

微生物制氢工艺优化与生物反应的调控*

广忠勇¹ 陈朋^{1,2Δ} 严晓娟¹ 郭天力¹ 胡先望¹ 梁宁¹

(1 甘肃省商业科技研究所 甘肃 兰州 730010 2 兰州大学生命科学学院干旱与草地生态教育部重点实验室 甘肃 兰州 730000)

摘要 氢作为一种清洁高效的可再生能源日益受到人们的重视。本文从微生物制氢的条件与代谢调控方面探讨了生物制氢的最新进展。目前常用产氢细菌进行了总结,分析了细菌的培养方式和工艺方法,探讨了影响生物制氢的各种因素(pH,温度,基质,离子浓度,反应器等)。在此基础上,阐述了分子生物学技术在生物制氢中的应用及系统代谢调控。最后,对生物制氢今后的主要研究方向及前景进行了展望。

关键词 生物制氢 发酵制氢 条件优化 代谢调控

中图分类号 Q93-3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)02-380-05

Optimality Condition and Metabolic Regulation of Bio-hydrogen*

GUANG Zhong-yong¹, CHEN Peng^{1,2Δ}, YAN Xiao-juan¹, GUO Tian-li¹, HU Xian-wang¹, LIANG Ning¹

(1 Gansu Institute of Business & Technology, Lanzhou 730020, China;

2 Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology of Ministry of Education of School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: As a clean, efficient and renewable energy, hydrogen is regarded as a promising alternative. This review discusses the development of biological hydrogen production from its condition and metabolic regulation. Firstly, this paper summarizes the fermentative microorganism and culture's methods. Secondly, Suitable conditions for the hydrogen-producers (pH, temperature, substrate, ion concentration and the actor). The application and metabolic regulation of Molecular Biological Techniques to biological hydrogen production were analyzed. Finally, the development direction of fermentative hydrogen is listed and the development of the future is expected.

Key words: Biological hydrogen production; Fermentative bio-hydrogen production; Optimality condition; Metabolic regulation

Chinese Library Classification(CLC): Q93-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-380-05

随着世界经济的快速发展和人口的迅速增加,大量开采和使用矿物能源带来的能源短缺和环境污染问题,已促使人类更多地关注对可再生能源和清洁能源的开发和利用。寻找新的可替代能源和开发可再生能源体系是实现社会可持续发展的必然选择^[1]。氢气素有清洁能源之称,在燃烧时只生成水,不产生任何污染物,是一种十分理想的载体。与传统的能源相比,能量密度高,是普通汽油的3倍,热转化效率高,输送成本低,被能源界公认为最具有潜力的新能源之一^[2]。

目前,制氢的方法很多,包括传统的理化法制氢和生物法制氢。传统的理化法制氢有矿物燃料制氢,水电解制氢,太阳能制氢,热化学循环制氢和等离子制氢等。生物法制氢可分为厌氧光合制氢和厌氧发酵制氢两大类。生物法可以利用大量的废水和废渣等废弃物,把废水或废渣的处理和能源回收结合起来,和理化法相比,具有成本低,潜力大的特点,应用前景广阔,已再次成为国际上热衷探索和研究的课题^[3]。

1 生物制氢的影响因素

国内外学者在这方面做了大量的工作,发现不同温度、pH值、培养时间、连续培养时底物流速、接种量、光照强度、搅拌速

度等对不同菌种在发酵不同的底物时的氢气产量均有影响。目前,对细菌发酵产氢的研究大部分集中在底物种类及其浓度、温度、pH值等方面。

1.1 菌株的筛选和改良

目前研究报道较多的制氢微生物主要涉及光合细菌和发酵细菌两类,产氢微生物的研究报道见表1。从表中可以看出,发酵细菌居多,而光合细菌的研究报道较少。

采用基因工程技术对优势产氢菌种进行改造,提高其产氢效率、扩大其可利用底物范围,保证了高效产氢性能的稳定遗传。Akihito Yoshida^[12]等研究了1株转基因改良大肠杆菌SR15利用葡萄糖为基本原料进行生物制氢的实验,结果发现,1mol葡萄糖氢气产量由野生菌的1.08mol提高到1.82mol,产氢速度(以干细胞计,13.4mmol/h·g)是原来的1.4倍。Toshinari Maeda^[13]等将重组子在大肠杆菌中表达,研究其对发酵产氢的影响,结果发现重组菌产氢速度是野生型的4.6倍,1mol葡萄糖氢气产量由野生型的0.65mol提高到1.3mol。Xiaoguang Liu^[14]等利用代谢工程突变技术,删除乙酸激酶基因(the acetate kinase gene, ACK),使丁酸产量由野生型梭菌的0.34g/g葡萄糖提高到突变型梭菌的0.42g/g葡萄糖,氢气产量也比野生型梭

* 基金项目 甘肃省科技支撑项目(0804NKCA114),甘肃省技术研究与开发项目(0912TCYA025, 1004TCYA041),

甘肃省酶制剂生产技术和应用研究创新团队项目(098TTCA013)资助

作者简介 广忠勇,男,(1971-),本科,工程师,研究方向 生物技术。E-mail: RedGene2008@gmail.com

Δ通讯作者 陈朋,男,(1977-),博士,副研究员,研究方向 生物转化与系统生物学。E-mail: chp08@lzu.cn

(收稿日期 2011-05-06 接受日期 2011-05-30)

菌提高了 50%以上。Hongxin Zhao^[15] 等将甲酸盐氢裂解酶 (FHL) 基因组 hycABCDE 的 A5431-bp DNA 片段编码植入产气微生物 IAM1183 染色体内, 其中, 三个变异菌株 I-AM1183-A、IAM1183-O 和 IAM1183-AO 的产氢量分别为 0.73、0.78 和 0.83mol/mol 葡萄糖, 而野生型 IAM1183 产氢量仅为 0.65 mol/mol 葡萄糖, 突变体的代谢产物包括乙酸盐、乙

醇、2,3- 丁二醇和琥珀酸盐都比野生型有所提高。S. Manisha^[16] 等对大肠杆菌生物制氢进行了新陈代谢通量分析(MFA), 结果野生型产氢量为 0.17 mol/mol 葡萄糖, 删除乳酸脱氢酶基因的菌株产氢量上升到 0.23 mol/mol 葡萄糖, MFA 发现乙醇和醋酸盐对产氢是必要的, 而琥珀酸和乳酸对产氢没什么影响。

表 1 产氢微生物的种类
Table 1 Types of hydrogen-producing microorganisms

中文名 Chinese name	拉丁名 Latin name	分类 Sort	参考文献 Reference	出版时间 Publish time
荚膜红细菌	Rhodobacter sphaeroides	光合细菌 Photosynthetic bacteria	[4]	2007
万尼氏红螺菌	Rhodospirillum vannielii		[3]	2007
紫色非含硫菌 W-1S	Rhodovulum Sulfidophilum W-1S		[5]	2008
深红螺菌	Rhodospirillumrubrum		[6]	2007
沼泽红假单胞菌	Rhodopseudomonas palustris		[5]	2007
巴氏梭菌	Clostridium	发酵细菌 Fermenting bacteria	[4]	2007
高温梭菌	C. thermolacticum		[5]	2007
丁酸梭状杆菌	Clost ridium butyricum		[5]	2007
丙酮丁醇梭菌	Clostridium acetobutylicm		[1]	2008
丁酸梭状杆菌	Clostridium butyricum W5		[7]	2008
类腐败梭状芽孢杆菌	Clostridium paraputrificum M221		[8]	2004
酪丁酸梭菌	Clostridium tyrobutyricum JM1		[9]	2008
酪丁酸梭状芽孢杆菌	clostridium butyricum		[5]	2007
产气肠杆菌	Enterobacter aerogenes		[10]	2008
热解糖高温厌氧杆菌	Thermoanaerobacterium sp.		[11]	2007
乙醇杆菌	Ethanoligenens sp. B49		[32]	2007
大肠杆菌	Escherichia coli		[34]	2009
丙酮丁醇梭菌	C. acetobutylicum M121		[36]	2007

1.2 pH 值

在发酵制氢过程中, 若 pH 值过高会有大量的甲烷形成, 导致产氢率较低。但是过低的 pH 会使细胞体内的 pH 值偏离正常生理条件(一般为 6-7), 而失去产氢活性。发酵制氢微生物一般在酸性环境下产氢(pH=4.5-6.5), 而光合细菌在 pH 高于 7 时依旧产氢^[17]。有研究表明 pH=5.5 是发酵产氢微生物的最适

pH^[18]。而 Samir Kumar Khanal^[19]的研究则认为当起始 pH=4.5 时产氢潜力达到最大, 但是产氢率最低, 当起始 pH 较高时, 虽然有较高的产氢率但产氢的持续时间会变短, 认为最适 pH=5.5-5.7。Wen-Hsing Chen^[20]等用 ASBR 研究 pH 对发酵制氢的影响时, 证明 pH=4.9 是最适 pH。

表 2 发酵产氢的最适 pH 值^[11]
Table 2 The optimal pH of fermentative hydrogen production

细菌 Bacteria	最适 pH Best PH
Clostridium sp.	4.5-6.0
Thermoanaerobacterium sp.	6.5-7.0
Enterobacter aerogenes	6.0-6.5
Citrobacter sp.	7.0
Rhodobacter sp.	7.5

1.3 温度

发酵产氢过程中,温度可直接对氢气的产量、产氢系统的稳定性产生影响。发酵产氢可以在多种温度下进行 20℃, 30℃, 35℃和 55℃, 氢气的产量随着温度升高而提高^[17]。任南琪等^[21]进行的混合菌产氢实验表明,在 29℃-35℃下,产氢率随温度升高而提高。

此外还有一些关于对菌种高温预处理的报道。Bita Baghchehsaraee^[22]等分别对活性淤泥和厌氧淤泥在 60℃, 80℃和 95℃下进行预处理。预处理的菌种主要代谢物为乳酸,产生的氢气量高于未处理菌种。处理温度从 65℃升到 95℃时氢气产量增加了 15%。

1.4 发酵产氢基质

发酵产氢的连续性依赖于使用的基质,基质的理化性质在很大程度上决定了发酵过程的效率。目前发酵制氢使用的基质的种类主要有 纯培养基(葡萄糖,蔗糖,淀粉,纤维素),能源作物,固体废弃物(食物残渣等)和工业废水。

因为纯培养基比较简单,代谢过程研究的比较清楚,因而主要用于理论研究。但是因为纯培养成本太高,很难用于产业化生产。曾有过利用能源作物制氢的报道。例如 Ntaikou I^[23]等的研究证明 *Ruminococcus albus* 可以利用能源作物(高粱)里的自由糖,纤维素和半纤维素产生氢气。Muhammad Farhan A-rooj^[24]等则利用淀粉作为基质进行了研究。

1.5 金属离子浓度

任南琪等^[21]在研究几种金属离子浓度对一株高效产氢细菌产氢能力的影响时发现,Fe²⁺、Ni²⁺和 Mg²⁺对产氢有促进作用。铁是大多数细菌生长的必要因素,镍是某些酶的必要成分,但浓度较高时有较强的毒性,镍不仅是许多酶的辅助成分和细胞壁、细胞膜的组分,而且它对一些重金属(如钴)的毒性有抵抗作用。

Heguang Zhua^[25]研究了以乳酸钠为基质时亚铁离子(0-3.2mg/L)对光合发酵产氢的影响。结果表明当缺乏 Fe²⁺时 *Rhodobacter sphaeroides* 的产氢量大量减少。当铁离子浓度从 0-1.6 mg/L 逐渐上升时,氢气产量逐渐增加。

1.6 混合细菌发酵产氢过程中彼此之间的协同作用

混合细菌产氢量较纯菌大,产氢能力较纯菌强,这是因为,多种类细菌间发生了协同效应,使代谢产物不易积累,相互创造有利的生存环境,使各菌的代谢活性充分发挥,提高了产氢能力,增加了产氢量^[26]。但是实际操作过程中发现,混合细菌发酵制氢过程中彼此之间的抑制、发酵末端产物对细菌的反馈抑制等现象使得效果不明显甚至出现产氢效率偏低的问题。

2 生物反应的调控

通过实际运行形成与所开发的高效产氢菌种相配套的生物反应器技术,在分子生物学水平上,阐明生物产氢系统中微生物种群结构、功能及其结构变化规律,从而建立相应的调控方法。

国内外学者在这方面做了大量的研究。Jamila Obeid^[29]等通过批培养方式建立了光合细菌 *Rhodobacter capsulatus* 的产氢动力学模型,研究了底物利用率、生物量构成形式以及产氢量,模型的建立有助于生物产氢自动化控制和生物制氢质量与数

量最佳参数的确定。Jianlong Wang^[30]等基于发酵产氢过程多种影响因素设计实验方案,使用软件分析各影响因素,提出了一种分析发酵产氢过程的最优实验设计。Xu Li^[31]等研究了光照强度和培养方式对 *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 产氢能力的影响,结果发现,摇瓶培养、光照强度 7000-8000 lux 条件与静置培养、光照强度 4000-5000 lux 条件相比,氢气最大产量和产氢平均速率分别提高了 59%和 56%。Xu Wang^[32]等用二维流体力学模拟了气-液-固三相在延伸的粒状淤渣床反应器的生物制氢情况(EGSB),模型显示在流体力学和产氢能力二者间存在定性关系,液压保留时间(HRT)是生物制氢的一个临界因子。You-Kwan Oh^[33]等通过代谢反应模型分析了 *Citrobacter amalonaticus* Y19 产氢代谢途径,当细胞的比生长速率作为目标函数时,模型很好地描述了 *Citrobacter amalonaticus* Y19 的一次性培养参数;当产氢率作为目标函数时,H₂产量达到 8.7mol/mol 葡萄糖。Shiue-Lin Lia^[34]等对厨房废弃物厌氧氢气发酵的间歇-连续搅拌器(I-CSTR)进行了工艺性能评价,研究发现,工艺过程中第三周期比第二周期产氢速率高 27mmol/L/天,到第四周期,产氢速率为 118 mmol/L/天,达到最大值,而液压保留时间开始下降。ZhenPeng Zhang^[35]等研究了 pH5.5、温度 37℃条件下生物膜污泥和粒状污泥两个反应器的液压保留时间(HRT)和葡萄糖浓度对产氢的影响,结果发现,两种反应器中氢气产量在 0.4-1.7 mol/mol 葡萄糖之间,在相同的 HRT 和葡萄糖浓度条件下,在生物膜反应器和颗粒反应器中产氢率分别为 7.6 和 6.6 L-H₂/L·h,均达到了最大值。Jianzheng Li^[36]等研究发现在厌氧隔板反应器中,产氢具有更好的操作稳定性和微生物活性,使得培养基转化率和产氢能力都有所提高。此反应属于乙醇发酵类型,乙醇在三个隔板中的含量分别为 1254、2053、和 2761mg/L。第一个隔板的产氢量最小,但驯化期最长,第二和第三个隔板的产氢量较高,但驯化期较短。在稳定的操作条件下,产氢量为 32.051L/d,产氢率为 0.13 L/d MLVSS d,培养基转化率为 0.13 L/d COD。Xiao Wu^[37]等研究了液体猪肥发酵产氢,通过厌氧连续培养,在 37±1℃、pH5.0 条件下,液压保留时间(HRT)从 24h 降到 8h,产氢量从 0.05 L/h/L 升高到 0.15 L/h/L 并且发现 HRT 在 12h 时,产氢量最大,产氢速率最快。Dong-Hoon Kim^[38]等通过早期将批培养转化为连续培养,研究产氢细菌的持续发酵产氢。第一阶段,H₂产量为 0.5mol H₂/hexose,从批培养转化为连续培养后,产氢量持续在 12h,但是丙酸盐产量有所下降。第二阶段,在持续产氢 10 天的时候,氢气产量出现波动,但是最终稳定在 0.8 mol H₂/hexose,乙醇生产数据显示在第二阶段氢气产量早期波动是由于产氢微生物的自解机制产生的。Liliana^[39]等利用有机固体废物和有机废水发酵产氢,试验中使用非厌氧微生物群为接种物,采用两种厌氧系统,一个是容积为 19.4L 的固体床反应器耦合(PBR),另一个是容积为 3.85L 的上流式厌氧污泥床(UASB)。当液压保留时间(HRT)为 24h 时,在 UASB 中产氢比例达到 51%v/v 和 127NmL H₂/gvs,在 HRT 为 50 天、有机负荷率为 16gvs 时,在 PBR 中产氢比例达到 47%v/v 和 99 NmL H₂/gvs。S. Jayalakshmi^[40]等研究了厨房废弃物发酵产氢,在斜推流反应器中固态厌氧培养 21 天、pH5.6、温度 100℃条件下,能够获得 40%VS 消化物并且在原来基础上增加了 72mL H₂/g VS,反应器中主要

的可溶性代谢物为丁酸 (45-50%)、乙酸 (20-30%) 和丙酸 (10-20%)。E. Navarro^[41]等利用代谢通量分析(MFA)研究 *Synechocystis* sp. PCC6803 的氢光致产生,它以文献资料和多种基础通量评估系统中多种不同生长条件下的产氢情况,将一系列的生物技术和数学分析相结合,用于找到一个可行的产氢操作范围,以避免氧气的抑制。

目前主要应用的生物反应器有连续搅拌反应器 (CSTR)和上流式厌氧污泥床(UASB)。Zhang H^[27]等进行了不饱和喷淋床反应器的研究。Dong-Yeol Lee^[28]等利用生物膜反应器(MBR)和CSTR 反应器在同等条件下进行了比较,结果证明 SRT 为 90 天时,MBR 的氢气产量为 2.43-2.56 H₂ / L / 天,是 CSTR 氢气产率的 2.6 倍。

3 研究重点和方向

目前,虽然关于生物制氢的研究很多,但是只有很少实验性大规模生产,还没有产业化应用的报道。目前关于生物制氢的研究主要集中在以下几个方面:

3.1 高产菌株的选育

微生物在产氢方面存在较大差异,筛选合适的发酵产氢微生物是制氢的关键之一。由于菌种筛选工作量大,任务繁重,目前还未能找到一种或一类能够实现持续高效稳定的产氢微生物。

目前国外的研究方向主要集中在通过基因工程改菌种性能。基因工程的方向主要为:

- 1) 通过纤维素酶和半纤维素酶的高效表达增加基质的使用率;
- 2) 可以耐受氧气的氢化酶的高效表达;
- 3) 减少抑制氢气产生所需的物质生成的代谢过程^[42]。

3.2 发酵细菌产氢的稳定性和连续性

利用发酵型细菌产氢虽然在我国取得了长足的进步,但是产氢的稳定性和连续性问题一直是困扰制氢工业化的一个很大障碍。目前国内外利用固定化技术对生物发酵产氢的研究较多,但大多数仍然以纯菌种为主,由于纯菌种的固定化处理对技术要求高,抗污染能力低,难以满足实际应用,因而增加了生物制氢的难度与成本。通过菌种固定化、酶固定化技术处理底物发酵产氢具有广阔的前景^[43]。

3.3 原料利用种类的研究

目前关于发酵基质的研究很多,所用的原料大多数为糖和淀粉,包括含有这些简单碳水化合物有机废水作为底物,所培养出来的产氢菌底物利用范围有限,将其用于降解其他类物质时,底物转化效率和产氢速率受到极大影响,这成为了厌氧产氢微生物进行更加广泛工业化应用的一个瓶颈。

因为氢气是甲烷的一个原料,在发酵制氢过程中氢气常被产甲烷细菌等消耗产生甲烷,这大大减少了氢气的产量。同时,因为氢气只能从碳水化合物制得,很多基质都无法在生物制氢中应用。如果诸如蛋白质和脂肪等基质可以应用,生物制氢的效率可以得到很大提高。同时基质的处理方法应更廉价、有效。据报道,原料的浓度对氢气的产量也会有影响。Zhi Li^[44]等在研究 pH 和基质浓度对以葡萄糖为原料的厌氧发酵的影响时,把葡萄糖浓度分为 5.0g、7.5g、10.0g、20.0g/L 葡萄糖进行了研究。

结果表明 7.5g/L 葡萄糖为最适浓度。

3.4 菌种预处理

菌种预处理的目的是除去产甲烷微生物等的活性。目前关于菌种预处理的研究主要集中在酸处理,热处理,超声波处理等。Bo Hu, Shulin Chen 用三氯甲烷处理菌种,证明在处理颗粒基质时三氯甲烷更加有效^[45]。

生物制氢所用的原料是城市污水、生活垃圾、动物粪便等有机废物,在获得氢气的同时净化了水质,达到保护环境的作用。因此无论从环境保护,还是氢内燃机巴士,从新能源开发的角度来看,生物制氢都具有很大的发展前途与科研投入价值。

从目前研究状况来看,经过国内外科研机构多年来对生物制氢系统的不断深入研究,积累了大量的生物信息与数据,如何从系统生物学的研究思路,运用相关研究工具,对现有知识进一步挖掘与重建,构建生物制氢系统模型,研究制氢微生物的代谢调节机制,建立生物制氢系统生物学平台,将为进一步合理设计及大规模工业化应用提供平台与支持,对突破现有生物制氢研究水平,提升制氢系统能力具有重要的研究意义。

目前报道的最大的氢气产量为 7.1 mol H₂/mol 葡萄糖^[17],依然有很大的空间有待于进一步提高,纵观整个生物制氢系统,对于产业化应用最大的瓶颈是氢气的产量和产氢率。厌氧发酵生物制氢较光合生物制氢更易实现大规模工业化生产,是一项集环境效益、社会效益和经济效益于一体的新型环保产业,我们在此方面正在进行相关的系统生物学研究,结合混合制氢的技术,构建以生物制氢系统为基础研究平台,指导混合发酵体系的设计的生物制氢反应器处理有机废物产氢,实现废物利用,改善环境的有效手段,是制氢工业的发展方向,将拥有着广阔的社会和经济前景。

参考文献 (References)

- [1] 蒋志城. 生物发酵制氢技术的研究及进展 [J]. 浙江化工, 2008, 39 (02): 14-17
Jiang Zhi-cheng. Research and Development of Hydrogen Production by Fermentation Technology [J]. Zhejiang Chemical Industry, 2008, 39 (02): 14-17
- [2] 尹爱国, 林汉森. 生物制氢的研究现状及前景 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13 (2): 51-53
Yin Ai-guo, Lin Han-sen. Present research Situation and Application Prospect of Hydrogen Production by Biotechnology [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13 (2): 51-53
- [3] 汤桂兰, 孙振钧. 生物制氢技术的研究现状与发展 [J]. 生物技术, 2007, 01: 93-96
Tang Gui-lan, Sun Zhen-jun. Study and Development of Hydrogen Production by Biological Technology [J]. Biotechnology, 2007, 01: 93-96
- [4] Herbert H.P. Fangb, Tong Zhangb, Lee A. Beaudettec. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodospirillum rubrum* [J]. International journal of hydrogen energy, 2007, 32: 4112-4118
- [5] 易艾琼. 有机垃圾厌氧发酵产氢技术研究进展 [J]. 河北化工, 2007, 03: 28-30
Yi Ai-qiong. Research on the Technology Biohydrogen Production by Anaerobic Fermentation [J]. Hebei Chemical Engineering and Industry, 2007, 03: 28-30
- [6] 王娜, 杨涛, 韩静, 等. 厌氧发酵生物制氢的研究进展及应用前景 [J].

- 中国农学通报,2008,24:454-456
- Wang Na, Yang Tao, Han Jing, et al. Present Research Situation and Application Prospect of Hydrogen Producing-by Biotechnology of Anaerobic Fermentation [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008,24:454-456
- [7] Xiaoyi Wang, Bo Jina, Dennis Mulcahy. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5 [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 4998-5005
- [8] 卢元, 邢新会. *Clostridium paraputrificum* M221 发酵制氢培养条件研究[J]. 生物加工过程, 2004, 02: 41-45
- Lu Yuan, Xing Xin-hui. Effect of cultivation conditions on hydrogen production by *Clostridium paraputrificum* M-21 [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2004, 02: 41-45
- [9] Ji Hye Jo, Dae Sung Lee, Donghee Park, et al. Statistical optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by newly isolated *Clostridium tyrobutyricum* JM1 [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 5176-5183
- [10] 刘婧. 一株厌氧发酵菌 *Biolog* 鉴定及利用不同碳源对产氢的影响 [J]. 环境研究与监测, 2008, 01: 11-13
- Liu Jing. Certificate of one anaerobic fermentation bacterium *Biolog* and affection to produce hydrogen using different carbon source [J]. Environmental research and monitor, 2008, 01: 11-13
- [11] Jana Zabranska, Piet N. L. Lens. Developments and constraints in fermentative hydrogen production [J]. 2007: 201-214
- [12] Akihito Yoshida, Taku Nishimura, Hideo Kawaguchi, et al. Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh*- and *frd*-inactivated *Escherichia coli* strains [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2006, 73: 67-72
- [13] Toshinari Maeda, Viviana Sanchez-Torres, Thomas K. Wood. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 77: 879-890
- [14] Xiaoguang Liu, Ying Zhu, Shang-Tian Yang. Construction and Characterization of *ack* Deleted Mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for Enhanced Butyric Acid and Hydrogen Production [J]. Biotechnology Progress, 2006, 22: 1265-1275
- [15] Hongxin Zhao, Kun Ma, Yuan Lu. Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H_2 -uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production [J]. International journal of hydrogen energy, 2009, 34: 186-194
- [16] S. Manisha, K.V. Venkateshb, Rangan Banerjeea. Metabolic flux analysis of biological hydrogen production by *Escherichia coli* [J]. International journal of hydrogen energy, 2007, 32: 3820-3830
- [17] Debabrata Das, T. Nejat Veziroglu. Advances in biological hydrogen production processes [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 6046-6057
- [18] D. Sivaramakrishna, D. Sreekanth, V. Himabindu, et al. Biological hydrogen production from probiotic wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed microflora [J]. Int J Renewable Energy, 2009, 34: 937-940
- [19] Samir Kumar Khanal, Wen-Hsing Chen, Ling Li, et al. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products [J]. International journal of hydrogen energy, 2004, 29: 1123-1131
- [20] Wen-Hsing Chen, Shihwu Sung, Shen-Yi Chen. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects [J]. International journal of hydrogen energy, 2009, 34: 227-234
- [21] 林明, 任南琪, 王爱杰, 等. 混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用 [J]. 环境科学, 2003, (02): 54-59
- Lin Ming, Ren Nan-qi, Wang Ai-jie, et al. Cooperation of Mixed Culturing Bacteria in the Hydrogen Production by Fermentation [J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2003, (02): 54-59
- [22] Bitar Baghchehsaraee, George Nakhla, Dimitre Karamanev, et al. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 4046-4073
- [23] Ntaikou I, Gavala HN, Komaros M, et al. Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus* [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 1154-1163
- [24] Muhammad Farhan Arooj, Sun-Kee Han, Sang-Hyoun Kim, et al. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 3289-3294
- [25] Heguang Zhua, Herbert H.P. Fang, Tong Zhangb, et al. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. International journal of hydrogen energy, 2007, 32: 4112-4118
- [26] 刘波, 王海岩, 赵静玫, 等. 几株产氢微生物的产氢能力及协同作用 [J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(08): 23-26
- Liu Bo, Wang Hai-yan, Zhao Jing-mei, et al. Ability of Hydrogen Production by Three Strains and Their Synergistic Effect [J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(08): 23-26
- [27] Zhang H, Bruns MA, Logan BE. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor [J]. Water Res, 2006, 42: 73-78
- [28] Dong-Yeol Lee, Yu-You Li, Tatsuya Noike. Continuous H_2 production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor [J]. Bioreactor Technology, 2009, 100: 690-695
- [29] Jamila Obeid, Jean-Pierre Magnin, Jean-Marie Flaus, et al. Modelling of hydrogen production in batch cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* [J]. International journal of hydrogen energy, 2009, 34: 180-185
- [30] Jianlong Wang, Wei Wan. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review [J]. International journal of hydrogen energy, 2009, 34: 235-244
- [31] Xu Li, Yong-Hong Wang, Si-Liang Zhang, 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: 9677-9685
- [32] Xu Wang, Jie Ding, Nan-Qi Ren, et al. CFD simulation of an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor for biohydrogen production [J]. International journal of hydrogen energy, 2009, 34: 9686-9695
- [33] You Kwan Oh, Heung Joo Kim, Sunghoon Park, et al. Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19 [J]. International journal of hydrogen energy, 2008, 33: 1471-1482

- LÓ pez-Casillas, et al. The Shedding of Betaglycan Is Regulated by Pervanadate and Mediated by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(9):7721-7733
- [10] Gerard C. Blobe, William P. Schiemann, Marie-Claude Pepin, et al. Functional Roles for the Cytoplasmic Domain of the Type III Transforming Growth Factor β Receptor in Regulating Transforming Growth Factor β Signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001,276 (27): 24627-24637
- [11] Gerard C. Blobe, Xuedong Liu, Shijing J. Fang, et al. A Novel Mechanism for Regulating Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(43): 39608-39617
- [12] José Esparza-Ló pez, José Luis Montiel, M. Magdalena Vilchis-Landeros et al. Ligand Binding and Functional Properties of Betaglycan, a Co-receptor of the Transforming Growth Factor- Superfamily[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(18):14588-14596
- [13] Hye Jin You, Monique W. Bruinsma, Tam How, et al. The type III TGF- β receptor signals through both Smad3 and the p38 MAP kinase pathways to contribute to inhibition of cell proliferation[J]. *Carcinogenesis*, 2007,28(12):2491-2500
- [14] Nadine Hempel, Tam How, Mei Dong, et al. Loss of Betaglycan Expression in Ovarian Cancer: Role in Motility and Invasion[J]. *Cancer Research*, 2007,67(11):5231-5238
- [15] Tracy L. Criswell and Carlos L. Arteaga. Modulation of NFB Activity and E-cadherin by the Type III Transforming Growth Factor Receptor Regulates Cell Growth and Motility [J]. *J Biol Chem*, 2007,282(44): 32491-32500
- [16] Yogeshwar Makanji, Craig A. Harrison, Peter G. Stanton, et al. Inhibin A and B in Vitro Bioactivities Are Modified by Their Degree of Glycosylation and Their Affinities to Betaglycan[J]. *Endocrinology*, 2007,148(5):2309-2316
- [17] Daniel J. Bernard, Stacey C. Chapman and Teresa K. Woodruff. Minireview: Inhibin Binding Protein (InhBP/p120), Betaglycan, and the Continuing Search for the Inhibin Receptor [J]. *Molecular Endocrinology*, 2002,16(2):207-212
- [18] Peter J. Fuller, Emma T. Zumpe, Simon Chu. Inhibin-Activin Receptor Subunit Gene Expression in Ovarian Tumors [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002,87(3):1395-1401
- [19] Jianqi Liu, Tiina Kuulasmaa, Veli-Matti Kosma, et al. Expression of Betaglycan, an Inhibin Coreceptor, in Normal Human Ovaries and Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors and Its Regulation in Cultured Human Granulosa-Luteal Cells[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003,88(10):5002-5008
- [20] Maree Bilandzic, Simon Chu, Paul G. Farnworth. Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells[J]. *Molecular Endocrinology*, 2009,23(4):539-48
- [21] Yuki Omori, Kazuto Nakamura, Soichi Yamashita, et al. Effect of Follicle-Stimulating Hormone and Estrogen on the Expression of Betaglycan Messenger Ribonucleic Acid Levels in Cultured Rat Granulosa Cells[J]. *Endocrinology*, 2005,146(8):3379-3386
- [22] Hempel N, How T, Cooper SJ, et al. Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta[J]. *Carcinogenesis*, 2008,29(5):905-912

(上接第 384 页)

- [34] Shiue Lin Lia, Shih Chiang Kuoa, Jian Sheng Lin, et al. Process performance evaluation of intermittent-continuous stirred tank reactor for anaerobic hydrogen fermentation with kitchen waste [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2008,33:1522-1531
- [35] Zhen-Peng Zhang, Kuan-Yeow Show, Joo-Hwa Tay. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based systems [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2008,33:1559-1564
- [36] Jianzheng Li, Baikun Li, Gefu Zhu, et al. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR)[J]. *International journal of hydrogen energy*, 2007,32:3274-3283
- [37] Xiao Wu, Jun Zhua, Chunying Donga, et al. Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2009,34:6636-6645
- [38] Dong-Hoon Kim, Sang-Hyoun Kim, In-Beom Ko, et al. Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover from batch to continuous operation[J]. *International journal of hydrogen energy*, 2008,33:1532-1541
- [39] Liliana M. Alzate-Gaviriaa, P.J. Sebastiana, Antonino Pérez-Hernández, et al. Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2007,32:3141-3146
- [40] S. Jayalakshmi, Kurian Joseph, V. Sukumaran. Bio hydrogen generation from kitchen waste in an inclined plug flow reactor [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2009,34:8854-8858
- [41] E. Navarro, A. Montagud, P. Fernández de Córdoba. Metabolic flux analysis of the hydrogen production potential in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2009, 34: 8828-8838
- [42] David B. Levin, Lawrence Pitt, Murray Love. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical[J]. *International journal of hydrogen energy*, 2004, 29: 173-185
- [43] 宋丽, 刘晓风, 袁月祥, 等. 厌氧发酵产氢微生物的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2008,24: 933-939
- Song Li, Liu Xiao-feng, Yuan Yue-xiang, et al. Progress on Hydrogen-production Microorganisms by Anaerobic Fermentation [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008,24: 933-939
- [44] Zhi Li, Hui Wang, Zongxun Tang, et al. Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose [J]. *International journal of hydrogen energy*, 2008, 33:7413-7418
- [45] Hu B, Chen S L. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation [J]. *Int J Hydrogen Energy*, 2007,32(15): 3266-3273