DOI:10.11918/202601017

面向碳中和的生物制氢技术发展与展望

王 晶[1], 李 朋[1], 李 真[2], 林佳怡[1], 周慧慧[1], 邢德峰[1]

(1. 城乡水资源与水环境全国重点实验室(哈尔滨工业大学),哈尔滨 150090;
2. 中国农业科学院 农产品加工研究所,北京 100193)

摘 要: 绿色氢能是实现我国碳中和目标以及推动能源转型的有效路径之一。生物制氢技术凭借其协同治理污染物、环境友好及可实现能源回收等优势,在该领域展现出广阔的应用前景。对比其他生物制氢技术,暗发酵法因产氢速率高、底物利用范围广且运行条件简单而备受关注。其中,乙醇型发酵具有底物利用率高、耐受低 pH 值以及乙醇-氢气协同生产等优势,使其成为当前研究重点及热点。本文系统阐明了乙醇型发酵代表性菌株哈尔滨产乙醇杆菌(*Ethanoligenens harbinense*)的乙醇-氢气代谢路径,并揭示了其在传统胁迫因子(pH 波动、产物积累)及新污染物微塑料暴露下的分子响应机制,深化了对产酸发酵微生物适应性机制的理解。在此基础上,本工作从菌群互作调控及电子传递强化的角度出发,提出了暗发酵强化策略,并进一步阐明了微生物电化学技术在强化生物制氢过程中的作用机理与应用前景。在应用层面,构建了面向"双碳"战略的多源有机固废梯级生物制氢系统,实现了有机废物处理、资源能源梯级回收与碳减排的协同,同时指出了以技术经济性和全生命周期环境效益分析为核心的未来研究方向。本工作系统阐述了生物制氢技术的发展路径,为该技术的工业化应用提供了理论与技术指导。

关键词: 生物制氢;产氢产乙醇发酵;产氢代谢途径;分子调控机制;梯级生物制氢
中图分类号: TQ116.2 **文献标志码**: A **文章编号**: 0367-6234(2026)08-0042-13

Development and prospects of biohydrogen production technologies for carbon neutrality

Wang Jing[1], Li Peng[1], Li Zhen[2], Lin Jiayi[1], Zhou Huihui[1], Xing Defeng[1]

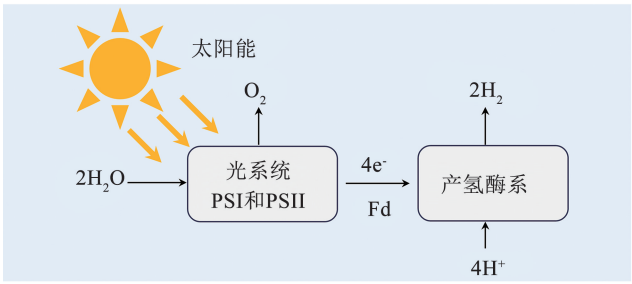
(1. State Key Laboratory of Urban-Rural Water Resource and Environment (Harbin Institute of Technology), Harbin 150090, China;
2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Green hydrogen is an effective pathway to achieve China's carbon neutrality goals and promote energy transition. Biohydrogen production, with its advantages in synergistic pollutant treatment, environmental friendliness, and energy recovery, shows broad application prospects in this field. Compared with other biohydrogen production technologies, dark fermentation has attracted much attention due to its high hydrogen production rate, broad substrate utilization range, and simple operating conditions. Among these, ethanol-type fermentation has become a research focus and hotspot owing to its high substrate utilization efficiency, low pH tolerance, and synergistic ethanol-hydrogen production. This paper systematically elucidated the ethanol-hydrogen co-metabolic pathway of the representative ethanol-type fermentative bacterium *Ethanoligenens harbinense*, and revealed its molecular response mechanisms under traditional stressors (pH fluctuation, product accumulation) and emerging pollutant microplastics exposure, deepening the understanding of the adaptive mechanisms of acidogenic fermentative microorganisms. Accordingly, this work proposed dark fermentation enhancement strategies from the perspectives of microbial interaction regulation and electron transfer enhancement, and further clarified the mechanism and application prospects of microbial electrochemical technology in enhancing biohydrogen production. From the application perspective, a multi-source organic solid waste cascade biohydrogen production system oriented towards the "dual carbon" strategy was constructed, achieving synergy among organic waste treatment, resource/energy cascade recovery, and carbon emission reduction, while identifying future research directions centered on techno-economic analysis and life cycle environmental benefit assessment. This work systematically elaborated the development pathway of biohydrogen production technology, providing theoretical and technical guidance for its industrial application.

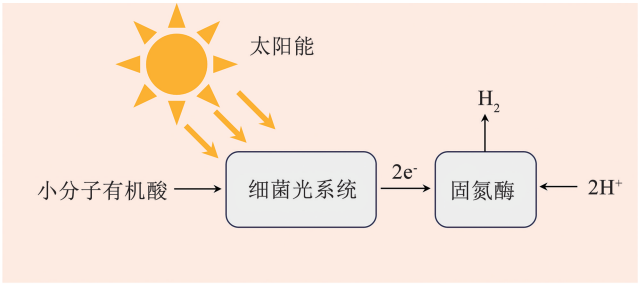
收稿日期: 2026-01-06;**录用日期**: 2026-01-29;**网络首发日期**: 2026-03-23
网络首发地址: https://link.cnki.net/urlid/23.1235.T.20260321.1219.002
基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点项目(U22A20443);国家自然科学基金(52400023)
作者简介: 王 晶(1994—),女,副研究员;邢德峰(1977—),男,教授,博士生导师
通信作者: 邢德峰,dxing@hit.edu.cn

Keywords: biohydrogen production; ethanol-hydrogen co-producing fermentation; metabolic pathway of hydrogen production; molecular regulatory mechanism; cascaded biohydrogen production

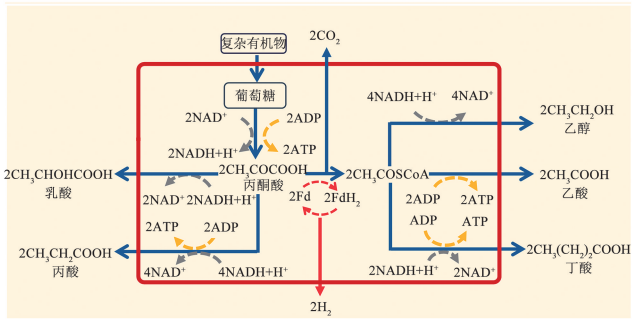
近年来,发展绿色低碳的氢能已成为国内外的研究热点。氢能已被确认为未来能源体系的重要组成部分,因此加快氢能产业发展将助力全球“碳中和”或“净零排放”目标的实现。目前,全球制氢技术主要以传统化石燃料产氢的“灰氢”技术为主,该技术途径存在高碳排放问题,不符合绿色可持续发展目标。利用可再生资源的“绿氢”技术是氢能未来发展的主流趋势。“绿氢”的生产过程基本不产生二氧化碳等温室气体,保证了“绿氢”生产过程中的零碳排放。与电解水制氢相比,废弃生物质制氢技术具有广泛的原料来源、污染物协同治理、低碳绿色可再生能源回收和环境友好性等优势,已成为最具发展前景的“绿氢”制取途径之一。生物制氢技术是通过微生物的代谢途径将可再生生物质或其他有机废弃物转化为氢气(H_2)的过程[1]。目前,生物制氢技术主要包括光解水法、光发酵法、暗发酵法、电发酵与微生物电解池(MEC)等(图 1)[2]。



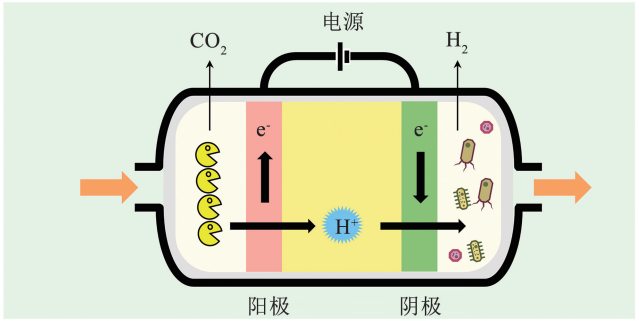
(a) 光水解法生物制氢



(b) 光发酵



(c) 暗发酵



(d) 微生物电解池法生物制氢

图 1　生物制氢技术分类

Fig. 1　Classification of biohydrogen production technologies

光解水生物制氢是微藻利用自身光合作用分解水产氢的代谢过程[3]。该方法存在光能转化率和产氢率低及光合产氧抑制等问题。光发酵法生物制氢技术是光合细菌利用固氮酶催化小分子挥发酸产生 H_2[4]。目前,光发酵产氢菌主要包括紫色非硫光合细菌如球形红细菌、荚膜红细菌、嗜硫红杆菌、红色红螺菌以及沼泽红假单胞菌等[5]。尽管该技术具有较高的光能利用率以及底物转化率,但存在光能依赖、产氢速率低和底物限制等瓶颈,难以实现规模化应用。暗发酵制氢技术是厌氧发酵产氢菌利用碳水化合物转化为 H_2 及挥发酸的过程。与光合产氢技术相比,暗发酵产氢技术具有操作成本低、产氢速率快、底物范围广和易于规模化等优势[6]。暗发酵产氢能力较高的代表性菌属主要是梭菌属和产乙醇杆菌属,二者分别进行产氢产丁酸发酵和产氢产乙醇发酵。MEC 制氢技术是利用电活性微生物的胞外电子转移通过电化学反应产生 H_2,该技术可同步实现电化学产氢和发酵产氢[7]。MEC 产氢技术具有热力学反应快、可利用底物种类广和可强化电子分流等优势[8]。目前暗发酵作为生物制氢的主流工艺,仍存在能量回收率低、产氢率低和生产成本高等问题。上述生物制氢技术因其原理和所用微生物的不同,在产氢效率、底物利用、技术成熟度及面临挑战等方面各具特点(表 1)。光依赖型技术(光解水、光发酵)虽能直接利用光能,但存在转化效率与速率的关键瓶颈。在非光依赖型技术中,暗发酵以其速率和适用性优势成为当前主流,但受限于底物转化率。正因单一技术均存在固有的局限性,

将暗发酵作为初级产氢平台,与电发酵、MEC、光发酵等技术进行耦合,构建梯级生物制氢系统,实现底物与能量的分级高效转化,成为生物制氢领域未来的重要发展方向[9]。

表1　主要生物制氢技术对比分析

Tab. 1　Comparative analysis of major biohydrogen production technologies

技术指标	核心原理	能量来源	主要底物	优势	劣势/瓶颈	技术成熟度
光解水	微藻光合系统II	光能	H_2O	以水为原料,过程清洁	产氢率极低,光合放氧抑制严重	基础研究
光发酵	光合细菌固氮酶	光能及有机物	小分子挥发酸、有机物	光效较高,可利用废弃挥发酸	依赖光照,产氢速率低,菌种底物适用范围窄	实验室研究
暗发酵	厌氧菌发酵酶系	有机物化学能	碳水化合物等广谱有机物	产氢速率快,底物广,易放大	底物转化率低,末端产物抑制	主流工艺,完成生产性示范
MEC	电活性微生物胞外电子转移	有机物化学能及外加电能	广谱有机物(如挥发酸)	产氢效率高,可打破热力学限制	需外加电能,系统成本与复杂性高	实验室向中试过渡
电发酵	微生物代谢及电化学调控	有机物化学能及弱电刺激	广谱有机物	可精准调控代谢,提升产率	机制复杂,处于研发早期	实验室研究

1　暗发酵法生物制氢的研究进展

1.1　暗发酵技术原理与概述

产氢细菌作为暗发酵生物制氢过程的关键微生物,通过细胞内部的[FeFe]-氢化酶(HydA)等关键酶系催化质子和电子结合生成 H_2。根据最适生长温度,暗发酵产氢菌可分为嗜热菌与中温菌两大类。嗜热菌如海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)在40~65 ℃甚至更高温度下表现出较高的底物降解速率和产氢能力,其产率可达3.85 mol H_2/mol 葡萄糖,接近理论最大值,但由于高温暗发酵工艺能耗较大,限制了其经济可行性[10-12]。中温菌的生长温度处于25~40 ℃范围内,且菌种资源丰富。中温暗发酵工艺因无需加热,具有能耗较低的工程优势,成为当前研究与应用的主流。中温菌的代表菌属包括梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、产乙醇杆菌属(*Ethanoligenens*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等。暗发酵反应器的运行参数如pH、氧化还原电位(ORP)及水力停留时间等,对优势菌群的组成具有重要影响,进而决定不同发酵类型的形成[13-14]。不同发酵类型的代谢差异均始于关键中间体丙酮酸,而丙酮酸主要通过丙酮酸脱氢途径或甲酸裂解途径进行分解。此外,细胞内积累的过剩还原力还可通过NADH途径在氢化酶催化下产生额外 H_2。根据主要液相末端产物的不同,中温暗发酵可分为3种类型:丁酸型发酵的液相代谢产物以丁酸及乙酸为主,其优势菌群为梭状芽孢杆菌属[15];丙酸型发酵的液相代谢产物主要是丙酸和乙酸,其优势菌群为丙酸杆菌属,丙酸型发酵通常不产生或极少产生 H_2[16];乙醇型发酵的液相代谢产物以乙醇及乙酸为主,其优势菌群为乙醇杆菌属产氢菌[13,17]。乙醇型发酵目前被认为是最具应用前景的暗发酵法生物制氢类型。在该代谢途径中,关键微生物通过乙醇合成途径高效地将NADH重新氧化为 NAD^+,从而维持细胞内氧化还原平衡,避免因还原力积累导致的代谢抑制[18-19]。乙醇型发酵通过其独特的代谢调控机制,为实现高效、稳定的连续流生物制氢工艺奠定了坚实基础。

1.2　乙醇型发酵及其产氢优势

乙醇型发酵在系统稳定性、耐酸能力和能量回收效率方面具有明显优势,其末端产物乙醇作为高价值化学品,进一步提升了发酵制氢工艺的经济效益。该技术的核心在于以哈尔滨产乙醇杆菌(*Ethanoligenens harbinense*)为代表的功能菌群。Xing等[14]分离获得的典型菌株YUAN-3不仅表现出高效产氢能力(理论产氢率接近2 mol H_2/mol 葡萄糖),其独特的自聚集和共聚集特性使其能形成直径2~10 mm的颗粒聚集体。这一特性在连续流反应器中具有关键工程价值,通过促进厌氧颗粒污泥或生物膜的形成,显著提高了反应器内的生物量,为实现发酵工艺长期稳定运行奠定了基础。在传统的连续搅拌槽式反应器中,当控制温度35±1 ℃、pH值4.6~4.9、ORP为-450~-470 mV、有机负荷率40 kg COD/(m^3·d)、水力停留时间4 h时,可获得7.6 m^3 H_2/(m^3·d)的最大产氢速率[20]。采用上流式厌氧污泥床、厌氧折流板等反应器,可有效强化生物量截留,进而实现更高的产氢效率。例如,添加颗粒活性炭的膨胀颗粒污泥床反应器在2 h水力停留时间下,产氢速率可达0.7 L/L h,H_2 产率达

3.5 mol H_2/mol 蔗糖[21]。Ren 等[22]采用约 1.5 m^3 的中试规模反应器,进行了超过 200 d 的研究,发现最大产氢速率可达 5.6 m^3 H_2/(m^3 · d),验证了乙醇型发酵产氢的工程可行性。为解决复杂生物质底物利用率低、产氢效率低及系统稳定性差等关键瓶颈,当前研究已采用多种强化策略。在底物预处理方面,活性污泥的重复曝气预处理可促进乙醇型发酵菌群富集[23]。超声预处理能将产氢效率提升至约 2.0 mol H_2/mol 葡萄糖[24]。在添加剂调控方面,Hao 等[25]合成的可回收铁基生物炭实现了 2.1 mol H_2/mol 葡萄糖的 H_2 产率,且经 3 次回收后,产率仍比对照组高 33.6%。在过程强化方面,Tang 等[26]的研究发现,乙酸会强烈抑制乙醇型发酵产氢,并据此提出了通过去除乙酸来促进产氢的方法。此外,生物强化技术也是提高 H_2 产生的有效手段。郭等[27]通过定期投加 2.5% 的 *E. harbinense* B49 菌液,使比产氢率提高至 1.4 L/(g VSS · d)。此外,Domińska 等[28]通过生物发酵联合热液处理,在 180 ℃下使餐厨垃圾的产氢率达到约 66 mL H_2/g VS。

2　生物制氢的分子机制与代谢途径

2.1　不同发酵类型产氢细菌的分子机制比较

不同发酵类型的产氢微生物在代谢途径及关键酶系上存在显著差异。丁酸型发酵的代表菌属梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)具有双途径产氢系统。一方面通过丙酮酸-铁氧还蛋白氧化还原酶与 HydA 的协同作用,直接利用丙酮酸脱羧产生的电子进行产氢;另一方面,通过 NADH -铁氧还蛋白还原酶的作用,将代谢过程中积累的 NADH 重新氧化,并将电子传递给铁氧还蛋白(Fd),最终由 HydA 实现 H_2 合成[29]。以酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)为例,其丁酸型发酵产氢过程主要依赖于还原性辅酶-铁氧还蛋白氧化还原酶的电子传递功能[30]。此外,巴氏梭菌(*Clostridium pasteurianum*)同时具有[NiFe]和[FeFe]两种氢化酶的编码基因,*hydA* 基因的过表达不仅能提升 H_2 产率,还能调节乙酸和乳酸等代谢产物的合成[31]。兼性厌氧菌的产氢机制与严格厌氧菌呈现明显区别,例如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)主要依赖甲酸裂解途径产氢[32]。通过敲除葡萄糖磷酸转移酶系统转运蛋白编码基因可显著提高 NADH 产量,进而增强大肠杆菌以混合碳源为底物的产氢能力[33]。产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)具有更为复杂的产氢系统,包括甲酸裂解途径和 NADH 途径。据报道,过表达[NiFe]-氢化酶的大小亚基编码基因(*hycE* 和 *hycG*)可显著提升氢化酶活性[34],而调控甲酸脱氢酶 H 和甲酸-氢裂解酶系统的转录激活蛋白基因 *fhlA* 的表达,能够改变细胞的氧化还原状态,从而影响产氢效率[35]。在其他产氢微生物中,也发现了独特的产氢机制。例如,嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium*)含有[NiFe]-氢化酶等产氢相关基因[36]。海神弧菌(*Vibrio tritonius*)的产氢过程依赖于甲酸氢裂解酶复合物。无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)则通过一氧化碳脱氢酶和一氧化碳依赖的氢化酶的共同作用,实现一氧化碳到 H_2 的转化[37]。这些研究从分子层面揭示了不同发酵细菌产氢代谢的多样性,为通过代谢工程手段优化产氢过程提供了理论依据。

2.2　乙醇型发酵产氢的分子调控机制

基于对 *E. harbinense* 的群体进化与比较基因组学研究,其乙醇-氢气协同代谢的分子路径目前已经较为清晰(图 2)。该菌株通过糖酵解途径将葡萄糖转化为丙酮酸,随后在关键酶丙酮酸 - 铁氧还蛋白氧化还原酶的催化下,丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶 A,此时电子转移至 Fd。这些电子最终由 HydA 接收,用于催化质子还原生成 H_2。在乙酰辅酶 A 的下游代谢路径中,一方面由双功能乙醛-CoA/乙醇脱氢酶(ADHE)催化其转化为乙醛,并进一步经乙醇脱氢酶(ADH)还原为乙醇。另一方面,部分乙酰辅酶 A 在乙酸激酶作用下生成乙酸。该代谢网络的流向受到环境因子与末端产物的综合调控。发酵体系的 pH 值可显著影响碳代谢、能量合成及胁迫响应等相关基因的表达。Yin 等[38]研究表明,低 pH 值条件下细胞生长与增殖相关基因普遍下调,而较高 pH 值则抑制产氢及产酸功能基因的表达。此外,末端产物乙醇和乙酸的积累对代谢调控也具有关键影响。Li 等[39]证实乙醇胁迫会显著上调 ADHE 蛋白表达水平,导致更多乙酰辅酶 A 流向乙醇合成途径,同时竞争性抑制乙酸生成,并刺激糖酵解途径以维持 NADH 和丙酮酸水平,从而增强细菌对乙醇胁迫的适应性。乙酸是 *E. harbinense* 另一主要液相末端产物,发酵过程中乙酸的积累会导致反应体系的 pH 值不断降低,造成细胞内酸化现象,从而抑制糖酵解途径,对细菌的能量代谢、细胞完整性及代谢稳态等构成威胁[40]。Li 等[41]的研究发现乙酸胁迫下细菌的磷酸转移酶系统受到抑制,这不利于 *E. harbinense* 对碳水化合物的吸收利用。乙酸积累对无机磷酸盐特异性转运系统存在负面影响,抑制了细菌对磷元素的吸收利用[42]。外源添加乙酸时,*E. harbinense* 会通过改变相关蛋白的表达

量启动防御机制，包括激活氧化应激反应及启动 DNA 和蛋白质结构修复机制等[43]。同时，菌体还会上调参与还原性嘧啶分解的关键酶表达，以促进泛酸及辅酶 A 的合成，从而缓解酸化环境对细菌的抑制[42,44]。HydA 被证实为乙醇型发酵产氢的关键酶，外源添加 Mg^{2+}、Fe^{2+} 等金属离子可调节其转录水平与酶活性，进而提升系统产氢效率[45]。此外，乙醇积累通过诱导碳储存调节蛋白分泌，抑制中枢碳代谢与生物膜形成，并促进抗氧化蛋白表达，最终增强细胞对氧化胁迫的抵抗能力。除上述代谢产物及理化因子外，新污染物如微/纳塑料也对 *E. harbinense* 的代谢调控具有显著影响。以 *E. harbinense* 为模型产酸发酵菌的研究表明，不同表面电荷的纳米塑料可对其代谢行为产生差异化影响。Wang 等[46]发现，带正电的氨基修饰纳米塑料可能通过诱导高水平的氧化应激，显著抑制 *E. harbinense* 的生长及乙醇–氢气代谢；而带负电的羧基修饰纳米塑料暴露下，细菌则通过增强生物膜形成能力来提升自身防御水平。然而，目前关于微塑料胁迫下产酸发酵微生物分子调控机制的研究仍处于起步阶段。

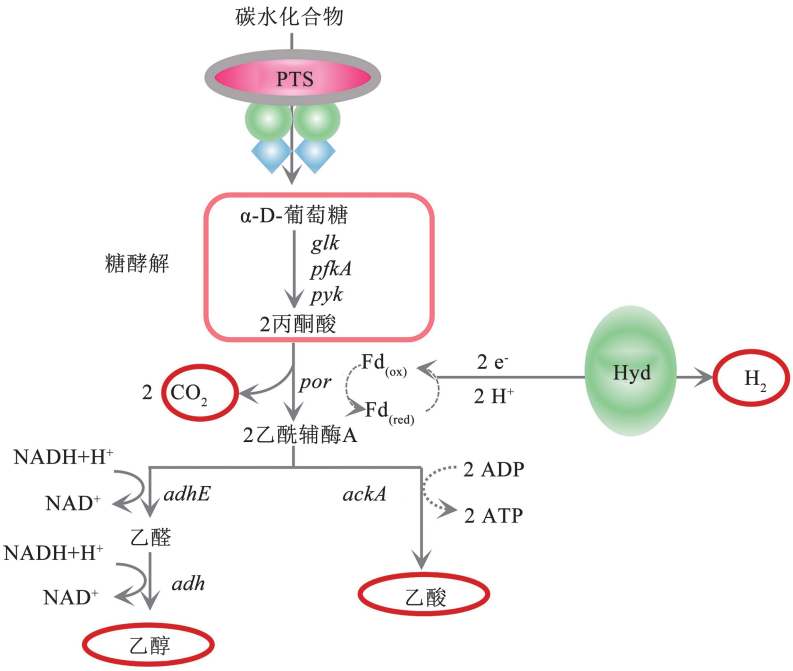


图 2 哈尔滨产乙醇杆菌产氢产乙醇代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathway for ethanol-hydrogen co-production in *Ethanoligenens harbinense*

3 生物制氢的强化技术

3.1 基于微生物互作的暗发酵强化策略

传统纯培养发酵制氢仍面临底物利用率低、产氢效率不稳定、操作条件苛刻等瓶颈问题。严格厌氧产氢菌（如 *E. harbinense* YUAN –3）的 HydA 等关键酶系对氧气高度敏感，微量氧气即可导致其失活[47–49]。同时，发酵过程存在显著的代谢产物抑制与电子利用效率低的问题[50]。尽管通过优化操作参数可在有限范围内提升产氢效率，但由于碳流主要流向细胞生物量增加及乙酸、乙醇等副产物合成，传统调控方法难以突破能量转化的理论限制[51–52]。与纯培养相比，多菌种协同体系能够重塑代谢网络。其中，通过环境因子调控实现的呼吸互作，以及依赖物质能量交换的互养互作，分别从代谢环境优化和资源高效利用两方面，调控微生物的协同代谢。在呼吸互作方面，Li 等[53]将兼性好氧菌 *Pseudomonas aeruginosa* 与产氢菌共培养，利用前者高效的有氧呼吸作用去除环境中的氧气，为产氢菌创造了稳定的厌氧环境。同时，该研究通过生物固定化技术的应用，借助填料载体实现生物量的高效截留，从而增强了系统运行稳定性与抗干扰能力。基于互养互作的共培养体系，通过微生物间的代谢互补优化了产氢路径，并增强了反应体系对 pH、温度等操作条件波动的鲁棒性[54–55]。Li 等[56]构建的 *E. harbinense* YUAN –3 与电活性菌 *Geobacter sulfurreducens* PCA 共生体系耦合 MEC，形成了高效的梯级产氢系统。*Geobacter sulfurreducens* PCA 对末端发酵产物乙酸与乙醇的消耗有效缓解了代谢反馈抑制。二者形成的生物膜促进了微生物间的直接种间电子转移，同时电极的介入定向调控了电子流向产氢途径，从而显著提升 H_2 转化效率。微生物互作强化暗发酵，能从

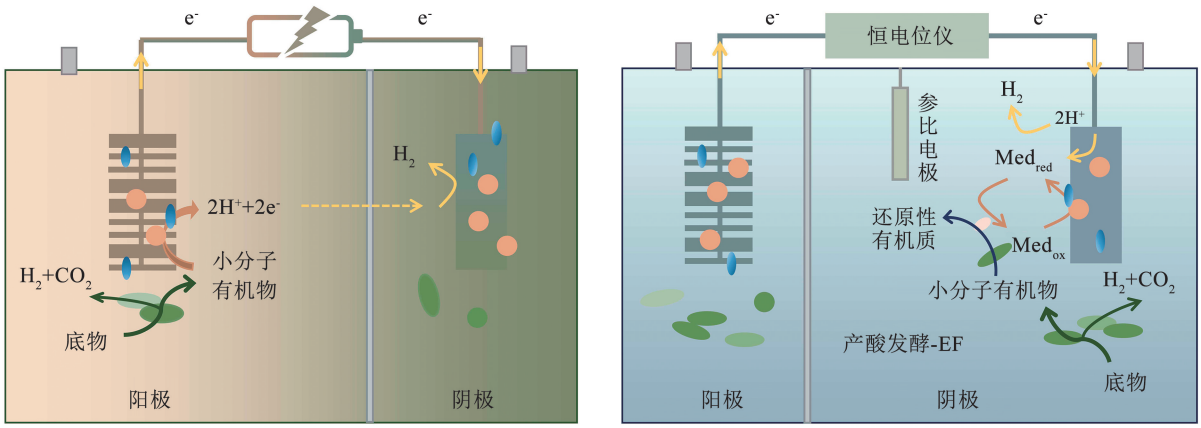
复杂有机废物中高效产出以挥发酸为主的小分子混合物,而该产物恰是下游光发酵或 MEC 等工艺的理想前体。因此,暗发酵是整个多级生物制氢系统实现能源资源梯级回收不可或缺的重要步骤。

3.2　微生物电解池辅助制氢技术

微生物电化学系统为实现生物制氢的增效降耗提供了新路径,其中 MEC 技术是目前的研究重点,图 3(a)展示了将暗发酵与 MEC 耦合的生物制氢系统[57]。MEC 体系较低的外部电压(通常为 0.2 ~ 0.8 V),协同电活性微生物催化有机废物降解及 H_2 产生,成功突破了传统暗发酵过程中的热力学限制[58]。其核心机制在于阳极的电活性微生物(如 *Geobacter*)氧化分解有机物产生电子与质子,电子通过外电路在外部电压的驱动下迁移至阴极,与质子结合并还原生成 H_2[59]。在与其他生物制氢技术耦合时,MEC 主要发挥后续深度处理的作用。MEC 利用电能,可以将暗发酵过程中产生的挥发酸等进一步转化为 H_2,从而突破单一生物过程的转化极限。这种协同作用使暗发酵 – MEC 耦合系统的理论 H_2 产率得以大幅提升,实现了对底物的梯级利用与碳的高效转化[59]。例如,相较于传统暗发酵系统,暗发酵与 MEC 集成工艺显著提高了系统性能,其产氢量从 39.8 mL H_2/g SCOD 提高至 83.4 mL H_2/g SCOD,此时挥发酸产量提高 1.9 倍[60]。当使用来自可再生能源的电力时,该耦合系统不仅能提高整体产氢量,还能将间歇性的电能转化为可储存的氢能,这为构建低碳、可持续的集成生物制氢工艺指明了未来的发展方向。然而,该技术迈向规模化应用的关键瓶颈在于其产氢速率远低于暗发酵,导致耦合系统对 MEC 的体积要求较高[61]。尽管通过设计高比表面积的电极(如碳刷)可以增加生物膜的附着,但系统的体积电流密度并未随之线性增长,表明单纯增大电极面积的能力有限。未来研究重点在于如何突破阳极电子传递的动力学瓶颈,包括深入解析优势电活性菌的胞内电子转移机制、开发兼具高导电性与生物相容性的新型电极材料,以及优化反应器构型以强化传质等。例如,在反应器构型创新方面,Hussien 等[47]研发的新型圆柱状 MEC 获得了 4.5 A/m^2 的峰值电流密度以及 97.3% 的阴极氢回收率,其盈利能力系数达 1.3,表明了通过构型设计提升性能与经济可行性的潜力。因此,提升 MEC 单位体积的产氢速率,有助于减小设备规模、降低经济成本,为微生物电化学制氢技术的商业化创造条件。

3.3　电发酵技术强化产氢

电发酵技术通过耦合微生物代谢与电化学反应,强化了生物制氢过程,其核心作用机制如图 3(b)所示。该技术能够从太阳能、生物质等可再生资源中捕获电子,并引导微生物将能量定向转化为 H_2[48]。电发酵系统根据电极功能可分为阳极电发酵与阴极电发酵两种,前者以阳极为电子受体,接受微生物代谢产生的电子,后者则以阴极为电子供体,向微生物提供还原力。电发酵通过调控 ORP 及 NAD^+/NADH 比例,可重塑代谢通路,实现高效产氢[62]。例如,Liao 等[49]发现在 0.3 ~ 0.6 V 的外加电压下,系统的比氢产率相较于对照组提高了 31.5% ~ 91.3%,同时底物降解效率提升了 13.3% ~ 20.7%,电子转移系统活性也显著增加了 74.6% ~ 311.5%。弱电刺激通过为微生物提供可控的外部电子传递途径,调控胞内关键辅因子(如 NADH/NAD^+)的平衡,进而重塑代谢电子流,以实现产氢过程的强化。Cardeña 等[63]研究表明,与传统的暗发酵相比,无论施加正电位还是负电位,电发酵都能提高 H_2 的产率和产量,在 – 0.5 V 的最佳条件下,产氢速率可达到 2.5 ± 0.3 mol H_2/mol 葡萄糖。这是因为负电位通过向体系提供外部电子,增加了细胞内 NADH 的还原力水平,而正电位则从体系中吸收电子,促进了 NAD^+ 再生,从而协同维持胞内氧化还原平衡。Gu 等[64]探究了不同电极电势对 *E. harbinense* 代谢途径的调控机制,并指出调控发酵体系的 ORP 和电子分流是改变代谢通量的关键。研究表明,当阳极被控制在适宜的电位时,可与氢化酶竞争来自 Fd_{red} 的电子,但这种竞争在优化条件下达到平衡,一方面不影响必要的产氢电子流,另一方面能通过调节胞外 ORP 促进 NADH 向 NAD^+ 的再生,从而维持适宜的胞内氧化还原态势,为持续高效的产氢过程创造条件[65]。Gu 等[64]的研究进一步揭示,在 0 V 阳极电位下,编码 HydA 关键亚基及 Fd 的基因表达显著上调,从分子层面证实了电刺激对产氢电子通路的直接增强作用。然而,当阳极电势不处于最优条件时,HydA 关键活性中心的编码基因表达受到抑制,同时 ABC 转运系统等相关基因的下调可能限制了底物摄取,共同导致 H_2 产量的下降[64,66]。未来的研究应聚焦于电子传递分子机制的深入解析、高效电极材料的开发以及系统参数的优化,以推动该技术的规模化应用。



(a) 暗发酵耦合微生物电解池制氢 (b) 暗发酵耦合电发酵制氢

图 3 产酸发酵与电化学系统耦合示意

Fig. 3 Schematic diagram of coupling of acidogenic fermentation and electrochemical system

4 有机废弃物生物制氢技术的系统集成与产业化应用

4.1 基于多技术耦合的有机固废生物制氢与碳能梯级转化

利用有机废水、餐厨垃圾、城市污泥及农业秸秆等多源有机废弃物进行生物制氢,是实现废弃物处理与能源回收双重目标的有效途径。该过程依赖复杂微生物群落对有机物的协同降解与转化,其中功能微生物组的组装、稳定性以及种间互作机制直接决定系统的产氢性能[67]。然而,微生物的代谢活性在很大程度上受底物理化性质的影响。这些有机废弃物的物质组成、含固率及生物降解性差异显著,导致其在转化过程中面临不同难题。来源于食品加工及发酵工业等的有机废水表现出液态、含固率低等特点,富含溶解性的有机物质(如糖类、淀粉和蛋白质等),不需要水解步骤,反应动力学快,易于被微生物直接利用,通常不需要复杂的物理、化学处理过程[68]。然而相比固态废弃物,有机废水 COD 浓度相对较低、存在波动,导致产氢量和产氢稳定性低,且在发酵过程中需要调控 pH,优化水力停留时间[68]。餐厨垃圾的有机物含量高,富含碳水化合物、蛋白质和脂肪等,是生物制氢的“理想”原料,理论产氢潜力巨大,并含有氮、磷等微生物生长必需的营养元素[69]。餐厨垃圾需要通过分选(去除杂质)、破碎和调浆等步骤将颗粒有机物转化为液态。此外,餐厨垃圾在工程应用中需强化 pH 缓冲能力,并对于含油量极高的餐厨垃圾,需要预先分离油脂以实现单独资源化利用[70]。污水处理过程中产生的半固态或固态污泥,具有产量高且富含微生物菌群的特点。污泥中的有机质多被微生物细胞膜或胞外聚合物裹挟,需经破解处理才能释放。此外,污泥的碳氮比(C/N)普遍较低,导致其未经处理时的 H_2 产量远低于餐厨垃圾。因此,工程应用中需研发高效低能的预处理技术,在抑制甲烷菌活性的同时,避免 H_2 进一步转化为甲烷[71-72]。农业废弃物作为生物制氢原料,具有来源广泛、成本低廉、有机质含量高等优点。利用秸秆进行生物制氢时,需通过高温、酸、碱等条件或生物处理等以破坏木质素结构,因此预处理与水解环节成为限制其产氢过程的难点。此外,在物理化学预处理过程中容易导致糠醛、酚类等抑制性副产物的产生,对产氢菌具有潜在毒害作用[73-74]。目前,工程应用中常采用“物理/化学预处理联合纤维素酶水解”的前处理方式。未来研究应致力于构建可同步分泌纤维素酶并高效产氢的复合菌群,或通过微生物共培养策略,实现秸秆的高效生物制氢[74]。

在工艺层面,光-暗发酵耦合系统能将暗发酵阶段产生的有机酸,作为光合细菌的底物进行二次产氢,在提升整体产氢率的同时,也有效降低了对光能的依赖(图 4)[75]。然而,该系统面临暗发酵功能微生物与光合细菌生长速率不匹配、有机酸积累抑制代谢等挑战,未来需围绕反应器构型优化与微生物互作机制解析等方面展开深入研究。微生物电化学系统为生物制氢提供了一种高效可控的新途径。该系统以电极作为电子受体或供体,通过调控胞外电子传递、ORP、细胞内 NAD^+/NADH 平衡及微生物群落结构等,定向调控电子流向目标产物。尽管微生物电化学系统在底物适用性与目标产物合成等方面优于传统厌氧消化,其在产氢代谢调控方面的机制仍有待深入探索。当前,有机固废的资源能源化利用多以获取单一产物(如甲烷或挥发酸)为主,未能实现其中碳源与化学能的充分利用,同时伴随大量沼渣、沼液产生及碳排放等问题。由于发酵产

氢菌无法利用自身产生的小分子挥发酸,导致原料中的化学能未能充分转化为 H_2,转化效率受限。电发酵系统能够将挥发酸进一步转化为 H_2,因此将其与厌氧发酵串联,可以实现碳源从糖类到挥发酸再到 H_2 的梯级转化。此外,厌氧发酵液还可作为微生物电合成系统的原料,用于合成短链或中链脂肪酸,后者是生物塑料、酯类及微生物蛋白等高附加值产品的重要前体[76]。综上,构建以“预处理 – 复合菌剂强化–微生物电化学耦合”为核心的梯级生物制氢系统,解析微生物群落结构与功能响应的分子机制,建立资源能源梯级回收的定向调控策略,对推动有机固废资源化技术的发展具有重要意义。

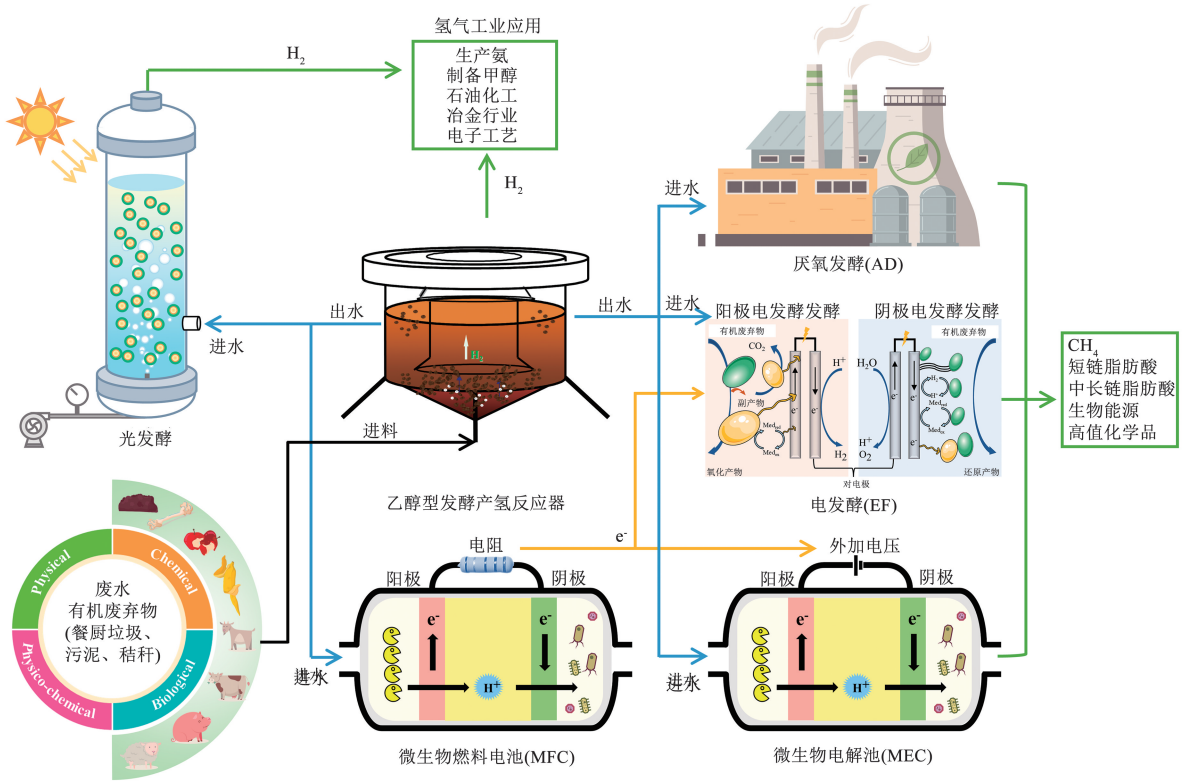


图 4　暗发酵生物制氢工艺耦合其他厌氧生物技术

Fig. 4　Dark fermentation biohydrogen production process coupled with other anaerobic biotechnologies

4.2　生物制氢的工程化应用

中国生物制氢技术的中试与示范工程建设取得了阶段性成果。任南琪院士团队于 1999 年完成了世界首例生物制氢中试,开发了具有自主知识产权的厌氧活性污泥工艺发酵法生物制氢技术。2005 年,团队建成全球首座以糖蜜废水为原料的规模化生物制氢示范基地,年产氢能力达 40 万 m^3,单台反应器日产氢量可达 347 m^3,标志着中国在发酵法生物制氢领域实现了从菌种到反应器再到工程示范的全链条突破。暗发酵无需外部供能、产氢速率高,且可连续利用有机废弃物,已从实验室研究迈向中试规模,展现出明确的工程化前景[77]。单一暗发酵存在理论产氢率低,并伴随产生大量挥发酸副产物的问题[78]。为此,暗–光发酵[79-80]及暗发酵–MEC[81-82]等耦合系统成为研究重点,以此提高总产氢效率并解决副产物积累问题。Zhang 等[83]、Lu 等[84]分别在4 m^3 与 11 m^3 反应器中验证了暗–光发酵联合工艺的工程可行性。反应器构型与运行方式对产氢性能影响显著。暗发酵多采用连续搅拌槽反应器及其改进构型(如折流板式反应器),并在连续或半连续模式下运行。例如,Lu 等[77]采用了一种三室串联的中试反应器系统,其研究确定的最佳水力停留时间与底物浓度分别为 24 h 与 30 g/L,此时系统产氢速率高达 100.2 mol H_2/(m^3 · d)。光发酵系统则普遍采用具有高比表面积的平板式或管式光生物反应器,以保障光能传输效率[85]。利用 MEC 技术处理实际废水进行产氢的中试可行性已获证实。例如,Heidrich 等[86]构建的 120 L 系统在实地连续运行超过 3 个月,直接处理生活污水并产出纯度高达 100% ±6.4% 的 H_2。该系统首次验证了从低浓度污水中回收氢能的可行性,在 0.14 kg COD/(m^3 · d)的负荷下,其能耗仅为 2.3 kJ/g COD,低于传统活性污泥法,实现了 70% 的输入电能回收。人工智能技术,特别是机器学习,已被应用于预测产氢潜力及识别关键工艺参数[87]。Hosseinzadeh 等[88]利用机器学习对暗发酵过程进行建模,实现了产氢量的预

测及关键影响因素的识别。此外,计算流体力学被用于模拟反应器内的流场与传质过程,为反应器的设计与放大提供了理论支撑。Zhang 等[89]利用计算流体力学模拟优化了下流式填充床反应器,显著改善了微生物富集效果与产氢效率。当前,生物制氢技术虽已通过示范工程验证了其阶段性可行性,但面向大规模工业应用,仍存在原料成分复杂导致的适应性不足、高效产氢菌种匮乏、反应器内生物量持留困难及代谢调控机制不清等瓶颈问题。暗 - 光发酵、暗发酵-MEC 等耦合系统虽能通过强化传质与能量利用提升产氢效率,但其在放大过程中仍面临光传递受限、微生物群落失稳及运行成本高等共性挑战,制约了规模化推广。

4.3 技术经济性与环境可持续性分析

生物制氢技术的产业化,需综合评估其经济成本与环境效益。技术经济分析与生命周期评价相结合,为评估不同原料路径生物制氢的生产成本、技术可行性、产业化潜力及环境效益提供了有效手段。暗发酵制氢的成本范围较广,其竞争力取决于原料与工艺。例如,利用木薯加工废水可将生产成本降至 81.5 美元/m^3 H_2[90]。然而,光发酵及相关的生物光解技术因能量转换效率限制及高成本投入,降低其经济可行性。相比之下,以林业及农业废弃物制备的生物油为原料,通过蒸汽重整制氢的成本约为 3.0 ~ 4.6 美元/kg H_2,而结合碳捕集技术后,成本可降至 2.8 ~ 3.7 美元/kg H_2[91]。生物质制氢,特别是以废弃物为原料的路径,其全生命周期碳排放可显著降低。例如,Siddiqui 等[92]的研究显示,基于玉米秸秆的生物质气化制氢碳排放量为 4.4 kg CO_2 - eq/kg H_2,而煤的气化则高达 23.7 kg CO_2-eq/kg H_2。Lui 等[93]指出,利用城市固体废弃物及废弃木材进行气化,碳排放量可低至 4.1 ~ 5.0 kg CO_2-eq/kg H_2。对比之下暗发酵与暗-光联合发酵的碳排放量分别为 6.6 与 6.4 kg CO_2-eq/kg H_2。上述生物质制氢路线的碳排放量均显著低于传统蒸汽甲烷重整(约 13.8 kg CO_2-eq/kg H_2)及依赖化石燃料的水电解(高达 28.6 kg CO_2-eq/kg H_2),凸显了其在低碳制氢方面的潜力。

生物制氢产业的发展受多重外部因素影响,需从政策、经济、技术、环境等多维度进行综合分析,以评价其长期可行性[94]。在政策与法律层面,全球主要经济体已将氢能纳入国家能源战略。欧盟、美国、中国及日本等均制定了明确的清洁氢发展规划与阶段性目标,通过政策引导与资金支持推动产业起步[95]。然而,生物制氢细分政策支撑不足,废弃物资源化制氢的补贴、碳定价及绿色认证等关键机制尚不完善。长期稳定的精准政策框架,对吸引投资和保障项目合规运营至关重要。经济性是生物制氢面临的主要挑战。暗发酵需着力解决原料预处理成本高与产氢率低的难题,而光发酵则需克服设备投资大与太阳能转化效率有限的障碍,系统评估必须涵盖从原料获取、设备折旧、运营能耗到 H_2 纯化的全流程成本[96]。未来成本削减有赖于生产规模的扩大、催化剂与反应器材料的创新,以及对高附加值产品(如中长链脂肪酸)的综合回收。废弃物资源化利用的现实需求,加上社会对绿色能源的逐步接纳,为生物制氢产业发展提供了基础支撑,同时公众环保意识的提升,为产业持续成长注入了动力。技术进步是破解生物制氢经济与环境难题的关键。当前研究聚焦于高效产氢耐逆菌株筛选、微生物群落优化、新型反应器设计及低能耗 H_2 提纯技术开发,旨在提升原料适应性、过程稳定性与能量效率[97]。生物制氢的环境价值,在于利用有机废弃物替代化石能源,实现碳减排与废物处理的双重目标。尽管潜力巨大,生物制氢在产业化初期仍面临投资高昂、公众认知不足、部分技术成熟度低以及基础设施欠缺等挑战[98]。因此,生物制氢的规模化发展有赖于政府、产业与科研机构协同推进,通过政策激励、研发投入、市场培育与公众沟通等多管齐下,为其产业化落地创造有利条件。

5 结 语

本文系统阐述了以乙醇型发酵为核心的生物制氢技术研究进展,从分子机制、强化策略到系统集成与应用前景进行了全面分析。聚焦乙醇型发酵模式菌株 *E. harbinense*,解析其乙醇-氢气协同代谢的核心路径,并揭示该菌株在 pH 值波动、产物反馈抑制以及微塑料等新兴污染物胁迫下的分子响应机制,为理解复杂环境中微生物的耐受性与适应性提供了新视角。本综述从菌群互作调控与电子传递强化角度,解析了生物制氢的强化技术,并指出多技术耦合是突破产氢效能及系统稳定性瓶颈的有效方法。构建暗发酵 - 微生物电化学耦合系统,是实现木质纤维素、餐厨垃圾及有机废水/废物等多源生物质高效产氢与能源梯级回收的关键途径。有机固废生物制氢与碳能梯级转化是推进规模化应用的核心,而技术经济分析与生命周期评价为判断该路径的经济与环境效益提供了重要依据。本文研究为构建负碳排放的可再生氢能供给体系、推动有机固废资源高值转化及绿色低碳能源转型提供了理论技术支撑。

参考文献

[1] Li Zhen, Gu Jiayu, Ding Jie, et al. Molecular mechanism of ethanol-H_2 co-production fermentation in anaerobic acidogenesis: challenges and perspectives[J]. Biotechnology Advances, 2020, 46:107679. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107679

[2] Hallenbeck P C, Ghosh D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(5): 287. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.02.004

[3] Jiao Haixin, Tsigkou K, Elsamahy T, et al. Recent advances in sustainable hydrogen production from microalgae: mechanisms, challenges, and future perspectives [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 270: 115908. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.115908

[4] Argun H, Kargi F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36(13): 7443. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.116

[5] Abdelkareem M A, Ayoub M, Al Najada R I, et al. Hydrogen from waste metals: recent progress, production techniques, purification, challenges, and applications[J]. Sustainable Horizons, 2024, 9: 100079. DOI: 10.1016/j.horiz.2023.100079

[6] Baek G, Saikaly P E, Logan B E. Addition of a carbon fiber brush improves anaerobic digestion compared to external voltage application [J]. Water Research, 2021, 188: 116575. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116575

[7] Ndayisenga F, Yu Zhisheng, Wang Bobo, et al. Effects of the applied voltage on electroactive microbial biofilm viability and hydrogen production in a recalcitrant organic waste-fed single-chamber membrane-free microbial electrolysis cell performance[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 469: 144002. DOI: 10.1016/j.cej.2023.144002

[8] Parkhey P, Gupta P. Improvisations in structural features of microbial electrolytic cell and process parameters of electrohy drogenesis for efficient biohydrogen production: a review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 69: 1085. DOI: 10.1016/j.rser.2016.09.101

[9] 李真. 哈尔滨产乙醇杆菌基因表达调控机制及电子流定向调控强化产氢[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020
Li Zhen. The regulation mechanism of geneexpression in *Ethanoligenens harbinense* and directionalcontrol of electron flow toenhance its hydrogen production[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020. DOI: 10.27061/d.cnki.ghgdu.2020.004784

[10] Sinha P, Pandey A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2011, 36 (13): 7460. DOI: 10.1016/j.ijhydene2011.03.077

[11] Munro S A, Zinder S H, Walker L P. The fermentation stoichiometry of Thermotoga neapolitana and influence of temperature, oxygen, and pH on hydrogen production [J]. Biotechnology progress, 2009, 25(4): 1035. DOI: 10.1002/btpr.201

[12] Díppolito G, Dipasquale L, Vella F M, et al. Hydrogen metabolism in the extreme thermophile *Thermotoga neapolitana* [J]. international journal of hydrogen energy, 2010, 35(6): 2290. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.12.044

[13] Ren Nanqi, Xing Defeng, Rittmann B E, et al. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(5): 1112. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01234.x

[14] Xing Defeng, Ren Nanqi, Wang Aijie, 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. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.09.038

[15] Van Den Heuvel J C, Beeftink H H, Verschuren P G. Inhibition of the acidogenic dissimilation of glucose in anaerobic continuous cultures by free butyric acid[J]. Applied microbiology and biotechnology, 1988, 29(1): 89

[16] 李华华. 哈尔滨产乙醇杆菌代谢调控分子机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019
Li Huahua. Study on molecular mechanism of metabolic regulation in *Ethanoligenens harbinense* [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019. DOI: 10.27061/d.cnki.ghgdu.2019.005070

[17] Ren Nanqi, Wang Baozhen, Huang Juchang. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor[J]. Biotechnology and bioengineering, 1997, 54(5): 428. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970605)54:5<428: AID-BIT3>3.0.CO;2-G

[18] 宫曼丽, 任南琪, 李永峰, 等. 生物制氢反应器不同发酵类型产氢能力的比较[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2006, 38(11): 1826
Gong Manli, Ren Nanqi, Li Yongfeng, et al. Comparison of biohydrogen production capacity from different types of fermentation in continuous-flow reactors [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2006, 38(11): 1826

[19] Li Jianzheng, Zheng Guochen, He Junguo, et al. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(5): 573. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.007

[20] 任南琪, 宫曼丽, 邢德峰. 连续流生物制氢反应器乙醇型发酵的运行特性[J]. 环境科学, 2004, 25(6): 113
Ren Nanqi, Gong Manli, Xing Defeng. Continuous operation of hydrogen bio-production reactor with Ethanol-type fermentation[J]. Environmental Science, 2004, 25(6): 113. DOI: 10.13227/j.hjkx.2004.06.023

[21] Guo Wanqian, Ren Nanqi, Wang Xiangjing, et al. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33(19): 4981. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.05.033

[22] Ren Nanqi, Li Jianzheng, Li Baikun, 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. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2006.02.011

[23] Ren Nanqi, Guo Wanqian, Wang Xiangjing, 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. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.003

[24] Xie Guojun, Liu Bingfeng, Wang Qilin, et al. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for recovering multiple nutrients for biofuel production[J]. Water Research, 2016, 93: 56. DOI: 10.1016/j.watres.2016.02.012

[25] Hao Jiayin, Zhou Huihui, Ma Jun, et al. Application of recyclable iron-based supplementation for promoting biohydrogen and ethanol co-production[J]. Fuel, 2024, 371: 131941. DOI: 10.1016/j.fuel.2024.131941

[26] Tang Jing, Yuan Yuan, Guo Wanqian, et al. Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinese* B49[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37: 741. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2011.04.067

[27] Guo Wanqian, Ren Nanqi, Wang Xiangjing, et al. Accelerated startup of biological hydrogen production process by addition of *Ethanoligenens harbinense* B49 in a biofilm-based column reactor [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35(24): 13407. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.11.115

[28] Domińska M, Paździor K, Ślęzak R, et al. Hydrothermal treatment of kitchen waste as a strategy for dark fermentation biohydrogen production[J]. Energies, 2025, 18(21): 5811. DOI: 10.3390/en18215811

[29] Kamalaskar L, Kapse N, Pore S, et al. Genome sequence and gene expression studies reveal novel hydrogenases mediated hydrogen production by *Clostridium biohydrogenum* sp. nov., MCM B-509^T [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2016, 41(28): 11990. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.05.101

[30] Jiang Ling, Song Ping, Zhu Liying, et al. Comparison of metabolic pathway for hydrogen production in wild-type and mutant *Clostridium tyrobutyricum* strain based on metabolic flux analysis [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2013, 38(5): 2176. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.11.050

[31] Sarma S, Ortega D, Minton N P, et al. Homologous overexpression of hydrogenase and glycerol dehydrogenase in *Clostridium pasteurianum* to enhance hydrogen production from crude glycerol [J]. Bioresource Technology, 2019, 284: 168. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.074

[32] Rai P, Pandey A, Pandey A. In-silico-mining of small sequence repeats in hydrogenase maturation subunits of *E. coli*, *clostridium*, and *Rhodobacter*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2019, 44(33): 17813. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.05.057

[33] Balderas-Hernandez V E, Landeros Maldonado K P, Sánchez A, et al. Improvement of hydrogen production by metabolic engineering of *Escherichia coli*: modification on both the PTS system and central carbon metabolism[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2020, 45(9): 5687. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.01.162

[34] Zhao Jinfang, Song Wenlu, Cheng Jun, et al. Improvement of fermentative hydrogen production using genetically modified *Enterobacter aerogenes*[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(6): 3676. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.08.161

[35] Lu Yuan, Zhao Hongxin, Zhang Chong, et al. Perturbation of formate pathway for hydrogen production by expressions of formate hydrogen lyase and its transcriptional activator in wild *Enterobacter aerogenes* and its mutants[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(12): 5072. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.04.025

[36] O-Thong S, Khongkliang P, Mamimin C, et al. Draft genome sequence of *Thermoanaerobacterium* sp. strain PSU-2 isolated from thermophilic hydrogen producing reactor[J]. Genomics Data, 2017, 12: 49. DOI: 10.1016/j.gdata.2017.02.012

[37] Ainala S K, Seol E, Sekar B S, et al. Improvement of carbon monoxide-dependent hydrogen production activity in *Citrobacter amalonaticus* Y19 by over-expressing the CO-sensing transcriptional activator, CooA[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2014, 39(20): 10417. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.04.148

[38] Yin Wen, Cai Xia, Ma Hongdan, et al. A decade of research on the second messenger c-di-AMP[J]. FEMS Microbiol Rev, 2020, 44(6): 701. DOI: 10.1093/femsre/fuaa019

[39] Li Huahua, Mei Xiaoxue, Liu Bingfeng, et al. Quantitative proteomic analysis reveals the ethanologenic metabolism regulation of *Ethanoligenens harbinense* by exogenous ethanol addition[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 166. DOI: 10.1186/s13068-019-1511-y

[40] Trček J, Mira N P, Jarboe L R. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(15): 6215. DOI: 10.1007/s00253-015-6762-3

[41] Li Huahua, Mei Xiaoxue, Liu Bingfeng, et al. Insights on acetate-ethanol fermentation by hydrogen-producing *Ethanoligenens* under acetic acid accumulation based on quantitative proteomics[J]. Environment International, 2019, 129: 1. DOI: 10.1016/j.envint.2019.05.013

[42] Shi En, Li Jianzheng, Zhang Miao. Application of IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 to simulate butyric acid, propionic acid, mixed acid, and ethanol type fermentative systems using a variable acidogenic stoichiometric approach[J]. Water Research, 2019, 161: 242. DOI: 10.1016/j.watres.2019.05.094

[43] Ferreira E, Gimenez R, Canas M A, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for efficient repair of cytotoxic DNA lesions in *Escherichia coli*[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 60: 202. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.01.008

[44] Liu Yuping, Tang Hongzhi, Lin Zhanglin, et al. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation[J]. Biotechnology Advances 2015, 33(7): 1484. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.06.001

[45] 李真, 李逸恬, 顾家玉, 等. 乙醇型发酵过程优化及代谢调控分子机制[J]. 环境科学学报, 2020, 40(10): 3526
Li Zhen, Li Yitian, Gu Jiayu, et al. Process optimization and molecular mechanism of metabolism regulation of ethanol-type fermentation[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020, 40(10): 3526. DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2020.0395

[46] Wang Jing, Zhu Weimin, Zhang Xingze, et al. Charge-specific impacts of polystyrene nanoplastics on acidogenesis and biofilm adaptation in *Ethanoligenens harbinense*[J]. Bioresource Technology, 2025, 439:133389. DOI: 10.1016/j.biortech.2025.133389

[47] Hussien M, Mohamed H O, Bahaa A, et al. Rational design of cylindrical microbial electrolysis cells for high-strength wastewater treatment and scalable hydrogen production[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 522: 167285. DOI: 10.1016/j.cej.2025.167285

[48] Mukherjee T, Venkata Mohan S. Metabolic flux of *Bacillus subtilis* under poised potential in electrofermentation system: gene expression vs product formation[J]. Bioresource Technology, 2021, 342: 125854. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125854

[49] Liao Guoqing, Wang Chao, Xia Ao, et al. Improving hydrogen production via electro-fermentation: insights of gas and soluble metabolites production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2025, 139: 1015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2024.11.446

[50] Zhang Zhanying, O'hara I M, Mundree S, et al. Biofuels from food processing wastes[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 38: 97. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.01.010

[51] Wong Y M, Wu T Y, Juan J C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014, 34: 471. DOI: 10.1016/j.rser.2014.03.008

[52] Lee H S, Vermaas W F J, Rittmann B E. Biological hydrogen production: prospects and challenges[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(5): 262. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.01.007

[53] Li Zhen, Wang Jing, Feng Kun, et al. Rapid recruitment of hydrogen-producing biofilms for hydrogen production in a moving bed biofilm reactor by a sequential immobilization and deoxygenization approach[J]. Bioresource Technology, 2020, 317: 123979. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123979

[54] Zhang Xinyu, Ye Xiaofeng, Finneran K T, et al. Interactions between *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens* in co-culture fermentation with anthrahydroquinone-2, 6-disulfonate (AH2QDS) for enhanced biohydrogen production from xylose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(1): 164. DOI: 10.1002/bit.24627

[55] Zhang Xinyu, Ye Xiaofeng, Guo Bin, et al. Lignocellulosic hydrolysates and extracellular electron shuttles for H_2 production using co-culture fermentation with *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens*[J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 89. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.106

[56] Li Zhen, Fang Anran, Cui Han, et al. Synthetic bacterial consortium enhances hydrogen production in microbial electrolysis cells and anaerobic fermentation[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 417(15): 127986. DOI: 10.1016/j.cej.2020.127986

[57] Sharma A, Hussain Mehdi S E, Pandit S, et al. Factors affecting hydrogen production in microbial electrolysis cell (MEC): a review[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2024, 61: 1473. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2024.02.193

[58] Gautam R, Nayak J K, Ress N V, et al. Bio-hydrogen production through microbial electrolysis cell: structural components and influencing factors[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 455: 140535. DOI: 10.1016/j.cej.2022.140535

[59] Lee H S, Wang Xin, Katakojwala R, et al. Microbial electrolysis cells for the production of biohydrogen in dark fermentation-a review[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 127934. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127934

[60] Syaichurrozi I, Hidayatullah M A, Nurullah A, et al. Enhanced biohydrogen production from palm oil mill effluent using single-stage process of dark fermentation and microbial electrolysis cell at various initial pHs[J]. Renewable Energy, 2025, 249: 123161. DOI: 10.1016/j.renene.2025.123161

[61] Bora A, Mohanrasu K, Angelin Swetha T, et al. Microbial electrolysis cell (MEC): reactor configurations, recent advances and strategies in biohydrogen production[J]. Fuel, 2022, 328: 125269. DOI: 10.1016/j.fuel.2022.125269

[62] Wang Jing, Liu Sitong, Feng Kun, et al. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Process intensification and artificial intelligence[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2025, 210: 115264. DOI: 10.1016/j.rser.2024.115264

[63] Cardeña R, Valencia-Ojeda C, Chazaro-Ruiz L F, et al. Regulation of the dark fermentation products by electro-fermentation in reactors without membrane[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2024, 49: 107. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2023.06.253

[64] Gu Jiayu, Li Zhen, Xie Guojun, et al. Electro-fermentation enhances H_2 and ethanol co-production by regulating electron transfer and substrate transmembrane transport[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 429(1): 132223. DOI: 10.1016/j.cej.2021.132223

[65] Thrash J C, Coates J D. Review: direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(11): 3921. DOI: 10.1021/es702668w

[66] Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Fems Microbiology Reviews, 2000, 24(4): 449. DOI: 10.1016/s0168-6445(00)00034-6

[67] Kouzuma A, Kato S, Watanabe K. Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 477. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00477

[68] Liu Chunmin, Wu Shuyii. From biomass waste to biofuels and biomaterial building blocks[J]. Renewable Energy, 2016, 96: 1056. DOI: 10.1016/j.renene.2015.12.059

[69] Mohanakrishna G, Sneha N P, Rafi S M, et al. Dark fermentative hydrogen production: potential of food waste as future energy needs[J]. Science of the Total Environment, 2023, 888: 163801. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163801

[70] Kumar A N, Mohan S V. Acidogenic valorization of vegetable waste for short chain carboxylic acids and biohydrogen production: influence of pretreatment and pH[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 203: 1055. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.08.198

[71] Preethi, Banu J R, Kumar G, et al. Biohydrogen production from waste activated sludge through thermochemical mechanical pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2022, 358: 127301. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127301

[72] Ali H M, Tyagi V K, Kazmi A A, et al. Biohythane production from organic fraction of municipal solid waste: clean and green energy generation under circular economy framework[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2024, 95: 1080. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2024.11.251

[73] Zheng Yaping, Zhang Quanguo, Zhang Zhiping, et al. A review on biological recycling in agricultural waste-based biohydrogen production: recent developments[J]. Bioresource Technology, 2021, 347: 126595. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126595

[74] Prado E R L, Rial R C. Biohydrogen production from residual biomass: the potential of wheat, corn, rice, and barley straw-recent advances[J]. Bioresource Technology, 2025, 432: 132638. DOI: 10.1016/j.biortech.2025.132638

[75] Trchounian K, Sawers R G, Trchounian A. Improving biohydrogen productivity by microbial dark-and photo-fermentations: novel data and future approaches[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 80: 1201. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.149

[76] Alloul A, Ganigué R, Spiller M, et al. capture-ferment-upgrade: a three-step approach for the valorization of sewage organics as commodities[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(12): 6729. DOI: 10.1021/acs.est.7b05712

[77] Lu Chaoyang, Wang Yi, Lee D J, et al. Biohydrogen production in pilot-scale fermenter: effects of hydraulic retention time and substrate concentration[J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 229: 751. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.04.233

[78] Elbeshbishy E, Dhar B R, Nakhla G, et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, 79: 656. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.075

[79] Łukajtis R, Hołowacz I, Kucharska K, et al. Hydrogen production from biomass using dark fermentation[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 91: 665. DOI: 10.1016/j.rser.2018.04.043

[80] Akhbari A, Ibrahim S, Ahmad M S. Feasibility of semi-pilot scale up-flow anaerobic sludge blanket fixed-film reactor for fermentative bio-hydrogen production from palm oil mill effluent[J]. Renewable Energy, 2023, 212: 612. DOI: 10.1016/j.renene.2023.05.091

[81] Patel S K S, Gupta R K, Das D, et al. Continuous biohydrogen production from poplar biomass hydrolysate by a defined bacterial mixture immobilized on lignocellulosic materials under non-sterile conditions[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 287: 125037. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.125037

[82] El Bari H, Lahboubi N, Habchi S, et al. Biohydrogen production from fermentation of organic waste, storage and applications[J]. Cleaner Waste Systems, 2022, 3: 100043. DOI: 10.1016/j.clwas.2022.100043

[83] Zhang Quanguo, Lu Chaoyang, Lee D, et al. Photo-fermentative hydrogen production in a $4m^3$ baffled reactor: effects of hydraulic retention time[J]. Bioresource Technology, 2017, 239: 533. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.067

[84] Lu Chaoyang, Zhang Huan, Zhang Quanguo, et al. An automated control system for pilot-scale biohydrogen production: design, operation and validation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2020, 45(6): 3795. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.04.288

[85] Cheng Dongle, Ngo H H, Guo Wenshan, et al. Enhanced photo-fermentative biohydrogen production from biowastes: an overview[J]. Bioresource Technology, 2022, 357: 127341. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127341

[86] Heidrich E S, Dolfing J, Scott K, et al. Production of hydrogen from domestic wastewater in a pilot-scale microbial electrolysis cell[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15): 6979. DOI: 10.1007/s00253-012-4456-7

[87] Yadav S, Singh V, Mahata C, et al. Optimization for simultaneous enhancement of biobutanol and biohydrogen production[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2021, 46(5): 3726. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.10.267

[88] Hosseinzadeh A, Zhou J L, Altaee A, et al. Machine learning modeling and analysis of biohydrogen production from wastewater by dark fermentation process[J]. Bioresource Technology, 2022, 343: 126111. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126111

[89] Zhang Zexi, Ding Ke, Ma Xiaojun, et al. Hydrodynamic design of down-flow packed bed reactor regulated the biohydrogen production and microbial enrichment[J]. Energy, 2023, 271: 127059. DOI: 10.1016/j.energy.2023.127059

[90] Martinez-Burgos W J, Sydney E B, De Paula D R, et al. Hydrogen production by dark fermentation using a new low-cost culture medium composed of corn steep liquor and cassava processing water: process optimization and scale-up[J]. Bioresource Technology, 2021, 320: 124370. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124370

[91] Puteri M N, Gew L T, Ong H C, et al. Biomass-to-biohydrogen conversion: comprehensive analysis of processes, environmental, and economic implications[J]. Biomass and Bioenergy, 2025, 200: 107943. DOI: 10.1016/j.biombioe.2025.107943

[92] Siddiqui O, Dincer I. A well to pump life cycle environmental impact assessment of some hydrogen production routes[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2019, 44(12): 5773. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.01.118

[93] Lui J, Sloan W, Paul M C, et al. Life cycle assessment of waste-to-hydrogen systems for fuel cell electric buses in Glasgow, Scotland[J]. Bioresource Technology, 2022, 359: 127464. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127464

[94] Machhirake N P, Vanapalli K R, Kumar S, et al. Biohydrogen from waste feedstocks: an energy opportunity for decarbonization in developing countries[J]. Environmental Research, 2024, 252: 119028. DOI: 10.1016/j.envres.2024.119028

[95] Gull U, Lens P N L, Logan M. review on dark fermentative biohydrogen production: current status and future perspectives on next-generation strategies[J]. Energy & Fuels, 2025, 39(45): 21697. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.5c03998

[96] Sun Xiyue, Wang Zhi, Wu Wenzhu, et al. Dark fermentation of biomass for enhanced hydrogen production: a review of pretreatment strategies, microbial enhancement, and process regulation[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2025, 175: 151546. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2025.151546

[97] 翟玉华, 苗长林, 庄新姝, 等. 生物质暗发酵制氢研究进展[J]. 生物质化学工程, 2025, 59(2): 53
Zhai Yuhua, Miao Changlin, Zhuang Xinshu, et al. research progress of hydrogen production by dark fermentation of biomass[J]. Biomass Chemical Engineering, 2025, 59(2): 53

[98] Qureshi F, Kamyab H, Rajendran S, et al. Unveiling the potentials of biohydrogen as an alternative energy source: strategies, challenges and future perspectives[J]. Materials Today Sustainability, 2025, 31: 101133. DOI: 10.1016/j.mtsust.2025.101133

(编辑 赵丽莹)