

生物产氢技术研究进展

朱核光^{1*} 史家樑²

(¹ 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

(² 华东师范大学环境科学与技术系 上海 200062)

关键词 微生物; 厌氧光营养细菌; 产氢(图1表1参75)

CLC Q936 : 0613.2

PROGRESS OF BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION

ZHU Huguang^{1*} & SHI Jialiang²

(¹ National Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

(² Dept. of Environmental Science and Technology, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Hydrogen is noted widely because it is a clean energy. Many countries in the world are studying and developing new methods for hydrogen production. Biological hydrogen production is one of such new methods with the advantages of utilizing renewable energy and wastes, and of low cost. In this paper, the characteristics of 5 modes of biological hydrogen production were summarized and compared according to hydrogen metabolic energetic. Furthermore, the molecular mechanism of biological hydrogen production by anoxygenic phototrophic bacteria was described. Finally, the newest progress of hydrogen production by anoxygenic phototrophic bacteria in the aspects of electronic donor, coupling to light energy, inhibition of ammonium, and genetic manipulation and exploiting of application system was reviewed. Fig 1, Tab 1, Ref 75

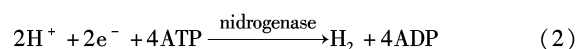
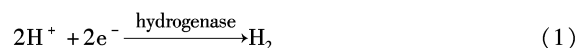
Keywords microorganism; anoxygenic phototrophic bacteria; hydrogen production

CLC Q936 : 0613.2

由于矿物资源的日益枯竭,寻找清洁的替代能源已成为一项迫切的课题.氢被普遍认为是一种最有吸引力的替代能源.这是因为氢是宇宙间最简单同时也是最为丰富的元素,它的热值高达118.4 kJ/g,是甲烷的2.3倍;氢又是一种十分清洁的能源,它燃烧后只生成水;氢还能够比较容易地储存在一些特殊的金属间化合物或纳米非金属材料中,并能快速释放,这样,在运输和使用上比较方便.氢除了作为优异的能源外,它还是一种工业上必不可少的原材料^[1].然而,氢气在地球表面的浓度小于1 mg/L,仅占地球表面大气的极小部分.在自然界中大部分的氢是以化合态存在的,因此,它的生产就需要从别的化合物中分解获得.传统的化学产氢方法采用电解水或热解石油、天然气,这些方法需要消耗大量的电力或矿物资源,生产成本也普遍较高.因此,新的产氢方法,特别是那些能利用可再生能源,进行废物利用,低成本,大量生产的产氢方法倍受注目.生物产氢技术便是一项具有这样一些特征的新技术.围绕着生物产氢,国际上已经开展了大量的基础性研究,积累了大量的研究成果,这为生物产氢技术的实用化奠定了基础.有关生物产氢的研究国际上已有少量综述文章发表^[2~13].本文首先对生物产氢研究作一简要概括,然后,着重介绍厌氧光营养细菌(原称为光合细菌)产氢研究的最新动态.

1 生物产氢的基本模型

生物产氢的现象是由 Nakamura 于 1937 年最早报道的.到目前为止,已报道的能进行生物产氢的微生物可归纳为 5 种,分别是异养型厌氧细菌、固氮菌、真核藻类、蓝细菌和厌氧光营养细菌,它们代表了 5 种不同类型的产氢模型(表1).氢酶和固氮酶是催化产氢反应的两个关键性酶,然而这两个酶均不是专一性产氢酶.氢酶有三种不同形态,即氢酶、吸氢酶和可逆氢酶.由于这三种形态的氢酶往往同时存在,因此,氢酶除了在有足够还原力时催化产氢外,还催化作为一种能量回收机制的吸氢反应.固氮酶的主要功能是催化固氮反应,只有当缺乏基质(分子氮)的时候才催化产氢反应.这两种酶不仅在不同的微生物中具有不同的功能,即使在同一种微生物中不同的氧化还原条件下也起不同的作用.另外,氢酶催化的产氢反应无需 ATP,而固氮酶催化的产氢反应则需要 ATP.这两种酶所催化的产氢反应可用以下方程来表示:



正如在表1中所列,异养型厌氧菌产氢是受氢酶催化,固氮酶不在该类菌内存在.氢酶作为在发酵中所产生的还原物的最终电子受体而起作用.例如,丁酸梭菌(*Clustidium butyricum*)从葡萄糖的产氢过程是这样的:首先,1 mol 葡萄糖通过EMP

收稿日期: 2000-12-07 接受日期: 2001-01-11

* 通讯作者 Corresponding author

表 1 生物产氢的不同模型
Tab 1 Different modes of biological hydrogen production

微生物种类 Microorganism	产氢酶 Enzyme	对光的需求 Light demand	抑制物 Inhibitor	电子供体 Electron donor	代表性种 Representative species
异养型厌氧菌 Heterotrophic anaerobic bacteria	氢酶 Hydrogenase	不需 No need	CO ₂	还原性有机物 Reductive organic substances	<i>Escherichia coli</i> , <i>Methanobacterium</i> sp. <i>Clostridium butyricum</i>
固氮菌 No photosynthetic nitrogen fixing bacteria	固氮酶 Nitrogenase	不需 No need	O ₂ , N ₂ , NH ₄ ⁺	还原性有机物 Reductive organic substances	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Rhizobium japonicum</i> <i>Desulfovibrio</i> sp.
真核藻类 Algae	氢酶 Hydrogenase	需要, 但 < 500 lx Need, but less than 500 lx	CO ₂	水 Water	Green algae: <i>Chlamydimonas reinhardtii</i> , <i>Chlamydomonas moewusii</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Ulva lactuca</i> Red algae: <i>Porphyra umbilicalis</i> , <i>Porphyridium cruentum</i> , Brown algae: <i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Anabaena cylindrica</i> , <i>Oscillatoria limnetica</i> <i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Synechocystis</i> sp. <i>Nostoc muscorum</i> , <i>Gleothoece</i> sp. <i>Plectonema boryanum</i>
蓝细菌 Cyanobacteria	固氮酶 Nitrogenase	需要 Need	O ₂ , N ₂ , NH ₄ ⁺	水 Water	
厌氧光营养菌 Anoxygenic phototrophic bacteria	固氮酶 Nitrogenase	需要 Need	O ₂ , N ₂ , NH ₄ ⁺	还原性有机物 Reductive organic substances	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Rhodospirillum vannielii</i> , <i>Cheomatum vinosum</i> <i>Thicapsa roseopersicina</i> , <i>Chlorobium thiosulfatophilum</i> <i>Rhodopeudomonas palustris</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i>

途径发酵形成 2 mol 丙酮酸、2 mol ATP 和 2 mol NADPH;其次,丙酮酸通过丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶被氧化成乙酰辅酶 A、CO₂ 和还原性铁氧还蛋白,或者通过丙酮酸甲酸裂解酶而分解成乙酰辅酶 A 和甲酸。所生成的甲酸再次被氧化成 CO₂,并使铁氧还蛋白还原。最后,还原性铁氧还蛋白还原氢酶,所形成的还原性氢酶当质子存在时便使质子还原生成氢气^[14]。在这类细菌中,氢酶在寄主得不到足够的能量时便在吸氢的方向上起作用。这种吸氢作用会对产氢反应造成反馈压力并影响产氢速率和产率。我国研究者在利用这类细菌进行有机废水产氢的研究中发现了乙醇型产氢途径,在这一产氢途径中,终端产物除了乙酸外,还有乙醇^[15,16]。

固氮菌是另一类异养菌。由于存在固氮酶,其产氢反应主要受固氮酶催化。尽管氢酶在这类细菌中也存在,但其作用主要在吸氢方向。由于这类菌没有光合成器官,固氮酶催化的产氢反应所需的 ATP 只能来源于有机化合物的氧化。由于从有机物中氧化获得 ATP 的能力较低,这类菌的产氢速率通常也较低。

真核藻类的产氢反应受氢酶催化。在这类微生物中尚未检测到固氮酶活性。因为藻类具有光合系统 I 和光合系统 II,因此它们能利用水作为电子和质子的原始供体,这也是藻类产氢的魅力所在。藻类产氢的最大缺陷是在产氢的同时氧气也被产生,而氧气除了能与氢气反应生成水外,还是氢酶活性的抑制剂,从而影响到产氢速率。而且当光强足够大时 ($E > 500 \text{ lx}$),藻类主要营 CO₂ 吸收并合成所需的有机物质。因此,藻类的产氢是不稳定的并且极易被其副产品氧气所抑制。

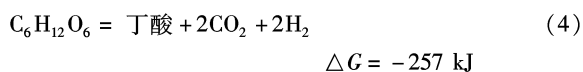
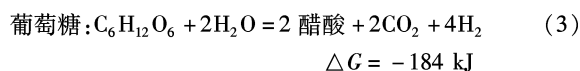
蓝细菌同时具有固氮酶和氢酶。它的产氢主要是由固氮酶中介的,氢酶主要是在吸氢方向上起作用。由氢酶催化的暗发酵产氢在某些种类中被发现,但产氢的速率相对光驱动产氢速率来说要低得多。蓝细菌也具有光合系统 I 和 II,水能被利用来作为最终电子供体。因此,和藻类相似,蓝细菌产氢所需的质子和电子也可来源于水的裂解,产氢的过程同时也是产氧的过程。氧气除了会和氢反应生成水外,也是固氮酶的抑制剂。但是蓝细菌的许多种已经进化了一种被称之为异质体 (heterocyst) 的特殊构造。在异质体内,光合系统 II 失去了裂解水的功能,而外界的氧气能被挡在外面,由相邻的植物型细胞所产生的还原物则能够进入,从而使得产氢能够得以正常进行。

厌氧光营养细菌的产氢主要也是固氮酶的功能。尽管氢酶也存在于这类细菌中,但和固氮菌及蓝细菌一样,主要在吸氢方向上起作用。产氢依赖光照。由氢酶催化的暗发酵产氢仅仅在 *Rhodospirillum rubrum* 中被发现,而且相比在明反应中所得到的速率要小得多^[13]。由于厌氧光营养细菌仅仅有光合系统 I 而没有光合系统 II,所以,它们不能像植物一样能利用水作为电子供体,在产氢时需要有机物作为电子供体。我国研究者也已分离到了属 *Rhodopseudomonas* 和 *Rhodobacter* 的高效产氢菌株^[17]。

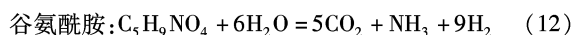
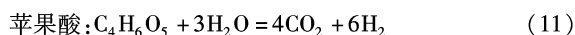
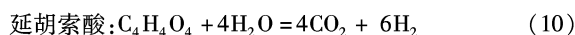
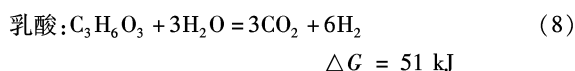
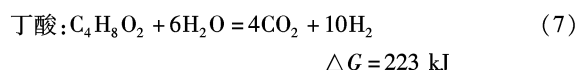
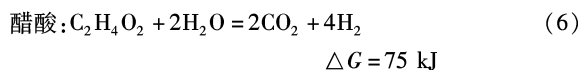
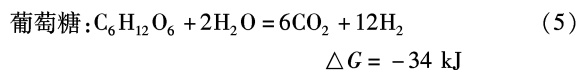
2 产氢能力学

某些典型的有机物的产氢方程及其某些反应的吉布斯自由能变化 (ΔG) 表示如下:

暗条件下厌氧菌产氢



光照条件下的厌氧光营养细菌



在能力学上,异养型厌氧菌产氢是十分有利的,它们能从产氢反应中获得比厌氧光营养菌更多的自由能,而且,由氢酶催化的产氢反应不需 ATP. 然而,它们分解有机物的不彻底性及分解速率的缓慢,影响其产氢的速率及产率. 它们从 1 mol 葡萄糖理论上只能产生 2 ~ 4 mol 氢气(方程 3、4). 不过,Woodward 等最近报道氧化性戊糖循环中的酶与另一种能利用 NADP^+ 作为电子载体的氢酶组成的离体培养系统从 1 mol 葡萄糖能获得 11.6 mol 氢气^[18],但这样的产氢系统是否在体内存在则有待证明.

厌氧光营养细菌每 mol 葡萄糖能产生 12 mol 的氢气(方程 12),在能力学上,厌氧光营养菌只能从产氢反应中获得少量的自由能甚至要付出大量的自由能. 另外,厌氧光营养菌受固氮

酶催化,每生成 1 mol 氢气需要 4 mol ATP. 然而,该菌能通过光合磷酸化获得足够的 ATP,因此,产氢反应能有效地进行.

由于固氮菌产氢也受固氮酶催化,产生 1 mol 氢气需要 4 mol ATP. 然而,这些菌没有光合成系统,它们不得不依靠分解有机物来获得 ATP. 而低的 ATP 产率限制了其氢气的生产. 例如,在 *Klebsiella* 这样的微生物中,每 mol 葡萄糖只能生成 2 mol ATP^[8],因而,从理论上,每 mol 葡萄糖只能生成 0.5 mol 的氢气.

在产氢能力学上,真核藻类大致和厌氧菌相似,蓝细菌则大致和厌氧光营养菌相似,但由于藻类的产氢受氢酶中介以及氧气的同时产生,而蓝细菌的产氢主要依赖于部分异质体,因此,它们的产氢系统不很稳定,在能力学上不十分有利.

3 厌氧光营养细菌产氢的原理

在不同的产氢模型中厌氧光营养细菌具有较高的产氢速率并且能整合废水处理又能利用太阳能,因此最有可能在不久的将来获得实用化. 因此,以下着重介绍该类细菌的产氢原理和国际上的研究进展.

按照表型,可以把厌氧光营养细菌分为绿硫细菌(*Chlorobiaceae*),绿色非硫细菌,红色硫细菌(*Chromatiaceae*)和红色非硫细菌(*Rhodospirillaceae*)及螺旋菌 5 类^[19]. 红色非硫细菌中的 *Rhodobacter capsulata* 和 *Rhodobacter sphaeroides* 是两种研究得最多的细菌,它们的产氢机制可用图 1 来表示.

外源性有机物通过 EMP、TCA 循环生成 ATP、质子、 CO_2 以及像琥珀酸一类的电子供体. 电子供体将电子传递给胞内的电子传递链,低能态的电子在光反应中心受到光的激发生成高能态的电子. 高能态的电子一部分离开电子传递链被传给铁氧还蛋白,铁氧还蛋白则又将电子传给固氮酶. 另一部分的电子则在电子传递链内传递,并生成 ATP. 固氮酶则利用 ATP、质子和电子生产氢气. 氢酶则主要起吸氢作用,以回收部分能量. 在铵

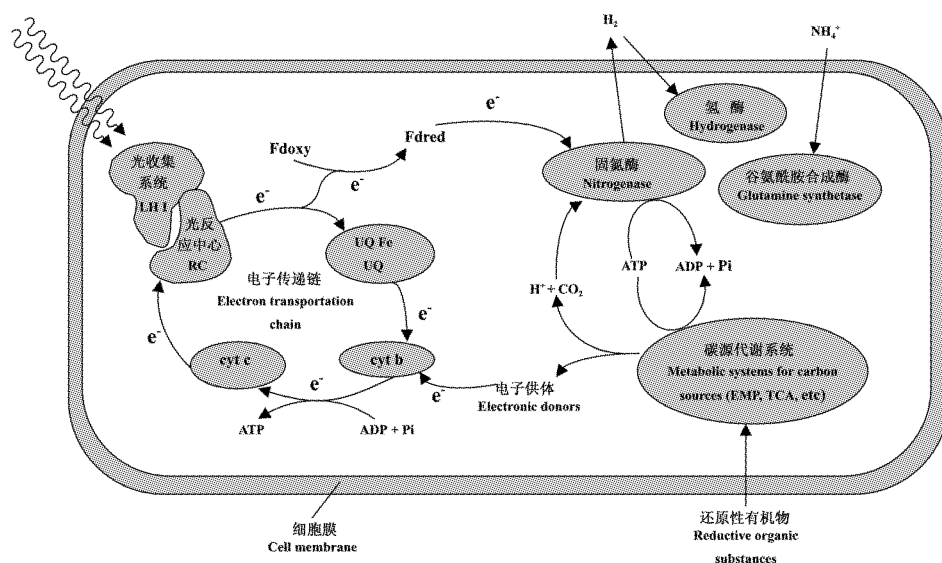


图 1 厌氧光营养菌产氢机制示意图

Fig 1 The mechanism of biological hydrogen production by anoxygenic phototrophic bacteria

离子存在下,谷氨酰胺合成酶大量表达,谷氨酰胺合成酶以某种尚不清楚的机制抑制固氮酶的合成,从而抑制产氢。

4 厌氧光营养细菌产氢研究的动向

4.1 电子供体

不象蓝细菌和真核藻类,厌氧光营养细菌没有光合成系统 II,因此,它们不能利用水作为电子供体,需要还原势能低于水的电子供体。

厌氧光营养细菌是一类在形态、生理等方面极端多样化的真细菌^[19]。它们的碳源代谢多样性不仅仅表现在这类细菌的不同种上,而且表现在于不同条件下生长的单一的种。尽管它们倾向于在厌氧光照条件下利用各种有机物进行光异养生长,但它们中的许多种被发现在光自养、化能矿石营养及化能异养下也能生长。厌氧光营养细菌能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、核糖、甘露醇、山梨醇、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、丙酸及二氧化碳(需加氢)作为碳源进行生长^[20]。它们普遍还能利用某些醇类物质、氨基酸作为碳源生长。某些种类还被发现能分解芳香族化合物^[21]。一般来说,碳源代谢的高多样性也意味着产氢所能利用的原始电子供体的多样性,这对考虑从有机废水进行产氢是十分有利的。但对个别的碳源来说,在作生长代谢的碳源和作产氢的电子供体时不一定一致,这就给评价个别碳源的产氢利用性上带来困难。例如,尽管乙酸是一种很好的生长用碳源,但它是不是产氢的很好的电子受体,则存在着不同的意见[个人通讯]。刘双江等的研究支持乙酸不是好的产氢电子供体^[22]。碳源利用性的检验是用这类菌进行产氢研究的一项基本工作。

4.2 与光能利用的耦联

厌氧光营养细菌最引人注目的特性就是它们能在细菌叶绿素的作用下进行厌氧光合作用。它们的光合作用也受到氧气的伤害,这是由于光合成色素的合成受到氧的抑制^[19]。每产生 1 mol 的 ATP 需要多少当量的光尚不清楚。厌氧光营养细菌的产氢是和光能的利用相耦联的,从明条件转换到暗条件,它们的产氢很快停止或仅维持在很低的速率上。记录到的光能转换效率已达到了 7.9%^[7,23]。产氢速率随着光强度的增加而增加,但是,相应的光能转化效率则随着光强的增加而降低^[23~26]。

4.3 氨的抑制

厌氧光营养细菌的产氢随着铵离子投入而立刻受到抑制,这种抑制会随着铵离子的去除而去除^[21,28]。利用谷氨酸钠作为氮源,氢气能够被持续有效地释放^[29,30]。铵离子的抑制作用发生在两个层面上。首先,铵离子通过对氮代谢中起重要作用的谷氨酰胺合成酶的激发而抑制固氮酶的合成^[31~39],谷氨酰胺营养缺损型变异株即使在有铵离子存在下也不受到抑制^[40~42]。也有一些研究人员认为是谷氨酰胺而不是谷氨酰胺合成酶直接参与了固氮酶的调节^[43,44]。第二种形式的铵离子的抑制作用发生在酶水平上,它通过某种还不知道的机制对已合成固氮酶进行快速调节^[2]。低至 10 $\mu\text{mol/L}$ 的铵离子浓度也会对产氢细菌造成明显毒害^[45]。然而,铵离子是这类菌异养

生长的典型的氮源,即使在有其它氮源存在下也会被优先利用掉。因此,为了增加细菌的代谢活力,少量的加入铵离子甚至会提高最终的总产氢量^[46,47]。

4.4 基因操作

为了获得高效的光能转化效率,用基因操作的手段改变细菌方面已有许多报道。Vasilyeva 等从 *Rhodobacter sphaeroides* 分离到了光捕捉收集系统重新排列了的变异株,其能量转化效率有了大大的提高^[48]。从 *Rhodobacter capsulata* 和 *Rhodospirillum rubrum* 已分离到了去吸氢酶活性的变异株,产氢活性得以大大提高^[49~51]。在铵离子存在下也能产氢即去铵离子抑制的变异株也从 *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospseudomonas capsulata* 和 *Rhodospirillum rubrum* 分离到^[42,43]。加拿大蒙特利尔大学的 Hellenbeck 正在分离不能向胞内传输 NH_4^+ 的变异株,这样,在 NH_4^+ 存在下产氢活性的恢复就有望在 NH_4^+ 的代谢系统不受改变的前提下进行[个人通讯]。

4.5 实用系统的开发

细菌的固定化广泛受到注目是因为它为微生物提供了一种相对隔离的生长环境,并且,可以省去菌液分离或酶分离的步骤。Mitsui 等报道了用琼脂包埋的海洋光合成细菌产氢时可免受氧的抑制,在曝气 5 h 后,细菌仍保持了 95% 的原始产氢活性^[52]。包埋在其它包埋剂如角叉菜胶^[53,54],海藻酸钠^[55,56]和基于异丁烯酸和丙烯酸乳化的胶体^[57]等的厌氧光营养菌的产氢也已有报道。Tsygankov 等成功地地将 *Rhodobacter sphaeroides* 固定在涂有多孔硅胶并用阳性的硅烷剂处理过的玻璃表面上^[58],这一技术如被用于光合成氢气的生产上能减少由于固定化载体的遮隔所造成的光能量的损失。笔者用阳性聚合电解质几丁质等固定 *Rhodobacter sphaeroides*,所获得的固定化细胞在 NH_4^+ 存在下仍有很高的产氢活性^[59]。

光反应器的开发是产氢实用化的重要的一个方面。几种新的反应器如填充多孔玻璃的光反应器^[60],连续恒化培养光反应器^[61],逆流漫射光反应器 (IDPBR)^[62],平板式光反应器^[63,64]和线圈式盘状反应器^[65]等已相继用于厌氧光营养细菌的产氢研究。

厌氧光营养细菌和其它细菌的联合培养及多级培养产氢也非常有吸引力。如厌氧菌具有很高的降价较大分子的能力,其产氢依赖于氢酶,因此,其产氢不受 NH_4^+ 的抑制。另一方面,厌氧光合成细菌能有效地利用光能,且其最终产物为 CO_2 和氢气,但是它们分解大分子的能力没有厌氧菌高。把这两种微生物联合培养有利于提高底物的利用和产氢效率。*Rhodobacter sphaeroides* 和 *Clostridium butyricum* 的联合培养用于葡萄糖的产氢已经有报道^[66]。笔者已经成功地将 *Clostridium paraputrificum* 和 *Rhodobacter sphaeroides* 的两级培养用于豆制品废水和酒糟废水的产氢试验^[67]。

从废水或其它生物质产氢之所以吸引人是由于它们的低成本和很好的环境效益。从桔子加工废水、乳品加工废水、制糖废水、禽畜废水、造纸废水、豆制品废水和酒糟废水的生物产氢已分别由 Mitsui^[53], Bolliger^[68], Zürrer^[69], Vráti 和 Verma^[70], Vincenzini^[71], 刘双江^[55] 及笔者^[67,72] 报道。Singh 甚至观察到了

用 *Rhodopseudomonas* sp. 从淀粉, 蔗糖汁及小麦的产氢^[73]. Buranakar 同样报道 *Rhodopseudomonas* 从粗淀粉的产氢, 并检出了两种淀粉酶^[74,75].

5 结语

生物产氢的研究虽然在机理及实用系统的开发方面有很大的进展, 但基本上仍处于开发阶段上, 尚未实用化. 其关键的原因是现有产氢系统要么产氢速率不够高, 要么受到自身产物的抑制. 厌氧光营养细菌产氢虽然速率较高, 但由于只能考虑从有机废水产氢, 因此, 易受废水中像 NH_4^+ 这样的因子所抑制. 利用光能的产氢系统还无法克服由于日昼变化所带来的产氢效率的下降和由于光能无法均匀地进入反应器所带来的光能转化效率的下降. 另外, 产氢的系统优化、产氢抑制因素的去除、菌种的改良、产氢的大规模化等许多方面还有待进一步突破.

致谢 本文在资料的收集整理过程中得到了日本通产省工业技术院产业领域融合技术研究所三宅淳主任研究官及日本冈山县工业技术研究中心浅田泰男所长的帮助, 在此致以衷心的感谢.

References

- 1 胡成春编著. 新能源. 上海科学技术出版社, 1994
- 2 Weaver PF, Lien S, Seibert M. Photobiological production of hydrogen. *Sol Energy*, 1980, **24**: 3 ~ 45
- 3 Kumazawa S, Mitsui A. Hydrogen metabolism of photosynthetic bacteria and algae. In: Mitsui A, Black CC ed. CRC Handbook of Biosolar Resources. Volume 1, Part 1. Boca Raton: CRC Press, 1982. 299 ~ 316
- 4 Mitsui A, Onta Y, Frank J, Kumazawa S, Hill C, Rosner D, Barciella S, Greenbaum J, Haynes L, Oliva L, Dalton P, Radway J, Griffard P. Photosynthetic bacteria as alternative energy sources—overview on hydrogen production research. In: Proceedings of the 2nd International Conference on Alternative Energy Sources. Hemisphere Publishing Corp, 1981. 3483 ~ 3510
- 5 Miyamoto K. Hydrogen production by photosynthetic bacteria and microalgae. In: Murooka Y, Imanaka T ed. Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications. Marcel Dekker, Inc., 1993
- 6 Mitsui A, Philips EJ, Kumazawa S, Reddy KJ, Ramachandran S, Matsunaga T, Haynes L, Ikemoto H. Progress in research toward outdoor biological hydrogen production using solar energy, sea water, and marine photosynthetic microorganisms. *Ann New York Acad Sci*, 1983. 514 ~ 530
- 7 Miyake J, Asada Y, Kawamura S. Nitrogenase, *Miomass Handbook*, In: Kitani O, Hall CW ed. Gordon and Breach Science Publishers, 1988
- 8 Miyake J. Hydrogen fermentation: hydrogen production from biomass. *Microbiology*, 1987, **3**(5): 42 ~ 49
- 9 Miyake J. Biological solar energy conversion—hydrogen generation. *J Fibre*, 1992, **48**(1): 33 ~ 37
- 10 Miyake J. Photo production of hydrogen using photosynthetic bacteria. *J Sunshine*, 1990, **11**(1): 20 ~ 24
- 11 Zajic JE, Margaritis A, Brossenu JD. Microbial hydrogen production from replenishable resources. *Int J Hydrogen Ener*, 1979, **4**: 385 ~ 402
- 12 Miyake J, Asada Y. Biological production of hydrogen by environmentally acceptable technology. *New Energy Systems and Conversions*. Universal Academy Press, Inc., 1993. 219 ~ 223
- 13 Hallenbeck PC. Immobilized microorganisms for hydrogen and ammonia production. *Enzyme Microb Technol*, 1983, **5**: 171 ~ 180
- 14 Karube I, Matsunaga T, Tsuru S, Suzuki S. Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **444**: 338 ~ 341
- 15 Ren NQ (任南琪), Wang BZ (王宝贞). Hydrogen gas bio-production for organic wastewater treatment. *China Environ Sci* (中国环境科学), 1994, **14**(6): 411 ~ 414
- 16 Ren NQ (任南琪), Wang BZ (王宝贞), Ma F (马放). A study on hydrogen production by fermentation with anaerobic activated sludge process. *China Environ Sci* (中国环境科学), 1995, **15**(6): 401 ~ 405
- 17 Liu SJ (刘双江), Yang HF (杨惠芳), Zhou PJ (周培瑾). Separation and Screen of purple nonsulfur bacteria for hydrogen production. *Microbiology* (微生物通报), 1993, **20**(5): 259 ~ 262
- 18 Woodward J, Orr M, Cordray K, Greenbaum E. Enzymatic production of biohydrogen. *Nature*, 2000, **405**: 1014 ~ 1015
- 19 Imhoff JF. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE ed. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. London Kluwer Academic Publishers, 1995. 1 ~ 15
- 20 Weaver PF, Wall JD, Gest H. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulate*. *Arch Microbiol*, 1975, **105**: 207 ~ 216
- 21 Gibson J. Harwood CS. Degradation of aromatic compounds by nonsulfur purple bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE ed. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. London Kluwer Academic Publisher, 1995. 991 ~ 1003
- 22 Liu SJ (刘双江), Sun Y (孙燕), Yang HF (杨惠芳), Zhou PJ (周培瑾). Hydrogen photoevolution by growing cultures of *Rhodopseudomonas* sp. H. *Microbiology* (微生物通报), 1994, **21**(5): 259 ~ 263
- 23 Miyake J, Kawamura S. Efficiency of light energy conversion to hydrogen by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*, 1987, **12**(3): 147 ~ 149
- 24 Zhu HG (朱核光), Zhao YL (赵琦琳), Shi JL (史家梁). Experimental research on hydrogen production factors by *Rhodobacter sphaeroides*. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 1997, **8**: 161 ~ 169
- 25 Nakada E, Nishikata S, Asada Y, Miyake J. Hydrogen production by gel-immobilized cells of *Rhodobacter sphaeroides*-distribution of cells, pigments, and hydrogen evolution. *J Mar Biotechnol*, 1996, **4**: 38 ~ 42
- 26 Nakada E, Nishikata S, Asada Y, Miyake J. Effect of culture depth and light wavelength for hydrogen production by photosynthetic bacteria. In: Mathis P ed. Photosynthesis V: from light to biosphere. London Kluwer Academic Publishers, 1995. 837 ~ 840
- 27 Hillimer P, Gest H. H_2 metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*: production and utilization of H_2 by resting cells. *J Bacteriol*, 1977, **129**: 732 ~ 739
- 28 Ormerod JG, Ormerod KS, Gest H. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria, relationships with nitrogen metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 1961, **94**: 449 ~ 463

- 29 Hillmer P, Gest H. H_2 metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H_2 production by growing cultures. *J Bacteriol*, 1977, **129**: 724 ~ 731
- 30 Miyake J, Tomizuka N, Kawamura S. Effect of glutamate on the production by *Rhodospirillum rubrum*. *Report of the Fermentation Institute (Japan)*, 1982, **58**: 25 ~ 31
- 31 Meyer J, Vignais PM. Effects of *L*-methionine - *DL*-sulfoximine and β -*N*-oxalyl - *L*- α , β -diaminopropionic acid on nitrogenase biosynthesis and activity in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, **89** (2): 353 ~ 359
- 32 Nordlund S, Eriksson U. Nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim et Biophysica Acta*, 1979, **547**: 429 ~ 437
- 33 Zumft WG, Castillo F. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch Microbiol*, 1978, **117**: 53 ~ 60
- 34 Weare NM, Shanmugam KT. Photoproduction of ammonium ion from N_2 in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Microbiol*, 1976, **110**: 207 ~ 213
- 35 Neilson AH, Nordlund S. Regulation of nitrogen synthesis in intact cells of *Rhodospirillum rubrum*: Inactivation of nitrogen fixation by ammonia, *L*-glutamine and *L*-asparagine. *J General Microbiol*, 1975, **91**: 53 ~ 62
- 36 Sweet WJ, Burris RH. Inhibition of nitrogenase activity by NH_4^+ in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 1981, **145** (2): 824 ~ 831
- 37 Tubb RS. Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella*. *Nature*, 1974, **251**: 481 ~ 485
- 38 Yoch DC, Cantu M. Changes in the regulatory of *Rhodospirillum rubrum* nitrogenase as influenced by nutritional and environmental factors. *J Bacteriol*, 1980, **142** (3): 899 ~ 907
- 39 Yagi K, Meada I, Idehara K, Miura Y, Akano T, Fukatsu K, Ikuta Y, Nakamura HK. Removal of inhibition by ammonium ion in nitrogenase dependent hydrogen evolution of a marine photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas* sp. Strain W-1S. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, **45** (46): 429 ~ 436
- 40 Wall JD, Johansson BC, Gest H. A pleiotropic mutant of *Rhodospseudomonas capsulata* defective in nitrogen metabolism. *Arch Microbiol*, 1977, **115**: 259 ~ 263
- 41 Weare NM. The photoproduction of H_2 and NH_4^+ fixed from N_2 by a depressed mutant of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **502**: 486 ~ 494
- 42 Wall JD, Gest H. Derepression of nitrogenase activity in glutamine auxotrophs of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*, 1979, **137** (3): 1007 ~ 1013
- 43 Jones BL, Monty KJ. Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodospseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. *J Bacteriol*, 1979, **137** (3)
- 44 Falk G, Johansson BC, Nordlund S. The role of glutamine synthetase in the regulation of nitrogenase activity ("switch off" effect) in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Microbiol*, 1982, **132**: 251 ~ 253
- 45 Meyer J, Kelley BC, Vignais PM. Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*, 1978, **136**: 201 ~ 208
- 46 Miyake J, Tomizuka N, Kamibayashi A. Prolonged hydrogen production by *Rhodospirillum rubrum*. *J Ferment Technol*, 1982, **60**: 199 ~ 203
- 47 Segers L, Verstraete W. Ammonium as an alternative nitrogen source for hydrogen production photobacteria. *J Appl Bacteriol*, 1985, **58**: 7 ~ 11
- 48 Vasilyeva L, Miyake M, Nakada E, Asada Y, Miyake J. Regulation of Bchl level in *Rb. sphaeroides* for optimization of hydrogen production, genetic approach. *Biohydrogen* 97, Hawii, 1997
- 49 Kern M, Klipp W, Klemme JH. Increased nitrogenase - dependent H_2 photoproduction by *hup* mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (6): 1768 ~ 1774
- 50 Ooshima H, Takamura S, Katsuda T, Okuda M, Shirasawa T, Azuma M, Kato J. Production of hydrogen by a hydrogenase - deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *J Ferment Bioeng*, 1998, **85** (5): 470 ~ 475
- 51 Takamura S, Odom JM, Wall JD. Hydrogen uptake deficient mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol*, 1983, **136**: 20 ~ 25
- 52 Mitui A, Matsunaga T, Ikemoto H, Renuka BR. Organic and inorganic waste treatment and simultaneous photoproduction of hydrogen by immobilized photosynthetic bacteria. *Develop Industr Microbiol*, 1985, **26**: 209 ~ 222
- 53 Hirayama O, Uya K, Hiramatsu Y, Yamada H, Moriwaki K. Photoproduction of hydrogen by immobilized cells of a photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* G - 9 BM. *Agric Biol Chem*, 1986, **54**: 891 ~ 897
- 54 Francou N, Vignais PM. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotechnol Lett*, 1984, **6**: 639 ~ 644
- 55 Liu SJ (刘双江), Yang HF (杨惠芳), Zhou PJ (周培瑾), Shun Y (孙燕), Cen YH (岑运华). 固定化光合细菌处理豆制品废水产氢研究. *Chin Environ Sci (中国环境科学)*, 1995, **16**(1): 42 ~ 44
- 56 Seon YH, Lee CG, Park DH, Hwang KY, Joe YI. Hydrogen production by immobilized cells in the nozzle loop bio-reactor. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**: 1275 ~ 1280
- 57 Martens N, Hall EAH. Immobilization of photosynthetic cells based on film-forming emulsion polymers. *Anal Chem Acta*, 1994, **292**: 49 ~ 63
- 58 Tsugankov AA, Hirada Y, Asada Y, Miyake J. Immobilization of the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides* on glass surfaces. *Biotechnol Techniques*, 1993, **7**(4): 283 ~ 286
- 59 Zhu HG, Wakayama T, Suzuki T, Asada Y, Miyake J. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer/agar gels for hydrogen production in the presence of NH_4^+ . *J Biosci Bioeng*, 1999, **88** (5): 507 ~ 512
- 60 Tsygankov AA, Hirada Y, Miyake M, Asada Y, Miyake J. Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77**(5): 575 ~ 578
- 61 Tsygankov AA, Laurinavichene T, Gogotov I, Asada Y, Miyake J. Switching from light limitation to ammonium limitation in chemostat cultures of *Rhodobacter capsulatus* in different types of photobioreactor. *J Mar Biotechnol*, 1996, **4**: 43 ~ 46
- 62 El - Shishtawy RMA, Kawazaki S, Morimoto M. Biological H_2 production using a novel light-induced and diffused photoreactor. *Biotechnol Techniq*, 1997, **11**(6): 403 ~ 407

- 63 Kitamura Y, El - Shishtawy RMA, Ueno Y, Otsuka S, Miyake J, Morimoto M. Analysis of compensation point of light using plane-type photosynthetic bioreactor. In: Zaborsky *et al* ed. Biohydrogen. New York: Plenum Press, 1998. 539 ~ 567
- 64 Kitajima Y, Otsuka S, Ueno Y, Kawazaki S, Morimoto M. Outdoor operation of bioreactor using photosynthetic bacteria and effect of dark reaction. In: Bolcich JC, Veziroglu TN ed. Proceedings of 12th world hydrogen energy conference. Buenos Aires, Argentina, June 21 ~ 26, 1998, **3**: 2025 ~ 2033
- 65 Hall DO, Rao KK, Fedorov AS, Tsygankov AA. Production of hydrogen by an *Anabaena* mutant in a photobioreactor under aerobic outdoor condition. Biohydrogen99, Tsukuba, Japan, June 22 ~ 23, 1999. 6 ~ 1
- 66 Miyake J, Mao XY, Kawamura S. Hydrogen photoproduction from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacteria and *Clustridium butyricum*. *J Ferment Technol*, 1984: 531 ~ 535
- 67 Zhu HG, Miyake J, Tsygankov AA, Asada Y. Hydrogen production from highly concentrated organic wastewater by photosynthetic bacteria and anaerobic bacteria. *Water Treatment*, 1995, **10**: 61 ~ 68
- 68 Bolliger R, Zürrer H, Bachofen R. Photoproduction of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, **23**: 147 ~ 151
- 69 Zürrer H, Bachofen R. Hydrogen from lactate and lactate containing wastes by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Studies in Envir Sci*, 1982, **9**: 31 ~ 36
- 70 Vrati S, Verma J. Production of molecular hydrogen and single cell protein by *Rhodopseudomonas capsulata* from cow dung. *J Ferment Technol*, 1983, **61**: 157 ~ 162
- 71 Vincenzini M, Materassi R, Tredici MR, Florenzano G. Hydrogen production by immobilized cells II: H₂ - photoevolution and wastewater treatment by agar entrapped cells of *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodospirillum molischianum*. *Int J Hydrogen Energy*, 1982, **7**: 725 ~ 728
- 72 Singh SP, Strivastava SC, Pandey KD. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *Int J Hydrogen Energy*, 1994, **19**: 437 ~ 440
- 73 Zhu HG, Suzuki T, Tsygankov AA, Asada Y, Miyake J. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides*. *J Int Hydrogen Energy*, 1999, **24**: 305 ~ 310
- 74 Buranakarl L, Fan CY, Ito K, Izaka K, Takahashi H. Production of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria with raw starch. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**: 3339 ~ 3343
- 75 Buranakarl L, Ito K, Izaka K, Takahashi H. Purification and characterization of a raw starch-digestive amylase from non-sulfur purple photosynthetic bacterium. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**: 173 ~ 179