

硫和 pH 对蛋白核小球藻光照产氢的影响

贺立静¹, 雷腊梅¹, 龙敏南², 韩博平^{1*}

(1. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 在有无硫及 pH 5.0-8.0 下对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)光照产氢的影响进行了研究。结果表明, 在持续光照 ($165 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 条件下, 从有硫培养液 (TAP 培养液) 内叶绿素 a 含量、Fv/Fm 值及 Φ_{PSII} 值的变化表明蛋白核小球藻在 pH 6.0-7.0 时生长最佳, 生长旺盛易形成暂时的无氧环境而利于藻产氢。最高的产氢速率和总产氢量出现在 pH 7.0, 分别是 $0.10 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ 和 1.39 ml。从无硫培养液 (TAP-S 培养液) 内叶绿素 a 含量、Fv/Fm 值及 Φ_{PSII} 值的变化表明蛋白核小球藻生长明显受抑制, 形成的无氧环境持久, 故产氢持久, 总产氢量比有硫培养液内高。蛋白核小球藻在 pH 5.5 培养液内的 Fv/Fm 值后期高于其他 4 种 pH 值的, 表明潜在的 PSII 光化学效率高, 在光照条件下产氢电子主要来源于 PSII, 故 pH 5.5 的无硫培养液内藻的产氢速率和总产氢量最大, 分别是 $0.58 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ 和 10.98 ml。说明 pH 为 5.5 的无硫培养液是蛋白核小球藻产氢的最佳条件。

关键词: 蛋白核小球藻; 产氢; pH; 硫

中图分类号: Q949.205

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)06-0487-06

Effects of Sulfur and pH on Photohydrogen Production of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa*

HE Li-jing¹, LEI La-mei¹, LONG Min-nan², HAN Bo-ping^{1*}

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The effects of sulfur and pH (5.0-8.0) on photohydrogen production was investigated in a unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. Under continuous illumination of $165 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ conditions, in the TAP culture medium, changes of chlorophyll a content, Fv/Fm and Φ_{PSII} indicated that growth of *C. pyrenoidosa* were very well at initial cultivation pH ranged from 6.0 to 7.0 and can form a temporary anoxic conditions in favor of H_2 production. Maximum H_2 production was obtained at initial cultivation pH 7.0 by *C. pyrenoidosa*. The maximum rate of H_2 produced by *C. pyrenoidosa* was $0.10 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ and the maximum total yield of H_2 produced was 1.39 ml. In TAP-S culture medium, changes of chlorophyll a content, Fv/Fm and Φ_{PSII} indicated that growth of *C. pyrenoidosa* were inhibited and can form a permanent anoxic conditions in favor of H_2 production. The total yield of H_2 production by *C. pyrenoidosa* in TAP-S culture was more than that in TAP culture. The Fv/Fm value of *C. pyrenoidosa* in pH 5.5 TAP-S culture was higher than the others culture. It indicated the residual PSII was more than the others. Under continuous illumination the electron of production H_2 requirement mostly comes from PSII, so the maximum rate and total yield of H_2 produced by *C. pyrenoidosa* appeared in pH 5.5 TAP-S cultures. The maximum rate of H_2 produced by *C. pyrenoidosa* was $0.58 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ and the total yield of H_2 produced was 10.98 ml. The H_2 production of *C. pyrenoidosa* was notable effected by sulfur and pH. In this test the best

收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-04-26

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2004B33401002); 国家“863”计划项目 (2002AA515030) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

conditions for H₂ production of *C. pyrenoidosa* was in pH 5.5 TAP-S cultures.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; Hydrogen production; pH; Sulfur

氢气是一种清洁的可再生能源,自 60 年前 Gaffron 等发现单细胞绿藻在光照下能产生氢气^[1]以来,单细胞绿藻产氢越来越受到人们的关注。氧是藻类光合作用过程中的主要产物,而氧对氢酶有很强的抑制作用,所以绿藻在光照条件下产氢通常是一个很短暂的现象^[2]。藻细胞在无硫培养液内生长时,一个显著的改变就是光系统 II (PS II) 活性降低^[3],莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 在无硫培养时光合放氧降低,产生的氢气量增加^[2-4]。除了硫元素对产氢的影响外,微藻产氢还受到温度、培养液的 pH 和光照强度等因素的影响,不同影响因素的组合对产氢有很大的影响^[5-6]。培养液的 pH 对微藻产氢的影响已经在绿藻^[7-9]以及蓝藻^[10]中得到证实,但也有报道认为 pH 对蓝藻^[10]产氢没有影响。

小球藻属的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 生长快,可用于大规模培养,是目前经济生产中的重要淡水藻,因此对其是否产氢以及产氢是否受到硫元素及培养液 pH 影响的研究有一定意义。本文研究在密闭和连续光照条件下,硫元素和 pH 对蛋白核小球藻光照产氢的影响。同时通过测定叶绿素含量和叶绿素荧光参数 Fv/Fm 和 Φ_{PSII} 的变化来研究硫和 pH 对蛋白核小球藻光照产氢影响的主要原因。

1 材料和方法

蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 用 BG11^[11]培养液培养。将藻液接种在 1 L 的三角烧瓶后放置在光照强度约为 165 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 温度 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$, 光暗时间比为 12:12 的条件下培养。藻细胞生长至对数期时,用离心法收集,在 4 000 \times g 下离心 5 min。收集的藻体分别转到 TAP^[12]和 TAP-S (所有的硫酸盐都用相同浓度的的氯盐代替,缩写为 TAP-S) 培养液中培养,实验设有 pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 和 8.0 共 6 个梯度,在 pH 5.0 下培养的藻虽可存活,但不产氢,故本文只讨论其它 5 个 pH 梯度。无硫培养的藻体用 TAP-S 培养液洗两次后将藻体悬浮在不同 pH 的 TAP-S 培养液中。有硫培养时,离心浓缩后的藻体直接悬浮在不同 pH 的 TAP 培养液中。藻细胞数量达到 9 \times 10⁶-10 \times 10⁶ cells ml⁻¹

时,用翻口橡皮塞塞紧培养瓶,暗适应 24 h 后,以光照强度为 165 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的日光灯进行全光照。培养瓶内藻液的体积为 130 ml,藻液上部空间的体积约为 6 ml,排水法读取气体的体积变化,用气相色谱检测气体组成,反应过程中产生的氢气量由气体组成乘以气体的体积求得。

藻细胞叶绿素荧光参数:用 XE-PAM 叶绿素荧光仪,测定蛋白核小球藻的 PS II 光化学效率。每隔 24 h 取 3 ml 藻细胞进行 1 min 暗适应处理,然后照射测量光(<0.10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$),荧光水平稳定后即为首始荧光(F₀)。随后打开饱和脉冲(5 700 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 0.6 s),一个脉冲后得到暗适应后的最大荧光(F_m),随后打开光化光(198 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$),1 min 后藻细胞光合作用达到稳态,得到荧光参数 F_s。这时再以饱和脉冲光处理,一个脉冲后得到光下最大荧光(F_m')^[13],每个重复 3 次。以此即可得到充分暗适应的 PS II 最大光化学量子产量 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, PS II 光化学能量转化的有效量子产量 $\Phi_{PSII} = \Delta F/F_m'$ 。

藻类叶绿素 a 用反复冻融 - 浸提法提取并测定^[14]其含量。

2 结果

2.1 硫元素和 pH 对叶绿素 a 含量的影响

叶绿素 a 含量是反映藻类生物量的直观指标,其动态变化反映了藻类的生长情况。有硫培养液 (TAP 培养液) 内的蛋白核小球藻在培养 72 h 内的叶绿素 a 含量呈直线增加,尤其在 48 h 内增长速度最快。48 h 内在 pH 5.5 和 8.0 培养的藻叶绿素 a 含量增加较其它 pH 下培养的略少,叶绿素 a 含量分别是 11.62 和 16.06 mg L⁻¹,而其它 pH 值培养液中藻的叶绿素 a 含量在 18-19 mg L⁻¹ 之间(图 1a)。无硫培养液(TAP-S 培养液)内的蛋白核小球藻光照 24 h 的叶绿素 a 含量都比 TAP 中略有增加,光照 48 h 除在 pH 5.5 下培养的藻叶绿素 a 含量下降外,其余 pH 值条件下生长的藻叶绿素 a 含量都有不同程度的升高,pH 8.0 培养液内藻的叶绿素 a 含量最高,达 2.47 mg L⁻¹。光照 72 h 各 pH 值培养液内藻的叶绿素 a 含量都减少(图 1b)。

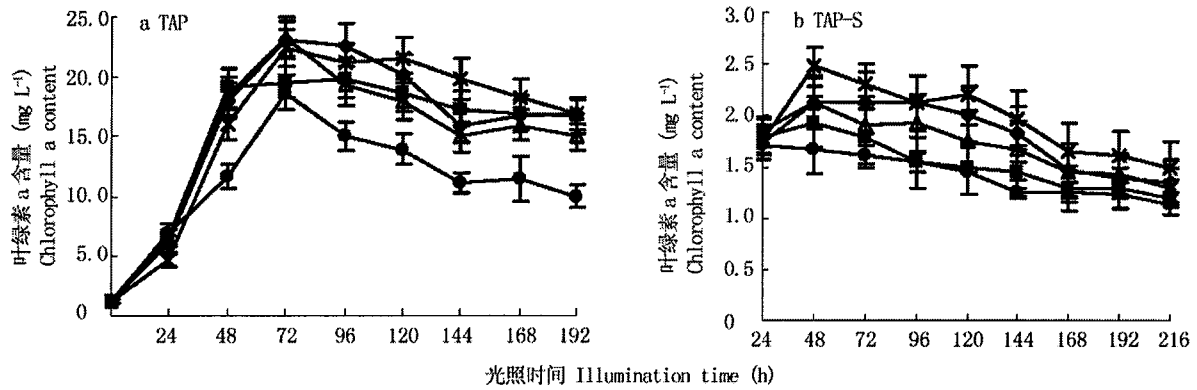


图 1 持续光照条件下硫和 pH 对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响
 Fig. 1 Effect of pH on the chlorophyll a contents of *Chlorella pyrenoidosa* in sulfur-replete (a) and sulfur-deprived (b) algal culture medium under the continuous illumination

◆ pH=5.5; ■ pH=6.0; △ pH=6.5; ◇ pH=7.0; * pH=8.0. 图 2-5 同。The same for Figs. 2-5.

2.2 硫元素和 pH 对 Fv/Fm 和 Φ_{PSII} 的影响

参数 Fv/Fm 是充分暗适应的光合机构潜在的 PSII 光化学效率, 代表了原初的光能转化效率, 但不受参与 Calvin 循环酶的影响, 所以此参数反映的不是整个光合作用; 参数 Φ_{PSII} 是 PS II 非环式电子传递的量子效率, 即打开光化光时的有效量子产量, 反映了 PS II 反应中心在环境胁迫中有部分关闭情况下的实际原初光能捕获效率, 可反映实际的 PS II 反应中心进行光化学反应的效率^[13]。蛋白核小球藻在有硫培养液内, 除在 pH 5.5 下的 Fv/Fm 值一直呈下降趋势外, 其余 pH 值条件下的 Fv/Fm 在光照 48 h 时略有升高, 且各 pH 之间差异不显著(图 2a)。在 TAP-S 培养液内, 光照 72 h pH 值对 Fv/Fm 值的影响差异不明显, 都呈下降趋势, 且 72 h 时下降到初始水平的 50%。光照 72 h 后, pH 5.5 培养液内蛋

白核小球藻的 Fv/Fm 值一直高于其他 4 种 pH 值下藻的 Fv/Fm 值; 随着 pH 的增加, Fv/Fm 有下降的趋势(图 2b)。

在 TAP 培养液内, pH 5.5 时蛋白核小球藻的 Φ_{PSII} 值在光照 48 h 后呈下降趋势; 而 48 h 以前, 在 pH 8.0 下培养的蛋白核小球藻的 Φ_{PSII} 值显著低于 pH 6.0、6.5 和 7.0 条件下的(图 3a)。TAP-S 培养时, Φ_{PSII} 值下降速度比 Fv/Fm 值快, 在 48 h 已经下降到初始水平的 50%, 在 96 h 时已经接近于 0(图 3b)。

2.3 硫元素和 pH 对产氢的影响

蛋白核小球藻在 TAP 培养液连续光照条件下培养 36 h 左右停止产氢, pH 5.5 培养液内的蛋白核小球藻总产氢量最少, 只有 0.98 ml; 其次是 pH 8.0, 总产氢量为 1.15 ml; pH 6.0 和 6.5 的产氢量相同, 为

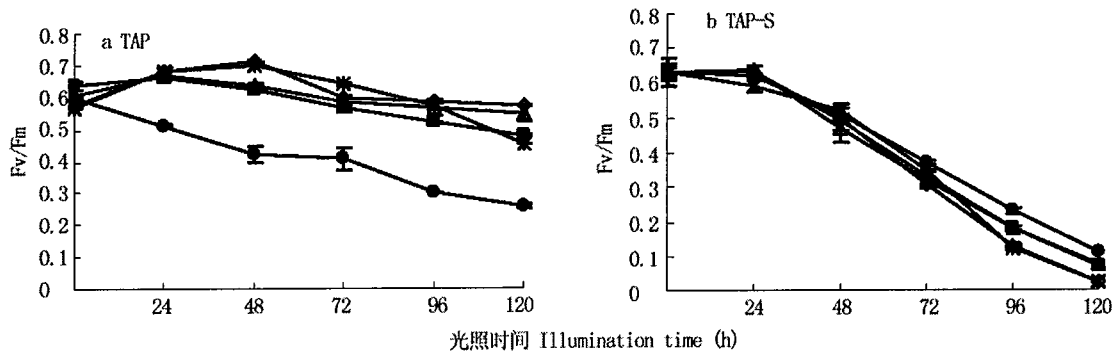


图 2 持续光照条件下硫和 pH 对蛋白核小球藻叶绿素荧光值 Fv/Fm 的影响
 Fig. 2 Effect of pH on Fv/Fm of *Chlorella pyrenoidosa* in sulfur-replete (a) and sulfur-deprived (b) algal culture medium under the continuous illumination

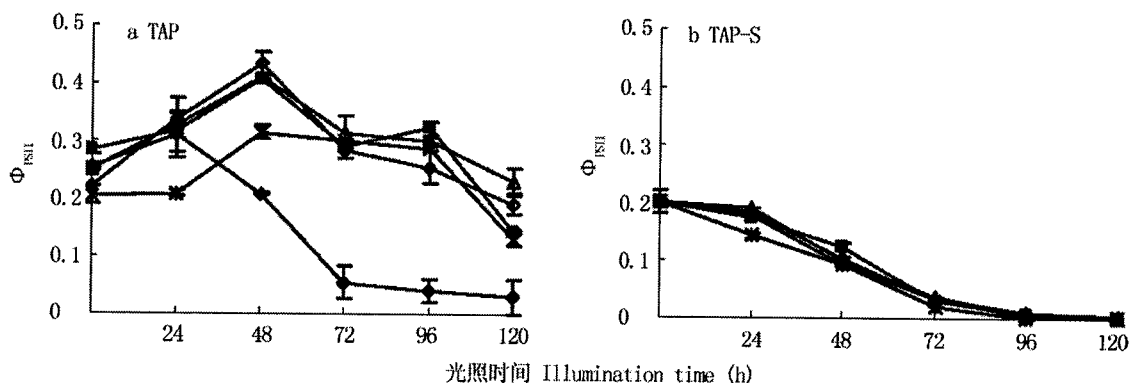


图 3 持续光照下硫和 pH 对蛋白核小球藻叶绿素荧光值 Φ_{PSII} 的影响

Fig. 3 Effect of pH on Φ_{PSII} of *Chlorella pyrenoidosa* in sulfur-replete (a) and sulfur-deprived (b) algal culture medium under the continuous illumination

1.34 ml; pH 7.0 的产氢量最高, 有 1.39 ml(图 4 a)。在 TAP-S 培养液内, 蛋白核小球藻产氢时间可以持续 216 h, pH 5.5 的产氢量最高, 共有 10.98 ml; pH 6.0 和 6.5 的产氢量次之, 分别为 5.57 和 5.71 ml; pH 7.0 和 8.0 的产氢量最少, 分别为 1.13 和 0.89 ml (图 4b)。

图 5 显示了相应的产氢速率。在 TAP 培养液中, pH 6.5 培养的蛋白核小球藻在光下 12 h 左右达到最大的产氢速率 $0.08 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$; pH 7.0 培养液内蛋白核小球藻在光下 24 h 达到最高产氢速率, 为 $0.10 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$; pH 5.5、6.0 和 8.0 培养液内蛋白核小球藻在 36 h 达到最高产氢速率, 分别为 0.06 、 0.065 和 $0.08 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ 。在 TAP 培养液内藻的产氢时间持续都很短, 在 36 h 后迅速下降, 48 h 后停止产氢。在 TAP-S 培养液内 pH 7.0 和 8.0 的产氢速率在 72 h 达到最大值, 分别是 0.09 和 $0.04 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$; pH 6.0 和 6.5 的产氢速率在 96 h 达到最大, 都在 $0.30 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ 左右; 而 pH 5.5 的产氢速率在 144 h 达到最大, 为 $0.58 \text{ ml mg}^{-1} \text{ chl h}^{-1}$ 。

3 分析和讨论

硫是微藻生长所需要的大量元素之一, Hase^[15]报道了在无硫时莱茵衣藻会停止分裂生长。硫的缺乏对莱茵衣藻的光合作用和呼吸作用影响不同, 硫缺失导致了 PS II 光化学效率的降低, 从而使光合作用下降, 而细胞呼吸作用却基本保持不变^[3-4]。莱茵衣藻在密闭无硫培养时, 即使在持续光照条件下也可以形成厌氧的环境, 厌氧环境是诱导氢酶产生且使其保持活性产生氢气的必需条件。本实验中蛋白核小球藻在无硫培养液内生长时, 从叶绿素荧光的变化(图 2a, 3a)可以看出其光合作用在逐渐下降, 从叶绿素 a 含量(图 1a)的变化可推断出蛋白核小球藻的生长基本停止。由于光合作用的下降及呼吸作用的存在使蛋白核小球藻在无硫密闭的条件下形成了一个厌氧的环境, 从而有利于产生氢气(图 4b)。而在有硫培养液生长时蛋白核小球藻也可以产生氢气(图 4a), 从叶绿素 a 含量变化可以看出蛋白

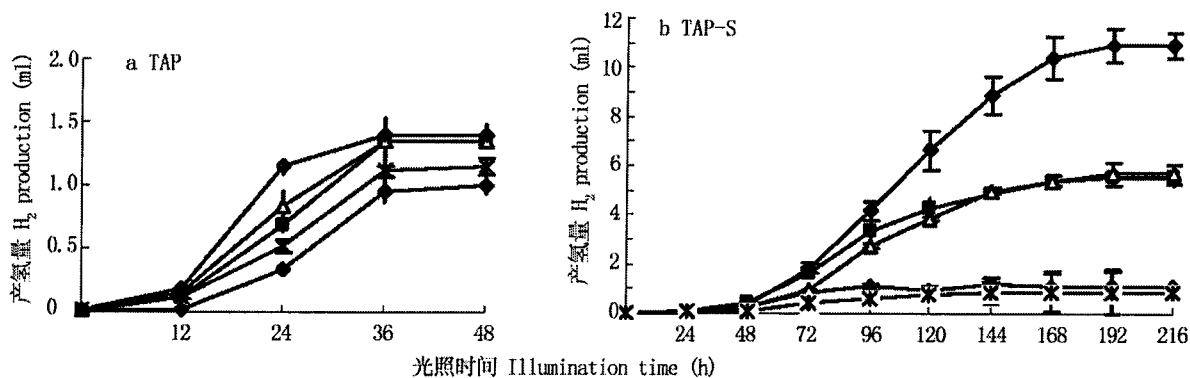


图 4 持续光照下硫和 pH 对蛋白核小球藻总产氢量的影响

Fig. 4 Effect of pH on the total yield of hydrogen production of *Chlorella pyrenoidosa* in sulfur-replete (a) and sulfur-deprived (b) algal culture medium under the continuous illumination

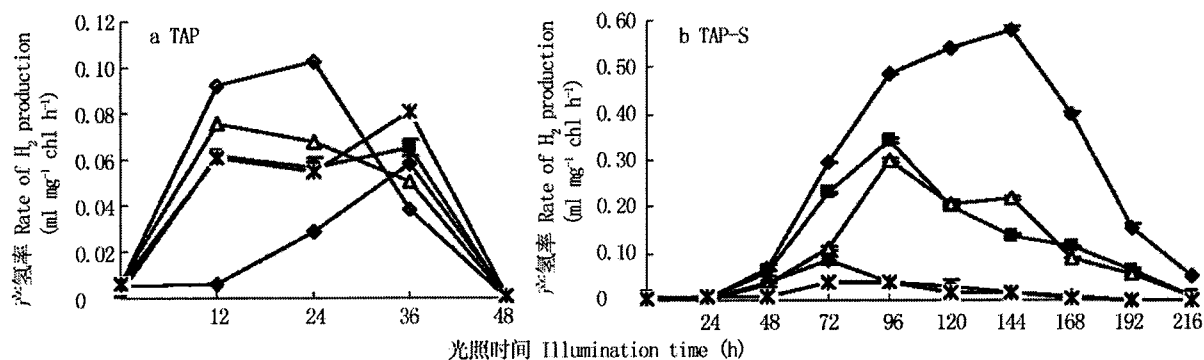


图5 持续光照条件下硫和 pH 对蛋白核小球藻每瓶产氢率的影响

Fig. 5 Effect of pH on the rate of hydrogen production of *Chlorella pyrenoidosa* in sulfur-replete (a) and sulfur-deprived (b) algal culture medium under the continuous illumination

核小球藻生长速度很快(图1),由此推断可能是由于过多的呼吸作用形成了局部缺氧环境而导致氢酶的表达并且催化产生氢气,这种情况在莱茵衣藻中也有出现^[6]。蛋白核小球藻在无硫培养液中的最高产氢量是有硫培养液中的7.9倍(图4),最高产氢速率是1.3倍(图5)。无硫可以提高氢气产量在淡水藻莱茵衣藻^[2-3]及海水藻扁藻^[7]中均得到证实。

pH 作为影响蛋白核小球藻生长的一个因素,也影响着其产氢。在有硫培养液内总产氢量受 pH 值影响不显著,最高总产氢量是最低总产氢量的1.5倍。pH 5.5 下培养的蛋白核小球藻生长速度最慢(图1a, 2a, 3a),其产氢总量也最少(图4a)。pH 8.0 培养液内藻的生长速度略大于 pH 5.5 的,其产氢总量略高于 pH 5.5。其余3种 pH 值下生长的蛋白核小球藻无论是叶绿素荧光参数还是叶绿素 a 含量都无显著差异(图1a, 2a, 3a),所以其最后总产氢量也无显著差异(图4a)。蛋白核小球藻在无硫培养液内最高产氢速率和产氢量在 pH 5.5 培养液内出现。总产氢量和产氢速率受到 pH 值影响显著,最高产氢量是最低产氢量的12.4倍(图4b),产氢速率是15.38倍(图5b)。从叶绿素 a 含量和叶绿素荧光参数的变化可以看出(图1b, 2b, 3b),蛋白核小球藻在无硫培养液内产氢与光合机构潜在的 PSII 光化学效率 Fv/Fm 有一定的关系,Fv/Fm 值在 72 h 前差异不显著(显著水平 $\alpha=0.05$),各 pH 培养液内藻细胞总产氢量差别不大(图4b)。在 72 h 后, pH 5.5 培养液内藻的 Fv/Fm 值下降最慢,其次是 pH 6.0 和 6.5 培养液内藻的 Fv/Fm 值,而 pH 7.0 和 8.0 培养液内藻的 Fv/Fm 值下降速度最快(图2b)。表明

在 pH 5.5 培养液内藻潜在的 PSII 光化学效率高,因为在光照条件下产氢电子主要来源于 PSII^[7],所以最高产氢量和产氢速率在 pH 5.5 培养液内出现,其次是 pH 6.0 和 6.5(图4b, 5b)。在无硫培养液内总产氢量受到 pH 的影响已有报道,莱茵衣藻在 pH 7.7 时的产氢量和产氢速率最高,在 pH 高于和低于 7.7 时产氢量和产氢速率降低^[7]。扁藻在 pH 8 时的产氢量最高^[8]。扁藻产氢量受 pH 值影响不显著, pH 8 比 pH 7 仅减少了 19.3%, pH 9 比 pH 7 减少了 25%。而莱茵衣藻产氢量受 pH 影响显著。蛋白核小球藻与这两种藻产生最高产氢量时的 pH 值不同,但产氢量与莱茵衣藻一样受 pH 影响显著。

参考文献

- [1] Melis A, Happe T. Hydrogen production: Green algae as a source of energy [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127:740-748.
- [2] Ghirardi M L, Zhang L, Lee J W, et al. Microalgae: A green source of renewable H₂ [J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18:506-511.
- [3] Melis A, Zhang L, Forestier M, et al. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122:127-136.
- [4] Wykoff D D, Davies J P, Melis A, et al. The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:129-139.
- [5] Khatipova E, Miyake M, Miyake J, et al. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate by *Rhodobacter sphaeroides* on various carbon and nitrogen substrates [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 162:39-45.
- [6] Tsygankov A, Kosourov S, Seibert M, et al. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures [J]. *Inter J Hydr Energy*, 2002, 27:1239-1244.

- [7] Kosourov S, Seibert M, Ghirardi M L. Effect of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(2):146–155.
- [8] Schnackenberg J, Ikemoto H, Miyachi S. Photosynthesis and hydrogen evolution under stress conditions in a CO₂-tolerant marine green alga, *Chlorococcum littorale* [J]. *J Photochem Photobiol, B: Biol*, 1996, 34:59–62.
- [9] Antal T K, Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa apicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH [J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98:114–120.
- [10] Shah V, Garg N, Madamwar D. Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 194:71–75.
- [11] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria [J]. *J Gen Microbiol*, 1979, 111:1–61.
- [12] Harris E H. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use [M]. San Diego: Academic Press, 1989:575–580.
- [13] Han B P(韩博平), Han Z G(韩志国), Fu X(付翔). *Algal Photosynthesis: Mechanisms and Models* [M]. Beijing: Science Press, 2003: 57–76.(in Chinese)
- [14] Lin S J(林少君), He L J(贺立静), Huang P S(黄沛生), et al. Comparison and improvement on the extraction method for chlorophyll a in phytoplankton [J]. *Ecol Sci(生态科学)*, 2005, 24(1):9–11.
- [15] Hase E, Otsuka H, Mihara S, et al. Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, studied by the technique of synchronous culture [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1959, 35:180–189.
- [16] Zhang L P, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga) [J]. *Planta*, 2002, 214:552–561.
- [17] Benemann J R. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production [J]. *Inter J Hydr Energy*, 1997, 22(10):979–987.
- [18] Guan Y F, Deng M C, Yu X J, et al. Two-stage photo-biological production of hydrogen by marine green alga *Platymonas subcordiformis* [J]. *Biochem Engin J*, 2004, 19:69–73.