

文章编号 1001-8166(2004)增-0537-05

生物制氢：理论进展

任南琪,李永峰,郑国香,林海龙,张蕊
(哈尔滨工业大学市政环境工程学院,黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要 对生物制氢的理论研究进行了评论性的回顾。讨论了光合成生物制氢系统、光分解生物制氢系统、水气交换反应生物制氢系统、光—发酵杂交生物制氢系统和厌氧发酵生物制氢系统、离体氢酶生物制氢系统等 6 个生物制氢系统。乙醇型发酵生物制氢理论(双碳发酵产氢学说或理论)是生物制氢理论的新发展。

关键词 生物制氢;制氢系统;发酵法工艺;乙醇型发酵
中图分类号 TQ920.1 **文献标识码** A

1

0 前 言

能源对于全球的生存、繁荣与发展是至关重要的,目前人类主要利用煤和石油等化石燃料作为初级能源,而这些能源能够给人类带来全球气候改变,环境污染生态变异和健康问题^[1]。氢气作为清洁可再生的能源而被人们所接受。氢气在能源转换的电化学和燃烧过程当中不产生含碳化合物的散射,而这些含碳化合物是造成环境污染和气候变暖的主要因素,氢气则不产生这些含碳物质。氢气燃料电池和其他氢气利用技术提供了可再生能源和可持续能源利用之间的基本联系,然而以化石燃料为基础的经济向以氢气为基础的经济转换,还面临着许多理论上的挑战和技术上的困难。这些问题包括不同生物制氢工艺中的微生物代谢和产氢量及产氢速率问题,氢气生产、储藏、运输和分配^[2-6]。氢气可以由水的电解富含氢有机化合物的热裂解和生物制氢等工艺来生产。目前氢气主要是通过水的电裂解来生产,不可避免的要消耗不可再生能源和造成环境污染。氢气的生物生产主要通过微生物的代谢过程制造氢气,这成为极具吸引力的新的热点研究领域,主要因为生物制氢工艺可以利用诸如高浓度有机废水、含碳水化合物物质等一系列可再生资源来

生产氢气^[3-6]。

我们从 20 世纪 90 年代就开始了发酵法生物制氢技术的研究。直到 2002 年以后,发酵法生物制氢在国际上才引起广泛的注意^[7,8]。本文在阐述生物制氢各项工艺理论与实践的同时,重点讨论发酵法生物制氢的机理与工程应用^[9-14]。

1 生物制氢系统

1.1 光合成生物制氢系统

氢的利用水的光合成是一个可以将太阳能转换成可以利用的、能够储存的化学能的生物学过程,其化学反应方程式为:



光合成的方法在植物和藻类有着相同的生物学过程,不同之处在于伴随这一过程的是藻类产生氢而不是含碳物质。光合成涉及光吸收的 2 个光合成系统:水裂解和释氧的光系统 II 或 PSII 和生成还原剂用来 CO_2 还原的光系统 I 或 PSI。在这 2 个系统中 2 个光子(每一系统一个光子)用来从水中转移 1 个电子和 CO_2 还原或 H_2 的形成。在植物中,因不存在氢化酶系统只有 CO_2 还原的发生;在藻类(原核藻类和真核藻类都是如此)中因具有氢化酶系统,在一定的条件下产生氢分子^[15]。

收稿日期 2004-04-10。

* 基金项目 国家杰出青年科学基金项目“发酵法生物制氢生理生态学与工程技术的研究”(编号:50125823);国家重点基础研究发展规划项目“生物质高效制氢反应机理”(编号:G2000026402)资助。

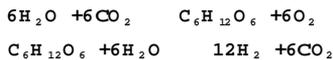
作者简介 任南琪(1959-),男,江苏省人,教授,研究方向为污水处理与环境生物技术。E-mail: rnh2003@cn.yahoo.com

绿藻的厌氧条件下氢气生产接种后需要几分钟到几小时的时间,主要在黑暗中需要诱导合成或活化涉及氢代谢的酶类,包括可逆氢化酶系统。氢化酶利用铁氧还原蛋白提供的电子结合 H^+ 质子形成和释放氢分子。 H_2 的合成支持持续不断的电子流通过电子传递链的流动,这一过程能够产生 ATP 的合成^[16]。

当进行绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 培养并剥夺无机元素硫的供给时,在有光条件下 24h 内 O_2 的合成和 CO_2 的还原固定显著降低,硫缺乏 22h 后,呼吸作用加强,培养在有光条件下,表现为厌氧并开始合成 H_2 ^[5]。基于这种原理,持续的 H_2 生产工艺在 *Chlamydomonas reinhardtii* 中已经建立起来。氢气生产速率为每 100h 为 $7.95 \text{ mol } H_2 / L$, 相当于 $0.07 \text{ mmol } H_2 / (L \cdot h)$ ^[18]。

1.2 光分解生物制氢系统

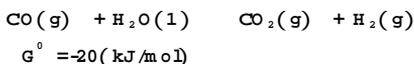
蓝细菌可以通过下面 2 个步骤释放氢:



蓝细菌是一类品种繁多、伴随地球历史而生的光能自养型微生物,具有光合作用的叶绿素分子和辅助色素分子,能够进行氧的光合成。蓝细菌的许多物种都含有能够进行氢代谢和分子氢合成的酶类。包括固氮酶催化分子氢作为还原 N_2 成为氨的副产品 H_2 的生产。氢化酶可以催化由固氮酶形成的 H_2 的氧化,也可以催化氢的合成,因而是一种可逆双向的酶类。已进行了蓝细菌的 14 个属的众多物种在不同条件下的氢气生产^[7]。氢气产率差异很大,因菌种和条件不同而异。其中 *Anabaena* 菌种氢的产量比较高。*A. variabilis* 的突变体 PK84 可以产生 $6.91 \text{ nmol } H_2 / \mu\text{g}$ 蛋白质 (350mL 培养基中)^[7]。当 *A. variabilis* 培养在氮饥饿条件时, H_2 的产率提高到 $12.6 \mu\text{g}$ 蛋白质 / h (350mL 培养基中)。培养基中的总蛋白质浓度是 $28.2 \mu\text{g/mL}$ 时, 1L 培养基含有 $28.200 \mu\text{g}$ 蛋白质,将产生 $355 \sim 320 \text{ nmol } H_2 / (L \cdot h)$ ^[17]。

1.3 水—气交换反应生物制氢系统

Rhodospirillaceae 科的某些光异养型细菌可以生长在 CO 为唯一碳源的生长环境中,产生 ATP 并伴随着 H_2 和 CO_2 的释放^[19~22], 伴随着 H_2 的释放由 CO 向 CO_2 的氧化转变,是通过下面的水—气交换反应来完成的:



这一反应由酶代谢途径中的蛋白质介导反应的,只发生在低温低压的条件下。热动力学研究表明,这一反应有利于 CO 的固定和 H_2 的合成,因为反应平衡强烈的倾向于反应的右侧。

CO 氧化过程中,化学计量意义上的 CO_2 和 H_2 含量产生了,吸附和氧化 CO 的酶是氧化还原酶(一氧化碳脱氢酶),吸附于膜的酶复合体的一部分^[22]。在黑暗中, *Rubrivivax gelatinosus* CBS 是一种完成 CO —水—气交换反应,并且 100% 转化空气中 CO_2 成为化学计量意义上的相接近的量 H_2 ; 在有光条件下,当 CO 是唯一碳源时,也同化 CO 成为细胞物质,即使是存在有机碳源作为底物时,该菌也自发利用两种底物,由此表明 CO 固定代谢途径是完全有功能的,既是存在更加有利的底物时也是如此^[5]。

CO 固定进行 H_2 的生产率是 $0.8 \text{ mmol} / (\text{mon} \cdot \text{g}$ 细胞),上面用 20% CO 充盈。因为 CO 吸收率和转化率大约为 $1.34 \text{ g } CO / (\text{h} \cdot \text{g}$ 细胞干重),即 $48 \text{ mmol } CO / (\text{h} \cdot \text{g}$ dcw)。2.0 的 OD_{660} 值产生 $2.0 \text{ g } R. \text{ gelatinosus } CBS \text{ cdw} / L$, 这相对应的是 $96 \text{ mmol } H_2 / (2 \text{ g dcw} \cdot \text{h})$, 即 $96 \text{ mmol } H_2 / \text{h}$ 的氢气产量^[5]。

1.4 光合—发酵杂生物制氢系统

这一生物制氢系统包括光和细菌和非光和细菌。可以强化生物制氢系统的产氢量。多种碳水化合物可以被 *C. butyricum* 消化降解,这种细菌不用光照就可以降解碳水化合物生产氢。产生的有机酸可以作为光和细菌的底物产生氢。厌氧细菌降解碳水化合物获得电子和能量,因为反应仅仅能向负的自由能方向进行,由厌氧细菌降解产生的有机酸不可能继续降解合成氢气。利用厌氧细菌,葡萄糖不可能完全的降解形成氢气和 CO_2 。光和细菌可以利用光能克服正向自由能反应(细菌可以利用有机酸生产氢气。这 2 种细菌的结合不仅可以还原光能满足光和细菌的能量需求,也可以增加氢气产量。

紫色非硫细菌生产分子氢,这一过程是由固氮酶在缺氮条件下由光能和还原有机物(有机酸)被固氮酶催化形成的。

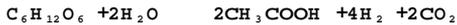


一般而言,光异养细菌的产氢率在细胞固定化时比自由存在时要高出许多。因此细胞固定化研究和工艺报道的很多。*Rhodospseudomonas capsulate* 和 *Rhodobacter spheroides* 的连续培养生产氢气的产率是 $40 \sim 50 \text{ mmol } H_2 / (L \cdot h)$ ^[23]、 $80 \sim 100 \text{ mL } H_2 / (L \cdot h)$ ^[24], *Rhodobacter spheroides* 的固定化培养产氢率为 $1.3 \sim 3.6 \sim 4.0 \text{ L } H_2 / (L \cdot h)$ 。生产率大大提

高。

1.5 厌氧发酵生物制氢系统

氢气也可以通过厌氧细菌发酵富含碳水化合物的底物生产。光合成和光降解生产获得的氢气为纯氢,发酵法生产的氢气为混合气体,含有 H_2 、 CO_2 和少量的 CO 、 H_2S 和 CH_4 。厌氧制氢的细菌主要为 *Enterobacter*, *Bacillus* 和 *Clostridium* 的许多种类。任南琪等^[24]发现了新一类的发酵产氢细菌,这些细菌的 16S rDNA 碱基顺序已经测定,并登记 GenBank,可能成为新的一类细菌,我们暂时命名为 *Biohydrogenbacterium* genus sp., 如 *Rennanqilyf1*, *RennanqilyfB* 和 B49 等菌种。极大丰富了生物制氢的微生物种质资源,发酵类型称之为乙醇型发酵^[9,24]。这些细菌偏爱碳水化合物作为产氢发酵的底物。葡萄糖、六碳糖的同聚物、淀粉、半纤维素和纤维素的多聚物都可以作为发酵底物。发酵产氢途径决定了 H_2 的产量。当乙酸作为末端产物时,理论上每 mol 葡萄糖可以产生 4 摩尔的分子 H_2 ,方程式如下:



当丁酸作为末端产物时,理论上每摩尔葡萄糖可以产生 2 mol 的分子 H_2 ,方程式如下:



较高的氢气产量与末端产物为乙酸相联系,我们认为,高的氢气产量与末端产物为乙酸和丁酸代谢联系在一起,较低的氢气产量与末端产物为丙酸和还原形式的乙醇和乳酸的代谢相联系。

1.6 离体氢酶生物制氢系统

P. furiosus 氢酶在焦磷酸硫酸素、NADP、磷酸戊糖循环反应体系中,将 6-磷酸葡萄糖转化成 11.6 mol 6-磷酸葡萄糖获得了 11.6 mol H_2 ,接进了 1 mol 葡萄糖产生 12 mol H_2 的理想值,比一般微生物利用葡萄糖产生 1.92 ~ 2.88 mol H_2 高出近 5 倍^[24]。

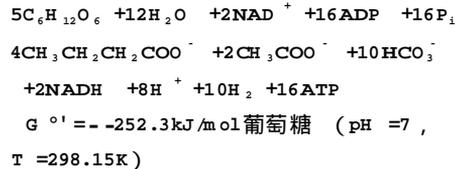
2 发酵生物制氢机理

2.1 丁酸型发酵(Butyric acid-type fermentation)产氢途径

发酵中主要末端产物为丁酸、乙酸、 H_2 、 CO_2 和少量的丙酸。丁酸型发酵主要是在梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)的作用下进行的,如丁酸梭状芽孢杆菌(*C. butyricum*)和酪丁酸梭状芽孢杆菌(*C. tyrobutyricum*)。从氧化还原反应平衡来看,以乙酸作为惟一终产物是不理想的,因为产乙酸过程中将产生大量 $NADH + H^+$,同时,由于乙酸所形成的酸

性末端过多,所以常因 pH 值很低而产生负反馈作用。由以上两方面原因,出现产乙酸过程与丁酸循环机制耦联(即呈现丁酸型发酵)就不难理解了。在这一循环机制中,尽管葡萄糖的产丁酸途径中并不能氧化产乙酸过程中过剩的 $NADH + H^+$,但是,因为产丁酸过程可减少 $NADH + H^+$ 的产生量,同时可减少发酵产物中的酸性末端,所以对加快葡萄糖的代谢进程有促进作用。从丁酸型发酵的末端产物平衡分析,丁酸与乙酸摩尔数之比(M_{Bu}/M_{Ac})约为 2

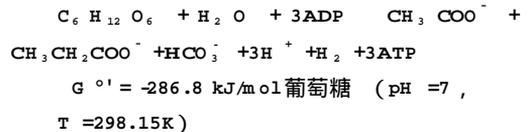
1,其反应式如下



2.2 丙酸型发酵(Propionic acid-type fermentation)产氢途径

含氮有机化合物(如酵母膏、明胶、肉膏等)的酸性发酵,难降解碳水化合物,如纤维素,在厌氧发酵过程常呈现丙酸型发酵。与产丁酸途径相比,产丙酸途径有利于 $NADH + H^+$ 的氧化,且还原力较强。丙酸型发酵的特点是气体产量很少,甚至无气体产生,主要发酵末端产物为丙酸和乙酸。

丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)等的丙酸的产生不经乙酰 CoA 旁路,而是由丙酮酸发酵形成,其中包括部分 TCA 循环机制。此外,由于丙酸杆菌属无氢化酶,因而无 H_2 产生。在丙酸型发酵中,产乙酸过程中所释放的过量 $NADH + H^+$ 通过与产丙酸途径耦联而得以再生,丙酸和乙酸摩尔产率比值(M_{Pr}/M_{Ac})理论上为 1。



2.3 乙醇型发酵(Ethanol-type fermentation)产氢途径

在经典的生化代谢途径中,所谓乙醇发酵是由酵母菌属等将碳水化合物经糖酵解(EMP)或 ED 途径生成丙酮酸,丙酮酸经乙醛生成乙醇。在这一发酵中,发酵产物仅有乙醇和 CO_2 ,无 H_2 产生。任南琪等^[9]对产酸反应器内生物相观察,并未发现酵母菌存在,也未发现运动发酵单孢菌属(*G* 细菌,不产芽孢的杆菌,杆径粗大, (1 ~ 2) $\mu m \times (2 \sim 5) \mu m$)。

试验中发现,发酵气体中存在大量 H_2 ,因而这一发酵类型并非经典的乙醇发酵。他将这一发酵类型称作乙醇型发酵,主要末端发酵产物为乙醇、乙酸、 H_2 、 CO_2 及少量丁酸。这一发酵类型中,通过如下发

酵途径产生乙醇(图 1)。从发酵稳定性及总产氢量等方面综合考察,乙醇型发酵仍不失为一种较佳的厌氧发酵及产氢途径。

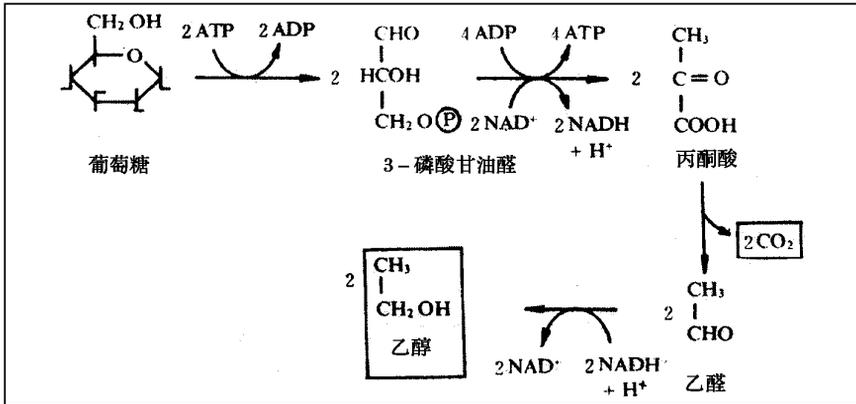


图 1 细菌乙醇型发酵, Ethanol-type fermentation

从乙醇、乙酸和丁酸的产生途径来看,大多数发酵细菌均是先将丙酮酸经脱羧产生乙酰 CoA 的同时,释放 H_2 。而丙酸和乳酸发酵均不产生 H_2 。由此可见,作为产酸相和作为生物制氢系统的最适液相末端发酵产物相同,均可选择乙酸、乙醇及丁酸。也就是说可选择乙醇型发酵或丁酸型发酵。但从两种发酵类型来看,乙醇型发酵的最适末端发酵产物的稳定性较好,工程控制条件易获得,同时,乙醇型发酵可承受较大的有机负荷,有机物处理能力较高。所以,在工程应用中选择乙醇型发酵较适宜。

考虑到乙酸和乙醇的在体系内和细胞内相互转换,我们也可以称乙醇型发酵理论为“双碳发酵产氢学说或理论”,目前,纯菌种分离鉴定和代谢分析为这种理论找到了物质基础^[24]。

3 结 语

生物制氢技术通过发酵或光合微生物的作用,将有机物分解,获得氢气。生物制氢与传统的物理化学方法相比,有清洁、节能等许多突出的优点。自 20 世纪 70 年代以来,生物制氢的实用性及可行性才得到高度重视。人们开始从获取氢能的角度进行各种生物制氢和产氢技术的研究。随着现代生物技术的发展,生物制氢技术必得到极大发展。

参考文献(References):

- [1] Bockris J O' M. The origin of ideas on a hydrogen economy and its solution to the decay of the environment [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27: 731-740.
- [2] Dunn S. Hydrogen futures: Toward a sustainable energy system [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27: 235-264.
- [3] Das D, Nejat Veziroglu T. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001, 26: 13-28.
- [4] Hallenbeck P, Benemann J R. Biological hydrogen production: Fundamentals and limiting processes [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27: 1185-1194.
- [5] Levin D B, Pitt L, Lowe M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, 29: 173-185.
- [6] Hawkes R, Dionsdale D L, Hawkes I, et al. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27: 1339-1347.
- [7] Pinto F A L, Olga Troshina, Peter Lindblad. A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27: 1209-1215.
- [8] You-Kwan Oh, Eun-Hee Seol, Jung Rae Kim, et al. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y 19 [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2003, 28: 1353-1359.
- [9] Ren Nanqi (任南琪). Bio-producing H_2 Principles and Controlling

- Strategy for Organic Wastewater Treatment[D]. Harbin, Harbin University of Architecture and Engineering(哈尔滨建筑大学), 1993(in Chinese).
- [10] Li Jianzheng(李建政), Ren Nanqi(任南琪). The approach on merits of biological phase isolation in the process of two-phase anaerobic technology[J]. Acta of Harbin University of Architecture and Engineering(哈尔滨建筑大学学报), 1998, 31(2): 50-56(in Chinese).
- [11] Li Baikun(李白昆). The Principles of Biohydrogen Production by Heavy Organic Wastewater-mechanism and Ability of Hydrogen-producing Bacterium[D]. Harbin University of Architecture and Engineering(哈尔滨建筑大学), 1995(in Chinese).
- [12] Li Yongfeng(李永峰), Ren Nanqi(任南琪), Li Jianzheng(李建政), et al. The improvement of anaerobic operation and isolation culture on hydrogen-producing and fermentative bacteria[A]. The 21st Century's New Technology of Solar Energy[C]. Shanghai: Shanghai Communications University, 2003: 814-818.
- [13] Wang Xiangjing(王相晶). Physiological Properties and Immobilization Application of Fermentative Hydrogen-producing Bacterial strain B49[D]. Harbin, The Harbin Institute of Technology(哈尔滨工业大学), 2003(in Chinese).
- [14] Qin Zhi(秦智). Controlling strategy of Fermentation Types and Bioaugmentation in Bio-hydrogen Production Reactor[D]. Harbin, The Harbin Institute of Technology(哈尔滨工业大学), 2003(in Chinese).
- [15] Benemann J R. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen, 1997, 24: 979-987.
- [16] Ghirardi M L, Zhang L, Lee J W, et al. Microalgae: A green source of renewable H₂[J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18: 506-511.
- [17] Sveshnikov D A, Sveshnikov N V, Rao K K, et al. Hydrogen metabolism of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress[J]. FEBS Letters, 1997, 147: 297-301.
- [18] Masukawa H, Nakamura M, Mochimura M, et al. Photohydrogen Production and Nitrogenase Activity in Some Heterocystous Cyanobacteria, BioHydrogen II[C]. 2001: 63-66.
- [19] Zhu H, Suzuki T. Hydrogen Production from Tofu Wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* Immobilized in Agar Gels[J]. International Journal of Hydrogen, 1999, 24: 305-310.
- [20] Champagne J E, Uffen R L. Membrane topography anaerobic carbon monoxide oxidation in *Rhodocyclus gelatinosus*[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169: 4784-4789.
- [21] Kerby R L, Ludden P W, Robert G P. Carbon monoxide dependent growth of *Rhodospirillum rubrum*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177: 2241-2244.
- [22] Uffen R L. Metabolism of carbon monoxide by *Rhodopseudomonas gelatinosa*: Cell growth and properties of the oxidation system[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 155: 956-965.
- [23] Tsygankov A A, Hirata Y, Miyake M, et al. Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77: 575-578.
- [24] Woodward J, Orr M, Cordray K, et al. Enzymatic production of biohydrogen[J]. Nature, 2000, 405(6790): 1014-1015.

BIO HYDROGEN : .THE PROGRESS OF FOUNDM ENTAL RESEARCH

REN Nan-qi, LI Yong-feng, ZHENG Guo-xiang, LIN Hai-long, ZHANG Rui
(Municipal and Environmental Engineering School Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstracts This paper reviewed the progress of the aspects of fundamental research on biohydrogen production. There are six systems of biohydrogen production which include biophotolysis, organic degradation of light, hydrogen synthesis via the water-gas shift reaction of photoheterotrophic bacteria, hybrid system of photo-fermentation, anaerobic fermentation and in vitro hydrogen production by hydrogenase. The theory of ethanol-type fermentation is the important progress on the biohydrogen production.

Key words Biohydrogen; Hydrogen production system; Fermentation; Ethanol-type fermentation.