

固定化光合细菌产氢过程的 基质利用动力学

徐向阳 俞秀娥 郑平 陈蔚 冯孝善

(浙江农业大学环保系 杭州 310029)

摘要 研究了固定化荚膜红假单胞菌 386、红假单胞菌 D 两菌株产氢过程基质利用的动力学特性。基质利用与产氢过程以不同的速率进行,琼脂包埋固定化细胞的产氢能力高于海藻酸钙固定化细胞,但最大产氢活性的进程迟于后者。固定化 D 菌株利用葡萄糖的动力学遵循一级反应,其反应常数 K 值为 $1.2 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$ 。宏观动力学分析表明,利用基质的产氢过程属于反应控制,扩散传质过程不构成控速步骤。386 和 D 两个菌株固定化细胞生物反应器连续产氢系统,在以乳酸作基质时,平均产氢量分别可达到 0.659L/d 和 0.457L/d,容积(液相)产氢率接近 $1.0\text{L/L} \cdot \text{d}$ 。

关键词 固定化细胞,光合细菌,光产氢,动力学,生物反应器

已有的研究表明,在厌氧光照条件下,光合细菌可利用葡萄糖、苹果酸、乳酸、低分子量的有机酸和一些有机废水为基质产氢^[1-4]。作者曾应用固定化细胞技术,在分批培养条件下研究了两株红假单胞菌光照产氢过程的特性,证实固定化细胞能明显提高产氢效率,延长产氢持续时间^[5,6]。

有关固定化光合细菌产氢过程的基质利用动力学和传质特性,以及固定化细胞在生物反应器内连续产氢等研究,尚未见国内外文献报道。为此,本文拟通过红假单胞菌 386 和 D 两个菌株,探讨固定化光合细菌产氢过程与基质利用的相互关系,并以此为基础,分析基质利用的动力学;同时应用生物反应器,在连续操作的条件下,考察基质去除效率和产氢效能,以期固定化光合细菌的工业化应用提供理论依据和有关技术参数。

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 (*Rhodospseudomonas capsulata*) 386 菌株和红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas* sp.) D 菌株。由浙江大学生物系孙琦教授惠赠。

1.1.2 培养基:菌株预培养采用 RCVBN 培养基,其中碳源和氢供体为苹果酸,氮源为谷氨酸。试验时,氢供体和碳源为葡萄糖和乳酸,其余不变。

1.1.3 培养方法与条件:分批试验时,在 100ml 血清瓶中装 50ml 培养液,接入固定化细胞后用铝盖压紧,放置于 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 水浴槽中光照培养,表面光强 $7\ 500 \pm 100\text{lx}$,定时分

析基质浓度和产氢量。

连续试验时,采用上流式固定化细胞生物反应器,总体积 950ml,内填装一定体积的固定化细胞颗粒。通过蠕动泵将基质以一定流速泵入底部,同时以相同流速将出水泵出。产生的氢气以排水集气法计量。其工艺流程见图 1。光强、温度等条件同上。

1.2 细胞干重测定

菌体细胞干重用菌体悬浊液在 660nm 吸光度换算,经测定,菌株 386 单位吸光度为 0.42mg/ml,菌株 D 为 0.52mg/ml。

1.3 固定化细胞的方法

采用琼脂和海藻酸钠作为包埋剂。

1.3.1 琼脂方法:取 3ml 处于稳定生长期的菌体悬液(细胞干重 5—6mg)与 7ml 2%琼脂混匀(55℃)。通过蠕动泵滴加到经预冷的 50ml 培养液中,所成颗粒即为固定化细胞。

1.3.2 海藻酸方法:取 3ml 菌体悬液(含细胞干重 5—6mg)与 7ml 2.86%海藻酸钠相混合,用蠕动泵将其滴加到 1.5%的 CaCl_2 溶液中,固化 1 小时后,用生理盐水清洗二次,将颗粒转入培养液中。

填装于生物反应器的固定化细胞颗粒亦按上述条件制得。

1.4 分析方法

1.4.1 H_2 含量:在 102G 气相色谱仪上进行,纯氢作外标。

1.4.2 葡萄糖测定:用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定。

1.4.3 COD:重铬酸钾法^[7]。

2 结果与分析

2.1 基质利用与产氢的动态特性

2.1.1 不同固定化材料的影响:采用不同的固定化材料,即琼脂和海藻酸钠,以浓度为 5 200mg/L 左右的葡萄糖作为产氢基质,在相同的条件下进行试验。基质利用与产氢过程并非同步进行,往往后者滞后,特别是培养初期,基质消耗速率很大,而产氢量却比较低。经计算在 120 小时内,海藻酸包埋的细胞产氢系,其中基质去除率为 81.2—88.0%,基质利用速率和去除率高于琼脂固定化细胞,后者仅 77.0%左右。从产氢过程来看,发现海藻酸钠包埋的固定化细胞,在培养过程的前期,其产氢能力比琼脂固定化细胞高,后期则以后者的产氢能力为高。培养 0—120 小时,总产氢量后者高于前者(见

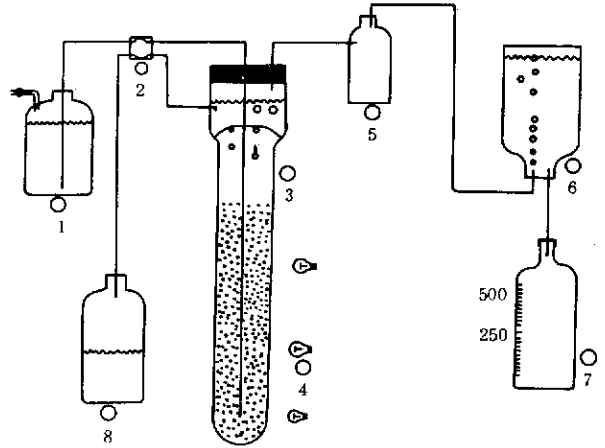


图 1 固定化细胞生物反应器连续光产氢的工艺流程图

Fig. 1 Schematic diagram of immobilized cells bioreactor set up for continuous H_2 photoproduction.

1. Feed reservoir, 2. Feed pump, 3. Bioreactor,
4. Illumination with lamp, 5. Gas-liquid separator,
6. H_2 collection bottle, 7. Cylinder for H_2 production with NaOH displacement, 8. Effluent reservoir

图 2)。因此，消耗单位质量的产氢底物，琼脂固定化细胞的产氢能力高于海藻酸钠固定化细胞。

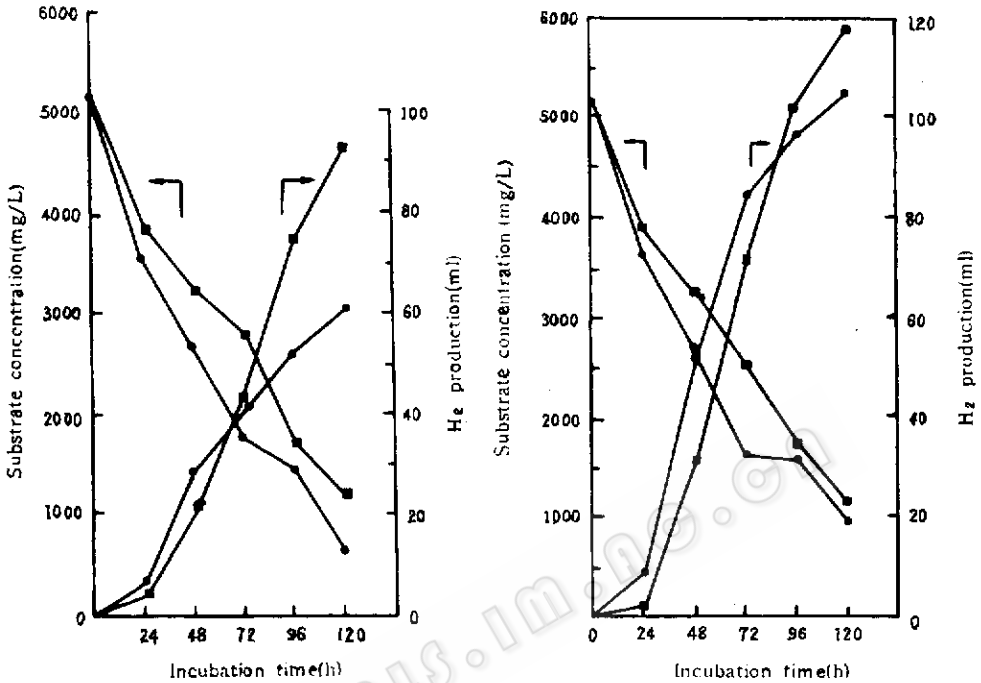


图 2 以琼脂、海藻酸钠作包埋剂下基质利用与产氢的关系

Fig. 2 The relationship between substrate utilization and H_2 production for immobilized cells with agar and alginate

a. Strain 386, b. Strain D —■—■ Agar —●—● Alginate

分析各时段产氢速率与比产氢速率，还可以看出，386 菌株和 D 菌株一样，海藻酸钠固定的细胞达到最大产氢速率（或最大比产氢速率）的时间均早于琼脂固定化细胞。在前者的产氢系中，24—48 小时产 H_2 达到最大值；D 菌株 $35.8 \text{ ml/L} \cdot \text{h}$ ($279.3 \text{ ml/g} \cdot \text{h}$)；386 菌株为 $18.8 \text{ ml/L} \cdot \text{h}$ ($144.0 \text{ ml/g} \cdot \text{h}$)。相应地在琼脂固定化细胞中，D 菌株在 48—72 小时段出现最大值，为 $33.8 \text{ ml} \cdot \text{H}_2/\text{L} \cdot \text{h}$ ($263.7 \text{ ml/g} \cdot \text{h}$)；386 菌株则在 72—96 小时内才出现最大值为 $27.1 \text{ ml/L} \cdot \text{h}$ ($208.0 \text{ ml/g} \cdot \text{h}$)。这种滞后现象很可能与固定化细胞操作条件有关，在琼脂包埋细胞时，需保持一定温度 (55°C)，这一条件不可避免影响固氮酶的活性。基质利用速率和产氢速率相对减低（见图 2）。但由于琼脂具有良好的光透性和基质传质速率，经过一段时间培养有关酶活性得以恢复，使总产氢量高于海藻酸钠包埋的细胞。但琼脂作固定化细胞的包埋剂，主要问题是凝胶不易形成均匀球状颗粒，且容易粘结成块。

2.1.2 不同颗粒大小对基质利用和产氢的影响：图 3 是不同粒径的海藻酸钠固定化 D 菌株细胞对基质利用和产氢的影响。结果清楚地表明，随着粒径的增大，固定化细胞的产氢能力有所降低，但无明显差异，基质的降解速率十分接近。

2.2 产氢过程的基质利用动力学

2.2.1 本征动力学分析:所谓的本征动力学是假设底物和产物在固定化细胞的微环境和本体大环境之间无扩散阻力条件下的动力学行为。因此可采用固定化细胞的碎粒作为本征动力学研究的对象。

设固定化细胞碎粒的基质利用符合一级反应动力学, 即:

$$-dS/dt=KS$$

$$\text{积分后有: } \ln S_0/S_t = Kt \quad (1)$$

式中 S_0 ——初始基质浓度 (mg/L)

S_t —— t 时基质浓度 (mg/L)

K ——一级反应动力学常数 (1/h)

根据前面固定化 D 菌株细胞碎粒 (直径 <1mm) 在初始葡萄糖浓度 5.45g/L 所得到的实验数据, 获得如下的方程:

$$\ln S_0/S_t = 0.012 (t - 1.8)$$

$$\text{相关系数 } r = 0.9968 \quad (2)$$

式中常数项可定义为固定化细胞利用基质的过程的松弛时间 (或诱导时间)。

由 r 值可知, 相关显著, 故可以认为在一定培养时间内, 固定化 D 菌株基质利用的本征动力学符合一级反应, 其中动力学常数 K 为 $2.1 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 。

2.2.2 传质特性分析:一般来说, 固定化细胞生物反应过程具有多相反应的特征。其表现行为包括如下过程: ①基质由液相本体扩散到固定化细胞颗粒表面并进行两相分配; ②由表面扩散到活性界面; ③继续扩散到活细胞上; ④进行生化反应。

鉴于固定化光合细菌产氢过程的基质利用属于慢反应过程, 外扩散阻力可不予考虑, 即颗粒表面的基质浓度等于本体浓度。在仅考虑内扩散阻力的情况下, 对球形颗粒厚度为 dr 的微元壳体作物料平衡, 有:

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \cdot \frac{dS}{dr} \right) = KS/D, \quad (3)$$

$$\text{边界条件为 } r=0 \quad dS/dr=0 \quad (4)$$

$$r=R \quad S_r = S_0 \quad (5)$$

上式即为颗粒内基质浓度随 r 分布的微分方程。

式中, D_r ——基质在颗粒内的有效的扩散常数。

K ——一级反应动力学常数。

解此方程可得基质浓度的解析式; 同时为了分析基质在颗粒内传质速度与生化反应速率

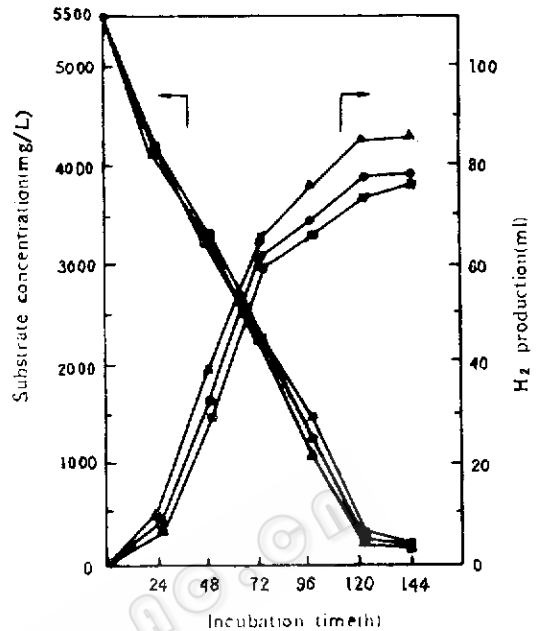


图3 颗粒大小对基质利用和产氢的影响 (D 菌株)

Fig. 3 Effects of particle size of immobilized cells (strain D) on substrate utilization and H₂ production.

- ▲——▲ D < 1.0mm
- D = 3.6mm
- D = 4.4mm

的相对比值, 常引入 Thiele 模数 Φ 和有效因子 η , 来表征颗粒对基质扩散过程和基质反应过程的影响。这里 Φ 和 η 均为无因次模量, 分别定义为:

$$\Phi = \text{反应速率/扩散速率} = R \sqrt{K/D}, \quad (6)$$

$$\eta = \text{固定化细胞的反应速率/自由细胞的反应速率}$$

$$= V/V_{\max} = \frac{3}{\Phi} \left(\frac{1}{\tan \Phi} - \frac{1}{\Phi} \right) \quad (7)$$

因基质葡萄糖在海藻酸钠内的扩散系数 D_s 为 $4.1 \times 10^{-4} \text{cm}^2/\text{min}^{(6)}$, 根据固定化 D 菌株的本征动力学参数 K 值, 可求得直径 3.6mm、4.4mm 固定化细胞颗粒的 Thiele 模数 Φ 分别为 0.126 和 0.154, 相应的有效因子为 0.999 和 0.998。很明显 Φ 值小于 0.3, $\eta = 1.0^{(9)}$, 故固定化光合细菌产氢过程的基质利用受反应控制, 而扩散阻力不构成控速因子。这一结果从动力学上也解释了不同颗粒大小对基质利用和产氢影响不明显的本质原因 (图 3)。

2.3 固定化细胞生物反应器连续产氢性能

为了实现固定化光合细菌连续产氢, 设计了如图 1 所示的生物反应器。内装有海藻酸钠包埋的固定化细胞颗粒 300—500ml。供试基质为葡萄糖和乳酸, 其 COD 浓度大致在 6 000mg/L 和 4 000mg/L 左右。根据分批实验的结果, 为了达到较高的 COD 去除率和产氢速率, 连续运行的 HRT 控制在 3.8d (即稀释速率为 0.26d^{-1})。实验结果如表 1 和图 4a、b 所示。

表 1 葡萄糖作产氢基质的固定化细胞生物反应器的运行性能

Table 1 Performance of immobilized cells bioreactor fed by glucose substrate.

Strain	Time (h)	Inf. COD (mg/L)	Eff. COD (mg/L)	COD Removal percent (%)	H ₂ production (L/d)	Volumetric H ₂ producing rate (L/L · d)	Substrate H ₂ producing rate (L/g · h)
386	2/6	6237	1803	71.1	0.184	0.409	0.166
	3/6		2339	62.5	0.184	0.409	0.189
	4/6		2787	55.3	0.289	0.642	0.335
	5/6		2787	55.3	0.165	0.367	0.191
	6/6		3564	42.9	/	/	/
			Average value		51.4	0.206	0.457
D	11/6	6597	2962	55.1	0.381	0.586	0.419
	12/6		3027	54.1	0.314	0.483	0.352
	13/6		3549	46.2	0.152	0.234	0.199
	14/6		3317	49.7	0.178	0.274	0.217
			Average value		51.3	0.256	0.394

结果发现, 生物反应器在较短的时间内, 反应器运行较为稳定, 以乳酸作为产氢基质的反应器为佳。其 COD 去除率可稳定在 60—70%; 而后随运行时间的延长, 两系统的运行性能逐渐下降, COD 去除率下降幅度为 20—50%, 出水 COD 浓度明显上升。另外, 产氢过程对运行中基质浓度的波动反应有明显的滞后现象, 这一点与前面结果有相似之处。从产氢各指标来看, 葡萄糖产氢能力相对较差, 386、D 两菌株的固定化细胞产氢系

统, 平均产氢量为 0.206L/d、0.256L/d, 基质产氢率为 0.220、0.290L/g·d, 且 H_2 浓度不高, 稳定的产氢时间较短。以乳酸作产氢基质的两产氢系统, 其平均产氢量有 0.659L/d 和 0.457L/d。平均容积(液相)产氢率 1.01L/L·d, 1.02L/L·d, 其氢含量可达 70—90%。由于氢的微泡附着于颗粒表面, 反应器床层易于膨胀, 膨胀率高达 63%, 这种自身流化作用, 有助于基质的扩散, 基质与颗粒的有效接触, 消除外扩散阻力, 这在某种程度上, 改善了反应器的运行性能。然而值得注意的是由于颗粒内产氢作用而引起发膨, 连续运行不到一周, 球形颗粒出现开裂的现象; 一周后, 有的已基本成碎粒, 出水生物量剧增。

3 结论

过程动力学研究表明, 产氢过程与基质利用并非同步进行, 产氢过程往往有滞后现象。基质利用动力学遵循一级反应, 宏观动力学以反应控制为特征, 传质扩散阻力不明显。

固定化细胞反应器在一定时间内具有较高产氢与除 COD 效能, 但随着运行时间的延长而逐渐衰退, 因此, 需进一步探求改善运行性状的对策, 以达到较长时间稳定、连续、高效的运行性能。

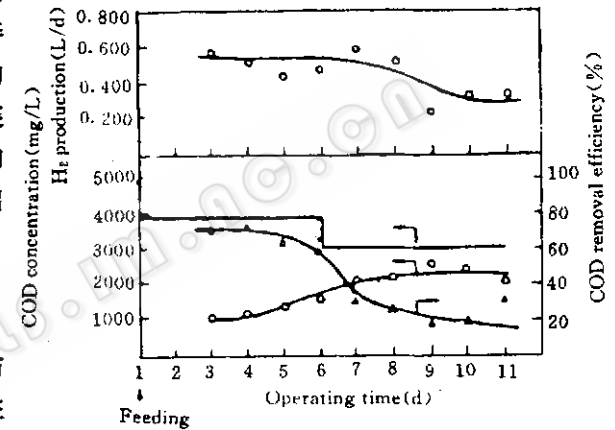
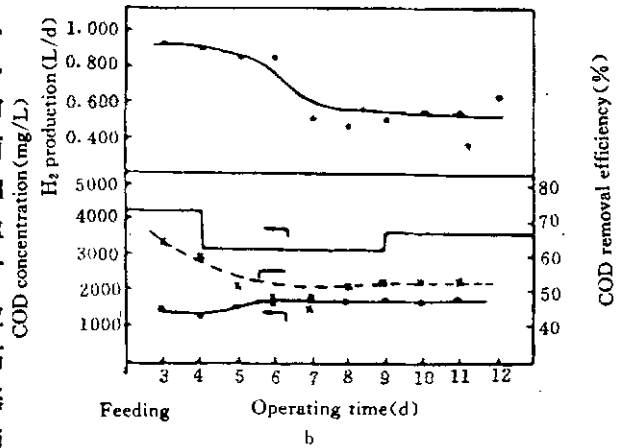


图 4 固定化细胞生物反应器连续产氢运行性能
Fig. 4 Performance of the immobilized cells bioreactor fed by lactate substrate for strain 386 and D

a. Strain 386 b. Strain D

参 考 文 献

- [1] Gest H *et al.* Science, 1949, 109: 558—560.
- [2] Fujii T *et al.* Agric. Biol. Chem., 1987, 51 (1): 1—7.
- [3] Felten P *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 23 (1): 15—20.
- [4] Segers L *et al.* Biotechnol. Bioengr., 1983, 25: 2843—2853.
- [5] 徐向阳等. 太阳能学报, 1993, 14 (4): 288—294.
- [6] 徐向阳等. 生物工程学报, 1994, 10 (4): 362—368.
- [7] 国家环保局, 水与废水标准分析方法, 北京, 中国环境科学出版社, 1989.
- [8] Tanaka H *et al.* Biotechnol. Bioengr., 1984, 26 (1): 53—58.
- [9] Bailey J E, Ollis D F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd McGraw-Hill ed, 1986.

Kinetics of Substrate Utilization for Hydrogen Production with Immobilized Cell of Photosynthetic Bacteria

Xu Xiangyang Yu Xiue Zheng Ping Chen Wei Feng Xiaoshan

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

Abstract The kinetic characteristics of substrate utilization by immobilized cells of *Rhodospseudomonas capsulata* 386 and *Rhodospseudomonas* sp. D for H₂ production was investigated. The results shown that substrate utilization didn't proceed simultaneous with H₂ formation, H₂ producing capacity of immobilized cells with agar was higher than that of alginate immotilized cells, but the appearance of maximum H₂ producing activity was later than the last one. The kinetics of substrate utilization (glucose) by immobilized cells of strain D followed the first-order reaction, rate constant K value was $1.2 \times 10^{-2}/h$, analysis of macrokinetics indicated that substrate utilization by immobilized cell in H₂ producing process was governed by biochemical reaction other than diffusion transfer, because the Thiele modulus were 0.125 and 0.154 for immobilized cells with $d = 3.6mm$ and $4.4mm$ particles, the corresponding effective factor were determined as 0.998, and 0.988 respectively. An immobilized cells bioreactor, fed by glucose and lactate, was employed as continuous H₂ producing system. It was found that H₂ production were 0.659L/d and 0.477L/d in immobilized cells system of strain 386 and D when lactate used as H₂ producing substrate, while the volumetric H₂ producing rate were all up to 1.0L/L · d.

Key words Immobilized cells, photosynthetic bacteria, H₂ photoproduction, kinetics, bioreactor