

# 葡萄糖对莱茵衣藻生长和产氢的影响

贾立娜 张 翎\* 谭天伟

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘 要:** 通过在莱茵衣藻的培养基中添加葡萄糖, 考察了葡萄糖对莱茵衣藻生长及产氢的影响。结果表明, 在 Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 培养基中添加葡萄糖对莱茵衣藻生长有利, 最佳葡萄糖浓度为 0.3 g/L, 藻细胞数和叶绿素浓度分别提高了 12.8% 和 16.4%。在产氢培养基中, 添加葡萄糖对莱茵衣藻产氢也有促进作用, 氢气产量提高了 27%。

**关键词:** 葡萄糖; 莱茵衣藻; 产氢; 细胞生长

**中图分类号:** TQ116.29

生物能源包括生物质能、生物液体燃料及利用生物质生产的能源, 如燃料酒精、生物柴油和生物质氢等<sup>[1]</sup>。其中, 氢能清洁可再生, 有可能成为 21 世纪的重要燃料之一。由于化学法制氢要消耗大量的矿物资源, 因而生物产氢技术受世人关注。

生物制氢法中主要采用的生物有厌氧微生物、光合细菌及藻类。由于藻类产氢利用太阳能和水, 制氢过程不产生污染, 因此具有较大发展优势。自从 Melis<sup>[2]</sup> 采用去硫法大幅度提高莱茵衣藻的产氢能力后, 人们对莱茵衣藻产氢研究给予了极大关注。在莱茵衣藻培养过程中, 对其培养环境进行控制, 当气相和液相中氧气含量降低后, 莱茵衣藻即被诱导, 合成出氢酶, 然后催化产生氢气<sup>[3]</sup>。作为普遍碳源, 葡萄糖有可能促进莱茵衣藻的呼吸作用, 并能为莱茵衣藻产氢提供电子<sup>[4]</sup>, 因此在莱茵衣藻产氢过程中起到重要作用。本文研究了在生长培养基和产氢培养基中添加葡萄糖后, 莱茵衣藻的生长和产氢的变化, 为产氢工艺优化提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种纯化培养与培养基

中国科学院水生生物研究所提供的野生型莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 为藻种, 培养基

为 Tris-Acetate-Phosphate (TAP)<sup>[5]</sup>, 初始 pH 7.2。

在培养基中加入质量分数 1.5% 的琼脂粉, 制成固体培养基平板, 再将待分离纯化的藻液通过划线方法接种在平板上, 置于培养箱中, 27℃ 培养 7 天。从平板上挑取单藻落, 接入 100 mL 液体培养基中, 在培养箱中以 150 μmol/(m<sup>2</sup>·s) 的光强光照静置培养。

把正常培养基<sup>[5]</sup>内的硫酸镁、硫酸铁、硫酸铜和硫酸锌分别换为等摩尔的氯化镁、氯化铁、氯化铜和氯化锌, 将该含氯化物的培养基作为产氢培养基。

### 1.2 产氢培养

将培养到对数生长期后期的藻培养液 (细胞数约为 3 × 10<sup>6</sup> ~ 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL) 于 4000 r/min 离心 8 min, 倒出上清液。把藻细胞加入到培养基中, 成为藻悬液。用青霉素小瓶与反口塞组成配套培养瓶, 高压灭菌, 移入藻悬液, 瓶口朝下置于培养箱内, 在 27℃, 以 150 μmol/(m<sup>2</sup>·s) 光照培养, 一定时间后, 用微量进样器抽取瓶中气体, 测定氢气体积。每天取出瓶中少量培养液, 测定藻细胞数。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 细胞数和叶绿素的测定** 将藻液按比例稀释后, 测定其在 750 nm 处的吸光度 (721 分光光度计)。依据标准曲线计算出藻细胞数。叶绿素质量浓度按照 Harris 的方法测定<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 氢气的测定** 采用气相色谱 (东西电子 GC 4000A, 北京) 测定氢气与氧气的含量, 分子筛 5 × 10<sup>-10</sup> m, 柱长 2 m, 内径 3 mm, 以氮气作为载气。进样体积 100 μL, 柱温 50℃, 进样温度 60℃, 热导检测温度 110℃。用外标法计算氢气和氧气体积<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2005-11-29

基金项目: 国家“973”计划 (2003CB716002); 国家“十五”科技攻关项目 (2004BA3411B05/2004BA71B0-02)

第一作者: 女, 1980 年生, 硕士生

\*通讯联系人

E-mail: zhangxu@mail.buct.edu.cn

## 2 结果与讨论

### 2.1 葡萄糖对莱茵衣藻生长的影响

葡萄糖可作为多数微生物的碳源,也可以作为藻类混合营养培养时的有机碳源<sup>[6]</sup>。实验室以前研究表明,莱茵衣藻不能利用葡萄糖作为单一碳源生长,但在本文中,将适量葡萄糖加入到 TAP 培养基中,并不影响莱茵衣藻的生长,反而对其生长有一定的促进作用,结果如图 1 所示。

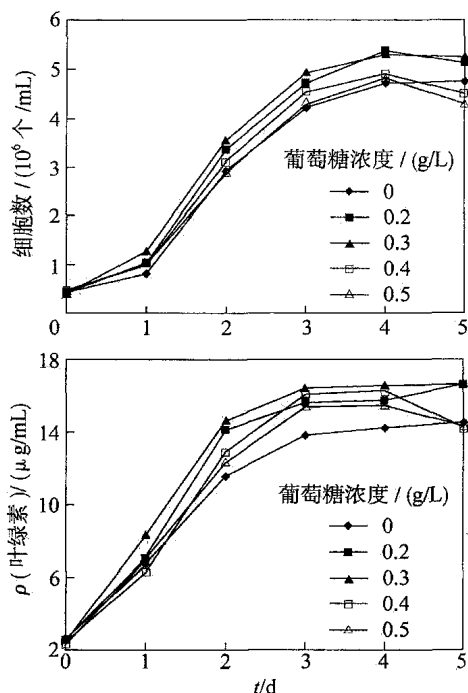


图 1 葡萄糖对莱茵衣藻生长及叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of glucose on *Chlamydomonas reinhardtii* growth and chlorophyll concentration

当加入葡萄糖 0.2 g/L 时,莱茵衣藻细胞数最大,到第四天时为  $5.39 \times 10^6$  个/mL,叶绿素质量浓度为  $15.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,分别比空白样多了 14.3% 和 11%。添加到 0.3 g/L 葡萄糖时,莱茵衣藻生长的叶绿素质量浓度最大,第四天藻细胞数为  $5.32 \times 10^6$  个/mL,叶绿素质量浓度为  $16.56 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,分别比空白样多了 12.8% 和 16.4%。葡萄糖浓度达 0.5 g/L 时,生长情况与未添加葡萄糖样品基本相同。藻细胞培养到第五天时,添加葡萄糖的样品除 0.3 g/L 的添加量外,都有下降趋势,这可能是由于莱茵衣藻利用葡萄糖的代谢物对其生长有一定反馈抑制作用。实验结果表明,葡萄糖在 0~0.4 g/L 范围内,有利于莱茵衣藻的生长和分裂。对藻细胞数,最佳葡萄糖浓度为 0.2 g/L。对叶绿素质量浓度,最

佳葡萄糖浓度为 0.3 g/L。综合对两者的促进效果,以 0.3 g/L 较好。

### 2.2 葡萄糖对莱茵衣藻产氢量影响

葡萄糖不仅可以为微生物提供碳源,而且也是很多微生物代谢中的还原底物,为合成代谢提供电子。作为莱茵衣藻的碳源,葡萄糖能够在培养时促进莱茵衣藻的呼吸作用,加快厌氧环境形成,同时为氢酶催化产氢提供电子,促进莱茵衣藻合成氢酶,催化生成氢气。

对产氢培养基中添加或不添加葡萄糖的产氢结果进行对比,依据葡萄糖对莱茵衣藻生长的影响结果,采取 0.3 g/L 的葡萄糖质量浓度,研究葡萄糖对莱茵衣藻产氢的影响。结果显示,产氢培养基中添加葡萄糖后,氢产量有较大提高,未添加葡萄糖产氢培养基样品,氢产量为  $4.08 \mu\text{L}/\text{mL}$ ,添加葡萄糖产氢培养基样品,氢产量为  $5.2 \mu\text{L}/\text{mL}$ ,比未添加葡萄糖样品提高了 27%。这说明葡萄糖作为广泛的还原性底物,可能在莱茵衣藻产氢过程为合成氢气提供了电子,使得产氢量提高。

### 2.3 葡萄糖对莱茵衣藻产氢时生长的影响

为证明添加葡萄糖后氢气产量提高是由于葡萄糖为莱茵衣藻产氢提供电子的结果,考察了在来茵衣藻产氢时葡萄糖的添加量对藻细胞数和叶绿素质量浓度的影响。结果如图 2 所示。

在培养初始阶段,由于藻细胞培养环境由空气开放状态改变为密闭状态,培养基中的溶氧量骤降,藻细胞不适应环境变化,添加葡萄糖的藻细胞数减少到原藻细胞数的 70%,未添加葡萄糖的藻细胞数减少到原藻细胞数的 88%;添加葡萄糖的叶绿素质量浓度减少到最初的 54%,未添加葡萄糖的叶绿素质量浓度减少到最初的 77%。未添加葡萄糖样品适应环境快,在第二天就缓慢恢复生长,第三天时藻细胞数恢复到  $3.95 \times 10^6$  个/mL,叶绿素质量浓度恢复到  $14.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。而添加葡萄糖样品的藻细胞数在第三天时只有  $3.22 \times 10^6$  个/mL,叶绿素质量浓度为  $9.95 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。从培养的第三天后,添加葡萄糖样品没有恢复生长的现象,藻细胞数和叶绿素质量浓度缓慢下降,未添加葡萄糖样品藻细胞生长情况优于添加葡萄糖样品。在实验结束后,测定葡萄糖含量。葡萄糖浓度由最初的 0.3 g/L 变为 0.015 g/L,说明葡萄糖在产氢过程被消耗。

实验表明葡萄糖的加入对于莱茵衣藻的恢复生长没有作用,这可能是由于葡萄糖的加入,直接提供

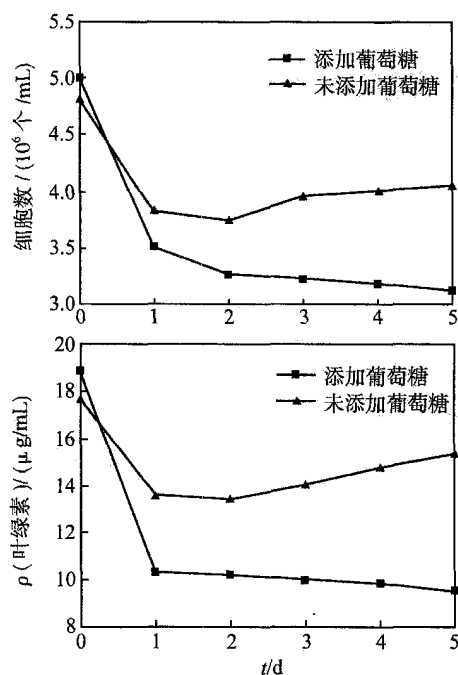


图 2 葡萄糖对莱茵衣藻产氢时藻细胞数的影响

Fig. 2 Effect of glucose on hydrogen production *Chlamydomonas reinhardtii* growth and chlorophyll concentration

呼吸作用底物,促进了莱茵衣藻的呼吸作用,在产氢过程不利于莱茵衣藻的生长。说明氢气产量的增加可能是其为莱茵衣藻产氢提供电子的作用结果,与藻细胞密度的提高与否无关。

### 3 结论

最佳葡萄糖浓度为 0.3 g/L,藻细胞数和叶绿素质量浓度分别比未添加葡萄糖时多 12.8% 和 16.4%。产氢培养基中添加 0.3 g/L 葡萄糖,可使氢气产量提高 27%。

### 参 考 文 献

- [1] 谭天伟,王芳,邓利. 能源生物技术[J]. 生物加工过程,2003,1(1):32-36.
- [2] Melis A, Zhang L, Maria L. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Physiology, 2000,122(1):127-135.
- [3] Antal T, Krendeleva T, Laurinavichene T, et al. The dependence of algal H<sub>2</sub> production on photosystem and O<sub>2</sub> consumption activities in sulfur deprived *C. reinhardtii* cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1607(2):153-160.
- [4] 贾立娜,张栩,谭天伟. 谷氨酸废液培养莱茵衣藻的产氢研究[J]. 生物加工过程,2005,3(1):45-48.
- [5] Harris E H. The *Chlamydomonas* Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use[M]. New York: Academic Press, 1989:32-34.
- [6] Lemm G, Ma W M, Qian Z P, et al. Mixotrophic cultivation of microcystis viridis[J]. Bulletin of Botanical Research, 2002,22(2):241-246.

## Effect of glucose on cell growth and hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*

JIA Li-na ZHANG Xu TAN Tian-wei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** The effects of added glucose on hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* and growth of *Chlamydomonas reinhardtii* were studied. The results show that glucose addition promoted both cell growth and hydrogen production. The maximum cell density and chlorophyll concentration were observed when 0.3 g/L glucose was added to a TAP medium. Compared with a control sample, the cell density and chlorophyll concentration were increased by 12.8% and 16.4% respectively, whilst the hydrogen production was increased by 27%.

**Key words:** glucose; *Chlamydomonas reinhardtii*; hydrogen production; cell growth