

# 提高生物制氢产量的研究进展

## Process of technologies in improving biohydrogen production

才金玲<sup>1,2,3</sup>, 王广策<sup>1,3</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100089; 3. 天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津 300222)

中图分类号: X382.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)02-0086-06

目前, 人们所利用的能源 80% 左右都是“化石能源”<sup>[1]</sup>, 对于这些传统的不可再生能源会随着人们对其不断开发利用而日渐枯竭。而且在对传统能源的利用过程中会释放大量的有害污染物, 造成环境染物。因此, 现代能源研究领域最重要的任务之一就是提供一种可再生、可持续、高效、便捷、安全, 并且在经济上合理的能源利用形式, 为经济和社会的持续发展提供保证。氢能由于其众多的优点成为最理想未来能源的利用形式。

但氢能不像“化石能源”可以直接开采, 它必需通过特定的制备方法才能够获得。氢能制备方法主要有非生物制氢法(裂解法和气化法等)和生物制氢法, 其中非生物制氢法产氢迅速、产氢量大, 但需要消耗大量的其他形式的能源(如热能和电能等), 并不能真正地实现环境友好, 因而会逐渐被低能耗的生物制氢法所取代。生物制氢具有可再生和环境友好等优势, 必然会成为最有发展前景的制氢方法之一, 成为新能源领域研究的热点。

近年来, 对于生物制氢原理的研究已经取得突破性进展, 有关的产氢相关酶的研究也取得了不同程度的成果, 但目前实验生物制氢的产量与理论产量相比仍然不高, 这在一定程度上限制了把生物制氢技术应用于实际生产中。因此, 以提高产氢量作为研究重点, 可能尽快地将生物制氢技术应用到实际生产实践中。作者就国内外有关提高生物制氢产量方法的进展情况综述, 并分析了有关技术的发展趋势。

### 1 制氢生物及其优缺点的比较

放氢微生物广泛存在于自然界中, 它们分解有机物或者直接利用太阳能放出  $H_2$ 。放氢生物不仅包括原核生物, 还包括许多低等真核生物<sup>[2]</sup>。近年来, 有研究表明高等真核生物, 例如小麦等也具有放氢能力<sup>[3]</sup>。

不同产氢生物的性质差异很大, 产氢生物的选择对于产氢量具有巨大影响。高等真核生物由于其产氢量不高, 很难应用于生产实践中。但是对于高等真核生物产氢机制的研究, 有利于生物制氢技术的发展。微生物因其自身繁殖和代谢的优越性, 比高等真核产氢生物更适合应用于生产实践中。表 1 就不同产氢微生物的优缺点进行对比。

发酵产氢菌能够分解利用多种有机物制取  $H_2$ , 甚至可以分解利用一些难分解的大分子有机物如纤维素等。因此, 可以将发酵产氢与有机废物处理相结合, 在制氢的同时完成环境治理。而且发酵菌能够不受光照的限制, 所以暗发酵产氢的反应器的设计相对简单, 而且可以实现持续产氢。但发酵产氢菌不能进一步分解利用小分子有机物如挥发性有机酸等, 因此发酵产氢菌的能量利用率不高。

光合产氢生物能够直接利用太阳能产氢, 这种制氢方式可以说是最经济有效的产氢方式。对于光合生物制氢来说, 由于太阳能在辐射到地面时, 其散射作用使得单位面积的光能很小, 这在一定程度上限制了光合生物将太阳能转化成为氢能。而且光能在不同地区、时间(昼夜)、季节的分布差异巨大, 很难维持持续稳定的生产。在光生物反应器中将太阳能传递能力有限也是另一个限制生物制氢发展的重要方面。在藻类中的“光饱和现象”使藻类的产氢远比实验室水平(低光强时)的放氢量小。

大部分光合细菌的产氢量很高, 能够充分利用有机物中的能量, 但它们分解大分子有机物的能力不强, 只能以一些小分子的有机物作为放氢底物。

收稿日期: 2008-01-30; 修回日期: 2008-07-10

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA05Z112)

作者简介: 才金玲(1976-), 女, 黑龙江佳木斯人, 博士, 从事海洋微生物发酵制氢研究, 电话: 0532-82898575, E-mail: cjldr@163.com; 王广策, 通信作者, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

绿藻和蓝藻可以直接利用太阳能分解水放出  $H_2$  和  $O_2$ , 实现氢能真正的清洁生产。但其产氢必须在光合作用的间隙进行, 因为在光合作用的过程

中释放的  $O_2$  能强烈抑制产氢相关酶的活性, 从而强烈抑制产氢, 因此很难达到持续生产。

表 1 产氢生物的种类和优缺点<sup>[4]</sup>

产氢生物	优点	缺点
发酵细菌	在黑暗条件下持续产氢 广泛的底物利用范围, 可以分解有机废物产氢 发酵产生各种有用的副产物, 如丁酸、乳酸、乙酸等 因为其发酵过程是一个厌氧的过程, 所以不存在 $O_2$ 抑制的问题	随着产氢量的增加, 发酵体系在热动力学上越来越不利于产氢
光合细菌	利用广泛的光谱范围 可以利用有机废物产氢	光能转化效率低, 只有 1%~5% 左右
蓝藻	可以实现持续产氢 可以通过分解水产氢 直接利用光能产氢 能够固定大气中的 $N_2$ 和 $CO_2$	双向氢酶能消耗 $H_2$ 产生的气体中大约有 30% 的是 $O_2$ , $O_2$ 的存在会抑制产氢酶的活性
绿藻	直接利用光能产氢 光能转化效率高(比陆地树木和作物高出十几倍)	需要高强度的光照 $O_2$ 对该体系产氢有强烈的抑制作用 光能转化效率低

每一种产氢生物都有其优缺点, 根据不同种类产氢生物的性质, 从而提高生物产氢量。目前发酵产氢菌的产氢速率较高, 产氢条件要求较低, 是目前应用较为广泛的生物制氢方法。但光合细菌的产氢速率比藻类快, 能量利用率比发酵产氢菌高, 且能将产氢与光能利用、有机物的去除有机地耦合在一起, 可能会成为最具有潜力的生物制氢方法之一。

如今限制生物制氢投入实际生产的最大障碍是生物制氢的成本仍然很高, 生物制氢的技术仍然不成熟, 所有这些归根到底仍然是产氢量不高, 因而许多科学家为提高产氢量做了大量的工作。

## 2 提高产氢量

生物制氢是一个生物过程, 它受到生物体物质代谢和能量代谢的影响。多种因素都会对产氢量产生巨大影响, 如制氢工艺、培养条件、反应器等。以下对当前提高生物制氢产量的主要方法进行简介。

### 2.1 改良生物制氢工艺

生物制氢的产氢系统很不稳定, 尤其是产氢相关酶如固氮酶和氢酶等。必须稳定生物产氢的环境条件, 才能达到持续产氢。在许多实验过程中, 我们发现一些生物短期内产氢率较高, 但很难长期维持此高产氢效率。生物制氢工艺(如产氢的启动, 过程控制等)会对生物产氢的环境条件产生巨大影响, 从而影响产氢量。因此, 必须优化生物制氢工艺, 使产氢量维持一个稳定的和较高的水平。

#### 2.1.1 生物制氢的启动

产氢生物并不是在任何条件下都具有产氢能力, 它们必须在合适的条件时才能放氢, 即生物制氢的启动。生物制氢的启动决定了生物制氢能否成功的关键。

##### 2.1.1.1 发酵产氢菌产氢的启动

对于发酵产氢菌产氢的启动不需要特殊的条件。但对于混合发酵菌群产氢时, 由于天然菌群中除含有产氢细菌外也有许多耗氢菌存在。在产氢过程中应尽量抑制吸氢菌, 而尽量不影响产氢菌的活性。其中最主要的耗氢菌是产甲烷菌, 它可以利用  $H_2$  作为电子供体生成甲烷。因此发酵产氢的启动最重要的是抑制产甲烷菌的活性。目前, 已出现了各种的前处理用于抑制产甲烷菌的生长或活性, 使产氢菌得到富集。主要包括以下几种:

(1) 热处理: 许多产氢菌在热处理后能形成芽孢, 而产甲烷菌对热敏感而被杀死, 从而使产氢菌得到富集。一般经热处理得到的产氢菌主要是厌氧梭菌(*Clostridium*)。一些相对较温和的处理方法, 如  $80^\circ C$  处理 20 min, 煮沸 15 min 等, 但这种稍温和的处理方法的接种体不能产生长期稳定的产氢, 甚至有的处理可以在产氢的后期会检测到甲烷<sup>[5]</sup>。另一些较为剧烈的处理方法, 如  $104^\circ C$  烘烤 1 h, 煮沸 2 h 等去除产甲烷菌的能力很强, 但产氢延迟时间较长。经热处理得到的产氢菌种一般都会产生芽孢, 这些芽孢恢复成活性细胞, 需要特殊的营养(如氨基酸等)。而且经热处理启动的产氢的延迟产氢时间较长。

(2) 酸碱处理:一些产氢菌可以在较宽的 pH 范围内生长,而产甲烷菌对 pH 的适应能力不强,在极端 pH 条件下就会死亡<sup>[6]</sup>。经酸碱处理得到的产氢体系产氢延长时间一般较短。

(3) 抑制剂处理:在反应体系中加入一些产甲烷菌抑制剂,经常应用的产甲烷的抑制剂主要有 O<sub>2</sub>、2-溴乙磺酸(2-bromoethanesulfonate, BES)、碘丙烷(iodopropane)和乙炔等。经抑制剂处理后,产甲烷菌的活性得到抑制,有效启动产氢。一般产甲烷菌是绝对厌氧菌,而一些产氢菌是兼性厌氧菌。在经过暴氧处理后,产甲烷的活性得到有效的抑制,而产氢菌在经过一定的恢复阶段之后,重新具有活性而作为产氢的接种体<sup>[7]</sup>。

BES 和碘丙烷是产甲烷菌辅酶 M 的类似物,可以专一地抑制产甲烷菌的活性<sup>[7,8]</sup>。如经碘丙烷处理后其产氢能力为 5.64 mol/mol 蔗糖,而不加处理的产氢量为 5.17 mol/mol 蔗糖<sup>[7]</sup>。BES 在高浓度的条件下(50 mmol/L)能强烈抑制产甲烷菌的活性<sup>[9]</sup>,但近年来也有人报导产甲烷菌也有一些 BES 抑制突变株<sup>[10]</sup>。通过 BES 或碘丙烷处理可以有效地抑制产甲烷菌的活性,同时很少抑制产氢菌的活性,所以产氢量和产氢速率都很大,但这两种抑制剂的价格昂贵,不适合应用于大规模的生产中。

乙炔即使在很低的浓度下(0.5%)也能抑制产甲烷菌的活性。通过在反应体系中引入乙炔来启动产氢反应,也能有效的启动产氢<sup>[11]</sup>。

经热处理启动的产氢延迟时间较长。经抑制剂处理得到的产氢量很大,但这些抑制剂一般都价格昂贵,不适于工业化生产。相对来说酸处理得到的产氢延迟时间比热处理少,产氢量虽然比抑制剂处理的产氢少,但酸处理成本较低,最有可能成为天然发酵菌产氢启动的最适选择。

#### 2.1.1.2 光合细菌产氢的启动

光合细菌产氢量受到多种因素的影响,如光照、温度、接种量、菌龄和培养基等多种因素的影响。氮氮能够抑制重要的产氢酶-固氮酶的活性,从而抑制光合细菌产氢,因此光合细菌产氢的启动一定要限制培养基中氮氮的量。

#### 2.1.1.3 藻类产氢的启动

在限硫的条件下,藻类能够改变其光合作用进程,同时改变其细胞代谢,从而放出氢气<sup>[12]</sup>。在限硫的条件下,藻类的光合作用严重受阻<sup>[13]</sup>,而呼吸作用基本不受影响<sup>[14]</sup>。在限硫 24 h 后,氧气几乎都被藻类的呼吸作用所消耗,从而使培养条件即使在有光照的条件下仍能基本处于厌氧<sup>[15]</sup>。但是藻类的产氢依赖于光合作用提供能量,因而藻类的光合产氢只能持续很短的一断时间,一般为 24~96 h。之后产

氢速率逐渐下降,直至完全停止。因此,对于藻类产氢启动中最关键的就是控制硫量。一些科学家利用两步法制氢,即藻类先在有硫的培养条件下生长积累生物质,然后将其转入无硫培养基中进行放氢培养。也有一些科学家提出利用光-暗交替的方法来制氢,即藻类在光照条件下进行光合作用积累生物质,在黑暗培养条件下分解生物质释放氢气。但这两种藻类产氢的启动方法都很难达到持续产氢。

## 2.2 代谢过程控制

生物制氢是一个生物过程,受到各种代谢条件的限制,只有在特定的环境条件下才具有产氢能力。培养基中营养物质的种类和浓度、pH 值和反馈物的浓度等都会影响生物的代谢,从而影响生物制氢。

### 2.2.1 底物

产氢底物(碳源和氮源)的种类和浓度都会对产氢产生深远的影响。碳源的不同会影响电子从辅因子传递给固氮酶的能力,从而影响产氢<sup>[16]</sup>。大部分产氢的底物是小分子的和易分解的糖类,如葡萄糖、果糖等。氮源的不同也会影响产氢,如亚硝酸盐、硝酸盐和氨等都会抑制 *Anabaena variabilis* WPU003 和 *Anabaena cylindrical* 的固氮酶活性<sup>[16,17]</sup>。而且不同产氢生物对碳源和氮源的需求差异很大。

### 2.2.2 反馈物

在制氢过程中,一些反馈物的积累会影响产氢量,如 H<sub>2</sub> 和挥发性脂肪酸等。如 H<sub>2</sub> 是一种重要的反馈抑制物,它在气相中的分压很大地影响着 H<sub>2</sub> 的释放。降低 H<sub>2</sub> 分压可以增加产氢量和产氢率。如通过向反应体系中通入 N<sub>2</sub> 以降低 H<sub>2</sub> 分压,可以使产氢量增加 68%<sup>[18]</sup>。产氢关键酶对 O<sub>2</sub> 极度敏感,对于藻类产氢而言,其在产氢的过程中会有 O<sub>2</sub> 的释放,有效解除 O<sub>2</sub> 对藻类产氢能够大大提高产氢量。

### 2.2.3 优化产氢的培养条件

通过优化产氢的培养条件能够提高 H<sub>2</sub> 的产量,如:光照、pH 值、温度、培养基组成等。

光照对光合生物的产氢影响巨大。大部分蓝藻和绿藻最大吸收峰是在红光区,而光合细菌的最大吸收峰是在远红外区近。但对于生物产氢的最适光谱却因种类的不同而差异较大。一些蓝藻(*Spirulina*)能在厌氧的条件下,无论光照还是黑暗都能产生 H<sub>2</sub>,如 *Arthrospira platensis*<sup>[19]</sup>。而有些蓝藻只能在光照条件下才能产氢<sup>[20]</sup>。光照度对红假单胞菌(*Rhodobacter sphaeroides*)产氢量影响巨大,当处理猪粪污水产氢时,最适光照度为 1 600 lx<sup>[21]</sup>。

不同的产氢生物其最适产氢温度相差很大,如在大部分暗发酵产氢菌的最适产氢温度在 30~45℃ 之间,大部分蓝藻和光合细菌的最适产氢温度在

30~40℃之间。*Nostoc muscorum* SPU004 在 40℃ 时达到最大产氢量<sup>[16]</sup>。*Anabaena variabilis* SPU003 在 30℃ 时达到最大产氢量<sup>[22]</sup>。张永芳等<sup>[23]</sup>发现当以混合发酵菌产氢时,产氢量在 35℃ 时最大产氢达 371.7 mL,远远高于在 25℃ 或 40℃。王相晶等<sup>[24]</sup>也发现发酵产氢菌 B49 在 35℃ 时达到最大产氢量。

盐度对生物的产氢具有巨大的影响<sup>[25]</sup>。一般淡水藻种和菌种的产氢量随着盐度的增高而产氢量下降。这可能是因为 Na<sup>+</sup> 从细胞内外排和细胞阻止 Na<sup>+</sup> 从细胞外进入细胞的过程中都会消耗大量的能量,这就相对减少了能量向产氢过程的提供<sup>[26]</sup>。而海洋产氢生物却能适应相对较高的盐度。

微量元素主要参与产氢关键酶(氢酶和固氮酶)的活性,对生物的产氢产生巨大的影响,如 Co、Cr、Mn、Fe、Cu、Mo、Zn、Ni 等<sup>[27]</sup>。张永芳等<sup>[28]</sup>发现 Fe 浓度对产氢量具有具大影响。

有报导指出,N<sub>2</sub> 能大大抑制产氢<sup>[29]</sup>。因此一些科学家提出驱除产氢体系里的 N<sub>2</sub> 对于提高产氢量是必要的。硫可以抑制藻类的有氧光合作用,因此藻类在硫饥饿的条件下可以大大提高产氢量。但另一方面,硫素对光系统 II 的修复循环十分重要,当无硫时,细胞不能合成半胱氨酸和甲硫氨酸<sup>[30]</sup>,从而严重影响蛋白质的生物合成和功能的行使。

## 2.3 混合培养

利用不同生物的不同特性,混合培养以充分利用有机物,从而提高产氢量,同时使产氢过程持续进行。

### 2.3.1 暗发酵菌与光合细菌混合培养

由于不同细菌利用有机物的高度特异性,其所能分解的有机物的成分相差很大。一方面,发酵细菌具有很高的降解大分子有机物的能力,光合细菌分解大分子有机物的能力不强,但是它们能分解发酵菌分解后剩下的小分子有机物。两者混合培养可以充分利用有机质,提高产氢量。另一方面,发酵菌在发酵产氢的过程中会放出大量的有机酸等使培养环境中的 pH 下降<sup>[31]</sup>。偏离了发酵菌的最适生长条件,从而使 H<sub>2</sub> 产量下降。光合细菌可以分解这些小分子有机酸,使培养环境中的 pH 保持恒定。把这两种微生物联合培养有利于提高底物的利用率和产氢量。如利用单独暗发酵产氢菌其产氢量可达 3.67 mol/mol 蔗糖,当与光合细菌-红假单胞菌(*Rhodobacter sphaeroides*)联合产氢时,产氢量高达 6.63 mol/mol 蔗糖,产氢量是仅用暗发酵产氢菌的 1.8 倍<sup>[32]</sup>。

### 2.3.2 藻类与光合细菌的混合培养

藻类和光合细菌可以不同光谱范围的光能产

氢。将藻类与光合细菌混合培养,可以提高光能利用效率。另一方面,藻类能够以生物质的形式固定光能,而光合细菌可以分解利用藻类积累的有机物产氢,而藻类也可以利用光合细菌产氢后产生的无机物作为培养基质生长,从而达到持续产氢<sup>[33]</sup>。

## 2.4 通过现代生物技术提高生物制氢产量

随着现代生物技术的不断提高,人们对生物制氢机理的了解更加深入,这就为通过分子生物学手段来提高生物制氢的产量提供了理论基础。如通过提高产氢酶的活性或表达量,抑制耗氢酶的活性或表达量来提高产氢量。产氢相关酶主要是氢酶和固氮酶。氢酶按其对产氢的影响又可分为上调氢酶和双向氢酶。上调氢酶的作用主要是促进 H<sub>2</sub> 的释放。而双向氢酶所催化的反应是可逆的,在 H<sub>2</sub> 释放量少时,它催化 H<sub>2</sub> 的释放;在 H<sub>2</sub> 的释放量过多时,双向氢酶催化 H<sub>2</sub> 的吸收。对于生物制氢过程来说,大多数情况下 H<sub>2</sub> 都是过多量的,所以双向氢酶在生物制氢过程中主要是起消耗 H<sub>2</sub> 的作用。通过分子生物学方法提高上调氢酶的活性,抑制双向氢酶的活性能够明显提高产氢量<sup>[34]</sup>。例如,突变项圈藻(*Anabaena*)的双向氢化酶后,其产氢量远远高于野生型<sup>[35]</sup>。*E. cloacae* III T-BT 08 通过遗传改造,使其 H<sub>2</sub> 的产量增加了 1.5 倍<sup>[36]</sup>。

一些代谢过程重要调控酶,通过调节物质代谢和能量过程从而调节生物产氢,如通过调节产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)HP1 通过遗传重组方法改造使乙醇脱氢酶系(含乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶活性)的 adhE 基因缺失,使发酵过程的产乙醇量下降,产氢量大大提高<sup>[37]</sup>。

## 3 生物制氢技术的展望

生物制氢要想实现产业化,就必须把研究重点放在提高产量上。

### 3.1 产氢反应器的设计

反应器对于制氢过程的综合控制至关重要,一个好的反应器可以达到 pH、氧化还原电位(ORP)、水力延长时间(HRT)、化学需氧量(COD)、光照强度等多种反应动力学指标的有效控制<sup>[38]</sup>。如今利用的生物制氢反应器大多是对现有的产甲烷反应器、污水处理反应器以及藻类培养反应器进行改造而得到的。如 UASB, CSTR, IC 等。但近年来,一些新型的制氢反应器也不断涌现,如微生物燃料电池(MFC)用于产氢,以及一些光反应器、厌氧流体床反应器和微型产氢反应器等<sup>[39]</sup>。但产氢反应器的种类和数量仍远远不能满足工业生产的需要,尤其是对于光反应器的研究远远不能满足需要。

### 3.2 遗传学改造

主要的产氢酶(如氢酶和固氮酶)都对  $O_2$  十分敏感,短暂的接触也能抑制其活性,甚至完全失活。因此,通过遗传学方法增加产氢相关酶对氧的耐受力,也可以大大增加产氢能力。

生物质氢是一个生物的过程,它受到多种代谢过程的调控,所以只是单单的调控产氢关键酶并不能从根本上提高产氢量。更重要的是找出整个氢代谢过程的调控点,从而对关键调节基因进行遗传学改造。只有这样才能真正做到事半功倍的效果,从而避免以往盲目基因的改造。

### 3.3 增强光能利用效率和扩大光谱利用范围

对于光合生物主要以光能作为产氢的能量来源。大多数光合产氢生物的光能利用效率都很低,有文献报导只有当光能利用效率  $>10\%$  时,光合制氢才能真正的具有生产意义<sup>[30]</sup>。因此必须增加光合生物的光能利用效率。对于蓝藻、绿藻和光合细菌的光谱利用范围是与太阳光谱相比是非常有限的。扩大光合产氢生物的光能利用范围可以更有效地利用太阳能。

### 3.4 扩大底物利用范围

大部分的产氢生物的底物利用范围是有限的,这在一定程度限制了生物制氢的应用和发展。虽然也有一些梭菌能够分解利用多种有机质(如利用纤维素和半纤维素)产氢,但这种产氢生物的在自然界中是很少的,而且其产氢量一般也不高。纤维素和半纤维素在自然界中广泛存在,如果以此为产氢底物,可大大降低产氢成本。能过生物工程方法将纤维素酶,半纤维素酶等分解大分子有机物的酶类引入产氢生物,从而扩大产氢生物的底物利用范围。

### 3.5 利用海洋资源生产 $H_2$

地球大部分都被海洋所覆盖,海洋里储藏着大量的有机物,在陆地资源日渐匮乏和人口增长的压力下,应当合理利用海洋资源。利用海洋生物质产氢将具有巨大的前景。另一方面,许多海洋生物本身就可以产氢,如一些海洋藻类、光合细菌和发发酵菌都具有产氢能力。如一种海洋衣藻(*Chlamydomonas* sp.)、*Chlamydomonas* MGA 16 1 和一种海洋绿藻(*Chlorella* sp.)在光暗交替的条件下可以放出  $H_2$ 。

目前,生物制氢在经济上并不能与传统的能源相比,但这只是从能源的价格上来讲的,并没有将其环保意义考虑进去。从整个社会的长远发展来说,未来氢能的利用必然会在全球能源系统的持续发展中将起到显著作用,并将对全球生态环境产生深远的影响。

生物产氢的研究虽然在机理及应用系统的开发方面有很大的进展,鉴于生物产氢过程的复杂性和精密性,研究内容仍主要集中在高活性产氢菌株的筛选或选育、优化和控制环境条件以提高产氢量。降低成本,提高产量和产氢速率是实现产业化生物制氢的关键所在。

#### 参考文献:

- [1] Basak N, Das D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production; the present state of the art[J]. **World Journal of Microbiol Biotechnol**, 2007, 23:31-42.
- [2] Horner J K, Wolinsky M A. A power-law sensitivity analysis of the hydrogen-producing metabolic pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2002, 27: 1 251-1 255.
- [3] 张凤章,林淑章. 高等植物放氢的初步研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1997, 36:808-811.
- [4] Nath K, Das D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2004, 65: 520-529.
- [5] Singh A, Pandey K D, Dubey R S. Enhanced hydrogen production by coupled system of *Halobacterium halobium* and *Chloroplast* after entrapment within reverse micelles [J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 1999, 24: 693-698.
- [6] 周俊虎,戚峰,程军,等. 秸秆发酵产氢的碱性预处理方法研究[J]. 太阳能学报, 2007, 28: 329-333.
- [7] Zhu H, Béland M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2006, 31: 1980-1988.
- [8] Venkata Mohan S, Lalit Babu V, Sarna P N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate [J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99: 59-67.
- [9] DiMarco A A, Bobik T A, Wolfe R S. Unusual coenzymes of methanogenesis [J]. **Annual Review of Biochemistry**, 1990, 59: 355-394.
- [10] Sparling R, Daniels L. The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanesulfonate [J]. **Canadian Journal of Microbiology**, 1987, 33: 1 132-1 136.
- [11] Valdez-Vazquez I, Ríos-Leal E, Muñoz-Pérez K M, et al. Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch  $H_2$  production from organic solid waste [J]. **Biotechnology & Bioengineering**, 2006, 95: 342-349.
- [12] Davies J P, Yildiz F, Grossman A R. Mutants of *Chlamydomonas* with Aberrant responses to sulfur deprivation [J]. **Plant Cell**, 1994, 6: 53-63.

- [13] Wykoff D D, Davies J P, Melis A, *et al.* The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Plant Physiology**, 1998, 117: 129-139.
- [14] 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 Physiology**, 2000, 122: 127-135.
- [15] Ghirardi M L, Zhang L, Lee J W, *et al.* Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>[J]. **Trends in Biotechnology**, 2000, 18: 506-511.
- [16] Madamwar D, Garg N, Shah V, Cyanobacterial hydrogen production[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2000, 16: 757-767.
- [17] Lambert G R, Daday A, Smith G D. Hydrogen evolution from immobilized cultures of cyanobacterium *Anabena cylindrica* [J]. **FEBS Letters**, 1979, 101: 125-128.
- [18] Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes F R, *et al.* Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging[J]. **Bioresource Technology**, 2000, 73: 59-65.
- [19] Aoyama K, Uemura I, Miyake J, *et al.* Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis* [J]. **Journal of Fermentation & Bioenergy**, 1997, 83: 17-20.
- [20] Stal L J, Krumbein W E. Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. [J]. **Archives of Microbiology**. 1985, 143: 72-76.
- [21] 张军合,张全国,杨群发,等. 光照度对猪粪污水条件下红假单胞菌光合产氢的影响[J]. **农业工程学报**, 2005, 21: 134-136.
- [22] Serebryakowa L T, Sheremetieva M E, Lindblad P. H<sub>2</sub>-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* CALI 758[J]. **Plant Physiology & Biochemistry**, 2000, 38: 525-530.
- [23] Zhang Y F, Shen J Q. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2006, 31: 441-446.
- [24] 王相晶,任南琪,向文胜. 发酵条件对发酵产氢细菌 B49 产氢的影响[J]. **太阳能学报**, 2005, 26: 99-103.
- [25] Shah V, Garg N, Madamwar D. Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production [J]. **Folia Microbiologica**, 2003, 48: 65-70.
- [26] Rai A K, Abraham G. Relationship of combined nitrogen sources to salt tolerance in freshwater cyanobacterium *Ababaena doliolum*[J]. **Journal of Applied Bacteriology**, 1995, 78: 501-506.
- [27] Ramchandran S, Mitsui A. Recycling of hydrogen photoproduction system using an immobilized marine blue green algae *Oscillatoria* sp Miami BG 7, solar energy and seawater[R]. New Delhi, India: **International Biotechnology Symposium**. 1984, 183-184.
- [28] Zhang Y F, Shen J Q. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2006, 31: 441-446.
- [29] Lambert G R, Smith G D. Hydrogen formation by marine blue-green algae[J]. **FEBS Letters**, 1977, 83: 159-162.
- [30] Asada Y, Miyake J. Photobiological hydrogen production[J]. **Journal of Bioscience & Bioenergy**, 1999, 88: 1-6.
- [31] Liu G Z, Shen J Q. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria[J]. **Journal of Bioscience & Bioenergy**, 2004, 98: 251-256.
- [32] Tao Y Z, Chen Y, Wu Y Q, *et al.* High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2007, 32: 200-206.
- [33] Melis A, Melnicki M R. Intergrated biological hydrogen production[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2006, 31: 1 563-1 573.
- [34] Lindblad P, Christensson K, Lindberg P, *et al.* Photoproduction of H<sub>2</sub> by wildtype *Anabaena* PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant; from laboratory experiments to outdoor culture[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2002, 27: 1 271-1 281.
- [35] Lindberg P, Schütz K, Happe T, *et al.* A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of *Nostoc punctiforme* ATCC 29133[J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2002, 27: 1 291-1 296.
- [36] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* II T-BT 08[J]. **Process Biochemistry**, 2000, 35: 589-593.
- [37] 朱俊波,龙敏南,徐方成,等. Klebsiella oxytoca Hpl AdhE 基因插入失活法构建产氢重组菌[J]. **科学通报**, 2007, 52: 55-58.
- [38] Polle J E W, Kanakagiri S, Jin E, *et al.* Truncated *Chlorophyll* Antenna size of the photosystems-a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2002, 27: 1 257-1 264.
- [39] Tartakovskiy B, Manuel M F, *et al.* (2008). Biocatalyzed hydrogen production in a continuous flow microbial fuel cell with a gas phase cathode. **Journal of Power Sources**, 2008, 182(1): 291-297.