotating liquid film reactor^[27]

法合成分子筛的优点主要体现在缩短了合成周期和降低了晶化温度。

超声波在合成分子筛中的有利影响是基于其自身的空化作用引起的物理和化学效应获得的。在超声波的作用下,振动的液体中产生大量的纳微空气泡,随着空气泡的膨胀收缩破裂,周围极小空间内会出现高温高压现象($>5\ 000\ \text{K}$, $>50\ \text{MPa}$),并伴随着震荡波^[40]。这种高温高压作用能够加快前驱体溶解,并通过分解气泡内水蒸气和不凝性气体产生羟基自由基,共同促进晶核形成^[41-42];而高速的震荡波作用对于物质混合和分子扩散也起到了一定的作用^[43]。因此,超声波也主要作用于分子筛的预混或老化过程。分子筛合成体系是一个多物质多相复杂体系,引入超声波产生的变化也很复杂,在合成过程中往往需要仔细考察超声条件才能获得性能良好的目标产物,否则会带来消极影响,例如生成杂晶、结晶度下降等。

1.5 微波技术

微波是一种介于红外波和无线电波之间的电磁波,频率位于 $0.3\sim 300\ \text{GHz}$ 之间,工业上常用的频率为 (915 ± 15) , $(2\ 450\pm 50)\ \text{MHz}$ ^[44]。微波作为一种光,可以被物质传递、吸收或者反射,由此可将材料分为反射微波材料、透波材料和吸波材料(表 1)^[45]。在微波提供的高频变换的能量场作用下,分子运动从杂乱无章的状态被迫变为有序的高频振动,这种变化导致的有级分子的转向极化和无极分子的位移极化会使得分子之间不停地碰撞、摩擦,从而将电磁能转为热能^[46]。因此,利用微波加热的特点有:1) 直接对物料加热,无需热传导,可瞬时升温;2) 微波具有穿透性,可实现内外同时加热,温度均匀分布;3) 根据介质对微波吸收能力的不同,选择性加热物质。

表 1 常见材料与微波的不同作用分类及其应用

Tab. 1 Classification and application of different effects of common materials and microwaves

类型	材料	作用	应用
反射微波	大块金属、合金	传播微波能量,有效利用微波能量并使其均匀分布	波导管、食品包装材料、金属箔、金属格栅等
穿透微波	石英、陶瓷、玻璃、塑料、聚四氟乙烯等	分子结构稳定或低损耗,能够允许微波能量穿透而不被大量吸收	容器材料(腔体、传输管道等)、天线/雷达罩、微波仪探头等
吸收微波	水、离子液体、超微金属粉及金属纤维、碳化硅、铁氧体粉、碳纤维、碳纳米管、活性炭等	用作被加工物料,吸收微波能量将其转为其他能量	雷达隐身材料、电磁屏蔽材料、防护服、隔热膜等

微波加热需要利用介质对于微波的吸收来获得热能,如图 3 所示。水作为典型的极性分子,具有较大的介电常数,对微波具有强吸收能力,因而在分子筛合成领域,微波技术最开始与传统水热合成工艺结合。微波加热用于合成分子筛最早可追溯到 1988 年, Mobil 公司将微波用于 ZSM-5 和 NaA 的合成,与传统水热晶化相比显著缩短了晶化时间^[47]。微波加热用于缩短晶化时间后续得到了广泛的研究。Cheng 等^[48]利用微波技术(100 W)在 20 min 即可得到 A 分子筛;Le 等^[47]进一步将 4A 分子筛的晶化时间在商用微波炉(800 W)下缩短到了 6 min。

除了合成时间外,微波加热对于分子筛的影响也体现在了多个方面。Fukasawa 等^[48]在微波下合成了孔直径约为 20 nm 的介孔 ZSM-5 分子筛,其对结晶紫染料的最大吸附量是传统水热合成分子筛的 2 倍以上。Khan 等^[49]利用微波将 SSZ-13 分子筛的粒径从 600 nm 降至 50 nm 以下,并在酸催化乙烯制丙烯(ETP)反应中获得了更高的乙烯转化率和丙烯收率。

近年来,微波技术在分子筛膜的合成上也取得了不错的进展。李砚硕等^[50]结合微波合成技术和装备将分子筛膜的构成晶体从微米级缩小至纳米级,并利用分子筛膜快速在线监测方法,首次突破了高品质和强稳定的零缺陷分子筛膜材料的连续化生产。分子筛膜表现出世界领先的分离选择性,在超深度

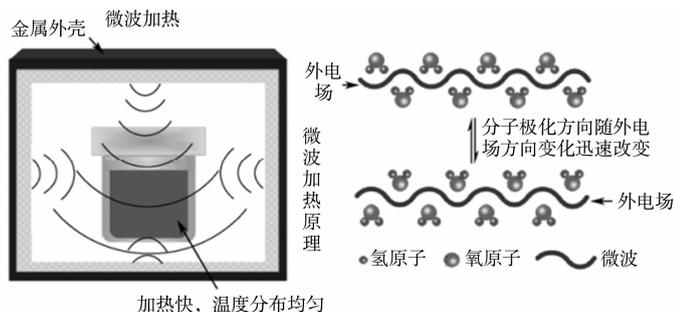


图 3 微波加热原理示意图^[46]

Fig. 3 Schematic diagram of microwave heating principle^[46]

脱水应用领域上展现出了优越的效果。除了水体系外,微波技术结合离子热合成和无溶剂合成路线也得到了研究。离子液体在合成过程中发挥着溶剂和结构导向剂的作用,且其本身作为一种优良的微波反应介质,与微波耦合能够在低温低压下合成分子筛,解决微波晶化过程中的耐压问题^[51]。但离子液体的引入导致成本的增加仍是需要关注的重点问题。同时,微波-无溶剂合成路线则需另添加微波吸收介质,才能发挥微波加热的作用。因此,微波水热合成是目前更具优势的微波合成分子筛技术。

微波加热用于合成分子筛表现出来的积极作用已经得到了广泛的研究,其优势包括:1)可极大缩短合成时间,降低能耗;2)能够明显改善分子筛的物化性能,包括粒径、纯度、酸强度和水热稳定性等;3)提高分子筛的吸附/催化应用性能^[46]。目前,微波水热合成的作用机制主要包括凝胶溶解机制和动力学控制机制。一方面,微波加热作用能够提高前驱体凝胶的溶解性,促进 T-O-T 键或 T-O-T' 键的形成;另一方面,微波加热均匀性和瞬时性能够使得溶液在短时间内各处形成大量晶核,且微波能量对晶体成核及生长速度的促进作用持续表现在整个合成过程中^[51-54]。但微波自身的特点意味着它主要充当加热源,不具备传质作用,无法独自用于分子筛合成的整个过程中。

1.6 紫外

光是由携带着能量的光子组成,这种能量在传播过程中表现为光的辐射,可以实现传递热量、引发化学反应和促进光合作用等多种物理和化学过程。尤其是对于 200~400 nm 波长的紫外光,当照射在某种物质上时,紫外所具有的能量被许多物质吸收能够引发光化学效应^[55]。目前,很多研究者基于紫外的光化学效应,将其用于促进合成分子筛中。紫外线照射在溶液中可以生成羟基自由基($\cdot\text{OH}$),从而加速分子筛结晶过程^[56]。在碱性环境中,氢氧根离子(OH^-)通过破坏 Si-O、Al-O 和 Si-O-Al 键等来促进硅铝酸盐凝胶的解聚和再聚合,而 $\cdot\text{OH}$ 作为比 OH^- 反应活性更高的物质,更有利于分子筛的合成^[3,45]。Feng^[3]等在水热条件下利用紫外照射产生 $\cdot\text{OH}$,证实了 $\cdot\text{OH}$ 对 NaA, NaX, NaZ-21 和 Silicalite-1 分子筛的合成促进作用,且 $\cdot\text{OH}$ 主要作用于成核阶段,提高了凝胶中的 Si-O-Si 键断裂和解聚速度,并促进新 Si-O-Si 键的形成,而 $\cdot\text{OH}$ 对晶体生长速率影响不大。 $\cdot\text{OH}$ 除了影响结晶速率,对形貌、酸量和催化性能等均有积极作用^[57-58]。

1.7 电场

作为热点领域,电场在材料合成中的应用一直被广泛研究,例如石墨烯、各种碳化物和无机纳米粒子的合成等^[54]。目前,外加电场对反应的作用机制主要集中在电学和热学等方面。然而,值得注意的是,Ghaani 等^[59]发现通过在水中外加电场能够显著促进纳米气泡的形成。而除了超声作用形成的空化气泡会产生自由基外,Takahashi 等^[60]证明了水中微纳米气泡($<50\ \mu\text{m}$)在没有强烈的动态刺激情况下,其自行崩塌和坍塌也会产生 $\cdot\text{OH}$,该自由基在分子筛合成领域的促进作用已得到证实。尽管目前没有直接将外加电场用于合成分子筛领域的研究,但 Ghaani 等^[59]和 Takahashi 等^[60]的研究结果为电场用于合成分子筛提供了一种可能性。

2 结论和展望

将不同强化技术引入分子筛合成过程中,对其粒径、比表面积、孔结构、活性位点及吸附催化等物理化学性能进行了优化。然而,目前外场强化技术在分子筛合成应用上仍存在一些困难,主要表现在:

- 1) 尽管有大量实验和模拟证明了外场强化技术在分子筛合成领域上的优势,但对于分子筛合成机制和外场强化机制的研究尚待深入挖掘;
- 2) 基于外场强化下合成分子筛的场景复杂性,目前仍缺乏先进的原位表征技术;
- 3) 一些外场强化技术仅具备单一强化功能,无法独自应用在分子筛合成上,例如微重力、微波、超声波、紫外和电场;
- 4) 目前,分子筛的合成仍使用间歇生产工艺,无法连续化生产。

因此,未来可从以下几个方面开展研究工作:

- 1) 探究分子筛合成过程中的原位表征技术,例如原位同步辐射技术和电子顺磁共振在线检测等,进一步揭示在外场强化下的分子筛合成机制;
- 2) 进一步创新改性超重力、微波、旋转液膜以及多技术耦合合成工艺,推动分子筛连续化生产。

参考文献:

- [1] 洪美花,郭子峰,刘冠锋,等. 碱处理方法合成多级孔分子筛的进展与挑战[J]. 无机盐工业,2023,55(6):36-42. DOI: 10.19964/j. issn.1006-4990.2022-000.
- [2] 刘贵丽,刘植昌. 分子筛的合成方法研究进展[J]. 现代化工,2015,35(9):34-37,39. DOI:10.16606/j. cnki. issn0253-4320.2015.09.008.
- [3] FENG Guodong,CHENG Peng,YAN Wenfu,*et al.* Accelerated crystallization of zeolites *via* hydroxyl free radicals [J]. Science,2016,351(6278):1188-1191. DOI:10.1126/science. aaf1559.
- [4] 齐乃明,张文辉,高九州,等. 空间微重力环境地面模拟试验方法综述[J]. 航天控制,2011,29(3):95-100. DOI:10.16804/j. cnki. issn1006-3242.2011.03.019.
- [5] CONTRERAS-PEREDA N,RODRÍGUEZ-SAN-MIGUEL D,FRANCO C,*et al.* Synthesis of 2D porous crystalline materials in simulated microgravity[J]. Advanced Materials,2021,33(30):2101777(1-9). DOI:10.1002/adma.202101777.
- [6] WARZYWODA J,BAC N,JANSEN J C,*et al.* Growth of zeolites A and X in low earth orbit[J]. Journal of Crystal Growth,2000,220(1/2):140-149. DOI:10.1016/S0022-0248(00)00659-X.
- [7] AKPORIAYE DE,STGCKER M,JUNGGREEN H. Results of the crystallisation of zeolite molecular sieves under microgravity conditions during the EURECA-1 mission[J]. Advances in Space Research,1995,16(8):55-58. DOI:10.1016/0273-1177(95)00270-O.
- [8] ZHANG H,KAMOTANI Y,OSTRACH S. Zeolite crystallization process modeling and comparison with microgravity flight results[J]. Journal of Spacecraft and Rockets,1995,32(1):110-116. DOI:10.2514/3.26582.
- [9] AKATA B,YILMAZ B,JIRAPONGPHAN SS,*et al.* Characterization of zeolite Beta grown in microgravity[J]. Microporous and Mesoporous Materials,2004,71(1/2/3):1-9. DOI:10.1016/j. micromeso.2004.03.012.
- [10] SONG Hongwei,ILEGBUSIA O J,Jr ALBERT S. Kinetics of zeolite NaA crystallization in microgravity[J]. Materials Letters,2005,59(21):2668-2672. DOI:10.1016/j. matlet.2005.04.015.
- [11] 陈建峰,初广文,邹海魁,等. 超重力反应工程[M]. 北京:化学工业出版社,2020.
- [12] COLIN R,HOWARD M R. Mass transfer apparatus and its use: EP19780300622[P]. 1979-06-27
- [13] 陈建峰. 超重力技术及应用[M]. 2版. 北京:化学工业出版社,2021.
- [14] XIANG Liangyu,WU Liankun,GAO Lidong,*et al.* Pilot scale applied research on CO₂ removal of natural gas using a rotating packed bed with propylene carbonate[J]. Chemical Engineering Research and Design,2019,150:33-39. DOI:10.1016/j. cherd.2019.03.038.
- [15] 郭浩,牛杰. 超重力技术的研究及应用[J]. 化工装备技术,2016,37(5):61-64. DOI:10.16759/j. cnki. issn.1007-7251.2016.10.016.
- [16] 齐婷婷,滕加伟,史静,等. 超重力预混+动态水热法制备 ZSM-5 分子筛: 水热过程影响机制[J]. 化工进展,2021,40(11):6228-6234. DOI:10.16085/j. issn.1000-6613.2020-2326.
- [17] MALINOWSKA JW,PITKOWSKI M,BLATKIEWICZ M,*et al.* Reactive absorption of carbon dioxide in aqueous *n*-methyl-diethanolamine solutions catalysed with carbonic anhydrase in a rotating packed bed (RPB)[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification,2023,184:109266-109277. DOI:10.1016/j. cep.2023.109266.
- [18] QI T,SHI J,WANG X,*et al.* Synthesis of hierarchical ZSM-5 zeolite in a rotating packed bed: Mechanism,property and application[J]. Microporous and Mesoporous Materials,2021,311:110679-110688. DOI:10.1016/j. micromeso.2020.110679.
- [19] 何万仁,陈昌海,史静,等. 超重力过程强化技术制备片状 MFI 分子筛及其催化性能[J]. 石油化工,2024,53(2):167-174. DOI:10.3969/j. issn.1000-8144.2024.02.004.
- [20] XU Yongquan,CAI Lianguo,LEI Shao,*et al.* Preparation and characterization of NaY zeolite in a rotating packed bed[J]. Petroleum Science,2012,9:106-109. DOI:10.1007/s12182-012-0190-0.
- [21] 齐婷婷. 超重力强化硅铝分子筛制备及应用研究[D]. 北京:北京化工大学,2023.
- [22] 侯文慧. 超重力强化稀土分子筛原位合成研究[D]. 北京:北京化工大学,2023.
- [23] 孙宝昌,齐婷婷,罗勇,等. 多孔材料连续化生产的微波耦合超重力反应系统: 110652950A[P]. 2020-01-07.
- [24] 孙宝昌,刘良印,初广文,等. 一种适用于液-固非均相反应体系的超重力耦合超声反应装置: 116726822A[P]. 2023-09-12.
- [25] QI Tingting,KANG Yingying,AROWO M,*et al.* Production of ZSM-5 zeolites using rotating packed bed: Impact

- mechanism and process synthesis studies[J]. *Chemical Engineering Science*, 2021, 244: 116794-116804. DOI: 10.1016/j.ces.2021.116794.
- [26] CHEN Jianfeng, WANG Yuhong, GUO Fen, *et al.* Synthesis of nanoparticles with novel technology: High-gravity reactive precipitation[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2000, 39(4): 948-954. DOI: 10.1021/ie990549a.
- [27] 韦礼顺, 许兰喜, 李殿卿. 旋转液膜反应器间隙对晶体粒径影响的研究[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2018, 45(1): 8-12. DOI: 10.13543/j.bhxbzr.2018.01.002.
- [28] 卢昌盛. 基于微液膜反应器的反应结晶过程及可控制备铋基光催化材料的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2022.
- [29] GUO Shengchang, EVANS D G, LI Dianqing, *et al.* Experimental and numerical investigation of the precipitation of barium sulfate in a rotating liquid film reactor[J]. *AIChE Journal*, 2009, 55(8): 2024-2034. DOI: 10.1002/aic.11818.
- [30] 林彦军, 万家豪, 李凯涛. 一种多流体并流旋转液膜反应器及其在制备层状复合金属氢氧化物中的应用: 116586001A[P]. 2023-08-15.
- [31] 乔瑞平, 耿翠玉, 张伦梁, 等. 一种负载型层状双金属复合氧化物催化剂的制备方法: 105195148A[P]. 2015-12-30.
- [32] TAN Jianghao, WANG Qi, LIN Yanjun, *et al.* Direct preparation of battery-grade lithium carbonate *via* a nucleation-crystallization isolating process intensified by a micro-liquid film reactor[J]. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2023, 101(2): 870-882. DOI: 10.1002/cjce.24436.
- [33] ZHAO Yun, LI Feng, ZHANG Rui, *et al.* Preparation of layered double-hydroxide nanomaterials with a uniform crystallite size using a new method involving separate nucleation and aging steps[J]. *Chemistry of Materials*, 2002, 14(10): 4286-4291. DOI: 10.1021/cm020370h.
- [34] FENG Yongjun, LI Dianqing, LI Chunxi, *et al.* Synthesis of Cu-containing layered double hydroxides with a narrow crystallite-size distribution[J]. *Clays and Clay Minerals*, 2003, 51(5): 566-569. DOI: 10.1346/CCMN.2003.0510510.
- [35] 冒爱琴, 宋洪昌, 李凤生, 等. 不同分散设备对超细 TiO₂ 水分散性影响的研究[J]. *精细与专用化学品*, 2003, 11(22): 18-20. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1100.2003.22.008.
- [36] 贺勇, 杨柳, 王聪慧, 等. 超声波-机械搅拌联合作用下 NaY 分子筛的合成及影响因素[J]. *工业催化*, 2023, 23(11): 892-896. DOI: 10.3969/j.issn.1008-1143.2015.11.008.
- [37] 郭红, 杨先海, 盛文斌, 等. 超声震荡低温水热合成纳米 X 型沸石分子筛[J]. *当代化工研究*, 2020(15): 36-38. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8114.2020.15.016.
- [38] HAN Jinfeng, HA Ying, GUO Mingyu, *et al.* Synthesis of zeolite SSZ-13 from coal gangue *via* ultrasonic pretreatment combined with hydrothermal growth method[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2019, 59: 104703-114713. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.104703.
- [39] CHEN Zongrong, SONG Guoqiang, LI C, *et al.* Coal fly ash to Y zeolite of great purity and crystallinity: A new and green activation method of combined *in situ* microwave and ultrasound[J]. *Solid State Sciences*, 2023, 136: 107102-107112. DOI: 10.1016/j.solidstatedsciences.2022.107102.
- [40] 马芳, 李发琪, 王智彪. 超声空化效应的研究进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2003, 5(5): 292-294. DOI: 10.3969/j.issn.1008-6978.2003.05.014.
- [41] BELVISO C, CAVALCANTE F, FIORE S. Ultrasonic waves induce rapid zeolite synthesis in a seawater solution[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20(1): 32-36. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.06.004.
- [42] MOKUDAI T, KAWADA M, TADAKI D, *et al.* Radical generation and bactericidal activity of nanobubbles produced by ultrasonic irradiation of carbonated water[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2024, 103: 106809-106818. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2024.106809.
- [43] 李明昊. 超声技术在无机材料合成与制备中的应用分析[J]. *信息记录材料*, 2018, 19(7): 24-25.
- [44] LI Yanshuo, YANG Weishen. Microwave synthesis of zeolite membranes: A review[J]. *Journal of Membrane Science*, 2008, 316(1/2): 3-17. DOI: 10.1016/j.memsci.2007.08.054.
- [45] CUNDY C S, COX P A. The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005, 82(1/2): 1-78. DOI: 10.1016/j.micromeso.2005.02.016.
- [46] 陈彦广, 徐婷婷, 韩洪晶, 等. 粉煤灰微波-水热合成法制备分子筛的研究进展[J]. *化工进展*, 2015, 34(8): 2916-2924. DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2015.08.002.

- [47] LE T M, NGUYEN G T, DAT N D, *et al.* An innovative approach based on microwave radiation for synthesis of zeolite 4A and porosity enhancement[J]. *Results in Engineering*, 2023, 19: 101235-101246. DOI: 10.1016/j.rineng.2023.101235.
- [48] CHENG Zhilin, WAN Hhuilin, LIU Zan. Fabrication of zeolite A rods with irregular macropores by self-assembly of zeolite A microcrystals using microwave-assisted hydrothermal synthesis[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2004, 22(12): 1454-1455. DOI: 10.1002/cjoc.20040221216.
- [49] KHAN N A, YOO D K, LEE S, *et al.* Microwave-assisted rapid synthesis of nanosized SSZ-13 zeolites for effective conversion of ethylene to propylene[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2023, 121: 242-248. DOI: 10.1016/j.jiec.2023.01.028.
- [50] 宁波大学李砚硕团队. 有机溶剂超深度脱水分子筛膜和成套装备[EB/OL]. (2022-08-16)[2024-07-28]. <https://heec.cahe.edu.cn/school/science-project/30955.html>.
- [51] BAGHBANZADEH M, CARBONE L, COZZOLI P D, *et al.* Microwave-assisted synthesis of colloidal inorganic nanocrystals[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(48): 11312-11359. DOI: 10.1002/anie.201101274.
- [52] ZENG Xiaojun, HU Xudong, SONG Hanbin, *et al.* Microwave synthesis of zeolites and their related applications[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2021, 323: 111262-111280. DOI: 10.1016/j.micromeso.2021.111262.
- [53] TOMPSETT G A, CONNER W C, YNGVESSON K S. Microwave synthesis of nanoporous materials[J]. *Chemp-hyschem*, 2006, 7(2): 296-319. DOI: 10.1002/cphc.200500449.
- [54] EDDY L, XU Shichen, LIU Changhao, *et al.* Electric field effects in flash joule heating synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(23): 16010-16019. DOI: 10.1021/jacs.4c02864.
- [55] GOTI G, MANAL K, SIVAGURU J, *et al.* The impact of UV light on synthetic photochemistry and photocatalysis[J]. *Nature Chemistry*, 2024, 16(5): 684-692. DOI: 10.1038/s41557-024-01472-6.
- [56] JIN Fan, WEI Min, LIU Chengbu, *et al.* The mechanism for the formation of OH radicals in condensed-phase water under ultraviolet irradiation[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19(32): 21453-21460. DOI: 10.1039/c7cp01798g.
- [57] NOVITA T H, KADJA G T M. Hydroxyl radical-regulated crystallization of hierarchical H-ZSM-5 at low temperatures for palm oil conversion into high aromatic green gasoline[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2024, 26: 101867-101877. DOI: 10.1016/j.biteb.2024.101867.
- [58] CHENG Peng, FENG Guodong, SUN Chang, *et al.* An efficient synthetic route to accelerate zeolite synthesis *via* radicals[J]. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2018, 5(9): 2106-2110. DOI: 10.1039/C8QI00441B.
- [59] GHAANI M R, KUSALIK P G, ENGLISH N J. Massive generation of metastable bulk nanobubbles in water by external electric fields[J]. *Science Advances*, 2020, 6(14): eaaz0094. DOI: 10.1126/sciadv.aaz0094.
- [60] TAKAHASHI M, CHIBA K, LI Pan. Free-radical generation from collapsing microbubbles in the absence of a dynamic stimulus[J]. *Journal Of Physical Chemistry B*, 2007, 111(6): 1343-1347. DOI: 10.1021/jp0669254.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407001



超临界 CO₂ 流体技术制备脱细胞外基质材料及其生物医学应用

吴冰, 段又愈, 陈爱政

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 脱细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)材料在组织工程和再生医学中具有重要应用,超临界 CO₂ 流体(supercritical CO₂ fluid, SCF-CO₂)技术已被证明可用于 dECM 材料的制备。文中综述了 SCF-CO₂ 的基本原理、SCF-CO₂ 脱细胞及其灭菌机制,介绍了辅助溶剂的使用与预处理技术对 SCF-CO₂ 脱细胞的影响,以及 dECM 材料的生物医学应用。结果表明:与常规方法相比,具有高渗透性、高扩散性的 SCF-CO₂ 能更有效地保持细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的结构完整性和生物活性,同时展现出高效灭菌的优势,且制备的 dECM 材料在组织修复和再生医学领域具有显著应用潜力。

关键词: 超临界 CO₂ 流体;脱细胞外基质;超临界灭菌;组织工程

中图分类号: R 318

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0551-08

Supercritical CO₂ Fluid Technology-Assisted Fabrication of Decellularized Extracellular Matrix Materials and Biomedical Applications

WU Bing, DUAN Youyu, CHEN Aizheng

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Decellularized extracellular matrix (dECM) materials play a significant role in tissue engineering and regenerative medicine. Supercritical CO₂ fluid (SCF-CO₂) technology has been proven to be applicable in the preparation of dECM materials. By reviewing relevant literature in recent years, this paper summarizes the basic principles of SCF-CO₂, the mechanisms of decellularization and sterilization by SCF-CO₂, and discusses the impact of auxiliary solvents and pretreatment techniques on SCF-CO₂-assisted decellularization, as well as the biomedical applications of dECM materials. The results show that, compared with conventional methods, SCF-CO₂ with high permeability and high diffusivity could maintain the structural integrity and biological activity of extracellular matrix (ECM) more effectively and show the advantage of high sterilization efficiency. Moreover, the prepared dECM materials have significant potential for application in the field of tissue repair and regenerative medicine.

Keywords: supercritical carbon dioxide fluid; decellularized extracellular matrix; supercritical sterilization; tissue engineering

收稿日期: 2024-07-01

通信作者: 陈爱政(1978-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事超临界流体技术、生物材料与组织工程的研究。E-mail: azchen@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(32271410)

生物材料在组织工程与再生医学领域发挥着重要作用,具有巨大的临床应用前景。随着生物医学工程技术的快速发展,脱细胞外基质(decellularized extracellular matrix, dECM)材料因其独特的生物相容性、低免疫原性和生物活性,在再生医学、组织工程和药物递送等领域展现出巨大的应用潜力。dECM材料通过去除具有免疫原性的细胞成分、同时保留天然细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分和结构以兼具生物相容性和生物活性。然而,传统的脱细胞方法,如使用极性洗涤剂或强酸强碱溶液,可能会导致多糖的损失和蛋白质结构的改变;使用生物酶会因浓度过高或作用时间过长破坏生物活性物质且成本高昂。

超临界 CO₂ 流体(supercritical CO₂ fluid, SCF-CO₂)技术利用 CO₂ 在超临界状态下的高渗透性、高扩散性和对极性组分(如蛋白质和多糖)的低反应性,有效地防止了在组织提取过程中生物分子的变性,从而最大限度地保留了 ECM 的天然成分和结构,因此成为一种可能的脱细胞方法^[1]。此外,温和、绿色的 SCF-CO₂ 在 dECM 材料的灭菌中也展现出了独特的优势。本文综述了 SCF-CO₂ 的基本原理、SCF-CO₂ 脱细胞及其灭菌机制,介绍了辅助溶剂的使用与预处理技术对 SCF-CO₂ 脱细胞的影响,以及 dECM 材料的生物医学应用。

1 SCF-CO₂ 概述

超临界流体技术是一种利用物质在超临界状态下的特殊性质进行材料加工和化学合成的技术。当一种特定物质的温度和压力达到其临界点之上时,如果对该气体状态的物质施加压力,它不会转变为液态,只是密度会增加,展现出类似液体的特性,同时仍然保持气体的一些性质,这种介于两者之间的一种特殊流体状态被称为超临界流体状态^[2]。超临界流体技术可以使用多种不同的流体作为溶剂,如水、甲醇、乙醇、丙烷和二氧化碳等,每种流体都有其独特的物理和化学性质,适用于不同的应用。其中,二氧化碳是最常用的超临界流体,因为它达到超临界状态的条件相对温和(临界温度约为 31.3 °C,临界压力约为 7.38 MPa),且对环境友好,具有较低的粘度、较高的扩散性以及很好的溶解能力。

SCF-CO₂ 因其独特的物理和化学特性,在材料加工领域有着广泛的应用,主要包括 SCF-CO₂ 萃取、SCF-CO₂ 造粒、SCF-CO₂ 发泡三个方面。SCF-CO₂ 萃取技术是一种利用 SCF-CO₂ 为萃取剂,从液体或固体中萃取出特定成分的技术^[3]。SCF-CO₂ 萃取在接近室温的条件下操作,可以最大限度地保留食品的原有风味和营养成分,因此被广泛应用于在食品工业提取香料、油脂和色素等成分^[4]。在医药与化妆品工业中,SCF-CO₂ 萃取技术被用于提取药物有效成分,可以保证产品的纯天然性和无化学污染。SCF-CO₂ 造粒技术是将溶质溶解于超临界流体中,通过特制的喷嘴进行快速降压膨胀,使溶质瞬间形成大量的晶核并生长成微粒,从而制备出粒度均匀、分布狭窄的超细微粒^[5],广泛应用于材料科学和生物医药领域制备高性能超细微粒材料和药物微纳米颗粒。SCF-CO₂ 发泡技术利用超临界流体的溶解和膨胀性质,在材料内部形成均匀分布的气泡结构,以制备出轻质、高强度的发泡材料^[6],适宜于建筑材料和汽车工业领域制备轻质、隔热、隔音的发泡板材,轻量化、高性能的发泡零部件等,以及在生物医药领域制备具有良好生物相容性的多孔支架,可用于组织工程和再生医学^[7]。

近年来,在生物医学领域,SCF-CO₂ 因其低粘度和高扩散性被广泛地用于 dECM 材料的制备,可以有效去除具有免疫原性的细胞成分并最大限度保留其生物活性成分。与传统的化学洗涤剂相比,SCF-CO₂ 的使用能够减少对 ECM 成分的伤害,并且有效避免因洗涤剂残留引起的细胞毒性。此外,SCF-CO₂ 也因其独特的物理和化学性质,在 dECM 材料的灭菌中也展现出了显著优势^[8]。

2 SCF-CO₂ 在 dECM 材料中的应用

SCF-CO₂ 制备 dECM 材料及其生物医学应用,如图 1 所示。

2.1 SCF-CO₂ 用于脱细胞

dECM 作为一种新兴的生物材料,近年来在组织工程和再生医学领域受到了广泛关注。dECM 是通过去除组织或器官中的细胞成分,保留其 ECM 的结构和成分得到的。dECM 材料的来源广泛,包括皮肤、心脏、血管、骨骼、软骨等多种组织和器官。这些组织和器官经过脱细胞处理后,可得到富含胶原

蛋白、糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs)、生长因子等生物活性物质的 dECM^[9], 对于细胞的增殖、迁移、黏附和分化具有重要影响, 为组织工程和再生医学提供了理想的生物材料。

传统上, 动物组织的脱细胞过程涉及物理、化学和生物方法的多种组合, 如使用酸碱溶剂、洗涤剂、生物酶处理或通过反复冻融来实现^[10]。然而, 在这些脱细胞方法中, 为防止因化学试剂引起 ECM 成分的损失降解是一个挑战。ECM 中的一些关键物质, 例如糖蛋白和生长因子, 对于组织再生至关重要, 但它们可能会因洗涤剂的表面活性作用而变性或被移除。SCF-CO₂ 作为一种温和的处理方法, 可以在较低的温度和压力下有效地去除细胞成分, 同时避免对 ECM 结构的破坏。如图 2 所示, SCF-CO₂ 渗透扩散至原始组织细胞内, 将细胞胀大破裂使细胞内内容物流出, 留下 ECM 成分与结构。

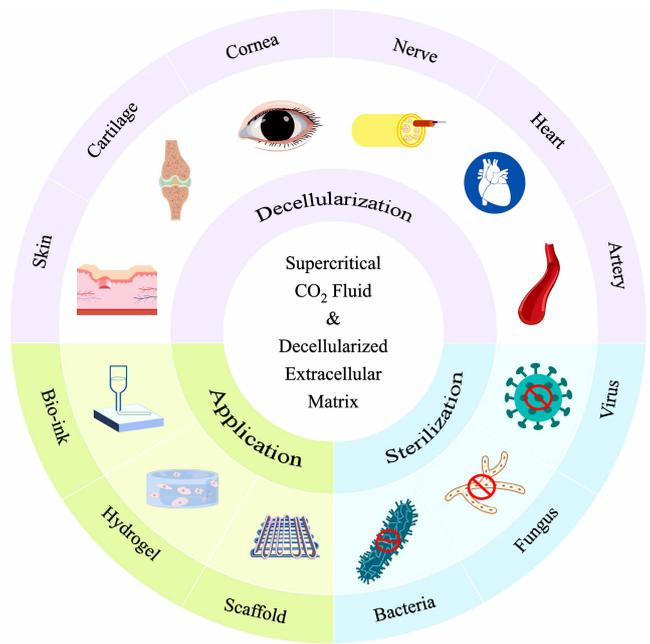


图 1 SCF-CO₂ 制备 dECM 材料及其生物医学应用

Fig. 1 SCF-CO₂-assisted fabrication of dECM materials and biomedical applications

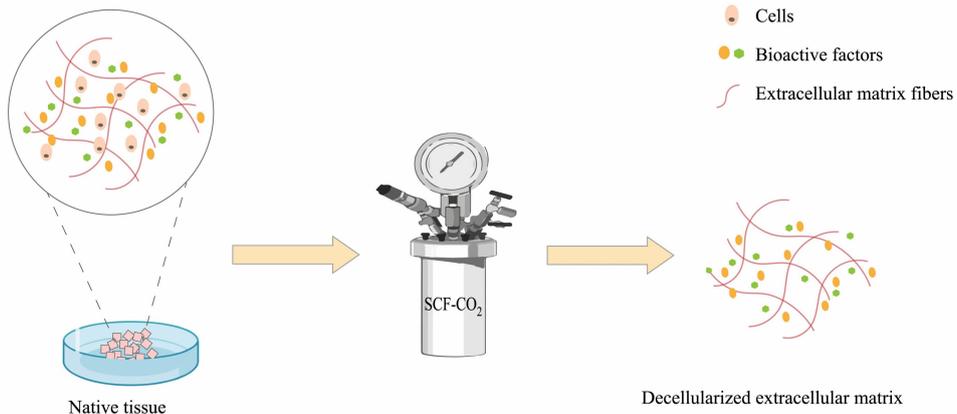


图 2 SCF-CO₂ 脱细胞示意图

Fig. 2 Schematic diagram of SCF-CO₂ decellularization

基于 SCF-CO₂ 制备的 dECM 材料具有优异的生物相容性、低免疫原性和生物活性, 在组织工程、再生医学和药物递送等领域具有广泛的应用前景^[11]。CO₂ 分子是非极性的, 但在超临界状态下, 其溶剂特性可以发生变化, 如 SCF-CO₂ 能够溶解一些通常难溶于非极性溶剂的极性物质^[12]。SCF-CO₂ 通过渗透进入组织, 利用其溶解能力将细胞内的部分成分溶解, 从而实现细胞内内容物的去除。此外, SCF-CO₂ 可以增加细胞膜的流动性, 加速细胞膜破裂, 释放细胞内容物, 进一步促进脱细胞过程。

由于不涉及化学试剂的使用, SCF-CO₂ 脱细胞在去除 DNA 的同时可以较大程度地保留 ECM, 相较于传统的脱细胞方法展现出了明显的优势。SCF-CO₂ 脱细胞技术是一种绿色高效的脱细胞方法, 然而, SCF-CO₂ 本身可能不足以完全去除组织中的所有细胞成分, 特别是当组织结构复杂或细胞间连接紧密时^[13]。因此, 研究通过引入辅助溶剂和优化预处理步骤等方法, 可以进一步提升 SCF-CO₂ 脱细胞的效率。

2008 年, Sawada 等^[14] 首次尝试使用 SCF-CO₂ 进行猪主动脉的脱细胞。但是单独使用 SCF-CO₂

不能完全去除细胞核,而添加乙醇作为辅助溶剂后可以成功地从主动脉彻底去除细胞核。辅助溶剂的作用机制是通过与 SCF-CO₂ 混合,降低其表面张力,增加其溶解极性分子的能力。这些溶剂可以是极性小分子、表面活性剂或酶,它们能够与细胞膜相互作用,削弱细胞间的连接,从而促进细胞的分离和去除。例如,表面活性剂可以降低细胞膜的稳定性,使得 SCF-CO₂ 更容易渗透进入细胞并去除细胞成分。

在一项软骨组织的脱细胞研究中^[15],以乙醇为助溶剂使用 SCF-CO₂ 进行脱细胞处理,不仅成功去除了 DNA,而且在 dECM 中培养的软骨细胞,其 COL-II 和聚集蛋白的基因表达水平有所增加,表明细胞在培养过程中保持了较高的活性。此外,将上述软骨 dECM 材料应用于软骨缺损的体内实验,观察到植入的 dECM 材料与周围的天然组织实现了良好的整合。在 Anton 团队的研究中,通过使用亲 CO₂ 洗涤剂(Ls-54)与 SCF-CO₂ 共溶剂成功进行了软骨、肌腱和皮肤的脱细胞^[16]。

另外,使用辅助溶剂的另一个重要考虑是它们的生物相容性和环境影响。理想的辅助溶剂应该具有良好的生物相容性,不会对后续的细胞培养或组织工程应用产生负面影响。此外,考虑到成本和环境可持续性,辅助溶剂的回收和再利用也是重要的考量因素。尽管使用辅助溶剂可以显著提高 SCF-CO₂ 脱细胞的效率,但仍存在一些问题和限制,如当组织结构致密时,即使使用辅助溶剂也需要较长的处理时间,且某些辅助溶剂可能难以从最终产品中完全去除。因此,研究人员需要不断探索优化脱细胞过程,以实现更高效、经济的脱细胞技术。

为了使 SCF-CO₂ 和辅助溶剂能够更好地通过渗透和溶解作用将细胞成分从 ECM 中分离出来,选择合适的预处理方法是关键的一步^[13]。预处理的目的是使组织更易于 SCF-CO₂ 处理,从而提高脱细胞效率并减少对 ECM 成分的损害。常见的预处理方法主要包括物理处理和化学处理两种方式。

物理预处理技术包括冻融循环、机械搅拌或压力处理。冻融循环通过冷冻和融化的过程破坏细胞膜,释放细胞内容物,为 SCF-CO₂ 的渗透创造通道;机械搅拌通过物理方式促进 SCF-CO₂ 与组织接触,加速细胞成分的去除;压力处理通过改变细胞的结构完整性,帮助 SCF-CO₂ 更深入地渗透到组织内部。

化学预处理通常涉及使用低浓度的表面活性剂或酶,低浓度的非离子表面活性剂(如 Triton X-100)可以轻微破坏细胞膜,有助于 SCF-CO₂ 的渗透和细胞内容物的去除;特定的酶,如胶原酶或透明质酸酶,可以特异性地分解 ECM 中的某些成分,促进细胞内容物的分离和去除。要注意的是,酶处理需要精确控制用量,以避免过度破坏 ECM。

联合预处理方法结合了物理和化学处理的优势,通过相互补充提高脱细胞效率,同时减少对 ECM 的损害。例如,可以先使用冻融循环或机械搅拌破坏细胞结构,再使用低浓度的化学试剂进一步促进细胞的去除。预处理条件的优化同样重要,需要根据具体的组织类型和所需的 ECM 特性进行调整。这包括确定最佳的冻融循环次数,机械搅拌的强度、时间和压力处理的参数,以及化学试剂的浓度和处理时间等。SCF-CO₂ 应用于脱细胞的研究结果,如表 1 所示。

表 1 SCF-CO₂ 用于脱细胞
Tab. 1 SCF-CO₂-assisted decellularization

组织来源	溶剂组成	处理时间/h	压力/MPa	温度/℃	预处理	参考文献
软骨(猪)	75%乙醇,CO ₂	0.6	10.00~35.00	30~50	—	[15]
神经(猪)	无水乙醇,CO ₂	3.0	20.00~40.00	37	—	[16]
肌腱(马)	CO ₂ ,Ls-54	1.0	25.00	37	—	[17]
皮肤(人)	CO ₂ ,Ls-54	1.0	25.00	37	1 mol·L ⁻¹ NaCl	[17]
软骨(牛)	CO ₂ ,Ls-54	1.0	25.00	37	冻融循环,高渗溶液,0.05%胰蛋白酶	[17]
心肌(牛)	70%乙醇,CO ₂	1.0	17.24	37	5次冻融循环,1.5 mol·L ⁻¹ NaCl	[18]
视神经(牛)	70%乙醇,CO ₂	4.0	7.39	37	1次冻融循环,0.5% EDTA	[18]
角膜(牛)	70%乙醇,CO ₂	1.0	17.25,31.03	37	生理盐水	[19]
主动脉(羊)	95%乙醇,CO ₂	1.0	10.00,15.00, 25.00	37	1 mol·L ⁻¹ NaOH, 0.8 mol·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ ,0.5% SDS	[20]
脂肪组织(猪)	CO ₂	0.5	10.00~30.00	30~40	0.05%胰蛋白酶-EDTA, 0.032 mol·L ⁻¹ 脱氧胆酸钠	[21]
主动脉(猪)	CO ₂ ,Ls-54, 水,无水乙醇	1.0	10.30,27.60	10~37	0.1% SDS,0.2 mg·mL ⁻¹ DNase, 0.02 mg·mL ⁻¹ RNase	[22]

2.2 SCF-CO₂ 用于灭菌

对于 dECM 材料的临床转化和实施,除了成功制备以外,还必须包括有效的灭菌方法。在材料植入体内之前,最关键的步骤是确保其经过彻底的灭菌处理,以避免因植入物引起的感染和免疫反应,从而提高植入的成功率及安全性。选择灭菌技术必须综合考虑脱细胞组织移植物的尺寸、复杂性,以及对结构完整性和 ECM 的影响。

常用的灭菌技术包括 γ 辐照、电子辐照及环氧乙烷(ETO)处理。 γ 辐照是一种冷过程,使用放射性同位素钴 60 作为辐射源,可以在无需额外处理的情况下对湿物料进行灭菌,适合于热敏感的生物材料。然而,辐照过程可能会对 ECM 的胶原蛋白网络造成一定程度的损伤^[23]。电子辐照也是一种冷杀菌工艺,使用电子加速器作为辐射源,与伽马辐照相似,能够有效破坏微生物 DNA,但同样也可能对 ECM 造成损伤。ETO 是一种烷基化剂,将材料暴露于 ETO 气体中能够通过破坏 DNA 来阻止微生物的复制,但由于其在材料中的渗透性有限,仅能作用于材料表面,可能需要额外的步骤以确保完全灭菌^[24]。

1951 年,Fraser 首次报告 SCF-CO₂ 作为一种灭菌方法^[25]。在后来研究中,SCF-CO₂ 杀菌作用被大量的文献证明,并广泛应用于食品、医疗等领域中。SCF-CO₂ 是一种具有化学惰性、易获得、溶解能力高、粘度低以及高扩散系数等物理化学性质的物质,能够不受多孔隙及结构较复杂材料的影响,穿透材料后可作用在病原微生物上,对细菌、酵母菌、霉菌、病毒等微生物具有很好的杀灭能力^[26]。

多年来,一些研究人员一直致力于了解 SCF-CO₂ 灭菌作用背后的机制。根据 Garcia-Gonzalez 等^[27]的假设,SCF-CO₂ 灭菌涉及 H₂CO₃ 的形成和解离,扩散进细胞膜内后会增加膜的流动性与通透性;同时,也会使细胞内的 pH 值降低,导致关键酶的失活、细胞代谢受抑制,最终导致细胞平衡紊乱、细胞成分流失,实现灭菌效果。SCF-CO₂ 灭菌过程,如图 3 所示

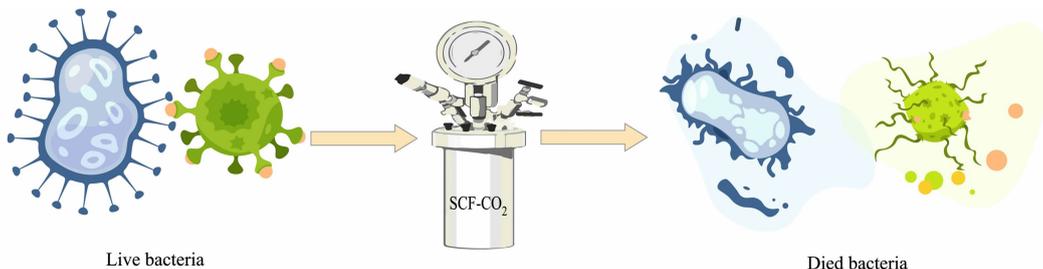


图 3 SCF-CO₂ 灭菌示意图

Fig. 3 Schematic diagram of SCF-CO₂ sterilization

因此,SCF-CO₂ 为脱细胞外基质材料的灭菌提供了一种非热、非化学的方法。但在大部分情况下,SCF-CO₂ 本身不足以使全部的病原体灭活,所以 SCF-CO₂ 可以与抗菌剂、氧化剂等辅助剂结合使用,进一步提高灭菌效果和效率^[28]。有研究显示,添加低剂量过氧乙酸的 SCF-CO₂ 处理可有效灭活细菌,同时保持生物力学性能,这创造了在一个步骤过程中整合脱细胞和灭菌的可能性,从而提高了效率。

de Wit 等^[8]采取三种方法对使用 SCF-CO₂ 制备的猪气管脱细胞支架材料进行灭菌,分别是 NaOH 清洗后 γ 射线照射灭菌、仅有 γ 射线照射灭菌,以及 SCF-CO₂ 配合低剂量过氧乙酸灭菌。研究结果显示,与 γ 射线灭菌相比,用 SCF-CO₂ 灭菌后支架材料的功能结果更接近于原始气管。

在 Ryan 等^[29]的研究中比较了 SCF-CO₂、电解水、 γ 射线、乙醇-过氧乙酸和过氧化氢方法对脱细胞猪心脏主动脉瓣无菌性和机械完整性的影响。通过组织学、微生物培养和电子显微镜分析,发现乙醇-过氧乙酸和 SCF-CO₂ 处理的瓣膜是无菌的,而且 SCF-CO₂ 处理的瓣膜尖端拉伸性能高于其他技术处理的瓣膜,且在用 SCF-CO₂ 灭菌处理的脱细胞瓣膜中发现了优异的无菌性和完整性。

综上所述,SCF-CO₂ 为 dECM 材料提供了一种理想的灭菌方法。

3 dECM 材料的生物医学应用

3.1 3D 打印

在 3D 生物打印领域,dECM 溶液可以通过改变温度和离子浓度形成固态作为生物墨水,为细胞生长、迁移和分化提供理想的支持环境,为构建具有生物活性的组织或器官提供了可能^[30]。通过将

dECM 与其他生物材料或细胞结合,可以打印出与原生组织相似的结构,为组织工程和再生医学提供了新的解决方案。Daniel 等^[31]的工作中突出了基于 SCF-CO₂ 来提取由不同细胞类型(人真皮成纤维细胞、脂肪干细胞)组成的细胞片的 ECM 成分,用于制备 dECM 生物墨水的优势,并开拓了 dECM 生物墨水在打印组织样结构开发中的前景。

3.2 水凝胶

dECM 水凝胶的形成是一种基于胶原蛋白的自组装过程,同时受到其他的蛋白成分、GAGs 以及蛋白多糖的影响。dECM 干燥粉末经胃蛋白酶消化后,通过调节 pH 值、盐离子浓度与温度以诱导形成凝胶。dECM 水凝胶结合了 dECM 的生物活性和水凝胶的吸水性,具有模拟生理基质环境,促进细胞粘附、浸润和增殖的能力^[32]。在皮肤创面修复、软骨再生等领域,dECM 水凝胶能够作为伤口敷料或细胞载体,加速组织的修复和再生,从而促进细胞的增殖和分化。Seo 等^[1]开发了一种使用 SCF-CO₂-乙醇共溶剂系统代替洗涤剂处理方法的心脏组织脱细胞方法,所制备的心脏 dECM 水凝胶有效促进了血管生成。

3.3 组织工程支架

dECM 材料还可作为组织工程支架,能够支持细胞的粘附和增殖,为细胞的生长和组织的形成提供模板^[33]。在骨缺损修复、神经修复再生等领域中,dECM 生物支架已被广泛应用。超临界脱细胞过程可以能够保持动物组织原有的三维结构,有效去除组织内的抗原性细胞和遗传物质。因此,采用 SCF-CO₂ 进行脱细胞的多种组织已被广泛应用于组织工程支架,以促进受损部位的修复再生。

Wang 等^[34]报道了一种用 SCF-CO₂ 技术从猪皮中制备脱细胞真皮基质的方法,实验结果显示 4 cm×3 cm 的全层创面经 dECM 处理后,创面缺损未出现组织学类型的异常纤维化或细胞团簇。有研究表示,SCF-CO₂ 处理后的脱细胞组织也可用于角膜移植实验。即使在猪与兔的异种移植实验中,移植的 SCF-CO₂ 脱细胞组织也没有表现出任何细胞毒性或炎症反应。经过板层角膜移植术,将眼睛的基质部位移除并用植入物代替,观察到脱细胞组织和原生眼组织完全融合,脱细胞组织被角质形成细胞浸润,未观察到免疫细胞识别和分化^[35]。此外,使用 SCF-CO₂ 对神经组织进行脱细胞,能更有效地保留神经组织中的 ECM 成分,植入后能够为轴突提供物理引导和化学信号,促进受损神经的再生和修复。Kim 等^[21]的研究表明,基于 SCF-CO₂ 的方法比传统的化学脱细胞能够更好地保存 ECM 成分和机械性能,以及更好地促进细胞反应。

4 结论与展望

综上所述,SCF-CO₂ 因其独特的物理和化学性质,如高渗透性、高扩散性以及绿色高效等特点,在 dECM 材料的制备过程中发挥了至关重要的作用。深入了解 SCF-CO₂ 脱细胞和灭菌原理,不仅能够更好地掌握其在 dECM 材料制备中的核心作用机制,还有助于进一步优化 SCF-CO₂ 的应用工艺,这对于对提高 dECM 材料的制备效率、降低生产成本,以及促进 dECM 材料的产品开发、临床应用与产业化具有重要意义。

参考文献:

- [1] SEO Y, JUNG Y, KIM S H. Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 67: 270-281. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.046.
- [2] COUNSELL J F, EVERETT D H. Nature of fluids in the hypercritical region[J]. *Nature*, 1960, 188(4750): 576-577. DOI: 10.1038/188576a0.
- [3] YOUSEFI M, RAHIMI NASRABADI M, POURMORTAZAVI S M, *et al.* Supercritical fluid extraction of essential oils[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 118: 182-193. DOI: 10.1016/j.trac.2019.05.038.
- [4] 吕东灿, 刘运权, 王夺, 等. 生物油萃取分离技术的研究进展[J]. *化工进展*, 2012, 31(7): 1425-1431. DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2012.07.025.
- [5] FRANCO P, DE MARCO I. Nanoparticles and nanocrystals by supercritical CO₂-assisted techniques for pharmaceutical applications: a review[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(4): 1476. DOI: 10.3390/app11041476.

- [6] DONG Mengyao, WANG Gang, ZHANG Xiangning, et al. An overview of polymer foaming assisted by supercritical fluid[J]. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2023, 6(6): 207. DOI: 10.1007/s42114-023-00790-6.
- [7] KANKALA R K, ZHANG Y S, WANG Shibin, et al. Supercritical fluid technology: An emphasis on drug delivery and related biomedical applications[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(16): 1700433. DOI: 10.1002/adhm.201700433.
- [8] DE WIT R J J, VAN DIS D J, BERTRAND M E, et al. Scaffold-based tissue engineering: Supercritical carbon dioxide as an alternative method for decellularization and sterilization of dense materials[J]. *Acta Biomaterialia*, 2023, 155: 323-332. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.11.028.
- [9] BEJLERI D, DAVIS M E. Decellularized extracellular matrix materials for cardiac repair and regeneration[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(5): 1801217. DOI: 10.1002/adhm.201801217.
- [10] YAO Qing, ZHENG Yawen, LAN Qinghua, et al. Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 104: 109942. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109942.
- [11] KIM B S, KIM J U, LEE J W, et al. Comparative analysis of supercritical fluid-based and chemical-based decellularization techniques for nerve tissue regeneration[J]. *Biomaterials Science*, 2024, 12(7): 1847-1863. DOI: 10.1039/D3BM02072J.
- [12] KANG Xing, MAO Lihao, SHI Jinwen, et al. Supercritical carbon dioxide systems for sustainable and efficient dissolution of solutes; a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2024, 22(2): 815-839. DOI: 10.1007/s10311-023-01681-4.
- [13] CHASCHIN I S, BRITIKOV D V, KHUGAEV G A, et al. Decellularization of the human donor aortic conduit by a new hybrid treatment in a multicomponent system with supercritical CO₂ and Tween 80[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2022, 180: 105452. DOI: 10.1016/j.supflu.2021.105452.
- [14] SAWADA K, TERADA D, YAMAOKA T, et al. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, 83(6): 943-949. DOI: 10.1002/jctb.1899.
- [15] CHEN Yiting, LEE H S, HSIEH D J, et al. 3D composite engineered using supercritical CO₂ decellularized porcine cartilage scaffold, chondrocytes, and PRP: Role in articular cartilage regeneration[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2021, 15(2): 163-175. DOI: 10.1002/term.3162.
- [16] KIM B S, KIM J U, LEE J W, et al. Comparative analysis of supercritical fluid-based and chemical-based decellularization techniques for nerve tissue regeneration[J]. *Biomaterials Science*, 2024, 12(7): 1847-1863. DOI: 10.1039/D3BM02072J.
- [17] ANTONS J, MARASCIO M G M, AEBERHARD P, et al. Decellularised tissues obtained by a CO₂-philic detergent and supercritical CO₂[J]. *European Cells and Materials*, 2018, 36: 81-95. DOI: 10.22203/eCM.v036a07.
- [18] TOPUZ B, GÜNAL G, GULER S, et al. Chapter 4 - Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization [M]// CABALLERO D, KUNDU S C, REIS R L. *Methods in Cell Biology*. Academic Press. 2020: 49-79. DOI: 10.1016/bs.mcb.2019.10.012.
- [19] GULER S, ASLAN B, HOSSEINIAN P, et al. Supercritical carbon dioxide-assisted decellularization of aorta and cornea[J]. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2017, 23(9): 540-547. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0090.
- [20] GAFAROVA E R, GREBENIK E A, LAZHKO A E, et al. Evaluation of supercritical CO₂-assisted protocols in a model of ovine aortic root decellularization[J]. *Molecules*, 2020, 25(17): 3923. DOI: 10.3390/molecules25173923.
- [21] CHUNG S, KWON H, KIM N P. Supercritical extraction of decellularized extracellular matrix from porcine adipose tissue as regeneration therapeutics[J]. *Journal of Cosmetic Medicine*, 2019, 3(2): 86-93. DOI: 10.25056/JCM.2019.3.2.86.
- [22] CASALI D M, HANDLETON R M, SHAZLY T, et al. A novel supercritical CO₂-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2018, 131: 72-81. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.07.021.
- [23] AFFATATO S, BORDINI B, FAGNANO C, et al. Effects of the sterilisation method on the wear of UHMWPE acetabular cups tested in a hip joint simulator[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(6): 1439-1446. DOI: 10.1016/s0142-9612(01)00265-4.
- [24] MENDES G, BRANDÃO T, SILVA C. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review[J]. *American Jour-*

- nal of Infection Control, 2007, 35(9): 574-581. DOI: 10.1016/j.ajic.2006.10.014.
- [25] FRASER D. Bursting bacteria by release of gas pressure[J]. Nature, 1951, 167(4236): 33-34. DOI: 10.1038/167033b0.
- [26] ZHANG Jian, DAVIS T A, MATTHEWS M A, *et al.* Sterilization using high-pressure carbon dioxide[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38(3): 354-372. DOI: 10.1016/j.supflu.2005.05.005.
- [27] GARCIA-GONZALEZ L, GEERAERD A H, SPILIMBERGO S, *et al.* High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1): 1-28. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018.
- [28] SHIEH E, PASZCZYNSKI A, WAI C M, *et al.* Sterilization of bacillus pumilus spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(3): 247-252. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.11.005.
- [29] HENNESSY R S, JANA S, TEFFT B J, *et al.* Supercritical carbon dioxide - based sterilization of decellularized heart valves[J]. JACC: Basic to Translational Science, 2017, 2(1): 71-84. DOI: 10.1016/j.jacbts.2016.08.009.
- [30] 闫伽宁, 胥义. 脱细胞基质生物墨水制备方法及应用进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(11): 4024-4035. DOI: 10.13345/j. ejb. 210091.
- [31] REIS D P, DOMINGUES B, FIDALGO C, *et al.* Bioinks enriched with ECM components obtained by supercritical extraction[J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 394. DOI: 10.3390/biom12030394.
- [32] SALDIN L T, CRAMER M C, VELANKAR S S, *et al.* Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 49: 1-15. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.068.
- [33] ZHANG Ying, ZHANG Chenyu, LI Yuwen, *et al.* Evolution of biomimetic ECM scaffolds from decellularized tissue matrix for tissue engineering: A comprehensive review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 246: 125672. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125672.
- [34] WANG C H, HSIEH D J, PERIASAMY S, *et al.* Regenerative porcine dermal collagen matrix developed by supercritical carbon dioxide extraction technology: Role in accelerated wound healing[J]. Materialia, 2020, 9: 100576. DOI: 10.1016/j.mtla.2019.100576.
- [35] HUANG Y H, TSENG F W, CHANG W H, *et al.* Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 58: 238-243. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.05.060.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407014



微生物-电极修饰及影响电合成 转化 CO₂ 过程的研究进展

解一诺¹, 李逸鑫^{1,2}, 王远鹏¹

(1. 厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005;

2. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 微生物电合成 (microbial electrosynthesis, MES) 是一种利用电活性微生物摄取胞外电子, 将 CO₂ 或有机废料转化为可再生化学品的技术。首先, 文中阐述了电极的改性方式, 碳基材料以其多样的形态、优异的化学稳定性和高比表面积等优点, 在电极改性中发挥着重要作用, 其主要是通过提供更多的微生物附着点和增强电子传递效率改善 MES; 而非碳基材料如金属材料等, 因其优异的导电性和催化活性, 则被广泛用于提升电极性能, 其作用机制在于加速电极上的催化反应和促进特定产品的生成。其次, 从电活性微生物角度入手, 揭示了在电极材料修饰和微生物细胞修饰上的共同点都是能够提高微生物的电子传递能力, 不同点在于微生物细胞修饰可以直接作用于微生物的生理和遗传特性, 以增强其电子传递能力和底物转化效率。此外, 分析了纳米材料与高附加值产品之间的关系, 认为合理选择和制备电极材料及微生物细胞修饰策略, 对于提高 MES 系统的效率和产物选择性至关重要。最后, 对 MES 技术面临的挑战和未来的研究方向进行了展望。

关键词: 微生物电合成 (MES); CO₂ 转化; 电极修饰; 电活性微生物; 胞外电子传递; 纳米材料

中图分类号: Q 939.9; X 701

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0559-16

Advances in Microbial-Electrode Modification and Influence on Process of Electrosynthesis to Convert CO₂

XIE Yinuo¹, LI Yixin^{1,2}, WANG Yuanpeng¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Microbial Electrosynthesis (MES) is a technology that uses electroactive microorganisms to take up extracellular electrons to convert CO₂ or organic wastes into renewable chemicals. In this paper, the electrode modification approach is firstly described, and it is pointed out that carbon-based materials, with their diverse morphology, excellent chemical stability and high specific surface area, play an important role in electrode modification, and their mechanism of action is mainly through providing more microbial attachment points and enhancing the electron transfer efficiency. While non-carbon based materials, such as metallic materials, are widely used to enhance electrode performance due to their excellent electrical conductivity and catalytic activity, and their mechanism of action lies in accelerating the catalytic reaction on the electrode and promoting the generation of specific products. Secondly, from the perspective of electroactive microorganisms, the article reveals that the common point on the modification of electrode materials and microbial cell modification is to enhance the microbial electron transfer ability, and the difference is that the microbial cell modification can di-

收稿日期: 2024-07-15

通信作者: 李逸鑫 (1992-), 讲师, 博士。主要从事微生物胞外电子传递与金属转化、废水/固体废弃物的资源化及环境污染修复的研究。E-mail: liyixin@hqu.edu.cn.

rectly act on the physiological and genetic characteristics of microorganisms in order to enhance the electron transfer ability and the efficiency of substrate conversion. In addition, the article analyses the relationship between nanomaterials and high value-added products, and concludes that the rational selection and design of electrode materials and microbial cell modification strategies are crucial for improving the efficiency and product selectivity of MES systems. Finally, it provides an outlook on the challenges and future research directions of MES technology.

Keywords: microbial electrosynthesis (MES); CO₂ conversion; electrode modification; electroactive microorganisms; extracellular electron transfer; nanomaterials

二氧化碳(CO₂)是导致全球气候变化的主要温室气体之一。为应对大量 CO₂ 排放造成的气候问题,2015年12月,联合国在法国巴黎召开第21届联合国气候变化大会并凝聚共识达成《巴黎协定》,要求缔约方尽快达到温室气体排放的全球峰值,并在本世纪下半叶实现温室气体源净零排放^[1]。然而,2023年,CO₂的排放总量还是增长了1.1%,非但没有迅速下降,反而达到了创纪录的 $3.74 \times 10^{10} \text{ t}^{[2]}$ 。因此,如何有效解决 CO₂ 排放已成为研究热点。

在成熟的 CO₂ 利用技术中,存在着包括反应空间要求高、能耗巨大、催化剂昂贵、产物多为一碳化合物等缺点^[3]。微生物电合成(microbial electrosynthesis, MES)可以利用具有细胞外电子传递(extracellular electron transfer, EET)能力的电活性微生物作为生物催化剂^[4],通过在电极上的直接(direct electron transfer, DET)或间接电子传递(mediated electron transfer, MET)摄取胞外电子,同时将有机的或无机物质转化为能量密度更高的产物^[5]。MES是一个复杂的过程,从细胞内到细胞外有多次氧化还原反应,这一过程的效率受多种因素影响,包括微生物代谢、物质传递、胞外聚合物、界面上的电子传递阻力等^[6]。近年来,为了消除微生物和电极之间的界面效应,提高 MES 的效率,国内外广泛关注了利用纳米材料对参与 MES 的电极、微生物进行修饰,使电子有效地从电极转移到微生物^[7]。

基于此,本文对近几年微生物电合成(MES)的发展进行了总结。首先从电极材料和电活性微生物的修饰两个方面阐述了提高 MES 系统的效率和产物选择性的方法,分析过程作用机制;其次,详细阐述了通过各种纳米修饰策略在 MES 生产 C₁, C₂, C₃, C₄ 等高附加值化学品的进展,解释不同纳米材料修饰对于产物选择性的作用机制;最后,根据目前存在的问题对未来 MES 的研究方向进行了展望。

1 微生物电合成还原 CO₂ 过程中微生物-电极的修饰策略

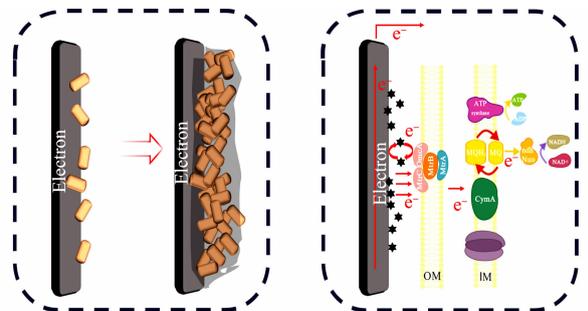
微生物电合成(MES)可以对 CO₂ 进行转化,生产高附加值化学品,如甲烷、乙酸、乙醇、丁酸、丁醇和己酸等^[8]。然而, MES 也有存在一些局限性,主要包括:1) 有机物合成需要大量的电子消耗;2) 需要外部的能量供应来激活生物膜的自养生长;3) 从阴极到微生物较低电子转移速率,减缓了 CO₂ 的还原过程^[9-10]。这些问题的根本在于微生物外膜与阴极之间存在界面,两者之间无法实现快速的电子交互。为了解决这些问题,探索 MES 的可行性,国内外研究人员从电极材料的改造和电活性微生物的修饰两个方面入手。

1.1 电极材料修饰

电极材料的主要修饰方法,如图1所示。

1.1.1 碳基材料 碳基材料由于其多样的形态、优异的化学稳定性和高比表面积等优点,在电极材料应用方面独具优势,受到极大的青睐^[11]。此外,碳基材料出色的生物相容性和导电性也可有效促进电活性细菌的增殖,提高 MES 效率^[12]。

Nevin 等^[13]利用带负电的固态石墨块阴极作为电子供体源,首次证明了阴极材料改性后通过微生物在 MES 中还原 CO₂ 的原理。不同形状和类型



(a) 形成多孔结构
提高生物膜厚度

(b) 提高电子传递效率
和降低界面效应

图1 电极材料的修饰方法

Fig. 1 Summary diagram of modification methods for electrode material

的碳电极,如碳棒碳布、碳毡、活性炭、气体扩散活性炭、颗粒、纤维棒和网状玻璃等,已被普遍用作 MES 系统的阴极。如碳毡(carbon felt,CF)具有高孔隙率、高表面积,以及能进一步表面改性的柔韧性优点,可作为阴极优化乙酸的生产。Bajracharya 等^[14]使用石墨毡和不锈钢组件作为 MES 系统的阴极,在析氢电位下,分别通过混合培养物和 *Clostridium ljungdahlii* 研究 MES 的 CO₂ 还原^[14],如图 2 所示。但碳基电极也存在一些缺点,如其孔隙率较差、生物电化学活性表面积有限、内阻高、还原当量供应不足和高活化电位而无法实现高生产率^[15]。

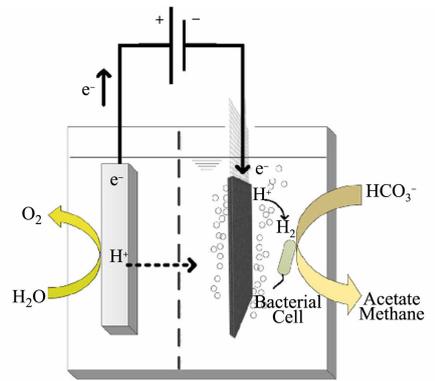


图 2 石墨毡和不锈钢组件用于 MES 阴极的 CO₂ 还原^[14]
Fig. 2 Graphite felt and stainless steel components for CO₂ reduction in MES cathodes^[14]

近年来,一些研究人员提出对碳基材料进行改进,如通过高孔隙率、高表面积与体积比,以及在电极表面诱导电荷和/或官能团来改善生物相容、增加电导率、诱导催化活性,并降低阈值活化能,以促进电极和微生物之间的电子转移。其中用碳基纳米材料改性的阴极获得了较好的结果,其产量和电流密度高出未改性的数倍^[16-17]。例如,Jiang 等^[18]构建了一个配备浆液电极的新型双室 ME-MES 集成系统,通过添加粉末活性炭(activated carbon,AC)对 CF 改性,并评估电解液中粉末活性炭(AC)浓度对化学品生产的影响。结果发现,5 g · L⁻¹ 的 AC 可产生高达 13.4 g · L⁻¹ 的乙酸,与没有 AC 的对照组相比增加了 179%。

在过去的十年中,氧化石墨烯(graphene oxide,GO)在 MES 中得到了深入研究^[19]。GO 不仅可以

促进细菌增殖、细胞粘附及细胞代谢,还具有出色的导电性、高载流子迁移率,以及出色的固有机机械强度、化学稳定性和较大的比表面积。Li 等^[20]将 GO/PEDOT 改性电极应用于将 CO₂ 还原成 CH₄ 的 MES 中,在 CH₄ 的最大生产率为 315.3 mmol · (m² · d)⁻¹,法拉第效率大于 92%,与裸碳布相比提高了 3.9 倍,如图 3 所示。

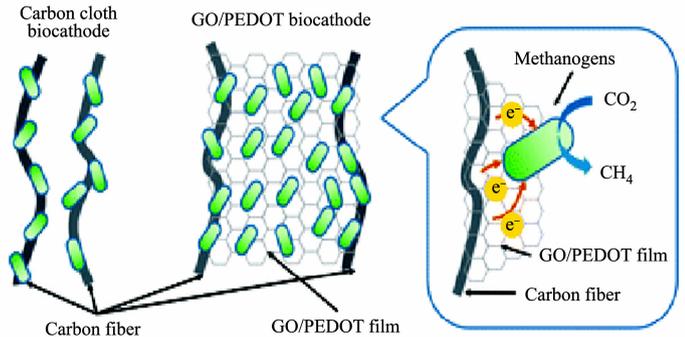


图 3 GO/PEDOT 用于 MES 合成 CH₄^[20]

Fig. 3 GO/PEDOT for MES synthesis of CH₄^[20]

其次,MXenes 作为一类二维(2D)电极材料,由于其优越的性能,包括出色的导电性、离子嵌入行为和亲水性,受到广泛关注^[21]。Khurram 等^[22]将 MXene 结构涂覆在生物炭基板上,结果表明,与未涂层的生物炭相比,该涂层具有改进的导电性,更高的电荷转移效率和选择性微生物富集特性,导致阴极电流产生增加 2.3 倍,如图 4 所示。

Han 等^[23]将一维碳纳米管与二维石墨烯纳米片(GN-CNTs)相结合,描述了一种新的 3D 材料微生物电极。结果表明,3D GN-CNTs 电极在其多孔结构内实现了较强的细菌附着和增殖,其宏观结构和纳米结构的结合可以有效地在阴极表面提供正电荷,提高电流消耗和微生物电化学合成速率,如图 5 所示。

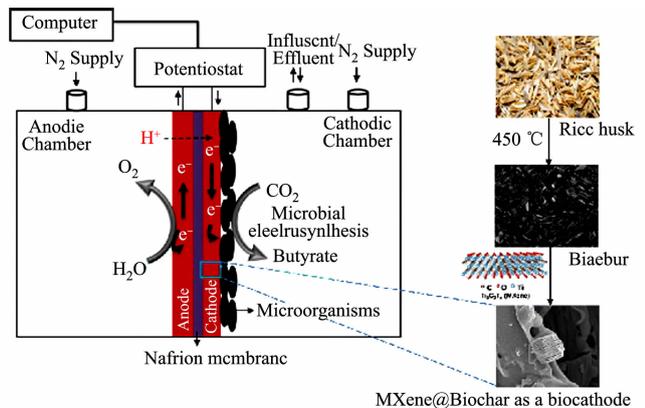


图 4 MXene@生物炭基板电极制备和 MES 操作^[22]

Fig. 4 Schematic diagram of MXene@Biochar electrode preparation and MES operation^[22]

在 MES 中,利用碳基材料对阴极电极改

性能够提高系统的整体性能和效率。改性后的碳质碳基电极能够增强微生物与电极的相互作用,提升电子传递速率,从而促进更多的底物转化为目标产物。此外,碳材料的高比表面积和良好的化学稳定性有助于微生物的附着和生物膜的形成,且碳材料的导电性能有助于提高电极的生物相容性和电子传输

效率,对于实现 MES 系统的高效运行和可再生能源的生产至关重要。

1.1.2 非碳基材料 金属材料以其优异的导电性、稳定性和优异的催化活性,被广泛认为是 MES 中有效的电极修饰材料^[24]。单金属催化剂具有良好的可控性且相对容易制备,使其成为极具吸引力的催化剂和阴极改性材料。Zhu 等^[25]制备铟(In)、锌(Zn)、钛(Ti)和铜(Cu)四种不同金属基的电催化剂箔。通过恒流电化学实验表明,四种金属电极都表现出高并联性,最大乙酸产率出现在 Zn 电极,为 $1.23 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$,如图 6 所示。虽然贵金属,如铱(Ir)、铂(Pt)和钯(Pd)等,已经显示出优异的电催化活性,但也存在高成本和低丰度等缺点^[26]。因此,寻找实际可行的高效非贵金属催化剂至关重要。

与纯金属催化剂相比,合金和复合材料具有性能优越、成本低等优势,近年来日益受到重视^[27]。复合材料的掺入,将非金属材料的大比表面积和亲水性性能与金属材料的高导电性和催化活性相结合,为 MES 阴极的性能提升和应用范围拓宽提供了有效途径^[28-29]。Cui 等^[30]使用 CF 作为微波吸收剂对二茂铁进行微波热解,从而在 CF 电极上生长出氧化铁(III)石墨化碳。这种复合材料呈现出多长尺度的多孔结构,具有高比表面积,优异的导电性和稳定性。乙酸产率超过 $14.9 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$,电子回收率为 $(86 \pm 9) \%$,如图 7 所示。

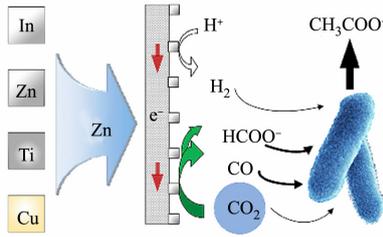


图 6 不同金属基团的电催化生物杂化阴极^[25]

Fig. 6 Electrocatalytic-biological hybrid cathode with different metal groups^[25]

对于某些金属,如 Cu, Ag 等,由于其抗菌性能而在生物电化学系统中受到限制的问题,可以通过复合材料的制备解决。例如,Nabin 等^[31]通过引入具有高生物相容性的还原氧化石墨烯(rGO),提高了生物相容性,促进了细菌在电极表面形成致密且具有电活性的生物膜,同时实现了 $1697.6 \text{ mmol} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$ 的高乙酸产出率,如图 8 所示。

通过调整金属氧化物的元素组成和纳米形态,可以制备出更多的纳米杂化催化剂。Dayakar 等^[32]开发了一种由纳米线与装饰在 GO 上的 MnO_2 结合,以花状形态相互连接而成的阴极,用于 MES 生产乙酸和异丁酸,这增加了 CO_2 吸收能力,降低了电子转移阻力。一些金属氧化物的加入给 MES 阴极带来了更多的功能,如磁铁矿(Fe_3O_4)作为天然的末端电子受体,具有良好的生物相容性和低毒性,有助于改善 EET^[33]。He 等^[34]通过将 Fe_3O_4 NPs 掺入 GO 溶液中,并将磁体包裹在碳布中,使生物复合物与电极之间形成磁性吸引,形成更厚的杂交生物膜。结果表明, CH_4 生成率与碳布生物阴极相比增加了 14.5 倍,如图 9 所示。

总而言之,金属、合金和复合材料通常具有良好的导电性和催化活性。通过三者对阴极材料进行修

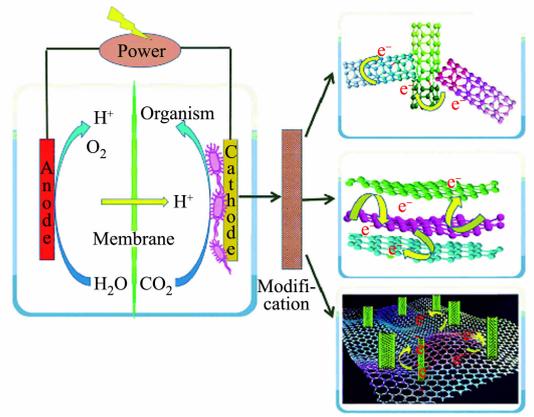


图 5 *Clostridium ljungdahlii* 和电极之间的阴极构型和电子消耗示意图^[23]

Fig. 5 Schematic of cathode configuration and electron-consumption between *Clostridium ljungdahlii* and electrode^[23]

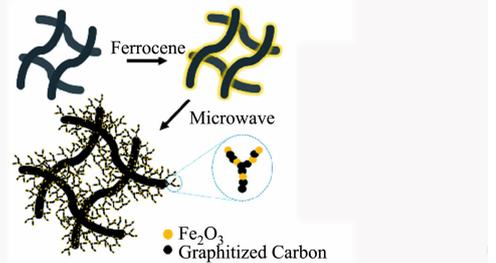


图 7 分层金属氧化物-碳结构的形成示意图^[30]

Fig. 7 Schematic of formation of hierarchical metal oxide-carbon structure^[30]

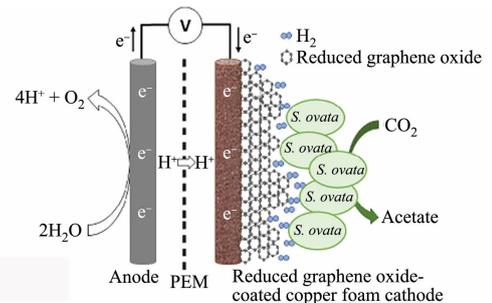


图 8 带有 rGO-CuF 阴极的 MES 反应器^[31]

Fig. 8 MES reactor with rGO-CuF cathode^[31]

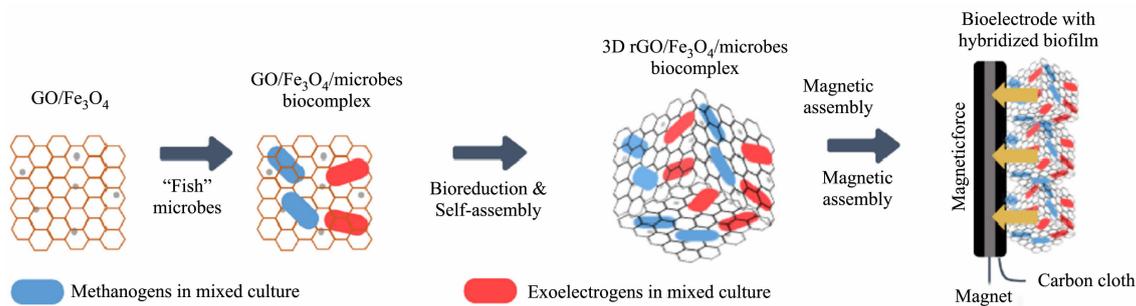


图 9 GO/Fe₃O₄ 生物阴极的制造原理^[34]

Fig. 9 Manufacturing principle of GO/Fe₃O₄ biocathode^[34]

饰,能够更有效地促进 MES 中的阴极反应,如 CO₂ 还原反应(CO₂RR);同时也可以有效提高 MES 的电子传递效率,提升了整个系统在高电流密度下的稳定性和性能,从而推动这一技术在高效能源转换和环境治理中的应用。

1.2 微生物细胞修饰

与对电极材料进行修饰相比,对微生物进行修饰可以直接作用于 MES 中的生物活性中心,提高微生物的内在活性和 EET 效率,减少对外部电子介体的依赖,从而降低系统成本;同时,也可能促进具有特定催化功能的微生物种群的富集,实现更高效和特异的电催化转化^[35-36]。此外,通过合成生物学手段对微生物进行基因层面的改造,可以精确调控其代谢途径,实现对微生物功能的定制化设计,为微生物电合成技术的发展提供了更广阔的应用前景和更高的灵活性^[37]。在 MES 中对微生物进行修饰主要分为三种方法,如图 10 所示。

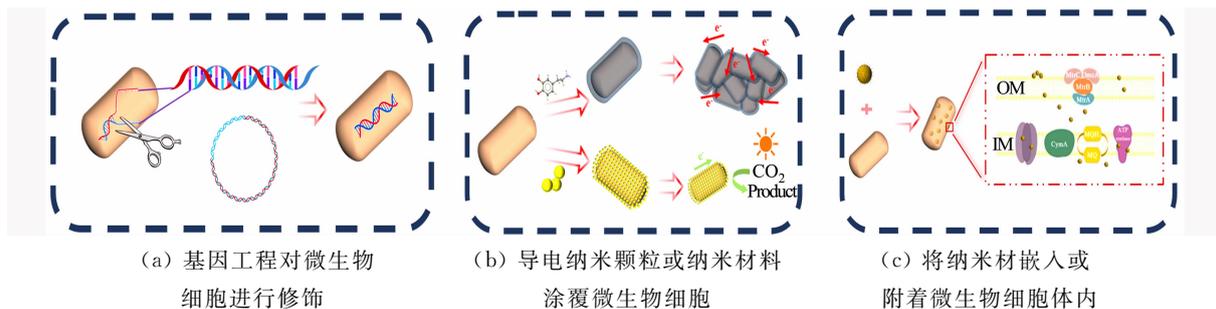


图 10 微生物细胞的修饰方法

Fig. 10 Summary diagram of modification methods for microbial cell

第一种方法是通过基因工程对微生物细胞进行修饰和改造,以提高其胞外电子的传递效率。例如,通过筛选模式产电微生物希瓦氏菌(*S. oneidensis* MR-1)基因组上有利于囊泡分泌的相关基因,然后对基因工程进行改造,可以提高胞外电子传递效率^[38]。Ding 等^[37]基于生物电子生成代谢途径的结构,通过一种模块化工程策略,拓宽胞内电子池的来源,促进胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)再生,促进电子池的电子释放,成功提高了 *S. oneidensis* MR-1 的 EET 效率,如图 11 所示。利用分子生物学及合成生物学手段,可以通过调控细胞电子传递路径、胞内还原力水平和胞内信号分子的表达,从而增强微生物的电子传递能力^[39-40]。

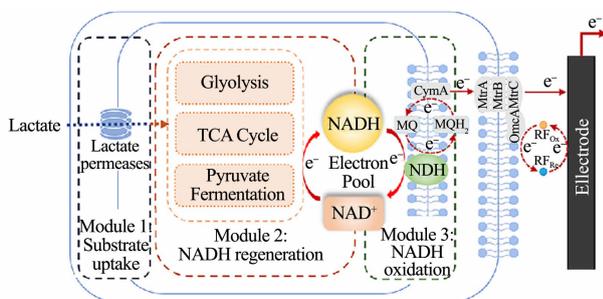


图 11 电子转移链重定向模块化工程改造^[37]

Fig. 11 Modular engineering of electronic transfer chain redirection^[37]

第二种微生物细胞修饰的方法是用导电纳米颗粒、导电纳米材料修饰或涂覆微生物细胞。Jiang 等^[41]通过在 *Shewanella* PV-4 的细胞表面均匀聚集 FeS 纳米颗粒,进而改善了电极的 EET,如图 12 所示。此外,导电聚合物具有可调节的导电性、电化学稳定性,以及优异的亲水性和高生物相容性等优势,更符合 MES 系统中构建阴极的要求^[42]。通过在

微生物细胞表面涂覆一层聚合物可以提高导电性和亲水性,从而使细菌粘附性强,提高 EET 效率和运行稳定性^[36]。Song 等^[43]通过将聚吡咯(polypyrrole, PPy)涂覆在 *S. oneidensis* MR-1, *Ochrobacterium anthropic*, *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* 四种细菌上来改善微生物-电极相互作用,发现 PPy 不仅提高了直接接触 EET 效率,而且提高了细菌活力。在这项研究中,观察到 *S. oneidensis* MR-1 在功率输出方面的 EET 增强了约 14 倍,如图 13 所示。

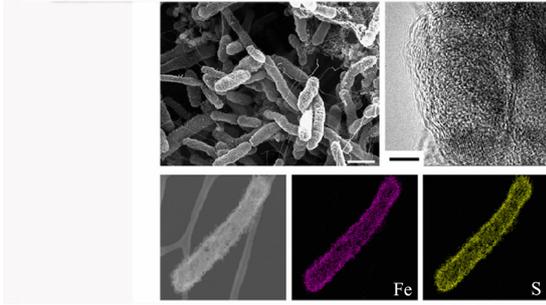


图 12 细胞/FeS 纳米颗粒杂化体的结构和元素分析图^[41]

Fig. 12 Structural and elemental analysis of cell/FeS nanoparticle hybrid structures^[41]

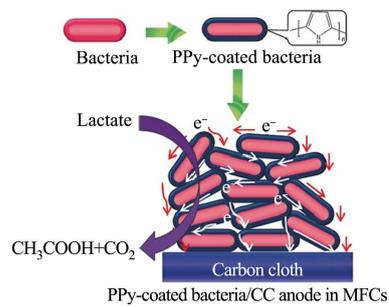


图 13 PPy 涂层 *S. oneidensis* MR-1/CC 阳极的直接接触 EET 机理示意图^[43]

Fig. 13 Schematic depicting direct contact-based EET mechanism of PPy-coated *S. oneidensis* MR-1/CC anode^[43]

第三种微生物修饰方法是通过嵌入或者附着的方式,将纳米材料与微生物的活性位点直接接触,进一步提高其胞外电子转移速率^[44]。例如,He 等^[45]将 CdS 与 *S. ovata* 一起共培养形成复合体并用于光催化(原理与微生物燃料电池类似),成功将 CO₂ 转化为乙酸。结果发现,电子传递相关蛋白(黄素蛋白、铁氧还原蛋白)、甲酸转化途径相关蛋白(FTL)等被激活,说明纳米材料修饰后提高电子传递基因的表达,如图 14 所示。

除此以外,碳点(carbon dots, CDs)作为一种高导电性和低生物毒性的碳基纳米材料,已有研究者将其应用于 MES,增强细菌的跨膜和胞外电子转移速率,提高微生物自身产电能力^[46-48]。Yang 等^[49]进一步分析 CDs 与 *S. oneidensis* MR-1 形成的复合体的代谢过程。结果发现,复合体的 *S. oneidensis* MR-1 的代谢速率会加快,细胞内电荷增加,三磷酸腺苷水平更高,底物消耗更快,细胞外分泌更丰富,因此 CDs 能够促进 *S. oneidensis* MR-1 的能量代谢,如图 15 所示。

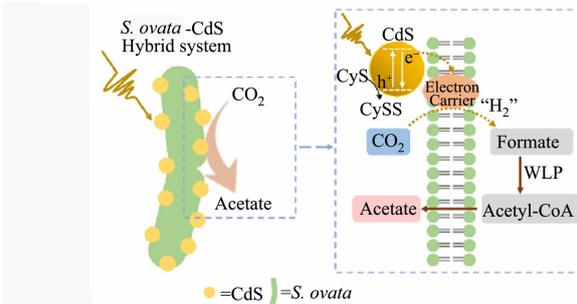


图 14 *S. ovata*-CdS 的形成及光照下 *S. ovata*-CdS 生物杂交系统对 CO₂ 的还原示意图^[45]

Fig. 14 Schematic illustration of formation of *S. ovata*-CdS, and CO₂ reduction by *S. ovata*-CdS biohybrid system under light irradiation^[45]

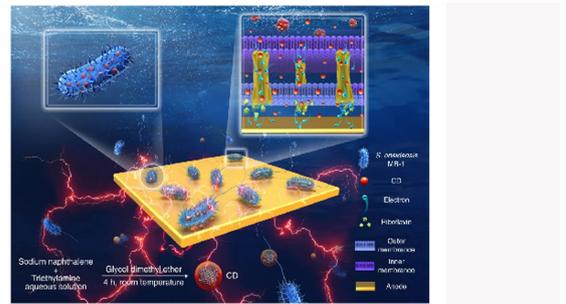


图 15 用于增强生物发电的 CDs 和 CDs 修饰的 *S. oneidensis* MR-1 的合成图^[49]

Fig. 15 Illustration of synthesis of CDs and CDs-fed *S. oneidensis* MR-1 for enhanced bioelectricity generation^[49]

在 MES 中,电极材料修饰主要是通过电极表面修饰碳基材料或者金属提高其电极电导率,以及制造多孔结构提高微生物负载量来加强 EET 效率。细胞修饰主要在细胞外膜至细胞膜上修饰纳米材料,降低阴极和细胞表面电子传递之间的界面影响,甚至影响细胞内部代谢来强化 MES 效率。相较而言,微生物改性的优势在于能够精确调控生物催化剂的内在特性,提高微生物对底物的转化率和选择性,增强其在电极表面的附着能力和生物膜的形成,以及优化微生物的代谢途径以生产特定的高价值化合物,为 MES 的发展提供了更广阔的应用前景和更高的灵活性。

2 MES 还原 CO₂ 生成的高附加值产品

到目前为止, 通过各种纳米修饰策略在 MES 生产高附加值化学品中的潜力已经被广泛探索。这些化学品根据碳链的长度, 可以分为 C₁, C₂, C₃, C₄ 产物等, 它们在能源、化工和材料科学领域具有广泛的应用前景, 如表 1 所示。

表 1 MES 产生的高附加值产品
Tab. 1 High value-added products generated by MES

碳链长	产物	阴极材料	微生物	库仑效率/%	产量	参考文献
C ₁	甲烷	rGO/碳毡	混菌	—	—	[52]
		碳毡复合电极板	厌氧污泥	—	302.51 mL (沼气产量)	[53]
		碳毡	混菌	64.30±4.83	—	[54]
		石墨毡	混菌	—	24.52 mL·(L·d) ⁻¹	[55]
		GO-PEDOT 改性碳布	厌氧污泥	>92	315.3±13.2 mmol·(m ² ·d) ⁻¹	[20]
		镀镍石墨	<i>M. maripaludis</i>	90	—	[56]
		碳刷和碳毡	混菌	—	—	—
		含有可溶性铁的活性炭阳极	<i>M. thermotrophicus</i>	99.4	27.3 L·(m ² ·d) ⁻¹	[58]
		磁铁矿	厌氧污泥	—	(0.37±0.009) L·g ⁻¹	[59]
		C ₁	甲酸	铜板	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	—
活性炭纤维负载的 g-C ₃ N ₄ -NiCoWO ₄	<i>E. coli</i>			81	12.8 mmol·L ⁻¹ d ⁻¹	[61]
碳纳米颗粒	<i>Thermophilic Moorella thermoautotrophica</i>			65	63.2 mmol·(m ² ·d) ⁻¹	[62]
Sn 修饰碳毡	混菌			—	(0.81±0.06) g·L ⁻¹	[63]
—	多酶催化			—	—	[64]
C ₁	甲醇	—	多酶催化	—	—	[65]
		—	混菌	35	0.78 g·(L·h) ⁻¹	[99]
		碳布	<i>Moorella thermoautotrophica</i>	65	58.2 mmol·(m ² ·d) ⁻¹	[62]
		未抛光的石墨棒	<i>S. ovata</i>	—	—	[13]
C ₂	乙酸	石墨棒	<i>S. acidovorans</i> , <i>S. ovata</i>	—	—	[68]
		用粉末活性炭	混菌	—	13.4 g·L ⁻¹	[18]
		3DMWCNTs 涂层网状玻璃碳	产乙酸菌群	—	(685±30) g·(m ² ·d) ⁻¹	[69]
		碳布接枝-COOH	产乙酸菌群	—	(4.29±0.23) mmol·L ⁻¹	[70]
		碳布+Ni, 碳布+Au, 碳布+Pd	混菌	80, 83, 79	0.64, 0.85, 0.66 mmol·(L·d) ⁻¹	[71]
		石墨棒电极掺杂磁铁矿纳米颗粒	厌氧污泥	—	—	[63]
		Fe ₃ O ₄ 修饰的多孔活性炭	混菌	—	0.171 g·(L·d) ⁻¹	[33]
		碳纳米管中空纤维膜	<i>Macellibacteroides</i> , <i>Geobacter</i> , <i>Cloacibacterium</i>	—	7.05 mg·L ⁻¹	[100]
		气体扩散电极	混菌	49	8.46 g m ⁻² d ⁻¹	[101]
		碳毡	<i>Clostridium scatologenes</i> ATCC 25775T	84	0.015 g L ⁻¹	[102]
C ₃	异丙醇	碳毡	产乙酸菌群	34±19	(1.17±0.34) g·(m ² ·d) ⁻¹	[73]
		—	工程大肠杆菌	—	(50.10±0.20) mmol·L ⁻¹	[81]

续表
Continue table

碳链长	产物	阴极材料	微生物	库仑效率/%	产量	参考文献
C ₁	丁酸	碳毡	富集羧基营养混合培养物	32	1.82 mmol · (L · d) ⁻¹	[73]
		石墨颗粒	混菌	—	4.0 mmol · L ⁻¹	[84]
		碳布	富集羧基营养混合培养物	—	7.2 mmol · (L · d) ⁻¹	[85]
		碳毡	混菌	—	(3.3 ± 0.2) g · (L · d) ⁻¹	[86]
		NiFe ₂ O ₄ 负载碳毡	混菌	—	—	[89]
异丁酸	铁氧体铜/rGO 负载碳毡	混菌	—	(11.4 ± 0.57) mmol · L ⁻¹	[90]	
丁醇	装有碳粉的普通石墨板	混菌	84.87	2 g · (L · d) ⁻¹	[91]	
戊酸	碳布	废活性污泥	—	324 mg L ⁻¹	[93]	
>C ₁	己酸	碳毡	混菌	—	(2.0 ± 0.1) g · (L · d) ⁻¹	[86]
		碳毡	预富集乙酰菌	—	(0.37 ± 0.07) g · L ⁻¹	[94]
	辛酸	碳毡	混菌	—	36 mg · L ⁻¹	[95]
	异戊醇	碳毡	代谢工程酿酒酵母	—	2.1 mg · L ⁻¹	[96]

注：“—”代表文献未涉及。

2.1 C₁ 产物

在 MES 实验中, 通过纳米材料修饰可以得到各种 C₁ 化学品, 包括甲烷(CH₄)、甲酸(HCOOH)和甲醇(CH₃OH)。甲烷是生物电化学研究中报道最广泛的产物之一, 同时甲烷也是最简单的有机化合物, 是天然气和沼气的主要成分, 不仅可以用作燃料, 还可以用作生产氢气的原料。在 MES 中, 产甲烷菌能够在外部电源的帮助下, 通过直接种间电子传递(direct interspecies electron transfer, DIET)和间接种间电子传递(mediated interspecies electron transfer, MIET)两个重要的途径生成甲烷^[50], DIET 过程的强化, 可以进一步提升 CH₄ 的产生效率。近年来研究表明, 导电材料可以通过加强 DIET 促进功能微生物富集或者增强电子传递效率, 提高 CH₄ 产生率^[51]。例如, 碳毡^[52-54]、石墨毡^[55]、碳布^[20]、石墨棒^[56]、碳刷^[57]、金属铁^[58]和磁铁矿^[59]等。

甲酸作为一种重要的有机化工原料, 可用于合成多种化学品和材料。在 MES 中, 可以通过代谢工程改造电活性微生物, 优化微生物的代谢途径提高甲酸产量。例如 *S. oneidensis* MR-1, 可以通过表达关键基因, 如 *cctA*, *fdhA1* 和 *nadV*, 将甲酸产率提高到了野生型的 5.59 倍^[60]。此外, 也可以通过纳米材料对电极的改性修饰提高电子传递效率, 实现高效的甲酸生产^[57, 61-62]。如 Qiu 等^[63]制备 Sn 改性碳毡, Sn 的存在有利于阴极生物膜的生长, 增加了微生物的积累。结果表明, Sn-CF 组甲酸产量为 (0.81 ± 0.06) g · L⁻¹, 而在 CF 中几乎没有检测到甲酸的生产。Sn 的存在显著提高了甲酸的生成, 并通过甲酸相关的代谢途径显著增强了电子转移, 从而提高了 CO₂ 在 MES 中的转化。甲醇作为一种多功能的化学中间体, 在制药、农药和燃料等领域有着广泛的应用。对于目前在 MES 中的甲醇生产, 关键在于优化微生物的代谢途径^[64-65]。

2.2 C₂ 产物

用于 MES 的主要 C₂ 生物产品包括乙酸(CH₃COOH)、乙醇(CH₃CH₂OH)、乙烯(C₂H₄)等。乙酸是 MES 过程中的一个关键 C₂ 化学品, 本身作为有价值的化学品同时, 也可以作为进一步产品生成的中间产物及许多工业生物过程(如废水处理厂的脱氮)的碳底物^[66], 具有许多潜在的可行用途。迄今为止, 75% 的 MES 研究报告了乙酸盐的生产^[67]。乙酸是产乙酸菌通过还原乙酰辅酶 A 途径(又称 Wood-Ljungdahl 途径)还原 CO₂ 的产物^[68]。在所有产乙酸微生物中, *S. ovata* 是第一株用于 MES 生产乙酸的菌株, 其乙酸产量较高^[13]。此后, 采用不同的纳米材料对阴极改性用于增强乙酸的生成, 例如碳基、金属基纳米材料等。

Jiang 等^[18]将 MES 与膜电解相结合, 在采用粉末活性炭作为阴极的情况下, 乙酸的产量提高了

179%。这一结果也表明了 MES 与其他系统相结合, 得以提高产量的可能性和可行性。二维结构的碳基材料虽然可以显著提升单位面积电流密度, 但对于单位体积产物的积累作用并不明显。因此开发了许多 3D 碳基电极, 使用三维大孔阴极, 乙酸最高产量为 $(685 \pm 30) \text{ g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$, 远超未改性碳基电极的产量^[69]。此外可以通过化学官能团对碳基材料进行修饰, 改性阴极通过在碳布电极表面接枝特定的官能团—COOH, 可以显著改善乙酸累积浓度^[70]。

除碳基纳米材料外, 金属纳米颗粒(NPs)也可以显著增强乙酸生成。例如, Ni, Au 和 Pd 三种金属纳米颗粒涂覆在碳布上, 与未处理的碳布相比, 加强了乙酸的生产^[71]。此外研究发现, 含有磁铁矿纳米颗粒的生物阴极可以催化微生物产氢, 同时具有更高的氢演化性能。Cruz 等^[72]在石墨棒电极中添加了磁铁矿纳米颗粒, 将乙酸盐产量提高了 8.5 倍。乙烯是一种简单的烯烃, 是石油化工行业中非常重要的基础化学品, 工业上主要用于生产聚乙烯(PE)、聚氯乙烯(PVC)等塑料和合成材料。虽然目前尚未有相关文献报道 MES 中生产乙烯, 但目前已有研究讨论了乙烯的生物合成途径, 例如在植物、藻类或微生物中, 通过使用廉价和可再生的基质直接合成乙烯^[73]。

2.3 C₃ 产物

目前, 通过纳米材料改性促进 C₃ 化学品生产方面的研究并不多, 是一种具有潜力的研究方向。已有研究表明, 通过合成生物学手段优化或外源引入电子传递元件的生物合成路径, 能够直接调控细胞电子传递路径, 提高产电微生物的胞外电子传递效率, 并得到较好的产量。在 MES 中可生成的 C₃ 化学品, 包括但不限于丙酮酸(CH₃COCOOH)、丙酸(CH₃CH₂COOH)、异丙醇((CH₃)₂CHOH)和乳酸(CH₃CH(OH)COOH)。其中丙酮酸广泛应用于食品、化妆品、制药、农业和化工等行业, 丙酮酸在糖酵解途径中起关键作用, 其衍生化学物质主要含有乙酸、丙酸、丙烯酸、3-羟基丙酸、乳酸和聚乳酸^[74]。

近年来, 包括大肠杆菌^[75]、酿酒酵母^[76]、光滑念珠菌^[77]等菌株已成功设计用于生产丙酮酸^[74], 基于原有 CO₂ 固定反应的新型代谢途径改造, 也非常具有科学研究和实用价值。Bouzon 等^[78-79]向高丝氨酸代谢途径引入了外源的转氨酶和醛缩酶, 使之可以裂解成丙酮酸和甲醛, 实现 CO₂ 固定的一种新的一碳代谢循环。

在 MES 中以 CO₂ 为底物可生产的 C₃ 化学品的相关报道并不多, 目前已经有关于异丙醇、乳酸的相关报道。异丙醇是一种无色、易挥发的液体, 具有类似乙醇的气味, 常用作溶剂、消毒剂以及化学合成的原料。Arends 等^[73]首次报道异丙醇的生产, 产量可以达到 $1.17 \text{ g} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$, 同时异丙醇地稳定生产, 为在 MES 中生产仲醇提供了可能性。乳酸作为一种重要的有机酸, 在工业和日常生活中有着广泛的应用。它是另一种可以通过 MES 生成的 C₃ 有机化合物, 由 CO₂ 通过三羧酸循环还原的中间产物生成^[80]。研究人员通过改造大肠杆菌的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)合成途径, 提高了胞内 FAD 的水平, 从而增加了大肠杆菌的电活性, 把高电活性大肠杆菌运用到 MES, 发现有利于乳酸、乙醇等还原性产物的生成^[81]。

2.4 C₄ 及以上产物

迄今为止, 乙酸一直是通过生物电化学系统转化 CO₂ 的大部分产物。然而, 由于市场价格低廉, 从经济角度来看, 乙酸的生产并不是很有吸引力。鉴于此, 研究人员逐渐尝试通过微生物催化短链脂肪酸伸长为中链脂肪酸^[82]。目前, MES 在生产 C₄ 化合物方面已经取得了一些进展。根据已有的研究报道, 可以生产丁酸(CH₃(CH₂)₂COOH)、异丁酸((CH₃)₂CHCOOH)、丁烷(CH₃(CH₂)₂CH₃)和丁醇(CH₃(CH₂)₃OH)等。丁酸是一种工业原料, 在制药和化学工业中具有许多应用, 可以通过酯化进一步转化为燃料。Sharma 等^[83]通过 -0.65 V 的直接电子转移, 将乙酸和丁酸生物催化还原为生物醇和中链脂肪酸, 生产的产品包括 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醇, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇, $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙醇, $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁醇和 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酮, 以及较低量的丙酸和己酸。Ganigue 等^[82]首次实现以 CO₂ 为唯一的碳源, 通过 MES 生产丁酸, 证明 CO₂ 还原为丁酸是由氢驱动的。此后大量研究证明, 通过 MES 生产丁酸是可行的^[84-86]。

通过研究发现, 脂肪链的延伸与相关微生物的生长呈正相关, 微生物生长条件也会影响微生物富集和最终产品^[87]。因此, 需要对阴极进行改性, 以改善电极-微生物的电子传递, 从而提高 MES 的生产率和选择性。近年来, CoP, MoS₂ 和镍钼合金改性阴极被用于选择性生产 C₂ 和 C₄ 化合物^[88]。Khurram

等^[89]用廉价的镍铁氧体($\text{NiFe}_2\text{O}_4@CF$)提高导电性、电荷转移效率,以及与选择性微生物富集的微生物-电极相互作用等优点,实现丁酸盐产量高于碳毡 1.2 倍。异丁酸是丁酸的异构体,Dayakar 等^[90]在石墨毡上引入创新的电极材料,铁氧体铜负载 GO,实现了异丁酸的生产率。丁烷、丁醇广泛用于化学生产,时常作为次要产品伴随乙酸、乙醇、丁酸等的生成^[91]。

C_4 以上的中链脂肪酸在各个行业都有广泛的应用,但传统的生产方法成本高昂且不可持续。MES 为链伸长提供了一个更具可扩展性、经济性和环保性的平台。该过程利用了 Wood-Ljungdahl 途径,这是乙酰细菌采用的代谢途径。其中 CO_2 转化为乙酰辅酶 A,然后,乙酰辅酶 A 可以转化为乙酸。作为合成长链脂肪酸的中间体,它可以合成高达 C_4 的产品^[92]。如戊酸($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$)^[93]、己酸($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$)^[86,94]、辛酸($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$)^[95],以及异戊醇($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)^[96]。这些中链脂肪酸中的大多数不是直接由 CO_2 还原得到,而是来自一些简单的 CO_2 衍生产物^[83,94-95],如 Wang 等^[95]在 MES 中以乙酸为碳源,无需添加外部介质即可产生包括己酸、丁酸和较小部分的辛酸的中链脂肪酸。Mohita 等^[83]开发硫酸盐还原菌(SRB)的生物阴极可通过直接电子传递将乙酸和丁酸还原成醇类、丙酮和己酸。除了微生物链伸长外,通过工程技术编辑特定的代谢途径在生成长链产物形成中发挥着重要作用,这是 MES 中的一个新兴研究领域。

2.5 C_n 化学品生成和微生物-电极修饰的未来发展趋势

通过深入总结现有文献和研究进展,可以发现尽管纳米材料在 MES 中的应用展现出巨大潜力,尤其是在提高电子传递效率和增强微生物代谢活性方面。但目前直接利用纳米材料改性修饰微生物电合成系统以生产特定化合物,尤其是高附加值的 C_3 和 C_4 产物,如丙酸、丁酸等的研究报道并不多。关于这类产物的合成,现阶段研究人员通常需要通过合成生物学手段对微生物进行基因改造,包括增强关键代谢酶的活性、引入新的代谢途径,或者通过基因编辑技术敲除或抑制某些基因的表达,从而改变微生物的代谢流向,增加目标产物选择性。

然而,已有研究发现纳米材料不仅可以充当电子穿梭体、改善电极或微生物的导电性提高 EET 的效率,纳米材料还能影响 EET 中功能基因的表达水平。Jia 等^[97]首次研究了纳米粒子(NPs)在有氧反硝化过程中介导的胞内/胞外电子传递(IET/EET)的机制。实验证明,纳米粒子可以通过提高 Fe-S 中心活性以及促进细胞色素的形成,加速电子传递。Jing 等^[98]在全细胞水平上阐明了 OmcA 和 MtrC 在 *S. oneidensis* MR-1 与石墨烯上,通过不同作用促进界面反应。此外,研究还表明,石墨烯复合材料可提高 EET 相关基因的表达水平。Yang 等^[49]研究发现碳点(CDs)可以被 *S. oneidensis* MR-1 有效吸收,增加细胞内电荷和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平、底物消耗,以及跨膜和细胞外电子转移能力,从而加速细菌代谢,促进生物产电。

此外在 MES 中,中链脂肪酸常作为短链脂肪酸的副产物出现。但纳米材料的选择与产物碳链的长短有着密切的关系。特定的纳米材料由于其独特的物理化学特性,能够针对性地影响微生物的代谢途径和电子传递效率,从而促进特定长度碳链化合物的合成。在金属和金属氧化物纳米材料中,如铁氧化物(Fe_3O_4)纳米粒子可能因其催化特性而更倾向于促进长链脂肪酸的生成^[34]。纳米材料的特定形貌和尺寸可以影响微生物的代谢途径,从而影响碳链产物的合成。例如,纳米线和纳米花状结构的 MnO_2 可以促进 CO_2 还原为乙酸和异丁酸^[32]。这些研究表明,纳米材料的引入为微生物电合成过程中的基因表达调控,以及实现对目标碳链长度产物的合成提供了新的策略。通过合成生物学手段对微生物进行基因改造,结合纳米材料的独特物理化学特性,可以更精确地调节微生物的代谢途径,实现对目标碳链长度产物的合成,优化目标化合物的生产效率。这种策略不仅有助于提高 MES 系统的生产力,还为开发新的生物制造过程和环境修复技术提供了新的思路。

未来的研究需要进一步探索纳米材料与微生物相互作用的分子机制,优化纳米材料的生物相容性和功能性,并通过合成生物学进一步改造微生物,以实现更高效、更经济、更绿色的 MES 过程。

3 总结与展望

文中首先对近几年 MES 发展进行了总结,从电极材料和电活性微生物的修饰两个方面阐述了提

高 MES 系统的效率和产物选择性的方法, 并分析过程作用机制。其次, 详细阐述了通过各种纳米修饰策略在 MES 生产 C₁, C₂, C₃ 和 C₄ 等高附加值化学品的进展, 解释了不同纳米材料修饰对于产物选择性的作用机制。

随着 MES 不断地发展和创新, 其已成为应对气候变化、加强清洁能源生产, 以及推进生物技术和环境科学应用不可或缺的解决方案。然而, 目前在微生物培养物、电极材料和生物产品的多样化等方面仍有很大的上升空间, 在提高产品产量和将 CO₂ 转化为高价值产品的商业可行性方面也存在难题; 其次, 在生产中链脂脂肪酸方面仍存在一定的局限, 在提高产品选择性, 以及寻找决定链伸长途径的关键因素上还需要进一步探索。随着新技术和新理念的发展, 应用于 CO₂ 捕获和转化的 MES 应该变得更加完善和灵活。

因此, 后续研究可以主要集中在以下几个方面。

1) 开发新型纳米材料, 不仅可以提高电子传递效率、增强微生物与电极的附着力, 还可以提高 EET 中功能基因的表达水平。

2) 深入研究微生物与电极材料之间的相互作用机制, 以实现更高效的电子传递和更稳定的微生物电极界面。

3) 通过合成生物学手段, 对微生物进行基因层面的改造, 以增强其电子传递能力和代谢途径的调控, 从而提高 MES 系统的整体性能。

4) 探索出决定增长碳链途径的关键因素, 寻找更高效的生长碳链菌株的调控方法。

5) 随着 MES 技术的成熟, 未来的工作也需考虑开发适合工业化应用的放大策略, 包括生物反应器设计、过程控制等方面。

参考文献:

- [1] 董聪, 董秀成, 蒋庆哲, 等. 《巴黎协定》背景下中国碳排放情景预测: 基于 BP 神经网络模型 [J]. 生态经济, 2018, 34(2): 18-23.
- [2] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. CO₂ emissions in 2023 [R/OL]. (2024-03-01) [2024-07-15]. <https://www.iea.org/reports/co2-emissions-in-2023>.
- [3] 蔡韬, 刘玉万, 朱蕾蕾, 等. 二氧化碳人工生物转化 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4101-4114. DOI: 10.13345/j.cjb.220889.
- [4] CHOI O, SANG B I. Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 1-14. DOI: 10.1186/s13068-016-0426-0.
- [5] GAJDA I, YOU J, MENDIS B A, *et al.* Electrosynthesis, modulation, and self-driven electroseparation in microbial fuel cells [J]. iScience, 2021, 24(8): 102805. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102805.
- [6] WANG Ruiwen, LI Huidong, SUN Jinzhi, *et al.* Nanomaterials facilitating microbial extracellular electron transfer at interfaces [J]. Advanced Materials, 2021, 33(6): 2004051(1-19). DOI: 10.1002/adma.202004051.
- [7] 苏紫荆, 刘远峰, 孙亚昕, 等. 促进微生物胞外电子转移的纳米材料研究进展 [J]. 精细化工, 2023, 40(4): 791-801. DOI: 10.13550/j.jxhg.20220599.
- [8] BIAN Bin, BAJRACHARYA S, XU Jiajie, *et al.* Microbial electrosynthesis from CO₂: Challenges, opportunities and perspectives in the context of circular bioeconomy [J]. Bioresource Technology, 2020, 302: 122863(1-12). DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122863.
- [9] CHRISTODOULOU X, OKOROAFOR T, PARRY S, *et al.* The use of carbon dioxide in microbial electrosynthesis: Advancements, sustainability and economic feasibility [J]. Journal of CO₂ Utilization, 2017, 18: 390-399. DOI: 10.1016/j.jcou.2017.01.027.
- [10] MARSHALL C W, ROSS D E, FICHOT E B, *et al.* Electrosynthesis of commodity chemicals by an autotrophic microbial community [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8412-8420. DOI: 10.1128/AEM.02401-12.
- [11] LEKSHMI G S, BAZAKA K, RAMAKRISHNA S, *et al.* Microbial electrosynthesis: Carbonaceous electrode materials for CO₂ conversion [J]. Materials Horizons, 2023, 10(2): 292-312. DOI: 10.1039/D2MH01178F.
- [12] HUI Su, JIANG Yujing, JIANG Yuanfan, *et al.* Cathode materials in microbial electrosynthesis systems for carbon

- dioxide reduction: Recent progress and perspectives[J]. *Energy Materials*, 2023, 3(6): 300055(1-31). DOI: 10.20517/energymater.2023.60.
- [13] NEVIN K P, WOODARD T L, FRANKS A E, *et al.* Microbial electrosynthesis: Feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds[J]. *mBio*, 2010, 1(2): e00103(1-10). DOI: 10.1128/mBio.00103-10.
- [14] BAJRACHARYA S, TER HEIJNE A, BENETTON X D, *et al.* Carbon dioxide reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel as a cathode[J]. *Biore-source Technology*, 2015, 195: 14-24. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.05.081.
- [15] ARYAL N, AMMAM F, PATIL S A, *et al.* An overview of cathode materials for microbial electrosynthesis of chemicals from carbon dioxide[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(24): 5748-5760. DOI: 10.1039/c7gc01801k.
- [16] GUO Kun, CHEN Xin, FREGUIA S, *et al.* Spontaneous modification of carbon surface with neutral red from its diazonium salts for bioelectrochemical systems[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 47: 184-189. DOI: 10.1016/j.bios.2013.02.051.
- [17] POPOV A L, KIM J R, DINSDALE R M, *et al.* The effect of physico-chemically immobilized methylene blue and neutral red on the anode of microbial fuel cell[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(2): 361-70. DOI: 10.1007/s12257-011-0493-9.
- [18] JIANG Yong, LIANG Qinjun, CHU Na, *et al.* A slurry electrode integrated with membrane electrolysis for high-performance acetate production in microbial electrosynthesis[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 741: 140198(1-9). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140198.
- [19] AMEEN F, ALSHEHRI W A, NADHARI S A. Effect of electroactive biofilm formation on acetic acid production in anaerobic sludge driven microbial electrosynthesis[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(1): 311-318. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b05420.
- [20] LI Qing, FU Qian, KOBAYASHI H, *et al.* GO/PEDOT modified biocathodes promoting CO₂ reduction to CH₄ in microbial electrosynthesis[J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2020, 4(6): 2987-2997. DOI: 10.1039/d0se00321b.
- [21] HART J L, HANTANASIRISAKUL K, LANG A C, *et al.* Control of MXenes' electronic properties through termination and intercalation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 522. DOI: 10.1038/s41467-018-08169-8.
- [22] TAHIR K, MIRAN W, JANG J, *et al.* MXene-coated biochar as potential biocathode for improved microbial electrosynthesis system[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 773: 145677. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145677.
- [23] HAN Shuo, LIU Hong, ZHOU C, *et al.* Growth of carbon nanotubes on graphene as 3D biocathode for NAD⁺/NADH balance model and high-rate production in microbial electrochemical synthesis from CO₂[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, 7(3): 1115-1123. DOI: 10.1039/c8ta10465d.
- [24] ZHAO Cuie, GAI Panpan, SONG Rongbin, *et al.* Nanostructured material-based biofuel cells: recent advances and future prospects[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(5): 1545-1564. DOI: 10.1039/c6cs00044d.
- [25] JIANG Yong, CHU Na, ZHANG Wei, *et al.* Zinc: A promising material for electrocatalyst-assisted microbial electrosynthesis of carboxylic acids from carbon dioxide[J]. *Water Research*, 2019, 159: 87-94. DOI: 10.1016/j.watres.2019.04.053.
- [26] ZHU Yansong, ZHANG Bingsen. Nanocarbon-based metal-free and non-precious metal bifunctional electrocatalysts for oxygen reduction and oxygen evolution reactions[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2021, 58(7): 610-628. DOI: 10.1016/j.jechem.2020.10.034.
- [27] YANG Yi, NIU Shuwen, HAN Dongdong, *et al.* Progress in developing metal oxide nanomaterials for photoelectrochemical water splitting[J]. *Advanced Energy Materials*, 2017, 7(19): 1700555(1-26). DOI: 10.1002/aenm.201700555.
- [28] RAMKUMAR R, MINAKSHI M. Fabrication of ultrathin CoMoO₄ nanosheets modified with chitosan and their improved performance in energy storage device[J]. *Dalton Transactions*, 2015, 44(13): 6158-6168. DOI: 10.1039/c5dt00622h.
- [29] HINDATU Y, ANNUAR M S M, GUMEL A M. Mini-review: Anode modification for improved performance of microbial fuel cell[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 73(C): 236-248. DOI: 10.1016/j.rser.2017.01.138.

- [30] CUI Mengmeng, NIE Huarong, ZHANG Tian, *et al.* Three-dimensional hierarchical metal oxide-carbon electrode materials for highly efficient microbial electrosynthesis[J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2017, 1(5): 1171-1176. DOI:10.1039/c7se00073a.
- [31] ARYAL N, WAN L, OVERGAARD M H, *et al.* Increased carbon dioxide reduction to acetate in a microbial electrosynthesis reactor with a reduced graphene oxide-coated copper foam composite cathode[J]. *Bioelectrochemistry*, 2019, 128: 83-93. DOI:10.1016/j.bioelechem.2019.03.011.
- [32] THATIKAYALA D, PANT D, MIN B. MnO₂/reduced graphene oxide nanohybrids as a cathode catalyst for the microbial reduction of CO₂ to acetate and isobutyric acid[J]. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 2021, 45: 101114(1-9). DOI:10.1016/j.seta.2021.101114.
- [33] ZHU Hao, DONG Zhiwei, HUANG Qiong, *et al.* Fe₃O₄/granular activated carbon as an efficient three-dimensional electrode to enhance the microbial electrosynthesis of acetate from CO₂ [J]. *RSC Advances*, 2019, 9(59): 34095-34101. DOI:10.1039/C9RA06255F.
- [34] HE Yuting, LI Qing, LI Jun, *et al.* Magnetic assembling GO/Fe₃O₄/microbes as hybridized biofilms for enhanced methane production in microbial electrosynthesis [J]. *Renewable Energy*, 2022, 185: 862-870. DOI: 10.1016/j.renene.2021.12.117.
- [35] WU Xiaoshuai, QIAO Yan, SHI Zhuanzhuan, *et al.* Hierarchically porous N-doped carbon nanotubes/reduced graphene oxide composite for promoting flavin-based interfacial electron transfer in microbial fuel cells[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(14): 11671-11677. DOI:10.1021/acsami.7b19826.
- [36] JIANG Yujing, HUI Su, JIANG Liping, *et al.* Functional nanomaterial-modified anodes in microbial fuel cells: Advances and perspectives[J]. *Chemistry*, 2023, 29(1): e202202002. DOI:10.1002/chem.202202002.
- [37] DING Qinran, LIU Qijing, ZHANG Yan, *et al.* Modular engineering strategy to redirect electron flux into the electron-transfer chain for enhancing extracellular electron transfer in *Shewanella oneidensis* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(2): 471-481. DOI:10.1021/acssynbio.2c00408.
- [38] 宋浩, 卢昱君, 蔚欢, 等. 一种工程改造希瓦氏菌囊泡提高胞外电子传递的方法: 116004690A[P]. 2023-04-25.
- [39] 邵映芝, 车鉴, 程驰, 等. 分子生物学方法提高电活性微生物胞外电子传递效率的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(6): 50-59. DOI:10.13523/j.cb.2102020.
- [40] 刘向, 张君奇, 张保财, 等. 强化产电微生物与电极间电子传递速率的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 361-377. DOI:10.13345/j.cjb.200281.
- [41] JIANG Xiaocheng, HU Jinsong, LIEBER A M, *et al.* Nanoparticle facilitated extracellular electron transfer in microbial fuel cells[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(11): 6737-6742. DOI:10.1021/nl503668q.
- [42] ANTOLINI E. Composite materials for polymer electrolyte membrane microbial fuel cells[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 69: 54-70. DOI:10.1016/j.bios.2015.02.013.
- [43] SONG Rongbin, WU Yichao, LIN Zongqiong, *et al.* Living and conducting: Coating individual bacterial cells with *in situ* formed polypyrrole[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(35): 10516-10520. DOI:10.1002/anie.201704729.
- [44] CHIRANJEEVI P, PATIL S A. Strategies for improving the electroactivity and specific metabolic functionality of microorganisms for various microbial electrochemical technologies[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107468(1-16). DOI:10.1016/j.biotechadv.2019.107468.
- [45] HE Ying, WANG Shurong, HAN Xinyue, *et al.* Photosynthesis of acetate by *sporangium ovata*-CdS biohybrid system[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(20): 23364-23374. DOI:10.1021/acsami.2c01918.
- [46] YANG Wanning, ZHANG Hong, LAI Junxin, *et al.* Carbon dots with red-shifted photoluminescence by fluorine doping for optical bio-imaging[J]. *Carbon*, 2018, 128: 78-85. DOI:10.1016/j.carbon.2017.11.069.
- [47] RAN Zhiyong, YANG Hongxing, LI Zhi, *et al.* Pillar[6]arene@ AuNPs Functionalized N-CQDs@ Co₃O₄ hybrid composite for ultrasensitive electrochemical detection of human epididymis protein[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(27): 10161-10172. DOI:10.1021/acssuschemeng.0c02238.
- [48] ZHANG Siyu, ZHAO Xinpeng, GUO Xinqi, *et al.* Boosting the electricity generation of nonclassical electroactive microorganisms enabled by carbon dots[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 462: 142147. DOI:10.1016/j.cej.2023.142147.
- [49] YANG Chenhui, ASLAN H, ZHANG Peng, *et al.* Carbon dots-fed *Shewanella oneidensis* MR-1 for bioelectricity enhancement[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1379-1379. DOI:10.1038/s41467-020-14866-0.

- [50] 李静,张宝刚,刘青松,等. 导电材料强化微生物直接种间电子传递产甲烷的研究进展[J]. 微生物学报,2021,61(6):1507-1524. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20210176.
- [51] GAHLOT P, AHMED B, TIWARI S B, *et al.* Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: Mechanism and application[J]. Environmental Technology & Innovation,2020,20:101056. DOI:10.1016/j.eti.2020.101056.
- [52] CARRILLO-PEN˜A D, MATEOS R, MOR˜AN A, *et al.* Reduced graphene oxide improves the performance of a methanogenic biocathode[J]. Fuel,2022,321:123957(1-8). DOI:10.1016/j.fuel.2022.123957.
- [53] WU Qi, XIAO Han, ZHU Hongguang, *et al.* Carbon felt composite electrode plates promote methanogenesis through microbial electrolytic cells[J]. Energies,2023,16(11):4416. DOI:10.3390/en16114416
- [54] YANG Houyun, WANG Yixuan, HE Chuanshu, *et al.* Redox mediator-modified biocathode enables highly efficient microbial electro-synthesis of methane from carbon dioxide[J]. Applied Energy, 2020, 274 (15): 115292(1-11). DOI:10.1016/j.apenergy.2020.115292.
- [55] QI Xuejiao, JIA Xuan, WANG Yong, *et al.* Development of a rapid startup method of direct electron transfer-dominant methanogenic microbial electrosynthesis[J]. Bioresource Technology,2022,358:127385(1-10). DOI:10.1016/j.biortech.2022.127385.
- [56] DEUTZMANN J S, KRACKE F, SPORMANN A M. Microbial electromethanogenesis powered by curtailed renewable electricity[J]. Cell Reports Physical Science,2023,4(8):101515. DOI:10.1016/j.xcrp.2023.101515.
- [57] DE LA PUENTE C, CARRILLO-PEN˜A D, PELAZ G, *et al.* Microbial electrosynthesis for CO₂ conversion and methane production: Influence of electrode geometry on biofilm development[J]. Greenhouse Gases: Science and Technology,2023,13(2):173-185. DOI:10.1002/ghg.2185.
- [58] ROHBOHM N, SUN Tianran, BLASCO-GÓMEZ R, *et al.* Carbon oxidation with sacrificial anodes to inhibit O₂ evolution in membrane-less bioelectrochemical systems for microbial electrosynthesis[J]. EES Catalysis,2023,1(6):972-986. DOI:10.1039/D3EY00141E.
- [59] VU M T, NOORI M T, MIN B. Conductive magnetite nanoparticles trigger syntrophic methane production in single chamber microbial electrochemical systems[J]. Bioresource Technology,2020,296:122265(1-9). DOI:10.1016/j.biortech.2019.122265.
- [60] LI Yixin, LUO Qingliu, SU Jiaying, *et al.* Metabolic regulation of *Shewanella oneidensis* for microbial electrosynthesis: From extracellular to intracellular[J]. Metabolic Engineering,2023,80:1-11. DOI:10.1016/j.ymben.2023.08.004.
- [61] GUPTA P, VERMA N. Conversion of CO₂ to formate using activated carbon fiber-supported g-C₃N₄-NiCoWO₄ photoanode in a microbial electrosynthesis system[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 446: 137029(1-14). DOI:10.1016/j.cej.2022.137029.
- [62] YU Linpeng, YUAN Yong, TANG Jiahuan, *et al.* Thermophilic *Moorella thermoautotrophica*-immobilized cathode enhanced microbial electrosynthesis of acetate and formate from CO₂ [J]. Bioelectrochemistry, 2017, 117: 23-28. DOI:10.1016/j.bioelechem.2017.05.001.
- [63] QIU Z, ZHANG K, LI X L, *et al.* Sn promotes formate production to enhance microbial electrosynthesis of acetate *via* indirect electron transport[J]. Biochemical Engineering Journal,2023,192:108842. DOI:10.1016/j.bej.2023.108842.
- [64] LUO Jianquan, MEYER A S, MATEIU R V, *et al.* Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO₂ to methanol[J]. New Biotechnology,2015,32(3):319-327. DOI:10.1016/j.nbt.2015.02.006.
- [65] ZHANG Zhibo, WANG Hui, NIE Yi, *et al.* Natural deep eutectic solvents enhanced electro-enzymatic conversion of CO₂ to methanol[J]. Frontiers in Chemistry,2022,10:894106. DOI:10.3389/fchem.2022.894106.
- [66] JOURDIN L, FREGUIA S, FLEXER V, *et al.* Bringing high-rate, CO₂-based microbial electrosynthesis closer to practical implementation through improved electrode design and operating conditions[J]. Environmental Science & Technology,2016,50(4):1982-1989. DOI:10.1021/acs.est.5b04431.
- [67] JOURDIN L, BURDYNY T. Microbial electrosynthesis: Where do we go from here? [J]. Trends in Biotechnology,2021,39(4):359-69. DOI:10.1016/j.tibtech.2020.10.014.
- [68] ARYAL N, TREMBLAY P L, LIZAK D M, *et al.* Performance of different *Sporomusa* species for the microbial

- electrosynthesis of acetate from carbon dioxide[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 233: 184-190. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.128.
- [69] JOURDIN L, GRIEGER T, MONETTI J, *et al.* High acetic acid production rate obtained by microbial electrosynthesis from carbon dioxide[J]. 2015, 49(22): 13566-13574. DOI: 10.1021/acs.est.5b03821.
- [70] 祁家欣, 曾翠平, 骆海萍, 等. 羧基改性阴极对微生物电合成系统产乙酸性能的影响机制[J]. *环境科学*, 2019, 40(05): 2302-2309. DOI: 10.13227/j.hjxk.201808250.
- [71] ZHANG Tian, NIE Huarong, BAIN T S, *et al.* Improved cathode materials for microbial electrosynthesis[J]. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6(1): 217-224. DOI: 10.1039/C2EE23350A.
- [72] VIGGI C C, COLANTONI S, FALZETTI F, *et al.* Conductive magnetite nanoparticles enhance the microbial electrosynthesis of acetate from CO₂ while diverting electrons away from methanogenesis[J]. *Fuel Cells*, 2020, 20(1): 98-106. DOI: 10.1002/face.201900152.
- [73] 孙芝兰, 陈以峰. 乙烯的直接生物合成[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(10): 1431-1440. DOI: 10.13345/j.cjb.2013.10.008.
- [74] LI Yang, YANG Shujie, MA Danlei, *et al.* Microbial engineering for the production of C₂-C₆ organic acids[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(8): 1518-1546. DOI: 10.1039/d0np00062k.
- [75] ZHU Yihui, EITEMAN M A, ALTMAN R, *et al.* High glycolytic flux improves pyruvate production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21): 6649-6655. DOI: 10.1128/AEM.01610-08.
- [76] WANG Zhikun, GAO Cuijuan, WANG Qian, *et al.* Production of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive evolution and rational cofactor metabolic engineering[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 67: 126-131. DOI: 10.1016/j.bej.2012.06.006.
- [77] LUO Zhengshan, LIU Song, DU Guocheng, *et al.* Enhanced pyruvate production in *Candida glabrata* by carrier engineering[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(2): 473-482. DOI: 10.1002/bit.26477.
- [78] BOUZON M, PERRET A, LOREAU O, *et al.* A synthetic alternative to canonical one-carbon metabolism[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(8): 1520-1533. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00029.
- [79] 任杰, 曾安平. 基于二氧化碳的生物制造: 从基础研究到工业应用的挑战[J]. *合成生物学*, 2021, 2(06): 854-862. DOI: 10.12211/2096-8280.2021-086.
- [80] MOHAN V S, MODESTRA J A, AMULYA K, *et al.* A circular bioeconomy with biobased products from CO₂ sequestration[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016, 34(6): 506-519. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.02.012.
- [81] WU Zaiqiang, WANG Junsong, ZHANG Xueli, *et al.* Engineering an electroactive *Escherichia coli* for the microbial electrosynthesis of succinate by increasing the intracellular FAD pool[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 146: 132-142. DOI: 10.1016/j.bej.2019.03.015.
- [82] GANIGUÉ R, PUIG S, BATLLE-VILANOVA P, *et al.* Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(15): 3235-3238. DOI: 10.1039/c4cc10121a.
- [83] SHARMA M, ARYAL N, SARMA P M, *et al.* Bioelectrocatalyzed reduction of acetic and butyric acids *via* direct electron transfer using a mixed culture of sulfate-reducers drives electrosynthesis of alcohols and acetone[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(58): 6495-6497. DOI: 10.1039/c3cc42570c.
- [84] VASSILEV I, HERNANDEZ P A, BATLLE-VILANOVA P, *et al.* Microbial electrosynthesis of isobutyric, butyric, caproic acids, and corresponding alcohols from carbon dioxide[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(7): 8485-8493. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b00739.
- [85] BATLLE-VILANOVA P, GANIGUÉ R, RAMÍO-PUJOL S, *et al.* Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction[J]. *Bioelectrochemistry*, 2017, 117: 57-64. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.06.004.
- [86] JOURDIN L, WINKELHORST M, RAWLS B, *et al.* Enhanced selectivity to butyrate and caproate above acetate in continuous bioelectrochemical chain elongation from CO₂: Steering with CO₂ loading rate and hydraulic retention time[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2019, 7: 100284. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100284.
- [87] ROGHAI M, HOOGSTAD T, STEIK D P B T B, *et al.* Controlling ethanol use in chain elongation by CO₂ loading rate[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(3): 1496-1505. DOI: 10.1021/acs.est.7b04904.
- [88] KRACKE F, WONG A B, MAEGAARD K, *et al.* Robust and biocompatible catalysts for efficient hydrogen-driven

- microbial electrosynthesis[J]. *Communications Chemistry*, 2019, 2(1): 45(1-9). DOI: 10. 1038/s42004-019-0145-0.
- [89] TAHIR K, MIRAN W, JANG J, *et al.* Enhanced product selectivity in the microbial electrosynthesis of butyrate using a nickel ferrite-coated biocathode[J]. *Environmental Research*, 2021, 196: 110907. DOI: 10. 1016/j. envres. 2021. 110907.
- [90] THATIKAYALA D, MIN B. Copper ferrite supported reduced graphene oxide as cathode materials to enhance microbial electrosynthesis of volatile fatty acids from CO₂[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 768: 144477 (1-11). DOI: 10. 1016/j. scitotenv. 2020. 144477.
- [91] SRIKANTH S, KUMAR M, SINGH D, *et al.* Long-term operation of electro-biocatalytic reactor for carbon dioxide transformation into organic molecules[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 265: 66-74. DOI: 10. 1016/j. biortech. 2017. 12. 075.
- [92] MAY H D, EVANS P J, LABELLE E V. The bioelectrosynthesis of acetate[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 225-233. DOI: 10. 1016/j. copbio. 2016. 09. 004.
- [93] LIU Wenzong, HUANG Shihching, ZHOU Aijuan, *et al.* Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37(18): 13859-13864. DOI: 10. 1016/j. ijhydene. 2012. 04. 090.
- [94] WANG Donglin, LIANG Qinjun, CHU Na, *et al.* Deciphering mixotrophic microbial electrosynthesis with shifting product spectrum by genome-centric metagenomics[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 451: 139010 (1-9). DOI: 10. 1016/j. cej. 2022. 139010.
- [95] VAN EERTEN-JANSEN M C A A, TER HEIJNE A, GROOTSCHOLTEN T I M, *et al.* Bioelectrochemical production of caproate and caprylate from acetate by mixed cultures[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2013, 1(5): 513-518. DOI: 10. 1021/sc300168z.
- [96] TEO Weisuong, LING Hua, YU Aiqun, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid short- and branched-chain alkyl esters biodiesel[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 1-9. DOI: 10. 1186/s13068-015-0361-5.
- [97] JIA Yating, QIAN Danshi, CHEN Yuancai, *et al.* Intra/extracellular electron transfer for aerobic denitrification mediated by in-situ biosynthesis palladium nanoparticles[J]. *Water Research*, 2021, 189: 116612(1-12). DOI: 10. 1016/j. watres. 2020. 116612.
- [98] JING Xinxin, WU Yichao, SHI Liang, *et al.* Outer membrane c-type cytochromes OmcA and MtrC play distinct roles in enhancing the attachment of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells to goethite[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(23): e01941-20. DOI: 10. 1128/AEM. 01941-20.
- [99] LABELLE E, MAY H. Energy efficiency and productivity enhancement of microbial electrosynthesis of acetate[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 756(1-9). DOI: 10. 3389/fmicb. 2017. 00756.
- [100] YANG Y, JI Z, ZHOU J, *et al.* Production of C²⁺ products in novel microbial electrosynthesis coupled with anaerobic membrane bioreactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 476: 146328. DOI: 10. 1016/j. cej. 2023. 146328.
- [101] SRIKANTH S, SINGH D, VANBROEKHOVEN K, *et al.* Electro-biocatalytic conversion of carbon dioxide to alcohols using gas diffusion electrode[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 265: 45-51. DOI: 10. 1016/j. biortech. 2018. 02. 058.
- [102] LIU H X, SONG T S, FEI K Q, *et al.* Microbial electrosynthesis of organic chemicals from CO₂ by *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 T[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5: 7. DOI: 10. 1186/S40643-018-0195-7.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407028



纳米结构石墨相氮化碳用于 CO₂ 催化转化的研究进展

王文栋, 王轶楠, 饶海彬, 郭芳松, 詹国武

(华侨大学 先进碳转化技术研究院, 福建 厦门 362021)

摘要: 系统性地梳理了石墨相氮化碳(g-C₃N₄)在光/电催化二氧化碳还原反应(CO₂RR)的最新研究进展, 深入探讨了通过精细调控其局域电子结构、表面化学配位、电荷传输机制及光学特性等关键参数所实现的催化性能提升。具体策略涵盖了结构优化设计、缺陷工程引入、元素/分子掺杂策略以及异质结构构建等前沿技术, 这些创新方法为 g-C₃N₄ 催化剂的定制化设计提供了丰富的工具箱。最后, 对面临的挑战和前景进行了简要的总结和展望, 以期为进一步合理设计 g-C₃N₄ 作为选择性高效的 CO₂RR 催化剂。

关键词: 石墨相氮化碳(g-C₃N₄); 二氧化碳还原反应(CO₂RR); 催化性能; 光催化; 电催化; 纳米结构

中图分类号: TB 34; O 643.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2024)05-0575-13

Progress of Nanostructured Graphitic Carbon Nitride for CO₂ Catalytic Conversion

WANG Wendong, WANG Yinan, RAO Haibin,
GUO Fangsong, ZHAN Guowu

(Academy of Advanced Carbon Conversion Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: This paper comprehensively reviews the state-of-the-art advancements in graphitic carbon nitride (g-C₃N₄) for electrocatalytic and photocatalytic carbon dioxide reduction reaction (CO₂RR). The improvement of catalytic performance by fine-tuning the key parameters of their local electronic structures, surface chemical coordination, charge transport mechanisms, and optical properties was discussed in detail. Highlighted approaches encompass cutting-edge methodologies like structural optimization, defect engineering, elemental/molecular doping and heterostructure assembly, collectively offering a versatile arsenal for tailored design of g-C₃N₄ catalysts. The review culminates in a concise synopsis of existing challenges and future perspectives, aiming to guide the rational development of g-C₃N₄ as highly selective and efficient CO₂RR catalysts.

Keywords: graphitic carbon nitride (g-C₃N₄); carbon dioxide reduction reaction (CO₂RR); catalytic performance; photocatalysis; electrocatalysis; nanostructure

随着社会迅猛发展和能源需求的爆炸增长,传统能源如石油、化石燃料及煤炭等正面临枯竭的严峻挑战^[1-2]。同时,这些碳密集型燃料的广泛使用已导致全球温室气体排放量激增,特别是二氧化碳浓度较工业革命初期飙升约 50%,对全球气候系统及生态平衡构成了深远威胁^[3-4]。因此,CO₂ 捕集与转化

收稿日期: 2024-07-16

通信作者: 郭芳松(1989-),男,副研究员,博士,主要从事集成催化剂材料等方面的研究。E-mail: fsguo@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U21A20324, 22278167, 22322806); 华侨大学科研启动项目(22BS138)

技术作为应对之策,不仅旨在遏制全球 CO₂ 排放量的攀升,还致力于将 CO₂ 转化为高附加值化学品和燃料,为实现循环经济愿景铺平道路。在这一领域,电催化、光催化和光电催化驱动的二氧化碳还原反应(CO₂RR)因其可行性、经济性及环境友好性而备受瞩目^[5-6]。

当前,CO₂RR 催化剂的研发呈现多元化趋势,涵盖了金属、金属氧化物、硫属化物及碳基材料等广泛范畴^[7-10]。其中,石墨相氮化碳(g-C₃N₄)作为一种地球储量丰富的无金属聚合物半导体光催化剂,凭借其卓越的化学与热稳定性、低毒性和良好的生物兼容性,正逐渐成为绿色、可持续、高效且经济适用的新型聚合物催化剂^[11-13]。自石墨相氮化碳(g-C₃N₄)被发现以来,在催化水分解^[13]、CO₂ 还原^[14]、氮气固定^[15]及选择性有机合成^[16]等领域展现出巨大潜力。

本文聚焦于 g-C₃N₄ 在 CO₂RR 中的改策策略,深入剖析了结构工程、缺陷调控、元素/分子掺杂及异质结构建等前沿技术如何精准调控 g-C₃N₄ 的催化性能;以及探讨了 CO₂ 的来源与减排策略,并展望了 g-C₃N₄ 在 CO₂RR 领域面临的挑战与未来发展方向。

1 二氧化碳的来源和排放

空气中的二氧化碳主要来自于人类活动和自然原因。人类活动包括各种工业活动(即水泥、石油/天然气工业、化学、冶金、燃料开采和矿物提炼转化)、运输(即公路、铁路、空气和海洋)、建筑(即能源生产、烹饪和供暖)、农业(即林业、农作物种植、畜牧业和砍伐森林)和新陈代谢;而自然原因包括有机物分解、海洋释放、动植物呼吸、森林火灾和火山喷发等。

美国环境保护局的数据显示,87%的二氧化碳来自于化石燃料(即煤炭、天然气和石油)的燃烧,其余的来自砍伐森林和其他土地利用变化(大约 9%)和水泥工业(大约 4%)。有趣的是,40%的二氧化碳来自电力和热力生产部门,因此找到一种不使用化石燃料的有效发电方式来减少二氧化碳排放至关重要。2023 年全球大气二氧化碳的质量分数达到 419.3×10^{-6} ,而 2019 年仅为 $(409.8 \pm 0.1) \times 10^{-6}$,年均增长约为 2.5×10^{-6} 。2023 年,全球与能源相关的二氧化碳排放量增长了 1.1%,增加了 4.1 亿 t,达到 374 亿 t 的历史新高。

得益于清洁能源(太阳能光伏、风能、核能、热泵和电动汽车)部署的不断增长,排放量呈现结构性放缓态势,从 2019 年到 2023 年与能源相关的排放总量仅增加了约 9 亿 t。在截至 2023 年的 10 a 间,全球排放量的年增长率略高于 0.5%,这是自经济大萧条以来最慢的速度。但是 2023 年,中国的排放量增长约 5.65 亿 t,是迄今为止全球增幅最大的国家,也是新冠疫情后中国排放密集型经济增长的延续。目前,中国的人均排放量比发达经济体高出 15%^[17]。

2 二氧化碳资源化利用

作为减缓气候变化的初步策略,CO₂ 捕获在 20 世纪中叶已成功实现商业化,但其后续处理,尤其是长期封存技术(如地下深层注入与海洋深层溶解),正面临潜在泄漏风险、高昂能耗及可持续性挑战等多重考验^[18-19]。鉴于此,作为替代方案,将 CO₂ 催化转化为高附加值化学品,自 19 世纪起就展现出其独特的吸引力与潜力。历经岁月洗礼,CO₂ 转化技术已发展成为一门涵盖化学重整、光化学、生物转化、矿化及直接化学转化等多元路径的学科体系^[20-21]。

然而,CO₂ 分子的高度稳定性($\Delta G = -394.39 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)及其 C=O 键断裂所需的高能量壁垒($750 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$),构成了 CO₂ 还原反应(CO₂RR)难以逾越的障碍^[22]。传统热催化方法虽能促进 C-O 键断裂,但往往伴随着高温高压条件,导致能耗显著增加^[23]。相比之下,生物催化 CO₂RR,如自然光合作用、酶催化及微生物代谢等,以其绿色、可持续及高效等特点而备受瞩目。但是,生物催化亦非尽善尽美,其气候依赖性、酶稳定性问题及微生物选择性的局限,仍是亟待克服的难题。

模拟自然界光合作用过程,利用太阳能驱动 CO₂ 转化,或将成为破解上述困境的关键。具体而言,此领域探索主要包括三大方向:一是直接光催化 CO₂ 还原,将太阳能直接转化为化学能;二是电催化路径,利用光伏电池产生的电力驱动 CO₂ 转化;三是光电催化技术,通过光电化学电池实现光能向化学能的直接转换^[24]。这些创新策略不仅为 CO₂ 的循环利用开辟了新途径,也为实现碳中和目标提供了强有

力的科技支撑。

3 用于催化转化 CO₂RR 的石墨相氮化碳

3.1 概述

$g\text{-C}_3\text{N}_4$ 在 CO₂RR 中的改性策略, 包括结构工程、缺陷调控、元素/分子掺杂及异质结构建等前沿技术精准调控 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的催化性能, 如图 1 所示。这些先进技术通过增加有效催化位点、优化局部化学/电子结构、调节带隙位置及设计界面等机制, 显著提升了光能的利用效率、催化剂的稳定性、产物的选择性及 CO₂ 还原的整体效能^[25-27]。

$g\text{-C}_3\text{N}_4$ 自 1834 年起便吸引了众多科学家的目光, 其独特的 π 共轭特性使之成为 CO₂RR 催化研究的热点之一。 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 是基于三嗪基或庚嗪基(三-s-三嗪)前体缩合构建而成的分子骨架, 这一结构不仅赋予了其卓越的化学与热稳定性, 在宽广的 pH 值范围(0~14)内均能稳定存在且耐高温^[28]。此外, $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 还因其聚合特性可实现表面性质与结构的精妙调控, 为与其他无机纳米材料的复合提供了可能^[29]。

$g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的表面特性尤为丰富, 包括丰富的碱性位点、缺陷结构、富电子环境, 以及路易斯碱与布朗斯特碱的双重作用, 这些特性协同作用, 显著促进了 CO₂ 分子的高效吸附与活化^[30]。尤为重要的是, 其二维层状结构优化了电子传输路径, 加速了电子向表面吸附位点的转移, 为 CO₂ 还原反应注入了强劲动力。此外, $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的导带电位恰好满足了驱动 CO₂ 还原的能级需求。

尽管 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 在 CO₂ 催化转化领域展现出巨大潜力, 但原始 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 具有光生载流子复合速率快、表面积相对较小(约 10~15 m² · g⁻¹)等固有缺点, 限制了其催化效率与活性位点的充分利用^[31-33]。为此, 科研人员正积极探索通过结构精细调控、缺陷工程、元素掺杂策略及异质结构建等先进手段, 以期进一步扩大 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的表面积, 加速电荷传输效率, 从而全面激发其催化潜能。

3.2 结构工程

催化剂的构效关系研究是提升 CO₂ 分子有效吸附和活化的关键。针对原始 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 比表面积受限的问题, 科研人员巧妙地通过厚度调控及低维结构设计策略, 显著改善了其表面物理化学性质与电子传输效率。特别是 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的超薄纳米片(厚度 < 10 nm), 以其强大的表面性能脱颖而出, 展现出卓越的催化效能。在 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的精细结构中, 伯氨基(CNH₂)、仲氨基(C₂NH)与叔氨基(C₃N)各司其职, 其中 CNH₂ 与 C₂NH 因前体不完全缩合而主要分布于骨架边缘, 而 C₃N 则稳固镶嵌于庚嗪杂环之中。

超薄化纳米片的制备促使 C₃N 基团浓度提升, 这些基团中的 sp² 杂化 N 原子携带着孤对电子, 不仅作为质子受体, 还兼任路易斯碱位点与 CO₂ 分子的优选吸附中心^[34-35]。在催化转化过程中, 超薄结构犹如一条快车道, 极大地缩短了光生载流子向催化剂表面迁移的路径, 促进了热电子在氧化还原反应中的高效利用^[36]。尤为引人注目的是, 超薄 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 能够在不触动原子本质结构的前提下, 精确调控其层数, 利用量子限域效应, 灵活调整其带隙宽度^[37]。Niu 等^[38] 成功将带隙从 2.77 eV 拓宽至 2.97 eV, 显著增强了其光催化性能。此外, $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的二维纳米片结构还展现出优秀的界面结合能力, 为与其他半导体催化剂构建高效异质结提供了可能。这种超薄且功能丰富的结构, 不仅极大提升了催化活性表面积, 还缩短了载流子至表面反应位点的传输距离, 结合量子尺寸效应, 共同推动了催化性能的全面升级。因此, 超薄 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 纳米片无疑是推动 CO₂ 催化转化领域向前迈进的重要里程碑。

孔结构工程已被认为是增加 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 比表面积以增强 CO₂ 吸附能力的高效策略。这可以通过硬模板(纳米铸造)策略和软模板(自组装)策略来完成^[39]。硬模板法凭借其能精准控制基底材料尺寸, 进而诱导氮化碳结构有序合成, 特别是形成具有优异光催化性能孔径的优势而备受瞩目。Fukasawa 团队及其合作者创新性地采用了二氧化硅纳米球(SNS)作为硬模板, 成功制备了复合 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 材料。他们先将 SNS 于氰胺溶液混合, 然后在 823 K 高温下使氰胺溶液发生聚合反应, 从而构建 SiO₂- $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 复合材

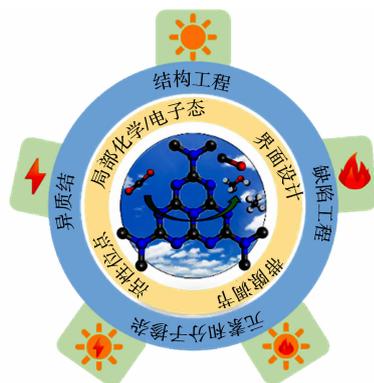


图 1 氮化碳改性技术对增强 CO₂RR 催化性能的影响

Fig. 1 Effect of carbon nitride modification technology on enhancing catalytic performance of CO₂RR

料;随后使用氟化氢进行蚀刻,精准移除 SNS 模板,展现出高度有序的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 结构。研究发现,SNS 直径的精细调控显著影响了 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的比表面积,尤以 30 nm 直径的 SNS 为最佳,此时 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的比表面积达到了惊人的 $230\text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ [40]。

然而,硬模板法虽有效,却伴随着较高的能耗及有毒溶剂(如 HF, NH_4HF_2)使用的环保挑战。为弥补硬模板法的不足,软模板策略应运而生,旨在实现更绿色、低能耗的合成过程。Sun 等[41]提出了一种创新方案,利用超稳定泡沫作为软模板来合成 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 泡沫。他们采用环氧胶(M01-A/B 及 M04-A/B 类型)混合物作为交联剂核心,构建出极其稳定的泡沫结构,并以此作为模板指导 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的合成。相较于硬模板法,去除软模板需要在低温下冷冻干燥,然后在高温($100\text{ }^\circ\text{C}$)下固定 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 泡沫形状,软模板法可以提高能源利用效率[41]。尽管软模板策略在环保性上表现出色,但由于其对昂贵试剂的依赖及可能产生的残留物等问题,在一定程度上限制了其催化效率的全面发挥。

$g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的制备路径主要是通过富氮前驱体(如尿素、硫脲、氰胺、双氰胺及三聚氰胺)的热解聚合而成。然而,这些传统方法受限于本体缩合过程中的不完全聚合,导致产物中残留大量未缩合的氨基基团,这不仅降低了载流子的迁移效率,还极大地限制了其光催化性能的发挥[42]。为解决这一瓶颈问题,科研人员致力于探索具有高聚合度的晶相氮化碳的合成路径,这类材料凭借扩展的 π 共轭体系和高度离域的 π 电子,在面内方向展现出强大的电子传输能力,并有效减少了载流子复合中心的数量[43]。此外,高结晶度能够有效扩展 π 共轭体系,进而缩小带隙,提升光捕获效率,促进光催化反应的进行。

然而,结晶度的提升往往伴随着 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 表面积的显著缩小,进而减少了表面活性位点的暴露,这对质子吸附能力和界面反应速率产生了不利影响。为了解决这一问题,Li 等[44]巧妙地采用了熔盐辅助结合有机溶剂的表面亲水改性策略,对 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 进行精准调控,成功引入了丰富的含氧基团,增强了晶相氮化碳表面的亲水性。这一改性不仅保留了高结晶度带来的优势,还促进了异质结构的形成,为进一步提升光催化性能开辟了新途径。例如, $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ 纳米带原位生长在晶相氮化碳表面时,相比其无定形态,其光催化活性实现了惊人的四倍提升。这一显著增强归因于晶相氮化碳为 WO_x 纳米带提供的稳定且有利于缓慢生长的基底,促进了清晰界面的形成,从而优化了电荷转移过程,加速了光催化反应的进行[45]。

结构工程无疑为揭示半导体光催化剂的构效关系(即结构与其活性性能之间的联系)开辟了一条新颖而富有前景的道路,为后续探索高效的改性策略奠定了坚实基础。通过精细调控 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的结构形貌,能够显著提升其表面积,进而增强光吸收与利用效率。然而,值得注意的是,实现这些结构改性 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的合成往往伴随着复杂的合成路线与形成机制,有时还需克服极为苛刻的实验条件。此外, $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 目前仍难以满足高效二氧化碳还原反应的需求。这促使深入进行结构性能关系的基础研究,旨在深刻理解结构改性碳氮化物在复杂混合体系中的具体作用机制与贡献,从而为设计并制备出具有更高性能的光催化剂提供坚实的理论依据与实验指导。通过这样的综合研究,有望推动光/电催化技术在二氧化碳还原反应中取得突破性进展。

3.3 缺陷工程

光催化剂结构中的缺陷一方面能够提供额外的活性位点,增加反应物的吸附能力,从而促进光催化反应的进行;另一方面,当光催化剂中存在大量结构缺陷时,光生电子和空穴在迁移过程中很容易被缺陷捕获而发生复合,以光或热的形式释放能量,最终导致光催化活性降低。近年来,通过精准调控 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的缺陷结构已被证明是一种有效提高催化性能的改性策略[46]。此策略能够有效调整氮化碳的局域电子结构与光学属性,为其性能优化开辟新的路径。通过在 Ar 或 NH_3 气氛(碳缺陷)或 H_2 气氛(氮缺陷)下进行简单处理,可实现去除碳或氮原子而产生的缺陷,从而扭曲 π 共轭 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 芳香结构并重建带隙[47]。诱导生成的缺陷作为中能隙态的“电子蓄水池”,能够高效捕获并存储热电子,显著抑制电荷复合过程,进而延长了光生载流子的寿命[48]。这一效应不仅减少了能量损失,还拓宽了材料对较长波长光的吸收范围,为光催化反应提供了更为丰富的光谱资源,极大地提升了材料的实际应用潜力。

N 缺陷更倾向于在 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的双配位氮($\text{N}_{2\text{C}}$)位点形成,这归因于其相比三配位氮($\text{N}_{3\text{C}}$)或三嗪间氮(N_1)位点拥有更低的结构能,如图 2(a)所示[49]。当氮缺陷形成时,它们会留下未成对的残余电子,这一现象在 Bader 有效电荷分析中得到了明确体现,具体表现为相邻碳(C)原子上的电荷密度相应减

少。这些多余的电子在 N 缺陷位点汇聚, 形成了高效的电子陷阱中心, 它们如同磁石一般, 引导着 g-C₃N₄ 骨架上的自由电子在其周围形成局域化的电子态。电子局域化不仅增强了材料内部的电子稳定性, 还促进了随机面内电子传输过程中的有效聚集, 为氧化还原反应提供了丰富的电子源, 如图 2(b) 所示^[49]。为了深入理解这一过程, 借助态密度(DOS)和电荷密度计算, 系统研究了缺陷诱导下 g-C₃N₄ 中的电子重新分布机制。离域氧化还原反应位点、跨庚嗪环的电荷迁移和中能隙态的协同效应通过空间分离和改善的电子传输来降低电荷复合率^[50-51]。

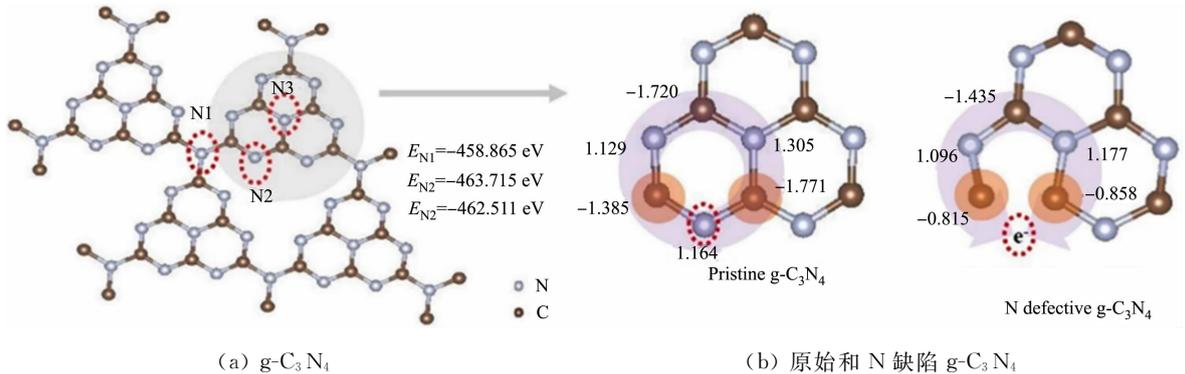


图 2 Bader 电荷分析^[49]

Fig. 2 Bader charge analysis^[49]

与 C 缺陷的形成相比, 氮化碳骨架中 N 原子的热力学稳定性较低, N 原子的去除更容易^[52]。因此, 关于 C 缺陷介导的 C₃N₄ 结构的报道较少。Yu 等^[53]开发了一种以三聚氰胺和 NH₄Br 为前驱体的共热解路线一步合成 C 缺陷 g-C₃N₄ 的方法。三聚氰胺与 NH₄Br 反应生成质子化低聚物网络, 随着温度升高, 该网络进一步分层并聚合形成三-s-三嗪结构。多孔骨架和碳缺陷随着 NH₃, HBr 和其他气体的释放而形成的。此外, 碳缺陷也可以作为掺杂剂或单原子催化剂的锚定位点^[54]。例如, 与 g-C₃N₄ 框架中与吡啶氮配位的单原子 Pd 催化剂相比, 锚定在 C 缺陷位点上的 Pd 原子具有更低的形成能^[55]。

总体而言, 缺陷工程无疑是一项强大的改性策略, 它不仅能够精细调控氮化碳的光学与电子特性, 还为其作为半导体、助催化剂及掺杂剂等多种化合物的锚定位点提供了无限可能。然而, 深入探索这一领域时, 必须认识到缺陷的尺寸与分布对氮化碳物理化学性质的深远影响, 这一认知是构建高效材料体系的基础。适量的缺陷能够作为性能优化的关键“杠杆”, 而过度引入则可能成为双刃剑, 导致材料内部形成过深的中带隙态, 这些状态不幸地成为了电子与空穴复合的温床, 从而削弱了材料的光电转换效率。因此, 掌握一套对缺陷形成进行精准控制的合成策略, 成为了实现氮化碳性能最大化不可或缺的一环。基于此, 对缺陷可控合成的合成路线建立基本而深入的理解, 不仅是化学研究者面临的紧迫任务, 也是推动材料科学进步、实现技术创新的关键所在。

3.4 元素和分子掺杂

除了缺陷工程之外, 在氮化碳上掺入杂原子也被证明是调整表面化学、促进电子重新分布、改善反应物分子吸附以及扩展可见光响应的有利策略^[56]。文中聚焦于这一前沿领域, 深入探讨了非金属及金属杂原子在氮化碳体系中的独特作用与潜力。

g-C₃N₄ 以其独特的聚合性质脱颖而出, 能够轻松将多样化的杂原子融入其主链骨架之中, 进而精确调控其电子结构。杂原子的引入可以通过共享空轨道或与额外电子占据的轨道来形成 π 共轭结构^[57]。以非贵金属 P 原子为例, 当其作为掺杂剂嵌入碳位点或间隙位置时, P 原子以其独特的电子构型, 通过三个 σ 键中的 sp^2 轨道与周围三个 N 原子紧密相连, 共享其五个价电子中的三个, 同时, 其剩余的两个 pzd^2 轨道则积极参与形成扩展的 π 共轭体系。这一过程不仅丰富了 g-C₃N₄ 的电子结构, 还带来了电导率和载流子迁移率的显著提升, 优化了其光催化性能^[58]。此外, P, N, C 原子间 p 键的强烈杂化作用也已被证明可以在 g-C₃N₄ 纳米片中诱导铁磁性^[59]。杂原子还可以充当 CO₂ 还原的活性位点, 能有效稳定所得关键中间体, 促进了 C₂₊ 燃料的高效生成, 为清洁能源的转化与储存提供了新途径^[60]。另一方面, 引入碱金属还可以增强氮化碳的光学性能。例如 K 掺杂剂的加入, 可以微调材料的电子能带结构, 使得带隙从原始的 2.79 eV 收窄至 2.72 eV, 拓宽了材料对光的吸收范围^[61]; 而 S 和 P

原子的掺杂更是将 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的光学吸收边分别推向了 630 和 620 nm, 这一显著变化归因于带隙内杂质能级所引发的光学跃迁^[62]。

Cl 和 S 等非金属掺杂剂已被证明能有效改变氮化碳的物理化学性质, 从而增强其光催化性能。例如, Cl 离子掺杂剂的存在有助于 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 对 CO_2 的吸附和活化。傅里叶变换(DFT)模拟显示, Cl 离子的引入使得 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 对 CO_2 的吸附能从微不足道的 0.02 eV 跃升至显著的 0.36 eV^[63]。这些非金属掺杂剂不仅增强了材料的吸附性能, 还直接成为了 CO_2 分子光还原过程中的活性中心, 促进了关键步骤中的电子转移, 为反应的顺利进行铺设了道路。值得注意的是, 催化剂的产物选择性并非孤立存在, 而是与催化剂表面中间体的解吸能紧密相关, 这一复杂而精细的调控机制, 正是掺杂改性策略所展现的深刻智慧。掺杂改性技术能有效优化氮化碳在的 CO_2RR 反应动力学。从初始的反应物吸附到还原途径和产物的解吸, 同时保持载流子的空间分离^[64]。

在 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的改性探索中, 杂原子的引入与缺陷工程等策略能有效地相互协同, 共同促进 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 催化性能的提升。值得注意的是, 这些策略对 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 物理化学性质的调控需相互兼容, 方能实现最佳效果。例如, 将氧原子嵌入 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 框架中会打破 π 共轭结构的价态平衡, 同时形成 C—C 和 C—O 键, 从而获得比 C 和 N 原子更高的价电子密度, 从而激活了其潜在的催化活性。在选择氧原子作为掺杂剂时, 将其与 N 缺陷修饰的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 相匹配, 是因为它们具有相似的原子半径和更强的 N 原子电负性。因此, 氧掺杂剂取代 $\text{N}_{2\text{C}}$ 缺陷位点, 导致光谱响应从 420 nm 上升至 650 nm^[65]。Chen 等^[54] 开发出一种具有氮缺陷和多孔结构的富碳 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 。其内部富碳的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的 C/N 比约为 0.52, 次外层由碳掺杂的带有氮空位的 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 组成, 最外表面主要由碳组成。由于这些具有不同碳成分的层连续接触, 费米能级上的电子流入内层, 直到能级达到平衡。总体而言, 不同修饰途径的协同效应可以共同作用, 以进一步增强光催化性能。

近年来, 单原子催化剂以其无与伦比的原子利用效率, 在催化领域崭露头角, 其显著减少催化剂用量的能力, 尤为引人注目。值得一提的是, 氮化碳单元中丰富的 N 原子孤对电子, 仿佛天然的牢笼, 有效地束缚了单原子, 避免了因高表面能诱发的团聚现象, 确保了催化剂的稳定性和持久性^[66]。更进一步地, 单原子催化剂的微小尺寸, 为我们提供了一个独特的视角去深入探究 CO_2 还原反应(CO_2RR)的催化机理。它们如同精密的探针, 能够精准地揭示反应过程中的电子转移、化学键断裂与形成等微观细节, 为设计更高效、更有选择性的催化剂提供了坚实的理论基础和实验依据。因此, 单原子催化剂与氮化碳的结合, 不仅是催化科学领域的一次创新尝试, 更是推动 CO_2RR 技术向实用化、规模化迈进的关键一步。

综上所述, 元素掺杂策略以其独特优势, 通过显著提升氮化碳的电子传导性, 引入丰富的表面活性中心, 并有效抑制载流子的复合过程, 成功克服了氮化碳材料在光催化领域中的固有局限性。但不容忽视的是, 当前广泛采用的合成方法往往伴随着晶格结构的扭曲与结晶度的下降, 这些不利因素可能催生电荷复合中心, 进而削弱催化性能。因此, 当务之急在于掌握并优化那些能够实现对氮化碳元素掺杂进行精确调控的合成技术。此外, 鉴于单原子催化剂(SACs)独特的原子级尺寸特性, 其催化活性中心上的动态变化过程变得尤为微妙且难以捉摸。传统的非原位表征技术受限于其时间分辨率与空间精度的局限, 往往难以捕捉这些关键瞬间的变化信息。这对于深入理解 SACs 的催化机制、发现并设计具备更高活性和稳定性的单原子催化剂而言, 无疑构成了巨大的挑战。因此, 开发新型的原位表征技术, 以实现 SACs 催化过程中动态变化的实时、精准监测, 将是未来催化科学研究中亟待攻克的重要课题。

3.5 异质结

在探索高效 CO_2 还原反应(CO_2RR)催化剂的过程中, 除了聚焦于 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 的结构调控、缺陷工程及元素掺杂外, 将助催化剂与之巧妙偶联构建异质结, 已成为一种强有力的策略。其增强机制主要基于两点: (i) 助催化剂可以捕获光生电子空穴对并延长载流子的寿命; (ii) 助催化剂可以通过活化 CO_2 分子或提供活性中间体来降低反应能垒^[67]。 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 以其独特的电子结构, 展现出与多种半导体(例如金属氧化物、金属磷化物和金属氢氧化物)及碳材料等构建复合异质结的广阔潜力^[68]。这些异质结结构不仅实现了电子空穴对的空间高效分离, 还通过协同效应, 赋予了复合材料独特的光化学性能^[67]。具体而言, 异质结系统可按其内在机制细分为四类: 基于半导体能带和费米能级排列的 II 型异质结、p-n

结、Z 型异质结以及新兴的 S 型异质结^[69-70]。如图 3 所示, 每一类异质结都以其独特的电子传输路径与能级匹配方式, 为设计高效、稳定的 CO₂RR 催化剂提供了丰富的思路与选择。

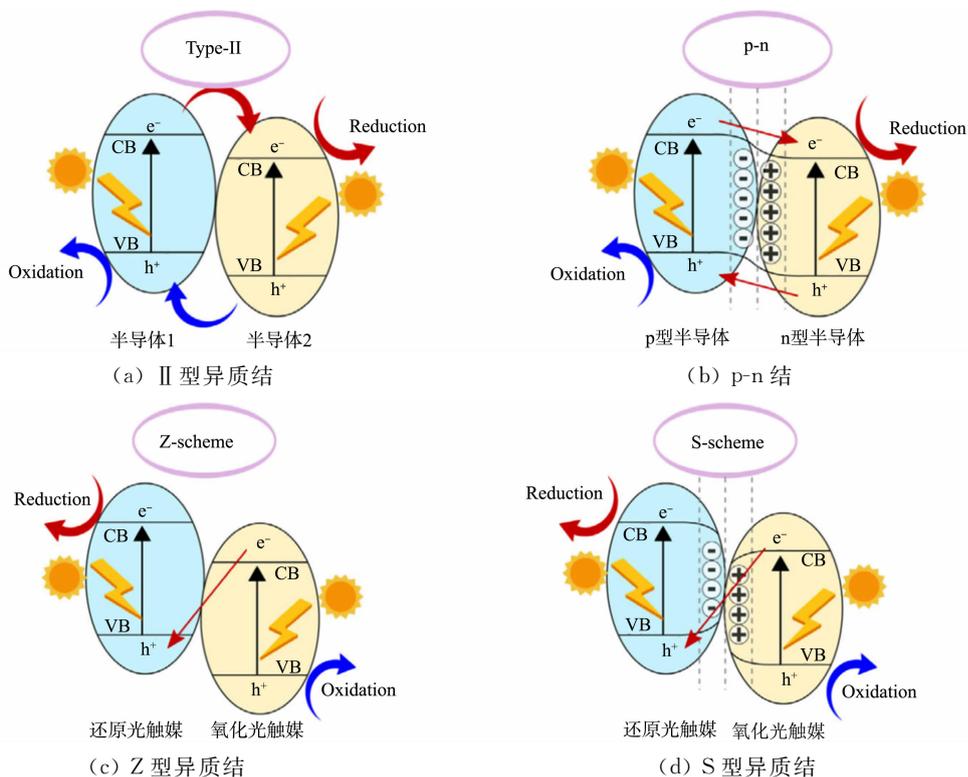


图 3 异质结系统的电荷转移机制^[70]

Fig. 3 Charge transfer mechanism of heterojunction systems^[70]

对于 II 型异质结, 一个半导体(半导体 1)的价带(VB)和导带(CB)位置将高于另一个半导体(半导体 2)的价带(VB)和导带(CB)位置。因此, 电子最终将在半导体 2 的 CB 上参与还原反应, 而氧化反应发生在半导体 1 的 VB 上。例如, g-C₃N₄ 和 NiFe 层状双氢氧化物(NiFe-LDH)异质结系统^[71]。与原始 g-C₃N₄ 相比, g-C₃N₄/NiFe-LDH 的光生载流子寿命更长, 为 5.18 ns, 这直接表明复合率较低。这使得载流子更好地参与 CO₂ 转化为 CO 的过程, 分别是原始 g-C₃N₄ 和 NiFe-LDH 的 4.8 倍和 7.2 倍。刘雪美等^[72]将 BiOBr 与 CN 复合制备出了 II 型异质结, 促进了光生载流子的分离和迁移, 使更多光生电子达到催化剂表面参与 CO₂ 还原反应, 进而让光催化还原 CO₂ 性能显著提高(机理见图 4)。

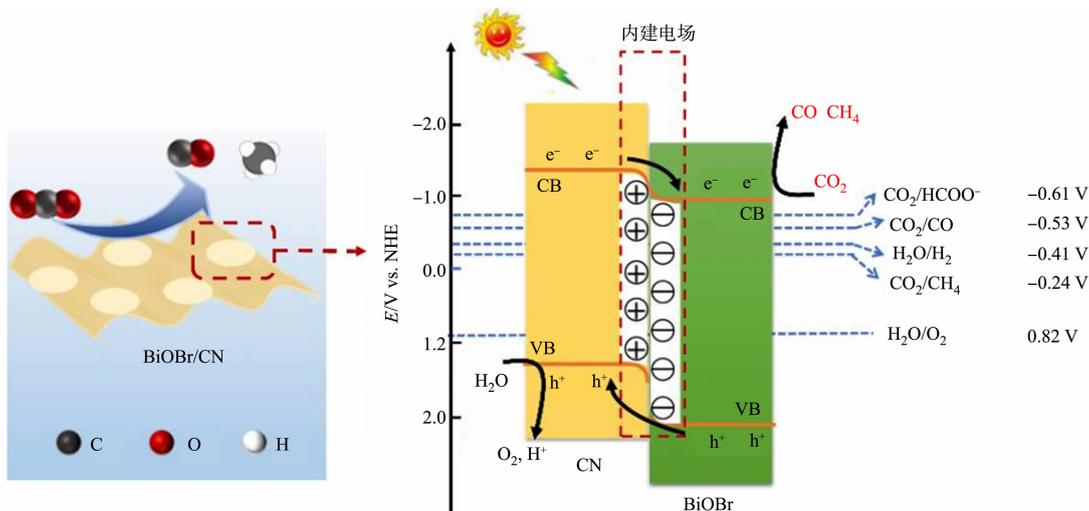


图 4 BiOBr/CN 样品的光催化机理图^[72]

Fig. 4 Photocatalytic mechanism diagram of BiOBr/CN sample^[72]

另一方面, p-n 异质结系统利用 p 型和 n 型半导体之间的内置电场。在理想状态下, 两者的导带

(CB)与价带(VB)边缘相对齐,但在接触界面处,由于费米能级的不连续,会引发电子与空穴的重新分布。这一过程导致在 p-n 结边界形成空间电荷区,即耗尽层,该区域通过产生内置电场来平衡载流子的扩散,从而有效阻止了光生电子与空穴的复合^[73]。这一机制极大地促进了光生电荷载流子在界面上的快速分离与转移,显著降低了复合概率。值得注意的是,p 型与 n 型半导体之间的化学势差异还会引发能带的弯曲现象,进一步强化了内置电场对光生电子与空穴的驱动作用,使它们沿相反方向迁移^[74]。Lü 等^[75]通过实验成功合成了 ZnCoMOF/g-C₃N₄ p-n 异质结催化剂,并发现其载流子寿命(τ)相较于原始 g-C₃N₄ (3.61 ns)有显著延长,达到了 3.78 ns。这一显著提升归因于 p-n 异质结的形成,其中 p 型 ZnCoMOF 的能级上移,而 n 型 g-C₃N₄ 的能级则因费米能级平衡而相应下移。p-n 结的存在不仅通过实验现象得以证实,还可通过莫特-肖特基图等先进表征手段进行验证,进一步加深了对该异质结催化机制的理解。

II 型与 p-n 光催化系统凭借其交错的带隙结构,成功实现了光生载流子的有效空间分离,从而延长了载流子的寿命。然而,这一优势也伴随着显著的缺点:由于电子倾向于流向具有较低负电势的导带(CB),而空穴则向具有较小正电势的价带(VB)迁移,导致光生载流子的氧化还原电势普遍降低。此外,电子与电子之间、空穴与空穴之间的静电排斥作用进一步加剧了界面电子转移的难度,限制了催化效率的提升^[76]。为克服上述难题,Z 型异质结系统应运而生,成为实现电荷高效空间分离同时保持高氧化还原活性的创新途径^[77]。BiVO₄/g-C₃N₄ 复合体系便是这一策略的典型代表,其独特的 2D/2D 界面设计提供了广阔的面对面接触面积,极大地缩短了电荷转移的路径,降低了传输阻力。尤为重要的是,Z 型电荷转移机制巧妙地规避了传统系统中氧化还原电势降低的问题,通过 BiVO₄ 的更正价带最大电势(VBM)与 g-C₃N₄ 的更负导带最小电势(CBM)的协同作用,确保了 CO₂ 还原与水氧化两个关键步骤在热力学上的高度可行性,为高效光催化 CO₂ 还原反应的实现开辟了新的道路^[78]。

相较于 Z 型电荷转移模型,S 型异质结系统展现了一种独特的电荷传输机制,其核心特征在于其内部电场方向由还原型光催化剂(RP)指向氧化型光催化剂(OP)。当这两种半导体紧密接触并达到平衡状态时,界面附近会自然形成电子消耗层与电子累积层,这是费米能级趋于一致过程中电子重新分布的直接结果。具体而言,OP 的费米能级向上移动,而 RP 的费米能级则向下移动,以适应这一平衡状态。在此 S 型异质结体系中,空穴与电子之间的库仑引力成为驱动电荷复合的关键因素,它促进了 OP 导带(CB)中的光生电子与 RP 价带(VB)中空穴的高效复合。这一机制不仅实现了电荷的空间分离,还保持了较高的氧化还原电位,有利于后续的光催化反应。以 S 掺杂的 g-C₃N₄ 与 BiOBr 构成的 S 型异质结系统为例,S 原子的引入通过其额外的价电子显著提升了复合材料的费米能级,进而影响了内建电场的强度。实验与计算结果表明,掺杂后的混合材料相较于非掺杂材料,其内建电场强度从 $6.04 \times 10^8 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ 提升至 $2.56 \times 10^9 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$,这一显著提升可归因于掺杂引起的更大偶极矩和更强的电场效应^[79]。这一发现不仅深化了对 S 型异质结电荷传输机制的理解,也为设计高效光催化剂提供了新的思路与策略。杨超等^[80]在疏水碳纤维纸上构建一个紧密的 2D/2D g-C₃N₄@BiOI(S 型)异质结(图 5),可以发现

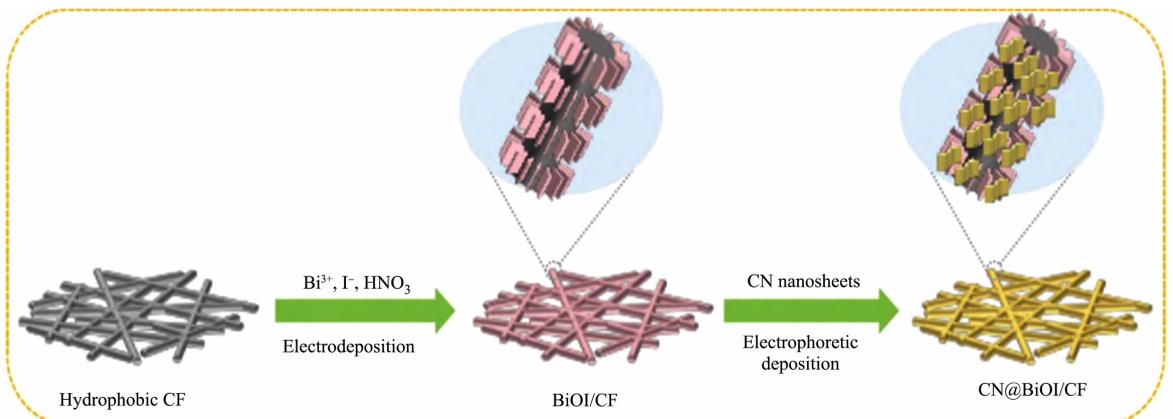


图 5 CN@BiOI/CF 的合成路线示意图^[80]

Fig. 5 Schematic representation of synthetic route of CN@BiOI/CF^[80]

其具有 77.8% 的 CO 选择性和 $458.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 活性。S 型异质结结构可以提高电荷分离效率,在催化过程中形成气-液-固三相界面,充分保证 CO₂ 和 H₂O 同时供给。

4 结论及展望

文中系统地总结了近年来 g-C₃N₄ 在 CO₂RR 领域的最新研究进展,深入分析 g-C₃N₄ 的独特优势,包括其简易的合成路径、卓越的热化学稳定性、固有的无金属特性以及高度可调的表面工程结构。文中揭示了 g-C₃N₄ 作为绿色、经济高效催化剂在 CO₂RR 中的巨大潜力。通过结构优化设计、缺陷工程引入、元素/分子掺杂策略以及异质结构构建等前沿技术,科研人员成功增强了 g-C₃N₄ 催化剂的性能,提高了产物的选择性和整体反应效率。这些先进方法为 g-C₃N₄ 催化剂的定制化设计提供了可能,为 CO₂RR 技术的进步注入了新的活力。

尽管 g-C₃N₄ 在 CO₂RR 中展现出了强大的潜力,但其现在的研究仍面临着诸多挑战。首先,g-C₃N₄ 的带隙较宽,限制了其对可见光的吸收和利用效率,未来研究应聚焦于如何通过更精细的能带调控策略来拓宽其光谱响应范围;其次,g-C₃N₄ 的催化活性位点有限,且存在电荷传输效率不高的问题,这限制了其工业化。因此,需要进一步探索简洁高效的改性方法,如引入更高效的助催化剂、优化催化剂的形貌与结构等,以提升其催化性能。

此外,随着对 CO₂RR 机制理解的深入,未来研究还应关注多相催化体系中各组分之间的协同作用机制,以及如何通过精准调控催化剂的局域电子结构和表面化学环境来优化催化性能。同时,通过不断优化催化剂设计,促进跨学科、跨领域的合作研究,有望将 g-C₃N₄ 催化剂应用于更广泛的领域,为实现全球碳中和目标和循环经济发展做出重要贡献。

参考文献:

- [1] ONG W J, ZHENG Nanfeng, ANTONIETTI M. Advanced nanomaterials for energy conversion and storage: Current status and future opportunities[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(22): 9904-9907. DOI: 10. 1039/d1nr90103f.
- [2] ARESTA M, DIBENEDETTO A, ANGELINI A. Catalysis for the valorization of exhaust carbon: From CO₂ to chemicals, materials, and fuels: Technological use of CO₂ [J]. *Chemical reviews*, 2014, 114(3): 1709-1742. DOI: 10. 1021/cr4002758.
- [3] JACOBSON T A, KLER J S, HERNKE M T, *et al.* Direct human health risks of increased atmospheric carbon dioxide[J]. *Nature Sustainability*, 2019, 2(8): 691-701. DOI: 10. 1038/s41893-019-0323-1.
- [4] BONIFACE K J, DYKEMAN R R, CORMIER A, *et al.* CO₂-switchable drying agents[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(1): 208-213. DOI: 10. 1039/c5gc01201e.
- [5] MODAK A, BHANJA P, DUTTA S, *et al.* Catalytic reduction of CO₂ into fuels and fine chemicals[J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(13): 4002-4033. DOI: 10. 1039/d0gc01092h.
- [6] SHAUGHNESSY C I, SCONYERS D J, LEE H J, *et al.* Insights into pressure tunable reaction rates for electrochemical reduction of CO₂ in organic electrolytes[J]. *Green chemistry*, 2020, 22(8): 2434-2442. DOI: 10. 1039/d0gc00013b.
- [7] FRANCO F, RETTENMAIER C, JEON H S, *et al.* Transition metal-based catalysts for the electrochemical CO₂ reduction: From atoms and molecules to nanostructured materials[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(19): 6884-6946. DOI: 10. 1039/d0cs00835d.
- [8] NIU Wenhan, LI Zhao, MARCUS K, *et al.* Surface-modified porous carbon nitride composites as highly efficient electrocatalyst for Zn-Air batteries[J]. *Advanced Energy Materials*, 2018, 8(1): 1701642(1-8). DOI: 10. 1002/aenm. 201701642.
- [9] WU Yunzhen, CAO Shuyan, HOU Jungang, *et al.* Rational design of nanocatalysts with nonmetal species modification for electrochemical CO₂ reduction[J]. *Advanced Energy Materials*, 2020, 10(29): 2000588(1-31). DOI: 10. 1002/aenm. 202000588.
- [10] SONG Qingwen, ZHOU Zhihua, HE Liangnian. Efficient, selective and sustainable catalysis of carbon dioxide[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(16): 3707-3728. DOI: 10. 1039/c7gc00199a.
- [11] ZHANG Deliang, HE Wen, YE Jiamin, *et al.* Polymeric carbon nitride-derived photocatalysts for water splitting and

- nitrogen fixation[J]. *Small*, 2021, 17(13):2005149(1-28). DOI:10.1002/smll.202005149.
- [12] XIA Pengfei, CHENG Bei, JIANG Jizhou, *et al.* Localized π -conjugated structure and EPR investigation of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ photocatalyst[J]. *Applied Surface Science*, 2019, 487:335-342. DOI:10.1016/j.apsusc.2019.05.064.
- [13] WANG Huimin, LI Xingxing, YANG Jinlong. The $g\text{-C}_3\text{N}_4/\text{C}_2\text{N}$ nanocomposite: A $g\text{-C}_3\text{N}_4$ -based water-splitting photocatalyst with enhanced energy efficiency[J]. *Chem Phys Chem*, 2016, 17(13):2100-2104. DOI:10.1002/cphc.201600209.
- [14] ONG W J, PUTRI L K, MOHAMED A R. Rational design of carbon-based 2D nanostructures for enhanced photocatalytic CO_2 reduction: A dimensionality perspective[J]. *Chemistry: A European Journal*, 2020, 26(44):9710-9748. DOI:10.1002/chem.202000708.
- [15] ZHANG Shouren, YI Wenjing, GUO Yanzhen, *et al.* Metal-free $g\text{-C}_3\text{N}_4$ nanosheets as a highly visible-light-active photocatalyst for thiol-ene reactions[J]. *Nanoscale*, 2021, 13(6):3493-3499. DOI:10.1039/d1nr00453k.
- [16] WANG Fengliang, CHEN Ping, FENG Yiping, *et al.* Facile synthesis of N-doped carbon dots/ $g\text{-C}_3\text{N}_4$ photocatalyst with enhanced visible-light photocatalytic activity for the degradation of indomethacin[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2017, 207:103-113. DOI:10.1016/j.apcatb.2017.02.024.
- [17] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. CO_2 emissions in 2023[R/OL]. (2024-03-01)[2024-07-16]. <https://www.iea.org/reports/co2-emissions-in-2023>.
- [18] ZHANG Yu, GAO Yanshan, LOUIS B, *et al.* Fabrication of lithium silicates from zeolite for CO_2 capture at high temperatures[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2019, 33(6):81-89. DOI:10.1016/j.jechem.2018.08.014.
- [19] HELDEBRANT D J, YONKER C R, JESSOP P G, *et al.* Organic liquid CO_2 capture agents with high gravimetric CO_2 capacity[J]. *Energy & Environmental Science*, 2008, 1(4):487-493. DOI:10.1039/B809533G.
- [20] NAKATA K, OZAKI T, TERASHIMA C, *et al.* High-yield electrochemical production of formaldehyde from CO_2 and seawater[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(3):871-874. DOI:10.1002/ange.201308657.
- [21] KORTLEVER R, PETERS I, KOPER S, *et al.* Electrochemical CO_2 reduction to formic acid at low overpotential and with high faradaic efficiency on carbon-supported bimetallic Pd-Pt nanoparticles[J]. *ACS Catalysis*, 2015, 5(7):3916-3923. DOI:10.1021/acscatal.5b00602.
- [22] KOVACIC Z, LIKOZAR B, HUS M. Photocatalytic CO_2 reduction: A review of ab initio mechanism, kinetics, and multiscale modeling simulations[J]. *ACS catalysis*, 2020, 10(24):14984-15007. DOI:10.1021/acscatal.0c02557.
- [23] KONG Tingting, JIANG Yawen, XIONG Yujie. Photocatalytic CO_2 conversion: What can we learn from conventional CO_x hydrogenation? [J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(18):6579-6591. DOI:10.1039/c9cs00920e.
- [24] WANG Liming, CHEN Wenlong, ZHANG Doudou, *et al.* Surface strategies for catalytic CO_2 reduction: From two-dimensional materials to nanoclusters to single atoms[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(21):5310-5349. DOI:10.1039/c9cs00163h.
- [25] 李晨露, 王亚男, 徐松, *et al.* $\text{MoO}_{(3-x)}$ 负载蜂窝状氮化碳的制备及其光热协同催化 CO_2 还原性能研究[J]. *化学反应工程与工艺*, 2024, 40(1):10-18. DOI:10.11730/j.issn.1001-7631.2024.01.0010.09.
- [26] 徐杨, 刘成宝, 郑磊之, *et al.* 高结晶度 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 在光催化领域的研究进展[J/OL]. *材料导报*, 2023:1-20(2023-11-13)[2024-07-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1078.tb.20231110.1017.006.html>.
- [27] 孙满营. 硼、磷修饰促进 $g\text{-C}_3\text{N}_4$ 光催化 CO_2 还原的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2023. DOI:10.27034/d.cnki.ggx-iu.2023.003069.
- [28] MILLER T S, JORGE A B, SUTER T M, *et al.* Carbon nitrides: Synthesis and characterization of a new class of functional materials [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19(24):15613-15638. DOI:10.1039/c7cp02711g.
- [29] ZHU Yuxiang, FENG Yi, CHEN Shuangling, *et al.* Carbon nitride nanotube-based materials for energy and environmental applications: A review of recent progresses[J]. *Journal of Materials Chemistry A: Materials for Energy and Sustainability*, 2020, 8(48):25626-25648. DOI:10.1039/d0ta08892g.
- [30] SUN Zhuxing, WANG Haiqiang, WU Zhongbiao, *et al.* $g\text{-C}_3\text{N}_4$ based composite photocatalysts for photocatalytic CO_2 reduction[J]. *Catalysis Today*, 2018, 300:160-172. DOI:10.1016/j.cattod.2017.05.033.
- [31] MA Huiqiang, LI Yang, LI Shuang, *et al.* Novel PO codoped $g\text{-C}_3\text{N}_4$ with large specific surface area: Hydrothermal synthesis assisted by dissolution-precipitation process and their visible light activity under anoxic conditions[J]. *Applied Surface Science*, 2015, 357:131-138. DOI:10.1016/j.apsusc.2015.09.009.

- [32] 唐浩宇, 刘成宝, 陈丰, *et al.* 模板法合成 g-C₃N₄ 基复合材料及其光催化性能的研究进展[J]. 功能材料, 2024, 55(4): 4062-4071. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9731.2024.04.008.
- [33] 张子琪, 孙彦东, 张雪, *et al.* 非金属掺杂的 g-C₃N₄ 光催化材料制备及应用研究进展[J]. 材料工程, 2023, 51(12): 47-58. DOI: 10.11868/j.issn.1001-4381.2023.000293.
- [34] XIA Pengfei, ZHU Bicheng, YU Jiaguo, *et al.* Ultra-thin nanosheet assemblies of graphitic carbon nitride for enhanced photocatalytic CO₂ reduction[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2017, 5(7): 3230-3238. DOI: 10.1039/C6TA08310B.
- [35] WANG Ke, FU Jile, ZHENG Ying. Insights into photocatalytic CO₂ reduction on C₃N₄: Strategy of simultaneous B, K co-doping and enhancement by N vacancies[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2019, 254: 270-282. DOI: 10.1016/j.apcatb.2019.05.002.
- [36] ZHANG Shumin, XU Difa, CHEN Xiaohua, *et al.* Construction of ultrathin 2D/2D g-C₃N₄/In₂Se₃ heterojunctions with high-speed charge transfer nanochannels for promoting photocatalytic hydrogen production[J]. Applied Surface Science, 2020, 528: 146858(1-9). DOI: 10.1016/j.apsusc.2020.146858.
- [37] LU Zhiyuan, LI Chunmei, HAN Juan, *et al.* Construction OD/2D heterojunction by highly dispersed Ni₂P QDs loaded on the ultrathin g-C₃N₄ surface towards superhigh photocatalytic and photoelectric performance[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2018, 237: 919-926. DOI: 10.1016/j.apcatb.2018.06.062.
- [38] NIU Ping, YANG Yongqiang, YU J C, *et al.* Switching the selectivity of the photoreduction reaction of carbon dioxide by controlling the band structure of a g-C₃N₄ photocatalyst[J]. Chemical Communications, 2014, 50(74): 10837-10840. DOI: 10.1039/c4cc03060e.
- [39] LI Hong, WANG Lingzhi, LIU Yongdi, *et al.* Mesoporous graphitic carbon nitride materials: Synthesis and modifications[J]. Research on Chemical Intermediates, 2016, 42: 3979-3998. DOI: 10.1007/s11164-015-2294-9.
- [40] FUKASAWA Y, TAKANABE K, SHIMOJIMA A, *et al.* Synthesis of ordered porous graphitic-C₃N₄ and regularly arranged Ta₃N₅ nanoparticles by using self-assembled silica nanospheres as a primary template[J]. Chemistry: An Asian Journal, 2011, 6(1): 103-109. DOI: 10.1002/asia.201000523.
- [41] SUN Zhimin, FANG Wei, ZHAO Lei, *et al.* 3D porous Cu-NPs/g-C₃N₄ foam with excellent CO₂ adsorption and Schottky junction effect for photocatalytic CO₂ reduction[J]. Applied Surface Science, 2020, 504: 144347(1-10). DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.144347.
- [42] LIN Lihua, YU Zhiyang, WANG Xinchun. Crystalline carbon nitride semiconductors for photocatalytic water splitting[J]. Angewandte Chemie, 2019, 131(19): 6225-6236. DOI: 10.1002/anie.201809897.
- [43] LI Han, ZHU Bicheng, CAO Shaowen, *et al.* Controlling defects in crystalline carbon nitride to optimize photocatalytic CO₂ reduction[J]. Chemical Communications, 2020, 56(42): 5641-5644. DOI: 10.1039/d0cc01338b.
- [44] LI Yupei, HE Jiangyan, WANG Xiaojing, *et al.* Introduction of crystalline hexagonal-C₃N₄ into g-C₃N₄ with enhanced charge separation efficiency[J]. Applied Surface Science, 2021, 559: 149876(1-10). DOI: 10.1016/j.apsusc.2021.149876.
- [45] ZHANG Xiao, HE Shuai, JIANG Sanping. WO_x/g-C₃N₄ layered heterostructures with controlled crystallinity towards superior photocatalytic degradation and H₂ generation[J]. Carbon, 2020, 156: 488-498. DOI: 10.1016/j.carbon.2019.09.083.
- [46] BAI Xiaojuan, JIA Tianqi, WANG Xuyu, *et al.* High carrier separation efficiency for a defective g-C₃N₄ with polarization effect and defect engineering: Mechanism, properties and prospects[J]. Catalysis Science & Technology, 2021, 11(16): 5432-5447. DOI: 10.1039/D1CY00595B.
- [47] CAO Shihai, FAN Bin, FENG Yanchao, *et al.* Sulfur-doped g-C₃N₄ nanosheets with carbon vacancies: General synthesis and improved activity for simulated solar-light photocatalytic nitrogen fixation[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 353: 147-156. DOI: 10.1016/j.cej.2018.07.116.
- [48] TU Wenguang, XU You, WANG Jiajia, *et al.* Investigating the role of tunable nitrogen vacancies in graphitic carbon nitride nanosheets for efficient visible-light-driven H₂ evolution and CO₂ reduction[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(8): 7260-7268. DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b01477.
- [49] LIAO Jiazhen, CUI Wen, LI Jieyuan, *et al.* Nitrogen defect structure and NO⁺ intermediate promoted photocatalytic NO removal on H₂ treated g-C₃N₄ [J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 379: 122282(1-8). DOI: 10.1016/j.cej.2019.122282.

- [50] WANG Mier, FAN Changzheng, YANG Shuaijun, *et al.* Nitrogen deficient carbon nitride for efficient visible light driven tetracycline degradation; A combination of experimental and DFT studies[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2020, 10(20): 6800-6808. DOI: 10. 1039/d0cy01124j.
- [51] YANG Chengwu, XUE Zhe, QIN Jiaqian, *et al.* Heterogeneous structural defects to prompt charge shuttle in $g\text{-C}_3\text{N}_4$ plane for boosting visible-light photocatalytic activity[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2019, 259: 118094(1-8). DOI: 10. 1016/j. apcatb. 2019. 118094.
- [52] XIONG Jun, DI Jun, XIA Jiexiang, *et al.* Surface defect engineering in 2D nanomaterials for photocatalysis[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(39): 1801983(1-19). DOI: 10. 1002/adfm. 201801983.
- [53] YU Guiyan, ZHAO Haitao, XING Chuanwang, *et al.* Creation of carbon defects and in-plane holes with the assistance of NH_4Br to enhance the photocatalytic activity of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2021, 11(15): 5349-5359. DOI: 10. 1039/d1cy00641j.
- [54] CHEN Xingzhu, ZHAO Xiujian, KONG Zhouzhou, *et al.* Unravelling the electrochemical mechanisms for nitrogen fixation on single transition metal atoms embedded in defective graphitic carbon nitride[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2018, 6(44): 21941-21948. DOI: 10. 1039/C8TA06497K.
- [55] LIU Guimei, HUANG Ying, LÜ Haiqin, *et al.* Confining single-atom Pd on $g\text{-C}_3\text{N}_4$ with carbon vacancies towards enhanced photocatalytic NO conversion[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2021, 284: 119683(1-12). DOI: 10. 1016/j. apcatb. 2020. 119683.
- [56] NG S F, LAU M Y L, ONG W J. Engineering layered double hydroxide-based photocatalysts toward artificial photosynthesis: State-of-the-art progress and prospects [J]. *Solar Rrl*, 2021, 5(6): 2000535. DOI: 10. 1002/solr. 202000535.
- [57] HU Chechia, HUNG Weizeng, WANG Maosheng, *et al.* Phosphorus and sulfur codoped $g\text{-C}_3\text{N}_4$ as an efficient metal-free photocatalyst[J]. *Carbon*, 2018, 127: 374-383. DOI: 10. 1016/j. carbon. 2017. 11. 019.
- [58] MAHVELATI-SHAMSABADI T, LEE B K. Photocatalytic H_2 evolution and CO_2 reduction over phosphorus-doped $g\text{-C}_3\text{N}_4$ nanostructures; Electronic, optical, and surface properties[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020, 130: 109957(1-19). DOI: 10. 1016/j. rser. 2020. 109957.
- [59] LIU Yonggang, LIU Peitao, SUN Changqi, *et al.* P dopants induced ferromagnetism in $g\text{-C}_3\text{N}_4$ nanosheets; Experiments and calculations[J]. *Applied Physics Letters*, 2017, 110(22): 222403(1-5). DOI: 10. 1063/1. 4984584.
- [60] FU Sijia, LIU Xin, RAN Jingrun, *et al.* CO_2 reduction by single copper atom supported on $g\text{-C}_3\text{N}_4$ with asymmetrical active sites[J]. *Applied Surface Science*, 2021, 540: 148293(1-7). DOI: 10. 1016/j. apsusc. 2020. 148293.
- [61] WANG Shuhui, ZHAN Jiawei, CHEN Kui, *et al.* Potassium-doped $g\text{-C}_3\text{N}_4$ achieving efficient visible-light-driven CO_2 reduction[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(22): 8214-8222. DOI: 10. 1021/acssuschemeng. 0c01151.
- [62] MA X, LV Y, XU J, *et al.* A strategy of enhancing the photoactivity of $g\text{-C}_3\text{N}_4$ via doping of nonmetal elements: A first-principles study[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2012, 116(44): 23485-93.
- [63] WANG Yi, TANG Xu, HUO Pengwei, *et al.* Insight into the effect of the Cl 3p orbital on $g\text{-C}_3\text{N}_4$ mimicking photosynthesis under CO_2 reduction[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2021, 125(18): 9646-9456. DOI: 10. 1021/acs.jpcc. 1c00663.
- [64] WEI Bo, MEI Qiong, AN Zexiu, *et al.* Nonmetal-doped C_2N nanosheets for removal of methoxyphenols: A first-principles study[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2020, 4(1): 478-486. DOI: 10. 1021/acsnm. 0c02787.
- [65] TANG Hua, XIA Zhihua, CHEN Ran, *et al.* Oxygen doped $g\text{-C}_3\text{N}_4$ with nitrogen vacancy for enhanced photocatalytic hydrogen evolution [J]. *Chemistry: An Asian Journal*, 2020, 15(21): 3456-3461. DOI: 10. 1002/asia. 202000912.
- [66] FU Junwei, WANG Shuandi, WANG Zihua, *et al.* Graphitic carbon nitride based single-atom photocatalysts[J]. *Frontiers of Physics*, 2020, 15(3): 33201(1-14). DOI: 10. 1007/s11467-019-0950-z.
- [67] LI Yanrui, KONG Tingting, SHEN Shaohua. Artificial photosynthesis with polymeric carbon nitride: When meeting metal nanoparticles, single atoms, and molecular complexes[J]. *Small*, 2019, 15(32): 1900772(1-18). DOI: 10. 1002/smll. 201900772.
- [68] FU Junwei, YU Jianguo, JIANG Chuanjia, *et al.* $g\text{-C}_3\text{N}_4$ -Based heterostructured photocatalysts[J]. *Advanced Energy Materials*, 2018, 8(3): 1701503(1-31). DOI: 10. 1002/aenm. 201701503.

- [69] LU Qingqing, EID K, LI Wenpeng, *et al.* Engineering graphitic carbon nitride (g-C₃N₄) for catalytic reduction of CO₂ to fuels and chemicals; Strategy and mechanism[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(15): 5394-5428. DOI: 10.1039/d1gc01303c.
- [70] NG S F, FOO J J, ONG W J. Solar-powered chemistry; Engineering low-dimensional carbon nitride-based nanostructures for selective CO₂ conversion to C₁-C₂ products[J]. *Info Mat*, 2022, 4(1): e12279. DOI: 10.1002/inf2.12279.
- [71] SHI Qunrong, HUANG Junjie, YANG Yong, *et al.* *In-situ* construction of urchin-like hierarchical g-C₃N₄/NiAl-LDH hybrid for efficient photoreduction of CO₂ [J]. *Materials Letters*, 2020, 268: 127560(1-5). DOI: 10.1016/j.matlet.2020.127560.
- [72] 刘雪美, 罗绣毓, 王华. BiOBr/CN 2D/2D 异质结高效光催化 CO₂ 还原[J/OL]. *化学工业与工程*, 2024, 1-13(2024-07-19)[2024-07-16]. <https://doi.org/10.13353/j.issn.1004.9533.20230175>.
- [73] MATHEW M, SHINDE P V, SAMAL R, *et al.* A review on mechanisms and recent developments in pn heterojunctions of 2D materials for gas sensing applications[J]. *Journal of Materials Science*, 2021, 56(16): 9575-9604. DOI: 10.1007/s10853-021-05884-4.
- [74] WANG Yajun, WANG Qisheng, ZHAN Xueying, *et al.* Visible light driven type II heterostructures and their enhanced photocatalysis properties: A review[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(18): 8326-8339. DOI: 10.1039/c3nr01577g.
- [75] LÜ Pan, DUAN Fang, SHENG Jialiang, *et al.* The 2D/2D p-n heterojunction of ZnCoMOF/g-C₃N₄ with enhanced photocatalytic hydrogen evolution under visible light irradiation[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2021, 35(3): e6124.
- [76] LI Haijin, TU Wenguang, ZHOU Yong, *et al.* Z-scheme photocatalytic systems for promoting photocatalytic performance; Recent progress and future challenges[J]. *Advanced science*, 2016, 3(11): 1500389. DOI: 10.1002/advsc.201500389.
- [77] ZHANG Wenhao, MOHAMED A R, ONG W J. Z-scheme photocatalytic systems for carbon dioxide reduction: Where are we now? [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(51): 22894-22915. DOI: 10.1002/anie.201914925.
- [78] LU Mengfei, LI Qiaoqiao, ZHANG Chengliang, *et al.* Remarkable photocatalytic activity enhancement of CO₂ conversion over 2D/2D g-C₃N₄/BiVO₄ Z-scheme heterojunction promoted by efficient interfacial charge transfer[J]. *Carbon*, 2020, 160: 342-352. DOI: 10.1016/j.carbon.2020.01.038.
- [79] FEI Xingan, ZHANG Liuyang, YU Jianguo, *et al.* DFT study on regulating the electronic structure and CO₂ reduction reaction in BiOBr/sulphur-doped g-C₃N₄ S-scheme heterojunctions[J]. *Frontiers in Nanotechnology*, 2021, 3: 698351. DOI: 10.3389/fnano.2021.698351.
- [80] YANG Chao, ZHANG Qinghe, WANG Wang, *et al.* 2D/2D g-C₃N₄@BiOI S-scheme heterojunction with gas-liquid-solid triphase interface for highly efficient CO₂ photoreduction[J]. *Science China Materials*, 2024, 67(6): 1830-1838. DOI: 10.1007/s40843-024-2789-0.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202401015



维生素 B₆ 的合成代谢及其生产应用

李丹妮, 郑忠亮

(武汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 为了得到环保、便捷且效率更高的维生素 B₆ 代谢生产途径,综述了维生素 B₆ 作为重要的生物活性小分子在不同生物体中参与的自然合成代谢途径及目前研究发现的偶然代谢途径;同时,总结了利用生物酶法与代谢工程生产维生素 B₆ 的生物合成法。结果表明,通过生物合成维生素 B₆ 可以代替化学合成法,但未来仍需要研究者对代谢途径进行不断优化、筛选,以得到更高产量的维生素 B₆。

关键词: 维生素 B₆; 系统代谢工程; 偶然途径; 酶催化

中图分类号: Q 56 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2024)05-0588-08

Synthesis Metabolism and Production Application of Vitamin B₆

LI Danni, ZHENG Zhongliang

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In order to achieve an environmentally friendly, convenient, and more efficient metabolic production pathway for vitamin B₆, the natural metabolic and serendipitous pathways of vitamin B₆ as an important bioactive small molecule in various organisms are comprehensively reviewed. Additionally, the biosynthesis method of vitamin B₆ production by enzyme and metabolic engineering techniques is summarized. The results indicate that biosynthesis can serve as an alternative method to chemical synthesis for producing vitamin B₆. However, further research is needed to continuously optimize and screen the metabolic pathway to obtain higher yields of vitamin B₆.

Keywords: vitamin B₆; system metabolic engineering; serendipitous pathway; enzyme catalysis

维生素 B₆ (vitamin B₆, VB₆) 是一种重要的水溶性 B 族维生素,由吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、磷酸吡哆醇、磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺 6 种形式组成,其中,磷酸吡哆醛(pyridoxal 5-phosphate, PLP) 具有生物活性,磷酸吡哆胺(pyridoxamine 5-phosphate, PMP) 只在较小程度上具有活性。PLP 作为生物体内的活性小分子,以辅酶的形式参与各种代谢过程,至今为止在生物体中发现了 160 多种利用 PLP 作为辅因子的酶,这些 PLP 依赖性酶涵盖了多种反应类型,如外消旋、脱羧、 β/γ -消除和取代反应^[1-3]。最近有研究发现,在自然界早期进化过程中,PLP 和金属的结合可以替代酶促转氨基反应,这些研究结果证明了 PLP 作为常见的辅酶即使在没有酶的情况下也可以充当代谢反应的催化剂^[4]。

在人体的肠道中,只有非磷酸化的 VB₆ 形式才可以进入肠细胞,从肠细胞出去以后在肝脏中被磷酸化,VB₆ 的 6 种形式在不同的细胞中有不同的运输形式。同时,PLP 作为人体中的活性小分子,以辅

收稿日期: 2024-01-18

通信作者: 郑忠亮(1976-),男,副教授,博士,主要从事酶工程、应用生物化学的研究。E-mail: biochem@whu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800190, 81372441)

酶的形式协助酶参与神经递质合成、叶酸合成、血红素生物合成、单碳单元转移, 从而促进核酸生物合成、鞘磷脂合成和碳水化合物的代谢。维生素 B₆ 还与糖尿病、心脏病、癌症、心血管等多种疾病有关^[5-6]。除了与上述疾病的发生机制相关, VB₆ 还可以应用到临床治疗中。新冠肺炎患者通常产生过度的 T 细胞反应和过量的促炎细胞因子来应对病毒, PLP 有助于抑制部分患者的细胞因子风暴与炎症的发生^[7-8]。P57 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂^[9], 它通过调节 VB₆ 代谢, 在低温治疗中有潜在的应用价值。磷酸吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PdxK) 是 P57 在体温调节中的一个未知的靶点, 在临床治疗环境中通过降低体温保护人体组织在神经血管、心血管缺血性疾病中避免造成细胞死亡^[10]。

基于此, 本文综述了维生素 B₆ 的合成代谢及其生产应用。

1 维生素 B₆ 的合成代谢通路

生物体存在 2 种不同的 VB₆ 从头合成途径, 即 5-磷酸脱氧木酮糖(deoxyxylulose 5-phosphate, DXP)依赖性途径和非依赖性途径。DXP 依赖性途径主要存在于 α -和 γ -蛋白细菌中, 如革兰氏阴性模式菌大肠杆菌, 并且在大肠杆菌的这一途径中, 磷酸吡哆醇磷酸酶尚未被鉴定, 可能使用具有非特异性底物的磷酸酶^[1]。DXP 非依赖性生物合成途径仅涉及 PLP 合成酶复合体(PLP synthase complex, PdxST), 在革兰氏阳性模式菌枯草芽孢杆菌、真菌、原生动物、古菌、植物和后生动物中发现。至今为止还没有发现同时具有 2 种 VB₆ 从头合成途径的生物体, 包括人类和其他哺乳动物在内的许多生物体只存在 VB₆ 相互转化的补救途径^[11]。

1.1 DXP 依赖性途径

DXP 依赖性途径含有来自 2 个分支途径的 7 种酶, 均起始于丙三醇的磷酸化途径, 如图 1 所示。

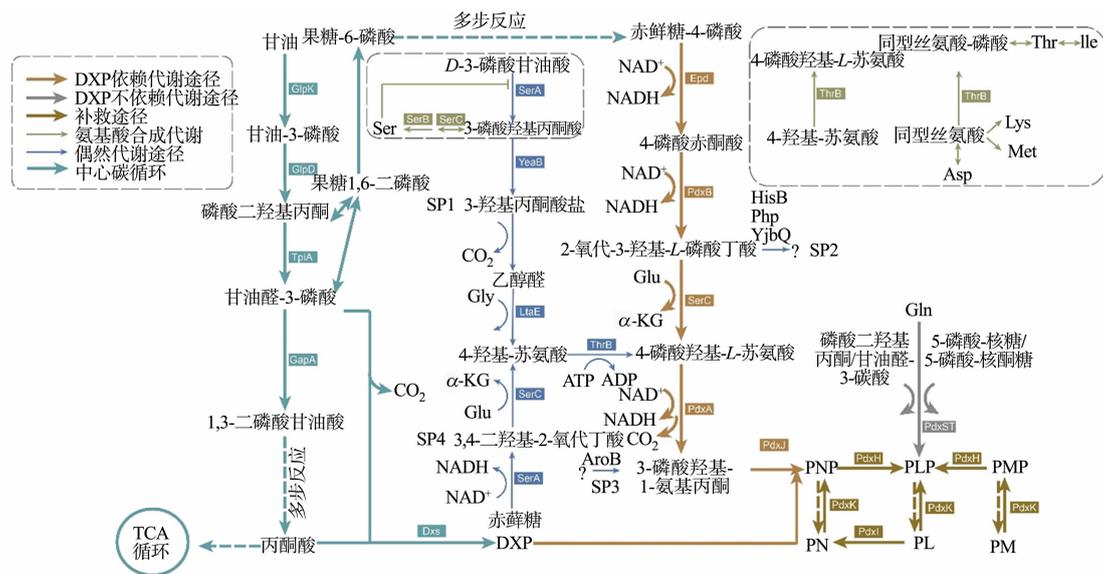


图 1 维生素 B₆ 相关的代谢合成途径

Fig. 1 Metabolic synthesis pathways related to vitamin B₆

4-磷酸赤藓糖(erythrose 4-phosphate, E4P)在 4-磷酸赤藓糖脱氢酶(erythrose 4-phosphate dehydrogenase, Epd)及辅酶 NAD⁺ 的催化下脱氢生成 4-磷酸赤酮酸(4-phosphoerythronate, 4PE), 接着在 4-磷酸赤酮酸脱氢酶(4-phosphoerythronate dehydrogenase, PdxB)及辅酶 NAD⁺ 的催化下脱氢生成 2-氧代-3-羟基-4-磷酸丁酸(2-oxo-3-hydroxy-4-phosphobutanoate, OHPB), PdxB 在一些生物体中被同源酶 PdxR 取代, 如在 *Sinorhizobium meliloti* 中^[12]。OHPB 与谷氨酸(glutamate, Glu)在 3-磷酸丝氨酸氨基转移酶(3-phosphoserineaminotransferase, SerC)的催化作用下生成 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)与 4-磷酸羟基-L-苏氨酸(4-phosphohydroxy-L-threonine, 4HTP), α -KG 可以作为 PdxB 的生理再氧化剂。4HTP 作为底物在 4-磷酸羟基-L-苏氨酸脱氢酶(4-phosphohydroxy-L-threonine dehydrogenase, PdxA)及辅酶 NAD⁺ 的催化下生成 3-磷酸羟基-1-氨基丙酮(3-phosphohydroxy-1-aminoace-

tone, PHA), 3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)与丙酮酸(pyruvate, Pyr)在1-脱氧木酮糖5-磷酸合成酶(1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase, DXS)作用下生成DXP,其与PHA在磷酸吡哆醇合成酶(PNP synthase, PdxI)催化下生成磷酸吡哆醇(pyridoxine 5-phosphate, PNP), PNP在PNP氧化酶(PNP oxidase, PdxH)氧化下生成终产物PLP。

1.2 非DXP依赖性途径

非DXP依赖性途径由PdxST合酶组成,其中PdxT部分亚基通过序列比较预测是I类谷氨酰胺酶家族的成员,特征是半胱氨酸-组氨酸-谷氨酸催化三联体。谷氨酰胺氨基转移酶通常由2个结构域组成,即合酶和谷氨酰胺酶结构域。在谷氨酰胺酶结构域中,谷氨酰胺被水解产生谷氨酸和氨,然后被转移到合酶结构域,并用于合成相应的含氮化合物PLP。谷氨酰胺酰胺转移酶复合物由24个蛋白质单元组成,这些蛋白质单元像齿轮一样组装,是1个与12个PdxT亚基相连的12元体PdxS。在PdxS的N-末端有1个独特的 α -螺旋,命名为 α N,催化与PdxT亚基的相互作用^[11,13]。在模式菌枯草芽孢杆菌的PdxT中, β 3折叠和螺旋 α 3区域之间Gly⁴⁷与Ala⁸⁰的肽氮形成氧阴离子孔,其被发现与PdxS、谷氨酰胺形成三元复合物以进行正确的催化^[14]。该三元结构表明PdxT内部的氧阴离子构象通过与PdxS的 α N相互作用而稳定,也因此证明了二者之间的依赖性。此外,PdxST合酶复合物的结构表明,氨在谷氨酰胺酶和合酶活性位点之间的远程转移通过PdxS β -桶内富含甲硫氨酸的隧道。谷氨酰胺酰胺转移酶复合体结构复杂、催化效率低,不利于通过改造手段提高酶的催化活性,因此,在VB₆发酵生产的改良过程中很少选择这条代谢途径^[1,14]。

1.3 维生素B₆补救途径

在生物体中,无论是否含有维生素B₆的从头合成途径,它都存在补救途径。不含从头合成途径的有机体可以通过从外界吸收吡哆醇(pyridoxine, PN)、吡哆醛(pyridoxal, PL)和吡哆胺(pyridoxamine, PM)在体内相互转化为维生素B₆的6种形式。

补救途径主要含有2种酶:PdxK和PdxH,PN/PL/PM均可以在前者的作用下生成PNP/PLP/PMP。在大肠杆菌和其他原核生物中发现含有由基因*pdxY*编码的同源PL激酶PdxY,PdxY与PdxK激酶具有非常低的序列同一性(约30%),该蛋白也在补救途径中发挥作用,但与PdxK相比,催化活性非常低。PNP与PMP均可以在PdxH的催化下生成PLP,3种磷酸化的VB₆分子在磷酸酶的作用下脱磷酸化。研究者发现,*ybhA*基因编码一种PLP磷酸酶,该酶属于卤酸脱卤酶(HAD)超家族。在大肠杆菌体内发现1种PdxI酶,在辅酶NAPD⁺的协助下,将PL还原成PN。PLP和PMP的互转在转氨酶的作用下进行。据研究,在枯草芽孢杆菌中可能不存在PdxH酶,枯草芽孢杆菌中的*pdxST*敲除突变体对PL是营养缺陷型,而PN与突变体的互补性非常弱。枯草芽孢杆菌可以吸收并磷酸化PL,但很难(或不能)为其生长需求募集PN,这很可能是由于缺乏专用的PNP氧化酶,并且在枯草芽孢杆菌基因组中缺失了编码大肠杆菌PNP氧化酶的*pdxH*同源物^[15-16]。

2 维生素B₆的生产应用

2.1 维生素B₆的生物合成

纵观维生素B₆的生产过程,从化学合成法到采用绿色、环保的微生物发酵,展现了现代生物基因改造手段的不断进化。化学合成大多围绕噁唑法不断改良,产率提高的同时也引发了环保的问题,化学过程使用了过多的溶剂,如苯和甲苯,且工业副产品处理困难、成本高昂,如大量的磷酸盐^[17]。此外,高温和氯化反应增加了安全风险,国内多家工厂曾出现因生产带来污染而停工的现象,通过微生物生产维生素也因此快速发展。

虽然PLP是在生物体内起作用的维生素B₆形式,由于人体肠道无法吸收磷酸化的VB₆,因此,商业化的维生素B₆大多为PN^[6]。VB₆合成的研究集中在DXP依赖途径,所用的工程菌主要有大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*, *S. meliloti*)等。早在20世纪70年代,人们就将目光投入到原核生物上,最早基因工程还没有达到现在的水平,只通过表达野生型菌株得到维生素B₆。随着对微生物体内代谢途径研究的

深入, 研究者开始对上述模式菌株进行简单改造, 通过过表达 VB₆ 合成途径中的一种或多种天然或异源的酶来达到提高 VB₆ 的产量的目的^[18-20]。工程菌生产维生素 B₆ 的优化方式, 如表 1 所示。表 1 中: *t* 为时间; ρ 为产量; Ec 为 *Escherichia coli*; Sm 为 *Sinorhizobium meliloti*; Eme 为 *Ensi fermeliloti*; Gni 为 *Glacielcola nitratreducens*; MM 为基本培养基。

表 1 工程菌生产维生素 B₆ 的优化方式

Tab. 1 Optimization method for producing vitamin B₆ by engineering bacteria

菌株	培养基	优化策略	产物	ρ /mg · L ⁻¹	<i>t</i> /h	文献
<i>Escherichia coli</i>	MM+酵母提取物	<i>epd</i> -Ec, <i>pdxJ</i> -Ec, <i>dxs</i> -Ec	VB ₆	>78	31	[18]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782	MM+酵母提取物	—	PN	103	168	[10]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782	MM+酵母提取物	<i>pdxP</i> -Sm, <i>pdxJ</i> -Ec	PN	149	216	[10]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782	MM+酵母提取物	<i>pdxJ</i> -Sm	PN	362	168	[10]
<i>Sinorhizobium meliloti</i> IFO14782	MM+酵母提取物	<i>epd</i> -Ec, <i>pdxJ</i> -Sm	PN	1 300	168	[10]
<i>Bacillus subtilis</i>	MM+酵母提取物+ 4HT+DX	Δ <i>pdxST</i> , <i>epd</i> -Ec, <i>pdxR</i> 和 <i>serC</i> 一个表达盒, <i>pdxA</i> -Sm 与 <i>pdxJ</i> - Sm 一个表达盒	PN	54	72	[14]
<i>Bacillus subtilis</i>	MM+氨基酸 混合物+4HT	Δ <i>pdxST</i> , <i>pdxA</i> -Ec 与 <i>pdxJ</i> -Sm 一个表达盒, <i>bcaP</i> (Δ 1094 ~ 1 159), P _{spac} <i>dxs</i> <i>erm</i> , Δ <i>trpEDFCAB</i> ; tet P* _{hom} (T63C)	PN	72	72	[15]
<i>Escherichia coli</i>	FM1.4 培养基	Δ <i>pdxH</i> :: <i>pdxST</i> , Δ <i>pta</i> :: Ptac- <i>pdxP</i> (Eme), p15AS1-Ptac- <i>epd</i> (Gni)- <i>pdxB</i> (Ec) - <i>dxs</i> (Eme)- P _{J231119} - <i>serC</i> (Ec), pRSFDuet-1_ P3- <i>pdxA</i> (H136N)- <i>pdxJ</i> (E104T/I218L/G194C)突变体	PN	1 400	48	[1]

Commichau 等^[15]通过在枯草芽孢杆菌中过表达 DXP 依赖性合成维生素 B₆ 途径的 5 个基因生成 PN 生产菌株, 将来源于大肠杆菌和苜蓿中华根瘤菌的基因 *pdxA*, *pdxJ*, *epd*, *serC* 与 *pdxR* 组装到 2 个表达盒中, 并插入到敲除了 *pdxST* 的枯草芽孢杆菌染色体。通过优化生长条件并共同加入 4-羟基-苏氨酸(4-hydroxy-L-threonine, 4HT)和脱氧木酮糖(deoxyxylulose, DX)来提高产率。尽管通过在培养基中加入特定被 4HT 抑制合成的氨基酸可以优化生长条件, 但是氨基酸的存在仍会产生反馈抑制, 改造后的菌株对引入的异源维生素 B₆ 途径的一种或多种酶存在强烈的选择压力, 暴露了异源表达生产 PN 技术的局限性。

前人的研究成果显示, 仅利用过表达某种或某几种基因可能会暂时提高维生素 B₆ 的产量, 但是得到的工程菌不稳定、遗传性差, 远不如通过适应性突变得到的菌株性状稳定, 推测原因有以下 3 点。

1) 参与 DXP 代谢途径的 7 种酶的动力学性质不同, 其中, PdxA 与 PdxJ 属于限速酶, 在代谢通路中催化速率较慢, 而 Epd, PdxB 与 SerC 反应速率快, 如果不控制酶的表达量很容易造成毒性中间产物 4HTP 过度积累, 最终使菌株死亡, 4HTP 合成的过程使同型丝氨酸激酶(homoserine kinase, ThrB)酶促反应功能单一化, 抑制了多种氨基酸的合成(图 1)。

2) 生物体内内环境的调控作用会维持 PLP 的稳定, 据显示, PLP 仅以非常小的催化量被需要, 并且一些酶储存 PLP, 其可以被转移到依赖于 PLP 的载酶。再加上低效的酶通过维生素 B₆ 生物合成途径的代谢通量非常低, 因此, 实际生产中应减弱终产物 PLP 对 VB₆ 合成途径的抑制。

3) 模式菌株被动地转入基因后进行发酵并不稳定, 几代以后容易造成基因丢失, 而通过改变培养环境得到的适应性突变菌株却可以得到稳定的遗传。

有了以上研究经验, 为了提高生产菌的遗传稳定性, Commichau 等^[16]运用适应性突变的策略, 在添加了 4HT 的培养基中获得了耐受型枯草芽孢杆菌突变菌, 并发现 *bcaP* 基因的 1 094~1 159 碱基缺失, 由于该基因编码 *B. subtilis* 和 *Lactococcus lactis* 中的支链氨基酸渗透酶, 推测 *bcaP* 的缺失减慢了

4HT 的吸收速度,并解除了对氨基酸合成的竞争性抑制。*hom-thrC-thrB* 操纵子编码参与苏氨酸生物合成转化的酶,通过适应性突变所得到的耐受型菌株的启动子发生变异,命名该突变为 P_{*hom} (T63C)。 P_{*hom} (T63C)启动子突变导致对苏氨酸抑制的解除,增强了对干扰苏氨酸生物合成的 4-HO-Thr 的抗性。芳香族化合物的积累表明,新的维生素 B₆ 代谢途径与色氨酸生物合成途径之间存在相互干扰。为了防止菌株产生副产物,研究者构建了删除色氨酸操纵子的菌株 $\Delta trpEDFCAB$,发现此时维生素 B₆ 途径和 Trp 生物合成途径之间的干扰解除。为了提高突变株的产率,在添加了 DX 的培养基中获得了适应性突变,在枯草芽孢杆菌中组成型表达生成 DXP 的同源酶(基因型 $P_{spac} dxs erm$),至此,在宿主菌体内产生了非天然 DXP 依赖性 VB₆ 合成途径^[11,16]。

近期,Liu 等^[1]通过迭代多模块优化策略做出了以下改进。

1) 在大肠杆菌系统中解耦连 PN 和 PLP 的生产途径,有机体不会因为 PLP 含量过高而抑制 DXP 依赖途径的发生。在敲除 *pdxH* 基因的位点插入 *pdxSH*,并通过调节核糖体结合位点(ribosome binding site,RBS)强度提高翻译强度。同时,将 PNP 磷酸酶(*PNP phosphatase, pdxP*)基因插入大肠杆菌的磷酸乙酰转移酶(*phosphate acetyltransferase, pta*)基因座中,从而避免了 PNP 积累对氨基酸代谢的抑制。

2) 对关键酶 PdxA 和 PdxJ 进行理性设计,通过将 PdxA 的 His136 位点突变为 Asn 氨基酸,发现可以使酶与底物产生直接相互作用,有利于 PdxA 的稳定催化,从而提高收率。PdxJ 的突变体(E104T/I218L/G194C)也被证明可以提高酶的催化能力。

3) 敲除 3-磷酸甘油酸脱氢酶基因(*3-phospho-D-glycerate dehydrogenase, serA*)补充甘氨酸、 α -KG,促进 SerC 从主要合成丝氨酸转向对 VB₆ 的合成,以甘氨酸(glycine, Gly)替代丝氨酸(serine, Ser),以防止丝氨酸的浓度过高而对菌株造成的生长抑制。 α -KG 作为 PdxB 的生理再氧化剂促进了代谢的进行。

4) 把维生素 B₆ 合成途径划分为上游推动部分和下游拉动部分,在 4HTP 处分离。上游部分由低拷贝质粒表达 *Epd*, *Dxs*, *PdxB* 和 *SerC* 组成,通过提供足够的 DXP 和中间 4HTP 来增强推动驱动力,下游通路由高拷贝质粒表达关键酶 *PdxA* 和 *PdxJ* 组成以增加拉力。

2.2 维生素 B₆ 的偶然途径合成

研究者对模式菌株大肠杆菌与枯草芽孢杆菌突变体进行抑制因子筛选,使其携带天然途径或异源基因的突变,从而揭示了 PLP 生物合成的新途径。这些途径由具有多种底物的非特异性酶和已经参与维生素 B₆ 生物合成的酶组成。因此,*E. coli* 与 *B. subtilis* 含有多种混杂的酶,导致所谓的偶然途径(serendipitous pathway, SP),使细菌绕过被破坏的维生素 B₆ 生物合成途径。

以大肠杆菌为例,截止目前,研究者已发现至少 4 条偶然途径可以在敲除了 VB₆ 合成途径中的酶时提供临时的补充合成途径(图 1)。他们通过将含有 3 276 个来自大肠杆菌的 ORF 引入质粒中,并在敲除 *pdxB* 基因的大肠杆菌中过表达,发现其中有 7 种不同基因的过表达恢复了 $\Delta pdxB$ 菌株的生长。

通路 1 的具体途径已经被研究者诠释,这条途径是通过 YeaB(未知具体功能)、L-丙氨酸醛缩酶(*L-allo-threonine aldolase, LtaE*)和 ThrB 将 3-磷酸羟基丙酮酸盐(3-phosphohydroxy-pyruvate, 3PHP)从丝氨酸合成途径拉向合成维生素 B₆。这种新型代谢途径所产生的中间产物可能含有对宿主生长不利的物质,如 4HT 与 3-羟基丙酮酸(3-hydroxy-pyruvate, 3HP),3HP 抑制丝氨酸和支链氨基酸的产生,而 4HT 干扰苏氨酸的生物合成。正常代谢网络的成分以 3 种方式干扰新的 PLP 合成途径:丝氨酸通过负反馈机制抑制 SerA 作用,并阻止新途径中第 1 个中间体 3PHP 的形成;同型丝氨酸(Homo-serine, Homo-Ser)在新的合成途径中抑制 4HT 向 4HTP 的转化,因为 ThrB 可以非特异性的磷酸化 4HT 与同型丝氨酸;乙酰羧基酸合成酶的同工酶将 3HP 从新的途径中转移出来,形成 1 个代谢产物。

通路 2 由咪唑焦磷酸脱水酶和组氨酸磷酸酶(imidazoleglycerolphosphatedehydratase and histidinol phosphatase, HisB)、Php(未知具体功能)和 YjbQ(未知具体功能)3 种酶构成,通过生成 OHPB 进入代谢途径。

通路 3 目前只发现了 3-脱氢奎尼酸合成酶(*3-dehydroquininate synthase, aroB*)基因,由于 AroB 没有可检测的 4HTP 脱氢酶活性,推测其可能通过生成 PHA 替代原有代谢途径,目前还没有研究对通路

2 和通路 3 进行详细的解释。

近些年,研究者利用 $\Delta pdxB$ 菌株在含有葡萄糖作为唯一碳源的培养基中进化上百代,得到了在葡萄糖中生长旺盛并可以合成 PLP 的菌株发现了第 4 条偶然途径。这条途径由已经参与 VB₆ 合成的 SerA, SerC 和 ThrB 组成,起始于 SerA 对赤藓糖(Erythronate)的氧化,除此以外还发现了这些酶以外的基因突变^[21-24]。

除了在大肠杆菌中,在枯草芽孢杆菌也发现了非天然代谢途径,通过对敲除了 $pdxST$ 基因并插入 $pdxH$ 与 $pdxJ$ 基因的菌株进行适应性实验室进化得到了含有 $\Delta bshC$ 缺陷基因的菌株,再次进行适应性突变得到了 $ytoQ$ (未知具体功能)基因表达增强,使得突变株的 PLP 生成速度达到了与野生型一致的水平^[25-26]。

研究表明,偶然代谢途径的出现并不一定需要该途径中编码酶的基因发生突变,也可能是由于人为突变改变了代谢产物中其他蛋白质和代谢产物的水平,在进化过程中由选择压力形成的新代谢路径中起作用的酶开始对原本结合能力较弱的非天然底物产生作用。偶然途径的出现提示,在模式菌株中合成维生素 B₆ 不仅依赖于天然代谢,还可采用由于酶底物的非特异性而产生的偶然代谢途径,这些途径可以在一定程度上减少合成 VB₆ 所需的步骤。想要利用偶然合成途径需要解决宿主的天然途径对非天然代谢的影响,可以改造偶然途径的非特异性代谢中间酶,将氨基酸合成途径与 VB₆ 代谢途径分开,同时由于丝氨酸的多效性,如果想要提高通路 1 的流通量,可以增加其他中间产物的量,而不应通过在培养基中添加丝氨酸补充物获得。

3 总结与展望

鉴于维生素 B₆ 对疾病治疗、保健品、科研材料、工业生产的重要性,高效、绿色环保、简单快捷地生产 VB₆ 对化学及生物领域仍是不断发展的方向。近年来,随着系统代谢工程的提出,系统生物学、合成生物学、进化工程与传统的代谢工程结合在了一起,从而促进高性能菌株的发展,这些领域的出现也为生物合成 VB₆ 提供了更多的思路。在后续对 VB₆ 合成的研究中,科研工作者不仅要考虑产物的产率,还要从实验菌株的稳定性入手。

从微观角度看,研究可以从 DNA 水平、转录水平、蛋白质翻译水平进行,DNA 水平可以通过 CRISPR-Cas 进行基因编辑、适应性实验室进化(adaptive laboratory evolution, ALE)等技术,从而避免质粒转化造成的基因丢失、菌株性状不稳定;转录水平可以从更换启动子、核糖开关、不同拷贝水平载体入手,也可以通过 CRISPRi, CRISPRa 对转录进行抑制或激活、随机突变等方式改变启动子强度,或者采用动态方式使用可以响应代谢环境变化的启动子;翻译水平可以通过使用稳定性不同的核糖体结合位点实现^[27-30]。

从宏观角度看,可以从已经明晰的主要代谢途径入手,提高碳利用效率,增加主要途径的代谢流量,减少并分离旁支的分流,解除限速步骤,防止中间有毒代谢产物的积累。同时,也需要考虑还原力(NAD⁺/NADP⁺)与能量(ATP)产生与消耗的平衡。有研究者在优化生产 L-赖氨酸时就提出碳通量的可用性对产物的生物合成至关重要,增加前体的供应、增强核心代谢途径、削弱竞争代谢途径是将碳通量引导到产物合成的有效途径。除此以外,还需要考虑产物对代谢调控的抑制,可以通过在宿主体内增强转运蛋白的表达来减弱反馈抑制^[31]。除了主要代谢途径,也可以利用较短的偶然代谢途径,但是需要分开偶然代谢与这些酶参与的其他代谢途径之间的相互作用。

随着计算手段的进步,机器学习在代谢设计的基因注释、途径设计与构建、代谢流量优化等方面均有应用,可以利用 Rosetta, FoldX, Discovery Studio 等软件对酶的结构进行理性设计与改造。酶的设计可以从对酶的底物通道、表面、环(loop)区改造入手,改变酶分子中的通道结构影响底物、产物和反应中间体在酶分子内部的转移。改变酶分子表面的氨基酸可以改变酶与底物、辅酶、反应中间体的相互作用,引入新的相互作用并消除局部的不良效应。Loop 区远离活性位点氨基酸的改造可以通过构象变化影响底物的识别和催化,提高对存在对映体底物的立体选择性^[32-34]。酶的突变可以增强酶的热稳定性或与底物结合能力,使得酶促反应的专一性增强,加快其在代谢通路中的反应进程。

无论是以上哪一种方法都需要不断尝试,目前生物学方法生产维生素 B₆ 因产量低而没有替代化学法,未来仍需要在前人研究的基础上完善、更新传统的方法体系,从而得到可以大规模生产的发酵策略。

参考文献:

- [1] LIU Linxia, LI Jinlong, GAI Yuanming, *et al.* Protein engineering and iterative multimodule optimization for vitamin B₆ production in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5304. DOI: 10. 1038/s41467-023-40928-0.
- [2] DU Yiling, RYAN K. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(3): 430-457. DOI: 10. 1039/c8np00049b.
- [3] LIANG Jing, HAN Qian, TAN Yang, *et al.* Current advances on structure-function relationships of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2019, 6: 4. DOI: 10. 3389/fmolb. 2019. 00004.
- [4] DHERBASSY Q, MAYER R, MUCHOWSKA K, *et al.* Metal-pyridoxal cooperativity in nonenzymatic transamination[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(24): 13357-13370. DOI: 10. 1021/jacs. 3c03542.
- [5] STACH K, STACH W, AUGOFF K. Vitamin B₆ in health and disease[J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 3229. DOI: 10. 3390/nu13093229.
- [6] WILSON M, PLECKO B, MILLS P, *et al.* Disorders affecting vitamin B₆ metabolism[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019, 42(4): 629-646. DOI: 10. 1002/jimd. 12060.
- [7] KUMRUNGSEE T, ZHANG Peipei, CHARTKUL M, *et al.* Potential role of vitamin B₆ in ameliorating the severity of COVID-19 and its complications[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 562051. DOI: 10. 3389/fnut. 2020. 562051.
- [8] ITO T. Role of the conserved pyridoxal 5'-phosphate-binding protein YggS/PLPBP in vitamin B₆ and amino acid homeostasis[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2022, 86(9): 1183-1191. DOI: 10. 1093/bbb/zbac113.
- [9] GUO Hui, TIAN Tao, NAN Kejun, *et al.* P57: A multifunctional protein in cancer (review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2010, 36(6): 1321-1329. DOI: 10. 3892/ij_o_00000617.
- [10] WANG Ruina, XIAO Lei, PAN Jianbo, *et al.* Natural product P57 induces hypothermia through targeting pyridoxal kinase[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5984. DOI: 10. 1038/s41467-023-41435-y.
- [11] ROSENBERG J, ISCHEBECK T, COMMICHAU F. Vitamin B₆ metabolism in microbes and approaches for fermentative production[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(1): 31-40. DOI: 10. 1016/j. biotechadv. 2016. 11. 004.
- [12] TAZOE M, ICHIKAWA K, HOSHINO T. Flavin adenine dinucleotide-dependent 4-phospho-D-erythronate dehydrogenase is responsible for the 4-phosphohydroxy-L-threonine pathway in vitamin B₆ biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(13): 4635-4645. DOI: 10. 1128/JB. 01999-05.
- [13] RICHTS B, ROSENBERG J, COMMICHAU F. A survey of pyridoxal 5'-phosphate-dependent proteins in the gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2019, 6: 32. DOI: 10. 3389/fmolb. 2019. 00032.
- [14] FITZPATRICK T, AMRHEIN N, KAPPES B, *et al.* Two independent routes of de novo vitamin B₆ biosynthesis: Not that different after all[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 407(1): 1-13. DOI: 10. 1042/BJ20070765.
- [15] COMMICHAU F, ALZINGER A, SANDE R, *et al.* Overexpression of a non-native deoxyxylulose-dependent vitamin B₆ pathway in *Bacillus subtilis* for the production of pyridoxine[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 38-49. DOI: 10. 1016/j. ymben. 2014. 06. 007.
- [16] COMMICHAU F, ALZINGER A, SANDE R, *et al.* Engineering *Bacillus subtilis* for the conversion of the antimetabolite 4-hydroxy-L-threonine to pyridoxine[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 196-207. DOI: 10. 1016/j. ymben. 2015. 03. 007.
- [17] 徐勇智, 范卫东, 党登峰, 等. 维生素 B₆ 的合成研究进展[J]. *广州化工*, 2012, 40(12): 50-51. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-9677. 2012. 12. 019.
- [18] TAZOE M, ICHIKAWA K, HOSHINO T. Biosynthesis of vitamin B₆ in *Rhizobium*: *In vitro* synthesis of pyridoxine from 1-deoxy-D-xylulose and 4-hydroxy-L-threonine[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66(4): 934-936. DOI: 10. 1271/bbb. 66. 934.
- [19] HOSHINO T, ICHIKAWA K, TAZOE M. Recombinant microorganism for the production of vitamin B₆: US2006/0228785 A1[P]. 2006-06-15[2024-01-01].
- [20] ACEVEDO-ROCHA C, GRONENBERG L, MACK M, *et al.* Microbial cell factories for the sustainable manufac-

- turing of B vitamins[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 18-29. DOI:10.1016/j.copbio.2018.07.006.
- [21] KIM J, FLOOD J, KRISTOFICH M, *et al.* Hidden resources in the *Escherichia coli* genome restore PLP synthesis and robust growth after deletion of the essential gene *pdxB*[J]. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(48): 24164-24173. DOI:10.1073/pnas.1915569116.
- [22] KIM J, KERSHNER J, NOVIKOV Y, *et al.* Three serendipitous pathways in *E. coli* can bypass a block in pyridoxal-5'-phosphate synthesis[J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6: 436. DOI:10.1038/msb.2010.88.
- [23] KIM J, COPLEY S. Inhibitory cross-talk upon introduction of a new metabolic pathway into an existing metabolic network[J]. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(42): E2856-E2864. DOI:10.1073/pnas.1208509109.
- [24] ROSENBERG J, MULLER P, LENTES S, *et al.* ThrR, a DNA-binding transcription factor involved in controlling threonine biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(5): 879-893. DOI:10.1111/mmi.13429.
- [25] ROSENBERG J, YEAK K, COMMICHAU F. A two-step evolutionary process establishes a non-native vitamin B₆ pathway in *Bacillus subtilis*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 156-168. DOI:10.1111/1462-2920.13950.
- [26] RICHTS B, COMMICHAU F. Underground metabolism facilitates the evolution of novel pathways for vitamin B₆ biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6): 2297-2305. DOI:10.1007/s00253-021-11199-w.
- [27] CHOI K, JANG W, YANG D, *et al.* Systems metabolic engineering strategies: Integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(8): 817-837. DOI:10.1016/j.tibtech.2019.01.003.
- [28] ZHAN Yangyang, XU Yong, ZHENG Pengling, *et al.* Establishment and application of multiplexed CRISPR interference system in *Bacillus licheniformis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 391-403. DOI:10.1007/s00253-019-10230-5.
- [29] 朱欣娜, 戴住波, 樊飞宇, 等. 微生物细胞工厂[J]. *科学通报*, 2023, 68(13): 1626-1636.
- [30] 刘洋, 牟庆璇, 石雅南, 等. 微生物细胞工厂的代谢调控[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1541-1563. DOI:10.13345/j. cj. 200688.
- [31] LIU Jie, OU Ying, XU Jianzhong, *et al.* L-lysine production by systems metabolic engineering of an NADPH auto-regulated *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129701. DOI:10.1016/j.biortech.2023.129701.
- [32] QU Ge, BI Yuexin, LIU Beibei, *et al.* Unlocking the stereoselectivity and substrate acceptance of enzymes: Proline-induced loop engineering test[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(1): e202110793. DOI:10.1002/anie.202110793.
- [33] PRAVDA L, BERKA K, VAREKOVA R, *et al.* Anatomy of enzyme channels[J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1): 379. DOI:10.1186/s12859-014-0379-x.
- [34] XIAO Shifeng, PATSALO V, SHAN Bing, *et al.* Rational modification of protein stability by targeting surface sites leads to complicated results[J]. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(28): 11337-11342. DOI:10.1073/pnas.1222451110.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407011



马来松香聚乙二醇酯表面活性剂的制备及性能分析

王翰文^{1,2,3}, 杨斌⁴, 苏江波⁴, 饶小平^{1,2,3}

- 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;
- 华侨大学 先进碳转化技术研究院, 福建 厦门 361021;
- 华侨大学 生物质低碳转化福建省高校重点实验室, 福建 厦门 361021;
- 福建南平青松化工有限公司 福建省松节油加工重点实验室, 福建 南平 354299)

摘要: 为了解决农用乳化剂对石油依存度大、环境友好性差等问题,以可再生资源松香为原料,经异构化及 Diels-Alder 加成反应合成了马来松香,然后与聚乙二醇 600 反应,合成马来松香聚乙二醇酯表面活性剂 (SM600);用傅里叶红外光谱仪 (FT-IR) 和凝胶色谱仪 (GPC) 对产物的结构进行表征,并对其外观颜色、酸值、水溶液的 pH 值、粘度、浊点、聚合度 (DP) 进行检测,以及对表面张力 (γ)、临界胶束质量分数 (w_{CMC})、泡沫性能 (FP)、乳化性能 (EP) 和亲水亲油平衡值 (HLB) 等表面活性性能进行研究。结果表明:SM600 在室温下呈棕红色液体单相透明,具有酸值低、粘度低及浊点高等特点,其水溶液呈中性,聚合度为 1.81,表面张力和临界胶束质量分数分别为 $36.139 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 和 0.063%,表现出良好的泡沫性能、乳化性能和亲水性。原料天然可再生,合成工艺简单,产品性能良好,可用于替代烷基酚聚氧乙烯醚乳化剂。

关键词: 马来松香聚乙二醇酯表面活性剂; Diels-Alder 加成反应; 松香; 马来松香; 聚乙二醇

中图分类号: TQ 423 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2024)05-0596-07

Preparation and Performance Analysis of Malay Rosin Polyethylene Glycol Ester Surfactants

WANG Hanwen^{1,2,3}, YANG Bin⁴, SU Jiangbo⁴, RAO Xiaoping^{1,2,3}

- College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
- Academy of Advanced Carbon Conversion Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
- Fujian Provincial Key Laboratory of Biomass Low-Carbon Conversion, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
- Fujian Provincial Turpentine Processing Key Laboratory, Fujian Nanping Qingsong Chemical Company Limited, Nanping 354299, China)

Abstract: In order to solve the problems of high dependence on petroleum and poor environmental friendliness of agricultural emulsifiers, rosin, a renewable resource, was utilized as the raw material to synthesize maleic rosin through isomerization and Diels-Alder addition reactions. Subsequently, maleic rosin was reacted with polyethylene glycol 600 to synthesize a malay rosin polyethylene glycol ester surfactant (SM600). The structural characterization of the product was performed using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and gel permeation chromatography (GPC). Additionally, the appearance color, acid value, pH value of the aque-

收稿日期: 2024-07-11

通信作者: 饶小平(1978-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事松香化学品高值化利用的研究。E-mail: raoxp@hqu.edu.cn。

基金项目: 福建省南平市科技计划项目(N2022B005)

ous solution, viscosity, cloud point and degree of polymerization (DP) were measured. Furthermore, surface tension (γ), critical micelle mass fraction (w_{CMC}), foam performance (FP), emulsification performance (EP), and hydrophilic-lipophilic balance (HLB) were studied to evaluate the surface activity performance. The results indicate that SM600 appears as a reddish-brown liquid at room temperature, exhibiting characteristics such as low acid value, low viscosity and high cloud point. Its aqueous solution is neutral with a polymerization degree of 1.81. The surface tension and critical micelle mass fraction are $36.139 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ and 0.063% , respectively, demonstrating excellent foam performance, emulsification performance and hydrophilicity. The raw materials are naturally renewable, the synthesis process is simple, and the product exhibits excellent performance, making it a potential substitute for alkylphenol polyoxyethylene ether emulsifiers.

Keywords: Malay rosin polyethylene glycol ester surfactant (SM600); Diels-Alder addition reaction; rosin; maleic rosin; polyethylene glycol

表面活性剂是一类既含有亲油基团又含有亲水基团的双亲性物质,可显著降低表面或界面张力^[1]。由于其分子结构的特殊性,会自发地在油水界面吸附而形成不同类型的聚集体,这使得表面活性剂在日化、涂料、造纸、农药等领域都有着广泛地应用^[2-3]。在农业领域,农用乳化剂由于具有特殊的分子结构和一系列应用功能,被应用于农业工程、农药助剂及其他相关领域中^[4-5],是配制乳油、微乳剂等农药剂型所不可缺少的成分之一。尤其是国内目前广泛应用的乳油、可湿性粉剂、胶悬剂和水溶剂等用水稀释的剂型,都必须依靠乳化剂对农药的有效组分起乳化、稳定、润湿、分散、展着及渗透等作用^[4,6]。农用乳化剂在农药剂型的配制和赋予有效成分最佳效力等方面起了重要的作用^[5]。我国作为一个农业大国,对农用乳化剂的需求量大,绝大部分农药乳化剂产品是以石化资源为原料的,存在对石油依存度大、环境友好性差等问题^[7]。常用的乳化剂已不能满足性能上的要求,需要制备低毒、安全、高效和环保及功能型的乳化剂以满足农药中不同功能的需要,因而开发乳化能力强、分散性能好、吸附能力更强和安全性好的功能性乳化剂成为主要研究方向^[8-9]。

20 世纪 90 年代,国内外学者开始关注天然植物油、脂肪酸等天然资源作为农用乳化剂原料的可行性^[10-11]。松香因其具有丰富、广泛分布和可再生等特点^[12-15],且具有三环二萜刚性疏水结构,逐渐成为了一种备受关注的乳化剂原料^[14,16]。松香基农用乳化剂具有良好的乳化性能和分散性能^[17],可以将水溶性或油溶性农药、肥料等液态物质与水混合均匀,并提高其粘附性和渗透性,从而增强其在植物表面的吸附和渗透能力,促进农药和肥料的吸收和利用效果^[18]。相比于传统的石油基农用乳化剂,松香基农用乳化剂具有更好的环保性和生物降解性,对环境和人体健康的影响更小。松香三环二萜刚性结构与烷基酚的刚性结构类似,有望替代毒性较强的烷基酚制备乳化剂,同时其三环二萜刚性结构对植物有较好的附着力和润湿性,能够增加农药对植物的附着时间,从而增加药效。因此,本研究通过对天然松香的结构进行改性,从而制备出性能较优良的农用乳化剂。

1 实验部分

1.1 原料、试剂和仪器

湿地松香,工业级(纯度),广东威斯达新材料有限公司;马来酸酐,分析纯,阿拉丁试剂有限公司;聚乙二醇 600(相对分子质量为 600),分析纯,国药集团化学试剂有限公司;抗氧剂 1010,分析纯,阿拉丁试剂有限公司;烷基酚聚氧乙烯醚乳化剂(农乳 600#),工业级,福建南平青松化工有限公司;无水乙醇、氢氧化钾等试剂均为分析纯,厦门晨泓环保科技有限公司。

ZNCL-T 型智能磁力(电热套)搅拌器,巩义市宏华仪器设备工贸有限公司;Sigma 701 型表面张力仪,瑞典百欧林科技有限公司;Thermo Scientific Nicoletis10 型傅里叶变换红外光谱仪,美国赛默飞公司;凝胶渗透色谱仪,美国沃特世公司。

1.2 合成方法

第一步,按照文献[19]的方法制备马来松香。称取 150 g 的湿地松香加入四口烧瓶中,在电加热套上加热到 $120 \text{ }^\circ\text{C}$,使其完全熔融,过程中通入氮气保护;然后,称取 27.5 g 的马来酸酐加入四口瓶,开启机械搅拌,缓慢升高温度到 $190 \text{ }^\circ\text{C}$,反应 4 h。

第二步,称取 615 g 的聚乙二醇 600,缓慢加热到 270 °C,保温反应 6~8 h,过程中进行酸值监控,直至酸值小于 20 mg · g⁻¹;然后降温到 120 °C 以下,称取 1.5 g 的抗氧化剂 1010 加入四口烧瓶中,搅拌均匀后出料,得到产品马来松香聚乙二醇酯(SM600)。

1.3 合成路线

天然松香是松树类树木分泌的一种可再生树脂,其主要成分是松香树脂酸,质量分数达 90%^[13]。松香树脂酸含有独特的三环二萜刚性骨架结构,在一定条件下发生异构化,转化为以枞酸为主的含有共轭双键结构的化合物^[13-14,17]。该化合物能与马来酸酐发生 Diels-Alder 加成反应生成马来松香,然后与聚乙二醇 600 进行酯化反应得到马来松香聚乙二醇酯(SM600)。马来松香聚乙二醇酯表面活性剂的合成线路,如图 1 所示。

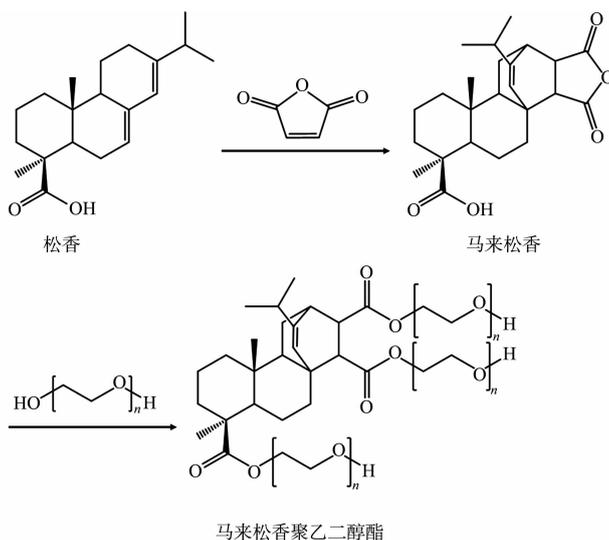


图 1 表面活性剂马来松香聚乙二醇酯的合成路线

Fig. 1 Synthesis of malay rosin polyethylene glycol ester

1.4 结构表征和性能分析

1.4.1 红外光谱(FT-IR)测试 采用 Thermo Scientific Nicolet IS50 型傅里叶变换红外光谱仪对产物进行表征,采用衰减全反射 ATR 测试。

1.4.2 凝胶色谱(GPC)测试 将产品溶解于四氢呋喃中,测试前样品通过孔径为 0.45 μm 的过滤器过滤,以四氢呋喃为流动相,流速为 1 mL · min⁻¹,用凝胶渗透色谱仪测定样品的相对分子质量,检测器为 Water 2487 型紫外检测仪和 Water 2414 型折光指数测定仪,色谱柱为 Styrag HR1 和 HR2(300 mm × 7.8 mm,两根串联);采用单分散聚苯乙烯(相对分子质量为 580~196 000,分散系数为 1.02~1.11)作为标准样品,计算聚合物的相对分子质量及其分布,相关数据由 Water Breeze GPC Software Verson 5.3.1.4 计算获得。

1.4.3 外观颜色分析 采用国家标准 GB/T 3776.3-1983《农药乳化剂乳化性能测定方法》,通过目测观察法来鉴定松香农用乳化剂的外观形貌。

1.4.2 酸值和 pH 值的测定 采用国家标准 GB/T 8146-2003《松香试验方法》的滴定法测试松香农用乳化剂的酸值。预先配制好一定浓度的用邻苯二甲酸氢钾溶液标定的氢氧化钾标准溶液和 10 g · L⁻¹ 的酚酞指示剂,称取试样 2 g(精确至 0.001 g),放置于 250 mL 锥形瓶中;加入 50 mL 中性乙醇溶解,超声辅助溶解,待试样完全溶解,加入 10 g · L⁻¹ 的酚酞指示剂 3~5 滴,然后用 0.5 mol · L⁻¹ 的氢氧化钾标准溶液滴定至微红色,并保持 30 s 不褪色。根据酸值计算公式得出酸值,在同等条件下进行两次平行试验,按下式计算试样的酸值(单位:mg · g⁻¹)。即

$$\text{酸值} = (V - V_1)c \cdot 56.1/m.$$

式中: m 为试样质量,g; V, V_1 分别为滴定试样和滴定空白消耗氢氧化钾标准溶液的体积,mL; c 为氢氧化钾标准溶液的浓度,mol · L⁻¹。

采用国家标准 GB/T 1601-1993《农药 pH 值的测定方法》的测定方法,测试松香农用乳化剂的 pH

值。称取 1 g 试样于 100 mL 烧杯中, 加入 100 mL 水, 剧烈搅拌 1 min, 并静置 1 min; 用校正好的 pH 计测其 pH 值, 至少平行测定三次, 测定结果误差的绝对值小于 0.2, 取平均值即为该试样的 pH 值。

1.4.4 粘度的测定 采用 NDJ-8S 型数字式粘度计测试松香农用乳化剂的粘度。当转子在液体中旋转时, 液体会产生作用在转子上的粘度力矩, 液体的粘度越大, 粘性力矩也越大; 反之, 液体的粘度越小, 粘性力矩也越小。作用在转子上的粘性力矩由传感器检测出来, 经计算机处理后得出被测液体的粘度。每个样品测试 3 次, 取其平均值。

1.4.5 浊点的测定 浊点通常使用 1% 的表面活性剂水溶液测量。浊点范围是 0~100 °C, 受水的冰点和沸点限制。随着温度的升高会出现浑浊现象, 表面活性剂由完全溶解转变为部分溶解, 其转变时的温度即为浊点温度。配制 1% 的乳化剂水溶液于烧杯中, 温度计探头置于烧杯液面以下, 将烧杯置于水浴锅中, 缓慢升高温度, 直至溶液变浑浊, 记录此时温度计读数, 即为该乳化剂浊点。

1.4.6 聚合度(DP)的测定 马来松香聚乙二醇酯是马来松香与聚乙二醇发生酯化反应脱水生成的, 马来松香相对分子质量为 400, 聚乙二醇相对分子质量为 600, 所以单体相对分子质量为 982。因此, 通过 SM600 的重均相对分子质量可以计算聚合度。即

$$\text{聚合度(DP)} = \text{重均相对分子质量} / \text{单体相对分子质量}。$$

1.4.7 表面张力和临界胶束质量分数(w_{CMC})的测定 配制不同质量分数的松香农用乳化剂水溶液, 通过吊环法, 采用 Sigma 701 型表面张力仪测试其表面张力(γ)并得出临界胶束质量分数(w_{CMC})。将样品配置成一系列不同质量分数的水溶液, 测定该样品的表面张力值, 每个质量分数平行测试三次, 取其平均值, 测试温度为(25±0.5) °C, 实验所用水为超纯水(18.2 M Ω ·cm)。

1.4.8 泡沫性能(FP)的测定 在 25 °C 条件下, 配制质量分数为 0.1% 的待测样品水溶液, 移液器移取 20 mL 待测样品水溶液置于 50 mL 具塞量筒中, 盖紧塞子, 以 2 次·s⁻¹ 的速率上下剧烈振荡 30 次, 立即记录此时泡沫的发泡高度; 然后, 水平放置 5 min 后, 记录此时泡沫剩余高度^[20]。重复操作三次, 计算求取其平均值。

1.4.9 乳化性能(EP)的测定 配制质量分数为 0.1% 的待测样品水溶液, 并取两份 40 mL 的待测样品溶液于 100 mL 的具塞量筒中, 再分别加入 40 mL 重油, 上下剧烈震荡 50 次, 静置; 记录分出 10 mL 水相所需时间, 即为目标产物的相对乳化力。该过程重复 3 次, 取其平均值^[20]。

1.4.10 亲水亲油平衡值(HLB)的测定 称取 0.2 g 的待测样品, 溶于 20 mL 的 1,4-二氧六环-苯中(体积比为 90:4); 然后用蒸馏水滴定至溶液出现明显浑浊, 记录蒸馏水所用量 V。所有 HLB 值均在 25 °C 下测量, HLB 值计算式为

$$\text{HLB} = 23.64 \lg V - 10.16。$$

2 实验结果与讨论

2.1 FT-IR 分析

原料及产物的红外光谱图, 如图 2 所示。图 2 中: T 为透过率; σ 为波数。

从图 2 可知: 波数在 3 469.51 cm^{-1} 处为羟基的伸缩振动特征峰, 在 945.69, 846.70 cm^{-1} 处为不饱和和双键中 C—H 的弯曲振动特征峰, 在 2 865.16 cm^{-1} 处为亚甲基—CH₂—的吸收峰, 在 1 720.75 cm^{-1} 处为酯基中 C=O 的特征吸收峰, 在 1 686.48 cm^{-1} 处为羧基中 C=O 的伸缩振动峰, 在 1 386.2 cm^{-1} 处为环的特征吸收峰, 而在 1 096.97 cm^{-1} 处为醇醚键—C—O—C—的吸收峰。

将马来松香聚乙二醇酯与马来松香进行比较, 在 1 840.30, 1 771.16 cm^{-1} 处的酸酐特征吸收峰和在 1 686.48 cm^{-1} 处的羧基特征吸收峰均消失, 出现了 1 720.75 cm^{-1} 处酯的特征吸收峰, 以及 1 096.97

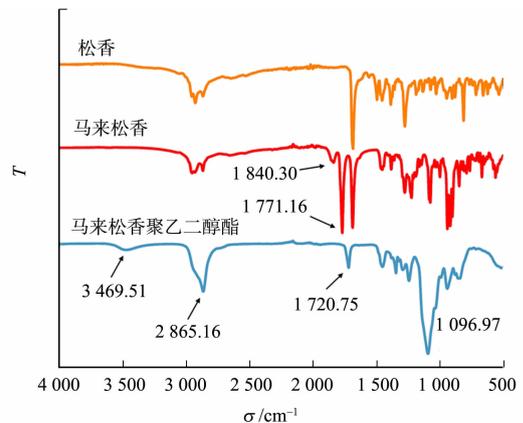


图 2 原料及产物的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of raw materials and products

cm^{-1} 处醇醚键 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 的吸收峰。以上分析说明已经合成马来松香聚乙二醇酯,产物结构正确。

2.2 相对分子质量和聚合度

根据凝胶色谱仪(GPC)测试得到,表面活性剂 SM600 的数均相对分子质量(M_n)为 807,重均相对分子质量(M_w)为 1 463,聚合度(DP)为 1.8。

M_n 往往体现小分子物质在材料中的情况,因为分子量越小会导致分子数据越多;而 M_w 更多是体现大分子物质在材料中的情况,因为分子量越大则单个分子会更重;聚合度(DP)则体现了大分子与小分子的分布情况,系数越接近 1,就代表着聚合物聚合程度越低,分子量分布越小,分子量越集中,所有的分子分子量都在一个比较窄的范围内^[9]。

2.2 基本物理性质分析

2.3.1 外观颜色 在室温下,松香农用乳化剂为棕红色液体,用水稀释 2 倍后,期外观形貌呈浅棕红色单相透明,说明样品不是浑浊的,只是颜色偏深。在农业应用领域中,产品具有颜色会给农户更加直观的感受。

2.3.2 酸值和 pH 值 天然的松香树脂酸结构中含有羧基基团具有一定的酸值^[13,17],其与马来酸酐发生加成反应生成马来松香后,酸值增大,而聚乙二醇结构中含有羟基基团可与马来松香发生酯化反应,使其酸值显著降低。因此,可通过酸值滴定的方式初步判定反应进行的程度。所测得松香农用乳化剂的酸值为 $13.83 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,低于 $20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,其 pH 值为 7.0,呈中性。将其应用于农业领域中,由于低酸值且中性的乳化剂不易水解,对与其复配的农药副作用小,对农作物不会造成伤害,使农业生产的安全性得到保证。

2.3.3 粘度和浊点 根据测试得到松香农乳 SM600 和市售农乳 600# 的粘度和浊点,如表 1 所示。

表 1 两种表面活性剂的粘度和浊点

Tab. 1 Viscosity and cloud point of two surfactants

表面活性剂	粘度/ $\text{mPa} \cdot \text{S}$	浊点/ $^{\circ}\text{C}$
松香农乳 SM600 (马来松香聚乙二醇酯)	646.9	73
市售农乳 600# (烷基酚聚氧乙烯醚)	7 363	66

由表 1 可以知道:室温下松香农乳 SM600 的粘度较小且远低于市售农乳 600#,表明松香农乳 SM600 的流动性很好,更容易均匀分散于溶剂当中;而松香农乳 SM600 的浊点高于市售农乳 600#,说明自制的松香农用乳化剂使用条件较市售农乳更耐高温。

2.4 表面活性性能分析

2.4.1 表面张力及临界胶束质量分数 将松香农乳 SM600 配制成不同质量分数的水溶液,使用 Sigma 701 型全自动表面张力仪,通过吊环法逐个测试表面张力,并作出表面张力(γ)-溶液质量分数(w)的曲线,如图 3 所示。

由图 3 可见,室温下松香农乳 SM600 的表面张力(γ)随着溶液质量分数的增大而减小。当溶液的质量分数达到一定值时,即使再增加,溶液的表面张力也几乎不再降低,此时即为松香农乳 SM600 的表面张力值,对应的质量分数即为其临界胶束质量分数(w_{CMC})。

由图 3 还可知,松香农乳 SM600 的临界胶束质量分数(w_{CMC})为 0.063%,对应的表面张力(γ)为 $36.139 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 。这表明松香农用乳化剂有显著降低液体表面张力的能力^[12],可以增加农作物与复配液之间的附着力,在农药喷洒作业中具有积极作用,并且较低的临界胶束质量分数(w_{CMC})表

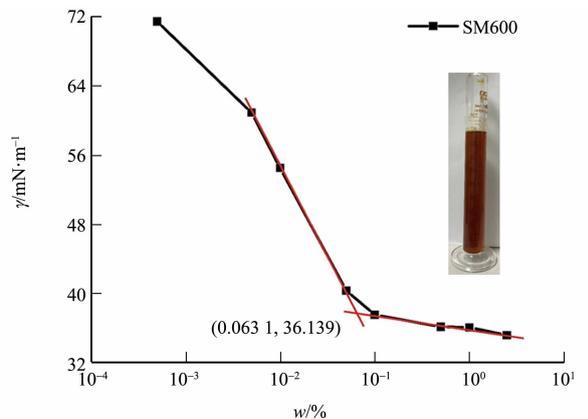


图 3 松香农乳 SM600 的 γ - w 曲线图

Fig. 3 γ - w curves of rosin agricultural milk SM600

明低剂量的松香农乳 SM600 即可起作用,可降低经济成本。

2.4.2 乳化性能、泡沫性能和亲水亲油平衡值 松香农乳 SM600 和市售农乳 600# 的乳化性能(EP)、泡沫性能(FP)、亲水亲油平衡值(HLB),如表 2 所示。

表 2 两种表面活性剂的表面活性
Tab. 2 Surface activity of two surfactants

表面活性剂	$w_{\text{CMC}}/\%$	$\gamma/\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$	EP 值/s	FP 值/mm		HLB 值
				0 min	5 min	
松香农乳 SM600 (马来松香聚乙二醇酯)	0.063	36.139	225	35	25	16.71
市售农乳 600# (烷基酚聚氧乙烯醚)	0.032	42.500	165	32	18	15.61

表面活性剂能够降低液体之间的界面张力,使得油滴或水滴能够更容易地分散在另一种液体中,从而形成稳定的乳液。由于表面活性剂在界面吸附形成界面膜,使得界面膜强度越大,乳状液越稳定,分水时间越长,乳化能力越强^[21]。由表 2 可知:松香农乳 SM600 的乳化性能相比于市售农乳 600# 更好,可以达到 225 s。

表面活性剂之所以具有泡沫性能,是因为它们能够降低液体表面的张力,并在液体表面形成一层薄膜,当形成这样的表面膜时,表面活性剂分子能够将液体表面张力降低到足以容纳气泡形成的程度,并保持泡沫的稳定性^[21]。松香农乳 SM600 的泡沫性能略好于市售农乳 600#,起泡高度达到 35 mm,在 5 min 后,其对应的泡沫高度为 25 mm。

HLB 值是来定量描述表面活性剂的亲水亲油性。HLB 值越大,亲水性越强,HLB 值越小,亲油性越强^[22]。由表 2 可知:松香农乳 SM600 和市售农乳 600# 的亲水亲油平衡值(HLB)分别为 16.71 和 15.61,两者的亲水性相当。

3 结论

1) 以天然松香为原料,先合成马来松香,再与聚乙二醇 600 反应,合成了马来松香聚乙二醇酯表面活性剂(SM600),并用红外光谱仪和凝胶色谱仪对结构进行了确证。

2) 室温下,松香农乳 SM600 为红棕色液体单相透明,具有较低酸值且水溶液呈中性,粘度低流动性好,浊点为 73 ℃,较市售农乳 600# 更耐高温。

3) 松香农乳 SM600 具有很好的表面活性性能,其 w_{CMC} 和 γ 值分别为 0.063% 和 36.139 mN·m⁻¹,相对乳化力达到 225 s,起泡高度达到 35 mm,5 min 后泡沫高度为 25 mm,且其 HLB 值为 16.71,具有较好的亲水性。

参考文献:

- [1] 崔正刚. 表面活性剂、胶体与界面化学基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [2] 裴鸿, 张利国. 2017 年中国表面活性剂原料及产品产销统计分析[J]. 日用化学品科学, 2018, 41(4): 1-6. DOI: 10.13222/j.cnki.dc.2018.04.001.
- [3] 黄旭娟, 刘鹤, 王磊, 等. 聚合植物油脂表面活性剂的制备及其结构与性能[J]. 化工进展, 2016, 35(2): 575-580. DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2016.02.037.
- [4] FAN Yaxun, WANG Yilin. Deposition and spread of aqueous pesticide droplets on hydrophobic/superhydrophobic surfaces by fast aggregation of surfactants[J]. Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2023, 39(16): 5631-5640. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c00282.
- [5] BAO Zhenping, WU Yanling, SONG Ridan, et al. The simple strategy to improve pesticide bioavailability and minimize environmental risk by effective and ecofriendly surfactants[J]. Science of The Total Environment, 2022, 851(Pt 1), 158169. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158169.
- [6] 汪侠. 表面活性剂研发现状及未来发展前景研究[J]. 化工设计通讯, 2023, 49(4): 55-57. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6490.2023.04.020.

- [7] JOHNSON P, TRYBALA A, STAROV V, *et al.* Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2021, 288: 102340. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102340.
- [8] REBELLO S, ASOK A K, MUNDAYOOR S, *et al.* Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2014, 12(2): 275-287. DOI: 10.1007/s10311-014-0466-2.
- [9] 王翔, 代加林, 杨梦. 高分子表面活性剂的发展及应用现状 [J]. *塑料工业*, 2007(增刊 1): 22-24, 35. DOI: 10.3321/j.issn:1005-5770.2007.z1.006.
- [10] 唐胜男, 张安琪. 绿色表面活性剂分类综述 [J]. *中国化妆品*, 2023(4): 104-108.
- [11] PRADHAN A, BHATTACHARYYA A. Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 150: 127-134. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.03.013.
- [12] 叶圣丰, 翟兆兰, 饶小平, 等. 松香基表面活性剂研究进展 [J]. *生物质化学工程*, 2022, 56(3): 67-74. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5854.2022.03.010.
- [13] 宋湛谦. 松香化学与应用 [J]. *化工时刊*, 1990(7): 11-18.
- [14] 宋湛谦. 松香的精细化工利用(I): 松香的组成与性质 [J]. *林产化工通讯*, 2002(4): 29-33. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5854.2002.04.009.
- [15] WANG Hanwen, ZHANG Hangyuan, WU Qian, *et al.* Pickering emulsions and viscoelastic solutions constructed by a rosin-based CO₂-responsive surfactant [J]. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2023, 39(44), 15653-15664. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c02085.
- [16] 周永红, 宋湛谦. 松香的精细化工利用(IV): 松香类表面活性剂的合成与应用 [J]. *林产化工通讯*, 2003(1): 28-32. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5854.2003.01.008.
- [17] 任天瑞, 李永红. 松香化学及其应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [18] 郑建强, 刘莉, 饶小平, 等. 松香基胆碱季铵盐表面活性剂的合成及抑菌活性研究 [J]. *林产化学与工业*, 2015, 35(5): 98-104. DOI: 10.3969/j.issn.0253-2417.2015.05.016.
- [19] YAN Xinyan, ZHAI Zhaolan, XU Ji, *et al.* CO₂-responsive pickering emulsions stabilized by a bio-based rigid surfactant with nanosilica [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(41), 10769-10776. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03458.
- [20] 王丽艳, 杨佳, 李云晴, 等. 含多官能团 Gemini 表面活性剂的合成及性能 [J]. *化工进展*, 2020, 39(8): 3278-3286. DOI: 10.16085/j.issn.1000-6613.2019-1570.
- [21] KAIZU K, ALEXANDRIDIS P. Effect of surfactant phase behavior on emulsification [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 466: 138-149. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.10.016.
- [22] 王早骧. 表面活性剂的亲水亲油平衡(HLB)及其在农药制剂研究中的应用 [J]. *精细化工*, 1986(2): 7-22. DOI: 10.13550/j.jxhg.1986.02.002.

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202406020



一例钙金属-有机骨架的合成 及其结构与性质分析

王伟娟¹, 黄丽丽², 林知秋², 卢冬飞², 史荣会², 刘耀³, 洪俊明¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建理工大学 生态环境与城市建设学院, 福建 福州 350118;

3. 福建省恒申化工科技有限公司, 福建 福州 350500)

摘要: 通过溶剂热合成法, 获得一例钙金属-有机骨架 $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$, 其中, 甲酸配体由溶剂 N,N -二甲基甲酰胺原位分解生成。利用 X-射线单晶衍射、傅里叶变换红外光谱、热重分析和荧光分光光度法, 对 $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$ 晶体结构和性质进行分析与表征。结果表明: 该化合物属于三斜晶系, $p1$ 空间群, 晶胞参数为 $a=0.671\ 86(6)\ \text{nm}$, $b=0.975\ 79(7)\ \text{nm}$, $c=0.984\ 60(9)\ \text{nm}$, $V=0.563\ 05(9)\ \text{nm}^3$, $Z=1$; $\text{Ca}(\text{II})$ 离子(8配位)之间通过共用乙酸上的羧基氧形成一维链, 链的两侧由羧基氧与 $\text{Ca}(\text{II})$ 离子(7配位)配位形成三明治的夹层, 每个夹层不断重复与乙酸配体配位形成二维层, 层与层之间通过甲酸配体的两个羧基氧分别与层中两种配位模式的 $\text{Ca}(\text{II})$ 离子连接形成三维有机骨架; 该化合物具有良好的稳定性, 在紫外光下可观察到绿光。

关键词: 钙金属-有机骨架; 溶剂热合成法; 晶体结构; 荧光性质

中图分类号: O 641.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2024)05-0603-07

Preparation and Evaluation of Astaxanthin Composite Nanoparticles Pickering Emulsion

WANG Weijuan¹, HUANG Lili², LIN Zhiqiu², LU Dongfei²,
SHI Ronghui², LIU Yao³, HONG Junming¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. School of Ecological Environment and Urban Construction, Fujian University of Technology, Fuzhou 350118, China;

3. Fujian Highsun Chemical Technology Limited Company, Fuzhou 350500, China)

Abstract: A calcium metal-organic framework $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$ was obtained by solvothermal synthesis method, in which the formic acid ligand was generated by *in-situ* decomposition of the solvent N,N -dimethylformamide. The crystal structure and properties of $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$ were analyzed and characterized using X-ray single-crystal diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis and fluorescence spectrophotometry. The results show that the compound belongs to the triclinic crystal system with $p1$ space group, the unit cell parameters are $a=0.671\ 86(6)\ \text{nm}$, $b=0.975\ 79(7)\ \text{nm}$, $c=$

收稿日期: 2024-06-28

通信作者: 王伟娟(1991-), 女, 助理实验师, 主要从事电催化二氧化碳还原技术的研究。E-mail: wangweijuan@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21901040); 福建省自然科学基金资助项目(2023J01931); 华侨大学校级实验教学改革与管理课题(SY2023J08)

0.984 60(9) nm, $V=0.563\ 05(9)\ \text{nm}^3$, and $Z=1$. Ca(II) ions (octacoordinate) form one-dimensional chains by sharing carboxyl oxygen on acetic acid, and the two sides of the chain are sandwiched by carboxyl oxygen coordinating with Ca(II) ions (heptacoordinate) to form sandwich layers. Each sandwich layer repeatedly coordinates with acetic acid ligands to form two-dimensional layers, and the two carboxyl oxygen groups of formic acid ligands are connected to Ca(II) ions in the two coordination modes of the layers to form a three-dimensional organic skeleton. This compound has good stability and green light can be observed under ultraviolet light.

Keywords: Ca metal-organic frameworks; solvothermal synthesis method; crystal structure; fluorescence

金属-有机骨架(MOFs)又称多孔配位聚合物,由金属离子/簇与有机配体通过配位作用自组装构建形成,是一种新兴的无机-有机杂化多孔材料,因其具有高比表面积和孔隙率、结构可调控、高化学稳定性等优点,在吸附、分离、气体存储、荧光传感、药物输送等领域得到了广泛的应用^[1-2]。钙金属-有机骨架(Ca-MOFs)除了具有 MOFs 的上述优点,还因钙离子独特的物理化学性质具有稳定性高、生物相容性高、毒性低、价格低的优点,作为荧光传感器可以有效避免重金属离子的二次污染,在生物医药等领域也具有良好应用价值^[3-5]。目前,与过渡金属类和稀土金属类的 MOFs 相比较,被合成的 Ca-MOFs 仍然很少。原因主要有以下 3 个方面^[6-7]: 1) 钙元素的氧化态单一,大部分情况下钙离子仅作为平衡阳离子; 2) 钙原子易失电子生成 Ca(II)离子,其离子半径相比于同周期的过渡金属较大,这种小电荷、大体积的特点使钙离子容易同时与多个供电子的原子/离子(如 O, N 和卤素离子,主要为 O)进行配位,由于离子键的无方向性,导致其配位数高且多变,配位构型多种多样,难以预测; 3) 钙离子的溶剂效应强,易与溶剂配位,也会抑制其配位作用。

基于此,本文首次报道同时与乙酸、甲酸配位的三维金属-有机骨架 $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$,其中,甲酸配体由溶剂 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)原位分解生成^[8],并通过 X-射线单晶衍射、傅里叶变换红外光谱、热重分析和荧光分光光度法对其进行分析与表征^[9-10]。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

冰醋酸、无水氯化钙、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)均为商购分析纯,使用前未进一步提纯。

Mercury CCD 型 X 射线单晶衍射仪(日本 Rigaku 公司); Mini Flex II 型 X 射线粉末衍射仪(日本 Rigaku 公司, Cu 靶, $\lambda=0.154\ 056\ \text{nm}$); STA 449F3 型热重分析仪(德国 NETZSCH 公司); LS55 型荧光光谱仪(美国 Perkin Elemer 公司); Magna 750 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)。

1.2 化合物 $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$ 的合成

在一个含有 3.0 mL DMF 的 20 mL 玻璃瓶内加入 6 mg, 0.054 mmol 无水 CaCl_2 和 200 μL 冰醋酸,通过搅拌使药品完全溶解,将该玻璃瓶置于 120 $^\circ\text{C}$ 烘箱中反应 7 d。反应结束后可得到大量薄片状白色晶体化合物,用 DMF 冲洗 2 次,乙醇冲洗 1 次,自然晾干,备用。

1.3 化合物的单晶结构测定

借助光学显微镜选择合适的白色片状晶体,在 Mercury CCD 型 X 射线单晶衍射仪上进行衍射数据收集,采用 $\text{MoK}\alpha$ 射线($\lambda=0.071\ 07\ \text{nm}$),在 293 K 下通过窄边框方法收集强度数据。衍射收集到的数据通过吸收因子、洛伦兹和极化因子校正,使用 Olex2 中的 SHELXS-2015 和 SHELXL-2015 程序^[11-12],直接法解析、全矩阵最小二乘法精修晶体结构。化合物的晶体学及精修数据,如表 1 所示。表 1 中: a, b, c 为棱长; α, β, γ 为轴角; M_r 为相对分子质量; V 为体积; Z 为分子数; $\mu(\text{MoK}\alpha)$ 为周期性; T 为温度; $F(000)$ 为结构因子。化合物的主要键长(l)、键角(φ),如表 2, 3 所示。表 2 中:³ 表示精修操作码为 $-1+X, +Y, +Z$; ⁴ 表示精修操作码为 $1-X, -Y, -Z$; ⁵ 表示精修操作码为 $1-X, -Y, 1-Z$; ⁶ 表示精修操作码为 $1+X, +Y, +Z$ 。表 3 中:^a 表示精修操作码为 $-X, -1-Y, -Z$; ^c 表示精修操作码为 $1-X, -Y, -Z$; ^d 表示精修操作码为 $-1+X, +Y, +Z$; ^e 表示精修操作码为 $1-X, -Y, 1-Z$; ^f 表示精修操作码为 $1+X, +Y, +Z$ 。更多详细数据参见英国剑桥国际晶体学数据库中登记号为 2366120 的

CIF 格式晶体学文件, 数据库官方网站为 <https://www.ccdc.cam.ac.uk>。

表 1 化合物的晶体学及精修数据

Tab. 1 Crystallographic and refinement data of compound

参数	数据	参数	数据	参数	数据
分子式	C ₁₃ H ₁₇ Ca ₄ O ₁₆	$\alpha/(\circ)$	110.875(8)	$\mu(\text{MoK}\alpha)/\text{mm}^{-1}$	1.742
晶系	三斜晶系	$\beta/(\circ)$	96.336(7)	$F(000)$	304.0
空间群	<i>P</i> -1	$\gamma/(\circ)$	106.897(7)	T/K	293(2)
a/nm	0.671 86(6)	M_r	590.59	优度因子	1.060
b/nm	0.975 79(7)	V/nm^3	0.563 05(9)		
c/nm	0.984 60(9)	Z	1		

表 2 化合物的主要键长

(单位: nm)

Tab. 2 Main bond lengths of compound

(unit: nm)

键	l	键	l	键	l
Ca1—O1	0.233 37(16)	Ca2—O1	0.262 46(17)	Ca2—O4	0.242 70(16)
Ca1—O2 ³	0.230 33(16)	Ca2—O2	0.246 57(17)	Ca2—O4 ⁴	0.246 26(18)
Ca1—O3	0.252 99(17)	Ca2—O3 ⁶	0.248 32(16)	Ca2—O5	0.232 92(16)
Ca1—O5 ⁴	0.251 45(18)	Ca2—O3 ⁴	0.286 24(19)	Ca2—O7	0.228 10(2)
Ca1—O8 ⁵	0.226 00(2)				

表 3 化合物的主要键角

(单位: \circ)

Tab. 3 Main bond angles of compound

(unit: \circ)

键角	φ	键角	φ	键角	φ	键角	φ
O6—Ca1—O6 ^a	65.42(8)	O4—Ca2—O4 ^c	74.89(6)	O5—Ca2—O2	151.44(6)	Ca2 ^d —O3—Ca1	104.05(6)
O6—Ca1—O3	165.80(7)	O1—Ca1—O3	89.41(6)	O7—Ca2—O1	82.82(7)	Ca2 ^d —O3—Ca2 ^c	110.65(6)
O6—Ca1—O5 ^c	114.19(7)	O1—Ca1—O5 ^c	83.87(6)	O7—Ca2—O2	91.21(7)	Ca2—O4—Ca2 ^c	105.11(6)
O4 ^c —Ca2—O1	78.58(6)	O2 ^d —Ca1—O6 ¹	103.18(7)	O7—Ca2—O3 ^f	90.16(7)	Ca2—O5—Ca1 ^e	113.52(7)
O4—Ca2—O1	75.51(6)	O2 ^d —Ca1—O6	94.07(7)	O7—Ca2—O3 ^c	154.84(7)	O1—Ca2—O3 ^c	119.81(5)
O4—Ca2—O2	125.54(6)	O2 ^d —Ca1—O1	162.32(6)	O7—Ca2—O4	87.51(7)	O2—Ca2—O1	50.41(5)
O4 ^c —Ca2—O2	87.29(6)	O2 ^d —Ca1—O3	72.94(6)	O7—Ca2—O4 ^c	157.00(7)	O2—Ca2—O3 ^c	95.50(6)
O1—Ca1—O6 ^a	110.393(18)	O2 ^d —Ca1—O5 ^c	89.75(6)	O7—Ca2—O5	93.97(7)	O2—Ca2—O3 ^f	71.13(6)
O1—Ca1—O6	66.701(13)	O5—Ca2—O1	158.15(6)	O8 ^f —Ca1—O1	87.82(8)	O3 ^f —Ca2—O1	120.71(5)
O4 ^c —Ca2—O3 ^f	110.93(6)	O5—Ca2—O3 ^c	69.13(6)	O8 ^f —Ca1—O2 ^d	92.35(8)	O4 ^c —Ca2—O3 ^c	47.90(5)
O4—Ca2—O3 ^f	163.18(6)	O5—Ca2—O3 ^f	80.78(6)	O8 ^f —Ca1—O3	87.99(8)	O5—Ca2—O4	82.77(6)
O4—Ca2—O3 ^c	107.78(5)	O5—Ca2—O4 ^c	98.27(6)	O8 ^f —Ca1—O5 ^c	158.68(8)	Ca1—O3—Ca2 ^c	97.26(6)

2 晶体结构描述与讨论

通过溶剂热反应,以乙酸和无水氯化钙为原料,将 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂分解生成的甲酸作为第 2 配体,合成金属-有机骨架[Ca₂(CH₃COO)₃(HCOO)](化合物)。根据表 1 可知,化合物空间群为三斜 *P*-1。化合物的晶体结构图,如图 1 所示。由图 1 可知:化合物的最小不对称单元是由 2 个 Ca(II)离子、3 个乙酸离子与 1 个甲酸离子组成;Ca(II)离子(Ca1)由 5 个乙酸配体的 6 个羧基氧配位和 1 个甲酸上的羧基氧形成 7 配位环境;而 Ca(II)离子(Ca2)由 5 个乙酸配体的 7 个羧基氧配位和 1 个甲酸上的羧基氧形成 8 配位环境;Ca(II)离子(Ca1)与(Ca2)通过共用 2 个乙酸配体上的羧基氧(O1, O2, O14)形成 2 核簇中心。Ca—O 键之间的距离分布在 0.226 00(2)~0.286 24(19) nm,这与文献[13-14]报道的 Ca—O 键键长相符合。

Ca(II)离子(Ca2)之间通过共用 2 个乙酸上的羧基氧形成 1 条链,链的两侧是由 Ca(II)离子(Ca2)配位的羧基氧与 Ca(II)离子(Ca1)配位形成三明治的夹层,每个三明治夹层通过乙酸配体不断重复配位形成二维层,层与层之间通过乙酸配体的 2 个羧基氧分别与层中的每个 Ca(II)离子(Ca2)和(Ca1)配位形成三维有机骨架,如图 2 所示。

Hirshfeld 表面分析是一种分析分子表面作用力常用的手段,基于 Hirshfeld 表面到内部最近的原

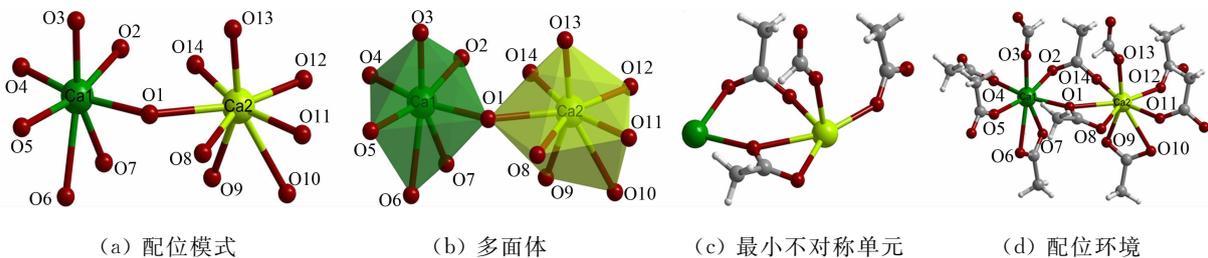


图1 化合物的晶体结构图

Fig. 1 Crystal structure diagram of compound

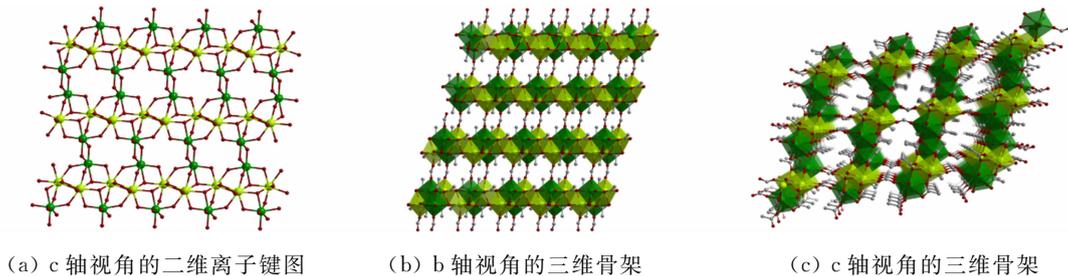


图2 化合物的二维与三维骨架

Fig. 2 Two-dimensional and three-dimensional skeletons of compound

子核的距离(d_i)、Hirshfeld表面到表面外最近的原子核的距离(d_e)和原子的范德华半径,根据计算出的电子分布作为球形原子电子密度的总和进行识别^[15-16]。将配合物单晶结构数据中的CIF文件导入到Crystal Explorer 17.5软件中,计算可得Hirshfeld表面作用力的分布情况,并形象地将分子间的相互作用力用三维模型展现出来,得到d norm图。d norm图用于表示分子间强烈的相互作用,如氢键和范德华力作用,而分子间表面作用力类型的定量分析结果可通过2D指纹图谱展示。

选取化合物的最小不对称单元进行Hirshfeld分析,结果如图3所示。由图3可以看出,d norm表面范围为 $-0.069\ 68\sim 0.102\ 54$ nm,其中,明亮的红色斑点代表在化合物分子表面占主导地位的是H-H,C-H,O-H之间的相互作用力,颜色最深的红色斑点代表氢原子之间的范德华力,颜色稍浅的是O-H \cdots O氢键及O-O之间的弱相互作用力。

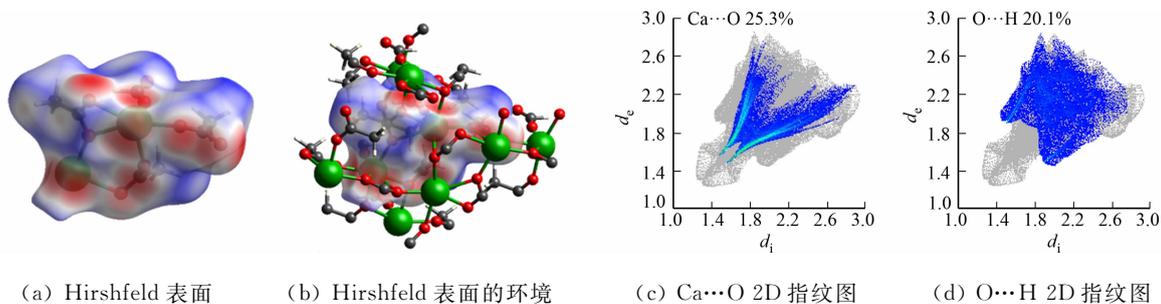


图3 化合物最小不对称单元的Hirshfeld表面和2D指纹图

Fig. 3 Hirshfeld surface and 2D fingerprint of smallest asymmetric unit of compound

化合物的2D指纹图,如图4所示。不同的分子间相互作用对应着不同的2D指纹区,其中一个分子充当供体($d_e > d_i$)和另一个分子作为受体($d_e < d_i$),因此能够给出晶体内部各分子间相互作用及各连接作用对整体的贡献程度,还可以分解、突出特定原子对之间的相互作用^[17]。这种分解能够从Hirshfeld表面中分离出各种类型的分子作用力情况,并用明确的数值表示其对整个Hirshfeld表面的贡献作用。

由图3,4可知:化合物中的H-H相互作用即氢原子之间范德华力作用占了整个Hirshfeld表面作用的34.9%,起主导作用,蓝色区域代表作用力位置;C-H相互作用代表了碳原子与氢原子之间的范德华力作用,占整个Hirshfeld表面作用的3.7%;O-H相互作用,在化合物中则代表了C-H \cdots O常规氢键和O-H \cdots O非常规氢键作用,占整个Hirshfeld表面作用的20.1%;O-O和C-O在整个表面作用中分别占13.3%和1.3%,可以看出在整个配合物结构中氢键作用明显。

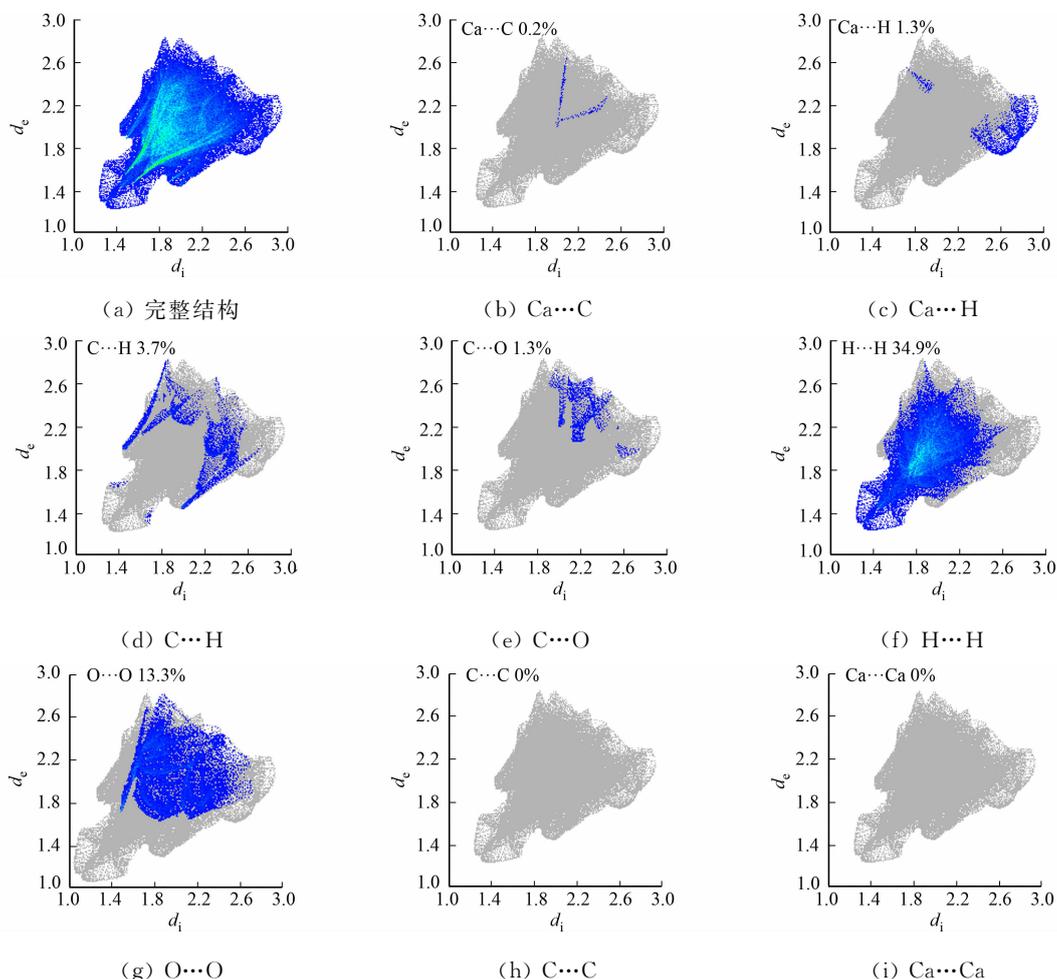


图4 化合物的2D指纹图

Fig. 4 2D fingerprint images of compound

3 表征与光谱性质

3.1 粉末衍射表征

为检测化合物样品的纯度,采用 Mini Flex II 型 X 射线粉末衍射仪(Cu 靶, $\lambda = 0.154\ 056\ \text{nm}$)收集化合物的粉末 X 射线衍射(PXRD)数据,扫描速率为 $2^\circ \cdot \text{s}^{-1}$,扫描范围为 $5^\circ \sim 50^\circ$ 。化合物的 XRD 粉末衍射结果,如图 5(a)所示。由图 5(a)可知:化合物的实验测试值与计算机模拟的衍射峰位置基本相一致,说明化合物的样品为纯相。

3.2 红外光谱分析

对化合物采用 KBr 压片法制样,通过傅里叶变换红外光谱仪测定其在波数(ν)为 $400 \sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 范围内的红外光谱,如图 5(b)所示。由图 5(b)可知:化合物分别在 $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 610\ \text{cm}^{-1}$ 左右有较强的吸收峰,归属为化合物中 COO 官能团的对称伸缩振动峰和不对称伸缩振动峰,而原本甲酸和乙酸配体中的羧酸 C=O 双键在 $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 左右伸缩振动吸收峰消失^[18-19]。这表明化合物结构中来自甲酸和乙酸配体上的羧基已经完全去质子化,且去质子化的羧基氧原子参与了与 Ca(II) 离子的配位^[20-21]。

3.3 热稳定性分析

使用 STA 449F3 型热重分析仪对化合物进行热稳定性测定。测试在氮气氛围下进行,升温速度为 $10\ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 。化合物的热重曲线,如图 5(c)所示。图 5(c)中: w 为质量分数; θ_{TC} 为温度。由图 5(c)可知:化合物随着温度的升高开始失重,到 $232\ \text{C}$ 时,失重约 14.71% ,对应的理论值为 15.03% ,可归属为化合物中的 1 个配位的甲酸基团的脱除;随后热重曲线趋于平稳,样品没有发生分解;从 $343\ \text{C}$ 起,化合物整个框架结构发生热解, $731\ \text{C}$ 时,配体全部失去,热重曲线趋于稳定,失重约 51.21% ,理论值为

51.22%，可能归属为化合物中的2个配位的乙酸基团的脱除；自731~900℃，热重曲线趋于平稳。

3.4 固体荧光性质分析

化合物的固体粉末样品在日光下为白色，在365 nm紫外灯照射下发射黄绿光。基于此，在室温下将激发光波长固定为365 nm，对化合物进行固体荧光测试，得到化合物的激发光谱和荧光发射光谱，如图5(d)所示。图5(d)中： λ 为波长。由5(d)可知：化合物的最大荧光发射峰波长为525 nm，处于绿光波长(490~570 nm)范围内，因此，化合物发绿光，与观察到的现象相符。

室温下以365 nm为激发波长，检测525 nm信号峰随时间的衰减曲线，得到固态荧光寿命衰减曲线，如图5(e)所示。图5(e)中： t 为时间。拟合计算可得常温下固体配合物的荧光寿命为5.91 ns。

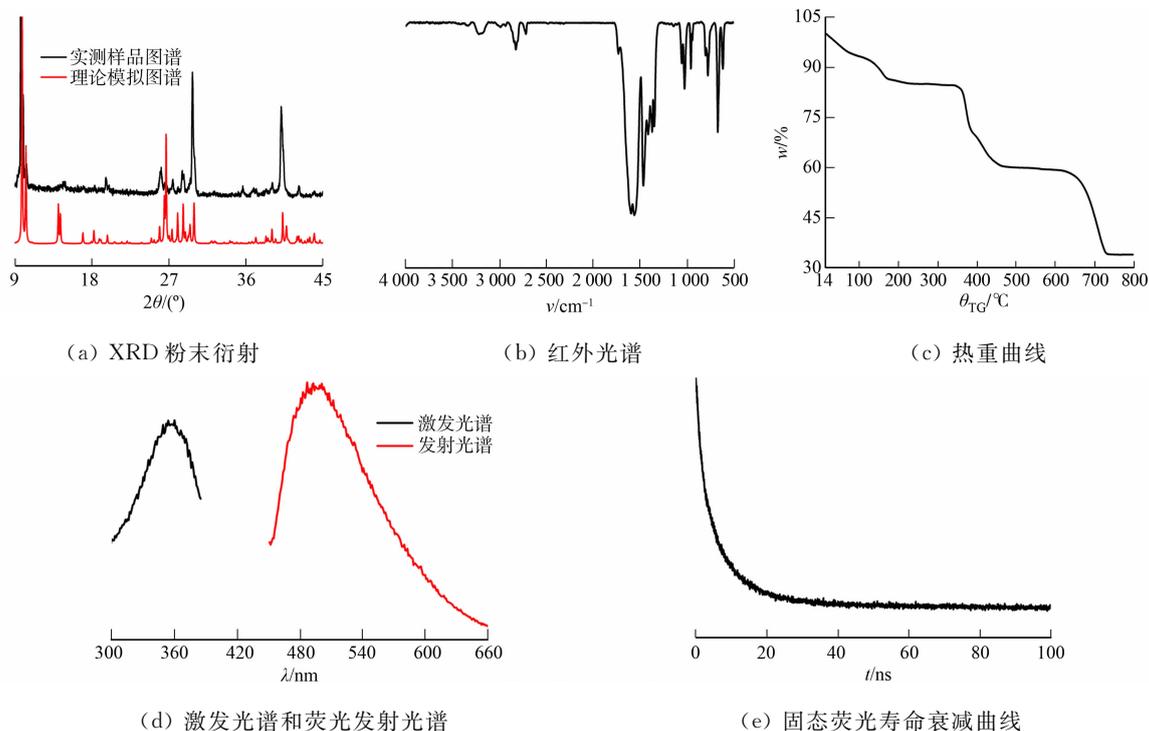


图5 化合物的表征

Fig. 5 Characterization of compound

4 结束语

通过溶剂热法，将乙酸和无水氯化钙作为原料，*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂原位分解生成的甲酸作为第二配体合成了具有三维结构的钙金属-有机骨架 $[\text{Ca}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{HCOO})]$ ，丰富了Ca-MOFs的结构种类。羧酸配体的O原子同时含有孤对电子和成单电子，且原子半径小、极性大，是很好的配位键电子给予体，能够形成丰富的氢键，更有利于形成超分子体系，改善荧光性能。该化合物中8配位的Ca(II)离子之间通过共用乙酸上的羧基氧形成一维链，链的两侧由羧基氧与7配位的Ca(II)离子桥连形成三明治的夹层，每个夹层不断重复与乙酸配体配位形成二维层，层与层之间通过甲酸配体的2个羧基氧分别与层中的两类Ca(II)离子配位形成三维有机骨架。该例钙金属-有机骨架结构稳定，在紫外灯的激发下，于525 nm处发出绿色荧光，在制备荧光传感器材料方面具有一定的应用前景。

参考文献：

- [1] WANG Kecheng, LI Yaping, XIE Linhua, *et al.* Construction and application of base-stable MOFs: A critical review [J]. *Chemical Society Reviews*, 2022, 51(15): 6417-6441. DOI:10. 1039/D1CS00891A.
- [2] QIAN Yongteng, ZHANG Fangfang, PANG Huan. A review of MOFs and their composites-based photocatalysts: Synthesis and applications [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31: 2104231. DOI:10. 1002/adfm. 202104231.
- [3] XIAN Shikai, LIN Yuhan, WANG Hao, *et al.* Calcium-based metal-organic frameworks and their potential applica-

- tions[J]. *Small*, 2020, 17(22):2005165. DOI:10.1002/small.202005165.
- [4] WANG Yanning, WANG Shaodan, ZHANG Jiamin, *et al.* A new fluorescence MOF for highly sensitive detection of acetylacetone[J]. *Chemistry Select*, 2021, 6(5):968-973. DOI:10.1002/slct.202004531.
- [5] ZUO Yanan, ZHAO Xianen, XIA Yinghui, *et al.* Ratiometric fluorescence sensing of formaldehyde in food samples based on bifunctional MOF[J]. *Mikrochimica Acta: An International Journal for Physical and Chemical Methods of Analysis*, 2023, 190:36. DOI:10.1007/s00604-022-05607-9.
- [6] BANERJEE D, PARISE J B. Recent advances in s-block metal carboxylate networks[J]. *Crystal Growth & Design*, 2011, 11:4704-4720. DOI:10.1021/CG2008304.
- [7] POONIA N S, BAJAJ A V, *et al.* Coordination chemistry of alkali and alkaline earth cations[J]. *Chemical Reviews*, 1979, 41(12):1759-1763. DOI:10.1021/cr60321a002.
- [8] ZHAO Yingping, YANG Hui, WANG Fei, *et al.* A microporous manganese-based metal-organic framework for gas sorption and separation[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1074:19-21. DOI:10.1016/j.molstruc.2014.05.033.
- [9] LU Dongfei, WANG Zhiwen, WANG Fei, *et al.* Phosphorescent calcium-based metal-organic framework with second-scale long afterglow [J]. *Inorganic Chemistry*, 2021, 60(14):10075-10078. DOI:10.1021/acs.inorgchem.0c03232.
- [10] SHI Ronghui, LONG Zhiqiang, WANG Fei, *et al.* Two calcium-based metal organic frameworks with long afterglow as anticounterfeiting materials[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 479:147851. DOI:10.1016/j.cej.2023.147851.
- [11] SHELDRICK G M. A short history of SHELX[J]. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 2007, 64:112-122. DOI:10.1107/S0108767307043930.
- [12] DOLOMANOV O V, BOURHIS L J, GILDEA R J, *et al.* OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program[J]. *International Union of Crystallography*, 2009(2):339-341. DOI:10.1107/s0021889808042726.
- [13] LU Dongfei, SUN Yayong, YE Zeyang, *et al.* Facile synthesis of a long afterglow calcium-organic framework in water[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(25):22015-22019. DOI:10.1021/acsomega.2c02658.
- [14] LONG Zhiqiang, WU Yulu, ZHENG Yunyun, *et al.* Room-temperature phosphorescence of a calcium-based metal-organic framework[J]. *Materials Letters*, 2024, 357:135753. DOI:10.1016/j.matlet.2023.135753.
- [15] PARK H, SEO H J, HA E S, *et al.* Preparation and characterization of glimepiride eutectic mixture with L-arginine for improvement of dissolution rate[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 581:119288. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119288.
- [16] ZHANG Hang, ZHOU Canhua, LIU Dong, *et al.* Structural and photophysical properties of a Cd(II) coordination polymer based on mixed aromatic ligands: A combined experimental and theoretical study[J]. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2017, 27:923-933. DOI:10.1007/s10904-017-0537-5.
- [17] 王凯民, 顾雄, 邓娜, 等. 三例基于 5-(二甲基氨基)间苯二甲酸的锌(II)/铜(II)配合物的合成、晶体结构、Hirshfeld 表面分析和荧光性质[J]. *无机化学学报*, 2024, 40(7):1397-1408. DOI:10.11862/CJIC.20240009.
- [18] YU Lan, LEI Yunze, MA Ying, *et al.* A comprehensive review of fluorescence correlation spectroscopy[J]. *Frontiers in Physics*, 2021, 9:644450. DOI:10.3389/fphy.2021.644450.
- [19] NAKAMOTO K. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, part B: Applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry[M]. New York: John Wiley & Sons, 2009.
- [20] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [21] PAL T K. Metal-organic framework (MOF)-based fluorescence "turn-on" sensors[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2023, 7(3):405-441. DOI:10.1039/d2qm01070d.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407015



多拷贝 *pucBA* 基因在沼泽红假单胞菌 光合生长中的作用

林若欣, 赵晓岚, 赵春贵, 杨素萍

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 选择沼泽红假单胞菌 CGA009 菌株, 采用基因敲除方法, 依次对菌株中的 5 对 *pucBA* 基因进行敲除, 以探求不同 *pucBA* 基因对菌株光合生长、光谱表型和光合色素质量浓度的影响。结果表明: 不同 *pucBA* 基因的表达量与菌株光合生长速率和光合色素合成量呈正相关关系; 高光下 *pucBA_b* 和 *pucBA_s* 基因对菌株生长发挥主要作用, 低光下 *pucBA_b*, *pucBA_d* 和 *pucBA_s* 基因对菌株生长起主要作用; 敲除 *pucBA_d* 基因可致 *pucBA_b* 基因高效表达, 敲除 *pucBA_c* 基因可致 LH1-RC 合成量提高, 表明某个 *pucBA* 基因的敲除对其他光合基因表达具有补偿作用。

关键词: 紫细菌; 沼泽红假单胞菌; 外周捕光复合体(LH2); 基因敲除

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0610-08

Role of Multiple Copy *pucBA* Genes in Phototrophic Growth of *Rhodopseudomonas palustris*

LIN Ruoxin, ZHAO Xiaolan, ZHAO Chungui, YANG Suping

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Selecting *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 strain, gene knockout method was used to sequentially knock out five pairs of *pucBA* genes in the strain in order to explore the effects of different *pucBA* genes on photosynthetic growth, spectral phenotype and photosynthetic pigment mass concentration of the strain. The results showed that the expression levels of different *pucBA* genes were positively correlated with the photosynthetic growth rate and photosynthetic pigment synthesis of the strain. The *pucBA_b* and *pucBA_s* genes played a major role in strain growth under high light conditions, while the *pucBA_b*, *pucBA_d* and *pucBA_s* genes played a major role in strain growth under low light conditions. Knocking out the *pucBA_d* gene could lead to efficient expression of *pucBA_b* gene, while knocking out the *pucBA_c* gene could increase LH1-RC synthesis, indicating that the knockout of a certain *pucBA* gene had a compensatory effect on the expression of other photosynthetic genes.

Keywords: purple bacteria; *Rhodopseudomonas palustris*; peripheral light-harvesting complex (LH2); gene knockout

不产氧光合细菌(APB)因其光合单元简单,常作为光合作用机制研究的模型生物^[1-2]。由于自然光的不连续性,APB形成了2种机制应对光环境的变化。一种是调控光合单元中外周捕光复合体(LH2)

收稿日期: 2024-07-15

通信作者: 杨素萍(1966-),女,教授,博士,主要从事资源微生物的挖掘与利用的研究。E-mail: yangsuping@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070054, 30970068); 国家海洋公益性行业科研专项(201505026)

和核心捕光复合体-反应中心复合物(LH1-RC)的数量以适应光变化,通常 LH1 与 RC 形成 1:1 的复合体^[3-4],随着光照强度升高,LH2/LH1-RC 的比例降低^[5-6]。另一种是随着光照强度变化,LH2 光谱类型也随之变化^[5-6],高光时菌株形成典型光谱 LH2(T-LH2),又称 B800-850 LH2,低光时形成异常光谱 LH2(U-LH2),主要包括 LH3(B800-820 LH2),LH4(B800-only 或 B800-low-850 LH2)和 LH2'(B800-840 LH2)等^[7-9]。

目前,研究已阐明了不同光谱类型 LH2 的形成机制及随光变化机制,其原因是菌株拥有多拷贝编码 LH2 $\alpha\beta$ 肽的 *pucBA* 基因,在不同光环境中多拷贝 *pucBA* 的表达量不同,由于不同 *pucBA* 基因编码的 $\alpha\beta$ 肽氨基酸残基的差异,导致不同 $\alpha\beta$ 肽与细菌叶绿素(BChl) *a* 结合位点和配位方式不同,从而形成不同的特征光谱 LH2^[9-11]。基因组和系统发育分析显示,多拷贝 *pucBA* 基因在隶属于 APB 的紫细菌中广泛存在,尤其在红假单胞菌属菌株中的拷贝数可高达 5~7 对^[5,9]。由于多拷贝 *pucBA* 基因同时表达,导致菌株中不同的 LH2 难以彼此分离,即使是高度纯化的 LH2,也是不同 LH2 的混合物^[10-13]。针对该问题, Southall 等^[2]和 Qian 等^[1]分别以沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*, *Rps. palustris*) CGA009 和 2.1.6 为研究对象,采用基因敲除的方法得到仅剩 1 对 *pucBA* 基因的菌株,纯化得到单一基因型的 LH2,不仅证明 LH4 均为 B800-noly LH2^[1-2],而且高分辨地解析了 4 种 LH2 的晶体结构^[1],但并没有报道这 4 种单一基因型 LH2 的光能传递活性^[1]。

LH2 功能活性评价通常采用 Cogdell 建立的检测光能传递效率的方法,目前研究仅在固氮红细菌(*Rhodobacter azotiformans*) 134K20、嗜温紫色硫光养细菌(*Allochromatium vinosum*)和 *Rps. palustris* CGA009 等极少数菌株中比较了高、低光下纯化 LH2 的光能传递效率^[5,14],但该方法依赖于 LH2 的分离纯化,而 LH2 彼此间难以纯化,所提供的数据往往是菌株同时表达不同 LH2 的综合结果^[5]。归根结底,LH2 的作用主要是推动菌株进行光合作用、促进生长,但目前还没有足够的数据来评估 LH2 在菌株光合作用代谢过程中的功能活性。Zhao 等^[5]采用 Cogdell 法比较研究了 *Rps. palustris* CGA009 菌株在高、低光下 U-LH2(LH4)和 T-LH2 的能量传递活性,进一步敲除菌株中的 *pucBA_d* 基因(编码 LH4 的 $\alpha\beta$ 肽),探求 LH4 在菌株光合生长中的作用。基于此,本文采用遗传解剖的策略,在前期敲除 *pucBA_d* 基因基础上,依次敲除菌株的 *pucBA_a*, *pucBA_b*, *pucBA_c* 和 *pucBA_c* 基因,分别在高、低光下,考察基因缺失对菌株光合生长、光谱表型和光合色素质量浓度的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Rps. palustris CGA009(野生株 WT),购自美国 ATCC 公司。*Rps. palustris* CGA009 *pucBA_d* 基因敲除株简称 Δd ,克隆菌株大肠杆菌(*E. coli*) JM109,由实验室保存。二氨基庚二酸(DAP)营养缺陷型 *E. coli* WM3064,由中国科学院水生生物研究所邱东茹研究员馈赠。质粒 pJQ200SK(携带硫酸庆大霉素抗性基因 Gm 和蔗糖筛选标记基因 *sacB*),购自武汉淼灵生物公司。

1.2 主要试剂

基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京全式金生物技术有限公司。质粒提取试剂盒和通用型 DNA 纯化回收试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司。PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase、限制性内切酶(*Pst* I, *Xba* I 和 *Xho* I)和 T4 DNA 连接酶等,均购自日本 Takara 公司。甲醇、丙酮、异丙醇等为色谱纯试剂,其余试剂为分析纯试剂,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基和培养条件

采用改良 Ormerod 液体培养基和 18# 固体培养基^[5]。改良 Ormerod 液体培养基培养容器为螺口蓝盖瓶,接种后用培养基充满 140 mL 蓝盖瓶,在 30 °C,白炽灯光源 2 000 lx(高光)和 200 lx(低光)条件下,厌氧培养 *Rps. palustris* CGA009 菌株的基因缺失菌株。*E. coli* 采用 LB 培养基,37 °C 培养,根据需要添加 DAP, Gm 和蔗糖。

1.4 基因敲除和验证

在巢式聚合酶链式反应(PCR)验证 *pucBA_d* 敲除株(Δd)基因缺失正确的基础上,以 Δd 菌株作为

出发株,依次敲除菌株中的 $pucBA_a$, $pucBA_b$, $pucBA_c$ 和 $pucBA_c$ 基因,得到 $pucBA_{da}$, $pucBA_{dab}$, $pucBA_{dabe}$ 和 $pucBA_{dabec}$ 基因缺失突变株,分别简称为 Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 菌株。 $pucBA_d$, $pucBA_a$, $pucBA_b$, $pucBA_c$ 和 $pucBA_c$ 基因敲除片段的长度分别为 381, 408, 412, 584 和 404 bp。

采用环状质粒介导的双交换同源重组法进行基因敲除^[5]。以 CGA009 基因组 DNA 为模板,采用 PCR 法分别扩增敲除目的基因上游(U)和下游(D)DNA 片段,采用 PCR 法拼接上、下游 DNA 片段,构建重组质粒 pJQ200SK-UD,转化 *E. coli* DH5 α ,涂布 LB 抗性(Gm)平板,筛选重组子,并进行 PCR 验证。提取重组质粒 pJQ200SK-UD,转化 *E. coli* WM3064,经 Gm 抗性筛选和 PCR 验证,得到重组菌株 *E. coli* WM3064(pJQ200SK-UD)。采用双亲交配的方法^[5],通过 *E. coli* WM3064 将质粒 pJQ200SK-UD 接合转移至受体菌,将接合转移的菌悬液涂布在 18# 固体培养基(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Gm,不含 DAP)上,培养 5~7 d,挑选菌落,在含体积分数为 10%蔗糖的 18# 固体培养基平板上划线,挑选菌落,分别用不同引物,通过巢式 PCR 筛选和验证目的基因缺失突变株。

使用的引物序列、酶切位点和扩增产物,如表 1 所示。表 1 中:F,R 分别为 $pucBA$ 基因的正向、反向引物;UF,UR 分别为 $pucBA$ 基因上游片段的正向、反向引物;DF,DR 分别为 $pucBA$ 基因下游片段的正向、反向引物;下标 a,b,c,e 分别为 $pucBA$ 基因编号;CTGCAG 为 *Pst* I 酶切位点,CTCGAG 为 *Xho* I 酶切位点,TCTAGA 为 *Xba* I 酶切位点;双下划线序列为 PCR 拼接互补序列。

表 1 引物序列、酶切位点和扩增产物

Tab. 1 Primer sequences, enzyme cleavage sites and amplification products

名称	引物序列(5'-3')	扩增产物(片段大小)
UF _a	CTAG CTGCAGGCACCTCGCCTTCGCCCGCA	$pucBA_a$ -U(947 bp)
UR _a	CCCCAAACGAAAACCCCTCATAATGGGGTTTCT	
DF _a	AACCCATTATGAGGGTTTTTCGTTTGGGGGC	$pucBA_a$ -D(939 bp)
DR _a	CTAG CTCGAGGGTTTGGCTCGTTGATGGCG	
F _a ,R _a	TCAAAATGGCTGACAAG;AGAAGAGCAGTATTGAT	$pucBA_a$ (374 bp)
UF _b	CTAG CTGCAGCCAGCCGATTCCTTGATTG	$pucBA_b$ -U(908 bp)
UR _b	AAATACAAAACACCCTCAATGCGTGCTGTTTCG	
DF _b	AACAGCACGCATTGAGCGGGTGTTTTGTATTT	$pucBA_b$ -D(926 bp)
DR _b	CTAG CTCGAGTGACGGTGTTTGGTGAGGGA	
F _b ,R _b	ATCCGAACAAGGTCTGG;CGGGGCGGCGACGGTGG	$pucBA_b$ (322 bp)
UF _c	CTAG CTCGAGCTGAGCGGCAGGATGTA	$pucBA_c$ -U(978 bp)
UR _c	GGAGGACAGAGGCGTTAGATGACCCTCTTGTT	
DF _c	CAAGAGGGTCATCTAACGGCTCTGTCTCTCTG	$pucBA_c$ -D(918 bp)
DR _c	CTAG TCTAGACGAGGTGGTGCTGTTGCGA	
F _c ,R _c	CACACAGCCCGTAAGCC;GAGCGGATTTGTAGACGA	$pucBA_c$ (815 bp)
UF _e	CTAG TCTAGACAGCCTGTGTTTCGGGGGAG	$pucBA_e$ -U(962 bp)
UR _e	TGTCCGCACCCCGCTGGATGCTTCCAGCCCTC	
DF _e	GGGCTGGAAGCATCCAGCGGGGTGCGGACATTT	$pucBA_e$ -D(919 bp)
DR _e	CTAG CTCGAGGCGTTCGGACCTTGAATAAA	
F _e ,R _e	TAGTCTTACAATCACTCGGA;AGGACCAGACTTTCATCAT	$pucBA_e$ (833 bp)

1.5 光合生长、吸收光谱和光合色素质量浓度的测定

离心收集低光培养 3 d 的 $pucBA$ 基因缺失菌株菌体,调整菌悬液吸光度 $D(660)$ 为 1.50,按体积分数为 3%的接种量接种至改良 Ormerod 液体培养基中。分别设置光照强度为 2 000 lx 和 200 lx,以 WT 为对照,进行 3 组重复实验。培养过程中取样测定菌体生物量和吸收光谱。生物量以 $D(660)$ 表示,绘制生长曲线。通过分析活细胞吸收光谱的特征峰的波长和吸光度的变化,表征 $pucAB$ 基因敲除对菌株 LH2 合成能力的影响。使用基准线法计算特征光谱的吸光度值(D),其计算公式为

$$D = D_T - D_{RL}$$

上式中: D_T 与 D_{RL} 分别为特征光谱的总吸光值和参考线(RL)的吸光值。

用 D_{WT} 表示野生型菌株的吸光度值,通过公式 $R = D/D_{WT} \times 100\%$ 计算敲除菌株和野生型菌株间的相对生长速率。用 ΔR 表示相对变化量,即 $pucAB$ 基因敲除后与敲除前相对生长速率的差值。

采用超声法提取菌体光合色素。按质量体积比(g : mL)为 1 : 12 向菌体中加入色素提取液(丙酮-甲醇按照体积比 7 : 2 配制而成)提取光合色素,将 3 次提取液合并定容至 10 mL,取样测定其吸收光谱。BChl *a* 和 Car 的最大吸收波长分别为 770,476 nm,BChl *a* 和 Car 的质量浓度(ρ)计算公式为

$$\rho = DVf/(aL).$$

上式中: a 为摩尔消光系数,Car 和 BChl *a* 摩尔消光系数分别为 $160,76 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [14-15]; L 为光程; D, V 和 f 分别表示样品的吸光度、体积和稀释因子。

2 实验结果与分析

2.1 基因敲除和突变株验证

以 UF/DR 为引物,基因敲除前、后菌株 PCR 扩增的目标条带大小,如图 1(a)所示。由图 1(a)可知:扩增条带与预期大小吻合;与基因敲除前菌株相比,*pucBA* 基因缺失株未检测到相应大小的 DNA 条带,检测到相对分子质量较小的 DNA 条带,与缺失基因片段基本吻合,表明基因敲除菌株靶基因片段缺失。以 F/R 为引物,基因敲除前、后菌株 PCR 扩增目标条带的大小,如图 1(b)所示。由图 1(b)可知:扩增条带与预期片段大小相吻合,与敲除前相比,基因敲除后的菌株未检测到相应大小的 DNA 条带,表明基因敲除菌株靶基因被敲除。由此表明,WT(CGA009)敲除 *pucBA_d* 基因菌株(Δd)的基因缺失正确,以 Δd 菌株作为出发株,依次敲除菌株中的 *pucBA_a*,*pucBA_b*,*pucBA_c* 和 *pucBA_e* 基因,相继获得了 Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 菌株。

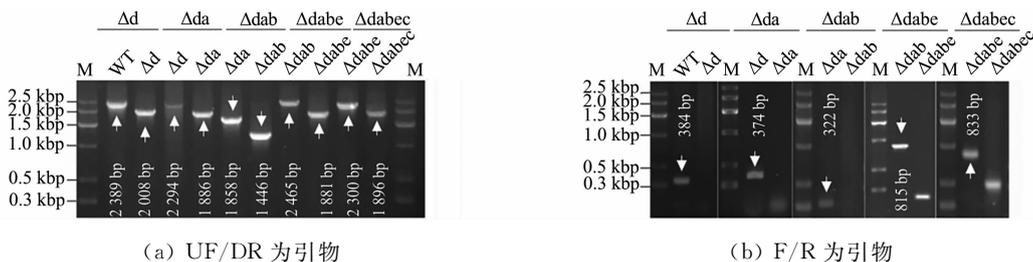


图 1 *pucBA* 基因敲除株 Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 的巢式 PCR 检测结果

Fig. 1 Nested PCR detection results of *pucBA* gene knockout strains of Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ and $\Delta dabec$

2.2 基因缺失对菌株吸收光谱的影响

由于 LH2 具有特征近红外(NIR)吸收光谱,常常用活细胞 NIR 光谱反映 LH2 特征和表达量的变化。*pucBA* 基因敲除株在高光和低光下的 NIR 特征光谱,如图 2 所示。图 2 中: λ 为波长。低光下 *pucBA* 基因敲除对菌株 NIR 特征光谱的影响,如表 2 所示。表 2 中: λ_{P1} , λ_{P2} 分别为特征峰 P1,P2 对应的波长; D_{max} 为吸光度峰值。

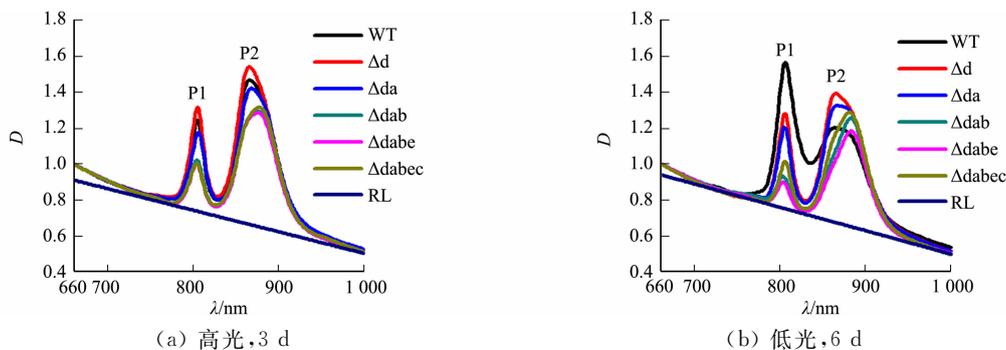


图 2 *pucBA* 基因敲除株在高光和低光下的 NIR 特征光谱

Fig. 2 NIR characteristic spectra of *pucBA* genes knockout strain under high and low light conditions

由图 2(b),表 2 可知:低光时,WT 菌株呈现 P1(805 nm)和 P2(864 nm)2 个 NIR 特征峰,且特征峰 P1 吸光度(D_{P1})>特征峰 P2 吸光度(D_{P2});随着 5 对 *pucBA* 基因的依次敲除,缺失株的 P1 最大波长(λ_{max})在 803~805 nm 范围内变化, D_{max} 呈逐渐降低(Δd , Δda , Δdab 和 $\Delta dabe$)、再升高($\Delta dabec$)现象;P2 峰的最大波长明显红移,从 864~865 nm(Δd , Δda 和 Δdab)红移至 881~883 nm($\Delta dabe$, $\Delta dabec$),

D_{\max} 呈现先升高(Δd)、后逐渐降低(Δda , Δdab 和 $\Delta dabe$)、再升高($\Delta dabec$)的现象。但不同敲除株的 P1 和 P2 特征峰吸光度峰值(D_{\max})的降低或升高的幅度(ΔR)不同。

表 2 低光下 *pucBA* 基因敲除对菌株 NIR 特征光谱的影响

Tab. 2 Effects of *pucBA* gene knockout under low light conditions on NIR characteristic spectra of strains

菌株	特征峰 P1				特征峰 P2				
	λ_{P1}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$	$D(866)$	λ_{P2}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$
WT	805	0.817	100.0	—	0.528	864	0.528	100.0	—
Δd	805	0.531	65.0	-35.0	0.721	865	0.720	135.9	35.9
Δda	805	0.455	55.7	-9.3	0.653	865	0.652	122.7	-13.2
Δdab	803	0.180	22.0	-33.7	0.603	881	0.603	74.7	-48.0
$\Delta dabe$	803	0.146	17.9	-4.2	0.533	883	0.533	64.9	-9.8
$\Delta dabec$	805	0.265	32.4	14.6	0.637	881	0.637	92.4	27.6

由于 T-LH2, U-LH2(LH4) 和 LH1-RC 分别呈现 B800-850, B800-only 和 B800-875 特征峰, 它们的光谱发生相互叠加, 从而形成菌体的 P1 和 P2 特征峰, *pucBA* 基因敲除前后特征峰变化可反映 *pucBA* 基因的表达情况。由表 2 可知: 与相应基因缺失前的菌株相比, Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 缺失株 P1 峰吸光度的相对变化(ΔR)分别为 -35.0%, -9.3%, -33.7%, -4.2% 和 14.6%, P2 峰吸光度的 ΔR 分别为 35.9%, -13.2%, -48.0%, -9.8% 和 27.6%。

由此可知以下 3 点结论: 1) 在低光环境中, *pucBA_d*, *pucBA_b* 和 *pucBA_a* 是主要表达合成 LH2 的基因, 表达量高低顺序为 *pucBA_b* > *pucBA_d* > *pucBA_a*, *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 表达量则更低; 2) 由于 Δda 敲除株的 P2 峰吸光度高于 WT 菌株, 表明敲除 *pucBA_d* 有利于 *pucBA_b* 基因的高效表达, 由于 *pucBA_b* 表达 b-LH2 合成量升高, 导致 P1 特征峰将升高, 从而低估了 Δd 菌株 P1 特征峰降低的程度; 3) 与 $\Delta dabe$ 菌株相比, 由于 $\Delta dabec$ 菌株的 $D(805)$ 和 $D(881)$ 升高, 由此说明尽管已有研究表明 *pucBA_e* 是伪基因, 不能合成 LH2^[9], 但敲除该基因有利于菌株中 LH1-RC 合成量升高, 表明 *pucBA_e* 对 LH1-RC 基因的表达具有抑制作用。

由图 2(a) 和表 3 可知: 高光时 *pucBA_d* 基因表达 d-LH2 合成量很低^[5,9], WT 菌株呈现 805 nm (P1) 和 866 nm (P2) 特征峰, 且 D_{P2} 高于 D_{P1} , 与文献结果一致^[5]; 随着 *pucBA* 基因的依次敲除, P1 峰位变化范围在 804~805 nm, P2 峰则从 866~867 nm (Δd 和 Δda) 红移至 876~878 nm (Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$), 其中, Δdab 红移幅度最大, 从 867 nm 红移至 876 nm; 与相应的未敲除株相比, Δd 和 $\Delta dabec$ 敲除株的 D_{P1} , D_{P2} , $D(866)$ 升高, 而 Δda , Δdab 和 $\Delta dabe$ 敲除株降低, 降低幅度(ΔR)为 Δdab > Δda > $\Delta dabe$ 。由此表明: 在高光条件下, 菌株主要表达的基因是 *pucBA_a* 和 *pucBA_b*, 且 *pucBA_b* 表达量高, 次要表达基因是 *pucBA_e*, 未检测到 *pucBA_d* 和 *pucBA_c* 基因的表达。虽然 *pucBA_d* 基因表达量很低, 但敲除该基因促进了菌体中其他 *pucBA* 的 LH2 合成。敲除 *pucBA_e* 则有利于 LH1-RC 表达。

表 3 高光下 *pucBA* 基因敲除对菌株 NIR 特征光谱的影响

Tab. 3 Effects of *pucBA* gene knockout under high light conditions on NIR characteristic spectra of strains

菌株	特征峰 P1				特征峰 P2				
	λ_{P1}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$	$D(866)$	λ_{P2}/nm	D_{\max}	$R/\%$	$\Delta R/\%$
WT	805	0.508	100.0	—	0.805	866	0.804	100.0	—
Δd	805	0.580	114.2	14.2	0.879	866	0.878	109.2	9.2
Δda	805	0.434	85.4	-28.7	0.751	867	0.758	93.4	-15.8
Δdab	804	0.284	55.9	-29.5	0.601	876	0.644	74.6	-18.7
$\Delta dabe$	804	0.264	52.0	-3.9	0.591	876	0.634	73.4	-1.2
$\Delta dabec$	804	0.266	52.4	0.4	0.603	878	0.685	74.9	1.5

2.3 基因缺失对菌株光合生长的影响

pucBA 敲除株在高光和低光下的生长曲线, 如图 3 所示。由图 3 可知: 高光条件下, 随培养时间的延长, 各敲除株光合生长速率有所不同, 但稳定期的生物量差异较小; 与高光条件相比, 低光下各敲除株的光合生长速率和最大生物量都有所不同。

pucBA 敲除株在高光和低光下的相对生长速率(R), 如图 4 所示。图 4 中: 字母 α , β , γ , δ , ϵ 表示

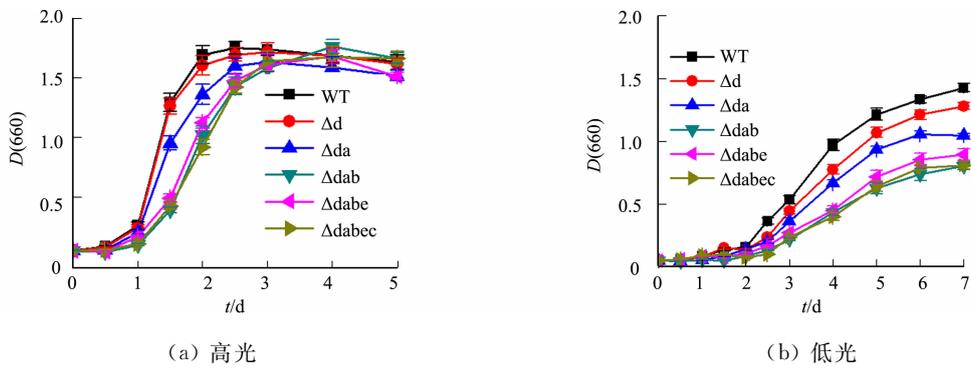


图 3 *pucBA* 敲除株在高光和低光下的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *pucBA* knockout strain under high and low light conditions

显著性差异分析,不同字母间的差异具有统计学意义($P < 0.05$);“—”表示与未敲除株相比,敲除株生长速率升高。由图 4 可知:高光和低光条件下, $\Delta dabec$ 菌株的相对生长速率(R)分别为 29.4%和 41.0%,即 5 对 *pucBA* 完全敲除使生长速率降低了 70.6%和 59.0%,表明 *pucBA* 基因在菌株光合生长过程中发挥重要的作用;随着 5 对 *pucBA* 依次敲除,在高光条件下,与相应的未敲除株相比, Δd , Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 和 $\Delta dabec$ 缺失株相对生长速率分别降低了 2.1% (Δd), 22.9% (Δda), 43.1% (Δdab), -3.3% ($\Delta dabe$), 5.8% ($\Delta dabec$), 在低光条件下,分别降低了 20.1%, 11.3%, 24.1%, -4.0%和 7.5%。

由此可见,高光时 *pucBA_a* 和 *pucBA_b* 对菌株的光合生长发挥主要作用,且 *pucBA_b* > *pucBA_a*, 而 *pucBA_d*, *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 的作用较小;低光时 *pucBA_d*, *pucBA_a* 和 *pucBA_b* 对菌株生长发挥主要作用,且 *pucBA_b* > *pucBA_d* > *pucBA_a*, *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 的作用较小。 $\Delta dabe$ 菌株在高光和低光下生长速率反而有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);*pucBA_c* 是伪基因^[9],但敲除该基因对生长有明显抑制作用。由此表明,敲除 *pucBA_e* 和 *pucBA_c* 仍影响菌株的生长和代谢,但总体上对生长影响较小。与菌株特征光谱结果相比可知,敲除 *pucBA* 基因对菌株生长的抑制作用与特征光谱吸光度降低的程度呈正相关关系,即敲除表达量高的 *pucBA* 基因对生长的抑制作用大,反之则小;光谱分析表明,敲除 *pucBA_d*, Δd 菌株 LH2 表达量升高,但高光时菌株的生长速率并没有升高,反而有降低的趋势,其原因可能是高光时高表达量的 LH2 对菌株光损伤作用较大。

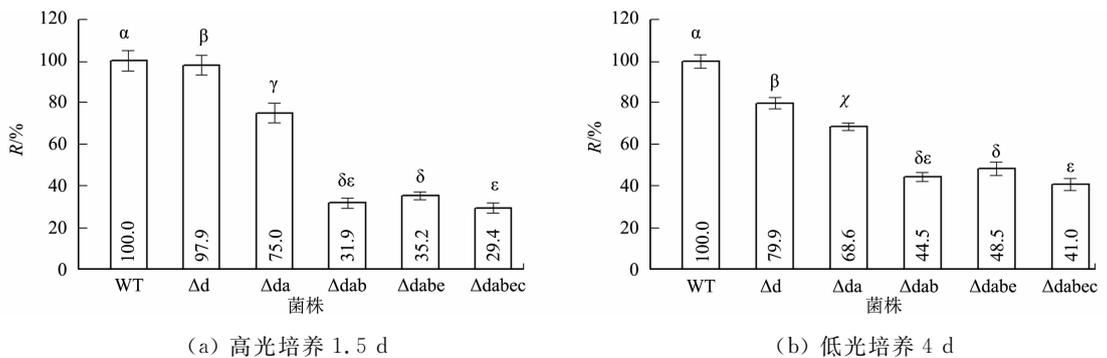


图 4 *pucBA* 敲除株在高光和低光下的相对生长速率

Fig. 4 Relative growth rate of *pucBA* knockout strain under high and low light conditions

2.4 基因缺失对菌株光合色素的影响

敲除 *pucBA* 基因对菌体 BChl *a* 和 Car 质量浓度(ρ)的影响,如图 5 所示。由图 5 可知:与基因敲除前菌株相比,高光下, Δda , Δdab , $\Delta dabe$ 菌株的 BChl *a* 和 Car 的质量浓度均显著降低($P < 0.05$),降低幅度为 $\Delta dab > \Delta da > \Delta dabe$, Δd 和 $\Delta dabec$ 菌株 BChl *a* 和 Car 的质量浓度虽然升高,但差异无统计学意义;低光下, Δd , Δda , Δdab 菌株的 BChl *a* 和 Car 的质量浓度均显著降低($P < 0.05$),降低幅度为 $\Delta dab > \Delta d > \Delta da$, $\Delta dabe$ 菌株的 BChl *a* 和 Car 质量浓度未显著降低, $\Delta dabec$ 菌株 BChl *a* 的质量浓度有所升高,但差异无统计学意义,而 Car 质量浓度显著升高。由此可见,敲除表达量高的 *pucBA* 基因,菌株光合色素的质量浓度降低幅度大。这与敲除株光合生长和 NIR 光谱测定的 LH2 表达量的结果基本

吻合,也与光合色素主要定位在 LH2 和 LH1-RC 上的报道结果相吻合^[16]。但敲除 *pucBA_d* 和 *pucBA_e* 基因,菌体积累的光合色素质量浓度升高,这与基因敲除导致菌株中其他 *pucBA* 或 LH1-RC 表达量升高的结果相吻合。

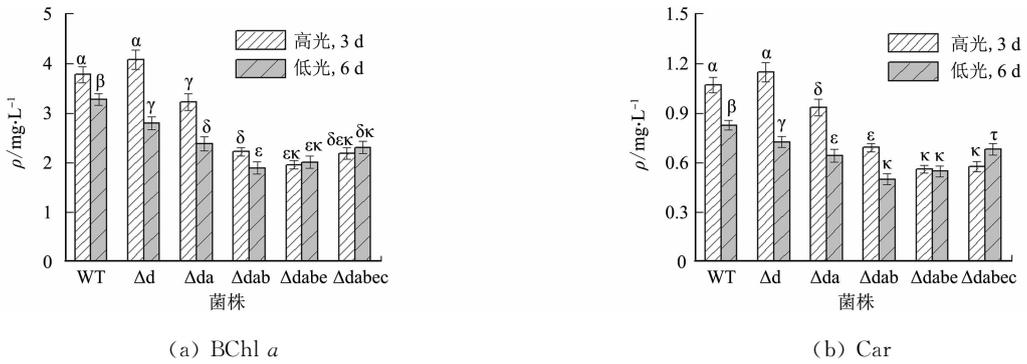


图5 敲除 *pucBA* 基因对菌体 BChl *a* 和 Car 质量浓度的影响

Fig. 5 Effect of knocking out *pucBA* gene on mass concentration of bacterial BChl *a* and Car

3 结论

目前研究主要从转录水平上揭示高低光与菌株多拷贝 *pucBA* 基因表达的关系^[9],尚缺乏转录表达产物(LH2)合成和功能活性的证据。采用遗传解剖策略,依次敲除多拷贝 *pucBA* 基因,通过光合生长、LH2 特征光谱和光合色素合成量等指标综合评价,分析多拷贝 *pucBA* 基因对菌株生存的贡献。

研究结果显示,敲除不同的 *pucBA* 基因对菌株生长的影响程度不同,基因的表达量与菌株光合生长和光合色素合成量呈正相关关系,即主要功能基因被敲除,严重制约菌株的生长、LH2 合成和光合色素积累,敲除次要功能基因则影响较小。高光时,*pucBA_a* 和 *pucBA_b* 基因是主要功能基因,对生长的贡献率大小为 *pucBA_b* > *pucBA_a*;低光时,*pucBA_d*, *pucBA_a* 和 *pucBA_b* 是主要功能基因,贡献率大小为 *pucBA_b* > *pucBA_d* > *pucBA_a*;无论高光还是低光,*pucBA_b* 对菌株光合生长的贡献最大,文中结果与转录组文献报道的结果相矛盾^[9]。特征光谱显示,敲除 *pucBA_d* 基因,LH2 相对含量不但不降低,反而升高,光合色素的质量浓度同样有升高趋势,由此表明,敲除该基因有利于菌株中其他 *pucBA* 的高效表达,对 LH2 合成具有补偿作用,这与本课题组前期研究结果一致^[5]。但研究结果进一步显示,在低光条件下,敲除 *pucBA_d* 基因有利于 *pucBA_b* 基因高效表达。转录组文献结果显示,CGA009 菌株在高光和低光条件下 *pucBA_b* 基因为次要表达的功能基因^[9],而文中结果显示,*pucBA_b* 基因对菌体光合生长贡献最大,由此明确,无论高光和低光,敲除 *pucBA_d* 基因都能诱导 *pucBA_b* 基因高效表达,这也是文中结果与转录组研究结果相矛盾的原因。另外,高光条件下 *pucBA_d* 基因转录表达量极低^[9],但敲除 *pucBA_d* 基因,LH2 合成量升高,菌株生长速率没有升高,反而有所降低的原因可能是高光下,LH2 表达量高,光能吸收和传递活性高,对菌株的光损伤也增大,从而导致菌株生长速率没有升高。敲除 *pucBA_e* 基因促进 LH1-RC 合成量升高,表明 *pucBA_e* 基因对 LH1-RC 合成具有抑制,其抑制机制有待深入研究。由此可见,多拷贝 *pucBA* 有利于菌株适应不同的光环境,不同光环境中不同的 *pucBA* 表达,其表达产物的功能势必与其环境相适应,因此,多拷贝 *pucBA* 表达调控的机制还有待深入研究。

通过遗传解剖策略,依次敲除 CGA009 菌株中的 5 对拷贝 *pucAB* 基因,阐明了多拷贝 *pucBA* 基因的缺失与菌株光合生长、光谱表型和光合色素合成的关系和规律,评价了 5 对 *pucBA* 在 CGA009 菌株中的功能和作用,即 *pucBA_a*, *pucBA_b* 和 *pucBA_d* 对该菌株的光合生长发挥主要作用,其中,*pucBA_d* 主要在低光时发挥作用。研究发现,敲除 *pucBA_d* 诱导 *pucBA_b* 的高效表达,敲除 *pucBA_e* 诱导 LH1-RC 合成量升高。研究为多拷贝 *pucBA* 功能和活性评价提供一种思路和方法。

参考文献:

- [1] QIAN Pu, NGUYEN-PHAN C T, GARDINER A T, *et al.* Cryo-EM structures of light-harvesting 2 complexes from *Rhodospseudomonas palustris* reveal the molecular origin of absorption tuning[J]. Proceedings of the National Acad-

- emy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(43); e2210109119. DOI: 10.1073/pnas.2210109119.
- [2] SOUTHALL J, HENRY S L, GARDINER A T, *et al.* Characterization of a *pucBA* deletion mutant from *Rhodospseudomonas palustris* lacking all but the *pucBA_a* genes[J]. *Photosynthesis Research*, 2018, 135(1/2/3): 9-21. DOI: 10.1007/s11120-017-0386-7.
- [3] LIU Luning, BRACUN L, LI Mei. Structural diversity and modularity of photosynthetic RC-LH1 complexes[J]. *Trends in Microbiology*, 2024, 32(1): 38-52. DOI: 10.1016/j.tim.2023.06.002.
- [4] GARDINER A T, NGUYEN-PHAN T C, COGDELL R J. A comparative look at structural variation among RC-LH1 'core' complexes present in anoxygenic phototrophic bacteria[J]. *Photosynthesis Research*, 2020, 145(2): 83-96. DOI: 10.1007/s11120-020-00758-3.
- [5] ZHAO Xiaolan, ZHAO Chungui, YANG Suping, *et al.* The growth-promoting mechanism of unusual spectroscopic form of LH2 (LH4) from *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 in low light[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2019, 95(6): 1369-1375. DOI: 10.1111/php.13134.
- [6] GARDINER A T, NIEDZWIEDZKI D M, COGDELL R J. Adaptation of *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050 to growth at different light intensities: What are the benefits to changing the type of LH2? [J]. *Faraday Discussions*, 2018, 207: 471-489. DOI: 10.1039/c7fd00191f.
- [7] SERDYUK O P, SMOLYGINA L D, ASHIKHMIN A A. A new type of light-harvesting complex detected when growing *Rhodospseudomonas palustris* under low light intensity conditions[J]. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2020, 491(1): 101-104. DOI: 10.1134/S160767292002012X.
- [8] SERDYUK O P, ABDULLATYPOV A V, SMOLYGINA L D, *et al.* Simultaneous functioning of different light-harvesting complexes: A strategy of adaptation of purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris* to low illumination conditions[J]. *Peerj*, 2023, 11: e14769. DOI: 10.7717/peerj.14769.
- [9] FIXEN K R, ODA Y, HARWOOD C S. Clades of photosynthetic bacteria belonging to the genus *Rhodospseudomonas* show marked diversity in light-harvesting antenna complex gene composition and expression[J]. *Msystems*, 2016, 1(1): e00006-e000015. DOI: 10.1128/msystems.00006-15.
- [10] HARTIGAN N, THARIA H A, SWEENEY F, *et al.* The 7.5-Å electron density and spectroscopic properties of a novel low-light B800 LH2 from *Rhodospseudomonas palustris*[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(2): 963-977. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75456-8.
- [11] BRODOSUDARMO T H P, COLLINS A M, GALL A, *et al.* The light intensity under which cells are grown controls the type of peripheral light-harvesting complexes that are assembled in a purple photosynthetic bacterium[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 440(1): 51-61. DOI: 10.1042/BJ20110575.
- [12] TADROS M H, KATSIU E, HOON M A, *et al.* Cloning of a new antenna gene cluster and expression analysis of the antenna gene family of *Rhodospseudomonas palustris*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 217(3): 867-875. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18315.x.
- [13] THARIA H A, NIGHTINGALE T D, PAPIZ M Z, *et al.* Characterisation of hydrophobic peptides by RP-HPLC from different spectral forms of LH2 isolated from *Rps. palustris*[J]. *Photosynthesis Research*, 1999, 61(2): 157-167. DOI: 10.1023/A:1006281532327.
- [14] BRITTON G. General carotenoid methods[J]. *Methods in Enzymology*, 1985, 111: 113-149. DOI: 10.1016/s0076-6879(85)11007-4.
- [15] SAGA Y, HIROTA K. Determination of the molar extinction coefficients of the B800 and B850 absorption bands in light-harvesting complexes 2 derived from three purple photosynthetic bacteria *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobacter sphaeroides*, and *Phaeospirillum molischianum* by extraction of bacteriochlorophyll *a*[J]. *Analytical Sciences*, 2016, 32(7): 801-804. DOI: 10.2116/analsci.32.801.
- [16] KAKITANI Y, FUJJI R, HAYAKAWA Y, *et al.* Selective binding of carotenoids with a shorter conjugated chain to the LH2 antenna complex and those with a longer conjugated chain to the reaction center from *Rubrivivax gelatinosus*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(24): 7302-7313. DOI: 10.1021/bi602485x.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202311010



沼泽红假单胞菌 CGA009 砷调控蛋白(ArsR)的调控作用

金春英¹, 崔亮¹, 陈勇男², 杨素萍¹, 赵春贵¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 北京农学院 国际学院, 北京 102206)

摘要: 采用改良的凝胶电泳迁移滞缓(EMSA)法和砷生物传感法研究沼泽红假单胞菌 CGA009 菌株 6 个高度异质性 ArsR 相关蛋白的调控作用。研究表明:6 个 ArsR 相关蛋白都具有 As(III)依赖的调控活性,改良的 EMSA 图谱可用于系统评价 ArsR 的功能;6 个相关蛋白对异种(*E. coli* pR733 or *Staphylococcus aureus* pI 258)的砷抗性操纵子的调控具有不同的选择性,氨基酸序列同源性(甚至低于 30%同源性)的 ArsR 具有砷依赖的调控作用。

关键词: 沼泽红假单胞菌; 砷; 砷调控蛋白; 砷生物传感

中图分类号: Q 811.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-5013(2024)05-0618-08

Regulatory Role of Arsenic Regulatory Protein (ArsR) in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009

JIN Chunying¹, CUI Liang¹, CHEN Yongnan²,
YANG Suping¹, ZHAO Chungui¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. International College, Beijing University of Agricultural, Beijing 102206, China)

Abstract: Using a modified gel electrophoretic mobility shift assay (EMSA) method and Arsenic biosensing method, the regulation of six highly heterogeneous ArsR-associated proteins from *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 bacterial strain is investigated. The research results show that six ArsR-associated proteins exhibited As(III)-dependent regulatory activity. The modified EMSA mappings can systematically evaluate the functions of ArsR. Six ArsR-associated proteins have different selectivity in regulating the arsenic resistance operon of different species (*E. coli* pR733 or *Staphylococcus aureus* pI 258). ArsRs with amino acid sequence homology (even with below 30% homology) have arsenic-dependent regulation.

Keywords: *Rhodopseudomonas palustris*; arsenic; arsenic regulatory protein; arsenic biosensing

砷污染导致的环境和人类健康问题已成为全球关注焦点^[1-2]。在与砷的长期博弈中,微生物进化出多种灵巧的抗砷手段,如氧化/还原、甲基化/去甲基化和外排^[3-4]等。细胞中的砷代谢相关蛋白/基因是应对环境砷胁迫的关键角色,但其表达量的差异导致微生物对砷的抗性有较大差异。深入解析微生物

收稿日期: 2023-11-01

通信作者: 赵春贵(1970-),男,教授,博士,主要从事资源微生物的挖掘与利用的研究。E-mail:chungui@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201505026);福建省自然科学基金资助项目(2018J01049)

砷代谢与调控机制,对于微生物修复与治理环境砷污染具有重要意义^[5-6]。砷调控蛋白(Arsenic regulatory protein, ArsR)在砷代谢调控过程中发挥重要作用^[7],对于仅有 1 个 ArsR 基因微生物的砷调控机制已有较深入研究^[8],但很多微生物不只 1 个砷抗性操纵子(Arsenic resistance operons, *ars*)^[9-12],不同的砷代谢(如砷还原、外排、甲基化及甲基砷氧化等)基因位于不同的 *arsR*,其复杂的表达调控关系及复杂环境中各基因发挥的作用难以预测和研究。

目前,关于多个 *ars* 的调控机制的研究仅在极少数菌株上,主要包括 *Pseudomonas putida* KT2440 (2 个 *arsR*)^[9], *Shewanella* sp. ANA-3 (6 个 *arsR*)^[10], *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (2 个 *arsR*)^[11] 和 *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) 5A (4 个 *arsR*)^[12] 等。通过转录分析或敲入报告基因方法,研究 *ars* 本身表达调控关系^[13];通过基因敲除和转录分析方法,研究敲除 *arsR* 与特定靶基因表达关系^[12]。*A. tumefaciens* 5A 砷代谢调控是最为复杂的菌株,4 个 ArsR 都具有砷代谢调控活性,同时,还参与其他非砷代谢基因(如 *pstSI* 和 *phoB1*)调控。ArsR 对特定的靶基因调控不但具有高度特异性,也存在交叉调控和重叠调控的现象,甚至同源性较低的多个 ArsR 都参与同一个 *ars* 操纵子调控,但这 4 个 ArsR 彼此之间的互作调控关系还不清楚^[12]。此外, *Shewanella* sp. ANA-3 的 6 个 ArsR 中,只有 1 个 ArsR₂ 同时参与 2 类不同操纵子(*ars* 和 *arr*)的调控,其他 5 个 ArsR 对这 2 个操纵子没有调控作用^[10],但尚不清楚这 5 个 ArsR 是否具有砷依赖的调控活性或参与其他基因调控。由此可见,关于多个 *arsR* 共存菌株的 ArsR 是否具有砷依赖的调控活性及调控选择性的研究尚待深入。

沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*, *R. palustris*) CGA009 是首次证明细菌具有砷甲基化机制的菌株^[14],其基因组拥有 As(V)还原、As(Ⅲ)外排、As(Ⅲ)甲基化和 MAs(Ⅲ)氧化等相关基因。Zhao 等^[15] 研究显示该菌株砷甲基化基因响应高质量浓度 As(Ⅲ)表达,但未检测到砷甲基化产物。Yang 等^[16] 进一步揭示该菌株的 2 个砷外排蛋白(ArsB 和 Acr3)抑制了砷甲基化。Ke 等^[17] 研究表明该菌株的 4 个 ArsR 与 As(Ⅲ)结合能力差异很大, ArsR₂ 活性最高,但其是否具有调控活性尚不清楚。在此基础上,本文对沼泽红假单胞菌 CGA009 砷调控蛋白(ArsR)的调控作用进行研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

砷操纵子缺失突变株 *E. coli* AW3110 (Δ *arsRBC*) (北京市中科院朱永官研究员赠送); *R. palustris* CGA009 (BAA-98) (美国 ATCC); *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (pET-28a, Kan^r) 及 DH5 α (pUC19, Amp^r) 保存于实验室; *E. coli* AW3110 (pUC19-OP-*gfp-arsR*) 设计构建于实验室,其中, *gfp* 基因为报告基因,其登录号为 BAG13002.1。

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、离心柱型通用型 DNA 纯化回收试剂盒及质粒小提试剂盒(北京市天根生化科技有限公司); Taq DNA 聚合酶、DL2000 Marker、限制性内切酶 *Hind* III, *Xho* I, *Pst* I, *Bam*H I, *Kpn* I, *Xba* I 和 T4 DNA 连接酶(上海市百赛生物技术股份有限公司); Trans2K DNA Marker 与 DNA Marker P(北京市全式金生物技术有限公司); 蛋白胨与酵母抽提物(美国 OXOID 公司); 琼脂糖(北京市索莱宝公司); 氨苄青霉素和卡那霉素(上海市生物工程股份有限公司); NaAsO₂ (As(Ⅲ)), Merck (德国 Darmstadt) 及其他分析纯试剂(北京市国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 培养基和培养条件

在温度为 37 °C, 转速为 200 r · min⁻¹ 下, 培养基为 Lysogeny Broth (LB) 液体培养基和固体培养基。CGA009 菌株采用改良的 Ormerod 培养基, 在温度为 30 °C, 光照度为 3 000 lx 中静置培养^[15]。

1.4 ArsR 氨基酸序列聚类分析

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载基因或氨基酸序列, 采用 MEGA 7.0 软件 (<http://www.megasoftware.net/>) 邻接法(neighbor joining) 构建基于 ArsR 氨基酸序列系统发育树。

1.5 ArsR 克隆表达纯化和调控活性的测定

以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *ars* 基因。经酶切(*Nco* I 和 *Xho* I)、连接(T4 连接酶)、转化

BL21 菌株、卡那霉素平板筛选和 PCR 验证^[17], 获得重组菌株 BL21(pET-28a-arsR)。将 BL21(pET-28a-arsR)接种到 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素 LB 培养基中, 培养 6 h, 加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactoside), 在 16°C 下培养 20 h。超声波破碎细胞, 收集蛋白提取液, 通过 Ni-NTA 柱层析纯化 ArsR, 采用 SDS-PAGE 进行纯度检测。采用改良的凝胶电泳迁移滞缓(EMSA)法测定 ArsR、基因组 DNA 与 As(III)三者相互作用^[18]。将纯化的 ArsR, 基因组 DNA 与 As(III)混合($30 \mu\text{L}$), 在 4°C 下反应 2 h, 采用琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.6 砷生物传感菌株的构建

1) 砷生物传感系统的组成。由 OP, *arsR* 和 *gfp* 三个基因元件组成砷生物传感系统, 砷生物传感菌株的基因元件和酶切位点, 如图 1 所示。

2) 基因元件设计和合成。从 NCBI 数据库下载基因元件序列, 采用 Snap gene 软件(6.0.2)对基因元件进行分析, 并按图 1 设计 OP_{E1}-*arsR*_{E1} (630 bp, *E. coli* J62.1 pR773), OP_S-*arsR*_S (417 bp, *S. aureus* pI258)序列和酶切位点, 由苏州金唯智公司合成。

3) *gfp* 扩增和重组。以 5'-CATGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3' 和 5'-CCGGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3' 为引物, 以 AW3110(pUC19-Pars-*gfp*-*arsR*)质粒为模板, PCR 扩增 *gfp*; 通过 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切和 T4 连接酶连接, 转化 AW3110 菌株, 筛选验证得到重组质粒 pUC19-*gfp*。

4) 砷生物传感体系的构建。将合成的 OP-*arsR* 基因和重组质粒 pUC19-*gfp* 经双酶切(*Hind* III 和 *Xho* I)、连接转化筛选、双酶切(*Hind* III 和 *Xho* I)验证和荧光活性验证, 得到 2 个重组菌株, 标记为 OP_{E1}-*arsR*_{E1} 和 OP_S-*arsR*_S。

5) 不同 ArsR 与 OP_{E1}, OP_S 相互作用生物传感菌株的构建。用待测 *arsR*_i 基因替换重组菌株 OP_{E1}-*arsR*_{E1} 和 OP_S-*arsR*_S 中的 *arsR*_{E1} 和 *arsR*_S。引物序列, 如表 1 所示。表 1 中: CTGCAG 和 CTC-GAG 为 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切位点, GGATCC 和 GGTACC 为 *Bam*H I 和 *Kpn* I 识别位点。不同的 *arsR* 的重组菌株分别标记为 OP_{E1}-*arsR*₁, OP_S-*arsR*₁, *arsR*_{E1} (*E. coli* J62.1 pR773), *arsR*_S (*S. aureus* pI258), *arsR*_{E2} (*E. coli* BL21) 和 *arsR*₁~*arsR*₆ (*R. palustris* CGA009)。

表 1 引物序列表

Tab. 1 Primer sequences

基因	序列(正向)5'-3'	序列(反向)5'-3'
<i>arsR</i> ₁	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGGATAACGATTCGGCCATC	CCG <u>CTCGAG</u> TCAGCAGCAGGGTGTGAGTTC
<i>arsR</i> ₂	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGGAAGCAAGTGTAGCC	CCG <u>CTCGAG</u> TCAGACATCGACGGTCTC
<i>arsR</i> ₃	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGGACACTGAAGCACTCTGTTA	CCG <u>CTCGAG</u> TCATGCAGCCCTCGCG
<i>arsR</i> ₄	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGACCGACACCGCCGATATC	CCG <u>CTCGAG</u> TCAGTGGCATTGCGGTTCTC
<i>arsR</i> ₅	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGGATGAGGTCTTCAAAGC	CCG <u>CTCGAG</u> TTACTCATCGCGCGTCTC
<i>arsR</i> ₆	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGGTGAGTTCGTTTCATC	CCG <u>CTCGAG</u> CTACTCGTCCGCGTGTTC
<i>arsR</i> _S	CATG <u>GGATCC</u> ATGTTGCAACTAACACCACT	CCG <u>GGTACC</u> TTAGATGCAGACAGCCTTAC
<i>arsR</i> _{E1}	CATG <u>GGATCC</u> ATGTCTTATAAAGAACTATC	CCG <u>GGTACC</u> TCAACAGTCACCTGATTTCA
<i>arsR</i> _{E2}	TGCA <u>CTGCAG</u> ATGTCATTTCTGTTACCC	CCG <u>CTCGAG</u> TAACTGCAAATGTTCTTAC

1.7 不同 ArsR 与 OP_{E1} 和 OP_S 相互作用选择性的测定

将构建的砷生物传感菌株接种到 LB 培养基中培养 10 h, 离心收集菌体, 重新悬浮菌体, 将菌悬液生物量调整至 1.00, 将体积分数为 1% 的接种量接种到不同质量浓度的 As(III) 的 LB 液体培养基中, 在温度为 37°C , 离心率为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中进行培养, 在不同时间取样, 测定菌体生物量和荧光光谱。以同样的方式培养, 在优化测定时间(10 h)取样, 测定各重组菌株荧光强度, 考察其对 As(III) 相应的剂量和效应的关系。

在 1 cm 荧光比色杯中, 采用分光光度计测定菌悬液在波长 660 nm 的菌悬液中菌体生物量(D)。将 D 调整为 0.10, 采用 F97pro 型荧光分光光度计, 激发波长设置为 479 nm, 激发单元狭缝为 10.0

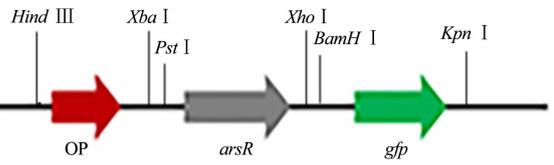


图 1 砷生物传感菌株的基因元件和酶切位点

Fig. 1 Gene elements and enzyme digestion sites of arsenic biosensing strains

nm,发射单元狭缝为 5.0 nm,光电管高压为 780 V,扫描速度为 1 000 nm · min⁻¹,在 1 cm 荧光比色杯中,扫描波长 94~600 nm 的荧光光谱或记录波长为 512 nm 的荧光强度(F_{512})。

2 实验结果与分析

2.1 砷调控蛋白(ArsR)系统发育分析

基于 ArsR 氨基酸序列的系统发育分析,如图 2 所示。由图 2 可知:*E. coli* 菌株的 3 个 ArsR 具有较高的同源性,紧密地聚类在一起;*R. palustris* CGA009 的 6 个 ArsR(ArsR₁~ArsR₆)聚类在 3 个大的分支上,同源性差异较大。ArsR₁,ArsR₂,ArsR₄ 和 ArsR₆ 聚类在一个分支上;CGA009 的 ArsR₃ 与 *E. coli* 的 3 个 ArsR 聚在 1 个分支上,但与这 3 个 ArsR 同源性具有较大差异;ArsR₅ 独立在 1 个大的分支上。由此可见,同种不同菌株间的 ArsR 可以具有高度同源性,同一菌株不同的 ArsR 也可以具有高度异质性。

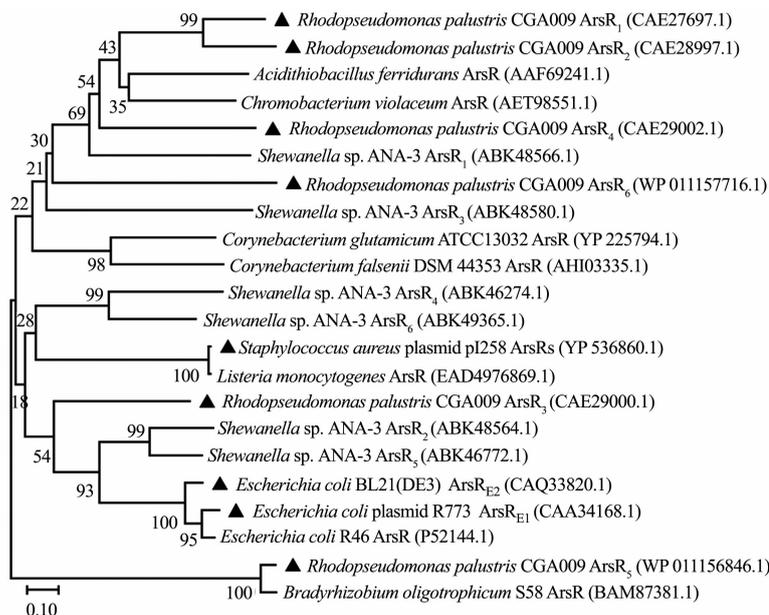
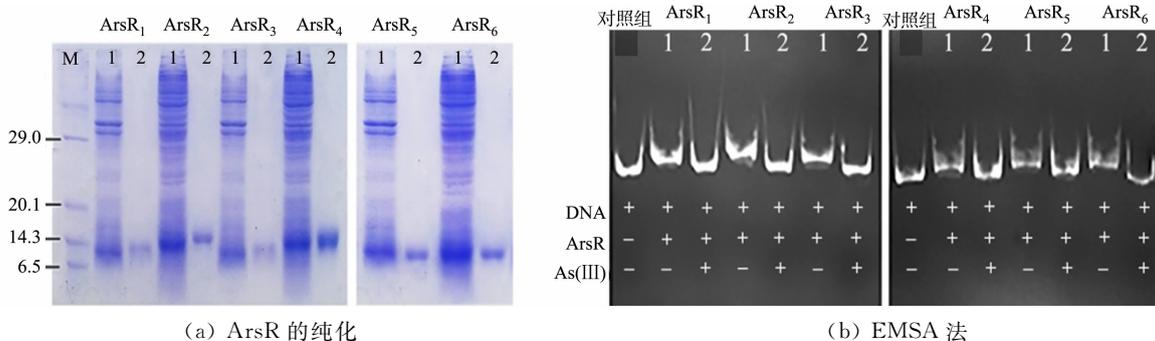


图 2 基于 ArsR 氨基酸序列的系统发育分析

Fig.2 System phylogenetic analysis based on ArsR amino acid sequences

2.2 ArsR 依赖 As(III)调控活性的测定

ArsR 依赖 As(III)调控活性的测定,如图 3 所示。图 3 中:1 为蛋白质粗提液;2 为纯化的蛋白质;M 为标准分子量蛋白。



(a) ArsR 的纯化

(b) EMSA 法

图 3 ArsR 依赖 As(III)调控活性的测定

Fig.3 Determination of ArsR dependent As(III) regulatory activity

由图 3(a)可知:经过异源表达、纯化和电泳检测,获得 CGA009 菌株的 6 个 ArsR。基因组 DNA, ArsR 和 As(III)三者相互作用的检测结果,如图 3(b)所示。由图 3(b)可知:无砷时,ArsR 可与识别的基因组 DNA 序列结合,使基因组 DNA 电泳迁移率降低;有 As(III)时,As(III)诱导 ArsR 构象变化,使

其与结合的基因组 DNA 分离,基因组 DNA 电泳迁移率升高。由此可见,无砷时,基因组 DNA 迁移率较低,添加 As(III)时迁移率升高,表明 CGA009 的 6 个 *ArsR* 均具有 As(III)诱导基因“开关”的功能。由于基因组 DNA 上拥有不同 *ArsR* 的所有结合位点,基于基因组 DNA 改良的 EMSA 法能够良好评价 *ArsR* 的功能,图谱清楚,结果明确。

2.3 砷生物传感体系构建

以 *gfp* 为报告基因,构建 $OP_{E1}-arsR_{E1}$ 和 OP_S-arsR_S 砷生物传感菌株。重组菌株 $OP_{E1}-arsR_{E1}$ 和 OP_S-arsR_S 双酶切验证和荧光光谱,如图 4 所示。图 4 中: F 为荧光强度; λ 为波长。由图 4 可知:电泳条带与预期 $OP_{E1}-arsR_{E1}$ (630 bp)和 OP_S-arsR_S (416 bp)DNA 片段条带吻合(图 4(a));与无砷对照相比,添加 As(III)能够诱导菌株报告基因(*gfp*)高效表达,荧光强度明显升高(图 4(b)),表明 $OP_{E1}-arsR_{E1}$ 和 OP_S-arsR_S 菌株具有 As(III)生物荧光传感活性。在此基础上,将这 2 个重组菌株中的 *arsR_{E1}* 和 *arsR_S* 替换成其他菌株的 *arsR*(检测结果未显示),用于研究异种间 OP 和 *ArsR* 相互作用。

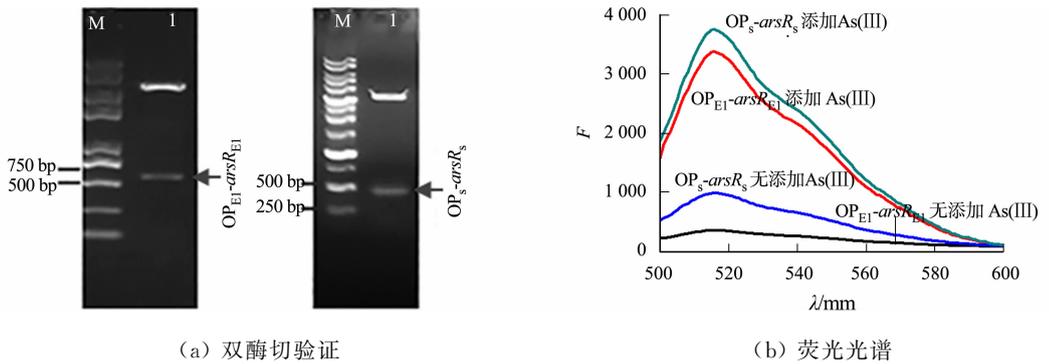


图 4 重组菌株 $OP_{E1}-arsR_{E1}$ 和 OP_S-arsR_S 双酶切验证和荧光光谱

Fig. 4 Verification of $OP_{E1}-arsR_{E1}$ and OP_S-arsR_S by enzyme digestion and fluorescence spectra of recombinant strains

2.4 *ArsR* 与 OP 相互作用条件的确定

As(III)对菌株的影响,如图 5 所示。图 5 中: $\rho(\text{As(III)})$ 为 As(III)质量浓度。由图 5 可知:随着时间延长,菌体 D 和 F_{512} 升高,8 h 基本稳定;随着时间延长,线性关系的斜率升高,本底值也升高,但线性关系范围减小,线性关系范围降至 As(III)质量浓度为 $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,8~10 h 直线的斜率和本底值无明显差异;随着 As(III)质量浓度的升高,菌株生长速率降低, F_{512} 升高。由此表明,砷生物传感菌株可用于 As(III)质量分数的测定,培养时间短,线性范围宽,本底值低,但灵敏度低。因此,研究不同 *ArsR* 与 OP 的相互作用,选择 As(III)质量浓度为 $0 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,培养时间为 10 h。

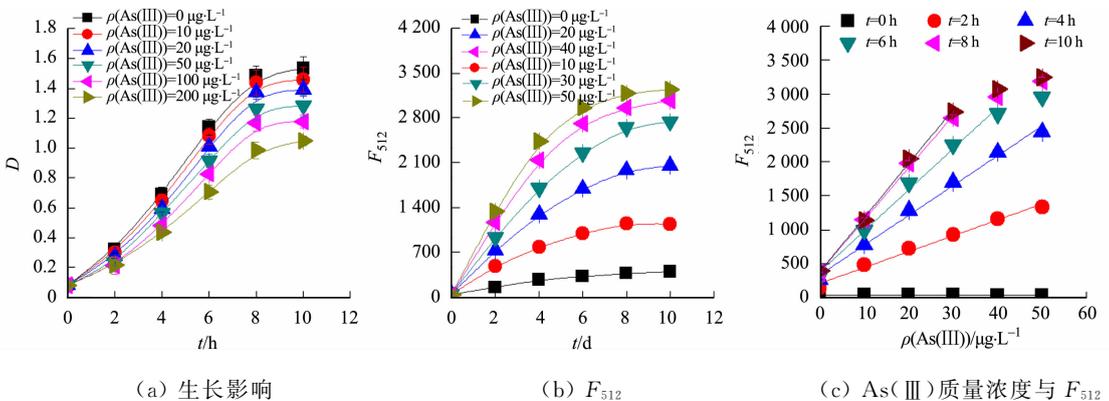


图 5 As(III)对 $OP_{E1}-arsR_{E1}$ 菌株生长和绿色荧光蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of As(III) on the growth and expression of green fluorescent protein of $OP_{E1}-arsR_{E1}$ strain

2.5 荧光生物传感法检测 *ArsR* 与 OP 的相互作用

ArsR 为转录抑制蛋白,若不与 OP 识别结合,基因表达将不受抑制,菌株产生 GFP 的荧光;若能相互作用,则抑制基因表达,菌株的荧光强度降低;As(III)诱导可解除 *ArsR* 的转录抑制,使基因表达、菌体荧光强度升高。*ArsR* 与 OP 的相互作用,如图 6 所示。由图 6 可知:除了 $ArsR_{E1}$ 外, $ArsR_{E2}$ 和 $ArsR_S$

也能与 OP_{E1} 相互作用,抑制菌株 GFP 表达;随着 As(III) 质量浓度升高,GFP 表达量升高,其余 5 个 ArsR 均不能与 OP_{E1} 相互作用(图 6(a));除了 $ArsR_S$ 外, $ArsR_1$ 和 $ArsR_5$ 也能与 OP_S 相互作用,其余 6 个 ArsR 均不能与 OP_S 相互作用(图 6(b))。由此表明,ArsR 具有高度特异性调控作用,但也具有交叉反应的现象,除了菌株自身 ArsR 外,其他不同菌株甚至异种的外源 ArsR 也能发挥调控作用。

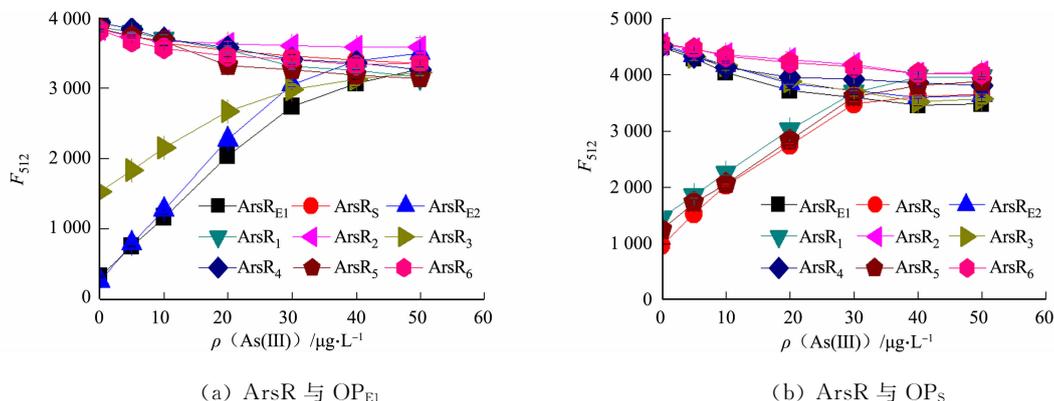


图 6 ArsR 与 OP 的相互作用

Fig. 6 Interaction role between ArsR and OP

将图 6 的 As(III) 和 GFP 荧光(F_{512})的剂量效应关系进行线性拟合,从定量水平分析 ArsR,OP 和 As(III) 三者之间的相互作用。不同重组菌株的 F_{512} 对 As(III) 浓度响应的线性拟合方程,如表 2 所示。表 2 中: k 为斜率,反映砷解除 ArsR 对基因表达的抑制的能力,斜率越大,GFP 表达越高,说明 ArsR 对砷响应活性高,反之则低; b 为截距,反映 ArsR 与 OP 结合能力的大小,截距大,说明 ArsR 与 OP 结合能力弱,反之则强;上标 a,b,c,d,e 表示显著性差异分析,不同字母间具有显著性差异($P < 0.05$)。

表 2 不同重组菌株的线性拟合方程

Tab. 2 Linear fitting equations of different recombinant strains

菌株	b	k	R^2
OP_{E1} - $ArsR_{E1}$	322.9 ± 15.8^a	84.49 ± 1.06^a	0.998 7
OP_{E1} - $ArsR_{E2}$	295.5 ± 14.5^a	96.03 ± 0.95^b	0.996 1
OP_{E1} - $ArsR_3$	$1\ 529.0 \pm 22.5^b$	57.58 ± 1.03^c	0.998 6
OP_S - $ArsR_S$	$1\ 084.1 \pm 27.9^c$	84.53 ± 1.33^a	0.976 1
OP_S - $ArsR_1$	$1\ 495.1 \pm 27.0^d$	74.93 ± 1.43^d	0.996 6
OP_S - $ArsR_5$	$1\ 258.9 \pm 14.8^e$	79.18 ± 1.26^e	0.998 9

由表 2 可知:与 OP_{E1} - $ArsR_{E1}$ 相比, OP_{E1} - $ArsR_{E2}$ 亲和力相近,但对砷响应活性更高, OP_{E1} - $ArsR_3$ 亲和力和对砷响应活性则显著降低;与 OP_S - $ArsR_S$ 相比, OP_S - $ArsR_1$ 与 OP_S - $ArsR_5$ 对砷响应线性方程的斜率显著降低, OP_{E1} - $ArsR_{E1}$ 的亲和力更高,无砷环境中调控系统更有效,基因本底表达量更低。

3 结论

3.1 ArsR 调控活性

ArsR 在微生物砷代谢调控及砷代谢转化过程中具有重要的作用。对于只有 1 个 *arsR* 菌株而言,*arsR* 通常位于 1 个 *ars* 操纵子上,在无砷的环境中,*ars* 操纵子基因表达产生 ArsR,ArsR 与操纵子的操纵区结合抑制基因表达。当 As(III) 存在时,可诱导 *ars* 操纵子基因的表达^[18]。在已报道的多个 *arsR* 菌株中,*Shewanella* sp. ANA-3 拥有 6 个 *arsR*,但调控方式则相对简单,只有 $ArsR_2$ 发挥调控作用,可同时调控 2 种类型操纵子(*ars* 和 *arr*)靶基因的表达,其余 5 个 *arsR* 却未呈现明确的调控作用^[10],但这 5 个 *arsR* 是否具有 As(III) 依赖的调控活性或参与其他基因调控尚不明确。

EMSA 法和 DNA 足迹法是 2 种经典的定性的研究蛋白质与 DNA 相互作用的方法^[19]。DNA 足迹法能全面地解决 ArsR 功能评价的问题,但需要高灵敏的放射性核素(³²P)标记基因组 DNA,常规使用受限。EMSA 法简单,主要用于评价 ArsR 对特定的基因组 DNA 片段是否具有识别作用,但菌株中不同的 ArsR 识别的基因组 DNA 片段并不清楚,即使 ArsR 对特定基因组 DNA 片段不识别,也不能证

明 ArsR 没有调控活性, ArsR 可能对基因组 DNA 其他区域具有识别作用。在 4 个 *arsR* 相关基因^[17] 的基础上, CGA009 菌株又预测了 2 个新型的 *arsR*, 但这 6 个 ArsR 识别的基因组 DNA 序列并不清楚。鉴于此, 以 CGA009 菌株的 6 个 ArsR 为对象, 通过 EMSA 法研究 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。结果表明, 基于基因组 DNA 改良的 EMSA 法能够全面地评价 ArsR 的功能, 且图谱清楚, 结果明确; CGA009 菌株的 6 个 ArsR 都具有 As(Ⅲ)依赖的调控活性, 但这 6 个 ArsR 的作用位点及其在菌株中调控机制尚不清楚, 还有待于进一步的分析。

3.2 ArsR 与基因组 DNA 的识别

ArsR 与 OP 的选择性识别是 ArsR 调控的基础。ArsR 系统发育表明, 同种 (*E. coli*) 不同菌株 (BL21, pR733 和 R46) 的 ArsR 的同源性也较高, 但同一菌株 (如 CGA009 或 ANA-3) 的不同 *arsR* 同源性差异很大 (图 2), 这与文献^[12] 在其他菌种 (株) 中分析结果基本一致。在生物进化过程中 *arsR* 可能存在横向转移现象^[12], 从理论上分析 ArsR 在异种间应该具有调控作用, 但尚未见报道。因此, 利用 2 个 OP 序列, 构建可替换基因元件的砷生物传感菌株, 探讨异种菌株 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用的可行性。结果发现, 外源 ArsR 能在同种不同菌株及异种菌株中发挥调控作用。

A. *tumefaciens* 5A 拥有 4 个 ArsR, 高度同源性 (93%) 的 ArsR₁ 和 ArsR₄ 具有高度的调控特异性, 二者不能等效替代; 而同源性只有 44% 的 ArsR₁ 和 ArsR₃, 却能发生交叉反应^[12]。ArsR 与 OP_{E1} 相关作用表明: 与 ArsR_{E1} 同源性为 77% 的 ArsR_{E2} 对 OP_{E1} 识别作用与 ArsR_{E1} 一致, 且砷诱导表达活性更高, 即 ArsR_{E2} 可替代 ArsR_{E1} 的作用, 这与高度同源的 ArsR “不能相互替代” 的结果不同^[12]; 与 ArsR_{E1} 同源性为 42.4% 的 ArsR₃, 也能识别 OP_{E1} 发挥调控作用, 这与同源性较低的 ArsR 之间能发生交叉反应的结果基本一致^[12]; 其他 6 个 ArsR 虽然都具有砷依赖的调控活性, 但均不能识别 OP_{E1}, 表明 ArsR 对 DNA 识别又具有高度特异性。

与菌株自身 ArsR_S 相比, 同源性低于 30% 的 ArsR₅ (28.6%) 和毫无同源性的 ArsR₁, 却能识别异源的 OP_S 发挥调控作用, 但同源性相对较高的 ArsR₃ (41%) 却不能识别 OP_S 发挥调控作用。这与文献报道的 ArsR 的特异性调控和交叉调控结果^[12] 是一致的, 只是显示亲缘关系差别更大、甚至毫无亲缘关系的 ArsR 也具有相互识别调控的作用。

高度同源的 ArsR 彼此之间却没有等效调控作用, 表明 ArsR 对基因组 DNA 识别序列具有高度特异性, 可能是因为 ArsR 与基因组 DNA 结合域的个别氨基酸差异^[12]。由此可知, 同源性很高的 ArsR 由于基因组 DNA 结合域的关键氨基酸不同, ArsR 与基因组 DNA 识别序列特异性也不同; 同源性很低甚至毫无同源性的 ArsR 却能识别相同的基因组 DNA 片段, 原因可能是 ArsR 与基因组 DNA 结合域的某些氨基酸相似度较高, 也可能是识别的基因组 DNA 片段的位点不同。由此可知, ArsR 对基因组 DNA 的识别序列具有丰富的多样性, 目前难以准确预测。这可能也是多个 ArsR 菌株的砷代谢调控机制难以分清 ArsR 识别基因组 DNA 位点的原因之一。根据异种已知的基因组 DNA 序列, 推测研究菌株中未知的 ArsR 作用位点, 还有待进一步研究。

通过改良的 EMSA 法研究 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。结果表明, CGA009 菌株的 6 个 ArsR (包括预测的 2 个 ArsR 相关基因) 都具有 As(Ⅲ)依赖的调控活性; 由于基因组 DNA 上具有相关 ArsR 全部的识别位点, 基于基因组 DNA 改良的 EMSA 法能够良好地评价 ArsR 的功能, 图谱清楚, 结果明确。采用砷生物传感法研究了异种间 ArsR、基因组 DNA 和 As(Ⅲ)三者之间的相互作用。结果显示, 同种不同菌株 (亲缘关系相对较近, ArsR_{E2} 与 OP_{E1}), 甚至异种间 (亲缘关系很远 ArsR₁ 和 ArsR₅ 与 OP_S) 的外源 ArsR, 也具有相互识别作用, 反而一些亲缘关系相对较近 ArsR (ArsR₃ 与 OP_S) 却不能相互作用, 表明 ArsR 调控选择性并不是由氨基酸序列的同源性高低决定的, 可能与 ArsR 识别基因组 DNA 结构域的关键氨基酸有关, 这为深入研究微生物复杂调控机制提供了思路和研究方法。

参考文献:

- [1] JOSHI V C, GUPTA A R, INDURKAR P, *et al.* Rationally designed in-chain porous metallo-polymeric microsphere: A highly efficient and regenerative scavenger for ultra-trace arsenic from water[J]. Chemical Engineering Journal,

- 2022,449;138420. DOI:10.1016/j.cej.20.22.138420.
- [2] WU Jingwen, LIANG Jieliang, BJÖRN L O, *et al.* Phosphorus-arsenic interaction in the ‘soil-plant-microbe’ system and its influence on arsenic pollution[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 802:149796. DOI:10.1016/j.scitotenv.2021.149796.
- [3] ZHUANG Fan, HUANG Jingyi, LI Hongguang, *et al.* Biogeochemical behavior and pollution control of arsenic in mining areas: A review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14:1043024. DOI:10.3389/fmicb.2023.1043024.
- [4] HUANG J H. Impact of microorganisms on arsenic biogeochemistry: A review[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2014, 225:1848. DOI:10.1007/s11270-013-1848-y.
- [5] BISWAS R, SARKAR A. *Microbes: Key players of the arsenic biogeochemical cycle*[M]. Cham: Springer International Publishing, 2022.
- [6] LI Ping, JIANG Zhou, WANG Yanhong, *et al.* Analysis of the functional gene structure and metabolic potential of microbial community in high arsenic groundwater[J]. *Water Research*, 2017, 123:268-276. DOI:10.1016/j.watres.2017.06.053.
- [7] WANG Liping, JEON B, SAHIN O, *et al.* Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15):5064-5073. DOI:10.1128/aem.00149-09.
- [8] KAUR S, KAMLI M R, ALI A. Role of arsenic and its resistance in nature[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(10):769-774. DOI:10.1139/W11-062.
- [9] FERNÁNDEZ M, MOREL B, RAMOS J L, *et al.* Paralogous regulators ArsR1 and ArsR2 of *Pseudomonas putida* KT2440 as a basis for arsenic biosensor development[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14):4133-4144. DOI:10.1128/aem.00606-16.
- [10] MURPHY J N, SALTIKOV C W. The ArsR repressor mediates arsenite-dependent regulation of arsenate respiration and detoxification operons of *Shewanella* sp. strain ANA-3[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21):6722-6731. DOI:10.1128/JB.00801-09.
- [11] SCHRÖDER J, TAUCH A. *The transcriptional regulatory network of Corynebacterium glutamicum*[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [12] KANG Y S, BRAME K, JETTER J, *et al.* Regulatory activities of four ArsR proteins in *Agrobacterium tumefaciens* 5A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(12):3471-3480. DOI:10.1128/aem.00262-16.
- [13] CHEN Jian, NADAR V S, ROSEN B P. A novel MAs (III) selective ArsR transcriptional repressor[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 106(3):469-478. DOI:10.1111/mmi.13826.
- [14] QIN Jie, ROSEN B P, ZHANG Yang, *et al.* Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(7):2075-2080. DOI:10.1073/pnas.0506836103.
- [15] ZHAO Chungui, ZHANG Yi, CHAN Zhuhua, *et al.* Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodospseudomonas palustris* CGA009[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(17):986. DOI:10.3389/fmicb.2015.00986.
- [16] YANG Pengmin, KE Changdong, ZHAO Chungui, *et al.* ArsM-mediated arsenite volatilization is limited by efflux catalyzed by As efflux transporters[J]. *Chemosphere*, 2020, 239:124822. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.124822.
- [17] KE Changdong, ZHAO Chungui, RENSING C, *et al.* Characterization of recombinant *E. coli* expressing *arsR* from *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 that displays highly selective arsenic adsorption[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102:6247-6255. DOI:10.1007/s00253-018-9080-8.
- [18] CHEN Xingjuan, JIANG Xin, TIE Cuijuan, *et al.* Contribution of nonconsensus base pairs within ArsR binding sequences toward ArsR-DNA binding and arsenic-mediated transcriptional induction[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2019, 13:1-12. DOI:10.1186/s13036-019-0181-4.
- [19] CHEN Yanxiang, ROSEN B P. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(22):14257-14262. DOI:10.1074/jbc.272.22.14257.

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202311032



产灵菌红素沙雷氏菌 R18 的 鉴定及基因组特性

陈明霞¹, 邢元军¹, 李和阳^{2,3}, 施俊豪¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 自然资源部 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

3. 第三海洋研究所 福建省海洋生态保护与修复重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用形态学、生理生化及分子生物学方法对菌株 R18 进行菌种鉴定。通过基因组测序和生物信息学比较,进一步分析其分类地位和生物学特性,并在基因组水平上探讨该菌株红色素的合成基因簇和代谢路径。结果表明:菌株 R18 最佳生长条件为温度 30~37 °C, pH 值 6~8, NaCl 质量浓度 0~10 g · L⁻¹;菌株 R18 与粘质沙雷氏菌模式菌株 ATCC 13880 的 16S rDNA 相似度为 99.86%,基因组平均核苷酸均一性和数字 DNA-DNA 杂交值分别为 98.73%, 89.5%, 均高于物种界定阈值,属于同一个物种;菌株 R18 灵菌红素合成基因簇全长 35 021 bp, 包含 29 个基因, 其中, 4 个核心合成基因、10 个补充的合成基因、1 个调控基因、1 个转运基因及 13 个其他基因, 具有完整的灵菌红素合成代谢途径。

关键词: 粘质沙雷氏菌; 灵菌红素; 菌种鉴定; 基因组特性

中图分类号: Q 939.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0626-10

Identification and Genomic Characterization of Prodigiosin-Producing *Serratia* sp. R18

CHEN Mingxia¹, XING Yuanjun¹, LI Heyang^{2,3}, SHI Junhao¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China;

3. Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Ecological Conservation and Restoration,
Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China)

Abstract: Strain R18 was identified using morphological, physiological, biochemical and molecular biological methods. Its taxonomic status and biological properties were further analyzed by comparing genome sequencing and bioinformatics, and the synthetic gene cluster and metabolic pathway of the red pigment in this strain were explored at the genomic level. The results showed that the optimal growth conditions for strain R18 were temperature of 30-37 °C, pH value of 6-8, and the mass concentration of NaCl of 0-10 g · L⁻¹. Strain R18 shared a 16S rDNA similarity of 99.86% to *Serratia marcescens* type strain ATCC 13880, the genome average nucleotide identity value and the digital DNA-DNA hybridization value were 98.73% and 89.5%, respectively, both of which were higher than the species identification threshold and belong to the same specie. Strain R18 prodigiosin synthetic gene cluster had a total length of 35 021 bp and contained 29 genes including 4 core syn-

收稿日期: 2023-11-29

通信作者: 李和阳(1978-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事海洋微生物生态的研究。E-mail: heyang_li@tio.org.cn。

基金项目: 福建省海洋经济发展专项资金资助项目(FJHJF-L-2022-11); 华侨大学 2023 年实验教学与管理改革课题(SY2023J05); 福建省海洋生态保护与修复重点实验室开放基金资助项目(EPR2020002)

thetic genes, 10 complementary synthetic genes, 1 regulatory gene, 1 transporter gene and 13 other genes, it had a complete prodigiosin synthesis metabolic pathway.

Keywords: *Serratia marcescens*; prodigiosin; bacterial identification; genomic characterization

沙雷氏菌属于细菌界、变形菌门、 γ -变形菌纲、肠杆菌目、肠杆菌科, 该属包含粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、嗜线虫沙雷氏菌 (*Serratia nematodiphila*)、嗜昆虫沙雷氏菌 (*Serratia entomophila*) 和泉居沙雷氏菌 (*Serratia fonticola*) 等 23 个物种 (<https://lpsn.dsmz.de/genus/serratia>), 其中, 粘质沙雷氏菌是模式种, 包含产灵菌红素的 A1, A2/A6 生物型和不产灵菌红素的 A3, A4, A5/A8 及 TCT 等生物型。A3 和 A4 生物型无处不在, A5/A8 及 TCT 生物型主要来源于医院病人临床样品, A1, A2/A6 生物型主要分布于自然环境中^[1]。粘质沙雷氏菌也是一类生防菌, 可生产多种具抗生性代谢产物, 如灵菌红素、脂肽、碳青霉烯、细菌素等, 具有抗菌、杀虫、杀藻、抗疟疾、抗肿瘤、免疫抑制、促进植物生长等作用^[2-5]。产灵菌红素的粘质沙雷氏菌菌落呈红色、酒红色或粉红色, 无明显扩散性, 菌种资源容易从普通环境样品中获取, 生物安全性较高, 因此, 近年来其成为高校“细菌画”创作中使用频率最高的菌种之一, 第 7 届全国微生物培养皿艺术大赛 153 幅作品中, 有 62 幅作品将粘质沙雷氏菌作为“红色颜料”进行作品创作, 深受广大师生好评^[6]。

在筹办华侨大学微生物培养皿艺术比赛时, 从健康人体皮肤表面分离到一株产红色素菌株 R18, 其菌落颜色鲜红靓丽, 是“细菌画”创作的绝佳“颜料”。为了更安全且有针对性地将该菌株应用于微生物学实验教学和大学生科创活动中, 本文采用形态学、生理生化和分子生物学方法对菌株 R18 进行菌种鉴定, 通过基因组测序和生物信息学分析, 进一步分析其分类地位和生物学特性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 沙雷氏菌株 R18 来源于健康人类皮肤表面, 保藏于中国海洋微生物菌种保藏管理中心, 保藏号为 MCCC 1K08643, 生物危害等级为 4 类。

1.1.2 主要仪器和试剂 Multiskan FC 型酶标仪(美国 ThermoFisher 公司); Centrifuge5417R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 1-14 型高速离心机(德国 Sigma 公司); GE9612T-S 型基因扩增仪(浙江省杭州市柏恒科技有限公司); DT 93-3 型微量振荡器(江苏省大唐医疗器械有限公司)。

胰蛋白胨(英国 OXOID 公司); 酵母提取物(英国 OXOID 公司); 2 \times premix Taq(日本 TaKaRa 公司); λ -Hind III digest DNA marker(日本 TaKaRa 公司); DL2000 DNA marker(日本 TaKaRa 公司); 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(北京市百泰克生物技术有限公司); 其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基 1) LB 培养基: 蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, NaCl 1 g, dH₂O 100 mL, pH 值为 7.2~7.8; 2) 牛奶琼脂平板: 蛋白胨 0.1 g, 酵母提取物 0.02 g, NaCl 1 g, 琼脂 2 g, 市售脱脂牛奶 50 mL, dH₂O 50 mL; 3) 淀粉/吐温 80 琼脂平板: 蛋白胨 0.1 g, 酵母提取物 0.02 g, NaCl 1 g, 琼脂 2 g, 淀粉/吐温 80 0.2 g, dH₂O 100 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7] 进行菌落形态、菌体形态、生长温度范围等生理生化特征测定。使用细菌 16S rDNA 通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[8] 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, PCR 产物使用 10 g \cdot L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并委托擎科科技有限公司进行 DNA 序列测定。所得序列校正后, 在 EzBioCloud 数据库 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) 进行同源性分析^[9], 从数据库下载相近菌种的 16S rDNA 序列。使用 DNAMAN 5.1 软件和 MEGA 7 软件, 采用邻近连接法构建系统进化树^[10]。

1.2.2 基因组测序和拼装 采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取细菌基因组 DNA, 使用 10 g \cdot L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳、NanoDrop one 型分光光度计和 Qubit 3.0 型荧光光度计检测 DNA 样品的质量浓度、纯度和降解程度。委托广东省美格基因科技有限公司进行基因组测序分析。采用 NEB Next 注册商标 Recalbon[®] Ultra DNA Library Prep Kit 试剂盒(美国 New England Biolabs 公司)构建测序

文库,使用 Illumina Novaseq 6000 测序平台(美国 New England Biolab 公司)进行高通量测序,测序原始数据通过 FastQC v0.11.9 软件^[11]和 Trimmomatic v0.36 软件^[12]进行质控,并去除低质量数据,采用 SPAdes v3.9.0 软件^[13]拼接构建 contigs/scaffolds(>500 nt),并用 QUAST v5.0.2 软件^[14]评估拼接质量。

1.2.3 基因预测和功能注释 采用 GeneMarkS v4.17 软件(<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>)^[15]进行编码基因预测。采用 tRNAscan-SE v1.3.1 软件^[16]预测 tRNA 基因,采用 RNAmmer v1.2 软件^[17]预测 rRNA 基因,采用 Rfam 数据库 Blast 程序(<https://rfam.org/>)^[18]预测 snRNA 基因。采用 BLAST v2.14.1 软件(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/>)将编码基因与 Gene Ontology(GO)^[19], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)^[20-21], Cluster of Orthologous Groups of Proteins(COG)^[22], Non-Redundant Protein Database(NR)^[23], Carbohydrate-Active EnZymes Database(CAZy)^[24]数据库进行比对,获得基因功能注释信息。

1.2.4 比较基因组学分析 使用 EzBioCloud 中的在线工具 ANI Calculator(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)分析菌株 R18 与近源物种的基因组平均核苷酸均一性(gANI)^[25]。使用 Genome-to-Genome Distance Calculation(GGDC) version 2.1 formula 2(<https://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>)分析菌株 R18 与近源物种的基因组同源性,即数字 DNA-DNA 杂交(dDDH)值^[26]。

1.2.5 次级代谢产物合成基因簇分析 采用 antiSMASH 7.0 在线工具(<https://antismash.secondarymetabolite.org/>)对菌株 R18 中的次级代谢产物合成基因簇进行预测^[27]。

1.2.6 GenBank 登录号 菌株 R18 的 16S rDNA 和基因组序列已提交到 GenBank 数据库,登录号分别为 OR043023, JASKOU000000000.1。

2 实验结果与分析

2.1 菌株形态及生理生化特征

菌株 R18 不同条件下的生长状况,如图 1 所示。图 1 中: t 为时间; $D(620)$ 为吸光度; $\rho(\text{NaCl})$ 为 NaCl 的质量浓度; θ 为温度。

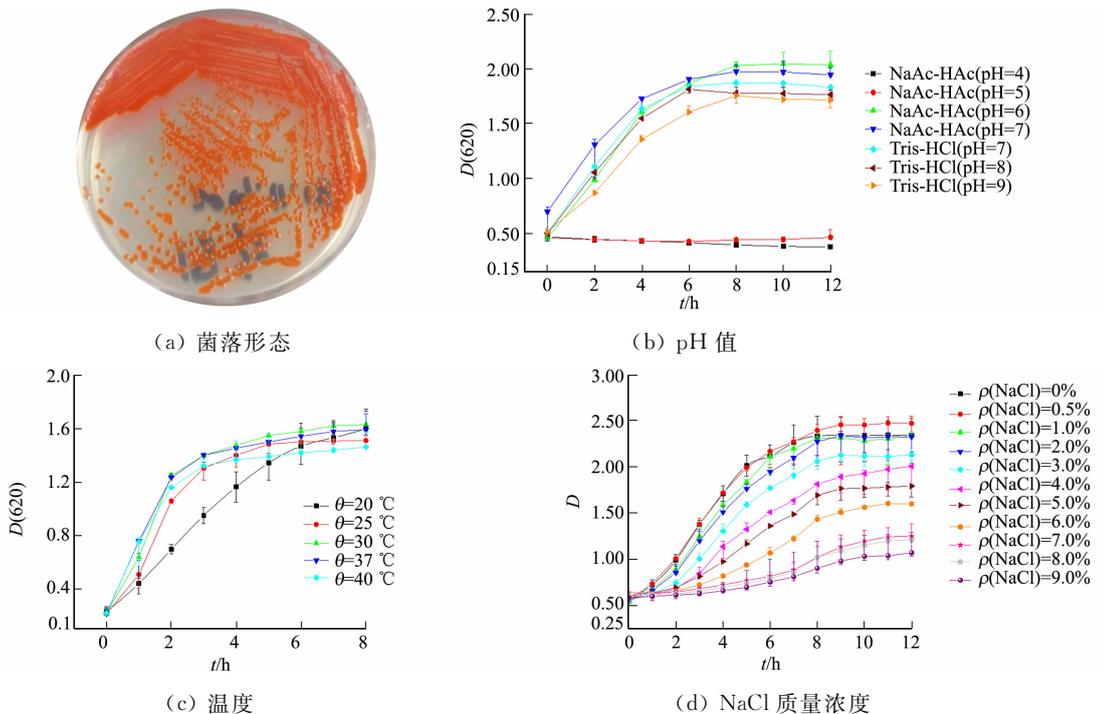


图 1 沙雷氏菌 R18 不同条件下的生长状况

Fig. 1 Growth status of *Serratia* sp. R18 at different conditions

菌株 R18 置于 LB 平板(LB 平板直径 $\phi = 80$ mm),在 30 °C 条件下培养 24 h 后,形成红色菌落,直

径 2~4 mm, 菌落表面光滑湿润、边缘整齐、突起且不透明(图 1(a))。菌体为革兰氏染色阴性, 形态近球形或短棒状, 宽 0.4~0.5 μm, 长 0.4~0.8 μm; 氧化酶和过氧化氢酶阳性, 产胞外酯酶和蛋白酶, 不产淀粉酶。

菌株 R18 在温度 20~37 °C, pH 值 6.0~9.0, NaCl 质量浓度 0~90 g · L⁻¹ 条件下均可生长, 最佳生长条件为温度 30~37 °C, pH 值 6.0~8.0, NaCl 质量浓度 0~10 g · L⁻¹(图 1(b)~(d))。菌株 R18 的形态和各类生理生化特征与模式菌株 *S. marcescens* ATCC 13880 一致^[1]。

2.2 16S rDNA 系统发育分析

菌株 R18 16S rDNA 基因序列全长 1 530 bp, 在 EzBioCloud 数据库中的比对结果表明, 菌株 R18 属于 *Serratia* 属, 与模式菌株 *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 相似度最高, 均为 99.86%。系统发育分析也显示 3 个菌株亲缘关系最近, 处于同一个进化分支。

采用邻近连接法构建系统进化树, 沙雷氏菌 R18 与其近源种的 16S rDNA 系统发育树, 如图 2 所示。图 2 中: 节点数值为大于 40% 的 Bootstrap 值; 括号内为 GenBank 登录号; 比例尺为进化距离。

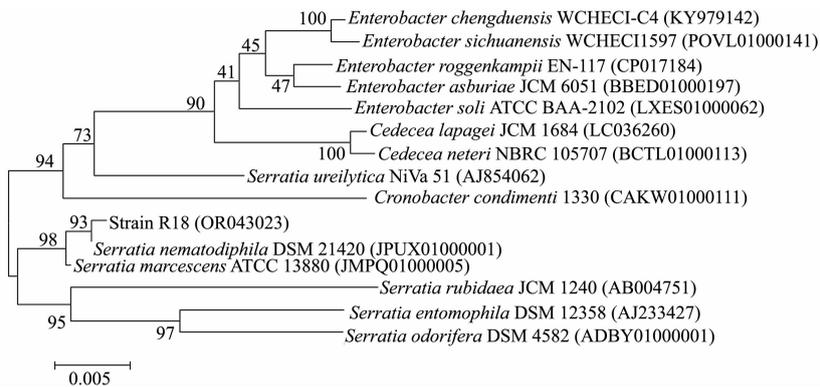


图 2 沙雷氏菌 R18 与其近源种的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 16S rDNA-based phylogenetic tree of *Serratia* sp. R18 and closely related species

2.3 沙雷氏菌 R18 基因组比较分析

基因组测序获得 8 037 186 个测序片段(reads)共 1 205 577 900 nt 的原始数据, 去除低质量片段后, 可得 7 446 608 个 reads(1 098 126 252 nt), 序列片段拼装成 23 个重叠群(contigs), 菌株 R18 基因序列总长度为 5 046 985 bp, GC 含量(GC 含量是指 DNA 序列中鸟嘌呤(guanine)和胞嘧啶(cytosine)两种碱基的总比例)为 59.7%, 基因组测序深度为 217×, 预测有 4 872 个编码基因、85 tRNA 基因、1 个 16S rRNA 基因、6 个 5S rRNA 基因和 43 个 sRNA 基因。菌株 R18 与各近源物种基因组大小差异不大(标准差 σ=0.16), GC 含量的比例也较为接近(σ=0.58), 但编码的基因数量存在较大差异(σ=175.25), 可能与测序的完整性、质粒的存在状况有关。

沙雷氏菌 R18 与其近源物种的基因组特征, 如表 1 所示。表 1 中: 1 为菌株 R18; 2 为 *S. marcescens* ATCC 13880(GCA_006974205.1); 3 为 *S. nematodiphila* DSM 21420(GCA_000738675.1); 4 为 *S. bockelmannii* S3(GCA_008011855.1); 5 为 *S. surfactantfaciens* YD25(GCA_001642805.2); 6 为 *S. ureilytica* C7(GCA_008122445.1)。

表 1 沙雷氏菌 R18 与其近源物种的基因组特征

Tab. 1 Genomic characteristics of *Serratia* sp. R18 and closely related species

类别	1	2	3	4	5	6
基因组大小/Mbp	5.05	5.16	5.22	5.29	5.12	5.54
GC 含量/%	59.70	59.80	59.50	59.04	59.60	58.10
编码基因数量	4 872	5 283	4 807	4 907	4 727	4 921
tRNA 基因数量	85	91	91	78	83	81
Contigs 数量	23	2	2	33	1	1 306
N50 长度/bp	710 292	5 115 562	4 451 630	524 298	5 117 644	22 383

沙雷氏菌 R18 与其近源物种的 gANI 值/dDDH 值, 如表 2 所示。表 2 中: 1~6 的含义与表 1 相同。

由表 2 可知:菌株 R18 与 4 个近源菌种基因组 gANI 值均高于 94%,基因组的相似度较高,其中,与 *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 的 gANI 值高于 95%~96%的物种界定阈值^[28-30],分别为 98.73%,96.98%;dDDH 值分析结果也表明菌株 R18,*S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 三者之间的 dDDH 值高于同一个物种界定阈值(70%)^[31]。由此可见,菌株 R18, ATCC 13880 和 DSM 21420 属于同一个物种 *S. marcescens*。菌株 ATCC 13880 和 DSM 21420 之间的 gANI 值和 dDDH 值分别为 96.93%,73.40%,其中,dDDH 值符合亚种界定阈值(小于 79%~80%)的要求^[32],故 *S. nematodiphila* 可以重新归类为 *S. marcescens* 的一个亚种。该结果与文献^[33]的结果(65.1%)不一致,主要原因在于计算 DNA-DNA 杂交(DDH)值的方法不同。文中采用的基于基因组序列进行的数字化 DDH 值计算,相较于传统的湿实验室 DDH 分析方法更具准确性、可重复性和可比性^[31],是基因组大数据时代中可靠的替代方法,具有更高的分辨率和可信度。

表 2 沙雷氏菌 R18 与其近源物种的 gANI 值/dDDH 值

Tab. 2 gANI values/dDDH values between *Serratia* sp. R18 and closely related species (unit: %)

物种	gANI 值/dDDH 值					
	1	2	3	4	5	6
1	100.00/100.00	98.73/89.50	96.98/74.40	95.89/66.30	94.31/56.80	94.59/59.10
2		100.00/100.00	96.93/73.40	95.93/66.60	94.27/56.40	94.69/58.80
3			100.00/100.00	95.43/63.40	94.66/58.80	94.64/58.80
4				100.00/100.00	94.18/55.70	94.66/58.80
5					100.00/100.00	93.94/54.70
6						100.00/100.00

2.4 沙雷氏菌 R18 基因组注释

沙雷氏菌 R18 基因组 COG,GO,CAZy 和 KEGG 功能分类,如图 3 所示。

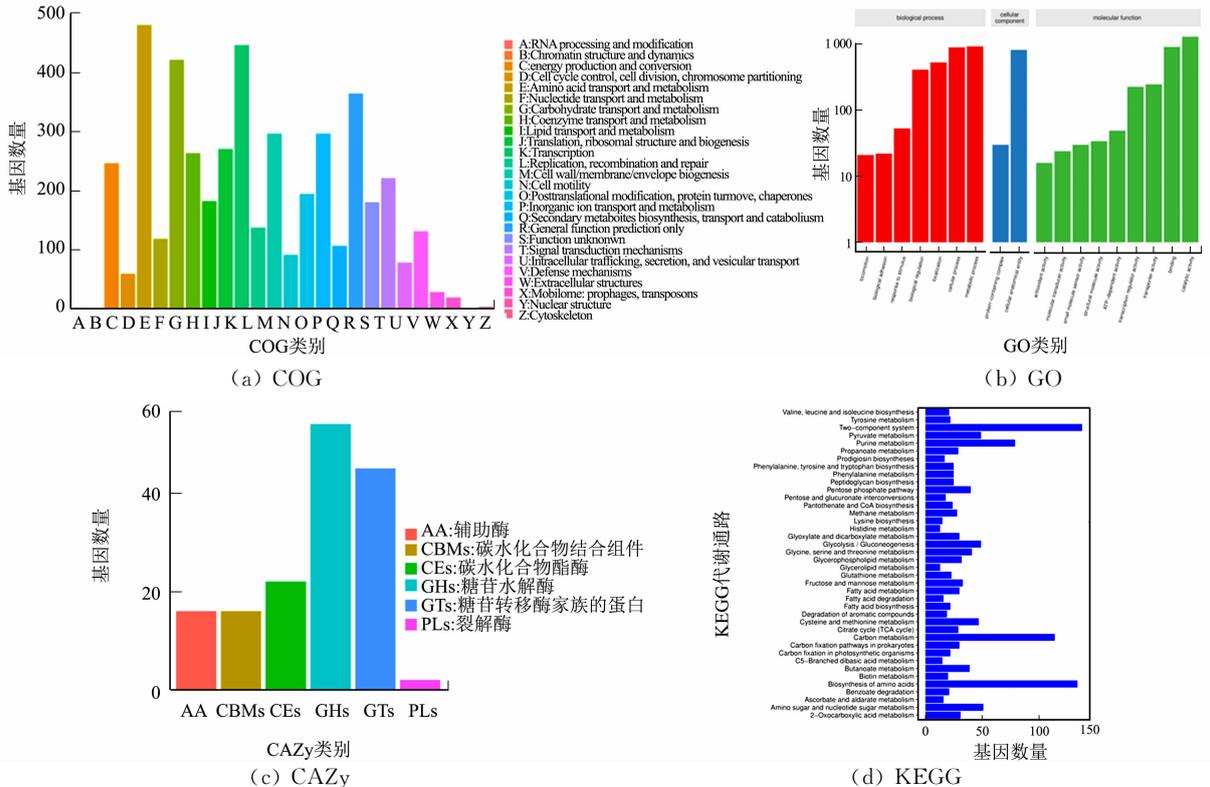


图 3 沙雷氏菌 R18 基因组 COG,GO,CAZy 和 KEGG 功能分类

Fig. 3 COG, GO, CAZy and KEGG functional classification of *Serratia* sp. R18 genome

由图 3(a)及相关分析可知:菌株 R18 共注释到 4 630 个基因,注释率为 95%;COG 数据库的 26 种功能组中,与氨基酸转运与代谢、糖类转移及代谢和转录相关的基因数量最多,分别为 480(10.4%),421(9.1%)和 446(9.6%),没有发现与核结构和染色质结构及动力学有关的基因,另有 180 个未知功

能基因。

由图 3(b)及相关分析可知:菌株 R18 共有 2 774 个基因在 GO 数据库中被注释,GO 数据库按照细胞组分、生物学过程和分子功能 3 个方面对蛋白进行注释,而生物学过程、细胞组分和分子功能分支分别为 7,2,9 个,共计 18 个分支;大部分基因具有多功能,可以被同时注释在不同组分或功能过程分支中,2 774 个基因共被注释了 6 529 次,其中,2 个基因被注释了 9 次,7 个基因被注释了 8 次,17 个基因被注释了 7 次,46 个基因被注释了 6 次,62 个基因被注释了 5 次,236 个基因被注释了 4 次,565 个基因被注释了 3 次,1 213 个基因被注释 2 次,626 个基因被注释 1 次;在细胞组分中,共 848 个基因得到注释;生物学途径类共 2 851 个基因得到注释,涉及细胞内过程与代谢过程的基因最多,分别为 893,924 个;分子功能分支共 2 830 个基因得到注释,涉及结合和催化活性的基因最多,分别为 908,1 296 个。

由图 3(c)及相关分析可知:菌株 R18 的基因组中共有 155 个基因编码的蛋白质结构域属于 CAZy 家族,包括糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)家族的蛋白 54 个、糖苷转移酶家族的蛋白(glycosyl transferases, GTs)45 个、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)22 个、裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)2 个、辅助酶(auxiliary activities, AA)16 个、碳水化合物结合组件(carbohydrate-binding modules, CBMs)16 个。

由图 3(d)及相关分析可知:菌株 R18 的 4 587 个基因富集在 215 条 KEGG 代谢通路中占菌株基因总数的 94.2%;基因数大于 25 的代谢通路有 40 个;KEGG 富集分析显示,ABC 转运蛋白、双组分调节系统、氨基酸生物合成、碳代谢是主要的 4 类代谢通路,分别包含 236,138,134 和 114 个基因获得注释。

2.5 次级代谢产物合成基因簇分析

沙雷氏菌 R18 次级代谢物基因簇,如表 3 所示。通过 antiSMASH 软件预测分析,在菌株 R18 基因组中共检测到 10 个与次级代谢产物合成相关的基因簇。这些基因簇可能编码的代谢产物包括以非核糖体肽合成酶途径(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)合成的小菌素(microcin)、紫杆菌素(viobactin)等,以聚酮合酶途径(polyketide biosynthase, PKS)合成的耶尔森杆菌素(yersiniabactin)、灵菌红素(prodigiosin),以及硫肽类抗生素(thiopeptide)的 O-抗原(O-antigen)和氧化还原辅因子(redox-cofactor)的兰卡杀菌素(lankacidin)等。这些代谢产物与抗菌、抗癌、杀虫等功能密切相关,另有 2 个基因簇(cluster 3. 2, cluster 3. 3)无法匹配到已知基因簇,显示出这些基因簇具有产生新代谢物的潜能。以上基因簇中,prodigiosin, ririwpeptide, trichrysobactin 和 viobactin 的合成基因簇与已知基因簇的相似性分别为 100%, 100%, 46% 和 46%, 其余的则低于 20%。由此可见,从基因组水平看,菌株 R18 具有生产多种具有拮抗作用的次级代谢产物的功能,对其环境竞争力和适应力都具有重要意义。

表 3 沙雷氏菌 R18 次级代谢物基因簇

Tab. 3 Secondary metabolic gene clusters of *Serratia* sp. R18

区域	基因簇类型	长度/bp	最似已知基因簇	相似度/%
1.1	T1PKS, NRPS	56 238	耶尔森杆菌素	4
1.2	NRPS	47 151	紫杆菌素	46
1.3	氧化还原因子	22 163	兰卡杀菌素	13
1.4	NRPS	47 952	小菌素 E492	12
1.5	硫肽类抗生素	26 445	O 抗原	14
2.1	灵菌红素	35 021	灵菌红素	100
3.1	NRP-金属团, NRPS	50 861	Trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/ chrysobactin/dichrysobactin	46
3.2	NRPS-like	42 964	—	—
3.3	β 内脂	25 671	—	—
4.1	NRPS	43 768	Ririwpeptide A/ririwpeptide B/ririwpeptide C	100

2.6 灵菌红素基因簇分析

与产红色素现象相对应,菌株 R18 含有完整的灵菌红素合成基因簇,处于 ctg002 拼装片段上,全长跨度 35 021 bp,包含 29 个基因,其中,包含 4 个核心合成基因、10 个补充的合成基因、1 个调控基因、1 个转运基因及 13 个其他基因。沙雷氏菌 R18 和粘质沙雷氏菌 ATCC 13880 灵菌红素合成基因簇的比

较,如图4所示。由图4可知:基因簇序列与粘质沙雷氏菌模式菌株 ATCC 13880 有 100% 的一致性;该基因簇与模式菌株 ATCC 13880 还存在 4 处小片段未知功能基因差异和一处基因位置偏差(箭头),故推测其基因组上存在基因跳跃的现象,这可能与粘质沙雷氏菌不同颜色自然突变株的高发生率有关。

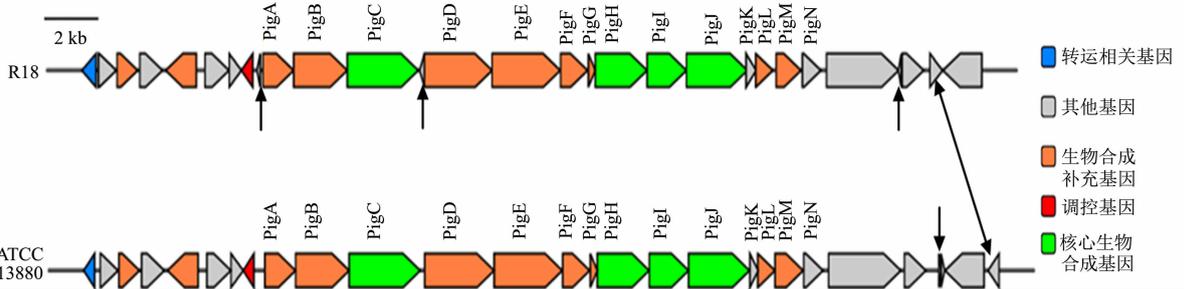


图4 沙雷氏菌 R18 和粘质沙雷氏菌 ATCC 13880 灵菌红素合成基因簇比较

Fig. 4 Comparison of prodigiosin synthetic gene cluster of *Serratia* sp. R18 and *S. marcescens* ATCC 13880

沙雷氏菌 R18 灵菌红素合成代谢途径,如图5所示。由图5可知:菌株 R18 完整的灵菌红素合成代谢途径包括 3 个部分:2-甲基-3-戊基吡咯(MAP)、4-甲氧基-2,2-二吡咯-5-羧甲基乙醛(MBC)的合成,以及在 ATP 的存在下灵菌红素缩合酶 PigC 催化 MAP 和 MBC 合成灵菌红素,这与早期的研究结果一致^[34-35]。

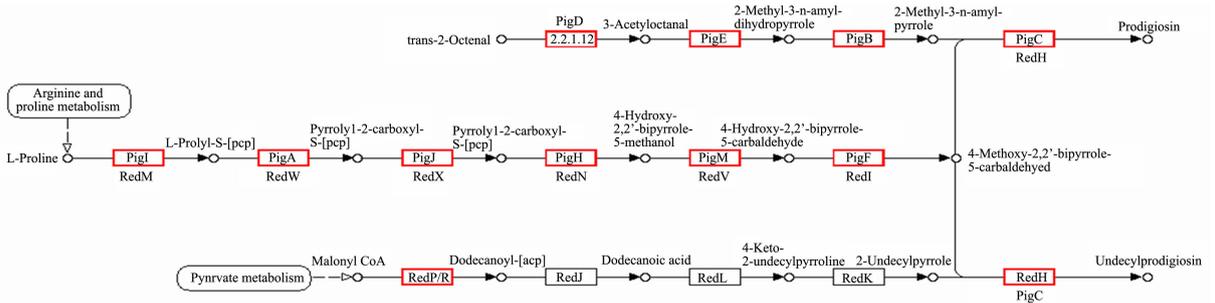


图5 沙雷氏菌 R18 灵菌红素合成代谢途径

Fig. 5 Prodigiosin biosynthesis metabolic pathway of *Serratia* sp. R18

3 结论

采用形态学、生理生化、分子生物学及基因组测序分析的方法对菌株 R18 进行物种鉴定和生物学特性分析,并着重分析菌株 R18 次级代谢产物灵菌红素的基因簇及代谢途径。研究表明,菌株 R18 属于 *Serratia* 属,与模式菌株 *S. marcescens* ATCC 13880 和 *S. nematodiphila* DSM 21420 的 16S rDNA 相似度皆为 99.86%,3 个菌株处在同一个进化分支上。gANI 值和 dDDH 值分析结果也表明,3 个菌株基因组的相似度极高,属于同一个物种 *S. marcescens*。

基因组序列注释有助于深入了解菌株 R18 生命现象的基因本质,尤其是了解各类次级代谢产物的基因簇和代谢途径,有利于探索它们的调控机理,为基因改造和生产应用奠定基础。粘质沙雷氏菌生产的灵菌红素是目前研究较为清楚的次级代谢产物,代谢途径包括 2-甲基-3-戊基吡咯(MAP)、4-甲氧基-2,2-二吡咯-5-羧甲基乙醛(MBC)的合成,以及在 ATP 的存在下灵菌红素缩合酶 PigC 催化 MAP 和 MBC 合成灵菌红素。通过 antiSMASH 软件预测的菌株 R18 灵菌红素基因簇由 29 个基因组成,包含了 PigA-PigN 及转运、调控等相关基因。

致谢:厦门市金安小学李昊城同学为本研究提供菌种,从他皮肤表面分离得到实验菌株 R18。

参考文献:

[1] GRIMONT F, GRIMONT P A D, GENUS X X X I V. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 2nd ed. Ber-

- lin:Springer,2005.
- [2] ARAÚJO R G,ZAVALA N R,CASTILLO-ZACARÍAS C,*et al.* Recent advances in prodigiosin as a bioactive compound in nanocomposite applications[J]. *Molecules*,2022,27(15):4982. DOI:10.3390/molecules27154982.
- [3] ESPONA-FIEDLER M,MANUEL-MANRESA P,BENÍTEZ-GARCÍA C,*et al.* Antimetastatic properties of prodigiosin and the BH3-mimetic obatoclox (GX15-070) in melanoma[J]. *Pharmaceutics*,2022,15(1):97. DOI:10.3390/pharmaceutics15010097.
- [4] CHEN P,WU H,BIAN T,*et al.* Prodigiosin improves acute lung injury in a rat model of rheumatoid arthritis *via* down-regulating the nuclear factor kappaB/nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 signaling pathway[J]. *Journal of Physiology and Pharmacology*,2023,74(1):43-54. DOI:10.26402/jpp.2023.1.05.
- [5] YOUNAS H,NAZIR A,BAREEN F E,*et al.* Metabolic profile and molecular characterization of endophytic bacteria isolated from *Pinus sylvestris* L. with growth-promoting effect on sunf-lower[J]. *Environmental Science and Pollution Research*,2023,30(14):40147-40161. DOI:10.1007/s11356-022-25118-7.
- [6] 中国轻工业联合会,中国生物发酵产业协会. 第一届菌种培养职业技能竞赛暨第七届微生物培养皿艺术大赛[EB/OL]. (2023-07-05)[2023-11-20]. [https://vote.isv.youzan.com/h5? banner_id=f.110709144~image_ad.5~0~30rBitpJ&.reft=1697538254536&.spm=f.110709144#/h5/1681269487132774/1/122509290/0](https://vote.isv.youzan.com/h5?banner_id=f.110709144~image_ad.5~0~30rBitpJ&.reft=1697538254536&.spm=f.110709144#/h5/1681269487132774/1/122509290/0).
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [8] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1992,89(12):5685-5689. DOI:10.1073/pna.89.12.5685.
- [9] KIM O S,CHO Y J,LEE K,*et al.* Introducing EzTaxone: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2012,62(Pt3):716-721. DOI:10.1099/ij.0.038075-0.
- [10] KUMAR S,STECHER G,TAMURA K,MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*,2016,33(7):1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054%20.
- [11] CHEN Shifu,ZHOU Yanqing,CHEN Yaru,*et al.* fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*,2018,34(17):i884-i890. DOI:10.1093/bioinformatics/bty560.
- [12] BOLGER A M,LOHSE M,USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*,2014,30(15):2114-2120. DOI:10.1093/bioinformatics/btu170.
- [13] BANKEVICH A,NURK S,ANTIPOV D,*et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology*,2012,19(5):455-477. DOI:10.1089/cmb.2012.0021.
- [14] GUREVICH A,SAVELIEV V,VYAHHI N,*et al.* QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies[J]. *Bioinformatics*,2013,29(8):1072-1075. DOI:10.1093/bioinformatics/btt086.
- [15] BESEMER J,LOMSADZE A,BORODOVSKY M. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genome: Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Research*,2001,29(12):2607-2618. DOI:10.1093/nar/29.12.2607.
- [16] LOWE T M,EDDY S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*,1997,25(5):955-964. DOI:10.1093/nar/25.5.955.
- [17] LAGESEN K,HALLIN P,RØDLAND E A,*et al.* RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*,2007,35(9):3100-3108. DOI:10.1093/nar/gkm160.
- [18] GARDNER P P,DAUB J,TATE J G,*et al.* Rfam: Updates to the RNA families database[J]. *Nucleic Acids Research*,2009,37(Database issue):D136-D140. DOI:10.1093/nar/gkn766.
- [19] ASHBURNER M,BALL C A,BLAKE J A,*et al.* Gene ontology: Tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*,2000,25(1):25-29. DOI:10.1038/75556.
- [20] KANEHISA M,GOTO S,KAWASHIMA S,*et al.* The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*,2004,32(Database issue):D277-D280. DOI:10.1093/nar/gkh063.
- [21] KANEHISA M,GOTO S,HATTORI M,*et al.* From genomics to chemical genomics: New developments in KEGG [J]. *Nucleic Acids Research*,2006,34(Database issue):D354-D357. DOI:10.1093/nar/gkj102.
- [22] TATUSOV R L,FEDOROVA N D,JACKSON J D,*et al.* The COG database: An updated version includes eukaryotes[J]. *BMC Bioinformatics*,2003,4(1):41. DOI:10.1186/1471-2105-4-41.

- [23] LI Weizhong, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(1): 77-82. DOI: 10. 1093/bioinformatics/18. 1. 77.
- [24] CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREL C, *et al.* The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D233-D238. DOI: 10. 1093/nar/gkn663.
- [25] YOON S H, HA S M, LIM J, *et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286. DOI: 10. 1007/s10482-017-0844-4.
- [26] MEIER-KOLTHOFF J P, SARDÀ C J, PEINADO-OLARTE R L, *et al.* TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(Database issue): D801-D807. DOI: 10. 1093/nar/gkab902.
- [27] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN H E, *et al.* AntiSMASH 7. 0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50. DOI: 10. 1093/nar/gkad344.
- [28] KIM M, OH H S, PARK S C, *et al.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt2): 346-351. DOI: 10. 1099/ij. 0. 059774-0.
- [29] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, *et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461-466. DOI: 10. 1099/ijsem. 0. 002516.
- [30] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(45): 19126-19131. DOI: 10. 1073/pna. 0906412106.
- [31] MEIER-KOLTHOFF J P, AUCH A F, KLENK H P, *et al.* Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60. DOI: 10. 1186/1471-2105-14-60.
- [32] MEIER-KOLTHOFF J P, HAHNKE R L, PETERSEN J, *et al.* Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2014, 9: 2. DOI: 10. 1186/1944-3277-9-2.
- [33] ZHANG Chongxing, YANG Shouyun, XU Mingxu, *et al.* *Serratia nematodiphila* sp. nov. associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditidoides chongmingensis* (*Rhabditida*: *Rhabditidae*) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59 (Pt7): 1603-1608. DOI: 10. 1099/ij. 0. 65718-0.
- [34] HARRIS A K P, WILLIAMSON N R, SLATER H, *et al.* The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt11): 3547-3560. DOI: 10. 1099/mic. 0. 27222-0.
- [35] LI Peishan, HE Shufen, ZHANG Xuejiao, *et al.* Structures, biosynthesis, and bioactivities of prodiginine natural products[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2022, 106(23): 7721-7735. DOI: 10. 1007/s00253-022-12245-x.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202402003



金线莲多糖通过抑制 NF- κ B 信号通路 对糖尿病小鼠肾损伤的改善作用

盛世美¹, 张建刚², 陈焯¹, 戴招龙¹, 李乐¹, 刘青¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 兰州大学 基础医学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 为了考察金线莲多糖对糖尿病小鼠肾损伤的改善作用,将糖尿病小鼠随机分为模型组、二甲双胍组及高、低剂量金线莲多糖组(100和300 mg·kg⁻¹),给药4周后测定小鼠血清生化指标、炎症因子及肾皮质中的蛋白表达,并观察肾组织形态学变化。结果表明:与正常组比,模型组小鼠24 h的尿蛋白质量,血肌酐浓度、丙二醛浓度、炎症因子显著升高,而血清超氧化物歧化酶活力显著下降;模型组小鼠肾组织 p-NF- κ B p65 的蛋白表达显著上调,podocin, Nephrin 的蛋白表达明显下调;组织学检查显示模型组小鼠肾组织结构异常改变;经金线莲多糖干预后,糖尿病小鼠血清生化指标、肾组织中蛋白表达均明显逆转,组织学检查也显示糖尿病小鼠肾损伤明显改善。

关键词: 金线莲多糖; 糖尿病; 肾损伤; NF- κ B 信号通路

中图分类号: R 965.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0635-07

Improvement Effects of *Anoectochilus roxburghii* Polysaccharose on Renal Injury in Diabetic Mice by Inhibiting NF- κ B Signaling Pathway

SHENG Shimei¹, ZHANG Jiangang², CHEN Ye¹,
DAI Zhaolong¹, LI Le¹, LIU Qing¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. School of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 73/000, China)

Abstract: To investigate the improvement effect of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide on renal injury in diabetic mice, the diabetic mice were randomly divided into model group, metformin group and *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide groups (100 and 300 mg·kg⁻¹). After 4 weeks of treatment, the serum biochemical indexes, inflammatory factors and protein expression in renal cortex of the mice were measured, and the renal morphological changes were observed. The results showed that compared with the control group, 24-hour urine protein mass, serum creatinine concentration, malondialdehyde content and inflammatory factors of mice in model group were significantly increased, while serum superoxide dismutase activity was significantly decreased. The protein expression of p-NF- κ B p65 in renal tissue of model group was significantly up-regulated, and the protein expressions of podocin and Nephrin were significantly down-regulated. Histological examination showed abnormal changes of renal tissue structure of mice in model group. The serum biochemical indexes and protein expression in kidney tissue of diabetic mice were significantly reversed after the intervention of the

收稿日期: 2024-02-15

通信作者: 刘青(1970-),女,副教授,博士,主要从事药理及中药提取物的活性研究。E-mail:liuq@hqu.edu.cn.

Anoectochilus roxburghii polysaccharide, and the histological examination also showed that the kidney injury of diabetic mice treated with *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide was significantly improved.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose; diabetes; renal injure; NF- κ B signaling pathway

糖尿病肾病是糖尿病最常见的综合症。在持续高血糖的毒性作用下糖尿病患者肾脏的结构和功能发生改变,导致肾小球高滤过,尿蛋白增加及肾脏损伤^[1]。肾小球滤过屏障异常,蛋白尿的出现是糖尿病肾病早期标志性的临床表现。足细胞及其足突之间的裂孔隔膜构成滤过屏障的最外层,足细胞结构异常是蛋白尿发生的重要原因。足细胞的足突间交叉形成裂孔,其上覆盖的隔膜中表达多种特异性蛋白,podocin 和 Nephlin 是裂孔膜上的重要蛋白分子,对维持裂孔膜的完成完整性起关键作用。如果足细胞的特征性蛋白丢失,裂孔间隙就会变大,引起肾小球滤过屏障高渗漏,蛋白就进入尿液,形成蛋白尿^[2]。引起糖尿病肾病的机制复杂,目前临床上还没有理想的治疗糖尿病肾病的特异性药物。

金线莲是兰科开唇属的多年生草本植物,在我国主要分布于福建、江西、台湾等地。金线莲性平味甘,具有清热凉血、祛风利湿的功效^[2],且无毒副作用,在民间常用于治疗肾炎、糖尿病、高血压等病症^[3]。金线莲多糖是金线莲的主要有效成分之一,以往的研究显示,金线莲多糖有很好的降血糖、降血脂等作用^[4-5]。金线莲多糖能保护糖尿病小鼠的肾组织^[6],但金线莲多糖是否能通过改善糖尿病小鼠的肾小球过滤屏障而改善肾功能还未见研究。基于此,本文研究金线莲多糖通过抑制 NF- κ B 信号通路对糖尿病小鼠肾损伤的改善作用。

1 实验材料

1.1 材料与试剂

金线莲原植物(福建省佳晟生物有限公司);二甲双胍肠溶片($0.25\text{ mg}\cdot\text{片}^{-1}$,贵州天安药业股份有限公司),药物均采用蒸馏水现配现用。金线莲多糖(*Anoectochilus roxburghii* polysaccharose, ARP)由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室提取、鉴定并提供^[6],纯度 $\geq 95\%$ 。

链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司);高脂饲料(HFD,按照 20%脂肪、2%胆固醇、10%蔗糖、0.5%胆酸钠、其他为基础鼠饲料进行配置);尿蛋白、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)、肌酐、IL-6 试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒(南京建成生物公司);p-NF- κ B p65 抗体(Affinity 试剂公司);Nephlin 抗体、podocin 抗体(武汉博士德生物工程有限公司); β -actin 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);二抗(上海圣克鲁斯生物技术有限公司)。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠,体质量为(18 ± 2) g,由福建医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(闽)2016-0006。将小鼠置于温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 5)%,光暗周期为 12 h/12 h(光照时间 7:00—19:00)的环境中饲养,自由获取饮水与饲料,适应性饲养 1 周后开始糖尿病模型的诱导。实验遵守华侨大学伦理批第(A2019016)号审查要求。

1.3 仪器

超微量核酸蛋白测定仪(英国 Bio Drop 公司);M530 型组织切片机(德国 MEDITE 公司);MULTISKAN ASCENT-354 型酶标仪(美国热电公司);JY-SCZ2 型垂直板电泳槽、JY300C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);Image Station 4000MM 型化学发光成像仪(美国柯达公司);快速血糖检测仪(美国罗氏生物技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 2 型糖尿病小鼠模型的建立

高脂饲料(HFD)/STZ 诱导 2 型糖尿病小鼠建模方法参考文献[6],即除正常组小鼠给予标准饲料外,其余小鼠给予 HFD 喂养 3 周,小鼠体质量明显增加后,将小鼠禁食不禁水 12 h 后,采用质量比为 $130\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 STZ 一次性腹腔注射。72 h 后,测小鼠空腹血糖浓度。选择血糖浓度 $\geq 11.1\text{ mmol}\cdot$

L^{-1} 为糖尿病小鼠,血糖不达标的小鼠3 d后再用 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 STZ 一次性腹腔注射,72 h 后,选择血糖浓度 $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为糖尿病小鼠。将糖尿病小鼠随机分为4组,每天分别灌胃给予同体积不同药物。糖尿病模型组(生理盐水,9只)、二甲双胍组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,8只)、低剂量 ARP 组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,9只)、高剂量 ARP 组($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,9只),所有糖尿病小鼠均持续给予高脂饲料,正常组小鼠给予普通饲料(10只)。药物处理4周之后,处死动物。处死动物前3 d,收集小鼠24 h 尿液,测尿蛋白质量,并测定小鼠空腹血糖浓度。小鼠处死后收集血液,分离血清,用于生化检测,并分离右侧肾脏皮质组织,快速冷冻,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于 Western blot 分析。左侧肾脏保存于 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多聚甲醛溶液中,用于组织学观察。

2.2 生化检测

使用血糖仪检测小鼠的空腹血糖浓度。取血液样品,分离血清,采用生化检测试剂盒检测小鼠24 h 尿蛋白质量及血清中 SOD 活性、MDA 浓度及肌酐浓度。

2.3 ELISA 分析

分离血清,按照试剂盒说明书要求检测小鼠血清中 IL-6, TNF- α 的质量浓度。

2.4 Western blot 分析

采用 Western blot 分析小鼠肾组织 p-NF- κ B p65, podocin, Neph rin 的蛋白表达。取小鼠肾脏组织匀浆约 50 mg,加入含蛋白酶抑制剂的预冷细胞裂解液,充分裂解后,离心取上清,采用 BCA 法测蛋白质量并定量。将各组蛋白样品用裂解液调成相同浓度($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)恒压电泳分离蛋白,将电泳好的凝胶转膜至硝酸纤维素膜,将转好的膜加 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脱脂牛奶封闭后,分别加入相应一抗,即 p-NF- κ B p65 抗体(1:1 000)、podocin 抗体(1:1 000)、Neph rin 抗体(1:1 000)和 β -actin 单抗(1:300), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。最后,加二抗 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, ECL 电致化学发光成像。使用 Quantity-one 专业分析软件对 Western blot 实验所得图片进行光密度扫描分析。

2.5 苏木精-伊红染色观察小鼠肾脏组织损伤

用 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多聚甲醛溶液固定小鼠肾脏组织 24 h 以上,经脱水、浸蜡、包埋,制成石蜡块,再用切片机切成 $4 \mu\text{m}$ 厚的切片,脱蜡至水,苏木精-伊红(HE)染色,二甲苯透明,树胶封片,于 400 倍光学显微镜下观察肾脏组织损伤情况。

2.6 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,数据用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,多组比较采用单因素方差分析,2组比较采用 LSD- t 检验。当 $P < 0.05$ 时,表示差异具有统计学意义。与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

3 实验结果与分析

3.1 小鼠的血糖与体质量

各组小鼠血糖浓度及体质量变化,如图1所示。图1中: c_b 为小鼠血糖浓度; m 为小鼠体质量。

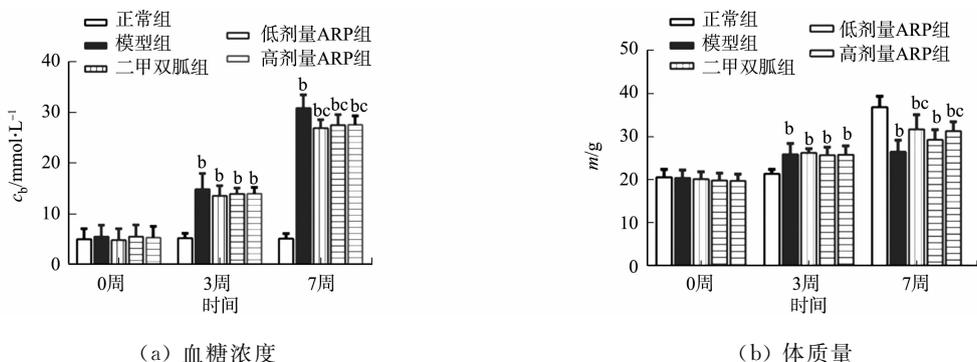


图1 各组小鼠血糖水平及体质量变化

Fig. 1 Changes of blood glucose level and body mass of mice

由图1可知:实验开始时(0周),各组小鼠的血糖浓度没有明显差异,小鼠经 HFD 喂养 3 周,STZ

诱导后,糖尿病小鼠的血糖浓度比正常组明显升高($P < 0.01$);随着实验时间的延长,与正常组相比,糖尿病小鼠的血糖浓度持续升高,而与模型组相比,给予不同药物干预4周后,药物组小鼠血糖明显下降($P < 0.05$);实验开始时,各组小鼠的体质量无明显差异,HFD喂养3周后,小鼠体质量明显增加($P < 0.01$);随着实验时间的延长,正常组小鼠体质量增加较快,相比之下,模型组小鼠的体质量明显下降($P < 0.01$);经药物治疗4周后,糖尿病小鼠的体质量下降得到明显缓解($P < 0.01$)。

3.2 生化检测结果

生化检测结果,如图2所示。图2中: z 为SOD的活性; c_{MDA} 为MDA浓度; m_p 为24h尿蛋白质质量; c_{cr} 为血肌酐浓度。

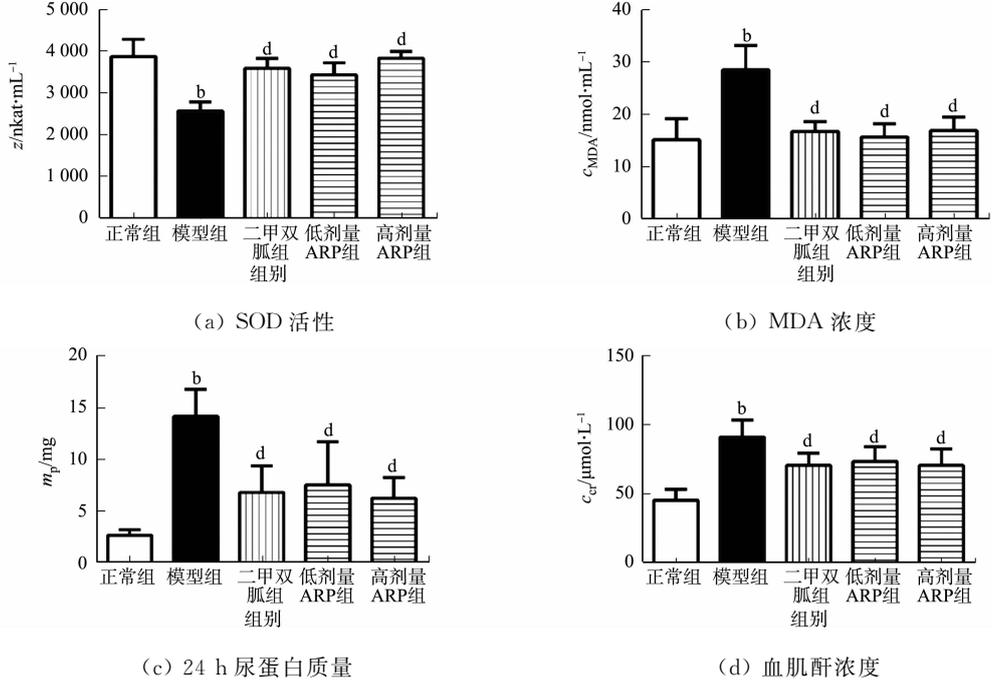


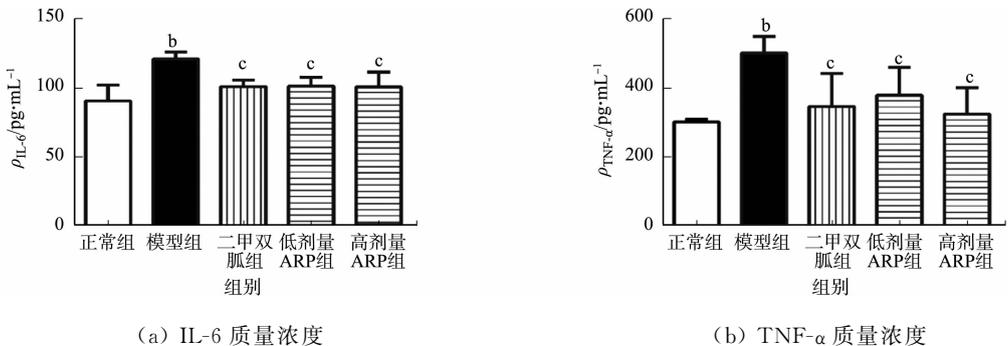
图2 生化检测结果

Fig. 2 Results of biochemical test

由图2可知:与正常小鼠相比,模型组小鼠的血清中抗氧化酶SOD的活性下降,MDA浓度增多,表明糖尿病小鼠的氧化应激作用增强;同时,模型组小鼠的24h尿蛋白质质量及血肌酐浓度增多,表明模型组小鼠肾功能异常;给予糖尿病小鼠金线莲多糖后,高、低两个剂量的ARP组小鼠的24h尿蛋白质质量及血肌酐浓度均明显下降($P < 0.01$),表明糖尿病小鼠肾小球高滤过现象得到改善;给予不同剂量金线莲多糖干预后,小鼠血清中SOD的活性显著上升($P < 0.01$),MDA浓度明显降低($P < 0.01$),表明糖尿病小鼠增强的氧化应激作用减弱。

3.3 Elisa 检测结果

小鼠血清中IL-6, TNF- α 的质量浓度,如图3所示。图3中: ρ_{IL-6} , $\rho_{TNF-\alpha}$ 分别为IL-6, TNF- α 的质量



(a) IL-6质量浓度

(b) TNF- α 质量浓度

图3 小鼠血清中IL-6, TNF- α 的质量浓度

Fig. 3 Mass concentrations of IL-6 and TNF- α in mouse serum

浓度。由图 3 可知:模型组小鼠血清中炎症因子 IL-6, TNF- α 的质量浓度比正常小鼠高,经金线莲多糖干预后,糖尿病小鼠血清中炎症因子 IL-6, TNF- α 的质量浓度明显下降($P < 0.05$),表明金线莲多糖有较强的抗炎作用。

3.4 Western blot 分析

小鼠肾脏组织中 p-NF- κ B p65, podocin, Nephrin 的蛋白表达,如图 4 所示。由图 4 可知:模型组小鼠肾脏组织中 p-NF- κ B p65 的表达上调,提示糖尿病小鼠肾脏组织中 NF- κ B 信号通路被激活;模型组小鼠肾脏组织中 podocin, Nephrin 的蛋白表达均下调,提示糖尿病小鼠肾小球滤过膜受损;给予金线莲多糖后,糖尿病小鼠肾脏组织中 p-NF- κ B p65 的表达下调($P < 0.01$),podocin, Nephrin 的蛋白表达均上调(低剂量 ARP 组 $P < 0.05$,高剂量 ARP 组 $P < 0.01$),(低、高剂量 ARP 组 $P < 0.01$)。

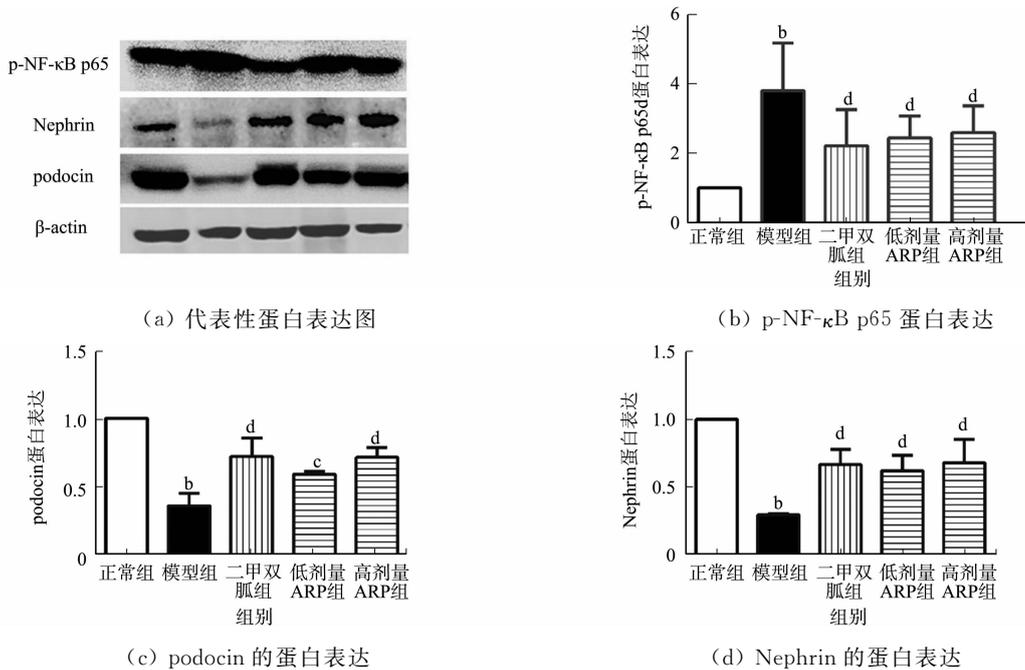
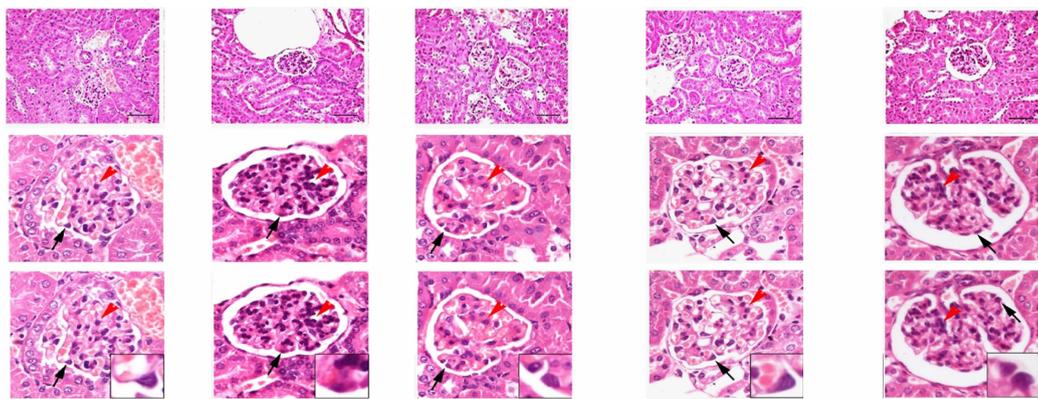


图 4 小鼠肾脏组织中 p-NF- κ B p65, podocin, Nephrin 及 β -actin 的蛋白表达

Fig. 4 Protein expressions of p-NF- κ B p65, podocin, Nephrin and β -actin in renal tissue of mice

3.5 HE 染色分析

金线莲多糖对糖尿病小鼠肾脏组织病理学变化的影响,如图 5 所示。图 5 中:红色箭头显示系膜区增生;黑色箭头显示足细胞病变;右下角方框内为箭头所示足细胞局部放大图。



(a) 正常组 (b) 模型组 (c) 二甲双胍组 (d) 低剂量 ARP 组 (e) 高剂量 ARP 组

图 5 金线莲多糖对糖尿病小鼠肾脏组织病理学变化的影响

Fig. 5 Effect of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide on renal histopathological changes in diabetic mice

正常组小鼠肾小球系膜细胞及基质无增生,毛细血管管腔通畅,肾小球囊无扩张(图 5(a));与正常小鼠相比,模型组小鼠的肾脏结构明显改变,肾小球系膜细胞呈现明显增生,系膜基质增多,呈弥漫或节

段性,毛细血管受压,管腔狭窄,肾小球囊扩张,足细胞萎缩、变性(图 5(b));给予二甲双胍的糖尿病小鼠的肾小球体积如常,系膜基质、系膜细胞呈局灶节段或节段性轻度增多,毛细血管扩张,肾小球囊无明显扩张,足细胞增生(图 5(c));给予低剂量金线莲多糖的糖尿病小鼠的肾小球系膜细胞及基质呈节段性轻度增生,以系膜基质增生为主,毛细血管腔无明显受压,足细胞肥大,损伤明显缓解,肾小球囊无明显扩张(图 5(d));给予高剂量金线莲多糖的糖尿病小鼠的肾小球系膜细胞及基质呈节段性明显增生,毛细血管受压贫血,肾小球囊扩张,但比模型组小鼠有所改善,足细胞增生(图 5(e))。

4 结论

糖尿病肾病占糖尿病患者的 30%~40%,是最常见的糖尿病并发症。引起糖尿病肾病的确切机制还不清楚。大量的报道显示,炎症反应、氧化应激、胰岛素抵抗等与糖尿病肾病病理密切相关^[7-9]。对糖尿病机制及治疗药物的研究是医疗领域的热点,目前 HFD/STZ 诱导的 2 型糖尿病模型被很多糖尿病研究者采用^[10-11]。实验小鼠经高脂饮食喂养 3 周,出现明显肥胖后,一次性注射 STZ 损伤小鼠胰岛 β 细胞,并持续给予高脂饲料喂养,经 HFD/STZ 诱导将小鼠发展为 2 型糖尿病。糖尿病小鼠随着血糖浓度的升高,体质量逐渐减轻,其 24 h 蛋白尿质量及血肌酐浓度均明显升高,表明糖尿病小鼠肾脏功能受损。肾小球高滤过,炎症、氧化应激与糖尿病肾病的发病机制有关^[12-13]。实验结果表明,糖尿病小鼠在持续高血糖作用下,血清抗氧化酶 SOD 活性显著下降。SOD 是内源性自由基清除酶,SOD 活性下降使体内氧化与抗氧化失衡,导致活性氧 ROS 产生量增多,引起脂质过氧化中间产物 MDA 浓度增多,MDA 浓度越高,表明氧化损伤越严重。

NF- κ B 信号通路是对氧化应激及炎症敏感的信号通路。糖尿病状态下,在过多活性氧 ROS 及炎症因子的刺激下,NF- κ B 信号通路被激活,促进系膜表达 TGF- β ,引起细胞外基质增生,导致肾小球基底膜增厚和肾小球硬化,加速纤维化进程,并引起或加剧炎症^[14-15]。足细胞损伤也是糖尿病肾病早期的一个关键特征。糖尿病状态下,足细胞丢失,导致肾小球内皮细胞的损伤和高通透性,引起蛋白尿的发生^[16]。实验中糖尿病小鼠血清中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的质量浓度显著升高。过多的炎症因子与氧化应激使糖尿病小鼠肾脏组织中 p-NF- κ B p65 的表达上调,激活了 NF- κ B 信号通路,激活的 NF- κ B 信号通路反过来又调控 IL-6 和 TNF- α 等炎症因子,加速疾病的进展^[17]。组织学检查显示,糖尿病小鼠肾小球系膜细胞明显增生,系膜基质增多,毛细血管腔明显受压,肾小球囊扩张,肾小球结构明显改变。肾小球结构的改变进一步引起肾小球功能的改变。实验中糖尿病小鼠肾脏组织的 podocin 和 Nephlin 的表达显著下降,podocin 和 Nephlin 是足细胞裂孔膜上的特殊蛋白分子,它们的减少导致肾小球滤过屏障缺损,使蛋白分子进入尿液,糖尿病小鼠出现蛋白尿、血肌酐浓度升高症状,并出现糖尿病肾病。

给予金线莲多糖后,糖尿病小鼠肾脏炎症因子水平明显下调,血清 SOD 活性增加,MDA 浓度显著减少,氧化应激反应降低,肾脏组织 p-NF- κ B p65 的表达下调,NF- κ B 信号通路被抑制。病理学检查结果显示,金线莲多糖组小鼠的损伤减轻,特别是低剂量金线莲多糖组系膜细胞及基质呈节段性轻度增生,毛细血管腔无明显受压,肾小球囊无明显扩张,足细胞损伤缓解(图 5(d))。与病理学结果一致的是,经金线莲多糖干预后,糖尿病小鼠尿蛋白明显减少,血肌酐浓度降低,糖尿病肾病明显好转。

临床上还没有理想的糖尿病肾病治疗药物,目前主要采用血管紧张素转化酶抑制剂,血管紧张素 II 受体阻断剂等药物治疗糖尿病肾病。但总体疗效和远期预后较差,加上不良反应多,不能有效阻止糖尿病肾病患者发展为终末期肾病。二甲双胍是临床推荐使用的抗 2 型糖尿病的一线药物,它可能增加乳酸中毒的风险,不适用于晚期糖尿病肾病的治疗^[18]。实验结果表明,金线莲多糖有与二甲双胍相似的作用,糖尿病肾病治疗药物仍是临床面临的难题,糖尿病肾病不仅提高了心血管疾病的病死率,还加重了患者和社会的负担。考虑到金线莲多糖基本无毒,能通过抗炎、抗氧化,抑制 NF- κ B 信号通路发挥肾保护作用,因此,将金线莲用于治疗糖尿病肾病可能具有较好的前景。

参考文献:

- [1] MOHANDS S,DOKE T,HU Hailong,*et al.* Molecular pathways that drive diabetic kidney disease[J]. Journal of Clinical Investigation,2023,133(4):e165654. DOI:10.1172/JCI165654.

- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第五册)[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [3] QIU Yi, SONG Wenbo, YANG Ying, *et al.* Isolation, structural and bioactivities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.: A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 236: 123883. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.123883.
- [4] GAO Huashan, DING Linlin, LIU Rui, *et al.* Characterization of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharide and its therapeutic effect on type 2 diabetic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 179: 259-269. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.217.
- [5] 刘青, 李永, 盛世美. 金线莲多糖抗衰老作用及其机制[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2020, 41(1): 77-83. DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201907059.
- [6] LI Le, LI Yumeng, LIU Zhenling, *et al.* The renal protective effects of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose on diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 178: 58-65. DOI: 10.1016/j.jep.2015.12.002
- [7] SAMSU N. Diabetic nephropathy: Challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. Biomed Research International, 2021, 2021: 1497449. DOI:10.1155/2021/1497449.
- [8] RAYEGO-MATEOS S, MORGADO-PASCUAL J L, OPAZO-RÍOS L, *et al.* Pathogenic pathways and therapeutic approaches targeting inflammation in diabetic nephropathy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3798. DOI:10.3390/ijms21113798.
- [9] JIN Qi, LIU Tongtong, QIAO Yuan, *et al.* Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: Role of polyphenols[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1185317. DOI:10.3389/fimmu.2023.1185317.
- [10] ZHOU Yingjun, TAO Heng, XU Nuo, *et al.* Chrysin improves diabetic nephropathy by regulating the AMPK-mediated lipid metabolism in HFD/STZ-induced DN mice[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(12): e14379. DOI: 10.1111/jfbc.14379.
- [11] SHEN Qiong, QI Simin, ZHANG Jingtian, *et al.* Platycodin D inhibits HFD/STZ-induced diabetic nephropathy via inflammatory and apoptotic signaling pathways in C57BL/6 mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 314: 116596. DOI:10.1016/j.jep.2023.116596.
- [12] SAPIAN S, BUDIN S B, TAIB I S, *et al.* Role of polyphenol in regulating oxidative stress, inflammation, fibrosis, and apoptosis in diabetic nephropathy[J]. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders: Drug Targets, 2022, 22(5): 453-470. DOI:10.2174/1871530321666211119144309.
- [13] MA Xiaojun, MA Jingru, LENG Tian, *et al.* Advances in oxidative stress in pathogenesis of diabetic kidney disease and efficacy of TCM intervention[J]. Renal Failure, 2023, 45(1): 2146512. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2146512.
- [14] JI Jing, TAO Pengyu, WANG Qian, *et al.* SIRT1: Mechanism and protective effect in diabetic nephropathy[J]. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders: Drug Targets, 2021, 21(5): 835-842. DOI: 10.2174/1871530320666201029143606.
- [15] XIAN Yuxin, GAO Yanyan, LÜ Wenshan, *et al.* Resveratrol prevents diabetic nephropathy by reducing chronic inflammation and improving the blood glucose memory effect in non-obese diabetic mice[J]. Naunyn Schmiedeberg's Archivs Pharmacology, 2020, 393(10): 2009-2017. DOI:10.1007/s00210-019-01777-1.
- [16] BARUTTA F, BELLINI S, GRUDEN G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy[J]. Clinical Science (Lond), 2022, 136(7): 493-520. DOI:10.1042/CS20210625.
- [17] LI Ying, HOU Jingang, LIU Zhi, *et al.* Alleviative effects of 20(R)-Rg3 on HFD/STZ-induced diabetic nephropathy via MAPK/NF- κ B signaling pathways in C57BL/6 mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 267: 113500. DOI:10.1016/j.jep.2020.113500.
- [18] DAIJI K, YUICHI T, MAKITO T. Significance of metformin use in diabetic kidney disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(12): 4239. DOI:10.3390/ijms21124239.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202404003



乙二醇对低共熔溶剂改性木质素 制酚醛树脂胶黏剂的影响

甘林火^{1,2}, 湛云¹, 严思恩¹, 何昌雍³

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学 生物质低碳转化福建省高校重点实验室, 福建 厦门 361021;

3. 寰宝工场(福建)新能源有限公司, 福建 南平 353099)

摘要: 采用氯化胆碱、甲酸和乙二醇(EG)合成三元酸性低共熔溶剂(TADES),利用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、二维核磁共振波谱(HSQC-NMR)和热重分析(TGA)等测试技术,分别考察 TADES 中 EG 质量分数对改性毛竹碱木质素(MBL)结构及其制木质素基酚醛树脂(LPF)胶黏剂性能的影响。结果表明:改性 MBL 保留了木质素特征结构,且出现羧基;当 EG 质量分数为 15.0%时,改性 MBL(DL-EG(15.0%))结构中紫丁香基结构单元摩尔分数减少,愈创木基和对羟基苯丙烷结构单元摩尔分数增加,其热稳定性得到提高;相较于 MBL,EG 质量分数对 LPF 胶黏剂黏度和 pH 值没有明显影响,但 EG 的加入提高了 LPF 胶黏剂的胶合强度,降低了游离甲醛含量;采用 DL-EG(15.0%)制备 LPF 胶黏剂的固含量增加,且性能较优,其胶合强度高达 3.25 MPa,游离甲醛含量仅为 0.01%。

关键词: 毛竹; 木质素; 低共熔溶剂; 酚醛树脂胶黏剂

中图分类号: TQ 314.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0642-07

Effect of Ethylene Glycol on Preparation of Phenolic Resin Adhesive Using Modified Lignin via Deep Eutectic Solvent

GAN Linhuo^{1,2}, ZHAN Yun¹, YAN Sien¹, HE Changyong³

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Biomass Low-Carbon Conversion, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

3. Huanbao Gongchang (Fujian) New Energy Limited Company, Nanping 353099, China)

Abstract: A ternary acidic deep eutectic solvent (TADES) was synthesized using choline chloride, formic acid and ethylene glycol (EG), and the effect of EG mass fraction in TADES on the structure of modified moso bamboo alkali lignin (MBL) and the properties of lignin-phenol-formaldehyde (LPF) adhesive was investigated respectively using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), two dimensional nuclear magnetic resonance (HSQC-NMR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), et al. The results show that the modified MBL retains the characteristic structure of lignin, and the carboxyl groups appear. When EG mass fraction is 15.0%, the mole fraction of syringyl structure unit in modified MBL (DL-EG (15.0%)) structure decreases, and the mole fractions of guaiacyl and *p*-hydroxyphenylpropane structure unit increase with improved thermal stability. Compared with MBL, EG mass fraction has no obvious influences on viscosity and pH value

收稿日期: 2024-04-02

通信作者: 甘林火(1979-),女,副教授,博士,主要从事木质生物质资源化利用的研究。E-mail:lhgan401@126.com。

基金项目: 福建省南平市科技计划重点项目(N2022B001, N2022B002); 华侨大学先进碳转化技术研究院开放基金资助项目(AACCT0002)

of LPF adhesive, but the addition of EG improves the bonding strength of LPF adhesive and reduces the free formaldehyde content. The solid content of LPF adhesive prepared by DL-EG (15.0%) increases and its performance is better with bonding strength as high as 3.25 MPa and free formaldehyde content only 0.01%.

Keywords: moso bamboo; lignin; deep eutectic solvent; phenolic resin adhesive

木质纤维素类生物质资源被认为是化石资源的有效替代品^[1],其中,木质素是仅次于纤维素的第二大可再生生物质资源^[2],由 3 种芳香型结构单元(紫丁香基(S)、愈创木基(G)和对羟基苯基(H))构成,可以替代苯酚合成木质素基酚醛树脂(LPF)胶黏剂^[3-12]。木质素的胶合强度、耐水性和阻燃性较佳,具有很好的工业推广前景。然而,木质素具有相对分子质量大、分散度高、反应活性低等不利结构特点,限制了其在酚醛树脂胶黏剂生产中的大规模应用。目前,研究人员主要采用脱甲基化、氧化、羟甲基化、酚化等化学改性方法增强木质素反应活性,提高 LPF 胶黏剂的性能。然而,化学改性工艺繁琐,条件苛刻,过程不绿色环保,导致改性成本较高,限制了木质素在合成 LPF 胶黏剂中的应用。

低共熔溶剂(DES)能够选择性溶解木质素,加入反溶剂后,所得再生木质素的酚羟基、醇羟基含量增多,甲氧基含量减少,从而增强木质素的反应活性^[13-14]。由氯化胆碱(ChCl)、有机酸和乙二醇(EG)合成的三元酸性低共熔溶剂(TADES)已被有效地应用于木质纤维素的组分分离及高值化利用中^[15-17],不仅可以提高木质素的提取率,抑制低相对分子质量木质素的再聚,还可以增强木质素的反应活性。基于此,本文以毛竹碱木质素(MBL)为原料,采用氯化胆碱、甲酸(F)和乙二醇合成的 TADES,对 MBL 进行改性预处理,研究 EG 质量分数对 MBL 结构及制备的 LPF 胶黏剂性能的影响,从而优化 DES 的改性工艺条件。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

毛竹碱木质素(工业级,福建省南平市寰宝工场(福建)新能源有限公司);氯化胆碱(分析纯,上海市阿拉丁化学试剂有限公司);甲酸(分析纯,广东省汕头市西陇科学股份有限公司);乙二醇(分析纯,上海市国药集团);无水乙醇(分析纯,广东省汕头市西陇科学股份有限公司);苯酚(分析纯,广东省汕头市西陇科学股份有限公司);甲醛(分析纯,广东省汕头市西陇科学股份有限公司);氢氧化钠(分析纯,广东省汕头市西陇科学股份有限公司);尿素(分析纯,上海国药集团);盐酸(分析纯,广东省汕头市西陇科学股份有限公司);盐酸羟胺(分析纯,上海国药集团);甲醇(分析纯,上海国药集团)。

iS50 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司);BD8820BE30T 型硫化压机(广东省东莞市宝鼎精密仪器有限公司);WDW-2M 型电子万能试验机(山东省济南中路昌试验机制造有限公司);STA449F5 型同步热分析仪(德国 NETZSCH 公司);AVANCE III 500 MHz 型核磁共振波谱仪(德国 BRUKER 公司);NDJ-5S 型数显黏度计(上海市力辰仪器科技有限公司)。

1.2 TADES 对毛竹碱木质素的改性预处理

将氯化胆碱与甲酸按照物质的量浓度比 1:2 混合,在 70 °C 油浴加热条件下,磁力搅拌一段时间至溶液澄清透明,得到二元低共熔溶剂(ChCl-F),在 ChCl-F 中加入适量的乙二醇,制备三元酸性低共熔溶剂,记为 ChCl-F-EG(x),其中, x 为乙二醇加入量占 TADES 总质量的百分比(x 分别为 0%,5.0%,7.5%,10.0%,15.0%)。将洗至中性并干燥后的 100~120 目 MBL 与 ChCl-F-EG(x)按照质量比 1:20 混合,在 120 °C 下反应 2 h,冷却至室温后,加入 9 倍体积的乙醇水溶液(乙醇与水的体积比为 1:9),静置过夜,析出沉淀,离心过滤,分离出固体颗粒,用去离子水洗至中性,真空干燥后,可得改性木质素,记为 DL-EG(x)。

1.3 木质素基酚醛树脂胶黏剂的合成

采用三步法制备 LPF 胶黏剂。首先,将 2.4 g 木质素、5.6 g 苯酚和 2.8 mL 氢氧化钠水溶液(质量分数为 40%)加入 250 mL 三口圆底烧瓶中,在 80 °C 下搅拌 2 h。然后,加入 7.2 mL 甲醛水溶液(质量分数为 37%),升温至 90 °C,搅拌反应 50 min。最后,加入 0.4 g 尿素和 3.1 mL 甲醛水溶液(质量分数为 37%),继续在 90 °C 下搅拌反应 40 min。反应结束后,将反应体系迅速降温至 70 °C,再缓慢降至室

温后出料,可得 LPF 胶黏剂。采用毛竹碱木质素原料合成的 LPF 胶黏剂记为 MBL-PF,采用 TADES 改性木质素合成的胶黏剂记为 DL-EG(x)-PF。

1.4 木质素和木质素基酚醛树脂的表征

1) 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)测试。将木质素样品真空干燥至恒质量,并与溴化钾按照质量比 1:100 混合、压片,采用红外光谱仪进行测试。红外光谱仪的分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描范围为 $500\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$,扫描 32 次。

2) 二维核磁共振(HSQC-NMR)波谱测试。将 80 mg 木质素样品溶解于 0.6 mL 的氘代二甲基亚砜中,超声振动至木质素完全溶解。数据采集时, ^1H 谱宽为 5 000 Hz,采样点为 1 024,弛豫时间为 1.5 s,共 64 次; ^{13}C 谱宽为 20 000 Hz,采样点为 256,碳氢耦合常数为 145 Hz。

3) 热重分析(TGA)测试。称取 10 mg 木质素或木质素基酚醛树脂样品,在氮气气氛下以 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度从室温升至 $800\text{ }^\circ\text{C}$,对热稳定性进行测试。

1.5 木质素基酚醛树脂胶黏剂的性能测试

按照 GB/T 14074-2017《木材工业用胶黏剂及其树脂检验方法》中规定的相应检验方法,对 LPF 胶黏剂中游离甲醛含量(质量分数)、固含量、黏度和 pH 值进行测试,测量 3 次取平均值。

将 LPF 胶黏剂制成胶合板,测定胶合强度。取出两块杨木板($100\text{ mm}\times 25\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ (长 \times 宽 \times 高)),在杨木板上均匀施胶,施胶量为 $150\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$;胶合板在温度为 $160\text{ }^\circ\text{C}$,压力为 1.2 MPa 的条件下热压 12 min,热压结束后,胶合板先于室温下放置 24 h,再于 $63\text{ }^\circ\text{C}$ 热水中浸渍 3 h,然后,在室温下冷却 10 min。将上述胶合板在电子万能试验机上进行拉伸测试,计算胶合强度,测量 5 次,取有效测试结果的算术平均值。

2 实验结果与讨论

2.1 木质素结构解析

2.1.1 FT-IR 分析 红外光谱被广泛地应用于改性前、后木质素结构的变化分析之中^[18]。毛竹碱木质素和改性木质素的红外光谱图,如图 1 所示。图 1 中: ν 为波数。

由图 1 可知: $3\,460\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰归属于 O—H 的拉伸振动,说明存在着大量羟基; $2\,940\text{ cm}^{-1}$ 处吸收信号归属于亚甲基中 C—H 的反对称伸缩振动; $1\,640$, $1\,520$, $1\,430\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰归属于芳香环中 C=C 键的拉伸振动,是木质素的结构特征峰。

由此可知,ChCl-F-EG(x)预处理 MBL 过程中并未对苯环造成破坏,这与文献[19]的报道一致。更为重要的是,经过 ChCl-F-EG(x)处理后的改性木质素均在 $1\,720\text{ cm}^{-1}$ 处出现吸收峰,归属于非共轭羰基(C=O)的伸缩振动,是羧基团的特征吸收峰,说明改性木质素表面出现羧基,增强了亲水性,有利于提高其在水相中与甲醛的反应活性^[20]。

2.1.2 HSQC-NMR 分析 HSQC-NMR 是分析木质素结构的有效测试手段。对比 TADES 改性前、后 MBL 和 DL-EG(15.0%)两个木质素样品在芳香环区域($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$, ($160\times 10^{-6}\sim 90\times 10^{-6}$)/($8.0\times 10^{-6}\sim 6.0\times 10^{-6}$))出现的信号,采用半定量分析法计算木质素 3 个结构单元的摩尔分数($x(\text{S})$, $x(\text{G})$, $x(\text{H})$),分析经 ChCl-F-EG(15.0%)改性后木质素结构的变化。

MBL 和 DL-EG(15.0%)在芳香环区域的 HSQC-NMR 波谱图,如图 2 所示。由图 2 可知:毛竹碱木质素 3 种结构单元的摩尔分数在三元酸性低共熔溶剂改性后发生了显著变化;相较于 MBL,改性后的 DL-EG(15.0%)中紫丁香基结构单元的摩尔分数明显下降,愈创木基结构单元的摩尔分数少量增加,而对羟基苯丙烷结构单元的摩尔分数显著增大。

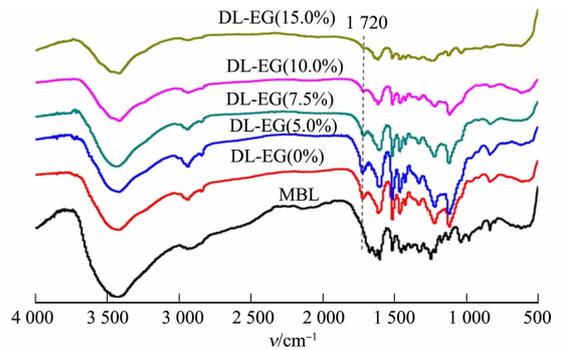


图 1 毛竹碱木质素和改性木质素的红外光谱图
Fig. 1 Infrared spectrogram of MBL and modified lignin

由此可知,在 $\text{ChCl-F-EG}(15.0\%)$ 预处理 MBL 的过程中,紫丁香基结构单元更易降解,可能发生脱甲氧基反应,产生更多的 G, H 结构单元,而乙二醇的加入有效地保护了木质素降解产物,为合成 LPF 胶黏剂提供更多的反应活性位点,有利于降低 LPF 游离甲醛含量,增强 LPF 胶合强度。

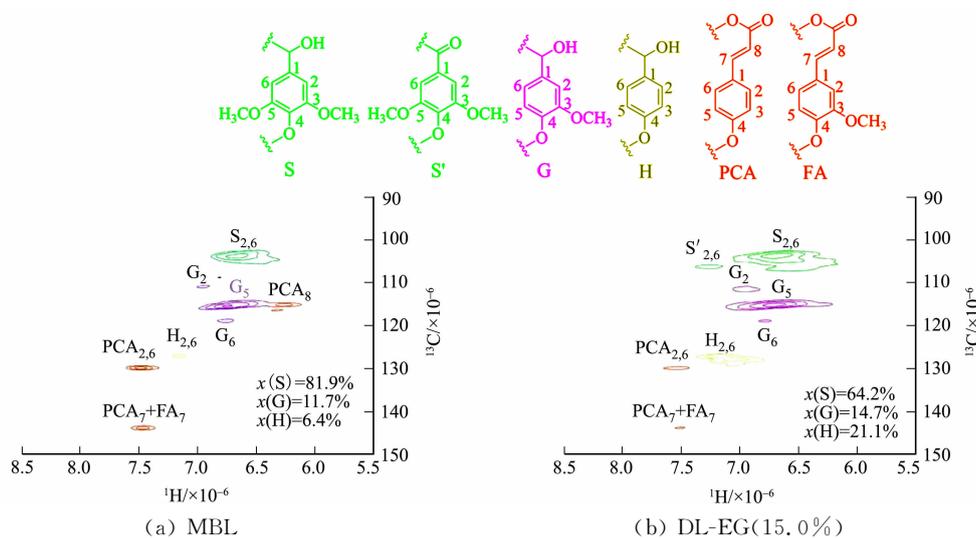


图 2 MBL 和 DL-EG(15.0%) 在芳香环区域的 HSQC-NMR 波谱图

Fig. 2 HSQC-NMR spectral diagram in aromatic ring region of MBL and DL-EG (15.0%)

2.1.3 TGA 一般认为木质素的热解过程可以分为 3 个阶段。第 1 阶段出现在 $130\text{ }^\circ\text{C}$ 左右,主要是木质素中游离水和结合水的蒸发;第 2 阶段出现在 $130\sim 280\text{ }^\circ\text{C}$,主要是低相对分子质量木质素的分解,以及高相对分子质量木质素侧链降解释放出 CO , CO_2 和 H_2O 等^[21];第 3 阶段出现在 $280\sim 600\text{ }^\circ\text{C}$,主要是木质素大分子内部单元键连接逐渐断裂,质量损失高达 $30\%\sim 40\%$,是木质素失重的主要阶段。

为了考察三元酸性低共熔溶剂预处理对毛竹碱木质素热稳定性的影响,分别对 MBL 和 DL-EG(15.0%) 的 TGA 曲线进行测定,结果如图 3(a) 所示。图 3(a) 中: W 为质量保留率; θ 为温度。由图 3(a) 可知:在实验最终温度 $800\text{ }^\circ\text{C}$ 时, MBL 和 DL-EG(15.0%) 的质量保留率分别为 32% , 40% 。

为便于分析,对 TGA 曲线进行数据处理,可得微商曲线,结果如图 3(b) 所示。图 3(b) 中: v 为失重速率。由图 3(b) 可知: MBL 和 DL-EG(15.0%) 在热解过程中均出现了 3 个失重峰,分别对应于木质素热解的 3 个阶段,而后面两个失重过程体现了木质素结构的热稳定性;相较于 MBL 热解第 2, 3 阶段最大失重速率出现的对应温度 ($185, 300\text{ }^\circ\text{C}$), 改性后的 DL-EG(15.0%) 热解第 2, 3 阶段最大失重速率出现的对应温度得到了显著提升,分别高达 $250, 365\text{ }^\circ\text{C}$ 。

由此可知,经 $\text{ChCl-F-EG}(15.0\%)$ 改性后的毛竹碱木质素的热稳定性得到了明显改善,有利于后期 LPF 胶黏剂的合成及应用。

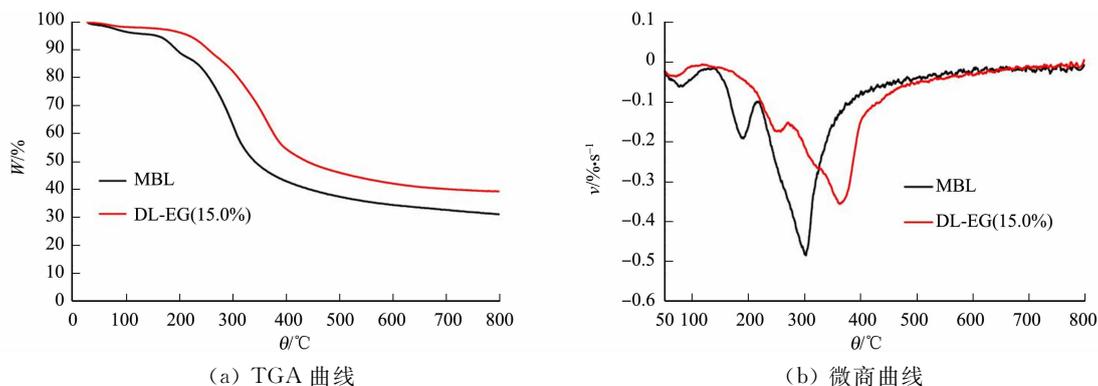


图 3 MBL 和 DL-EG(15.0%) 的 TGA 曲线和微商曲线

Fig. 3 TGA curves and derivative curves of MBL and DL-EG (15.0%)

2.2 乙二醇质量分数对 LPF 胶黏剂性能的影响

经测量, MBL 合成 LPF 胶黏剂的黏度为 $3\ 899\text{ mPa}\cdot\text{s}$, 固含量为 40.14% , pH 值为 11.30 。乙二

醇质量分数对 LPF 胶黏剂物理性能的影响,如表 1 所示。表 1 中: $w(\text{EG})$ 为乙二醇质量分数; μ 为黏度。由表 1 可知:EG 质量分数对制备 LPF 胶黏剂的黏度和 pH 值没有明显影响,仅当 EG 质量分数达到 15.0%时,固含量明显提高至 57.00%。

表 1 乙二醇质量分数对 LPF 胶黏剂物理性能的影响

Tab. 1 Effect of EG mass fraction on physical properties of LPF adhesive

$w(\text{EG})/\%$	$\mu/\text{mPa}\cdot\text{s}$	固含量/ $\%$	pH 值
0	3 870	39.38	11.78
5.0	3 542	41.43	11.68
7.5	3 680	40.68	11.43
10.0	3 898	38.38	11.72
15.0	3 904	57.00	11.76

经测量,MBL 合成 LPF 胶黏剂的胶合强度为 2.03 MPa,游离甲醛含量为 0.35%。乙二醇质量分数对 LPF 胶黏剂胶合强度和游离甲醛含量的影响,如图 4 所示。图 4 中: b 为胶合强度; w_f 为游离甲醛含量(质量分数)。由图 4 及相关分析可知:在实验考察范围内,相较于 MBL 合成 LPF 胶黏剂,EG 的加入有利于降低 LPF 中游离甲醛含量,并提高胶合板的胶合强度;当 EG 质量分数为 15.0%时,DL-EG (15.0%)-PF 胶合强度高达 3.25 MPa,比 MBL-PF 胶合强度提高了 60.1%,且游离甲醛含量从 0.35% (国家标准 GB/T 14732-2017《木材工业用胶粘剂及其树脂检验方法》要求酚醛树脂中的游离甲醛含量 $\leq 0.30\%$)降低至 0.01%,基本可以忽略不计。

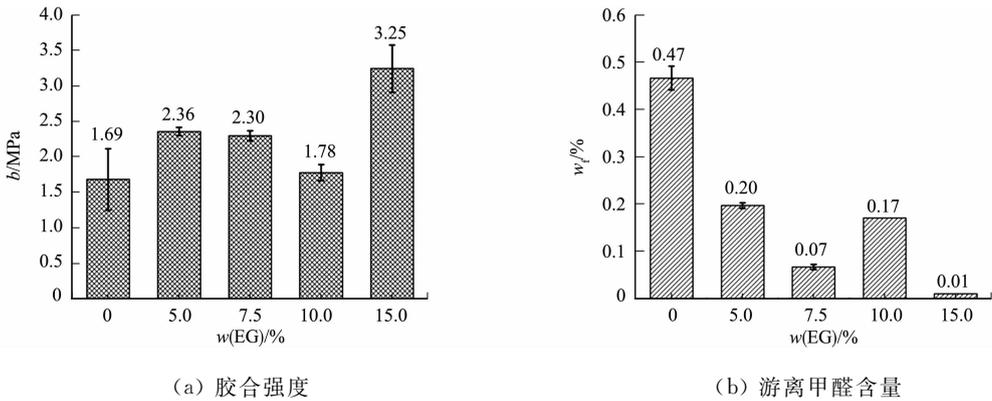


图 4 乙二醇质量分数对 LPF 胶黏剂胶合强度和游离甲醛含量的影响

Fig. 4 Effects of EG mass fraction on bonding strength and free formaldehyde content of LPF adhesive

应注意的是,不加 EG 的二元 DES 改性后制备 DL-EG(0%)-PF 的胶合强度低于 MBL-PF(由 2.03 MPa 降低至 1.69 MPa),且游离甲醛含量也高于 MBL-PF(由 0.35% 增加至 0.47%)。综合分析可知,采用三元酸性 DES(ChCl-F-EG)改性后的毛竹碱木质素反应活性明显增强,具有更多的反应位点与甲醛充分反应,从而使 LPF 中游离甲醛含量显著降低。这可能是因为 EG 的加入有效抑制了低共熔溶剂预处理过程中木质素降解分子的再聚^[22],使改性木质素结构中酚羟基含量增大,与甲醛反应活性位点增多,这与 HSQC-NMR 分析结果(图 2)一致。

酚醛树脂胶黏剂的主要性能,如表 2 所示。表 2 中:数据均在干状试件条件下测得。由表 2 可知:通过 ChCl-F-EG(15.0%)改性 MBL 制备的 LPF 胶黏剂具有较高的胶合强度和极低的游离甲醛含量。

表 2 酚醛树脂胶黏剂的主要性能

Tab. 2 Main performances of phenolic resin adhesive

木质素种类	分离/改性方法	酚醛树脂胶黏剂的主要性能
有机溶剂木质素 ^[3]	加氢催化降解	取代 50% 苯酚时,胶合强度为 2.00 MPa,游离甲醛含量为 0.50%
酶解木质素 ^[4]	水蒸汽爆破	取代 20% 苯酚时,胶合强度为 0.64 MPa,游离甲醛含量为 0.18%
碱木质素 ^[5]	脱甲基化改性	取代 30% 苯酚时,胶合强度为 1.15 MPa
竹木质素 ^[6]	甘油/甲醇中微波液化	取代 40% 苯酚时,胶合强度为 1.00 MPa,游离甲醛含量为 0.17%
有机溶剂木质素 ^[7]	羟甲基化改性	与纯酚醛树脂按质量比 1:3 混合后,胶合强度为 2.34 MPa

续表
Continue table

木质素种类	分离/改性方法	酚醛树脂胶黏剂的主要性能
碱木质素 ^[8]	马来酸酐改性	取代 50% 苯酚时, 胶合强度为 0.80 MPa
硫酸盐木质素 ^[9]	丙酮分馏	完全取代苯酚时, 胶合强度为 4.30 MPa, 游离甲醛含量为 1.30%
硫酸盐木质素 ^[10]	乙酸乙酯分馏	取代 25% 苯酚时, 胶合强度为 4.50 MPa
硫酸盐木质素 ^[11]	氧化改性	取代 50% 苯酚时, 干胶合强度为 2.75 MPa, 湿胶合强度为 1.64 MPa
碱木质素 ^[12]	酸析	取代 20% 苯酚时, 胶合强度为 2.14 MPa
毛竹碱木质素(文中)	TADES 改性	取代 30% 苯酚时, 胶合强度为 3.25 MPa, 游离甲醛含量为 0.01%

3 结论

1) 在氯化胆碱与甲酸摩尔比为 1:2, 乙二醇加入量占三元酸性低共熔溶剂总质量 15.0% 的条件下, 合成 ChCl-F-EG(15.0%), 采用 FT-IR, HSQC-NMR 和 TGA 等测试手段表征 ChCl-F-EG(15.0%) 改性 MBL 的结构变化。由此可知, DL-EG(15.0%) 结构中出现羧基, 紫丁香基结构单元可能发生去甲基反应, 愈创木基和对羟基苯丙烷结构单元增多, 热稳定性能得到明显增强。

2) 三元酸性低共熔溶剂中, 乙二醇质量分数对 LPF 胶黏剂的黏度和 pH 值没有明显影响。采用 DL-EG(15.0%) 替代 30% 苯酚可成功制备固含量较高且性能较优的 DL-EG(15.0%)-PF, 其胶合强度高达 3.25 MPa, 而游离甲醛含量低至 0.01%。

参考文献:

- [1] SONG Shushan, XU Zhongbin, ZHEN Xiang, *et al.* Preparation of lignosulfonate-based phenol formaldehyde foam with excellent thermal performance[J]. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2022, 223(20): 2200159. DOI: 10.1002/macp.202200159.
- [2] RAGAUSKAS A J, BECKHAM G T, BIDDY M J, *et al.* Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery[J]. *Science*, 2014, 344(6158): 1246843. DOI: 10.1126/science.1246843.
- [3] CHENG Shuna, YUAN Zhongshun, LEITCH M, *et al.* Highly efficient de-polymerization of organosolv lignin using a catalytic hydrothermal process and production of phenolic resins/adhesives with the depolymerized lignin as a substitute for phenol at a high substitution ratio[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 44: 315-322. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.10.033.
- [4] STÜCKER A, SCHÜTT F, SAAKE B, *et al.* Lignins from enzymatic hydrolysis and alkaline extraction of steam refined poplar wood: Utilization in lignin-phenol-formaldehyde resins[J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 85: 300-308. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.062.
- [5] LI Jiongjiang, WANG Wen, ZHANG Shifeng, *et al.* Preparation and characterization of lignin demethylated at atmospheric pressure and its application in fast curing biobased phenolic resins[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(71): 67435-67443. DOI: 10.1039/c6ra11966b.
- [6] YANG Sheng, FAN Dongbin, LI Gaiyun. Analysis of phenolic compounds obtained from bamboo microwave liquefaction for fast-curing phenol-formaldehyde resin preparation[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 136(9): 46952. DOI: 10.1002/app.46952.
- [7] FENG Shanghuan, SHUI Tao, WANG Haoyu, *et al.* Properties of phenolic adhesives formulated with activated organosolv lignin derived from cornstalk[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 161: 113225. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113225.
- [8] YOUNESI-KORDKHEILI H. Maleated lignin coreaction with phenol-formaldehyde resins for improved wood adhesives performance[J]. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2022, 113: 103080. DOI: 10.1016/j.ijadhadh.2021.103080.
- [9] AREFMANESH M, NIKAFSHAR S, MASTER E R, *et al.* From acetone fractionation to lignin-based phenolic and polyurethane resins[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 178: 114604. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114604.
- [10] RODRIGUES J S, DE FREITAS A D S M, MACIEL C C, *et al.* Selection of kraft lignin fractions as a partial substitute for phenol in synthesis of phenolic resins: Structure-property correlation[J]. *Industrial Crops and Products*,

- 2023,191;115948. DOI:10.1016/j.indcrop.2022.115948.
- [11] BANSODE A, VILLARREAL L A P, WANG Yuyang, *et al.* Kraft lignin periodate oxidation for biobased wood panel resins[J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2023, 5(6):4118-4126. DOI:10.1021/acscapm.3c00324.
- [12] YOUNESI-KORDKHEILI H, PIZZI A. Lignin-based wood adhesives: A comparison between the influence of soda and kraft lignin[J]. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2023, 121:103312. DOI:10.1016/j.ijadhadh.2022.103312.
- [13] ABBOTT A P, BOOTHBY D, CAPPER G, *et al.* Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(29):9142-9147. DOI:10.1021/ja048266j.
- [14] WANG Zhiwen, LIU Yongzhuang, BARTA K, *et al.* The effect of acidic ternary deep eutectic solvent treatment on native lignin[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, 10(38):12569-12579. DOI:10.1021/acssuschemeng.2c02954.
- [15] FRANCISCO M, VAN DEN B A, KROON M C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): Screening as solvents for lignocellulosic biomass processing[J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(8):2153-2157. DOI:10.1039/c2gc35660k.
- [16] EE L Y, TAN Y K, MIAO Jiawei, *et al.* High-purity lignin from selective biomass fractionation with ternary deep eutectic solvents[J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(8):3137-3151. DOI:10.1039/d3gc00080j.
- [17] TAN Jinyu, YU Dayong, YUAN Junfa, *et al.* Efficient delignification of wheat straw for microbial lipid production enabled by a novel ternary deep eutectic solvent containing ethylene glycol[J]. *Fuel*, 2023, 347:128485. DOI:10.1016/j.fuel.2023.128485.
- [18] DUAN Congjia, HAN Xu, CHANG Yuanhang, *et al.* A novel ternary deep eutectic solvent pretreatment for the efficient separation and conversion of high-quality gutta-percha, value-added lignin and monosaccharide from *Eucommia ulmoides* seed shells[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 370:128570. DOI:10.1016/j.biortech.2022.128570.
- [19] HONG Shu, LIAN Hailan, SUN Xiang, *et al.* Zinc-based deep eutectic solvent-mediated hydroxylation and demethoxylation of lignin for the production of wood adhesive[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(92):89599-89608. DOI:10.1039/c6ra18290a.
- [20] ZHANG Yuling, REN Hongwei, LI Baochai, *et al.* Mechanistic insights into the lignin dissolution behavior in amino acid based deep eutectic solvents[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242(2):124829. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.124829.
- [21] WANG Shuizhong, LI Wenxin, YANG Yueqin, *et al.* Unlocking structure-reactivity relationships for catalytic hydrogenolysis of lignin into phenolic monomers[J]. *ChemSusChem*, 2020, 13(17):4548-4556. DOI:10.1002/cssc.202000785.
- [22] CHEN Zhu, BAI Xianglan, LUSI A, *et al.* Insights into structural changes of lignin toward tailored properties during deep eutectic solvent pretreatment[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(26):9783-9793. DOI:10.1021/acssuschemeng.0c01361.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202405029



纤维素对活性炭孔结构的影响

宋磊, 夏嘉誉, 丁闻军

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为了探讨纤维素对活性炭孔结构的影响,采用废茶、荞麦壳和开心果壳 3 种生物废弃物作为制备活性炭的原材料,利用活化剂 KOH, $ZnCl_2$, 通过改变浸渍比控制活性炭的比表面积和孔结构。结果表明:利用 KOH 活化的活性炭最佳浸渍比均为 2.0;当 KOH 为活化剂、浸渍比为 2.0 时,荞麦壳活性炭的 BET 比表面积和微孔孔容最大,分别达到 $904.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$,开心果壳活性炭的 BET 比表面积和微孔孔容分别为 $746.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.31 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$,废茶活性炭的 BET 比表面积和微孔孔容分别为 $747.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.28 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 。纤维素去除实验的结果表明:纤维素是影响活性炭微孔结构的主要因素。

关键词: 纤维素; 活性炭; 微孔结构; 生物废弃物

中图分类号: TQ 427.26

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0649-05

Influence of Cellulose on Pore Structure of Activated Carbon

SONG Lei, XIA Jiayu, DING Wenjun

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to investigate the effect of cellulose on the pore structure of activated carbon, three types of biological waste, namely waste tea, buckwheat shell, and pistachio shell, were used as raw materials for preparing activated carbon. KOH and $ZnCl_2$ were used as activators, and the specific surface area and pore structure of activated carbon were controlled by changing the impregnation ratio. The results show that the optimal impregnation ratio for activated carbon activated by KOH is 2.0. When KOH is used as an activator and the impregnation ratio is 2.0, the BET specific surface area and micropore volume of buckwheat shell activated carbon are the highest, reaching $904.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and $0.37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, and those of pistachio shell activated carbon are $746.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and $0.31 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, of waste tea activated carbon are $747.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and $0.28 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The results of the cellulose removal experiment show that cellulose is the main factor affecting the microporous structure of activated carbon.

Keywords: cellulose; activated carbon; micropore structure; biological waste

活性炭的组成成分主要有半纤维素、纤维素和木质素。在相同活化条件下,采用不同原材料制得的活性炭 BET 比表面积和孔结构存在较大的差异,这很可能与原材料的组成成分有关。相关研究表明,活性炭的比表面积和孔容的大小不仅与制备过程中的活化条件有关^[1],也与原材料的组成成分息息相关^[2]。以不同的农林废弃物为原料,通过相同的 H_3PO_4 活化工艺制备活性炭^[3],结果表明,不同原材料制备的活性炭的孔结构存在明显的差异。以棕榈壳和椰壳为原材料,在活化过程相同的情况下,棕榈壳活性炭的比表面积和总孔容比椰壳活性炭的大^[4]。荞麦壳、开心果壳和废茶这 3 种生物质的密度和基本形态均有显著差异,它们的组成成分半纤维素、纤维素和木质素也可能存在差异。因此,本文选取荞

收稿日期: 2024-05-31

通信作者: 宋磊(1973-),男,讲师,博士,主要从事多孔性碳材料的研究。E-mail: songlei@hqu.edu.cn.

麦壳、开心果壳和废茶为原材料^[5],考察纤维素去除前、后活性炭的孔结构变化。

1 实验部分

1.1 主要材料

废茶和开心果壳均来自华侨大学厦门校区附近的农贸市场;荞麦壳购自内蒙古包头市丽城科技有限公司;活化剂采用不同浓度的 KOH, ZnCl₂^[6]。

1.2 纤维素的去除

精确称取 5 g 试样,用滤纸包好,并用线扎住,置于索氏抽提器中;加入苯醇混合液,置沸水浴中抽提 6 h,抽提次数控制为每小时 4 次;将抽提后的试样移入锥形瓶中,加入体积分数为 72% 的硫酸,原料中的纤维素结构在硫酸的作用下发生水解而溶出^[7],残余物即为去除纤维素结构的原料。

1.3 活性炭的制备

将开心果壳、荞麦壳、废茶分别与活化剂(KOH, ZnCl₂)按一定的质量比混合,加入适量的蒸馏水,在玻璃容器中搅拌至充分混合后,置于鼓风烘箱中 105 ℃ 烘干 12 h 以上,得到浸渍料^[8]。将浸渍料置于管式加热炉中,在流量为 0.5 L · min⁻¹ 的氮气下以 10 ℃ · min⁻¹ 的升温速率加热至指定温度;保持一定时间后,待样品冷却至室温,用 0.1 mol · L⁻¹ 的盐酸煮沸,除去残余的活化剂,再用热蒸馏水反复洗涤至滤液呈中性后,在 105 ℃ 下烘干;将所得活性炭置于干燥器中保存备用。对所得活性炭进行命名, GKAC, QMAC, WTAC 分别表示开心果壳活性炭、荞麦壳活性炭和废茶活性炭。例如, GKAC-K-600-1.5(2.0) 表示开心果壳活性炭的活化条件为活化剂 KOH, 活化温度 600 ℃, 活化时间 1.5 h, 浸渍比(KOH 质量: 原材料质量)为 2.0, 其他制备的样品均按这种方式命名。

1.4 活性炭的表征

由 DTG-60H 型差热-热重分析装置(日本岛津公司)检测材料的热分解特性,材料在氮气保护下,温度由室温升至 1 000 ℃,升温速率为 10 ℃ · min⁻¹^[9]。采用 EA3000 型有机元素分析仪测定材料中 C, H, N, O 的质量分数。材料的氮气吸附等温线通过 II-2000PS1 型比表面及孔径分析仪(北京贝士德仪器科技公司)于 77 K 液氮浴下测定。

表 1 3 种原材料的元素分析结果

Tab. 1 Element analysis results of three raw materials

原材料	w/%			
	C	H	O	N
开心果壳	47.66	6.68	44.20	0.04
荞麦壳	45.95	6.03	45.92	0.27
废茶	48.34	6.83	36.72	6.08

2 实验结果与讨论

2.1 原材料的元素分析、热重分析和组分分析

3 种原材料的元素分析结果,如表 1 所示。表 1 中: w 为质量分数。由表 1 可知:开心果壳、荞麦壳、废茶中 C 的质量分数都比较高,荞麦壳 C 的质量分数最低,也达到了 45.95%,说明这 3 种材料都是良好的制备活性炭的前驱体;开心果壳和荞麦壳中 C, H, O, N 的质量分数相差不大,而废茶中 N 的质量分数较高, O 的质量分数则较低,说明 3 种材料的元素组成存在一定的差异。

3 种原材料的热重分析结果,如图 1 所示。图 1 中: η 为失重率; θ 为温度。由图 1 可知:在 250 ℃ 之前,开心果壳和荞麦壳的失重曲线几乎一致,而废茶的失重最大;当温度从 250 ℃ 升高到 400 ℃ 时,开心果壳和废茶的失重曲线一致,而荞麦壳的失重最大;继续升温到 600 ℃ 时,荞麦壳和废茶的失重一致,而开心果壳的失重最大。

张利波等^[10]指出,半纤维素的分解温度为 180~300 ℃,纤维素的分解温度为 250~400 ℃,而木质素的分解温度为 280~550 ℃。3 种原材料组分分析结果,如表 2 所示。表 2 中: w 为质量分数。由表 2 可知:开心果壳和荞麦壳中半纤维素的质量分数相当,分别为 31.7% 和 28.2%,而废茶中半纤维素的质量分数最高,达到 41.6%。因此,

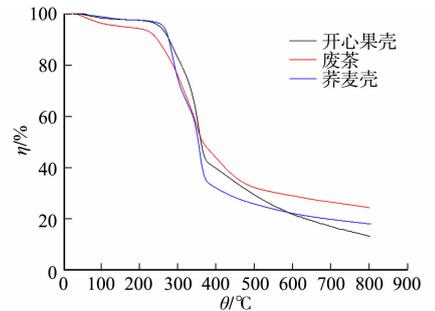


图 1 3 种原材料的热重分析结果
Fig. 1 Thermogravimetric analysis results of three raw materials

半纤维素质量分数高的废茶在 250 °C 前的失重高于开心果壳和荞麦壳。纤维素质量分数高的荞麦壳在 250~400 °C 的失重高于开心果壳和废茶,木质素质量分数高的开心果壳在 400~600 °C 的失重高于废茶和荞麦壳。

2.2 纤维素对活性炭微孔结构的影响(KOH 活化)

KOH 活化条件下,3 种原材料在不同浸渍比^[11]下制备活性炭的氮气吸附等温线,如图 2 所示。图 2 中:Q 为吸附量;P/P₀ 表示分压,P 为压力,P₀ 为标准大气压。根据国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)标准可知,3 种原材料制备的活性炭吸附等温线均呈 I 型,当 P/P₀<0.1 时,吸附量急剧增加,并迅速达到吸附饱和;当继续增加分压时,吸附量不再变化,说明 3 种原材料利用 KOH 活化制备的活性炭孔结构均以微孔为主^[12]。由图 2 可知:随着浸渍比的增加,3 种活性炭的饱和吸附量均呈现先增大后减小的趋势^[13],并且最佳浸渍比均为 2.0,说明不同原材料对活性炭制备条件中的最佳浸渍比并没有影响;在相同活化条件下,QMAC 的饱和吸附量明显的高于 GKAC 和 WTAC,而后两者饱和吸附量则变化不大,这说明在相同的活化条件下,前驱体的不同导致了活性炭孔结构的差异^[14]。

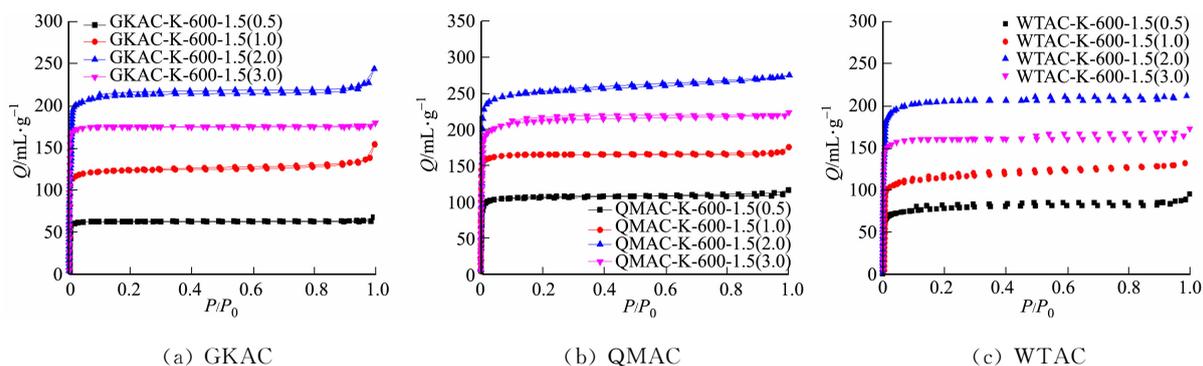


图 2 3 种原材料在不同浸渍比下的氮气吸附等温线

Fig. 2 Nitrogen adsorption isotherms of three raw materials under different impregnation ratios

KOH 活化条件下,3 种原材料在不同浸渍比下制备活性炭的孔结构参数,如表 3 所示。表 3 中: S_{BET} 为 BET 比表面积;V_{meso} 为中孔孔容;V_{micro} 为微孔孔容。

表 3 不同浸渍比下制备活性炭的孔结构参数

Tab. 3 Pore structure parameters of activated carbons under different impregnation ratios

样品	S _{BET} /m ² ·g ⁻¹	V _{meso} /cm ³ ·g ⁻¹	V _{micro} /cm ³ ·g ⁻¹
GKAC-K-600-1.5(0.5)	222.7	0.01	0.10
GKAC-K-600-1.5(1.0)	433.8	0.05	0.19
GKAC-K-600-1.5(2.0)	746.7	0.06	0.31
GKAC-K-600-1.5(3.0)	609.1	0.01	0.27
QMAC-K-600-1.5(0.5)	377.9	0.02	0.15
QMAC-K-600-1.5(1.0)	579.6	0.04	0.23
QMAC-K-600-1.5(2.0)	904.8	0.06	0.37
QMAC-K-600-1.5(3.0)	748.6	0.03	0.32
WTAC-K-600-1.5(0.5)	273.3	0.01	0.12
WTAC-K-600-1.5(1.0)	405.4	0.05	0.16
WTAC-K-600-1.5(2.0)	747.8	0.05	0.28
WTAC-K-600-1.5(3.0)	580.7	0.03	0.24

由表 3 可知:随着 KOH 用量(浸渍比)的提高,3 种原材料的 BET 比表面积和微孔孔容均呈现先增大、后减小的趋势,三者的最佳浸渍比均为 2.0,说明活化剂用量过高或过低均不利于活化过程,活化剂用量过低可能导致活化反应不够完全,而活化剂用量过高则会导致活化剂对碳材料的烧蚀作用过大,从而使一部分的孔结构坍塌,导致 BET 比表面积和微孔孔容下降,这与图 2 的表征结果一致;在相同活化

表 2 3 种原材料组分分析结果

Tab. 2 Component analysis results of three raw materials

原材料	w/%		
	纤维素	半纤维素	木质素
开心果壳	38.9	31.7	25.4
荞麦壳	51.4	28.2	16.3
废茶	38.6	41.6	16.5

条件下, QMAC 的 BET 比表面积和微孔孔容均大于 GKAC 和 WTAC, 而中孔孔容则变化不大。

以最佳浸渍比 2.0 为例, QMAC 的 BET 比表面积和微孔孔容均最大, 分别达到了 $904.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 而 GKAC 的 BET 比表面积和微孔孔容分别为 $746.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.31 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, WTAC 的 BET 比表面积和微孔孔容分别为 $747.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.28 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 。由此可以看出, QMAC 的 BET 比表面积和微孔孔容均大于 GKAC 和 WTAC, 而 GKAC 和 WTAC 的 BET 比表面积和微孔孔容相差不大。结合表 2 可以看出, 荞麦壳的纤维素质量分数最高(51.4%), 而开心果壳和废茶的纤维素质量分数相当, 分别为 38.9% 和 38.6%, 这与三者对应的 BET 比表面积和微孔孔容的结果一致, 说明纤维素的质量分数可能是导致不同原材料微孔结构差异的主要因素。为了验证这一结果, 开展纤维素的去除实验, 对比纤维素去除前、后活性炭孔结构的变化。

纤维素去除实验的活化剂为 KOH, 选择样品为 QMAC-K-600-1.5(2.0)。纤维素去除前、后活性炭的氮气吸附等温线, 如图 3 所示。由图 3 可以看出, 纤维素去除前、后活性炭的氮气吸附等温线均呈 I 型, 表明制备的活性炭均以微孔为主。同时, 未去除纤维素的活性炭的氮气饱和和吸附量明显高于去除纤维素后的活性炭, 说明纤维素的去除是其饱和吸附量减小的主要原因。

去除纤维素后, 活性炭的 BET 比表面积由原来的 $904.8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 下降到 $780.5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 微孔孔容从 $0.37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 下降到 $0.29 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 而中孔孔容变化不大, 说明纤维素的去除导致活性炭微孔孔容的降低, 由于 BET 比表面积主要由微孔贡献, 微孔孔容降低导致 BET 比表面积的下落。因此, 纤维素去除前、后活性炭微孔结构的变化结果进一步证明了纤维素是影响活性炭微孔结构的主要因素。

2.3 纤维素对活性炭微孔影响的验证

由于图 3 中纤维素去除实验的原材料中孔孔容较小, 为了进一步论证纤维素的去除对微孔影响较大, 而对中孔没什么影响, 选择中孔孔容较大的材料进行纤维素去除实验, 选择活化剂为 ZnCl_2 , 样品为 QMAC-Zn-600-1.5(3.0)。纤维素去除前、后活性炭的氮气吸附等温线, 如图 4 所示。由图 4 可知: 纤维素去除前, 活性炭的氮气吸附等温线呈 IV 型, 说明原材料有一定的中孔存在; 纤维素去除后, 活性炭的吸附等温线仍呈 IV 型, 且迟滞环的大小变化不大, 而饱和和吸附量有一定的下降, 说明纤维素的去除对中孔孔容的影响并不大, 饱和吸附量的变化主要是由于微孔的减少导致^[15]。

纤维素去除前、后活性炭的结构参数(ZnCl_2 活化), 如表 4 所示。由表 4 可知: 去除纤维素后, 活性炭的 BET 比表面积由原来的 $1545.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 下降到 $1264.2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 微孔孔容则从 $0.55 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 下降到 $0.44 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, 而中孔孔容变化不大, 说明纤维素的去除导致活性炭微孔孔容降低, 因此选用具有一定中孔结构的材料进行纤维素的去除实验。该结果进一步表明纤维素的去除使活性炭的微孔孔容下降, 中孔孔容变化不大, 说明纤维素质量分数是影响活性炭微孔结构的主要因素。

表 4 纤维素去除前、后活性炭的结构参数(ZnCl_2 活化)

Tab. 4 Structural parameters of activated carbon before and after cellulose removal (ZnCl_2 activation)

纤维素去除	$S_{\text{BET}}/\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	$V_{\text{meso}}/\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	$V_{\text{micro}}/\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$
否	1 545.7	0.29	0.55
是	1 264.2	0.28	0.44

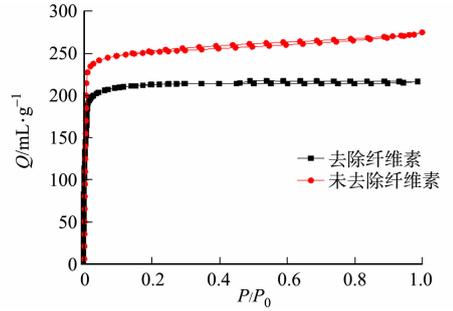


图 3 纤维素去除前、后活性炭的氮气吸附等温线(KOH 活化)

Fig. 3 Nitrogen adsorption isotherms of activated carbon before and after cellulose removal (KOH activation)

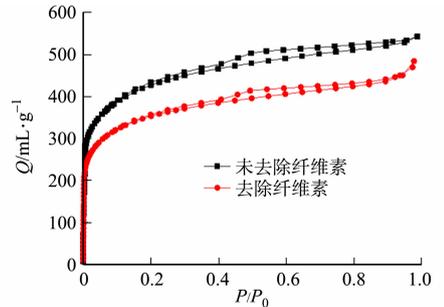


图 4 纤维素去除前、后活性炭的氮气吸附等温线(ZnCl_2 活化)

Fig. 4 Nitrogen adsorption isotherms of activated carbon before and after cellulose removal (ZnCl_2 activation)

3 结论

1) 以 KOH 为活化剂,最佳浸渍比为 2.0,由 KOH 活化的活性炭的氮气吸附等温线均呈 I 型,以微孔为主。

2) 纤维素的去除实验表明,以 KOH 为活化剂,去除纤维素后,活性炭微孔孔容从 $0.37 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 下降到 $0.29 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$,而中孔孔容变化不大,说明纤维素是影响活性炭微孔结构的主要因素。

参考文献:

- [1] 潘晓威,梁耀辉,占国艳,等. 活性炭制备的研究进展[J]. 现代农业科技,2024(9):118-122. DOI:10.3969/j.issn.1007-5739.2024.09.030.
- [2] BOUNDZANGA M H,CAGNON B,ROULET M,*et al.* Contributions of hemicellulose, cellulose, and lignin to the mass and the porous characteristics of activated carbons produced from biomass residues by phosphoric acid activation[J]. Biomass Conversion and Biorefinery,2020,12(8):1-16. DOI:10.1007/s13399-020-00816-9.
- [3] 张晓雪,王欣. 磷酸活化沙柳制备活性炭工艺[J]. 林业工程学报,2016,1(3):58-62. DOI:10.13360/j.issn.2096-1359.2016.03.011.
- [4] WAN A M W D,WAN S W A. Comparison on pore development of activated carbon produced from palm shell and coconut shell[J]. Bioresource Technology,2004,93(1):63-69. DOI:10.1016/j.biortech.2003.09.015.
- [5] 王雪宇,于娜林,江宏伟,等. 添加不同生物质对无灰煤基活性炭结构及性能的影响[J]. 功能材料,2023,54(4):4209-4215. DOI:10.3969/j.issn.1001-9731.2023.04.028.
- [6] 何梓谦,周雅彬,张成,等. 甘草水热炭化-化学活化联合制备活性炭[J]. 洁净煤技术,2022,28(6):120-126. DOI:10.13226/j.issn.1006-6772.CE21051201.
- [7] 李杨,黄艺鸿,林银娜,等. 茶梗的综合利用研究进展[J]. 农产品加工,2023(2):87-90. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2023.01.054.
- [8] YAMAMOTO T,MAKINO Y,IRISAWA T. Synthesis of activated carbon using bagasse and recycled carbon fibers[J]. Chemical Engineering and Technology,2021,44(9):1618-1622. DOI:10.1002/ceat.202100235.
- [9] 范圣楠,张春辉,张晓,等. 三种纤维素基活性炭纤维的制备及表征[J]. 高校化学工程学报,2021,35(1):72-82. DOI:10.3969/j.issn.1003-9015.2021.01.009.
- [10] 张利波,涂建华,彭金辉,等. 烟杆炭化过程中结构变化的研究[J]. 林产化学与工业,2006,26(2):44-48. DOI:10.3321/j.issn:0253-2417.2006.02.012.
- [11] 韦思远,刘宇,刘志高. 不同浸渍方式对氯化锌活化竹纤维活性炭理化结构和性能的影响[J]. 化工新型材料,2024,52(1):183-188. DOI:10.19817/j.cnki.issn1006-3536.2024.01.022.
- [12] 田莹莹,刘恩辉,沈海杰,等. 茶籽壳质活性炭的制备及其电化学性能[J]. 功能材料,2012,43(6):752-755. DOI:10.3969/j.issn.1001-9731.2012.06.020.
- [13] SUHAIMI A,ABDULLAH A S,JAWAD A H,*et al.* Production of large surface area activated carbon from a mixture of carrot juice pulp and pomegranate peel using microwave radiation-assisted ZnCl_2 activation: An optimized removal process and tailored adsorption mechanism of crystal violet dye[J]. Diamond and Related Materials,2022,130:109456. DOI:10.1016/j.diamond.2022.109456.
- [14] ZHAO Jing,GUAN Bing,MA Chi,*et al.* Effect of elemental sulfur in precursors on the pore structure and surface chemical characteristics of high-surface area activated carbon[J]. Journal of Saudi Chemical Society,2017,21(6):691-697. DOI:10.1016/j.jscs.2017.03.001.
- [15] 仲美娟,刘杏娥,尚莉莉,等. 植物基活性炭孔隙调控研究进展[J]. 生物质化学工程,2022,56(1):57-66. DOI:10.3969/j.issn.1673-5854.2022.01.008.

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202406022



红树林来源细菌抑菌活性 及其增肥潜力评估

杨道茂, 周钰烨, 李嘉欣, 易家乐, 杨勤伟, 黄康隆

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 通过平板对峙实验、菌丝生长速率抑制实验,测试细菌对禾谷镰刀菌、假禾谷镰刀菌、香蕉枯萎病菌、油茶炭疽病菌、巴西曲霉的抑菌活性,并通过固氮解磷实验、产 γ -聚谷氨酸实验探究增肥潜力。结果表明:细菌 YY9, 暹罗芽孢杆菌 T1, T6, 贝莱斯芽孢杆菌 T3 对菌丝生长速率抑制率均达到 80% 以上;细菌 YY6~YY12 表现出较强的固氮能力,细菌 YY9 产 γ -聚谷氨酸质量浓度达到 $(6.57 \pm 0.34) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 暹罗芽孢杆菌; 抑菌活性; 固氮能力; γ -聚谷氨酸

中图分类号: S 476 文献标志码: A 文章编号: 1000-5013(2024)05-0654-07

Evaluation of Antibacterial Activity and Fertilization Potential of Bacteria Derived From Mangrove Forests

YANG Daomao, ZHOU Yuye, LI Jiaxin, YI Jiale,
YANG Qinwei, HUANG Kanglong

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The antibacterial activity of bacteria against *Fusarium graminearum*, *Fusarium pseudograminearum*, banana wilt fungus, *Camellia oleifera*, and *Aspergillus brasiliensis* were tested through plate confrontation experiments and mycelial growth rate inhibition experiments. The fertilization potential was explored through nitrogen fixation and phosphorus removal experiment, as well as γ -polyglutamic acid production experiment. The results show that bacteria YY9, *Bacillus siamensis* T1 and T6, *Bacillus velezensis* T3 have inhibition rate over 80% on mycelial growth rate. Bacteria YY6-YY12 show stronger nitrogen fixation ability, and the mass concentration of γ -polyglutamic acid produced by bacteria YY9 can reach $(6.57 \pm 0.34) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords: *Bacillus velezensis*; *Bacillus siamensis*; antibacterial activity; nitrogen fixation ability; γ -polyglutamic acid

农业生产对维护人类粮食安全和社会稳定起到了重要的作用。然而,植物病虫害的不断蔓延对农作物产量和质量造成了严重威胁,限制了农业的可持续发展,如假禾谷镰刀菌(*Fusarium pseudograminearum*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)等病原真菌综合侵染引起的小麦茎基腐病^[1],镰刀菌或腐霉菌单独侵染、镰刀菌和腐霉菌复合侵染引起的玉米茎腐病^[2],古巴尖镰孢菌侵染引起的香蕉枯萎病^[3],油茶炭疽病菌(*Camellia oleifera*)则是危害油茶植株生长和产量的主要病害^[4-5]。

收稿日期: 2024-06-29

通信作者: 杨道茂(1975-),男,讲师,博士,主要从事天然生物活性物质分离与应用、生物转化制备天然产物的研究。
E-mail: ydmao@hqu.edu.cn.

防控植物病害的方法一般采用化学防控手段,但杀菌剂的长期使用会导致环境污染、生态失衡及“3R”问题的产生等,而生物防控对环境友好,病原菌不易产生抗药性,符合可持续发展需求。因此,开发绿色微生物农药有现实意义和经济意义。

微生物农药因具备选择性高、对人畜无害、对自然环境污染小、不易产生抗药性等优点而倍受青睐,是目前发展最迅速、推广应用最成功的一类生物农药产品。与真菌和病毒等其他微生物农药相比,细菌易于培养,农药活性评价也相对容易。更重要的是细菌发酵生产工艺成熟,工业化生产成本可控,更加便于产业化利用。所以,细菌类微生物农药一直受到科研单位和企业的青睐,成为微生物农药研发创制和商业化开发的热点领域。在 2010—2020 年全球新登记的微生物农药中,细菌种类占比超过 40%^[6]。目前,我国主要生物农药品种多样^[7],包括细菌类微生物农药、真菌类微生物农药、病毒类微生物农药、基因工程菌类微生物农药等,在植物保护、虫害防治方面发挥着重要作用。

细菌不仅可以开发为生物农药,而且还有增肥效果。如某些细菌具有合成 γ -聚谷氨酸(γ -PGA)的能力。 γ -PGA 是由多种杆菌产生的一种胞外多肽,具有优良生物相容性、生物降解性及无毒无污染性,广泛用作药物缓释材料、食品的水凝剂及高强度纤维^[8]。在农业应用方面, γ -PGA 可以用于改良酸化植烟土壤^[9],调节土壤微生物群落变化和促进作物生长,富集有益微生物,在作物采摘后依旧维持较高的土壤生物活性^[10],与化学肥料合用,起到明显提高肥效的作用^[11]。目前,暹罗芽孢杆菌^[12-13]、地衣芽孢杆菌^[14]、枯草芽孢杆菌^[11,15]等细菌均具有产 γ -PGA 的能力。基于此,本文对红树林来源细菌抑菌活性及增肥潜力进行评估。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器

γ -PGA(上海市麦克林生化科技股份有限公司);葡萄糖,磷酸氢二钠,硫酸镁等药品(国产分析纯);TGL-20M 型台式高速冷冻离心机(湖南省长沙市湘仪实验室仪器开发有限公司);UV-1800PC 型紫外可见分光光度计(上海市美谱达仪器有限公司)。

1.2 供试试验菌株

油茶炭疽病菌由华侨大学化工学院王奇志副教授馈赠。香蕉枯萎病菌(banana wilt fungus)由华侨大学化工学院王明元教授馈赠。禾谷镰刀菌,假禾谷镰刀菌由江苏省南京市中旗科技股份有限公司馈赠。巴西曲霉(*Aspergillus brasiliensis*)购自广东省广州市微生物菌种保藏中心。

1.3 培养基配方

培养基配方,如表 1 所示。

表 1 培养基配方
Tab. 1 Formula of culture medium

培养基	配方
阿须贝无氮培养基 ^[16]	葡萄糖(10 g), KH_2PO_4 (0.2 g), NaCl (0.2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g), CaSO_4 (0.1 g), CaCO_3 (5 g), 琼脂(15 g), 纯水(1 L)
蒙金娜无机磷培养基 ^[16]	葡萄糖(10 g), NaCl (0.3 g), KCl (0.3 g), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (10 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.03 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03 g), 琼脂(15 g), 纯水(1 L)
蒙金娜有机磷培养基 ^[16]	葡萄糖(10 g), NaCl (0.3 g), KCl (0.3 g), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.03 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), CaCO_3 (5 g), 卵磷脂(0.2 g), 琼脂(18 g), 纯水(1 L), pH 值为 7.0~7.2
γ -PGA 发酵培养基 ^[17]	蔗糖(40 g), 牛肉膏(8 g), 谷氨酸钠(40 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.24 g), K_2HPO_4 (1.2 g), NaCl (5 g), 离子水(1 L), pH 值为 7.5

2 实验部分

2.1 细菌的分离

用无菌药勺取约 5 g 福建省厦门市集美大桥红树林根部土壤,并将其装于无菌培养皿中。将约 1 g

土壤倒入 9 mL 无菌水试管中,摇匀后,稀释 10 倍。取 0.5 mL 稀释液涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,30 ℃培养 2~5 d。观察微生物生长情况,依据菌落特征的差异挑取菌株。纯化菌株,直到获得单一菌落为止。挑选一部分菌株送往北京市擎科生物科技股份有限公司做 16S rDNA 鉴定。

2.2 固氮解磷效果

细菌固氮解磷的实验流程参考文献[16],并做略微调整。挑取一接种环培养物分别接种到阿须贝无氮培养基、蒙金娜无机磷培养基和蒙金娜有机磷培养基上,每个培养基接种 3~4 株菌,培养 5 d 后观察透明圈产生情况。

2.3 对病原真菌的拮抗活性

采用对峙培养法考察各细菌对病原真菌的拮抗活性^[18]。在 PDA 中央位置接种病原菌菌丝,并在周边等距接 3~4 株细菌,在室温下培养 5 d 后观察其拮抗效果。

2.4 对病原真菌菌丝体生长速率的抑制效果

实验过程参考文献[16],并做一些调整。取节 2.3 具有拮抗效果的菌株接种于装有 30 mL 的 LB 液体培养基中,于 30 ℃培养 2 d 后,取 2 mL 菌液加入到无菌培养皿中,随后倒入约 50 ℃,20 mL 的 PDA 中,摇匀。待培养基凝固后,往培养基中央接种一环病原真菌菌丝,室温下培养 7 d,以不接细菌的 PDA 为对照。生长结束后分别测量对照组菌丝直径、实验组菌丝直径及菌丝生长速率抑菌率。菌丝生长速率抑制率计算式为

$$\text{菌丝生长速率抑制率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%。$$

2.5 γ -PGA 产量

采用比浊法建立 γ -PGA 标准曲线。精确配制 γ -PGA 母液, γ -PGA 质量浓度为 0.500 g · L⁻¹,然后逐步稀释成 0.278,0.227,0.182,0.167,0.154,0.125,0.100 g · L⁻¹ 溶液,备用。分别取 3 mL 各质量浓度标准品溶液与等体积十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,0.07 mol · L⁻¹)溶液混匀,室温下静置 3 min 后,测量其在 400 nm 波长下的吸光度(D(400))^[19]。将各细菌接种于 γ -PGA 发酵培养基中,30 ℃培养 3 d 后,发酵液在转速为 10 000 r · min⁻¹ 离心机中离心 20 min,将 1 mL 上清液稀释 10,20 倍,最终按照标准曲线计算 γ -PGA 质量浓度。每株菌重复 3 次,最后计算平均值。

2.6 复合菌剂可能性

考察增肥潜力细菌与抑菌活性的芽孢杆菌进行复配的可能性。将具有增肥潜力的细菌 YY6,YY11 接种于 50 mL 的 LB 培养基中,30 ℃培养 24 h 后,各取 0.5 mL 溶液涂布于 PDA 培养基上,随后在培养基表面接种暹罗芽孢杆菌 T1,T6(细菌 T1,T6),贝莱斯芽孢杆菌 T3(细菌 T3),细菌 YY9,30 ℃培养 2 d 后观察是否有透明圈,不产生透明圈,则表明二者可共培养,有制备复合菌剂的可能。

3 实验结果与讨论

3.1 菌株分离

从红树林根部土壤中共分离到 130 多株细菌。取其中 3 株细菌 T1,T3,T6 进行 16S rDNA 鉴定。结果表明,细菌 T1,T6 为暹罗芽孢杆菌(相似性分别为 99.93%和 100.00%),细菌 T3 为贝莱斯芽孢杆菌(相似性为 100%)。

暹罗芽孢杆菌于 2010 年被刊物 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 收录为有效种名,属芽孢杆菌科芽孢杆菌属。研究表明,暹罗芽孢杆菌可用于治疗烟草赤星病^[20-21]、花生白绢病^[22],分解原油,降解土壤中化合物等,有着广泛的应用前景^[23]。

贝莱斯芽孢杆菌对辣椒褐腐病^[24]、油菜根肿病和稻瘟病^[25]、禾谷镰刀菌^[26]均表现出良好的抑菌效果。目前仅有四川省成都市百事东旺生物科技有限公司登记的贝莱斯芽孢杆菌为生物农药(<http://www.icama.org.cn/>),贝莱斯芽孢杆菌还有较大的开发空间。

3.2 菌株固氮解磷效果

细菌 YY5~YY12 固氮解磷效果,如图 1 所示。

由图 1 可知:细菌 YY6~YY12 的透明圈直径与菌落直径的比值为 2.0~5.2,具有较强的固氮效

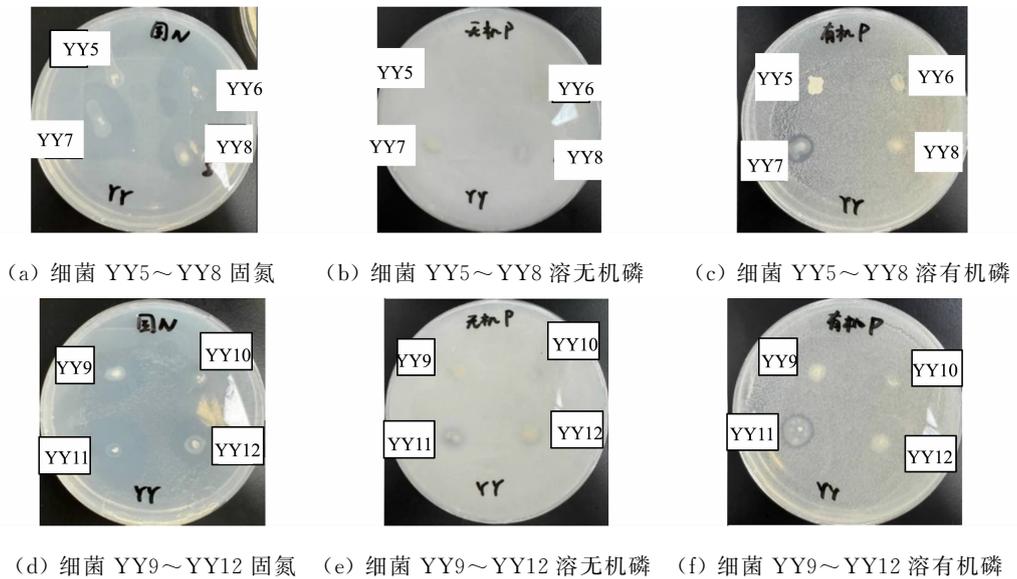


图 1 菌株 YY5~YY12 固氮解磷效果

Fig. 1 Effects of nitrogen fixation and phosphorus release of strains YY5-YY12

果;细菌 YY7, YY11 具有其他菌株不具备的解无机磷和有机磷效果,具有较强的增肥潜力研究价值。

3.3 对病原真菌拮抗活性的考察

各细菌对病原真菌拮抗效果,如图 2 所示。由图 2 可知:各菌株对 5 种植物病原菌表现出较明显的抑菌效果,有进一步研究开发的价值。

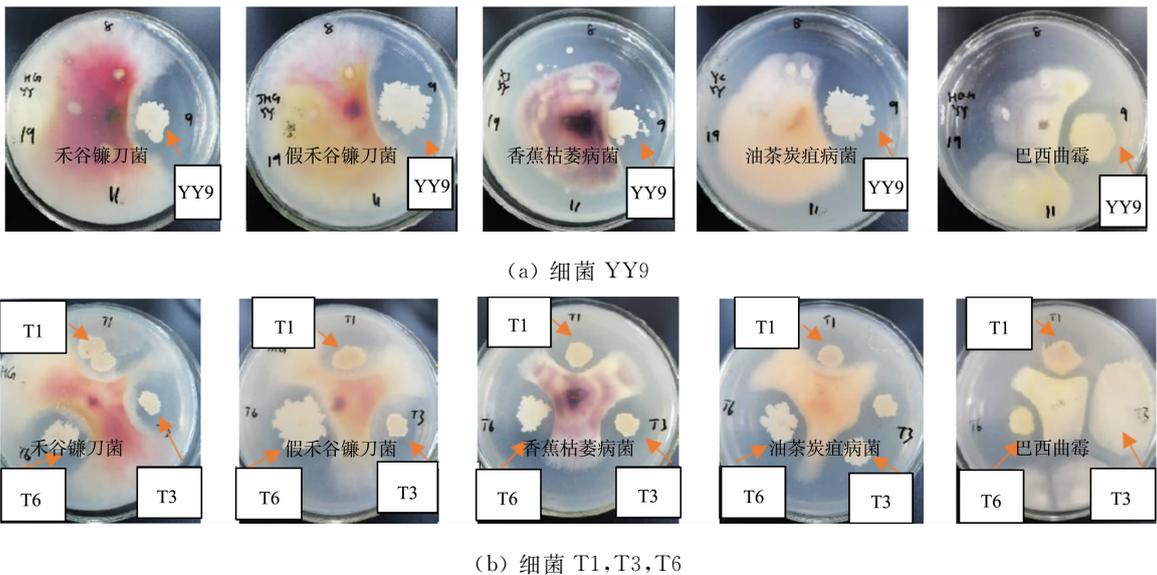
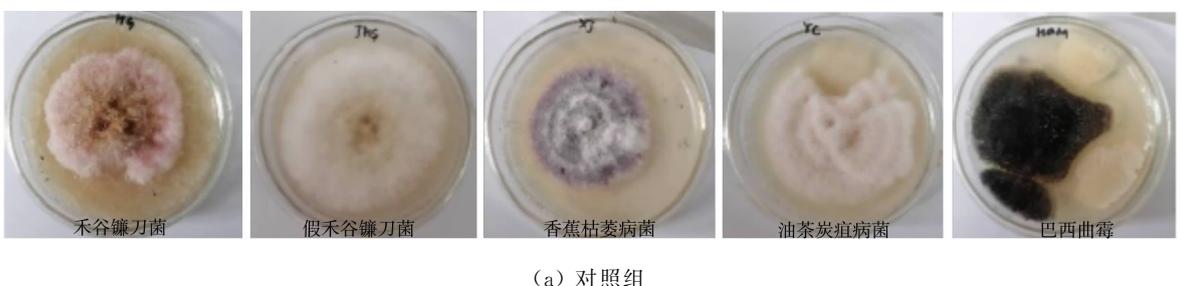


图 2 各细菌对病原真菌拮抗效果

Fig. 2 Antagonistic effect of various strains on pathogenic fungi

3.4 植物病原真菌菌丝生长速率抑制实验

细菌对病原真菌菌丝生长速率抑制效果图,如图 3 所示。



(a) 对照组

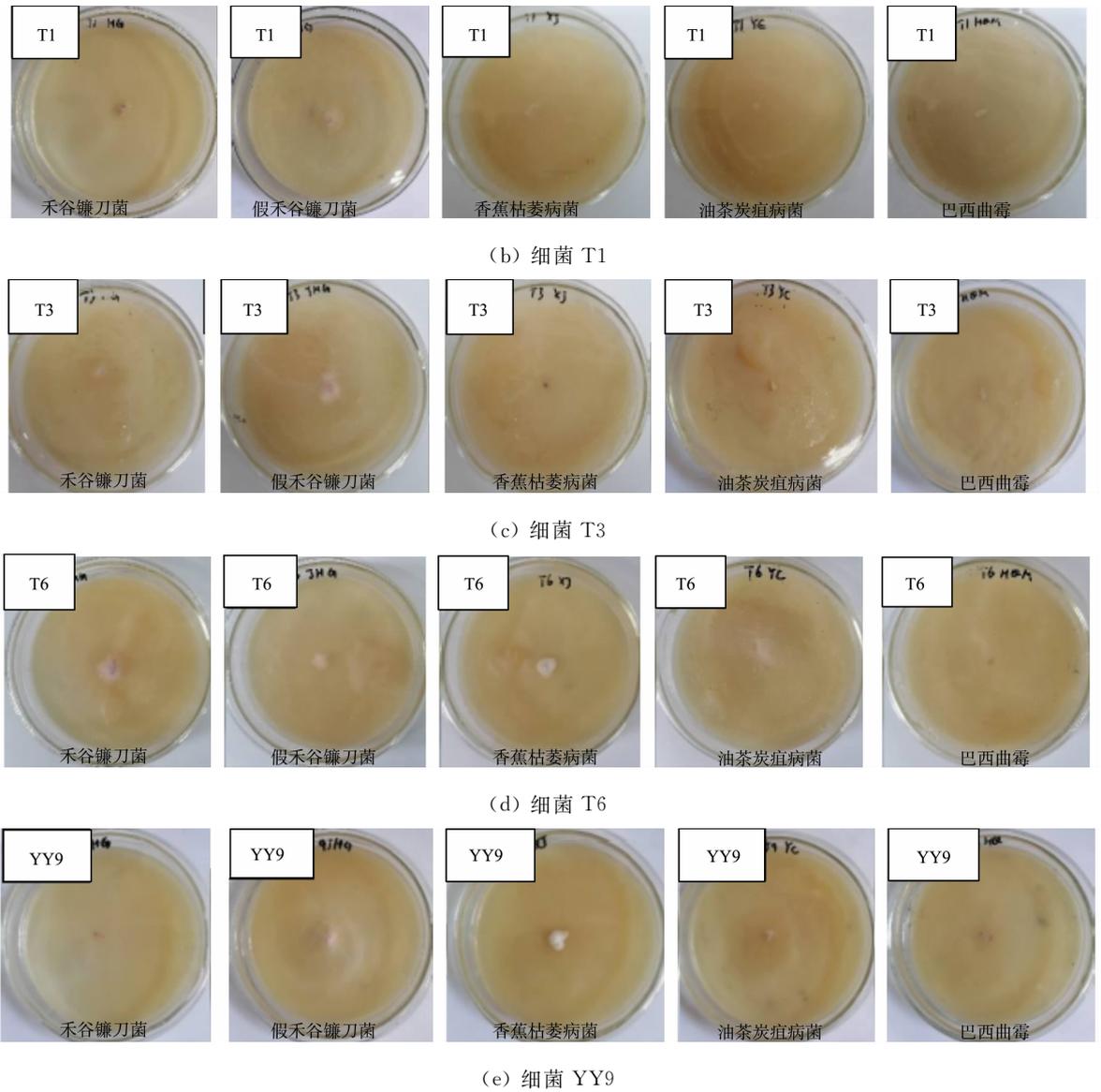


图 3 细菌对病原真菌菌丝生长速率抑制效果图

Fig. 3 Inhibition effect of bacteria on growth rate of pathogenic fungal hyphae

植物病原真菌菌丝生长速率抑制率,如图 4 所示。由图 3,4 可知:4 株细菌对 5 种植物病原真菌菌丝生长速率抑制率均在 80% 以上,其中细菌 T3 的抑制效果最佳,对 5 株植物病原菌菌丝生长速率抑制率均在 90% 以上。

菌株 zk1 的菌液对胶孢炭疽菌的抑制率达到 91.63%,对哈茨木霉的抑制率也接近 80%^[27]。细菌 Vel-HNGD-F2 抑菌物质粗提物对禾谷镰刀菌抑菌率达到 $(63.21 \pm 0.94)\%$ ^[26]。细菌 Pm9 对禾谷镰刀菌、小麦全蚀病菌、小麦纹枯病菌、君子兰茎基腐病菌、番茄灰霉病菌和南天竹炭疽病菌 6 种供试植物病原菌抑制率在 55.5%~87.5% 之间^[28]。细菌 T3 对植物病原菌的抑制率与文献报道的一致,在农业生产上具有较好的应用价值。

3.5 产 γ -PGA 的能力

γ -PGA 标准曲线为 $Y = 3.35574X - 0.02095$, $R^2 = 0.9953$,其中 Y 为 γ -PGA 质量浓度, X 为

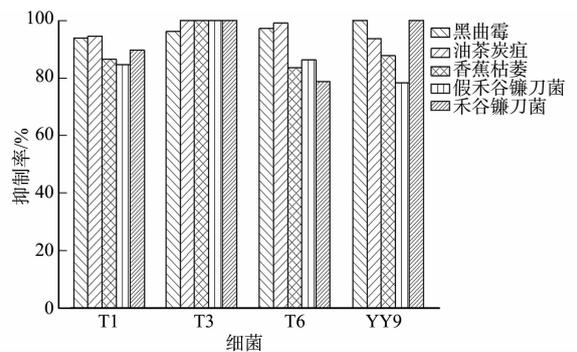


图 4 植物病原真菌菌丝生长速率抑制率

Fig. 4 Inhibition rates of mycelial growth of plant pathogenic fungi

D(400)。各菌株 γ -PGA 产量, 如图 5 所示。图 5 中: $\rho(\gamma\text{-PGA})$ 为 γ -PGA 质量浓度。

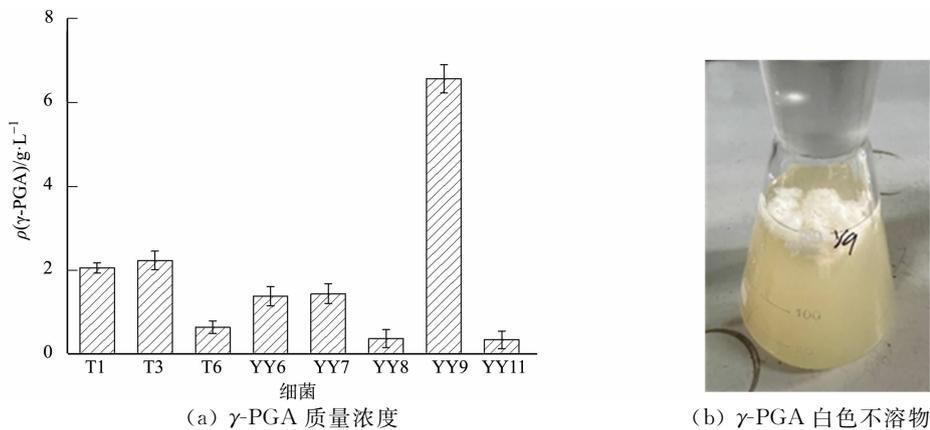


图 5 各菌株 γ -PGA 产量

Fig. 5 γ -PGA production of each strain

由图 5 可知: 8 株菌具有合成 γ -PGA 的产量, 其中, 细菌 YY9 合成的 γ -PGA 质量浓度达到 $(6.57 \pm 0.34) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细菌 CAU83 的 γ -PGA 最高产量为 $30.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[29], 细菌 LBY-7 的 γ -PGA 最高产量为 $23.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13], 细菌 LW-1 的 γ -PGA 最高产量为 $44.78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12]。因此, 细菌 YY9 的 γ -PGA 产量还有很大的提升空间。

3.6 复合菌肥配制可能性评估

细菌与芽孢杆菌拮抗关系, 如图 6 所示。

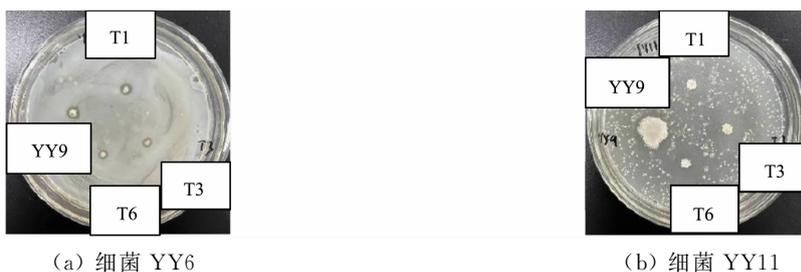


图 6 细菌与芽孢杆菌拮抗关系

Fig. 6 Antagonistic relationship between bacteria and *Bacillus subtilis*

由图 6(a) 可知: 细菌 YY6 与 4 株生防细菌有一定的拮抗关系, 不能用于复配复合菌剂用, 而细菌 YY11 可与细菌 YY9 进行复配。

4 结论

1) 分离到的细菌具有固氮功能, 其透明圈直径与菌落直径的比值在 2.0~5.2, 具有较强的固氮效果, 对无机磷和有机磷的溶解效果则较弱。

2) 通过对峙培养实验表明, 分离到的细菌 T1, T6, T3, 细菌 YY9 对 5 株植物病原真菌(禾谷镰刀菌、假禾谷镰刀菌、香蕉枯萎病菌、油茶炭疽病菌、巴西曲霉)有抑制作用。通过菌丝体生长速率抑制实验, 结果表明, 4 株细菌对 5 株植物病原真菌菌丝生长速率抑制率达到 80% 以上, 尤其细菌 T3 的抑制率达到 90% 以上, 有进一步开发的价值。

3) 多株细菌具有合成 γ -PGA 的能力, 细菌 YY9 合成 γ -PGA 的质量浓度为 $(6.57 \pm 0.34) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 还有很大的提升空间。

参考文献:

- [1] 吴振锋, 王陆军, 任淑芳, 等. 苯醚甲环唑及其复配剂对小麦茎基腐病的防效[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(9): 88-90.
- [2] 杨冰娟, 陶睿泽, 林丽, 等. 芽孢杆菌抑制玉米茎腐病菌禾谷镰孢菌和拟轮枝镰孢菌的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(12): 42-49. DOI:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.12.005.

- [3] 韦锡昌,林蓝慧,蒙姣荣,等.一株香蕉枯萎病菌拮抗菌的筛选鉴定及盆栽防治效果[J].西南农业学报,2024,37(7):1522-1530. DOI:10.16213/j.cnki.scjas.2024.7.014.
- [4] 李勇,刘飞,叶锴,等.油茶炭疽病原菌的分离与鉴定[J].分子植物育种,2024,22(12):3947-3953. DOI:10.13271/j.mpb.022.003947.
- [5] 陈洁宇,姜毅,龚涵,等.油茶炭疽病原菌鉴定及生物学特性[J].生物灾害科学,2024,47(2):224-237. DOI:10.3969/j.issn.2095-3704.2024.02.29.
- [6] 张正炜,成玮,何壮,等.我国细菌类微生物农药的登记情况与应用策略浅析[J].世界农药,2024,46(4):11-18. DOI:10.16201/j.cnki.cn10-1660/tq.2024.04.02.
- [7] 朱伟冉,刘媛,赵晨,等.我国微生物农药的概述与进展[J].工业微生物,2024,54(3):153-155. DOI:10.3969/j.issn.1001-6678.2024.03.042
- [8] 凡朱,吕忠良,杨叶东,等.高黏发酵液中 γ -聚谷氨酸的分离纯化工艺[J].化学工程,2013,41(12):9-11,47. DOI:10.3969/j.issn.1005-9954.2013.12.003.
- [9] 施河丽,彭五星,向修志,等. γ -聚谷氨酸高产菌株的筛选及改良酸化植烟土壤效果研究[J].中国烟草科学,2022,43(4):15-21. DOI:10.13496/j.issn.1007-5119.2022.04.003.
- [10] 陶龙锦,张经博,董正武,等. γ -聚谷氨酸对棉花生长与根际微生物的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2023,43(4):33-43. DOI:10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202305001.
- [11] 嵯优伏,邢芳芳,高明夫,等. γ -聚谷氨酸合成菌的鉴定及其对肥效的影响[J].湖北农业科学,2016,55(17):4569-4572. DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2016.17.052.
- [12] 蔡亚慧,王青,王文玉,等.暹罗芽孢杆菌 LW-1 产 γ -聚谷氨酸发酵培养基的优化[J].食品工业科技,2021,42(16):163-170. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020110269.
- [13] 张雷,张蕾,王玲莉,等. γ -聚谷氨酸生产菌株的鉴定及发酵培养基优化[J].食品工业科技,2020,41(20):64-71. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.011.
- [14] 李松.农用聚谷氨酸低成本液体发酵工艺研发[D].济南:齐鲁工业大学,2018.
- [15] 贾艳萍,殷爱鸣,孙艳梅,等.产聚谷氨酸菌株的筛选及菌株发酵液对玉米幼苗抗旱性的作用[J].生物技术通报,2017,33(10):135-142. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0699.
- [16] 梁倩文.禾谷镰孢生防细菌的筛选、鉴定及生防潜能研究[D].合肥:安徽农业大学,2023.
- [17] 张雯,刘利歌,张艳,等.一株 γ -PGA生产菌株的分离鉴定及产物性能研究[J].现代食品科技,2014,30(7):44-50. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.07.001.
- [18] 李身.生防细菌 QTH8 的鉴定及对小麦茎基腐病、大豆胞囊线虫病的防治研究[D].洛阳:河南科技大学,2022.
- [19] ASHIUCHI M. Analytical approaches to poly- γ -glutamate: Quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(29): 3096-3101. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.03.029.
- [20] 王东坤.暹罗芽孢杆菌 LZ88 抗烟草赤星病菌物质鉴定与作用研究[D].北京:中国农业科学院,2022.
- [21] 谢中玉.暹罗芽孢杆菌 LZ88 对烟草赤星病的防治效果和作用机理研究[D].重庆:西南大学,2020.
- [22] 张霞,许曼琳,郭志青,等.暹罗芽孢杆菌 ZHX-10 的分离鉴定及其对花生白绢病的生防效果[J].中国油料作物学报,2020,42(4):674-680. DOI:10.19802/j.issn.1007-9084.2019207.
- [23] 林志楷,林文珍.暹罗芽孢杆菌研究进展[J].亚热带植物科学,2019,48(4):391-396. DOI:10.3969/j.issn.1009-7791.2019.04.016.
- [24] 赵春燕,安良聪,赵秋玲,等.贝莱斯芽孢杆菌 JK-1 可湿性粉剂研制及对辣椒褐腐病的防治效果[J].天津农业科学,2023,29(2):52-56,63.
- [25] 周旭峰.贝莱斯芽孢杆菌 F85 剂型研制及防病效果评估[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [26] 王冲,李倩,肖红英,等.贝莱斯芽孢杆菌 Vel-HNGD-F2 产抗菌物质发酵条件优化及抗菌特性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2024,45(1):73-80. DOI:10.16433/j.1673-2383.2024.01.010.
- [27] 陈少先.贝莱斯芽孢杆菌 zk1 脂肽类次级代谢产物的抑菌机理研究[D].广州:仲恺农业工程学院,2022.
- [28] 李永丽,周洲,曲良建,等.贝莱斯芽孢杆菌 Pm9 生物防治潜力及全基因组分析[J].河南农业大学学报,2021,55(6):1081-1088. DOI:10.16445/j.cnki.1000-2340.20210816.002.
- [29] 林格儿,刘宏,刘海杰,等.暹罗芽孢杆菌高产 γ -聚谷氨酸的发酵条件优化[J].微生物学通报,2022,49(8):3335-3345. DOI:10.13344/j.microbiol.china.211134.

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202307035



三峡库区源头溪流湾滩河 浮游植物群落特征

陈焱垚¹, 孙荣¹, 杨瑛¹, 胡家榕¹, 代晓涵²

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;
2. 甘肃农业大学 植物保护学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为探讨山地河流源头溪流浮游植物群落的空间格局和生物多样性维持机制,对湾滩河流域浮游植物群落空间结构变化特征及其与环境因子的关系进行研究;在三峡库区汤溪河上游的湾滩河干支流设置 9 个样地,调查浮游植物物种组成和环境变量,进行 Spearman 相关性分析。结果表明:丰水期和枯水期的浮游植物物种组成均主要以硅藻-绿藻型为主;均匀度指数和 Simpson 生物多样性指数变化不大,水质较为清洁;丰水期和枯水期浮游植物密度分别为 $1.9856 \times 10^4 \sim 5.7263 \times 10^4$, $2.0332 \times 10^4 \sim 6.0060 \times 10^4$ cells · L⁻¹; pH 值、溶解氧(DO)、总磷(TP)、海拔是影响湾滩河浮游植物特征指数变化的关键因子。

关键词: 浮游植物; 群落特征; 空间格局; 生物多样性; 湾滩河; 三峡库区

中图分类号: Q 948.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-5013(2024)05-0661-06

Phytoplankton Community Characteristics of Headstream Wantan River in Three Gorges Reservoir Area

CHEN Yanyao¹, SUN Rong¹, YANG Ying¹,
HU Jiarong¹, DAI Xiaohan²

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to explore the spatial pattern and biodiversity maintenance mechanism of phytoplankton community in headstream of mountain rivers and streams, the spatial structure change characteristics of phytoplankton community in Wantan River basin and their relationship with environmental factors were studied. Nine plots were set up in Wantan River tributaries in the upper reaches of Tangxi River in the Three Gorges Reservoir Area. The phytoplankton species composition and environmental variables were investigated, and Spearman correlation and other analyses were performed. The results showed that the phytoplankton species composition was mainly diatomic-green algae type in both wet and dry periods; evenness index and Simpson biodiversity index changed little, and the water quality was relatively clean; the phytoplankton densities in wet and dry periods were $1.9856 \times 10^4 \sim 5.7263 \times 10^4$ and $2.0332 \times 10^4 \sim 6.0060 \times 10^4$ cells · L⁻¹ respectively; the pH value, dissolved oxygen (DO), total phosphorus (TP) and altitude were key factors affecting the variation of phytoplankton characteristic index in the Wantan River.

Keywords: phytoplankton; community characteristics; spatial pattern; biodiversity; Wantan River; Three Gorges Reservoir area

收稿日期: 2023-07-27

通信作者: 孙荣(1982-),男,副教授,博士,主要从事环境生态学、环境规划的研究。E-mail: sunrong@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51509094); 华侨大学本科教育教学改革研究项目(HQJGYB2339)

在水库建设和形成过程中,随着水动力学条件的变化,水生物群落也发生巨大变化。对我国三峡建坝后的浮游植物群落变化进行监测,发现生物多样性格局与水库调度和水体滞留时间密切相关,而浮游植物作为生产者,是形成水域生产力基础之一^[1-2],在维持水域生态系统平衡、物质循环及能量流动等方面起着重要的作用^[3]。由于浮游植物对水环境的变化十分敏感,河流连续性及其库区水生态环境的改变通常会致浮游植物种类组成及群落结构发生变化^[4]。

目前,长江支游浮游植物的野外调查主要从环境因子对浮游植物群落结构的影响进行研究。朱爱民等^[5]对长江干流和支流未淹没区与回水区的浮游植物进行调查,研究表明三峡工程蓄水对回水区浮游植物与水质的影响比长江干流大;朱爱民等^[6]对水库浮游植物群落结构特征进行分析,发现对淹没支流河口,浮游植物群落组成特点明显改变,组成成分发生明显变化,硅藻优势种类占比、最高优势度明显下降;张静等^[7]对长江干支流的浮游植物进行调查,认为总磷(TP)和总氮(TN)与浮游植物密度呈现显著正相关;朱永锋等^[8]对三峡水库进行了大范围调查,发现硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)、水温是影响支流库湾浮游植物群落结构的主要环境因子。

湾滩河是三峡库区左岸一级支流汤溪河的上游河段,干流长 46.2 km,流域面积 633.8 km^2 ,截止目前湾滩河干流规划和建成的电站有 18 座,在我国西南山地河流梯级水电开发中具有典型的代表性。因此,针对湾滩河开展浮游植物群落结构研究对于西南山地河流和三峡库区河流水质安全和生态系统完整性具有重要意义。本文通过开展湾滩河浮游植物采样调查及水质评价,分析枯水期、丰水期湾滩河浮游植物群落结构特征及其与环境因子间的相关性,探明湾滩河水生态状况,以期对湾滩河水生态保护提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 采样点设置

湾滩河流域径流主要来源于降雨和地下水,径流的年内变化与降雨一致。每年 3 月下旬开始,随着降雨增加,径流也相应增大,4 月为汛前过渡期,5—9 月流域进入主汛期,径流量大增,10 月为汛后过渡期,降雨减少,径流也逐渐减少,11 月至次年 2 月很少降雨,径流主要由地下水补给。于 2020 年 7 月(丰水期)和 2020 年 12 月(枯水期)在湾滩河共布设 9 个采样点,涵盖回龙电站(S1)、鱼泉电站(S2)、汇合口(S3)、中源一级电站水坝(S4)、中源二级电站水坝(S5)、红池坝镇下(S6)、游家河汇口上(S7)、温水(S8)、转角楼(S9),如图 1 所示。样地特征一览表,如表 1 所示。表 1 中: L 为距电站水坝距离; H 为海拔; θ 为温度; $\rho(\text{DO})$ 为溶解氧(DO)的质量浓度; $\rho(\text{NH}_4\text{N})$ 为氨氮质量浓度; $\rho(\text{TP})$ 为总磷的质量浓度。

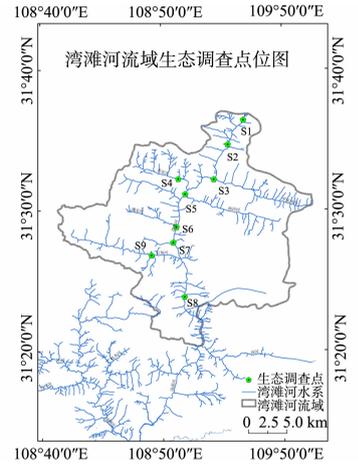


图 1 湾滩河流域生态调查点位图
Fig. 1 Bitmap of ecological survey points in Wantan River basin

表 1 样地特征一览表

Tab. 1 List of plot features

采样点	L/m	H/m	所在溪流	丰水期						枯水期					
				$\theta/^\circ\text{C}$	pH	$\rho(\text{DO})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho(\text{NH}_4\text{N})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho(\text{TP})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\theta/^\circ\text{C}$	pH	$\rho(\text{DO})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho(\text{NH}_4\text{N})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$\rho(\text{TP})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		
S1	200	1 330	干流	22.2	7.9	8.5	0.14	0.01	14.3	7.8	8.1	0.16	0.01		
S2	600	685	干流	24.3	7.8	8.1	0.17	0.08	16.6	7.8	7.8	0.23	0.11		
S3	550	560	干流	24.6	7.8	8.3	0.48	0.09	15.5	7.6	7.9	0.62	0.16		
S4	430	660	支流	25.6	7.7	8.1	0.44	0.16	16.2	7.6	7.8	0.56	0.21		
S5	400	660	支流	25.5	7.6	6.8	1.01	0.21	15.8	7.5	6.6	1.22	0.29		
S6	1 120	450	干流	26.1	7.5	6.6	1.22	0.29	16.6	7.5	6.3	1.56	0.32		
S7	180	490	干流	25.9	7.6	7.1	1.02	0.28	16.2	7.4	6.7	1.35	0.31		
S8	3 000	510	干流	26.2	7.5	6.2	1.44	0.28	17.8	7.3	5.8	1.62	0.38		
S9	580	505	支流	25.8	7.4	5.8	1.49	0.27	18.2	7.3	6.1	1.63	0.39		

1.2 样品采集和处理

1) 水样定性。在调查水体的各采样点采集浮游植物定性水样, 样品用质量分数 2% 的鲁哥氏液固定后带回实验室观察, 并进行浮游植物种类鉴别, 确定水体中浮游植物的优势种。

2) 水样定量。将同一采样断面 3 个采样点水样混合后取 1 000 mL, 加 15 mL 鲁哥氏液进行固定。

3) 室内观察与处理。种类鉴定参照《中国淡水藻类: 系统、分类及生态》, 通过 0.1 mL 浮游生物计数框计数。

1.3 数据分析

采用优势度指数(Y)确定浮游植物的优势种, 当优势度指数 $Y \geq 0.02$ 时, 认定为优势种^[9]。优势度指数的计算式为

$$Y = \left(\frac{n_i}{N} \right) \cdot f_i。$$

上式中: n_i 为第 i 个物种的个体数; f_i 为第 i 个物种出现的频率; N 为每升水样中所有浮游植物的数量, $N = \frac{P_n}{F_n} \times \frac{C_s}{F_s} \times \frac{V}{v}$, 其中, P_n 为平均每片实际计数的某种浮游植物个数, F_n 为平均每片计数过的视野数, C_s 为计数框面积, F_s 为每个视野面积, V 为最终浓缩水量, v 为计数框容积。

2 研究结果与分析

2.1 湾滩河浮游植物群落结构时空分布特征

2.1.1 浮游植物的种类组成与优势种 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物种类数(k), 如图 2 所示。由图 2 可知: 湾滩河丰水期共检出浮游植物 7 门 86 种, 硅藻门种类最为丰富, 共 47 种, 绿藻门次之, 有 22 种; 枯水期共检出浮游植物 7 门 71 种, 以硅藻门为主, 共 42 种, 其次是绿藻门 16 种。丰水期浮游植物种类数量比枯水期的种类数多。

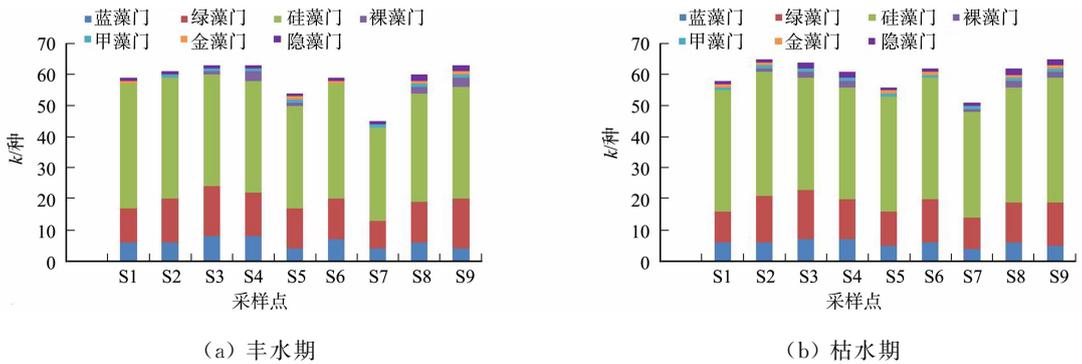


图 2 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物种类数

Fig. 2 Number of phytoplankton species in Wantan River during wet and dry periods

调查期间, 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物优势种及优势度, 如表 2 所示。由表 2 可知: 不论丰水期还是枯水期, 优势物种的种类均以蓝藻门的小颤藻为主, 丰水期和枯水期浮游植物优势种种类相同。

表 2 湾滩河丰水期和枯水期的浮游植物优势种及优势度

Tab. 2 Dominant species and degree of phytoplankton in Wantan River during wet and dry periods

门类	优势种	Y	
		丰水期	枯水期
蓝藻门	小颤藻(<i>Oscillatoria tenuis</i>)	0.087	0.046
	尖针杆藻(<i>Synedra acus</i> var)	0.046	0.031
硅藻门	线性舟形藻(<i>Navicula graciloides</i>)	0.033	0.022
	简单舟形藻(<i>Navicula simplex</i>)	0.036	0.022
	膨胀桥弯藻(<i>Cymbella tumida</i>)	0.041	0.019
金藻门	黄群藻(<i>Synuraceae urelin</i>)	0.033	0.019
绿藻门	普通水绵(<i>Spirogyra communis</i>)	0.044	0.021

2.1.2 浮游植物密度及生物量 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物密度和生物量变化,如图3所示.图3中: P 为浮游植物密度; w_B 为生物量.

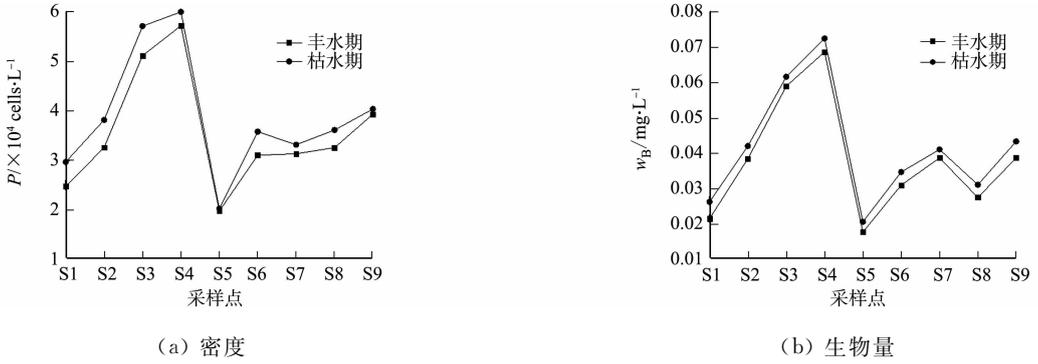


图3 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物密度和生物量变化

Fig. 3 Changes in phytoplankton density and biomass in Wantan River during wet and dry periods

由图3可知:丰水期浮游植物密度为 $1.9856 \times 10^4 \sim 5.7263 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$,生物量为 $0.0178 \sim 0.0688 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;枯水期浮游植物密度为 $2.0332 \times 10^4 \sim 6.0060 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$,生物量为 $0.0207 \sim 0.0726 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;不论是丰水期还是枯水期,采样点S4浮游植物密度及生物量最高,采样点S3次之,采样点S5的浮游植物密度及生物量最低.

2.1.3 浮游植物特征指数 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物特征指数变化,如图4所示.图4中: δ_H 为多样性指数; δ_j 为均匀度指数.

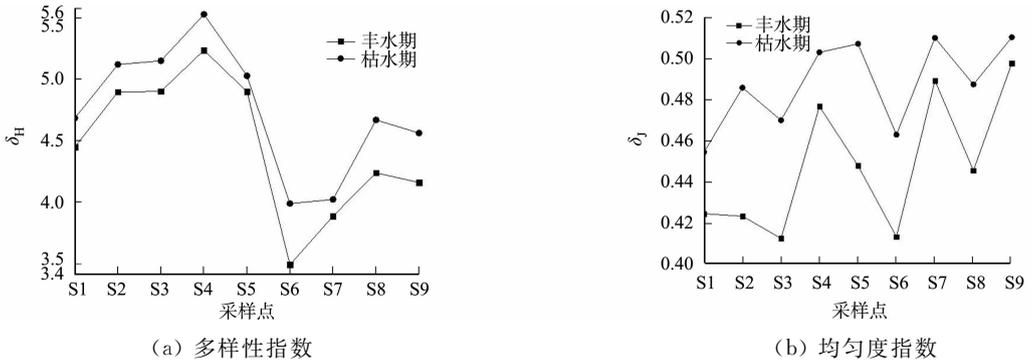


图4 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物特征指数变化

Fig. 4 Changes in phytoplankton characteristic indices in Wantan River during wet and dry periods

由图4(a)可知:丰水期各采样点浮游植物多样性指数的变化范围为 $3.4896 \sim 5.2364$,平均值为 4.4616 ;枯水期多样性指数在 $3.9876 \sim 5.5286$ 波动,平均值为 4.7502 。由图4(b)可知:丰水期各采样点浮游植物均匀度指数为 $0.4128 \sim 0.4979$,平均值为 0.4481 ;枯水期均匀度指数为 $0.4547 \sim 0.5105$,平均值为 0.4881 。

2.1.4 Simpson生物多样性指数 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物Simpson生物多样性指数变化,如图5所示.图5中: δ_D 为Simpson生物多样性指数.

由图5可知:丰水期各采样点浮游植物Simpson生物多样性指数为 $0.4896 \sim 0.5879$,平均值为 0.5348 ;枯水期均匀度指数为 $0.5187 \sim 0.6102$,平均值为 0.5675 ;枯水期Simpson生物多样性指数略高于丰水期.

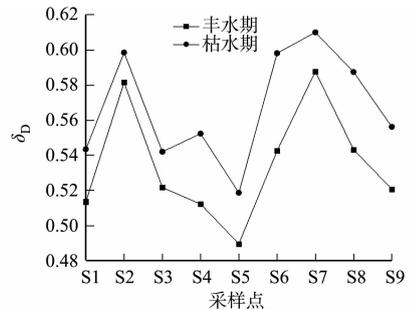


图5 丰水期和枯水期Simpson生物多样性指数变化

Fig. 5 Changes in Simpson biodiversity index during wet and dry periods

2.2 湾滩河丰水期和枯水期浮游植物密度与环境因子关系

湾滩河丰水期和枯水期浮游植物密度及特征指数与环境影响因子的Spearman相关性分析热图,如图6所示.图6中: t 为时间; r 为Spearman相关系数.

由图 6 可知: 丰水期 δ_j 与 pH 值呈显著负相关 ($r = -0.667, p < 0.05$), 枯水期 δ_j 与 w_{DO} ($r = -0.703, P < 0.05$) 呈显著负相关, δ_j 与 w_{TP} 呈显著正相关 ($r = 0.683, P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 湾滩河浮游植物的时空分布特征

丰水期和枯水期的浮游植物物种组成均主要以硅藻-绿藻型为主。丰水期和枯水期浮游植物群落组成差异较小(图 2), 丰水期和枯水期浮游植物优势种类相同。多样性指数和优势种也可用于水体污染程度划分及水质评价^[10-11], 枯水期采样点 S4, S5, S7, S9 的水质类型为清洁-寡污型, 其余采样点在不同水情期的水质类型均为 β -中污型。

从时间尺度分析, 丰水期小颤藻的优势度明显高于其他物种, 丰水期优势度指数明显高于枯水期(表 2), 枯水期浮游植物的多样性指数、均匀度指数普遍高于丰水期, 枯水期 Simpson 生物多样性指数也略高于丰水期。说明在丰水期的浮游植物物种数量分布较不均匀, 生态系统的结构趋于简单化, 而枯水期浮游植物物种数量分布均匀, 异质度较高。此外, 枯水期水温适宜, 有利于浮游植物生长, 使得枯水期的浮游植物密度高于丰水期。

从空间采样点分析, 采样点 S6 浮游植物的多样性指数最低, 采样点 S4 的多样性指数最高; 从各采样点的均匀度指数变化来看, 丰水期采样点 S7 浮游植物的均匀度指数最高, 采样点 S3 最低, 而枯水期采样点 S7 浮游植物的均匀度指数最高, 采样点 S1 最低。采样点 S1 海拔较高; 采样点 S7, S8 与电站水坝距离较远, 受人类活动影响较少, 因此浮游植物密度都较低; 采样点 S3 由于处于干流支流汇合处, 浮游植物密度较高; 采样点 S4, S9 位于湾滩河的支流, 且采样点 S4 位于上游位置, 水流流速较缓、泥沙淤积、营养物质含量增加, 导致浮游植物密度增加。

3.2 湾滩河浮游结构的主要影响因子

相关性分析表明, pH 值、溶解氧(DO)、总磷(TP)、海拔是影响湾滩河浮游植物特征指数变化的关键因子(图 6)。采样点 S4 的浮游植物密度及生物量最高, 采样点 S5 的最低(图 3)。采样点 S4 位于采样点 S5 上游, 入库河流带来部分营养盐和有机质, 导致上游营养盐丰富, 浮游植物群落大量繁殖, 且人口活动相对较密集, 生活污水排入其中, 有机物含量相对高, 为浮游植物的生长提供了一定的营养条件, 有利于部分藻类生长, 因此, 浮游植物的数量和生物量增大; 采样点 S5 人口稀疏、无大型工厂、有机污染少、营养盐含量低、水温相对低, 限制了浮游植物的生长。DO 和 TP 是影响浮游植物均匀度指数变化的主要环境影响因子, 因为藻类生长繁殖过程消耗水体中的 DO, 水体中 DO 质量浓度降低, 浮游植物密度增加, 藻类竞争作用导致 DO 成为关键影响因子^[12-13]; 而高 TP 质量浓度导致部分浮游植物快速增长, 这与张静等^[7]的研究结果一致。此外, 水体 pH 值对浮游植物的组成和分布有一定的影响^[14]。丰水期和枯水期平均 pH 值分别为 7.6 和 7.5, 影响了部分浮游植物的生长, 与浮游植物群落结构变化表现为负相关关系。

浮游植物群落结构不仅受 pH 值、溶解氧(DO)、总磷(TP)等因素的限制, 还受水文条件的影响较大。电站建成后, 库区因为水体变深、增大, 流速减小, 库区河段的水生生态将发生较大的变化。此外, 采样点所处位置附近的电站水坝运行时间为 4~5 a, 生物趋向于适应新的环境, 并与新环境之间达到新的平衡。根据调查结果, 湾滩河流域内浮游植物以硅藻为主, 硅藻属于流水型浮游植物, 库区硅藻数量将减少, 而适宜静水的蓝藻门、绿藻等其他门类的种类将会增加并成为优势种, 生活于急流浅水区的着生藻类将会因水环境的快速改变而消失^[15], 这与朱爱民等^[5]的研究结果一致。因而, 采样点与电站的距离和浮游植物密度呈正相关关系。

此外, 回龙电站、鱼泉电站、中源一级电站、中源二级电站等依次分布于湾滩河的梯级电站, 在各水

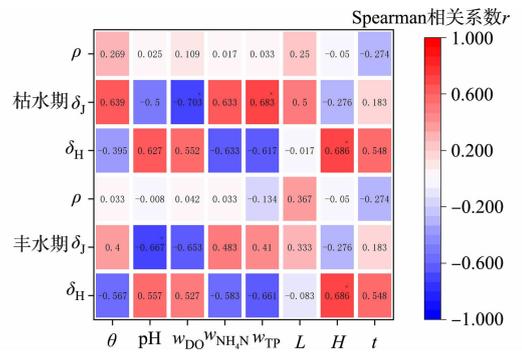


图 6 Spearman 相关性分析热图

Fig. 6 Spearman correlation analysis heat map

电站下游采集的浮游植物样品分析结果表明,虽然各梯级小电站浮游植物丰度存在一定差别,但优势种均相同,且浮游植物组成占比较为相似。浮游植物的生长、繁殖、休眠都在水体中,由于同一河流水系的连续性,即使存在水电站阻隔,同一河流水系水生生物种属来源仍可表现一定的趋同性^[16]。

4 结论

1) 丰水期和枯水期的浮游植物物种组成均主要以蓝藻-硅藻型为主,丰水期共检出浮游植物 7 门 86 种,枯水期共检出浮游植物 7 门 71 种。丰水期和枯水期共有优势种为小颤藻、尖针杆藻、线性舟形藻、简单舟形藻、膨胀桥弯藻、黄群藻、普通水绵。

2) 湾滩河浮游植物具有时空异质性,枯水期的浮游植物密度、多样性指数和均匀度指数均高于丰水期。中源一级电站水坝(S4)浮游植物密度及生物量最高,中源二级电站水坝(S5)浮游植物密度及生物量最低。

3) pH 值、溶解氧(DO)、总磷(TP)、海拔是影响湾滩河浮游植物特征指数变化的关键因子。

参考文献:

- [1] 潘晓洁,刘诚,万成炎,等.三峡水库典型支流河口浮游植物群落与水环境相关性分析[J].水生生态学杂志,2016,37(6):7-13. DOI:10.15928/j.1674-3075.2016.06.002.
- [2] 潘晓洁,刘诚,朱梦灵,等.三峡水库泄、蓄水过程对小江浮游植物群落结构的影响[J].水生生态学杂志,2016,37(3):42-48. DOI:10.15928/j.1674-3075.2016.03.006.
- [3] 朱为菊,庞婉婷,尤庆敏,等.淮河流域春季浮游植物群落结构特征及其水质评价[J].湖泊科学,2017,29(3):637-645. DOI:10.18307/2017.0312.
- [4] 王雪,张虹,林志蓉,等.东张水库夏季浮游植物特征与健康评价[J].福建师范大学学报(自然科学版),2022,38(5):18-25. DOI:10.12046/j.issn.1000-5277.2022.05.003.
- [5] 朱爱民,胡菊香,李嗣新,等.三峡水库长江干流及其支流枯水期浮游植物多样性与水质[J].湖泊科学,2013,25(3):378-385. DOI:10.18307/2013.0311.
- [6] 朱爱民,程郁春,周连凤,等.三峡水库汛期运行对长江干支流浮游植物的影响[J].水生生态学杂志,2018,39(5):22-30. DOI:10.15928/j.1674-3075.2018.05.004.
- [7] 张静,胡愈妍,胡圣,等.长江流域浮游植物群落的环境驱动及生态评价[J/OL].环境科学:1-15(2022-08-01)[2023-02-02]. DOI:10.13227/j.hjxk.202206095.
- [8] 朱永锋,琚珊珊,蔡庆华,等.三峡水库春季浮游植物群落特征及影响因素[J].长江流域资源与环境,2019,28(12):2893-2900. DOI:10.11870/cjlyzyyhj201912010.
- [9] 赵文.水生生物学[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [10] CARLSON R E. A trophic state index for lakes[J]. Limnology and Oceanography, 1977, 22(2):361-369.
- [11] 王明翠,刘雪芹,张建辉.湖泊富营养化评价方法及分级标准[J].中国环境监测,2002(5):47-49. DOI:10.19316/j.issn.1002-6002.2002.05.023.
- [12] 李娜,周绪申,孙博闻,等.白洋淀浮游植物群落的时空变化及其与环境因子的关系[J].湖泊科学,2020,32(3):772-783. DOI:10.18307/2020.0317.
- [13] 白海锋,王怡睿,宋进喜,等.渭河陕西段浮游植物群落结构时空变化与影响因子分析[J].环境科学学报,2021,41(8):3290-3301. DOI:10.13671/j.hjkxxb.2021.0273.
- [14] 杨晓波.白水江流域梯级引水式电站开发对生态环境的主要影响[J].环境保护与循环经济,2022,42(1):71-76. DOI:10.3969/j.issn.1674-1021.
- [15] 林彰文,林生,顾继光,等.浮游植物群落对海南小水电建设的响应[J].生态学报,2013,33(4):1186-1194. DOI:10.5846/stxb201205300790.
- [16] 张琦,陈宇琛,林育青,等.不同水期澜沧江梯级水库浮游植物群落结构空间分布特征[J].环境科学学报,2022,42(12):392-401. DOI:10.13671/j.hjkxxb.2022.0150.

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202406017



鹿茸菇液体菌种培养过程中 生理指标的变化规律

彭汇涵, 于海玲, 王明元, 杨苗, 万雨欣

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 鹿茸菇菌丝采用液体摇瓶培养, 分别测定菌丝生物量、菌丝球数量、菌丝球直径、发酵液 pH 值、还原糖和氨基氮质量浓度, 淀粉酶活性、纤维素酶活性、漆酶活性等生理指标。结果表明: 鹿茸菇培养过程中菌丝生物量和菌丝球数量在第 10 天达到最大值, 分别为 $2.33, 106 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 菌丝球直径随培养时间延长而持续变大; 还原糖与氨基氮质量浓度先增加而后逐渐降低; 淀粉酶及纤维素酶活性最大值分别为 $0.17, 0.10 \text{ nkat}$, 漆酶胞外酶活性呈现明显上升趋势; 摇瓶培养第 8~10 天的液体菌种生物量达到最大 ($0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 液体菌种培养终点应控制在第 8~10 天, 此时菌种活力最高, 可用于发酵罐扩繁培养。

关键词: 鹿茸菇; 液体培养; 还原糖; 胞外酶

中图分类号: S 646

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0667-06

Change Laws of Physiological Indexes of *Lyophyllum decastes* Liquid Strains Cultivation Process

PENG Huihan, YU Hailing, WANG Mingyuan,
YANG Miao, WAN Yuxin

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The mycelia of *Lyophyllum decastes* is cultured in liquid shake flasks. The physiological indexes such as mycelium biomass, the mycelium ball numbers, the mycelium ball diameters, the pH value of fermentation broth, the mass concentrations of reducing sugar and amino nitrogen, the enzymatic activities of amylases, cellulases and laccases are measured separately. The results show that the mycelium biomass and the mycelium ball numbers both reach the maximum values which are $2.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $106 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively on the 10th day. The mycelium ball diameter continues to increase with the extension of cultivation time. The mass concentrations of reducing sugars and amino nitrogen increase firstly and then decrease gradually. The maximum enzyme activities of amylase and cellulase are 0.17 and 0.10 nkat respectively, while the laccase extracellular enzyme activity increases significantly. The biomass of liquid bacterial strains reaches maximum of $0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ on the 8th-10th day in shake flask cultivation, and the end point of the liquid culture should be controlled at the 8th-10th when the activity of the strain is the highest at this time and it can be used for fermenter propagation culture.

Keywords: *Lyophyllum decastes*; liquid culture; reducing sugar; extracellular enzyme

鹿茸菇, 学名荷叶离褶伞(*Lyophyllum decastes*), 又称荷叶蘑, 属伞菌目、白蘑科, 离褶伞属。鹿茸菇菌盖呈现类似鹿茸的形状, 拥有独特的医疗作用与药用价值^[1]。鹿茸菇营养价值极高, 其子实体和菌丝的蛋

收稿日期: 2024-06-17

通信作者: 于海玲(1989-), 女, 讲师, 博士, 主要从事园艺植物栽培与管理的研究。E-mail: yuhl@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省厦门市科技计划项目(3502Z20226030); 福建省星火项目(2021S0036, 2022S0050)

白质质量分数约为20%,28%,脂肪质量分数约为1.5%,3.0%,多糖质量分数约为4.0%,1.8%^[2-4],其中, β 1,3-D葡聚糖、 β 1,6-D葡聚糖^[5]可起到良好的抗菌作用,在治疗糖尿病和特异性皮炎、降低胆固醇、预防肿瘤癌症方面有明显作用^[6],因此,鹿茸菇在当今的市场中有着巨大的发展潜力。

菌种质量会影响菌丝的生长及后续出菇情况,研究食用菌液体培养过程中的生理指标变化规律,可以进一步明确菌种生长过程中的质量变化情况,确定发酵终点,为液体菌种的最佳培育时间提供参考。戴建清^[7]发现双孢蘑菇菌种在培养至第8天时的菌丝生物量、菌丝球直径及菌丝球个数均达到峰值,同时培养液中的各种胞外酶及活性物质质量浓度也达到最高。刘海娟等^[8]发现白灵菇液体发酵菌种最佳培养时间为第5天,从而有效缩短栽培周期。余昌霞等^[9]发现草菇液体菌种培养终点在84~96 h,从而大大缩短了草菇菌种所需的活化时间。殷书平等^[10]发现香菇液体菌种最佳培育时间为8~9 d。但目前,尚未有对鹿茸菇菌种液体培养过程中生理指标变化规律的研究。

以往对于液体菌种发酵终点的研究,将菌丝生物量作为主要衡量指标^[11]。然而,除了菌丝生物量外,还有一些重要的生理指标可表征菌种活力,有研究认为菌丝生物量与菌丝活力之间并没有必然联系,只是反应发酵状态的指标之一^[12]。因此,本文对鹿茸菇液体菌种培养过程中生理指标的变化规律进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌种选择

鹿茸菇菌种由福建省厦门市如意食用菌生物高科技有限公司提供。

1.2 培养基的配置

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:40 g 马铃薯葡萄糖琼脂粉末,加入1 000 mL蒸馏水溶解,在121 ℃,高压下,灭菌20 min,冷却倒平板,备用。

马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)培养基:25 g 马铃薯葡萄糖肉汤,加入1 000 mL蒸馏水溶解,在121 ℃,高压下,灭菌20 min,备用。

1.3 鹿茸菇菌种的活化

将鹿茸菇菌种接种到PDA培养基中,在28 ℃的电热恒温培养箱中培养2周,备用。

1.4 液体培养

取100 mL的PDB培养液于250 mL锥形瓶中,在121 ℃下,灭菌20 min,待培养液冷却后,接种2块菌块(1 cm²活化的PDA菌种)。在24 ℃,180 r·min⁻¹下,振荡培养液,每隔2 d随机取3个锥形瓶检测各项指标。

1.5 菌丝球的测定

取20 mL发酵液于50 mL离心管中,在4 ℃,12 000 r·min⁻¹下离心20 min,蒸馏水洗涤3次沉淀菌丝,在65 ℃下烘干至恒质量。取4 mL培养液于平皿中计数菌丝球数量。取2 mL发酵液,随机选取测量菌丝球最长和最短长度,取平均值记为菌丝球直径。

1.6 发酵液pH值的测定

采用pH计测定发酵液的pH值。

1.7 还原糖及氨基氮质量浓度的测定

采用二硝基水杨酸法(DNS)法测定还原糖质量浓度^[13-14],采用茚三酮法测定氨基氮质量浓度^[15]。

1.8 纤维素酶、淀粉酶、漆酶活性的测定

根据文献^[15-16]测定纤维素酶活性。1个酶活单位为每分钟释放出1 mg葡萄糖需要的酶量。根据文献^[15]中的方法测定淀粉酶活性。1个酶活单位定义为每分钟生成1 μ mol葡萄糖需要的酶量。根据文献^[17]的方法测定漆酶活性。1个酶活单位定义为每分钟内催化氧化1 μ mol 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)需要的酶量。

1.9 菌种活力的测定

将培养时间为2,4,6,8,10,12 d的液体菌种再次进行液体培养,接种量为体积分数4%液体培养基,在24 ℃,180 r·min⁻¹下,振荡培养6 d,取样计算菌丝生物量及菌丝球数量。

2 实验结果与分析

2.1 菌丝球的变化情况

不同培养时间鹿茸菇菌丝球变化情况,如图1所示。图1中: ρ 为菌丝生物量; n 为菌丝球数量; D 为菌丝球直径。由图1可知:在培养过程前6d中,菌丝生物量增加缓慢,第6~10天鹿茸菇菌丝生物量增长加快,第10~12天菌丝生物量增长趋于稳定,菌丝生物量达到最高峰值(环境峰值, $2.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);在培养过程中,菌丝球数量稳步增长,第10天达到最大值为 $106 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,与菌丝生物量变化一致,第10天后营养成分减少,菌丝活性下降,菌丝球数量减少;菌丝球直径持续增加,前8d增长较为缓慢,第8~10天增长迅速,在后期菌丝球边缘出现明显绒毛,第12天达到最大值为 5.84 mm ,菌丝球表面呈现光滑状态。

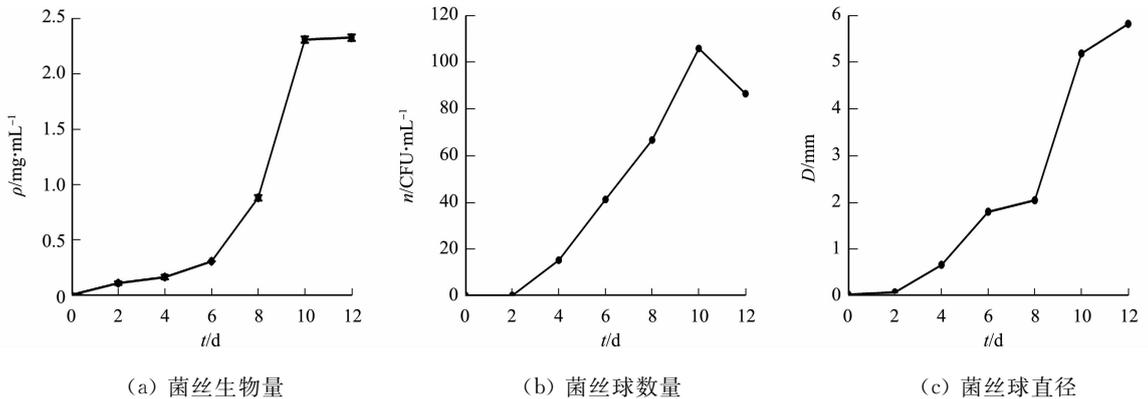


图1 不同培养时间鹿茸菇菌丝球变化情况

Fig. 1 Change situation of *Lyophyllum decastes* mycelium ball at different culture times

2.2 不同培养时间菌液 pH 值的变化情况

菌液 pH 值会随着菌丝的生长而变化,影响菌丝胞外酶活性及细胞膜内外电位差,从而影响培养液中的营养物质吸收。不同培养时间鹿茸菇培养液 pH 值的变化情况,如图2所示。由图2可知:由于菌丝生长分解葡萄糖,使丙酮酸迅速积累,pH 值在第0~2天呈现下降趋势;而后菌丝产生代谢生成碱性物质,pH 值在第2~6天小幅回升;酸性代谢物质在培养液中持续累积,pH 值在第6~10天下降至最低值1.93;第10天后,菌丝生长步入平缓,还原糖消耗,部分老化菌丝自溶后释放氨基酸等碱性物质,pH 值出现上升趋势。

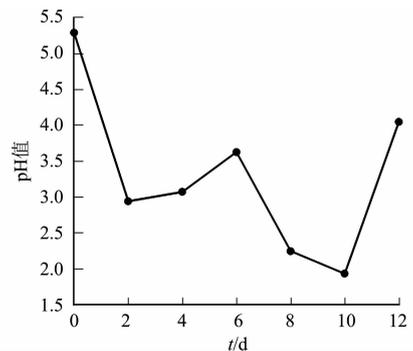


图2 不同培养时间鹿茸菇培养液 pH 值的变化情况

Fig. 2 Change situation of pH values of *Lyophyllum decastes* culture liquid at different culture times

2.3 还原糖及氨基氮质量浓度变化情况

还原糖与氨基氮质量浓度变化曲线,如图3所示。图3中: ρ_r 、 ρ_n 分别为还原糖、氨基酸的质量浓度。

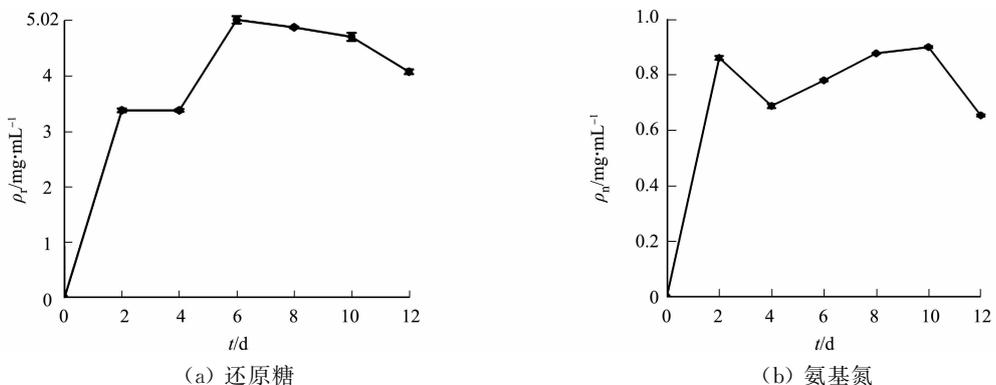


图3 还原糖与氨基氮质量浓度变化曲线

Fig. 3 Change curves of reducing sugar and amino nitrogen mass concentrations

由图3可知:鹿茸菇菌液中还原糖质量浓度在第0~6天呈上升趋势,第6天达到峰值 $5.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;鹿茸菇菌液中氨基氮质量浓度在第2~4天呈下降趋势,随着菌丝生长,胞外酶分泌增多,培养基内氮源生成大于消耗,呈上升趋势,在第10天达峰值 $0.89 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,后再次下降;第10天后,鹿茸菇菌丝生物量达到最大开始趋于平缓,不断消耗培养基内大量含氮物质,氨基氮质量浓度呈下降趋势。

2.4 不同培养时间菌液中胞外酶活性变化情况

在培养过程中,胞外酶会将基料中的营养成分转化为自身的物质,胞外酶活力的高低决定着鹿茸菇对培养基料中物质的降解速率。不同培养时间鹿茸菇菌液中胞外酶活性变化情况,如图4所示。图4中: z_a 为淀粉酶活性; z_c 为纤维素酶活性; z_l 为漆酶活性。由图4可知:淀粉酶与纤维素酶活性均呈先上升后下降趋势,淀粉酶活性于第6天达到峰值 0.17 nkat ;纤维素酶于第10天达到峰值 0.10 nkat ;漆酶在培养过程时间内,整体一直处于较快的上升趋势,第0~6天增长缓慢,第6~10天增长迅速,第10~12天相对趋于稳定。

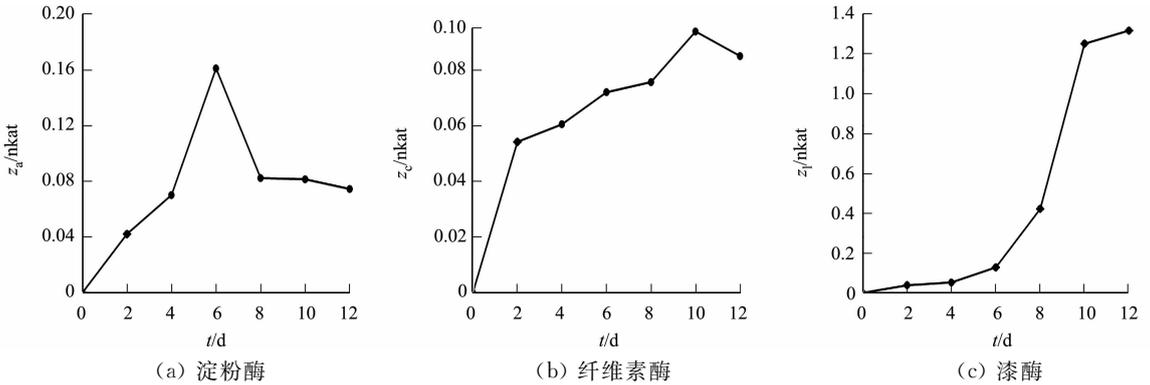


图4 不同培养时间鹿茸菇菌液中胞外酶活性变化曲线

Fig. 4 Curves of extracellular enzyme activities change of

Lyophyllum decastes bacterial liquid at different culture times

2.5 不同培养时间液体菌种活力验证

为进一步探究鹿茸菇液体菌种最佳培养时间,将培养时间为2,4,6,8,10,12 d的液体菌种再次进行为期12 d的液体培养,不同培养时间菌丝生物量与菌丝球数量,如图5所示。

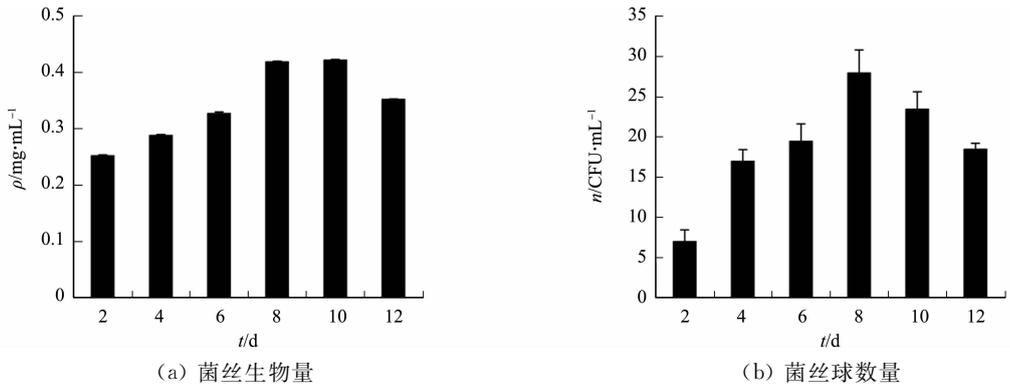


图5 不同培养时间菌丝生物量与菌丝球数量

Fig. 5 Mycelium biomass and mycelium ball numbers at different culture times

由图5可知:液体菌种再次培养8,10 d的得到的菌丝生物量最大,分别为 $0.41, 0.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与液体菌种培养2,4,6,12 d得到的菌丝生物量的差异有统计学意义($P < 0.05$);第8天的液体菌种再次培养得到的菌丝球数量最大,为 $28 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,与液体菌种培养2,4,6,8,10,12 d得到菌丝生物量的差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此,在液体培养第8~10天的鹿茸菇菌种更适宜作为发酵罐工厂化培养的种源。

3 结论

在鹿茸菇液体培养过程中,当培养第0~3天时,由于菌种需要适应新的生长环境,其菌丝生物量(图1

(a)、菌丝球数量(图 1(b))及菌丝球直径(图 1(c))没有明显增长,此结果与余昌霞等^[9]对草菇、伍晋雨^[18]对灵芝与金针菇的研究结果一致。在培养中后期,菌丝生物量、菌丝球数量、菌丝球直径、氨基氮质量浓度(图 3(b))等生理指标在培养第 10 天均达到峰值。随着培养液中营养成分的减少及菌丝开始老化和菌丝活性减弱,其生理指标开始逐渐下降,到第 12 天,菌丝普遍老化,并产生自溶现象,此结果与殷书平^[10]研究的香菇理化指标变化趋势相似,第 8~10 天的鹿茸菇菌丝活力最高,此结果与单灿灿等^[19]对鹿茸菇菌种活力的研究结果一致。在整个培养过程中,菌丝生物量,菌丝球数量及菌丝球直径在培养的时间为第 0~10 天均处于稳定上升状态,第 10 天之后开始维持稳定甚至有所下降,由此预测鹿茸菇菌丝最适宜接种并进行下一步培养的时间约为第 8~10 天。

在液体培养及生理指标检测中,培养初期,胞外酶尚未分泌,菌丝增长缓慢,培养中期,菌丝生长逐渐旺盛,还原糖质量浓度变化呈现升高趋势,在第 6 天达到峰值,此时由于菌丝大量繁殖,致使培养基中环境承载量即将达到饱和,菌丝对于碳源的利用逐渐大于产出,形成还原糖质量浓度下降趋势。培养液 pH 值在整个培育过程中的变化趋势整体呈现先降低、后升高的趋势,在无人为干扰情况下,鹿茸菇菌丝在生长过程中通过代谢调节环境 pH 值,此过程在段应策等^[20]测定香菇最适生长 pH 值实验中得到相似验证,在培养第 10~12 天时,由于菌丝老化,停止生长繁殖,代谢减缓并开始自溶释放胞内氨基酸等物质,培养液 pH 值呈现一段上升趋势。胞外酶会将培养基中的营养成分转化为自身需要的物质,胞外酶的酶活性大小影响着其对培养基成分的降解速率,同时也影响着鹿茸菇对营养物质的吸收率。在培养过程中,鹿茸菇中漆酶的酶活性相较于淀粉酶及纤维素酶的酶活性变化非常明显(图 4),在第 10 天时达到快速增长巅峰,随后缓慢变化增加。漆酶是降解木质素大分子物质的主要酚氧化酶,能加速木质素芳香族高分子化合物的分解,提供菌丝所需的营养,漆酶酶活性越高,菌株分解木质素的能力越强^[21]。鹿茸菇的漆酶酶活性较另外两种胞外酶变化更加明显,因此,漆酶在鹿茸菇胞外酶中具有较高酶活。牛鑫等^[22]在鹿茸菇漆酶基因测定中也同样得出此结论,并从基因方面对此进行进一步验证。由于漆酶分解木质素会提供菌丝生长的部分能量,使纤维素酶及淀粉酶变化幅度不高。纤维素酶及淀粉酶的微小变化趋势与戴建清^[7]研究的双孢蘑菇的胞外酶变化趋势具有相似性。

在菌种活力验证方面,将培养不同时间的菌种进行二次培养,结果表明,再次培养的第 8,10 天鹿茸菇菌种生物量达到最大,分别为 0.41,0.42 mg·mL⁻¹。柯丽娜等^[23]研究证明杏鲍菇工厂化最适合发酵种为培养第 10 天的菌种,与文中鹿茸菇的最佳发酵菌种时间相近,表明培养第 8~10 天的菌种进行二次发酵,更有利于提升发酵水平,有利于鹿茸菇工厂化阶段的菌种繁育,可为鹿茸菇工厂化生产液体菌种扩繁提供重要参考。

参考文献:

- [1] 王碧卿. 鹿茸菇的栽培现状与营养保健价值[J]. 食品安全导刊,2023(6):104-106. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2023.06.067.
- [2] GÜLSENTEL M, OZTURK M, DURU A. Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents [J]. Pharmaceutical Biology, 2015, 53(6): 824-830. DOI:10.3109/13880209.2014.943245.
- [3] 席亚丽, 茆爱丽, 王晓琴, 等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体及发酵液蛋白质营养价值评价[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 603-607. DOI:10.13346/j.mycosystema.2010.04.023.
- [4] 张凤培, 徐慧, 邱绍峰, 等. 鹿茸菇多糖抗氧化保肝研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(11): 92-100. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0891.
- [5] CLELAND C L. Integrating recent advances in neuroscience into undergraduate neuroscience and physiology courses[J]. Advances in Physiology Education, 2002, 26: 271-277. DOI:10.1152/advan.00044.2002.
- [6] UKAWA Y, ITO H, HISAMATSU M. Antitumor effects of (1→3)-βD-glucan and (1→6)-βD-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lycophyllum decastes* Sing.) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(1): 98-104. DOI:10.1016/s1389-1723(00)80041-9.
- [7] 戴建清. 双孢蘑菇 W192 液体菌种摇瓶培养过程中的生理生化分析[J]. 福建农业学报, 2021, 36(2): 182-187. DOI:10.19303/j.issn.1008-0384.2021.02.007.
- [8] 刘海娟, 刘利娟, 郑素月, 等. 白灵菇液体发酵条件优化[J]. 北方园艺, 2021(18): 125-131. DOI:10.11937/bfy.

20210531.

- [9] 余昌霞,陈明杰,李正鹏,等. 草菇 9715 液体菌种培养过程的生理变化及培养终点[J]. 微生物学通报,2020,47(2):665-672. DOI:10.13344/j.microbiol.china.190261.
- [10] 殷书平,程贤利,陈文强. 香菇液体发酵过程中生理指标的检测分析[J]. 北方园艺,2016(8):142-144. DOI:10.11937/bfy.20160839.
- [11] 任亚倩,庄孟颖,刘兴健,等. 绣球菌双向液体发酵条件优化及其菌丝体多糖抗氧化活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2022,50(12):146-154. DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.12.016.
- [12] 王逸初,白妍,贺晓龙,等. 北虫草液体菌种培养基优化及胞外多糖抗氧化性初探[J]. 延安大学学报(自然科学版),2024,43(1):1-7. DOI:10.13876/J.cnki.ydnse.230114.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry,1959,31(3):426-428. DOI:10.1007/s00216-022-04312-z.
- [14] WOOD I P,ELLISTON A,RYDEN P,*et al.* Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay[J]. Biomass and Bioenergy,2012,44:117-121. DOI:10.1016/j.biombioe.2012.05.003.
- [15] 揭广川,陈红杰,李必金. 微波辅助复合酶法提取草菇中的风味物质[J]. 食品与机械,2015,31(1):164-166,243. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2015.01.038.
- [16] 王玉万,王云. 构菌栽培过程中对木质纤维素的降解和几种多糖分解酶活性的变化[J]. 微生物学通报,1989,16(13):137-140,187. DOI:10.13344/j.microbiol.china.1989.03.004.
- [17] YU Hailong,XU Yuqin,NI Yonghao,*et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose from waste paper fibers by cationic polymers addition[J]. Carbohydrate Polymers,2018,200:248-254. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.07.079.
- [18] 伍晋雨. 灵芝与金针菇液态单培养和共培养中胞外多糖的比较研究[D]. 厦门:厦门大学,2020. DOI:10.27424/d.cnki.gxmd.2020.004094.
- [19] 单灿灿,叶典章,郭宇,等. 响应面法优化鹿茸菇液体菌种发酵配方[J]. 福建农业学报,2023,38(6):723-731. DOI:10.19303/j.issn.1008-0384.2023.06.011.
- [20] 段应策,胡姿仪,杨帆,等. pH 和缓冲作用对香菇菌丝生长的影响[J]. 中国农业科学,2020,53(22):4683-4690. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2020.22.014.
- [21] 吉军,张玉璠,肖鑫,等. 白假鬼伞漆酶基因家族鉴定及表达模式[J]. 植物生理学报,2023,59(11):2027-2038. DOI:10.13592/j.cnki.ppj.100641.
- [22] 牛鑫,梁倩倩,宋利茹,等. 荷叶离褶伞漆酶的基因预测及其生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2021,40(增刊1):2232-2243. DOI:10.13417/j.gab.040.002232.
- [23] 柯丽娜,袁烽,陈炎腾,等. 液体菌种栽培杏鲍菇不同后熟期对菌丝生长和产量的影响[J]. 福建农业科技,2023,54(4):48-51. DOI:10.13651/j.cnki.fjnykj.2023.04.007.

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202407046



不同干燥方式对鹿茸菇品质的影响

于海玲, 汪依霓, 万雨欣, 杨苗, 彭汇涵, 王明元, 刘建福

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探究不同干燥方式对鹿茸菇品质的影响,以新鲜鹿茸菇为原料,分别采用热风干燥、微波干燥及真空冷冻干燥 3 种方式,对处理后的鹿茸菇外观、营养成分质量分数、抗氧化活性和复水特性进行检测。结果表明:不同干燥方式对鹿茸菇外观及营养成分质量分数的影响不同,真空冷冻干燥能较好地保持样品外观,热风干燥次之,微波干燥对鹿茸菇外观影响最大;3 种干燥方式中,真空冷冻干燥鹿茸菇的多糖与蛋白质质量分数高于其他两种干燥方式,而热风干燥鹿茸菇的粗纤维和脂肪质量分数较高,微波干燥鹿茸菇菌盖的总酚和总黄酮质量分数最高,分别为 $4.95, 7.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;干燥后鹿茸菇酚类物质具有较强的清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的能力,各处理组间的复水比呈现显著差异;真空冷冻干燥鹿茸菇干品的各项指标最佳,为较优干燥方式。

关键词: 鹿茸菇; 干燥方式; 营养成分; 复水特性

中图分类号: S 646.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0673-08

Effect of Different Drying Methods on Quality of *Lyophyllum decastes*

YU Hailing, WANG Yini, WAN Yuxin, YANG Miao,
PENG Huihan, WANG Mingyuan, LIU Jianfu

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To explore the effects of different drying techniques on the quality of *Lyophyllum decastes*, fresh *Lyophyllum decastes* was used as starting material, and three methods including hot air drying, microwave drying and vacuum freeze-drying were used to test the appearance, mass fraction of nutrient component, antioxidant activity and rehydration properties of *Lyophyllum decastes* after treatment. The results showed that different drying methods had different effects on the appearance and mass fraction of nutrient component of *Lyophyllum decastes*. Vacuum freeze-drying could better maintain the appearance of the sample, followed by hot air drying, and microwave drying had the most impact on the appearance of *Lyophyllum decastes*. Among the three drying methods, the mass fractions of polysaccharide and protein of vacuum freeze-dried *Lyophyllum decastes* were higher than those by the other two drying methods, while the mass fractions of crude fiber and fat of hot air dried *Lyophyllum decastes* were higher, and the mass fractions of total phenolic and total flavonoid of microwave dried *Lyophyllum decastes* caps were the highest at 4.95 and $7.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. After drying, the phenolic substances of *Lyophyllum decastes* had strong ability to scavenge DPPH free radicals and ABTS free radicals, and the rehydration ratios between each treatment group showed significant

收稿日期: 2024-07-30

通信作者: 于海玲(1989-),女,讲师,博士,主要从事草地生态学、园艺植物栽培与管理的研究。E-mail: yuhl@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省星火项目(2021S0036, 2022S0050); 福建省厦门市科技计划项目(3502Z20226030)

differences. The vacuum freeze drying of dried *Lyophyllum decastes* had the best indicators and was the preferred drying method.

Keywords: *Lyophyllum decastes*; drying method; nutrient component; rehydration property

鹿茸菇(*Lyophyllum decastes*)是一种食药兼用的大型真菌,因其切片外表与中国名贵中药材鹿茸的外表相似而得名。鹿茸菇营养丰富,无论菌丝体或子实体,均具有较高的营养价值^[1]。鹿茸菇含有大量的多糖、多酚、蛋白质和膳食纤维^[2],这些营养元素具有保持白血球活力、提高免疫力、改善高血压、抗肿瘤、防止组织老化等功效^[3-4]。此外,鹿茸菇含有丰富矿物质及人体所需的维生素B族、微量元素,必需氨基酸在氨基酸总量中的占比最高达到40%,有着广阔的生物医药开发和保健食品应用前景^[5-6]。

我国鹿茸菇的种植区域主要集中在江苏、云南、新疆、内蒙古、辽宁、黑龙江等地区^[7],工厂化栽培基地主要集中在江苏和山东。目前,我国鹿茸菇年产量约32万t,具有广阔的开发前景。新鲜采摘的鹿茸菇容易腐烂,贮藏时间较短。干燥是食用菌加工方式里极为重要的一步,它能够有效地降低食用菌的含水率,显著地延长食用菌的货架期。将鹿茸菇制成干品可以延长货架期,提高鹿茸菇的附加值,助力产业升级。不同的干燥方法会对食用菌干制后的外观(色泽、形态)、味道(香气、风味)及营养成分质量分数产生不同的影响。因此,选择适宜的干燥方法对减少食用菌营养成分损失尤为重要。虽然鹿茸菇目前已经工厂化生产,但有关干燥工艺对鹿茸菇的品质研究还有待补充。基于此,本文采用热风干燥、微波干燥及真空冷冻干燥3种方式对新鲜鹿茸菇进行处理,探究不同干燥方式对鹿茸菇外观及营养成分质量分数的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜鹿茸菇由福建省厦门市如意食用菌生物高科技有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 将新鲜鹿茸菇的菌柄与菌盖切分开,其中,菌柄切成20 mm小段备用。

热风干燥:将鹿茸菇样品置于电热鼓风干燥箱内,65℃加热烘干,直至质量无明显变化。

微波干燥:将鹿茸菇样品置于微波炉,加热,使样品表面焦黄后,取出,短暂多次加热,直至质量无明显变化。

真空冷冻干燥:将鹿茸菇样品置于超低温冰箱中,-80℃冷冻24 h,冷冻后放入冷冻干燥机,干燥12 h后称质量,再次放入冷冻干燥机,多次测定直至质量无明显变化。

1.2.2 鹿茸菇营养成分质量分数的测定 根据NYT 1676-2008《食用菌中多糖含量的测定》中的苯酚-硫酸法,测定鹿茸菇中的多糖质量分数。根据GB 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中的分光光度法,测定鹿茸菇中的蛋白质质量分数。根据GB 5009.6-2016《食品安全国家标准食品中脂肪的测定》中的索氏抽提法,测定鹿茸菇中的脂肪质量分数。根据GB 5009.10-2003《植物类食品中粗纤维的测定》中的酸碱法,测定鹿茸菇中的粗纤维质量分数。对文献[8]的方法稍做改进,测定鹿茸菇中总酚及总黄酮质量分数。

1.2.3 鹿茸菇水提物抗氧化能力的测定 取2 mL的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基溶液与2 mL鹿茸菇样品溶液(0.5~50.0 μg·mL⁻¹)混匀,采取紫外分光光度法测定其吸光度,并用体积分数为95%的乙醇溶液作为对照组重复实验。

DPPH自由基清除率(η (DPPH))为

$$\eta(\text{DPPH}) = \left(1 - \frac{D_1 - D_2}{D_0}\right) \times 100\%$$

上式中: D_1 为样品组吸光度; D_2 为对照组吸光度; D_0 为空白组吸光度。

取0.1 mL鹿茸菇样品溶液与2.9 mL的2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)自由基溶液混匀后测吸光度,空白组为乙醇(体积分数为95%)替代样品液。

ABTS自由基清除率(η (ABTS))为

$$\eta(\text{ABTS}) = \left(1 - \frac{D_1}{D_0}\right) \times 100\%。$$

1.2.4 鹿茸菇复水能力及复水浸泡液中营养物质的测定 取完整的鹿茸菇干制品置于温度为 45 ℃ 的蒸馏水(料液比为 1 : 40)中。恒温水浴,每隔 10 min 取出,并沥干水份 1 min,直至质量无明显变化后,复水完成。

复水比(R)的计算公式为

$$R = \frac{m_1}{m_2}。$$

上式中: m_1 为复水后鹿茸菇的质量,g; m_2 为鹿茸菇干制品的质量,g。

复水浸泡液中多糖质量分数的测定参考文献[8]的苯酚-硫酸比色法。分别称取 3 种鹿茸菇浸泡液各 1.0 g 左右,按照节 1.2.2 的方法,测定鹿茸菇复水浸泡液中蛋白质的质量分数。

1.2.5 数据分析 不同干燥方式处理后鹿茸菇营养成分质量分数差异采用单因素方差分析进行比较,多重比较方法采用最小显著差异(LSD)法。

采用 Origin Pro 2021 软件进行制图,采用 SPSS Statistics 26 软件进行数据统计分析,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 实验结果与分析

2.1 不同干燥方式对鹿茸菇外观品质的影响

不同干燥方式处理后鹿茸菇外观及复水后外观变化,如图 1 所示。



图 1 不同干燥方式处理后鹿茸菇外观变化

Fig. 1 Appearance changes of *Lyophyllum decastes* after treatment with different drying methods

由图1可知:经过不同方式干燥后,鹿茸菇的体积明显缩小,表面颜色加深,同时也出现了皱缩;真空冷冻干燥鹿茸菇的体积变化最小,表面颜色最浅(图1(c),1(f)),热风干燥鹿茸菇表面出现了大量皱缩(图1(a),图1(d)),微波干燥鹿茸菇表面颜色最深(图1(b),图1(e));经过真空冷冻干燥后,新鲜鹿茸菇的形状和体积几乎无变化,可能是因为干燥过程中,鹿茸菇中的水分直接升华散失而不破坏其多孔结构,由于没有经过高温加工,鹿茸菇的表面质构所受影响较小。热风干燥鹿茸菇表面的干缩程度大于微波干燥鹿茸菇和真空冷冻干燥鹿茸菇,这可能是由于长时间的高温加工,对鹿茸菇的质构有较大的影响。

2.2 不同干燥方式对鹿茸菇含水率的影响

经过3种干燥方式处理后,鹿茸菇菌盖含水率的差异并不明显,鹿茸菇菌柄含水率则存在一定差异。不同干燥方式处理后鹿茸菇的含水率(δ),如表1所示。

由表1可知:3种干燥方式中,热风干燥和微波干燥同属于高温干燥,在高温环境中,水分蒸发速度较快,整体干燥效率较高,故热风干燥和微波干燥的菌柄含水率小于真空冻干干燥菌柄。

此外,在高温干燥过程中,物料内部的水分都会经过物料表面蒸发,而长时间的高温处理,会使物料表面产生不同程度的结壳和硬化现象,影响干燥效率,故相同干燥条件下,物料形状的大小会对干燥效率产生一定影响,切碎后的菌柄含水率会明显小于菌盖含水率。

表1 不同干燥方式处理后鹿茸菇的含水率

Tab. 1 Moisture content of *Lyophyllum decastes* after treatment with different drying methods

干燥方式	δ (菌柄)/%	δ (菌盖)/%
热风干燥	10.72±1.01	11.60±0.78
微波干燥	11.17±0.89	11.91±2.03
真空冷冻干燥	11.90±1.22	11.47±1.31

2.3 不同干燥方式对鹿茸菇多糖及蛋白质质量分数的影响

不同干燥方式对鹿茸菇多糖和蛋白质质量分数的影响,如图2所示。图2中:不同大写字母表示不同干燥方式处理菌柄的差异性;不同小写字母表示不同干燥方式处理菌盖的差异性($P<0.05$); w 为质量分数。

由图2可知以下2个结论。

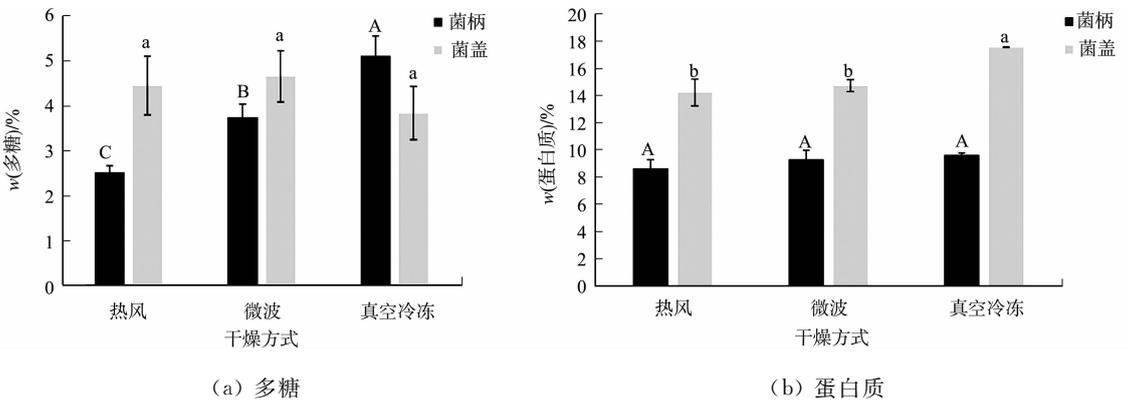


图2 不同干燥方式对鹿茸菇多糖和蛋白质质量分数的影响

Fig. 2 Effects of different drying methods on mass fraction of polysaccharide and protein of *Lyophyllum decastes*

1) 采用3种干燥方式处理鹿茸菇菌柄及菌盖,其多糖质量分数为2.52%~5.11%,且菌盖中的多糖质量分数高于菌柄;热风干燥鹿茸菇菌柄中的多糖质量分数最低,仅为2.52%,说明热风干燥对鹿茸菇中多糖的破坏最大;真空冷冻干燥鹿茸菇菌柄中多糖质量分数最高,达到5.11%;微波干燥鹿茸菇菌柄的多糖质量分数高于热风干燥鹿茸菇菌柄,但低于真空冷冻干燥鹿茸菇菌柄。

2) 不同干燥方式处理下,鹿茸菇菌柄与菌盖的蛋白质质量分数均具有明显差异,菌盖的蛋白质质量分数显著高于菌柄的蛋白质质量分数;3种干燥方式对鹿茸菇蛋白质质量分数影响并不大,不同干燥处理下,菌柄中蛋白质质量分数未表现出明显差异,真空冷冻干燥鹿茸菇菌盖具有较高的蛋白质质量分数,可得17.54%,显著高于热风干燥鹿茸菇菌盖和微波干燥鹿茸菇菌盖。

2.4 不同干燥方式对鹿茸菇脂肪质量分数的影响

不同干燥方式对鹿茸菇脂肪质量分数的影响,如图 3 所示。

由图 3 可知:不同干燥方式下,鹿茸菇脂肪的质量分数为 9.3%~16.5%,且菌盖中的脂肪质量分数均大于菌柄中的脂肪质量分数;热风干燥鹿茸菇的菌盖和菌柄中脂肪质量分数差异不显著,但和另外两种干燥方式相比,其脂肪质量分数最高;微波干燥和真空冷冻干燥下,鹿茸菇菌盖和菌柄的脂肪质量分数具有明显差异,但鹿茸菇相同部位的微波干燥与真空冷冻干燥的差异不显著。

2.5 不同干燥方式对鹿茸菇粗纤维质量分数的影响

不同干燥方式对鹿茸菇粗纤维质量分数的影响,如图 4 所示。

由图 4 可知:不同干燥方式下,鹿茸菇粗纤维质量分数为 2.07%~6.14%;热风干燥鹿茸菇菌柄和菌盖中的粗纤维质量分数均高于其他干燥方式处理下的菌柄和菌盖,真空冷冻干燥鹿茸菇菌盖中的粗纤维质量分数显著低于其他处理组。

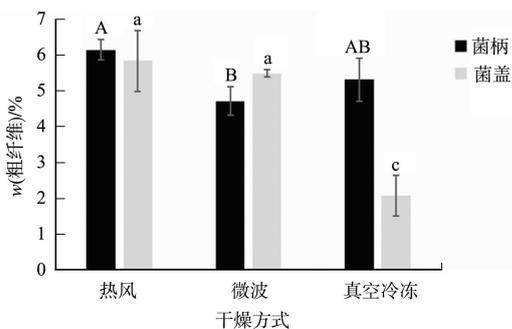
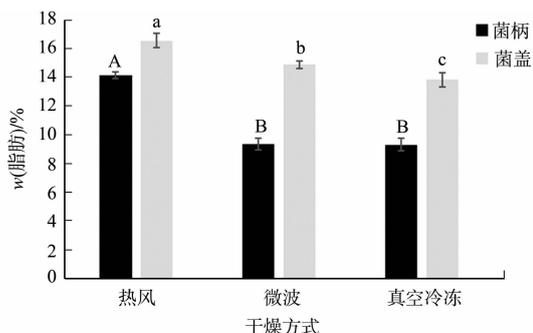


图 3 不同干燥方式对鹿茸菇脂肪质量分数的影响

图 4 不同干燥方式对鹿茸菇粗纤维质量分数的影响

Fig. 3 Effects of different drying methods on mass fraction of fat of *Lyophyllum decastes*

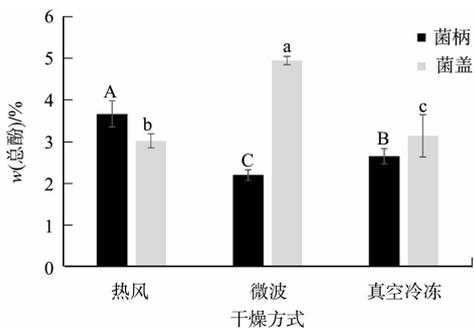
Fig. 4 Effects of different drying methods on mass fraction of crude fiber of *Lyophyllum decastes*

2.6 不同干燥方式对鹿茸菇总酚及总黄酮质量分数的影响

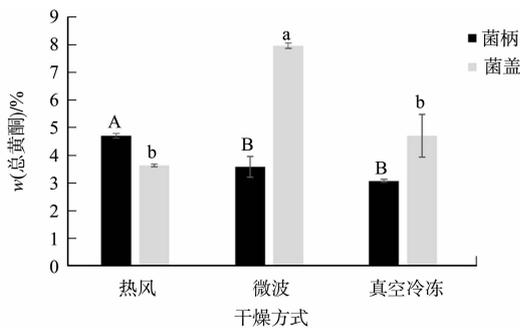
不同干燥方式对鹿茸菇总酚和总黄酮质量分数的影响,如图 5 所示。

由图 5(a)可知:在热风、微波和真空冷冻干燥下,鹿茸菇相同部位中的总酚质量分数呈现显著差异;总酚质量分数最高的是微波干燥的鹿茸菇菌盖,其次是热风干燥的菌柄,而真空冷冻干燥下,鹿茸菇菌柄和菌盖的总酚质量分数也不低。

由图 5(b)可知:不同干燥方式下,总黄酮质量分数为 3.07%~7.96%;在热风、微波和真空冷冻 3 种不同的干燥方式处理下,鹿茸菇总黄酮质量分数呈现显著差异,微波干燥鹿茸菇菌盖的总黄酮质量分数最高;不同干燥方式对鹿茸菇总黄酮质量分数的影响与不同干燥方式对鹿茸菇总酚质量分数的影响呈现相似的趋势变化。



(a) 总酚



(b) 总黄酮

图 5 不同干燥方式对鹿茸菇总酚和总黄酮质量分数的影响

Fig. 5 Effects of different drying methods on mass fraction of total phenols and total flavonoids of *Lyophyllum decastes*

2.7 鹿茸菇抗氧化能力分析

2.7.1 DPPH 自由基清除能力分析 鹿茸菇酚类物质对 DPPH 自由基的清除率,如图 6 所示。图 6

中: ρ 为酚类物质的质量浓度。

由图 6 可知:当酚类物质的质量浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,维生素 C(Vc)对 DPPH 自由基的清除率达到 96.01%,鹿茸菇对 DPPH 自由基的清除率随着酚类物质质量浓度的增加而逐渐升高;当酚类物质质量浓度为 $25 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,曲线的起伏变化不大,说明此阶段对 DPPH 自由基的清除率基本不变;当酚类物质的质量浓度较低时,热风干燥菌柄对 DPPH 自由基的清除能力最弱,当酚类物质的质量浓度达到 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,真空冷冻干燥菌柄对 DPPH 自由基的清除率最低,清除率仅为 67.13%,而其他处理组对 DPPH 自由基的清除率均达到 73% 以上。

不同干燥方式下鹿茸菇的抗氧化活性,如表 2 所示。表 2 中:采用半数有效浓度(EC_{50})来表征鹿茸菇的抗氧化活性。

由表 2 可知:不同处理组的 EC_{50} 的差异较小;微波干燥菌盖的 EC_{50} 最大,为 $(42.96 \pm 1.84) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,真空冷冻干燥菌盖的 EC_{50} 最小,为 $(2.16 \pm 2.91) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 2 不同干燥方式下鹿茸菇的抗氧化活性

Tab. 2 Antioxidant activity of *Lyophyllum decastes* under different drying methods

处理组	$\text{EC}_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	DPPH	ABTS
热风干燥菌柄	5.75 ± 0.09	7.91 ± 0.94
热风干燥菌盖	5.17 ± 0.26	8.28 ± 1.55
微波干燥菌柄	4.60 ± 0.18	11.24 ± 2.10
微波干燥菌盖	6.57 ± 0.23	42.96 ± 1.84
真空冷冻干燥菌柄	5.01 ± 2.78	8.67 ± 0.55
真空冷冻干燥菌盖	2.16 ± 2.91	15.09 ± 11.35

2.7.2 ABTS 自由基清除能力分析 鹿茸菇酚类物质对 ABTS 自由基的清除率,如图 7 所示。

由图 7 可知:当酚类物质的质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,Vc 对 ABTS 自由基的清除率达 99%,清除率随酚类物质质量浓度增加而升高;当酚类物质的质量浓度较低时,真空冷冻干燥菌盖对 ABTS 自由基的清除能力最弱;当酚类物质质量浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,微波干燥和真空冷冻干燥菌盖的清除能力较弱,清除率分别为 63.78%,67.74%,而其他处理组的清除率均达到 84% 以上。

由表 2 还可知:微波干燥菌盖的 EC_{50} 最大,为 $(42.96 \pm 1.84) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,热风干燥菌盖的 EC_{50} 最小,为 $(8.28 \pm 1.55) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.8 鹿茸菇复水特性分析

不同干燥方式处理后鹿茸菇复水比,如图 8 所示。由图 8 可知:真空冷冻干燥鹿茸菇的复水比最大(4.0),微波干燥次之,热风干燥最差(2.1)。

不同干燥方式鹿茸菇复水后多糖和蛋白质的溶出量,如图 9 所示。由图 9 可知:微波干燥和真空冷冻干燥鹿茸菇在复水时溶出的多糖质量分数表现显著性差异,分别为 0.12%,0.14%,但与热风干燥鹿茸菇复水时溶出的多糖质量分数无显著性差异;不同干燥方式鹿茸菇复水后蛋白质的溶出量呈现显著差异,微波干燥鹿茸菇复水时溶出的蛋白质质量分数较低,其次是真空冷冻干燥鹿茸菇,热风干燥鹿茸菇复水后的溶出蛋白质质量分数最高。

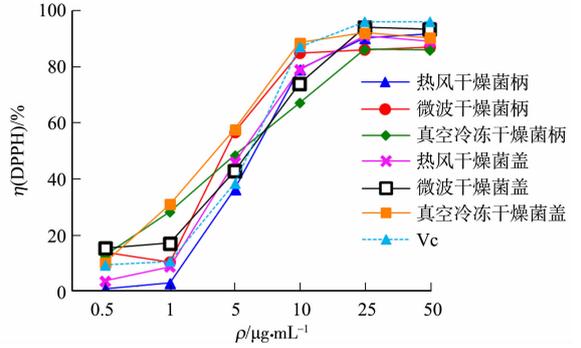


图 6 鹿茸菇酚类物质对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 6 DPPH free radical scavenging rate by phenolic substances of *Lyophyllum decastes*

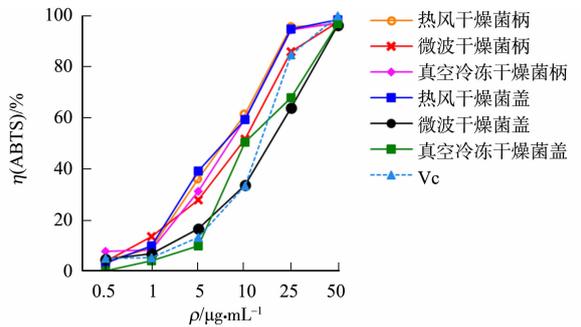


图 7 鹿茸菇酚类物质对 ABTS 自由基的清除率

Fig. 7 ABTS free radical scavenging rate by phenolic substances of *Lyophyllum decastes*

3 讨论

食用菌干燥技术主要分为传统干燥、新型干燥和联合干燥 3 类^[9]。其中,传统干燥又分为自然干燥和热风干燥,具有操作简单和可大批量生产的优点。自然干燥的缺点体现在干燥过程不易控制、卫生条件差等。因此,自然干燥在实际生产中应用较少^[10]。热风干燥基于热量传递系统,使热风在干燥室内产生对流,提高物料表面温度,使物料水分蒸发,达到干燥的目的^[11-12]。研究表明,热风干燥对多糖和蛋白质的破坏最大,可能因为较高的温度会引

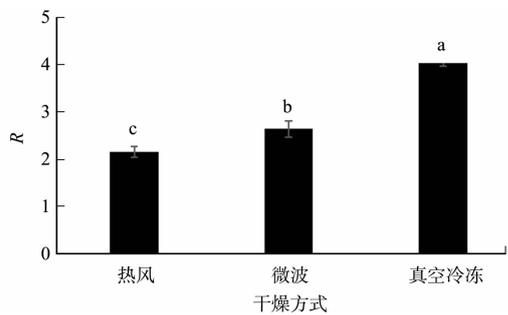
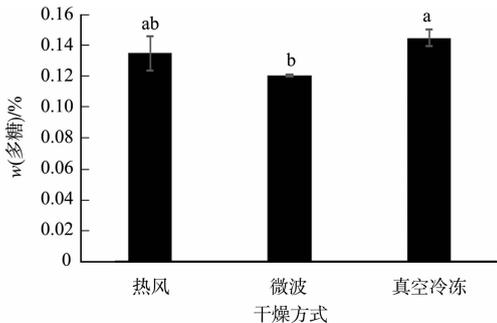
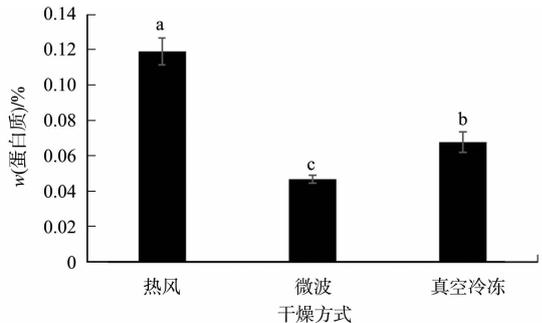


图 8 不同干燥方式处理后鹿茸菇复水比
Fig. 8 Rehydration ratios of *Lyophyllum decastes* after treatment with different drying methods



(a) 多糖



(b) 蛋白质

图 9 不同干燥方式下鹿茸菇复水后多糖和蛋白质的溶出量

Fig. 9 Dissolved amount of polysaccharide and protein after rehydration of *Lyophyllum decastes* under different drying methods

起蛋白质发生美拉德反应,从而引起蛋白质损失^[13]。Xu 等^[14]采用高温预加热处理后对香菇进行传统热风干燥,该处理下香菇的复水率和硬度提升,收缩率、褐变度和甲醛含量降低。Liu 等^[15]通过控制湿物料水分蒸发速率从而控制干燥室的加湿策略。结果表明,杏鲍菇加湿 30 min 可有效改善产品质量,缩短 15% 的干燥时间,降低 23% 的干燥能耗,提高干燥系统的可持续性。

新型干燥主要有热泵干燥、真空冷冻干燥、太阳能干燥、红外辐射干燥、微波干燥及真空干燥等^[9]。相对于传统干燥方式,新型干燥技术更能保证产品质量的稳定性。文中研究结果表明,微波干燥对鹿茸菇外观影响最大,可能因为在高温干燥过程中发生美拉德反应,反应中产生的类黑素使鹿茸菇表面颜色加深,也有可能是因为水分扩散不均匀而出现过热,使鹿茸菇边角焦化加深^[9]。微波处理过后鹿茸菇总酚质量分数最高,这可能是因为鹿茸菇的糖苷键和酯键被破坏,使与糖类或细胞壁相结合的酚类物质被释放^[16]。真空冷冻干燥鹿茸菇菌柄总酚质量分数也相对较高,这可能是因为真空环境下与氧气相隔绝,低温条件也使相关酶活性降低,使样品中酚类物质不易被氧化^[17]。焦睿智等^[18]发现真空微波干燥处理黑木耳时间短和效率高,对理化指标影响较小且具有良好抗生素残留降解效果。陈冰洁等^[19]发现真空冷冻干燥对花菇结构损伤最小,干燥的花菇复水比高和收缩率小,具有良好的色泽品质、可溶性蛋白和可溶性糖的保留率高。由此可见,新型干燥技术对于保证鹿茸菇综合品质方面胜于传统干燥技术。

DPPH, ABTS 自由基清除法是评价抗氧化物质清除自由基能力广泛使用的两种方法^[20-21]。研究结果表明,不同干燥方式下的鹿茸菇总酚物质都具有较强 DPPH 自由基清除能力,干燥过程可能并未显著改变鹿茸菇中总酚物质的化学结构或抗氧化活性,使这些化合物在干燥后依然能够有效捕获并中和 DPPH 自由基。

研究还揭示,鹿茸菇不同部位的总酚物质在 ABTS 自由基清除实验中均表现出较高的活性,这进一步证实了鹿茸菇作为一种天然抗氧化剂资源的广泛适用性。后续研究可聚焦于分离鉴定鹿茸菇各部位的主要抗氧化成分,并深入探讨这些成分的结构与抗氧化活性之间的关系,为鹿茸菇在功能性食品、保健品及药物开发中的精准应用提供科学依据。

4 结束语

3种干燥方式会对鹿茸菇产生不同程度的影响,其中,真空冷冻干燥可以更有效地保持新鲜鹿茸菇的外观,且得到各项营养成分较多的干品。不同干燥方式下,鹿茸菇总酚物质都具有很强的DPPH和ABTS自由基清除能力,而干品鹿茸菇复水能力由强到弱为真空冷冻干燥、微波干燥、热风干燥。综上,真空冷冻干燥得到的鹿茸菇各项指标良好,是干燥鹿茸菇的最佳方式。

参考文献:

- [1] 程继红. 名贵食用菌鹿茸菇商业化生产现状与发展前景[J]. 食药用菌, 2014(4):194-197.
- [2] 席亚丽, 茆爱丽, 王晓琴, 等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体及发酵液蛋白质营养价值评价[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 603-607.
- [3] UKAWA Y, ITO H, HISAMATSU M. Antitumor effects of (1→3)- β -D-glucan and (1→6)- β -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(1): 98-104. DOI:10.1016/S1389-1723(00)80041-9.
- [4] 王晓琴, 曹礼, 郑秀芳, 等. 荷叶离褶伞多糖的提取工艺及其抑菌作用的研究[J]. 中国食品工业, 2009(12): 51-53.
- [5] 张汉焱, 张芬琴, 王小明, 等. 荷叶离褶伞子实体营养成分分析与评价[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 696-700.
- [6] 李文佼, 温世勇, 张洪勇, 等. 鹿茸菇研究进展[J]. 中国食用菌, 2022, 41(3): 1-5.
- [7] 李立功. 荷叶离褶伞研究进展[J]. 中国林副特产, 2019(1): 79-81. DOI:10.13268/j.cnki.fbsic.2019.01.032.
- [8] 赵圆圆, 易建勇, 毕金峰, 等. 干燥方式对复水香菇感官、质构及营养品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 101-108. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171108-091.
- [9] 张越翔, 刘静, 吴小恬, 等. 食用菌干燥技术研究进展[J]. 中国果菜, 2022, 42(1): 24-33. DOI:10.19590/j.cnki.1008-1038.2022.01.004.
- [10] 陶盛昌, 李文佳, 邱健健, 等. 食用菌真菌干燥技术研究进展[J]. 保鲜与加工, 2019, 19(1): 171-178. DOI:10.3969/j.issn.1009-6221.2019.01.029.
- [11] 于蒙杰, 张学军, 牟国良, 等. 我国热风干燥技术的应用研究进展[J]. 农业科技与装备, 2013, 4(8): 14-16. DOI:10.16313/j.cnki.nykjybz.2013.08.002.
- [12] TIAN Yuting, ZHAO Yingting, HUANG Jijun, et al. Effects of different drying methods on the product quality and volatile compounds of whole shiitake mushrooms[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 714-722.
- [13] 杜冉, 郑新雷, 王世雄, 等. 真空微波干燥技术对食用菌粉品质的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(7): 76-82. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2018.07.015.
- [14] XU Lei, FANG Xiangjun, WU Weijie, et al. Effects of high-temperature pre-drying on the quality of air-dried shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) [J]. Food Chemistry, 2019, 285(5): 406-413. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.179.
- [15] LIU Ziliang, ZIELINSKA M, YANG Xuhai, et al. Moisturizing strategy for enhanced convective drying of mushroom slices[J]. Renewable Energy, 2021, 172(5): 728-739. DOI:10.1016/j.renene.2021.03.066.
- [16] 李思童. 油茶籽油不同形态酚类化合物抗氧化互作及油相迁移特征[D]. 扬州:扬州大学, 2021.
- [17] 邢颖, 张月, 徐怀德, 等. 不同干燥方法对生姜叶活性成分和抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 8075-8086.
- [18] 焦睿智, 岳田利, 高振鹏, 等. 不同干燥方式对黑木耳理化特性及抗生素含量变化的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 87-94.
- [19] 陈冰洁, 刘贵阁, 路遥, 等. 不同干燥方式对花菇品质的影响[J]. 上海农业学报, 2023, 39(2): 82-87. DOI:10.15955/j.issn1000-3924.2023.02.14.
- [20] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 317-322. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201409062.
- [21] 刘青, 刘珍玲, 周娟. 金线莲多糖的体外抗氧化活性[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2010, 31(6): 718-720. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.2010.06.0718.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202403038



膜分离精度对再造烟叶 提取液的截留影响

赖傲楠¹, 武士杰^{2,3}, 李淑纯¹, 周树锋¹

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 云南中烟再造烟叶有限责任公司, 云南 昆明 650202;

3. 天津科技大学 轻工科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 为实现对再造烟叶提取液成分的精确调控,将不同过滤精度膜依次用于提取液的分离,考察不同孔径膜及相应膜组合对提取液化学成分的截留效果影响。结果表明:孔径为200 nm的微滤(MF)膜主要截留悬浮物,孔径为20~30 nm的超滤(UF)膜可进一步截留可溶性蛋白质和果胶等大分子物质,孔径为5~10 nm的纳滤膜(NF1)能够对烟碱和碳原子数介于10~13的烟草中性致香成分进行有效分离,而孔径为3~5 nm的纳滤膜(NF2)则对糖类物质和碳原子数6~8的中性致香成分具有较强的截留作用,孔径为1~2 nm的纳滤膜(NF3)可以截留有机酸盐和碳原子数超过4的中性致香成分;采用MF+UF+NF1+NF2+NF3膜分离组合方式能够实现对再造烟叶提取液主要化学成分的调控。

关键词: 烟草提取液; 膜分离; 化学成分; 纳滤

中图分类号: TQ 028

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0681-07

Interception Effects of Membranes With Different Pore Sizes for Reconstituted Tobacco Extract

LAI Aonan¹, WU Shijie^{2,3}, LI Shuchun¹, ZHOU Shufeng¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Yunnan China Tobacco Remanufactured Tobacco Leaf Limited Company, Kunming 650202, China;

3. College of Light Industry Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To achieve precise control of the components of the extracted liquid from reconstituted tobacco leaves, different filtration precision membranes were sequentially used for the separation of the extracted liquid, and the effects of different pore size membranes and corresponding membrane combinations on the retention of chemical components in the extracted liquid were investigated. The results showed that microfiltration (MF) membranes with a pore size of 200 nm mainly retained suspended solids, ultrafiltration (UF) membranes with a pore size of 20-30 nm could further retain macromolecular substances such as soluble proteins and pectin, nanofiltration membranes (NF1) with a pore size of 5-10 nm could effectively separate nicotine and tobacco neutral aroma components with carbon atom numbers ranging from 10 to 13, while nanofiltration membranes (NF2) with a pore size of 3-5 nm had strong retention effects on sugars and neutral aroma components with carbon atom numbers ranging from 6 to 8, and nanofiltration membranes (NF3) with a pore size of

收稿日期: 2024-03-26

通信作者: 武士杰(1985-),男,工程师,博士,主要从事再造烟叶工艺技术的研究。E-mail:wushi20082009@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(201706032); 云南中烟再造烟叶有限责任公司科技项目(GYJS2021-2)

1-2 nm could retain organic acid salts and tobacco neutral odorant components with more than 4 carbon atoms. The combination of MF + UF + NF1 + NF2 + NF3 membrane separation could be used to regulate the main chemical components of the reconstituted tobacco extract.

Keywords: tobacco extract; membrane separation; chemical composition; nanofiltration

再造烟叶提取液是烟草的水溶性成分,为再造烟叶提供糖类、烟碱、有机/无机酸盐、氨基酸、可溶性大分子物质、脂溶性致香成分和糖苷类物质^[1-3]。因此,提取液的组成和含量影响着再造烟叶的品质^[4-5]。按化学成分类别对提取液组分进行分离,再以重组的方式精准调控各类物质的相对含量,可实现对再造烟叶组分的精确调控,有利于提高其品质^[6-8]。

膜分离技术是一种基于膜的筛分效应、对不同粒径的分子或离子进行选择分离的技术,具有分离和浓缩同步进行的优点^[9-11]。根据过滤精度的差异,膜材料可以分为微滤(MF)膜、超滤(UF)膜和纳滤(NF)膜等^[12-13]。再造烟叶提取液化学成分复杂,粒径各有差异,因此,可以选择不同过滤精度的多级膜组合方式对其进行分离。多级膜组合技术应用广泛,如饮用水和工业用水的净化与循环利用^[14-16]、细菌和热原的去除^[17-18]、天然产物的分离纯化和富集^[19-22]等。但目前该技术在烟草提取液的分离和浓缩方面的研究还比较少^[23-25]。

为明确膜分离精度对再造烟叶提取液各化学成分的截留影响,实现对提取液化学成分的调控,本文将微滤、超滤和不同孔径纳滤膜依次用于提取液的分离工序,考察不同孔径分离膜对提取液主要化学成分的分离效果,研究相应膜组合技术对提取液的截留影响。

1 实验部分

1.1 材料与设备

经沉降处理的再造烟叶提取液由云南昆明烟叶产区生产,可溶性固形物的质量分数为 8.45%,悬浮物质量分数为 0.92%。

仪器:旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);6890GC-5975MS 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);AA3 型流动分析仪(德国 SEAL 公司);白利糖度仪、TG328B 型电光分析天平(上海天平仪器厂);FED115 型多功能热风循环烘箱(德国 Binder 公司);GCM-S-02 型多功能膜分离实验设备(国初科技(厦门)有限公司);KBF115 型恒温恒湿箱(德国 BINDER 公司)。耗材:打烟器具、烟管和氟化瓶等。

管式微滤膜、超滤膜和不同过滤精度纳滤膜(NF1, NF2, NF3)组件参数,如表 1 所示。

表 1 膜组件参数

Tab. 1 Parameters of membrane components

指标	微滤膜	超滤膜	纳滤膜		
			NF1	NF2	NF3
膜材料	聚四氟乙烯	聚酰胺	聚酰胺	聚酰胺	聚酰胺
膜孔径/nm	200	20~30	5~10	3~5	1~2
膜面积/m ²	64	528	528	528	528
膜长度/mm	3 000	1 016	1 016	1 016	1 016
温度操作范围/℃	20~70	20~50	20~50	20~50	20~50
运行压力/MPa	0.2~0.4	0.5~2.0	0.5~2.5	0.5~4.0	1.0~4.0

1.2 实验和检测方法

1.2.1 提取液的截留实验流程和滤液样品的制备 经沉降处理后的再造烟叶提取液进料量为 5 000 kg,料液温度为 65~70 ℃,经过换热器后料液温度为 50~60 ℃。料液再依次经过 MF, UF, NF1, NF2, NF3 膜处理,各级透过液占该级过滤液量的 90%,各级操作温度≤60 ℃,其工艺流程如图 1 所示。

MF 试验流程:首先,提取液经过 MF 膜组件分离,当透过液质量达到进料液的 90%时,分别对截留液和透过液进行取样分析;随后,将透过液泵入下一级膜分离流程;往截留液中加入等质量水稀释后,继续过滤至原质量;循环 5 次,排出稀释的透过液,对剩余截留液进行取样分析,验证本级膜的截留效果。

UF, NF1, NF2, NF3 试验流程和 MF 试验流程相似,进料均是上一级膜工艺的透过液,经本级膜过

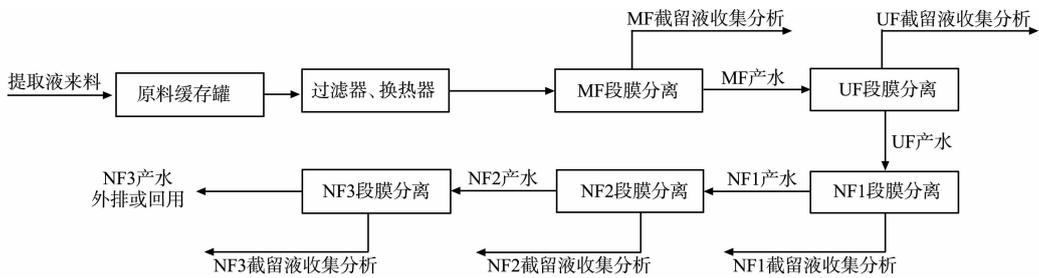


图 1 工艺流程图

Fig. 1 Flowchart of process

滤后,对截留液和透过液进行取样分析。

1.2.2 主要化学成分的检测方法 1) 采用连续流动法,分别按照 YC/T 159—2002, YC/T 160—2002, YC/T 161—2002, YC/T 162—2002, YC/T 249—2002, YC/T 296—2009 标准测定各级膜截留液的总糖、烟碱、总氮、钾离子、氯离子、蛋白质和硝酸盐的质量分数。

2) 采用 GC-MS 型气相色谱-质谱联用仪分析致香成分的质量分数。气相色谱条件:DB-5MS 型石英毛细管柱(30 mm×0.25 mm, 0.25 μm)。程序升温:初始 60 °C,保持 1 min;以 8 °C·min⁻¹ 的速率升至 170 °C,保持 3 min;再以 12 °C·min⁻¹ 的速率升至 260 °C,保持 18 min。进样口温度为 200 °C,柱箱温度为 60 °C;分流进样,柱流量为 1 mL·min⁻¹;吹扫流量为 3 mL·min⁻¹;分流比为 5:1;载气为高纯氮;进样量为 1 μL;溶剂延迟为 2 min。质谱条件:采用电子轰击电离方式(EI),电子能量为 70 eV。接口温度为 250 °C,离子源温度为 200 °C。采用全扫描离子采集方式(Scan),扫描范围为 40~500 u。标准质谱图库:美国国家标准与技术研究院标准质谱数据库(NIST)。

2 实验结果与讨论

2.1 膜分离精度对悬浮物及可溶性大分子的截留影响

再造烟叶提取液经不同过滤精度膜分离前、后的悬浮物及可溶性大分子质量分数,如表 2 所示。表 2 中:截留液(2)为对应段截留液(1)加水反复循环过滤 5 次时的截留液;“—”表示未检测出相应数据。由表 2 可知:MF 膜过滤后,透过液中悬浮物(含难溶性蛋白质和果胶)质量分数极低,显著低于原液中相应质量分数,表明悬浮物能够被 MF 膜有效截留;透过液中可溶性蛋白质和果胶的质量分数也略低于原液中相应质量分数,表明 MF 膜对这两类物质有一定的截留作用。此外, MF 截留液(1)经 5 次加水循环过滤后, MF 截留液(2)中的悬浮物、可溶性蛋白质和果胶质量分数虽有下降但仍有较多残留,再次证明 MF 微滤膜对提取液的悬浮物、可溶性蛋白质和果胶具有截留作用。

表 2 不同过滤精度膜处理前、后提取液的悬浮物和可溶性大分子质量分数 (单位: %)

Tab. 2 Mass fraction of suspended solids and soluble macromolecules in extracts before and after membrane treatment with different filtration precisions (unit: %)

溶液	悬浮物	蛋白质	果胶
提取液原液	0.92	0.53	0.02
MF 透过液	0.02	0.47	—
MF 截留液(1)	8.32	0.66	0.28
MF 截留液(2)	8.01	0.63	0.13
UF 透过液	—	0.04	—
UF 截留液(1)	—	5.17	0.28
UF 截留液(2)	—	4.56	0.13

将 MF 透过液进一步经 UF 膜分离后, UF 透过液中可溶性蛋白质质量分数仅为 0.04%, 显著低于 MF 透过液(0.47%)。果胶质量分数的变化趋势与此一致,表明提取液中含有的可溶性蛋白质和果胶等大分子能被 UF 膜高效截留。UF 截留液(1),(2)的检测结果进一步证实了该截留作用。

2.2 膜分离精度对常规化学成分截留影响

再造烟叶提取液经过不同过滤精度膜分离前、后的常规化学成分的质量分数,如表 3 所示。由表 3

可知:MF 透过液中烟碱、钾离子、氯离子和硝酸盐的质量分数与原液中相应质量分数一致,表明 MF 膜对提取液中这些组分没有截留作用;而 MF 透过液中总氮和总糖的质量分数略低于原液中相应的值,表明 MF 膜对部分含氮物质和某些糖类物质具有截留作用。对比 MF 截留液的检测结果,进一步证实 MF 膜对常规化学成分具有选择性截留作用。

UF 膜的截留作用与 MF 膜类似,即 UF 膜对提取液中烟碱、钾离子、氯离子和硝酸盐没有截留作用,对部分含氮物质和某些糖类物质具有截留作用。

表 3 不同过滤精度膜处理前、后提取液的常规化学成分的质量分数 (单位:%)

Tab. 3 Mass fraction of conventional chemical components of extracts before and after membrane treatment with different filtration precisions (unit: %)

溶液	烟碱	钾离子	氯离子	硝酸盐	总氮	总糖
提取液原液	0.26	0.32	0.11	0.05	0.13	2.73
MF 透过液	0.26	0.32	0.11	0.05	0.12	2.60
MF 截留液(1)	0.25	0.29	0.10	0.05	0.25	2.87
MF 截留液(2)	0.01	0.01	0.01	—	0.17	0.18
UF 透过液	0.26	0.32	0.11	0.05	0.06	2.57
UF 截留液(1)	0.27	0.37	0.11	0.05	0.87	2.65
UF 截留液(2)	0.01	0.01	0.01	—	0.73	0.12
NF1 透过液	0.04	0.31	0.11	0.05	0.01	2.35
NF1 截留液(1)	2.43	0.35	0.11	0.05	0.49	4.29
NF1 截留液(2)	2.01	0.02	—	—	0.45	0.04
NF2 透过液	—	0.29	0.11	0.05	0.01	0.15
NF2 截留液(1)	0.41	0.44	0.11	0.05	0.10	22.50
NF2 截留液(2)	0.39	0.02	—	—	0.10	12.70
NF3 透过液	—	0.15	0.10	0.04	0.01	—
NF3 截留液(1)	0.02	1.43	0.17	0.09	0.05	1.48
NF3 截留液(2)	0.02	1.31	—	—	0.04	1.41

NF1 纳滤膜的分离结果表明,与 UF 透过液相比,NF1 透过液的烟碱和总氮质量分数明显降低,同时总糖的质量分数也有所降低,表明 NF1 纳滤膜对这些物质具有较好的截留作用。而过滤前、后钾离子、氯离子和硝酸盐的质量分数没有明显变化,表明 NF1 纳滤膜对其截留作用不明显。对比 NF1 截留液的检测结果,进一步证实 NF1 纳滤膜对常规化学成分具有选择性截留作用。

NF2 纳滤膜对 NF1 透过液进行分离后,NF2 透过液中烟碱的质量分数显著降低,仪器未检出,表明其对烟碱有较强的截留作用;总糖的质量分数也明显降低,表明该膜对糖类物质也具有较好的截留作用。总氮和钾离子的质量分数略有降低,表明 NF2 纳滤膜对部分含氮物质和以钾表征的有机酸盐有一定截留作用。而过滤前、后氯离子和硝酸盐的质量分数没有明显变化,表明 NF2 纳滤膜对其截留作用不明显。对比 NF2 截留液的检测结果,进一步证实上述选择性截留作用。

使用 NF3 纳滤膜对 NF2 透过液进一步分离后,NF3 透过液中未检出糖类物质,表明该 NF3 纳滤膜对其具有较强的截留效果;钾离子质量分数显著降低,表明 NF3 纳滤膜对以钾表征的有机酸盐有较好的截留作用。此外,结合 NF2 截留液(1)的检测结果分析可知,NF3 纳滤膜对部分含氮物质和以氯离子和硝酸盐表征的无机酸盐也具有一定的截留作用。

2.3 膜分离精度对中性致香成分的截留影响

再造烟叶提取液经过不同过滤精度膜分离的中性致香成分及质量比,如表 4 所示。表 4 中: t 为保留时间; w 为致香成分质量比; N_c 为碳原子数; w_{tot} 为致香成分总质量比。由表 4 可知:MF 透过液和提取液原液的中性致香成分及质量比接近,表明 MF 膜对中性致香成分的截留作用并不明显。

经过 UF 膜分离后,UF 透过液的中性致香成分总质量比降低到 $4.258 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,比 MF 透过液的相应质量比($8.609 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)降低近 50%,表明 UF 膜对部分中性致香成分具有较好的截留作用。UF 膜对 N_c 为 4~5 的中性致香成分截留作用较弱,对 N_c 为 6~11 的中性致香成分普遍具有一定截留作用,对 N_c 为 13 的中性致香成分具有较好的截留作用。对比相关致香成分在 UF 截留液与 UF 透过液

的质量比,进一步证实了 UF 膜对不同含碳数中性致香成分表现出选择性截留作用。

表 4 不同过滤精度膜处理前、后提取液的中性致香成分及质量比

Tab. 4 Neutral aroma components and mass ratio of extracts before and after membrane treatment with different filtration precisions

成分	N_c	t/min	$w/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$										
			提取液原液	MF 透过液	MF 截留液	UF 透过液	UF 截留液	NF1 透过液	NF1 截留液	NF2 透过液	NF2 截留液	NF3 透过液	NF3 截留液
3-羟基-2-丁酮	4	2.955	0.453	0.396	0.436	0.420	0.470	0.391	0.504	0.208	2.150	—	2.174
3-甲基丁醇	5	3.228	0.044	0.039	0.036	0.040	0.043	0.046	0.516	0.027	0.262	—	0.218
糠醛	5	4.544	0.094	0.063	0.075	0.059	0.084	0.038	0.128	0.025	0.157	—	0.179
2-甲基丁酸	5	4.762	0.032	0.027	0.032	0.023	0.055	0.007	0.117	0.002	0.014	—	0.017
糠醇	5	4.894	0.146	0.093	0.091	0.081	0.101	0.037	0.353	0.029	0.093	—	0.153
4-环戊烯-1,3-二酮	5	5.369	0.049	0.041	0.043	0.038	0.077	0.020	0.121	—	0.011	—	0.025
吡啶-2-甲醛	6	6.651	0.009	0.008	0.021	0.007	0.017	—	—	—	—	—	—
苯甲醛	6	6.931	0.067	0.060	0.043	0.040	0.161	—	0.132	—	—	—	—
2-乙酰基吡咯	6	8.868	0.240	0.192	0.197	0.129	0.874	0.035	1.287	0.002	0.089	—	—
4-甲氧基苯酚	7	9.344	0.045	0.039	0.040	0.013	0.236	0.003	0.106	—	0.008	—	—
苯甲醇	7	8.345	0.863	0.725	0.716	0.615	1.328	0.256	3.025	0.018	1.846	—	0.099
苯乙醛	8	8.517	0.301	0.278	0.253	0.207	0.603	0.064	1.749	0.006	0.163	—	0.014
苯乙醇	8	9.880	0.704	0.628	0.670	0.325	0.975	0.138	1.754	0.002	1.179	—	0.013
苯并噻吩	8	11.487	0.313	0.399	0.419	0.327	0.883	0.077	2.196	0.009	0.526	—	0.021
2,3-二氢苯并呋喃	8	11.979	1.325	1.201	1.582	0.860	1.584	0.225	5.372	—	0.271	—	—
吡啶	8	13.294	0.187	0.143	0.121	0.113	0.162	0.021	0.849	—	0.050	—	—
芳樟醇	10	9.578	0.013	0.015	0.022	0.007	0.094	—	0.055	—	—	—	—
二氢猕猴桃内酯	11	17.782	0.467	0.461	0.494	0.179	2.328	—	1.691	—	0.007	—	—
茄酮	13	14.274	2.139	1.845	1.857	0.382	11.365	0.016	2.853	—	0.091	—	—
β -大马酮	13	14.685	0.562	0.503	0.644	0.085	3.189	—	0.658	—	—	—	—
β -二氢大马酮	13	14.803	0.102	0.096	0.106	0.010	0.835	—	0.124	—	—	—	—
β -紫罗兰酮	13	15.145	0.095	0.075	0.097	0.012	0.662	—	0.131	—	—	—	—
二氢乙位紫罗兰酮	13	15.221	0.114	0.098	0.185	0.014	0.861	—	0.126	—	—	—	—
巨豆三烯酮 B	13	18.663	0.594	0.543	0.863	0.127	4.309	—	1.240	—	—	—	—
巨豆三烯酮 D	13	19.551	0.537	0.488	0.795	0.145	4.172	—	1.532	—	0.002	—	—
3-氧代- α -紫罗兰醇	13	19.867	0.174	0.153	0.191	0.031	1.065	—	0.275	—	—	—	—
$w_{\text{tot}}/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$			9.669	8.609	10.029	4.258	32.361	1.514	26.894	0.328	6.917	—	2.913

NF1 纳滤膜对提取液进一步分离后, NF1 透过液的中性致香成分总质量比为 $1.514 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 对比 UF 透过液降低近 65%, 表明 NF1 纳滤膜对提取液中的中性致香成分具有较强的截留作用。此外, 对比 NF1 过滤前、后的致香成分可知, NF1 膜对 N_c 为 4~5 的中性致香成分具有一定截留作用, 对 N_c 为 6~8 的中性致香成分具有较好的截留作用, 对 N_c 为 10~13 的中性致香成分具有较强的截留作用。

使用 NF2 纳滤膜对 NF1 透过液进一步分离后, NF2 透过液的中性致香成分总质量比降低到 $0.328 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 降低了近 78%, 表明 NF2 纳滤膜可以对 N_c 为 4~8 的中性致香成分进一步有效截留。对各组分分析可知, NF2 膜对 N_c 为 4~5 的烟草中性致香成分具有一定的截留作用, 对 N_c 为 6~8 的烟草中性致香成分具有较强的截留作用。

使用 NF3 纳滤膜对 NF2 透过液再分离后, 在透过液中未检出烟草中性致香物质, 且 NF3 截留液富集了 N_c 为 4~8 的中性致香成分, 表明 NF3 纳滤膜对提取液中碳原子数超过 4 的中性致香成分均具有较强的截留作用。

2.4 不同过滤精度膜组合的各段组分

采用 MF+UF+NF1+NF2+NF3 膜组合方式对再造烟叶提取液进行逐级过滤, 提取液进料量为 5 000 kg, 各级透过液占该级过滤液质量的 90%。通过测定各段不挥发物质量分数, 结合各段质量, 可以计算各组分干物质总质量及其占比, 如表 5 所示。由表 5 可知: 提取液经 MF+UF+NF1+NF2+

NF3膜组合方式逐级过滤,形成了5个可用于涂布料化学成分调控的截留液组分,占进料干物质总质量的97.76%。通过计算可知,这5个组分混合后的不挥发物质量分数为20.16%。

表5 提取液在各组分的质量、不挥发物质量分数、干物质总质量及其占比

Tab.5 Quality, nonvolatile matter mass fraction, total dry matter mass and its proportion of extraction in each group segment

溶液	各段质量/kg	不挥发物质量分数/%	干物质总质量/kg	干物质占比/%
提取液原液	5 000	8.45	422.50	—
MF截留液	500	18.31	91.55	21.67
UF截留液	450	23.06	103.77	24.56
NF1截留液	405	24.43	98.94	23.42
NF2截留液	365	24.85	90.70	21.47
NF3截留液	329	8.53	28.06	6.64
NF3排放液	2 951	0.37	10.92	2.58

根据各截留液段主要化学成分的质量和表5中各段质量,可计算出各主要化学成分在各段的质量,并将其与表5中各段的干物质总质量进行对比,计算出每段中各主要化学成分占该段干物质总质量的比例,如表6所示。由表6可知:MF段的主要化学成分是悬浮物,占该段干物质总质量的45.44%;UF段的主要化学成分是可溶性大分子和糖类物质,分别占该段干物质总质量的23.64%和11.49%;NF1段的主要化学成分是糖类物质和烟碱,分别占该段干物质总质量的17.56%和9.95%;NF2段的主要化学成分是糖类物质,占该段干物质总质量的90.55%;NF3段的主要化学成分是有机酸盐,占该段干物质总质量的68.60%。因此,采用MF+UF+NF1+NF2+NF3膜组合方式可以在较为宽泛的范围内实现再造烟草涂布液主要化学成分的调控。

表6 各组分中主要化学成分占干物质总质量的比例 (单位:%)

Tab.6 Ratio of major chemical components to total dry matter mass in each group segment (unit: %)

溶液	悬浮物	可溶性大分子	烟碱	糖类	有机酸盐	无机酸盐	致香成分
MF截留液	45.44	5.13	1.37	15.67	4.17	2.24	0.005
UF截留液	—	23.64	1.17	11.49	4.39	1.57	0.014
NF1截留液	—	—	9.95	17.56	3.89	1.54	0.011
NF2截留液	—	—	1.65	90.55	5.63	1.51	0.003
NF3截留液	—	—	0.23	17.35	68.60	7.63	0.003

3 结论

通过将微滤、超滤和不同孔径纳滤膜依次应用于再造烟叶提取液的分离,研究不同孔径分离膜对提取液主要化学成分的截留影响,实现了对再造烟叶涂布液化学成分的调控。具体有以下2点结论。

1) 孔径为200 nm的MF膜对悬浮物(含难溶性蛋白质和果胶)有良好的截留作用;孔径为20~30 nm的UF膜对可溶性蛋白质和果胶等大分子物质具有较强的截留作用;孔径为5~10 nm的NF1纳滤膜对烟碱和碳原子数为10~13的中性致香成分具有较强的截留作用;孔径为3~5 nm的NF2纳滤膜对糖类物质和碳原子数6~8的烟草中性致香成分具有较强的截留作用;孔径为1~2 nm的NF3纳滤膜对以钾表征的有机酸盐和碳原子数超过4的烟草中性致香成分具有较强的截留作用。

2) 采用MF+UF+NF1+NF2+NF3膜分离组合方式能够将再造烟叶提取液分成相应的5组截留液组分,可以在较为宽泛的范围内实现再造烟叶涂布液主要化学成分的重组和调控。

参考文献:

- [1] 王承福,赵爽,葛永辉,等.烟草综合利用及研究进展[J].贵州农业科学,2016,44(11):37-41.
- [2] 王锐.废弃烟末功能性成分的提取及应用研究[D].泰安:山东农业大学,2021.
- [3] 李华雨,薛建中,王毅博,等.再造烟叶生产浓缩过程中挥发性香味成分的变化[J].烟草科技,2018,51(12):52-64. DOI:10.16135/j.issn1002-0861.2018.0128.

- [4] 张翼鹏,张健,曾熠程,等.津巴布韦烟草提取物制备工艺优化及化学成分研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2019,34(1):63-69. DOI:10.12101/j.issn.1004-390X(n).201708017.
- [5] 李猛政,李荣华,夏岩石,等.烟草叶蛋白提取技术研究进展[J].中国烟草科学,2021,42(4):85-91. DOI:10.13496/j.issn.1007-5119.2021.04.013.
- [6] 唐蓉,唐向阳,孙旭海,等.再造烟叶连续多级逆流提取工艺试验研究[J].纸和造纸,2018,37(4):17-20. DOI:10.13472/j.ppm.2018.04.005.
- [7] 黄晶.造纸法再造烟叶提取过程中致香成分的溶出规律[J].福建分析测试,2017,26(3):56-62. DOI:10.3969/j.issn.1009-8143.2017.03.12.
- [8] 俞京,庄海涛,袁广翔,等.浓缩工艺对再造烟叶原料醇提液蒸发效果的影响[J].安徽农业科学,2021,49(19):164-169. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.19.043.
- [9] 时钧,袁权,高从堦.膜技术手册[M].北京:化学工业出版社,2001.
- [10] 淡俊豪,齐绍武,黎娟,等.新型烟草制品用烟草香味物质提取与分离纯化技术研究进展[J].山东农业科学,2017,49(11):151-156. DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2017.11.031.
- [11] 胡嘉维,吴宇航,樊功博,等.再造烟叶提取工艺优化与应用[J].广州化工,2021,49(3):50-54.
- [12] 祝倩倩.膜分离技术在注射用芪红脉通刺剂工艺中的研究与应用[D].南京:南京中医药大学,2013.
- [13] ZHU Xiaoying,BAI Renbi. Separation of biologically active compounds by membrane operations[J]. Current Pharmaceutical Design,2017,23(2):218-230. DOI:10.2174/1381612822666161027153823.
- [14] WANG Zhuqing,WU Aiguo,CIACCHI L C,*et al.* Recent advances in nanoporous membranes for water purification [J]. Nanomaterials,2018,8(2):65.
- [15] WARSINGER D M,CHAKRABORTY S,TOW E W,*et al.* A review of polymeric membranes and processes for potable water reuse[J]. Progress in Polymer Science,2018,81:209-237. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2018.01.004.
- [16] REZAKAZEMI M,KHAJEH A,MESBAH M. Membrane filtration of wastewater from gas and oil production[J]. Environmental Chemistry Letters,2018,16(2):367-388.
- [17] NGHIEM L D,SCHÄFER A I,ELIMELECH M. Pharmaceutical retention mechanisms by nanofiltration membranes[J]. Environmental Science & Technology,2005,39(19):7698-7705. DOI:10.1021/es0507665.
- [18] KOZLOV M,MOYA W,TKACIK G. Removal of microorganisms from fluid samples using nanofiber filtration media: US201013257501[P]. 2012-04-19[2024-02-17].
- [19] ALMANASRAH M,BRAZINHA C,KALLIOINEN M,*et al.* Nanofiltration and reverse osmosis as a platform for production of natural botanic extracts: The case study of carob by-products[J]. Separation and Purification Technology,2015,149:389-397. DOI:10.1016/j.seppur.2015.06.008.
- [20] GALANAKIS C M. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration[J]. Trends in Food Science & Technology,2015,42(1):44-63. DOI:10.1007/s11947-012-0829-2.
- [21] CONIDI C,CASSANO A,CAIAZZO F,*et al.* Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes[J]. Journal of Food Engineering,2017,195:1-13. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2016.09.017.
- [22] MONIZ P,SERRALHEIRO C,MATOS C T,*et al.* Membrane separation and characterisation of lignin and its derived products obtained by a mild ethanol organosolv treatment of rice straw[J]. Process Biochemistry,2018,65:136-145.
- [23] 高猛峰.烟草薄片萃取液膜浓缩技术研究[D].上海:华东理工大学,2021.
- [24] 张静楠,张峻松.基于膜分离技术提高碎片浓缩液质量的研究[J].福建分析测试,2015,24(2):27-29. DOI:10.3969/j.issn.1009-8143.2015.02.06.
- [25] 唐向阳,唐蓉,杨斌.造纸法再造烟叶生产中分离浓缩新工艺研究[J].纸和造纸,2019,38(4):33-36. DOI:10.13472/j.ppm.2019.04.009.

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:刘源岗)

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202401024



华侨大学厦门校区鸟类多样性的 时空分布格局

罗湘, 孙荣, 陈焱焱

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 2014年12月—2015年11月(第1期)和2022年12月—2023年11月(第2期)采用样线法、样点法对华侨大学厦门校区鸟类进行调查,并分析其物种组成及多样性。结果表明:两期调查共记录鸟类93种,隶属13目40科,相比第1期调查,第2期新增鸟类17种;秋季鸟类物种数量和多样性指数均最高,冬季最低;两期调查5类生境的鸟类物种数量从大到小均为白鹭湖区、绿地区、内河区、宿舍区、教学区,多样性指数从大到小均为白鹭湖区、宿舍区、绿地区、内河区、教学区;相比第1期调查,第2期调查各生境和各季节的鸟类物种数和多样性指数均有所增加,均匀度指数除绿地区和教学区有所增加外,其余3个生境均出现小幅度减少。

关键词: 鸟类群落; 多样性; 鸟类生境; 季节; 华侨大学厦门校区

中图分类号: Q 958.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2024)05-0688-08

Spatial and Temporal Distribution Pattern of Bird Diversity in Xiamen Campus of Huaqiao University

LUO Xiang, SUN Rong, CHEN Yanyao

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The Xiamen campus of Huaqiao University birds are investigated from December 2014 to November 2015 (the first phase) and from December 2022 to November 2023 (the second phase), using the line transect method and plot sampling method, and their species composition and diversity are analysed. The results show that, a total of 93 species of birds belonging to 13 orders and 40 families are recorded in the two phases. Compared with the first phase survey, 17 species of birds are newly added in the second phase. The numbers of bird species and diversity index are highest in autumn and the lowest in winter. The numbers from large to small of bird specie in the five types of habitats in the two phases are the heron lake area, green area, inland river area, dormitory area, teaching area, and the diversity indices from large to small are the heron lake area, dormitory area, green area, inland river area, teaching area. The numbers of bird specie and the diversity index of all habitats and seasons increased in the second phase survey compared to the first phase survey, and the evenness indices show a slight decrease in other three habitats, except for the green and teaching area where there is an increase.

Keywords: bird community; diversity; bird habitat; season; Xiamen campus of Huaqiao University

随着城市化进程的加快,城市生境发生剧烈变化,道路和建筑物的修建导致城市生境破碎化,城市

收稿日期: 2024-01-02

通信作者: 孙荣(1982-),男,副教授,主要从事环境生态学、环境规划的研究。E-mail:sunrong@hqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51509094); 华侨大学2023年本科教育教学改革研究资助项目(HQJGYB 2339)

维持生物多样性的能力下降,城市生态系统遭到严重破坏^[1-2]。城市化的负面影响将对全球生物多样性产生深远影响^[2-3]。鸟类是生态系统的重要组成部分,具有较强的活动能力和较高的环境敏感性,鸟类种群的变化能够有效地反映栖息地的生态变化^[4-5],因此,它们通常作为城市生态系统健康水平的指示物种,用于研究城市化对生物多样性的影响^[6]。在保护城市生态系统生物多样性中,城市绿地起着至关重要的作用^[2]。大学校园作为城市绿地的重要组成部分,通常拥有丰富的生境类型^[7-8]和原始自然的大片绿地^[3],能为鸟类提供安全的栖息环境和丰富的生长资源,是城市鸟类重要的栖息地之一^[7]。

现今许多大学校园拥有很高的生物多样性水平^[8],甚至在校园内发现了新物种^[9],大学校园在维护鸟类多样性方面发挥着重要作用^[2,10]。目前,诸多大学建立了植物园或动物保护区以研究校园生物多样性,全球超过 300 所高校进行了校园植物和鸟类的多样性调查,主要集中在中国和印度^[8]。我国大学校园鸟类研究主要集中在鸟类群落物种组成调查^[11-15]、结合不同生境特征的鸟类多样性分析^[4,11,16-24]、繁殖鸟类调查^[25]、冬季鸟类调查^[26-29]、鸟类警觉行为探究^[30-31]和植物与鸟类共生关系探究^[32]等方面。华侨大学厦门校区绿地面积大、植被丰富、覆盖率较高,虽然以前进行过鸟类多样性调查,但数据较陈旧。基于此,本文对华侨大学厦门校区(简称校区)鸟类多样性的时空分布格局进行研究。

1 研究区概况与研究方法

1.1 研究区概况

福建省厦门市属于亚热带海洋性季风气候,温和多雨,冬短夏长,年平均气温约 21 ℃,年平均降雨量约 1 200 mm^[33-34]。校区位于厦门市集美区,2006 年投入使用,2015 年在校生超过 2.0 万人,截止 2023 年 12 月在校生超过 4.6 万人。校区前临杏林湾海湾公园,校区中心直线距离杏林湾海湾公园 800 m,后靠兑山森林公园和天马山郊野公园(图 1),校区中心直线距离兑山森林公园 10 m,距离天马山郊野公园中心点 2 800 m。校区总占地面积约 132 万 m²,建筑面积约 60 万 m²,绿地面积约 52 万 m²,白鹭湖区、荷花池、人工河等水体的景观面积约 8 万 m²。

1.2 研究方法

1.2.1 生境划分 校区生境划分,如表 1 所示。

表 1 校区生境划分

Tab.1 Habitat types of campus

生境	生境特征	人为活动
白鹭湖区	湖泊有 2 座树岛屿,水域面积大,右临教学区,左临校园围墙,周围植被种类较多、覆盖率较高,较远离污染源	干扰小
内河区	校内河流水域面积较小,水浅鱼多,河面上水生植物较单一,河道两旁种有乔木,左临绿地和教学区	干扰较小
教学区	植被覆盖度较小、种类单一	干扰极大
绿地区	树木较少、分布较稀疏,多为草本和低矮灌木,有大块的可供鸟类作遮蔽物的植物区域,但绿地间连通性较差,离污染源较远	干扰较小
宿舍区	树木种类单一,但数量较多,且古树较多、生长茂密,北部靠近兑山和学校操场,西北部靠近马路	干扰较大

校区生境划分图,如图 2 所示。

1.2.2 数据采集 对 2014 年 12 月—2015 年 11 月(第 1 期)和 2022 年 12 月—2023 年 11 月(第 2 期)进行校园鸟类多样性调查,在每个生境设置 1 条样线,样线布设尽可能涵盖大部分生境。在晴朗、风力小于 3 级的天气条件下,选择清晨或傍晚鸟类活动的高峰期,调查人员沿着固定样线以 1 km · h⁻¹ 的速度匀速步行,使用双筒或单筒望远镜观察鸟类,记录样线两侧 50 m 范围内及前方所有见到或听到的鸟类物种、所在生境及数量等信息^[35];对于水域的调查则采用设定固定样点,以半径 5 m 的范围内的样点法开展鸟类群落与多样性观测。为避免重复计数,从样线后方向前方飞的鸟类不进行统计^[36]。调查时

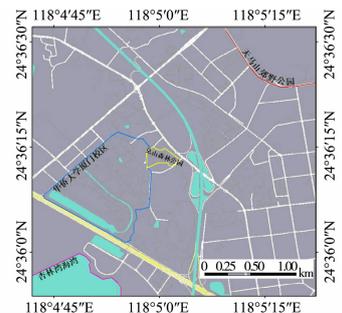


图 1 校区地理位置图

Fig. 1 Geographical location map of campus

期分别为冬季越冬期(2014年12月—2015年2月;2022年12月—2023年2月)、春季迁徙期(2015年3月—2015年5月;2023年3月—2023年5月)、夏季繁殖期(2015年6月—2015年8月;2023年6月—2015年8月)和秋季迁徙期(2015年9月—2015年11月;2023年9月—2023年11月),每个季节调查1~2次。鸟类的鉴定和分类等主要参照《中国鸟类观察手册》^[37]。

1.2.3 数据处理与分析 物种多样性采用 Shannon-Wiener 指数(H)进行分析, H 的表达式为

$$H = - \sum P_i \lg P_i。$$

上式中: P_i 为第*i*种的个体比例,即物种*i*的个体数与所有物种总个体数之比。

均匀度采用 Pielou 指数(E), E 表达式为

$$E = H/H_{\max} = H/\lg R。$$

上式中: H_{\max} 为在物种丰富度相同的情况下能达到的最大 Shannon-Wiener 指数; R 为群落物种丰富度。

Sorensen 相似性系数(S)的表达式为

$$S = 2c/(a+b)。$$

上式中: a 为群落*A*中的物种数; b 为群落*B*中的物种数; c 为2个群落(5个生境视为5个不同的群落)中共有的物种数。

数据分析处理和作图均使用 Origin 2022 软件。

2 实验结果与分析

2.1 鸟类群落物种组成

2.1.1 物种组成 2期调查共记录到鸟类93种,隶属13目40科。其中,雀形目鸟类最多,有26科67种,占全部鸟类的72.04%;其次为鸮形目,有1科7种,占全部鸟类的7.53%。鹳科鸟类有13种,占鸟类总数的13.98%。

在调查到的鸟类中,有国家一级重点保护野生动物1种,为黄嘴白鹭(*Egretta eulophotes*);国家二级重点保护野生动物4种,包括褐翅鸦鹃(*Centropus sinensis*)、画眉(*Leucodioptron canorus*)、领角鸮(*Otus lettia*)、红隼(*Falco tinnunculu*);福建省重点保护野生动物11种,包括小鸮鸺(*Tachybaptus ruficollis*)、大白鹭(*Ardea alba*)、苍鹭(*Ardea cinerea*)、白鹭(*Egretta alba*)、灰喜鹊(*Cyanopica cyanus*)、喜鹊(*Pica serica*)、金腰燕(*Cecropis daurica*)、画眉(*Leucodioptron canorus*)、戴胜(*Upupa epops*)、黑枕黄鹂(*Oriolus chinensis*)、家燕(*Hirundo rustica*)。

2.1.2 鸟类群落物种的组成 两期鸟类群落物种组成,如图3所示。由图3可知:在居留型方面,留鸟数量最多,有60种,占总物种数的64.51%,冬候鸟22种,占总物种数的23.66%,夏候鸟9种,占总物种数的9.68%,旅鸟数量最少,有2种,占总物种数的2.15%;在区系方面,东洋界鸟最多,有62种,占总物种数的66.67%,其次是古北界鸟,有26种,占鸟类总数的27.96%,广布种鸟最少,有5种,占鸟类总数的5.37%;在生态类型方面,鸣禽最多,有67种,占总物种数的72.04%,其次是涉禽,有12种,占总物种数的12.90%,攀禽有7种,占总物种数的7.53%,陆禽有3种,占总物种数的3.23%,猛禽有2种,占总物种数的2.15%;游禽有2种,占总物种数的2.15%。

2.1.3 优势种 校区校园内的93种鸟类中,有优势种4种,占总数的4.30%,分别为白头鹎

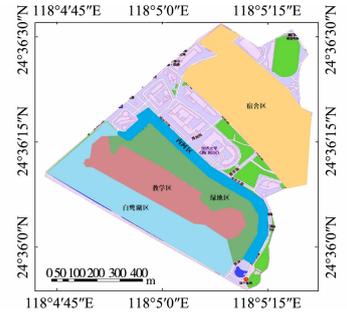


图2 校区生境划分图
Fig. 2 Habitat division map of campus

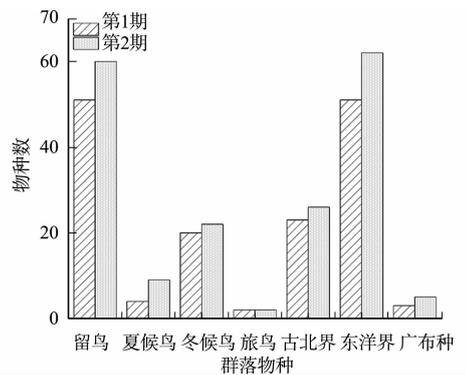


图3 两期鸟类群落物种组成
Fig. 3 Species composition of bird communities in two periods

(*Pycnonotus sinensis*)、白颊噪鹛(*Pterorhinus sannio*)、麻雀(*Passer montanus*)、白鹡鸰(*Motacilla alba*); 常见种 18 种, 占总数的 19.35%; 少见种 43 种, 占总数的 46.24%。

2.2 鸟类多样性时空格局

2.2.1 不同生境鸟类群落多样性 2014 年 12 月—2015 年 11 月, 白鹭湖区的鸟类种数有 41 种, 绿地区有 34 种, 内河区有 29 种, 宿舍区有 20 种, 教学区有 11 种。校区各生境鸟类群落统计, 如图 4 所示。由图 4 可知: 第 1 期调查的物种数占比从大到小的生境为白鹭湖区、绿地区、内河区、宿舍区、教学区, 物种多样性指数从大到小的生境为白鹭湖区(2.703)、宿舍区(1.822)、绿地区(1.666)、内河区(1.629)、教学区(0.481), 均匀度指数从大到小的生境为白鹭湖区(0.728)、宿舍区(0.608)、内河区(0.484)、绿地区(0.472)、教学区(0.201); 第 2 期调查的物种数占比从大到小的生境为白鹭湖区、绿地区、内河区、宿舍区、教学区, 物种多样性指数从大到小的生境为白鹭湖区(2.816)、宿舍区(1.946)、绿地区(1.884)、内河区(1.686)、教学区(0.557), 均匀度指数从大到小的生境为白鹭湖区(0.700)、宿舍区(0.605)、绿地区(0.484)、内河区(0.436)、教学区(0.211); 较第 1 期调查, 第 2 期调查的各生境的鸟类物种数和物种多样性指数均有所增加, 均匀度指数除绿地区和教学区有所增加外, 其余 3 个生境均出现小幅度减少。

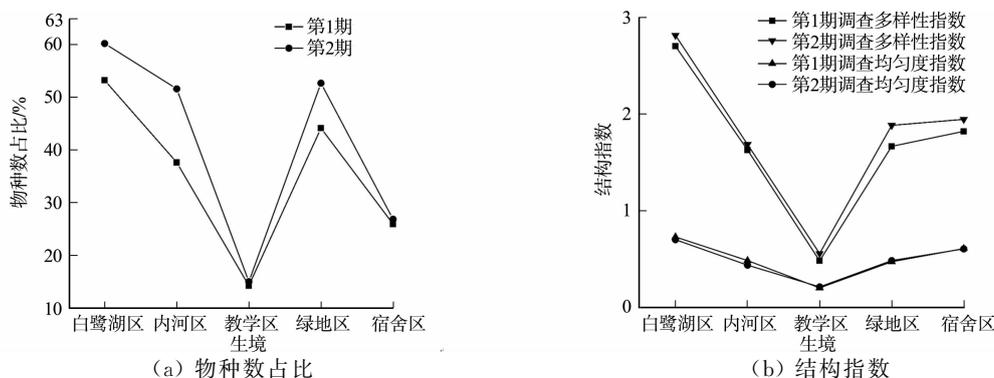


图 4 校区各生境鸟类群落统计

Fig. 4 Statistics of bird community in various habitats of campus

2.2.2 不同季节鸟类群落多样性 校区不同季节鸟类群落, 如图 5 所示。

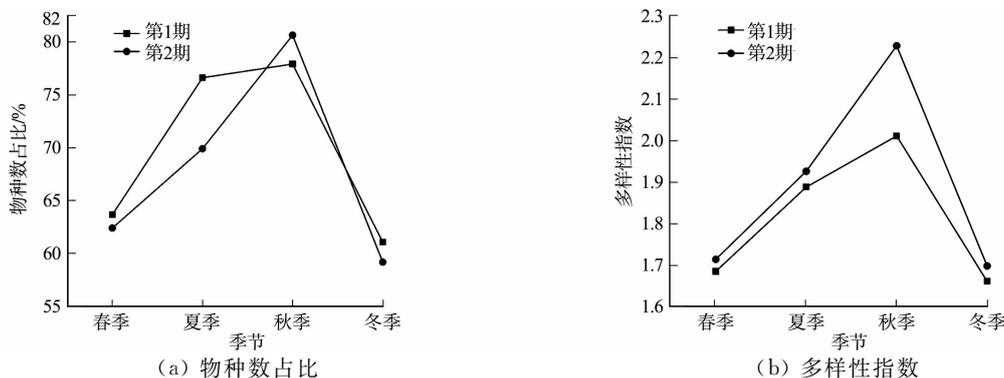


图 5 校区不同季节鸟类群落

Fig. 5 Bird communities in different seasons of campus

2014 年 12 月—2015 年 11 月, 春季记录到鸟类 49 种, 夏季记录到鸟类 59 种, 秋季记录到鸟类 60 种, 冬季记录到鸟类 47 种。2022 年 12 月—2023 年 11 月, 春季记录到鸟类 58 种, 夏季记录到鸟类 65 种, 秋季记录到鸟类 75 种, 冬季记录到鸟类 55 种。由图 5 可知: 第 1 期调查的不同季节鸟类群落多样性指数有所不同, 春季为 1.715, 夏季为 1.927, 秋季最高(2.229), 冬季最低(1.699); 第 2 期调查的不同季节鸟类群落多样性指数有所不同, 春季为 1.686, 夏季为 1.889, 秋季最高(2.012), 冬季最低(1.662)。

2.2.3 鸟类群落相似性 2014—2015 年校区不同生境鸟类群落相似性, 如表 2 所示。由表 2 可知: 绿地区与白鹭湖区的生境鸟类群落相似性最高(0.568), 宿舍区与绿地区的生境鸟类群落相似性次之(0.444), 宿舍区与白鹭湖区的生境鸟类群落相似性第 3(0.367), 教学区与白鹭湖区的生境鸟类群落相似性最低(0.087)。

表2 2014—2015年校区不同生境鸟类群落相似性

Tab. 2 Similarity of bird communities in different habitats of campus from 2014 to 2015

生境	S				
	白鹭湖区	内河区	教学区	绿地区	宿舍区
白鹭湖区	1.000	—	—	—	—
内河区	0.299	1.000	—	—	—
教学区	0.087	0.242	1.000	—	—
绿地区	0.568	0.230	0.100	1.000	—
宿舍区	0.367	0.255	0.154	0.444	1.000

2022—2023年校区不同生境鸟类群落相似性,如表3所示。由表3可知:内河区与白鹭湖区的生境鸟类群落相似性最高(0.456),内河区与绿地区的生境鸟类群落相似性次之(0.378),绿地区与白鹭湖区的生境鸟类群落相似性第3(0.344),教学区与宿舍区的生境鸟类群落相似性最低(0.109)。

表3 2022—2023年校区不同生境鸟类群落相似性

Tab. 3 Similarity of bird communities in different habitats of campus from 2022 to 2023

生境	S				
	白鹭湖区	内河区	教学区	绿地区	宿舍区
白鹭湖区	1.000	—	—	—	—
内河区	0.456	1.000	—	—	—
教学区	0.123	0.266	1.000	—	—
绿地区	0.344	0.378	0.188	1.000	—
宿舍区	0.144	0.211	0.109	0.216	1.000

不同季节鸟类群落相似性,如表4所示。由表4可知:春季和冬季生境鸟类群落相似性最高(0.800),春季和秋季次之(0.587),秋季和冬季第3(0.579),夏季和春季、夏季和秋季最低(0.462)。

表4 不同季节鸟类群落相似性

Tab. 4 Similarity analysis of bird communities in different habitats

季节	S			
	春季	夏季	秋季	冬季
春季	1.000	—	—	—
夏季	0.462	1.000	—	—
秋季	0.587	0.462	1.000	—
冬季	0.800	0.466	0.579	1.000

2.3 与南方其他高校鸟类比较

与南方其他高校鸟类调查相比^[12-13,18-20,25],华侨大学厦门校区鸟类种类组成上居中等偏上(表5)。

表5 校区鸟类种数与其他南方高校对比

Tab. 5 Numbers of bird species of campus compared with other south universities

高校	目	科	种	调查时间	地理位置	来源
华侨大学厦门校区	13	40	93	第1,2期	福建省厦门市	文中
福建农林大学	13	52	61	2013年4月—2014年9月	福建省福州市	文献[12]
玉林师范学院	8	23	48	2015年4月—2016年5月	广西省玉林市	文献[13]
华南农业大学	15	60	260	2021年3月—2022年2月	广东省广州市	文献[18]
浙江农林大学	15	38	103	2021年11月—2022年5月	浙江省杭州市	文献[19]
重庆大学A区	5	18	24	2018年8月—2019年4月	重庆市沙坪坝区	文献[20]
海南师范大学	4	11	12	2018年全年和 2019年3月—2019年8月	海南省海口市	文献[25]

3 讨论

3.1 群落特征

校区鸟类物种数较多,雀形目在种类和丰富度方面占据主导地位;在居留型方面,以留鸟为主,这与

福建省鸟类区系吻合^[39];在区系方面,以东洋界鸟物种,这与中国动物地理区划相吻合;在生态类型方面,以鸣禽为主。这可能与校区的地理位置和环境条件有关。厦门地处东南沿海,属亚热带地区,常年呈亚热带海洋性季风气候,气候温和,雨量充沛,是鸟类良好的栖息地,也是北方高纬度繁殖的鸟类的重要越冬区。鸣禽以浆果、花蕾、种籽、谷物和昆虫为食,校园内人为活动强烈,人为活动产生的生活垃圾等可以为鸣禽提供大量的食物,且鸣禽身体多为小型,校园中乔木和灌木可为其提供充足、相对安全的庇护所。另外,校园后靠兑山森林公园和天马山郊野公园,这两座公园以林鸟、鸣禽等为主,其林鸟、鸣禽可能迁移至校园。

作为一个新建校区(2006年建成投入使用),校园鸟类的科、种相比其他高校都处于较高的水平(表5)。一方面表明校区鸟类生境多样性程度高,另一方面与该校区毗邻天马山郊野公园、兑山森林公园、杏林湾海湾等都有关系,这几个区域分别给学校带来了林鸟、鸣禽和水鸟。从空间位置看,校区位于杏林湾海湾与天马山郊野公园的中间,再加上学校内丰富的食物资源为鸟类提供了停歇的场所,因此,鸟类数量较高。

3.2 空间尺度

不同的生境条件使鸟类物种数和多样性在空间尺度上存在差异,校区鸟类物种丰富度与海拔高度、降水、校园面积、建校时间和人口密度等密切相关。白鹭湖区鸟类物种数、多样性指数和均匀度指数均最高,一方面,丰富的水域环境能有效提升鸟类群落多样性;另一方面,栖息地植被条件是影响鸟类物种多样性的主要因素,植被斑块面积越高,鸟类物种越丰富。教学区鸟类物种数、多样性指数和均匀度指数均最低,这可能因为该区植被覆盖度较小、种类单一、人为活动频繁,因此干扰极大,不利于鸟类生存繁殖。宿舍区鸟类物种数较少,但多样性指数和均匀度指数较高,可能因为其北部靠近兑山,兑山森林公园鸟类物种丰富,可能迁徙至临近的宿舍区,且该区古树较多、生长茂密,能为鸟类提供良好的栖息条件,但宿舍区相邻马路和学校操场,人车流量大,不利于鸟类的日常活动。

当两种生境的鸟类群落相似性系数低于0.600时,可以看成两种生境不相似。从不同生境来看,生境相似性系数均低于0.600,可以看成5种生境均互不相似。但白鹭湖区与绿地区鸟类群落相似性系数接近0.600(0.568),可能因为白鹭湖区与绿地区均有大块的可供鸟类作遮蔽物的植物区域,且这两个功能区较远离污染源,是比较适合鸟类栖息的区域。从不同季节来看,春季和冬季的相似性大于0.600(0.800),这可能是由于冬季鸟类数量逐渐减少,不适寒冷的鸟类飞离了校区,而大部分留鸟留了下来,且春冬季时间接近,记录的鸟类接近。

3.3 时间尺度

校区5类生境的鸟类物种数和多样性均为第2期调查高于第1期调查,第2期调查新增鸟类17种。一方面,生境异质性是形成丰富多样鸟类群落的重要因素,建校时间越久,生境越丰富,鸟类物种越丰富。另一方面,建校以来,校园绿化水平不断提高,浆果类、核果类等果实类树种增加,能为鸟类提供更多食物。另外,鸟类增多还与杏林湾、天马山得到有效治理有关。第1期调查至第2期调查期间,天马山进行了山体生态修复,丰富了植被盖度和群落多样性;杏林湾进行了湿地修复,种植了大量的植物,提高了水质,提升了河道景观效果,有效保护了鸟类栖息。由于特殊情况,在2019年底至2022年初学校基本上实行了封闭式管理,部分时间开展线上授课,校园内人类活动大量减少,人为干扰大幅度减弱,这段时间的校内环境更利于鸟类生活。此外,2022年长江中下游大旱,高纬度地区的生态环境与往年不同,长江中下游区域生态环境改变,部分鸟类外溢至厦门进行觅食和越冬。

校区的鸟类物种数和多样性均在秋、夏两季明显高于春、冬两季。这是因为秋季有大量的候鸟迁徙,厦门地处冬候鸟迁徙路线的重要节点,秋季有大量的冬候鸟在厦门进行觅食、补充;夏季校园内的植物枝叶繁茂且水生植被增多,可以为鸟类提供丰富的食物资源和较安全的庇护所,因此,秋、夏两季鸟类物种数和多样性较高。

4 结论

2014年12月—2015年11月和2022年12月—2023年11月采用样线法、样点法对校区鸟类组成及多样性进行了调查。共记录到鸟类93种,隶属13目40科,其中,雀形目鸟类最多,有26科67种,占

总数的72.04%,其次为鹤形目,有1科7种,占全部鸟类的7.53%。较第1期调查,第2期调查新发现鸟类17种、6目、10科。校园内有国家一级重点保护野生动物1种;国家二级重点保护野生动物4种;福建省级重点保护野生动物11种。居留型方面,留鸟最多,有60种,占总种数的64.51%,旅鸟最少,有2种,占总种数的2.15%;在区系方面,东洋界鸟最多,有62种,占鸟类总种数的66.67%,广布种鸟最少,有5种,占鸟类总种数的5.37%;在生态类型方面,猛禽和游禽最少,均为2种。

在5种生境的两期调查中,白鹭湖区多样性指数和均匀度指数均最高,教学区均最低。从相似性看,第1期调查时绿地区与白鹭湖区的鸟类群落相似性最高,教学区与白鹭湖区的鸟类群落相似性最低;第2期调查时内河区与白鹭湖区的鸟类群落相似性最高,教学区与宿舍区的鸟类群落相似性最低。春、冬两季的鸟类群落相似性最高(0.800)。

综合来看,华侨大学厦门校区内鸟类种类丰富,群落多样性较高,具有保护价值。

参考文献:

- [1] XU Weizhen, YU Jiao, HUANG Peilin, *et al.* Relationship between vegetation habitats and bird communities in urban mountain parks[J]. *Animals*, 2022, 12: 2470. DOI: 10.3390/ani12182470.
- [2] LIU Jun, BAI Haotian, MA Huiyao, *et al.* Bird diversity in Chinese urban parks was more associated with natural factors than anthropogenic factors[J]. *Urban Forestry and Urban Greening*, 2019, 43: 126358. DOI: 10.1016/j.ufug.2019.06.001.
- [3] SANLLORENTE O, RÍOS-GUISADO R, IZQUIERDO L, *et al.* The importance of university campuses for the avian diversity of cities[J]. *Urban Forestry and Urban Greening*, 2023, 86: 128038. DOI: 10.1016/j.ufug.2023.128038.
- [4] 刘佳琪, 李灵贝, 王彩红, 等. 吉林农业大学校园鸟类多样性研究[J]. *野生动物学报*, 2019, 40(4): 933-944. DOI: 10.19711/j.cnki.issn2310-1490.2019.04.017.
- [5] 李斌强, 柏海珍, 王忠辉, 等. 江西赣州鸟类物种多样性及监测现状分析[J]. *生物资源*, 2023, 45(5): 462-471. DOI: 10.14188/j.ajsh.2023.05.007.
- [6] 游巍斌, 蔡新瑜, 王英姿, 等. 基于不同网格尺度福州主城区鸟类多样性与景观特征的关系研究[J]. *生态学报*, 2023, 43(18): 7670-7681. DOI: 10.20103/j.stxb.202306071214.
- [7] SURIPTO B, LINDASARI N, HENDRY N. Campuses in Yogyakarta as a bird habitat[J]. *AIP Conference Proceedings*, 2020, 2260(1): 020014. DOI: 10.1063/5.0016499.
- [8] LIU Jiajia, ZHAO Yunpeng, SI Xingfeng, *et al.* University campuses as valuable resources for urban biodiversity research and conservation[J]. *Urban Forestry and Urban Greening*, 2021, 64: 127255. DOI: 10.1016/j.ufug.2021.127255.
- [9] MIRONOV S, CHANDLER C. New feather mites of the genus *Amerodectes* Valim and Hernandez (Acariformes: Proctophyllodidae) from passerines (Aves: Passeriformes) in Georgia, USA[J]. *Zootaxa*, 2017, 4344(2): 201-245. DOI: 10.11646/zootaxa.4344.2.1.
- [10] ZHANG Wenjing, LIANG Chenxia, LIU Jun, *et al.* Species richness, phylogenetic and functional structure of bird communities in Chinese university campuses are associated with divergent variables[J]. *Urban Ecosyst*, 2018, 21: 1213-1225. DOI: 10.1007/s11252-018-0803-5.
- [11] 黎思涵, 刘金福, 兰思仁, 等. 福建农林大学校园鸟类种类的多样性特征[J]. *武夷科学*, 2014, 30: 1-8. DOI: 10.15914/j.cnki.wywx.2014.00.001.
- [12] 梁宇, 韦柳凤, 黄玲玲, 等. 玉林师范学院东校区植物群落结构对校园鸟类的影响[J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(13): 113-117, 126. DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2020.13.026.
- [13] 赵海鹏, 曹颖, 刘雪燕, 等. 河南大学校园鸟类再报[J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2022, 52(4): 430-440. DOI: 10.15991/j.cnki.411100.2022.04.007.
- [14] 孙喜娇, 胡灿实, 张明明, 等. 贵州大学校园及周边绿地的鸟类多样性及其与景观格局间关系[J]. *四川动物*, 2018, 37(6): 693-702. DOI: 10.11984/j.issn.1000-7083.20180055.
- [15] 佟富春, 陆红璇, 袁千允, 等. 华南农业大学校园鸟类多样性分析[J]. *福建林业科技*, 2023, 50(2): 70-76. DOI: 10.13428/j.cnki.fjlk.2023.02.013.
- [16] 姚雨欣, 舒美英, 傅东示, 等. 浙江农林大学不同生境鸟类群落的多样性[J]. *中南农业科技*, 2023, 44(6): 170-173, 188.

- [17] 李波,曾星月,贺萌,等.山地校园鸟类多样性及其生境特征研究:以重庆大学A区为例[J].园林,2023,40(2):28-34. DOI:10.12193/j.laing.2023.02.0028.004.
- [18] 韩丹妮,罗旭,马长乐,等.昆明校园绿地因子与鸟类多样性关系研究:以昆明两所高校为例[J].西部林业科学,2022,51(1):132-140,147. DOI:10.16473/j.cnki.xblykx1972.2022.01.020.
- [19] 彭子嘉,高天,师超众,等.校园绿地植被结构、生境特征与鸟类多样性关系[J].生态学杂志,2020,39(9):3032-3042. DOI:10.13292/j.1000-4890.202009.014.
- [20] 杨程,罗青青,赵文秀,等.黔南民族师范学院校园及其周边绿地鸟类调查[J].安徽农业科学,2020,48(16):98-101,142. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.16.026.
- [21] 刘金梅,周博,梁伟.海南师范大学龙昆南校区的校园繁殖鸟类[J].海南师范大学学报(自然科学版),2020,33(4):419-423. DOI:10.12051/j.issn.1674-4942.2020.04.008.
- [22] 杨岚,亓东明,王静,等.西昌学院北校区校园冬季鸟类多样性及栖息地特征[J].野生动物学报,2015,36(2):197-201. DOI:10.19711/j.cnki.issn2310-1490.2015.02.012.
- [23] 郭少荣,陈凡,李一琳.南京市仙林大学城冬季鸟类多样性初步调查:以文澜路3所高校为例[J].江苏林业科技,2019,46(2):25-31. DOI:10.3969/j.issn.1001-7380.2019.02.007.
- [24] 亓东明,杨岚,王静等.西昌学院北校区校园冬季鸟类区系组成与群落结构[J].畜牧与饲料科学,2015,36(4):27-32. DOI:10.16003/j.cnki.issn1672-5190.2015.04.009.
- [25] 曹长雷,郭心怡,由玉岩,等.长江师范学院校园鸟类对人为侵扰的适应性研究[J].西南师范大学学报(自然科学版),2016,41(1):132-137. DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2016.01.023.
- [26] 郑冬杰,李媛,毕文奇.西南林业大学校园鸟类警戒行为初探[J].畜牧兽医科技信息,2023(6):31-33. DOI:10.3969/J.ISSN.1671-6027.2023.06.012.
- [27] 曹煜方,姜智俊,王红兵,等.上海师范大学奉贤校区内植物与鸟类共生关系探究[J].上海师范大学学报(自然科学版),2022,51(01):70-79. DOI:10.3969/J.ISSN.1000-5137.2022.01.009.
- [28] 刘晓芳,齐涛,吴昕怡.城市公园景观文化服务实现度量化评价[J].华侨大学学报(自然科学版),2022,43(2):206-215. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.20210477.
- [29] 袁炯炯,孟庆林,袁彦峰.厦门地区典型农村住宅夏季室内热环境实测与分析[J].华侨大学学报(自然科学版),2017,38(1):53-57. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.201701010.
- [30] 李登泰,包小样,王维熙,等.仁怀市鸟类群落结构与多样性分析[J].山地农业生物学报,2024,43(1):64-72. DOI:10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2024.01.008.
- [31] 樊涵,耿彦飞,胡国雄,等.传统村落野生动植物物种多样性及相关资源利用特征分析:以贵州省贵阳市花溪区镇山村大寨为例[J].山地农业生物学报,2021,40(5):48-55. DOI:10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2021.05.008.
- [32] 刘阳,陈水华.中国鸟类观察手册[M].长沙:湖南科学技术出版社,2021.
- [33] 唐兆和,陈友铃,唐瑞干.福建省鸟类区系研究[J].福建师范大学学报(自然科学版),1996,12(2):77-87.
- [34] 王鹏,陈天恩,隋佳容,等.河南开封柳园口省级湿地自然保护区及其南侧区域鸟类群落的多样性[J].湿地科学,2024,22(1):38-51. DOI:10.13248/j.cnki.wetlandsci.2024.01.005.
- [35] 陈志强,付建平,赵欣如,等.北京圆明园遗址公园鸟类组成[J].动物学杂志,2010,45(4):21-30. DOI:10.13859/j.cjz.2010.04.011.
- [36] 叶佳伟,闫淑君,廖剑威,等.城市公园植物群落对鸟类多样性影响的研究进展[J].四川林业科技,2022,43(6):116-121. DOI:10.12172/202201110002.
- [37] SOIFER L, DONOVAN S, BRENTIENS E, *et al.* Piecing together cities to support bird diversity: Development and forest edge density affect bird richness in urban environments[J]. Landscape and Urban Planning, 2021, 213:104122. DOI:10.1016/j.landurbplan.2021.104122.
- [38] SABO S. Niche and habitat relations in subalpine bird communities of the white mountains of new hampshire[J]. Ecological Monographs, 1980, 50(2):241-259. DOI:10.2307/1942481.
- [39] ANDERLE M, BRAMBILLA M, HILPOLD A, *et al.* Habitat heterogeneity promotes bird diversity in agricultural landscapes: Insights from remote sensing data[J]. Basic and Applied Ecology, 2023, 70:38-49. DOI:10.1016/j.baae.2023.04.006.

(责任编辑:陈志贤 英文审校:刘源岗)

华侨大学化工学院(系)成立 60 周年庆典大会暨 华侨大学化工学科发展战略研讨会

60 周年院庆是华侨大学化工学院总结经验、擘画未来、凝聚力量、推动高质量发展的重要契机。为回顾发展历史,展现办学成就,汇聚校友力量,增强发展合力,进一步推进学院科学发展、跨越发展,学院将在全年举办学术、文化、人才培养、校友交流等系列活动,并于 12 月 7 日举行学院办学 60 周年庆典活动。

光阴荏苒,弦歌不辍。我们热忱期待各级领导、兄弟院校、合作单位、海内外校友和各界宾朋拨冗与会,重温青春时光、畅叙情谊、共襄盛举,携手共谱化工学院崭新华章!

特此公告,敬祈周知。

联系人:林静

工作邮箱:71108588@qq.com

华侨大学化工学院院庆筹备组

化工学院院庆日程表

日期	时间	主要内容	地点
12 月 7 日	上午	嘉宾、校友报到	华侨大学厦门园区化工学院
12 月 7 日	14:30—15:30	华侨大学化工学院(系) 建院 60 周年庆典大会	华侨大学厦门园区 王源兴会议中心
12 月 7 日	15:30—17:30	华侨大学化工学科 发展战略研讨会 校园参观、班级活动、校友友谊赛	华侨大学厦门园区王源兴会议中心 华侨大学厦门园区教学楼群
12 月 7 日	19:30—21:30	华侨大学化工学院迎新晚会 暨华侨大学化工学院(系) 建院 60 周年庆典晚会	华侨大学厦门园区 王源兴会议中心
全年	任意时间	校友班级师生聚会活动	按班级意愿组织更多座谈分场 或其他类型聚会活动

注:具体内容安排可能根据实际情况进一步变动或完善。

《华侨大学学报(自然科学版)》征稿简则

《华侨大学学报(自然科学版)》是华侨大学主办的,面向国内外公开发行的自然科学综合性学术刊物。本刊坚持四项基本原则,贯彻“百花齐放,百家争鸣”和理论与实践相结合的方针,广泛联系海外华侨和港、澳、台、特区的科技信息,及时反映国内尤其是华侨大学等高等学府在基础研究、应用研究和开发研究等方面的科技成果,为发展华侨高等教育和繁荣社会主义科技事业服务。本刊主要刊登机械工程及自动化、测控技术与仪器、电气工程、电子工程、计算机技术、应用化学、材料与环境工程、化工与生化工程、土木工程、建筑学、数学和管理工程等基础研究和应用研究方面的学术论文,科技成果的学术总结,新技术、新设计、新产品、新工艺、新材料、新理论的论述,以及国内外科技动态的综合评论等内容。

1 投稿约定

- 1.1 作者应保证文稿为首发稿及文稿的合法性;署名作者对文稿均应有实质性贡献,署名正确,顺序无争议;文稿中所有事实均应是真实的和准确的,引用他人成果时,应作必要的标注;不违反与其他出版机构的版权协议及与其他合作机构的保密协议;无抄袭、剽窃等侵权行为,数据伪造及一稿两投等不良行为。如由上述情况而造成的经济损失和社会负面影响,由作者本人负全部责任。
- 1.2 自投稿日期起2个月之内,作者不得另投他刊。2个月之后,作者若没有收到反馈意见,可与编辑部联系。无论何种原因,要求撤回所投稿件,或者变更作者署名及顺序,需由第一作者以书面形式通知编辑部并经编辑部同意。
- 1.3 作者同意将该文稿的发表权,汇编权,纸型版、网络版及其他电子版的发行权、传播权和复制权交本刊独家使用,并同意由编辑部统一纳入相关的信息服务系统。
- 1.4 来稿一经刊用,编辑部将按篇一次性付给稿酬并赠送该期刊物。本刊被国内外多家著名文摘期刊和数据库列为收录刊源,对此特别声明不另收费用,也不再付给稿酬。
- 1.5 其他未尽事宜,按照《中华人民共和国著作权法》和有关的法律法规处理。

2 来稿要求和注意事项

- 2.1 来稿务必具有科学性、先进性,论点鲜明、重点突出、逻辑严密、层次分明、文字精练、数据可靠。
- 2.2 论文题名字数一般不超过18字,必要时可加副题。文中各级层次标题要简短明确,一般不超过15字,且同一层次的标题应尽可能“排比”。
- 2.3 署名作者应对选题、研究、撰稿等作出主要贡献并能文责自负,一般以不超过3名为宜。作者单位应标明单位、所在城市、省份及邮政编码。
- 2.4 摘要应包括研究的目的、使用的方法、获得的结果和引出的结论等,应写成独立性短文且不含图表和引用参考文献序号等。其篇幅一般以150~250字左右为宜,关键词以4~8个为宜。
- 2.5 量和单位符号等要符合国家标准和国际标准。
- 2.6 能用文字说明的问题,尽量不用图表;画成曲线图的数据,不宜再列表。图表应有中英文标题。
- 2.7 参考文献仅选最主要的,且已公开发表的,按规范的内容、顺序、标点书写列入,并按其在文中出现的先后次序进行编号和标注。参考文献不少于15篇,未公开发表的资料不引用。
- 2.8 英文摘要尽可能与中文摘要对应,包括题目、作者姓名、作者单位、摘要、关键词。用过去时态叙述作者工作,用现在时态叙述作者结论,并符合英文写作规范。
- 2.9 文稿首页地脚处依次注明收稿日期;通信作者为可联系作者的姓名、出生年、性别、职称、学历、研究方向、电子邮件地址;基金项目为课题资助背景及编号,可几项依次排列。
- 2.10 请登录本刊唯一官方网站(<https://hdxh.hqu.edu.cn>)进行在线投稿,本刊不接受其他方式投稿。

- 《中文核心期刊要目总览》
- RCCSE 中国核心学术期刊
- 中国期刊方阵“双效期刊”
- 中国科技论文在线优秀期刊
- ISTIC 中国科技核心期刊
- 全国优秀科技期刊
- 华东地区优秀期刊

本刊被以下国内外检索期刊和数据库列为固定刊源

- 美国《化学文摘》(CAS)
- 波兰《哥白尼索引》(IC)
- “STN 国际”数据库
- 中国科学引文数据库
- 中国科技论文统计期刊源
- 中国学术期刊(光盘版)
- 中文科技期刊数据库
- 中国力学文摘
- 中国生物学文摘
- 中国数学文摘
- 俄罗斯《文摘杂志》(AJ, VINITI)
- 荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus)
- 德国《数学文摘》(Zbl MATH)
- 中国学术期刊综合评价数据库
- 中国期刊网
- 万方数据库
- 中国机械工程文摘
- 中国化学化工文摘
- 中国无线电电子学文摘
- 中国物理文摘

华侨大学学报(自然科学版)

JOURNAL OF HUAQIAO UNIVERSITY

Huaqiao Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban)

(NATURAL SCIENCE)

(双月刊, 1980 年创刊)

(Bimonthly, Started in 1980)

第 45 卷 第 5 期 (总第 199 期) 2024 年 9 月 20 日

Vol. 45 No. 5 (Sum 199) Sep. 20, 2024

主管单位: 福建省教育厅

Competent Authority: The Education

主办单位: 华侨大学

Department of Fujian Province

(中国福建泉州 362021)

Sponsor: Huaqiao University

(中国福建厦门 361021)

(Quanzhou 362021, Fujian, China)

编辑出版: 华侨大学学报自然科学版编辑部

(Xiamen 361021, Fujian, China)

电话: 0595-22692545

Editor in Chief: HUANG Zhongyi

电子信箱: journal@hqu.edu.cn

Edited and Published by Editorial

网址: https://hdxh.hqu.edu.cn

Department of Journal of

Huaqiao University (Natural Science)

主 编: 黄 仲 一

Tel: 0595-22692545

印 刷: 泉州晚报印刷厂

E-mail: journal@hqu.edu.cn

国内发行: 福建省泉州市邮政局

https://hdxh.hqu.edu.cn

订购处: 全国各地邮政局(所)

Distributed by China Publication Foreign

国外发行: 中国出版对外贸易总公司

Trading Corporation

(北京 782 信箱, 邮政编码 100011)

(P. O. Box 782, Beijing, 100011, China)

中国标准连续出版物号: ISSN 1000-5013
CN 35-1079/N

ISSN 1000-5013

国内邮发代号: 34-41

国内定价: 10.00 元/册
60.00 元/套

国外发行代号: NTZ 1050

