

亚心形四角藻培养和产氢过程一体化 平板光生物反应系统

郑 阳^{1,2}, 陈兆安¹, 傅贇彬^{1,2}, 陆洪斌¹, 张 卫¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所海洋产品工程组, 大连 116023; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 利用整合了燃料电池的平板光生物反应器, 探讨了将亚心型四角藻高密度培养和产氢两段工艺一体化集成的可行性. 在培养阶段通入体积分数为2%~5%的CO₂可使藻细胞迅速增殖, 9 d内即可达到产氢要求的生物量(8.5 × 10⁶ cell/mL). 通过叶绿素荧光参数分析, 选择2%的CO₂培养的藻进行后续的产氢实验. 结果表明, PS II活性和光合电子传递速率均随时间的推移而逐渐下降. 通过对产氢动力学曲线的分析, 计算出最大产氢速率为1.1 mL/(h · L), 持续产氢时间为60 h.

关键词 平板光生物反应器; 一体化工艺; 亚心形四角藻(*Tetraselmis subcordiformis*); 叶绿素荧光; 燃料电池
中图分类号 Q949.2 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)11-2209-04

随着化石能源的日益枯竭, 氢能作为可再生的清洁能源已成为各国研究者关注的热点. 早在1939年, Gaffron^[1]就发现单细胞绿藻在厌氧光照条件下可产生氢气. 随着对绿藻制氢研究的深入, 人们相继发现了很多种具有明显产氢能力的绿藻, 如: *Scenedesmus obliquus*^[1], *Chlamydomonas reinhardtii*^[2,3], *Tetraselmis subcordiformis*^[4]等. 目前, 产氢工艺大都是将微藻培养于摇瓶中, 然后于对数生长期收集, 再用于光照产氢^[2~5]. 由于摇瓶培养所获得的藻细胞密度低, 无法达到产氢要求的最优密度, 因此在产氢前需要通过离心浓缩来达到产氢要求的生物量. 为简化产氢过程和降低产氢成本, 本文探讨了将平板光生物反应器高密度培养与光照产氢结合于同一反应器中集成化产氢的可行性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

羰基氰化物间氯苯腙(CCCP, Sigma公司); 甲醇和丙酮, A. R.级(天津市科密欧化学试剂开发中心), 亚心形四角藻(*Tetraselmis subcordiformis*)由辽宁省水产科学研究院提供. Olympus(BH-2)显微镜; GC-960T气相色谱仪(上海海欣色谱仪器厂, 5A分子筛, 2 m × 2 m, 载气为氩气); Water-PAM叶绿素荧光仪(德国, WALZ); P-9710辐照计(德国, Gigahertz optik); HPG-400光照培养箱(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); 碱性燃料电池(自制); SWP-NSR八通道无纸记录仪(大连瑞星仪表有限公司).

1.2 藻种培养

亚心形四角藻经实验室纯化后, 以康维方营养盐为培养基, 于2 L三角瓶中培养, 接种初始密度5 × 10⁴ cell/mL, 藻液体积1 L; 温度25 °C; 光强50 μE/(m² · s)(400~700 nm); 光暗比为14:10.

1.3 产氢一体化反应器系统

一体化光生物反应器系统见图1, 在微藻的培养阶段, 转换阀D为开放态, 通过泵C向反应器中泵入空气和CO₂混合气, 为藻提供碳源的同时还能起到搅动藻液的作用; 在制氢阶段开放B, 以N₂气吹扫除去反应器中的氧, 此时D仍为开放态. 然后关闭B和D, 使反应器处于密闭状态. 继续由泵C进行体系内气体的自循环. 系统产生的氢气被燃料电池E消耗, E的电流变化可由监测系统G记录.

收稿日期: 2008-02-28.

基金项目: 国家“九七三”计划(批准号: 2003CB214500)、国家“八六三”计划(批准号: 2006AA05Z106)、中国科学院知识创新工程重要方向项目基金(批准号: KSCX2-YW-G-002)和中国科学院知识创新工程领域前沿项目基金资助.

联系人简介: 张 卫, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事海洋绿藻制氢理论和技术研究. E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

1.4 藻液培养及产氢实验

将培养于摇瓶中处于指数生长期的藻, 稀释至 10^6 cell/mL, 接种于平板反应器中, 藻液体积为 1.5 L. 通以一定浓度的 CO_2 , 待藻密度达到 8×10^6 cell/mL 时, 进行产氢实验. 产氢时, 先通氮气吹扫 10 min 左右, 以达到厌氧状态. 然后使反应器避光 4 h, 待氢酶充分表达后注入 CCCP, 30 min 后开始进行连续光照产氢, 光照强度为 $100 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (400 ~ 700 nm). 反应器内气体浓度及产氢速率由气相色谱和燃料电池进行检测.

1.5 叶绿素荧光参数测定

取反应器中藻液 2 μL , 加入到 Water-PAM 荧光仪样品池中, 再加入新鲜培养基 3 mL, 暗适应 10 min 后, 进行快速光曲线、 F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m'$ 的测定.

2 结果与讨论

2.1 培养阶段 CO_2 对平板反应器中藻生长的影响

CO_2 是藻类光合作用最重要的碳源, 在培养过程中添加 CO_2 可缩短倍增时间促进藻的增殖^[6]; 还可抑制光饱和效应发生, 提高光合效率^[6,7]; 另外还能抑制暗呼吸, 促进碳水化合物的积累^[7]. 图 2(A) 表明, 培养阶段通入体积分数为 2% 和 5% 的 CO_2 , 可明显促进藻的增殖, 9 d 内藻密度可达到 8.5×10^6 cell/mL 左右, 近乎空气处理组的 2 倍. 同时, 该两组处理对干物质的积累有明显的促进作用 [图 2(B)]; 而 10% 和 15% CO_2 处理组对藻密度和干重的影响不明显, 几乎与空气处理组相同; 20% CO_2 处理组对藻的生长有明显的抑制作用, 这是由于高浓度的 CO_2 使藻液 pH 值持续下降, 造成酸碱胁迫所致^[6,7]. 可见, 在培养时通入一定浓度的 CO_2 可实现藻的迅速增殖和生物质的快速积累, 在短时间内达到产氢所需的生物量^[4,5], 并省去目前产氢方法中的离心浓缩步骤.

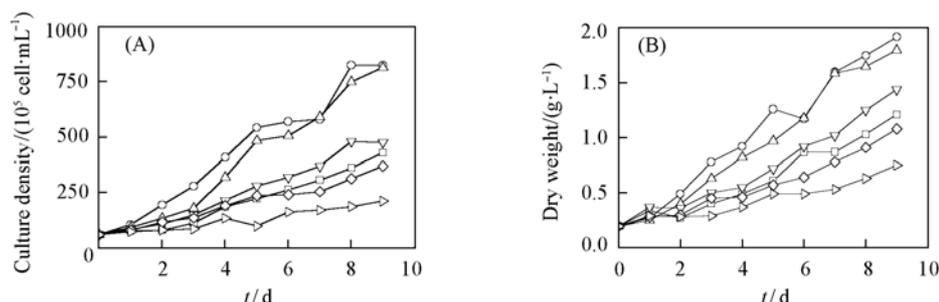


Fig. 2 Effect of CO_2 supplementation on cell growth kinetics of *Tetraselmis subcordiformis*

(A) Cell growth kinetics in terms of cell density; (B) cell growth kinetics in terms of cell dry weight.

□ Air control; ○ 2% CO_2 ; △ 5% CO_2 ; ▽ 10% CO_2 ; ◇ 15% CO_2 ; ▽ 20% CO_2 .

2.2 培养阶段叶绿素荧光参数的变化

叶绿素荧光技术被广泛用于植物光合作用的研究^[8~11]. 微藻样品所具有的潜在最大光合量子产率以 F_v/F_m 表示; 实际光合量子产率以 $\Delta F/F_m'$ 表示. 以上二者可作为 PS II 活性的反映. 图 3 显示, 2% CO_2 处理组的这两项指标均为最高, PS II 活性最好, 具有较强的光合能力; 而 5% CO_2 处理虽有较强的潜在光合能力, 但其实际光合量子产率并不高. 另外, 通过快速光诱导曲线(图 4)可以看出, 各处理组中, 2% CO_2 处理组具有最强的电子传递能力(电子传递能力是高效产氢的物质保障).

2.3 产氢阶段叶绿素荧光参数的变化

绿藻制氢的本质是氢酶利用光合过程传递的电子和质子产生氢气的过程^[2,3,12]. 因此, 可用叶绿

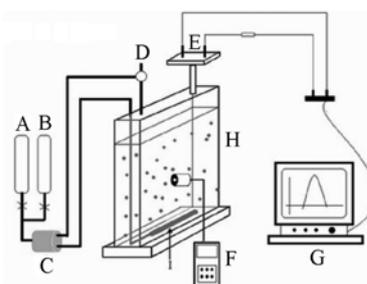


Fig. 1 Integrated photobioreactor and alkaline fuel cell system

A: CO_2 bottle; B: N_2 bottle; C: micro vacuum pump; D: gas path switch valve; E: fuel cell; F: radiation meter; G: on-line computer monitor system; H: flat-plate photobioreactor (size: 20 cm \times 20 cm \times 4.0 cm; actual volume: 1.6 L); I: air disperse unit.

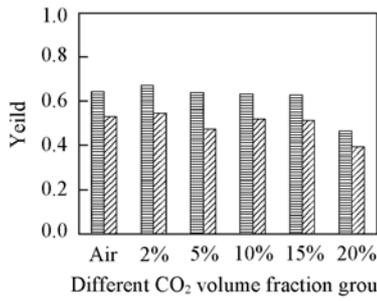


Fig. 3 Chlorophyll fluorescence yield of algal cells grown at different CO₂ volume fractions

■ F_v/F_m ; ▨ $\Delta F/F_m'$.

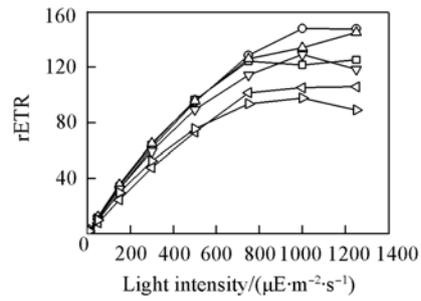


Fig. 4 Rapid light induced curve of algal cells grown at different CO₂ volume fraction

□: Air control; ○: 2% CO₂; △: 5% CO₂; ▽: 10% CO₂; ◁: 15% CO₂; ▷: 20% CO₂.

素荧光技术来表征产氢过程中光合能力的变化. 图 5 表明, 随着产氢时间的推移, 快速光诱导曲线不断下降, 说明光合电子传递能力随着时间的推移而逐渐减弱, 进而影响氢酶的电子和质子供给, 使产氢能力下降. 造成这一现象的可能原因是储藏物质的大量消耗, 造成维系自身生存的能量供给不足; 产氢过程中的副产物如: 甲酸、乙酸等对藻体产生毒害作用^[12]. 图 6 显示产氢体系中 F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m'$ 都随时间的推移不断下降, 说明一旦光照产氢开始, PS II 即处于一个逐渐失活的状态. 其原因可能是自身 D1 蛋白无法得到及时修复, 进而造成还原侧电子积累, 使 PS II 活性下降^[12]. D1 蛋白的修复较慢, 而电子积累造成的活性下降相对较快, 二者相互竞争使光照 10 h 内 PS II 活性下降明显, 此后达到一个相对稳定状态; 产氢 20 h 后, PS II 活性继续下降, 电子供给能力进一步减弱. 且藻细胞本身是一个活的生命体, 在高密度条件下会发生溶解现象, 这也是造成叶绿素荧光发生变化的原因之一.

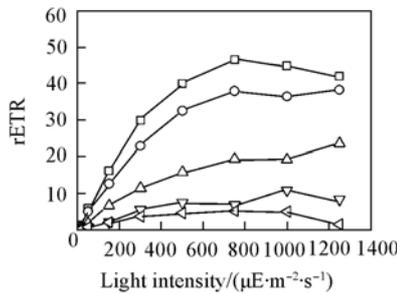


Fig. 5 Rapid light curves of algal cells at different hydrogen production time

□: Dark 0 h; ○: dark 4 h; △: light 4 h; ▽: light 8 h; ◁: light 24 h.

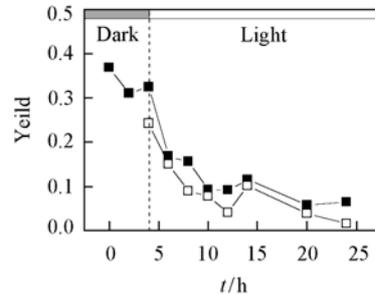


Fig. 6 Chlorophyll fluorescence yield of algal cells at different hydrogen production time

■: F_v/F_m ; □: $\Delta F/F_m'$.

2.4 偶联燃料电池后产氢动力学曲线分析

微藻光解水所产的氢气可直接提供给碱性燃料电池使用, 根据其电流 I 的变化可计算氢的消耗速率, 进而得出产氢速率, 公式如下^[13]:

$$R_{H_2} = \frac{1}{k} \cdot \frac{dR_a}{dt} + R_a$$

式中, R_{H_2} 代表产氢速率; R_a 代表氢消耗速率; k 为常数 (本实验室构建的系统中, 经测定 k 值为 0.3046). 图 7 为碱性燃料电池耗氢速率与产氢速率的关系. 经计算, 产氢的总体积为 26.77 mL, 燃料电池耗氢总体积为 26.35 mL, 最大产氢速率为 1.1 mL/(h · L), 最大耗氢速率为 1.23 mL/(h · L). 该产氢动力学过程可分为 3 个阶段: (1) 产氢速率迅速上升阶段. 这一阶段光合电子传递能力强, 氢酶

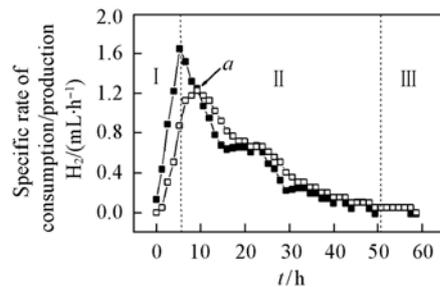


Fig. 7 Kinetic curve of photobiohydrogen production

■: Rate of H₂ production; □: rate of H₂ consumption.

活性高,产氢速率大于耗氢速率,反应器中氢气浓度不断加大,产氢系统处于“供大于求”状态;(2)产氢速率下降阶段.此阶段产氢速率持续下降,至图7中a点处与耗氢速率相等,此后便始终低于燃料电池的耗氢速率,并一直延续到光照后的60 h左右,这一阶段系统处于“供不应求”状态;(3)产氢稳定状态.这一阶段,系统的产氢速率基本恒定,但较低.所产氢气全部被燃料电池消耗,反应器中氢气浓度接近为零.另外,该动力学曲线与前述PS II活性、光合电子传递能力(rETR)在变化趋势上吻合得很好,说明这些指标是影响产氢的关键因素.

参 考 文 献

- [1] Gaffron H. . Nature[J], 1939, **143**: 204—205
- [2] RAN Chun-Qiu(冉春秋), ZHANG Wei(张卫), YU Xing-Ju(虞星炬), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(1): 62—66
- [3] Zhang Liping, Thomas Happe, Anastasios Melis. Planta[J], 2002, **214**: 552—561
- [4] Guan Ying-Fu, Zhang Wei, Deng Mai-Cun, *et al.* . Biotechnology Letters[J], 2004, **26**: 1031—1035
- [5] Ran Chun-Qiu, Yu Xing-Ju, Jin Mei-Fang, *et al.* . Biotechnology Progress[J], 2006, **22**(2): 438—443
- [6] Ikuko Iwasaki. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology[J], 1998, **44**: 184—190
- [7] Ikuko Iwasaki. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology[J], 1996, **36**: 327—332
- [8] Hu Qiang, Norihide Kurano. Appl. Microbiol. Biotechnol. [J], 1998, **49**: 655—662
- [9] Nils G. A. , Ekelund K. , Andreas Aronsson. . Environmental and Experimental Botany[J], 2007, **59**: 92—98
- [10] Graham Peers, Neil M. Price. Nature[J], 2006, **441**(7091): 341—344
- [11] Peter J. Ralph, Rolf Gademann. Aquatic Botany[J], 2005, **82**: 222—237
- [12] Melis A. . Planta[J], 2007, **226**: 1075—1086
- [13] Du Hai. Study of the Process Characterizations of H₂ Photoproduction from *Platymonas Subcordiformis* at High Cell Density[D], Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 2005

Integrated Cultivation and Photohydrogen Production of *Tetraselmis Subcordiformis* in a Flat-plate Photobioreactor System

ZHENG Yang^{1,2}, CHEN Zhao-An¹, FU Yun-Bin^{1,2}, LU Hong-Bin¹, ZHANG Wei^{1*}

(1. Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract This paper aimed to develop an integrated processes of microalgal cultivation and hydrogen photoproduction in a flat-plate photobioreactor system combined with alkaline fuel cell. The optimal high cell density of 8.5×10^6 cell/mL was achieved on 9 d when the cultivation of *Tetraselmis subcordiformis* was supplemented with CO₂ of 2%—5% (volume fraction) in the flat-plate photobioreactor. When the bioreactor system was switched to the hydrogen production condition, hydrogen evolution was induced by the addition of carbonylcyanide (*m*-chlorophenylhydrazone, CCCP) and anaerobic condition, with a maximum hydrogen production rate of 1.1 mL/(h · L) for 60 h. The kinetics analysis of algal chlorophyll fluorescence was carried out to identify the limiting factors in both algal growth and hydrogen production at 2% CO₂ supplementation. At hydrogen production phase, algal PS II activity and relative electron transfer rate(rETR) decreased with the increase of time, which caused the decline and eventual stop in hydrogen production. To sustain the hydrogen production, PS II activity and rETR must be maintained. The results demonstrate the feasibility of process integration of algal cultivation and hydrogen production in one single system, which will significantly improve the process economics.

Keywords Flat-plate photobioreactor; Process integration; *Tetraselmis subcordiformis*; Chlorophyll fluorescence; Fuel cell

(Ed. : H, J, Z)