

暗发酵-光发酵两阶段联合生物制氢技术研究进展

刘坤 陈银广* 赵玉晓

(同济大学 环境科学与工程学院污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

摘要: 随着能源紧缺的日益加剧,以及化石燃料燃烧引起的环境问题逐渐突显,氢能作为一种清洁可再生能源越来越受到青睐。生物制氢与热化学及电化学制氢相比其反应条件温和、低耗、绿色,是一项非常有应用前景的技术。生物制氢从广义上可以分为暗发酵和光发酵产氢两种,其中暗发酵微生物可以利用有机废弃物产生氢气以及有机酸等副产物,光合细菌在光照和固氮酶的作用下可以将暗发酵产生的有机酸继续用于产氢,因此两种发酵产氢方式相结合可以提高有机废物的资源化效率。将近年来暗发酵-光发酵两阶段生物制氢技术进行整理分析,从其产氢机理、主要影响因素、暗发酵-光发酵产氢结合方式(两步法、混合培养产氢)几个方面进行阐述,最后指出该技术面临的挑战。

关键词: 光发酵,暗发酵,生物制氢,两步法产氢,混合培养产氢,废物资源化

The advances in bio-hydrogen production by two steps of dark and photo-fermentation

LIU Kun CHEN Yin-Guang* ZHAO Yu-Xiao

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: With the increasing of energy shortage and environmental problems caused by burning fossil fuels, hydrogen, as a clean and renewable energy has gained special attention. Compared with thermochemical and electrochemical hydrogen production, bio-hydrogen production has a lot of advantages, such as ambient reaction conditions, low consumption and environmentally friendly. Therefore, it was considered as a promising technology.

*通讯作者: Tel: 86-21-65981263; 信箱: yg2chen@yahoo.com

收稿日期: 2011-11-18; 接受日期: 2012-02-07

Bio-hydrogen production usually undergoes two stages, i.e., dark fermentation and light fermentation. In dark fermentative stage, waste organic materials can be converted to hydrogen by bacteria, and leave some by-products, such as organic acids. The photosynthetic bacteria can decompose organic acids and release hydrogen by using light energy and nitrogenase in a photo fermentation process. Thus, combining these two kinds of hydrogen production methods can improve the utilization rate of waste organic material. This review is based on the development of dark and photo two-stage fermentation in recent years. It was elaborated mainly from the following aspects: mechanism of two-stage hydrogen production, main influence factors, kinds of two steps bio-hydrogen production (sequential dark and photo-fermentation & combined dark and photo-fermentation), and the facing challenges.

Keywords: Photo fermentation, Dark fermentation, Bio-hydrogen production, Sequential dark and photo-fermentation, Combined dark and photo-fermentation, Waste materials re-utilization

社会经济的发展很大程度上依赖于能源,其中约 80%的能源来自于化石燃料的燃烧,这也使得地球上可利用的化石燃料储量急剧减少,日趋严重的能源与环境问题摆在人们面前,因此开发可再生的清洁能源成为现今科学研究的一个重要方向。氢能以其可再生、热值高(143 GJ/t)、燃烧产物不会引起温室效应、易被燃料电池转化为电能等特点被认为是一种未来能源^[1-2]。

近 50 年来,制氢技术得到越来越多的关注,目前氢气生产方法很多,如电解水制氢、水煤气法制氢、石油裂解的混合气和天然气制氢、生物制氢等。其中生物制氢具有反应条件温和、可实现废物资源化、节能低耗等优点,因而成为研究的热点。生物制氢又可以分为以下几类^[3]: (1) 利用藻类和蓝细菌生物法光解水产氢; (2) 有机物发酵产氢; (3) 利用光合细菌分解有机物产氢; (4) 光合细菌和发酵细菌混合系统产氢。其中蓝细菌和藻类光解水产氢的同时也会产生氧气,而氧气会对与产氢相关的固氮酶和氢化酶产生抑制,导致产氢量较低^[1]。暗发酵产氢过程中有机物的降解不彻底,其产物中含有大量的挥发酸;光合细菌在光能的作用下,可以利用这些暗发酵副产物使其进一步转化为氢气和二氧化碳,从而

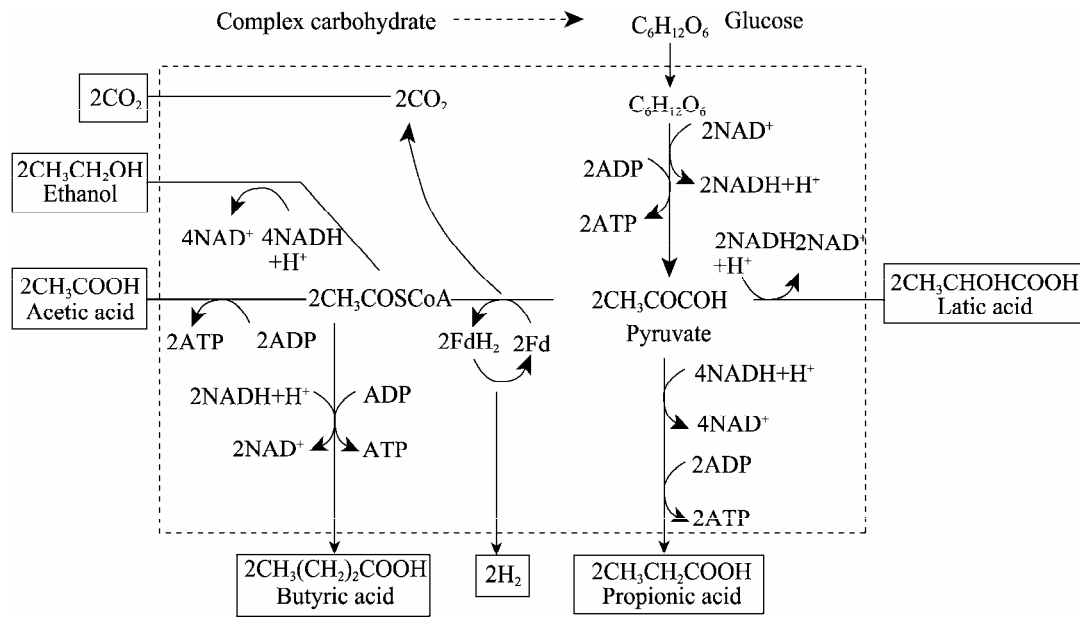
提高有机废物的产氢效率,并且降低其可能对环境造成的污染,所以暗发酵和光发酵联合产氢是一项很有应用价值的研究。本文对暗发酵-光发酵两阶段产氢机理、主要影响因素、暗发酵-光发酵产氢结合方式(两步法、混合培养产氢)几个方面进行阐述,最后指出该技术面临的挑战。

1 两阶段生物制氢技术原理

1.1 厌氧暗发酵产氢机理

许多异养细菌在厌氧条件下具有利用碳水化合物发酵产生 H₂、挥发酸(VFAs)和 CO₂的能力。一般来说,能形成孢子的梭菌属、兼性肠杆菌、芽孢杆菌^[4],一些嗜热菌属^[5-6]和污泥中的厌氧产酸菌^[7-8]是暗发酵产氢中常用的种类。暗发酵产氢过程中主要的酶为氢化酶(Hydrogenase),在它的催化作用下质子与电子结合形成分子态的氢^[9-10]。根据厌氧暗发酵的产物可以将其代谢途径分为:乙醇型发酵、丙酸型发酵和丁酸型发酵。可能的代谢途径如图 1 所示。

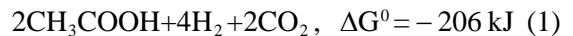
厌氧暗发酵产氢途径有:丙酮酸脱羧途径、甲酸途径(甲酸裂解产氢)和 NADH/NAD⁺的氧化还原平衡调节途径。发酵菌体内缺乏完整的呼吸链电子传递体系,因此在发酵过程中通过脱氢作

图 1 不同发酵产氢类型代谢途径^[11-12]Fig. 1 Metabolic pathways possible for the carbohydrate fermentation^[11-12]

用产生的过剩电子必须经过适当的途径得到释放,从而使物质的氧化与还原过程保持平衡,以保证代谢过程的顺利进行。还有一些微生物为了缓解氧化还原过程中所产生的过剩电子而采取发酵途径直接产生分子氢的调节机制。

暗发酵将葡萄糖转化为氢气、乙酸和二氧化碳,反应见方程式(1)。该反应的自由能为负值说明正向反应无需外加能量可自发进行。理论上,当代代谢产物的 VFAs 只有乙酸时,1 mol 葡萄糖最多可以产生 4 mol 氢气,转化率较低,约为 33%^[13];但实际上,由于葡萄糖代谢还要用于维持生物自身的生长,因此产生的氢气要低于理论值,研究报道的碳水化合物暗发酵产氢量在 1-2.8 mol H₂/mol 葡萄糖^[14]。当代代谢产物为丁酸时,1 mol 葡萄糖代谢可以产生 2 mol 氢气,而当产物为丙酸时形成 1 mol 的丙酸反而要消耗 1 mol 氢气^[15]。发酵产物为乳酸和乙醇时不涉及氢气的产生和消耗;当代代谢产物既有乙酸也有丁酸时,1 mol 的葡萄糖经代谢可释放 2.5 mol 的氢气。

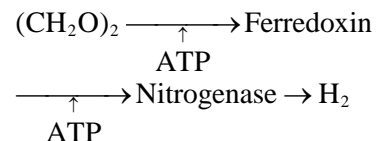
暗发酵产氢: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow$



1.2 光发酵产氢机理

紫色非硫细菌(Purple non-sulfur bacteria, 简称 PNS)在厌氧条件下有将 VFAs 转化为 H₂ 和 CO₂ 的能力,同时光合细菌也可以利用葡萄糖、蔗糖、琥珀酸盐等复杂的碳源产生氢气^[16-17]。光发酵产氢中应用最广泛的菌种有 *Rhodobacter sphaeroides* O.U001、*Rhodobacter capsulatus*、*R. sphaeroides*-RV、*Rhodobacter sulfidophilus*、*Rhodospseudomonas palustris* 和 *Rhodospirillum rubrum*。

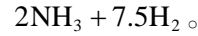
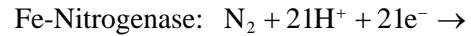
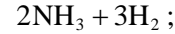
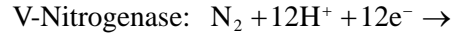
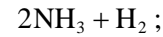
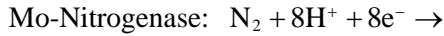
光发酵产氢的生物化学途径可以表示如下:



光合细菌铁氧还原蛋白(Ferredoxin)在细胞膜上存在固氮酶(Nitrogenase)的情况下作为电子传递体。

图 2 为光合细菌产氢机理。光合细菌光捕获

复合体上的细菌叶绿素 Bchl 和类胡萝卜素吸收光子后,其能量被送到光合反应中心(RC),从而产生一个高能电子,该电子在一系列电子传递体间循环传递的过程中产生一个质子梯度,ATP 酶利用该质子梯度所含的能量合成 ATP。光合细菌光合作用只提供 ATP,并不提供还原力,其还原力是由有机物经反向电子传递产生。紫色非硫细菌中与产氢有关的酶是固氮酶和氢化酶,其中固氮酶起主要作用,它不仅促使质子转化为氢气,同时也为紫色非硫细菌固氮,目前鉴定出的固氮酶共有 3 种,它们产氢的机制如下^[1]:



固氮酶催化产氢是不可逆过程,而且每产生 1 mol 氢气需要消耗 4 mol ATP ($2\text{H}^+ + 4\text{ATP} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 4\text{ADP} + 4\text{Pi}$),使得该过程效率较低。氢酶催化产氢的过程比较简单: $\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$,它在光合产氢条件下,吸收固氮酶在固氮过程中产生的氢气,回收固氮酶因放氢而消耗的能量,与固氮酶相比不起主要作用。

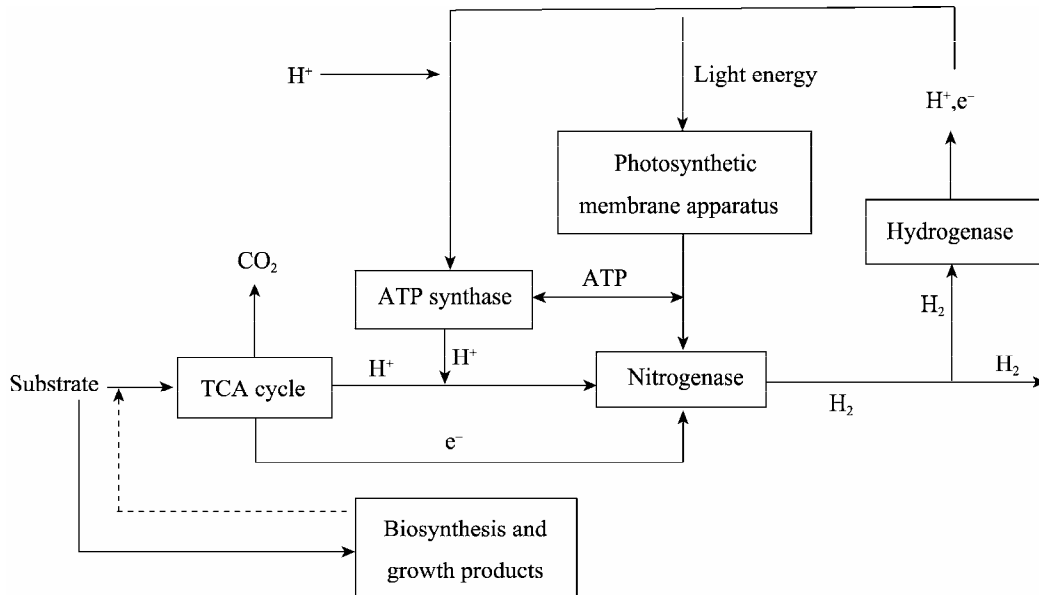


图 2 光合产氢机理^[18]

Fig. 2 The mechanism of photosynthetic hydrogen production^[18]

紫色非硫细菌用乙酸做底物时光发酵产氢如公式(2)^[19]所示,反应自由能为正值说明该反应非自发,需要外加能量才能进行,光合细菌恰好可以利用光照能量来实现此反应。



由公式(1)和(2)可以得到公式(3),从上述公式可知,假设葡萄糖暗发酵的产物仅为乙酸,那么暗发酵光发酵联合制氢的情况下,1 mol 葡萄糖的理论产氢量为 12 mol^[14,20]。然而实际产氢量远小于理论值,这是因为葡萄糖代谢后产物为混合挥发酸而且部分还要用于维持细胞生长代谢及 PHB

的合成^[21]; 实际总产氢量最少为 8 mol H₂/mol 葡萄糖才有经济价值^[20]。

2 暗发酵、光发酵产氢影响因素

2.1 暗发酵产氢影响因素

2.1.1 温度: 发酵产氢过程中, 温度可以直接对氢气的产量、产氢系统的稳定性产生影响。厌氧暗发酵产氢在中温(25 °C–40 °C)、高温(40 °C–65 °C)、超高温(>80 °C)的条件下都可以进行^[22]。中温发酵产氢比高温应用广泛, 因为中温更易实现且所需能量少; 然而有研究报道^[5], 高温条件下更利于产氢, 此时耗氢菌活性减弱, 产氢菌代谢速率加快。Kumar 等^[23]发现, 产氢菌 *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 的产氢率随着温度的上升而逐渐增高, 并在 36 °C 时达到最大值, 2.25 mol H₂/mol 葡萄糖。Fabian 等^[24]考察了温度对产氢率的影响, 研究中采用纯种产氢菌, 控制温度在 28 °C–46 °C 范围内, 产氢率在 40 °C 的条件下达到最大值, 随后产氢率下降。农作物废弃物常采用高温发酵, 因为高温时更利于其水解, 例如用草作为底物接种奶牛场发酵池微生物温度为 70 °C 时氢气产量最高为 16 mL H₂/g VS^[25]。虽然有部分学者在高温范围内也取得了较高的氢气产率, 但出于节能考虑现在的产氢研究大多采用中温方式, Li 等^[26]对比了 101 个发酵产氢的研究, 其中 73 个采用的是中温发酵。

2.1.2 pH: pH 是影响微生物生长和繁殖的一个重要因素, 微生物生长代谢过程中体内发生的生物化学反应是酶促反应, 而酶促反应需在合适的 pH 范围内才能进行; 此外, pH 还会影响细胞膜的渗透性、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, pH 对于厌氧暗发酵生物产氢来说也是至关重要的, pH 不仅会影响产氢量多少还会影响其代谢产物, 若是混合菌种发酵产

氢, pH 的变化还会导致优势菌种的变化。有文献认为^[27]厌氧发酵产氢时 pH 中性和偏酸性有利于产氢, 厨余垃圾产氢的适宜 pH 为 5.0–6.0, 农作物废物和动物粪便产氢时应维持中性。虽然文献普遍认为厌氧发酵产氢最佳 pH 范围在 6.0–7.0 之间, 但也有研究指出, 随着挥发酸的产生, 较低的 pH 不利于发酵产氢的进行, 初始 pH 碱性有利于发酵产氢。Lee 等^[28]在使用蔗糖发酵产氢时发现 pH 9.0 左右出现最大产氢率和产氢速率; 本课题组的研究^[29]则指出在恒定 pH 10.0 时最有利于产氢, 恒定 pH 10.0 比初始 10.0 时产氢量增加了 47.8%, 原因在于恒定 pH 10.0 时更有利于剩余污泥中有机物的水解, 从而使可利用的有机物量增加的同时又可以抑制同型产乙酸菌活性。

2.1.3 C/N 比: 厌氧暗发酵产氢过程中, 微生物是产氢的主体, 系统中产氢菌数量直接影响产氢的效率, 同时产氢细菌的生长状况和代谢水平也会决定系统的处理效果和产氢能力。C/N 比通过影响微生物的生长、酶活性水平、代谢途径、代谢产物的累积等从而影响微生物的产氢能力。若 C/N 比过高, 则反应体系含 N 量不足, 缓冲能力低, pH 容易降低; 若 C/N 比过低, 则反应体系含 N 量过高, 可能会导致 pH 上升以及有机物分解受到抑制。研究表明, 适宜的 COD/N 在 11.4:1–200:1 之间, COD/P 在 73:1–970:1 之间^[30]。一般污泥中组成微生物细胞的 C/N 比约为 5:1, 若再考虑到微生物生长时所需要消耗的碳源, 当反应体系中 C/N 比达到 10–20 时, 才能满足微生物生长的需要^[31]。有报道称城市生活垃圾厌氧消化过程中, 如果 C/N 比高于 30 会使得氮元素缺乏; 而 Lin 等^[32]的研究则表明当 C/N 比为 47:1 时产氢量达到 4.8 mol H₂/mol 蔗糖和 270 mmol H₂/(L·d), 这比对照组分别增加了 500% 和 80%, 合适的 C/N 比能通过改变产氢微生物的代谢途径提高产氢量, 从而得到较高的产氢效率。

2.1.4 金属离子: 在厌氧暗发酵产氢过程中, 金属离子也会影响产氢菌的生长。铁是氢化酶的重要组成成分之一, 氢化酶的活性随着铁的消耗而下降, 同时铁也是铁氧还蛋白的重要组成成分。但对于产氢最适 Fe^{2+} 浓度, 不同的学者有不同的结论, 这可能是由于接种微生物和底物的不同而引起的。Yang 等^[33]研究了不同 pH 和不同底物浓度条件下 Fe^{2+} 对产氢的影响, 研究发现 pH 7.0 和 Fe^{2+} 浓度为 150 mg/L 时产氢量最高, Fe^{2+} 浓度在 200–400 mg/L 之间对产氢无抑制作用; Lee 等^[34]研究发现 Fe^{2+} 浓度为 800 mg/L 时产氢量最高, 为 131.9 mL/g 蔗糖, Fe^{2+} 浓度分别为 3、200、3 000 mg/L 时, 蔗糖分别转化的乙酸(389.3 mg/g)、丙酸(37.8 mg/g)、丁酸(196.5 mg/g)最多。Yu 等^[35]研究了 Cr^{3+} 和 Cd^{2+} 对厌氧暗发酵产氢的影响, 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 VFAs、乙醇产量和酸化程度, 但对氢气和丙酸的累积不产生影响; Li 等^[36]报道了 6 种重金属离子对产氢的毒害程度为 $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Cd} > \text{Pb}$ (对产氢的半抑制浓度分别为 30 mg Cu/L、1 600 mg Ni/L、1 600 mg Zn/L、3 000 mg Cr/L、3 500 mg Cd/L 和 $>5\ 000$ mg Pb/L), 但 Lin 等^[37]利用混合菌种产氢的研究表明 3 种重金属对产氢的毒害程度是 $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Cr}$ (3 种金属对产氢的半抑制浓度分别为 4.5 mg Zn/L、6.5 mg Cu/L 和 60 mg Cr/L)。

2.2 光发酵产氢影响因素

2.2.1 光照: 光照强度、波长以及光-暗交替很大程度上会对光合细菌产氢量的高低造成影响。研究中常用的人工光源有: 荧光灯、卤素灯、光学纤维、霓虹灯管、发光二极管和光合有效辐射; 光发酵反应装置的光源也可以是单独的太阳光、太阳光与一种或几种人工光源共同结合。产氢基质和菌体会削弱光能在反应装置中的传递, 入射光

能量遵循 Beer-Lambert's 定律, 随着与光源的距离、培养基质中微生物浓度的增大而成对数降低。研究发现光发酵产氢适宜的波长范围是 400–1 000 nm^[18], 光照强度为 6 000–10 000 lux^[11]。Argun 等利用纯种 *Rhodobacter sphaeroides*-RV 对不同光源和光照强度进行研究, 采用卤素灯光强为 5 000 lux 时产氢速率和产氢量都达到最大^[21]。刘颖^[38]在研究丁酸梭菌与菌株 RLD119 两步法联合制氢过程中发现光照强度在 7 500 lux 以下时, 产氢量随着光照强度的增加而增加, 在光照强度 7 500 lux 时, 产氢量最大。在实验研究和实际应用中还需针对不同的光发酵细菌选择适合其产氢的光照强度和波长。

研究还发现采用光-暗交替循环的方式(光照 14 h 黑暗 10 h)比持续光照的产氢量要高, 可能是因为细菌浓度增大和光-暗交替有助于保持固氮酶的活性^[39]; 哈工大刘冰峰等将暗发酵和光发酵细菌按照一定的比例混合培养产氢最适宜光照强度为 10.25 W/m², 光照 16 h 黑暗 8 h 时光能转化率最高为 1.09%^[40]。光-暗交替与连续光照相比表现出的产氢优势表明日后室外光发酵产氢, 采用自然光源是有科学依据并且是切实可行的。

2.2.2 氨氮: 大量研究表明, 在利用光合细菌发酵产氢的过程中 NH_4^+ 过高会降低光合细菌的产氢能力。抑制的可能机理有: NH_4^+ 影响固氮酶的合成, 降低光合细菌的能量水平, 导致细胞内 ATP 和还原力水平的下降进而导致光合细菌产氢活性的降低。据文献报道当 NH_4^+ 浓度超过 28 mg/L 时便会影响光发酵产氢^[41], 本课题组用污泥发酵液光合产氢^[42], 发酵液中含有高浓度的 NH_4^+ (平均为 164 mg/L), 该条件下 7 d 和 10 d 的累积产氢量仅为 6.6 mL 和 7 mL; 而用鸟粪石法去除发酵液中的 NH_4^+ 后, NH_4^+ 剩余浓度约为 15 mg/L, 此时相同时间的累积产氢量大大提高,

分别为 94.8 mL 和 101.1 mL。Özgür 等指出为了不影响光合产氢菌的产氢能力, 厌氧暗发酵液 NH_4^+ 浓度应低于 1 mmol/L^[43], 有的文献甚至指出 NH_4^+ 浓度为 20 μmol 时就会对固氮酶活性产生抑制作用^[18]。Argun 等将 *Rhodobacter sphaeroides* 属的 RS-NRRL、RS-DSMZ 和 RS-RV 进行混合培养来利用富含 VFAs 的小麦发酵液产氢, 研究发现 TVFA 为 2 350 mg/L, NH_4^+ 浓度为 47 mg/L 时最有利于产氢, 高于该值则会产生抑制作用^[44]。不同研究得出的 NH_4^+ 抑制浓度不同, 这是因为不同菌种对 NH_4^+ 浓度的适应能力有差异, 因此在利用光合细菌产氢时应使 NH_4^+ 浓度保持在合理的范围内。

2.2.3 底物: 光发酵产氢细菌在厌氧条件下可以利用 VFAs 产氢, 同时也可以利用葡萄糖、蔗糖、琥珀酸盐等复杂的碳源产氢。底物浓度对光发酵产氢的影响也很大。浓度太低, 提供的有机物含量少, 细菌无法得到足够的营养, 生长缓慢甚至导致停止产氢代谢。相反, 如果底物浓度过高, 会提高细胞环境的渗透压或产生毒性, 同样损伤细胞, 抑制光合细菌的生长和产氢。研究发现, 选用菌种 *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 产氢时, 苹果酸是最适合的(pH 6.8)产氢底物^[39]。当利用挥发酸做底物产氢时, 适宜的 VFA 浓度为 1 800–2 500 mg/L^[45]。Belokopytov 等^[46]研究发现, 异丙酸盐和丁醇都会对光合细菌的产氢产生抑制, 异丙酸盐在浓度为 15 g/L 或丁醇 20 g/L 时产氢量会降低 50%, 而乙酸在 5–15 g/L 时产氢量受抑制程度很小。暗发酵阶段选用合适的有机废物, 其发酵副产物在应用于光发酵产氢前需根据不同的情况进行一定的处理, 如有的发酵液中挥发酸浓度过高则要将其稀释到有利于光合细菌产氢合理的浓度范围内。

2.2.4 金属元素: 金属元素对微生物的活性起着重要的作用, 尤其是作为金属酶的活性中心或辅

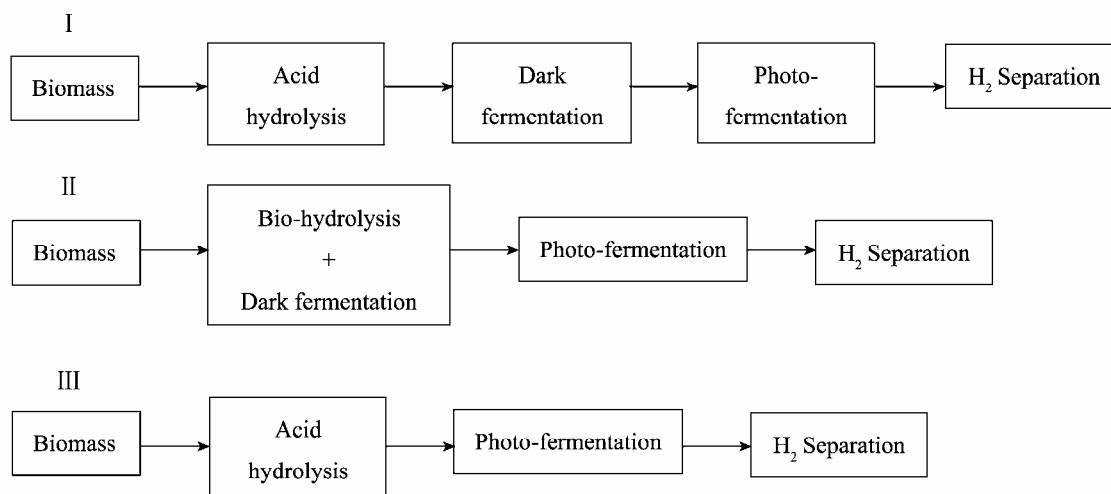
基的元素。哈工大刘冰峰等研究了 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 对光合细菌产氢的影响, 研究发现 Ni^{2+} 浓度在 0–4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 氢气的产量和产率随着 Ni^{2+} 浓度的增加而增加, 然后随着 Ni^{2+} 浓度进一步增加到 10 $\mu\text{mol/L}$ 而逐渐降低; Fe^{2+} 浓度 0–200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 80 $\mu\text{mol/L}$ 时产氢量最高, 高浓度的 Fe^{2+} 能够抑制光发酵产氢; Mg^{2+} 对产氢没有明显影响^[47]。Belokopytov 等也进行了金属元素对光合产氢影响的研究, 发现光合细菌产氢对 Zn^{2+} 的耐受能力较强, 10–50 mg/L 范围内对产氢量无明显影响, Fe^{2+} 浓度为 200 mg/L 时最有利于产氢, 50 mg/L 时产氢速率最高^[46]; 而 Cu^{2+} 在浓度很低时便会对光合产氢产生强烈的抑制作用^[45]。在利用光发酵产氢时金属离子浓度控制在合理范围内对产氢意义重大, 另外选择合适的(对产氢影响不大而对产甲烷抑制作用明显的)金属离子可以很好地解决非纯种情况下产甲烷菌与产氢菌的竞争问题, 例如使产氢基质中的 Zn^{2+} 浓度维持在 10 mg/L^[46]。

此外 pH 值、温度、培养时间长短、反应装置顶部气体、菌龄等也对光合细菌产氢有着重要影响。一般认为光合细菌产氢的最佳 pH 范围在 6.5–8.0 之间, 温度在 30 °C–35 °C 之间, 顶部空间用氩气吹扫去除空气, 氢气最高产率出现在光合细菌对数生长期。

3 暗发酵-光发酵两阶段联合产氢技术

3.1 暗发酵-光发酵两步法产氢

暗发酵产氢由于发酵产物中 VFAs 的积累会对产氢造成抑制, 所以产氢量较低; 然而紫色非硫细菌恰好具有利用 VFAs 产氢的能力, 因此可以用来稳定暗发酵液并进一步获得更多的氢气。当暗发酵和光发酵联合产氢时, 1 mol 葡萄糖理论最大产氢量为 12 mol H_2 (如公式 3 所示), 然而若将暗发酵液直接用于光发酵产氢也存在一些问题, 例如氨氮浓度高、挥发酸浓度高, 这就会使

图3 生物质暗发酵-光发酵两步法产氢^[2]Fig. 3 Bio-hydrogen production from biomass by sequential dark and photo-fermentation^[2]

得光发酵产氢效率降低,所以在将暗发酵液应用于光发酵产氢之前应采取合理的措施使上述两种物质的浓度保持在一定的浓度范围内(一般TVFA < 2500 mg/L, NH₄ < 40 mg/L, 随光合产氢菌种的不同而有所差异)。常用的暗发酵液预处理方法有稀释、氨氮去除、离心和灭菌等。

暗发酵-光发酵两阶段产氢的几种形式如图3所示,图中I为暗发酵前添加了酸化水解预处理的联合产氢,II为暗发酵与生物水解同时进行的两阶段产氢,生物质经酸化水解后也可直接用于光发酵产氢如III。暗发酵液在用于光发酵前进行预处理以及酸化水解后将溶液pH调节到合理的范围内都是很重要的。Lo等^[48]用酶对淀粉溶液进行水解预处理,产氢量得到显著提高,氢气产量为16.1 mmol H₂/g COD (3.09 mol H₂/mol 葡萄糖),COD去除率为54.3%。Fukushima等^[49]在利用秸秆发酵产氢时,由于其所含纤维素含量高,微生物难以利用,采用先碱液处理再用酶处理的方法,然后用光发酵和暗发酵两步法产氢,1000 kg 秸秆最终可以产生17.8 kg 的氢气,反应系统还添加了藻类固定二氧化碳装置,获得的藻类和剩余有机物一起用于产甲烷可获得138 kg

的甲烷,该技术路线不但降低了温室气体的排放还尽可能地回收了能量。Cheng等^[50]用稻草做底物两步法产氢时,对稻草进行微波和碱液预处理再用纤维素酶水解,暗发酵和光发酵总产氢量为463 mL H₂/g TVS,达到理论产氢量的43.2%。

有关暗发酵-光发酵两步法产氢的研究很多,选取其中有代表性的不同底物用于暗发酵光发酵两步法产氢的研究列于表1。产氢量最高的是Yokoi等^[51]用10 g/L 甘薯淀粉产氢,暗发酵-光发酵总产氢为7.2 mol H₂/mol 葡萄糖。在产氢底物的选择上葡萄糖、蔗糖、淀粉类成分较简单便于利用因而研究较多,剩余活性污泥中含有大量多糖、蛋白质及脂肪等可生物利用物质,虽然较难利用但是资源化前景意义重大,Jeong等^[52]和本课题组^[29,42]用剩余污泥做底物两阶段产氢都取得了一定成果,产氢量有待进一步提高。

两步法产氢时由于光发酵和暗发酵在不同的反应装置中进行,所以暗发酵和光发酵过程可以分别采用不同的工艺条件。常见的发酵产氢的工艺条件可以分为:序批式反应(Batch fermentation)、连续式反应(Continuous fermentation)、分

表 1 不同底物暗发酵-光发酵两步法产氢量比较

Table 1 Bio-hydrogen production from different substrates by sequential dark and photo fermentations

产氢底物 Substrate	暗发酵细菌 Dark fermentation microorganism	光发酵细菌 Photo fermenta- tion microor- ganism	暗发酵产氢量 Yield of dark fer- mentation (mol H ₂ /mol glucose)	光发酵产氢量 Yield of photofer- mentation (mol H ₂ /mol glucose)	参考文献 Reference
水解的木薯淀粉 Hydrolyzed cassava starch(25 g/L)	经预处理的活性污泥	<i>Rhodopseudom onas palustris</i>	2.00	0.86	[53]
木薯淀粉 Cassava starch (10.4 g/L)	厌氧混合菌种 (主要为梭菌属)	混合光合细菌 (主要为球形红 假单胞菌)	2.53	3.54	[54]
小麦粉溶液 Ground wheat solution (6.7 g starch/L)	厌氧污泥	<i>Rhodobacter sp. RV</i>	1.87	2.68	[21]
糖蜜废水 Sugar beet molasses (15 g sucrose/L)	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	<i>R.capsulatus</i> 的 突变体	2.10	4.75	[55]
蔗糖 Sucrose (17.81 g/L)	<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	<i>Rhodopseudom onas palustris</i> WP3-5	1.90	3.22	[20]
秸秆 Rice straw (50 g/L)	经预处理的活性污泥	<i>Rhodopseudom onas palustris</i>	155 mL H ₂ /g TVS	328 mL H ₂ /g TVS	[50]
剩余活性污泥 Waste activated sludge (17.4 g TCOD/L)	经预处理的活性污泥	<i>Rhodopseudom onas palustris</i>	0.87 mmol H ₂ /g 干污泥	1.01 mmol H ₂ /g 干污泥	[29,42]

批补料式反应(Fed-batch fermentation) 3 种形式。序批式反应是厌氧发酵产氢应用最广泛的工艺, 它的缺点是起始高底物浓度和发酵产物累积会对产氢过程产生抑制; 有关序批式反应的研究主要目的在于通过优化反应条件、底物和菌种的选择来增强产氢量。连续式反应在操作条件稳定时可以得到质量一致的产品, 然而反应受水力停留时间(或稀释比例)的影响; 缓慢添加产氢基质和连续去除发酵产物是应对底物以及产物抑制的有效措施, 目前分离发酵产物是解决挥发酸和乙醇对暗发酵产氢抑制的重要方法, 但是能同时解除 VFAs 和氢气对细菌抑制的有效方法还没有。分批补料工艺与序批式、连续式工艺相比最突出的优势在于微生物浓度高, 有利于克服高浓度底物和发酵产物的抑制, 目前该工艺在发酵产氢研

究中的应用较前两种工艺少。

采用两步法产氢, 产氢量明显高于单独的暗发酵产氢, 文献报道的暗发酵-光发酵两步法产氢量一般都在 5.0 mol H₂/mol 葡萄糖以上, 但是由于光发酵细菌产氢速率较慢, 使得两步法式产氢速率要低于单独暗发酵产氢速率, 在现有研究的基础上采取何种方式优化产氢条件, 从而进一步提高产氢量和产氢速率是暗发酵-光发酵两步法产氢进行实际应用前应该解决的重要问题。

3.2 暗发酵-光发酵细菌混合培养产氢

暗发酵细菌和光发酵细菌可以在同一反应装置中混合培养进行产氢, 暗发酵产氢的同时产生的 VFAs 再被光发酵细菌利用继续产氢, 这种产氢方式与两步法相比所需发酵时间短, 还可以降

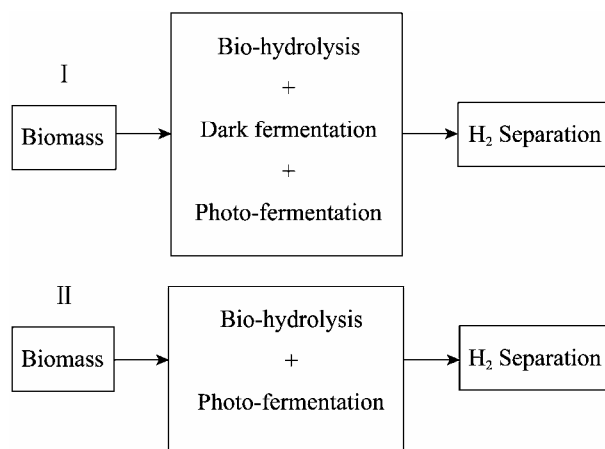


图4 生物质暗发酵-光发酵细菌混合培养产氢^[2]

Fig. 4 Bio-hydrogen production from biomass by combined dark and photo-fermentation^[2]

低溶液中 VFAs 积累对暗发酵产氢菌的抑制, 目前有关混合培养产氢的研究远远少于两步法产氢, 典型的混合培养产氢方案如图4所示。

暗发酵-光发酵细菌混合培养产氢也存在一些问题, 如光发酵细菌和暗发酵细菌所需的最适宜条件不同, 光发酵细菌的菌龄要长于暗发酵细菌, 暗发酵产生的有机酸使反应体系中的 pH 降低会对光发酵细菌的生长代谢产生抑制, 所以实现混合培养产氢要比两步法产氢难度大得多。现有的研究主要针对暗发酵-光发酵细菌比例、菌种的选择、底物浓度、光强等因素的优化。

本文针对有代表性的光发酵-暗发酵细菌混合培养产氢进行对比, 见表2。哈工大任南琪课题组对暗发酵-光发酵细菌混合培养产氢做了很多研究: (1) 将 *Clostridium Butyricum* 和固定化的 *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 混合培养, 底物为葡萄糖(6 g/L), 暗发酵/光发酵细菌比例为1:10, 光照强度为8 000 lux, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 起始 pH 7.5 的条件下获得的最大产氢量为4.134 mol H₂/mol 葡萄糖, 最大产氢速率为33.85 mL H₂/(L·h), 其中磷酸盐缓冲液浓度是影

响产氢量的最重要因素^[56]; (2) *Ethanoligenens harbinense* B49 和固定化的 *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53, 反应条件同(1)时最大产氢量和产氢速率分别为3.10 mol H₂/mol 葡萄糖和17.2 mmol H₂/(L·h)^[57]; (3) *Clostridium Butyricum* 和 *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 直接混合培养, 葡萄糖做单一底物研究了两种细菌的最佳产氢混合比例, 得出当前者与后者混合比例为1:600 时产氢量最大^[58]。Argun 等也对混合培养产氢做了大量研究: (1) *Clostridium beijerinckii* (DSMZ-791)和 *Rhodobacter sphaeroides*-RV 混合培养, 产氢底物为5 g/L 的淀粉溶液, HRT 6 d 时产氢量最大为90 mL H₂/g 淀粉, 为了获得高产氢量 HRT 应在5 d 以上^[59]; (2) 光源、光强、光照-黑暗交替时间对混合培养产氢的影响, 实验微生物采用热预处理过的厌氧污泥和 *Rhodobacter sphaeroides*-RV, 研究发现卤素灯、光强10 klux 时产氢量最高为139 mL H₂/g 淀粉, 持续光照情况下累积产氢量较高; (3) 底物浓度和细菌浓度对产氢的影响, 淀粉浓度为20 g/L 时累积产氢量和产氢速率最大, 但是淀粉浓度为2.5 g/L 时每克淀粉产氢量最大, 细菌浓度为1.1 g/L 时最有利于产氢^[60]。Ozmihci 等^[61]研究了分批补料工艺条件下, 淀粉负荷对热预处理厌氧污泥与 *Rhodobacter sphaeroides*-NRRL 混合培养产氢的影响, 初始底物淀粉浓度为10 g/L, 暗发酵-光发酵细菌比例为1:2, 淀粉负荷为80.4 mg 淀粉/h 条件下氢气累积量(3460 mL)、产氢量(201 mL H₂/g 淀粉)、产氢速率(18.1 mL/h) 都达到最大, 反应开始暗发酵细菌很快完成产氢过程而光发酵细菌的产氢则要滞后一段时间。

综合相关文献可知, 暗发酵-光发酵细菌混合培养产氢时应使暗发酵和光发酵细菌保持一定的比例, 这样更利于光发酵细菌尽快利用暗发

表 2 不同底物暗发酵-光发酵混合培养产氢量比较
Table 2 Bio-hydrogen production from different substrates by combined dark and photo fermentations

接种细菌 Inoculum cultures	产氢底物 Substrate	光源 Light source	光强 Light intensity	产氢量 Yield of dark fermentation (mol H ₂ mol/glucose)	参考文献 Reference
Anaerobic sludge and mixed photosynthetic bacteria [<i>Rhodobacter</i> sp. (NRRL B-1727), <i>Rhodobacter</i> sp. (DSMZ-158), <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (DSMZ-127), <i>Rhodobacter</i> sp. RV]	小麦淀粉 (4.1 g/L)	荧光灯	9.5 klux	1.16	[62]
Anaerobic sludge and <i>Rhodobacter</i> sp. RV	小麦淀粉 (4.3 g/L)	卤素灯	270 W/m ²	1.45	[63]
<i>Clostridium butyricum</i> and <i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	葡萄糖 (6.0 g/L)	白炽灯	8 klux	4.13	[56]
<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49 and <i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	葡萄糖 (6.0 g/L)	白炽灯	4 klux	3.1	[57]
Anaerobic sludge and <i>Rhodobacter</i> sp. (NRRL B-1727)	小麦粉 (10.0 g/L)	荧光灯	4 klux	1.32	[61]
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702 and <i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM 158	葡萄糖 (5.0 g/L)	钨灯	135 W/m ²	0.86	[64]

酵产生的挥发酸从而使 pH 不会降低过快且降低产物抑制; 反应体系中加入 pH 缓冲溶液有助于产氢量的提高; 光合细菌固定有利于其维持稳定, 但是固定了的光合细菌对光能的吸收减弱; 两阶段产氢底物浓度应控制在合适的浓度范围内; 采用连续式工艺时 HRT 是影响产氢的一个重要条件。

4 两阶段制氢技术面临的挑战

暗发酵-光发酵两阶段制氢是一项重要的资源化生产技术, 能有效地将有机废物转化为氢气, 比传统的单一暗发酵产氢更高效, 剩余发酵产物中有机物含量更低。暗发酵-光发酵细菌混合培养产氢与两步法产氢相比具有操作简单, 所需发酵容器体积小的优点; 但是由于混合培养时暗发酵光发酵之间有一段延滞期、暗发酵光发酵细菌在同一系统中相互作用存在一

定的竞争且各自需要的营养物质不同, 也会导致产氢量和产氢能力低于暗发酵-光发酵两步法产氢。

目前将两阶段产氢技术用于实际生产的实例尚未见报道, 这是因为两阶段产氢技术还存在以下问题: 产氢效率较低, 较理论产氢量 12 mol H₂/mol 葡萄糖还有很大的差距, 报道的最大产氢量为 7.2 mol H₂/mol 葡萄糖; 光合细菌要求的光照强度大, 户外生产实现困难; 光强利用率低, 经济效益低; 纯种微生物在实际生产中操作难度较大; 另外, 利用废弃生物质做产氢底物时, 生物质本身的性质以及其所含有的杂质等都会对两阶段产氢微生物产生不确定的影响。如何及时消除不利影响并控制反应系统稳定, 使产氢微生物持续高效产氢都是亟待解决的问题。因此, 在将两阶段产氢技术进行实际应用前还有很多研究工作需要开展。

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 Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(1): 31–42.
- [2] Argun H, Kargi F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(13): 7443–7459.
- [3] Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001, 26(1): 13–28.
- [4] Xu JF, Ren NQ, Wang AJ, et al. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(24): 13467–13474.
- [5] Karadag D. Anaerobic H₂ production at elevated temperature (60°C) by enriched mixed consortia from mesophilic sources[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(1): 458–465.
- [6] Hniman A, O-Thong S, Prasertsan P. Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(14): 8785–8793.
- [7] Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo HM. Hydrogen production by fermentative consortia[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009, 13(5): 1000–1013.
- [8] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34(5): 2195–2200.
- [9] Trohalaki S, Pachter R. The effects of the dimethylether bridging moiety in the H-cluster of the *Clostridium pasteurianum* hydrogenase on the mechanism of H₂ production: a quantum mechanics/molecular mechanics study[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(24): 13179–13185.
- [10] Nicolet Y, Fontecilla-Camps JC, Fontecave M. Maturation of [FeFe]-hydrogenases: structures and mechanisms[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(19): 10750–10760.
- [11] Ren NQ, Wang BZ, Huang JC. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, 54(5): 428–433.
- [12] 刘冰峰. 光发酵细菌的选育及其与暗发酵细菌耦合产氢研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2010.
- [13] Gómez X, Fernández C, Fierro J, et al. Hydrogen production: two stage processes for waste degradation[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(18): 8621–8627.
- [14] Ozmihci S, Kargi F. Bio-hydrogen production by photo-fermentation of dark fermentation effluent with intermittent feeding and effluent removal[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(13): 6674–6680.
- [15] Luo G, Xie L, Zou ZH, et al. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR)[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(21): 11733–11737.
- [16] Jeong TY, Cha GC, Yeom SH, et al. Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2008, 14(3): 333–337.
- [17] Li X, Wang YH, Zhang SL, et al. Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 using a novel strategy-shaking and extra-light supplementation approach[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34(24): 9677–9685.
- [18] Koku H, Eroğlu I, Gündüz U, et al. Aspects of the

- metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27(11/12): 1315–1329.
- [19] Uyar B, Eroglu I, Yücel M, et al. Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(10): 4517–4523.
- [20] Chen CY, Yeh KL, Lo YC, et al. Engineering strategies for the enhanced photo-H₂ production using effluents of dark fermentation processes as substrate[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(24): 13356–13364.
- [21] Argun H, Kargi F. Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: effects of light source and light intensity[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(4): 1595–1603.
- [22] Levin DB, Chahine R. Challenges for renewable hydrogen production from biomass[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(10): 4962–4969.
- [23] Kumar N, Das D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 29(4/5): 280–287.
- [24] Fabiano B, Perego P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27(2): 149–156.
- [25] Pakarinen O, Lehtomäki A, Rintala J. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: the effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(2): 594–601.
- [26] Li CL, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2007, 37(1): 1–39.
- [27] Guo XM, Trably E, Latrille E, et al. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(19): 10660–10673.
- [28] Lee YJ, Miyahara T, Noike T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2002, 77(6): 694–698.
- [29] Zhao YX, Chen YG, Zhang D, et al. Waste activated sludge fermentation for hydrogen production enhanced by anaerobic process improvement and acetobacteria inhibition: the role of fermentation pH[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 44(9): 3317–3323.
- [30] Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, et al. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32(2): 172–184.
- [31] Sosnowski P, Wiczorek A, Ledakowicz S. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes[J]. Advances in Environmental Research, 2003, 7(3): 609–616.
- [32] Lin CY, Lay CH. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2004, 29(1): 41–45.
- [33] Yang HJ, Shen JQ. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(15): 2137–2146.
- [34] Lee YJ, Miyahara T, Noike T. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation[J]. Bioresource Technology, 2001, 80(3): 227–231.
- [35] Yu HQ, Fang HHP. Inhibition by chromium and cadmium of anaerobic acidogenesis[J]. Water Science and Technology, 2001, 43(11): 267–274.
- [36] Li CL, Fang HHP. Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge[J]. Chemosphere, 2007, 67(4): 668–673.
- [37] Lin CY, Shei SH. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(2): 587–593.
- [38] 刘颖. 暗发酵细菌与光发酵细菌两步法联合产氢

- 研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士毕业论文, 2007.
- [39] Koku H, Eroğlu I, Gündüz U, et al. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* OU 001[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2003, 28(4): 381–388.
- [40] Liu BF, Ren NQ, Xie GJ, et al. Enhanced bio-hydrogen production by the combination of dark- and photo-fermentation in batch culture[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(14): 5325–5329.
- [41] Zheng GH, Wang L, Kang ZH. Feasibility of biohydrogen production from tofu wastewater with glutamine auxotrophic mutant of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Renewable Energy, 2010, 35(12): 2910–2913.
- [42] Zhao YX, Chen YG. Nano-TiO₂ enhanced photofermentative hydrogen produced from the dark fermentation liquid of waste activated sludge[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(19): 8589–8595.
- [43] Özgür E, Afsar N, de Vrije T, et al. Potential use of thermophilic dark fermentation effluents in photofermentative hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*[J]. Journal of Cleaner Production, 2010, 18(Suppl 1): S23–S28.
- [44] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter* species at different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(24): 7405–7412.
- [45] Laurinavichene TV, Tekucheva DN, Laurinavichius KS, et al. Towards the integration of dark and photo fermentative waste treatment. 1. Hydrogen photoproduction by purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* using potential products of starch fermentation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(23): 7020–7026.
- [46] Belokopytov BF, Laurinavichius KS, Laurinavichene TV, et al. Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 2. Optimization of starch-dependent fermentative hydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(8): 3324–3332.
- [47] Liu BF, Ren NQ, Ding J, et al. The effect of Ni²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(2): 721–726.
- [48] Lo YC, Chen SD, Chen CY, et al. Combining enzymatic hydrolysis and dark-photo fermentation processes for hydrogen production from starch feedstock: a feasibility study[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(19): 5224–5233.
- [49] Fukushima Y, Huang YJ, Chen JW, et al. Material and energy balances of an integrated biological hydrogen production and purification system and their implications for its potential to reduce greenhouse gas emissions[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(18): 8550–8556.
- [50] Cheng J, Su HB, Zhou JH, et al. Microwave-assisted alkali pretreatment of rice straw to promote enzymatic hydrolysis and hydrogen production in dark- and photo-fermentation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(3): 2093–2101.
- [51] Yokoi H, Maki R, Hirose J, et al. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes[J]. Biomass and Bioenergy, 2002, 22(5): 389–395.
- [52] Jeong TY, Cha GC, Yoo IK, et al. Hydrogen production from waste activated sludge by using separation membrane acid fermentation reactor and photosynthetic reactor[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2007, 32(5): 525–530.
- [53] Su HB, Cheng J, Zhou JH, et al. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(4): 1780–1786.
- [54] Cheng J, Su HB, Zhou JH, et al. Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photo fermentation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(1): 450–457.
- [55] Özgür E, Mars AE, Peksel B, et al. Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark

- and photofermentation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(2): 511–517.
- [56] Ding J, Liu BF, Ren NQ, et al. Hydrogen production from glucose by co-culture of *Clostridium Butyricum* and immobilized *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(9): 3647–3652.
- [57] Xie GJ, Feng LB, Ren NQ, et al. Control strategies for hydrogen production through co-culture of *Ethanoligenens harbinense* B49 and immobilized *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(5): 1929–1935.
- [58] Liu BF, Ren NQ, Tang J, et al. Bio-hydrogen production by mixed culture of photo- and dark-fermentation bacteria[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(7): 2858–2862.
- [59] Argun H, Kargi F. Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreactor[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(12): 6170–6178.
- [60] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(15): 6181–6188.
- [61] Ozmihci S, Kargi F. Effects of starch loading rate on performance of combined fed-batch fermentation of ground wheat for bio-hydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(3): 1106–1111.
- [62] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(10): 4305–4311.
- [63] Argun H, Kargi F. Effects of light source, intensity and lighting regime on bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and photo-fermentations[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(4): 1604–1612.
- [64] Fang HHP, Zhu HG, Zhang T. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(15): 2223–2230.

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。