

综述

“双碳”下金属纳米颗粒优化暗发酵制氢策略及前景

李亮荣^{1,2}, 陈镇¹, 杨小喆¹, 江文丹¹, 邹子怡¹, 付兵^{1*}

(1. 南昌大学 抚州医学院, 江西 抚州 344000; 2. 抚州市 AI 药物技术创新中心, 江西 抚州 344000)

摘要: 氢能是“双碳”下推动化石能源低碳转型的重要方向, 推动绿氢技术的发展仍面临诸多挑战, 微生物暗发酵制氢是实现生物质绿氢转化的有效途径。其中, 利用具有量子尺寸效应、比表面积大和电导率高的金属纳米颗粒(MNPs)优化暗发酵制氢技术是近年来的研究热点。综述和评论了国内外添加 MNPs 用于优化暗发酵制氢性能的作用机制、技术难点和制氢效果等, 重点阐述并比较了铁、镍和锌基三类热门 MNPs 优化策略在提高产氢酶系活性、增强代谢产氢途径和优化微生物群落结构等方面的作用, 展望了暗发酵制氢可深入 MNPs 优化氢化酶活性、拓宽生物质发酵底物以及产氢菌筛选和反应器设计、生物质发酵技术开发等研究方向和应用前景。

关键词: 双碳; 金属纳米颗粒; 暗发酵; 制氢; 绿氢

中图分类号: TQ116.2; TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2024) 03-0542-16

Optimization and prospect of dark fermentation hydrogen production strategy by metal nanoparticles under "double carbon"

LI Liangrong^{1,2}, CHEN Zhen¹, YANG Xiaozhe¹, JIANG Wendan¹, ZOU Ziyi¹, FU Bing^{1*}

(1. Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344000, Jiangxi, China; 2. Fuzhou Innovation Center for AI Drug, Fuzhou 344000, Jiangxi, China)

Abstract: Hydrogen energy is an important direction to promote the low-carbon transformation of fossil energy under "double carbon". Though development of green hydrogen technology still faces many challenges, microbial dark fermentation is an effective way to achieve green hydrogen conversion of biomass. The use of metal nanoparticles (MNPs) with quantum size effect, large specific surface area and high conductivity to optimize dark fermentation hydrogen production technology is a research hotspot in recent years. In this review, the mechanism, technical difficulties and effects of MNPs on optimization of the hydrogen production performance by dark fermentation at home and abroad were summarized and discussed. The effects of three popular MNPs optimization strategies of iron, nickel and zinc on improving the activity of hydrogenase system, enhancing the metabolic hydrogen production pathway and optimizing the microbial community structure were then emphatically described and compared. Finally, the research directions and application potential of dark fermentation hydrogen production were prospected, such as optimizing the activity of hydrogenase by MNPs, broadening the substrate of biomass fermentation, screening and reactor design of hydrogen-producing bacteria, and developing biomass fermentation technology.

Key words: double carbon; metal nanoparticles; dark fermentation; hydrogen production; green hydrogen

氢能是一种来源广泛、清洁零碳、灵活高效且应用场所丰富的二次能源, 具有科技含量高、覆盖

范围广、产业链条长、社会经济效益明显, 对降低能源转型社会成本、推动国家深度脱碳, 构建安全

收稿日期: 2023-04-26; 定用日期: 2023-06-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230354

基金项目: 江西省教育厅科技项目 (GJJ2203405); 抚州市科技指导项目 (20220906); 南昌大学抚州医学院重点科技项目 (FYKJ-202203)

作者简介: 李亮荣 (1986—), 男, 副教授, E-mail: ncurong@163.com。联系人: 付兵 (1989—), 男, 讲师, E-mail: fubing20150701@163.com。

清洁能源体系等方面具有重要意义。中国“3060”双碳文件《2030年前碳达峰行动方案》提出,氢能的开发利用和技术研发是实现中国能源战略转型、优化能源消费结构和保障能源安全的必经路之一,是实现工业、交通运输和建筑等领域向低碳化发展的重要战略方向^[1-3]。截至2020年,中国各行业 H_2 年需求量>3000万t,预计到2060年,将猛增至13030万t,且 H_2 的供给量也将名列世界前茅。截至2022年, H_2 产量已高达2200万t(图1a),而绿色氢能作为中国“双碳”战略和“十四五”可再生能源发展规划的重要发展方向,其占比却不到产量的1‰,绿氢技术缺乏及生产成本等仍是制约中国氢能发展的关键。为满足各行业日益增长的 H_2 供应及“双碳”政策需求,亟需解决绿氢技术多元发展中存在的系列问题。因此,针对绿色制氢原料和途径、制氢催化剂和载体、制氢机制和条件等相关技术的深入研究极其重要。

绿氢是以风能、水能、太阳能、生物质能等可再生能源制取 H_2 (图1b)。其中,生物质是利用光

合作用提供能量而形成的一类有机体,具有来源广泛、产量巨大且可再生的优点,以农作物及其残渣、动物粪便、城市生活污水等形式存在,主要包括原始生物质(陆生、水生生物质等)和生物质废料(农业固体废料、工业废物等)等^[4-5](图1c)。中国具有大量的生物质废料资源和发展空间,目前各类生物质废料保守估计高达50亿t/a,产生的总能量接近全球消耗量的6倍^[6]。这些生物质如果没有得到妥善处理,不仅给环境、社会 and 居民身心健康带来巨大危害,还不能充分地循环利用资源,不符合国家“双碳”总体战略。因此,如何将这些生物质“变废为宝”,成为当今学术和工业领域亟需解决的棘手问题。中国在生物乙醇、生物柴油、生物发电、生物汽化等生物质应用领域虽然取得了显著的进步,但这些领域产生的大量糖类、醇类、酚类、酸类等生物质衍生物并没有得到很好的利用,如果能够合理利用这些糖类等生物质衍生物,将其作为原料来制取 H_2 ,将进一步实现生物质的低碳转化且变废为宝。

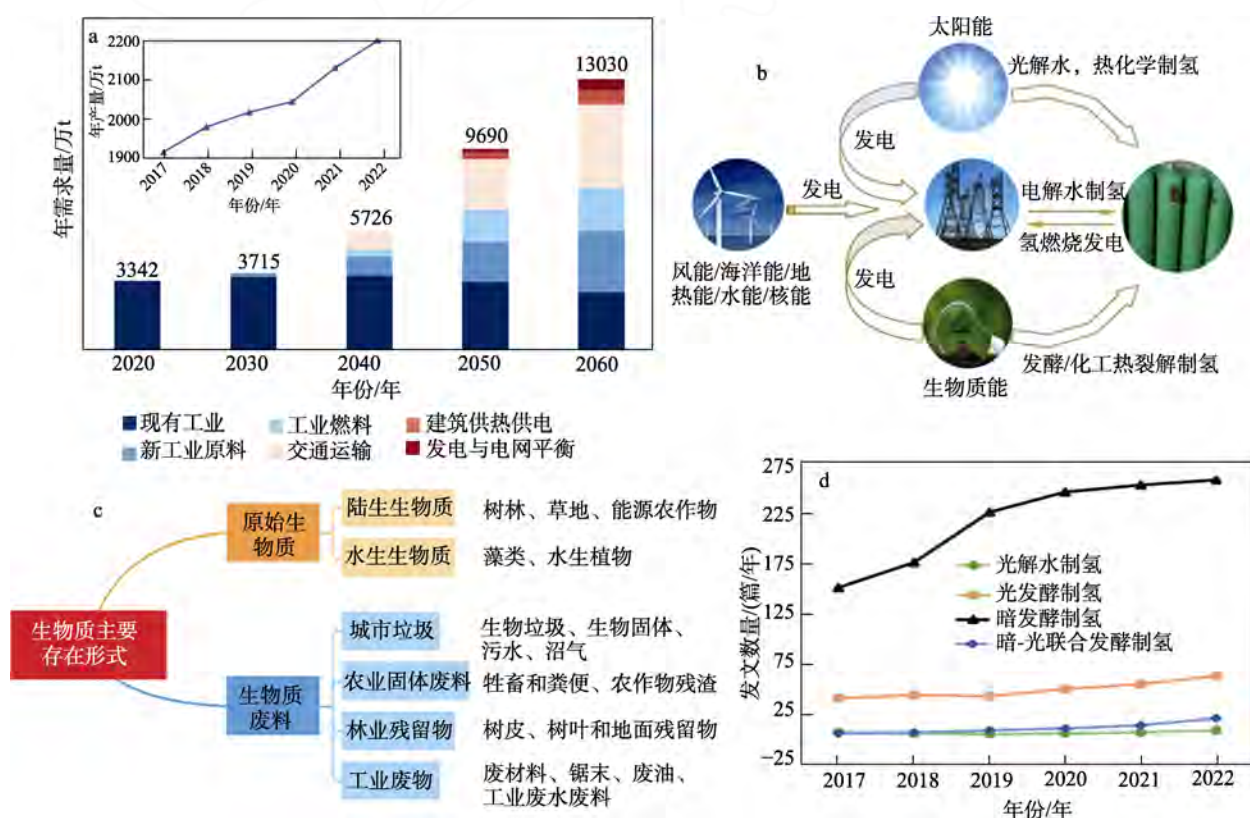


图1 中国 H_2 近年来年产量和未来各领域需求量趋势(a);绿氢的主要制备途径(b);自然界中生物质的主要存在形式(c);近六年国内外微生物制氢技术发文趋势(d)

Fig. 1 China H_2 production in recent years and future demand trends in various fields (a); Main preparation methods of green hydrogen (b); Main forms of biomass in nature (c); Published paper trend of microbial hydrogen production technology in recent six years at home and abroad (d)

目前,制氢方法主要包括化石能源制氢、电解水法制氢和生物质法制氢等^[7-8]。其中,化石能源制

氢工艺成熟且成本低廉,适合大规模制氢,但气体杂质多、碳排放和常规污染物排放量大,不符合清

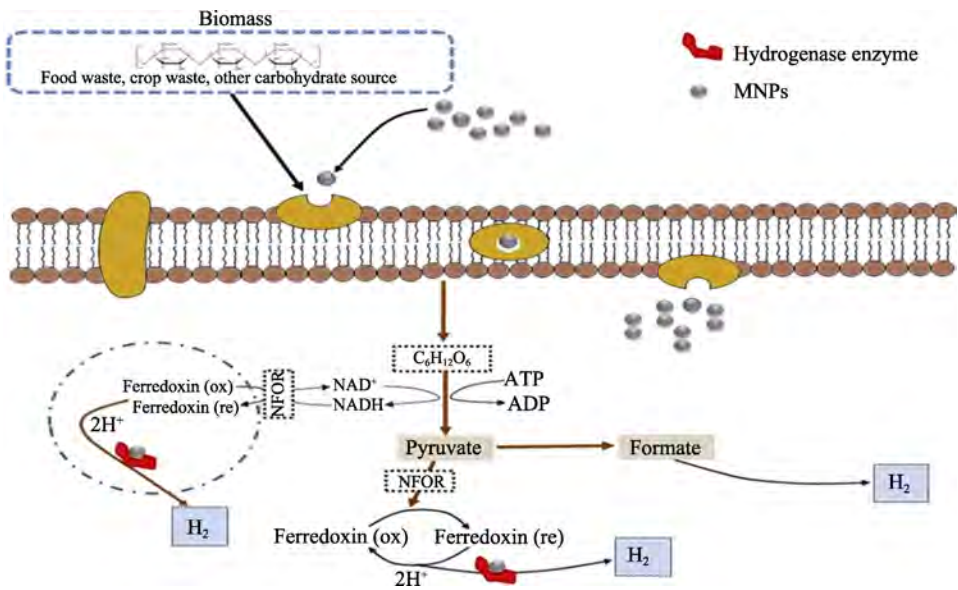
洁低碳的绿氢要求；电解水法制氢具有生产灵活、污染少、产氢纯度高等优点，但目前制氢电能消耗较高、转化效率低且成本高；生物质法制氢主要是通过利用厌氧微生物发酵农林废料、工业废物或生活有机废水废料等生物质废料绿色制氢，可实现大多生物质废物的持续性转化利用。因此，生物质发酵绿色制氢能实现生物质变废为宝和低碳利用，具有清洁环保、制氢纯度高且经济效应明显等特点，可分为微生物光解水制氢、光发酵制氢、暗发酵制氢和暗-光联合发酵制氢^[9-10]，相关制氢原理和优缺点见表 1^[11-12]。在 Web of Science 引文索引检索国内外近 6 年微生物制氢发文趋势如图 1d 所示，其中具有无需光照、环境友好、能耗低且持续性强等特点的暗发酵制氢技术^[13-14]，被认为是最具潜力且研究最多的微生物制氢技术之一^[15-16]。暗发酵制氢参与反应的主要是生物质底物转化的葡萄糖，在氢化酶、铁氧还蛋白和脱氢酶等一系列酶和辅酶以及中间传递体的作用下完成的生物氧化过程^[17-18]，分为丙酮

酸脱羧、甲酸分解以及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）/NAD⁺平衡调节 3 种途径^[19-20]，在调控细菌暗发酵制氢的这些途径中，氢化酶起着关键的催化质子还原作用。氢化酶的催化效率与产氢效率密切相关，其催化活性主要依赖于活性位点上的金属团簇，依据其活性位点结合金属的不同，又主要分为[Fe]氢化酶、[Fe-Fe]氢化酶和[Ni-Fe]氢化酶 3 类。金属团簇中金属元素对微生物的酶活性具有重要影响，主要起酶活性激活剂和酶辅助因子的作用，相关优化机制等研究是限制微生物暗发酵制氢进一步发展的主要技术瓶颈^[21]。

目前研究发现，金属纳米颗粒（MNPs）具有小尺寸效应、宏观量子隧道效应和较高的表面效应，能参与构成金属团簇，并加快电子向氢化酶转移，不仅能有效提高底物转化率、氢化酶等制氢酶的活性和稳定性，还能优化发酵代谢途径，进而提高微生物暗发酵制氢系统的产氢性能^[22-23]，其作用机制如图 2 所示。

表 1 微生物法制氢技术比较
Table 1 Comparison of microbial hydrogen production technology

技术	光解水制氢	光发酵制氢	暗发酵制氢	暗-光联合发酵制氢
原理	光照下，微生物催化分解废水制氢	光发酵细菌利用固氮酶在光照条件下分解小分子生物质制取氢	丙酮酸脱羧、甲酸分解和 NADH/NAD ⁺ 平衡调节途径制氢	厌氧细菌和光合细菌协同制氢
优点	工艺简单、成本低、菌种易培育	光能转换率高、清洁高效	无需光照、成本低	经济性好、产量高
缺点	稳定性差、应用范围局限	氢产率较低、固氮酶活性低	氢化酶活性较低、易产生挥发性脂肪酸（VFAs）	选育菌种困难、机制不明确
技术水平	多数处于实验阶段，暂未实现商业化生产			



注：C₆H₁₂O₆为暗发酵后的葡萄糖；ATP为三磷酸腺苷，是生物体内最直接的能量来源；ADP为二磷酸腺苷，是ATP分解释放能量后产生的物质；NFOR为NADH铁氧还蛋白氧化还原酶；Ferredoxin (ox)和Ferredoxin (re)分别代表铁氧还蛋白氧化态和铁氧还蛋白还原态

图 2 金属纳米颗粒在暗发酵产氢过程中的作用机制^[23]

Fig. 2 Mechanism of metal nanoparticles in hydrogen production by dark fermentation^[23]

近年对 MNPs 的研究主要集中在金属单质(Fe、Ni、Zn 等)、金属氧化物(如铁氧化物、镍氧化物、锌氧化物)、碳纳米颗粒和 SiO_2 等^[24-26], 其中又以用铁、镍和锌基 3 大金属及其氧化物在提高氢化酶暗发酵制氢活性方面最为有效。铁基 NPs 通过优化暗发酵代谢途径, 大幅减少小分子酸的生成来提高生物质底物转化率, 有效加速铁氧还蛋白和氢化酶之间电子的转移, 从而显著增强[Fe]氢化酶、[Fe-Fe]氢化酶、铁氧还蛋白的活性, 但其作用效果受到尺寸效应和质量浓度效应的限制, 极易团聚失活^[27]; 而镍基 NPs 释放出的 Ni^{2+} 可提高[Ni-Fe]氢化酶的活性, 有效促进电子转移到电子受体, 增加氢代谢通量分布, 进而促进产氢, 但除了会受质量浓度效应和尺寸效应限制以外, 还会对微生物产生毒性作用^[28]; 锌基 NPs 释放的 Zn^{2+} 可作为多种酶的辅助因子, 能对酶系产生刺激效果以促进电子转移, 减少小分子酸生成, 改善微生物群落结构, 尤其在促进细菌生长、代谢及提高氢产量方面可发挥重要作用, 但也具有一定的毒性作用^[29]。

本文从生物质绿色制氢的角度出发,以 MNPs 改善微生物暗发酵酶系活性、稳定性和制氢性能为切入点,分析和比较了在暗发酵制氢系统中添加铁、镍和锌基 3 类常用的 MNPs 优化暗发酵酶系活性的作用机制、产氢效果以及现存问题,并提出未来金属纳米颗粒暗发酵制氢优化策略可深入研究的方向。

1 铁基改性暗发酵制氢

为推动微生物暗发酵制氢技术发展,许多研究探索利用铁基 NPs 的量子尺寸和表面效应,通过缓慢释放 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 来改善制氢酶的金属团簇性质,以解决制氢酶活性低和稳定性差的难题。 $[\text{Fe}]$ 氢

化酶和[Fe-Fe]氢化酶是暗发酵细菌主要的制氢酶，多存在于专性厌氧产氢菌中^[30-31]，铁作为[Fe]氢化酶、[Fe-Fe]氢化酶、铁硫蛋白活性中心[4Fe-4S]簇和[2Fe-2S]簇上的关键元素^[32]，能增强制氢代谢途径中氢化酶和铁氧还蛋白的活性，有效催化电子从NADH向氢化酶转移，从而促进产氢^[33-34]，缩短制氢停滞时间和总制氢时间，提升暗发酵系统整体的制氢性能。目前，研究较多的铁基 NPs 主要包括纳米零价铁（NZVI）、纳米 Fe_3O_4 （FMNPs）和纳米 Fe_2O_3 （FONPs），这些铁基 NPs 具有导电优良、电子转移率高且成本低等优势，合理控制其质量浓度及粒径，对提高氢化酶活性和稳定性、底物转化率以及 H_2 生成等有重要的促进作用。

1.1 NZ VI 暗发酵制氢

ZHANG 等^[35-36]研究发现,大部分 MNPs 容易被微生物外层的胞外聚合物 (EPS) 截留而较难进入细胞,但 NZVI 因粒径极小,比表面积和表面能急剧增大,表现出优异的小尺寸效应、宏观量子隧道效应和较高的表面效应,在电学和化学等方面表现出独特的性质^[37-38],能破坏晶体的边界条件,因而极易与 EPS 中腐植酸类有机物形成螯合物,提高铁离子的迁移性和可利用性,在不破坏细胞完整性的情况下自由进入细胞。在进入微生物体内后, NZVI 会与溶解氧发生反应,降低系统溶解氧含量 ($2\text{Fe}^0 + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Fe}^{2+} + 4\text{OH}^-$),通过降低系统溶解氧水平来维持厌氧条件,从而降低系统的氧化还原电位 (ORP),有效增强了 $[\text{Fe}-\text{Fe}]$ 氢化酶的活性,促进产氢反应 ($\text{Fe}^0 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{OH}^- + \text{H}_2$)^[39-41]。完成制氢后,胞外 EPS 降解会破坏衰亡细胞的细胞膜,促进胞内 NZVI 等物质的释放,实现胞内 NZVI 的循环再利用,其作用机制如图 3 所示。

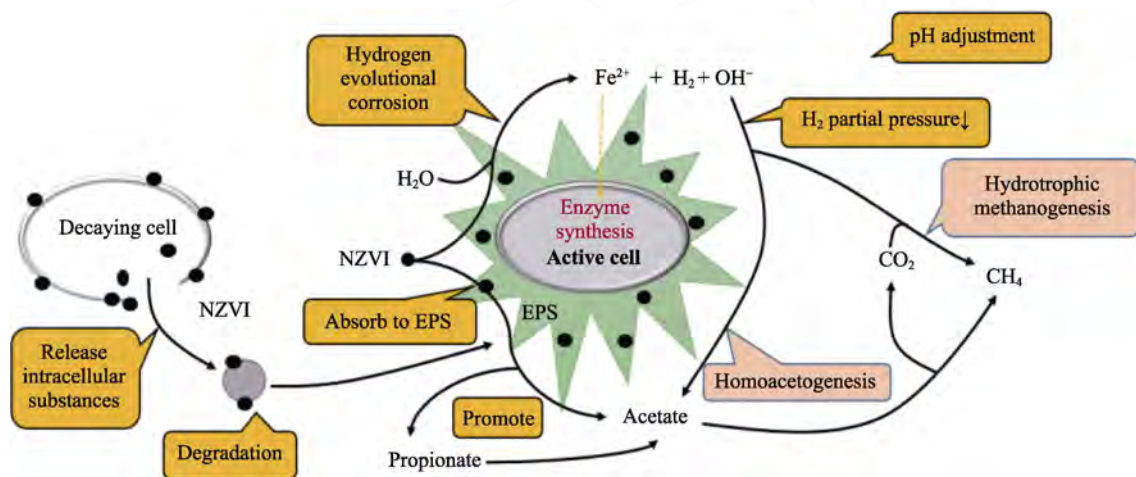
图 3 NZVI 颗粒促进厌氧细菌产氢的作用机制^[41]

Fig. 3 Mechanism of NZVI particles promoting hydrogen production by anaerobic bacteria^[41]

尽管 NZVI 可提高厌氧产氢菌对底物的利用效率和产氢潜力, 其表面效应和宏观量子隧道效应可加快电子转移, 增强[Fe-Fe]氢化酶的活性和稳定性, 增加产氢关键节点的代谢通量^[42-43], 但其质量浓度过低对促进产氢效果不明显, 过量则又会抑制细菌生长, 导致氢产量降低, 且 NZVI 粒径过大则易被 EPS 阻挡在外而不能发挥作用。为了严格调控 NZVI 的质量浓度和粒径, LI 等^[44]在细菌 *Klebsiella* sp. WL1316 发酵棉秆生物质后的水解液制氢系统中加入 NZVI, 发现 NZVI 能增强该菌株的[Fe-Fe]氢化酶的活性, 适宜质量浓度和粒径的 NZVI 可有效促进细菌生长、提高还原糖利用率和产氢效率, NZVI 的最佳质量浓度和粒径分别为 20 mg/L 和 50 nm, 该条件下的氢产量最高可达 (94.31 ± 0.23) mL/g_{还原糖}, NZVI 质量浓度提高后极易产生毒性, 其粒径也会团聚增大, 使 NZVI 被 EPS 阻挡而失活, NZVI 毒性与团聚均对微生物活性产生抑制作用, 导致最大产氢潜能明显降低, NZVI 质量浓度为 20 mg/L, 粒径增至 100 nm 时, 氢产量降至 (87.42 ± 0.13) mL/g_{还原糖}, 且氢产量随着 NZVI 质量浓度的增加而不断降低。

为了进一步解决 NZVI 易团聚失活的问题^[45], BECKERS 等^[46]和范传芳^[47]采用无机材料负载铁基 NPs 来降低活性位点团聚的风险, 以改善氢化酶间

电子转移。活性炭 (AC) 是 NPs 的最常用负载支撑材料, 具有多孔吸附能力强、比表面积大、机械性能好和毒性低等特点, 能有效控制铁离子释放, 避免 NZVI 聚集团聚, 不仅起到了良好的吸附剂-缓冲液作用, 还有利于微生物在多孔结构的表面和内部自由生长^[48-49]。由晓刚^[41]用 AC 吸附 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 制得了 AC 负载的 NZVI (AC/NZVI), 考察了其在厌氧微生物拟杆菌 (*Bacteroidia*) 污泥暗发酵过程中的作用机制, 并探究其对污泥厌氧消化的协同促进效应。AC 的多孔结构且较大的比表面积使 AC/NZVI 表面的 NZVI 颗粒能高度分散 (图 4a), 增加了 NZVI 与微生物和有机物的接触面积, 有效缓解了 NZVI 的团聚, 提高了利用效率, 促进了产氢。此外, AC/NZVI 还可实现对污泥厌氧消化的协同促进效应, 通过加快污泥水解酸化进程, 刺激厌氧微生物持续利用有机污染物促进污泥降解, 进一步提高了系统整体产氢性能, 累计氢产量 >6.0 mL/g_{VS} (VS 为挥发性固体), 氢含量体积分数最高可达 $8.2\% \pm 0.5\%$, 但产氢微生物活性在暗发酵后期会受到干扰, 甲烷含量的不断增加导致了制氢停滞时间的延长, AC/NZVI 组产气量达到峰值所需时间 (1.65 d) 比 NZVI 对照组 (1.61 d) 推迟将近 1 h, 持续性制氢受到一定限制。

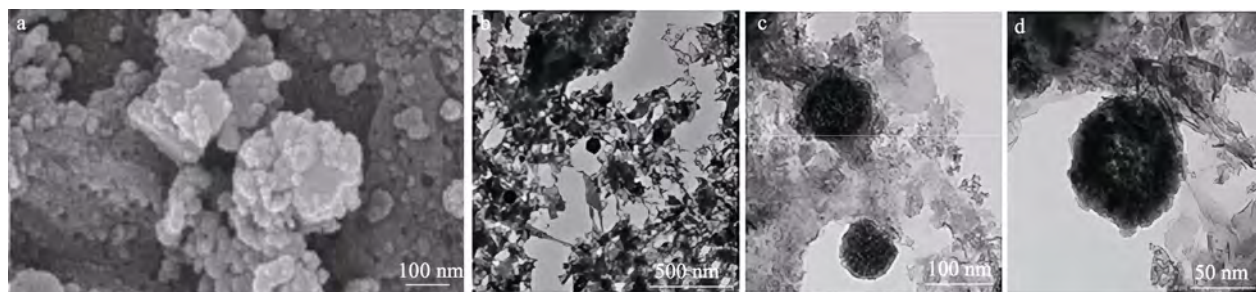


图 4 AC/NZVI 的 SEM 图 (a)^[41]; CS/NZVI 的 TEM (b、c) 及自发排列的棒状结构粒子 (d)^[50]
Fig. 4 SEM image of AC/NZVI (a)^[41]; TEM images of CS/NZVI (b, c); Spontaneously arranged rod-like particles (d)^[50]

为有效解决上述制氢停滞时间较长的问题, SEWWANGI 等^[50]尝试用壳聚糖 (CS) 为 NZVI 的支撑材料。将 CS 溶于硝酸中, 并在 N_2 保护下滴加 FeCl_2 和 NaBH_4 , 充分混合后制得 CS/NZVI, 分析其对产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 暗发酵葡萄糖制氢效率的影响。结果表明, 负载后的铁纳米颗粒呈球形分散包埋在 CS 上 (图 4b、c), TEM 显示存在自发排列的棒状结构粒子, 这些结构特征明显提高了 NZVI 分散度, 减少了颗粒聚集 (图 4d), NZVI 明显增强了氢化酶的活性, 当 Fe^{2+} 质量浓度为 150 mg/L 时, 氢产量最高可达 243.1 mL/g_{还原糖}, 高出空白对照组 30%。微生物活性提高后制氢停滞时

间缩短, CS/NZVI 组氢产量达最大值时所需时间由空白对照组的 3.6 h 缩短至 3.1 h。在暗发酵生物质废料制氢系统中, NZVI 对发酵产氢、细菌生长和底物利用均有积极影响, 且利用无机负载材料可有效解决金属纳米颗粒团聚, 减少其制氢停滞时间, 能协助微生物在多孔结构表面和内部自由生长, 有助于提高制氢系统氢产量, 为提高 NZVI 暗发酵系统制氢性能和持续性制氢提供了一种较为清洁且环保的研究思路。

1.2 纳米非零价铁暗发酵制氢

纳米非零价铁由于粒径小, 晶体的边界条件易被破坏, 使其比表面积、表面能和表面原子数急剧增

加,从而表现出良好的电学性质和生物相容性^[51-52],已广泛应用于化工、医疗和传感器等领域^[53-54]。在暗发酵制氢领域中,FMNPs和FONPs透过EPS进入细胞后能直接释放出 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} ,其能参与氢化酶活性位点合成,可提高微生物制氢活性,缩短制氢停滞时间,其释放出的铁离子不仅能够促进厌氧细菌生长和底物利用,还可通过调控 NADH/NAD^+ 水平来降低ORP,缓解氢化酶对ORP较敏感的问题^[55-56],但其质量浓度过高也会导致氢化酶的分子结构扭曲,且会对厌氧菌产生毒害作用,并阻碍细菌与底物接触而抑制细菌的生长和代谢^[57]。为探究纳米非零价铁的最佳质量浓度,吴凯旋^[58]将两类乙醇型发酵性细菌乙醇生孢产氢菌(*Hydrogenispora ethanolica* LX-B)和乙醇寡食球菌(*Oligosphaera ethanolica* 8KG-4^T)放置在含有FMNPs的葡萄糖底物中暗发酵,发现FMNPs质量浓度为400 mg/L时,强化产氢效果最好,氢产量最大值为17.9 mmol/L,比空白对照组提高了28.3%。但随着FMNPs质量浓度的增加,微生物制氢能力受到抑制,质量浓度增至600 mg/L时,氢产量则降至15.1 mmol/L,只比对照组提高了6.8%。LIN等^[59]在含产气大肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的暗发酵系统中加入FONPs,当FONPs质量浓度为0~200 mg/L时,氢产量从 (164.5 ± 2.29) mL/g 葡萄糖增至 (192.4 ± 1.14) mL/g 葡萄糖,当FONPs质量浓度增至400 mg/L时,氢产量则降至 (147.2 ± 2.54) mL/g 葡萄糖,作者认为,FONPs最佳质量浓度为200 mg/L。FMNPs和FONPs能有效降解生物质用于暗发酵制氢,具有产氢率高、成本低和可循环利用等优点,但需严格调控FMNPs和FONPs的质量浓度,为进一步推进暗发酵制氢技术的应用,还需考察如何改善纳米非零价铁在暗发酵制氢过程中

因磁性团聚而失活、制氢停滞时间过长等问题^[60]。

针对MNPs之间存在磁性吸引而引起粒子易团聚失活等问题,除了利用非金属无机材料负载NPs的方法来控制铁离子释放速率以减缓聚集团聚^[61],还可将具有大比表面积金属氧化物(M_xO_y)作为支撑材料来制备铁-金属氧化物双金属复合材料以分散活性位点,金属与金属的表面相互作用不仅能降低其颗粒磁性,有效解决纳米非零价铁之间粒子团聚导致寿命缩短等问题,还可增大纳米非零价铁与微生物的接触面积和均匀分布,显著减少制氢停滞时间。YORUKLU等^[62]使用廉价易得的 M_xO_y (ZrO_2 、 TiO_2 和 Al_2O_3)通过浸渍法合成FONPs掺杂金属氧化物复合材料($\text{FONPs}@ \text{M}_x\text{O}_y$)(图5a),在 $\text{FONPs}@ \text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{FONPs}@ \text{ZrO}_2$ 和 $\text{FONPs}@ \text{TiO}_2$ 的质量浓度均为0~200 mg/L时,筛选评估 M_xO_y 存在下的最佳氢产量,振动磁力仪分析发现, $\text{FONPs}@ \text{Al}_2\text{O}_3$ 磁性最低,磁参数(Mr)仅为0.02 emu/g(图5b),较 $\text{FONPs}@ \text{ZrO}_2$ 、 $\text{FONPs}@ \text{TiO}_2$, $\text{FONPs}@ \text{Al}_2\text{O}_3$ 能够明显降低NPs磁性,更好地增大了FONPs分散度,TEM证实,FONPs能均匀分布在 Al_2O_3 颗粒表面上,且分散较好(图5c);其中,质量浓度为50 mg/L $\text{FONPs}@ \text{Al}_2\text{O}_3$ 的暗发酵制氢效果最好,产氢量为162 mL/g 葡萄糖, H_2 生成速率较无NPs催化的对照组加快了近34%,制氢停滞时间缩短近30%。该研究说明,将纳米非零价铁活性位点分散在大比表面积材料上,可降低颗粒磁性、增大其分散度,以缓解团聚现象,未来可选用更廉价易得、绿色环保的 M_xO_y 与铁基NPs复合来降低磁性,以提高暗发酵制氢效率,表2总结了铁基NPs在暗发酵产氢中的作用效果和 H_2 产量。

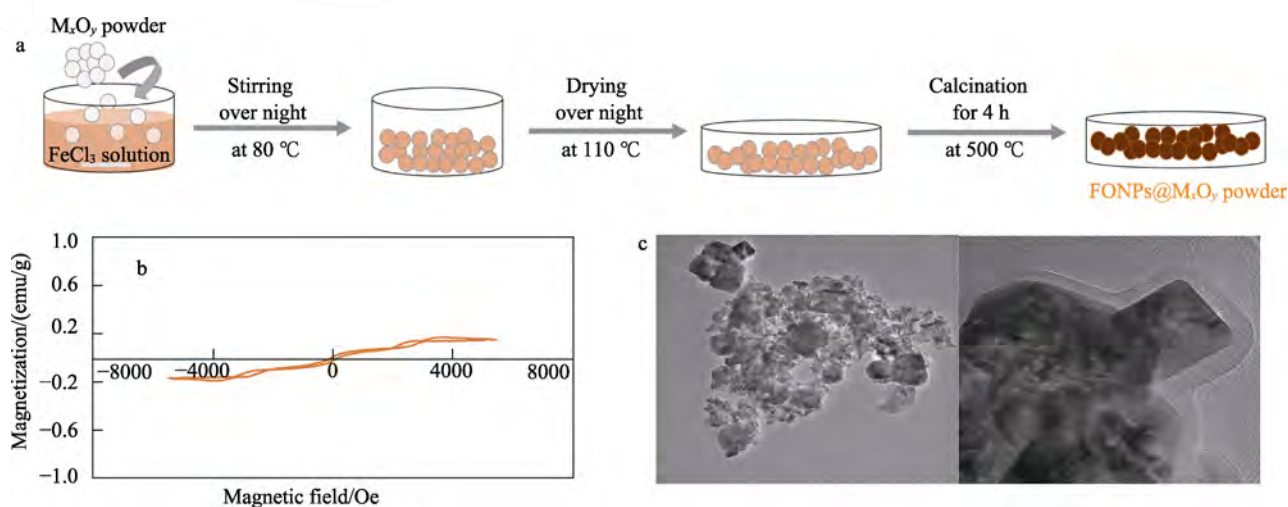


图5 FONPs@ M_xO_y 合成过程示意图(a)、FONPs@ Al_2O_3 的磁化磁滞回线(b)及TEM图(c)^[62]

Fig. 5 Schematic diagram of synthesis process of $\text{FONPs}@ \text{M}_x\text{O}_y$ (a), magnetization hysteresis loops (b) and TEM images (c) of $\text{FONPs}@ \text{Al}_2\text{O}_3$ ^[62]

表 2 铁基纳米颗粒在暗发酵产氢系统中的作用效果
Table 2 Effect of iron-based nanoparticles in dark fermentation hydrogen production system

接种物	发酵底物	颗粒类型	质量浓度/(mg/L)	粒径/nm	H ₂ 产量	参考文献
丁酸梭菌	厌氧污泥	FONPs	200	50	3.57 mol/mol 蔗糖	[33]
混合培养物	玉米秸秆	FONPs	50	~50	1.92 mol/mol 葡萄糖	[34]
接种污泥	餐厨垃圾	NZVI	100	~20	281.68 mL/g _{vs}	[42]
<i>Klebsiella</i> sp. WL1316	棉秆水解液	NZVI	20	50	(94.31±0.23) mL/g 还原糖	[44]
产气肠杆菌	葡萄糖培养液	CS/NZVI	150	<100	243.1 mL/g 葡萄糖	[50]
<i>H. ethanolic</i> LX-B 和 <i>O. ethanolic</i> 8KG-4 ^T	酒糟厌氧发酵液	FMNPs	400	30	17.9 mmol/L	[58]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	葡萄糖培养液	FONPs	200	—	(192.4±1.14) mL/g 葡萄糖	[59]
梭状芽胞杆菌	厌氧污泥	FONPs@Al ₂ O ₃	50	—	162 mL/g 葡萄糖	[62]

注：“—”为未提及，下同。

2 镍基改性暗发酵制氢

在暗发酵制氢过程中，除专性厌氧产氢菌中存在的[Fe]氢化酶和[Fe-Fe]氢化酶以外，在兼性厌氧菌中还存在[Ni-Fe]氢化酶，因其在催化氢分子可逆氧化和质子还原中起到至关重要的作用也备受关注^[63-64]，其活性中心包含双金属 Ni-Fe 活性位点，对底物的亲和力较[Fe]氢化酶、[Fe-Fe]氢化酶更高^[65]。Ni 作为[Ni-Fe]氢化酶活性中心的结合金属离子之一，能有效加快电子转移并增加氢代谢通量分布以促进产氢。在暗发酵制氢过程中添加镍基 NPs，能有效提高[Ni-Fe]氢化酶活性，是增强厌氧菌制氢能力的可行策略之一。目前，镍基 NPs 主要分为纳米氧化镍颗粒 (NiONPs) 和纳米镍颗粒 (NiNPs)，其中 NiONPs 对提高氢化酶的活性效果较好，但其质量浓度过高会对厌氧菌造成细胞毒性作用，而 NiNPs 对厌氧菌毒性更小，也可提高[Ni-Fe]氢化酶活性而促进暗发酵制氢，但同样需慎重考虑其质量浓度的影响，避免因粒子浓度过高而触发非产氢代谢途径产生过多 VFAs 的问题^[66-67]。

2.1 纳米氧化镍

NiONPs 作为高导电材料能加快暗发酵制氢中电子转移和中间代谢物的还原，提高[Ni-Fe]氢化酶的催化活性^[68]，但需合理控制质量浓度以避免细胞毒性作用，而解决 NiONPs 潜在的毒性作用是进一步提高氢产量的关键^[69]。过渡金属 Co 是多种生物酶的必要辅助因子^[70]，微量存在可减少 VFAs 生成和细胞毒性，但质量浓度过高具有毒性^[71]。研究发现，合理添加 NiONPs 和 CoONPs 进行协同暗发酵制氢可降低二者的细胞毒性，促进厌氧细菌细胞生长和底物消耗^[72]。MISHRA 等^[73]研究发现，NiONPs 在占比较高时可加速厌氧细菌代谢产氢，而 CoONPs 在占比较高时则会导致体系非产氢代谢途径增强，从而降低制氢效率，为探求二者合适占比，该研究在炭疽芽胞杆菌 PUNAJAN 1 (*Bacillus*

anthracis PUNAJAN) 厌氧暗发酵后的棕榈油厂废水 (POME) 中加入 NiONPs 和 CoONPs，分析 NiONPs 和 CoONPs 的最佳质量比对厌氧细菌代谢产氢能力的影响，结果表明，质量比为 3 : 1 时制氢效果最优，产氢率达到峰值，为 45 mL/h，比单 NiONPs 暗发酵 (产氢率 36 mL/h) 提高了 25%。在 POME 中添加 NiONPs 和 CoONPs 协同发酵产氢，不仅能解决单一颗粒作用因毒性受限问题，还能提高发酵系统氢产量和整体产氢性能，同时促进底物消耗，以实现有机废物的循环利用。

为进一步降低 NiONPs 暗发酵制氢系统毒性，SINGH 等^[74]利用植物中的次生代谢产物来绿色合成 NiONPs，不仅能有效避免传统合成过程中使用试剂毒性过大的问题，将其添加至暗发酵系统中还能显著提高[Ni-Fe]氢化酶的活性。植物凤眼莲 (*Ec*) 中富含酚类、甾醇类和黄酮类等次生代谢产物^[75]，ZHANG 等^[76]以凤眼莲提取物为原料绿色合成纳米氧化镍 (*Ec*-NiONPs)，将其添加至克雷伯菌 WL1316 (*Klebsiella* sp. WL1316) 暗发酵木质纤维素水解物中，能改善氢合成途径中还原糖转化和代谢通量分布，增强[Ni-Fe]氢化酶相关功能基因表达，有效提高厌氧菌暗发酵制氢能力和氢产量。*Ec*-NiONPs 最佳质量浓度为 20 mg/L 时，每日氢产量和最大累计氢产量分别达到(2077.00±4.23) mL/L 和(4842.19±23.43) mL/L，比空白对照组分别提高了 18.70% 和 47.29%，氢化酶活性较对照组增加了 623%。绿色合成的 NiONPs 较好地避免了传统合成使用试剂毒性过大问题，且植物提取物在与金属离子反应期间可作为稳定剂和促进剂，能有效控制 MNPs 的形状和尺寸，为优化 MNPs 性能以提高暗发酵制氢提供了一种廉价且环保的策略。

2.2 纳米镍

暗发酵制氢过程中添加适宜质量浓度的 NiNPs，可加快铁氧还蛋白与[Ni-Fe]氢化酶之间的质子和电子转移，从而增加丙酮酸产氢途径关键节点的代谢

通量,对提高[Ni-Fe]氢化酶活性、促进代谢途径转变和优化暗发酵制氢均具有重要意义^[77-78],但NiNPs质量浓度过高也会引起细胞毒性反应,还会触发非产氢代谢途径,导致发酵底物多转化为CO₂而抑制H₂生成^[79-80]。为探求NiNPs最佳使用质量浓度,ELREEDY等^[81]在混合培养菌暗发酵含单乙二醇(MEG)工业废水的制氢系统中引入NiNPs,当NiNPs最优质量浓度为60 mg/L时,化学需氧量(COD)去除率明显提高,产氢率比未加NiNPs提高了23%,最高可达(24.73±1.12) mL/g_{COD},制氢停滞时间也由4.52 h缩短至3.44 h,而当NiNPs质量浓度增至100 mg/L时,微生物活性和生长速度开始大幅减弱,产氢量也降至(20.80±1.12) mL/g_{COD},累计氢产量从(44±4) mL降至(37±2) mL。表明控制NiNPs的质量浓度可促进菌落生长和底物降解,增强[Ni-Fe]氢化酶活性,从而提高累计氢产量和系统制氢效率。

NiNPs质量浓度过高除了会造成细胞毒性以外,还会导致制氢系统产生的VFAs增多而引起pH急剧下降,从而影响生物质水解速率、代谢途径和微生物细胞生长。pH过高或过低均会降低氢化酶活性,进而抑制厌氧制氢反应的进行^[82-83],为了降低pH对制氢系统的影响,WANNAPOKIN等^[84]采用化学结合法将NiNPs和巴氏杆菌(*C. pasteurianum*

CH5)固定在凝胶中,以保持细菌生物活性实验22 d,探究共固定化法提高暗发酵系统厌氧细菌对pH耐受的可行性。研究发现,在发酵过程中会产生大量的VFAs,制氢系统pH从6.8降至4.6,但凝胶颗粒在实验前10 d内仍保持完整。FESEM显示,巴氏杆菌和NiNPs均能较好地嵌入并分布在凝胶结构中(图6a和b),不仅可控制NiNPs释放到环境中的速度及质量浓度,还可让NiNPs与巴氏杆菌密切接触,为巴氏杆菌提供了很好的生存保护环境,有效提高厌氧细菌对低pH的耐受性,系统的氢化酶活性和产氢率并没有受到pH降低所带来的负面影响。通过此共固定化法释放的NiNPs最佳质量浓度为400 mg/L时,氢产量从未固定的0.49 mol/mol葡萄糖可直接增至1.28 mol/mol葡萄糖。然而14 d后,巴氏杆菌数量不断增加,导致细菌生长所需空间增多,致使部分凝胶颗粒开始出现胀破现象(图6c),细菌暴露在高酸环境中,使其pH耐受性开始减弱。综上,提高暗发酵产氢率不仅要合理控制MNPs的质量浓度,还要综合考虑VFAs增多和pH改变等其他因素的影响,如何进一步提高凝胶颗粒的稳定性是今后利用共固定化法协助微生物暗发酵制氢深入研究的重要方向之一。表3总结了镍基NPs在暗发酵产氢系统中的作用效果和H₂产量。

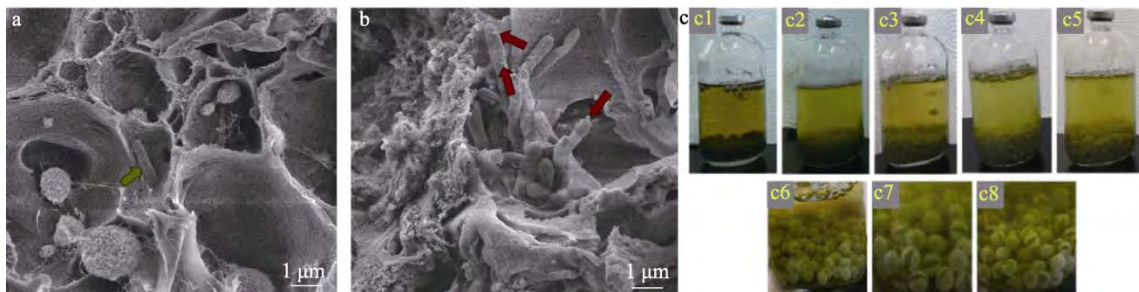


图6 巴氏杆菌和质量浓度为200 mg/L的NiNPs共固定化的FESEM图(a、b);质量浓度为200 mg/L的NiNPs和巴氏杆菌共固定化的分批实验:第5 d(c1)、第10 d(c2)、第14 d(c3)、第18 d(c4)、第22 d(c5)照片及第14 d(c6)、第18 d(c7)和第22 d近景图像(c8)(c)^[84]

Fig. 6 FESEM images of co-immobilization of *C. pasteurianum* CH5 and NiNPs with a mass concentration of 200 mg/L (a, b); Batch tests of co-immobilization of NiNPs with a mass concentration of 200 mg/L and *C. pasteurianum* CH5: Images of day 5 (c1), day 10 (c2), day 14 (c3), day 18 (c4), day 22 (c5), as well as close images of day 14 (c6), day 18 (c7), day 22 (c8) (c)^[84]

表3 镍基纳米颗粒在暗发酵产氢系统中的作用效果

Table 3 Effect of nickel-based nanoparticles in dark fermentation hydrogen production system

接种物	发酵底物	颗粒类型	质量浓度/(mg/L)	粒径/nm	H ₂ 产量	参考文献
<i>Beijerinckii</i> DSM791	米厂废水	NiONPs、CoONPs	1.5	~26、~50	214.9 mL/L、195.7 mL/L	[72]
<i>Bacillus anthracis</i> PUNAJAN 1	棕榈油厂废水	NiONPs、CoONPs	7.5、2.5	14	45 mL/h	[73]
<i>Klebsiella</i> sp. WL1316	木质纤维素水解物	Ec-NiONPs	20	9.1±2.6	(2077.00±4.23) mL/L	[76]
混合培养菌	工业废水	NiNPs	60	—	(24.73±1.12) mL/g _{COD}	[81]
厌氧颗粒污泥	葡萄糖	NiNPs	5.67	13.64	2.54 mol/mol 葡萄糖	[83]
<i>C. pasteurianum</i> CH5	葡萄糖	NiNPs	400	50~100	1.28 mol/mol 葡萄糖	[84]

3 锌基改性暗发酵制氢

Zn 作为多种酶的辅助因子,能够刺激暗发酵制氢,同时作为细胞生长代谢的必需微量元素,能够维持胞内蛋白质的结构稳定,在促进细菌细胞生长、代谢和生化反应等过程中发挥着关键作用^[85]。近年来,锌基 NPs 因优异的吸附特性和电学性质而成为优化暗发酵制氢性能的研究热点^[86-87],将其添加至暗发酵体系中可用于改善生物群落、加快电子转移和提高氢化酶稳定性,使产氢效率得到显著提升^[88-89]。目前,研究主要集中在纳米氧化锌颗粒(ZnONPs)和纳米锌颗粒(ZnNPs)。其中,ZnONPs 能提高有机物的生物降解性,促进污泥分解,在废水污泥处理和厌氧产氢强化方面具有环保意义,而质量浓度过高时易产生细胞毒性,通过探究其最优添加量可有效解决这一问题。ZnNPs 毒性较 ZnONPs 小,不易造成细胞毒性,通过负载后还可调节系统 pH 稳定,提高氢化酶的活性,进而增加发酵氢产量。

3.1 ZnONPs 暗发酵制氢

ZnONPs 作为锌基 NPs 的典型代表,具有比表面积大和表面活性高的特点,能减少液体废料在厌氧制氢过程中生成 CH_4 和 H_2S ,可应用于废水废料处理和厌氧产氢强化,实现污染废水废料的循环利用,实现清洁 H_2 的可持续转化^[90]。为探究 ZnONPs 对废弃活性污泥(WAS)暗发酵氢产量的影响,ZHANG 等^[91]利用 1 g ZnONPs 和 100 mL 去离子水($\text{pH}=6.9\pm 0.1$)混合制备 ZnONPs 原液,探究 ZnONPs 对产乙酸菌厌氧暗发酵 WAS 制氢的作用效果,结果发现,ZnONPs 透过细胞膜后可增强胞内产氢酶活性,优化微生物群落结构,从而提高厚壁菌(*Firmicutes*)和绿浮菌(*Chloroflexi*)等优势菌种丰度(达 84.5%);其次,ZnONPs 不仅能提高有机物的生物降解性,还能较强地抑制 WAS 生成 CH_4 和 CH_3COOH 等过程,有效改善暗发酵体系 pH 因 VFAs 质量浓度的增加而急剧下降的现象,提高了微生物存活率和氢化酶的活性,使微生物厌氧暗发酵 WAS 的产氢能力有所提升。当 ZnONPs 含量[以总固体(TS)质量为基准,下同]分别为 30 和 150 mg/g_{TS} 时,乙酸产量较对照组(0 mg/g_{TS})分别降低了 10.7% 和 17.9%,氢产量较对照组分别提高了 1.8 倍和 3.5 倍。ZnONPs 具备缓解发酵产氢系统 pH 下降和促进废水废料生物降解的潜力,为将来 ZnONPs 持续处理 WAS 进行可持续制氢的工艺应用提供了一种绿色且经济的策略。

在暗发酵产氢领域添加 ZnONPs 有利于 WAS 的生物利用,为进一步探究适宜的 ZnONPs 质量浓度,袁静^[92]在含乙醇型发酵产氢优势菌(*Enterobacter* sp.

HDX08)的葡萄糖培养液中添加了 ZnONPs,发现 ZnONPs 促进了丙酮酸的生成,而丙酮酸作为启动混合酸发酵途径的关键节点代谢产物,其含量增加可使代谢通量分布增强,进一步加快底物降解和 H_2 生成。当质量浓度为 200 mg/L 时,ZnONPs 能改善细菌生长状况,细菌的氢产量为 0.45 mol/mol 葡萄糖,较对照组提高了 36.36%。表明丙酮酸的含量变化与发酵过程的产氢速率变化呈正相关,ZnONPs 的添加能够催化刺激丙酮酸途径产氢,提高暗发酵系统的产氢率和制氢性能,但 ZnONPs 的过量添加会诱导活性氧(ROS)大量生成,氧化损伤微生物细胞膜而释放细胞质,降低细胞活力和生存能力,严重抑制氢化酶活性^[93],其添加量的深入研究有望解决暗发酵产氢量低和氢化酶活性低的瓶颈。

3.2 ZnNPs 暗发酵制氢

与 ZnONPs 相比,ZnNPs 本身毒性较低,能更好地优化微生物群落结构,以提高暗发酵氢产量,但为防止 ZnNPs 因磁性吸引而团聚失活,实现 ZnNPs 的循环再利用,WIMONSONG 等^[94]和 ELREEDY 等^[95]采用载体材料负载 ZnNPs 来克服这一问题。载体负载法可通过提供更多的碱性位点,以缓解制氢系统 pH 下降趋势,提高厌氧菌落生物暗发酵制氢能力。目前,研究较多的水滑石(HT)载体具有多孔结构、大的比表面积和导电性等特点,作为 ZnNPs 负载材料能够为厌氧菌提供生长附着条件、提高厌氧菌数量和生物黏附力,但会导致制氢系统出现 VFAs 过度累积而引起 pH 下降问题,降低微生物生存能力和氢产量,针对这一问题,WIMONSONG^[96]利用椰子壳制得活性炭(TAC),通过浸渍法合成了 HT/TAC 负载 Zn(Zn-HT/TAC)催化剂,探究其对混合培养菌厌氧暗发酵 WAS 的作用效果,结果发现,Zn-HT/TAC 催化剂中的 HT 和 TAC 分别具有较高的弱碱位点和较强的吸附能力,两者共同作用可提高底物转化率,并减少制氢系统 VFAs 累积,从而缓解 pH 下降,提高厌氧细菌的生长能力和产氢量,Zn-HT/TAC 质量浓度为 8.33 g/L 时,暗发酵制氢产量较无 NPs 催化的对照组提高了 26.62%,高达 3.08 mol/mol 总糖。但 HT 易堵塞 TAC 微孔,因此 Zn 负载改性 HT 的 Zn-HT 浸渍 TAC 后,杂化催化剂的比表面积与总孔体积也降低了 23.14%,其催化效率和稳定性很难再进一步提升。

为进一步增大活性炭类负载材料的比表面积和总孔体积以增强载体材料的活性,SYBOUNYA 等^[97]在活化温度为 400~700 °C 的条件下,利用化学活化剂 H_3PO_4 改性商用活性炭(CAC)制得了 mCAC,将其作为 Zn-Ni-HT 的支撑材料制备了 Zn-Ni-HT/mCAC 复合材料(图 7a),考察了该材料对接种污泥厌氧暗发酵蔗糖的作用效果。利用 H_3PO_4 改性可

去除 CAC 孔隙中含有的酸、醇和其他化合物等杂质, 通过改变 CAC 的官能团, 使其表面孔隙增大、数目增多 (图 7b), 600 °C 下的 mCAC600 的吸附能力进一步增强且最优, 能够较好地缓解被 HT 堵塞, 提高氢产量 (图 7c), 在 Zn-Ni-HT/mCAC600 复合材料中, 碱性位点较多的 HT 能在 mCAC600 表面和孔隙内均匀分布 (图 7d), 这均可减少体系中的 VFAs, 从而缓解发酵过程中 pH 的下降, 提高了微生物存活率, 且该复合材料缓慢释放出的 Zn^{2+} 等金属离子能有效加快电子转移并增强氢化酶活性, 进一步提高了暗发酵氢产量 (图 7e)。与

mCAC600 和 Zn-Ni-HT/CAC 相比, Zn-Ni-HT/mCAC600 复合材料促进细菌厌氧暗发酵制氢效果最佳, 氢产量高达 2.958 mol/mol_{总糖}, 分别提高了 0.335 和 0.545 mol/mol_{总糖} (图 7f)。利用载体负载颗粒的方法不仅克服了 VFAs 引起的 pH 下降问题, 明显改善产氢酶系整体的活性与稳定性, 还可实现材料的循环利用, 降低了材料制备成本, 利用双金属 Zn 和 Ni 之间的协同作用还能进一步增强微生物发酵制氢能力, 为今后实现暗发酵制氢的工业化应用提供了思路。锌基 NPs 在暗发酵产氢系统中的作用效果和 H_2 产量见表 4。

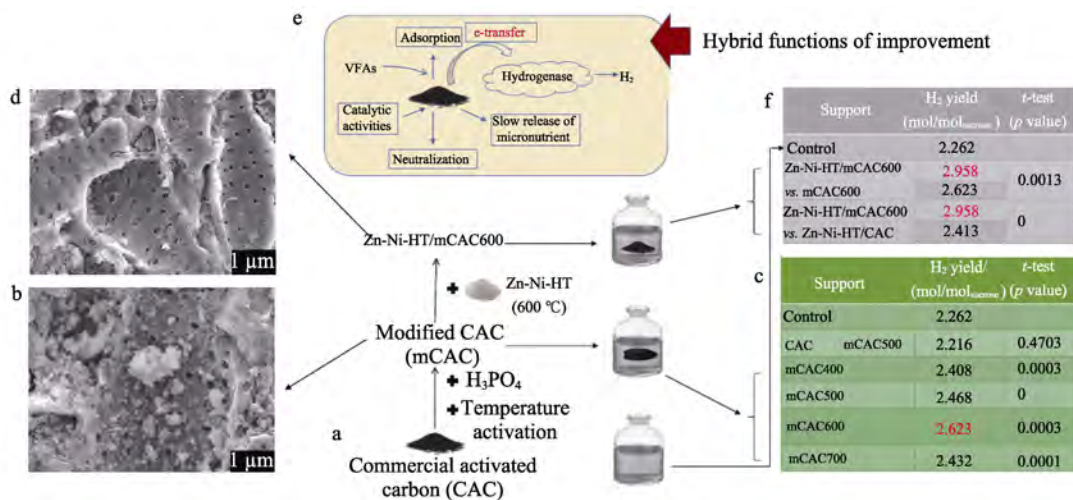


图 7 mCAC 和 Zn-Ni-HT/mCAC600 的制备过程 (a); mCAC 的 FESEM 图 (b); 不同温度下制备的 mCAC 对氢产量的作用效果 (c); Zn-Ni-HT/mCAC600 的 FESEM 图 (d); Zn-Ni-HT/mCAC600 的作用原理 (e); Zn-Ni-HT/mCAC600 分别与 mCAC600、Zn-Ni-HT/CAC 促进产氢效果比较 (f)^[97]

Fig. 7 Preparation of mCAC and Zn-Ni-HT/mCAC600 (a); FESEM image of mCAC (b); Effect of mCAC prepared at different temperatures on hydrogen production (c); FESEM image of Zn-Ni-HT/mCAC600 (d); Working principle of Zn-Ni-HT/mCAC600 (e); Comparison of Zn-Ni-HT/mCAC600 with mCAC600 and Zn-Ni-HT/CAC in promoting hydrogen production (f)^[97]

表 4 锌基纳米颗粒在暗发酵产氢系统中的作用效果

Table 4 Effect of zinc-based nanoparticles in dark fermentation hydrogen production system

接种物	发酵底物	颗粒类型	质量浓度/(mg/L)	粒径/nm	H_2 产量	参考文献
接种污泥	WAS	ZnONPs	0~50	90±10	21.1~74.0 mL/gvs	[91]
<i>Enterobacter</i> sp. HDX08	葡萄糖培养液	ZnONPs	200	30±10	0.45 mol/mol _{葡萄糖}	[92]
混合培养菌	污泥	Zn-HT/TAC	8.330	—	3.08 mol/mol _{总糖}	[96]
接种污泥	蔗糖	Zn-Ni-HT/mCAC600	8330	—	2.958 mol/mol _{总糖}	[97]

4 国内外氢能政策发展历程及 MPS 在暗发酵过程中的机制

在全球地缘政治日益复杂和俄乌局部战争背景下, 全球传统化石能源与新能源氢能的生产与消费版图必将重塑, 从能源供给侧着手实现全面脱碳必将成为各国研究攻关的重要方向, H_2 作为一种终端绿色零碳、应用前景广阔的二次能源, 是国内外能源低碳发展和转型变革最具应用前景的能源之一,

有望成为全球能源使用的终极形式^[98-99], 中国也高度重视氢能技术与产业发展, 提出要在氢能领域推动国际合作以助力“一带一路”沿线国家基础设施建设等, 2022 年 3 月发布的《氢能产业发展中长期规划 (2021~2035 年)》更是将氢能产业确定为战略性新兴产业和未来产业重点发展方向, 明确氢能是中国未来国家能源体系的重要组成部分, 将重点发展生物质、风、光、水、等可再生能源制氢, 图 8 展示了近十年来国内外的氢能政策发展历程, 不难看出,

氢能正逐步成为中国以及全球能源转型发展的重要载体,绿色制氢技术已成为中国“十四五”期间需重点发展攻克的领域^[100-102]。中国氢能体系面临亟需从化石能源供给为主转变为以“可再生能源+氢”为主的绿氢体系的难关^[103-104]。其中,生物质微生物暗发酵制氢不仅具有无需光照、原料易得和氢产量相对较高等优势,还是一条有效处理农业、工业、生活生物质废料和改善生态环境的合理途径。然而,目前暗发酵产氢的氢化酶活性较低,基础配套设施仍不足,受诸多条件限制,大多微生物制氢方法还停留在实验室

研究阶段,暂未实现大规模的工业化应用。为此,美国、中国、日本等一些国家成立了专门机构,并制定了生物制氢的发展规划以期通过对生物制氢技术的基础性和应用性研究,促使该技术实现商业化生产,例如:中国提出的“863 项目”对生物制氢的研究给予了大力支持和方向引导,也取得了一些可喜成绩,任南琪院士团队^[105]研究发现,生物炭能够促进乙醇型发酵产氢,中国科学院大学余至晟团队^[106]在利用农业废弃物发酵制氢方面取得新进展,这些研究都为实现生物制氢工业化生产奠定了基础。



图 8 近十年国内外氢能政策发展历程

Fig. 8 Development process of hydrogen energy policy at home and abroad in recent ten years



图 9 MNPs 在暗发酵过程中的作用机制

Fig. 9 Mechanism of MNPs in dark fermentation process

MNPs 作为近年来的研究热点,有望解决暗发酵制氢技术难题,本文分析总结其作用的可能机制如图 9 所示^[107-110],其在提高暗发酵氢化酶活性和稳定性方面具有重要的研究意义,被广泛地应用在生物质微生物暗发酵绿色制氢领域。

5 结束语与展望

在铁、镍、锌基三类热门 MNPs 优化暗发酵制氢策略中,适宜质量浓度的纳米零价铁 NZVI 和非零价铁 FMNPs、FONPs 可加速铁氧还蛋白和氢化酶之间电子的转移,显著增强[Fe]氢化酶、[Fe-Fe]氢

化酶和铁氧还蛋白的活性,质量浓度过低对促进产氢效果并不明显,但 NZVI 质量浓度过高会抑制细菌生长,并产生细胞毒性,而 FMNPs 和 FONPs 质量浓度过高则更易破坏氢化酶分子结构,并阻碍细菌与底物接触而抑制细菌的生长和代谢;同时较 NZVI,非零价铁 FMNPs 和 FONPs 可直接释放出 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} ,其参与氢化酶活性位点合成,制氢停滞时间更短,可通过 CS 等载体负载技术有效控制铁离子释放以调控质量浓度,分散活性位点以避免颗粒团聚失活,能协助微生物在多孔结构的表面和内部自由生长,进一步缩短铁基暗发酵制氢停滞时间

并促进产氢。在镍基 NPs 优化策略中, NiONPs 和 NiNPs 能够提高[Ni-Fe]氢化酶的活性, 加快暗发酵制氢中电子转移, 增加氢代谢通量分布以促进产氢, 但 NiONPs 质量浓度过高会对厌氧细菌造成细胞毒性, 抑制细菌细胞生长, 而 NiNPs 毒害作用相对较小, 能更好地促进代谢途径转变和微生物菌落生长, 增强厌氧微生物发酵制氢能力, 然而 NiNPs 质量浓度过高会更易导致制氢体系 VFAs 的积累, 使 pH 下降而影响氢化酶活性, 该策略可利用双金属协同添加、共固定化等技术来有效降低镍基 NPs 细胞毒性, 进一步提高暗发酵体系厌氧细菌对 pH 的耐受性, 增加优势菌种丰度, 提高累计氢产量和系统制氢效率。锌基 NPs 中的 ZnONPs 和 ZnNPs 释放出的 Zn^{2+} 可作为多种酶的辅助因子, 能够对酶系产生刺激效果以促进电子转移, 提高暗发酵系统微生物丰度和制氢性能, 其中 ZnONPs 能明显提高生物质的生物降解, 促进废水废料微生物分解, 对强化厌氧暗发酵产氢效果较好, 但质量浓度过高毒性较强, 易诱导 ROS 生成而氧化损伤微生物细胞膜, 降低厌氧菌的活力和生存能力, 而 ZnNPs 毒性则更小, 更不易造成细胞毒性, 但其更易因磁性吸引而团聚失活, 循环利用性能较低, 该策略可利用载体负载法、双金属协同作用等方法来控制颗粒释放质量浓度、提供更多碱性位点, 缓解由 VFAs 引起的 pH 下降趋势, 改善产氢酶系整体的活性与稳定性, 提高厌氧微生物暗发酵制氢能力。综上, 相比于镍基 NPs 和锌基 NPs, 目前, 铁基 NPs 添加策略的研究及其应用最为广泛, 制备成本较低且环境效益较好, 用于暗发酵制氢能更好地提高微生物制氢能力和系统氢产量。因此, 针对 MNPs 最优添加量和负载技术等方面的深入研究有望解决暗发酵氢化酶活性低和产氢量低的瓶颈问题, 同时在 MNPs 优化氢化酶催化活性、生物质发酵底物拓宽、高效产氢微生物筛选和制氢反应器设计、以及新型生物质发酵技术开发等方面也仍面临诸多挑战, 为拓宽其在暗发酵制氢中的应用前景, 推动生物质绿色制氢工业化进程, 提出未来绿色发酵制氢技术可从以下 4 个方面开展更深入的研究:

(1) MNPs 优化氢化酶活性方面, 目前暗发酵制氢研究过程中多采用单一 MNPs 添加, 较难避免 MNPs 在高质量浓度下干扰细胞代谢, 从而产生细胞毒性, 通过深入双金属协同作用发酵制氢研究, 探索双金属协同使用和作用机制, 不仅能克服单一颗粒作用因毒性受限问题, 还能提高发酵系统氢产量和整体制氢性能, 同时促进底物消耗利用以实现有机废物的循环利用。例如: Ni 和 Co 作为细胞生长不可缺少的元素和辅助因子, 能有效转移电子以

增强氢化酶活性, Ni^{2+} 可提高[Ni-Fe]氢化酶的活性, 增加氢代谢通量分布, 从而促进产氢, Co^{2+} 可加速代谢反应, 调节代谢产氢途径以提高氢产量, 但二者均受质量浓度效应和毒性效应限制, 合理添加 NiONPs 和 CoONPs 进行协同发酵制氢能降低二者产生的细胞毒性, 促进厌氧菌细胞生长和底物降解。

(2) 生物质发酵底物拓宽方面^[111-112]。东方电气集团和重庆市政府合作的垃圾制氢项目作为国内首个垃圾制绿氢示范项目, 目前已实现每吨垃圾制取 20~40 公斤左右绿氢的目标^[113]。今后研究除大力开发生活垃圾和工农业废水废弃物原料、传统木质纤维素生物质等原料发酵制氢以外, 还可对海洋生物质(如海藻类)和海洋微生物制氢菌种进行深入研究, 通过开发利用海洋生物质发酵制氢的有效微生物链, 实现发酵产氢、环境保护和生物质高效利用等多个目标, 促进从以淡水暗发酵细菌生物制氢为研究主体逐渐向海洋微生物发酵制氢方向转变, 进一步发掘暗发酵海洋细菌生物质发酵制氢潜力和海洋能源生产的双重功效。

(3) 产氢菌筛选和制氢反应器方面^[114]。深入探索基因工程手段改造或诱变出高氢转化效率的厌氧暗发酵菌株, 从源头提高生物质发酵制氢氢产量和效率, 同时不断改进生物反应器设计和优化生物质暗发酵制氢反应器结构, 如同济大学赵有才团队^[115]评价了新型半连续式厌氧转鼓反应器(SARD)与连续搅拌槽式反应器(CSTR)发酵产氢的效果, 结果发现, SARD 的运行效果优于 CSTR, 且半连续运行比序批式运行的效果更佳, 产氢细菌数量和氢产量均得到明显提高, 相关反应器的设计改造值得进一步研究。

(4) 生物质发酵技术方面^[116-118]。利用暗发酵的副产物 VFAs 可作为光发酵生物制氢底物这一特性, 深入探究暗-光发酵制氢机制, 充分发挥两者各自优势, 同时接种基因工程改造的光-暗发酵优势菌, 再通过利用植物中的次生代谢产物来绿色合成高稳定性的 MNPs, 减少暗-光发酵制氢体系中毒性化学试剂使用, 充分考虑生物相容性、发酵基质和接种菌种等因素, 推进生物质发酵技术研究。

未来, 为引导氢能产业健康有序发展, 政府应高度重视以下几个方面并持续发力^[119-120]: (1) 应统筹推进氢能基础设施建设, 合理布局制氢设施, 稳步构建储运体系, 统筹规划加氢网络; (2) 需稳步推进氢能多元化示范应用, 有序推进交通领域示范应用, 积极开展储能领域示范应用, 合理布局发电领域多元应用, 逐步探索工业领域替代应用; (3) 要加快完善氢能发展政策和制度保障体系, 建立健全氢能政策体系, 建立完善氢能产业标准体系、加

强全链条安全监管；重点要系统构建支撑氢能产业高质量发展创新体系，提升关键核心技术水平，着力打造产业创新支撑平台，推动建设氢能专业队伍，积极开展氢能技术创新国际合作，早日推进实现生物质暗发酵制氢工业化。

参考文献：

- [1] WANG R X (王瑞雪), WU J Z (吴家哲), ZHENG W Y (郑文钰), *et al.* Electrolyte regulation in water electrolysis for hydrogen production[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(10): 1964-1975.
- [2] MENG Z X (孟照鑫), HE Q (何青), HU H W (胡华为), *et al.* Development situation and consideration of hydrogen energy industry in China[J]. *Modern Chemical Industry (现代化工)*, 2022, 42(1): 1-6, 12.
- [3] LI L R (李亮荣), LIANG J (梁娇), PENG J (彭建), *et al.* Research progress of photocatalytic water splitting for hydrogen production using MOF based catalysts[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(3): 553-564, 696.
- [4] LEE H S, XIN W, KATAKOJWALA R, *et al.* Microbial electrolysis cells for the production of biohydrogen in dark fermentation-A review[J/OL]. *Bioresource Technology*, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127045>.
- [5] VUPPALADADIYAM A K, VUPPALADADIYAM S S V, AWASTHI A, *et al.* Biomass pyrolysis: A review on recent advancements and green hydrogen production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 1-17.
- [6] ZHANG Y, SUN H X, TAN J X, *et al.* Capacity configuration optimization of multi-energy system integrating wind turbine/photovoltaic/hydrogen/battery[J]. *Energy*, 2022, 252: 124046.
- [7] TANG T T, CHEN Y, LIU M, *et al.* Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification[J]. *Environmental Research*, 2022, 208: 112663.
- [8] CHEN Y J (陈英杰). Technical progress and development trend of hydrogen production from natural gas[J]. *Coal and Chemical Industry (煤炭与化工)*, 2020, 43(11): 130-133.
- [9] WU S T (伍赛特). The future prospect of biological hydrogen production technology[J]. *Energy and Environment (能源与环境)*, 2019(3): 83-84, 87.
- [10] SRIVASTAVA N, SRIVASTAVA M, MISHRA P K, *et al.* Advances in nanomaterials induced biohydrogen production using waste biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 307: 123094.
- [11] LI L R (李亮荣), PENG J (彭建), FU B (付兵), *et al.* Development trend and application prospect of green hydrogen production technologies under carbon neutralization vision[J]. *Acta Energies Solaris Sinica (太阳能学报)*, 2022, 43(6): 508-520.
- [12] WU M J (吴梦佳), SUI H (隋红), ZHANG R L (张瑞玲). Recent research advances in bio-fermentation hydrogen production technology[J]. *Modern Chemical Industry (现代化工)*, 2014, 34(5): 43-46, 48.
- [13] MARTINO M, RUOCCO C, MELONI E, *et al.* Main hydrogen production processes: An overview[J]. *Catalysts*, 2021, 11(5): 547.
- [14] KUMAR R, KUMAR A, PAL A. An overview of conventional and non-conventional hydrogen production methods[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 46: 5353-5359.
- [15] RAMPRAKASH B, LINDBLAD P, EATON-RYE J J, *et al.* Current strategies and future perspectives in biological hydrogen production: A review[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2022, 168: 112773.
- [16] LUKAJTIS R, HOLOWACZ I, KUCHARSKA K, *et al.* Hydrogen production from biomass using dark fermentation[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2018, 91: 665-694.
- [17] SHARMILA V G, TAMILARASAN K, KUMAR M D, *et al.* Trends in dark biohydrogen production strategy and linkages with transition towards low carbon economy: An outlook, cost-effectiveness, bottlenecks and future scope[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(34): 15309-15332.
- [18] ZHANG Q G (张全国), LI G (李刚). Status quo of the technology for biological hydrogen generation and its developing potential[J]. *Renewable Energy Industry (新能源产业)*, 2007(4): 17-22.
- [19] CHENG D L, NGO H H, GUO W S, *et al.* Advanced strategies for enhancing dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 351: 127045.
- [20] SUN R R (孙茹茹), JIANG J S (姜霁珊), XU Y (徐叶), *et al.* Research advances on metabolic pathways of hydrogen production by dark fermentation[J]. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences) (上海师范大学学报: 自然科学版)*, 2020, 49(6): 614-621.
- [21] MISHRA P, THAKUR S, MAHAPATRA D M, *et al.* Impacts of nano-metal oxides on hydrogen production in anaerobic digestion of palm oil mill effluent-A novel approach[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2018, 43(5): 2666-2676.
- [22] SHARMA M, JOSHI M, NIGAM S, *et al.* ZnO tetrapods and activated carbon based hybrid composite: Adsorbents for enhanced decontamination of hexavalent chromium from aqueous solution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 358: 540-551.
- [23] SHANMUGAM S, HARI A, PANDEY A, *et al.* Comprehensive review on the application of inorganic and organic nanoparticles for enhancing biohydrogen production[J]. *Fuel*, 2020, 270: 117453.
- [24] YILDIRIM O, TUNAY D, OZKAYA B, *et al.* Effect of green synthesized silver oxide nanoparticle on biological hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(45): 19517-19525.
- [25] PUGAZHENDHI A, SHOBANA S, NGUYEN D D, *et al.* Application of nanotechnology (nanoparticles) in dark fermentative hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(3): 1431-1440.
- [26] KUMAR G, MATHIMANI T, RENE E R, *et al.* Application of nanotechnology in dark fermentation for enhanced biohydrogen production using inorganic nanoparticles[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44(26): 13106-13113.
- [27] REN Y, SI B C, LIU Z D, *et al.* Promoting dark fermentation for biohydrogen production: Potential roles of iron-based additives[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(3): 1499-1515.
- [28] SUN Y, WANG Y S, YANG G, *et al.* Optimization of biohydrogen production using acid pretreated corn stover hydrolysate followed by nickel nanoparticle addition[J]. *International Journal of Energy Research*, 2020, 44(3): 1843-1857.
- [29] DABIRIAN E, HAJIPOUR A, MEHRIZI A A, *et al.* Nanoparticles application on fuel production from biological resources: A review[J]. *Fuel*, 2023, 331: 125682.
- [30] KIM D H, KIM M S. Hydrogenases for biological hydrogen production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(18): 8423-8431.
- [31] ZHANG L, CHUNG J S, REN N Q, *et al.* Effects of the ecological factors on hydrogen production and [Fe-Fe]-hydrogenase activity in *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2015, 40(21): 6792-6797.
- [32] LI S Y (李姝怡). Albumin/[FeFe]-hydrogenase mimics for photochemical hydrogen evolution[D]. Nanjing: Nanjing University (南京大学), 2020.
- [33] HAN H L, CUI M J, WEI L L, *et al.* Enhancement effect of hematite nanoparticles on fermentative hydrogen production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 7903-7909.
- [34] ENGLIMAN N S, ABDUL P M, WU S Y, *et al.* Influence of iron (II) oxide nanoparticle on biohydrogen production in thermophilic mixed fermentation[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, 42(45): 27482-27493.
- [35] ZHANG J S, ZHAO W Q, YANG J W, *et al.* Comparison of mesophilic and thermophilic dark fermentation with nickel ferrite

- nanoparticles supplementation for biohydrogen production[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124853.
- [36] ZHANG J S, LI W Q, YANG J W, *et al.* Cobalt ferrate nanoparticles improved dark fermentation for hydrogen evolution[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 316: 128275.
- [37] CHEN K F, LI S L, ZHANG W X. Renewable hydrogen generation by bimetallic zero valent iron nanoparticles[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 170(2/3): 562-567.
- [38] LIU A R (刘爱荣), LI J (李季), WANG W (王伟), *et al.* Advance of heavy metal-loading industrial wastewater treatment with nanoscale zero-valent iron[J]. *Environmental Chemistry (环境化学)*, 2022, 41(4): 1278-1291.
- [39] MOKETE R, ELJAMAL O, SUGIHARA Y. Exploration of the reactivity of nanoscale zero-valent iron (NZVI) associated nanoparticles in diverse experimental conditions[J]. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2020, 150: 107879.
- [40] TONG H H (童海航), SHI D Z (石德智), LIU J Y (刘嘉宇), *et al.* Research progress on dark fermentative bio-hydrogen production from lignocellulose assisted by metal nanoparticles[J]. *CIESC Journal (化工学报)*, 2022, 73(4): 1417-1435.
- [41] YOU X G (由晓刚). Effect of nano-zerovalent iron (NZVI) on anaerobic digestion of sludge[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology (青岛科技大学), 2020.
- [42] WANG X (王雪), YUAN H Y (苑宏英), JIA X (贾璇), *et al.* Effect of nano zero valent iron and zero valent iron on the iron ion composition and enzyme activity during dark fermentation of food waste for hydrogen production[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering (环境工程学报)*, 2020, 14(5): 1354-1364.
- [43] MALIK S N, KUMAR S. Enhancement effect of zero-valent iron nanoparticle and iron oxide nanoparticles on dark fermentative hydrogen production from molasses-based distillery wastewater[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2021, 46(58): 29812-29821.
- [44] LI Y B, ZHU Q H, DING P F, *et al.* Effects of Fe⁰ and Ni⁰ nanoparticles on hydrogen production from cotton stalk hydrolysate using *Klebsiella* sp. WL1316: Evaluation of size and concentration of the nanoparticles[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2020, 45(11): 6243-6253.
- [45] KAN L B (阚连宝), LIU Z (刘泽). Research progress in preparation and application of nano-zero-valent iron[J]. *Environmental Science & Technology (环境科学与技术)*, 2019, 42(6): 215-223.
- [46] BECKERS L, HILIGSMANN S, LAMBERT S D, *et al.* Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 109-117.
- [47] FAN C F (范传芳). Study on the preparation of bio-based iron-carbon material and its application on hydrogen production by dark fermentation[D]. Jinan: Qilu University of Technology (齐鲁工业大学), 2019.
- [48] YI N, WU Y G, FAN L, *et al.* Remediating Cd-contaminated soils using natural and chitosan-introduced zeolite, bentonite, and activated carbon[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2019, 28(3): 1461-1468.
- [49] KIM M H, JEONG I T, PARK S B, *et al.* Analysis of environmental impact of activated carbon production from wood waste[J]. *Environmental Engineering Research*, 2019, 24(1): 117-126.
- [50] SEWWANGI K, NITISORAVUT R. Nano zero valent iron embedded on chitosan for enhancement of biohydrogen production in dark fermentation[J]. *Energy Reports*, 2020, 6: 392-396.
- [51] SUN H P, SHEN J H, HU M Y, *et al.* Manganese ferrite nanoparticles enhanced biohydrogen production from mesophilic and thermophilic dark fermentation[J]. *Energy Reports*, 2021, 7: 6234-6245.
- [52] YIN Y N, WANG J L. Mechanisms of enhanced hydrogen production from sewage sludge by ferrous ion: Insights into functional genes and metabolic pathways[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 321: 124435.
- [53] JIA Y (贾园), MA H (马欢), YANG J X (杨菊香), *et al.* Application and research progress of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles[J]. *Chemical Industry & Engineering (化学工业与工程)*, 2023, 40(5): 8-18.
- [54] EL-SHAFAI N M, ABDELFAH M M, EL-KHOULY M E, *et al.* Magnetite nano-spherical quantum dots decorated graphene oxide nano sheet (GO@Fe₃O₄): Electrochemical properties and applications for removal heavy metals, pesticide and solar cell[J]. *Applied Surface Science*, 2020, 506: 144896.
- [55] ZHANG Y G (张永贵), XU S Y (许思远), ZHANG Q (张琴), *et al.* Progress on the application of metal nanoparticles in the dark fermentative hydrogen production[J]. *Applied Chemical Industry (应用化工)*, 2021, 50(7): 1922-1926.
- [56] LI Y M, ZHANG Z P, LEE D J, *et al.* Role of L-cysteine and iron oxide nanoparticle in affecting hydrogen yield potential and electronic distribution in biohydrogen production from dark fermentation effluents by photo-fermentation[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 276: 123193.
- [57] ZHANG J S, FAN C F, ZANG L H. Improvement of hydrogen production from glucose by ferrous iron and biochar[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 98-105.
- [58] WU K X (吴凯旋). Iron-based nanoparticles enhance anaerobic hydrogen production of ethanol-type fermentable bacteria[D]. Qingdao: Qingdao University (青岛大学), 2020.
- [59] LIN R C, CHENG J, DING L K, *et al.* Enhanced dark hydrogen fermentation by addition of ferric oxide nanoparticles using *Enterobacter aerogenes*[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 207: 213-219.
- [60] ZHAO L, ZHANG J S, ZHAO W Q, *et al.* Improved fermentative hydrogen production with the addition of calcium-lignosulfonate-derived biochar[J]. *Energy & Fuels*, 2019, 33(8): 7406-7414.
- [61] BU J, WEI H L, WANG Y T, *et al.* Biochar boosts dark fermentative H₂ production from sugarcane bagasse by selective enrichment/colonization of functional bacteria and enhancing extracellular electron transfer[J]. *Water Research*, 2021, 202: 117440.
- [62] YORUKLU H C, FILIZ B C, FIGEN A K, *et al.* Screening of biohydrogen production based on dark fermentation in the presence of nano-sized Fe₂O₃ doped metal oxide additives[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(34): 15383-15396.
- [63] HIROMOTO T, NISHIKAWA K, TAMADA T, *et al.* The challenge of visualizing the bridging hydride at the active site and proton network of [Ni-Fe]-hydrogenase by neutron crystallography[J]. *Topics in Catalysis*, 2021, 64: 622-630.
- [64] VIGNANIS P M, BILLOUD B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(10): 4206-4272.
- [65] LOGAN B E. Biologically extracting energy from wastewater: Biohydrogen production and microbial fuel cells[J]. *Environmental Science Technology*, 2004, 38(9): 160-167.
- [66] MISHRA P, SINGH L, WAHID Z A. Influence of nano nickel oxide (NNO) particles on hydrogen production in dark fermentation of palm oil mill effluent[C]. *The National Conference for Postgraduate Research*, 2016: 783-787.
- [67] BISWAL T, SHADANGI K P, SARANGI P K. Application of nanotechnology in the production of biohydrogen: A review[J]. *Chemical Engineering & Technology*, 2023, 46(2): 218-233.
- [68] MUDIGONDA S, DAHMS H U, HWANG J S, *et al.* Combined effects of copper oxide and nickel oxide coated chitosan nanoparticles adsorbed to styrofoam resin beads on hydrothermal vent bacteria[J]. *Chemosphere*, 2022, 308: 136338.
- [69] RAZANAMAHANDRY L C, NWANYA A C, BASHIR A K H, *et al.* Thermal valorisation extracts of selected agro-waste for human pathogen antibacterial NiO nanoparticles synthesis[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 36: 559-565.
- [70] RODIONOV D A, HEBBELN P, GELFAND M S, *et al.* Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: Evidence for a novel group of ATP-binding

- cassette transporters[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(1): 317-327.
- [71] CHAI Y F, LYU Z Y, DU H T, *et al.* Recent progress on rational design of catalysts for fermentative hydrogen production[J]. *SusMat*, 2022, 2(4): 392-410.
- [72] RAMBABU K, BHARATH G, THANIGAIVELAN A, *et al.* Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124243.
- [73] MISHRA P, SINGH L, ISLAM M A, *et al.* NiO and CoO nanoparticles mediated biological hydrogen production: Effect of Ni/Co oxide NPs-ratio[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2019, 5: 364-368.
- [74] SINGH J, DUTTA T, KIM K H, *et al.* 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 1-24.
- [75] JAGATHESAN G, RAJIV P. Biosynthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using *Eichhornia crassipes* leaf extract and assessing their antibacterial activity[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 13: 90-94.
- [76] ZHANG Q, XU S Y, LI Y B, *et al.* Green-synthesized nickel oxide nanoparticles enhances biohydrogen production of *Klebsiella* sp. WL1316 using lignocellulosic hydrolysate and its regulatory mechanism[J]. *Fuel*, 2021, 305: 121585.
- [77] ABDELSALAM E, SAMER M, ATTIA Y A, *et al.* Effects of Co and Ni nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of slurry[J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 141: 108-119.
- [78] MOURA A G L, RABELO C, OKINO C H, *et al.* Enhancement of *Clostridium butyricum* hydrogen production by iron and nickel nanoparticles: Effects on hydA expression[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2020, 45(53): 28447-28461.
- [79] PATEL S K S, LEE J K, KALIA V C. Nanoparticles in biological hydrogen production: An overview[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2018, 58(1): 8-18.
- [80] AHMAD A, OTHMAN I, RAMBABU K, *et al.* Polymerization of lactic acid produced from food waste by metal oxide-assisted dark fermentation[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 24: 101862.
- [81] ELREEDY A, IBRAHIM E, HASSAN N, *et al.* Nickel-graphene nanocomposite as a novel supplement for enhancement of biohydrogen production from industrial wastewater containing mono-ethylene glycol[J]. *Energy Conversion and Management*, 2017, 140: 133-144.
- [82] TAHERDANAK M, ZILOUEI H, KARIMI K. Investigating the effects of iron and nickel nanoparticles on dark hydrogen fermentation from starch using central composite design[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2015, 40(38): 12956-12963.
- [83] MULLAI P, YOGESWARI M K, SRIDEVI K. Optimisation and enhancement of biohydrogen production using nickel nanoparticles-a novel approach[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 141: 212-219.
- [84] WANNAPOKIN A, CHENG Y T, WU S Z, *et al.* Potential of bio-hydrogen production by *C. pasteurianum* co-immobilized with selected nano-metal particles[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2021, 46(20): 11337-11344.
- [85] ZHANG H, LI Y M, CHEN L, *et al.* Effect of zinc ion on photo-fermentative hydrogen production performance, kinetics and electronic distribution in biohydrogen production by HAU-M1[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 324: 124680.
- [86] YANG Y R (杨裕然), ZHANG C (张灿), LI Z L (李振轮). The toxicity of ZnO and CuO nanoparticles on biological wastewater treatment and its detoxification: A review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2023, 39(3): 1026-1039.
- [87] LIU C, USMAN M, JI M Y, *et al.* Response mechanisms of anaerobic fermentative sludge to zinc oxide nanoparticles during medium-chain carboxylates production from waste activated sludge[J]. *Chemosphere*, 2023, 317: 137879.
- [88] SHAHBAZ A, HUSSAIN N, SALEEM M Z, *et al.* Nanoparticles as stimulants for efficient generation of biofuels and renewables[J]. *Fuel*, 2022, 319: 123724.
- [89] KANMANI S. Enhancement of biological hydrogen production from organic wastes with the application of nanomaterials[J]. *International Journal of Energy Research*, 2022, 46(13): 18929-18946.
- [90] SONG Y (宋旸), LIANG H B (梁宏宝), CHEN Z X (陈忠喜), *et al.* Effect of nano-ZnO particles on nitrification of SBR activated sludge and its mechanism [J]. *Journal of Functional Materials (功能材料)*, 2022, 53(8): 8134-8139.
- [91] ZHANG Y T, WEI W, NI B J. Revealing the mechanism of zinc oxide nanoparticles facilitating hydrogen production in alkaline anaerobic fermentation of waste activated sludge[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 328: 129580.
- [92] YUAN J (袁静). Effect of metal nanoparticles on biohydrogen produced by *Enterobacter* sp. HDX08 bacteria during anaerobic fermentation[D]. Xiangtan: Xiangtan University (湘潭大学), 2019.
- [93] CHEN Y, YIN Y N, WANG J L. Recent advance in inhibition of dark fermentative hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2021, 46(7): 5053-5073.
- [94] WIMONSONG P, NITISORAVUT R, LLORCA J. Application of Fe-Zn-Mg-Al-O hydrotalcites supported Au as active nano-catalyst for fermentative hydrogen production[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 253: 148-154.
- [95] ELREEDY A, FUJII M, KOYAMA M, *et al.* Enhanced fermentative hydrogen production from industrial wastewater using mixed culture bacteria incorporated with iron, nickel, and zinc-based nanoparticles[J]. *Water Research*, 2019, 151: 349-361.
- [96] WIMONSONG P. Carbon-Zn hydrotalcite hybrid catalyst for fermentative hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2021, 46(5): 3704-3715.
- [97] SYBOUNYA S, NITISORAVUT R. Hybrid composite of modified commercial activated carbon and Zn-Ni hydrotalcite for fermentative hydrogen production[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(1): 104801.
- [98] ZOU C N (邹才能), HE D B (何东博), JIA C Y (贾成业), *et al.* Connotation and pathway of world energy transition and its significance for carbon neutral[J]. *Acta Petroli Sinica (石油学报)*, 2021, 42(2): 233-247.
- [99] LEBROUHI B E, DJOUPO J J, LAMRANI B, *et al.* Global hydrogen development-A technological and geopolitical overview[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(11): 7016-7048.
- [100] LIU P K, HAN X. Comparative analysis on similarities and differences of hydrogen energy development in the world's top 4 largest economies: A novel framework[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(16): 9485-9503.
- [101] ISHAQ H, DINCER I, CRAWFORD C. A review on hydrogen production and utilization: Challenges and opportunities[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 47(62): 26238-26264.
- [102] MA T (马婷), LIU Q Y (刘芊驿). Development prospects and investment strategies of hydrogen energy[J]. *Maritime China (中国远洋海运)*, 2022(5): 42-48, 9.
- [103] RASUL M G, HAZART M A, SATTAR M A, *et al.* The future of hydrogen: Challenges on production, storage and applications[J]. *Energy Conversion and Management*, 2022, 272: 116326.
- [104] LI L R (李亮荣), FU B (付兵), LIU Y (刘艳), *et al.* Research progress of hydrogen production by reforming biomass-derived compounds[J]. *Inorganic Chemicals Industry (无机盐工业)*, 2021, 53(9): 12-17.
- [105] PEI X Y (裴轩媛), REN H Y (任宏宇), REN N Q (任南琪), *et al.* Review on the application of sludge derived biochar in the treatment of emerging contaminants in water environment[J]. *Water & Wastewater Engineering (给水排水)*, 2021, 57(S2): 545-552.
- [106] NDAYISENGA F, YU Z S, ZHENG J Z, *et al.* Microbial

- electrohydrogenesis cell and dark fermentation integrated system enhances biohydrogen production from lignocellulosic agricultural wastes: Substrate pretreatment towards optimization[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2021, 145: 111078.
- [107] GADHE A, SONAWANE S S, VARMA M N. Influence of nickel and hematite nanoparticle powder on the production of biohydrogen from complex distillery wastewater in batch fermentation[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2015, 40(34): 10734-10743.
- [108] KANWAL F, TORRIERO A A J. Biohydrogen-A green fuel for sustainable energy solutions[J]. *Energies*, 2022, 15(20): 7783.
- [109] LIN H N, HU B B, ZHU M J. Enhanced hydrogen production and sugar accumulation from spent mushroom compost by *Clostridium thermocellum* supplemented with PEG8000 and JFC-E[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, 41(4): 2383-2390.
- [110] SRIVASTAVA N, SRIVASTAVA M, MANIKANTA A, *et al.* Nanomaterials for biofuel production using lignocellulosic waste[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15(2): 179-184.
- [111] SIM Y B, JUNG J H, BAIK J H, *et al.* Dynamic membrane bioreactor for high rate continuous biohydrogen production from algal biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125562.
- [112] KUMAR M D, KAVITHA S, TYAGI V K, *et al.* Macroalgae-derived biohydrogen production: Biorefinery and circular bioeconomy[J]. *Biomass Conversion & Biorefinery*, 2021, 12: 769-791.
- [113] CCTV Network (央视网). Renewable energy hydrogen production has great potential for growth Trash hydrogen production opens a new track[EB/OL]. [2023-04-24]. https://m.gmw.cn/2023-04/24/content_1303352995.html.
- [114] CHOUDHARY A K, KUMAR A A, PRAKASH O, *et al.* Bioreactors for biomass conversion: Solid-state fermentation, slurry reactors, airlift reactors[M]// Florida: CRC Press, 2022: 1-12.
- [115] LIU C Q (刘常青), CHEN W (陈琬), ZENG Y F (曾艺芳), *et al.* Hydrogen production capacity of semi-continuous fermentation of SARD and CSTR bio-hydrogen production reactor[J]. *China Water & Wastewater* (中国给水排水), 2018, 34(21): 7-11, 17.
- [116] RATHI B S, KUMAR P S, RANGASAMY G, *et al.* A critical review on biohydrogen generation from biomass[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022, 52: 115-138.
- [117] RAMPRAKASH B, LINDBLAD P, EATON-RYE J J, *et al.* Current strategies and future perspectives in biological hydrogen production: A review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2022, 168: 112773.
- [118] SURESH G, KUMARI P, MOHAN S V. Light-dependent biohydrogen production: Progress and perspectives[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 380: 129007.
- [119] PEOPLE'S Network (人民网). The development of China's hydrogen energy industry is on the 'fast track' (expert interpretation)[EB/OL]. [2023-04-24]. <https://world.people.com.cn/n1/2023/0424/c1002-32671685.html>.
- [120] ZHANG Z (张智), ZHAO Y J (赵苑瑾), CAI N (蔡楠). Technological development status and prospect of hydrogen energy industry in China[J]. *Natural Gas Industry* (天然气工业), 2022, 42(5): 156-165.
- (上接第541页)
- [57] LEE S S, ZHU H, CONTRERAS E Q, *et al.* High temperature decomposition of cerium precursors to form ceria nanocrystal libraries for biological applications[J]. *Chemistry of Materials*, 2012, 24(3): 424-432.
- [58] SHEN Y M, MA J Z, FAN Q Q, *et al.* Strategic development of chrome-free tanning agent by integrating layered double hydroxide with starch derivatives[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 304: 120511.
- [59] MARMER W N. Overview of the USDA hides and leather research program[J]. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2001, 96(3): 88-93.
- [60] KAUSSEN M. Fatliquoring agent for improving the properties of furniture and automotive leather[J]. *The Journal of the American Leather Chemists Association*, 1998, 93: 16-21.
- [61] LIAO L L (廖隆理), CHEN W Y (陈武勇). Experiments of leather making technology[M]. Beijing: China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 2000.
- [62] MA J Z (马建中). Chemical of leather[M]. Beijing: Chemical Industry Publishing Company (化学工业出版社), 2002.
- [63] ALI Y, ESER E B, MANFRED R. Preparation of antimicrobial lipid-additive agents containing zinc oxide nanoparticles in the tanning industry[J]. *Chinese Leather* (中国皮革), 2020, 49(6): 33-40.
- [64] GAO J J (高建静). Alkyl glycoside derivatives/Ag/TiO₂/soybean phospholipids research on nanocomposite fatliquor[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology (陕西科技大学), 2019.
- [65] MOHAMED O A, MOUSTAFA A B, MEHAWED M A, *et al.* Styrene and butyl methacrylate copolymers and their application in leather finishing[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009, 111(3): 1488-1495.
- [66] FAN Q Q, MA J Z, XU Q N, *et al.* Animal-derived natural products review: Focus on novel modifications and applications[J]. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 128: 181-190.
- [67] KOTHANDAM R, PANDURANGAN M, JAYAVEL R, *et al.* A novel nano-finish formulation for enhancing performance properties in leather finishing applications[J]. *Journal of Cluster Science*, 2016, 27: 1263-1272.
- [68] MA J Z, XU Q N, ZHOU J H, *et al.* Nano-scale core-shell structural casein based coating latex: Synthesis, characterization and its biodegradability[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2013, 76(10): 1346-1355.
- [69] SUNDAR S, VIJAYALAKSHMI N, GUPTA S, *et al.* Aqueous dispersions of polyurethane-polyvinyl pyridine cationomers and their application as binder in base coat for leather finishing[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2006, 56(2/3): 178-184.
- [70] XIA Q F, YANG L, HU K, *et al.* Chromium cross-linking based immobilization of silver nanoparticle coating on leather surface with broad-spectrum antimicrobial activity and durability[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 11(2): 2352-2363.
- [71] WANG Y N, MA J Z, XU Q N, *et al.* Fabrication of antibacterial casein-based ZnO nanocomposite for flexible coatings[J]. *Materials & Design*, 2017, 113: 240-245.
- [72] FAN Q Q, WEN L, DONG R, *et al.* Visible light-driven highly efficient self-cleaning coatings crafted on leather surface using double perovskite as the booster[J]. *Applied Surface Science*, 2023, 638: 158108.
- [73] WU Y, DENG Z C, WANG X Y, *et al.* Synergistic antibacterial photocatalytic and photothermal properties over bowl-shaped TiO₂ nanostructures on Ti-19Zr-10Nb-1Fe alloy[J]. *Regenerative Biomater*, 2022, 9: rbac025.
- [74] LIU G Y, LI K J, LUO Q Q, *et al.* PEGylated chitosan protected silver nanoparticles as water-borne coating for leather with antibacterial property[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 490: 642-651.