



生物封装氢化酶催化产氢策略与挑战*

许翔^{1,2)} 曹长乾^{1,2)**}⁽¹⁾ 中国科学院地质与地球物理研究所行星科学与前沿技术重点实验室, 北京 100029;⁽²⁾ 中国科学院大学地球与行星科学学院, 北京 100049)

摘要 氢化酶作为高效、可逆催化质子还原产氢的生物催化剂, 其工业化应用长期受限于高氧敏感性、重组成熟难度大、电子传递系统效率与催化稳定性不足等问题。常用的酶固定化技术能够提高氢化酶的重复使用性, 但也常伴随着工艺复杂与固定化材料生物相容性低等局限。近年来, 生物封装技术通过利用生物来源的封装材料构建物理限域与化学微环境, 已成为提升氢化酶催化性能的关键策略之一。本文系统综述了利用蛋白纳米基容器封装与工程化氢化酶全细胞两大类生物封装策略, 在提升氢化酶耐氧性、稳定性和产氢效率方面的最新研究进展。重点阐述了病毒样衣壳、羧酶体蛋白壳等纳米蛋白笼体系, 以及氢化酶细胞内部区室化封装与外部天然多糖材料的全细胞封装系统的作用机制与性能表现。研究表明, 封装策略不仅有效隔离氧气、延缓酶失活, 还能通过提高局部酶浓度、优化电子传递等途径显著增强氢化酶的产氢活性。然而, 该技术仍面临封装效率、材料长期稳定性及光-生物界面匹配性等挑战。展望未来, 通过计算机辅助设计、增强电子传递效率以及开发复合功能材料, 有望推动生物封装氢化酶体系向高效、稳定、可规模化的产氢应用方向发展。

关键词 氢化酶, 生物封装, 生物制氢技术, 纳米蛋白笼, 细菌工程化

中图分类号 Q814.3, Q816, Q813.6

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0556

CSTR: 32369.14.pibb.20250556

在全球能源结构向低碳化转型的背景下, 氢能因其高能量密度、零碳排放的可持续应用潜力, 被广泛视为实现碳中和目标的关键载体之一^[1-2]。相较于依赖化石燃料蒸汽重整的传统制氢路径, 利用可再生资源(如太阳能^[3]、生物质^[4])驱动的生物制氢技术, 特别是基于氢化酶(hydrogenase)的催化产氢途径, 展现出环境友好、产氢效率高、条件温和且理论上可无限再生的独特优势^[5-6]。氢化酶作为自然界高效可逆催化质子还原产氢的生物催化剂^[7], 其应用为开发低成本、可持续的生物制氢技术提供了极具潜力的可行路径。

然而, 氢化酶在实际应用中面临诸多挑战。绝大多数高效产氢的氢化酶(尤其是[FeFe]-氢化酶)对氧气(O₂)表现出高敏感性, 即暴露于有氧环境会迅速导致其活性中心失活^[6, 8]。此外, 氢化酶类型的选择, 其活性对不同培养基、温度、pH的适宜度, 以及长期运行下的性能衰减, 都对生物制氢技术走向规模化应用有所制约^[9]。

而“生物封装(bioencapsulation)”技术被视

为应对氧敏感性挑战、抵御氧化应激问题的重要策略之一^[10]。通过将氢化酶限于生物源的材料基质内部, 可为酶分子构筑一个物理或化学屏障, 有效隔绝外部环境中氧气、热和蛋白酶等不利因素的伤害, 同时增强其结构稳定性并维持其高效催化产氢活性^[11]。

本文系统综述了生物封装技术在优化氢化酶催化产氢性能方面的最新研究, 重点聚焦于两类主流封装体系: 一是基于蛋白基纳米容器(如蛋白纳米隔室、病毒样颗粒等)的体外重构系统; 二是工程化氢化酶细胞, 以内部区室化或外部天然多糖进行封装。通过系统梳理前沿研究成果, 本文全面阐释了生物封装技术如何通过空间隔离机制有效克服氢化酶的氧敏感性, 同步实现其催化产氢效率与操作

* 国家自然科学基金(42474099), 国家自然科学基金地质联合基金项目(U2244223)和中国科学院地质与地球物理所重点部署项目(IGGCAS-202201)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-82998001, E-mail: changqiancao@mail.iggcas.ac.cn

收稿日期: 2025-12-19, 接受日期: 2026-04-04

稳定性的显著提升,为推动氢化酶技术向工业化规模应用提供理论支持和实践指导。

1 生物制氢技术

中国持续完善氢能产业生态,截至2024年底,全国氢气产能超5 000万吨/年,在全球可再生能源制氢项目累计建成产能占比超50%,已逐步成为全球可再生能源制氢及相关产业发展的引领国家。环境友好的生物制氢是可再生能源制氢方法之一,其利用储存于自然界的光能和有机物等,通过微生物的代谢过程产生氢气,因具有零碳排放且成本低、能耗低的特点而受到关注。目前,生物制氢技术主要分为光发酵、光解水、暗发酵、耦合4种方式(图1)。

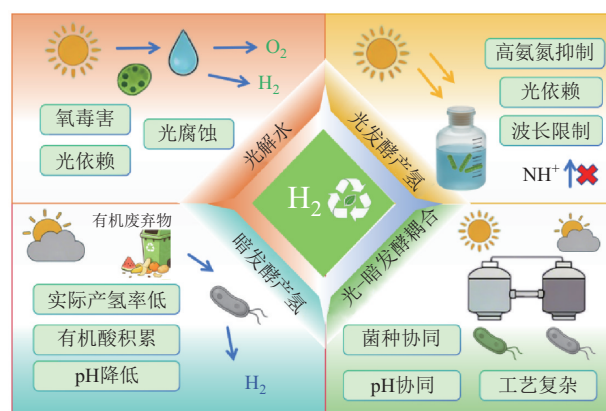


Fig. 1 Biological hydrogen production methods and limitations

图1 生物制氢方式与限制

藻类、光合细菌能够利用光解水,或是光能和有机物发酵产氢气。直接光解水产氢过程主要指绿藻、蓝细菌等^[12],其类囊体上的两个光系统,光系统I(photosystem I, PSI)和光系统II(photosystem II, PSII),可通过光合作用裂解水产生氢气和氧气,无二氧化碳的产生。绿藻产氢主要由氢化酶作用催化质子还原为氢气。光合细菌分布广泛,主要有红螺菌科、着色菌科、绿硫细菌科和绿弯菌科^[12],它们无法直接裂解水,而是利用光能和有机物通过底物光发酵产生氢气。在包括蓝细菌、固氮菌、根瘤菌在内的许多微生物中,氢化酶常与固氮酶协同作用。氢化酶催化方向具有可逆性,但在生理条件下呈现显著偏好性。产氢型氢化酶(H_2 -evolving hydrogenase)在低电位电子供体驱动下将质子还原为氢气,摄取型/吸氢型氢化酶

(H_2 -uptake hydrogenase)则优先氧化氢气以获取能量。在固氮体系中,这两类酶形成代谢偶联^[13]。一方面,固氮酶在还原氮气为氨的过程中伴随氢气的产生,氢化酶则负责氧化固氮酶产生的氢气,并消耗氧气,维持固氮反应持续进行;另一方面细菌在白天通过光合作用积累的糖原,到了夜晚或厌氧环境中,能够通过发酵途径降解糖原,此时,氢化酶会将多余的电子传递给质子,释放氢气以防止细胞过度还原^[14]。

光解水制氢过程中同时释放氧气,导致产氢仅能维持几秒至几分钟。并且其产氢过程依赖光照,光照不足或是光强不均都会影响产氢效率,在长时间光照下,PSII的活性会下降,发生光腐蚀。而光合细菌常只对特定波长的光有吸收作用,不仅存在光能利用率低的特点,还因维护光照波长而增加了成本^[12]。而且光发酵过程对于铵离子浓度非常敏感,高浓度铵离子会显著抑制光合细菌的活性。2024年Li等^[15]将ZnO/ZnS纳米颗粒与光合细菌SB1003结合,利用静电作用使纳米颗粒附着在细菌表面,观察到氢气产量比对照组提高约30%,表明利用无机纳米材料辅助可有效地提升光合细菌制氢效率。

暗发酵生物制氢是厌氧发酵产氢细菌在不需外界光能的情况下,将有机物代谢分解从而转化为氢气的过程^[16]。氢化酶是厌氧产氢细菌的催化核心,其产氢的方式可利用多种低成本有机废弃物,例如啤酒酿造副产物^[17]、果皮废弃物^[18]等,发酵过程产生有机酸,以啤酒糟水解液为底物最高速率能达到 $760\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[17]。在实际生产中,氢气产率往往低于理论值^[12]。

暗发酵生物制氢过程能在无光条件下进行,对底物种类适应性广,且产氢速率相对较快。但反应过程持续消耗大分子有机物,生成小分子有机酸或醇,在反应后期pH降低使得反应受到抑制,而光反应制氢则能利用小分子有机酸或醇来完成代谢,因此暗-光发酵耦合是进一步提升产氢效率的有效方式。2025年Wang等^[19]利用巴氏梭菌暗发酵与球形红细菌光发酵,实现两阶段高效产氢,最终耦合系统共产氢6.48 L,比单一暗发酵提高80%,且有效降解了有机酸。两阶段发酵相互协助,但仍需考虑光暗发酵分别的适宜pH值和菌种^[12, 16]。

在以上几类生物制氢路径中,无论是光解水、光发酵,还是暗发酵与暗-光耦合发酵的代谢过程,氢化酶在其中均扮演着核心催化角色,参与高效转

移电子催化产氢过程顺利进行。对于这种自然界亿万年进化出的高效的产氢分子酶的研究,正是未来生物制氢技术工艺提升的突破口所在。

2 氢化酶产氢技术

氢化酶是一类广泛分布于细菌、古细菌及真核生物中的金属酶^[8],具有可逆催化分子氢(H_2)与质子-电子对相互转化的生物活性^[20]。该酶类由 Stephenson 和 Stickland^[21]于1931年首次发现并命名,其核心催化的反应可表示为:



氢化酶通过介导氢分子的氧化或质子的还原,提供生物所需能量和平衡氧化还原电位^[9, 20]。氢化酶作为一类重要的金属酶,在生物体的能量代谢、氧化还原平衡、生物固氮以及环境适应等方面发挥着不可替代的作用。相较于目前主要依赖化石燃料的制氢方式,通过环境友好的氢化酶制氢方式具有巨大的研究价值。

氢化酶催化产氢为可逆的双向过程,其方向取决于能够与氢化酶相互作用的组分的氧化还原电位^[22],因此在不同的生物过程中,氢化酶扮演着不同的角色。例如,硫酸盐还原菌在富含硫酸盐的环境中,氢气作为电子供体,被氧化产生电子和质子。而在硫酸盐受限的发酵条件下, H^+ 作为电子受体,氢化酶将电子传递给质子生成氢气^[23]。根据其活性部位的金属组成,可以将氢化酶分为3类:[NiFe]-氢化酶(可细分为[NiFeSe]-氢化酶,即其中镍的一个半胱氨酸配体被硒代半胱氨酸取代^[24])、[FeFe]-氢化酶,以及[Fe]-氢化酶。这3类氢化酶在结构与功能方面各有特点,但活性中心都具备对氧气敏感这一共性,尤其是[FeFe]-氢化酶,极易因氧气作用而失活^[8, 25]。

2.1 氢化酶产氢机制

2.1.1 [NiFe]-氢化酶

[NiFe]-氢化酶广泛分布于古细菌和细菌之中^[8],在3类氢化酶中数量最多,在生物体内可进行催化产氢及其氧化的反应^[6]。1995年,Fontecilla团队首次解析了巨大脱硫弧菌(*Desulfovibrio gigas*)的[NiFe]-氢化酶,2.85 Å分辨率的晶体结构,为理解其催化机制奠定了基础^[26]。该酶通常由2个亚基构成,分别为催化大亚基和小亚基。其活性中心为1个独特的镍-铁双金属簇,嵌入大亚基内部。该簇由2个半胱氨酸残基的硫原子连接起镍与铁原子,另外2个半胱氨酸

残基的硫原子则直接与镍配位。铁原子则与2个氰化物(CN^-)和1个羰基(CO)配体结合,形成催化反应的核心(图2a)。小亚基通常包含3个铁硫簇($[4Fe-4S]$ 、 $[3Fe-4S]$ 、 $[4Fe-4S]$),它们根据与活性中心的距离,依次被称为近端、中间和远端簇,共同构成高效的电子传递链^[9, 26]。

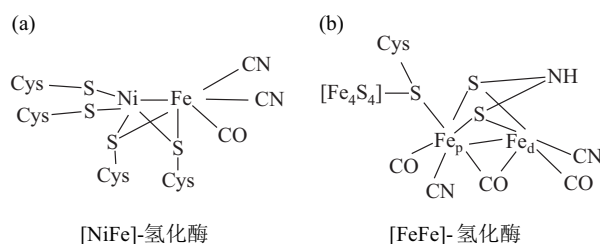


Fig. 2 Structures of [NiFe]-hydrogenases (a) and [FeFe]-hydrogenases (b)

图2 [NiFe]-氢化酶(a)和[FeFe]-氢化酶结构(b)

[NiFe]-氢化酶催化产氢的循环过程涉及多个关键的中间态连续可逆转化,其中间活性态包括Ni-SIa(Ni^{2+})、Ni-R(Ni^{2+})、Ni-C(Ni^{3+})。该循环通常从活性的Ni-SIa态(Ni^{2+})开始,该态与氢分子结合并使其发生异裂,生成1个桥联在Ni-Fe原子之间的氢负离子(H^-)和1个质子(H^+),从而形成完全还原的Ni-R态。随后,Ni-R态经历1次质子耦合的电子转移,失去1个电子和1个质子,被氧化为Ni-C态。Ni-C态进一步发生质子耦合电子转移,失去桥联 H^- ,转化为 H^+ 和 e^- ,后又在近端 $[4Fe-4S]$ 簇的调控下,重新回到活性的Ni-SIa态,完成一个完整的、可逆的氢气氧化/产氢催化循环^[9, 27]。通过这些中间态之间的连续、可逆转化,[NiFe]氢化酶的催化活性得以动态调节(图3)。

但不同类型的[NiFe]-氢化酶对氧的耐受程度存在差异,在生物体内也发挥着各不相同的作用。在[NiFe]-氢化酶的催化机制中,当氧气进入酶的活性位点时,它会与活性中心直接结合,形成两种主要的催化惰性氧化态Ni-A、Ni-B(图3)。在有足够的电子可用的情况下,氧气与Ni、Fe中心结合并完全还原,形成一个桥联的羟基($-OH$),即为Ni-B态,该状态能够被 H_2 快速激活恢复催化活性。但当没有足够的电子快速完全还原氧气时,则形成Ni-A状态,Ni、Fe之间的桥连配体暂未确定,需要更长的时间或是更低电势才能实现催化活性再激活^[9]。

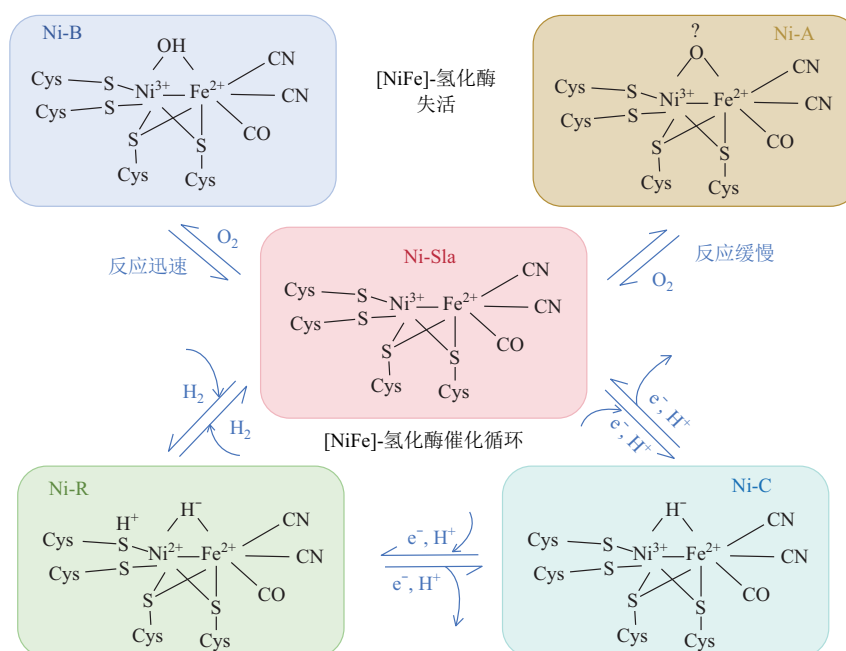


Fig. 3 Catalytic cycle of [NiFe]-hydrogenase (modified from reference [9])

图3 [NiFe]-氢化酶的催化循环 (修改自文献[9])

红色框、绿色框、蓝绿色框展示了[NiFe]-氢化酶在催化循环中不同状态下的活性位点结构，分别为Ni-Sla、Ni-R、Ni-C。Ni-Sla为[NiFe]-氢化酶稳定态，当接触氢气，一个氢化物(H^-)结合到Ni和Fe之间形成桥联，另一个质子(H^+)结合到末端半胱氨酸的硫上，转变为Ni-R。在Ni-R状态释放1个电子(e^-)和1个质子(H^+)，转变为Ni-C状态，整个过程可逆，Ni-R也可释放出氢气回到Ni-Sla态。蓝色框和黄色框则分别展示氧耐受型、标准/氧敏感型[NiFe]-氢化酶接触氧气失活的活性中心状态，如果活性位点有足够的电子可用，氧气可被还原为水使得酶再次被激活，但氧耐受型Ni-B状态可被快速激活，Ni-A状态则再激活非常缓慢。

基于分子系统发育分析，[NiFe]-氢化酶可被划分为5类：膜结合氢气摄取[NiFe]-氢化酶(membrane-bound H_2 -uptake [NiFe]-hydrogenase, MBH)、可溶性摄取和 H_2 传感器[NiFe]-氢化酶、

双向异源性细胞质[NiFe]-氢化酶、膜结合型能量转换[NiFe]-氢化酶、高亲和力[NiFe]-氢化酶^[8](表1)。

Table 1 Classification of [NiFe]-hydrogenases

表1 [NiFe]-氢化酶的分类

类别	特点
膜结合氢气摄取[NiFe]-氢化酶(MBH)	对氧气的敏感性不同 ^[26, 28-29] ；位于细胞膜周质侧，与醌池通过细胞色素b相连 ^[8, 29] ；将氢气分解后，驱使质子跨过细胞膜，形成质子动力势，最终驱动ATP的合成，为微生物提供能量 ^[30-31] 。存在于固氮菌、蓝藻中，回收固氮副产物 H_2 ^[14]
可溶性摄取和 H_2 传感器[NiFe]-氢化酶	亚类A参与氧化还原平衡调节参与细胞代谢；亚类B作为氢气传感器，调控其他氢化酶基因的表达 ^[32]
双向异源性细胞质[NiFe]-氢化酶	亚类A为F420还原氢化酶，存在于产甲烷古菌中 ^[33] ；亚类B为双功能硫氢化酶，可在超嗜热古菌中还原 S^0 或产生 H_2 ^[34-35] ；亚类C为F420非还原氢化酶，与异二硫还原酶偶联 ^[36] ；亚类D为NAD(P)依赖的双向氢化酶，维持NAD ⁺ /NADH的平衡 ^[37-38]
膜结合型能量转换[NiFe]-氢化酶	催化质子还原为 H_2 ，参与发酵或化能自养代谢 ^[39-42]
高亲和力[NiFe]-氢化酶	能够在极低 H_2 浓度下氧化大气 H_2 ^[43]

膜结合的[NiFe]-氢化酶即包含多种不同氧耐受性的亚型。硫酸盐还原菌的氢化酶是氧敏感型代表^[35]，大肠杆菌中的氢化酶2仅具低耐氧性^[40]，而大肠杆菌氢化酶1依赖于其活性位点的一个独特

的[4Fe-3S]近端簇对氧气耐受性尤为突出^[41]。同样表现出显著耐氧特性的还有钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*) H16氢化酶^[36]，因此，氢化酶产氢技术所要克服的关键瓶颈之一即为克服产氢

过程中的氧气毒害。

基于此, 对于[NiFe]-氢化酶的产氢技术从基础酶学走向应用导向的产氢系统构建, 学者们发现, 通过共培养、酶固定化、异源表达等方式, 能够有效优化[NiFe]-氢化酶产氢。Mai等^[44]利用两种嗜热厌氧细菌人工共培养, 在最优接种比下, 氢气产量提高了70.84%, 且与[NiFe]-氢化酶相关的*hyp*基因簇显著上调, 使得酶表达与成熟过程受到促进。Khalil等^[45]将[NiFe]-氢化酶封装于两种功能化的 β 酮烯胺共价有机框架(covalent organic framework, COF)材料中。修饰电极在氢气氧化反应中表现出显著增强的催化电流, 且酶活性在14 d内保持稳定。Kim等^[46]大肠杆菌中成功克隆并表达了氧耐受型[NiFe]-氢化酶, 将其固定在 TiO_2 纳米管上, 形成聚吡咯包覆层构建电极。该研究首次实现了氧耐受型[NiFe]-氢化酶在纳米电极上的稳定固定, 并验证其在好氧条件下的电催化产氢性能。可见, 提升氢化酶的产氢效率, 不仅依赖于其催化活性的增强, 也取决于其稳定性与可集成性的显著提升。

2.1.2 [FeFe]-氢化酶和[Fe]-氢化酶

相比于[NiFe]-氢化酶, [FeFe]-氢化酶在自然界中分布范围较窄, 存在于细菌和真核生物中^[6]。[FeFe]-氢化酶是 H_2 释放的主要参与者, 具有极高的产氢效率, 通常高于[NiFe]-氢化酶。该酶有着独特的活性位点金属簇, 称为H簇。H簇是以[4Fe-4S]簇通过半胱氨酸桥连于双铁活性中心的复合物。其中双铁催化亚簇包含近端铁与远端铁(Fe_d), 近端铁(Fe_p)上通过半胱氨酸残基与[4Fe-4S]簇相连(图2b)。[Fe_p]、[Fe_d]通过2个硫和1个CO桥连, 同时, 分别还与1个CO和1个 CN^- 配位。 Fe_d 保留1个空位用于结合氢化物(如 H^+ 、 H_2 或 H^-), 是催化反应的关键位点^[9, 47]。该酶对于氧气和一氧化碳都十分敏感, 当外源性一氧化碳、氧分子通过空腔扩散到H簇活性位点, 与该位点发生不可逆结合, 会导致活性位点结构发生改变或被阻塞, 从而使酶失活^[48]。

H簇是负责[FeFe]-氢化酶催化的核心部位, H_{ox} 通常被认为是酶稳定的氧化态形式, 在产氢的过程中, H_{ox} 态的[4Fe-4S]簇处于正二价氧化态, 接受1个电子后, [4Fe-4S]簇的电荷变为正一价, 被还原为 H_{red} 态。再结合1个氢质子(H^+), 伴随内部电子重排转移到氨基(—NH)配体上转化为 H_{red} (H^+)状态。接受第二个电子转变为 H_{red} (H^+)态,

该状态为超还原态, [4Fe-4S]簇被进一步还原, 此时H簇已经累积了2个电子, 再结合1个氢质子后, 转变为氢化物(H^-)结合到 Fe_d 上, 变为 H_{hyd} (H^+)状态。这一步通常被认为是氢气形成的关键中间体, 氢化物(H^-)是氢气合成的活性物种。随后内部电子质子重排, [4Fe-4S]和 Fe_p 都结合电子, 在 Fe_d 上形成氢分子。在释放氢分子后, 回到初始氧化态 H_{ox} , 完成一个催化循环^[47](图4)。依据结构特征, [FeFe]-氢化酶可划分为单聚体和多聚体两大类型。在自然界中, 绝大部分的[FeFe]-氢化酶都是单聚体^[49]。

而[Fe]-氢化酶, 其活性位点以单铁原子为核心, 又称 H_2 -形成亚甲基-四氢甲烷蝶呤脱氢酶(Hmd), 最初从嗜热产甲烷古菌中分离获得。它是一种不含铁硫簇结构的同源二聚体, 依赖独特的铁-鸟苷吡啶醇辅因子实现功能, 辅因子由铁中心、吡啶醇环以及鸟苷一磷酸部分共同构成(图5a)。只有在次甲基四氢甲烷蝶呤(methenyl- H_4MPT^+)存在的情况下, [Fe]-氢化酶才能催化 H_2 的可逆活化与异裂。该酶可逆地催化 H_2 与次甲基四氢甲烷蝶呤还原为亚甲基四氢甲烷蝶呤(methenyl- H_4MPT)^[27](图5b)。该酶在产甲烷古菌的代谢能量转化过程中扮演着关键角色, 催化过程主要针对于氢气分子的裂解。

三类氢化酶在生物体内各司其职, 精准地维持着氢离子的动态平衡。对氢化酶结构与产氢机制的深入探索, 使我们充分认识到其多样类型与催化能力。然而, 在实际应用中, 如何攻克氢化酶的成熟与纯化难关、降低其对氧的敏感性, 以及如何提升酶的活性和稳定性, 已成为推动该技术发展的核心挑战。

2.2 氢化酶产氢应用面临的挑战

氢化酶的催化活性中心主要由镍和铁构成, 相较于贵金属化学催化剂, 其在资源可持续性和成本控制方面具备显著优势。在各类氢化酶中, [FeFe]-氢化酶表现出极高的催化活性, 譬如在最佳条件下, 来自丙酮丁醇梭菌的[FeFe]-氢化酶其周转频率高达21 000 H_2/s , 显示出优异的产氢潜力^[49]。然而, 将其作为高效、稳定的核心材料投入实际应用仍面临显著挑战, 主要包括氢化酶的氧敏感性、重组成熟难度高、电子传递效率不佳、催化稳定性不足。

2.2.1 氢化酶的氧敏感性

氢化酶固有的氧敏感性为关键问题之一。早在

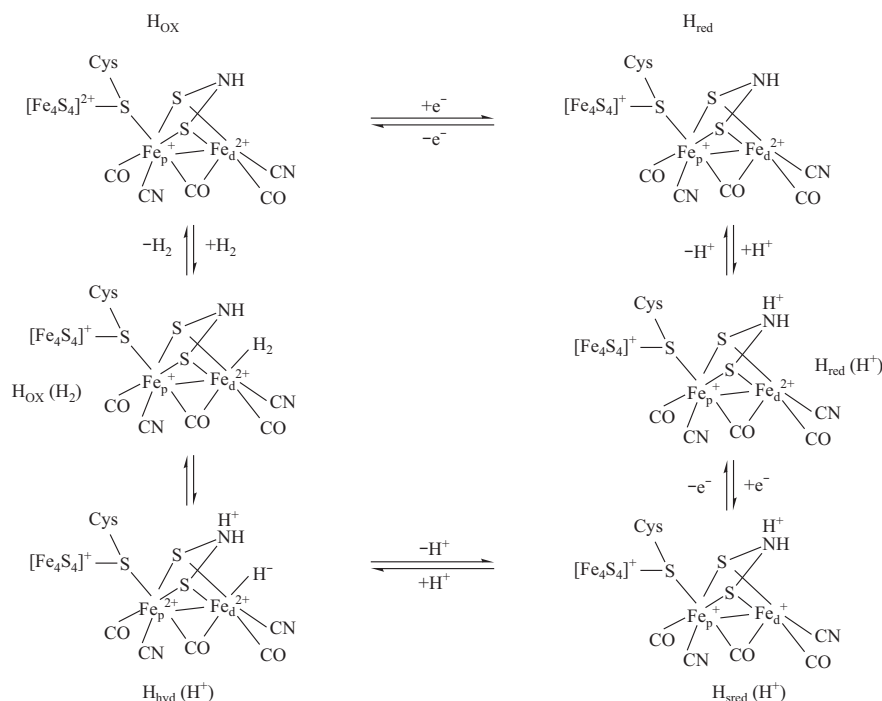


Fig. 4 Catalytic cycle of [FeFe]-hydrogenase (modified from reference [47])

图4 [FeFe]-氢化酶的催化循环 (修改自文献[47])

展示了[FeFe]-氢化酶在催化循环中的6种状态,其中 H_{ox} 通常被认为是酶稳定的氧化态形式,接受1个电子后,[4Fe-4S]簇的电荷变为正一价,被还原为 H_{red} 态,结合1个氢质子(H^+),内部电子重排转化为 $H_{red}(H^+)$ 状态。接受第二个电子转变为 $H_{sred}(H^+)$ 态,该状态为超还原态, $H_{hyd}(H^+)$ 态为氢气形成的关键中间体,后经电子质子重排,生成氢气,转化为 $H_{ox}(H_2)$ 状态,最终释放氢气分子,回到稳态。

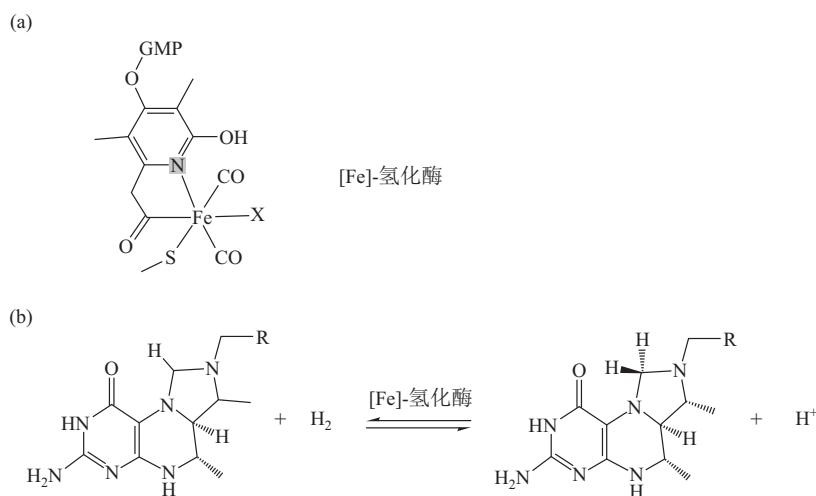


Fig. 5 Chemical structure and catalytic reaction of [Fe]-hydrogenase

图5 [Fe]-氢化酶的化学结构式和催化反应

(a) [Fe]-氢化酶分子结构式;(b) [Fe]-氢化酶催化反应,能够可逆催化次甲基四氢甲蝶呤(methenyl- H_4MPT^+)与氢气反应生成亚甲基四氢甲蝶呤(methenyl- H_4MPT)与氢质子(修改自文献[27])。

1990年,Adams^[50]就系统论述了氢化酶的氧不稳定性,并指出这是阻碍其从基础研究走向工业规模应用的主要瓶颈之一。绝大多数高活性氢化酶,包括产氢活性突出的[NiFe]-氢化酶型和[FeFe]-氢化酶型,对氧气极为敏感。氧气可轻易扩散至活性中

心,可逆或不可逆地氧化关键金属原子,导致酶结构破坏和永久失活。因此,氧敏感性严重限制了这类酶在有氧环境或复杂工况下的使用。

氢化酶的活性中心易受到氧气攻击,无论是外界环境中的氧气还是体内产氧,都能使酶的活性急

速衰减。以[FeFe]-氢化酶为例, 如莱茵衣藻中的CrHydA1, 具有很高的催化活性, 纯化后产氢速率可达700 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 但在有氧的环境下, 其活性几乎完全丧失^[51]。莱茵衣藻中的PSII实现光合产氢的过程中, 体内光解水产生的氧气扩散, 在短时间内也会使得氢化酶失活^[52]。在生物固碳的电子竞争和产氧扩散的双重攻击下, 氢化酶在正常光合作用细胞中难以持续工作。相比之下, 大多数[NiFe]-氢化酶的产氢活性不如[FeFe]-氢化酶, 但通常表现出较强的氧耐受性, 在大约2 000种已识别的[NiFe]-氢化酶中, 约有44%被预测为具有氧耐受性^[52]。例如, 激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)的[NiFe]-氢化酶1具备良好耐氧性, 且无论在短时间还是长时间暴露于氧气, 都能一定程度恢复活性^[53]。

但总体来讲, 无论是[NiFe]-氢化酶还是

[FeFe]-氢化酶的活性, 都受到氧气的严重影响, 若想实现氢化酶的高效且持续的产氢, 提升其对氧气的耐受程度非常关键。

2.2.2 氢化酶的重组成熟

大多数天然宿主中, 氢酶的表达量通常很低。为进一步提升氢化酶产量, 学者们做了很多氢化酶同源重组和异源表达的研究, 利用人们熟知的、生长迅速、生物量大的工业微生物作为酶体宿主, 以期寻找到更易培养、更耐氧的培养方式。而且从天然宿主中分离纯化氢化酶往往因其严格厌氧的培养方式难度很大, 在便于操作的宿主中异源表达能够使得纯化更快速, 减少过程中的损失。同时, 像大肠杆菌这种研究得较为透彻的表达宿主, 也是进行蛋白质工程和定向进化的理想平台。目前已对[FeFe]-氢化酶、[NiFe]-氢化酶的异源重组做出多种成功表达(表2, 3)。

Table 2 Comparison of hydrogen production activity of recombinant [FeFe]–hydrogenase
表2 重组[FeFe]–氢化酶的产氢活性对比

氢化酶种类	原宿主	共表达成熟因子来源	重组生产宿主	产氢速率/($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	文献
HydA1	丙酮丁醇梭菌	丙酮丁醇梭菌	/	162	[54]
HydA	丙酮丁醇梭菌	丙酮丁醇梭菌	大肠杆菌	75	[55]
HydB	丙酮丁醇梭菌	丙酮丁醇梭菌	大肠杆菌	8.6	[55]
HydA	莱茵衣藻	莱茵衣藻	/	741	[56]
HydA1	莱茵衣藻	丙酮丁醇梭菌	大肠杆菌	150	[55]
HydA2	莱茵衣藻	丙酮丁醇梭菌	大肠杆菌	116	[55]
HydA1	莱茵衣藻	希瓦氏菌	大肠杆菌	641	[57]
HydA	巴氏梭菌	巴氏梭菌	/	3 400	[58]
HydA	巴氏梭菌	希瓦氏菌	大肠杆菌	1 087	[57]
HydA-HydD	腾冲嗜热厌氧杆菌	腾冲嗜热厌氧杆菌	/	1 700	[59]
HydA-HydD	腾冲嗜热厌氧杆菌	希瓦氏菌	大肠杆菌	5.3	[60]

表中灰色底行为原酶纯化后的活性数值。

Table 3 Comparison of hydrogen production activity of recombinant [NiFe]–hydrogenase
表3 重组[NiFe]–氢化酶的产氢活性对比

氢化酶种类	原宿主	重组生产宿主	产氢速率/($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	文献
膜结合型	大肠杆菌	/	12.2	[61]
膜结合型	海洋氢弧菌	大肠杆菌	28.8	[61]
膜结合型	柠檬酸杆菌	/	18 700	[62]
膜结合型	柠檬酸杆菌	大肠杆菌	2 410	[63]
传感器型	钩虫贪铜菌	/	19.2	[64]
传感器型	钩虫贪铜菌	大肠杆菌	1 230	[65]
可溶型	钩虫贪铜菌	大肠杆菌	35 000	[66]
可溶型	耐金属贪铜菌	大肠杆菌	8 200	[66]
可溶型	淡黄嗜氢菌	大肠杆菌	100	[66]
可溶型	泽维尔温胞菌	大肠杆菌	4 000	[66]

表中灰色底行为原酶纯化后的活性数值。

从表2和表3中可看出,对于氢化酶在大肠杆菌当中的异源重组研究已有多种尝试。氢化酶异源重组具备可操作性、可设计性和可放大性,是推动氢酶从基础研究走向实际应用的重要路径。但氢化酶的重组成熟之路也包含着成熟机制复杂,纯化难度高、产量低的核心难点。首先,[FeFe]-氢化酶需要至少3种特异性成熟酶(HydE、HydF、HydG),[NiFe]-氢化酶则需要至少6种辅助蛋白质(HypA~F等)。这些成熟酶负责合成、组装并将复杂的金属辅因子精准地插入到脱辅基酶的正确位置,使得氢化酶能具备产氢活性。大肠杆菌等常规的异源表达宿主虽然自身可能编码氢酶,但其内源的成熟机制往往无法识别并作用于外源的氢酶。其次,氢化酶的高氧敏感性也使得整个生产、纯化和储存过程都必须在严格的无氧条件下进行,对设备、操作流程和成本都提出了很高的要求,获得高细胞密度的同时保护氧气敏感的氢酶,是一个巨大的工程挑战。再者,即使在共表达成熟酶的情况下,异源表达的氢酶产量也常常很低,难以满足工业应用对蛋白质量的需求^[67]。从表2也可直观看出,[FeFe]-氢化酶异源表达后的氢化酶活性往往要低于纯化的原酶,因此如何平衡正确高效的组装和重组纯化产量是影响氢化酶产率值得考量的重要因素,可从共表达氢化酶的成熟因子^[57]、优化诱导表达条件^[55]、补充金属辅因子^[55, 57]等方式促进氢化酶重组成熟。

2.2.3 电子传递系统效率

提升电子在酶内部的传递效率,不仅是氢化酶驱动催化反应的基础,也是应对复杂环境、克服酶自身生理局限的关键。电子传递链在其中扮演着双重角色,它既要高效地将外部电子输送至活性中心以还原质子,还需具备处理氧化性物质的电子供给能力。以氧气耐受型[NiFe]-氢化酶为例,其特殊的[4Fe-3S]簇能够快速提供2个电子,将进攻活性中心的氧气彻底还原为水,从而避免酶失活^[68]。这一机制表明,高效的电子传递链不仅是催化反应的通道,更是酶在含氧环境中维持活性的关键。

然而,电子传递的效率还受其热力学性质的影响,氢化酶催化的反应是可逆的,而反应的偏向性主要由电子传递链的氧化还原电位决定。许多天然氢化酶的铁硫簇电位偏高,导致电子在抵达活性中心时能量不足,难以驱动质子还原,天然偏向氢氧化方向^[69]。除了电子传递链自身的性质外,产氢过程中的动态因素同样影响整体效率。催化产生的

氢气若不能及时从活性中心附近移除,会因局部浓度过高而产生产物抑制,显著降低电子传递效率。

为了突破这一限制,研究者们通过多种手段对电子传递路径进行改造或重建。常见的策略包括基因突变以增强电子质子协同^[70]、引入电子介体苝基紫精等以绕过原有的高能垒^[71],以及利用金属纳米簇Ag^[72]等构建直接的电子注入界面,从而激活酶的产氢活性。因此,提升电子传递链的效率,必须综合考虑其电子储备能力和在实际反应环境中的动态协同。

2.2.4 氢化酶催化稳定性

氢化酶产氢的规模应用除了有氧环境造成的不可逆失活外,实际工业场景中存在的多重理化因素同样对其催化稳定性构成了严峻制约,如生物发酵通常伴随着复杂的气体组分、pH值、温度波动以及机械搅拌产生的剪切力,因此保证氢化酶在此条件下能够稳定、持续地产氢也是规模产氢的必要条件。发酵副产物中常含有一氧化碳和硫化氢等杂质气体,这些气体都可能会与氢化酶的活性中心强配位,强烈抑制酶的活性^[73]。在反应过程中,有机酸的积累导致pH值波动也会导致酶失活^[18]。且大多数高效的氢化酶最佳工作温度通常在室温至37℃左右^[74-75]。但在实际反应过程中,为了提高反应速率和降低纯化难度,常希望在较高温度下运行,高温会破坏维持酶三维结构的氢键和疏水作用,导致蛋白质变性失活。

为突破上述多重限制,近年来研究者围绕提升氢化酶在复杂环境下的催化效率开展了大量探索,通过酶工程改造、工程化细菌光驱动改造、酶固定化的方式,形成增强氢化酶产氢效率与稳定性的策略。

2.3 提升氢化酶产氢效率的应对策略

面对氢化酶产氢应用的各类挑战,当前的产氢技术研究多聚焦于酶工程、协同光能、酶固定化层面。在氢化酶产氢系统中通过定点突变和定向进化,借助人工智能和计算机辅助技术以优化氢化酶的基因表达,筛选出耐氧性更强的突变株以改造反应方向偏好性和增强产氢稳定性。或是构建半人工的光合制氢系统,以光激发量子点产生的电子,直接传递给氢化酶,驱动质子还原为氢气,优化电子传递路径。另一方面,酶固定化技术则着眼于解决酶的稳定性。通过将氢化酶固定于功能化载体材料中,为其提供隔离环境,不仅能够有效限制酶分子的构象变化从而延缓失活,还能实现酶的重复利用

和连续化操作, 从而大幅提升整体产氢效率。

2.3.1 酶分子工程

根据氢化酶的催化偏好性, 对于其进行酶工程改造, 可直接增强将多余电子和质子催化生成氢气释放的产氢型氢化酶的产氢效率, 也可通过抑制或调控摄取氢气作为能源的吸氢型氢化酶的活性, 减少其对氢气的再氧化, 从而提高体系的净产氢效率。这两类策略相辅相成, 共同拓展了氢化酶在生物能源系统中的应用维度与发展潜力。

酶分子工程可通过理性设计或定向进化策略对氢化酶结构进行精准调控。Yonemoto等^[76]针对马氏交替单胞菌深海生态型[NiFe]-氢化酶小亚基中的2个Fe-S簇连接残基进行定点突变(H230C/P285C), 构建的双突变体在大肠杆菌和蓝细菌中都表现出了3~4倍的产氢活性提升, 且热稳定性和耐氧性未受影响。Evans等^[70]通过将[NiFe]-氢化酶活性中心的半胱氨酸替换成硒代半胱氨酸, 不仅提高了催化活性, 还显著缓解了氢气对反应产物的抑制效应。Plummer等^[77]利用定向进化技术, 将来自2种不同藻类的3种氢化酶基因进行片段重组, 构建嵌合氢化酶, 并利用计算机预测出理论上产氢能力可以提升数十倍甚至数百倍的超级突变体。然而, 并非所有改造都对产氢效率与稳定性有所增强, 例如对巴氏梭菌的[FeFe]-氢化酶进行蛋白质工程改造后, 突变体的氧气耐受性提高了, 但其产氢活性下降了约80%^[78]。

在氢化酶产氢过程中, 产氢型氢化酶虽为关键催化单元, 但生物体系中常存在的吸氢型氢化酶会逆向消耗氢气, 将分子氢重新氧化为质子与电子, 从而显著降低系统的净产氢效率。在大肠杆菌氢化酶1和2中敲除*hyaB*、*hybC*基因来抑制氢气吸收, 显著提升了以葡萄糖为底物时的产氢速率^[39]。Zhang等^[79]对球形红细菌进行多纬度的基因工程改造, 以已被敲除吸氢型氢化酶基因*hupSL*的菌株作为基础菌株, 整合*pufQ*、*spbA*到*hupR*和*hupC*基因位点上, 使得整个系统更倾向于氢气的积累。Li等^[80]发现, 在暗发酵过程中, 50 mg/kg总悬浮固体的多环芳烃菲显著促进氢气积累, 既可上调产氢代谢途径, 又可以下调耗氢途径。这些研究表明, 氢化酶的催化方向可控, 阻断吸氢型氢化酶活性或是对吸氢型氢化酶进行基因工程改造、提高微生物产氢效率的有效策略。

在改造过程中, 常需在成百上千的基因库中进行筛选, 而近来计算模拟和机器学习已成为高效预

测和筛选的有效工具。从计算机学习与模拟视角看, 当前氢化酶工程研究已从“经验试错”转向“理性设计”。密度泛函理论(density functional theory, DFT)与分子动力学模拟的有效使用, 揭示了[FeFe]-氢化酶H簇中末端氢化物作为关键中间体的催化机制, 奠定活性中心的理性改造的基础^[81-83]。AlphaFold等结构预测方法为缺乏晶体结构的氢化酶提供了可靠三维模型, 明确了辅助结构域与催化结构域的动态相互作用对电子传递效率和氧气敏感性的影响, 从而识别出可用于定点突变的功能性区域^[83]。在酶改造策略上, 定向进化结合静电势表面积建模也成为有效途径, 现已成功构建出产氢量达野生型2.5倍的嵌合酶, 并预测通过插入残基提升产氢量的方法^[77], 而机器学习, 例如常用到的随机森林、梯度提升树等对暗发酵制氢过程关键影响因素的识别, 为酶在实际反应器中提供了最优环境参数指导^[84-85]。这种人工智能与生物学的融合开启了从单一酶分子的大量实验到省时省力模拟预测设计的转化。计算机建模结果为酶工程提供了精确的改造靶点, 关联催化活性的关键因素, 机器学习则利用数据驱动指导酶在实际工况中的高效表达与稳定运行。可以看出, 它不仅是解释实验现象的工具, 更是指导氢化酶理性设计与优化的核心平台。

然而, 当前计算机和人工智能研究仍存在发展空间, 机器学习模型受制于实验数据支撑, 计算模拟的成本高, 且往往依赖于参数选择, 现大多人工智能驱动的合成设计菌群仍多停留在概念验证阶段。未来发展方向应聚焦于多尺度模型的深度耦合与协同进化, 真正实现可预测酶体设计。

总之, 对于酶本身的改造能够使得其产氢量与稳定性得到提升, 尤其是现在借助计算机辅助工具, 能够更高效地设计和改造目的菌落。然而, 目前对氢化酶本身氧敏感性的改善仍有局限, 部分研究存在着氢化酶提升耐氧性的同时, 催化活性下降的问题。因此学者们不局限于酶本身的改造, 利用光材料进行工程化改造, 或采用锚定于固体载体或包埋于保护性基质中的固定化策略, 以提升酶的整体操作稳定性。

2.3.2 工程化细菌光驱动改造

太阳能作为一种绿色、可持续的能源形式, 因其资源丰富性和环境友好性, 已成为生物制氢领域的重要研究方向。近年来, 通过将光能捕获系统与产氢细菌结合, 研究者开发出多种光驱动杂合系

统,显著提升了氢气的生产效率与系统稳定性。尽管天然光合微生物(如蓝藻和绿藻)具备内源性氢化酶和光合系统,能够直接进行光驱动产氢^[86],但其太阳能转化效率及工程可塑性仍存在局限。因此,当前研究更多聚焦于对非光合产氢细菌进行光驱动改造,通过引入外源光敏材料,构建高效、稳定的人工光合成系统。相较于纯酶系统,全细胞催化剂在光照条件下展现出更优的操作稳定性与持续产氢能力^[87]。

光驱动杂合系统的构建核心在于将光能高效转化为细菌可利用的化学能。目前主流策略主要分为两类:与无机半导体材料结合以及与有机光敏剂结合^[88]。近年来,研究者利用共沉淀、原位合成、基因工程引导组装及细胞摄取等策略,实现光敏材料与细菌的紧密集成。例如,Honda等^[89]利用硫化镉(CdS)与[FeFe]-氢化酶大肠杆菌共沉淀合成,生成了能够在单细胞内实现光能转换和氢生成的杂交体(图6a)。Wei等^[90]通过表面展示重金属结合蛋白PbrR,引导CdS纳米颗粒在工程大肠杆菌表面有序合成,并结合仿生二氧化硅封装,使系统在自然有氧条件下连续产氢96 h,产量达 $0.52 \times 10^{-8} \mu\text{mol}/\text{细胞}$ 。这一原位结合方式为光催化产氢提供了新思路(图6b)。Lin等^[91]利用麦芽糖聚合物包裹CuInS₂量子点,使得表达了[FeFe]-氢

化酶的大肠杆菌膜上的麦芽糖结合蛋白特异性识别麦芽糖聚合物并“吞下”被聚合物包裹的CuInS₂量子点,该方式相较于内动扩散,能够实现对量子点的高效主动内存,最优条件下可实现 $3\ 149.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 氢气产率,相较于野生大肠杆菌系统产氢速率提升83.3倍,且有着优秀的光能利用率。但是,在10 h的光照下,系统的稳定性因光致活性氧类的累积而显著下降,从初始的85%降至34%。

而有机光敏剂可通过有机合成更灵活地精确修饰。例如,Honda等^[87, 89]利用曙红Y(Eosin Y)作为光敏剂与基因工程改造的大肠杆菌结合,开发了一种可见光驱动、无需外加电子介体的高效氢气生产系统,Eosin Y这种小分子的还原态可以直接将电子传递给细胞内的氢化酶,而不需要任何额外的人工电子介体。选用该类光敏剂,为光驱动的氢化酶催化系统提供了新思路,Eosin Y可以吸收可见光,打破了TiO₂半导体仅能利用紫外光的局限。但Gamache等^[92]在2023年的研究当中,针对[FeFe]-氢化酶分别采用了Eosin Y和[Ru(bpy)₃]²⁺两种光敏剂,发现Eosin Y的电子传递效率更高,但引起小分子进入细胞内,导致毒性较大,细胞存活率下降也更快。而反应发生于细胞外的生物相容性更好,是实现长期稳定运行的关键优势。

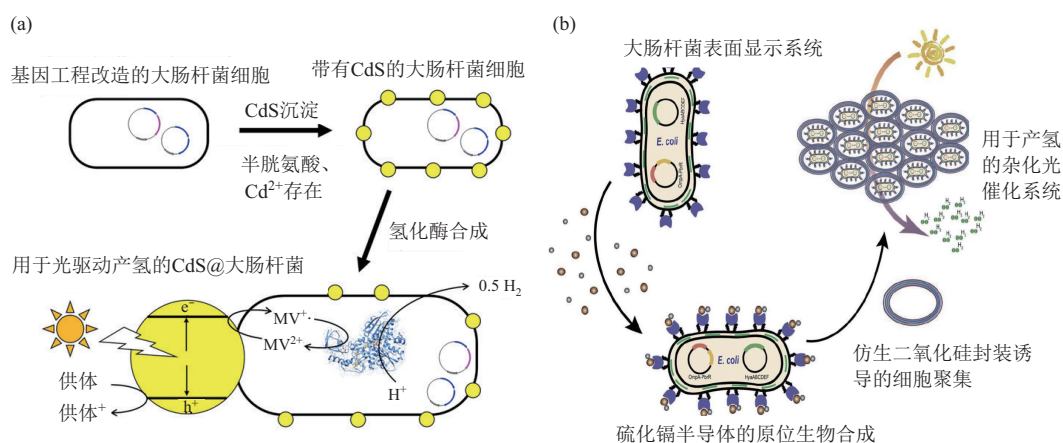


Fig. 6 Schematic diagram of light-driven cell-catalytic hydrogen production

图6 光驱动细胞催化产氢示意图

(a) 制备大肠杆菌共沉淀CdS全细胞生物催化剂用于光生物氢生产的示意图。黄色球代表细菌沉淀的CdS颗粒(修改自文献[89]); (b) 用于空气中光驱动氢气生产的表面显示生物杂交方法,在大肠杆菌表面原位合成CdS,后又用仿生二氧化硅进行封装(修改自文献[90])。

总体而言,通过将人工光敏材料与非光合细菌催化剂以不同方式结合,构建出的多种光驱动产氢

系统在催化效率和稳定性方面展现出显著优势。目前,研究已在材料选型与结合策略上取得关键进

展, 有效提高了电子传递效率。然而, 要推动该类系统走向实际应用, 仍需进一步解决若干关键挑战, 包括光敏材料的光降解问题、电子界面传递效率的持续优化和生物相容性问题、系统活性氧类积累下的长期稳定性等。

2.3.3 固定化与生物封装技术

固定化技术同样不再局限于对酶本身性质的改造。引入外界载体对氢化酶进行保护, 是提高氢化酶稳定性、耐氧性及可重复使用性的有效手段。固定氢化酶的载体种类繁多, 包括碳材料、高分子材料、金属-有机框架 (metal organic frameworks, MOFs)、多孔 COFs 等^[93], 这些载体的特性为氢化酶在工业生产中的广泛应用创造了条件。碳材料因其高比表面积、优良导电性及成本低廉等优势, 成为固定氢化酶的常用载体。例如, Tsygankov 等^[94]用一种简单、无需电极表面活化的定向固定方法, 通过疏水相互作用将鲍氏着色菌 (*Thiocapsa bogorovii*) 的 [NiFe]-氢化酶大小亚基固定在疏水性碳电极上, 实现了稳定且高效的直接电子转移。高分子材料具有可调控的物理化学性质, 有助于增强氢化酶的环境适应性。例如, Filmon 等^[95]将梭菌 [FeFe]-氢化酶嵌入到两种联吡啶盐修饰的树状大分子膜中, 发现酶的氧气耐受性显著提升, 在空气暴露 18 h 后, 仍能保留约 74% 的活性。MOFs 材料则以其结构可设计、高孔隙率和表面功能多样等特点, 在酶的精准固定方面展现出潜力。Kosem 等^[96]将 [FeFe]-氢化酶 (HydA) 封装在沸石咪唑酯骨架 8 (zeolitic imidazolate framework-8, ZIF-8) 纳米颗粒中, 在宽范围的 pH (6~10) 和温度 (25~55°C) 条件下, 都表现出了优秀的稳定性和催化活性, ZIF-8 的多孔结构允许小分子通过, 同时保护酶免受外界环境的破坏, 最高活性损失也保持在 20% 以内。COFs 则可设计为更大孔结构来容纳氢化酶, Khalil 等^[45]通过将膜结合型 [NiFe]-氢酶 (MBH) 固定于 80 nm 大孔的 β 酮烯胺 COF 当中, 功能化修饰了两种具有不同官能团 ($-\text{SO}_3\text{H}$ 和 $-\text{COOH}$), 固定后的酶不仅表现出显著增强的氢气氧化电流, 还能达到氢气氧化 38.9 s^{-1} 的周转率, 在 14 d 后活性保留率依然优秀。

氢化酶固定化的核心在于利用多孔材料的孔道或笼状结构实现酶分子的空间限域, 通过氢键、静电、配位等相互作用将酶稳定结合于载体表面或孔道内部。这种策略不仅能够有效隔离氧气及其他气体分子, 减缓酶活性中心的氧化失活, 还可通过载

体微环境的调控实现对局部氧化还原电位的精细调节, 使酶在不利条件下仍保持活性状态^[95]。不仅如此, 固定化策略通过引入导电载体或氧化还原活性介体, 优化界面电子的传递, 在酶与电极之间构建高效电子通路, 实现直接电子传递 (direct electron transfer, DET) 或介导电子传递 (mediated electron transfer, MET)。该策略能够有效提升氢化酶产氢的稳定性, 甚至在偏酸或偏碱 pH, 高温条件下仍保持优秀活性。固定后的酶耐氧性得到大幅度提升, 且可多次离心回收再利用, 是规模生产、降低成本的前提所在^[94, 96]。然而, 固定化工艺较为复杂, 载体材料仍存在一定局限。例如: 碳材料易发生团聚, 影响酶分散性; 高分子材料普遍导电性差; MOFs 在高温或有机溶剂中结构容易坍塌; 部分 MOFs 材料与氢化酶生物相容性不佳, 可能会引起酶构象变化^[93]。

关于固定化包埋法合适载体的选择, 近年来学者们将目光投向蛋白笼、病毒样颗粒、细菌微区室、生物大分子等天然或半天然屏障, 用生物源材料作为封装载体, 为氢化酶构建一个兼具保护性与功能性的微环境。与传统固定化策略依赖人工合成载体不同, 生物封装技术的核心在于直接利用自然界存在的生物材料作为酶的保护容器。这些天然屏障本身固有的选择性渗透性可实现对氧气等毒物的梯度阻隔, 同时允许底物与产物的自由扩散, 其内部高度有序的限域空间能够提升酶的构象刚性, 有效延缓热失活与蛋白酶降解。

3 生物封装氢化酶产氢研究进展

3.1 生物封装氢化酶技术概述

近年来, 多种天然蛋白质纳米笼和自组装生物结构已被开发为理想的催化微反应器。这些结构具备高度有序的几何形态和可控的物质传递能力, 能够将酶限制在纳米尺度空间内, 实现高效催化反应。病毒衣壳、铁蛋白、细菌微区室都是常见用以包裹的蛋白基纳米容器。以细菌微区室为例, 其直径在 80~140 nm 之间的羧酶体蛋白, 能够包裹 1,5-二磷酸羧化酶和碳酸酐酶, 显著提升蓝细菌和化能自养生物中的 CO_2 固定效率^[97]。此外, 还有多种类似结构也可应用于生物催化过程, 比如玉米醇溶蛋白^[98]、油体蛋白^[99]、铁蛋白^[100]、噬菌体 P22 衣壳^[11]等。

将氢化酶包裹于生物源的封装壳当中, 不仅能够利用这些生物分子本身的渗透屏障作用, 有良好

的生物相容性，还能在细胞内原位自组装，能有效解决氢化酶应用中氧敏感性和稳定性差的问题，有效阻隔其与氧气的直接接触，并在一定程度上维持甚至提升其催化活性。生物封装氢化酶技术利用生物来源而非人工合成的材料，即由蛋白质亚基自组装形成的纳米级笼状结构或天然生物大分子，通过基因融合、静电作用等机制，将氢化酶定向、高效地包裹于其内部空腔的过程。目前研究主要集中在两类封装方式：一是利用蛋白基纳米容器（如蛋白壳、病毒样颗粒等）在体外构建重构型封装体系；二是工程化氢化酶细胞封装（细菌内部区室化封装和天然多糖外部封装），以优化其产氢性能。封装策略不仅显著增强了氢化酶的耐氧性和操作稳定性，也为其在生物制氢、生物传感器^[101-102]及生物燃料电池^[103]等众多领域的应用都提供了新路径。

本文系统梳理了生物封装技术在氢化酶保护与功能增强方面的研究进展，总结了常用蛋白壳结构与工程化氢化酶细胞催化系统的优势与局限，评估了封装对氢化酶耐氧性、稳定性及催化效率的提升效果，并对其未来优化方向与应用前景作出展望。

3.2 蛋白基纳米容器封装氢化酶

目前，研究聚焦于蛋白基纳米自组装的生物容器，蛋白基纳米容器凭借其均匀的纳米级空腔和可定制的表面特性，被成功应用于活性酶的封装领域，且有良好的包裹效果^[11, 98-100, 104-107]。细菌微区室作为典型代表，其核心功能在于将代谢反应限定于蛋白壳内，不仅能有效限制底物与产物的扩散，还能减少外部环境的干扰^[97]。研究表明，与游离氢化酶相比，封装后的氢化酶在产氢速率和环境抗性方面均具有显著提升^[11, 108-110]（表4）。

Table 4 Performance comparison of hydrogenase encapsulated in protein-based nanocapsules

表4 蛋白基纳米容器封装氢化酶性能对比

氢化酶类型	蛋白容器类型	封装体系酶活性/ (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	游离酶活性/ (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	氧暴露24 h后酶活性保留率/%	加热后酶活性保留率/%	催化稳定性	文献
[NiFe]-氢化酶	噬菌体P22衣壳	3218	12.6	封装: 10.6 游离: 0	封装: 16.7 游离: 11.1 (60°C, 45 min)	-	[11]
[FeFe]-氢化酶	α-羧酶体壳	603.33	109.32	封装: 13.3 游离: 0.97	-	-	[108]
[NiFe]-氢化酶	α-羧酶体壳	543.4	47.3	封装: 88 游离: 13	封装: 54 游离: 33 (65°C, 20 min)	-	[109]
[FeFe]-氢化酶	α-羧酶体壳(协同TBAP-α-HOFs)	3.97 mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹ (可见光)	0.79 mmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹ (仅TBAP-α)	-	-	5次循环后酶活无明显下降, 30 h连续照射后速率仍保持1 137.8 μmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹	[110]

表中除最后一行，其余的酶活性皆为在pH 8，50 mmol/L，甲基紫精/连二亚硫酸钠（MV/DT）条件下测得；α-羧酶体壳（协同HOFs）研究为生物-非生物杂合光催化体系，酶活性比较与前三者有差异。

3.2.1 噬菌体P22衣壳封装

噬菌体P22衣壳是一种高度有序的自组装蛋白质纳米结构，由420个拷贝的外壳蛋白（coat protein, CP）和可变数量的支架蛋白（scaffold protein, SP）协同组装而成，形成具有 $T=7$ 二十面体对称性的空腔结构^[111]。该衣壳外径约为60~65 nm，内部空腔直径约48~50 nm，为其作为纳米反应器提供了理想的空间条件。该系统的关键优势在于其能够通过基因工程将目标蛋白质（如氢化酶亚基）与SP的N端融合，实现在体内高效包装与定位，从而显著提高酶的环境稳定性和催化持

续性^[111-113]。

2015年，Douglas团队^[11]在该研究领域取得重大突破。他们选用大肠杆菌O₂耐受型[NiFe]-氢化酶1为模型，将其小亚基（hyaA）和大亚基（hyaB）分别与P22 SP进行融合表达，并利用时序控制表达策略，先诱导氢化酶亚基表达并完成活性位点成熟，再诱导CP表达以驱动衣壳自组装，最终实现氢化酶在衣壳内的高拷贝封装，平均每个衣壳内包装约88个异源二聚体，该系统被命名为P22-Hydropt。这种分阶段表达策略确保了氢化酶在封装前已正确折叠并具备催化活性，避免了因衣壳

内部空间限制而导致的酶折叠障碍。同时, P22 衣壳的选择性通透性允许小分子底物和产物(如电子供体、质子和氢气)自由扩散, 而较大分子如蛋白酶则被有效阻挡在外。

研究结果表明, 噬菌体 P22 衣壳的确体现出了良好的生物封装特性, 经噬菌体 P22 衣壳封装后的氢化酶在多项关键性能指标上均表现出显著提升(表4)。在催化效率方面, 封装酶在 pH 5 条件下的最高产氢速率达到 $6\,773\text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 其转换频率(turnover frequency, TOF)为 41 s^{-1} , 相当于每秒钟每个酶分子可完成41次催化转化, 这一数值比未封装的游离重组酶(产氢速率 $46\text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)提高了约147倍。在氧气耐受性方面, 封装氢化酶展现出明显的优势。在空气中暴露 24 h 后, 经还原处理仍能恢复催化功能, 产氢速率可达到 $340\text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (pH 8), 而在相同条件下, 游离酶则完全失活, 无法检测到产氢活性。热稳定性实验显示, 经 60°C 处理 45 min 后, 封装体系(P22-Hydopt)仍能维持 16.7% 的初始活性(产氢速率 $537\text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 远高于游离酶在该条件下的残留活性(产氢速率 $1.4\text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)。此外, 封装还显著增强了酶的抗蛋白酶水解能力, 经胰蛋白酶处理后, 封装样品仍保留 51% 的初始活性, 高于仅保留 14% 活性的游离酶。这些数据充分表明, 通过蛋白质纳米笼封装策略可全面增强氢化酶的生物催化性能与环境适应性。

P22 衣壳封装技术通过定向自组装构建的生物纳米催化材料, 为氢化酶提供了多方面的保护效应。一方面, 衣壳结构有效屏蔽了氧气、热和蛋白酶等外部胁迫因素, 酶稳定性大幅提升, 另一方面, 每个 P22 衣壳内平均封装 88 个氢化酶异二聚体, 其内部空间限制作用稳定了 hyaA 和 hyaB 亚基形成的异源二聚体, 优化了酶的空间构象, 这种生物封装的方法全部在大肠杆菌内完成表达、组装、成熟, 无需体外重构, 且在纯化过程中能够有效避免亚基丢失, 利用衣壳的大尺寸和均一性即可富集。

然而, 也可看出现阶段大肠杆菌内源成熟系统的效率有限, P22-Hydopt 的产氢系统中 Ni、Fe 活性位点附着不足 50%, 最大的理想产氢量可能还会翻倍。且 P22 壳本身无选择性通透性, 氧气仍可自由扩散进入衣壳内部, 酶氧失活的可逆性也有所局限, 虽然优于游离酶, 但仍有 90% 的失活情况。基于前人研究, 可进一步筛选更耐氧的 HyaB 突变

体进行产氢。除了病毒样蛋白壳, 另一些研究蛋白容器封装酶体系选择采用羧酶体壳进行封装, 其自身有选择性通透的优势能更有效地保护酶不受氧气毒害。

3.2.2 羧酶体封装

羧酶体是一类具有二十面体对称性的蛋白质微区室, 由六聚体和五聚体蛋白质单元通过精密自组装形成, 直径通常为 100~200 nm。其结构主要包括 α 型和 β 型两种亚类, 广泛存在于蓝藻和化能自养细菌中, 在 CO_2 固定过程中发挥核心作用。

相较于 P22 病毒样衣壳, 羧酶体的外壳具有选择性通透性, 允许小分子底物(如 HCO_3^-)通过蛋白质单元的中央孔道进入, 而有效阻隔氧气等干扰因子^[114]。这种特性不仅可以防止内部二氧化碳泄露, 还能显著抑制氧气扩散, 为封装其中的酶创造稳定的微环境。研究表明, 羧酶体天然封装核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶(Rubisco)和碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA), 通过碳浓缩机制将二氧化碳局部浓度提升至核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶活性所需阈值的百倍以上, 从而极大优化固碳效率。这种微区室化结构为氢化酶的封装提供了理想平台, 其物理屏障可有效缓解氢化酶的氧敏感性问题的。

在 2020 年, Li 等^[108]首次在非宿主大肠杆菌中重构了直径约 100 nm α 羧酶体空壳, 并利用 CsoS2 蛋白 C 端鉴定出的封装肽(encapsulation peptide, EP), 将来源于绿藻的 [FeFe]-氢化酶(HydA)、其天然电子传递伴侣铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)以及大肠杆菌源的铁氧还蛋白 NADP⁺还原酶(ferredoxin-NADP⁺ reductase, FNR), 共同封装于壳内, 构建出催化产氢的纳米反应器, 被称为 Shell-HydA (图 7a)。这一过程同样采用时序表达策略, 首先诱导氢化酶亚基及其成熟酶(HydE、HydF、HydG)表达, 确保活性中心正确组装, 随后诱导壳蛋白表达以实现高效封装。

Li 等^[108]构建的 Shell-HydA 系统显著提升了其催化效率与环境耐受性。体内实验的厌氧条件下, 封装氢化酶的产氢速率达到 $4\,464.69\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 较游离酶提升约 20%, 而在有氧条件下, 其产氢速率仍能维持 $882.95\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 为游离酶的 4.1 倍。这一显著差异显示出壳结构在阻隔氧气方面的优势。体外催化性能测试进一步证实了封装策略的有效性, Shell-HydA 的最大产氢速率为

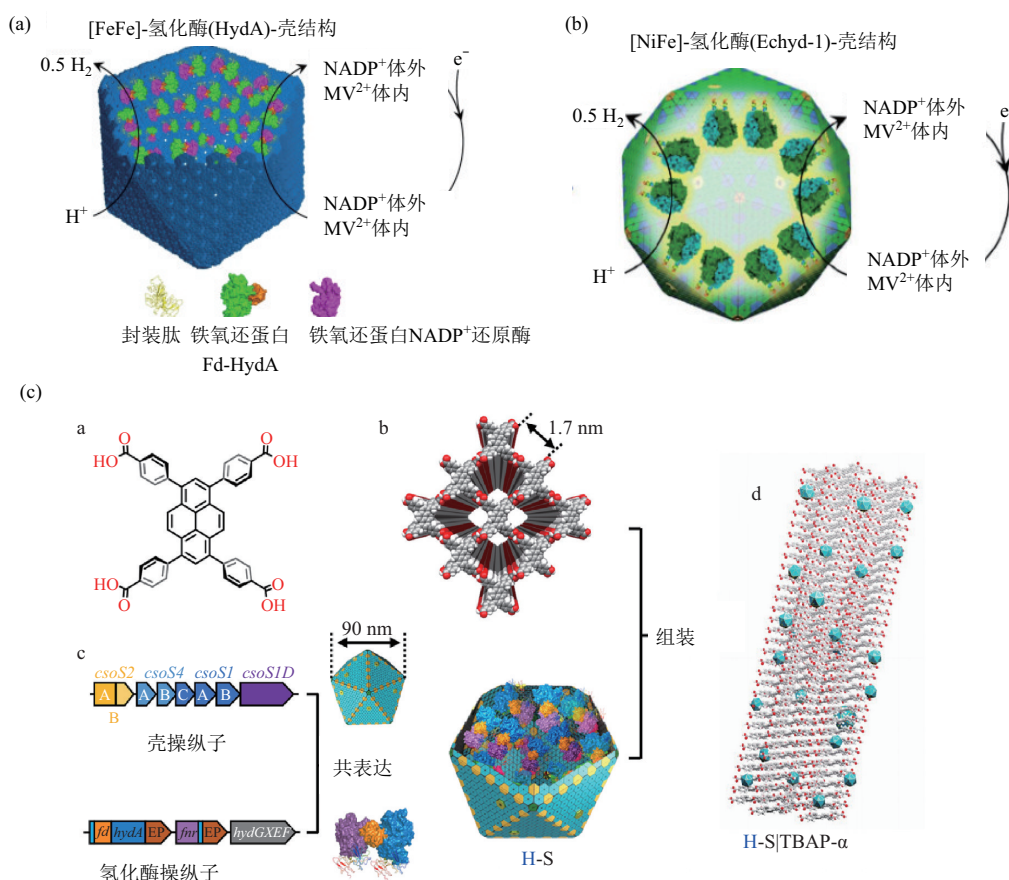


Fig. 7 Structure diagram of carboxylase encapsulating hydrogenase

图7 羧酶体封装氢化酶结构图

(a) [FeFe]-氢化酶(HydA)-壳纳米反应器封装铁氧还蛋白Fd-HydA和大肠杆菌源的铁氧还蛋白NADP⁺还原酶(FNR)的示意图(修改自文献[108]);(b)基于 α -羧酸体壳的[NiFe]-氢化酶封装催化剂的结构图(修改自文献[109]);(c)有机半导体、含氢化酶的羧酶体外壳以及化学-生物杂化纳米反应器H-S|TBAP- α 的生成(修改自文献[110])。

603.33 nmol·mg⁻¹·min⁻¹, 较游离酶提升约5.5倍。更重要的是, 在空气中暴露24 h后, Shell-HydA仍能保留13.33%的活性, 而游离酶几乎完全失活(表4)。这种保护效应归因于羧酶体外壳形成的物理屏障, 其通过限制氧气分子扩散为氢化酶提供了稳定的厌氧微环境。

Jiang等^[109]后续研究将大肠杆菌来源的[NiFe]-氢化酶(Echyd-1)封装于 α 羧酶体壳中, 进一步拓展了该技术的应用范围。该研究同样利用CsoS2蛋白C端的EP将hyaA和hyaB亚基C端融合, 并通过时序诱导策略实现高效封装(图7b)。

实验结果表明, 封装后的纳米反应器(HyaAB-Shell)在多项性能指标上均实现显著提升。首先在产氢效率方面, 其在厌氧条件下产氢速率高达41 777.5 nmol·L⁻¹·h⁻¹, 比游离酶提高23倍;

有氧条件下的产氢速率为8 937.4 nmol·L⁻¹·h⁻¹, 提升幅度达33倍。其次在催化活性方面, HyaAB-Shell的最大产氢速率为543.4 nmol·mg⁻¹·min⁻¹, 为游离酶的12倍。最后稳定性也得到极大提高, 在空气中暴露24 h后, 封装酶仍保留88%的活性, 经65°C热处理20 min, 封装酶活性维持54%, 远高于游离酶。

同样的, 纳米尺寸的微环境提供了酶在内部的浓缩与富集, CsoS2的C端作为EP, 通过蛋白质-蛋白质相互作用将目标酶自组装于壳内。但羧酶体封装策略相较于前文提到的P22壳具有选择通透性的优势, 在实验结果中也明显体现出来, 氧暴露后活性保留率高达80%以上。但其尺寸相对不均一(80~110 nm), 且组装机制复杂, 异源表达时可能出现空壳或组装不全。

基于此, 2024 年 Yang 等^[110] 又进一步优化羧基体封装系统, 协同氢键有机框架 (hydrogen bonded organic frameworks, HOFs) 实现了高效可持续的光催化产氢。他们同样重组 α 羧化体壳, 内部封装了 [FeFe]-氢化酶、Fd 和 FNR, 形成氢化酶封装纳米反应器 (图 7c)。通过氢键自组装与 HOFs 1,3,6,8-四 (4'-羧基苯基) 芘 (1,3,6,8-tetra (4'-carboxyphenyl) pyrene, TBAP) - α 结合在一起, 这种引入了光能效应的催化系统, 展现出了可以媲美贵金属铂催化剂的优越性能。在模拟太阳光下, 产氢速率 $3.97\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 较未封装单独的 TBAP- α 系统高出近 5 倍。在实验进行 30 h 后, 产氢速率仍能保持在 $1\ 137.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 且在总计 25 h 的循环稳定性实验当中, 产氢速率没有观察到明显下降。该工作的创新性在于将生物封装技术与人工光捕获材料结合, 模拟了自然光合作用的部分特征。半导体材料负责光能捕获与电子激发, 而封装氢化酶则利用质子还原产氢。二者协同实现了高效可持续的能量转化。该研究利用羧基体提供的限氧微环境增强了氢化酶的耐氧性, 其在能量转换效率和稳定性方面的优势为生物-非生物光能杂合系统的设计提供了新范式。

综上所述, 目前对于利用天然蛋白基纳米容器进行氢化酶封装的技术已经展现出多重优势。蛋白壳不仅阻隔氧气, 还通过空间限制效应稳定酶构

象, 未来可在 P22 衣壳蛋白上引入带电残基, 模拟羧酶体的选择性通透。且继续探索与其他无机材料的杂合, 构建光驱动-生物催化体系, 开发更高效的杂合系统。

3.3 工程化氢化酶细胞封装

氢化酶全细胞的工程化的改造封装, 目前包括氢化酶细胞内部区室化封装和外部天然多糖封装两种策略。相比于纳米蛋白容器, 该策略在工艺上更为简单, 且省去了纯化流程。

3.3.1 氢化酶细胞内部区室化封装

除了利用蛋白质壳体区室外, 自然界还提供了另一种精妙的封装范式——基于液-液相分离形成的无膜细胞器。在 2024 年一项研究中, Yu 等^[115] 在大肠杆菌中表达了 [FeFe]-氢化酶和一种可以液-液相分离的氢化酶-蜘蛛丝蛋白融合蛋白 (HydA-MaSpI8 fusion protein, HM), 构成一种无膜亚细胞区室, 并在区室原位合成 $\text{CdSe}_x\text{S}_{1-x}$ 量子点, 通过遗传工程与生物矿化技术实现光敏剂与酶的共定位 (图 8)。在体内产氢过程中, 将有毒的 Cd^{2+} 限制在特定的蛋白质凝聚体内, 隔离了其对细胞其他关键代谢过程的损害, 从而提高了工程菌对重金属离子的耐受性。这种生物原位矿化策略, 相对于量子点与 HM 的物理混合, 产氢量提升了 16.4 倍, 明显体现出该方式与光能量子点结合的优越性, 且区室化反应限制于局部, 保护了细胞整体。

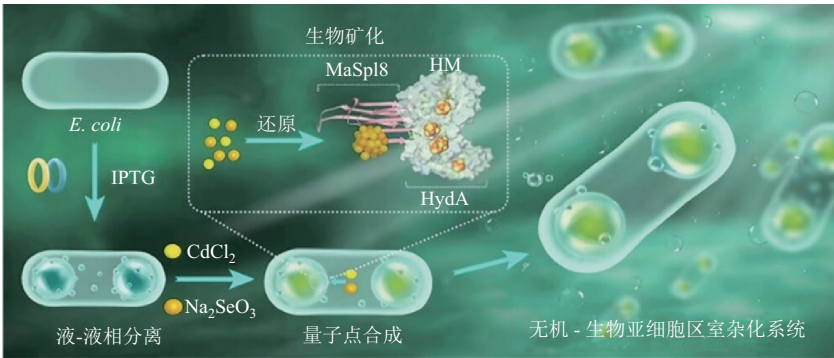


Fig. 8 Hydrogenase cellular compartmentalization encapsulation (modified from reference [115])

图8 氢化酶细胞内部区室化封装示意图 (修改自文献[115])

构建大肠杆菌中无机-生物亚细胞区室混合系统的示意图, 大肠杆菌中表达液-液相分离的HM蛋白, 构成一种无膜亚细胞区室, 并在区室原位合成 $\text{CdSe}_x\text{S}_{1-x}$ 量子点。

HM 蛋白作为具有内在无序区的相分离蛋白, 可在特定信号触发下快速组装成液态凝聚体, 也可在条件改变时迅速解离。这种动态特性使得氢化酶的封装状态可随细胞代谢需求或环境变化而按需调

节。且相分离微区内酶体富集, 提升氢化酶与底物、电子供体的碰撞频率。这种依赖于细胞内源性组分, 无需引入异源材料的封装方式, 在保持细胞生理稳态方面具有天然优势。

但该区室本质为无膜细胞器，使得高浓度蛋白质聚集，不像蛋白质壳体有清晰明确的边界，氧气分子仍可通过扩散进入相分离区内部，对于高度氧敏感的[FeFe]-氢化酶，相分离封装的保护作用可能不足以应对长期有氧环境。并且，由于是细胞内部的自反应，依赖于活的细胞体系，其理化参数难以时时量化，使得规模化生产与体外应用受限。

3.3.2 天然多糖外部封装氢化酶细胞

天然多糖可从外部对氢化酶进行封装，并因其生物相容性高、可功能化基团丰富及来源广泛等特点，在构建细胞封装系统中展现出独特优势。通过

形成保护性微环境，多糖基质能够有效隔离外界不利因素（如氧气、蛋白酶），同时提供有利于电子传递和底物扩散的局部条件，从而显著提升产氢细胞的活性与稳定性（表5）。Jian等^[116]将[FeFe]-氢化酶模拟物封装于壳聚糖基质中可显著提升光催化产氢性能，壳聚糖与模拟物之间强烈的分子相互作用，形成了类酶天然蛋白质微环境，周转数（turnover number, TON）提升达4 000多倍，有效促进电子传递并增强催化稳定性。虽然是模拟酶封装，但这种天然多糖的封装形式对氢化酶产氢系统的优化有了很大的启发。

Table 5 Comparison of hydrogen-producing cells encapsulated by natural polysaccharides
表5 天然多糖封装产氢细胞性能对比

氢化酶类型	封装材料（天然多糖）	细胞类型	累计产氢量	反应条件	文献
[FeFe]-氢化酶模拟物	壳聚糖	-	52 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$	无氧 反应时间：60 h	[116]
[FeFe]-氢化酶	海藻酸钙薄膜	绿藻	312 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	无氧 反应时间：160 h	[117]
[FeFe]-氢化酶	海藻酸钙凝胶珠	绿藻	152.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	有氧 反应时间：共43 d（6个循环）	[118]
[NiFe]-氢化酶	海藻酸钠水凝胶珠	大肠杆菌	2 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$	有氧 反应时间：48 h	[119]
[NiFe]-氢化酶	海藻酸钠水凝胶	产气肠杆菌	3 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$	无氧 反应时间：48 h	[120]
[NiFe]-氢化酶/ [FeFe]-氢化酶	海藻酸钙水凝胶	蓝藻/绿藻	蓝藻：46.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ 绿藻：1 226.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$	无氧 反应时间：5 d	[121]
[NiFe]-氢化酶/固氮酶	海藻酸钙水凝胶	大肠杆菌/ 沼泽红假单胞菌	4 270 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$	有氧 反应时间：12 d 菌浓度比=1:1	[122]

因反应条件有差异，故表格中仅展示封装体系后的产氢性能，不再单独列出游离酶活。

此后，Kosourov等^[117]利用海藻酸钙薄膜包埋莱茵衣藻，使其在光照条件下产氢速率达到12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ （以叶绿素质量计），证明海藻酸钙可有效维持细胞内氢化酶活性并提供物理庇护。Maswanna等^[118]进一步利用海藻酸钠包裹绿藻CU2551，在疏剥夺培养基中经过6个循环后，有氧条件下最佳产氢速率为182 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ （以细胞干重计），凸显了封装策略对环境波动的适应能力。

Incharoensakdi团队^[119]开发了一种基于海藻酸钠封装的大肠杆菌——二氧化钛（TiO₂）纳米生物混合系统，旨在实现有氧条件下实现光催化生物产氢。该系统通过将具有产氢能力的大肠杆菌与光催化剂TiO₂结合，并利用海藻酸钠水凝胶珠进行封

装，以保护对氧气敏感的氢化酶，从而提高氢气产量。在最优条件下，系统产氢量为2.8 $\text{mmol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ （以葡萄糖物质的量计）。海藻酸钠水凝胶珠的封装不仅提供了物理屏障，其多孔结构还允许底物和产物的选择性扩散，同时阻隔氧分子的渗透，为氢化酶创造了稳定的厌氧微环境。

一年后，该团队进一步优化策略，不再直接添加半导体材料，而是利用产气肠杆菌在含有镉离子（Cd²⁺）和半胱氨酸的培养基中生长^[120]。细菌通过代谢产生硫化物（S²⁻），Cd²⁺和S²⁻直接在菌体表面反应并沉淀，在细胞外自然生成硫化镉（CdS）纳米颗粒。通过引入四氧化三铁（Fe₃O₄）纳米颗粒并与海藻酸钠共同封装，构建了新型杂合系统。该设计即使处于有氧环境，仍保持2.7 $\text{mmol}\cdot\text{mmol}^{-1}$

(以葡萄糖物质的量计)的产氢量,相当于未封装系统的13.5倍。这一结果凸显了封装技术对维持微环境及提升系统稳健性的核心作用。封装珠可重复使用至少96 h,两种系统皆能在自然日光下有效产氢,显示出良好的可再生性与实际应用前景。

Wang等^[121]对比了3种固定化策略对蓝藻和绿藻产氢性能的影响,发现凝胶固定化可构建内部厌氧区,使集胞藻属蓝藻和莱茵衣藻的产氢量分别提高1.89倍和2.02倍,从另一角度验证了生物化封装在维持还原性催化环境方面的通用性与优越性。

Tao等^[122]研究并设计了一种利用海藻酸钙凝胶逐层包裹,用于高效产氢的“核壳结构生物凝胶微反应器”,核中矿化CdS纳米颗粒,负责高效转化乙酸盐和乙醇为氢气,壳层修饰Fe₃O₄纳米颗粒负责利用葡萄糖等底物产氢,并提供磁回收功能。该反应体系在宽pH值(6.5~8.5)和温度范围(≤45℃)内保持高效产氢,最优可达4.27 mol·mol⁻¹(以葡萄糖物质的量计),在补料前可高效产氢约6 d,补料后能再维持4 d的高效转化。

以上研究表明,在菌体外部进一步包裹天然多糖材料(如海藻酸钙、壳聚糖),通过物理交联形成致密网络,显著限制氧气向内部的扩散,都能够给对氧气敏感的氢化酶提供适宜且生物相容性高的催化环境。这类策略不仅有效增强了电子传递效率,与纳米材料(CdS、TiO₂、Fe₃O₄)复合,增强光吸收和电子传递,同时多糖的官能团可能促进底物富集。更重要的是,与使用纯化氢化酶的系统相比,天然多糖封装体系能直接封装活细胞,利用细胞自身代谢产氢,无需纯化氢化酶,封装过程简单,可在较宽pH值、温度范围内保持结构稳定,易于规模化。且封装材料可制成珠、膜、纤维等形态,便于反应器填充、回收和重复使用。

然而细胞密度过高时,单位叶绿素产氢速率会下降^[117]。因此,凝胶层过厚或细胞密度过高也会限制底物和产物氢气的扩散,影响整体产氢速率。

4 总结与展望

生物封装技术通过物理限域与化学微环境构建的协同作用,为提升氢化酶催化性能提供了创新性途径。生物封装不再局限于通过酶工程对酶本身的改造,而是进一步利用壳体提供物理保护,并能同时封装多个酶,实现级联反应。相比于单一光驱动模式,生物封装后的完整氢化酶细胞可实现辅因子再生,利用天然孔隙实现底物交换,避免外加介

体。对比于人工合成固定化载体,生物封装的材料都来源于生物本身,有更加良好的生物相容性,且能实现自组装。

现阶段,生物封装根本机制在于构建生物微环境限制氢化酶,以此提升局部酶浓度,提升电子传递速率,同时隔绝外界环境,有效限制氧气接触,从而显著延缓氧化失活过程。蛋白基容器封装氢化酶技术可实现分子水平的自组装调控与壳体固有的选择性渗透,但基于纯酶的体外产氢成熟表达复杂度高、纯化成本昂贵,相比之下天然多糖封装技术已从单藻包埋发展到多菌协同、纳米材料复合、多层核壳结构等高级形式。其核心优势在于操作简便、成本低廉、可规模化,但也存在活性单位偏低、传质与光分布问题有待优化。无论是蛋白基容器封装氢化酶还是工程化氢化酶细胞封装方式,都从多维度提升了氢化酶催化产氢性能,产氢效率可达200多倍的提升,而最显著的优势体现在大幅提升氢化酶的耐氧性,氧暴露后能保留80%的酶活。有了生物源的封装,在保持良好生物相容性下,酶的稳定性和可重复利用性也能显著增强。这无疑对于规模化氢化酶产氢技术提供了有效途径。可以看出,生物封装既是一种保护手段,又是功能增强策略。

然而,生物封装产氢技术的产氢量仍无法媲美化石燃料产氢的规模,大多仍在实验室阶段。从经济性与规模性角度而言,氢化酶的纯化与标准化生产难度较大,在纯化时关键部位亚基易解离与丢失,厌氧环境的把控严重制约其大规模应用。相比之下,全细胞天然多糖封装采用海藻酸钙、壳聚糖等工业化量产的低成本材料,通过简单的离子交联即可制备,无需复杂设备与专业技能,珠粒或薄膜形式可直接填充于流化床或固定床反应器,在原料成本、设备投入、人力门槛、下游处理等各维度均展现出显著的经济性优势。将蛋白壳封装后的氢化酶二次包埋于天然多糖,或许是平衡性能与实用的有效方法。

基于现有研究成果与瓶颈问题,未来该领域的发展应聚焦于以下3个关键方向。

首先,在当前生物封装产氢技术的研究基础上,应进一步发展高效智能的人工智能与计算机辅助设计工具,实现对封装载体与氢化酶的理性设计与精准调控。具体而言,可开发具有自适应能力的智能蛋白笼或合成高分子载体,实现氢化酶的高密度、定向封装,在提高酶稳定性的同时最大限度保

留其催化活性。2025年Liu等^[123]提出的从数字细胞到数字微生物群落的研究范式,展示了人工智能在多尺度建模与微生物相互作用预测中的潜力。实验中利用模型预测产氢关键参数,包括累计产氢量、pH值、产率、氧化还原电位等,为工艺优化提供了低成本预测工具^[124]。发展更智能的人工智能,在大数据中实现了对氢化酶更精准地从约10万候选序列中筛选出能特异性阻断氧气扩散通道的蛋白质结合体^[125-126]。可见,机器学习与人工智能能够在系统建模、工艺预测、酶性能优化等多个层面发挥核心作用,大幅降低实验试错成本。未来研究中,应建立“人工智能辅助理性设计-实验验证-反馈优化”的闭环研发范式,加速高性能封装产氢系统从实验室走向规模化应用。

其次,寻求更优的电子传递方式,加强封装材料的长期稳定性与系统耐久性研究。生物封装氢化酶产氢技术在提供物理屏障以保护酶免受氧气失活的同时,不可避免地增加了底物与电子供体的传质阻力,这种“保护”与“传质”之间的矛盾在电子传递环节尤为突出——封装载体若孔径过小或表面电荷不当,将严重阻碍电子供体的扩散,甚至阻断光敏剂与酶之间的电子传递通道。为解决这一瓶颈,未来可从载体结构与电子传递路径两个层面协同优化。通过理性设计具有最优孔径和表面化学性质的封装材料,在保证氧气阻隔的前提下最大化底物与电子供体的扩散速率;可引入稳定性高、与封装材料兼容的人工电子中介体,在载体内部建立“电子高速公路”,绕过缓慢的扩散过程,实现电子从外部供体或光敏剂到氢化酶的高效定向传输。半导体材料与氢化酶封装体系的结合可大幅提升光生电子传递效率与产氢速率^[90],在此基础上还可借鉴Hao等^[127]的研究,协同利用磁热效应,不仅提升催化剂表面温度,还能借助洛伦兹力促进光生载流子的分离与迁移,减少电子-空穴复合。这种光热、磁热协同的策略为氢化酶封装提供了新的优化维度。此外,天然或人工电子媒介体的引入^[128]、细菌表面诱导形成的矿化层^[129]、纳米颗粒与酶的复合体系^[130-132]等路径,均有望构建更加畅通的电子传递路径,实现光能与化学能的高效转换。

最后,未来可探索人工设计合成与天然材料复合的策略,例如功能性水凝胶^[133]与MOF核壳结构的结合^[134]、自修复微胶囊与半导体的复合^[135],在维持传质能力的同时增强材料的抗疲劳、抗光照老化性能。将电子传递优化与材料稳定性增强结

合,推动生物封装氢化酶产氢技术逐步走向规模化应用。

参 考 文 献

- [1] 潘健民,魏运洋,李永峰,等.氢能的重要性和制氢方法浅析.环境保护,2008,36(18):59-61
Pan J M, Wei Y Y, Li Y F, *et al.* Environ Prot, 2008, 36(18): 59-61
- [2] 王明华,毛亚林.我国氢能应用场景多元化战略研究.中国煤炭,2025,51(7):104-112
Wang M H, Mao Y L. China Coal, 2025, 51(7): 104-112
- [3] 张宁远.可移动型光发酵生物制氢反应器研究[D].郑州:河南农业大学,2023
Zhang N Y. Research on Mobile PhotoFermentation Biological Hydrogen Production Reactor[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2023
- [4] 沈元兴,李欢,苏建彬.微波热解生物质制氢研究.呼伦贝尔学院学报,2025,33(4):129-138
Shen Y X, Li H, Su J B. J Hulunbuir Univ, 2025, 33(4): 129-138
- [5] Constant P, Hallenbeck P C. Hydrogenase//Hallenbeck P C. Biohydrogen. Amsterdam: Elsevier, 2013: 75-102
- [6] Kim D H, Kim M S. Hydrogenases for biological hydrogen production. Bioresour Technol, 2011, 102(18): 8423-8431
- [7] Marić A K, Radan A, Milčić N, *et al.* Hydrogenases-types, sources, properties, and the potential for their application. Chemistry in Industry: Journal of Chemists and Chemical Engineers of Croatia, 2025, 74(1-2): 33-42
- [8] Constant P, Hallenbeck P C. Hydrogenase//Pandey A. Biohydrogen. Amsterdam: Elsevier, 2019: 49-78
- [9] Lubitz W, Ogata H, Rüdiger O, *et al.* Hydrogenases. Chem Rev, 2014, 114(8): 4081-4148
- [10] Edwardson T G W, Levasseur M D, Tetter S, *et al.* Protein cages: from fundamentals to advanced applications. Chem Rev, 2022, 122(9): 9145-9197
- [11] Jordan P C, Patterson D P, Saboda K N, *et al.* Self-assembling biomolecular catalysts for hydrogen production. Nat Chem, 2016, 8(2): 179-185
- [12] 陈鸿伟,付昱飞,宋杨凡,等.生物制氢原理及研究进展.动力工程学报,2024,44(6):872-885
Chen H W, Fu Y F, Song Y F, *et al.* J Chin Soc Power Eng, 2024, 44(6): 872-885
- [13] Dixon R O. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Arch Mikrobiol, 1972, 85(3): 193-201
- [14] Bothe H, Schmitz O, Yates M G, *et al.* Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2010, 74(4): 529-551
- [15] Li Y, Jiang Q, Yang X, *et al.* Enhanced photo-fermentative hydrogen production by constructing Rhodobacter capsulatus-ZnO/ZnS hybrid system. Bioresour Technol, 2024, 414: 131632
- [16] 任南琪,郭婉茜,刘冰峰.生物制氢技术的发展及应用前景.哈尔滨工业大学学报,2010,42(6):855-863
Ren N Q, Guo W Q/X, Liu B F. J Harbin Inst Technol, 2010, 42(6): 855-863

- [17] Soares J F, Mayer F D, Mazutti M A. Hydrogen production from Brewer's spent grain hydrolysate by dark fermentation. *Int J Hydrog Energy*, 2024, **52**: 352-363
- [18] Elerakey N, Rasmeay A M, Aboseidah A A, *et al.* Mathematical modeling of biohydrogen production *via* dark fermentation of fruit peel wastes by *Clostridium butyricum* NE95. *BMC Biotechnol*, 2024, **24**(1): 105
- [19] Wang H, Zhang X, Cheng Y, *et al.* Enhanced hydrogen production through two-stage fermentation coupling clostridium pasteurianum and rhodobacter sphaeroides. *bioRxiv*, 2025. DOI: 10.64898/2025.12.14.694164
- [20] Vignais P M, Billoud B, Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **25**(4): 455-501
- [21] Stephenson M, Stickland L H. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J*, 1931, **25**(1): 205-214
- [22] Vignais P M, Colbeau A. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol*, 2004, **6**(2): 159-188
- [23] Singh N K, Singh R. A sequential approach to uncapping of theoretical hydrogen production in a sulfate-reducing bacteria-based bio-electrochemical system. *Int J Hydrog Energy*, 2021, **46**(39): 20397-20412
- [24] Garcin E, Vernede X, Hatchikian E C, *et al.* The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 1999, **7**(5): 557-566
- [25] Fontecilla-Camps J C, Volbeda A, Cavazza C, *et al.* Structure/function relationships of [NiFe] - and [FeFe]-hydrogenases. *Chem Rev*, 2007, **107**(10): 4273-4303
- [26] Volbeda A, Charon M H, Piras C, *et al.* Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 1995, **373**(6515): 580-587
- [27] Huang G. Studies on Catalytic Mechanism of [Fe]-hydrogenase From Methanogenic Archaea Based on Crystal Structures[D]. Marburg: University of Marburg, 2019
- [28] Dubini A, Pye R L, Jack R L, *et al.* How bacteria get energy from hydrogen: a genetic analysis of periplasmic hydrogen oxidation in *Escherichia coli*. *Int J Hydrog Energy*, 2002, **27**(11/12): 1413-1420
- [29] Pandelia M E, Lubitz W, Nitschke W. Evolution and diversification of Group 1 [NiFe] hydrogenases. Is there a phylogenetic marker for O(2)-tolerance?. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1817**(9): 1565-1575
- [30] Gross R, Simon J, Theis F, *et al.* Two membrane anchors of Wolinella succinogenes hydrogenase and their function in fumarate and polysulfide respiration. *Arch Microbiol*, 1998, **170**(1): 50-58
- [31] Kröger A, Biel S, Simon J, *et al.* Fumarate respiration of Wolinella succinogenes: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1553**(1/2): 23-38
- [32] Kleihues L, Lenz O, Bernhard M, *et al.* The H(2) sensor of Ralstonia eutropha is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol*, 2000, **182**(10): 2716-2724
- [33] Thauer R K, Kaster A K, Goenrich M, *et al.* Hydrogenases from methanogenic Archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu Rev Biochem*, 2010, **79**: 507-536
- [34] Ma K, Schicho R N, Kelly R M, *et al.* Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(11): 5341-5344
- [35] Ma K, Hao Z, Adams M W W. Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: a key role for NADPH. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **122**(3): 245-250
- [36] Stojanowic A, Mander G J, Duin E C, *et al.* Physiological role of the F420-non-reducing hydrogenase (Mvh) from Methanothermobacter marburgensis. *Arch Microbiol*, 2003, **180**(3): 194-203
- [37] Horch M, Lauterbach L, Saggü M, *et al.* Probing the active site of an O₂⁻ tolerant NAD⁺-reducing [NiFe] -hydrogenase from Ralstonia eutropha H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**(43): 8026-8029
- [38] van der Linden E, Burgdorf T, Bernhard M, *et al.* The soluble [NiFe] -hydrogenase from Ralstonia eutropha contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J Biol Inorg Chem*, 2004, **9**(5): 616-626
- [39] Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood T K. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microb Biotechnol*, 2008, **1**(1): 30-39
- [40] Bonam D, Lehman L, Roberts G P, *et al.* Regulation of carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: effects of CO and oxygen on synthesis and activity. *J Bacteriol*, 1989, **171**(6): 3102-3107
- [41] Welte C, Krätzer C, Deppenmeier U. Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of Methanosarcina Mazei. *FEBS J*, 2010, **277**(16): 3396-3403
- [42] Tersteegen A, Hedderich R. Methanobacterium thermoautotrophicum encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins. *Eur J Biochem*, 1999, **264**(3): 930-943
- [43] Constant P, Chowdhury S P, Hesse L, *et al.* Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe] -hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H(2) -oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**(17): 6027-6035
- [44] Mai J, Hu B B, Zhu M J. Metabolic division of labor between Acetivibrio thermocellus DSM 1313 and Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum MJ1 enhanced hydrogen production from lignocellulose. *Bioresour Technol*, 2023, **390**: 129871
- [45] Khalil I E, Waffo A F T, Das P, *et al.* Enhancing and stabilizing hydrogen catalysis through [NiFe]-hydrogenase immobilization within macroporous covalent organic frameworks. *Adv Funct Mater*, 2026, **36**(16): e20237

- [46] Kim H, Kim K N, Lee S H, *et al.* Hydrogen evolution via oxygen tolerant [NiFe] -hydrogenase immobilized on TiO₂Nanotubes. *Nano Sel*, 2026, **7**: e70069
- [47] Sommer C, Adamska-Venkatesh A, Pawlak K, *et al.* Proton coupled electronic rearrangement within the H-cluster as an essential step in the catalytic cycle of [FeFe] hydrogenases. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(4): 1440-1443
- [48] Cohen J, Kim K, King P, *et al.* Finding gas diffusion pathways in proteins: application to O₂ and H₂ transport in Cpl [FeFe] -hydrogenase and the role of packing defects. *Structure*, 2005, **13**(9): 1321-1329
- [49] Madden C, Vaughn M D, Díez-Pérez I, *et al.* Catalytic turnover of [FeFe] -hydrogenase based on single-molecule imaging. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(3): 1577-1582
- [50] Adams M W W. The metabolism of hydrogen by extremely thermophilic, sulfur-dependent bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **75**(2/3): 219-237
- [51] Sybirna K, Antoine T, Lindberg P, *et al.* Shewanella oneidensis: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Biotechnol*, 2008, **8**: 73
- [52] King S J, Jerkovic A, Brown L J, *et al.* Synthetic biology for improved hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microb Biotechnol*, 2022, **15**(7): 1946-1965
- [53] Kwan P, McIntosh C L, Jennings D P, *et al.* The [NiFe] -hydrogenase of pyrococcus furiosus exhibits a new type of oxygen tolerance. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(42): 13556-13565
- [54] Demuez M, Cournac L, Guerrini O, *et al.* Complete activity profile of Clostridium acetobutylicum [FeFe] -hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **275**(1): 113-121
- [55] King P W, Posewitz M C, Ghirardi M L, *et al.* Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an Escherichia coli biosynthetic system. *J Bacteriol*, 2006, **188**(6): 2163-2172
- [56] Kamp C, Silakov A, Winkler M, *et al.* Isolation and first EPR characterization of the [FeFe] -hydrogenases from green algae. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1777**(5): 410-416
- [57] Kuchenreuther J M, Grady-Smith C S, Bingham A S, *et al.* High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2010, **5**(11): e15491
- [58] Peters J W, Lanzilotta W N, Lemon B J, *et al.* X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (cpl) from clostridium pasteurianum to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 1998, **282**(5395): 1853-1858
- [59] Soboh B, Linder D, Hedderich R. A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium Thermoanaerobacter tengcongensis. *Microbiology (Reading)*, 2004, **150**(Pt 7): 2451-2463
- [60] Kelly C L, Pinske C, Murphy B J, *et al.* Integration of an [FeFe]-hydrogenase into the anaerobic metabolism of Escherichia coli. *Biotechnol Rep*, 2015, **8**: 94-104
- [61] Kim J Y, Jo B H, Cha H J. Production of biohydrogen by heterologous expression of oxygen-tolerant *Hydrogenovibrio marinus* [NiFe] -hydrogenase in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2011, **155**(3): 312-319
- [62] Eguchi S, Yoon K S, Ogo S. O₂⁻ stable membrane-bound [NiFe] hydrogenase from a newly isolated Citrobacter sp. S-77. *J Biosci Bioeng*, 2012, **114**(5): 479-484
- [63] Maier J A, Ragozin S, Jeltsch A. Identification, cloning and heterologous expression of active [NiFe] -hydrogenase 2 from *Citrobacter* sp. SG in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2015, **199**: 1-8
- [64] Bührke T, Brecht M, Lubitz W, *et al.* The H(2) sensor of Ralstonia eutropha: biochemical and spectroscopic analysis of mutant proteins modified at a conserved glutamine residue close to the [NiFe] active site. *J Biol Inorg Chem*, 2002, **7**(7/8): 897-908
- [65] Fan Q, Waldburger S, Neubauer P, *et al.* Implementation of a high cell density fed-batch for heterologous production of active [NiFe] -hydrogenase in *Escherichia coli* bioreactor cultivations. *Microb Cell Fact*, 2022, **21**(1): 193
- [66] Siebert D L. Development of a universal platform for the heterologous expression of bidirectional [Ni-Fe]-hydrogenases in *E. coli*. *ACS Synth Biol*, 2025, **14**(7): 2710-2717
- [67] Fan Q, Neubauer P, Lenz O, *et al.* Heterologous hydrogenase overproduction systems for biotechnology-an overview. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(16): 5890
- [68] Fritsch J, Scheerer P, Frielingsdorf S, *et al.* The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, 2011, **479**(7372): 249-252
- [69] Ji H, Wan L, Gao Y, *et al.* Hydrogenase as the basis for green hydrogen production and utilization. *J Energy Chem*, 2023, **85**: 348-362
- [70] Evans R M, Krahn N, Weiss J, *et al.* Replacing a cysteine ligand by selenocysteine in a [NiFe] -hydrogenase unlocks hydrogen production activity and addresses the role of concerted proton-coupled electron transfer in electrocatalytic reversibility. *J Am Chem Soc*, 2024, **146**(25): 16971-16976
- [71] Kim E J, Kim J E, Zhang Y P J. Ultra-rapid rates of water splitting for biohydrogen gas production through *in vitro* artificial enzymatic pathways. *Energy Environ Sci*, 2018, **11**(8): 2064-2072
- [72] Li W, Zhao Y, Wan L, *et al.* Tuning electron transfer pathway in [NiFe] -hydrogenase via silver nanocluster-directed electron injection. *ACS Catal*, 2026, **16**(3): 2097-2104
- [73] Mendes S S, Miranda V, Saraiva L M. Hydrogen sulfide and carbon monoxide tolerance in bacteria. *Antioxidants*, 2021, **10**(5): 729
- [74] Xiao Y, Zhang X, Zhu M, *et al.* Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15. *Bioresour Technol*, 2013, **137**: 9-17
- [75] Vičević R, Karačić Z, Milunić M, *et al.* Application of recombinant [NiFe] -hydrogenase for sustainable coenzyme regeneration. *Catalysts*, 2026, **16**(1): 10
- [76] Yonemoto I T, Matteri C W, Nguyen T A, *et al.* Dual organism design cycle reveals small subunit substitutions that improve [NiFe] hydrogenase hydrogen evolution. *J Biol Eng*, 2013, **7**(1): 17

- [77] Plummer S M, Plummer M A, Merkel P A, *et al.* Using directed evolution to improve hydrogen production in chimeric hydrogenases from algal species. *Enzyme Microb Technol*, 2024, **173**: 110349
- [78] Koo J. Enhanced aerobic H₂ production by engineering an [FeFe] hydrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Int J Hydrog Energy*, 2020, **45**(18): 10673-10679
- [79] Zhang Y, Wang X, Yuan J, *et al.* Multidimensional engineering of *Rhodobacter sphaeroides* for enhanced photo-fermentative hydrogen production. *Chem Eng J*, 2024, **488**: 150852
- [80] Li X, Liu Y, Li X, *et al.* Phenanthrene regulates metabolic pathways for hydrogen accumulation in sludge alkaline dark fermentation. *Bioresour Technol*, 2023, **384**: 129311
- [81] Kim C A, Wu J, Zhu J, *et al.* Computational modeling and experimental approaches for understanding the mechanisms of [FeFe]-hydrogenase. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, **12**(21): e2408297
- [82] Nayek A, Poria R K, Ahmed M E, *et al.* Hydrogen oxidation by bioinspired models of [FeFe]-hydrogenase. *ACS Org Inorg Au*, 2025, **5**(2): 105-116
- [83] Botticelli S, la Penna G, Minicozzi V, *et al.* Predicting the structure of enzymes with metal cofactors: the example of [FeFe] hydrogenases. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(7): 3663
- [84] Hosseinzadeh A, Zhou J L, Altaee A, *et al.* Machine learning modeling and analysis of biohydrogen production from wastewater by dark fermentation process. *Bioresour Technol*, 2022, **343**: 126111
- [85] Liu C, Li F, Zhang P, *et al.* Augmented machine learning with limited data for hydrogen yield prediction in wastewater dark fermentation. *npj Clean Water*, 2025, **8**: 101
- [86] Eroglu E, Melis A. Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. *Bioresour Technol*, 2011, **102**(18): 8403-8413
- [87] Honda Y, Shinohara Y, Fujii H. Visible light-driven, external mediator-free H₂ production by a combination of a photosensitizer and a whole-cell biocatalyst: *Escherichia coli* expressing [FeFe]-hydrogenase and maturase genes. *Catal Sci Technol*, 2020, **10**(17): 6006-6012
- [88] Chen J, Li Q, Wang L, *et al.* Advances in whole-cell photobiological hydrogen production. *Adv NanoBiomed Res*, 2021, **1**(4): 2000051
- [89] Honda Y, Shinohara Y, Watanabe M, *et al.* Photo-biohydrogen production by photosensitization with biologically precipitated cadmium sulfide in hydrogen-forming recombinant *Escherichia coli*. *ChemBioChem*, 2020, **21**(23): 3389-3397
- [90] Wei W, Sun P, Li Z, *et al.* A surface-display biohybrid approach to light-driven hydrogen production in air. *Sci Adv*, 2018, **4**(2): eaap9253
- [91] Lin S, Tao Z, Li Z, *et al.* Enhancing photocatalytic hydrogen production from engineered *Escherichia coli*-biohybrid system via intracellular electron redirection. *Chem Eng J*, 2024, **499**: 156488
- [92] Gamache M T, Kurth L, Filmon D T, *et al.* *E. coli*-based semi-artificial photosynthesis: biocompatibility of redox mediators and electron donors in [FeFe] hydrogenase driven hydrogen evolution. *Energy Adv*, 2023, **2**(12): 2085-2092
- [93] 雷航彬, 何宁, 李斐焯, 等. 氢化酶固定化研究进展. *合成生物学*, 2024, **5**(6): 1485-1497
- Lei H B, He N, Li F X, *et al.* *Synth Biol J*, 2024, **5**(6): 1485-1497
- [94] Tsygankov A A, Zorin N A, Starodubov A S, *et al.* A simple method for oriented immobilization of HydSL hydrogenase of *Thiocapsa bogorovii* on carbon electrodes. *Int J Hydrog Energy*, 2023, **48**(100): 39989-39999
- [95] Filmon D T, Jaenecke J, Winkler M, *et al.* Turning the FeFe hydrogenase from *Clostridium beijerinckii* into an efficient H₂ oxidation catalyst using a redox-active matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, **122**(41): e2514698122
- [96] Kosem N, Ohsaki Y, Watanabe M, *et al.* FeFe]-hydrogenase encapsulated in zeolitic imidazolate framework (ZIF) -8 nanoparticles as a robust biocatalyst for photocatalytic hydrogen production. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2024, **12**(16): 6300-6309
- [97] Sun Y, Chen T, Ge X, *et al.* Engineering CO₂-fixing modules in *Escherichia coli* via efficient assembly of cyanobacterial Rubisco and carboxysomes. *Plant Commun*, 2025, **6**(3): 101217
- [98] Zuo J, Yan H, Lan R, *et al.* An enzyme-responsive core-double shell structured nano pesticide delivery system for improving the UV stability of emamectin benzoate (EB). *Ind Crops Prod*, 2024, **213**: 118464
- [99] Sun Y, Zhong M, Kang M, *et al.* Novel core-shell nanoparticles: encapsulation and delivery of curcumin using guanidine hydrochloride-induced oleosome protein self-assembly. *LWT*, 2023, **173**: 114352
- [100] Ning C, Dong Y, Yang K, *et al.* Co-encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs into human H chain ferritin nanocarrier enhances antitumor efficacy. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, **9**(5): 2572-2583
- [101] Kyrpel T, Saska V, de Poulpique A, *et al.* Hydrogenase-based electrode for hydrogen sensing in a fermentation bioreactor. *Biosens Bioelectron*, 2023, **225**: 115106
- [102] Li W, Gao Y, Han C, *et al.* Electrochemical biosensor for point-of-care testing aqueous molecular hydrogen. *Electrochim Acta*, 2025, **517**: 145756
- [103] He K, Lingford J P, Wang F, *et al.* Nanoengineered bioanode with oxygen-insensitive hydrogenase for sustainable energy harvesting from atmospheric hydrogen and waste gases. *Nano Energy*, 2025, **143**: 111358
- [104] Comellas-Aragonès M, Engelkamp H, Claessen V I, *et al.* A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(10): 635-639
- [105] Fiedler J D, Brown S D, Lau J L, *et al.* RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**(50): 9648-9651
- [106] Inoue T, Kawano M A, Takahashi R U, *et al.* Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J Biotechnol*, 2008, **134**(1/2): 181-192
- [107] Wörsdörfer B, Woycechowsky K J, Hilvert D. Directed evolution

- of a protein container. *Science*, 2011, **331**(6017): 589-592
- [108] Li T, Jiang Q, Huang J, *et al.* Reprogramming bacterial protein organelles as a nanoreactor for hydrogen production. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5448
- [109] Jiang Q, Li T, Yang J, *et al.* Synthetic engineering of a new biocatalyst encapsulating [NiFe] -hydrogenases for enhanced hydrogen production. *J Mater Chem B*, 2023, **11**(12): 2684-2692
- [110] Yang J, Jiang Q, Chen Y, *et al.* Light-driven hybrid nanoreactor harnessing the synergy of carboxysomes and organic frameworks for efficient hydrogen production. *ACS Catal*, 2024, **14**(24): 18603-18614
- [111] Prevelige P E, Thomas D, King J. Scaffolding protein regulates the polymerization of P22 coat subunits into icosahedral shells *in vitro*. *J Mol Biol*, 1988, **202**(4): 743-757
- [112] Parker M H, Casjens S, Prevelige P E. Functional domains of bacteriophage P22 scaffolding protein. *J Mol Biol*, 1998, **281**(1): 69-79
- [113] Weigele P R, Sampson L, Winn-Stapley D, *et al.* Molecular genetics of bacteriophage P22 scaffolding protein's functional domains. *J Mol Biol*, 2005, **348**(4): 831-844
- [114] Rae B D, Long B M, Badger M R, *et al.* Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments that facilitate CO₂ fixation in cyanobacteria and some proteobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, **77**(3): 357-379
- [115] Yu X, Li H, Xu C, *et al.* Liquid-liquid phase separation-mediated photocatalytic subcellular hybrid system for highly efficient hydrogen production. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, **11**(22): e2400097
- [116] Jian J X, Liu Q, Li Z J, *et al.* Chitosan confinement enhances hydrogen photogeneration from a mimic of the diiron subsite of [FeFe]-hydrogenase. *Nat Commun*, 2013, **4**: 2695
- [117] Kosourov S N, Seibert M. Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **102**(1): 50-58
- [118] Maswanna T, Lindblad P, Maneeruttanarungroj C. Improved biohydrogen production by immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 incubated under aerobic condition. *J Appl Phycol*, 2020, **32**(5): 2937-2945
- [119] Ramprakash B, Incharoensakdi A. Alginate encapsulated nanobio-hybrid system enables improvement of photocatalytic biohydrogen production in the presence of oxygen. *Int J Hydrog Energy*, 2022, **47**(22): 11492-11499
- [120] Ramprakash B, Incharoensakdi A. Extracellular self-photosensitizer combined with metal oxide-based nano bio-hybrid system encapsulated by alginate improves hydrogen production in the presence of oxygen. *Bioresour Technol*, 2023, **388**: 129703
- [121] Wang X, Li S Y, Chen Y, *et al.* New insights into microalgal photobiological hydrogen production: potential role of aggregation forms in modulating the hydrogenase activity and metabolic properties of microalgae during hydrogen production. *Chem Eng J*, 2024, **500**: 156802
- [122] Tao Z, Chen D, Li B, *et al.* Core-shell bio-gel microreactor for efficient hydrogen production through multi-bacterial synergistic catalysis. *Chem Eng J*, 2025, **514**: 163308
- [123] Liu Q, Gao S, Hou Y, *et al.* AI- and biotechnology-driven digital design of biohydrogen-producing microbiota. *Engineering*, 2025. DOI:10.1016/j.eng.2025.09.027
- [124] Marousek J, Gavurova B, Marouskova A. Machine learning enables more efficient (nano)catalyst management, enhancing the competitiveness of (bio)hydrogen production from sewage sludge. *Renew Energy*, 2026, **256**: 124025
- [125] Choi G, Kim W, Koo J. Investigating the performance of machine learning methods in predicting functional properties of the hydrogenase variants. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2023, **28**(1): 143-151
- [126] Sun X, Li W, Li W, *et al.* *De novo* design of a protein binder to probe gas channel and enhance the oxygen tolerance of [NiFe] hydrogenase. *bioRxiv*, 2025. DOI:10.1101/2025.11.19.689374
- [127] Hao P, Shan P, Lu J, *et al.* Magnetic-field-induced activation of S-scheme heterojunction with core-shell structure for boosted photothermal-assisted photocatalytic H₂ production. *Fuel*, 2024, **373**: 132394
- [128] Shakya D, Shukla R K, Kumar S, *et al.* CuO/ZnO Type-II heterojunction modified by rGO nanosheets for improved photocatalytic mineralization of antibiotics. *J Ind Eng Chem*, 2024, **132**: 304-317
- [129] Zhang Y, Zhang Y, Yu J, *et al.* Direct CO₂ mineralization of steel slag accelerated by *Sporosarcina pasteurii*. *Energy Fuels*, 2025, **39**(34): 16282-16294
- [130] Wang F, Liu Y, Dong Q, *et al.* Enhancement of enzyme activity by alternating magnetic field and near-infrared irradiation. *Catalysts*, 2025, **15**(4): 386
- [131] Liu R, Wu Y, Qu H, *et al.* Magnetically and optically powered nanozymes: boosting breast cancer therapy with magnetothermodynamic-enhanced ferroptosis and apoptosis. *Chem Eng J*, 2025, **509**: 161353
- [132] Hu A, Pu Y, Xu N, *et al.* Hierarchically decorated magnetic nanoparticles amplify the oxidative stress and promote the chemodynamic/magnetic hyperthermia/immune therapy. *Acta Biomater*, 2024, **173**: 457-469
- [133] Ji H, Wang Y, Yao K, *et al.* Engineering an anaerobic microenvironment to empower hydrogenase-catalyzed hydrogen therapy for diabetic wound healing. *Aggregate*, 2026, **7**(2): e70285
- [134] Li J, Fu Z, Liu Y. Encapsulation of liquid metal nanoparticles inside metal-organic frameworks for hydrogel-integrated dual functional biotherapy. *Chem Eng J*, 2023, **457**: 141302
- [135] Ren J, Zhang T, Jiao S, *et al.* Liquid-like PDMS brushes/TiO₂ microcapsule-driven coatings with integrated self-healing, photodegradation, and antifouling functions. *J Environ Chem Eng*, 2025, **13**(6): 119848

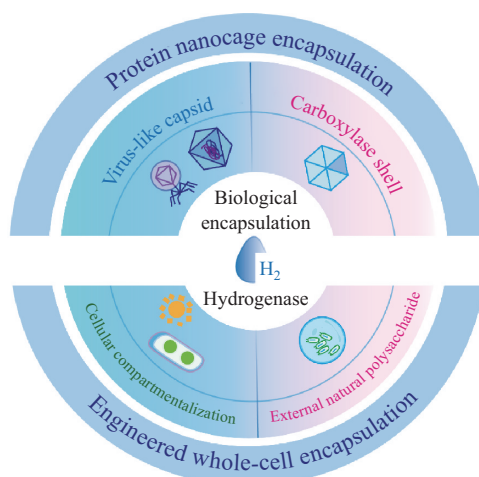
Strategies and Challenges of Hydrogen Production Catalyzed by Bioencapsulated Hydrogenase*

XU Xiang^{1,2)}, CAO Chang-Qian^{1,2)**}

⁽¹⁾Key Laboratory of Planetary Sciences and Frontier Technology, Institute of Geology and Geophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China;

²⁾College of Earth and Planetary Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Graphical abstract



Abstract Hydrogenases, as a class of highly efficient and reversible biological catalysts, can catalyze the reduction of protons to molecular hydrogen, thus demonstrating great potential in a wide range of fields such as renewable energy production and green chemistry. Despite their significant potential, the large-scale industrial application of hydrogenases has long been constrained by several inherent limitations, including high sensitivity to molecular oxygen, the challenges in the *in vitro* reconstitution and maturation of their catalytic centers, and the inefficiency and instability of the natural electron transfer pathways. To overcome these limitations and enhance the catalytic performance of hydrogenases, researchers have developed various strategies, among which enzyme molecular engineering, photo-driven modification, and enzyme immobilization techniques are the most common exploration directions. Particularly, enzyme immobilization technology is widely used to improve the reusability of hydrogenases, but traditional immobilization methods often come with disadvantages in practical applications, such as complex multi-step procedures and insufficient biocompatibility of the immobilization materials. In recent years, bioencapsulation technology has emerged as a promising alternative strategy to enhance the catalytic

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (42474099), National Natural Science Foundation of China-Geological Joint Fund (U2244223), and Key Project of Institute of Geology and Geophysics, Chinese Academy of Sciences (IGGCAS-202201).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-82998001, E-mail: changqiancao@mail.iggcas.ac.cn

Received: December 19, 2025 Accepted: April 4, 2026

performance of hydrogenases. This method utilizes biologically derived encapsulation materials to construct physically confined and precisely defined chemical microenvironments around the enzyme molecules, offering simpler self-assembly processes and superior biocompatibility. With these biomimetic constructs, bioencapsulation technology not only provides better oxygen tolerance but also helps to create a local microenvironment conducive to sustained catalytic function. This article systematically reviews the latest research progress of two main bioencapsulation strategies for hydrogenases: one is the encapsulation technology based on protein-based nanocages; the other is the engineering strategy for whole-cell hydrogenase expression. In the nanocage-based systems, this article focuses on the structural and functional characteristics of virus-like capsids and carboxysome protein shells, which serve as efficient enzyme encapsulation scaffolds, not only providing a stable physical barrier to prevent oxygen diffusion but also enabling high-density enzyme loading, thereby promoting substrate channeling effects and electron transfer kinetics. This article also discusses whole-cell encapsulation systems, which achieve hydrogenase compartmentalization within engineered cellular structures or by using external natural polysaccharide-based encapsulation matrices to wrap whole-cell catalysts. Bioencapsulation strategies can bring multiple synergistic benefits: they can effectively protect hydrogenases from oxygen-mediated inactivation, significantly delay the decline of catalytic activity over time, and enhance the hydrogen production rate by increasing the local concentration of active enzyme molecules and optimizing the electron transfer efficiency from redox partners to the catalytic center. Despite the significant progress made, several technical challenges remain to be addressed. The main obstacles include limited enzyme loading and encapsulation efficiency, insufficient long-term stability of encapsulation materials under operating conditions, and the need to improve the matching of the photo-biological interface in systems integrating light-harvesting components with enzymatic catalysis. Future efforts can focus on the integration of multiple technological approaches, such as using computer-aided protein design to optimize encapsulation structures, developing engineered electron transfer pathways to enhance catalytic conversion efficiency, and designing composite multifunctional materials with both structural stability and functional adaptability. These directions collectively aim to achieve efficient, stable, and scalable hydrogen production applications of bioencapsulated hydrogenase systems.

Key words hydrogenase, bioencapsulation, biological hydrogen production technology, nano-protein cage, bacterial engineering

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0556

CSTR: 32369.14.pibb.20250556