

两种光强条件下亚心形扁藻各生长阶段的产氢能力

刘润国, 虞星炬, 金美芳, 张 卫

(中国科学院 大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组, 辽宁 大连 116023)

摘要: 海洋亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*) 在光照生长后, 经过暗培养诱导其可逆产氢酶, 然后转移到光照下可产生氢气。在 300 mL 产氢反应器中对海洋亚心形扁藻产氢情况的考察表明, 不同的光强条件可导致扁藻产生不同的生长曲线, 而在不同的培养阶段, 扁藻的产氢能力也有很大的差别。其他培养条件相同, 高光强强度($E=13\ 000\ \text{lx}$) 条件下, 扁藻生长较快, 而且可以获得更大的产氢能力, 300 mL 密度为 3×10^6 个/mL、叶绿素质量浓度为 5.8 mg/L 的藻液最大产氢浓度可达 17.5%, 比低光照强度($E=5\ 000\ \text{lx}$) 时提高了 32%, 叶绿素含量降低了 61%。根据产氢前后以及暗诱导后扁藻生理状态的考察结果, 可以推测出是不同生长阶段扁藻的生理状态差异导致了其产氢能力的变化。

关键词: 亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*); 生长阶段; 可逆产氢酶; 氢能

中图分类号: TQ02

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)03-0001-05

氢作为能源具有应用范围广、转化效率高、清洁可再生等优点, 从能源的资源量、对环境的影响以及世界经济可持续发展考虑, 预计氢能将在 21 世纪的能源结构中逐渐占据主导地位^[1]。因此迫切需要一种资源丰富、生产过程清洁、经济技术指标合理的制氢新技术。利用地球上储量最丰富的能源形式——太阳能和最大的氢源——水, 高效快速地转化为可用氢源, 将是完成这一目标的理想路线。

研究发现, 部分光合作用微生物体内含有吸光色素和氢酶, 可突破光催化剂禁带波长的限制, 更有效地利用太阳能制取氢能^[2]。这些微生物主要包括光合细菌和微藻^[3-6]。一些微藻可以利用太阳能和水制取氢气, 基本不受原料限制, 正逐渐成为太阳能光解水制氢研究的热点之一^[2, 7, 8]。微藻产氢包括蓝藻固氮酶制氢和绿藻可逆产氢酶制氢, 其中绿藻可逆产氢酶效率较高, 是目前国际上公认最有潜力的太阳能制氢方法之一^[9-12]。作者研究发现, 经过光照培养的海洋亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*), 暗培养诱导可逆产氢酶的表达后, 在一定浓度羰基氰化物间氯苯腙 (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, CCCP) 的作用下进行光照可产生氢气^[13]。而扁藻的光照培养作为扁藻产氢的原料供给及能量储存阶段, 在扁藻转化太阳能为氢能的过程中起着重要的作用。为进一步阐明光照培养阶段对海洋亚心形扁藻产氢的影响及其产氢过程中的生理生化变化规律, 作者研究了不同生长阶段亚心形扁藻的产氢能力以及产氢前后叶绿素、可溶

性总糖以及水溶性蛋白的变化, 以期进一步深入了解扁藻的产氢机理。

1 材料与方法

1.1 材料

亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*): 由辽宁省水产研究所提供, 经划线法 3 次纯化。

海水: 取自辽宁大连临海, 过滤后 121 °C 高温灭菌处理。

培养: 3 L 三角瓶, 2 L 培养藻液, 在光照培养室培养。

1.2 培养基

亚心形扁藻优化培养基: 2.0 mg FeCl₃、0.36 mg MnCl₂、33.6 mg H₃BO₃、45.0 mg EDTA、35.0 mg NaH₂PO₄、100 mg NaNO₃、0.21 mg ZnCl₂、0.20 mg CoCl₂、0.09 mg (NH₄)₂MoO₇·O₂·H₂O、0.20 mg CuSO₄·5H₂O、800 mg NaHCO₃、45.0 mg NH₄Cl、0.1 μg VB₁₂ 和 1.0 μg VB₁, 海水 1 L^[14]。

1.3 培养方法

扁藻置于 3 L 的三角烧瓶中进行培养, 培养体积 2 L, 接种密度 3×10^5 个/mL, 12 层无菌纱布封口,

收稿日期: 2005-04-22; 修回日期: 2005-07-28

基金项目: 国家 973 计划项目(2003CB214506)

作者简介: 刘润国(1978), 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物技术; 张卫, 通讯作者, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

培养温度 25℃, 光源为两组日光灯, 表面光强分别为: (a) 5 000 lx 和(b) 13 000 lx, 光暗比均为 14: 10, 初始 pH 值为 8. 2。藻细胞密度用血球计数板在 Olympus BH-2 光学显微镜(日本 Olympus 株式会社)下计数。

1.4 H₂ 的产生、收集和检测

取不同生长阶段的扁藻培养液, 2 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 细胞密度用离心上清液调整至 (280~ 320) × 10⁴ 个/mL。加入 1‰康威方营养盐(体积比)^[14], 然后用 1 mol/L 稀盐酸调整藻液 pH 值到 8. 2。取 300 mL 标准血浆瓶, 内装 300 mL 藻液, 以翻口橡皮塞密封瓶口, 输液器与藻液上部空间紧密连接, 充氮气 10 min, 放置于 25℃中暗培养 32 h 诱导可逆产氢酶表达, 然后加入 0. 3 mL 15 mmol/L 的 CCCP 溶液(CCCP 溶于 DMSO 中), 混匀 10 min 后, 放在光强为 13 000 lx、150 r/min 的回旋震荡条件下光照放氢。输液器另一端放入倒置的刻度试管中, 用排水取气法收集气体直至 8~ 10 h 后放氢结束。用 SRI 8610C 气相色谱仪(美国 SRI 科学仪器公司)进行气体分析, 分离柱用长 2 m 的 13X 分子筛, 载气为氩气, 热导式检测器的检测温度为 80℃。

1.5 几种胞内化合物含量的检测

叶绿素、可溶性总糖和水溶性蛋白的检测都是基于已调整细胞密度为 (280~ 320) × 10⁴ 个/mL 的扁藻藻液。

叶绿素含量采用丙酮酒精提取比色法测定, 取 5 mL 样品藻液, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 丙酮酒精溶液($V_{\text{丙酮}}: V_{\text{酒精}} = 2: 1$), 冰水浴中 400 W、超声时间 5 s, 间隔 3 s, 超声次数 15 次下破碎细胞, 静置 1 h, Jasco V-530 型紫外分光光度计(日本 Jasco 公司)测定 663 和 645 nm 下吸光度, 按公式 $C_{a+b} = 8. 02 \times A_{663\text{nm}} + 20. 20 \times A_{645\text{nm}}$ 计算叶绿素质量浓度(mg/L)^[15]。

可溶性总糖含量采用蒽酮比色法测定, 取 5 mL 样品藻液, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 三蒸水, 同样条件下破碎细胞, 放入 80℃水浴中 2 h, 静置 4 h, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上层清液 0. 1 mL, 加入 3 mL 蒽酮试剂, 90℃保温 15 min, 620 nm 比色, 同样方法制作标准曲线, 计算可溶性总糖质量浓度(mg/L)^[15]。

蛋白质含量的检测采用 G-250 考马斯亮蓝比色

法测定, 同可溶性总糖的检测一样对样品进行前处理至破碎细胞, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 0. 1 mL, 加入 5 mL G-250 溶液, 混匀显色 2 min, 595 nm 比色, 同样方法制作标准曲线, 计算水溶性蛋白质质量浓度(mg/L)^[15]。

2 结果与讨论

2.1 两种光强条件下扁藻各生长阶段的产氢情况

图 1 为两种光强条件下, 各生长阶段的扁藻用于诱导产氢的试验结果。(a) 与(b) 的培养条件除光照强度不同外, 其他条件一致, 其中(b) 条件下的光照强度为 13 000 lx, 要高于(a) 条件下的光照强度 5 000 lx。由图可见, 高光强下扁藻的生长速度明显快于低光强, 其最大比生长速率分别为

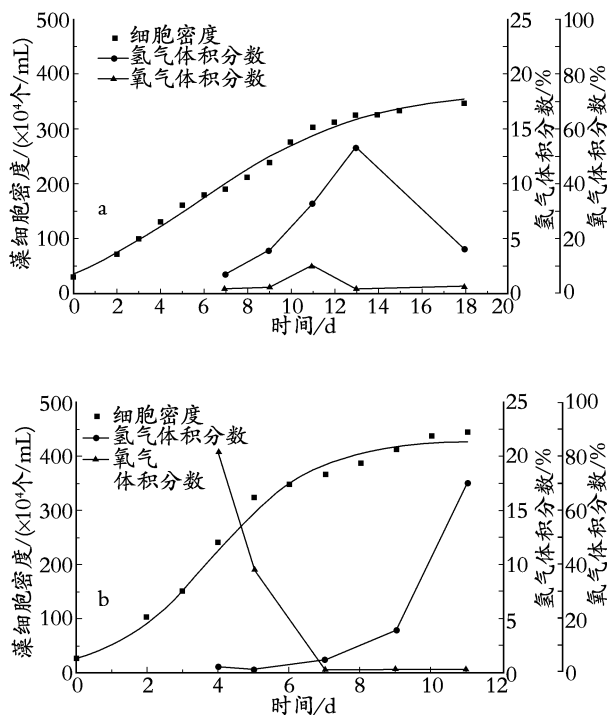


图 1 两种光强条件下亚心形扁藻生长动力学及不同生长阶段其产氢能力的变化

Fig. 1 Comparison of photobiological hydrogen production and oxygen evolution at different growth phases of *Platymonas subcordiformis* growing under two kinds of light intensity

a. 5 000 lx, b. 13 000 lx

7.7×10^5 和 2.6×10^5 个/(mL·d), 最高的生物密度分别为 4.5×10^6 和 3.5×10^6 个/mL。

从图 1 还可看出, 扁藻的生长阶段规律明显, 包含适应期、对数生长期、平台期这三个典型的细胞培养生长阶段, 而在不同生长阶段, 其产氢能力有着很大的差别。在图 1a 中, 光照强度较低, 扁藻生长较慢, 在其适应期和对数生长前期, 产氢能力慢慢增加, 并在对数生长中后期快速增加直至在对数生长末期(13 d)达到最大值, 此时 300 mL 密度为 3×10^6 个/mL、叶绿素质量浓度为 15 mg/L 的藻液产氢浓度为 13.3%, 其后进入平台期, 产氢能力逐渐下降。而在图 1b 中, 光照强度较高, 扁藻生长很快, 但培养直至进入平台期之前, 产氢能力很弱, 第 9 天产氢能力迅速增加并在第 11 天超过 a) 条件下的产氢能力最大值。二者相比, 高光照强度条件下, 单位细胞叶绿素的含量较低, 但扁藻生长快, 可用较少的时间(11 d)获得较大的氢气量, 300 mL 密度为 3×10^6 个/mL、叶绿素质量浓度为 5.8 mg/L 的藻液产氢浓度达 17.5%, 效率更高。

由此可见, 在其他培养条件一致的情况下, 在一定范围内提高光照强度, 不仅可以加快扁藻的生长速率, 而且还可获得更高的产氢能力。

2.2 两种光强条件下扁藻各生长阶段的叶绿素含量与产氢关系

由图 2 可见, 随着扁藻的生长, 单位细胞的叶绿素含量呈下降趋势, 而扁藻产氢前后及暗诱导后的叶绿素浓度变化不大。高光照强度、高生长速率下, 叶绿素的初始含量要大大低于低光照强度、低生长速率的扁藻。对比二者的产氢能力, 高光照强度下叶绿素含量最低的阶段产氢能力最强。

扁藻的光自屏蔽效应导致了随着光路通径的延伸, 入射光迅速衰减, 是制约扁藻生长和产氢阶段光能供应的重要因素之一^[16, 17]。本试验表明, 利用一定的高光照强度, 虽然损伤了叶绿素, 但同时可以降低单位细胞的叶绿素含量, 从而减弱扁藻的光自屏蔽效应, 最终提高扁藻的生长速率。且在高光照强度的培养条件下, 扁藻的产氢能力有一定的提高。

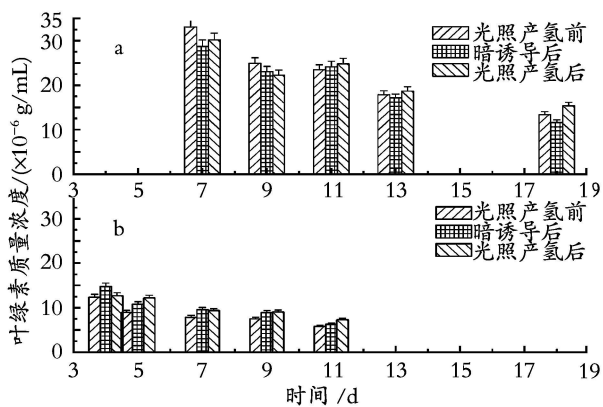


图 2 两种光强下不同生长阶段的扁藻产氢前后及暗诱导后叶绿素质量浓度比较

Fig. 2 Comparison of chlorophyll concentrations before and after H₂ production, as well as after dark adaptation at different growth phases of *Platymonas subcordiformis* growing under two kinds of light intensity
a. 5 000 lx; b. 13 000 lx

2.3 两种光强条件下扁藻各生长阶段的可溶性总糖含量与产氢关系

由图 3 可见, 扁藻产氢前后可溶性总糖含量变化十分明显。随着扁藻的生长, 其可溶性总糖的浓度呈增加趋势, 并于平台和死亡期达到最大, 产氢阶段消耗大量的累积总糖, 可溶性总糖含量降到了较低的水平。扁藻产氢暗诱导阶段需要维持细胞的正常生理生化活性, 这需要能量的供应, 可溶性总糖在暗诱导阶段的显著消耗说明培养阶段产生的可溶性总糖是其能量的来源之一。光照产氢阶段的能量供应除了试验供应的光能, 也有可溶性总糖的消耗产能。

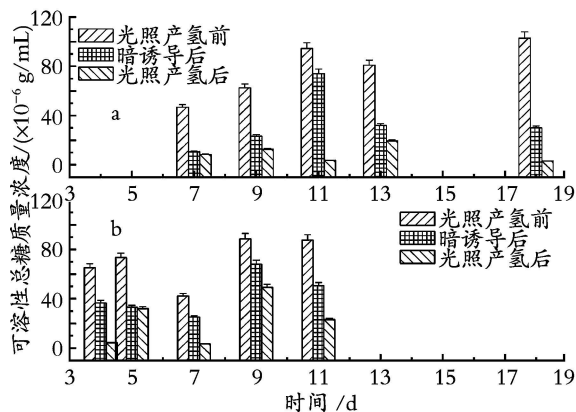


图 3 两种光强下不同生长阶段的扁藻产氢前后及暗诱导后可溶性总糖浓度比较

Fig. 3 Comparison of dissolved sugar concentrations before and after H₂ production, as well as after dark adaptation at different growth phases of *Platymonas subcordiformis* growing under two kinds of light intensity
a. 5 000 lx; b. 13 000 lx

2.4 两种光强条件下扁藻各生长阶段的水溶性蛋白质含量与产氢关系

从图 4 可见,低光照强度下,扁藻的培养前期,单位细胞水溶性蛋白的含量最高,其后含量保持一定的水平,平台期的含量有稍小的下降。而高光照强度下,单位细胞水溶性蛋白的含量保持在较为稳定的水平,总体也有略微的下降。二者相比,高光照强度下培养的扁藻,单位细胞水溶性蛋白的含量明显低于低光照强度下培养的扁藻。

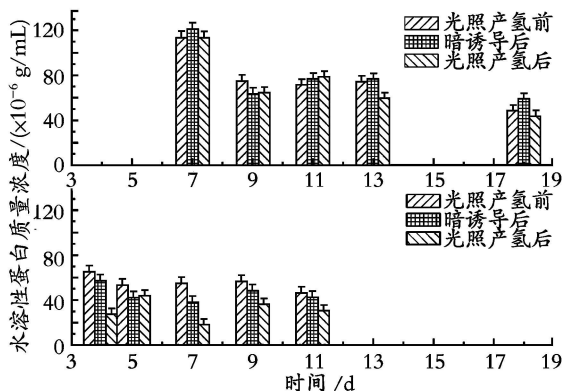


图 4 两种光强下不同生长阶段的扁藻产氢前后及暗诱导后水溶性蛋白质含量比较

Fig. 4 Comparison of soluble protein concentrations before and after H₂ production, as well as after dark induction at different growth phases of *Platymonas subcordiformis* growing under two kinds of light intensity
a. 5 000 lx; b. 13 000 lx

以上结果表明,同一接种细胞浓度的不同光强条件或不同培养阶段的扁藻,产氢能力显著不同,而获得产氢最大能力的阶段也并不恒定。优化扁藻培养基,保持适宜的温度、pH 条件,一定范围内提高光照强度,可以大大提高扁藻的生长速率。而提高光照强度,还可以降低藻液的叶绿素含量,减弱扁藻的自屏蔽效应,提高扁藻的产氢能力。

高光照强度下培养的扁藻,叶绿素、水溶性蛋白的含量明显低于低光照强度下培养的扁藻。在产氢过程的暗诱导和产氢阶段,藻液中的可溶性总糖被大量消耗以保持扁藻细胞正常的生命活动。如果保持藻液中可溶性总糖在一定的水平,从而减弱扁藻细胞在厌氧状态下的衰亡速度,将有可能延长扁藻的产氢时间,从而进一步提高扁藻的产氢能力。

由此可以看出,扁藻的产氢过程中,产氢能力的大小不仅取决于可逆产氢酶的诱导,也与产氢时扁藻的生理生化特性有着重要的关系。准确确定扁藻细胞的生理生化性质,深入了解不同培养条件及不同培养阶段下的扁藻产氢情况,从而确定扁藻产氢

的最优条件,可从宏观和微观方面共同考察。宏观方面,可以分析微藻细胞的叶绿素、可溶性总糖(或淀粉)、水溶性蛋白、脂类含量或者元素组成。微观上从分子水平入手,考察可以产氢酶的诱导情况及产氢过程中微藻细胞内部的生理生化状态,包括微藻细胞的物质、能量代谢等,是取得研究进展的重要途径。

3 结论

对两种不同光强条件扁藻的产氢情况以及此过程中细胞的一些生理生化特性进行了研究,发现不同的培养条件和生长阶段对扁藻的产氢能力影响甚大。在生长较慢的低光照强度下,产氢能力的最大值表现在培养阶段的对数生长期末期,而在生长较快的高光照强度下,表现在平台期。作者力求找到一个产氢效率较高、产氢能力较强的培养条件和生长阶段。结果表明,高光照强度($E = 13\ 000\ \text{lx}$)的条件下培养,减弱了扁藻细胞的自屏蔽效应,细胞密度在较短时间内到达平台期,达 4.5×10^6 个/mL,产氢能力也在此阶段到达最大值,300 mL 密度为 3×10^6 个/mL、叶绿素质量密度为 5.8 mg/L 的藻液最大产氢浓度可达 17.5%,与低光照强度($E = 5\ 000\ \text{lx}$)相比,最大产氢浓度提高了 32%,单位细胞叶绿素含量降低了 61%,此培养条件和生长阶段是较为合适的。

参考文献:

- [1] Carolyn C E. IEA agreement on the production and utilization of hydrogen[R]. Paris: IEA Annual Report, 1998. 15-20.
- [2] 中华人民共和国国家发展计划委员会基础产业发展司. 中国新能源与可再生能源 1999 白皮书[M]. 北京: 中国计划出版社, 1999.
- [3] 朱核光, 史家樑. 生物产氢技术研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 98-104.
- [4] 赵永丰, 鲍德佑. 多用途开发氢源促进我国氢能发展[J]. 太阳能学报, 1999, 20: 1-5.
- [5] 袁传敏, 颜涌捷, 曹建勤. 生物质制氢气的研究[J]. 煤炭转化, 2002, 25(1): 18-22.
- [6] 张明, 史家樑. 光合细菌光合产氢机理研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(suppl): 25-29.
- [7] Miyake J, Miyake M, Asada Y. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion[J]. *J Biotechnology*, 1999, 70: 89-111.
- [8] Ike A, Murakawa T, Kawaguchi H, et al. Photo production of hydrogen from raw starch using a halophilic bacteria community[J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 88(1): 72-79.
- [9] Benemann J. Hydrogen biotechnology: progress and

prospects[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1 101-1 103.

- [10] 管英富, 邓麦村, 金美芳, 等. 微藻光生物水解制氢技术[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 4: 8-13.
- [11] Asada Y, Miyake J. Photobiological hydrogen production[J]. *J of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88: 1-6.
- [12] Guan Yingfu, Deng Maicun, Yu Xingju, *et al.* Two stage Photobiological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 19: 69-73.
- [13] 张卫, 管英富, 虞星炬, 等. 一种海洋绿藻两步法生物

光解水制氢方法[P]. ZL: 031 1098 1. 0, 2003 01 29.

- [14] 湛江水产专科学校. 海洋饵料生物培养[M]. 北京: 农业出版社, 1980.
- [15] 汤章城, 魏家绵, 陈因, 等. 现代植物生理学试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [16] 康瑞娟, 蔡昭铃, 施定基. 用于微藻培养的气升式光生物反应器[J]. *化学反应工程及工艺*, 2001, 17(1): 44-49.
- [17] 曾文炉, 李浩然, 蔡昭铃, 等. 螺旋藻细胞培养与光能利用的关系[J]. *植物资源与环境学报*, 2001, 10(3): 7-10.

Two-stage photobiological hydrogen production of *Platymonas subcordiformis* cells at different growth phases under two kinds of light intensity

LIU Run-guo, YU Xing-ju, JIN Mei-fang, ZHANG Wei

(Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Received: Apr., 22, 2005

Key words: *Platymonas subcordiformis*; growth phases; reversible hydrogenase; hydrogen

Abstract: A marine green microalga, *Platymonas subcordiformis*, was able to generate H₂ photosynthetically when exposed to light after a period of anaerobic, dark incubation. The growth curves were different at different kinds of light intensity, and the ability of H₂ production varied significantly at different growth phases. At higher light intensity ($E = 13\ 000\ \text{lx}$), the microalga grew faster, and gave a higher H₂ yield. At the stationary phase, the ability of H₂ production reached the maximum hydrogen concentration of 17.5% collected in 300 mL Culture at 3×10^6 cells/mL. At lower light intensity ($E = 5\ 000\ \text{lx}$), the H₂ yield decreased by 24% with the maximum hydrogen concentration of 17.5%, and the chlorophyll concentration reduced by 61%. The results indicated that the physiological status of algal cells has a significant effect on the ability of H₂ production. Therefore optimization of physiological parameters is required to maximize hydrogen production in green algae.

(本文编辑: 张培新)