微生物发酵产氢的影响因素分析*

肖本益　魏源送　刘俊新**

(中国科学院生态环境研究中心　北京　100085)

摘要：随着环保要求的愈益严格和化石能源的日益短缺，氢作为清洁高效的可再生能源日益受到人们的重视。微生物发酵产氢可以利用可再生的生物质，符合可持续发展的要求。针对影响微生物发酵产氢的因素，总结了国内外在该领域的研究成果，重点介绍了产氢微生物、营养物、产物和工艺操作条件等方面对发酵产氢的影响，同时还阐述了以有机废弃物为基质时的发酵产氢影响因素。

关键词：微生物，发酵产氢，影响因素，有机废弃物

中图分类号：Q93　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2654 (2004) 03-0130-06

Factors of Affecting Microbial Fermentative Hydrogen Production

XIAO Ben-Yi　WEI Yuan-Song　LIU Jun-Xin

(*Research Center for Eco-Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100085)

Abstract: As a clean, efficient, and renewable energy, hydrogen is regarded as a promising alternative. Because of using biomass as substrate, microbial fermentative hydrogen production can meet the need of sustainable development. The factors affecting the process of microbial fermentative hydrogen production, are analyzed in this paper on the basis of microorganisms, substrates, products and operative parameters. The parameters related to hydrogen production from organic wastes, are also mentioned.

Key words: Microorganisms, Hydrogen production, Factors analysis, Organic waste

由于能源和环境问题，生物制氢已成为人们关注的一个热点。生物制氢是利用微生物体内的酶催化反应制取氢气，与传统的物理化学方法相比，生物制氢具有清洁、节能和不消耗矿物资源等突出特点。生物制氢方法可分为厌氧光营养菌产氢（简称光合产氢）和发酵细菌产氢（简称发酵产氢）。同光合产氢相比，发酵产氢的速率更高。另外，从能量学上看，由于发酵产氢从产氢反应中获得的自由能比光合产氢更多，且氢酶催化的产氢反应不需要 ATP，因而它十分有利。

虽然近年来国内外对发酵产氢的研究很多，但由于发酵产氢是一个复杂的生化过程，受到许多因素的影响，氢气产量还达不到人们的要求。许多研究者对发酵产氢的影响因素进行了一些探讨，但是这些工作比较零碎、分散。为此，本文对发酵产氢的主要影响因素—产氢微生物、产氢基质和其它营养物、操作条件等方面进行了较系统的总结、分析和阐述，同时还分析了当前的研究热点—有机废弃物发酵产氢的影响因

---

* 国家自然科学基金资助项目 (No.20277043)
Project Granted Chinese Natural Science Fund (No. 20277043)
** 联系人　Tel: 010-62849108
收稿日期：2003-07-21，**修回日期**：2003-09-15

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

素，以期对发酵产氢的研究有所帮助。

1　发酵产氢微生物

1.1　微生物种类　微生物是影响发酵产氢的重要因素。研究表明，能够进行发酵产氢的微生物有许多，如 *Clostridium*，*Enterobacter*，*Escherichia*，*Citrobacter*，*Bacillus*，*Desulfovibrio* 和 *Methanogen* 等[1,2]，但目前的研究主要集中在前两个属。不同种类的微生物对同一有机底物的产氢能力不同，通常严格厌氧的 *Clostridium* sp. 高于兼性厌氧的 *Enterobacter* sp.[3]。另外，同种微生物不同菌株的产氢能力也存在差异。目前，利用厌氧发酵进行微生物产氢的方式大体上可分为两种类型：一是利用纯菌进行微生物产氢，二是利用厌氧活性污泥或其它混合物，以混合培养方式进行产氢。通常 *Enterobacter* sp. 主要用于纯培养，而 *Clostridium* sp. 则是混合培养中的优势微生物[3]。在混合培养的厌氧发酵产氢过程中，抑制和防止消耗氢的氢营养微生物的生长至关重要。目前用于抑制氢营养微生物的方法主要有两种：(1) 采用低 pH 值来抑制和杀死氢营养微生物；(2) 通过缩短水力停留时间 (HRT)，将菌龄较长的氢营养微生物冲洗出反应体系[3]。

表 1 列出了不同微生物发酵产氢的一些参数，从表中可以看出由于生理特性、代谢过程等不同，微生物在产氢方面存在较大差异，因此，筛选合适的发酵产氢微生物是产氢的关键之一。

表 1　不同发酵产氢微生物和底物的产氢

微生物	有机营养物	规模	温度/ pH 值	产氢率	比产氢速率 a
Citrobacter intermedius	葡萄糖	14 L	34℃/ 7.0	1 mol/mol 葡萄糖	2.5 (3.7) mmol/g 干细胞·h
Clostridium sp. No.2	葡萄糖 阿拉伯糖	300 mL 1 L	36℃/ 6.0	2.36 mol/mol 葡萄糖 14.55 mmol/g 阿拉伯糖	20.40 mmol/ L·h 28.60 mmol/ L·h
C. bifermentans	活性污泥	125 mL	35℃/ 5.5 ~ 6.0	1.5 ~ 2.1 mmol/gCOD	NA
E. aerogenes	糖蜜	300 mL	38℃/ 6.0	2.5 mol/mol 蔗糖	20 (36) mmol/ L·h
E. cloacae	蔗糖 纤维二糖	50 mL	32℃ ~ 40℃/ 5.6	6 mol/mol 蔗糖 5.4 mol/mol 纤维二糖	NAc (650 mmol/ L·h)
C. butyricum, *E. aerogenes*	淀粉 淀粉加工废物	250 mL	36℃/ 6.5	2.6 mol/mol 葡萄糖 2.7 mol/mol 葡萄糖	58.04 mmol/ L·h NA
Escherichia coli	葡萄糖	NA	37℃/ NA	0.6 mol/mol 葡萄糖	NA
甲烷菌	乙酸	NA	55℃/ 7.0	NA	4.6 nmol/m3·h
热处理消化污泥	城市固体废物	120 mL	37℃/ 7.0	NA	(45 mL/gVSS·h)
二沉池污泥	酿酒废水	3L	55℃/ 5.5	1.37 ~ 2.14 mol/mol 蔗糖	(9.33L/gVSS·d)
堆肥污泥	糖质废水	5 L	60℃/ 7.0	14 mmol/g 碳水化合物[b]	34 ~ 198 mmol/L·d
煮沸厌氧消化污泥	脂肪	120 mL	37℃/ 7.0	9.75 mL/gVS	NA
煮沸厌氧活性污泥	蛋白胨	NA	35℃/NA	0.345 mol/kgCOD	NA
厌氧活性污泥	制糖废水	2000 L	35℃ ~ 38℃/ 4.0 ~ 5.5	26 mmol/g COD	30 mmol/gVSS·d

a () 数据为最大值，b 最大值，NA 文献中没有提到

1.2　微生物的存在方式　生化反应体系中的微生物存在方式通常有两种：游离悬浮态和附着固定态。一些研究表明固定化系统比悬浮系统的产氢效果好，因为固定化系统内可以保持更高的生物量。

为了达到固定化的目的，研究者采用一些微生物载体或包埋剂（如聚氨基甲酸乙酯泡沫、藻酸钙等）对细胞进行固定化。以聚氨基甲酸乙酯泡沫作为 *E. aeogenes*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

E82005 菌株的载体，产氢结果表明反应器的持续产氢率和最大产氢率分别从悬浮态的 1.5 mol H_2/mol 葡萄糖和 2.5 mol H_2/mol 葡萄糖提高到固定态的 2.2 mol H_2/mol 葡萄糖和 3.5 mol H_2/mol 葡萄糖[4]。然而，由于载体基质占据反应体系内一定的有效空间，因此，反应体系比产氢速率的进一步提高也因生物持有量不足而受到限制。鉴于载体的这一不足，研究者开始考虑利用能够自絮凝的产氢微生物，使之能够自己形成絮凝、颗粒，从而达到自固定化。*E. aerogenes* HU-101 及其突变株 AY-2 具有自絮凝能力，能在没有任何载体下形成絮凝体。Fang 等[5]成功地利用 3L 发酵罐在短时间内培育出了产氢颗粒污泥，第 15 d 出现，60 d 后达到稳定。该系统的产氢速率为 541.7 mol H_2/L·h，氢产率为 4.275 mol H_2/mol 蔗糖，其产气组成为 63%H_2、35%CO_2 和 2%N_2，不含甲烷。

2 有机营养与无机营养物

2.1 有机营养物 目前用于发酵产氢的有机营养物分为单一化合物和复合化合物两类。单一化合物如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、蔗糖、淀粉、纤维素、蛋白胨等；复合化合物如糖蜜、活性污泥、有机废水、城市固体废弃物等（见表 1）。由于不同有机营养物在组成、分子结构和理化性质等方面存在差异，因而其发酵产氢途径也有所不同。通常，结构简单、分子量小的化合物可直接被微生物利用转化为氢，而复杂的大分子化合物则首先必须被分解为小分子，然后才能被微生物转化为氢。碳水化合物比蛋白质、脂肪易被利用。另外，有机营养物浓度对发酵产氢也有影响。Yu 等[6]采用玉米酿酒废水进行厌氧发酵产氢时，发现当废水的 COD 浓度从 14 g/L 升高到 36 g/L 时，氢气的比产生速率从 3.61 L H_2/gVSS·mol 己糖升高到 8.12 L H_2/gVSS·mol 己糖，但氢气产率却由 1.8 mol H_2/mol 己糖下降到 1.7 mol H_2/mol 己糖。

从表 1 中可以看出，用来发酵产氢的底物较多，但目前的研究主要集中在易降解的简单化合物，其中以碳水化合物为底物的研究远远多于其它物质。总之，发酵产氢尚处于研究阶段，氢气产量不高，氢气转化率较低，还有待进一步提高。

2.2 无机营养物 无机营养物是微生物生长必不可少的一类营养物质，它们在机体中的生理功能多样，如作为酶活性中心的组成部分（如铁）、维持生物大分子和细胞结构的稳定性等。因此，优化产氢时必须考虑无机营养物的影响[3]。

铁和磷是影响发酵产氢的两种重要营养物[3]。铁对产氢的影响可能是因为铁不足而影响氢化酶的活性。铁是氢化酶的一种重要组成成分，氢化酶的体内活性随着铁的消耗而下降。另外，铁也是铁氧还蛋白的重要组成成分。在蔗糖的分批混合发酵中，低 Fe^{2+} 浓度有利于乙醇、丁醇的产生，当生长培养基中含 800 mg/L Fe^{2+} 时，氢的产量最大。就 *C. butyricum* 的甘油发酵产氢而言，铁和磷的不足对氢产量有较大影响，并对其它代谢产物也有影响，可能是铁和磷的不足导致了 *C. butyricum* 代谢途径的改变。

Yu 等[7]研究了 Cr^{3+} 和 Cd^{2+} 对厌氧酸化产氢过程的影响，研究结果表明，当 Cd^{2+} 的浓度低于 20 mg/L 时，添加 Cd^{2+} 能够促进酸化产氢，而高于这个值时，则产生抑制作用；添加 5 mg/L Cr^{3+} 会降低总挥发酸、沼气和乙醇产量、酸化程度等，但对氢气和丙酸的积累不产生影响。对 *E. aerogenes* 生长和产氢来说，添加 $CoCl_2$ 可提高氢产量，添加 $MnCl_2$ 能提高产氢速率；但 $CuSO_4$ 的加入却会降低氢产量；而添加 HBO_3 和 $NaWO_4$ 则会完全抑制产氢，如果将这两种物质同时加入反应体系中，则会产生协同抑制作用。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

目前，只有铁对产氢微生物的作用机理相对较清楚，其它如 P、Cr^{3+} 和 Cd^{2+} 等只是从量上对它们进行了描述性研究，而其生理功能、作用机理等均有待进一步的研究。

3 发酵产物（氢和挥发性有机酸）

产氢微生物利用有机营养物进行厌氧发酵的产物除氢外，还有挥发性脂肪酸（如乙酸、丁酸等）、醇类物质等。如果产物在微生物的体内或体外环境中积累过高，通常会对微生物活性及其生理过程产生影响。

氢的产生是细菌将铁氧还蛋白和携带氢的辅酶再氧化的一种过程。根据气液平衡关系，气相中如果积累了较高浓度的氢，则必然使液相中氢浓度升高，不利于再氧化过程的进行，从而使产氢过程受到抑制。另外，氢分压还会影响发酵产物组成及其含量。因此，如何在微生物发酵产氢过程中减少 H_2 对产氢的抑制是发酵产氢技术的关键之一。

借鉴厌氧菌的 Hungate 培养法，利用氮气、氩气等惰性气体或反应气体（如 CO_2）吹脱反应体系或用其它方法可降低体系的氢分压。采用氮气鼓泡吹脱厌氧微生物群（主要是 *Clostridium* sp.）发酵液中的氢气，结果发现产氢速率从未吹脱的 2.08 mL H2/min·L 提高到 3.31 mL H2/min·L，氢气产率也提高 68.2%[8]。

微生物发酵产氢过程中会产生有机酸。一般认为，有机酸的积累会降低系统的 pH 值，从而影响产氢过程，但研究结果表明并非完全如此。在蛋白胨的高温发酵产氢过程中，乙酸的添加对产氢发酵过程几乎没有影响；但在极端 pH 值下，乙酸的添加会延长停滞期（pH≤6），或降低产氢速率（pH≥8）；并且高含量挥发酸会加速系统中氢的消耗。副产物乙酸对产氢菌的毒性低于丁酸。当丁酸浓度高于 13 g/L 时，微生物生长和产氢均会受抑制。通常认为丙酸的积累会抑制厌氧过程，因此，厌氧过程中应尽量避免丙酸的产生和积累。

任南琪等[9]认为厌氧发酵过程中乙醇的产生不但可以减少酸性副产物的数量，维持细胞内正常的生理 pH 值，而且还可以通过产乙酸过程和乙醇发酵的耦联，维持细胞内 NADH/NAD^+ 的动态平衡，避免丙酸的积累，从而有利于发酵产氢。

4 操作（工艺）条件

4.1 温度　不同发酵产氢微生物的产氢温度存在较大的差异（表 1）。例如 *Clostridium* sp. No.2 发酵阿拉伯糖等的温度为 36℃，而 *Thermotoga elfii* 的产氢温度为 65℃，Van Groenestijn 等甚至发现某些微生物在 70℃下仍能发酵产氢。但出于节能的考虑，目前大多数研究都采用中温（37℃左右）进行发酵产氢。

当温度在 15℃～36℃变化时，*E. cloacae* ⅡT-BT 08 的氢气产量随温度升高而增加，36℃时达到最大产氢率（2.25 mol H2/mol 葡萄糖），但当超过 36℃时，其产氢量开始下降。而 *E. aerogen* 利用蔗糖产氢时，其产氢率的增加可一直持续到 40℃。当温度从 20℃升高到 55℃时，随着温度的升高，二沉池污泥驯化物的氢产率和产氢速率均升高，最佳产氢温度可能超过 55℃，其原因可能是由于接种物中同时存在中温和高温产氢菌，优势菌随着温度升高逐渐从中温菌转变为高温菌。

4.2 pH 值　pH 值对发酵产氢的影响往往与细胞内 NADH/NAD^+ 动态平衡和产氢菌的生理条件有关。pH 值会影响产氢微生物细胞内氢化酶活性和（或）代谢途径，另外还

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

会影响细胞的氧化还原电位、基质可利用性、代谢产物及其形态等。

通常每一种产氢微生物都有其最佳 pH 值。大多数研究认为微生物发酵产氢的最佳 pH 值在 5.0~7.0 之间[3]（表 1）。但也有例外，例如，蔗糖分批发酵产氢的结果表明，产氢最佳 pH 值为 9.0，其最大比产氢速率为 37.0L H_2/g·VSS·h[10]。低 pH 值会增加丁醇的产生，而产生的丁醇会破坏细胞维持胞内 pH 值的能力、降低胞内 ATP 的水平、影响葡萄糖等基质的吸收；高 pH 值会引起微生物结团，影响传质过程和葡萄糖等物质的吸收。当系统 pH 值迅速降低到 4.0~4.5 时会抑制产氢过程。当系统 pH 值维持在 5.2 左右时，淀粉的产氢速率最高；pH 值低于 4.7 或高于 5.7 时，其产氢速率开始下降；pH 值低于 4.1 或高于 6.1 时则有利于乙醇的产生。另外，改变 pH 值会影响混合培养体系中的优势微生物，从而影响氢、有机酸等代谢产物。

4.3 其它 反应器形式对产氢效率具有一定影响。Kumar 等[11]认为填充床反应器的产气释放是发酵产氢过程的一个重要影响因素，他们研究了 3 种反应器形式（管形、圆锥形和偏菱形）对产气释放的影响，结果表明扁菱形反应器的产氢速率最大（可达 1.7 L H_2/L·h)。4 种不同反应器（污泥回流式反应器、全混式反应器、传统无搅拌式反应器和柱塞流式反应器）的发酵产氢结果表明，全混式反应器最适合厌氧发酵产氢，其次为无搅拌式反应器。

采用合适的水力停留时间（HRT）能够达到筛选产氢菌而淘汰氢营养菌的目的，有利于提高基质的氢转化率。在 pH 值为 6.7 时，Chen 等[12]通过改变 HRT 来筛选产氢优势菌—*C. pasteurianum*，当 HRT 为 8 h 时，该菌的产氢速率最大，而当 HRT 降到 6h 时则发生流失现象。当 HRT 从 13.3 h 降到 3 h 时，蔗糖发酵的氢产量从 4.9 L H_2/L·d 增加到 26.9 L H_2/L·d，但 HRT 继续降到 2 h，氢产量则下降到 20.8 L H_2/L·d 。

氧化还原电位（ORP）是微生物正常生长繁殖不可缺少的环境因子之一，对微生物的生存状态有着重要影响。李建政等[13]发现生物制氢反应器正常运行时，反应器中的 ORP 基本保持在-100~-125mV，呈现出一定的稳定性。但 Wang 等[14]研究 *C. bifermentans* 利用预处理污泥进行发酵产氢时，则发现体系的 ORP 会逐渐降低到约-300mV。

微生物在发酵产氢的同时会产生大量的副产物—乙醇等溶剂类物质和乙酸等有机酸，有机酸在反应体系中过多积累会抑制产氢。为了消除这种抑制作用，保持体系一定的碱度是十分必要的。李建政等[13]发现在高有机负荷下，进水碱度（以 $CaCO_3$ 计）如果维持在 300~500mg/L，则可保证乙醇型发酵的最适 pH 值（4.0~4.5)，同时可在一定程度上提高污泥的产氢能力。

在较低有机负荷下，反应器的产氢速率随着容积负荷的增加而迅速增加，在容积负荷达到 40 kg COD/m^3·d 后，产氢速率不再随容积负荷的增加而明显变化，当容积负荷超过 70kg COD/m^3·d 后，反应器的产氢速率出现下降趋势[13]。

在产氢菌的发酵液中，不搅拌时氢含量比搅拌时高。搅拌对发酵产氢的影响主要是因为它可以促进传质过程，加速氢气从液相向气相转移，从而降低液相中的氢含量。

5 有机废弃物的发酵产氢及其主要影响因素

如前文所述，由于发酵产氢目前仍属于试验室研究阶段，大多研究者均采用容易降解、结构相对简单的碳水化合物来发酵产氢。一部分研究者已开始研究利用有机废

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

弃物进行发酵产氢，如表1中所列出食品加工废水、活性污泥、城市固体废弃物等。利用这些废弃物进行发酵产氢，一方面可以保护环境，另一方面可以在废弃物的处理过程中回收氢能源。

有机废弃物组成复杂，含有多种有机物，同时微生物种类繁多。对于这类物质的发酵产氢，笔者认为除了上述主要影响因素外，还有一个较为重要的因素——预处理。对于成分复杂的废弃物，通常在进行发酵产氢前，必须经过一定的预处理，使这些废弃物中的有机物可以或易于为产氢微生物所利用，而且不同的预处理方法对微生物利用这些废弃物进行发酵产氢的影响是不同的。采用5种不同方法（超声波振荡处理、酸处理、灭菌处理、添加甲烷菌抑制剂处理和冻融处理）对活性污泥进行预处理，结果表明，冻融和酸处理的产氢效果最好，其次为灭菌处理[14]。另外，对城市固体废弃物，一般先要粉碎、调整其含水率等。废弃物中往往存在着多种微生物，其发酵产氢过程中常伴随有消耗氢的氢营养微生物生长，采用合适的预处理方法淘汰其中的氢营养微生物，是实现废弃物发酵产氢的重要保证。另外，在各种废弃物中还可能含有一些对产氢微生物有抑制作用的有害组分，如重金属，在利用这类废弃物时，首先必须采用合适的预处理将这些有害组分去除或降低其浓度，从而减少它们对发酵产氢的抑制。

6 结语

尽管人们对微生物厌氧发酵产氢已进行了许多研究，且已取得了很大进展，并已引起了世界各国的重视，但由于发酵产氢的条件要求严格，体系较复杂，影响因素较多，目前大部分研究仍处于实验室阶段，实现发酵产氢的持续性和稳定性，还有相当大的困难，离实际应用还有一段距离。认识微生物发酵产氢的影响因素只是研究的第一步，如何确定各因素的"黄金点"及因素之间的最佳组合是提高发酵产氢的关键。这一关键问题的解决必须依靠在借鉴前人经验的基础上，在试验过程中摸索。另外，以有机废弃物为基质进行发酵产氢的研究也刚起步，还有许多工作要做。

参 考 文 献

[1] Das D, Veziroğ T N. Int J Hydrogen Energy, 2001, **26**: 13～28.
[2] Nandi R, Sengupta S. Crit Rev Microbial, 1998, **24** (1): 61～84.
[3] Hawkes F R, Dinsdale R, Hawkesh D L, *et al*. Int J Hydrogen Energy, 2002, **27**: 1339～1347.
[4] Tanisho S, Ishiwata Y. Int J Hydrogen Energy, 1995, **20** (7): 541～545.
[5] Fang H H P, Liu H, Zhang T. Biotechnol Bioeng, 2002, **78** (1): 44-52.
[6] Yu H Q, Zhu Z H, Hu W R, *et al*. Int J Hydrogen Energy, 2002, **27**: 1359～1365.
[7] Yu H Q, Fang H H P. Wat Sci Technol, 2001, **43** (11): 267～274.
[8] Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes F R, *et al*. Bioresource Technol, 2000, **73**: 59-65.
[9] 任南琪，王宝贞，马 放．中国沼气，1995，**13**（1）：1～6.
[10] Lee Y J, Miyahara T, Noike T. J Chem Technol Biotechnol, 2002, **77**: 694～698.
[11] Kumar N, Das D. Enzyme Microbial Technol, 2001, **29**: 280～287.
[12] Chen C C, Lin C Y, Chang J S. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **57**: 56～64.
[13] 李建政，任南琪，林 明，等．太阳能学报，2002，**23**（2）：252～256.
[14] Wang C C, Chang C W, Chu C P, *et al*. J Biotechnol, 2003, **102**: 83～92.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn