

生物冰核和生物氢的应用 ——划时代的生物工程

闵九康 王羲元 主编

中国农业科学技术出版社

生物冰核和生物氢的应用 ——划时代的生物工程

闵九康 王羲元 主编

中国农业科学技术出版社

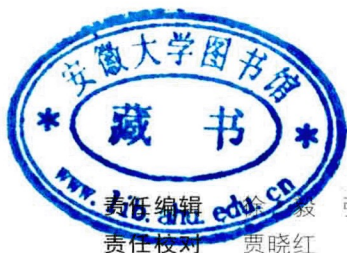
图书在版编目 (CIP) 数据

生物冰核和生物氢的应用: 划时代的生物工程 / 闵九康, 王羲元
主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2015. 3

ISBN 978 - 7 - 5116 - 2005 - 7

I. ①生… II. ①闵…②王… III. ①生物工程 IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 039703 号



出 版 者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010)82106636 (编辑室) (010)82109702 (发行部)
(010)82109709 (读者服务部)
传 真 (010)82106636
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 各地新华书店
印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司
开 本 850mm × 1 168mm 1/32
印 张 4. 125
字 数 100 千字
版 次 2015 年 3 月第 1 版 2015 年 3 月第 1 次印刷
定 价 32.00 元

版权所有 · 翻印必究

《生物冰核和生物氢的应用 ——划时代的生物工程》 编委会

主 编：闵九康 王羲元

副主编：黄辉标 宁哲斌 于和军

编 委：于和军 王羲元 宁哲斌 闵九康

沈育芝 孟凡同 妥国栋 符国栋

胡喜娜 韩先旭 黄辉标 游有林

陶天申 魏 刚

内容简介

全书共 10 章，主要论述了如下内容：生物冰核的作用及其应用；生物冰核的生产和喷散技术；生物造雪、生物降雨和生物驱散雾霾；生物氢（ H_2 ）——永不枯竭的无碳能源；生物氢的生产和应用；生物氢生产技术的进步和展望；柠檬酸细菌和巴氏芽孢梭菌的产氢能力等。

本书可供大专院校师生、科学研究系统的专家和学者，以及有关部门的领导和工程技术人员等阅读和参考。

序

闵九康教授一生勤奋好学，知识渊博，硕果累累，著述等身，其新作《生物冰核和生物氢的应用——划时代的生物工程》一书即将问世，为此，我欣然为其作序，并祝贺新书的出版。

随着生物技术的发展，越来越多的人开始关注生物领域，开始认识生物技术在节能减排、环境保护及农业生产中的重要作用。生物技术不仅关系到农业的可持续发展，也关系到人类的生存环境和粮食安全。同时，与人类健康长寿、与环境质量的关系也极为密切。

在美国及许多发达国家，生物造雪、生物降雨和生物驱散雾霾以及生物净化水质等都已成功地实践了商业化的标准程序和商业运作，并成为常规的生物技术。

当今，最严重的环境问题之一就是全球气候变暖，主要由矿物燃料大量的应用所引发。矿物燃料的燃烧除产生大量的温室气体（ CO_2 ）外，还产生氧化硫和氧化氮（ SO 和 NO_x ）。这类氧化物及其衍生物的发射导致了酸雨，从而破坏了天然生态系统的平衡。近年来，发达国家和发展中国家都在致力于开发生物能源氢（ H_2 ），并取得了可喜的成效，其中日本居世界第一，德国其次，美国名列第三，印度位列第四。目前，全世界都十分关注生物 H_2 能源的重要作用和在环境保护中的意义，许多国家都认为，生物氢（ H_2 ）是最有希望可以应用的生物技术之一。所以，生物氢（ H_2 ）的生产和发展前景十分乐观。

生物技术对氢能源的生产和应用具有至关重要的意义。现已

研发了两个阶段的发酵过程，以产生氢（ H_2 ）和甲烷（ CH_4 ）的混合气体。第一阶段产生 H_2 和有机酸。第二阶段将有机酸转化为 CH_4 。这种混合气体的最大优点是 $H_2 - CH_4$ 混合气体。这种 $H_2 - CH_4$ 混合气体生产成本低，效益明显，并可大大降低对环境的污染。目前，此项技术已在一些发达国家投入了生产。

《生物冰核和生物氢的应用——划时代的生物工程》一书，内容新颖，取材广泛，理论联系实际，值得一读。我深信，该书的出版将会对生物技术的理论和实践起到积极的推动作用。

武汉大学教授

Handwritten signature in black ink, reading '姚天中' (Yao Tianzhong).

2015 年 1 月 30 日

前 言

生物冰核和生物氢的生产与应用是划时代的两项重大生物工程，具有重大的战略意义，将为子孙万代创造优良和健康的环境。

我和同事们经过十余年的悉心研究和广泛的收集信息，现已掌握了生物冰核和生物氢的生产和应用技术，并拥有了有效的基因工程菌和成功地大规模培养发酵工程菌的工艺和专利。

生物冰核在国际上已成功地用于商业运行，并取得了巨大的经济效益。它可用于人工造雪、人工降雨、人工驱散雾和霾及防治冰雹的发生等。现在化学冰核主要以碘化银和溴化银，以及难以处理的干冰（固体 CO_2 ）为主，成本高，并会造成二次污染。而生物冰核价廉物美，节能环保，所需成本仅为化学冰核的 60%。所以，生物冰核的生产与应用被誉为 21 世纪的环保旗舰和最高的科学技术产品（State-of-the-art）。

生物能源氢（ H_2 ）是永不枯竭的无碳能源。它是最有希望和最有利益于环境，并有利于农业持续发展的新兴科学技术的产业（用 1kg 作物残体可制造出 50L 生物氢）。目前，全世界正在努力进行研究和发 展，我国亦已开始了生物氢的研发，此项技术的开发应用将具有巨大的市场前景。现在，我们将成熟的技术和资源编撰成了《生物冰核和生物氢的应用——划时代的生物工程》一书，并将由中国农业科学技术出版社出版。该书内容新颖，取材广泛，理论联系实际，不失为当代科学技术创新的优秀著作。

本书能及时出版，完全得益于中国农业科学技术出版社的编

辑和领导的关怀与支持，得益于中国农业科学院、浙江大学、北京林业大学和南京九康壹可农业科技有限公司的教授、学者们的精心撰稿和校阅。在此，我对他们付出的辛勤劳动表示深深的谢意。

最后，十分感谢我国著名微生物学家陶天申教授不顾八秩高龄为本书作序，在此，我深表敬佩和谢意，并遥祝他健康长寿。由于作者水平有限，错误和不足之处在所难免，敬请读者批评指正。

闵九康

2015 年元旦

目 录

第一章 生物冰核的作用及其应用	(1)
导言	(1)
一、植物的耐冻性	(2)
二、植物的抗冻性	(3)
三、植物的冻害	(4)
四、植物和真菌的冰核作用活性	(6)
五、冻害的防治	(7)
第二章 生物冰核 (Biological Ice Nucleators) 的生产 工艺和应用技术	(9)
导言	(9)
一、Ina 细菌的发酵技术和展望	(10)
二、生物冰核技术的商业化进程	(11)
三、摘要	(14)
第三章 生物氢 (H_2) ——永不枯竭的无碳能源	(17)
导言	(17)
一、产生氢气的微生物	(20)
二、生物氢 (H_2) 的生产	(22)
三、光合生物氢 (H_2) 的生产	(27)
四、生物氢生产的相关因子	(35)
五、结语和建议	(38)
第四章 微生物氢的生产和应用	(40)
导言	(40)
一、生物氢的产生	(42)
二、结论	(64)
第五章 生物氢生物技术的进步和展望	(65)
导言	(65)
一、生物氢的生产	(66)

二、有光条件下的产氢过程	(68)
三、黑暗条件下的产氢过程	(70)
四、生物氢的未来展望	(72)
第六章 生物氢发生的动力学	(73)
一、悬浮式生长系统	(73)
二、填充柱系统	(77)
三、液体流动床系统	(79)
四、影响厌气发酵过程的速率	(79)
五、生物氢发酵装置的设计	(85)
第七章 固氮蓝细菌 (<i>Anabaena</i> SP.) 的好气产 H_2 及其积累	(87)
导言	(87)
一、材料和方法	(88)
二、结果和讨论	(90)
第八章 柠檬酸细菌 (<i>Citrobacter intermedius</i>) 和巴氏芽孢梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>) 的产氢能力	(94)
导言	(94)
一 材料和方法	(94)
二、结果和讨论	(96)
第九章 葡萄糖脱氢酶和氢化酶的产氢过程	(104)
导言	(104)
一、材料与方法	(104)
二、结果和讨论	(105)
第十章 生物反应器 (发酵罐) 中固定细胞的产 H_2 技术	(111)
导言	(111)
一、试验材料和方法	(111)
二、结果和讨论	(114)
参考文献	(118)

第一章 生物冰核的作用及其应用

导 言

生物冰核的作用已在广泛的科学基础上引起了科学家的兴趣和高度的关注。植物生理学家和农学家发现，农业上重要霜冻敏感程度都与冰核作用有关。当冰核（Ice nucleators）是一种很小的腐生物细菌时，它便成为主要的异质冰核剂。这种现象大大地激发了微生物学家和生物化学家的兴趣。冰核还可用于冰核活性基因（INA genes）以作为转录作用和转导作用的报道基团。现已发现，腐生细菌是大气中冰核的重要来源。因此，生物冰核又引起了气象学家的兴趣。

生物冰核作用也能调控冷血动物冬季的生存状况。许多不耐冻的昆虫为避免冻死，可通过内在发生的冰核作用而抑制温度的下降。相反，一些耐冻昆虫则能合成冰核蛋白质以确保在零下低温时出现冰冻。同样，冰核作用的温度也是细胞和组织低温贮藏时的一种临界因子。

异质冰核作用现象虽然长期备受关注，但是在 20 世纪 70 年代以前却无人问津。现已发现，自然界最活跃的冰核乃是生物源。这一发现，引发了全球一系列会议的召开，许多论文和评述的发表。

在生物系统中有关冰核作用的科学论文和专著如雨后春笋般的出现。因为，该项技术的研究范围十分宽广。其中主要有气象学，细菌学，植物生理学，农学和冷血动物（特别是昆虫）耐冻生物学，以及冰核作用在医药，低温生理学，食品科学，以及

人工造雪，人工造雨和驱散雾霾技术中的应用。

现在，全世界都十分重视该项技术的开发和应用，并特别强调和重点研究了如下内容。

1. 冰核作用的原理
2. 细菌冰核作用的发现及其在植物冻害中的作用
3. 冰核作用生态学 - 活性细菌
4. 细菌冰核的生物化学
5. 冰核活性基因 (INA genes) 和蛋白质的鉴定与分析
6. 细菌冰核活性蛋白质 (INA proteins) 三维结构的分子模拟
7. 植物的耐冻性
8. 冰核作用活性与植物和真菌的关系
9. 木本植物深度超冷和细胞壁结构的作用
10. 木本植物花芽的深度超冷过程
11. 腐生菌冰核作用的调控——植物冻害的管理技术
12. 利用冰核微生物对昆虫进行生物防治
13. 冰核作用基因——报道基因
14. 细菌冰核活性在食品加工中的应用
15. 冰核作用在低温贮存中的作用
16. 生物冰核的喷洒技术

一、植物的耐冻性

粮食和纤维生产，是最重要的全球实业，其通过贸易使各国相互联系和交流。许多有经济实力的国家会从大量生产粮食和纤维的国家购置这类产品。各国不同的气候和气象条件，如霜冻和干旱，都会导致农产品产量和品质的下降，从而对生产国家造成极大的经济损失。即使大国在其某些地区乃至全国也会因一种非生物胁迫造成作物产量的严重损失。例如，在加拿大西部 1992

年8月中旬出现非季节性霜冻而使作物损失超过10亿美元。由于霜冻，不仅造成减产，而且造成品质下降。因此，由高品质制造面包的面粉往往会变为价值较低的饲料。这样，不仅对面包生产者造成极大的损失，而且也影响了小麦处理厂、铁路、国际贸易、面粉厂和农场的经济效益。

温带作物的生长季节一般由温度和无霜期所确定。全球变暖导致温度升高，从而使农作物早出苗，早抽穗。因此，这也增加了非季节性霜冻的危险。因温度升高，果树也会提早开花，从而也会遭到霜冻的危害。

由于霜冻在植物分布以及作物产量和质量形成过程中起着重要的作用，所以防治和避免霜冻无论是从实用还是研究水平上现时都受到了极大的关注。植物组织在零下时便会出现霜冻的危害。最近发现了生物冰核，所以科学家便提出了许多利用生物冰核防治冻害的方法。在缺乏冰核时，当温度降至零下几度时，水亦不会结冰。生物冰核如细菌或真菌，它们都是外在冰核剂(entrinsic agents)。这种外源冰核剂的结冰起始温度近于零度。最近的证据表明，在植物中也存在着内在冰核，它的结冰起始温度在零度以下。与之相比，某些花芽，如杜鹃花植物的花芽和硬木质树的花芽，它们都缺乏内在和外在冰核。因此，杜鹃花花芽能耐 $-20 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 的超冷。美国榆树的木质部髓射线柔软组织细胞则在冬季能耐 -45°C 的超冷。

二、植物的抗冻性

自然界的植物会通过一些不同类型的冷冻胁迫，这些冰冻胁迫主要有非季节性霜冻（正常期为正常季节）和极度低温（当植物休眠和生长不活跃时则属正常温度）。根据最低温度原理，植物会部分地受伤害或冻死，其结果是造成减产，质量下降，甚至绝收。在春夏两季植物的旺盛生长阶段，结冰的瞬间便会冻

死，如黄瓜（ $-3 \sim -2^{\circ}\text{C}$ ），而禾谷类作物则能耐冰点至 -9°C 。一些冬季作物则能适应秋天的温度低至 -30°C 。大部分耐寒植物如多年生木本植物在活跃的生长期不会耐 -30°C 的温度。但是，当完全适应低温后，这类植物则会耐 -196°C 的低温。

不耐寒植物，当组织中结冰时，不管其结冰的起始温度如何，它们都会遭到冻害。植物组织中结冰会导致机械损伤和/或脱水伤害。如果在零下温度时结冰，那么，细胞中的水分就能耐超冷冻，而且不会发生伤害。所以，不耐寒植物为抗冷冻而保存自己，就必须避免和躲开结冰的危害。耐寒植物如能将细胞质中的水排出，那么它就能耐组织的结冰。耐寒植物耐冰冻的能力取决于许多因子，这些因子有结冰点，结冰的温度，结冰过程中冷冻速度，冰核增大速度，曝光的最小温度和曝光冰冻过程等因子。温带植物对低冷温度适应的固有能力和其适应的速度是限止低温生存的两个重要因子。植物对低温的适应是一个复杂的遗传特性，它是由低温诱导而发生，并导致形态和分子的变化。最近，植物超冷学方面的进展，以及与冷冻适应性有关的基因确认和坚定大大地增强了我们对植物抗冰冻原理的了解。

三、植物的冻害

在植物生长期间，天气晴朗和无风的夜晚所出现的放射状霜冻是最为普通的冰冻类型。与天空快速散热平行的定向大叶片通过背面体辐射而朝向上空，并能将温度冷却至周围环境温度以下。所以，在平时冷凉时叶片和空气温度会以类似的速度下降，其是由流入的冷空气所致，而且，在植物生长季节也会发生这种现象。如前所述，某些不耐寒的植物组织，如黄瓜和番茄，它们在冰核形成的一刻就会受到冻害。因此，这些植物为了有效地避免非季节性霜冻，它们必然会通过降低组织中水分的冰点或通过最大地增加超冷程度和超冷进程而免遭冻害。

在严酷的冬季条件下可以生存的多年生植物，它们能在秋季形成耐冻特性。冰核形成的温度和位置对最终的耐冻水平有着深刻的作用。一般而论，在冰冻以前，植物已经受了超冷条件，因此，在持续结冰冰冻过程中，它们更会受到伤害。Siminovitch 和 Scarth 曾指出，耐寒植物于冰冻前持续遭受超冷，那么，细胞冻死的可能性就会增加。科学家证实，初始冰核形成的温度接近零度时有可能降低植物的伤害程度。随后 Olien 进一步证明，超冷能促进冷冻的失衡，从而不会对植物组织造成伤害。在明显地超冷以后的快速冷冻失衡过程而形成冰核时有大量的 Gibbs 自由能，这种自由能对冰核—液界面植物组织的破坏提供了能源。能在 -3°C 时结冰的冬小麦花冠组织，它的抗冻性就比 0°C 以下结冰的品种要差。

Rajasherar 等测定了茄品种 (*solanum acaule*) 叶片在 -1°C 时会结冰，从而可在 -7°C 时仍能存活。但如果叶片在 -3°C 时结冰，那么它们便会在这一温度被冻死。类似的研究报告表明，梅品种 (*prunus* spp.) 的花芽亦会出现这种现象。这些研究证明，就大部分植物品种而言，如果初始结冰的温度为 0°C ，那么植物就能耐较低的温度而成活（与发生超低温相比）（表）。

表 在田间条件下植物结冰起始平均温度

品种	结冰起始温度 ($^{\circ}\text{C}$)
桃 (<i>prunus persica</i>)	-1.6
苹果 (<i>Malus domestica</i>)	-1.3
欧洲水青冈 (<i>fagus sylvatica</i>)	-1.6
木来木 (<i>cornus florida</i>)	-1.8
纯刺冬青 (<i>Ilex crenata</i>)	-1.6
圆柏 (<i>Juniperus chinensis</i>)	-1.3
西洋梨 (<i>pyrus communis</i>)	-2.1

(续表)

品种	结冰起始温度 (°C)
山莓等品种 (<i>Rubus communis</i>)	-1.6
美国五针松 (<i>pinus strobus</i>)	-1.2
冬北红豆杉 (<i>Taxus cuspidata</i>)	-2.0
番茄 (<i>Lgcopersicon esculentum</i>)	-2.0
玉米 (<i>Zea mays</i>)	-2.5
大豆 (<i>Glgcine max</i>)	-2.7
菜豆 (云扁豆) (<i>phaseolus vulgaris</i>)	-2.7
陆地棉 (<i>Gossypium hirsutum</i>)	2.5

冰核作用的微生物主要有列几属。

假单胞菌属 (*Pseuomonds*)

欧文氏菌属 (*Erwinia*)、(*Listeria*)、(*salmonella*)、(*vibrio fischeri*)

植物中一旦形成冰核，就会迅速转向胞内间隙，并蔓延到含有较多水分的大维管束。冰核又会从维管束通过胞外间隙而扩散，并不断移动，直至不含水分的植物组织或较温暖的区域停止。因为，在霜冻发展过程中，植物各部分的温度会有 5°C 的变化。在木质茎中，冰核移动速度会达到 60 ~ 74cm/min (试验室模拟结果)。在大田条件下，冰冻始于几个冰核点或冰核形成点，然后迅速扩散至维管束。在耐寒植物中，这是防止超冷的有效方法，而且可以减少细胞形成冰核的危险。

四、植物和真菌的冰核作用活性

生物冰核主要是由一些腐生细菌品种而形成。它们具有在较暖和温度条件下开始结冰的能力。