

光合细菌生物产氢技术的研究进展*

任丽滨 朱建良 陈晓晔 杨晓瑞

(南京工业大学制药与生物工程学院, 江苏 南京 210009)

摘要 光合细菌生物产氢技术能够将光能利用、氢能制备和有机物去除有效地结合在一起, 是一种极具发展潜力的氢能生产技术。分析了光合细菌产氢技术的机制与主要影响因素, 着重介绍了国内外各种光合细菌生物产氢技术, 指出目前研究技术存在的问题, 并对其应用前景进行了评述。

关键词 光合细菌 生物产氢技术 光生物反应器

Research progress on hydrogen production biotechnology by photosynthetic bacteria REN Libin, ZHU Jianliang, CHEN Xiaoye, YANG Xiaorui. (Institute of Pharmaceutical and Biological Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing Jiangsu 210009)

Abstract: Bacterial photo-hydrogen production technology was the most potential hydrogen energy production technologies, which got together solar energy using, environment management and clean energy producing. The mechanism of photosynthetic bacterial hydrogen production and the main factors were analyzed in this paper. In the further, the variety of photo-hydrogen production technology was focused both at home and abroad. The current problems in research techniques were pointed and the applications in the future were proposed in the article.

Keywords: photosynthetic bacteria; hydrogen production biotechnology; photobioreactor

随着经济和社会的发展, 人类对能源的需求越来越多, 化石燃料的大量开采和使用已造成了严重的温室效应、环境污染、生态变异等问题。因此, 寻找和开发新的绿色可再生能源是实现社会可持续发展的必然选择^[1,2]。

氢气是一种理想的替代能源, 具有高效、清洁、可再生、易运输等特点。随着氢气燃料电池、氢气内燃机和发动机等技术的推广应用, 氢气的需求大大提高。目前, 获取氢气的主要方法是化石燃料重整制氢、电解水制氢和生物产氢^[3]。生物产氢技术因具有低能耗、低成本、无污染和可再生等突出优势而引起广泛关注。多种生物产氢技术中, 利用光合细菌产氢的能量利用率高、产氢速率大、生产工艺简单, 并且该技术能够将光能利用、氢能制备和有机物去除有效地结合在一起, 是一种极具发展潜力的氢能生产技术。

1 光合细菌产氢机制

光合细菌是一类能进行光合作用并产生氢气的原核生物, 属于细菌门真细菌纲, 红螺菌目^[4]。产氢

是光合细菌特有的性能, 在光照厌氧条件下, 光合细菌通过自身复合体上的细菌叶绿素和类胡萝卜素捕获高能光子, 并将能量传递到光合反应中心, 使高能光子发生电荷分离产生高能电子。高能电子经过环式磷酸化将光能转化成三磷酸腺苷(ATP), 为产氢过程提供能量。产氢过程中所需要的还原力来自有机物的氧化代谢, 由细胞内还原性的铁氧蛋白水平所决定。固氮酶是光合细菌光合产氢的关键酶^[5], 在细胞提供足够的 ATP 和还原力的前提下, 固氮酶可以将氮气转化成氨气, 同时质子化生成氢气。产氢是光合细菌调节其机体内剩余能量和还原力的一种方式, 对其生命活动非常重要^[6]。

许多光合细菌在黑暗条件下可以通过厌氧发酵产氢, 氢酶在厌氧暗发酵产氢过程中起主要作用。研究证实, 光合细菌的厌氧暗发酵产氢机制与严格厌氧菌很相似^[7], 都是以葡萄糖、有机酸、醇类物质为底物, 在氢酶代谢过程中产生氢气, 该过程不需外加光能。光合细菌厌氧暗发酵产氢过程相对简单, 但是在黑暗条件下有机物降解不彻底, 分解速度缓慢, 产氢效率较低。

第一作者: 任丽滨, 女, 1983 年生, 硕士研究生, 主要从事新能源开发的研究。

* 国家“973 计划”项目(No. 2003CB716000)。

2 光合细菌产氢的影响因素

2.1 影响光合作用的因素

光合细菌中的细菌叶绿素是吸收光子、传递能量的重要物质,氧气的存在能够迅速抑制光合系统中细菌叶绿素的合成,使产氢量下降。铵盐中的 NH_4^+ 对光合磷酸化有解耦联的作用,能够干扰ATP的产生,但是该抑制作用可逆,当铵盐代谢完全后光合细菌又能正常产氢。光照波长与光照强度可以影响光合细菌的光能转化效率进而影响其产氢能力。当光照强度超过某一极限值时,光合细菌体内会发生“光饱和”现象,使光合系统Ⅰ过量激发导致光合效率下降,产氢受阻。

2.2 影响固氮酶及氢酶的因素

铵盐是光合细菌生长的有效氮源,但铵盐的摩尔浓度大于1 mmol/L时,铵盐将抑制固氮酶结构基因的转录,终止固氮酶的合成,对固氮酶的合成产生“瞬间关闭”效应。因此,可以通过控制环境介质中铵盐的浓度来增强固氮酶活性^[8]。环境中的氧气能够钝化固氮酶的合成,并且该抑制作用是不可逆的。SCOLNIK等^[9]从分子水平研究了影响固氮酶活性的因素,发现draG和draT组成的内在调节系统能够对固氮酶翻译后修饰进行调节来改变固氮酶的活性。培养基中的N/C是固氮酶表达的决定性因素,N/C超过极限值,固氮酶活性就会消失^[10]。

在有足够的还原力时,光合细菌中的氢酶可以通过厌氧暗发酵实现产氢,但氢酶还能发生吸氢反应回收能量。氧气能够使氢酶氧化失活,然而氢酶对氧气的耐受性却远高于固氮酶。此外, CO 、 NaCl 都能抑制氢酶的吸氢活性。杨素萍等^[11]在研究镍对氢酶活性的影响时发现,镍是参与构建氢酶催化剂的中心结构,镍离子在光合细菌生长和产氢过程中起着分配还原力的作用。

2.3 其他影响因素

光合细菌的生长环境如pH、温度、底物以及光合细菌的菌龄、接种量等也会影响产氢率。底物中的有机物和还原性物质可以为光合产氢提供质子或电子,在光照厌氧条件下,不同的菌种对底物有一定的选择性。REN等^[12]发现,将丁酸盐以1:1的质量比加入到醋酸盐培养基中,可大幅提高沼泽红假单胞菌RLD-53的产氢量和最大产氢速率。王永忠等^[13]在考察环境条件对沼泽红假单胞菌产氢行为的影响时发现,光合细菌在pH为8、温度为25℃时

的产氢能力最佳。菌种的接种量和菌龄会直接影响光合细菌的生理和生长状态,接种量超过一定范围不仅会引起细胞生长原料与产氢原料供给不足,同时较高的细胞浓度还会引起光合细菌自我遮蔽现象。不同菌龄的光合细菌的产氢酶系发育程度不同,因此产氢率也不相同。

3 光合细菌光合产氢技术

3.1 高产菌种的筛选和制备技术

光合细菌自身的产氢能力是光合细菌生物产氢技术的基础,可以通过传统的方法从自然菌种中筛选高产菌种,为高效生物产氢技术提供优质菌种资源。目前,双向聚合酶链式反应技术可以从分子水平快速鉴定菌种的产氢能力^[14]。TAO等^[15]筛选到一株高产的紫色脱硫光合细菌,利用丁酸盐作为底物时,其产氢速率最高可达118 mL/h。

近年来,人们从细胞、分子水平上对光合细菌产氢机制进行了深入研究,并通过基因操作或诱变技术改进光合系统,提高光捕获效率,从而筛选出具有高产氢能力的变异菌株。KONDO等^[16]发现,光合细菌*R. sphaeroides*变异株中的外周捕光色素蛋白(LH₂)和核心捕光色素蛋白(LH₁)的含量较低,但其产氢能力明显提高,产氢率是野生菌株的1.5倍左右。EUI等^[17]利用遗传技术得到LH₂中缺失B850-800复合物的*R. sphaeroides*变异株,产氢能力提高了2倍。ZABBTSKY^[18]通过pufBA基因突变,得到*Rb. sphaeroides* P3变异株,在850 nm单色光下,变异株的产氢率是原菌株的1.5倍。光合细菌的光谱利用范围低,光能利用效率差,只有当光能利用率大于10%时光合产氢技术才具有生产的意义,因此可以通过诱变技术扩大光合细菌对太阳光谱的利用范围来提高光能利用效率^[19]。氢酶的吸氢活性会影响产氢率,利用基因改造获得吸氢活性缺失的氢酶可以提高光合细菌的产氢能力。殷幼平等^[20]获得了吸氢酶大亚基基因hupL缺失的*R. palustris* CQU012变异株,使菌株的产氢率提高了50%。

3.2 混合培养产氢技术

自然界中,生物反应过程并不能由单一的菌种来完成。不同的菌种对底物的利用具有高度特异性,混合培养中多种菌种之间可以发生协同效应,不仅能够提高生态系统的稳定性,形成良好的微生态产氢体系,而且可以达到彻底降解底物的效果,这种培养方式已经在处理废水产氢方面显示出突出的优

越性。

目前,常用的方法是利用厌氧菌与光合细菌混合培养产氢。工农业废弃物与废水成分复杂,多含有大分子有机物,不利于光合细菌的利用,异养型厌氧细菌在黑暗条件下发酵分解各种大分子有机物,产生甲酸、乙酸、丁酸等小分子有机酸,光合细菌利用小分子有机酸产氢。该混合培养技术不仅减少光合细菌光能需求,保护净化环境,同时能够提高氢气产量,实现日夜连续产氢。张立宏等^[21]从沼气池活性污泥中分离出以光合细菌为主的混合菌种,并在蔗糖和可溶性淀粉 2 种底物中培养产氢,结果发现混合菌种的产氢率是光合产氢菌种 *Rh. Palustris* Z02 的 7.08、7.43 倍,并且产氢条件更为宽松。混合培养可以彻底将大分子有机物降解为 CO_2 和 H_2O ,现有的混合培养产氢技术多采用两步转化法,即先经过有机物消化然后进行光合细菌产氢,工艺过程比较复杂。而采用一步转化法同时实现有机物消化与光合细菌产氢的技术还缺乏控制发酵参数的有效手段。未来应逐步建立在线监测技术,实时监测混合菌株的生长与代谢情况,了解各菌株之间的协调作用机制,使微生物代谢向着有利于氢气产生的方向进行。

3.3 固定化培养产氢技术

固定化培养产氢技术能够消除氧气对固氮酶的抑制,耐受高盐环境,防止渗透压对微生物细胞的危害,提高产氢酶系统的稳定性,延长产氢率与产氢时间,同时固定化培养产氢技术还能够解决菌体流失及固液分离难的问题。常见的固定化方法有包埋法和吸附法,最近挂膜法也引起了人们的重视。ZHU 等^[22]利用聚氨基葡萄糖凝胶固定 *R. sphaeroides* RV 菌株光合产氢,不仅提高产氢效率,还能通过限制 NH_4^+ 的扩散来降低铵盐对产氢的抑制作用。张全国等^[23]利用大粒径陶粒吸附光合细菌,并以消化预处理后的猪粪为底物进行光合产氢,固定化培养后,细菌总产氢量可达 452.7 mL,是对照组游离态细菌总产氢量的 2.16 倍。徐向阳等^[24]分别利用琼脂和海藻酸钠固定红假单胞菌菌株 D 处理有机废水,产氢率分别为 28.5、20.3 mL/(g·h),而悬浮的菌株产氢率为 17.7 mL/(g·h)。廖强等^[25]在固定化填充床产氢实验中发现,增加培养基流量能够消除外扩散传质阻力,使最大产氢率达到 2.6 mmol/(L·h),但是无法消除由固定化材料造成的内扩散传质阻力。

虽然固定化培养产氢技术可以提高光合细菌产氢效率,但固定化材料内部传质阻力大,基质浓度不均一,反馈抑制和阻遏作用强,占据空间大,不利于工业生产。因此,开发性质稳定、吸附能力强、透光性好、传质阻力小、成本低的固定化材料是未来固定化培养产氢技术的研究方向。

3.4 利用光生物反应器光合产氢技术

光生物反应器是光合细菌培养与产氢的装置,可以为光合细菌提供最佳的生长产氢条件。因此,光生物反应器的设计要求密闭性好,接收与透光性能高,能够最大限度地提高光化学转换效率与产氢率,消除产氢过程中的限制性因素。

光照是光合细菌产氢的重要影响因素,光在光生物反应器内射程短,光合细菌在代谢过程中的着色现象会引起自我遮蔽效应,妨碍光透过性及反应器内光照的均匀性,进而可能会转变代谢模式,降低产氢率^[26]。为了高效地接受光和透过光,可采用具有高表面积体积比的光生物反应器或内置光源生物反应器。KONOD 等^[27]设计了多层光生物反应器,利用菌株 *R. sphaeroides* RV 光合产氢,产氢量是平板式光生物反应器的 2 倍。为了使光传播到光生物反应器的深处,目前还相继开发出了内部设置光纤、石英发光体、光扩散板的光生物反应器。CHEN 等^[28]设计了一种内外光源结合式光生物反应器,利用碘钨灯与钨灯或者金属氯化物等作为内光源,使沼泽红假单胞菌的产氢能力大大提高,产氢量及光能转化效率分别达到了 944 mL 和 1.42%。

相对于连续光照反应器,光照黑暗交替有助于提高强光下的光能转化效率。在微氧暗条件下,菌株可以通过呼吸作用下产生 ATP,为光合产氢提供更多能量,提高固氮酶活性,产氢率大大提高。KOKU 等^[29]采用自然光照与黑暗交替的光照模式进行生物产氢,使产氢率大大提高。随着光照时间延长,光合细菌不断吸收红外光使光生物反应器内温度逐渐上升,因此利用光生物反应器光合产氢时应筛选耐热菌株以省去冷却温度的能源消耗,降低成本。

4 前景展望

随着能源危机与环境恶化等问题日益突出,生产无污染、可再生的氢气已成为了各国能源技术开发的重要计划项目。光合细菌产氢技术的研究仍处于实验室阶段,目前还存在光能利用率低、氢气产量

少、产氢代谢过程稳定性差、反应器综合控制能力弱等瓶颈问题,严重制约着光合细菌产氢技术的产业化发展。为了提高产氢量,今后研究的重点应主要集中在以下几点:(1)筛选自然界中光能要求小、产氢活性高的光合细菌,这种方法是在不增加成本的条件下提高产氢量的最基本的方法,并且可以结合多种菌株构建一个稳定的酵解产氢微生态体系,在污水治理的同时提高产氢量;(2)产氢是多个代谢过程协同作用的结果,单独改变产氢关键酶并不能从根本上提高光合细菌的产氢能力,可以运用代谢工程这一新兴生物技术,找出整个产氢代谢过程的调控点,利用比较基因组学、功能基因组学、蛋白质基因组学得到调控基因并对其进行遗传学改造,构建多功能光合产氢菌株;(3)研制连续高效光生物反应器,并且提高光生物反应器对多种反应动力学指标如光照强度、氧化还原电位、化学需氧量等的综合自动控制能力,以便为光合细菌提供最佳的生长产氢环境。

参考文献:

- [1] MIYAKE J, MIYAKE M, ASAD Y. Bio-technological hydrogen production: research for efficient light energy conversion[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 70(3): 89-101.
- [2] KAPDAN I K, KARGI F. Bio-hydrogen production from waste materials[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(5): 569-582.
- [3] 翟秀静, 刘奎仁, 韩庆. 新能源技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [4] 计红芳, 陈锡时, 王爱杰. 光合细菌光合产氢的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 44-46.
- [5] MITSUI A, OHTA Y, FRANK J, et al. Photosynthetic bacteria as alternative energy sources: overview on hydrogen production research [M]. Washington D. C.: Hemisphere Publishing Corp., 1981.
- [6] HUSTADE E, STEINBUCHER A, SCHLEGEL H G. Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sul-fur bacteria[J]. Microbiology, 1993, 64(39): 39-87.
- [7] 杨素萍, 赵春贵, 曲波钱, 等. 光合细菌产氢研究进展[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 87-88.
- [8] ELA E, INCI E, UFUK G, et al. Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 6799-6808.
- [9] SCOLNIK P A, VIROSCO J, HASELKORN R. The wild type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to *glnA* mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*[J]. Bacteriology, 1983, 155(1): 180-185.
- [10] 王毅, 安静, 张全国, 等. 光合细菌光合作用及固氮产氢作用研究进展[J]. 可再生能源, 2009, 27(1): 53-54.
- [11] 杨素萍, 赵春贵, 曲波钱, 等. 铁和镍对光合细菌生长和产氢的影响[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 257-262.
- [12] REN Nanqi, LIU Bingfeng, DING Jie, et al. The effect of butyrate concentration on photo-hydrogen production from acetate by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53[J]. Hydrogen Energy, 2008, 33(21): 5981-5985.
- [13] 王永忠, 廖强, 朱恂, 等. 静态培养条件对光合细菌产氢行为的影响[J]. 工程热物理学报, 2007, 28(2): 46-47.
- [14] JEE W T, KWAI L T, NIRMALA D A, et al. Development of a PCR assay for the detection of *nifH* and *nifD* genes in indigenous photosynthetic bacteria[J]. Hydrogen Energy, 2009, 34(17): 7538-7541.
- [15] TAO Yongzhen, HE Yanling, WU Yongqiang, et al. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment[J]. Hydrogen Energy, 2008, 33(3): 963-973.
- [16] KONDO T, ARAKAWA M, HIRAI T, et al. Enhancement of hydrogen production by aphotsynthetic bacterium mutant with reduced pigment[J]. Journal of Bio-engineering, 2002, 93(2): 143-150.
- [17] EUI J K, JU S K, MI S K, et al. Effect of changes in the level of light harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* on the photoheterotrophic production of hydrogen[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(1): 531-538.
- [18] ZABITSKY O R. Biohydrogen[M]. London: Plenum Press, 1998.
- [19] ASADA Y, MIYAKE J. Photobiological hydrogen production [J]. Bioscience & Bioenergy, 1999, 88(1): 1-6.
- [20] 殷幼平, 张宝鹏, 廖强, 等. 沼泽红假单胞菌高效产氢 *hupL* 缺失突变株的构建[J]. 中国环境科学, 2009, 29(4): 413-418.
- [21] 张立宏, 周俊虎, 陈明, 等. 活性污泥分离混合菌的光合产氢特性分析[J]. 太阳能学报, 2008, 29(2): 145-150.
- [22] ZHU H, WAKAYAMA T. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer agargels for hydrogen production in the presence of NH_4^+ [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(5): 507-512.
- [23] 张全国, 荆艳艳, 周雪花, 等. 吸附法固定光合细菌技术产氢能力的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(9): 199-201.
- [24] 徐向阳, 郑平. 固定化光合细菌处理有机废水过程产氢的研究——II. 红假单胞菌菌株 D 利用有机物光产氢的特性[J]. 太阳能学报, 1993, 14(4): 288-294.
- [25] 廖强, 王永忠, 田鑫, 等. 固定化光合细菌光生物制氢填充床产氢特性研究[J]. 工程热物理学报, 2009, 30(1): 150-152.
- [26] KO K H, MATARY O. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Hydrogen Energy, 2002, 27(11): 1315-1329.
- [27] KONOD T, WAKAYAMA T, MIYAKE J. Efficient hydrogen production using a multi-layered photobioreactor and a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(11): 1522-1526.
- [28] CHEN C Y, LEE C M, CHANG J S. Hydrogen production by indigenous photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using optical fiber illuminating photo-bioreactors [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(1): 33-42.
- [29] KOKU H, EROGLU I. Kinetics of biological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* OU001[J]. Hydrogen Energy, 2003, 28(4): 381-388.

编辑: 丁 怀 (修改稿收到日期: 2009-12-25)