

# 生物产氢研究进展

梁建光 吴永强

(中国科学院上海植物生理生态研究所 上海 200032)

**摘要:**氢能是一种清洁高效的能源。氢气可以利用工农业废料通过微生物发酵制取,是一种可再生燃料。文中介绍了厌氧菌、兼性厌氧菌、好氧菌、光合细菌和蓝细菌等产氢的微生物种类,以及它们的产氢机理。从光合细菌利用废料产氢的效率和产氢设备的研究来看,无疑具有很大的潜力。以产氢技术作为下一代能源开发创新的技术已引起国际社会的重视,具有广阔的市场前景。

**关键词:**氢能,生物产氢,光合细菌

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0081-05

随着环保要求的日益严格和化石能源的日益短缺,氢能作为清洁高效的可再生能源受到人们的普遍重视。汽车尾气是当今世界尤其是工业化国家最主要的污染源。约31%的温室气体  $\text{CO}_2$  来自于汽车。氢燃烧时仅产生水,而不排放  $\text{CO}_2$ ,它是一种比化石燃料更令人满意的环保型能源。目前全世界 5.2 亿车辆中有 93% 使用汽油、柴油等化石燃料,由于化石燃料已经短缺,有人估计最多只能再使用 200a。而氢气是可再生的,随着产氢技术的不断发展,氢将成为取之不尽用之不竭的燃料。

在所有燃料中,单位重量燃料中所含能量以氢气为最高,并且燃烧效率也最高(比汽油高 50%),长期使用成本最低。因此氢是很有魅力的。

## 1 生物产氢的优点与不足

虽然宇宙中 90% 的质量是由氢元素构成的,但在地球上氢气不是氢元素的主要存

收稿日期: 2001-10-15, 修回日期: 2001-12-19

在形式, 氢元素主要存在于各种化合物中。目前工业上获取氢气的方法主要是在高温(700℃~1000℃)下从天然气中提取。此外还有水的电解、水的光电解, 生物量气化(将木片和农业废料高温加热)。这些产氢方法都需要消耗大量能量, 而且并没有从根本上摆脱对化石能的依赖, 也没有从根本上消除对环境的污染。通过生物产氢, 可以变废为宝, 以造纸工业废水、发酵工业废水、农业废料(如秸秆、牲畜粪便等)获得洁净的氢气, 而不另外消耗大量能源。目前所有的生物产氢工艺都处于实验室阶段, 尚未扩大到工业应用级的水平。在生产成本上仍无法与目前工业产氢的工艺相比。因而, 在工业上应用生物产氢技术仍有一段路要走。

## 2 生物产氢所用微生物

**2.1 厌氧菌** 迄今用于生物产氢研究的微生物已有不少, 它们的生理特征及其产氢机制大致可以分成以下5种类型:

1 梭菌(*Clostridia*) 专性厌氧的梭菌缺乏参与氧化磷酸化的细胞色素系统, 只能通过基质水平磷酸化产生 ATP。葡萄糖通过糖酵解途径形成丙酮酸, 同时产生 ATP 和 NADH。在丙酮酸铁氧还原酶和氢酶(hydrogenase, 简称 HD)的作用下, 丙酮酸产生乙酰辅酶 A、CO<sub>2</sub> 和氢气。NADH 可通过磷酸丁酸酶和丁酸激酶催化乙酰辅酶 A 生成丁酸, 并产生 ATP。乙酰辅酶 A 也通过乙酰激酶催化产生 ATP, 而 NADH 也可以在铁氧还原蛋白-氧化还原酶、铁氧还蛋白和 HD 的作用下被氧化产生氢气。反应式如下:



发酵过程中产生的丁酸和乙酸的比例决定了从葡萄糖发酵产 H<sub>2</sub> 的量。早在 60 年代初 Magna 公司就以 *C. butyricum* 和 *C. welchii* 用 10L 发酵罐生产出了 H<sub>2</sub>。Rohrback 等<sup>[1]</sup> 试图通过固定在琼脂中的 *C. butyricum* 细胞以酒厂的废水为原料生产的 H<sub>2</sub> 制造成燃料电池。该电池反应持续了 20d, 并产生了 15mA 的电流。2 甲基营养型细菌(*Methylobacteria*) 1979 年 Egorov 等<sup>[2]</sup> 首先从一种甲基营养型细菌中分离了 NAD 依赖型甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, 简称 FDH), 并揭示了可以用这个系统从甲烷产生 NADH 或 H<sub>2</sub>。该系统是由 NAD 依赖型 FDH 和 HD 参与催化的, 它们在这个菌株中是组成型表达的可溶性酶。3 产甲烷细菌(*Methanogenic Bacteria*) Zehnder 等<sup>[3]</sup> 分离了一株产甲烷细菌, 它能降解甲酸形成 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>。这个菌株的基本特征是能够在以乙酸为有机基质的矿物盐培养基上生长。4 瘤胃细菌(*Rumen Bacteria*) 白色瘤胃球菌(*Ruminococcus albus*) 是一种能够水解纤维素的厌氧瘤胃细菌。它通过分解碳水化合物生成乙酸、乙醇、甲酸、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>。Innotti 等<sup>[4]</sup> 以葡萄糖为原料连续培养 *R. albus* 产生 H<sub>2</sub>。培养过程中, 每 100mol 的葡萄糖生成了 65mol 乙醇、74mol 乙酸和 237mol H<sub>2</sub>。5 古细菌(*Archaea*) 嗜热古细菌中的激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*) 含有一种可溶性的含镍 HD, 能从碳水化合物和蛋白质生成 H<sub>2</sub><sup>[5]</sup>。

**2.2 兼性厌氧菌** (1) 大肠杆菌(*Escherichia coli*) Stickland 和 Yudkin 于 1929 年至 1933 年对 *E. coli* 将甲酸降解成 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 做了许多的研究。*E. coli* 中有一种甲酸氢解酶(FHL)的催化活性是可诱导的, 静止细胞悬浮液将甲酸厌氧分解为等分子的 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>。当 O<sub>2</sub> 或甲基蓝存在时, 甲酸的分解不再释放 H<sub>2</sub>。O<sub>2</sub> 对诱导 FHL 的形成有抑制作

用,但不影响 FHL 系统的催化活性。随后发现 FHL 系统是一个包含 FDH 和 HD 的膜结合多酶体系,这两种酶是通过未知的电子载体连接起来的。其中与产  $H_2$  相关的 FDH 对电子染料苯基紫 (BV) 有催化活性,这与其它能够还原甲基蓝 (MB) 的 FDH 不同。这种 FDH (BV) 催化的不产能的反应受  $O_2$ ,  $NO_3^-$  和 MB 抑制。FDH (MB) 可以在不产生  $H_2$  的情况下氧化甲酸,这一反应可以与多个厌氧还原酶系统耦联 ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$  和 延胡索酸  $\rightarrow$  琥珀酸) 并产生能量 ATP。

Klibanov 等发现 *E. coli* 中 FHL 可以催化可逆反应 ( $HCOO^- + H_2O \rightleftharpoons H_2 + HCO_3^-$ ), 此反应可利用甲酸产  $H_2$ , 也可用于催化逆反应。Nandi 等<sup>[6]</sup> 固定化了的 *E. coli* 的 FHL 系统, 并且用它持续地将甲酸转化为  $H_2$  和  $CO_2$ 。(2) 肠细菌 (*Enterobacter*) Tanisho 等<sup>[7]</sup> 分离到一株产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)。在  $38^\circ C \sim 40^\circ C$  下该菌能够在含葡萄糖、酪蛋白和盐的培养基上产  $H_2$ 。最大产  $H_2$  能力是每小时每 L 培养基产  $H_2$   $0.0089 mol \sim 0.0093 mol$ 。后来经过优化, 达到在 23h 内每小时每 L 培养基产  $H_2$   $0.0232 mol$ 。

**2.3 好氧菌** (1) 产碱菌 (*Alcaligenes*) 好氧氢细菌能够利用  $H_2$  和  $CO_2$  作为唯一能源和碳源自养生长。它们含有一种可溶性的能还原 NAD 的 HD。这类菌也能异养生长。Kuhn 等<sup>[8]</sup> 发现了真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 在厌氧条件下利用葡萄糖或果糖异养生长并分解有机物放  $H_2$ 。*A. eutrophus* 含有一种还原 NAD 的 HD, 它能够在厌氧条件下利用多余的还原力释放  $H_2$ 。有机底物产生的电子流并不进入呼吸链。Klibanov 等将 *A. eutrophus* 固定化后对可逆反应  $HCOOH \rightleftharpoons H_2 + CO_2$  进行了研究。当甲酸降解时, 高浓度的甲酸抑制产氢。虽然固定化细胞具有很高的稳定性, 但并未表明固定化细胞可以持续降解甲酸。(2) 杆菌 (*Bacillus*) 从产氢细菌培养基中, Kalia 等<sup>[9]</sup> 分离出一种产  $H_2$  的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。*B. licheniformis* 在 3% 的葡萄糖培养基中批量培养, 在 24h 内利用每 mol 葡萄糖可以产生  $0.58 mol H_2$ 。

**2.4 光合细菌 (photosynthetic bacteria)** 光合细菌是一类厌氧自养微生物, 它可以利用多种有机或无机来源的还原力还原  $CO_2$ <sup>[10]</sup>。在光合细菌中, 紫色硫细菌 (荚硫菌属 *Thiocapsa* 和着色菌属 *Chromatium*) 能够利用  $H_2S$  和元素硫, 而紫色非硫细菌红螺菌属 (*Rhodospirillum*) 和红细菌属 (*Rhodobacter*) 不能够利用硫, 但能在暗条件下利用有机物好氧生长。Gest 及其同事<sup>[11]</sup> 广泛地研究了深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 在许多化合物上光合生长时的放氢。试验表明在限制铵的培养基中, 铵耗尽后才开始放氢, 而菌体并无明显生长。而以谷氨酸为氮源时有明显的放氢。静止的细胞在光照条件下, 以三羧酸循环中的有机酸为底物放氢。*R. rubrum* 静止细胞利用每 mol 以下底物放氢量分别是: 乙酸 ( $4 mol H_2$ ), 琥珀酸 ( $7 mol H_2$ ), 延胡索酸 ( $6 mol H_2$ ), 和苹果酸 ( $6 mol H_2$ )。他们进而证明了光合细菌的放  $H_2$  是由于固氮酶具有依赖于 ATP 催化质子 ( $H^+$ ) 的放氢活性。光合细菌可以利用的碳源 (三羧酸循环的酸) 和氮源 (如谷氨酸/天冬氨酸), 在细胞产生了多余的 ATP 而还原力也超过了需要时, 细胞开始放氢。光合细菌中的 HD 能利用  $II_2$  为还原力固定  $CO_2$ , 它与固氮酶显著不同。二者之间的功能联系十分复杂。据推测, 在嗜酸红细菌 (*Rhodobacter acidophilla*) 中, 编码固氮酶的基因与编码 HD 的基因在遗传上是连锁的。荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 中 HD 是组成型表达的。红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*) 中的几个种, 能够利用葡萄糖、有机酸 (包括甲

酸)在暗处生长,放出  $H_2$  和  $CO_2$ , 也表现出无固氮酶介导的放氢。后来发现,非硫细菌在暗生长时具有与 *E. coli* 相似的丙酮酸:甲酸分解酶(pyruvate:formate lyase)和 FHL 活性<sup>[12]</sup>。这两种 HD 的同功酶到底是参与  $H_2$  的氧化反应,还是象 *E. coli* 中一样参与产  $H_2$ , 目前尚不清楚。与 *E. coli* 一样, *R. capsulatus*, *R. rubrum*, 和桃红荚硫菌(*Thiocapsa roseopersicina*)中的膜结合吸氢酶都是镍铁氢酶。在 *R. rubrum* 中发现几种 HD 能被  $CO$ 、 $CO_2/H_2$ 、丙酮酸所诱导,也能在固氮条件下被诱导。能被  $CO$  诱导的 HD 是镍铁氢酶,性质与 *E. coli* 的同功酶Ⅲ十分相似。Gest 和 Kamen<sup>[13]</sup>报道了 *R. rubrum* 以谷氨酸或天冬氨酸代替铵离子在光合生长时,从苹果酸、延胡索酸或乙二酸以一定比例产生  $H_2$ 。Hillmer 和 Gest 最先研究了 *R. capsulatus* 在谷氨酸上的放氢。除赖氨酸和半胱氨酸以外的氨基酸都支持放氢,最高产氢效率达到了每 mL 培养基每小时  $5.80\mu mol$ 。

Kelly 等也研究了 *R. capsulatus* 的产氢,发现在底物浓度较低时固氮酶产生的  $H_2$  可被 HD 完全回收。Zurrer 和 Bachofen 在光照条件下用 *R. rubrum* 从乳糖、乳清、酸乳酪废料连续产氢 80d,中间阶段性添加乳糖。碳源转化效率为 67%~99%,而产  $H_2$  能力是每 g 干细胞每小时 6mL。而用连续培养可使产  $H_2$  能力达到每 g 干细胞每小时 20mL,并且转化效率保持在 70%~75%。

Macler 等从浑球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 分离了一株突变株,能够定量地将葡萄糖转化为  $H_2$  和  $CO_2$ ,而不会象野生型那样积累葡萄糖酸。持续产  $H_2$  长达 60h,而在 20h~30h 生长期转化效率最高。

Kim 等分离的数株红细菌 *Rhodobacter* sp., 能从葡萄糖酸培养基中产生更多的  $H_2$  (每 mg 细胞每小时  $5.80mmol$ )。Odom 和 Wall 报道了用纤维单胞菌 *Cellulomonas* sp. ATCC21399 和 *R. capsulatus* 混合培养可利用纤维素产氢。他们比较了纤维单胞菌和光合菌的野生型混合培养物与纤维单胞菌和光合菌吸氢酶缺失突变株混合培养物的产  $H_2$  效率。在光照厌氧条件下持续观察了 200h。结果表明,每利用 1mol 葡萄糖, *Cellulomonas* 与突变株的混合培养物产生  $4.3mol \sim 4.6mol H_2$ , 而同等条件下与野生型的混合培养物只产生  $1.2mol \sim 4.3mol H_2$ 。由此可见,吸氢酶缺失突变株有利于  $H_2$  的积累。

在生物产氢时,由于光合细菌有诸多优点,如可应用工业废水、转化效率高等,目前大多数人倾向于应用光合细菌。科学家们通过设计的各种光合细菌产氢反应器,在一定程度上解决了光合细菌产氢的光照、控温、气体排放等问题,从而为进一步扩大规模、进行工业化生产做了有益的探索。<sup>[14]</sup>

**2.5 蓝细菌 (Cyanobacteria)** 蓝细菌(蓝绿藻)是一种好氧的光养细菌。绝大多数蓝细菌含有一个产氢的固氮酶系统,由固氮酶催化放  $H_2$ 。而固氮酶系统的表达需要一定的生长条件和缺乏固定态的氮源的环境。蓝细菌与高等植物类似,以光合系统 I 和光合系统 II 进行光合作用,产生氧气<sup>[15]</sup>。 $H_2$  与  $O_2$  的混合物是易爆气体,在考虑利用蓝细菌产  $H_2$  时需同时解决除  $O_2$  问题。

### 3 应用前景

氢在工业上有许多用途,目前主要应用纯氢来制造氨基酸和甲烷。氢的应用还包括化学工业、石油精炼、冶金、食用油氢化、太空计划、天气预报以及电子元件制造

等。将来, 氢气还会用作运输工具的燃料、民用及工业商用电站的燃料, 以及消费电子器的能源。也就是说, 将来总有一天, 大部分耗能器具都用氢气。

目前美国年产  $H_2$  48 亿立方米, 已经达到价值 1000 亿美金的市场规模<sup>[16]</sup>。强大的市场需求必将推动氢气工业生产的研究。生物产氢技术因其具有的种种优点, 也必将得到更大的发展。

以氢作为下一代能源代用品的技术是目前十分热门的开发创新技术。主要汽车制造商 (如戴姆勒-克莱斯勒、通用、福特)、石油公司 (如壳牌、德萨克、阿克萨以及能源公司)、设备制造商 (如 GE) 都对此表现出浓厚的兴趣。

由于氢气易爆, 氢的贮存、运输一直是一大难题。目前常用的压缩气体罐贮存效率低。而采用  $-253^\circ\text{C}$  条件下贮存液氢的深度制冷技术对于大众市场来说, 还很不成熟。据报道, 一种具有复杂的纳米结构的石墨纤维, 其单位重量可以吸收 20% 的氢气, 可能具有一定的应用前景。

鉴于环保要求的日益严格, 内燃机的发展已经走到了尽头。燃料电池由于其能量转换效率高、污染零排放或极少排放而受到人们的普遍重视。其中最适合汽车的是质子交换膜燃料电池。加拿大的巴拉德公司已经开发出功率密度达到 1350W/L 的电池组, 据说成本可以降到每千瓦 60 美元<sup>[17]</sup>, 对传统的活塞式发动机已经很有竞争力了。我国上海神力科技有限公司承担的国家“九五”攻关项目“30 千瓦氢能燃料电池动力系统”日前通过专家验收, 该公司研制的首辆氢能燃料电池电动游览车投入运行, 引起社会各方的关注<sup>[18]</sup>。

分析家认为, 如果燃料电池以目前的速度继续发展, 最后一家汽车发动机制造厂可能会在 21 世纪中叶关闭。

## 参 考 文 献

- [1] Rohrback G H, Scott W R, and Canfield J H. Prodeedings of the 16th Annual Power Sources Conference, 1962. 18.
- [2] Egorov A M, Avilova T V, Dikob M M, *et al.* Eur J Biochem, 1979, 99: 569.
- [3] Zehnder A J, Huser B A, Brock T D, *et al.* Arch Microbiol, 1980, 124: 1.
- [4] Innoti E L, Kafkawitz D, Wolin M J, *et al.* J Bacteriol, 1973, 114: 1231.
- [5] Fiala G, Stetter K O. Arch Microbiol, 1986, 145: 56.
- [6] Nandi R, Bhattacharya P K, Bhaduri A N, *et al.* Biotechnol Bioeng, 1992, 39: 775.
- [7] Tanisho S, Wakao N, Kosako Y. J Chem Eng (Japan), 1983, 16: 529.
- [8] Kuhn M, Steinbuechel A, Schlegel H G. J Bacteriol, 1984, 159: 633.
- [9] Kalia V C, Jain S R, Kumar A, *et al.* World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10: 224.
- [10] Pfennig N. Rev Microbiol, 1977, 31: 275.
- [11] Ormerod J G, Ormerod K S, Gest H. Arch Biochem Biophys, 1961, 94: 449.
- [12] Gorrell T E, Uffen R L. J Bacteriol, 1977, 131: 533.
- [13] Gest H, Kamen M D. Science, 1949, 109: 558.
- [14] Mignot I, Planchard A, Junter G A. Chemicaggi, 1989, 7: 47.
- [15] Rippka R. The Prokaryotes-A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Berlin: Springer-Verlag, 1981. 212.
- [16] 美国能源部 2000 年年度报告.
- [17] 郑海金, 曹学军, 陈 刚. 国外科技动态, 2001, 1: 35~39.
- [18] 于沛华. 文汇报, 2001/06/01, 第 10 版.