

固定化光合细菌利用有机物产氢的研究

徐向阳 俞秀娥 郑平 冯孝善

(浙江农业大学环保系, 杭州 310029)

摘要 应用固定化细胞技术包埋荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*) 菌株 386, 研究在光照下利用有机物产氢的特性。实验观察到, 光照培养 120 小时, 悬浮培养物的产氢量为 68.2ml, 比产氢速率为 104.1ml H₂/g (生物量) · h; 用琼脂包埋后, 其产氢能力得到改善, 产氢量和比产氢速率分别达到 128.4ml 和 195.8ml H₂/g · h。该菌株除可利用苹果酸外, 还可利用葡萄糖、乳酸、丙酸等基质高效地产氢。基质浓度只有控制在适当水平时, 才具有较高的基质转化产氢效率。此外, 菌体生物量、菌龄、培养液 pH、光照强度、光照/黑暗时间比以及温度对产氢过程均有不同程度的影响。

关键词 固定化细胞, 光合细菌, 光产氢

早在 1949 年, 美国 Gest 就发现了紫色非硫的光合细菌在固氮酶催化下的光产氢 (H₂-photoproduction) 现象^[1]。近十几年来, 随着全球环境问题的加剧和生物技术的发展, 国外对光合细菌利用有机物 (包括有机废水) 光产氢的研究比较活跃。日本、意大利、瑞士、比利时等国家的研究表明, 紫色非硫光合细菌可利用葡萄糖、苹果酸、乳酸、低分子有机酸、混合醇类和一些有机废水作为电子供体光敏产氢, 特别是固定化细胞技术的应用, 为工业化生产清洁、无污染的生物能源提供了具有竞争潜力的技术方法^[2-9]。在国内, 光合细菌已成功地应用于处理高浓度有机废水^[10], 但至今未见有其产氢的研究报道。

鉴于光合细菌具有分解有机物, 在光照下产氢的特性, 本研究拟将废水处理与氢回收相结合, 开发有机废水资源化处理的新技术。这里报道在分批培养条件下, 固定化荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*) 菌株 386 光产氢过程的一些影响因子和特性。以期为连续操作提供依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株与培养方法

1.1.1 菌株: 荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*) 386, 由浙江大学生物系孙琦教授惠赠, 它在苹果酸基质上有较高的产氢活性。

1.1.2 培养基: 按 RCVB 配制^[11], 其中生长碳源和氢供体为苹果酸 (30 mmol/L), 氮源为谷氨酸 (7 mmol/L), pH7.0—7.2。

1.1.3 培养方法和条件: 在 100 ml 血清瓶装 50.0ml 培养液, 接种后用铝盖压紧, 放置于 30±2℃ 水浴中光照培养, 血清瓶表面光强 7 500±100lx。试验时, 每个处理均作二个重复。文中除特别注明外, 均按上述条件进行。

1.2 细胞干重测定

菌体细胞干重用菌液在 660nm 下所测光密度来换算求得, 经测定, 单位光密度 = 0.42mgvss/ml。

1.3 固定化细胞方法

采用琼脂和海藻酸钠作为包埋材料。

1.3.1 琼脂方法: 3ml 含菌体细胞干重 5—6mg 左右处于稳定生长期的菌体悬液与 7ml 2% 琼脂, 在 $55 \pm 1^\circ\text{C}$ 下混匀, 通过蠕动泵将混合物滴加到预冷的含培养液血清瓶之中, 所成颗粒即为固定化细胞, 直径 3—4mm。

1.3.2 海藻酸钙方法: 3ml 含菌体细胞干重 5—6mg 左右的菌体悬液与 7ml 2.86% 海藻酸钠相混合, 用蠕动泵将此混合物滴加到 50 mmol/L CaCl_2 溶液中, 凝胶颗粒固化 4 小时后, 用生理盐水清洗二次, 将颗粒转入血清瓶内。

1.4 产氢量的测定方法

不同处理血清瓶气相氢经平衡后, 用 1.0ml 微量注射器取样, 在 102G 气相色谱仪上分析氢含量。外标物为超纯氢。

光产氢能力用产氢量、产氢速率 ($\text{ml H}_2/\text{L 培养液} \cdot \text{h}$, 比产氢速率 ($\text{ml H}_2/\text{g 生物量} \cdot \text{h}$) 来表示。

2 结果与分析

2.1 固定化细胞和自然细胞光产氢能力的比较

早期研究表明, 菌株 386 产氢发生在稳定期的后阶段。本试验用 48 小时的培养物, 分别用两种固定化材料包埋, 测定光照培养 48 小时的产氢情况。表 1 清楚地表明, 菌株 386 经包埋固定后能有效地提高其产氢活性, 与自然细胞相比, 产氢能力提高了 30—130%; 同时还说明琼脂包埋的固定化细胞其产氢能力明显高于海藻酸钙颗粒。实验过程还发现, 琼脂颗粒内外几乎呈红色, 菌体生长较好; 海藻酸钙颗粒则呈黄褐色。分析上述原因似乎与颗粒的光透性、基质的传递效率等有关。我们在以下实验中均选择琼脂作为包埋材料。

表 1 固定化细胞和自然细胞产氢能力的差异

Table 1 The differences of H_2 -production capacity between immobilized and free cells

H_2 production capacity Cell type	H_2 production within 48h (ml)	Specific H_2 production rate ($\text{ml H}_2/\text{g} \cdot \text{h}$)	H_2 production rate ($\text{ml H}_2/\text{L} \cdot \text{h}$)
Free cell	28.9	120.4	12.0
Immobilized cell with agar gels	67.5	285.4	28.1
Immobilized cell with Ca-alginate	37.1	153.4	15.4

对于琼脂包埋的固定化细胞, 延长其培养时间, 测定各时段内的产氢活性。结果发现, 产氢速率随培养时间延长而逐渐下降, 在 0—72 小时, 内有较高的产氢速率, 在 120 小时之后, 仍具有一定的产氢能力。作为对照的自然菌体细胞其产氢速率在 48—96 小时内较高。但此后又很快下降, 在 120 小时后已停止产氢, 并出现吸氢过程。光照培养 120

小时内,两种不同细胞的产氢速率和比产氢速率分别为 21.4ml H₂/L·h、195.8ml H₂/g·h 和 11.4ml H₂/L·h、104.1ml H₂/g·h。

表 2 不同培养时间下固定化细胞和自然细胞光产氢的变化

Table 2 The Changes of H₂-photoproduction of immobilized and free cells with culturing time

Time (h) Cell type	0—48		48—72		72—96		96—120		120—144	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
H ₂ production capacity										
H ₂ production within 48 h (ml)	60.0	31.7	28.8	21.5	25.8	14.3	13.7	0.7	10.5	10.0
H ₂ production rate (ml H ₂ /L·h)	25.0	13.2	24.0	17.9	17.9	21.5	11.4	0.3	8.8	/
Specific H ₂ production rate (ml H ₂ /g·h)	228.9	120.9	219.8	164.1	196.9	109.1	104.5	2.7	80.1	/

2.2 不同条件因子对固定化细胞光产氢的影响

2.2.1 固定化颗粒中生物量的影响:颗粒内所包埋的生物量的影响表明,随着生物量的增加,产氢量、产氢活性随之而提高;但生物量过高,对产氢就无强化作用;10ml 颗粒中适宜的生物量是 3.5—7.0mg (表 3)。该参数与 Vincenzin 等^[5]用琼脂包埋沼泽红假单胞菌 420L 菌株所得到结果相仿。可以认为固定化颗粒包埋生物量越高,维持菌株生理活动所需的能量增加,相应作为电子供体流向于形成氢的基质就减少,故在一定基质下,产氢量就反而下降。但在连续操作的条件下,较高生物量的存在可加快反应速率,此时产氢效率或许能得以改善或提高。

表 3 琼脂颗粒中不同生物量对光产氢的影响

Table 3 Effects of various biomass in agar gel on H₂ photoproduction of immobilized cells

H ₂ production capacity	H ₂ production within 48h (ml)	Specific H ₂ production rate (ml H ₂ /g·h)	H ₂ production rate (ml H ₂ /L·h)
Biomass in agar gel (mg/10ml)			
1.75	29.1	345.8	12.1
3.50	45.8	272.6	19.1
5.00	56.2	234.2	23.4
7.00	42.2	125.8	17.6
8.75	36.0	85.7	15.0

2.2.2 菌龄对光产氢的影响:菌株菌龄长短,直接影响着菌株生理状态和培养物的化学组分。Felten 研究表明菌龄为 70 小时的 *R. rubrum* 细胞经固定化后,具有最高的产氢活性,并认为菌龄是影响光产氢的关键因子^[6]。本试验结果揭示,菌龄在 48 小时以上,其产氢能力比 36 小时要强,64、88 小时与 48 小时的固定化细胞,光产氢能力无明显差异(表 4)。

2.2.3 培养液 pH 的影响:图 1 为 pH 对光产氢的影响,可见,在 pH7.0 时有最高的光产氢活性。在偏碱性条件下,产氢活性随 pH 升高而迅速下降,在 pH9.0 时,无氢气产生。偏酸性的 pH 时,随着培养时间的延续,基质的消耗,培养液 pH 发生变化,起始受

抑

表 4 菌龄对光产氢的影响

Table 4 Effects of strain age on H₂ photoproduction of immobilized cells

H ₂ production capacity Age of inoculum (h)	H ₂ production within 48h (ml)	Specific H ₂ production rate (ml H ₂ /g · h)	H ₂ production rate (ml H ₂ /L · h)
36	43.6	196.6	18.0
48	56.2	214.1	23.4
64	53.7	24.1	22.4
88	52.0	224.3	21.7

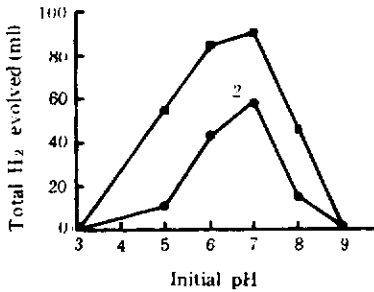


图 1 培养液初始 pH 对固定化细胞光产氢的影响

Fig. 1 Effects of medium pH on H₂ photoproduction of immobilized cells

1.4h, 2.72h

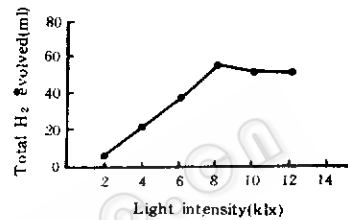


图 2 光照强度对固定化细胞光产氢的影响

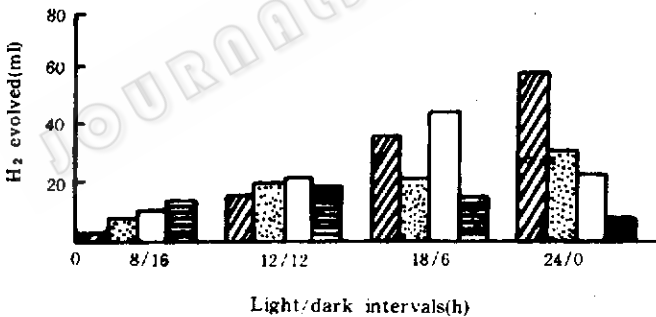
Fig. 2 Effects of light intensity on H₂ photoproduction of immobilized cells

图 3 光照/黑暗培养时间对光产氢的影响

Fig. 3 Effects of light/dark interval on H₂ photoproduction of immobilized cells

▨0—48, ▩48—72, □71—79, ▤96—120

制的产氢作用可逐渐恢复,并在较高速率下产氢。例如 pH5.0, 初始 48 小时内产氢速率仅有 4.9ml H₂/L · h, 然而随后 24 小时达到 36.2ml H₂/L · h。不过如果培养液 pH 初始值很低, 固定化细胞不能产氢, 如 pH3.0 情形。Margaritis 等^[12]的研究表明, 红假单胞菌菌株 VM81 在 pH 低于 4.0 的条件下, 不能利用葡萄糖光产氢, 最佳 pH 范围是 7.0—7.2。因此, 光产氢基质 pH 控制十分重要。本试验所用菌株宜选择在中性或偏酸性范围内。

2.2.4 光照强度的影响: 光强直接影响光产氢过程(见图 2)。表明在 8.0 klx 光强下, 有最高的产氢量; 低于 8klx 产氢能力明显降低; 大于 8.0 klx, 对产氢能力的提高无作用

反而有降低的趋势,这可能是固定化光合细菌光产氢过程存在光能量饱和现象。

2.2.5 光照/黑暗培养时间的影响: 试验在每 24 小时内设置 8/16、12/12、18/6、24/0 四个水平下进行。所得结果表明(图 3), 24 小时内光照时间对光产氢有明显影响, 不论产氢量还是产氢速率, 均随光照时间的增加而增加; 不同处理水平的产氢体系, 当其累积光照时间达 48 小时时, 产氢总量除 8/16 外, 其余处理均比较接近。这一现象可说光合细菌光产氢存在光能量临界值。

表 5 环境温度对光产氢的影响

Table 5 Effects of temperature on H₂ photoproduction of immobilized cells

H ₂ production capacity Temp. (°C)	H ₂ production within 48h (ml)	Specific H ₂ production rate (ml H ₂ /g · h)	H ₂ production rate (ml H ₂ /L · h)
20±2	50.8	197.6	21.2
30±2	63.8	243.4	26.6
40±2	46.4	204.6	19.3

光照/黑暗培养时间交替的影响可能与光合细菌两种酶有关。在黑暗培养时, 氢酶被激活而利用氢, 光合细菌进行厌氧呼吸而消耗产氢基质, 因而表现产氢量减少。光照培养时间越短, 这种影响就越明显。

2.2.6 环境温度的影响: 据报道, 光合细菌光产氢的最佳温度为 30—40℃, 且在 40℃ 时有最高产氢速度, 但不稳定。本试验结果表明, 固定化细胞产氢体系在 30℃ 左右有较高的产氢性能, 而在 40℃ 时并没有表现出能提高光产氢速率的迹象, 同时在 20℃ 时, 产氢体系仍具有较好的产氢活性。这一结果可以认为是一种有利于实际应用的性状, 至于存在如此结果的原因尚不清楚。

2.3 不同基质浓度下固定化细胞光产氢的动力学

通过改变产氢基质(苹果酸)的浓度(氮源仍为 7mmol/L, pH7.0), 得到此条件下的产氢动态曲线(图 4)。结果表明, 光照培养 48 小时后, 低浓度基质的产氢体系, 出现吸氢现象。其余四个浓度的产氢体系的产氢过程比较复杂, 在 0—72 小时时段内, 高浓度基质似乎有抑制作用, 主要表现在低产

氢量。光照培养 72 小时之后, 尽管产氢量多少与基质浓度高低, 有一定相关; 但求算基质转化产氢效率, 可发现基质浓度越高, 效率越低, 现按下列的反应式:

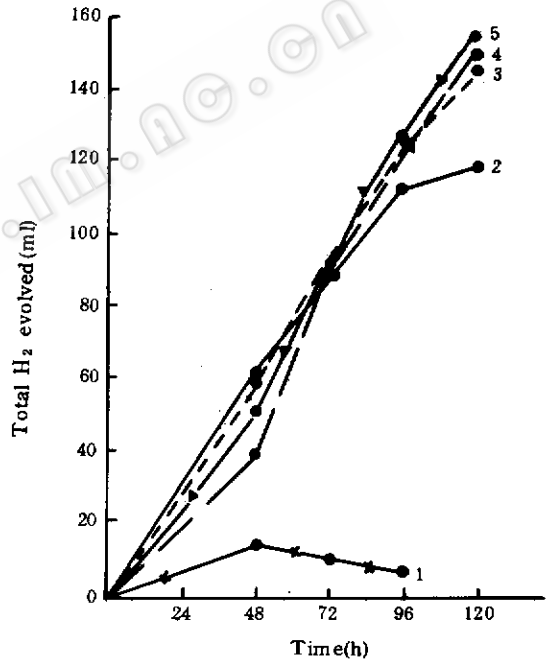
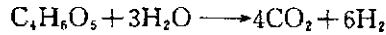


图 4 不同产氢基质浓度下固定化细胞光产氢的动力学

Fig. 4 The dynamics of H₂ production of immobilized cells at various concentrations of substrate
1. 15mmol/L, 2. 30mmol/L, 3. 45mmol/L, 4. 60mmol/L, 5. 90mmol/L



计算 120 小时, 30、45、60、90 mmol/L 产氢体系的基质转化产氢效率分别为 53.5%、42.9%、35.4%、24.5%。因此, 为了提高单位基质产氢效率, 控制适当的基质浓度十分必要。

2.4 不同基质类型的产氢能力

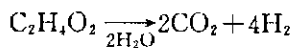
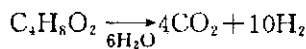
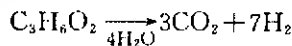
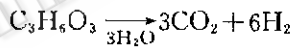
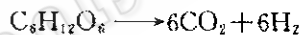
已有报道, 光合细菌除能利用苹果酸作为光产氢底物外, 还可利用其它有机物产氢。试验选取工业有机废水中常见的污染物如葡萄糖、挥发性脂肪酸、乳酸作为产氢基质, 探索产氢能力。在其浓度 30 mmol/L, 用生长于苹果酸基质的菌体固定化细胞进行试验, 所得结果表明 (表 6), 所试几种有机物均能不同程度地被 386 菌株利用而产氢, 根据基质转化产氢效率, 乳酸、葡萄糖、丙酸较适合作为产氢基质。

表 6 固定化细胞利用有机物光产氢的能力

Table 6 H_2 photoproduction from organic compounds by immobilized cells

Substrate	H_2 production capacity within 48h (ml)	H_2 production rate (ml H_2 /L · h)	Specific H_2 production rate (ml H_2 /g · h)	Conversion efficiency (%)
Glucose	43.2	18.0	178.8	19.2
Lactate	76.9	32.0	305.0	34.4
Propionate	30.5	12.7	121.2	13.4
Butyrate	7.3	2.9	28.0	2.0
Acetate	6.3	2.6	24.9	4.2

* This item is calculated as following reaction formula⁽⁵⁾



3 讨 论

本实验证实琼脂包埋的荚膜红假单胞菌菌株 386 固定化细胞, 能提高产氢速率, 最高可达到 28.1 ml/L · h, 相当于自然细胞的 1.3 倍, 这一结果与国外已报道的结果相接近⁽⁴⁾。受试菌株利用不同底物产氢效果不同, 其中乙酸、丁酸的产氢能力最低。Vincenzini 等⁽⁴⁾用固定化沼泽红假单胞菌研究产氢时, 也发现类似的现象。这种现象可能与光合细菌代谢的灵活性、多样性有关。已有报道表明, 光合细菌除了代谢形成 H_2 和 CO_2 外, 还可通过其它途径如厌氧依光性的柠檬酸途径代谢有机物。深红色红螺菌的静止细胞在氢存在下, 可光代谢 (Photo-metabolism) 乙酸盐形成贮藏性物质如 β -羟基丁酸⁽⁵⁾。因此, 很可能在荚膜红假单胞菌中也存在相类似的代谢途径⁽¹³⁾, 当乙酸盐作为产氢基质时, 其产氢效率降低。

本试验证实良好产氢基质有苹果酸、乳酸和葡萄糖等, 它们存在一些有机酸发酵废

液中, 如果废液中不存在产氢过程的抑制物如 NH_4^+ , 则应用光合细菌处理上述废液的同时, 可望回收氢能。这样, 结合有关生物技术的进展, 就有可能在生物反应器水平实现上述资源化处理废物的目标。

参 考 文 献

- [1] Gest H *et al.* Science, 1949, 109, 560.
- [2] 吴 明编著. 生物工程学——过去 现在 未来, 北京: 知识出版社, 1989, 183—184.
- [3] Fujii T *et al.* Agric Biol Chem, 1987, 51 (1), 1—7.
- [4] Hirayama D *et al.* Agric Biol Chem, 1986, 50 (1), 897.
- [5] Vincenzini M *et al.* Int J Hydrogen Energy, 1982, 7 (3), 231—236.
- [6] Vincenzini M *et al.* Int J Hydrogen Energy, 1986, 11 (11), 623—626.
- [7] 三宅淳 サコシセイコシセヘナル, 1990, 11 (1), 24.
- [8] Felten P *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1985, 23 (1), 15—20.
- [9] Segers L *et al.* Biotechnol Bioeng 1983, 25, 2843—2853.
- [10] 徐向阳, 孙 琦. 环境污染与防治, 1990, 12 (5), 37.
- [11] Weaver P F *et al.* Arch Microbiol, 1975, 105, 207—216.
- [12] Margrinitis A *et al.* Int J Hydrogen Energy, 1983, 8 (4), 284.
- [13] Beatty J T *et al.* J Bacteriol, 1981, 148, 584.

Research on Hydrogen Production from Organic Compounds with Immobilized Cells of Photosynthetic Bacteria (PSB)

Xu Xiangyang Yu Xiue Zheng Ping Feng Xiaoshan

(Department of Environment Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract The characteristics of hydrogen photoproduction from organic compounds by immobilized *Rhodospseudomonas capsulata* 386, were studied in batch culture. On the condition that free cells hydrogen-producing cultures were cultured in light for 120 hours, hydrogen production and specific H_2 production rate were 68.2ml and 104.1ml $\text{H}_2/\text{g} \cdot \text{h}$, respectively. The activity was largely increased when immobilized cells by agar gels was used with hydrogen production up to 128.4ml and specific hydrogen production rate up to 195.8ml $\text{H}_2/\text{g} \cdot \text{h}$. It was proved that in addition to malate, this bacterium could also used glucose, lactate and propionate as hydrogen production substrate and only at appropriate substrate concentration it reached a higher conversion efficiency of substrate to H_2 . Age of inoculum, pH value, light intensity, light dark time and temperature all have different effect patrn.

Key words Immobilized cells, photosynthetic bacterium, hydrogen photoproduction