

FRI-LCR-P-1-BFT(R)-01

BIOHYDROGEN PRODUCTION

Ch. Asst. Prof. Evgenia Vasileva, PhD

Biochemical Engineering Laboratory,
Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences of Sofia
E-mail: jenivasileva96@gmail.com

Ch. Asst. Prof. eng. Evgeniy Ganev, PhD

Innovative Processes and Systems Engineering Laboratory,
Institute of Chemical Engineering,
Bulgarian Academy of Sciences of Sofia, Bulgaria
E-mail: evgeniy_ganev@iche.bas.bg

Prof. Venko Beschkov, DSc

Biochemical Engineering Laboratory,
Institute of Chemical Engineering, Bulgarian Academy of Sciences of Sofia
E-mail: vbeschkov@bas.bg

Abstract: *Hydrogen is an alternative energy source with enormous potential and is considered as clean renewable resource. Its production is characterized as a low-energy-intensive and environmentally friendly process, facilitating waste recycling. Biohydrogen production can be achieved mainly through photo fermentation and dark fermentation. Dark fermentation is the preferred method due to its high production rate, simplicity of operation and adaptability to different raw materials. It depends on the type of substrate, the choice of microorganisms, and the operating conditions in the bioreactor. In recent years, biohydrogen production has grown rapidly through nanotechnology, microbial immobilization and genetic/metabolic engineering.*

Keywords: *Biohydrogen, Photo fermentation, Dark fermentation*

ВЪВЕДЕНИЕ

Водородът е алтернативен енергиен източник с огромен потенциал и се счита за чист възобновяем ресурс, който може устойчиво да захранва бъдещите поколения. Той има редица предимства като слабо въздействие върху околната среда по време на горене, висока калоричност и разнообразно приложение. Въпреки, че производството на биоводород се експериментира широко, търговското генериране на водород все още се извършва чрез газификация на въглища, електролизно разделяне на водата и парен реформинг. Литературният преглед показва, че по-голямата част от световното производство на водород се получава от изгарянето на изкопаеми горива и паровия реформинг, като около 5% се получава от електролиза на вода и по-малко от 1% от биомаса. Производството на биологичен водород става все по-важно поради това че този процес е по-малко енергоемък, по-екологичен и при него е улеснено рециклирането на отпадъците.

ИЗЛОЖЕНИЕ

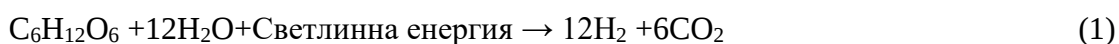
Производството на биоводород може да се осъществи чрез четири основни технологии: фотоферментация, тъмна ферментация, биофотолиза и електролиза в микробни електролизни клетки (Mokhtarani, B., et al., 2025). При фотоферментацията, фотосинтезиращите бактерии в присъствието на нитрогенази и слънчева светлина, превръщат субстратите, съдържащи захар във водород. Основен недостатък тук е по-малката ефективност при преобразуване на светлината.

Тъмната ферментация се провежда при липса на слънчева светлина. Тогава някои стриктни или факултативни ан-аероби превръщат субстратите във водород, летливи мастни киселини (оцетна, пропионова, мравчена, маслена и др.) и въглероден диоксид. Биофотолитизата е процес, който използва светлинна енергия от слънчеви или изкуствени източници, за да се произведе биоводород от водни молекули чрез фотосинтеза от фотоавтотрофни организми. Този процес се случва предимно в зелените водорасли и цианобактериите, като ключовите ензими, участващи в производството на биоводород, са нитрогеназата и хидрогеназата. За качествено производство на биоводород чрез биофотолитиза, трябва да се прилагат оптимална интензивност на светлината, рН и температура. Микробните електролизни клетки обикновено са двукамерни клетки и работят на принципа на органично окисляване на анода и редукционни реакции на катода.

Фотоферментация

Фотосинтезиращите бактерии превръщат въглехидратите във водород под въздействието на слънчева светлина. В сравнение с цианобактериите и водораслите, фотосинтезиращите бактерии (пурпурни бактерии) са за предпочитане, тъй като могат да използват всички светлинни спектри и ефективно да разграждат различни субстрати. Щамове *Rhodospseudomonas* и *Rhodobacter* са изключително активни продуценти на водород, при които катализата на органични киселини се извършва от нитрогенази. Когато субстратът е лигноцелулозен отпадък или е отпадъчна вода, водородът се синтезира от *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodobacter capsulatus* (Goveas, L., et al., 2024).

Производството на биоводород от пурпурни, несъдържащи сяра бактерии, се дължи главно на наличието на азотфиксиращ ензим, който в условия на недостиг на кислород използва светлинна енергия и органични съединения. Реакцията е както следва (1):



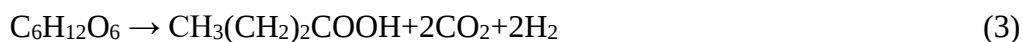
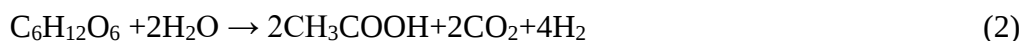
Фотосинтетичните бактерии са добре изучени в широк аспект (Kumar, S. et al., 2020). Тези бактерии са се оказали подходящи за превръщане на светлинна енергия във водород, като използват органични отпадъци като субстрат в периодични процеси, непрекъснати култури или имобилизирани системи.

Тъмна ферментация

Тъмната ферментация е предпочитан метод за производство на биоводород поради високата скорост на производство, простотата на експлоатация и адаптивността към различни суровини. За производството на биоводород се използва предимно анаеробни бактерии, които работят в отсъствие на светлина при температури от 25°C до 80°C. В този процес могат да се използват различни субстрати, богати на въглехидрати, включително горивни култури от първо поколение като захарна тръстика, пшеница, царевича и захарно цвекло, както и източници на биомаса от второ поколение, като селскостопански отпадъци, промишлени отпадъци и отпадъчни води.

Производството на водород чрез тъмна ферментация се влияе от типа на субстрата, избора на микроорганизми и работните условия в биореактора, като температура, рН и парциално налягане на водорода. Лесно разградимите въглехидрати обикновено дават по-високи добиви на водород. Разнообразието от бактериални щамове оказва отражение за подобряване на ефективността при производството, като дава възможност за използване предимствата на различните метаболитни пътища. Оперативните условия като температура, рН и парциално налягане на водорода оказват също значително влияние, като мезофилните (30–40°C) и термофилните (50–60°C) условия са оптимални за микробната активност. Поддържането на рН в диапазона от 5,0 до 8,0 подпомага растежа на бактериите и функцията на ензимите, докато контролирането на парциалното налягане на водорода предотвратява инхибиторните обратни ефекти.

Биохимичните реакции, участващи в тъмната ферментация от факултативни анаероби, могат да бъдат илюстрирани с реакции (2) и (3), както е показано:



Основните продукти на този процес са ацетатът и бутиратът. Както показват тези реакции, глюкозата може да се превърне в 4 мола водород на мол субстрат, когато оцетната киселина е съпътстващ продукт и в 2 мола водород на мол субстрат, когато съпътстващият продукт е маслена киселина. Следователно, ацетатният път е предпочитан, защото дава повече водород от бутиратния път (Chandrasekhar, K., et al. 2015).

Видове микроорганизми

При проектирането на ефективен процес за производство на биоводород, изборът на подходящ микроорганизъм е най-важната стъпка. Микробни култури, способни да продуцират водород, се срещат в различни среди, като почва, отпадъчни води, утайки и компост. Изборът на щам зависи до голяма степен и от вида на използвания субстрат. Проучени са редица щамове микроорганизми за производството на биоводород. Част от тях са: *Clostridium*., *Enterobacter*., *Enterococcus*, *Cianobacter*, *Rhodobacter*, *Phodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Escherihia coli*, *Klebsiella*, *Chronobacter*, *Citrobacter*, *Thermotoga maritima*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus paramycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus aminovorans*, *Bacillus thermoamylovorans*. и др. Някои от тези щамове са патогенни, което ги прави трудни за използване.

Най-важните бактерии, участващи в светлинната ферментация са *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum* и *Rhodobacter*. Те могат да използват широк спектър от ресурси като субстрати и широк спектър на светлинната вълна.

Бактериите, участващи в процеса на тъмната ферментация са строги и факултативни анаероби. Някои от строгите анаеробни микроорганизми са *Clostridia*, *Methylothermophiles*, *Methanogenic bacteria*, *Archaea* и *Rumen bacteria* (Nandi, R., & Sengupta, S., 1998). Най-често използваните облигатни анаероби принадлежат към рода *Clostridium*, произвеждащи водород в логаритмичната фаза на растеж. Когато тези микроорганизми навлизат в стационарната фаза, метаболизмът им се измества към производството на летливи мастни киселини. *Clostridium butyricum* и *Clostridium acetobutylicum* използват бутиратовия и ацетатния път за производство на водород (Liang, K., 2024). Видовете *Enterobacter* са факултативни анаероби като те могат да растат както в аеробни, така и в анаеробни условия, но производството на водород се осъществява в анаеробни условия. (Nizzy et al., 2020). Метаболитният път на тези микроорганизми включва разграждане на глюкоза, като крайните продукти на този процес включват маслена, млечна и мравчена киселина, заедно с малки количества етанол. Други анаеробни термофилни бактерии са *Thermotoga maritima* и *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Високата температурна стабилност на тези бактерии ги прави особено подходящи за производство на биоводород в промишлен мащаб (Ben Gaida, L., et al., 2022).

Два щамове от рода *Bacillus sp.*, показват висока производителност на водород като използват за субстрат глюкоза и разтворимо нишесте, намиращи се в твърд битов отпадък. Те са използвани като чиста култура, като краен резултат са получени 61 мл водород на грам летливи твърди вещества (Shah, A. et al., 2016).

Щамът *Bacillus licheniformis* е известен с високата си способност да секретира протеини и се използва широко за промишлено производство на ензими като протеази и амилази.

Бактериалните консорциуми и ко-култури са предпочитани пред чистите култури, тъй като предлагат по-добър добив и производството е по-лесно за управление и контрол. В литературата има данни за процеси със смесени култури от тъмноферментативни бактерии и фотоферментативни като *Clostridium butyricum* и *Rhodopseudomonas faecalis*, *Klebsiella* и *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas sp.* и *Rhodopseudomonas capsulata* и др.

ИЗВОДИ

Основни процеси за производството на биоводород са фотоферментацията и тъмната ферментация. Съществен недостатък при фотосинтезиращите бактерии е малката им ефективност, зависеща от интензитета и поглъщането на светлината. Тъмната ферментация е предпочитан метод, при който могат да се използват различни субстрати, богати на въглехидрати. Изборът на подходящ микроорганизъм е най-важната стъпка. Оперативните условия като температура, рН и парциално налягане на водорода оказват значително влияние върху ефективността на процеса. Някои от основните недостатъци на тъмната ферментация са използването на бактерии, които консумират водород, чувствителността на ензимите към кислорода, както и намаляването на добива поради отделянето на летливи мастни киселини. Напоследък все по-голямо приложение има и синтезът на водород чрез водорасли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последните прегледи в областта на производството на водород чрез ферментация показват рязко нарастване на добива чрез нано-технологии, микробно имобилизиране и генетично/метаболично инженерство за промяна на микробните геноми (Goveas, L., et al., 2024). Друг подход е използването на иновативни тактики за подобряване на добива като дизайн и конфигурация на реактора, микрофлора, начално количество въглерод и азот. Съществено внимание се обръща и на параметрите на процеса - рН и температура, дължина на вълната и интензивност на светлината и др. При вариации в температурата се отчитат промени в оползотворяването на субстрата, микробните общности, метаболитните пътища и продуктовете форми. Промяната на рН влияе върху активността на ензимите. Други важни фактори са източника на въглерод и азот както и наличието на метални йони (като желязо и молибден) в средата за ферментация. Бъдещето на производството на биоводород зависи не само от напредъка в научните изследвания, но и от икономически съображения, обществено одобрение и разработването на водородни енергийни системи.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Изследването представя резултати, получени по проект „Ресурсно-осигурителни вериги за устойчиво производство и разпространение на водород от различни суровини“, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ по договор № КП-06-Н89/6/09.12.2024 г.

REFERENCES:

- Ben Gaida, L., Gannoun, H., Casalot, L., Davidson, S., Liebgott, P., (2022). Biohydrogen production by *Thermotoga maritima* from a simplified medium exclusively composed of onion and natural seawater. *Comptes Rendus. Chimie.*, 25(S2), 129-143, <https://doi.org/10.5802/crchim.136>
- Chandrasekhar, K., Lee, Y.-J., Lee, D.-W., (2015). Biohydrogen production: Strategies to improve process efficiency through microbial routes. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 8266–8293, <https://doi.org/10.3390/ijms16048266>
- Goveas, L., Nayak, S., Kumar, P., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Rangasamy, G., (2024). Recent advances in fermentative biohydrogen production. *International journal of hydrogen energy*, 54, 200-217, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.04.208>
- Kumar, S., Sharma, S., Thakur, S., Mishra, T., Negi, P., Mishra, Sh., Hesham, A., Rastegari, A., Yadav, N., Yadav, A., (2020). Bioprospecting of Microbes for Biohydrogen Production: Current Status and Future Challenges, *Chapter of Bioprocessing for Biomolecules Production*, First Edition, Published 2020 by John Wiley & Sons Ltd., <https://doi: 10.1002/9781119434436.ch22>
- Liang, K., (2024). Metabolic pathways and genetic engineering of anaerobic bacteria for biohydrogen production. *Bioscience Evidence*, 14(2), 81-92, <https://doi: 10.5376/be.2024.14.0010>
- Mokhtarani, B., Zanganeh, J., Moghtaderi, B., (2025). A Review on Biohydrogen Production Through Dark Fermentation, Process Parameters and Simulation. *Energies*, 18, 1092, <https://doi.org/10.3390/en18051092>

Nandi, R., Sengupta, S., (1998). Microbial production of hydrogen: An overview. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24, 61–84, <https://doi.org/10.1080/10408419891294181>

Nizzy, A., Kannan, S., Anand, S., (2020). Identification of hydrogen gas producing anaerobic bacteria isolated from sago industrial effluent. *Current Microbiology*, 77, 2544-2553, <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02092-2>

Shah, A., Favaro, L., Alibardi, L., Cagnin, L., Sandon, A., Cossu, R., Casella, S., Basaglia, M., (2016). *Bacillus* sp. strains to produce bio-hydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *Applied Energy*, V.176,116-124,<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.05.054>