

Biološki procesi proizvodnje biovodika

Bubalo, Patrik

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:350152>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Patrik Bubalo

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJEPOVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE
ISPITE

Kandidat Patrik Bubalo

doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskoginženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu
Fakultetkemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Martina Sudar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskoginženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultetkemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog
rada predpovjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 22. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Patrik Bubalo

BIOLOŠKI PROCESI PROIZVODNJE BIOVODIKA

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc.dr.sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. doc. dr. sc. Martina Sudar
3. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Zagreb, rujan 2023.

SAŽETAK

Biovodik (bioH_2) je vodik proizveden održivim i ekološki prihvatljivim biološkim procesima koji uključuju mikroorganizme poput bakterija i algi. Jedan od najpoznatijih bioloških procesa za proizvodnju bioH_2 je fermentacija. Tijekom fermentacije bakterije razgrađuju organsku tvar (šećer ili celuloza) u anaerobnim uvjetima proizvodeći pri tome bioH_2 kao metabolički nusprodukt. Sama proizvodnja bioH_2 privukla je pažnju kao potencijalni obnovljivi izvor energije jer se bioH_2 može proizvesti iz organskih materijala poput poljoprivrednog otpada, otpadnih voda ili biomase. Obzirom na način proizvodnje, bioH_2 se smatra čistim i održivim izvorom energije što ga čini konkurentnim tradicionalnim izvorima energije. BioH_2 , uz to što se može koristiti kao gorivo, je i vrijedna sirovina u proizvodnje električne energije, pročišćavanju vode te proizvodnji amonijaka i gnojiva, sinteze metanola i polimera, rafiniranju nafte (hidrokreking i hidroobrada), proizvodnji farmaceutika itd.

U okviru ovog završnog rada napravljen je literaturni pregled bioloških procesa proizvodnje bioH_2 kao obnovljivog i alternativnog izvora energije.

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

SUMMARY

Biohydrogen (BioH₂) is hydrogen produced by sustainable and environmentally friendly biological processes involving microorganisms such as bacteria and algae. One of the best-known biological processes for BioH₂ production is fermentation. During fermentation, bacteria break down organic material (such as sugar or cellulose) under anaerobic conditions, producing BioH₂ as a metabolic byproduct. The production of BioH₂ has attracted attention as a potential renewable energy source because it can be produced from organic material such as agricultural waste, wastewater, or biomass. Because of the production method, BioH₂ is considered a clean and sustainable energy source that can compete with conventional energy sources. In addition to its use as a fuel, BioH₂ is a valuable resource for electric power generation, water treatment, ammonia and fertilizers production, methanol and polymer synthesis, petroleum refining (hydrocracking and hydrotreating), pharmaceutical production, and more.

This final thesis includes a literature review of biological processes for the BioH₂ production as a renewable and alternative energy source.

Key words: Biohydrogen, biofuel, biowaste, biomass, enzymes

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Opći dio	3
2.1 Vodik - gorivo za budućnost	3
2.2 Boje vodika, usporedba cijena i utjecaj na okoliš	4
2.3 Biovodik.....	10
2.3.1 Čimbenici koji utječu na proizvodnju bioH₂.....	12
2.3.1.1 Utjecaj predobrade sirovina na proizvodnju bioH ₂	12
2.3.1.2 Utjecaj koncentracije supstrata na proizvodnju bioH ₂	13
2.3.1.3 Utjecaj pH vrijednosti na proizvodnju bioH ₂	13
2.3.1.4 Utjecaj temperature na proizvodnju bioH ₂	13
2.3.1.5 Utjecaj prisutnosti nanočestica na proizvodnju bioH ₂	14
2.3.1.6 Utjecaj ostalih čimbenika na proizvodnju bioH ₂	14
2.4 Biološke metode proizvodnje bioH₂.....	15
2.4.1 Fermentacija	15
2.4.1.1 Tamna fermentacija.....	15
2.4.1.2 Fotofermentacija.....	19
2.4.1.3 Kombinacija tamne fermentacije i fotofermentacije	21
2.4.2. Biofotolize	22
2.4.2.1 Izravna biofotoliza.....	23
2.4.2.2 Neizravna biofotoliza	24
2.4.3 Mikrobna elektroliza	27
2.5 Budućnost proizvodnje bioH₂.....	29
3 Zaključak	32
4 Popis literature	33

1. Uvod

Iscrpljivanjem rezervi fosilnih goriva i rastućim izazovima vezanim uz klimatske promjene, sve je veća potreba za povećanjem raznolikosti izvora goriva i energije. Ako u obzir uzmemo nastavak trenda rasta populacije i najoptimističniju procjenu maksimalnih preostalih rezervi fosilnih goriva prema modelu Canuta i Mazze [1], do 2200. godine fosilnih goriva za masovnu potrošnju će ponestati. Osim toga, Protokol iz Kyota i Pariški protokoli pozivaju na korištenje čistih, zelenih i obnovljivih izvora energije u budućnosti kako bi se negativni utjecaji na okoliš koji su posljedica pridobivanja, prerade i korištenja fosilnih goriva smanjili. Biogoriva (bioetanol, biodizel, biovodik itd.) se smatraju ekološki i ekonomski prihvatljivom alternativom fosilnim gorivima [2]. Upotrebom biogoriva smanjuju se emisije ugljičnog dioksida i ostalih štetnih plinova te stabiliziraju cijene energije, a uz to, što je u današnje vrijeme iznimno važno, korištenje biogoriva čini mnoge zemlje neovisnima o velikim proizvođačima fosilnih goriva. Jednim od najperspektivnijih alternativnih energetska rješenja smatra se vodik. Vodik praktički ne postoji u prirodi u slobodnom obliku, ali se može proizvesti kemijskim i biološkim procesima. Glavni nedostaci kemijskih metoda proizvodnje vodika su veliki investicijski i ukupni troškovi, velika specifična potrošnja energije i niska učinkovitost procesa. Kako bi se prevladali navedeni problemi te ekološki i ekonomski opravdao i unaprijedio proces proizvodnje vodika, biološki procesi postaju sve zastupljenija alternativa kemijskim procesima. Proces koji se najčešće koristi za proizvodnju bioH₂ su anaerobna fermentacija, fotofermentacija i mikroba elektroliza. Obzirom da su mikroorganizmi odgovorni za proizvodnju, učinkovitost navedenih procesa najvećim dijelom ovisi o metaboličkim putevima. Zbog toga je iznimno važno odabrati dobar mikroorganizam. Osim mikroorganizama, drugi ključan čimbenik je izbor supstrata, pri čemu je važno da je supstrat bogat ugljikohidratima. Danas se u proizvodnji bioH₂ najviše pažnje posvećuje lignoceluloznoj biomasi te otpadnim vodama [3]. Nažalost, proces proizvodnje bioH₂ je i dalje složen i dugotrajan što utječe na cijenu samog proizvoda te bioH₂ još uvijek ne može konkurirati kemijskim procesima proizvodnje vodika. Kako bi se prevladali svi nedostaci i u budućnosti bioH₂ učinili konkurentnim biogorivom važno je istraživati nove metode, sirovine, mikroorganizme, reaktore itd.

U ovom radu analizirani su i uspoređeni biološki procesi proizvodnje bioH₂. Kroz detaljno razmatranje procesa, njihovih čimbenika i održivosti, te projekcija za budućnost, ovaj rad

nastoji pridonijeti sveobuhvatnom razumijevanju potencijala bioH₂ kao ključnog faktora u tranziciji prema čistim i održivim izvorima energije.

2. Opći dio

2.1 Vodik - gorivo za budućnost

Vodik je još od druge polovice 20. stoljeća, kad ga je američka svemirska agencija NASA počela koristiti kao raketno gorivo [4] smatran jednim od goriva budućnosti s najvećim potencijalom. Razlog tome je prije svega velika specifična energija vodika (142 MJ/kg), pri čemu je specifična energija koja nastaje u gorivnim ćelijama koje koriste vodik kao energent 2,75 puta veća od one koja nastaje izgaranjem goriva na bazi ugljikovodika (Tablica 1). Trenutno ga, s obzirom na sve širu upotrebu, koja stalno nastavlja rasti, možemo početi nazivati i gorivom sadašnjosti. Korištenje vodika kao goriva ima brojne prednosti od kojih su najznačajnije, osim spomenute visoke energetske gustoće, niska emisija štetnih plinova, mogućnost brzog punjenja gorivnih ćelija, pohrana viškova energije i općenito univerzalnost primjene [5].

Tablica 1. Usporedba goriva prema specifičnoj energiji i emisijama [6]

Gorivo	Energetska gustoća, MJ/kg	Emisije CO₂, kg CO₂/kg goriva
Vodik	141,9	0*
Prirodni plin	54	2,34
Benzin	47	3,13
Dizel	45	3,24
Etanol	29,7	2,5
Drvo	15	1,81

***podatci se odnose na tzv. zeleni vodik**

Uz prethodno navedene prednosti korištenja vodika kao energenta, treba uzeti u obzir i probleme povezane s njegovom primjenom. Vodik je izrazito zapaljiv i eksplozivan plin koji može biti opasan u slučaju curenja i nestručnog rukovanja, no, iako značajan, ovo je vrlo rijedak problem s obzirom na rigorozne sigurnosne standarde postavljene za rukovanje njime. Osim toga, najveći nedostatak vodika kao goriva je trenutno i nedostatak infrastrukture za širu uporabu. Da bi se vodik počeo masovno koristiti za potrebe transporta ili proizvodnje struje velika je potreba za izgradnjom novih punionica i distribucijskih sustava [5]. Zbog veličine molekule, najveći izazovi rukovanja s vodikom su povezani s njegovim skladištenjem i transportom jer se mora držati pod visokim tlakovima ili niskim temperaturama. U konačnici i

već spomenuta cijena proizvodnje, a posljedično i visoka cijena vodika na tržištu u usporedbi s današnjim komercijalnim gorivima je jedan od glavnih nedostataka korištenja vodika.

Kao što je već navedeno, vodik nije zanimljiv samo sa gledišta biogoriva nego se on danas upotrebljava u različitim industrijskim procesima poput proizvodnje amonijaka i gnojiva, sinteze metanola i polimera, rafiniranju nafte (hidrokreking i hidroobrada), proizvodnji farmaceutika, itd., pri čemu se procjenjuje da se 55% proizvedenog vodika koristi za proizvodnju amonijaka. Udio vodika koji se u ovom trenutku upotrebljava kao energent razmjerno je mali u odnosu na ostala područja primjene. Međutim u strateškom planu Europske unije iz 2018. planirano je da se udio vodika u ukupnoj energetskej potrošnji s 2% podigne na 13-14% do 2050. Za postizanje tog cilja u danom vremenskom intervalu su predviđena ukupna ulaganja od strane Europske unije u rang od 180 do 470 milijardi eura [7].

Vodik se može proizvesti različitim kemijskim i biološkim metodama. Kao najveći nedostaci kemijskih metoda proizvodnje vodika spominju se veliki investicijski i ukupni troškovi, velika specifična potrošnja i niska učinkovitost procesa te visoki negativni utjecaj na okoliš. Zbog toga se trenutno radi na razvoju ekološki prihvatljivih procesa proizvodnje vodika koji bi jednog dana potencijalno bili konkurentni kemijskim metodama.

Kako bi se prevladali navedeni problemi te ekološki i ekonomski opravdao i unaprijedio proces proizvodnje vodika, intenzivno se radi na poboljšanju postojećih i razvoju novih tehnologija i procesa, pri čemu biološki procesi postaju sve zastupljenija alternativa kemijskim procesima. Jedna od mogućnosti je i proizvodnja bioH₂ o kojem će više biti rečeno u nastavku rada.

2.2 Boje vodika, usporedba cijena i utjecaj na okoliš

Budući da je vodik najobilniji element na Zemlji, dostupan je i obnovljiv. Glavni nedostatak široke promjene vodika je to što se on prirodno ne pojavljuje kao molekula, pa se mora proizvoditi iz različitih izvora. Vodik se može proizvesti različitim termodinamičkim, elektrokemijskim i biološkim procesima, kao što su elektroliza, piroliza, reformiranje nafte, plinifikacija, fotofermentacija, tamna fermentacija, itd., i iz različitih izvora kao što su prirodni plin, ugljen, obnovljiva električna energija, biomasa, itd.. Izbor metode proizvodnje vodika ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući dostupne sirovine, energetske potrebe, ekonomske faktore i okolišne aspekte. S razvojem tehnologija za proizvodnju "zelenog"

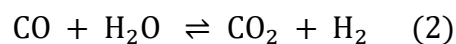
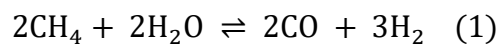
vodika, tj. vodika proizvedenog koristeći obnovljive izvore energije i bez emisija stakleničkih plinova, postaju sve važniji postupci koji minimiziraju ekološki utjecaj.

Kako bismo razlikovali vodik proizveden različitim postupcima, dodjeljuju mu se različite boje (Slika 1). Klasifikacija vodika po bojama može varirati ovisno o istraživanju [8], ali glavne boje su zelena, plava, siva i tirkizna. Do prije nekoliko godina, 95% svjetski proizvedenog vodika bio je sivi vodik proizveden parnom reformacijom metana (SMR), autotermalnom reformacijom (ATR) prirodnog plina i djelomičnom oksidacijom (POX) ugljena ili teške nafte. Svaki od tih procesa proizvodi plin koji je mješavina H_2 i CO koji mora proći daljnji postupak pročišćavanja kako bi se iz njega uklonio ugljikov monoksid, što rezultira značajnom proizvodnjom CO_2 koji se ispušta u atmosferu. Budući da su emisije stakleničkih plinova iz tog procesa vrlo visoke (oko 530 Mt/g), neobnovljivi izvori se iscrpljuju, a ovaj proces je energetski vrlo zahtjevan, provode se istraživanja u cilju pronalaženja alternativnih procesa. Zbog toga postaju sve važnije drugi postupci proizvodnje vodika, tj. proizvodnja tzv. plavog, tirkiznog i posebno zelenog vodika. Osnovna ideja je koristiti obnovljive izvore energije (OIE) u kombinaciji s energetski učinkovitim tehnologijama za proizvodnju vodika u procesu s niskim emisijama stakleničkih plinova. Kada se CO_2 uhvati i pohrani kao dio SMR procesa, vodik koji se proizvodi naziva se plavi vodik. Emisije stakleničkih plinova iz ovog procesa su niske, ali samo ako se uhvaćeni CO_2 trajno pohrani. U nastavku teksta biti će više riječi o različitim bojama tj. metodama proizvodnje vodika.



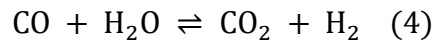
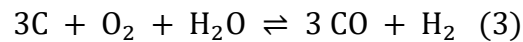
Slika 1. Boje vodika

Sivi vodik: Sivi vodik je vodik proizveden iz fosilnih goriva i trenutno je daleko najzastupljeniji na globalnom tržištu zbog svoje niske cijene i relativne lakoće proizvodnje. Proizvodi se tzv. SMR (engl. *Steam Methane Reforming*) metodom, odnosno reakcijom vodene pare s prirodnim plinom prema jednadžbama (1) i (2):



Reakcija je katalizirana visokom temperaturom koja se povećava od 700 do 1000 °C. Iako ovaj proces rezultira visokim emisijama ugljičnog dioksida (9 -12 t CO₂/t H₂) trenutno na tržištu ne postoji niti jedan način proizvodnje koji mu cijenom konkurira (0,67-1,31\$/kg [8]). Trenutno, oko 6% globalne potrošnje prirodnog plina otpada na proizvodnju sivog vodika.[9].

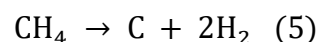
Crni/smeđi vodik: Crni ili smeđi vodik je vodik koji se proizvodi uplinjavanjem crnog ili smeđeg ugljena. Nakon sivog, najzastupljeniji je tip vodika na globalnom tržištu. Tokom njegove proizvodnje također nastaju značajne količine ugljikovog monoksida i ugljikovog dioksida, kao što je vidljivo prema reakcijama proizvodnje (Jednadžbe (3) i (4)):



Iako je velika količina emisije štetnih plinova ozbiljan ekološki problem, prednost ovog tipa vodika je isto niska cijena. Naime za proizvodnju kilograma vodika iz ugljena treba izdvojiti od 1,2\$ do 2\$, ovisno o tržišnoj cijeni ugljena [8].

Plavi vodik: Plavi vodik je izraz koji se upotrebljava za vodik proizveden iz prirodnog plina. Sami proces proizvodnje odgovara procesu proizvodnje sivog odnosno smeđeg vodika uz veliku razliku tj. procese se provodi korištenjem tzv. CCS (engl. *Carbon Capture and Storage*) procesnih jedinica za hvatanje CO₂ tokom procesa [10]. Ako se CO₂ uhvati i pohrani, emisije CO₂ iz procesa postaju niske, što proces čini ekološki prihvatljivijim u usporedbi s procesom proizvodnje sivog vodika. CCS jedinice su jako vrijedne u industrijama gdje se dobiveni CO₂ dalje iskorištava kao sekundarna sirovina i zbog toga postaje sve popularnija tehnologija. Prema međunarodnoj agenciji za energiju (–engl. *International Energy Agency*) cijena kilograma proizvedenog vodika iz fosilnih goriva primjenom sustava za hvatanje CO₂ doseže 1,2-2,1 \$/kg, dok cijena kilograma vodika proizvedenog uplinjavanjem ugljena doseže iznos od 2,1-2,6 \$/kg [11]. Ipak, unatoč rastu cijene, ukupno smanjenje emisije CO₂ prelaskom sa sivog na plavi vodik iznosi 9-12%.

Tirkizni vodik: Tirkizni vodik je vodik proizveden pirolitičkim odvajanje prirodnog plina na plinoviti vodik i kruti ugljik prema reakciji (Jednadžba (5)):

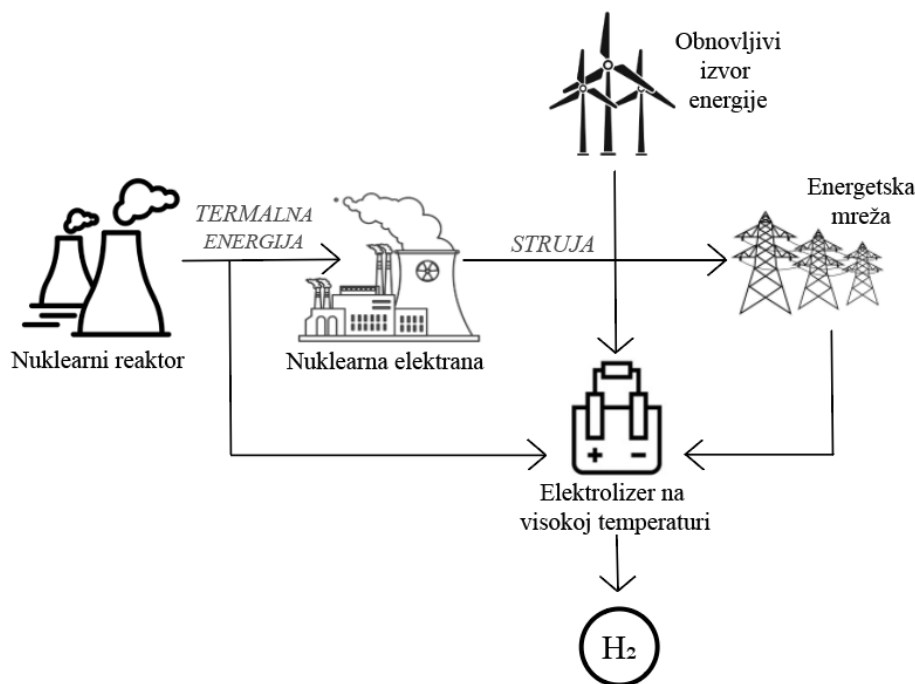


Nazvan je tirkiznim jer se proces proizvodnje nalazi između plavog i zelenog vodika. Iako je proces relativno ekološki prihvatljiv i dalje koristi prirodni plin kao glavnu sirovinu te se zbog toga ne može smatrati potpuno zelenim procesom [10]. Zagađenje uzrokovano

proizvodnjom tirkiznog vodika je uvelike ovisno o izvoru dovedene energije, odnosno električne struje koja uzrokuje raspad prirodnog plina, kao i izvoru prirodnog plina korištenog u procesu. Prosječna cijena mu je oko 2 \$/kg ovisno o tržišnoj cijeni prirodnog plina, dok je procijenjeno da se na kilogram proizvedenog vodika proizvede oko 2,6 kg CO₂ [8].

Zeleni vodik: Zeleni vodik je vodik proizveden iz obnovljivih izvora energije, poput solarnih panela, vjetroelektrana ili hidroelektrana, procesom elektrolize vode. Elektroliza vode strujom dobivenom iz obnovljivih izvora i fotokatalitičko razdvajanje vode na TiO₂ elektrodi su primjeri zelenih metoda proizvodnje vodika [10]. Iako je količina tako proizvedenog vodika trenutno na globalnom tržištu vrlo mala zbog svoje visoke cijene, ove metode proizvodnje postaju sve popularnije razvijanjem novih metoda proizvodnje i izradom sve više elektrolizera i gorivnih ćelija zbog malih implikacija na okoliš. Prosječna cijena proizvodnje zelenog vodika elektrolitskim putem iz obnovljivih izvora iznosi 5 \$/kg [13], a cijene se razlikuju prema metodama proizvodnje, trenutno u rasponu od 2,28 \$/kg do 7,39 \$/kg [8].

Rozi/ljubičasti/crveni vodik: Rozi vodik je vodik proizveden elektrolizom vode koristeći nuklearnu energiju kao vanjski izvor energije [14]. Prednost ove metode je mogućnost kombiniranja s drugim metodama zbog visokih temperaturama koje se postižu u nuklearnim reaktorima kao na Slici 2.



Slika 2. Hibridni sustav nuklearne i obnovljive energije za dobivanje struje i vodika [15]

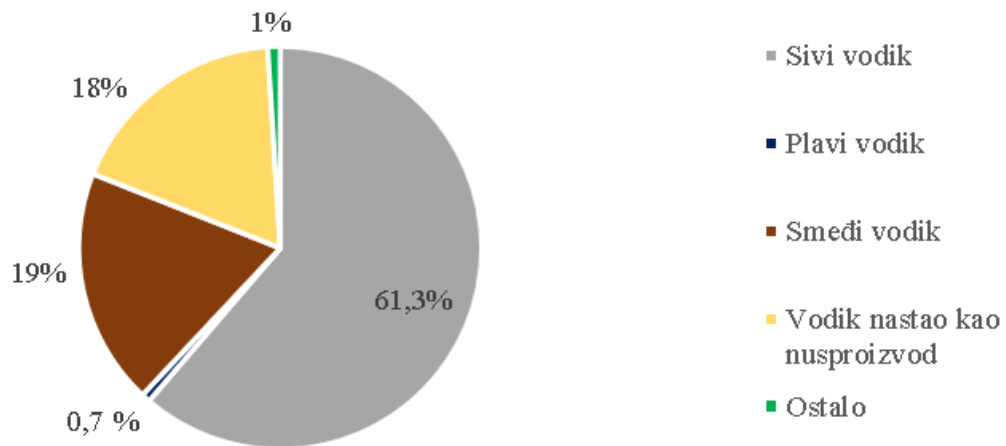
Žuti vodik: Žuti vodik je, kao i rozi, vodik proizveden elektrolitski, ali on kao izvor energije koristi struju iz energetske mreže, tako da su emisije ovisne o izvorima struje koju sama energetska mreža koristi. [14]

Cijene žutog i rozog vodika je teško odrediti zbog izrazito promjenjivog stanja na energetskom tržištu, ali u pravilu su oko 2,18-5,92 \$/kg za rozi, a čak 6,06-8,81 \$/kg za žuti vodik [8].

Bijeli/narančasti vodik: Bijeli i narančasti vodik je vodik pronađen kao slobodni plin u zemljinoj kori. Iako je izrazito reaktivan, procjenjuje se da oko 20 Mt vodika godišnje iz zemljine kore izlazi u atmosferu [16]. Može se naći i u vulkanskim plinovima, gejzirima i hidrotermalnim sustavima. Iako nije još sasvim dokazano, mišljenje je da je nastao reakcijom vode s ultrabazičnim stijinama [8]. Teško je procijeniti količinu vodika u zemljinoj kori, ali u svakom slučaju ovo je metoda proizvodnje s velikim potencijalom jer nema emisija, nije skupa, i nema potrebe za novom infrastrukturom. Budući da je jedan od novijih načina dobivanja i ovisi o količini rezervi vodika na nekom mjestu prosječna cijena dobivanja bijelog vodika još nije poznata.

Trenutna situacija na tržištu vodika ima izrazite implikacije na okoliš što se vidi analizom globalne potrošnje po proizvodnom postupku. Udjeli ukupno proizvedenog vodika prema načinu proizvodnje vidljivi su na slici 1. Više od 80% vodika proizvodi se iz neobnovljivih izvora, a u 2021. za proizvodnju ukupno 94 Mt H₂ globalno, emisije CO₂ su iznosile oko 900 Mt [20]. Velike količine vodika, čak 18% ukupne proizvodnje, nastaju kao nusproizvod u procesu rafinacije nafte, dok se trenutno manje od 2% vodika globalno proizvodi iz obnovljivih izvora (Slika 3).

Globalna proizvodnja vodika prema postotku 2021.



Slika 3. Globalna proizvodnja H₂ iz različitih izvora izražena postotkom ukupne proizvodnje u 2021. godini [20]

Osim spomenutih vrsta vodika, postoje i neki tipovi koji još nisu dobili određenu boju. Razlog tome je činjenice da su ove tehnologije proizvodnje još uvijek u fazi razvoja i istraživanja, i trebat će neko vrijeme prije nego što dostignu razinu razvoja današnjih tehnologija. Jedna od takvih metoda je upotreba biomase i proizvodnja bioH₂.

2.3 Biovodik

Proizvodnja bioH₂ novo je polje istraživanja te mu zbog toga još nije dodijeljena boja. Ipak, boje koje se spominju u kontekstu opisa bioH₂ su *srebrna* zbog odsustva emisije štetnih plinova, *zlatna* zbog hvatanja CO₂ i čak *platinasta* [17]. Izrazita prednost bioH₂ je korištenje otpadnih bioloških sirovina za proizvodnju vodika što rezultira s vrlo malo zagađenja, čak i rješava dio problema skladištenja biološkog otpada. Ovakav način proizvodnje u teoriji gotovo i da nema negativnih ekoloških strana. Međutim, veliki problem proizvodnje bioH₂ je visoka cijena proizvodnje, niske konverzije supstrata, nisko iskorištenje na produktu i produktivnosti. Smatra se da bi proizvodnja bioH₂ bila ekonomski opravdana kada bi konverzija supstrata bila 60-80%. Ipak, sa svakim novim istraživanjem i poboljšavanjem postojećih metoda, projekcija je [18] 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 [19] što je među većim cijenama proizvodnje H₂ (Tablica 3).

Tablica 2. Projekcije cijena bioH₂ i prirodnog plina od 2019. do 2050. izražene u \$/kg [18]

Indikator	Period		
	2019	2030	2050
Matematički očekivana tržišna cijena bioH ₂	3,55	1,95	1,15
Matematički očekivana tržišna cijena prirodnog plina	2,4	2,4	2,15

Tablica 3. Procjena cijena i emisija tijekom proizvodnje vodika prema boji [8]

Boja	cijena, \$/kgH ₂	emisije, kgCO ₂ /kgH ₂
Sivi	0,67-1,31	8,5
Crni/smeđi	1,2-2	20
Plavi	0,99-2,05	1-2
Tirkizni	2,0	2,6
Zeleni	2,28-7,39	0
Rozi	2,18-5,92	0
Žuti	6,08-8,81	*
Biovodik	1,42-7,61	0

*Emisije žutog vodika teško procijeniti s obzirom da su ovisne o individualnim emisijama energetskih mreža

2.3.1 Čimbenici koji utječu na proizvodnju bioH₂

Kao što je već napomenuto, nekoliko je procesa koji se koriste za proizvodnju bioH₂, kao što su anaerobna fermentacija (tamna fermentacija), fotofermentacija i mikrobná 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 o kojem ovisi učinkovitost procesa proizvodnje bioH₂ je izbor supstrata, pri čemu je važno da je supstrat bogat ugljikohidratima. Osim njih predobrada sirovina/supstrata, koncentracija supstrata, početne pH vrijednosti u reaktoru, temperatura, prisutnost nanočestica i drugi čimbenici, igraju važnu ulogu u optimizaciji procesa proizvodnje bioH₂. Razumijevanje ovih čimbenika, odabir ispravne metode, sirovine i mikroorganizama te definiranje optimalnih uvjeta ključni su za učinkovitu proizvodnju bioH₂.

2.3.1.1 Utjecaj predobrade sirovina na proizvodnju bioH₂

Upotreba jednostavnih šećera kao supstrata (glukoza i saharoza) u proizvodnji bioH₂ relativno je dobro istražena, a danas se sve više pozornosti posvećuje lignoceluloznoj biomasi kao održivom, obnovljivom i jeftinom supstratu. U većini slučajeva lignoceluloza se sastoji od celuloze (33-40%), hemiceluloze (20-25%) i lignina (15-20%), a smatra se jednom od najvažnijih sirovina za proizvodnju biogoriva zbog svoje cijene i dostupnosti. Većina lignocelulozne biomase nastaje kao otpad iz poljoprivredne, prehrambene i drvne industrije. Iako proizvodnja bioH₂ iz lignocelulozних materijala kao sirovina ima brojne prednosti, još nije komercijalizirana. Prvenstveno je to stoga što korištenje lignocelulozних materijala kao sirovina za proizvodnju bioH₂ zahtijeva njihovu obradu koja uključuje tri faze: prethodnu obradu, hidrolizu i po potrebi, pročišćavanja nastalih hidrolizata kako bi se iz njih uklonile komponente koje mogu imati negativan utjecaj na biološke procese proizvodnje bioH₂. Proces hidrolize lignoceluloze može se podijeliti na tri vrste i to alkalna, kisela i ultrazvučno-potpomognuta hidroliza. Alkalna hidroliza se provodi 6 sati, pri pH 12 i nakon nje nastale koncentracije bioH₂ su 206 puta veće u usporedbi s procesom u kojem je proizvodnja provedena na materijalu bez predobrade [21]. Kisela hidroliza se provodi 12 sati pri pH 2 i utrostručuje proizvodnju H₂ [22]. Nedostatak oba procesa je potreba za velikom količinom kemikalija za hidrolizu i neutralizaciju pH. S druge strane, ultrazvučno-potpomognuta hidroliza povećava prinos bioH₂ za 75-88%, ali cijena opreme i potrošnja energije tijekom

obrade otežava komercijalizaciju ove metode [23]. Predgrijavanje ($t = 90 \text{ min}$, $T = 90 \text{ °C}$) se također pokazalo uspješnom metodom predobrade za ubrzavanje reakcija nastanka bioH_2 .

2.3.1.2 Utjecaj koncentracije supstrata na proizvodnju bioH_2

Početna koncentracija supstrata ima značajnu ulogu u mnogim procesima pa tako i u proizvodnji bioH_2 . Previsoke početne koncentracije često imaju inhibitorni učinak na radni mikroorganizam što se negativno odražava na sam proces. Kako bi se umanjio negativni učinak, nekoliko je pristupa. Prvi je smanjiti koncentraciju samog supstrata, drugi je provoditi procese korištenjem šaržnih reaktora s dotokom ili dodatkom bakterija, poput *Enterobacter aerogenes* u proces [24].

2.3.1.3 Utjecaj pH vrijednosti na proizvodnju bioH_2

Tijekom fermentacije često dolazi do smanjenja pH vrijednosti reakcijske smjese, a smanjenje pH uzrokuje smanjenje brzine proizvodnje bioH_2 . Primjerice, početna pH vrijednost manja od 5 rezultira prepolovljenom brzinom proizvodnje bioH_2 u odnosu na neutralnu početnu vrijednost pH. Kako bi se ovaj negativni utjecaj izbjegao, početni pH se u procesima podešava između pH 6 i pH 7 dodatkom jakih lužina ili kiselina, ovisno o početnim uvjetima [25]. U procesu proizvodnje bioH_2 pomoću algi uočeno je da kada se proces provodi pri pH 6, prinos bioH_2 se povećava za minimalno 2,4% u odnosu na isti proces koji je vođen pri drugim pH vrijednostima [24].

2.3.1.4 Utjecaj temperature na proizvodnju bioH_2

Obzirom na prisutnost radnog mikroorganizma i temperatura ima značajan utjecaj na proizvodnju bioH_2 . Tako je npr. tokom procesa tamne fermentacije pokazano da prisutnost termofilnih bakterija povećava prinos bioH_2 u odnosu na procese koji su vođeni s mezofilnim bakterijama. Stoga je u tim procesima nešto viša temperatura, u intervalu od 30 do 55 °C rezultirala većim prinosom bioH_2 [25]. Iznimno, u procesima koji se provode pomoću hipertermofilnih bakterija poput *Pyrococcus furiosus* i *Thermotoga maritima* značajan prinos bioH_2 zabilježen je i pri temperaturama višim od 80 °C. U fotofermentacijskim procesima optimalna je temperatura oko 25 °C, budući da temperature iznad 30 °C imaju veliki inhibicijski utjecaj na hidrogenazu ljubičastih nesumpornih bakterija koje su najčešće korišteni mikroorganizmi u tom procesu [24].

2.3.1.5 Utjecaj prisutnosti nanočestica na proizvodnju bioH₂

Nanotehnologija je sve prisutnija u svim granama kemijske industrije zbog svojih brojnih prednosti uzrokovanih specifičnim svojstvima čestica na nano skali. Zbog njihove vrlo velike specifične površine dodatkom malog broja nanočestica površina adsorpcije elektrona znatno raste, povećavajući pritom aktivnost enzima što kao posljedicu ima povećan prinos bioH₂. Osim toga, nanočestice mogu poboljšati učinkovitost hidrolize, razlaganje celuloze i kontrolu temperature i kiselosti [26]. Dodavanjem 20 nmol/L srebrenih nanočestica prinos bioH₂ se povećao za 67,6% u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj nisu bile prisutne. Bitno je naglasiti i da povećanje koncentracije nanočestica u istom procesu nije dovelo do značajne razlike u prinosu bioH₂. Procesi sinteze nanočestica su često kompleksni, ali u proizvodnji bioH₂ mogu se upotrebljavati nanočestice od različitih materijala (Au, Ag, Cu, Ni, Fe, ZnO, Pd, Ti, ugljikove nanocjevčice i aktivni ugljen), kao i nanočestice sintetizirane različitim postupcima (biološke, fizikalne, kemijske) [24].

2.3.1.6 Utjecaj ostalih čimbenika na proizvodnju bioH₂

Osim već spomenutih utjecaja, postoji još cijeli niz ostalih čimbenika koji mogu utjecati na proces. Njihov utjecaj prvenstveno ovisi o metodi proizvodnje i odabiru sirovina. Tako npr. prisutnost različitih nutrijenata i soli poput fosfora, dušika i sumpora može značajno utjecati na proces. Fosfor, ako je prisutan u obliku fosfatnih soli djeluje kao katalizator, dok dušik i sumpor imaju pozitivne i negativne utjecaje. Dušik služi kao nutrijent za rast bakterija, stvaranje većeg broja enzima i tako utječe na veći prinos bioH₂. Međutim, u prevelikim količinama u reakciji s vodikom daje amonijak (NH₃) što negativno utječe na pH ili reagira s kisikom stvarajući pri tome nitrite (NO₂⁻) koji su toksični za mnoge mikroorganizme. Sumpor u obliku sulfata (SO₄²⁻) djeluje kao elektron akceptor u anaerobnim procesima i tako iz procesnog prostora uklanja slabije elektron akceptore poput nitrata (NO₃⁻) i nitrita (NO₂⁻). Redukcija prevelike količine sulfata (SO₄²⁻) u sumporovodik (H₂S) tijekom fermentacije ima negativan utjecaj jer je i sumporovodik toksičan za mnoge mikroorganizme [24].

Intenzitet svjetlosti ima veliki utjecaj na procese fotofermentacije, odnosno na aktivnost ljubičastih nesumpornih bakterija. Takve bakterije najveći prinos imaju na intenzitetu od 2500 do 5000 lx [27]. Optimalan izvor svjetla su LED žarulje zbog svoje valne duljine (770-920 nm) na kojoj je aktivitet ljubičastih nesumpornih bakterija najbolji, a i zbog najbolje iskoristivosti s obzirom na cijenu i dugovječnost.

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 [24].

2.4 Biološke metode proizvodnje bioH₂

Biološke metode proizvodnje bioH₂ uključuju procese anaerobne (tamne) fermentacije, fotofermentacije, izravne i neizravne biofotolize, i mikrobnu elektrolizu. U usporedbi s proizvodnjom crnog/sivog vodika, proizvodnja bioH₂ je znatno čišća i ekološki održivija zbog nižih emisija CO₂, a i procesi su manje energetski zahtjevni. Osim toga, u ovim procesima se kao supstrat koriste obnovljivi izvori energije što ih čini posebno zanimljivima. Biološki procesi proizvodnje bioH₂ danas su dobro poznati i istraženi međutim ono što je novo, i što predstavlja veliki izazov je kako razviti industrijski održivi proces proizvodnje bioH₂. Kao što je već rečeno, konverzija supstrata i prinos su vrlo niski u ovim procesima, a smatra se kako bi proces bio ekonomski opravdan kad bi konverzija supstrata dostigla 60–80%

2.4.1 Fermentacija

Fermentacija je biološki proces u kojem mikroorganizmi poput bakterija, gljiva i kvasaca koriste različite kemijske reakcije za razgradnju organskih supstrata, obično ugljikohidrata, i pretvaraju ih u druge tvari, obično alkohole, kiseline ili plinove. Ovaj proces može se dogoditi bez prisustva kisika (anaerobna fermentacija) ili u prisutnosti kisika (aerobna fermentacija). Kada govorimo o proizvodnji bioH₂ proces fermentacije se provodi korištenjem anaerobnih ili fototrofnih bakterija. Zbog toga razlikujemo anaerobnu (tamnu) fermentaciju i fotofermentaciju ali i kombinaciju tih procesa. Ovaj proces proizvodnje bioH₂ je i najčešće korišten i najbolje istražen od svih metoda biološke proizvodnje bioH₂ zbog jednostavnosti [25]. Prednosti ovakvih procesa su mogućnost korištenja biootpada kao sirovine i velika selektivnost prema bioH₂. Glavni nedostatak je mali prinos bioH₂ u odnosu na teoretski mogući i nešto viša potrošnja energije od ostalih bioloških procesa.

2.4.1.1 Tamna fermentacija

Tamna fermentacija, također poznata kao anaerobna fermentacija je biološki proces u kojem mikroorganizmi, obično bakterije, razgrađuju organske materijale u odsustvu kisika. Ovaj proces naziva se "tamnom" fermentacijom jer se odvija bez svjetla, za razliku od fotosinteze

koja zahtijeva svjetlo. Tijekom tamne fermentacije, mikroorganizmi razgrađuju različite organske supstrate, poput šećera, celuloze ili drugih ugljikohidrata, i pretvaraju ih u različite produkte, uključujući kiseline, alkohole, plinove i bioH₂. Bakterije koje se najčešće upotrebljavaju za proizvodnju bioH₂ pripadaju skupinama anaeroba (*Clostridia, archae*), fakultativnih anaeroba (*Escherichia coli*) i aeroba (*Alcalligenes, Bacillus*). Upotreba jednostavnih šećera kao supstrata (glukoza i saharoza) u proizvodnji bioH₂ relativno je dobro istražena, a danas se sve više pozornosti posvećuje lignoceluloznoj biomasi kao održivom, obnovljivom i jeftinom supstratu. U većini slučajeva lignoceluloza se sastoji od celuloze (33-40 %), hemiceluloze (20-25 %) i lignina (15-20 %), a smatra se jednom od najvažnijih sirovina za proizvodnju biogoriva zbog svoje cijene i dostupnosti. Većina lignocelulozne biomase nastaje kao otpad iz poljoprivredne, prehrambene i drvne industrije [28].

Tablica 4. Usporedba prinosa bioH₂ za različite supstrate i mikroorganizme [25]

Mikroorganizam	Supstrat	Prinos bioH₂ po potrošnji supstrata
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	Hidrolizat kore krumpira	3,4 mol/mol
<i>Clostridium butyricum</i>	Hidrolizat vlakana šećerne trske	1,73 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

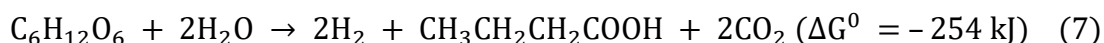
Iako proizvodnja bioH₂ iz lignoceluloznih materijala kao sirovina ima brojne prednosti, još nije komercijalizirana. Prvenstveno je to stoga što korištenje lignoceluloznih materijala kao sirovina za proizvodnju bioH₂ zahtijeva njihovu obradu koja uključuje tri faze:

prethodnu obradu, hidrolizu i po potrebi, pročišćavanja nastalih hidrolizata kako bi se iz njih uklonile komponente koje mogu imati negativan utjecaj na biološke procese proizvodnje bioH₂ [29]. Jednom kada se dobiju jednostavni šećeri, proces fermentacije može započeti. U prvom koraku bakterije razlažu monosaharide stvarajući pri tome pirogrožđanu kiselinu (CH₃COCOOH) i piruvat (CH₃COCOO⁻) koji se daljnjim djelovanjem enzima hidrogenaze i piruvat oksidoreduktaze razlažu na plinovite CO₂ i H₂ te kapljevit acetil koenzim A (acetil CoA). Acetil CoA je intermedijar koji prelazi u etanol, acetatnu kiselinu ili butansku kiselinu (Slika 4). Dobiveni spojevi su vrijedne sekundarne sirovine. Osim spomenutih plinova (CO₂ i H₂) u tragovima su prisutni i CO i CH₄. Optimalni procesni uvjeti tamne fermentacije su temperature od 30 do 55 °C i početna vrijednost pH od 6 do 7. Prinos bioH₂ tamnom fermentacijom se može predvidjeti proučavajući metaboličke puteve mikroorganizama i temeljem početne koncentracije šećera u fermentacijskom mediju. Tri metabolička puta koja daju najbolji prinos tamnoj fermentaciji prikazani su sljedećim jednadžbama (Jednadžbe (6)-(9)):

Heksoza u acetatnu kiselinu:



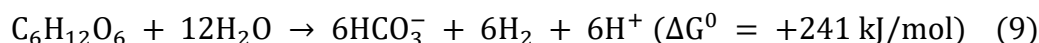
Heksoza u butansku kiselinu:



Heksoza u acetat i etanol

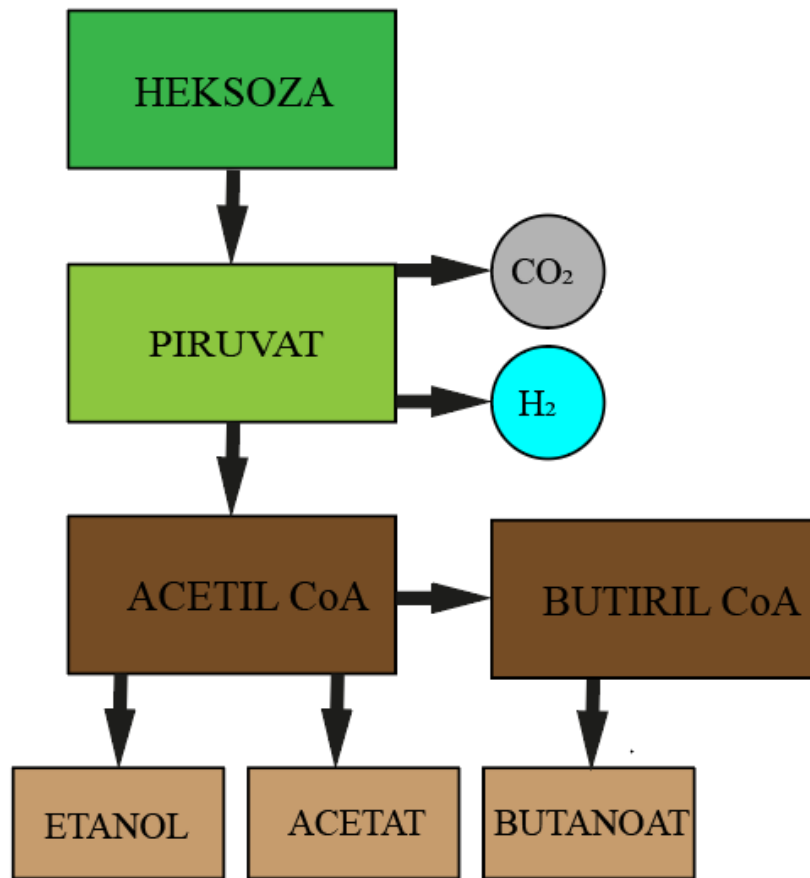


$$(\Delta G^0 = -97 \text{ kJ/mol}) \quad (8)$$



Zbog pozitivne ukupne Gibbsove energije ($\Delta G^0 = +241 \text{ kJ/mol}$) u niti jednom procesu se ne ostvaruje 100% konverzija biomase u bioH₂. S acetatnom kiselinom kao glavnim produktom (jednadžba (6)) nastaju 4 mola bioH₂, dok s butanskom kiselinom (jednadžba (7)) nastaju 2 mola bioH₂ za svaki mol utrošene heksoze. Teoretski najveći prinos tamnom fermentacijom nastaje potpunom oksidacijom heksoze, koja rezultira s 12 mol bioH₂

i 6 mol CO₂. Ipak, u praksi se procesom fermentacije najčešće dobiva 1 do 2,5 bioH₂/mol glukoze.



Slika 4. Shema reakcija nastanka vodika tamnom fermentacijom

Nedostatak tamne fermentacije je rezultirajući bioplin, koji je mješavina CO₂ i bioH₂. Da bi se dobio bioH₂, CO₂ se mora ukloniti kako ne bi dospio u atmosferu. Osim toga, tamna fermentacija je brža u usporedbi s drugim procesima, ali količina proizvedenog bioH₂ je mala, jer se tijekom procesa proizvodi mnogo drugih nusproizvoda. Kao što je već rečeno osim CO₂, mogu se proizvesti različite kiseline (masna kiselina, mliječna kiselina i octena kiselina), alkoholi (metanol, butanol), aceton, te plinovi poput metana i vodikovog sulfida.

Kako bi se prevladali postojeći problemi, istražuju se novi pristupi proizvodnji bioH₂ postupkom tamne fermentacije kao što su primjena mikroreaktora, nanočestica i metalnih aditiva.

Mikroreaktori, pripadaju relativno novim tehnologijama upotreba kojih bi mogla prevladati neke od poznatih nedostataka konvencionalnih bioreaktora. Veliki omjer površine i

volumena, kratki difuzijski putevi, laminarno strujanje, brz i učinkovit prijenos tvari i topline, neke su od glavnih prednosti mikroreaktorskih sustava koji se uspješno koriste u području (bio)kemijske sinteze i u industrijskoj proizvodnji. U usporedbi s reakcijama koje se provode u konvencionalnim reaktorskim sustavima, reakcije provedene u mikroreaktorima u pravilu rezultiraju većim konverzijama i produktivnostima, što je prvenstveno povezano s učinkovitim prijenosom tvari i topline u tim sustavima. Primjena različitih mikroreaktorskih sustava za intenziviranje kemijskih procesa proizvodnje vodika bila je predmet brojnih istraživanja, a dobiveni rezultati pokazuju da je uporaba mikrotehnologije opravdana s aspekta konverzije i produktivnosti. U proizvodnji bioH₂ navedeno se može iskoristiti integracijom mikromješala, kojima se dodatno unaprjeđuje prijenos tvari u sustavu, ili mikroseparatora, za separaciju vodika od ostalih plinova koji u procesu nastaju. Do sada su mikroreaktori korišteni u WGS (engl. *Water–Gas Shift*) reakciji za podešavanje omjera H₂/CO u plinovitoj smjesi produkata, te za proizvodnju bioH₂ iz ugljikovodika, alkohola i supstrata kao što su amonijak i dimetil eter. Primjena mikrostrukturiranih uređaja u biološkim procesima nije ograničena samo na neposrednu proizvodnju bioH₂ već se može koristiti kod pretraživanja mikroorganizama, potencijalnih proizvođača bioH₂, te za optimizaciju procesnih uvjeta i reakcijskog medija, što posljedično utječe na učinkovitost proizvodnog procesa [30].

Kombiniranjem nanotehnologije s metalnim aditivima, kao u primjeru monomera NZVI (engl. *Nano-Zero-Valent Iron*) pokazalo se da je učinkovitost tamne fermentacije dodatkom 200 mg/L NZVI čak 6,5 puta veća od one u kontrolnoj grupi bez aditiva[31].

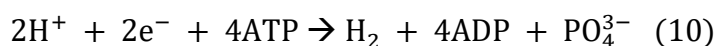
2.4.1.2 Fotofermentacija

Fotofermentacija je biološki proces proizvodnje bioH₂ iz biomase djelovanjem svjetlosti kao izvora energije. Proces uključuje upotrebu različitih fotosintetskih mikroorganizama poput zelenih algi i cijanobakterija te ljubičaste nesumporne bakterije). Glavni enzimi odgovorni za proces proizvodnje bioH₂ tokom fotosinteze su nitrogenaza i hidrogenaza.

Tablica 5. Usporedba prinosa bioH₂ na hidrolizatu kukuruzne stabljike korištenjem različitih bakterija [32]

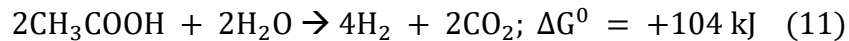
Mikroorganizmi	Supstrat	Prinos bioH ₂ po potrošnji supstrata
Smjesa mikroorganizama (kompost od kravljeg gnojiva)	Kukuruzna stabljika	92,9 mL/g
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	Kukuruzna stabljika	80,3 mL/g
<i>Clostridium thermocellum</i> i <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Kukuruzna stabljika	68,2 mL/g
<i>Clostridium butyricum</i>	Kukuruzna stabljika	40,6 mL/g

Najučinkovitija metoda proizvodnje bioH₂ je anaerobna fotofermentacija pomoću enzima nitrogenaze koja se može opisati sljedećom reakcijom (Jednadžba (10)):



Reakcijom adenzin trifosfata (ATP) s vodikovim ionima i elektronima nastaju bioH₂ i adenzin difosfat (ADP) te fosfatna skupina (PO₄³⁻). ATP je molekula koja je u živim bićima istoznačna s energijom. Nastaje u mitohondrijima i kloroplastima i služi kao stanično gorivo za obavljanje svih životnih funkcija uključujući stanično disanje i fotosintezu. Sve zelene organske sirovine koje obavljaju fotosintezu, uključujući alge, cijanobakterije i biljke su bogata skladišta ATP-a što znači i da su potencijalno dobre sirovine za fotofermentaciju. Stvaranjem anaerobnih uvjeta u procesu, stanice umjesto kisika koriste vodikove ione i elektrone kao sredstvo za razlaganje ATP-a, stvarajući pri tome plinoviti H₂. Optimalni uvjeti za provedbu ovog procesa (jednadžba (10)) su pH od 6,8 do 7,5, temperatura od 30 do 35 °C i intenzitet svjetlosti 6-6000 lx.

Fotofermentacija s ciljem proizvodnje bioH₂ se može provoditi i koristeći acetat kao organsku tvar i ljubičaste nesumporne bakterije prema reakciji (jednadžba (11)):



Ovaj postupak rezultira većim prinosom bioH₂ po molu utrošene sirovine, ali kao negativnu posljedicu ima nastanak CO₂ [33]. Kao što je slučaj i kod tamne fermentacije, ključno pitanje fotofermentacije je na koji način povećati učinkovitost procesa i podići prinos bioH₂ na razinu kompetitivnu s drugim metodama. Prvi pristup rješavanju tog pitanja je poboljšati metode predobrade sirovina te optimirati procesne uvjete. Drugi pristup je dodatak mikronutrijenata poput željeza, mangana, nikla i molibdena koji poboljšavaju rast mikroorganizama [34]. Konačno, treći pristup je kombinacija procesa pri čemu prinos bioH₂ može značajno porasti.

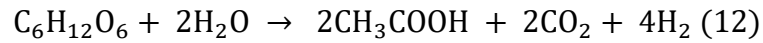
2.4.1.3 Kombinacija tamne fermentacije i fotofermentacije

Fermentacijski proces koji trenutno donosi najbolji prinos bioH₂ je kombinirana fermentacija tj. kombinacija tamne fermentacije i fotofermentacije, koja se može provoditi kao dvostupanjski slijedni proces ili kao jednostupanjski proces. U dvostupanjskom slijednom procesu, prvi stupanj obično je tamna fermentacija. U drugom stupnju, kiseline koje se proizvode kao nusproizvodi u tamnoj fermentaciji koriste se kao supstrat za proizvodnju bioH₂ putem fotofermentacije. Nedostatak ovog procesa je potreba za dva reaktora i pretretmanom prije fotofermentacije. Kada se kombinirani proces provodi kao jednostupanjska fermentacija, koristi se samo jedan bioreaktor. Glavni izazov u ovom procesu je stvaranje uvjeta prikladnih za oba tipa bakterija, one koje sudjeluju u tamnoj fermentaciji i one koje sudjeluju u fotofermentaciji.

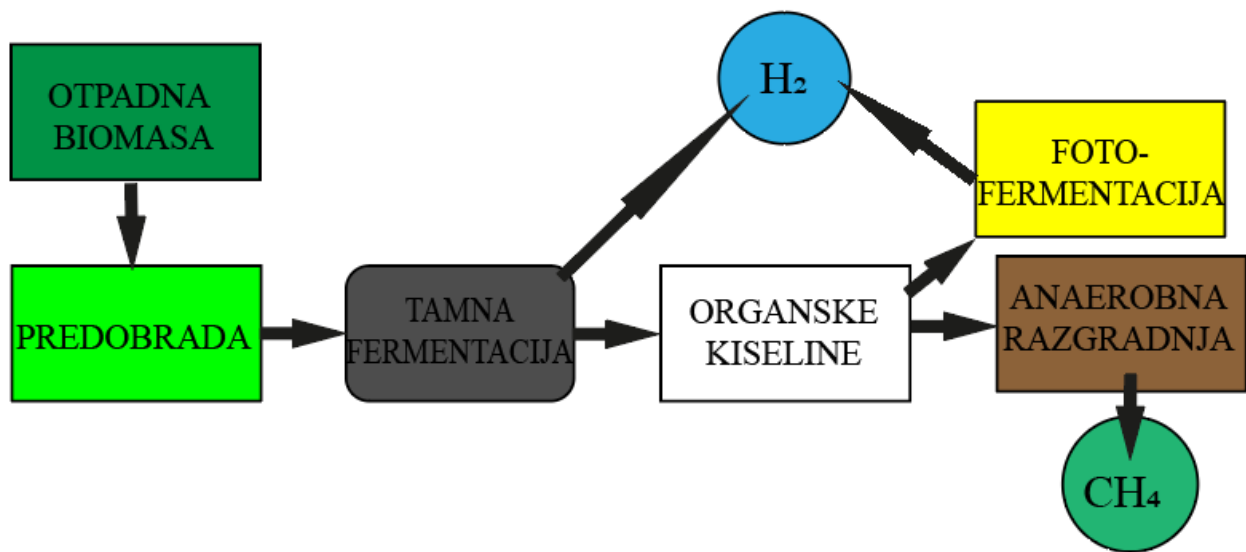
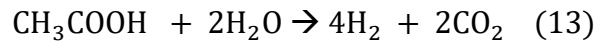
U kombinirani fermentacijski proces se mogu integrirati i još neki procesi, primjerice proces stvaranje biometana anaerobnom razgradnjom organskih kiselina kao što je prikazano na Slici 5.

Kombiniranjem metoda teoretski prinos iznosi 12 mol H₂/mol glukoze. Stvarni dobiveni prinos je niži od toga ali je veći od prinosa pojedinačnih procesa i ovisan o korištenim supstratima i bakterijama[25].

Slijedna fermentacija može se prikazati na sljedećem primjeru. U prvom koraku, u procesu tamne fermentacije iz heksoze nastaje octena kiselina, bioH₂ i CO₂ (jednadžba (12)) i odvija se bez svjetlosti



U sljedećem koraku fotofermentacijom iz octene kiseline nastaju dodatni CO₂ i bioH₂ (jednadžba (13)).



Slika 5. Shematski prikaz integrirane tamne fermentacije i fotofermentacije

2.4.2. Biofotolize

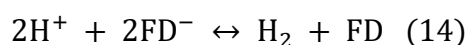
Biofotoliza ulazi u skupinu fotofermentacija, a temelji se na proizvodnji bioH₂ iz vode i različitih sirovina, uglavnom koristeći zelene alge (Slika 6) i cijanobakterije. Biofotolizu možemo podijeliti na izravnu i neizravnu biofotolizu.



Slika 6. Primjer solarnog fotobioreaktora za proizvodnju biovodika iz algalne biomase [36]

2.4.2.1 Izravna biofotoliza

Izravna (direktna) fotoliza koristi se za pretvaranje vode u bioH_2 i O_2 u prisutnosti svjetla i CO_2 . Proces se odvija u dvije faze. Prva faza je svjetlosna reakcija stvaranja ATP-a, nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) te nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u prisutnosti svjetla. Druga faza je reakcija u tami, tj. potrošnja NADH, NADPH te ATP-a za redukciju CO_2 u organske tvari. Za ovaj proces ključan je enzim RuBisCo, odnosno rubiloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza. U prvoj fazi (Slika 7A) fotosinteze kao i biofotolize se elektroni prenose duž lanca sastavljenog od PS II (PS II – fotosustav II), plastokinona, citokrom b6 kompleksa, fotocijanina, PS I (PS I – fotosustav I) i konačno ferodoksina koji služi kao redukcijsko sredstvo. PS I i PS II su molekule sastavljene od kompleksnih pigmenata za pohranu svjetlosti. U procesu fotosinteze ferodoksin se oksidira prilikom redukcije NADP^+ u NADPH, dok se kod izravne biofotolize ferodoksin oksidira prilikom redukcije vodikovih iona u vodik uz pomoć enzima hidrogenaze (Slika 7B). Redoks reakcija ferodoksina i vodikovih iona glasi [35] (jednadžba (14)):



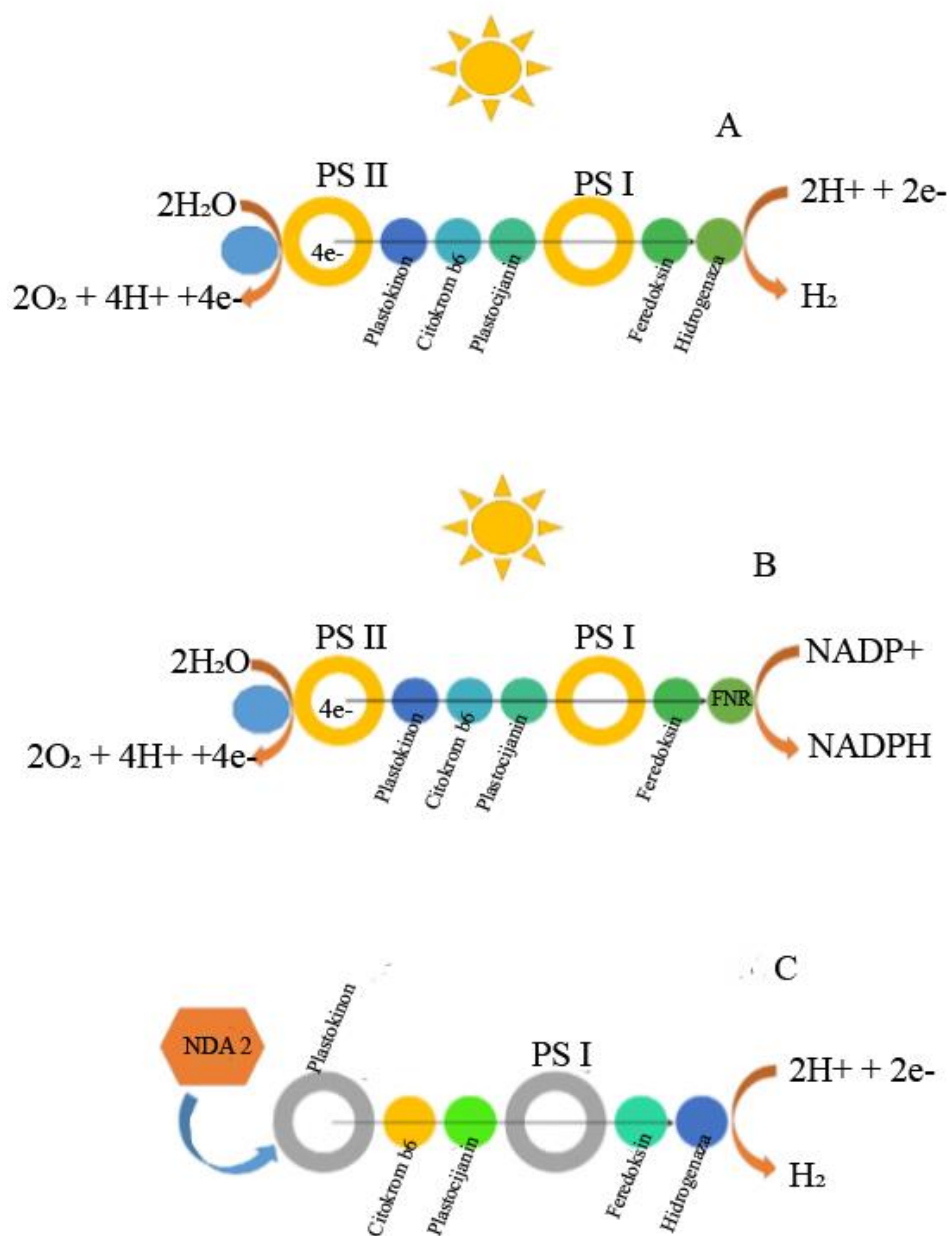
odnosno ukupna reakcija izravne biofotolize je glasi (jednadžba (15)):



Izravna biofotoliza se mora odvijati u anaerobnim uvjetima, s konstantnim odvođenjem dobivenog kisika iz procesnog prostora. Kisik se mora odvoditi zato što je u aerobnim uvjetima energetski povoljniji proces fotosinteza, dakle stvaranje bioH₂ prestaje.

2.4.2.2 Neizravna biofotoliza

Kod neizravne fotolize postoji dvije različite faze. U prvoj fazi, CO₂ i H₂O pretvaraju se u organske proizvode i O₂ u prisustvu cijanobakterija. U drugoj fazi, organski proizvodi koji su nastali pretvaraju se od strane cijanobakterija u bioH₂, CO₂ i druge metabolite. Odnosno, elektroni koji reduciraju vodikove ione do enzima hidrogenaze dolaze iz fermentativnih rezervi ugljikohidrata i organskih tvari nastalih fiksacijom ugljika. Skladišni polisaharidi, npr. škrob se razlažu fermentacijskim mehanizmom ostavljajući višak elektrona koji se dostavlja bazenu plastikinona, zaobilazeći PS II. Nastavkom fermentacije se troši kisik, a linearni transport se duž lanca prema hidrogenazi nastavlja preko PS I i ferodoksina kao na slici 7C. Primjerice alge *Chlamidomonas reinhardtii* se koriste fermentacijskim enzimima poput piruvatne dekarboksilaze (PDC 1), piruvatne ferodoksinke okidoreduktaze (PFR 1) i laktatne dehidrogenaze, i enzimom NADH dehidrogenaza tip 2 za redukciju plastikinonskog bazena.



Slika 7. Lanac prijenosa elektrona do hidrogenaze za A – izravnu fotolizu, B – fotosintezu i C – neizravnu fotolizu [35]

Najveći prinos bioH_2 u ovom 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, suplementacije mikronutrijentima, i dodavanja aktivnih nanočestica pozitivno djeluju na procese biofotolize [37].

Glavni nedostaci biofotolize općenito su stvaranje O₂, što može inhibirati postojeće mikroorganizme, i stvaranje eksplozivne smjese O₂ i H₂. Osim toga, indirektna fotoliza zahtijeva inhibiciju hidrogenaza kako bi se spriječila razgradnja bioH₂.

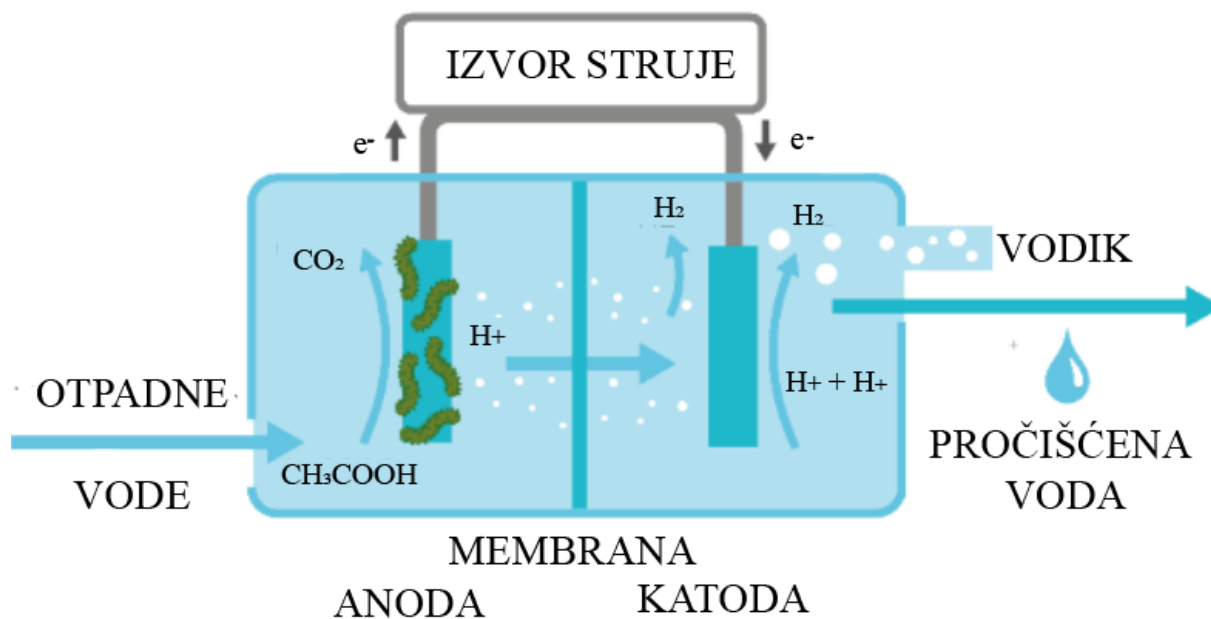
U Tablici 6. dana je usporedba različitih procesa fermentacija.

Tablica 6. Prednosti i nedostaci korištenja nekih mikroorganizama te načina proizvodnje [38]

Mikroorganizam	Način pretvorbe	Prednosti (+) i mane (-):
Fermentacijske bakterije	Tamna fermentacija:	+ Širok raspon sirovina
	$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 6CO_2 + 12H_2$	+ Dobivanje vrijednih nusprodukata:
	Piruvat + CoA \rightarrow Acetil-CoA + format	butanska i octena kiselina
	Piruvat + CoA \rightarrow Acetil-CoA + CO ₂	- Potrebni izvori C i N za rast -Nastanak CO ₂ -Problem stvaranja otpadnih voda
Zelene alge	Izravna biofotoliza:	+ Proizvodnja H ₂ iz vode i svjetla
	$2H_2O + \text{svjetlost} \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$	+ Visoka konverzija solarne energije
	$4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2$	+ Smanjenje CO ₂ u okolišu
	Fotofermentacija:	-Proizvodnja H ₂ inhibirana kisikom
	$6CO_2 + 12H_2O \rightarrow 6O_2 + C_6H_{12}O_6$ $6H_2 + C_6H_{12}O_6 \rightarrow 12H_2 + 6CO_2$	
Cijanobakterija	Izravna biofotoliza:	+ Proizvodnja H ₂ iz vode i svjetla
	$2H_2O + \text{svjetlost} \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$	+ Smanjenje CO ₂ u okolišu
	$4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2$	- Hidrogenaza troši H ₂
	Neizravna biofotoliza:	-Proizvodnja H ₂ inhibirana kisikom
	$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2$ + 16ADP + 16Pi	
	$8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 4H_2 + 16ADP + 16Pi$	
	$12H_2O + 6CO_2 \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$ $C_6H_{12}O_6 + 6H_2 \rightarrow 6CO_2 + 12H_2$	
Fotosintetske bakterije	Fotofermentacija:	+ Široki raspon izvora svjetla
	$CH_3COOH + 2H_2O + \text{svjetlost} \rightarrow 4H_2$ + 2CO ₂	+Širok raspon sirovina
	$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2$ + 16ADP + 16Pi	-Problem stvaranja otpadnih voda -Potrebna svjetlost za proizvodnju H ₂

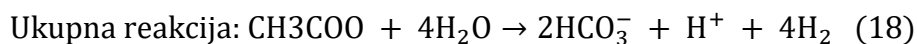
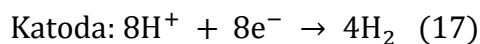
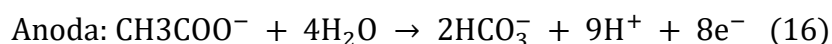
2.4.3 Mikrobna elektroliza

BioH₂ se može proizvoditi i u elektrokemijskim sustavima korištenjem tehnologije mikrobnih elektrokemijskih ćelija (engl. *Microbial Electrochemical Cells*). Proces je kombinacija mikrobnog metabolizma i elektrokemije. U ovom procesu odabrani soj ili mješavina sojeva pretvara organski materijal u CO₂, elektrone i protone (H⁺). Generirani elektroni prenose se na anodu, dok H⁺ ostaje u elektrolitskom rješenju. Pod utjecajem vanjskog električnog kruga, elektroni se premještaju s katode na anodu, gdje se kombiniraju s H⁺ kako bi se proizveo bioH₂. MEC sustavi imaju puno potencijala, ne samo za proizvodnju H₂, nego i za pročišćavanje vode i zraka, budući da kao sirovinu mogu koristiti otpadnu vodu i CO₂. Ovakvi elektrokemijski sustavi, za razliku od crvenog i žutog vodika ne koriste elektrolizu vode kao vodeću reakciju procesa, nego procese anodne biokatalitičke oksidacije te katodne redukcije. Potrošnja energije iz vanjskih izvora (teoretski > 0,14 V), bitno je manja od one potrebne za elektrolizu vode (> 1,2 V) [39]. Iako je teoretski potreban napon > 0,14 V, u praksi je za učinkovitu proizvodnju bioH₂ potreban prenapon od > 0,6 V [40]. Sami proces se odvija rastom elektrogenih mikroorganizama na anodi pri čemu se razgrađuju organske tvari. Mikroorganizmi razgradnjom organske tvari otpuštaju elektrone koji kroz elektrolit putuju prema katodi gdje reduciraju vodikove ione. Redukcijom vodikovih iona nastaje plinoviti bioH₂. Između katode se često nalaze separatori, odnosno ion-izmjenjujuće membrane koje služe za sprječavanje miješanja anolita i katolita, a pomažu i u sprječavanju miješanja supstrata i produkta [40]. Kao i kod prethodnih metoda postoje mnoge sirovine koji se mogu koristiti u ovom procesu. Jedan od primjera je oksidacija acetata iz otpadne vode u kojem se uz paralelnu proizvodnju bioH₂ pročišćava otpadna voda (slika 8.)



Slika 8. Shematski prikaz proizvodnje bioH₂ uz pročišćavanje vode u MEC [41]

Spomenuti proces može se opisati sljedećim jednadžbama (Jednadžba (16)-(18)):

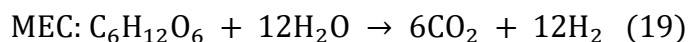


Potencijal katode u reakciji iznosi -0,414 V, a potencijal anode iznosi -0,300 V prema standardnoj vodikovoj elektrodi. Uvrštavanjem ovih vrijednosti u Nernstovu jednadžbu možemo predvidjeti hoće li se reakcija odvijati spontano a, ukoliko neće, može se izračunati koliki minimalni napon trebamo narinuti izvana da bi se reakcija odvijala.

$$E_{MEC} = E_{KATODE} - E_{ANODE} = (-0,414 \text{ V}) - (-0,300 \text{ V}) = -0,114 \text{ V}$$

Na spomenutom primjeru, budući da je potencijal ćelije negativan i iznosi -0,114 V, potrebno je iz vanjskog izvora struje narinuti napon od minimalno 0,114 V za pokretanje reakcije razvijanja bioH₂.

Promatrajući reakcije nastanka vodika iz glukoze možemo usporediti prinose procesa s MEC i procesa tamne fermentacije (jednadžbe (19) i (20)):



Uspoređujući teoretski prinose vodika po molu glukoze vidimo da je MEC proces čak 4 puta efikasniji od tamne fermentacije [39].

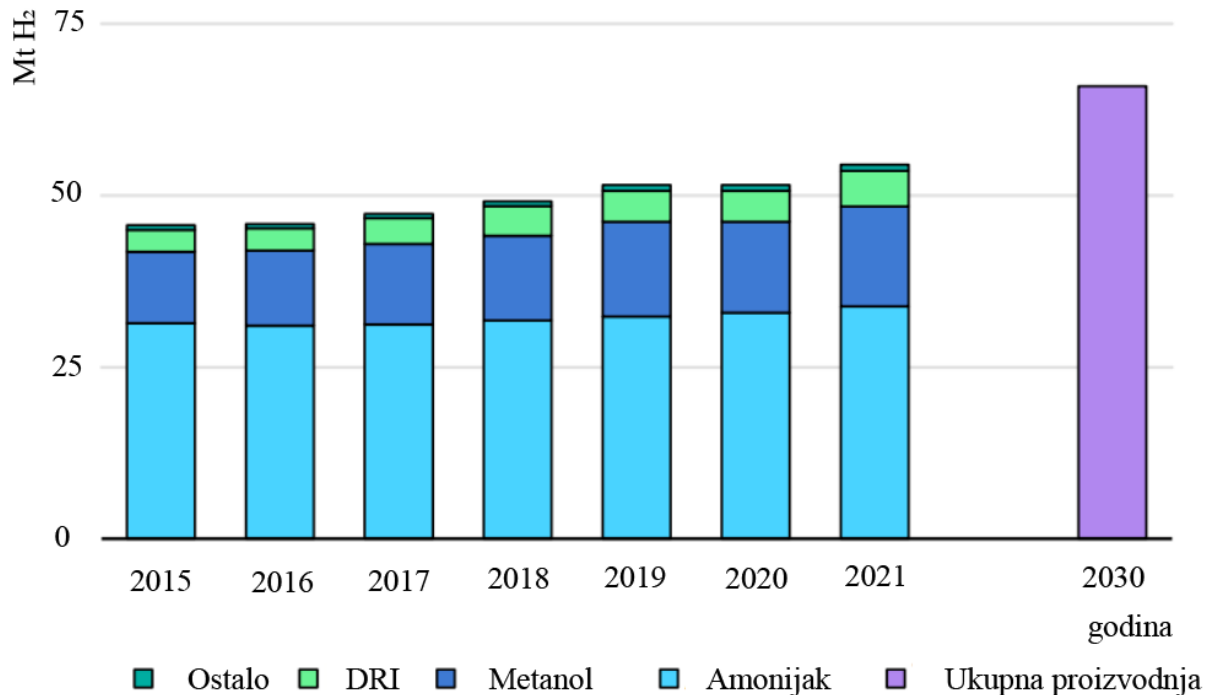
MEC je još uvijek nova tehnologija u usporedbi s drugim procesima proizvodnje bioH₂. Stoga je potrebno riješiti mnoge nedostatke i prepreke. Prije svega, trošak proizvodnje mora se smanjiti, mehanizam prijenosa elektrona mora biti potpuno razumljiv, metanogena aktivnost mora se smanjiti, treba odabrati elektrodni materijal koji je jeftin, ali učinkovit, treba odabrati mikroorganizme za postizanje visokog prinosa itd. Kao katodni materijal najbolje je istražena platina zbog vrlo dobre katalitičke aktivnosti, ali ona nije održiv materijal za ovakve procese zbog visoke cijene, kratkog vijeka i brzog trovanja kationima. Velika prednost MEC sustava je mogućnost njihovog kombiniranja i s MFC (-engl. *microbial fuel cells*) sustavima mikrobnih gorivnih ćelija za vrlo efikasno pročišćavanje voda i proizvodnju bioH₂ i električne energije. MFC sustavi mogu djelovati kao „vodikovi motori“ koji koriste metaboličku aktivnost ugljikohidrata za proizvodnju vodika i struje. MFC sustavi imaju mogućnost pročišćavanja vode do čistoće od najmanje 50% pa do 98%, mogu proizvesti oko 30 W struje po m² izmjene i oko 1 m³ vodika dnevno[42].

2.5 Budućnost proizvodnje bioH₂

Projekcije za budućnost proizvodnje bioH₂ ukazuju na značajan rast i potencijalnu ključnu ulogu ovog obnovljivog goriva. Predviđa se da će bioH₂ postati sve važniji izvor energije u niskougličnim i održivim energetske sustavima. Predviđa se eksponencijalno povećanje proizvodnje, razvoj infrastrukture i distribucije kao i poboljšanja u područjima ekonomičnosti, održivosti i utjecaja na okoliš.

Također se očekuje diverzifikacija primjene vodika općenito, uključujući i masovne primjene za transport, industriju i električnu energiju. Sve veći broj strateških planova i sporazuma za smanjenje globalnih emisija stakleničkih plinova, poput europskog zelenog plana i pariškog sporazuma o klimatskim promjenama, se potpisuje i provodi, a budući da je bioH₂ jedna od čestih sastavnica tih sporazuma, predviđaju se i sve veći poticaji za proizvodnju. Kako globalna potražnja za vodikom iz godine u godinu raste, (Slika 9) raste i potreba za poboljšanjem i otkrićem novih metoda održive proizvodnje, a generalni konsenzus

među istraživačima je da je kolaboracija u otkriću ovakvih metoda puno prikladniji pristup nego konkurencija.



Slika 9. Globalna potražnja za vodikom u industriji [43]

U svom istraživanju „*Perspective on the hydrogen economy as a pathway to reach net-zero CO₂ emissions in Europe*“ [44] Van der Spek i Mijndert su predložili model za širenje infrastrukture bioH₂ u 6 koraka:

- 1) Sustavno uklanjanje investicijskih prepreka za javne i privatne dionike širom industrija
- 2) Proširenje metrike za procjenu projekata i investicija uzimajući u obzir veću društvenu vrijednost ovih investicija povrh analize troškova i zarade.
- 3) Poslovni modeli trebaju zadovoljiti tri cilja: stvaranje početnog prihoda od stabilnih korisnika srednjeg do dugog roka, obveze za investiranje od strane državnih institucija i pružanje fleksibilnosti za budući razvoj tržišta s obzirom na nove tehnologije i metode.
- 4) Predvođenje početnog razvoja tržišta od strane javnog sektora uz pomoć specijaliziranih tvrtki.
- 5) Temeljenje odabira projekata koji dobivaju državnu potporu na sustavnom pristupu koji uzima u obzir suradnju između dionika, projekata i regija kako bi se spriječile nove prepreke izazvane konkurencijom

- 6) Dijeljenje rizika između privatnog i javnog sektora, temeljeno na nepristranosti i kompetentnosti odgovornih osoba za upravljanje rizikom. Ovakvo dijeljenje rizika osigurava poštenu podjelu i obuhvaća vlasništvo nad imovinom, izvore kapitala, razvoj tržišta i dostavu

Procjena međunarodne agencije za energiju (IEA), je da će hibridni sustav proizvodnje tamnom fermentacijom i tehnologijom mikrobioloških elektrokemijskih ćelija (MEC) moći sam na godišnjoj bazi i više nego zadovoljiti trenutnu potražnju za bioH₂, pa čak i projiciranu potražnju za 2030. godinu. S obzirom da ovakav sustav ima teoretsku mogućnost biosintetizirati 105 milijuna tona vodikovog plina iz 1,3 milijarde tona otpada hrane, potencijal ovakve proizvodnje premašuje predviđenu potražnju za 2030. koja iznosi 88,3 milijarde tona [43]. Realna gornja granica cijene proizvodnje vodika na održiv način, a da bi se on smatrao globalno isplativim za masovnu proizvodnju, iznosi 2 \$/kg [45].

3 Zaključak

BioH₂ se istražuje zbog svojih prednosti kao goriva za budućnost, uključujući visoku energetska gustoću i niske emisije, unatoč izazovima infrastrukture i cijenama. Kroz ispitivanje čimbenika koji utječu na proizvodne procese, uključujući metode predobrade, koncentraciju supstrata, pH vrijednost i temperaturu moguće je optimizirati ove procese, postići bolje prinose i povećati ekonomske i ekološke prednosti biovodika. Projekcije za budućnost ukazuju na rast proizvodnje, razvoj infrastrukture i poboljšanja u ekonomičnosti i održivosti. Kao odgovor na globalne napore za smanjenje emisija stakleničkih plinova, bioH₂ se vidi kao važan resurs za postizanje energetske održivosti.

4 Popis literature

- [1] Canuto, E., Mazza, D., Fossil fuel reserves and depletion: can they comply with CO₂-emission pledges and targets. *Academia Letters*, **2** (2022).
- [2] Jeswani, H. K., Chilvers, A., Azapagic, A., Environmental sustainability of biofuels: a review. *Proceedings of the Royal Society A*, **476** (2020) 20200351.
- [3] 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.
- [4]<https://history.nasa.gov/SP-4404/ch8-1.htm> (pristup 6.rujna 2023.)
- [5] Dash, S. K., Chakraborty, S., Roccotelli, M., Sahu, U. K., Hydrogen fuel for future mobility: Challenges and future aspects. *Sustainability*, **14** (2022) 8285.
- [6]https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/emission-factors_2014.pdf (pristup 28. kolovoza 2023.)
- [7]<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52020DC0301> (pristup 1.9.2023.)
- [8] 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).
- [9]https://iea.blob.core.windows.net/assets/9e3a3493-b9a6-4b7d-b499-7ca48e357561/The_Future_of_Hydrogen.pdf (pristup 1. rujna 2023.)
- [10] Hermesmann, M., Müller, T. E., Green, turquoise, blue, or grey? Environmentally friendly hydrogen production in transforming energy systems. *Progress in Energy and Combustion Science*, **90** (2022), 100996
- [11]<https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/global-average-levelised-cost-of-hydrogen-production-by-energy-source-and-technology-2019-and-2050> (pristup 2. rujna 2023.)
- [12] Howarth, R.W., Jacobson, M.Z., "How green is blue hydrogen? *Energy Science & Engineering* **9** (2021)
- [13] Ramadan, M. M., Wang, Y., & Tooteja, P., Analysis of Hydrogen Production Costs across the United States and over the next 30 years. *arXiv preprint arXiv*, **2206** (2022), 10689
- [14] Panić, I., Cuculić, A., Čelić, J., Color-coded hydrogen: production and storage in maritime sector. *Journal of marine science and engineering*, **10** (2022), 1995

- [15] <https://www.energy.gov/eere/analysis/articles/economic-potential-nuclear-renewable-hybrid-energy-systems-producing> (pristup 3. rujna 2023.)
- [16] Osselin, F., Soullaine, C., Fauguerolles, C., Gaucher, E. C., Scaillet, B., Pichavant, M., Orange hydrogen is the new green. *Nature Geoscience*, **15** (2022).
- [17] <https://www.linkedin.com/pulse/biohydrogen-what-color-code-protium-technologies/> (pristup 6. rujna 2023.)
- [18] 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).
- [19] 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
- [20] https://iea.blob.core.windows.net/assets/9e3a3493-b9a6-4b7d-b499-7ca48e357561/The_Future_of_Hydrogen.pdf (pristup 1. rujna 2023.)
- [21] Jang, S., Kim, D.-H., Yun, Y.-M., Lee, M.-K., Moon, C., Kang, W.-S., Kwak, S.-S., Kim, M.-S., Hydrogen fermentation of food waste by alkali-shock pretreatment: Microbial community analysis and limitation of continuous operation. *Bioresource Technology*, **186** (2015)
- [22] 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** (2018)
- [23] Gadhe, A., Sonawane, S.S., Varma, M.N., Ultrasonic pretreatment for an enhancement of biohydrogen production from complex food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* **39** (2014)
- [24] Kanwal, F., Torriero, A.A.J., Biohydrogen—A Green Fuel for Sustainable Energy Solutions. *Energies*, **15** (2022), 7783
- [25] Sarangi, P. K., Nanda, S., Biohydrogen production through dark fermentation. *Chemical Engineering & Technology*, **43** (2020)

- [26] Maroušek, J. Nanoparticles can change (bio) hydrogen competitiveness. *Fuel*, **328** (2022), 125318
- [27] Assawamongkholsiri, T., Reungsang, A., Photo-fermentational hydrogen production of *Rhodobacter* sp. KKU-PS1 isolated from an UASB reactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, **18** (2015)
- [28] Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably 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)
- [29] Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Deng, L., Hoang, N. B., Advanced strategies for enhancing dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment. *Bioresource Technology* **351** (2022), 127045
- [30] Šalić, A., Zelić B., A Game Changer: Microfluidic Technology for Enhancing Biohydrogen Production—Small Size for Great Performance. *Energies* **15** (2022), 7065
- [31] Ren, Y., Si, B., Liu, Z., Jiang, W., Zhang, Y., Promoting dark fermentation for biohydrogen production: potential roles of iron-based additives. *International Journal of Hydrogen Energy*, **47** (2022)
- [32] Lu, C., Li, W., Zhang, Q., Liu, L., Zhang, N., Qu, B., Sun, Y., Enhancing photo-fermentation biohydrogen production by strengthening the beneficial metabolic products with catalysts. *Journal of Cleaner Production*, **317** (2021), 128437
- [33] Melitos, G., Voulkopoulos X., and Zabaniotou A., Waste to sustainable biohydrogen production via photo-fermentation and biophotolysis – A systematic review. *Renewable Energy and Environmental Sustainability*, **6** (2021), 45
- [34] Tiang, M. F., Hanipa, M. A. F., Abdul, P. M., Jahim, J. M., Mahmud, S. S., Takriff, M. S., Wu, S. Y., Recent advanced biotechnological strategies to enhance photo-fermentative biohydrogen production by purple non-sulphur bacteria: an overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, **45** (2020)
- [35] Nagarajan, D., Dong, C. D., Chen, C. Y., Lee, D. J., & Chang, J. S., Biohydrogen production from microalgae—Major bottlenecks and future research perspectives. *Biotechnology Journal*, **16** (2021), 2000124

- [36] Pantí, L., Chávez, P., Robledo, D., Patiño, R., A solar photobioreactor for the production of biohydrogen from microalgae, u: Guo, J., *Solar hydrogen and nanotechnology II* **6650**, (2007), str. 221-229
- [37] 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
- [38] Le, T. G., Tran, D. T., Van Do, T. C., & Nguyen, V. T., Design considerations of microalgal culture ponds and photobioreactors for wastewater treatment and biomass cogeneration, u: Alam, A., Wang, Z., *Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment*. Springer, Singapore, (2019), str. 535-567.
- [39] 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.
- [40] Singh, R., Pooja, L.R., Tomer, R., Shukla, A., Current State of the Art of Lignocellulosic Biomass: Future Biofuels, u: Joshi, J., Sen, R., Sharma, A., Salam, P.A. (eds) *Status and Future Challenges for Non-conventional Energy Sources Volume 2. Clean Energy Production Technologies*. Springer, Singapore. (2022), str. 1-19
- [41] Fudge, T., Bulmer, I., Bowman, K., Pathmakanthan, S., Gambier, W., Dehouche, Z., Al-Salem, S. M., Constantinou, A., *Microbial Electrolysis Cells for Decentralised Wastewater Treatment: The Next Steps*. *Water*, **13** (2021), 445.
- [42] Ahmed, S. F., Mofijur, M., Islam, N., Parisa, T. A., Rafa, N., Bokhari, A., Mahlia, T. M. I., Insights into the development of microbial fuel cells for generating biohydrogen, bioelectricity, and treating wastewater. *Energy*, **254** (2022), 124163.
- [43] <https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/global-hydrogen-demand-by-sector-in-the-sustainable-development-scenario-2019-2070> (pristup 5. rujna 2023.)
- [44] van der Spek, M., Banet, C., Bauer, C., Gabrielli, P., Goldthorpe, W., Mazzotti, M., Gazzani, M., Perspective on the hydrogen economy as a pathway to reach net-zero CO₂ emissions in Europe. *Energy & Environmental Science*, **15** (2022)

[45] Kaur Brar K., Cortez A.A., Pellegrini V.O.A., Amulya K., Polikarpov I., Magdouli S., Kumar M., Yang Y-H., Kant Bhatia S., Kaur Brar S., An overview on progress, advances, and future outlook for biohydrogen production technology. *International Journal of Hydrogen Energy*, **47** (2022).

5 Životopis

Patrik Bubalo je pohađao Prvu osnovnu školu Široki Brijeg od 2007. do 2015. godine u Širokom Brijegu. Pohađao je opću Gimnaziju fra Dominika Mandića, također u Širokom Brijegu do 2019. godine. Trenutno je student Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu na kojem je 2019. godine upisao preddiplomski studij. Stručnu praksu je obavio u TT kabeli d.o.o u Širokom Brijegu provodeći tipska ispitivanja kabela.