

Impact Factors of Bio-Hydrogen Production by Dark Fermentation

Jing TANG^{1,2*}, Nanqi REN²

¹School of Civil and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang 100168, China

²State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Email: fairy_tang2003@yahoo.com.cn

Abstract: Hydrogen is a clean, effective and renewable energy, and is a satisfactory alternative for fossil fuels in the future. Bio-hydrogen by dark fermentation from organic wastes is attractive due to energy recovery and environmental cleanup at the same time, making hydrogen a real green energy. This paper focused on the effects of ecological factors such as temperature, pH, substrat, metal ions and end products on bio-hydrogen generation, and discussed the condition of dark fermentation processes of hydrogen production.

Keywords: bio-hydrogen production; pH; substrate; metal ions; end products

暗发酵生物制氢的影响因子

唐婧^{1,2*}, 任南琪²

¹市政与环境工程学院, 沈阳建筑大学, 沈阳, 中国, 110168

²城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨工业大学, 哈尔滨, 中国, 150090

Email: fairy_tang2003@yahoo.com.cn

摘 要: 氢气是清洁、高效、可再生能源, 是化石燃料的理想替代品之一。暗发酵生物制氢利用有机废物生产氢气, 具有回收能源和净化环境的双重功效, 使氢能成为真正的清洁能源。本文针对温度、pH、底物种类、金属离子及末端产物等生态因子对微生物产氢发酵的影响进行了深入论述, 探讨了暗发酵生物制氢技术的制氢条件。

关键词: 生物制氢; pH; 底物种类; 金属离子; 末端产物

1 引言

随着世界技术经济的发展、人口的激增、人类生活水平的提高和物质欲望的无限上升, 世界气候面临越来越严重的问题, 二氧化碳排放量逐年增大, 全球灾难性气候变化屡屡出现, 已经严重危害到人类的生存环境和健康安全。人类亟待寻找和开发清洁、高效、可持续利用的新能源和可再生能源。氢气燃烧时与空气中的氧结合生成水, 不会造成污染, 而且放出的热量是燃烧汽油放出热量的 2.8 倍, 因而被视为 21 世纪最具发展潜力的清洁能源^[1]。发酵法生物制氢技术利用有机废水制取氢气, 具有净化环境和回收清洁能源的双重功效, 成为国内外研究的热点。本文将对暗发酵生物制氢的各影响因子进行重点论述。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870037): 哈尔滨产乙醇杆菌过量产氢代谢途径与机制解析

2 暗发酵生物制氢的影响因子

2.1 温度

温度是影响产氢微生物的活性及其产氢发酵代谢过程的重要因素之一。温度对微生物的生长和繁殖等生理代谢过程有重要影响。由于微生物的生长和繁殖是通过一系列的生物化学反应来完成的, 根据生物化学中酶促反应特性, 这些反应需要在一定的温度范围内才能正常进行, 并且在这一范围内, 温度越高反应的速率越快。有研究表明, 在适宜的温度范围内, 提高温度能够提高产氢菌的产氢能力, 但温度升高超过此范围, 反而会降低产氢菌的产氢能力。Jung 等^[2]对 *Citrobacter* sp. Y19 的研究表明, 其最适的细胞生长和产氢温度为 30~40℃。Kumar 等^[3]证明 *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 在 36℃ 时具有最大产氢速率。从节

能的角度考虑,有研究者进行了常温发酵产氢的研究,如 Lin 等^[4]采用厌氧恒化器,在温度 15~34℃ 范围内进行了活性污泥的产氢研究,与 35±1℃ 条件下的产氢过程相比,常温条件下(15~25℃)反应器的氢气产量和氢气百分含量均远低于后者,因此常温发酵制氢并不具备优势。有少数研究^[5]将产氢温度控制在高温范围(55℃),获得了较好的产氢效能。

2.2 pH

pH 值是影响微生物生长和繁殖的另一个重要因素。由于微生物生长过程中生物体内发生的生物化学反应是酶促反应,而酶促反应都有一个最合适的 pH 值范围。溶液 pH 值的改变直接影响着酶的活性中心的存在形式,改变底物分子和酶分子的带电状态,从而影响酶与底物的结合,过高或过低的 pH 值都将影响酶的稳定性,进而使酶遭到不可逆的破坏导致细菌失活。此外,pH 值还同时影响细胞质膜的渗透性、膜结构的稳定性和营养物质的溶解性或电离性,影响营养的代谢和吸收,从而影响微生物的生长速度。因此对发酵细菌最佳产氢 pH 值的研究也很多。Tanisho 等^[6]通过对 *Enterobacter aerogenes* E.82005 的研究表明其最佳产氢 pH 值为 6.0;Fabiano 等^[7]在研究中发现,产气肠杆菌 NCIMB10102 的最适 pH 值也为 6.0;Heyndrickx 等^[8]的研究认为,*Clostridium butyricum* IFO3847 最适 pH 值为 5.5~6.6。Monot 等^[9]研究了细胞内 pH 值对发酵产物的影响,结果表明,高 pH 值条件下的发酵产物以酸类物质为主,而低 pH 值条件下的发酵产物往往是丙酮和丁醇等物质。严格厌氧的丁酸梭菌产氢最佳 pH 值范围在 6.0~6.5 左右;而产气肠杆菌的产氢最佳 pH 范围在 5.5~6.0 之间^[10],产乙醇杆菌的产氢最佳 pH 范围是 4.0~4.5 之间。

对利用混合细菌发酵产氢的最佳 pH 范围的报道差别较大。大部分研究表明^[11~12],厌氧发酵细菌生长的最佳 pH 值范围在 5.0~6.0 之间,最佳产氢 pH 范围在 5.5 左右。任南琪等^[13]报道的乙醇型发酵最佳产氢 pH 范围在 4.2~4.5 之间。Lin 等^[14]报道的丁酸型发酵的最佳产氢 pH 在 6.7 左右。任南琪等^[15~16]经过系统地研究提出,pH 和氧化还原电位对产氢发酵微生物的发酵产物组成有重要影响,是影响产酸发酵类型的限制性生态因子。

2.3 底物种类及浓度

产氢发酵细菌利用不同种类的底物获得的产氢能力差别很大。每种微生物对底物的利用都是有选择性

的,并且对某些种类的底物具有优先选择性。底物的种类和浓度影响了产氢发酵细菌的产氢能力。在一定范围内,增加底物浓度能够使产氢量增加,但如果底物浓度超出一定范围,底物浓度的增加反而会使产氢量下降。由于菌种和运行条件的不同,同一种底物的最适浓度也不尽相同^[17]。厌氧发酵产氢细菌能够利用的最适底物为碳水化合物,蛋白质和脂肪由于其结构复杂难以在短时间内被细菌利用,因而不适合作为发酵产氢的底物。在碳水化合物中,葡萄糖和蔗糖是最好的产氢底物,糖蜜、果糖、乳糖、木糖、阿拉伯糖、纤维糖和淀粉也能被很好的利用。Kumar 等^[3]以阴沟肠杆菌 IIT-BT08 为模式菌株,对其利用纤维二糖、纤维素、阿拉伯糖、果糖、D-葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和木糖等产氢情况进行了研究,发现蔗糖的最大产氢速率和比产氢速率均为最高。Yokoi 等^[18]研究了不同底物对产气肠杆菌 HO-39 产氢的影响,葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖醇、甘露糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉、纤维素和糊精等基质均可被利用,但以葡萄糖和麦芽糖为底物时产氢能力最强,利用麦芽糖时的比产氢速率最大,得到的比产氢率为 2.16mol/mol-麦芽糖。Taguchi 等^[19]对巴氏梭菌 AM21B 利用多种基质的产氢能力进行了研究,在阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、淀粉、蔗糖、木糖等基质中,以蔗糖为底物时的产氢能力最高,为 379.4mLH₂/g COD,而利用淀粉时的产氢能力最低。*Ethanoligenens harbinense* B49^[20]能够利用葡萄糖、纤维二糖、半乳糖、乳糖、果糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、蔗糖、菊糖、棉籽糖、海藻糖和蜜二糖进行发酵产氢,而葡萄糖是其生长和产氢的最适底物,比产氢率达到 1.69mol H₂/mol 葡萄糖,*E. harbinense* B49 还可以利用小麦、大豆、玉米、土豆及糖蜜废水和啤酒废水产氢,其中糖蜜废水的氢转化能力为 137.9mL H₂/g COD。

目前的研究主要集中在对碳水化合物的利用上,其中葡萄糖是大多数发酵细菌最易利用的底物。近年来,有研究开始以有机废弃物^[21]如豆腐渣、生活垃圾等为底物进行发酵产氢,以及以结晶纤维和麦秆作为发酵产氢底物^[22]。但这些底物在应用前往往需要进行预处理,才能取得较好的产氢效果^[23~24]。

2.4 金属离子

金属离子能够对氢酶的结构和功能产生影响,从而影响产氢发酵细菌的产氢能力。适宜的金属离子浓度能够大大提高产氢菌的产氢能力和氢酶活性。Fe²⁺存在于氢酶之中^[25],因而成为研究者关注的焦点。

王勇^[26]的研究表明, Fe 参与了产氢—产酸代谢中相关酶系的作用过程, 可直接影响细菌的生物氧化及脱氢过程, 并可诱导系统的发酵过程向平衡程度较高的乙醇型发酵类型转变, 并且单质 Fe 对产氢的促进作用要优于 Fe^{2+} 。林明^[27]对多种金属离子的研究表明, 适宜浓度的 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 对产氢菌株 B49 的生长和产氢发酵有促进作用, 在 0.001g/L 浓度下, 促进顺序为 $\text{Fe}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 。王相晶^[28]的研究表明不同浓度的 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 对产氢细菌 B49 生长代谢和产氢能力都有较大影响, 铁离子能够影响 NADH-Fd 还原酶的活性, 从而影响末端发酵产物和产氢量。丁杰^[29]研究了金属离子的生物有效性, 对 Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子对生物产氢的影响进行了系统地研究, 优化了产氢产乙醇发酵细菌的培养基配方, 并确定了混合菌群产氢发酵的最佳铁离子浓度阈值。Li 等^[30]研究了重金属对产氢发酵的影响, 发现毒性作用为 $\text{Cu} > \text{Ni-Zn} > \text{Cr} > \text{Cd} > \text{Pb}$ 。Lin 等^[31]研究了三种重金属对产氢发酵的影响, 认为其毒性为 $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr}$ 。

2.5 末端产物

2.5.1 气相产物的影响

发酵法生物制氢系统的气相产物为 H_2 和 CO_2 , 由于发酵产氢是在厌氧条件下进行的, 所以不同气体对产氢有着不同的影响。Tanisho 等^[32]采用氩气对发酵气相进行吹脱, 分析了 CO_2 对产氢机制的影响, 结果检测到了还原性辅酶 I NADH 数量的增加, 表明 CO_2 对产氢的抑制大于 H_2 对产氢的抑制; 利用氢气和氩气吹脱, 去除系统中的 CO_2 后, *Enterobacter aerogenes* strain E.82005 的产氢能力提高到 1.58 mol H_2 /mol glucose。Mizuno 等^[33]利用 N_2 吹脱排出气相产物 H_2 和 CO_2 , 使 CSTR 中混合菌种的产氢速率从 2.08ml H_2 /min/L 提高到了 3.31ml H_2 /min/L, 产氢能力从 0.85mol H_2 /mol glucose 增加到 1.43mol H_2 /mol glucose, 提高了 68%。目前的研究成果认为, 产酸发酵反应器中 H_2 积累, 氢分压过高是抑制产氢的最主要因素之一。

2.5.2 液相产物的影响

产氢发酵微生物自身代谢产物和其他微生物的代谢产物均能对微生物的代谢产生重要影响。Niel 等^[34]分别针对底物和产物对高温产氢菌 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 产氢能力的影响进行了研究, 发现当排除系统中氢气的抑制作用时, 最大的抑制因素是乙酸, 当乙酸浓度达到 365 mmol/L

时, 产氢菌停止生长同时停止产氢。Kyazze 等^[35]利用 CSTR 厌氧消化污泥产氢的研究中发现, 外加 2g/L 丁酸, 对产氢没有影响, 而当外加 4g/L 丁酸时, 产氢停止并开始产丙酸。Zheng 等^[36]针对丁酸对产氢发酵菌群的影响进行了间歇实验, 当外加丁酸为 4.18g/L 时, 仅产生轻微的抑制作用, 当外加丁酸达到 8.36g/L 时, 产生了明显的抑制作用, 当外加丁酸达到 25.08g/L 时, 产氢过程被完全抑制。林明^[27]对产氢发酵高效菌种 B49 的产物抑制进行了研究, 通过外加代谢产物对 B49 累积产气量的变化进行了比较, 发现当外加 VFAs 浓度在 41.5~100 mmol/L 时, VFAs 为丙酸、丁酸、乳酸时, B49 几乎停止了产氢; 而当 VFA 为乙酸时, B49 尚具有微弱的产氢能力; 但当 VFA 为乙醇时, B49 的产氢能力仅下降了一半。因此认为, 乙醇对 B49 的产氢能力抑制作用相对最弱, 乙酸次之, 而丙酸、丁酸、乳酸有较强的抑制作用。宋佳秀^[37]通过添加外源产物——乙醇、乙酸和丁酸, 对乙醇型发酵菌群和丁酸型发酵菌群的液相末端产物对其产氢能力的抑制进行了静态实验研究, 结果表明, 对于乙醇型产氢发酵菌群, 乙醇对发酵产氢的抑制作用不明显, 而乙酸对菌群的发酵产氢有较强的抑制, 外加乙酸浓度为 15~20mmol/L 时即对产氢过程产生抑制, 外加 20~25 mmol/L 时代谢进程受到抑制, 产物总量大幅减少。对于丁酸型产氢发酵菌群, 丁酸和乙酸对菌群的发酵产氢均有明显抑制, 当外加丁酸和乙酸浓度分别为 10~15mmol/L 和 15~20mmol/L 时, 对产氢过程产生明显抑制, 当外加丁酸和乙酸浓度分别达到 20mmol/L 和 25mmol/L 时, 产氢受到严重抑制。

References (参考文献)

- [1] Bockris. J.M. The Origin of Ideas on a Hydrogen Economy and Its Solution to the Decay of the Environment. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, P731-740.
- [2] Jung G.Y, Kim J.R, Park J.Y, et al. Hydrogen Production by a New Chemoheterotrophic Bacterium *Citrobacter* sp.Y19. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, P601-610.
- [3] Kumar N, Das D. Enhancement of Hydrogen Production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, 2000, 35(6), P589-593.
- [4] Lin C.Y, Chang R.C. Fermentative Hydrogen Production at Ambient Temperature. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004, 29, P 715-720.
- [5] Yu H.Q, Zhu Z.H, Hu W.R, et al. Hydrogen Production from Rice Winery Wastewater in an Upflow Anaerobic Reactor by Using Mixed Anaerobic Culture. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002, 27, P1359-1365.
- [6] Tanisho S, Suzuki Y, Wakao N. Fermentative Hydrogen Evolution by *Enterobacter aerogenes* Strain E82005. *Int. J. Hydrogen Energy*, 1987, 12(9), P 623-627.
- [7] Fabiano B, Perego P. Thermodynamic Study and Optimization of Hydrogen Production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydro-*

- gen Energy*, 2002, 27(2), P149-156.
- [8] Heyndricky M, Vos De P, Thibau B, *et al.* Effect of External Factors on the Fermentative Production of Hydrogen Gas from Glucose by *Clostridium butyricum* Strains in Batch Culture. *System. Appl. Microbiol.*, 1987,9, P163-168.
 - [9] Monot F, Engasser J, Petitdemange H. Influence of pH and Undissociated Butyric Acid on the Production of Acetone and Butanol in Batch Cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1984, 19, P422-426.
 - [10] Evvyernie D, amasaki A.Y, Morimoto K, *et al.* Identification and Characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a Chitinolytic Mesophilic and Hydrogen-producing Bacterium. *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, 89(6), P596-601.
 - [11] Mohan S.V, Bhaskar Y.V, Krishna P.M, *et al.* Biohydrogen Production from Chemical Wastewater as Substrate by Selectively Enriched Anaerobic Mixed Consortia: Influence of Fermentation pH and Substrate Composition. *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007, 32(13), P2286-2295.
 - [12] Cheong D.Y, Hansen C.L, Stevens D.K. Production of Bio-hydrogen by Mesophilic Anaerobic Fermentation in an Acid-phase Sequencing Batch Reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, 96, P421-432.
 - [13] Ren N.Q, Wang B.Z, Huang J.C. Ethanol-type fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor. *Biotechnol Bioeng.*, 1997, 54, P428-433.
 - [14] Lin C.Y, Jo C.H. Hydrogen Production from Sucrose Using an Aerobic Sequencing Batch Reactor Process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2003, 78, P678-684.
 - [15] Ren N.Q, Li J.Z, Li B.K, *et al.* Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *Int J Hydrogen Energy*, 2006, 31, P2147-2157.
 - [16] Li J.Z, Li B.K, Zhu G.F, *et al.* Hydrogen Production from Diluted Molasses by Anaerobic Hydrogen Producing Bacteria in an Anaerobic Baffled Reactor (ABR). *Int J Hydrogen Energy*, 2007, 32(15), P3274-3283.
 - [17] Lo Y.C, Chen W.M, Hung C.H, *et al.* Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res.*, 2008, 42, P827-842.
 - [18] Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, *et al.* Characteristics of Hydrogen Production by Aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J Fermentation Bioengineering*, 1995, 80(6), P571-574.
 - [19] Taguchi F, Chang J.D, Mizukami N. Isolation of a Hydrogen-producing Bacterium *Clostridium beijerinckii* strain AM21B from Termites. *Can. J. Microbiol.*, 1993, 39, P726-730.
 - [20] Xing D.F, Ren N.Q, Li Q.B, *et al.* *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp nov., Isolated from Molasses Wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56, P755-760.
 - [21] Kapdan I.K, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol.*, 2006, 38, P569-582.
 - [22] Fan Y.T, Zhang Y.H, Zhang S.F, *et al.* Efficient Conversion of Wheat Straw Wastes into Biohydrogen Gas by Cow Dung Compost. *Bioresource Technol.*, 2006, 97, P500-505
 - [23] Guo L, Li X.M, Bo X, *et al.* Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresour Technol.*, 2008, 99, P3651-3658.
 - [24] Zhang M.L, Fan Y.T, Xing Y, *et al.* Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass Bioenergy*, 2007,31, P250-254.
 - [25] Wang J.L, Wan W. Effect of Fe²⁺ concentrations on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int J. Hydrogen Energy*, 2008, 33, P1215~1220.
 - [26] Wang Yong. Control of Optimal Fermentation Type for Bio-hydrogen Production and Efficient Hydrogen Producing Bacteria. Dissertation for the Doctoral Degree, Harbin Institute of Technology. 2002 (Ch).
王勇. 微生物最佳产氢发酵类型控制及高效产氢细菌研究[D]. 哈尔滨工业大学博士论文, 2002.
 - [27] Lin Ming. Hydrogen Production Mechanism of New Efficient Fermentation Bacteria and its Ecological factor. Dissertation for the Doctoral Degree, Harbin Institute of Technology. 2002 (Ch).
林明. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究. 哈尔滨工业大学博士论文, 2002.
 - [28] Wang X., Ren N.Q, Xiang W.S. Effect on iron on hydrogen production capacity, hydrogenase and NADH-Fd reductase activities of a fermentative hydrogen producing bacteria strain B49. *High Technol Lett.*, 2004, 10(4), P69-74.
 - [29] Ding Jie. Effects of Metal Ions and L-cysteine on hydrogen production capacity and operation strategy. Dissertation for the Doctoral Degree, Harbin Institute of Technology. 2005 (Ch).
丁杰. 金属离子和半胱氨酸对产氢能力的影响及调控对策研究. 哈尔滨工业大学博士论文, 2005.
 - [30] Li C.L, Fang H.H.P. Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere*. 2007,67, P668-673.
 - [31] Lin C.Y, Shei S.H. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. *Int J. Hydrogen Energy*, 2008,33, P587-593.
 - [32] Tanisho S, Kuromoto M, kadokura N. Effect of CO₂ Removal on Hydrogen Production by Fermentation. *Int. J. of Hydrogen Energy*, 1998, 23(7), P559-563.
 - [33] Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes F.R, *et al.* Enhancement of Hydrogen Production from Glucose by Nitrogen Gas Sparging. *Bioresource Technology*. 2000, 73(1), P59-65.
 - [34] Ed W. J. van Niel, Pietermel A. M. Claassen, Alfons J. M. Stams. Substrate and Product Inhibition of Hydrogen Production by the Extreme Thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol Bioeng.*, 2003, 81(3), P255-262.
 - [35] Kyazze G, Martinez-Perez N, Dinsdale R, *et al.* Effect of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnol Bioeng.*, 2006, 93(5), P971-979.
 - [36] Zheng X.J, Yu H.Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *J Environ Manage*, 2005, 74(1), P65-70.
 - [37] Song Jiaxiu. Climax Community of Fermentation Types and Products Feedback Inhibition in Hydrogen Production Reactor [D]. Dissertation for the Doctoral Degree, Harbin Institute of Technology. 2006(Ch).
宋佳秀. 产氢发酵类型顶级群落及产物反馈抑制研究. 哈尔滨工业大学工学博士论文, 2006