

# 深红红螺菌吸氢酶缺失突变株在 管式光合反应器中的产氢

朱瑞艳<sup>1,2\*</sup> 林涛<sup>1</sup>

(1. 河北省生物新能源工程技术研究中心 河北 秦皇岛 066004)

(2. 燕山大学环境与化学工程学院 河北 秦皇岛 066004)

**摘要:** 本研究设计了一种 2 L 分体式管式光合反应器, 并研究了深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)吸氢酶缺失突变株在该反应器中分别利用人工光源(持续光照与光暗交替)和自然光的产氢规律。结果表明在人工光照条件下 *R. rubrum* 的产氢可维持 5 d, 持续光照和光暗交替条件下(12 h: 12 h)的氢产量可分别达到 5752 mL/PBR  $\pm$  158 mL/PBR 和 5012 mL/PBR  $\pm$  202 mL/PBR; 自然光条件下, 最适产氢光照强度为 30000 Lux~40000 Lux; 在此光照条件下, *R. rubrum* 产氢可维持 6 d~10 d, 最高氢产量可达到 2800 mL/PBR。尽管利用自然光的氢产量比利用人工光源氢产量低, 但是利用自然光的产氢比较经济, 并且该光合产氢系统操作简单, 该工艺有望开发为低成本的光合细菌产氢技术。

**关键词:** 深红红螺菌, 光合反应器, 光照强度, 人工光照, 昼夜更替, 氢产量

## Hydrogen Production of *Rhodospirillum rubrum* Uptake Hydrogenase Deficient Mutant in Tubular Photobioreactor

ZHU Rui-Yan<sup>1,2\*</sup> LIN Tao<sup>1</sup>

(1. Engineering Research Center for Bioenergy of Hebei Province, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

(2. College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

**Abstract:** A 2 L tubular photobioreactor (PBR) was designed, and hydrogen production by *Rhodospirillum rubrum* uptake hydrogenase deficient mutant in this PBR under artificial illumination condition (including continuous illumination and light/dark cycle condition) and natural day/night cycle was investigated, respectively. Hydrogen production by *R. rubrum* uptake hydrogenase deficient mutant under artificial illumination lasts five days, and hydrogen yield under continuous illumination and light/dark cycle (12 h:12 h) reaches 5752 mL/PBR  $\pm$  158 mL/PBR and 5012 mL/PBR  $\pm$  202 mL/PBR, respectively. Under natural day/night cycle, hydrogen production lasts 6~10 days and the maximal hydrogen yield of *R. rubrum* reaches 2800 mL/PBR with the optimal light intensity of about 30000~40000 Lux. Hydrogen production under natural day/night cycle condition was lower than that under artificial illumination, however, it would be a promising technology of hydrogen production due to low cost and ease of operation of hydrogen production system.

基金项目: 国家 863 计划资助项目(No. 2006AA05Z108)

\* 通讯作者: Tel: 86-335-8015280; ✉ zhuruiyan\_22@126.com

收稿日期: 2009-06-04; 接受日期: 2009-07-08

**Keywords:** *Rhodospirillum rubrum*, Photobioreactor, Light intensity, Artificial illumination, Natural day/night cycle, Hydrogen yield

光合细菌利用光合磷酸化产生的能量在固氮酶的催化下,可将有机物中的质子还原成氢气<sup>[1,2]</sup>。由于光合细菌只具有光合系统 I,在代谢过程中不产生氧气,不会造成固氮酶的氧失活,以及具有较高的产氢速率和较高的氢气纯度,使光合细菌制氢成为目前理想的生物制氢方法之一。深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)为紫色非硫光合细菌,其产氢过程是固氮酶催化固氮过程的副反应,当反应体系中不存在氮气时,供给固氮酶的所有电子和能量全部用于质子还原<sup>[2-4]</sup>。吸氢酶为 *R. rubrum* 中另外一种与产氢相关的酶,吸氢酶可将氢气催化成为质子和电子,导致光合氢产量的减少<sup>[5,6]</sup>,吸氢酶活性丧失有助于光合氢产量的提高<sup>[7,8]</sup>。目前,对光合细菌产氢的研究大多集中于实验室阶段产氢工艺的优化及菌株的改造<sup>[9-11]</sup>,对光合产氢反应器<sup>[12]</sup>和利用自然光的产氢过程研究较少,规模较小<sup>[13,14]</sup>。由于自然光随季节、天气和时间变化非常明显,对产氢效率影响较大,因此,为保证光合细菌产氢效率,目前开发的利用自然光的产氢系统都比较复杂,需要较昂贵的辅助设备控制工艺参数,资金投入较大。国内外一些学者研究了光合反应器型式对光合产氢的影响,并对光源控制技术进行了不懈的研究,为使光能传入到反应器内部,开发出了将光纤发光体引入到反应器内的装置,但是对于直接或间接利用自然光产氢的报道较少。探索光合细菌在合适光合反应器中的产氢规律,寻找简便、具有可操作性的产氢系统是光合细菌产氢规模化的基础。本研究设计了一种分体式管式反应器,并研究了在管式反应器中 *R. rubrum* 吸氢酶缺失突变株分别利用人工光源和自然光的产氢的光合产氢规律,为光合细菌利用自然光的产氢规模放大奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株:** *R. rubrum* UR801 为吸氢酶缺失突变株( $\Delta hupL::aacCI$ ),本室保存<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 培养基:** 种子培养基(SMN 培养基)和发酵培养基(改良 MG 培养基)见参考文献<sup>[15]</sup>。

**1.1.3 主要试剂及仪器:** 酶水解酪蛋白为 Sigma 产品;酵母浸膏粉为 Oxoid 产品,谷氨酸钠为红梅集

团产品(谷氨酸钠含量 99%),其余试剂均为北京化学试剂公司产品。Unico UV2802 紫外-可见分光光度计;北京师范大学光电所 ST-80C 照度计测定光照强度;保定兰格 BT600 蠕动泵。

### 1.2 种子制备和光合反应器(Photobioreactor, PBR)接种与安装

将活化的 *R. rubrum* UR801 接种于种子培养基中,30°C 避光振荡培养(100 r/min)至对数生长期。

将 *R. rubrum* 种子按 1.5%~3% 接种量接入 2 L 管式光合反应器中,光合反应器顶部留有 100 mL 的气体空间,避免发酵过程中所产生气体压力过大造成反应器破裂。光合反应器接种后不需要通入氩气或其他惰性气体将反应体系置换成厌氧环境,因为反应器上层空间少量的氧在细胞生长初期会被快速消耗,从而使反应器达到厌氧环境。管式反应器安装与地面成 30°角。

人工光照条件下:光合反应器安装于光照培养室内,光合产氢所需光能由安装有 12 个 60 W 超反射灯泡的光照盒提供,灯泡共分两排,每排 6 个;光源与反应器平行,反应器表面的光照强度控制为 10000 Lux~11000 Lux。45 W 风扇或制冷循环泵控制反应器的温度为 30°C~32°C。

自然光光照条件下:光合反应器安装于秦皇岛领先科技阳光温室(秦皇岛地理位置:东经 120°,北纬 39.5°),研究时间为 2008 年 6 月~2008 年 10 月;光照强度由遮阳网控制,培养过程中反应器的温度不再单独控制,随阳光温室中温度变化而变化(变化范围为 28°C~35°C),发酵过程中不调节 pH 值。为避免发酵液与体系外发生气体交换造成固氮酶失活,发酵液循环由蠕动泵驱动,蠕动泵转速为 80 r/min~100 r/min,发酵液的流动线速度为 2 cm/s~3 cm/s。当产氢速率<15 mL/PBR·h~20 mL/PBR·h,终止发酵。

### 1.3 气体的收集与检测

气体的收集采用排水法,在排气口接一个 600 mL 血清瓶,血清瓶中装有 1% NaOH 加 2% NaCl 的水溶液,用以除去气相中的 CO<sub>2</sub>,气体检测见参考文献<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 管式光合反应器设计

由于光合反应器制作材料为玻璃或有机玻璃,

易损耗或老化, 因此本研究设计了分体式光合反应器以易于更换损耗部件, 降低光合反应器制作成本。将集光部分(II, 即细胞培养部分)、氢气收集部分(I)和发酵液循环连接部分(III和I)分离; I和II、II和III分别由气密性较强的92#PHARMED管连接, 部分I和部分III由24#PHARMED管连接, 蠕动泵驱动发酵液的循环(图1)。光合反应器由透光性能高的玻璃或有机玻璃制作, 集光部分由6组平行玻璃管组成, 每组管直径为40 mm, 长度为200 mm, 玻璃厚度为3 mm。

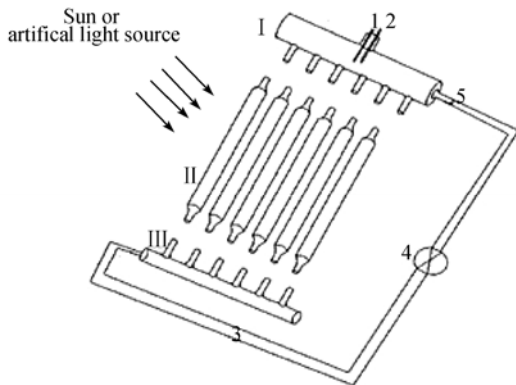


图1 管式光合反应器示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of tubular photobioreactor

Note: 1: Thermometer; 2: Gas exit; 3: Return pipe (24#PHARMED); 4: Peristaltic pump; 5: Tie-in of pharmed tube with PBR.

## 2.2 人工光照条件下 *R. rubrum* UR801 的产氢

*R. rubrum* 能够利用波长范围为 400 nm~950 nm 的光, 并且在 700 nm~900 nm 有较强的吸收<sup>[12]</sup>, 因此人工光源由超反射灯泡提供。利用人工光源在持续光照条件下 *R. rubrum* UR801 的产氢开始于接种后 15 h~20 h, 在 40 h~45 h 时可达到最高速率为 140 mL/PBR·h~150 mL/PBR·h (图 2), 之后产氢速率逐渐下降, 可能的原因是随着细胞浓度和细胞色素合成量的增加, 反应器内透光率逐渐降低, 光合作用效率减弱, 供给固氮酶的能量缺乏所致。为模拟自然光照模式, 我们研究了光暗交替条件下的产氢过程, 接种 *R. rubrum* UR801 后在持续光照培养 24 h 之后转入光暗交替条件(12 h:12 h) (图 2)。由于 *R. rubrum* UR801 的固氮酶在黑暗条件下会被修饰失去活性, 因此只有在光照时才会有氢气产生。第 2 次、第 3 次, 第 4 次分别从黑暗条件下转入光照条件下时, 光合产氢立刻恢复, 并且最高速率可达到 120 mL/PBR·h~140 mL/PBR·h。当发酵 110 h~120 h 时, 人工光照条件下 *R. rubrum* 的产氢速

率低于 20 mL/PBR·h, 终止发酵; 此时在持续光照和光暗交替条件下的氢产量分别可达到 5752 mL/PBR ± 158 mL/PBR 和 5012 mL/PBR ± 202 mL/PBR (图 3)。光暗交替条件下, 在相同发酵周期内 *R. rubrum* 的氢产量比持续光照条件下低, 可能的原因是: 在此条件下固氮酶具有产氢活性时间仅为持续光照条件下的 1/2, 尽管每隔 12 h 恢复到光照时产氢速率可恢复到较高水平, 但是有限的光合效率不能完全满足耗能的固氮酶催化产氢过程, 导致光暗交替条件下的氢产量降低, 为持续光照条件下氢产量的 81%~93%。尽管光暗交替条件下的氢产量有所降低, 但是降低幅度较小, 推测昼夜更替条件下 *R. rubrum* 会具有较高的产氢潜力。

## 2.3 管式反应器中 *R. rubrum* UR801 利用自然光的产氢

为保证 *R. rubrum* 在接种后能够快速生长, 利用自然光的产氢在早上 8:00 接种。由于光照强度是影

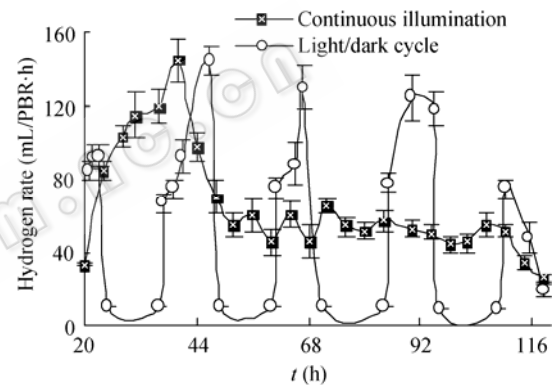


图2 持续光照和光暗交替条件下 *R. rubrum* UR801 光合产氢速率

Fig. 2 Time courses of hydrogen evolution rate of *R. rubrum* UR801 under artificial continuous illumination and light/dark cycle

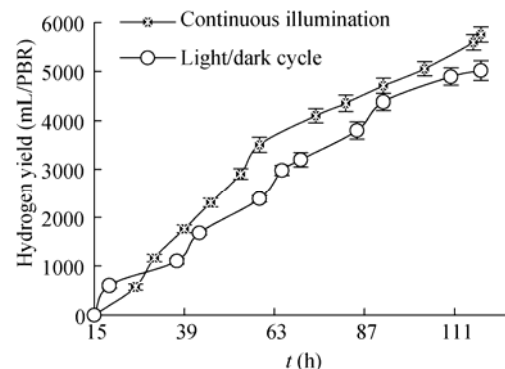


图3 持续光照和光暗交替条件下 *R. rubrum* UR801 光合氢产量

Fig. 3 Hydrogen yields of *R. rubrum* UR801 under artificial continuous illumination and light/dark cycle

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

响 *R. rubrum* 产氢的关键因素之一,且自然光源与人工光源的光质存在较大差异,因此首先研究自然光照强度对 *R. rubrum* 生长和产氢的影响,并确定自然光照条件下 *R. rubrum* 产氢的最适光照强度(表 1)。结果表明当光照强度大于 50000 Lux 或小于 40000 Lux 时,随着光照强度的增加或降低,产氢速率逐渐降低。当光照强度大于 90000 Lux 或小于 20000 Lux 时,产氢活性被完全抑制或无法启动。虽然光照强度在 40000 Lux~50000 Lux 时具有较高的产氢速率,但是产氢可持续时间较短,从氢产量的角度考虑 *R. rubrum* UR801 利用自然光产氢的最适光照强度为 30000 Lux~40000 Lux。

将阳光温室的最高光照强度控制为 30000 Lux~40000 Lux, *R. rubrum* UR801 利用自然光的产氢如

表 1 自然光光照强度对 *R. rubrum* UR801 细胞生长及产氢的影响

Table 1 Effect of light intensity of sunshine on cell growth and hydrogen production of *R. rubrum* UR801

<sup>a</sup> 光照强度 (Lux) Light intensity	平均产氢速率 Average H <sub>2</sub> production rate (mL/PBR/h)	产氢可持 续时间 Lasting time (days)	<sup>b</sup> OD <sub>600</sub>
90000~100000	0	0	1.22
60000~70000	24~42	2	1.28
40000~50000	42~67	4	1.58
30000~40000	22~38	10	1.67
<20000 (Cloudy or rainy)	0	0	0.67

Note: <sup>a</sup>: Average light intensity at 10:00-14:00 at least three days after inoculation; <sup>b</sup>: Optical density at 600 nm when hydrogen production stopped.

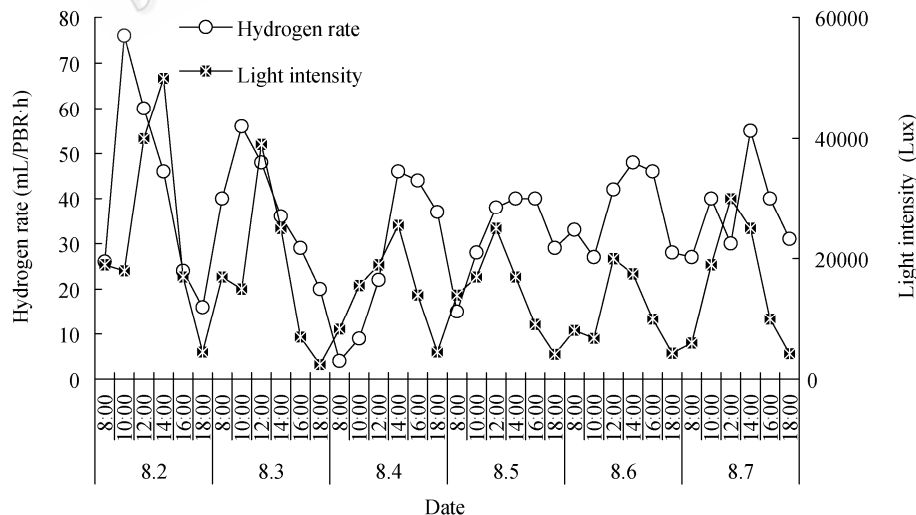


图 4 *R. rubrum* UR801 在 2 L 管式反应器中利用自然光的产氢速率

Fig. 4 Time courses of hydrogen evolution of *R. rubrum* UR801 in 2 L tubular PBR under natural day/night cycle (2008. 8.1~2008.8.7)

图 4。结果表明产氢速率与光照强度有一定的相关性,在每日 10:00~12:00 产氢速率达到该天的最高,最高产氢速率可以达到 78 mL/PBR·h,在此光照强度下的产氢过程可以维持 6~10 天,最高氢产量可以达到 2800 mL/PBR。当有阳光时,尽管早上 8:00 的光照强度小于 20000 Lux,但是都能启动光合产氢,与 Table 1 中阴雨天结果不一致,可能是两种天气情况下的光组成差异导致。因此,光对光合细菌产氢的影响除分析光照强度外,还必须考虑光组成对产氢的影响。*R. rubrum* UR801 在 10 L 管式光合反应器中利用自然光的产氢规律与 2 L 反应器中相似(未显示结果),为反应器的进一步放大奠定了基础。

### 3 讨论

光合反应器有管式、平板式和发酵罐式, Akkerman 等对 3 种反应器的特性进行了比较,尽管从理论上讲,管式反应器比平板式光能转换率略低(比发酵罐式光能转换率高),但是管式反应器密闭性较好,在制作工艺上更简单,可满足光合细菌产氢过程中的严格厌氧,并可以与其他加工设备配套,是目前开发的光合反应器中最容易实现产氢规模化的反应器<sup>[1,2]</sup>。因此,我们设计了分体式管式反应器,并研究了 *R. rubrum* 在该反应器中分别利用人工光照和自然光的产氢规律,实现了不借助昂贵辅助设备、光合细菌可在太阳光下的持续产氢,但是产氢效率需进一步提高,规模需进一步扩大。目前,管式光合产氢反应器的放大可行的操作是加粗管径或加

长长度, 根据光在管式反应器中的分布, 管径一般小于 100 mm, 继续增加管径会影响光合细菌生长和产氢, 尽管有学者将光纤发光体引入到反应器内部, 但是在光纤发光体系统中为保护光纤将红外光(光波长 > 750 nm)滤过, 提供的为冷光, 不能满足光合细菌能量转换需求(在 700 nm~900 nm 有特征吸收); 因此, 管式光合反应器的放大即是长度的放大, 管式光合反应器由于较容易与其他加工设备配套, 在长度加长方面具有独特的优势。

光合细菌产氢的关键酶 - 固氮酶对氧非常敏感, 低浓度的氧即使会使固氮酶失去活性, 因此在探索光合反应器的液体循环方面局限性较小, 首先选择物料与循环装置不直接接触的蠕动泵, 但是蠕动泵释放功率有限, 在蠕动泵转速为 80 r/min~120 r/min 时, 液体的流速仅为 2 cm/s~3 cm/s, 此条件下液体的雷诺数 < 2000, 表明液体的流动为层流; 将细胞作为质点, 细胞随液体流动轨迹相对于光源不发生变化, 此流体状态不利于气体的溢出及细菌的均匀受光; 需要选择大功率蠕动泵或其他泵种改变发酵液流动状态, 既能保证反应体系密闭又能保证液体呈湍流状态, *R. rubrum* 的产氢效率还有进一步提升的潜力。

*R. rubrum* 在自然光照条件的氢产量比人工光照条件下(持续光照或光暗交替条件)低, 且发酵周期相对较长, 分析可能的原因为: 1) 自然光条件下发酵条件不稳定, 细胞需要消耗更多的维持能应对环境变化导致底物到产物的代谢流减少; 2) 由于人工光照条件下的光照强度和波长组成比较稳定, 且人工光照能量密度较高, 而自然光照随季节、时间而发生很大变化, 较难控制光照强度和光波长的组成, 从而影响氢产量; 对于光照强度大于 40000 Lux 的自然光能够采用遮光方式使其达到 *R. rubrum* 产氢的最适光照强度, 但是波长组成较难控, 利用自然光的产氢效率较低。利用自然光产氢, 不同批次的产氢速率和产氢持续时间差异较大, 该条件下最高产氢效率仅为人工光照条件下产氢效率的 24%~28%, 因此利用自然光的产氢效率需进一步提高。但是, 利用自然光的产氢比人工光照成本显著降低, 同时本研究不借助于昂贵设备控制发酵工艺参数(尤其是光照), 即能保证 *R. rubrum* 在太阳光下连续产氢, 该光合产氢系统操作简单, 投资成本低; 产氢效率进一步提高后, 该工艺有望开发成一种低成本产氢技术。

## 参 考 文 献

- [1] Burris RH. Nitrogenases. *J Biol Chem*, 1991, **266**(15): 9339-9342.
- [2] Gest H, Kamen MD, Brecoff HM. Study on the metabolism of photosynthetic bacteria: V photoproduction of hydrogen and nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem*, 1950, 153-170.
- [3] Simpson FB, Burris RH. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, 1984, **224**(4653): 1095-1097.
- [4] Gest H, Kaman MD. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, 1949, **109**: 558.
- [5] Maness PC, Weaver PF. Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**(5/6): 751-756.
- [6] Van Praag E, Degli Agosti R, Bachofen R. Rhythmic activity of uptake hydrogenase in the prokaryote *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Rhythms*, 2000, **15**(3): 218-224.
- [7] Kern M, Klipp W, Klemme JH. Increased nitrogenase-dependent H<sub>2</sub> photoproduction by *hup* mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(6): 1768-1774.
- [8] 朱瑞艳, 王 迪, Zhang YP, 等. 深化红螺菌 *draTGBhupL* 双突变菌株在不同光照条件下的产氢. *科学通报*, 2006, **51**: 2045-2051.
- [9] Uyar B, Eroglu I, Yucel M, *et al.* Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *Int J of Hydrogen Energy*, 2007, **32**: 4670-4677.
- [10] Sasikala K, Ramana CV, Rao PR. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrogen Energy*, 1991, **16**: 597-601.
- [11] Eroglu I, Askan K, Gunduz U, *et al.* Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J of Biotechnol & Bioeng*, 1999, **70**(1): 103-113.
- [12] Akkerman I, Janssen M, Rocha J, *et al.* Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1195-1208.
- [13] Borodin VB, Tsygankov AA, Rao KK, *et al.* Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **69**(5): 478-485.
- [14] Tsygankov AA, Fedorov AS, Kosourov SN, *et al.* Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **80**(7): 777-783.
- [15] Fitzmaurice WP, Sarri LL, Lowery RG, *et al.* Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol Gen Genet*, 1989, **218**(2): 340-347.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>