

Biološki procesi proizvodnje biovodika

Renata Vičević¹, Anita Šalić¹, Bruno Zelić^{1,2}

¹Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, 10000 Zagreb

²Sveučilište Sjever, Trg Žarka Dolinara 1, 48000 Koprivnica

Sažetak: Ubrzano iscrpljivanje rezervi i negativni utjecaji na okoliš koji su posljedica prerade i korištenja fosilnih goriva te nestabilnost tržišta energenata, samo su neki od razloga sve većeg istraživanja i korištenja čistih, zelenih i obnovljivih izvora energije. Biogoriva se smatraju ekološki i ekonomski prihvatljivom alternativom fosilnim gorivima, pri čemu je vodik jedno od najperspektivnijih alternativnih energetske rješenja. Vodik praktički ne postoji u prirodi u slobodnom obliku, ali se može proizvesti kemijskim i biološkim procesima. Glavni nedostaci kemijskih procesa proizvodnje vodika su veliki investicijski i ukupni troškovi, velika specifična potrošnja i niska učinkovitost procesa. Kako bi se prevladali navedeni problemi te ekološki i ekonomski opravdao i unaprijedio proces proizvodnje (bio)vodika (bioH_2), biološki procesi postaju sve zastupljenija alternativa kemijskim procesima. Ovaj pregledni rad pruža literaturni uvid u biološke procese proizvodnje bioH_2 kao obnovljivog izvora energije.

Ključne riječi: biovodik, biogorivo, biootpad, biomasa, enzimi

1. Uvod

Iscrpljivanjem rezervi fosilnih goriva i rastućim klimatskim izazovima, raste potreba za povećanjem raznolikosti energetskog portfelja. Prema predikciji Canuta i Mazze [1], fosilna goriva za masovnu potrošnju će u potpunosti nestati do 2200. godine. Iz tog razloga raste zanimanje za biogoriva (bioplin, bioetanol, biodizel, biovodik itd.) koja se smatraju ekološki i ekonomski prihvatljivom alternativom fosilnim gorivima [2]. Prednosti korištenja biogoriva su višestruke pri čemu se mogu izdvojiti sljedeće:

- **Smanjenje emisija stakleničkih plinova:** Korištenje biogoriva umjesto fosilnih goriva može značajno smanjiti emisije CO_2 i drugih štetnih plinova, što doprinosi borbi protiv klimatskih promjena.

- *Smanjenje ovisnosti o fosilnim gorivima*: Biogoriva doprinose smanjenju ovisnosti o uvozu fosilnih goriva, što povećava energetska sigurnost država.
- *Obnovljivost*: Biogoriva se proizvode iz obnovljivih izvora poput biljaka, algi ili otpadnih biorazgradivih materijala, što ih dugoročno čini održivim izvorom energije.
- *Podrška ruralnom razvoju*: Proizvodnja biogoriva može potaknuti razvoj ruralnih područja kroz uzgoj sirovina poput biljaka ili algi te stvaranje radnih mjesta u poljoprivredi i industriji biogoriva.
- *Diversifikacija energetskeg portfelja*: Korištenje biogoriva doprinosi diversifikaciji energetskeg portfelja, smanjujući rizik od nestanka ili fluktuacija cijena fosilnih goriva.
- *Smanjenje onečišćenja zraka*: Biogoriva obično imaju niže emisije štetnih čestica i drugih onečišćenja u usporedbi s fosilnim gorivima, što poboljšava kvalitetu zraka i smanjuje zdravstvene probleme povezane sa zagađenjem.
- *Potencijal za inovacije*: Razvoj tehnologija za proizvodnju biogoriva otvara put za inovacije u području obnovljive energije te potiče istraživanje i razvoj novih tehnologija.

Među spomenutim biogorivima, vodik se smatra jednim od najperspektivnijih zahvaljujući svom visokom energetskeg potencijalu (142 MJ/kg) i činjenici da njegovim izgaranjem nastaje samo voda [3]. Međutim, budući da u prirodi vodik ne postoji u slobodnom obliku, mora se proizvoditi kemijskim ili biološkim procesima. Kemijske procese, trenutno dominantne u proizvodnji vodika, odlikuju veliki investicijski i ukupni troškovi, velika potrošnja energije i niska učinkovitost. Kako bi se prevladali navedeni problemi i unaprijedio proces proizvodnje vodika, sve se više pažnje pridodaje biološkim procesima koji nude ekološki prihvatljiviju varijantu. Proces koji se najčešće koristi za proizvodnju bioH_2 su anaerobna fermentacija, fotofermentacija i mikroba elektroliza, pri čemu učinkovitost tih procesa prvenstveno ovisi o mikroorganizmima koji sudjeluju u procesu te o supstratima bogatim ugljikohidratima. Danas se u proizvodnji bioH_2 najviše pažnje posvećuje lignoceluloznoj biomasi te otpadnim vodama s ciljem razvijanja održivih procesa [4]. Unatoč velikom potencijalu, biološka proizvodnja bioH_2 ograničena je složenošću procesa, što utječe na konačnu cijenu i konkurentnost u odnosu na kemijske metode. Kako bi bioH_2 postao održiva i ekonomski opravdana alternativa fosilnim gorivima, potrebna su daljnja istraživanja usmjerena na pronalazak novih metoda, sirovina, mikroorganizama i tehnologija proizvodnje.

U ovom preglednom radu analizirani su i uspoređeni biološki procesi proizvodnje bioH_2 s ciljem boljeg razumijevanja njegove uloge u tranziciji prema čistim i obnovljivim izvorima energije.

2. Vodik

2.1 Vodik – gorivo budućnosti

Jules Verne je u svojem romanu “Tajanstveni otok” (fr. *L’Île mystérieuse*, 1874.) predvidio upotrebu vodika kao goriva budućnosti. U knjizi jedan od likova iznosi ideju da će voda, rastavljena na svoje sastavne elemente (vodik i kisik), jednog dana postati izvor energije:

“Voda će jednog dana biti gorivo. Vodik i kisik, od kojih se sastoji, korišteni zasebno, osigurat će neiscrpan izvor topline i svjetla, s jačinom koju ugljen ne može postići. Kad zalihe ugljena presuše, ugrijat ćemo se pomoću vode.”

Ova vizionarska izjava smatra se jednim od prvih literarnih nagovještaja korištenja vodika kao energetskog izvora. Iako je tada to bila samo znanstvena fantastika, danas je vodik ključna tema u istraživanjima obnovljive energije i procesu dekarbonizacije. Verneova ideja o elektrolizi vode za proizvodnju vodika postaje sve važnija u modernoj energetici, posebno kroz koncept zelenog vodika, koji se dobiva pomoću obnovljivih izvora energije poput sunca i vjetra.

Prednost vodika leži u velikoj specifičnoj energiji (142 MJ/kg), pri čemu se u gorivnim ćelijama koje koriste vodik, oslobađa 2,75 puta veća energija u usporedbi s izgaranjem goriva na bazi ugljikovodika. S obzirom na njegovu sve širu primjenu, vodik sve više poprima ulogu goriva sadašnjosti. Prednosti njegove upotrebe uključuju nisku emisiju štetnih plinova (njegovim izgaranjem nastaje samo voda), mogućnost brzog punjenja gorivnih ćelija, pohranu viškova energije i primjenu u različitim sektorima [5]. Neka od ključnih svojstava vodika prikazana su u Tablici 1.

Uz brojne prednosti korištenja vodika kao goriva, potrebno je uzeti u obzir i izazove povezane s njegovom primjenom. Vodik je zapaljiv i eksplozivan plin, što može predstavljati sigurnosni rizik u slučaju curenja ili nestručnog rukovanja. Međutim, zahvaljujući strogim sigurnosnim standardima, takvi problemi su iznimno rijetki. Jedan od najvećih izazova u širokoj uporabi vodika kao goriva je nedostatak infrastrukture, odnosno punioca i distribucijskih sustava [5]. Osim toga, zbog male molekulske mase, skladištenje i transport vodika predstavljaju tehnički izazov, budući da se mora čuvati pod visokim tlakom ili iznimno niskim temperaturama [6].

Dodatni čimbenik koji ograničava širu primjenu jest visoka cijena proizvodnje, što vodik trenutno čini skupljim od konvencionalnih goriva [8]. Unatoč tim izazovima, vodik ima brojne primjene u industriji, posebno u procesima proizvodnje amonijaka i gnojiva (55%), rafiniranju nafte (25%), sintezi metanola (10%) te brojnim drugim procesima (10%) kao što su sinteza polimera, farmaceutska industrija, itd. [4,9].

Tablica 1. Svojstva vodika pri standardnim uvjetima (prilagođeno iz [7])

Svojstvo	Vrijednost	Jedinica
<i>Fizikalna svojstva</i>		
Molekulska masa	2,016	g/mol
Gustoća (plin)	0,08988	g/dm ³
Volumetrijska gustoća	0,08376	kg/m ³
Talište	-259,16	°C
Vrelište	-252,87	°C
Kritična točka	-240,2 °C pri 1286,83	kPa
Trojna točka	-259,3 °C pri 7,09	kPa
Specifična toplina	14,304	J/(g·K)
Topljivost u vodi	1,6	mg/dm ³
<i>Termodinamička svojstva</i>		
Viša ogrjevna vrijednost	141,86	MJ/kg
Niža ogrjevna vrijednost	119,93	MJ/kg
Energetska gustoća	10,05	MJ/m ³
Energetska gustoća	141,90	MJ/kg
<i>Kemijska svojstva</i>		
Temperatura samozapaljenja	570	°C
Eksplzivne granice	4 – 75	% vodika u zraku
Standardni elektrođni potencijal	0,00	V (prema SHE*)

* Standardna vodikova elektrođa

Vodik se može proizvesti različitim kemijskim i biološkim procesima, pri čemu kemijski procesi i dalje dominiraju unatoč svojim nedostacima, poput velikih investicijskih i ukupnih troškova, velike specifične potrošnje, niske učinkovitosti procesa te negativnog utjecaja na okoliš. Konkretno, proizvodnja vodika iz fosilnih goriva rezultira emisijama ugljikovog dioksida (CO₂) u atmosferu.

Kako bi se ti problemi prevladali te se ekološki i ekonomski opravdao i unaprijedio proces proizvodnje vodika, intenzivno se radi na poboljšanju postojećih i razvoju novih tehnologija i procesa proizvodnje kao održivih alternativa, s posebnim naglaskom na biološke procese [4] o kojima će više biti rečeno u nastavku rada.

2.2 Boje vodika

Vodik se smatra obnovljivim izvorom energije s obzirom da je najzastupljeniji element na Zemlji. Međutim, njegova primjena je ograničena činjenicom da u slobod-

nom obliku ne postoji pa se mora sintetizirati iz različitih izvora kao što su prirodni plin, ugljen ili biomasa korištenjem različitih termodinamičkih, elektrokemijskih i bioloških procesa među kojima su najvažniji elektroliza, piroliza, reformiranje nafte, plinifikacija, fotofermentacija i tamna fermentacija. Odabir optimalne metode proizvodnje vodika ovisi o dostupnosti sirovina, energetske potrebe, ekonomskim čimbenicima i utjecaju na okoliš. S razvojem tehnologija za proizvodnju “zelenog” vodika, tj. vodika proizvedenog iz obnovljivih izvora energije i bez emisija stakleničkih plinova, sve važniji postaju procesi koji minimiziraju ekološki utjecaj. Kako bi se vodik klasificirao ovisno o načinu na koji je proizveden, u industriji i energetici koristi se “sustav boja” [10] (Slika 1).

ZELENI VODIK	PLAVI VODIK	CRNI/SIVI VODIK
proizveden elektrolizom primjenom struje dobivene iz obnovljivih izvora energije i vode	proizveden parnim reformiranjem ili rasplinjavanjem uz hvatanje ugljika pomoću prirodnog plina	proizveden parnim reformiranjem ili rasplinjavanjem ugljena pomoću prirodnog plina ili ugljena
Ugljični otisak minimalan	Ugljični otisak nizak	Ugljični otisak visok
SMEĐI VODIK	TIRKIZNI VODIK	CRVENI VODIK
proizveden rasplinjavanjem fosilnih goriva	proizveden pirolizom iz prirodnog plina	proizveden elektrolizom primjenom struje dobivene iz nuklearne energije
Ugljični otisak visok	Ugljični otisak nizak	Ugljični otisak minimalan
BIJELI VODIK	ŽUTI VODIK	?? VODIK
proizveden pomoću podzemnog plina	proizveden elektrolizom primjenom struje dobivene iz solarne energije	proizveden iz biomase
Ugljični otisak minimalan	Ugljični otisak srednji	Ugljični otisak minimalan

Slika 1: Boje vodika

Zeleni vodik je trenutno najpoželjniji jer se proizvodi iz vode i obnovljive energije, bez emisija CO₂. Međutim, i plavi i tirkizni vodik se smatraju privremenim rješenjima dok tehnologije “zelene” proizvodnje ne postanu jeftinije i dostupnije.

2.3 Biovodik

Osim spomenutih vrsta vodika, postoji i biovodik (bioH₂), vodik dobiven biološkim procesima, kojem još nije dodijeljena boja jer je istraživanje ekonomski održivih

procesa njegove proizvodnje još u ranoj fazi. Jedna od glavnih prednosti proizvodnje bioH₂ je korištenje otpadnih bioloških sirovina što omogućuje minimalno zagađenje i istovremeno rješavanje problema zbrinjavanja biološkog otpada. U teoriji, takav proces proizvodnje nema negativnih utjecaja na okoliš.

Takav tip vodika dobiva se korištenjem bioloških sustava, poput bakterija, algi, ili enzimskih reakcija, koji mogu proizvesti bioH₂ kao nusproizvod svojih metaboličkih aktivnosti. U mnogim slučajevima, bioH₂ se smatra “zelenim” izvorom energije jer ne stvara štetne emisije, osim ako se u procesu koristi određena količina fosilnih goriva za podupiranje proizvodnje. Korištenje bioH₂ u industriji ili transportu može doprinijeti smanjenju ovisnosti o fosilnim gorivima i postizanju globalnih ciljeva smanjenja emisije stakleničkih plinova.

BioH₂ također ima potencijal u različitim industrijskim i komercijalnim primjenama, uključujući gorivne članke za proizvodnju električne energije i vozila na vodik. Iako je proizvodnja bioH₂ još uvijek u fazi istraživanja i razvoja, taj oblik vodika može ponuditi dugoročnu održivost u energetske proizvodnji, posebno ako se poveže s obnovljivim izvorima energije i naprednim biotehnoškim metodama.

Trenutni glavni izazovi proizvodnje bioH₂ uključuju visoku cijenu proizvodnje, relativno niske konverzije supstrata, iskorištenje na produktu i produktivnost. Procjenjuje se kako bi proizvodnja bioH₂ bila ekonomski isplativa kada bi konverzija supstrata bila 60-80% [11]. Ipak, sa svakim novim istraživanjem i poboljšavanjem postojećih metoda, očekuje se da bi do 2050. cijena bioH₂ trebala biti manja od cijene prirodnog plina (Tablica 2). Cijena proizvodnje bioH₂ trenutno iznosi 7,54-7,61 \$/kg za fermentacijske procese, 2,13-7,24 \$/kg za procese izravne biofotolize i oko 1,42 \$/kg za procese neizravne fotolize što te procese čini skupljima u odnosu na troškove proizvodnje konkurentnih procesa proizvodnje vodika [12].

Tablica 2: Projekcije cijena bioH₂ i prirodnog plina od 2019. do 2050. izražene u \$/kg [13]

Energent	2019.	2030.	2050.
bioH ₂	3,55	1,95	1,15
prirodni plin	2,40	2,40	2,15

2.4 Biološke metode proizvodnje vodika

Nekoliko je procesa koji se koriste za proizvodnju bioH₂, kao što su anaerobna (tamna) fermentacija, fotofermentacija, izravna i neizravna biofotolizu i mikroba elektroliza. Učinkovitost tih procesa najvećim dijelom ovisi o metaboličkim putevima, stoga je odabir odgovarajućih mikroorganizama za proizvodnju bioH₂ od presudne

važnosti. Uz mikroorganizme, drugi ključan čimbenik je izbor supstrata, pri čemu je važno da je supstrat bogat ugljikohidratima. Danas se sve više pozornosti posvećuje lignoceluloznoj biomasi kao održivom, obnovljivom i jeftinom supstratu za proizvodnju bioH_2 . Iako proizvodnja bioH_2 iz lignoceluloznih materijala kao sirovina ima brojne prednosti, još nije komercijalizirana. Prvenstveno je to stoga što korištenje lignoceluloznih materijala kao sirovina za proizvodnju bioH_2 zahtijeva njihovu obradu kako bi se uklonile komponente koje mogu imati negativan utjecaj na proizvodnju bioH_2 . Proces proizvodnje bioH_2 složen je i dugotrajan te unatoč prednostima još uvijek ne može konkurirati kemijskim procesima proizvodnje vodika zbog svoje visoke cijene. Kako bi se prevladali postojeći problemi, istražuju se novi pristupi proizvodnji bioH_2 , kao što su učinkovitije korištenja svjetla u fotofermentacijama povezano s razvojem novih tipova foreoreaktora, genetska modifikacija mikroorganizama koji se koriste u fermentacijskim procesima, optimizacija procesa, dizajniranje sintetskih enzimatskih puteva za proizvodnju bioH_2 , itd. Iako su biološki procesi proizvodnje bioH_2 dobro poznati i istraženi, glavni izazov ostaje razvoj industrijski održivih bioloških procesa [11].

2.4.1 Fermentacijski procesi za proizvodnju bioH_2

Fermentacija je biološki proces u kojem mikroorganizmi (bakterije, gljive i kvasci) razgrađuju organske supstrate, obično ugljikohidrate, i pretvaraju ih u druge tvari, najčešće alkohole, kiseline ili plinove. Može se odvijati bez prisustva (anaerobna fermentacija) ili u prisutnosti kisika (aerobna fermentacija) [14]. U kontekstu proizvodnje bioH_2 , proces fermentacije se provodi korištenjem anaerobnih ili fototrofnih bakterija, zbog čega razlikujemo anaerobnu (tamnu) fermentaciju i fotofermentaciju. Kombinacija tih procesa je najčešće korištena i najbolje istražena od svih metoda biološke proizvodnje bioH_2 , prvenstveno zbog jednostavnosti [15]. Prednosti fermentacijskih procesa su mogućnost korištenja biootpada kao sirovine i velika selektivnost prema bioH_2 , dok su glavni nedostaci nizak prinos bioH_2 u odnosu na teoretski maksimum i veća potrošnja energije u usporedbi s drugim biološkim procesima.

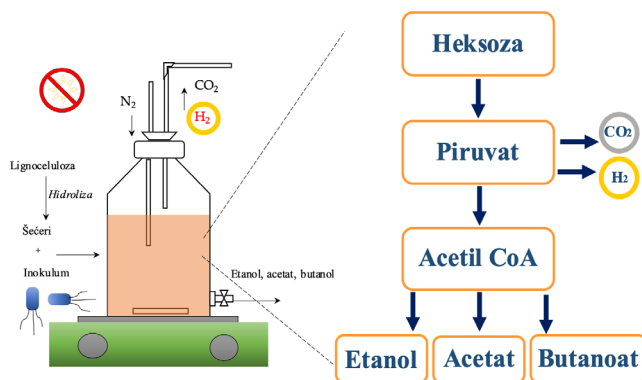
2.4.1.1 Anaerobna (tamna) fermentacija

Tamna ili anaerobna fermentacija biološki je proces u kojem mikroorganizmi razgrađuju organske tvari u odsustvu kisika. Proces se naziva tamnom fermentacijom jer se odvija bez svjetla, za razliku od fotofermentacije koja zahtijeva svjetlosnu energiju. Tijekom anaerobne fermentacije, mikroorganizmi razgrađuju različite organske supstrate poput šećera, celuloze ili drugih ugljikohidrata, i pretvaraju ih u različite produkte, uključujući kiseline, alkohole, plinove i bioH_2 . Bakterije koje se najčešće upotrebljavaju za proizvodnju bioH_2 (Tablica 3) pripadaju skupinama anaeroba (*Clostridia*, *archae*), fakultativnih anaeroba (*Escherichia coli*) i aeroba (*Alcalligenes*,

Bacillus). Kao supstrati za proizvodnju bioH₂ se često koriste jednostavni šećeri, ali se sve više istraživanja usmjerava na lignocelulozu kao održivu, obnovljivu i jeftinu alternativu [16], odnosno općenito prema biološki razgradivim otpadnim sirovinama kao što su organski otpad, poljoprivredni ostaci i industrijske otpadne vode. Treba također istaknuti kako je kod primjene sastavom složenih sirovina, kao primjerice lignoceluloze, potrebno uključiti i različite oblike predtretmana kojima se oslobađaju jednostavni šećeri.

Tablica 3: Usporedba prinosa bioH₂ primjenom različitih supstrata i mikroorganizama [15]

Mikroorganizam	Supstrat	Prinos bioH ₂ po supstratu
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	Hidrolizat kore krumpira	3,4 mol/mol
<i>Clostridium butyricum</i>	Hidrolizat vlakana šećerne trske	1,7 mol/mol
<i>Clostridium thermocellum</i> 7072	Kukuruzna stabljika	1,2 mol/mol
<i>Thermotoga naepolitana</i>	Rižina slama	68,2 mL/g
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glukoza	124,5 mL/g
	Saharoza	109,4 mL/g
	Laktoza	37,8 mL/g



Slika 2: Pojednostavljena shema nastanka vodika tamnom fermentacijom iz heksoza

U prvom koraku fermentacije bakterije razlažu monosaharide na piruvat ($\text{CH}_3\text{CO}-\text{COO}^-$) koji se daljnjim djelovanjem enzima hidrogenaze i piruvat oksidoreduktaze razlaže na plinoviti ugljikov dioksid (CO_2) i vodik (H_2) te kapljeviti acetil koenzim A (acetil CoA). Acetil CoA je intermedijer koji prelazi u etanol, octenu kiselinu ili butansku kiselinu (Slika 2) [15,16].

Optimalni procesni uvjeti za provedbu tamne fermentacije uključuju temperature u rasponu 30-55 °C i pH-vrijednosti u rasponu 6-7. Prinos bioH₂ tamnom fermentacijom se može izračunati proučavajući metaboličke puteve mikroorganizama uzimajući u obzir početne koncentracije šećera u fermentacijskom mediju. Tri metabolička puta koja daju najveći prinos tijekom provedbe tamne fermentacije prikazani su sljedećim jednadžbama kemijskih reakcija (1)-(3):

Fermentacija heksoza u octenu kiselinu:



Fermentacija heksoza u butansku kiselinu:



Fermentacija heksoza u acetat i etanol:

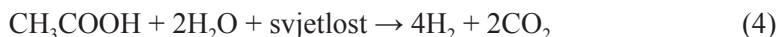


S octenom kiselinom kao glavnim produktom nastaju 4 mola bioH₂, dok s butanskom kiselinom kao produktom nastaju 2 mola bioH₂ po molu utrošene heksoze [17]. Teoretski najveći prinos tamnom fermentacijom nastaje potpunom oksidacijom heksoze, koja rezultira s 12 mol bioH₂ i 6 mol CO₂. Međutim, u praksi se procesom fermentacije najčešće dobiva 1 do 2,5 bioH₂/mol glukoze [15]. Glavni nedostatak tamne fermentacije je nastanak bioplina – smjese CO₂ i bioH₂ pri čemu je potrebno ukloniti CO₂ kako bi se dobio čisti bioH₂. Iako je tamna fermentacija brža od drugih bioloških procesa, prinos bioH₂ je niži zbog nastanka mnogih nusprodukata kao što su kiseline (mliječna, octena kiselina), alkoholi (metanol, butanol), aceton, i plinovi (metan i vodikov sulfid) [18]. S druge strane, dok su foto procesi ograničeni s dostupnošću sunčeve svjetlosti, u procesu tamne fermentacije bioH₂ je moguće proizvoditi cijeli dan što taj proces čini ekonomičnijim.

2.4.1.2 Fotofermentacija

Fotofermentacija je biološki proces proizvodnje bioH₂ iz organskih kiselina djelovanjem anaerobnih bakterija i svjetlosti kao izvora energije. Proces uključuje upotrebu različitih fotosintetskih mikroorganizama poput zelenih algi i cijanobakterija te ljubičaste nesumporne bakterije, a ključni enzim odgovoran za proces proizvodnje

bioH₂ tijekom fotofermentacije je nitrogenaza koja proizvodi vodik u uvjetima limitacije dušikom [19]. U tom procesu se često koriste bakterije roda *Rhodopseudomonas* [20], kao i ljubičaste nesumporne bakterije jer mogu rasti kao fotoautotrofi i kemoheterotrofi, a za razliku od biljaka, algi i cijanobakterija nemaju puno slobodne energije za proizvodnju bioH₂, pa se u sustavu ne proizvodi kisik. Osim toga, imaju sposobnost korištenja širokog spektra organskih spojeva kao supstrata (piruvat, acetat, alkoholi, ugljikohidrati, organske kiseline) [20]. Ukupna reakcija nastajanja bioH₂ fotofermentacijom se može opisati sljedećom jednadžbom kemijske reakcije (Jednadžba (4)) [16]:



Teoretski, u tom procesu se može proizvesti 4 mol H₂/mol octene kiseline. Međutim, ta količina se ne postiže u praksi jer se dio octene kiseline također troši za proizvodnju (rast) biomase.

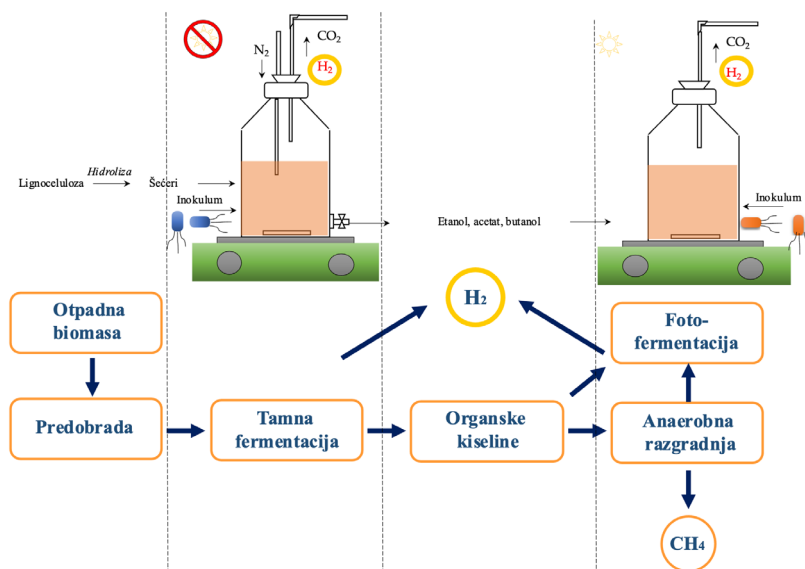
Biokemijski proces fotofermentacije uključuje prijenos elektrona koji se oslobađaju tijekom razgradnje organskih supstrata, pri čemu ih feredoksin prenosi nitrogenazi, koja ih potom koristi za redukciju protona u molekularni vodik. Energija potrebna za taj proces dolazi iz izvora svjetlosti [21], a optimalni procesni uvjeti za fotofermentaciju su pH u rasponu 6,8-7,5, temperatura u rasponu 30-35 °C i intenzitet svjetlosti u rasponu 6-6000 lx [21]. Glavni nedostatak upotrebe enzima nitrogenaze je njegova niska katalitička aktivnost, supresija njegove ekspresije u prisutnosti izvora dušika te manja fotokemijska učinkovitost [16]. Osim toga, nedostatak samog procesa je mala fotokemijska učinkovitost procesa, koja posljedično zahtijeva korištenje velikih površina za prikupljanje dovoljne količine svjetlosne energije. Potrebu za svjetlom ograničava prirodni ciklus dan-noć, što rezultira diskontinuiranom proizvodnjom bioH₂.

Kako bi se prevladali nedostaci tamne i foto(heterotrofne) fermentacije, predložen je dvostupanjski proces koji kombinira oba ta procesa. U prvom dijelu procesa tijekom tamne fermentacije, fermentacijom heksoza dolazi do nastanka bioH₂ i organskih kiselina. BioH₂ se odvodi, a nastale organske kiseline se u drugom dijelu procesa (foto(heterotrofna) fermentacija) prevode do bioH₂ i CO₂.

2.4.1.3 Kombinacija tamne fermentacije i fotofermentacije

Kombinirana fermentacija, koja kombinira tamnu fermentaciju i fotofermentaciju, trenutno je proces koji daje najveći prinos bioH₂. Može se provoditi kao dvostupanjski slijedni proces pri čemu je tamna fermentacija prvi stupanj, a u drugom stupnju se kiseline, nastale kao nusprodukt prvog stupnja, koriste kao supstrat za proizvodnju

bioH₂ putem fotofermentacije. Nedostatak te metode je potreba za predtretmanom prije fotofermentacije i činjenica da su za provedbu procesa potrebna dva reaktora. Kada se kombinirani proces provodi kao jednostupanjska fermentacija, koristi se samo jedan bioreaktor, ali u tom slučaju izazov predstavlja usklađivanje uvjeta pogodnih za obje vrste bakterija [22]. Kombiniranjem tih procesa, teoretski prinos može doseći 12 mol H₂/mol glukoze [15].



Slika 3. Shematski prikaz integrirane tamne fermentacije i fotofermentacije

Sljedeća fermentacija glukoze može se prikazati na sljedećem primjeru (Slika 3) [18]. U prvom koraku, tijekom tamne fermentacije, iz glukoze nastaje octena kiselina, bioH₂ i CO₂, a proces se odvija bez prisustva svjetlosti prema sljedećoj jednadžbi kemijske reakcije (Jednadžba (5)):



U sljedećem koraku fotofermentacijom iz octene kiseline u prisustvu svjetlosti nastaje dodatna količina bioH₂ i CO₂ (Jednadžba (6)) prema sljedećoj jednadžbi kemijske reakcije:



2.4.2 Biofotoliza

Biofotoliza je još jedan od procesa proizvodnje bioH₂, koji se temelji na razgradnji vode u prisutnosti svjetla uz proizvodnju bioH₂. Taj proces se najčešće provodi korištenjem zelenih algi i cijanobakterija, kojima su za proizvodnju bioH₂ potrebni enzimi [FeFe]-hidrogenaza i nitrogenaza [23]. Biofotolizu možemo podijeliti na izravnu i neizravnu biofotolizu [21].

2.4.2.1 Izravna biofotoliza

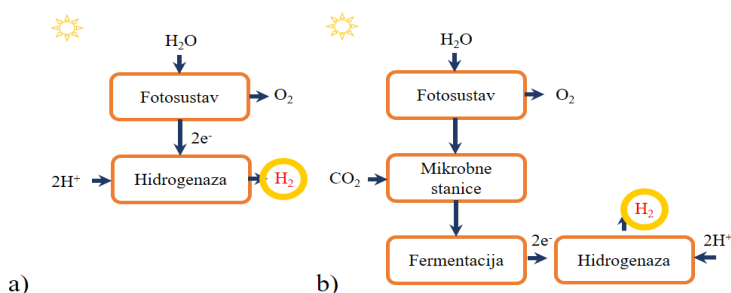
U procesu izravne biofotolize (Slika 4a), zelene alge i cijanobakterije koriste sunčevu svjetlost u rasponu 400-700 nm za svoj rast. Nakon apsorpcije svjetlosti, mogu proizvoditi bioH₂ pomoću enzima hidrogenaze ili nitrogenaze [23]. Proces se može opisati sljedećom jednačbom kemijske reakcije (Jednačba (7)) [12]:



Tijekom izravne fotolize, fotosintetski organizmi reduciraju feredoksin i NADP⁺ korištenjem elektrona i protona iz vode. Elektroni se zatim prenose na feredoksin, koji potom donira elektrone enzimu hidrogenaza koja katalizira pretvorbu protona u bioH₂ prema sljedećoj jednačbi kemijske reakcije (Jednačba (8)) [4]:



Taj proces se mora odvijati u anaerobnim uvjetima zato što kisik u aerobnim uvjetima ometa stvaranje bioH₂.



Slika 4. Shematski prikaz a) izravne i b) neizravne fotolize

2.4.2.2 Neizravna biofotoliza

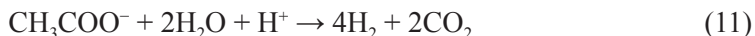
Kod neizravne biofotolize (Slika 4b) odvijaju se dvije različite faze, fotosinteza i tamna fermentacija. U prvoj fazi, CO_2 i H_2O pretvaraju se u organske tvari i O_2 , a u drugoj fazi, u prisutnosti cijanobakterija ili algi, organske tvari prevode se u bioH_2 , CO_2 i druge metabolite [19]. Najveći prinos bioH_2 u tom procesu ostvaruje se pri pH od 4,5 do 8, optimalno oko 6, temperaturi 37 do 55 °C te dobroj izloženosti svjetlosti. Također, prije spomenuti procesi optimizacije poput metoda predobrade, dodatka mikronutrijenata i aktivnih nanočestica pozitivno djeluju na procese biofotolize [24]. Proces se može prikazati sljedećim jednadžbama kemijskih reakcija (Jednadžbe (9)-(10)) [15]:



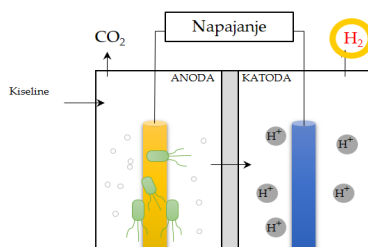
Glavni nedostaci procesa biofotolize su stvaranje O_2 , što može inhibirati postojeće mikroorganizme, te stvaranje eksplozivne smjese O_2 i H_2 . Osim toga, indirektna fotoliza zahtijeva inhibiciju hidrogenaza kako bi se spriječila razgradnja bioH_2 .

2.4.3. Mikrobna elektroliza

BioH_2 se može proizvoditi i u elektrokemijskim sustavima korištenjem tehnologije mikrobnih elektrokemijskih ćelija (engl. *Microbial Electrochemical Cells*, MEC), a sam proces predstavlja kombinaciju mikrobnog metabolizma i elektrokemije (Slika 5) [18]. Mikroorganizmi koji se koriste u ovom procesu su elektrogeni mikroorganizmi koji pretvaraju organski materijal u CO_2 , elektrone i protone (H^+). Generirani elektroni prenose se na anodu, dok H^+ ostaje u elektrolitskoj otopini. Pod utjecajem vanjskog električnog kruga, elektroni se premještaju s katode na anodu, gdje se kombiniraju s H^+ kako bi se proizveo bioH_2 , a proces se može prikazati sljedećom jednadžbom kemijske reakcije (Jednadžba (11)) [19]:



MEC sustavi imaju ogroman potencijal, jer se uz proizvodnju bioH_2 mogu koristiti i za pročišćavanje vode i zraka, budući da kao sirovinu mogu koristiti otpadnu vodu i CO_2 [18,25].



Slika 5. Shematski prikaz mikrobne elektrolize

2.4.4 Enzimatska proizvodnja biovodika

Enzimatska proizvodnja bioH₂ predstavlja inovativan pristup u području obnovljivih izvora energije, koristeći enzime kao biokatalizatore za proizvodnju bioH₂ putem različitih biokemijskih reakcija inspiriranih prirodnim metaboličkim putevima mikroorganizama. Ključnu ulogu u tim procesima imaju enzimi hidrogenaza i nitrogenaza, koji sudjeluju u katalitičkim mehanizmima proizvodnje bioH₂ [26]. Hidrogenaza katalizira reverzibilnu reakciju stvaranja bioH₂ iz protona i oksidaciju bioH₂ u protone, dok nitrogenaza reducira dušik u amonijak te proizvodi bioH₂ kao nusproizvod u anaerobnim uvjetima s limitacijom dušika [27,28].

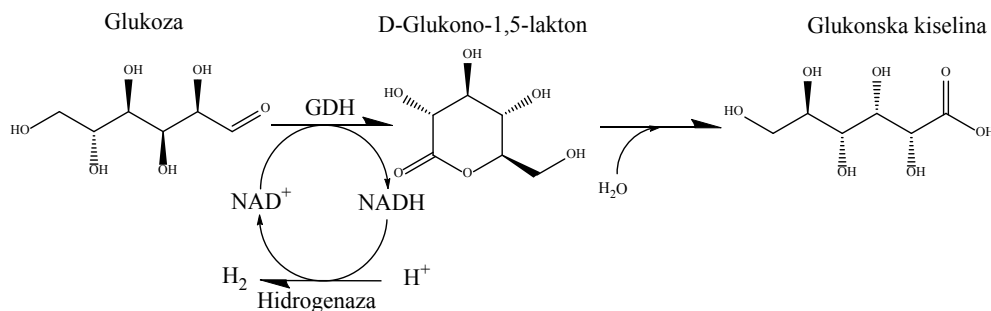
Bakterija *Ralstonia eutropha* H16 pokazala se kao izuzetno značajna u biotehnološkim procesima zahvaljujući svojoj sposobnosti korištenja hidrogenaza za proizvodnju i potrošnju bioH₂ u anaerobnim uvjetima. Ova gram-negativna bakterija raste litoautotrofno i u potpunosti se oslanja na fiksaciju ugljikovog dioksida, što zahtijeva velike količine energije. U njoj se mogu pronaći tri vrste hidrogenaza: membranski vezana hidrogenaza (MBH), slobodna hidrogenaza (SH) i regulatorna hidrogenaza (RH), koje pripadaju skupini [NiFe]-hidrogenaza [29,30]. Za razliku od većine drugih mikroorganizama, čije hidrogenaze inaktivira prisutnost kisika [30], hidrogenaze *R. eutropha* H16 tolerantne su na kisik, što značajno proširuje mogućnosti njihove primjene u biotehnološkim procesima. Izolacija *R. eutropha* H16 moguća je iz različitih okolišnih izvora bogatih organskim materijalima, uključujući tla, vodene ekosustave i industrijske otpadne vode [31]. Kada se jednom izolira, optimalni rast bakterije u laboratorijskim uvjetima postiže se korištenjem mineralnog medija obogaćenog različitim izvorima ugljika [32]. Tijekom uzgoja mogu se pojaviti izazovi poput kontrole pH-vrijednosti, nakupljanja nusprodukata fermentacije i osiguravanja dostupnosti hranjivih tvari. Regulacija pH-vrijednosti ključna je za stabilan rast bakterije, dok se nakupljanje nusproizvoda, poput organskih kiselina i alkohola, može ublažiti primjenom genetičkog inženjerstva i sustava za uklanjanje nusprodukata iz medija [33-34].

Hidrogenaze su ključni enzimi u biološkoj proizvodnji bioH₂ i dijele se prema metalnim centrima aktivnog mjesta u tri glavne klase: [FeFe]-hidrogenaze, [NiFe]-hi-

drogenaze i [Fe]-hidrogenaze. [FeFe]-hidrogenaze karakterizira visoka aktivnost u proizvodnji bioH_2 te prisutnost H-klastera koji sadrži željezo, ugljikov monoksid i cijanidne ligande, što im omogućuje učinkovit prijenos elektrona. [NiFe]-hidrogenaze su stabilnije, ali manje aktivne u odnosu na [FeFe]-hidrogenaze te pokazuju veću otpornost na kisik. [Fe]-hidrogenaze ili Hmd hidrogenaze sadrže jedinstveni željezni centar i ne ovise o niklu, što im omogućuje specifične katalitičke aktivnosti [35-38].

Mehanizam djelovanja hidrogenaza temelji se na vezanju molekularnog vodika na aktivno mjesto enzima, gdje dolazi do njegove disocijacije na protone i elektrone [39]. Elektroni se zatim transportiraju kroz niz kofaktora unutar enzima do konačnog akceptora elektrona, dok se protoni oslobađaju u okoliš [35]. Taj proces može biti reverzibilan, omogućujući sintezu bioH_2 . Izazovi u primjeni hidrogenaza uključuju njihovu osjetljivost na kisik i temperaturu, što ograničava njihovu industrijsku upotrebu. Stoga se intenzivno istražuju metode za poboljšanje njihove stabilnosti, uključujući inženjerstvo enzima i razvoj novih biokatalitičkih sustava prilagođenih za primjenu u održivim energetske sustavima [36].

Kombinacijom enzima glukoza dehidrogenaza (GDH) i enzima hidrogenaza, bioH_2 se može proizvesti i u biokatalitičkoj reakciji s glukozom kao supstratom pri čemu se reakcijski sustav temelji na jednostavnoj enzimskoj konverziji glukoze u glukonsku kiselinu uz paralelnu proizvodnju molekularnog vodika. Enzim GDH katalizira oksidaciju glukoze u glukono-1,5-lakton, koji se hidrolizira u glukonsku kiselinu, a kofaktor za ovu reakciju je NAD^+ ili NADP^+ , koji se pri tome reducira. Drugi enzim, hidrogenaza tolerantna na kisik (hidrogenaza), koristi kofaktor kao donor elektrona, što rezultira nastankom molekularnog vodika i, ne manje bitno, regeneracijom kofaktora (Slika 6) [3].



Slika 6. Shematski prikaz enzimatske proizvodnje bioH_2 iz glukoze katalizirane enzimom GDH i hidrogenaza

2.5 Čimbenici koji utječu na proizvodnju bioH₂

Učinkovitost prethodno navedenih procesa u proizvodnji bioH₂ najvećim dijelom ovisi o metaboličkim putevima organizama/enzima koji se koriste u procesu i izboru supstrata pri čemu je važno da je isti bogat ugljikohidratima. Nadalje, predobrada sirovina/supstrata, početna koncentracija supstrata, pH-vrijednost, temperatura, prisutnost nanočestica i mnogi drugi čimbenici također igraju važnu ulogu u optimizaciji procesa proizvodnje bioH₂ [18].

2.5.1.1 Utjecaj predobrade sirovina na proizvodnju bioH₂

Upotreba jednostavnih šećera poput glukoze i saharoze u proizvodnji bioH₂ relativno je dobro istražena, ali s ciljem dobivanja ekološki i ekonomski prihvatljivog procesa danas se sve više pozornosti posvećuje lignoceluloznoj biomasi kao održivom, obnovljivom i jeftinom supstratu. Lignoceluloza se sastoji od celuloze (33-55%), hemiceluloze (20-25%) i lignina (15-25%), a većinom potječe iz otpada poljoprivredne, prehrambene i drvne industrije. Unatoč brojnim prednostima proizvodnje bioH₂ iz lignoceluloznih materijala, komercijalizirana primjena još nije zaživjela jer je za oslobađanje jednostavnih šećera potrebna složena obrada. Obrada uključuje tri faze: prethodnu obradu, hidrolizu i po potrebi, pročišćavanje hidrolizata. Proces hidrolize lignoceluloze može se podijeliti na tri vrste i to na alkalnu, kiselu i ultrazvučno-potpomognutu hidrolizu [18]. Alkalna hidroliza rezultira koncentracijama 2,6 puta većim u usporedbi s procesom u kojem je proizvodnja provedena na materijalu bez predobrade, kiselinska hidroliza rezultira 3 puta većim koncentracijama bioH₂, a ultrazvučno-potpomognuta hidroliza u trajanju od 15 do 30 minuta povećava prinos bioH₂ za 75-88% [17].

2.5.1.2 Utjecaj koncentracije supstrata

Početna koncentracija supstrata važna je za proizvodnju bioH₂ jer prevelike početne vrijednosti često inhibiraju rast mikroorganizma/aktivnost enzima što se negativno odražava na sam proces. Kako bi se izbjegla inhibicija, mogu se koristiti šaržni reaktori s dotokom supstrata, smanjiti koncentracija samog supstrata ili u proces dodati bakterije (npr. *Enteroerobacter aerogenes*) koje smanjuju inhibiciju i stimuliraju mikrobiološku aktivnost proizvodnje bioH₂ [26].

2.5.1.3 Utjecaj pH-vrijednosti

Jedan od ključnih faktora za uspješnu proizvodnju bioH₂ je pH-vrijednost reakcijske smjese zbog toga što različiti mikroorganizmi imaju različitu aktivnost pri različitim

pH-vrijednostima. Mikroorganizmi koji sudjeluju u proizvodnji bioH_2 najčešće pokazuju najveću aktivnost pri pH-vrijednostima u rasponu od 5 do 8. pH-vrijednost manja od 5 može prepoloviti brzinu proizvodnje bioH_2 u odnosu na neutralnu početnu pH-vrijednost, dok se optimalnim pokazao pH 5,5 [15,17].

2.5.1.4 Utjecaj temperature na proizvodnju bioH_2

Temperatura značajno utječe na aktivnost mikroorganizama i enzima uključenih u proizvodnju bioH_2 . Istraživanja su pokazala da je optimalna proizvodnja bioH_2 u temperaturnom rasponu od 30 do 40 °C, pri čemu najbolje rastu bakterije ključne za ovaj proces, poput roda *Clostridium*. Osim što utječe na aktivnost mikroorganizama, temperatura također utječe i na sastav mikrobne populacije. Primjerice, pri temperaturama između 37 i 45 °C dominira *Clostridium*, dok u rasponu temperatura 60-65 °C prevladava *Thermoanaerobacterium*, što rezultira povećanom proizvodnjom etanola [18].

Iznimno, u procesima koji se provode pomoću hipertermofilnih bakterija poput *Pyrococcus furiosus* i *Thermotoga maritima* značajan prinos bioH_2 zabilježen je i pri temperaturama većim od 80 °C. U fotofermentacijskim procesima optimalna je temperatura oko 25 °C, budući da temperature iznad 30 °C imaju značajan inhibicijski utjecaj na enzim nitrogenazu ljubičastih nesumpornih bakterija koje su najčešće korišteni mikroorganizmi u tom procesu [40].

2.5.1.5 Utjecaj ostalih čimbenika na proizvodnju bioH_2

Osim već spomenutih utjecaja, postoji još cijeli niz ostalih čimbenika koji mogu utjecati na proces proizvodnje bioH_2 kao što su primjerice dodatak nanočestica, različitih nutrijenata, metalnih iona, intenzitet svjetlosti, itd. Dodatkom nanočestica površina adsorpcije elektrona znatno raste pri čemu se povećava aktivnost enzima što za posljedicu ima povećan prinos bioH_2 . Primjerice, dodavanjem 20 nmol/dm³ srebrenih nanočestica prinos bioH_2 se povećao za 67,6% u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj nanočestice nisu bile prisutne [40]. Prisutnost različitih nutrijenata i soli poput fosfora, dušika i sumpora može značajno utjecati na proces. Fosfatne soli djeluju kao katalizator, dok dušik i sumpor mogu imati i pozitivne i negativne učinke. Dušik služi kao nutrijent za rast bakterija, ali u prevelikim količinama u reakciji s vodikom daje amonijak (NH_3) što negativno utječe na pH ili može reagirati s kisikom stvarajući pri tome nitrite (NO_2^-) koji su toksični za mnoge mikroorganizme. Sumpor u obliku sulfata (SO_4^{2-}) iz procesnog prostora uklanja slabije elektron akceptore poput nitrata (NO_3^-) i nitrita (NO_2^-), ali redukcija sulfata (SO_4^{2-}) u sumporovodik (H_2S) tijekom fermentacije ima negativan utjecaj jer je sumporovodik toksičan za mnoge mikroorganizme [40].

U procesima fotofermentacije, intenzitet svjetlosti ima veliki utjecaj na proces, odnosno na aktivnost ljubičastih nesumpornih bakterija pri čemu te bakterije imaju najveći prinos na intenzitetu svjetlosti od 2500 do 5000 lx [15].

Dodavanje metalnih iona poput Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} i Fe-iona u tragovima također pospješuje reakcije tamne i foto fermentacije optimiziranjem djelovanja enzima i rasta mikroba [40].

3. Zaključak

BioH_2 se smatra gorivo budućnosti zbog svoje visoke energetske gustoće i niskih emisija, unatoč izazovima povezanim s infrastrukturom i visokom cijenom proizvodnje. Optimizacijom uvjeta provedbe procesa kao što su primjerice koncentracija supstrata, pH-vrijednost i temperatura, uz uključene metode predobrade supstrata i pravilan izbor radnih mikroorganizama, moguće je unaprijediti te procese uz postizanje većih prinosa te posljedično povećati ekonomske i ekološke prednosti proizvodnje i korištenja bioH_2 .

Projekcije za budućnost ukazuju na rast proizvodnje bioH_2 , razvoj infrastrukture i poboljšanja u ekonomičnosti i održivosti. S obzirom na globalne inicijative za smanjenje emisija stakleničkih plinova i sve veća ulaganja u obnovljive izvore energije, bioH_2 se ističe kao važan resurs za postizanje energetske održivosti.

Zahvala

Rad je izrađen u okviru projekta "Integrirani mikrosustav za enzimatsku proizvodnju biovodika (MicroBioH_2)" financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (IP-2022-10-2175).

4. Literatura

- [1] Canuto, E.; Mazza, D.: Fossil fuel reserves and depletion: can they comply with CO_2 -emission pledges and targets, *Academia Letters*, **2** (2022), <https://doi.org/10.20935/AL5005>
- [2] Jeswani, H. K.; Chilvers, A.; Azapagic, A.: Environmental sustainability of biofuels: a review, *Proceedings of the Royal Society A*, **476** (2020) 20200351, <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>
- [3] Vičević, R.; Šalić, A.; Jurinjak Tušek, A.; Zelić, B.: Kinetic modelling of *Ralstonia eutropha* H16 growth on different substrates, *Sustainability*, **16** (2024) 10650, <https://doi.org/10.3390/su162310650>

- [4] Mona, S.; Kumar, S. S.; Kumar, V.; Parveen, K.; Saini, N.; Deepak, B.; Pugazhendhi, A.: Green technology for sustainable biohydrogen production (waste to energy): a review, *Science of the Total Environment*, **728** (2020) 138481, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138481>
- [5] Dash, S. K.; Chakraborty, S.; Roccotelli, M.; Sahu, U. K.: Hydrogen fuel for future mobility: Challenges and future aspects, *Sustainability*, **14** (2022) 8285, <https://doi.org/10.3390/su14148285>
- [6] Xie, Z.; Jin, Q.; Su, G.; Lu, W.: A review of hydrogen storage and transportation: Progresses and challenges, *Energies*, **17** (2024) 4070, <https://doi.org/10.3390/en17164070>
- [7] Sharma, S.; Agarwal, S.; Jain, A.: Significance of hydrogen as economic and environmentally friendly fuel, *Energies*, **14** (2021) 7389, <https://doi.org/10.3390/en14217389>
- [8] Luo, Z.; Hu, Y.; Xu, H.; Gao, D.; Li, W.: Cost-economic analysis of hydrogen for China's fuel cell transportation field, *Energies*, **13** (2020) 6522, <https://doi.org/10.3390/en13246522>
- [9] Machado, H.; Ferreira, A.C.; Teixeira, S.F.; Teixeira, J.C.: Green hydrogen value chain: Modelling of a PV power plant integrated with H₂ production for industry application, *Energies*, **17** (2024) 1414, <https://doi.org/10.3390/en17061414>
- [10] Arcos, J. M. M.; Santos, D. M. F.: The hydrogen color spectrum: Techno-economic analysis of the available technologies for hydrogen production, *Gases*, **3** (2023) 25-46, <https://doi.org/10.3390/gases3010002>
- [11] Arun, J.; Sasipraba, T.; Gopinath, K. P.; Priyadharsini, P.; Nachiappan, S.; Nirmala, N.; Dawn, S. S.; Chi, N. T. C.; Pugazhendhi, A.: Influence of biomass and nanoadditives in dark fermentation for enriched bio-hydrogen production: A detailed mechanistic review on pathway and commercialization challenges, *Fuel*, **327** (2022) 125112, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125112>
- [12] Ahmed, S.; F., Rafa, N.; Mofijur M.; Badruddin, I. A.; Inayat, A.; Ali, M. S.; Khan Y. T. M.: Biohydrogen production from biomass sources: Metabolic pathways and economic analysis, *Frontiers in Energy Research*, **9** (2021) 753878, <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.753878>
- [13] Hutsol, T.; Glowacki, S.; Tryhuba, A.; Kovalenko, N.; Pustova, Z.; Rozkosz, A.; Sukmaniuk, O.: *Current Trends of Biohydrogen Production from Biomass–Green Hydrogen*, Libra-Print, Warsaw, (2021)
- [14] Sharma, R.; Garg, P.; Kumar, P.; Bhatia, S. K.; Kulshrestha, S.: Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods, *Fermentation*, **6** (2020) 106, <https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- [15] Sarangi, P. K.; Nanda, S.: Biohydrogen production through dark fermentation, *Chemical Engineering & Technology*, **43** (2020) 601-612, <http://dx.doi.org/10.1002/ceat.201900452>
- [16] Ghimire A.; Frunzo L.; Pirozzi F.; Trabaly E.; Escudie R.; Lens P. N. L.; Esposito G.: A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products, *Applied Energy*, **144** (2015) 73-95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- [17] Jarunglumlert, T.; Prommuak, C.; Putmai, N.; Pavasant, P.: Scaling-up bio-hydrogen production from food waste: Feasibilities and challenges, *International Journal of Hydrogen Energy*, **43** (2017) 634-648, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.10.013>

- [18] Albuquerque, M. M.; Sartor, G. d. B.; Martinez-Burgos, W. J.; Scapini, T.; Edwiges, T.; Soccol, C. R.; Medeiros, A. B. P.: Biohydrogen produced via dark fermentation: A review, *Methane*, **3** (2024) 500-532, <https://doi.org/10.3390/methane3030029>
- [19] AlZohbi, G.: An overview of hydrogen energy generation, *ChemEngineering*, **8** (2024) 17, <https://doi.org/10.3390/chemengineering8010017>
- [20] Gupta, S.; Fernandes, A.; Lopes, A.; Grasa, L.; Salafranca, J.: Photo-fermentative bacteria used for hydrogen production, *Applied Sciences*, **14** (2024) 1191, <https://doi.org/10.3390/app14031191>
- [21] Dębowski, M.; Dudek, M.; Zieliński, M.; Nowicka, A.; Kazimierowicz, J.: Microalgal hydrogen production in relation to other biomass-based technologies—a review, *Energies*, **14** (2021) 6025, <https://doi.org/10.3390/en14196025>
- [22] Pankaj, K. R.; Singh, S. P.: Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement, *International Journal of Hydrogen Energy*, **41** (2016) 19957-19971, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084>
- [23] Sharma, R. K.; Nazari, M. A.; Haydary, J.; Singh, T. P.; Mandal, S.: A review on advanced processes of biohydrogen generation from lignocellulosic biomass with special emphasis on thermochemical conversion, *Energies*, **16** (2023) 6349, <https://doi.org/10.3390/en16176349>
- [24] Pathy, A.; Nageshwari, K.; Ramaraj, R.; Maniam, G. P.; Govindan, N.; Balasubramanian, P.: Biohydrogen production using algae: Potentiality, economics and challenges, *Bioresource Technology*, **360** (2022) 127514, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127514>
- [25] Yang, E.; Mohamed, H. O.; Park, S. G.; Obaid, M.; Al-Qaradawi, S. Y.; Castaño, P.; Chae, K. J.: A review on self-sustainable microbial electrolysis cells for electro-biohydrogen production via coupling with carbon-neutral renewable energy technologies, *Bioresource technology*, **320** (2021) 124363, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124363>
- [26] Kovács, K. L.; Maróti, G.; Rákhely, G.: A novel approach for biohydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, **31** (2006) 1460-1468, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.011>
- [27] Leone, L.; Sgueglia, G.; La Gatta, S.; Chino, M.; Nastri, F.; Lombardi, A.: Enzymatic and bioinspired systems for hydrogen production, *International Journal of Molecular Sciences*, **24** (2023) 8605, <https://doi.org/10.3390/ijms24108605>
- [28] Ayodele, D. T.; Ogunbiyi, O. D.; Akamo, D. O.; Otun, K. O.; Akinpelu, D. A.; Adegoke, J. A.; Fapojuwo, D. P.; Oladoye, P. O.: Factors affecting biohydrogen production: Overview and perspectives, *International Journal of Hydrogen Energy*, **48** (2023) 27513-27539, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.04.001>
- [29] Bowien, B.; Kusian, B.: Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*, *Archives of Microbiology*, **178** (2002) 85-93, <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0441-3>
- [30] Lubitz, W.; Ogata, H.; Rüdiger, O.; Reijerse, E.: Hydrogenases, *American Chemical Society*, **114** (2014) 4081-4148, <https://doi.org/10.1021/cr4005814>

- [31] Sohn, Y.J.; Son, J.; Jo, S.Y.; Park, S.Y.; Yoo, J.I.; Baritugo, K.A.; Na, J.G.; Choi, J.; Kim, H. T.; Joo, J.C.; Park, S.J.: Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review, *Bioresource Technology*, **340** (2021) 125693, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125693>
- [32] Li, H.; Opgenorth, P. H.; Wernick, D. G.; Rogers, S.; Wu, T. Y.; Higashide, W.; Liao, J. C.: Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols, *Science*, **335** (2012) 1596-1596, <https://doi.org/10.1126/science.1217643>
- [33] Poladyan, A.; Blbulyan, S.; Sahakyan, M.; Lenz, O.; Trchounian, A.: Growth of the facultative chemolithoautotrophy *Ralstonia eutropha* on organic waste materials: Growth characteristics, redox regulation and hydrogenase activity, *Microbial Cell Factories*, **18** (2019) 201, <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1251-5>
- [34] Fritsch, J.; Lenz, O.; Friedrich, B.: Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases, *Nature Reviews Microbiology*, **11** (2013) 106-114, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2940>
- [35] Momirlan, M.; Veziroglu, T. N.: The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet, *International Journal of Hydrogen Energy*, **30** (2005) 795-802, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.10.011>
- [36] Vignais, P. M.; Billoud, B.: Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview, *Chemical Reviews*, **107** (2007) 4206-4272, <https://doi.org/10.1021/cr050196r>
- [37] Hoekstra, A. S.; Bayley, J. P.: The role of complex II in disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1827** (2013) 543-551, <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2012.11.005>
- [38] Shima, S.; Pilak, O.; Vogt, S.; Schick, M.; Stagni, M. S.; Meyer-Klaucke, W.; Warkentin, E.; Rhauer, R. K.; Ermler, U.: The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site, *Science*, **321** (2008) 572-575, <https://doi.org/10.1126/science.1158978>
- [39] Peters, H. W.; Schut, G. J.; Boyd, E. S.; Mulder, D. W.; Shepard, E. M.; Broderick, J. B.; King, P. W.; Adams, M. W. W.: [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1853** (2015) 1350-1369, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.021>
- [40] Kanwal, F.; Torriero, A.A.J.: Biohydrogen—a green fuel for sustainable energy solutions, *Energies*, **15** (2022) 7783, <https://doi.org/10.3390/en15207783>