

生物发酵制氢技术的最新研究进展

吴梦佳¹, 隋红^{1,2}, 张瑞玲^{3*}

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072; 2. 精馏技术国家工程研究中心, 天津 300072;
3. 天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384)

摘要:在综述国内外生物制氢技术研究进展的基础上,重点综述了生物制氢暗发酵、光发酵以及联合发酵3种技术体系的菌种选育特点以及工业应用的生物反应器研究现状,指出了目前国内外生物制氢领域各技术的发展趋势及研究方向。

关键词:生物制氢;微生物;暗发酵;光发酵

中图分类号:TK91

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)05-0043-04

Recent research advances in bio-fermentation hydrogen production technology

WU Meng-jia¹, SUI Hong^{1,2}, ZHANG Rui-ling^{3*}

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. National Engineering Research Centre of Distillation Technology, Tianjin 300072, China;

3. School of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

Abstract: Based on the research of the biological hydrogen production technology, the characteristics of the screening bacteria and industrially applied bioreactor system for three technologies including biological dark-fermentation, photo-fermentation and combined fermentation, are highlighted. The development trends and research directions for bio-hydrogen production technologies at home and abroad are pointed out.

Key words: bio-hydrogen production; microbe; dark fermentation; photo fermentation

随着人口的增多及工业与制造业的迅猛发展,能源和环境问题逐渐扩大成为全球性的问题。以煤炭、石油为主的不可再生能源因其储量有限,以及燃烧产生的二氧化碳和二氧化硫是温室效应和酸雨产生的主要原因,逐渐显现出劣势。氢能以其能量密度高、放热效率高、燃烧性能好,以及清洁无污染等优点,被称为最理想的能源。目前世界上氢能的制取大部分是依靠石油、煤炭和天然气等作为原料,这样进一步加速了不可再生能源的消耗。最理想的清洁能源氢能开始成为研究的热点,国内外有大量学者从事制氢技术的研究,并进一步扩大到实际的生产中。现有的制氢技术类的综述文献[1-3]大都是从理论上进行总结和介绍,对制氢技术进行分类,对体系条件进行优化概括,缺少菌种选育、实际操作和工业化生产方面的概况和介绍,为进一步指导实验研究和扩大生产,以菌种角度进行分析和总结显得尤其重要。

本文中首先简单介绍生物制氢技术的现状,然后综合现有的生物制氢技术进行详细的分析和概括,其中重点介绍了暗发酵生物制氢和光发酵生物制氢技术,综合国内外现有的反应器类型对工业化生产技术进行探索,并结合已有的实验研究结果及

菌种选育研究对联合制氢技术进行总结和展望,最后对生物制氢技术的发展趋势和研究方向做出分析和讨论。

1 生物制氢技术概况

1.1 生物制氢概念的提出

生物制氢最先于1966年由Lewis提出,细菌和藻类产生分子氢的特性被人们所认识^[4]。随后的能源危机和环境问题加速了可再生清洁能源的发展。氢能作为最理想的清洁能源,近些年一直是研究的热点。传统的制氢技术,如煤气化、电解水、化石燃料部分氧化(POX)、天然气蒸汽重整(SRM)、天然气裂解、氨裂解等^[5]会消耗大量的不可再生资源,并造成严重的环境负荷,不利于可持续发展。而生物制氢是通过微生物的代谢作用将有机化合物转化为氢气,所用底物涵盖了有机废水、生物质等来源丰富、价格低廉的原料,且整个过程对矿物资源的消耗几乎为零,生产过程清洁环保,是制氢技术的发展趋势。

现有的生物制氢技术有以下几种类型:①直接生物光解制氢,利用藻类微生物的光合作用系统(PS I、PS II)将太阳能转化为化学能从而生成氢

气;②间接生物光解制氢,利用蓝细菌等微生物的代谢作用将生物质中的能量转化并生成氢气;③生物学水气转换制氢,在革兰氏染色阴性菌种的作用下发生水气转换作用制氢;④暗发酵制氢,微生物在黑暗的厌氧环境中发酵有机物制氢;⑤光发酵制氢,微生物在光照条件下发酵有机物制氢^[6]。其中暗发酵和光发酵制氢技术以其产氢量大、易于工业化生产等优点,被广泛而深入地研究。

1.2 生物制氢关键因素

微生物与酶活性是生物制氢最关键的影响因素。其中微生物的选择包括菌种、固定化、菌龄、接种量等^[7],吸氢酶、可逆氢酶和固氮酶^[8]的酶活性调控了体系的产氢状况。

国内外对于微生物的研究,根据菌种特性进行分类,研究纯菌种、混合菌种及菌群、活性污泥等对于发酵类型、产氢状况的影响,本文中主要从菌种研究出发,对国内外发酵制氢技术进行概括与总结,对生物制氢发展方向进行深刻的剖析。

除此之外,在暗发酵过程中的体系 pH、温度、碳源与氮源等,在光发酵过程中的光源、光照强度、保护气等都是其关键考量因素^[9-10]。目前关于关键因素选择与优化的研究很多,同时也作为放大生产的工艺条件成为研究的热点。

2 暗发酵生物制氢技术的研究

暗发酵制氢过程产生的是混合气,除含有氢气外还含有一定量的 CO₂,以及少量的甲烷、一氧化碳以及 H₂S^[11]。目前暗发酵制氢技术的研究可分为如下几种:①纯菌种暗发酵制氢;②2 种或几种菌种协同暗发酵制氢;③以活性污泥为代表的混合菌种暗发酵制氢。

2.1 纯菌种暗发酵制氢

利用纯菌种的代谢作用将富含碳水化合物的有机质进行发酵制氢。目前,国内外研究所用的菌种可分为嗜温菌种(25 ~ 40℃)、嗜热菌种(40 ~ 65℃)、耐热菌种(65 ~ 80℃)以及超级嗜热菌种(>80℃)^[8],目前研究最多的是在室温或稍高于室温的条件下生长产氢的嗜温菌种,最常用的是严格厌氧的梭状芽胞杆菌属(*Clostridium*)和兼性厌氧的肠杆菌属(*Enterobacter*)^[12-16]。Patra 等^[12]采用 *Clostridium* sp. T2 菌种,以蔗糖为原料,在全混流反应器(CSTR)中产氢速率高达 3.15 mmol/(L·h)且氢气体积分数也高达 61.5%。Xing 等^[16]用 *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 菌种,以葡萄糖为底物,

在非无菌条件的连续发酵过程中进行产氢实验,所能够得到的产氢量达到 1.93 mol/mol。而早在 1995 年 Tanisho 等^[15]用聚氨酯泡沫作为菌种附着的支撑物,在连续发酵条件下用糖浆作发酵底物,能够得到的最大产氢量为 3.5 mol/mol。众多的研究成果显示,嗜温菌种在暗发酵产氢过程中能够实现较高的产氢量,同时缓解由于有机废水和生物质的排放而产生的环境危害。

对嗜温菌种产氢特性的研究打开了暗发酵制氢的途径,拓宽了制氢技术的发展方向,同时,耐热菌种产氢特性的研究也为暗发酵制氢技术提供了新的思路。2010 年学者利用 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 能够实现 3.3 ~ 3.6 mol/mol 的产氢量,产氢量的大大提高使得以葡萄糖为代表的碳水化合物的发酵制氢有了新的突破^[17-18]。而目前研究的重点在于如何进一步提高菌种的产氢能力,选择高效产氢菌种,并建立有效的反应器进行放大实验。

2.2 2 种或几种菌种协同暗发酵制氢

由于纯菌种用于制氢过程受到操作条件的限制,考虑到菌种之间的协同作用,可以将已知的 2 种或多种菌种共同应用于制氢过程^[19],早在 2002 年 Niel 等^[17]就将极其嗜热的菌种 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 和 *Thermotoga elfii* 混合应用于暗发酵制氢阶段,用 2 个完全搅拌釜式反应器(CSTR)和 1 个厌氧序批式反应器(ASBR)实现 3.2 mol/mol 的产氢量,且体系中容易形成小颗粒,表面嗜热菌能够很好地用于造粒,是适合作碳水化合物制氢发酵的菌种模式。

2.3 以厌氧活性污泥为代表的混合菌种暗发酵制氢

厌氧活性污泥是在缺氧或无氧条件下具有一定活性,含有复杂的混合菌种的半固态或固态物质。利用污泥进行暗发酵制氢突破了利用纯菌种的种种局限,能够持续产氢,成本低,环境负荷小。其发酵类型可以分为乙酸型、丁酸型、乙醇型发酵等。通过控制体系的 pH、酶活性、氧化还原电位可使发酵类型偏向有利于产氢的乙醇型发酵,从而使产氢过程连续性提高,利于工业化生产。

国内外的研究主要集中在污泥的预处理方式和发酵体系优化 2 个方面。不同的预处理方式作用于菌种的富集和筛选,所得菌种的产氢特性也不尽相同。Cheong 等^[20]比较了 5 种预处理方法(酸、二溴乙磺酸钠、湿热、干热和冻融处理),研究表明,酸处理是最利于产氢的污泥处理方式。Ren 等^[21]研究

了4种处理方式(热、酸、碱、反复曝气)对于暗发酵产氢类型的影响,实验结果表明,经过预处理的污泥(碱处理除外)在用于发酵时能够几乎完全抑制产甲烷菌种的活性;反复曝气处理后的菌种发酵类型多为乙醇型发酵,最高产氢量为1.96 mol/mol。

综合国内外研究成果,适宜的发酵体系可描述为:30~35℃、初始pH 5.5~6.5、氧化还原电位-100~-125 mV、水力停留时间(HRT)5~6 h、C/N比40~60、反应器型式多为完全搅拌釜式反应器(CSTR)和厌氧序批式反应器(ASBR)^[22-23]。

2.4 暗发酵生物制氢技术的发展趋势

混合菌种制氢突破了纯菌种的操作局限,简化了菌种分布和固定化的操作,产氢量大,环境负荷小且能够利用有机废物,是未来生物制氢的重要途径。其未来的发展趋势则趋向于:高产氢量的持续性;高效产氢反应器的设计与控制,反应器结构通过影响菌种固定和分布影响产氢结果,升流式厌氧污泥床反应器、膜分离反应器、散水滤床反应器等形式各异的高效反应器的研究,及填料等支撑物对于菌种固定化的影响也逐渐成为研究的重点;产物混合气体的分离提纯与保存;高效产氢混合菌群的筛选与培育等方面,制氢技术的发展也更趋向于稳定化和高效化产氢的研究。

3 光发酵生物制氢技术的研究

3.1 光发酵生物制氢的菌种

光发酵生物制氢是在厌氧光照条件下,利用菌种的代谢作用,将小分子有机酸、醇类等作供氢体,由光驱动产氢的过程。所用菌种为光发酵产氢菌(photo-fermentation producing hydrogen bacteria, PF-PHB)。早在1937年,Nakamura就观察到了光发酵细菌能够释放氢气。之后1949年,Gest和Kamen则报道了深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)在光照条件下的产氢现象,同时发现了它的光合固氮作用。已经研究报道的菌株类群包括*Rhodospirillum*、*Rhodobacter*、*Rhodospseudomonas*、*Chromatium*、*Rhodomicrobium*和*Ectothiorhodospira*属的多种菌种。近年来学者采用遗传工程技术对菌种进行改造,通过多功能基因工程构建菌种,遗传诱变与选择培养技术相结合进行菌种的筛选和培育,企图得到产氢速率快、底物转化效率高、应用范围广的高效产氢菌种^[24-26]。

3.2 光发酵生物制氢技术的条件优化

除去菌种本身的菌龄、接种量等影响光发酵的

因素外,光源、光照强度、碳源与氮源、pH、温度、气相保护等都是关键因素。其中以包埋法、物理吸附法、共价结合法、交联法等为代表的菌种固定化方法有利于简化处理工艺、简便操作、减少菌体流失进而提高菌种生物活性等,并能够增加菌种的耐氧性,消除氧气对固氮酶的抑制,增强对pH的耐受力,易于大规模生产、稳定的运行和便捷有效的控制,成为扩大生产的基础保障^[27-28]。结合国内外的研究成果,其工艺条件可描述为:30~35℃、初始pH 6.0~7.0、光照强度4 000~6 000 lux、保护气为氩气。

3.3 光发酵生物制氢技术的发展趋势

对于光发酵制氢技术的研究依然处于实验室研究阶段,高效产氢菌种的限制是最重要的因素。因此其发展集中在以下几个方面:高效产氢菌种的筛选与培育、底物作用范围广的菌种的筛选与培育、菌种固定化技术的研究与发展、不同类型菌种的协同作用研究等方面。此外,为进一步提高菌种利用生物质等废弃物进行发酵产氢的氢气产量,同时降低环境负荷,暗发酵与光发酵联合制氢也成为研究的热点,因此,光发酵制氢技术的发展也将趋向于与暗发酵制氢技术的耦合等方面,这些还需要进行深入的研究,为大规模工业化的生产奠定基础。

4 联合制氢技术的发展

为了最大限度地提高产氢量和产氢速率,增大底物利用率,以及更好地发挥菌种间的协同作用,联合制氢技术逐渐被人们关注和重视。目前研究的联合制氢技术包括同类群生物联合制氢、光合生物与暗发酵生物联合制氢、暗发酵与光发酵两阶段联合生物制氢、多阶段联合生物制氢等。工业化生产延展性最好的是两阶段和多阶段的联合制氢技术。

暗发酵与光发酵两阶段联合生物制氢技术是将暗发酵与光发酵进行偶联的生物制氢技术。暗发酵的液相末端产物多为乙酸、乙醇、丁酸等小分子有机酸和醇类物质,是光发酵菌种可利用的底物,二者联合起来能够极大地提高底物的利用效率,增大产氢量,实现有机物的高效降解。但能够应用暗发酵液相末端产物的光发酵菌种的选育是一个难题,同时也是制约联合制氢产氢量的关键因素^[29-30]。目前,笔者所在实验室创新性地采用暗发酵的液相末端产物作为菌种筛选培育的营养液,筛选培育出了能够用于光发酵产氢阶段的混合菌种,菌种在合适的光发酵产氢条件下,产氢量能够达到8 mol/mol,两阶段联合产氢量为3.63 mol/mol,拓宽了产氢菌种的

范围,并且进一步提高了产氢量,提高了有机废水的利用率,是环境友好型生物制氢技术的拓展。所筛选出的菌种目前还在进行理化测试和高通量测序阶段,但这在很大程度上拓展了光发酵产氢菌种的来源,结合暗发酵技术在联合制氢过程中给出了新的思路和解决方案。

5 结论与展望

生物制氢技术是制氢技术中起步较晚但发展迅速的技术,无论是光解制氢还是发酵制氢,都在近年来得到了突飞猛进的发展。氢能是解决能源短缺和环境问题的清洁能源,制氢技术的发展对于能源和环境问题具有深刻的意义。纵观制氢技术的发展研究,其未来的发展趋势集中在以下几个方面:进一步研究光发酵产氢菌种的来源和筛选培育方式,与暗发酵过程进行联合,进行菌种的筛选和培育;将筛选出的混合菌种进行分离,得到纯菌种进行专项研究,针对发酵机理进行深入研究,为制氢技术的应用拓展提供支持;扩大制氢技术中工艺与条件的优化范围,进一步拓展其工业化应用范围;设计新的反应器型式,结合新材料和支撑物的研究技术进行反应器的创新研究;进一步放大到大规模的连续性生产阶段,并实行有效的控制。对制氢技术的研究有着很高的挑战,但同时也富有理论研究和实用价值,在可再生能源研究的道路上具有深刻的意义。

参考文献

[1] Eriksen N T, Riis M L, Holm N K, *et al.* H₂ synthesis from pentoses and biomass in *thermotoga* spp[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33 (2): 293 - 300.

[2] Christopher K, Dimitrios R. A review on exergy comparison of hydrogen production methods from renewable energy sources[J]. *Energy and Environmental Science*, 2012, 5: 6640 - 6651.

[3] Chaubey R, Sahu S, James O, *et al.* A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 23: 443 - 462.

[4] Gallucci F, Fernsandez E, Corengia P. Recent advances on membranes and membrane reactors for hydrogen production[J]. *Chemical Engineering Science*, 2013, 92: 40 - 66.

[5] 谭天伟,王芳,邓利. 生物能源的研究现状及展望[J]. *现代化工*, 2003, 23(9): 8 - 12.

[6] Ni M, Leung D Y C, Leung M K H, *et al.* An overview of hydrogen production from biomass[J]. *Fuel Processing Technology*, 2006, 87 (5): 461 - 472.

[7] 刘坤,陈银广,赵玉晓. 暗发酵-光发酵两阶段联合生物制氢技术研究进展[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1145 - 1159.

[8] Türksarlan S, Yücel M, Gündüz U, *et al.* Identification of hydrogenase from *Rhodobacter* species and hydrogen gas production in photobioreactors[A]. In: *Abstract Book, BioHydrogen 2002 Conference* [C]. The Netherlands, 2002: 21 - 24.

[9] Ren H Y, Liu B F, Ding J, *et al.* Enhanced photo-hydrogen production of *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53 by EDTA addition[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37(10): 8277 - 8281.

[10] Rai P K, Singh S P, Asthana R K, *et al.* Biohydrogen production from sugarcane bagasse by integrating dark-and photo-fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 140 - 146.

[11] David B Levin, Richard Chahine. Challenges for renewable hydrogen production from biomass[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(10): 4962 - 4969.

[12] Patra S, Lay C H, Lin C Y, *et al.* Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum* [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(14): 8697 - 8703.

[13] Ren N Q, Li J Z, Li B K, *et al.* Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31(15): 2147 - 2157.

[14] Zhao L, Gao G, Wang A, *et al.* Enhanced bio-hydrogen production by immobilized *Clostridium sp.* T2 on a new biological carrier[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37(1): 162 - 166.

[15] Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1995, (20): 541 - 546.

[16] Xing D F, Ren N Q, Wang A J, *et al.* Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33(5): 1489 - 1495.

[17] Niel E W J Van, Budde M A W, Haas G G De, *et al.* Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii* [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, 27(11/12): 1391 - 1398.

[18] Koskinen P E P, Lay C H, Puhakka J A, *et al.* High-efficiency hydrogen production by an anaerobic, thermophilic enrichment culture from Icelandic hot spring[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(4): 665 - 678.

[19] Zhang Y H P. Renewable carbohydrates are a potential high-density hydrogen carrier [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(19): 10334 - 10342.

[20] Cheong D Y, Hansen C L. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(4): 635 - 643.

(1) 透明质酸-4-聚糖水解酶 (EC3. 2. 1. 35): 主要来源于哺乳动物睾丸、动物毒液及溶酶体, 为内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 并伴有转糖苷酶活性, 通过作用于 β -1, 4 糖苷键可以将 HA 降解为四糖, 同时也可以将软骨素和硫酸软骨素降解为四糖。依据碳水化合物活性酶数据库 (CAZY) 酶学分类标准, 哺乳动物 HAase 属于糖苷水解酶 56 家族^[6], 它对于内切 HA 的 β -1, 4 糖苷键具有随机性, 同时伴随着生成聚合度减少若干单位的全新 HA 链, 由于裂解过程需要同时释放出多个四糖, 哺乳动物 HAase 尚具有转糖苷酶活性, 从而可以更加及时地转移裂解后的四糖, 直到完全生成最终的四糖产物。

(2) 透明质酸-3-聚糖水解酶 (EC3. 2. 1. 36): 主要来源于水蛭与十二指肠虫, 属内切- β -葡萄糖醛酸苷酶, 通过作用 β -1, 3 糖苷键可以特异性降解 HA 为四糖或者己糖, 不能降解软骨素和硫酸软骨素。

(3) 透明质酸裂解酶 (EC4. 2. 2. 1): 微生物来源的 HAase 分布于细菌、病原真菌以及噬菌体中, 既可降解 HA 也可作用于软骨素和硫酸软骨素, 通过 β -1, 4 糖苷键断裂和 β -消去作用可以获得 4, 5-不饱和双糖。细菌 HAase 与哺乳动物 HAase 由于属于不同的 CAZY 家族, 其降解 HA 的过程大不相同^[7], 它内切 HA 的 β -1, 4 糖苷键具有严格的顺序性, 每次内切作用仅仅释放出 1 个单位双糖, 并且伴

随着对侧链基团外切修饰作用, 同时生成减少 1 个双糖单位的全新 HA 链, 整个降解过程非常有序, 直到最终得到 4, 5-不饱和双糖。

1.2 HAase 的来源

HAase 在自然界中的分布比较广泛, 已被发现存在于哺乳动物、无脊椎动物 (甲壳类、水蛭和昆虫)、病原真菌 (念珠菌属、链霉菌属) 以及细菌中。对于哺乳动物 HAase 研究表明, 不同种类哺乳动物来源的 HAase 不同, 同一哺乳动物不同组织部位来源的 HAase 也不同。蛇、黄蜂、蝎子、蜥蜴等动物毒液以及水蛭中也含有 HAase, 故在发起进攻时可以加强其毒液在受害者局部组织间的渗透和扩散^[8]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 已经在链球菌、葡萄糖球菌、肠球菌、厌氧型杆菌以及链霉菌属中发现 HAase 同源性氨基酸序列。

1.2.1 人类 HAase

人类的基因组序列表明人的 HAase 具有 6 个成员基因, 其中 HYAL-1、HYAL-2 和 HYAL-3 3 段基因紧密地定位于染色体 3p21.2, 另外 3 段基因 HYAL-4、HYAL-P1 和 PH-20 紧密地定位于染色体 7q31.3, 然而 6 个亚型基因的序列相似性高达 33% ~ 44%, 形成的原因可能与古老的基因复制过程有关^[9]。HYAL-1 主要分布于哺乳动物的血浆和尿液中, 肝脏、肾、脾以及心脏中也发现有表达, 但含量水平很低且分离纯化比较困难, 近年发展的基

(上接第 46 页)

- [21] Ren N Q, Guo W Q, Wang X J, *et al.* Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33 (16): 4318 - 4324.
- [22] Liu Z, Lv F, Zheng H, *et al.* Enhanced hydrogen production in a UASB reactor by retaining microbial consortium onto carbon nanotubes (CNTs) [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37 (14): 10619 - 10626.
- [23] Peixoto G, Saavedra N K, Varesche M B A. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36 (15): 8953 - 8966.
- [24] Kim E J, Lee M K, Kim M S, *et al.* Molecular hydrogen production by nitrogenase of *Rhodobacter sphaeroides* and by Fe-only hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33 (5): 1516 - 1521.
- [25] Hay J X W, Wu T Y, Juan J C, *et al.* Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen

usage [J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2013, 7 (3): 334 - 352.

- [26] Zheng G H, Kang Z H, Qian Y F, *et al.* Biohydrogen production from tofu wastewater with glutamine auxotrophic mutant of *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Water Dynamics*, 2008, 987 (143): 143 - 148.
- [27] Lin C Y, Lay C H, Sen B, *et al.* Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, 37 (20): 15632 - 15642.
- [28] Fang H H P, Liu H, Zhang T, *et al.* Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005, 30 (7): 785 - 793.
- [29] Chen C Y, Yang M H, Yeh K L, *et al.* Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33 (18): 4755 - 4762.
- [30] Jung K W, Moon C, Cho S K, *et al.* Conversion of organic solid waste to hydrogen and methane by two-stage fermentation system with reuse of methane fermenter effluent as diluting water in hydrogen fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 120 - 127. ■