

## FERMENTACIJA LIGNOCELULOZNIH OBNOVLJIVIH SIROVINA I PROIZVODNJA VODONIKA

*M. Jotanović<sup>1</sup>, I. Ristić<sup>2</sup>, V. Mičić<sup>1</sup>, J. S. Budinski<sup>2</sup>, S. Pavlović<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Tehnološki fakultet Zvornik, Univerzitet u Istočnom Sarajevu

<sup>2</sup>Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

**Apstrakt:** Korišćenje jeftinih obnovljivih sirovina kao što su lignocelulozne sirovine za proizvodnju vodonika fermentacijom ima veliki značaj a i potencijal da u budućnosti da glavni doprinos obezbeđenju čiste energije. Vodonik se sve više koristi kao alternativno gorivo za obezbeđenje energije, zamjenjujući sve više razna fosilna goriva. Vodonik je čisto, obnovljivo gorivo visoke toplotne moći a pri sagorijevanju ne prouzrokuje efekat staklene bašte. Osnovni izazov u razvoju procesa proizvodnje vodonika je mali prinos vodonika zbog slabe efikasnosti mikroorganizama na celuloznim sirovinama. Zato se danas u svijetu dešavaju značajni istraživački napor na unapređenju predtretmana i hidrolize lignoceluloznih materijala. Razvoj efikasnih enzima celulaze, optimizacija i unapređenje procesa fermentacije i inženjerski pristup aplikaciji procesa su osnova sve većeg interesovanja za lignocelulozne sirovine. Istraživanja o genomu kombinovana sa genetičkim inženjeringom nude širok spektar mogućnosti unapređenja performansi korišćenja celuloznih sirovina u proizvodnji vodonika. U ovom radu se daje pregled kritičnih tehnologija, koje su danas u svijetu predmet istraživanja i usavršavanja, za proizvodnju vodonika iz lignoceluloznih sirovina.

**Ključne reči:** biogoriva, biovodonik, celulaza, tamna fermentacija, lignoceluloza, saharifikacija.

### 1. UVOD

Glavni izvor energije danas za potrebe privrede i za ljudske potrebe je fosilno gorivo jer se i dalje oko 80 % energije dobija iz tih izvora, [1]. Sektor privrede koji su glavni potrošači nafte i naftnih derivata (dizel, benzin, tečni naftni gas) su u sve nepovoljnijoj situaciji zbog smanjenja rezervi nafte i stalnog rasta cijena, [2].

Fosilna goriva oslobađaju gasove koji izazivaju efekat staklene bašte (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO) i kao rezultat toga stvara globalno zagrijavanje i zagađenje planete. Intenzivna istraživanja se danas izvode radi dobijanja čistih i održivih energetske izvora iz obnovljivih ugljeničnih resursa, [3]. Sada je trenutno energetski sistem neprihvatljiv zbog ekoloških, ekonomskih i političkih teškoća, [4].

Lignocelulozna biomasa je najrasprostranjeniji obnovljivi biološki resurs [5,6] koji se dobija fotosintezom CO<sub>2</sub> sa svetlošću, [7]. Najveći dio lignocelulozne biomase čine poljoprivredni i šumski otpaci i industrijski efluenti industrije papira i prehrane. Biosintezom celuloze iz biljaka na zemlji i morskih algi godišnje se

dobije  $0,85 \cdot 10^{11}$  tona što je četiri puta više od ukupne svjetske potrošnje energije [8-10]. Zato postoji veliki interes u svijetu za razvoj novih i ekonomski povoljnih procesa konvertovanja biomase u bioenergiju, [11, 12]. S druge strane, korišćenje biomase za proizvodnju energije, hrane i hemikalija može riješiti problem odlaganja otpada i pomoći da se prekine rastuća zavisnost od fosilnih goriva, [5, 13-15]

Biogoriva su ekološka, biorazgradiva, održiva, ekonomski konkurentna i perspektivna alternativna goriva, [16]. Među svim biogorivima vodonik je izuzetno čisto gorivo sa visokom toplotnom moći – 122 MJ/kg, [17]. Sagorijevanjem vodonika nastaje voda zbog čega nema doprinosa efektu staklene bašte. Toplotna moć vodonika skoro tri puta veća nego kod metana, tabela 1, [18]. Zbog toga korišćenje jeftinih obnovljivih resursa, kao što je lignoceluloza, za dobijanje biovodonika ima veliki potencijal. Za vodonik se predviđa da će 2100 godine biti glavna sirovina za obećavajuće korišćenje energije, [19-20].

Tabela 1. Poređenje energije emisije ugljenika i donje toplotne moći (LHV) goriva

Redni broj	Energija/jedinici mase, MJ/kg	Energija/jedinici zapremine, MJ/l	Emisija ugljenika kgC/kg goriva	LHV MJ/kg
Gasoviti vodonik	120	2	0	120,1
Tečni vodonik	120	8,5	0	120,1
Ugalj (antracit)	15-19	-	0,5	33,3
Prirodni gas	33-50	9	0,46	38,1
Benzin	42-45	38	0,84	42,5
Dizel	42,8	35	0,9	43
Nafta	40-43	31,5	0,86	44,9
Biodizel	37	33	0,5	-
Etanol	21	23	0,5	27,0

U ovom radu se prezentuje pregled metoda za tretman lignoceluloznih sirovina uključujući i mikrobiološki, enzimski, postupak.

## 2. KONVERZIJA CELULOZE I UPRAVLJANJE CELULOZNIM OTPADOM

### 2.1. Postupci predtretmana celuloze

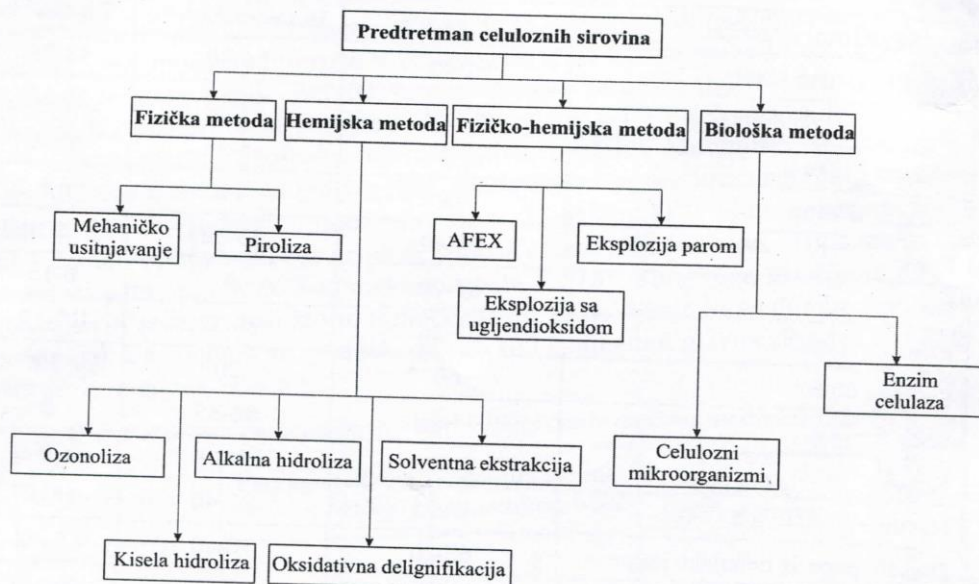
Konverzija lignocelulozne biomase podrazumijeva hidrolizu celuloznih materijala do šećera koji služi za proizvodnju vodonika i cijenjenih produkata fermentacije. Faktori koji utiču na hidrolizu celuloze su poroznost materijala, step kristalichnosti celuloznih vlakana i lignina i sadržaj hemiceluloze, [21]. U tabeli [22-23] je prikazan sastav lignocelulozne biomase.

Tabela 2. Sadržaj celuloze, hemiceluloze i lignina u uobičajenim poljoprivrednim ostacima i otpadu

Lignocelulozni materijal	Celuloza %	Hemiceluloza %	Lignin %
Stabljike tvrdog drveta	40-55	24-40	18-25
Stabljike mekog drveta	45-50	25-35	25-35
Orahova ljuska	25-30	25-35	30-40
Kukuruz u klipu	45	35	15
Trave	25-40	35-50	10-30
Papir	85-99	0	0-15
Pšenična slama	33-38	26-32	17-19
Sortirani otpaci	60	20	20
Lišće	15-20	80-85	0
Pamuk	80-95	5-20	0
Novine	40-55	25-40	18-30
Otpadni papir iz hemijske pulpe	60-70	10-20	5-10
Primarne čestice iz otpadne vode	8-15	-	24-29
Svinjski otpad	6,0	28	-
Čvrsti stajnjak od goveda	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Trava na obali Bermudskih ostrva	25	35,7	6,4
Šiblje	45	31,4	12,0
Kineska šećerna trska	27	25	11
Pirinčane ljuske	35	25	17
Pirinčana slama	32-47	19-27	5-24
Vlakna kokosovog oraha	36-43	1,5-2,5	41-45
Pšenične ljuske	30	50	15
Ječmene ljuske	23	32	21,4
Ječmena slama	31-45	27-38	14-19

Osnovni cilj predtretmana lignoceluloznih materijala je oslobađanje od lignina i hemiceluloze, redukcija stepena kristaličnosti celuloze i povećanje vanjske površine materijala, [24]. Postupci predtretmana treba da budu ekonomski prihvatljivi i da spriječe formiranje sporednih produkata koji mogu biti inhibitori u kasnijoj hidrolizi celuloze, [25]. Rezultat predtretmana je uravnotežen između troškova i cijene biomase, [26-28]. Postoji nekoliko metoda za prevođenje

polisaharida u monomere a svaka od njih ima svoju metodu predtretmana, [29], slika 1.



Slika 1. Metode predtretmana celuloznih sirovina

Opis fizičkog, fizičko hemijskog i hemijskog predtretmana je detaljno prikazan u odgovarajućoj literaturi, [31-33].

## 2.2. Biološki predtretman

Proces biološke hidrolize celuloze vodi se ili uz pomoć celuloznih mikroorganizama ili pomoću kompleksnog enzima celulaze. U prirodi se celulozni materijali degradiraju sa mikroorganizmima od kojih su braon, bijele i meke truležne gljivice (rot fungi) sposobne da razgrade lignin i hemicelulozu, [35-37].

Miješane kulture [38, 39] obuhvataju celulozne bakterije i necelulozne bakterije koje mogu razgraditi prirodne celulozne materijale aerobno i anaerobno. Biološki predtretman nije skup, troši malo energije ali je brzina hidrolize veoma mala.

## 2.3. Hidroliza celuloze enzimima

Celuloza kao linearni kondenzacioni polimer glukoze je vezana glikozidnim vezama stepena polimerizacije 100-20000, pa je nerastvorljiva u vodi i nepodesna za hidrolizu zbog zbijenog pakovanja, jake kristalne strukture i stabilnih vlakana.

Konverzija celuloze u šećere pomoću biokatalitičke celulaze je ekonomski izvodljiv proces, [42]. Nastajanje rastvorljivih šećera iz celuloze biomase zasniva se na djelovanju  $\beta$ -endoglukonaze,  $\beta$ -eksoglukonaze i  $\beta$ -D-glukozidaze iz enzima

celulaze, [43-44]. Endoglukonaze razdvajaju intramolekularne  $\beta$ -1,4-glukozidne veze i oslobađaju šećere u reakcionoj smeši.  $\beta$ -D-glukozidaze hidrolizuju rastvorljivu celulozu proizvodeći glukozu u vodenoj fazi, [45]. Pored ove tri glavne komponente celulaze postoje brojni pomoćni enzimi koji napadaju hemicelulozu, [46].

Mikroorganizmi i enzimi, koji razgrađuju celulozni materijal, su proučavani u nizu mikrobiološki povezanih procesa pri obradi tekstila, hrane i papirne celuloze, [47-52].

Celulaze su relativno skupi enzimi. Zbog velikih mogućnosti tržišta i važne uloge koju celulaza ima u bioenergiji i bioproduktima, nužan je razvoj bolje celulaze za hidrolizu celuloze. Zato se istražuju različiti faktori koji utiču na enzimsku hidrolizu celuloze kao što su su supstrati, reakcioni uslovi, temperatura, pH itd., [53-57]. Unapređena, poboljšana celulaza mora imati veću katalitičku efikasnost i veću stabilnost na datoj temperaturi. Za ostvarivanje ovoga cilja, istraživanja idu u tri pravca:

- stvaranje povoljne celulaze zasnovano na znanju o njenoj strukturi i mehanizmu katalitizacije, [56,57],
- direktno izdvajanje svake celulaze i provjera molekulske rekombinacije, [51, 58-60],
- rekonstruisanje aktivnih sistema celulaze na nerastvornim supstratima doprinoseći većoj brzini hidrolize, [61-64].

### 3. ENERGIJA IZ VODONIKA – METODE PROIZVODNJE

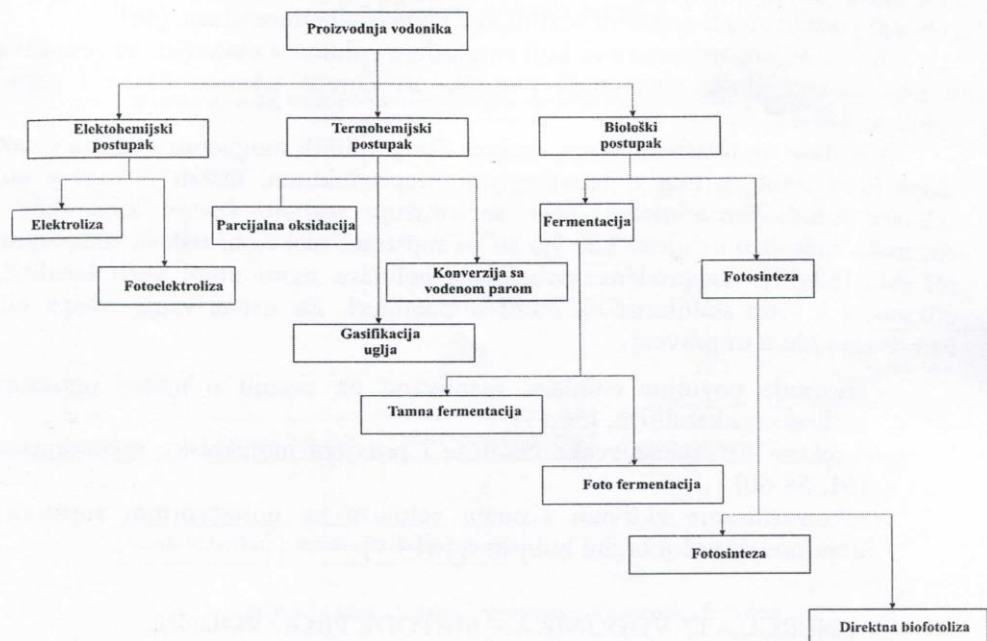
#### 3.1. Važnost energije vodonika

Vodonik je perspektivna alternativa fosilnim gorivima sa mnogim društvenim, ekonomskim i ekološkim prednostima. Koncept koji se zasniva na korišćenju vodonika polazi od toga da je on čista i efikasna zamjena za naftne derivate, [65]. Vodonik ima nisku emisiju, predstavlja čist i obnovljiv resurs i značajno doprinosi redukciji efekta staklene bašte, [66, 67]. Vodonik je višestruki energetska resurs, koristi se za proizvodnju hemikalija (amonijak, etanol), u rafinerijama ulja za uklanjanje nečistoća, za proizvodnju električnih uređaja, obradu čelika, desulfurizaciju benzina i za korišćenje u kosmičkim programima, [68]. Danas se u gorivim ćelijama vodonik koristi sa 3 % ukupne potrošnje, [69]. Godišnje se proizvede više od 50 miliona tona vodonika uz godišnju stopu rasta od 10 %, [70]. Od toga se 99 % vodonika proizvede iz fosilnih goriva, prvenstveno iz prirodnog gasa, a iz obnovljivih izvora ostala količina, [70, 71]. Prema procjenama Američkih institucija, količina vodonika će 2025 godine na ukupnom energetska tržištu iznositi 8-10 %, [72].

#### 3.2. Proizvodnja vodonika fizičko-hemijskim postupcima

Iako je vodonik najrasprostranjeniji element u kosmosu, on se mora proizvoditi iz jedinjenja koja sadrže vodonik kao što su fosilna goriva, biomasa ili voda, [73].

Fizičko-hemijske metode za proizvodnju vodonika, prikazane na slici 2, se zasnivaju uglavnom na poznatim konvencionalnim postupcima, [74-76].



Slika 2. Prikaz postupaka koji se koriste kod proizvodnje vodonika

### 3.3. Proizvodnja vodonika biološkim metodama

Biološka proizvodnja vodonika iz obnovljive lignocelulozne biomase je najvažnija alternativa i obnovljivi bioenergetski resurs, slika 2. Biološke metode za proizvodnju vodonika zasnivaju se na fotolizi vode sa algama i cijanobakterijama, fotorazgradnji organskih jedinjenja sa fotosintetičkim bakterijama, proizvodnji vodonika tamnom fermentacijom, [75, 77-79]. Osnovne prednosti biološke proizvodnje vodonika su:

- proces je katalizovan mikroorganizmima u vodi i na temperaturi i pritisku okoline,
- proces je jeftin,
- proces zahtijeva malo energije,
- pogodan je za decentralizovanu proizvodnju energije u postrojenjima manjeg kapaciteta i na mjestima gdje ima biomase i otpada.

### 3.4. Uloga hidrogenaze u proizvodnji vodonika

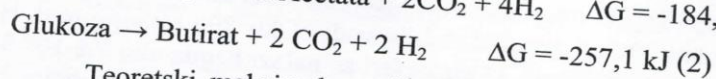
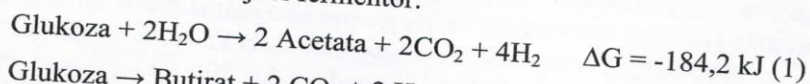
Hidrogenaze, ključni enzimi metabolizma  $H_2$  su rasprostranjeni u mnogim mikroorganizmima smještenim u citoplazmi ili periplazmi i takođe su uključeni u

mnoge biološke procese gde je i vodonik uključen. Hidrogenaze oksidišu  $H_2$  do protona i elektrona ili redukuju protone oslobađajući molekul  $H_2$ , [80, 81]. U biosferi uglavnom biološka proizvodnja vodonika je odvojena od procesa mikrobiloške fermentacije. Ovi organizmi razlažu organsku materiju do  $H_2$ , CO i metabolita kao što su isparljive masne kiseline i etanol, [82]. U prirodnim zajednicama vodonična bakterija može čak rasti autotrofički sa  $H_2$  gasom kao jedina redukciona snaga i energetski supstrat, [83]. U ovoj bakteriji, kiseonik služi kao krajnji akceptor elektrona pri čemu se kao krajnji produkt dobija voda. Oko 200 miliona tona  $H_2$  kruži unutar ovih ekosistema godišnje. U atmosferi se nalazi negde oko  $7,8 \cdot 10^{-5} \%$   $H_2$ , [84]. Fiziološka uloga i biohemijske karakteristike hidrogenaze su različite za različite mikrobiloške procese, [75, 80, 81, 85-87].

Istraživan je širok opseg biološkog procesa proizvodnje vodonika uključujući direktnu biofotolizu, indirektnu biofotolizu, fotofermentaciju i tamnu fermentaciju, [88]. Glavne tri vrste mikroorganizama, sposobne za proizvodnju  $H_2$  su cijanobakterija ili zelena alga, fotosintetička bakterija i anaerobna bakterija. Cijanobakterija/zelena alga direktno razlaže vodu do  $H_2$  i  $O_2$  u prisustvu energije svjetlosti sa fotosintezom. Proizvodnja vodonika iz algi može da se razmatra kao ekonomična i održiva metoda u zavisnosti od korišćenja vode kao obnovljivog resursa i potrošnje  $CO_2$  kao jednog od zagađivača vazduha. Prirodno stvoreni organizmi ovih vrsta, ispitani ranije, pokazali su manju brzinu proizvodnje  $H_2$  zbog komplikovanog reakcionog sistema i inhibicije hidrogenaze sa kiseonikom. Drugi problem na koji se naišlo je da se zahtjeva nosač da sakuplja oslobođen gas iz kulture. Brzo odvajanje  $O_2$  i  $H_2$  takođe nije riješeno, [89-92]. Odatle tamna i fotofermentacija se posmatraju kao metode sa više prednosti usled istovremenog tretmana otpada i proizvodnje vodonika - gasa. Fotosintetička bakterija koristi organske supstrate kao što su organske kiseline umjesto vode kao polaznog jedinjenja za proizvodnju  $H_2$ . Upoređujući sa hidrolizom alge, fotosintetička bakterija zahtijeva manje slobodne energije ( $+8,5$  kJ/mol  $H_2$ ) za proizvodnju  $H_2$  i može potpuno degradirati organske supstance. Ovaj proces zahtijeva visoku energiju aktivacije da se dostigne nitrogenezna koja je odgovorna za proizvodnju  $H_2$  u fotosintetskoj bakteriji, [93], a posljedica je mala efikasnost solarne konverzije obično ne veća nego za sisteme biofotolize algi, [94]. Fototropna proizvodnja  $H_2$  sa fotosintetičkom bakterijom je ekstremno sumnjiva na sadržaj amonijaka i kiseonika, čineći teškoće u praktičnim primjenama, [79].

Poslije 1990 godine, veća pažnja je posvećena proizvodnji  $H_2$  sa anaerobnim tamnim fermentacionim sistemom koji ima najbolji potencijal za praktičnu upotrebu, [95]. Neke osnovne prednosti u odnosu na druge procese su: jednostavnost procesa na tehničkom nivou, mali zahtjevi za energijom, velika brzina proizvodnje  $H_2$ , ekonomska isplativost, sposobnost stvaranja  $H_2$  iz velikog broja ugljenih hidrata (ili drugih organskih materijala) češće dobijanih kao otpadni produkti, [95-97]. Raznovrsnost mikroba (anaerobna bakterija *Clostridium* sp.), fakultativni anaerobi (*Eutrobacter* i *Bacillus* sp) kao i razne bakterije iz organskih otpada mogu se koristiti za tamnu fermentaciju  $H_2$ . Glavni rastvorljivi metaboliti iz tamne fermentacije uključuju isparljive masne kiseline i alkohole i njihova dalja razgradnja nije mo-

guća pod anaerobnim uslovima, [88, 98, 99]. Anaerobne bakterije koriste organske supstance kao jedini izvor elektrona i energije konvertujući ih u H<sub>2</sub>, [17]. Reakcije uključene u proizvodnju H<sub>2</sub>, [17] (jednačine 1 i 2) su brže i ovi procesi ne zahtevaju sunčevo zračenje koristeći ih podesnim za tretiranje velikih količina organskog otpada uz odgovarajući fermentor.



Teoretski maksimalan prinos H<sub>2</sub> tamnom fermentacijom je 4 mol H<sub>2</sub>/mol glukoze. Nadalje, pošto je tamna fermentacija nepotpuna degradacija organskih supstrata, proizvodnja H<sub>2</sub> kao gasa je praćena sa formiranjem acetata i/ili butirata sa stehiometrijskim odnosom 2 molH<sub>2</sub> po 1 mol acetate ili butirata.

Cena proizvodnje biovodonika tamnom fermentacijom je 340 puta manja nego fotosintetskim procesom i zbog toga je ovaj proces više komercijalan, [100]. Prinos vodonika mogao bi biti povećan sa integracijom tamnog i foto-fermentacionog procesa tako da se može očekivati teoretski najveći prinos dobijenog H<sub>2</sub> (12 mol H<sub>2</sub>/mol glukoze), [101]. Biotehnološka istraživačka grupa pri IOWA državnom univerzitetu, [102] razvila je novi fermentacioni proces koji konvertuje organske otpadne tokove u gas bogat H<sub>2</sub>. U najnovijim studijama o proizvodnji H<sub>2</sub> korišćene su čiste izolovane anaerobne bakterije kao proizvođač vodonika. U nekim slučajevima proces upotrebljava korišćenje pomiješanih mikroflora ili prilagođenog otpadnog mulja za proizvodnju H<sub>2</sub>, [105-106]. Proučavani su anaerobni H<sub>2</sub> fermentacioni procesi od vrsta Clostridium, [107-108]. Za maksimalni prinos H<sub>2</sub> optimalna vrijednost pH je između 5,0 – 6,0 [106, 124-126] dok su neki zabilježili pH u opsegu od 6,8 – 8,0 [110, 111, 119, 126]. pH vrijednost utiče na aktivnost gvožđa koji sadrži enzim hidrogenazu, [127]. Kultura pH takođe utiče na prinos proizvodnje H<sub>2</sub>, sadržaj biogasa, tip organskih kiselina koje su proizvedene i specifičnu brzinu proizvodnje H<sub>2</sub>. Zbog toga je kontrola pH na optimalnom nivou korisna za bolji prinos. Nadalje sastav supstrata, sastav sredine, temperatura i tip mikrobiološke kulture su takođe važni parametri koji utiču na efikasnost proizvodnje H<sub>2</sub>. Različiti supstrati su korišćeni za tamnu fermentaciju vodonika. Biokonverzijom 1 mol glukoze dobijeno je 4 mol H<sub>2</sub> kao gasa tamnom fermentacijom. Najveći prinos H<sub>2</sub> dobijen iz glukoze je oko 2,0 – 2,4 mol/mol, [132, 133], što je saglasno sa korišćenjem glukoze kao izvora energije i ugljenika za rast bakterije. Ipak u prisustvu drugog tipa šećera saharoze prinos od 4,52 mol H<sub>2</sub>/mol saharoze je dobijen za 8 sati korišćenjem PRIM reaktora, [134]. Optimizacijom odnosa C/N na 47 obezbeđena je efikasna konverzija saharoze u H<sub>2</sub> gas sa prinosom od 4,8 mol H<sub>2</sub>/mol saharoze, [130]. Ipak najveći prinos (6 mol H<sub>2</sub>/mol saharoze) je dobijen sa Enterobacter cloacae, što je najveći prinos među drugim testiranim izvorima ugljenika, [120]. Collet, [110] je zabilježio maksimalni prinos H<sub>2</sub> od 3 molH<sub>2</sub>/mol laktoze mada je teoretski prinos 8 mol H<sub>2</sub>/mol laktoze. Rezultati ukazuju da saharoza daje veći prinos poredeći je sa drugim šećerima, ipak prinos po molu heksoze ostaje gotovo isti. Saglasno stehiometrijskoj reakciji, 1 g skroba daje prinos od 553 ml H<sub>2</sub> gasa sa acetatom kao bioproduktom, [135]. Prinos je niži od teoretskog zbog korišćenja



skroba za sintezu ćelije. Maksimalna specifična brzina proizvodnje  $H_2$  od 237 ml  $H_2/g$  zabilježena je sa *C. Pasteurianum* korišćenjem 24 g/l jestivog kukuruznog skroba, [111] i 365 ml  $H_2/g$  *Thermoanaerobacterium* pri 55°C, [135]. Mešana kultura *C. Butyricum* i *E. aerogenes* daje bolji prinos  $H_2$  (2,4 mol  $H_2/mol$  glukoze) dobijen u dugom ponavljanju šaržnih operacija kada je korišćen ostatak skroba (2,0%) sadržan u otpadnoj vodi, [109].

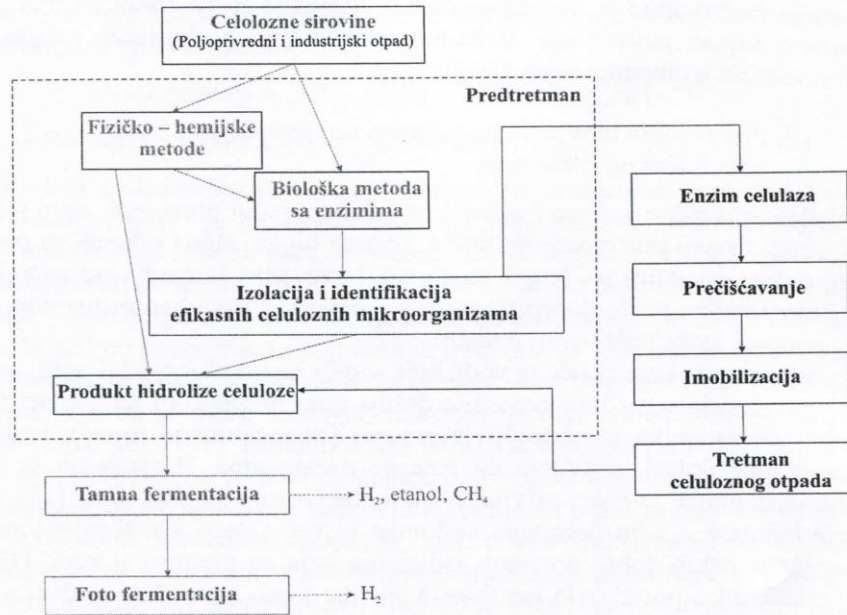
### 3.5. Proizvodnja biovodonika tamnom fermentacijom iz celuloznog materijala

Poljoprivredne kulture i njihovi otpadni sporedni proizvodi, drvo i drvni otpaci, otpaci nastali proizvodnjom hrane, vodene biljke, alge i efluenti su proizvedeni u ljudskim zajednicama. Korišćenje ovih, biomasom, bogatih resursa za bioenergiju i bioprodukte može doprineti zamjeni fosilnih goriva kao primarnog energetskog resursa i može redukovati emisiju.

Bioenergija koja potiče iz vode koja sadrži biomasu (otpadni mulj, poljoprivredni i životinjski otpad) uglavnom se dobija mikrobiološkom fermentacijom. Proizvodnja biovodonika iz obnovljivih resursa (lignocelulozni otpad), trebala bi u vremenu koje dolazi, u svijetu da postane dominantna. Biovodonik će svakako predstavljati glavni i veoma privlačan energetski resurs u budućnosti, [17]. Biokonverzija biomase u cilju dobijanja vodonika je već vršena korišćenjem anaerobne fermentacije nekih dobro poznatih jedinjenja koja su prisutna u vodi, [107, 137-139]. Međutim, i pored ovih ispitivanja postoje samo ograničeni podaci o prinosu vodonika i to iz mulja otpadnih voda. Mnogi procesi gde se dobija  $H_2$  iz biomase se dopunjavaju sa dobijanjem biomaterijala. Zemlje, gde je izuzetno razvijena i moćna poljoprivreda odnosno njihova ekonomija, imaju mogućnost značajnog ekonomskog razvoja kroz inkorporiranje bioenergije u bioindustriju.

Glavna sirovina za dobijanje  $H_2$  tokom biološkog fermentativnog procesa su ugljenihidrati ili kao oligosaharidi ili kao polimeri (celuloza, hemiceluloza i skrob). Celuloza je najrasprostranjeniji sastojak biomase biljaka i uglavnom se nalazi u poljoprivrednim otpacima i industrijskim efluentima (industrija papira i prehrambena industrija) pa se smatra najperspektivnijom sirovinom za dobijanje biovodonika. Značajna količina  $H_2$  može se dobiti iz celuloznih sirovina (slama, iverke drveta, ostatci trave, otpadni papir, strugotina, itd.), korišćenjem konvencionalne tehnologije anaerobne tamne fermentacije i prirodnih mješovitih mikroflora pod uslovima koji podstiču dobijanje acetogenih bakterija (AB) i usporavaju metanobakterije (MB), [141-142]. Za efikasan prinos  $H_2$  direktno iz celuloznog materijala, koristeći tamnu fermentaciju, zahtjevani su procesi predtretmana (delignifikacija i hidroliza) radi rastvaranja organske materije iz lignoceluloznog kompleksa pa je dati proces skup, [143-145]. Ipak, mikrobiološki (efikasni celulolitički mikroorganizmi) i enzimski (celulaza kompleks) predtretman ima sposobnost da konvertuje celuloznu biomasu u fermentabilne šećere i učini proces povoljnim sa ekonomske strane. Proizvodnja biovodonika iz celuloznih sirovina pod tamnom anaerobnom fermentacijom može se postići, ili direktnim procesom u kojem celuloza istovremeno hid-

rolizuje i konvertuje se u  $H_2$  gas u jednom stepenu, ili sa dvostepenim procesom gdje hidroliza celuloze i proizvodnja biovodonika se izvode odvojeno, slika 3.



Slika 3. Mogući proces prevođenja lignoceluloznih sirovina u bioenergiju pomoću procesa dvostepene hidrolize i proizvodnje biovodonika

### 3.6. Direktni proces proizvodnje biovodonika

Zbog gustog (kompaktnog) pakovanja, visoke kristalnosti i nerastvorljivosti u vodi, celuloza je postala nepogodna da hidrolizuje na svoje pojedinačne glukozne jedinice. U prirodi neki mikroorganizmi degradiraju celulozu efikasno korišćenjem njihovih enzima celulaze a nastali hidrolizovani produkti (saharidi) mogu biti konvertovani u  $H_2$  tamnom fermentacijom sa čistom ili mješavinom populacije bakterija. Celuloza može biti razgrađena korišćenjem celulolitičkih i necelulolitičkih mikroorganizama prisutnih u anaerobnom digestoru iz mulja, kompostnog životinjskog ekskreta i potom direktno koristiti za proizvodnju  $H_2$ , [148]. Anaerobno aktivno blato (dobija se u procesu prečišćavanja vode) se koristi za proizvodnju  $H_2$  iz celuloze i biomase. Sa korišćenjem miješane kulture pri termofilnim uslovima, Liu je zabeležio maksimalni prinos  $H_2$  (102 ml  $H_2$ /g celuloze) što je sa 18% teoretskog prinosa. To je u saglasnosti sa djelimičnom hidrolizom celuloze [147]. Najveći prinos  $H_2$  (2,8 mmol  $H_2$ /g celuloze) zabilježen je korišćenjem kvasnog stajnjaka u prisustvu celuloze kao supstrata pod anaerobnom tamnom fermentacijom, [150]. Neke miješane kulture su takođe korisne za tretman sirovina

biomase radi boljeg prinosa  $H_2$ , [65, 148]. Ipak u poređenju sa sistemima čistih kultura prinos proizvodnje može biti manji zbog uticaja nekih mikroorganizama.

Izolavani napori koji efikasno doprinose celuloznim materijalima za dobijanje  $H_2$  su od velikog praktičnog interesa. Na primer, *Clostridium thermoceillum* je gram – pozitivna, acetogena, termofilna, anaerobna bakterija koja razgrađuje celulozu korišćenjem celulozoma i izvršava fermentaciju mješavine produkata stvarajući gasove  $H_2$  i  $CO_2$  kao i acetat, laktat i etanol kao rastvorne metabolite pod različitim uslovima rasta, [155-159]. Celulozom je kompleksne strukture, raspoređen na površini ćelije, i sadrži različite celulolitičke enzime, [40, 44]. Tokom hidrolize, bakterija se hvata na čestice celuloze preko celulozoma i enzima sa celulozomom efikasno razgrađujući celulozu do glukoze i celulodekstrana koji se prenose u ćelije radi metabolizma, [40, 44]. U biološkom tretmanu, obrada prirodnih celuloznih materijala bez predtretmana i/ili sterilizacije je teška. Optimalna temperatura rasta je  $60^\circ C$ . *Clostridium thermocellum* može spriječiti kontaminaciju mnogih mezofilnih bakterija i nije potrebna sterilizacija ulazne biomase koja se zahteva za fermentacioni proces čiste kulture. Termofilni rad takođe smanjuje rastvorljivost gasova vodeći efikasnijem uklanjanju gasovitih produkata ( $H_2$  i  $CO_2$ ), [40], zbog čega se izbjegava inhibicija produkta. *Clostridium Thermocellum* pokazuje veću brzinu degradacije celuloze u odnosu na druge Clostridial vrste i ima sposobnost da stvara  $H_2$ ,  $CO_2$  i acetat nudeći mogućnost proizvodnje  $H_2$  direktno iz celulozne otpadne biomase, [158, 159]. *Clostridium Thermocellum* može koristiti celulozu, isjeckani filter papir i delignifikovana vlakna drveta (DLWs) u šaržnoj kulturi pod anaerobnom tamnom fermentacijom, [104]. Visok prinos  $H_2$  (1,6 mol  $H_2$ /mol glukoze zabilježen je u prisustvu DLWs sa acetatom, etanolom, laktatom i formiatom kao krajnjim produktima fermentacije, [104]. Dodavanje *C. Thermocellum* nekih drugih anaerobnih termofilnih mikroorganizama koji pripadaju rodu *Thermoanaerobacterium* (*T. Thermosaccharolyticum* i *Desulfotomaculum geothermicum*) se pojačavaju stabilni celulolitički enzimi i omogućava proizvodnja  $H_2$  gasa u termofilnoj acidogenoj kulturi, [115]. Na primer *T. Thermosaccharolyticum* daje gotovo isti prinos  $H_2$  u poređenju sa *C. Butyricum*, [132]. *Thermococcus kodakoraensis* KOD1 i *C. Thermolacticum* daju  $H_2$  na  $85^\circ C$  i  $58^\circ C$ , [121], respektivno. Liu, [103] je zabeležio da izolovana *C. Thermocellum* može razgraditi mikrokristalnu celulozu i proizvesti  $H_2$  (0,8 mol  $H_2$ /mol glukoze) sa etanolom, sirćetnom kiselinom, i mliječnom kiselinom kao krajnjim produktima. Napori takođe mogu omogućiti razgradnju prirodnih biljnih sirovina (samljevena kukuruzna stabljika (0,5%  $H_2$  prinos, 9,1 mmol/l) i samljeven klip kukuruza (0,5 %  $H_2$  prinos, 9,4 mmol/l).

Lay, [126] je zabilježio da povećanje koncentracije mikrokristalne strukture pod mezofilnim uslovima sa toplotnom digestijom mulja rezultuje nižim prinosom  $H_2$  (2,18 mol  $H_2$ /mol celuloze) pri koncentraciji celuloze ispod 12,5 g/l. Prinos se smanjuje na 1,60 mmol $H_2$ /g celuloze kada se koncentracija celuloze duplira na 25 g/l. U proučavanju ko-kulture *C. Thermocellum* i *T. Thermosaccharolyticum*, u prisustvu mikrokristalne celuloze, prinos  $H_2$  raste do 1,80 mol  $H_2$ /mol glukoze u poređenju sa korišćenjem jedne kulture, [103]. Ovaj sistem ko-kulture može takođe

efikasno koristiti nekoliko vrsta prirodnih supstrata [samljevene kukuruzne stabljike (0,5% prinos  $H_2$ , 16,1 mmol/l) i samljevene klipove kukuruza (0,5 %  $H_2$  prinos, 20,4 mmol/l) kao izvore ugljenika za dobijanje  $H_2$  što je mnogo efikasnije nego kada poredimo sa prinosom koji se postiže sa pojedinačnim *C. Thermocellum*, [103].

### 3.7. Dvostepeni proces proizvodnje biovodonika

U direktnom procesu dobijanja celuloznog biovodonika, celuloza hidrolizira i potom se dobija vodonik sa istim ili koegzistirajućim mikroorganizmima. Kao rezultat, redukujući šećeri dobijeni hidrolizom celuloze mogu biti potrošeni sa mikroorganizmima tokom dobijanja ili nedobijanja vodonika koji su prisutni u kulturi tokom njihovog rasta zbog čega je primjetna redukcija prinosa  $H_2$ . Čiste kulture i tzv. ko-kulture daju efikasnu hidrolizu celuloze ali čiste kulture (*C. Thermocellum*) obično zahtevaju termofilne uslove što za rezultat ima povećanje troškova rada. Za sistem ko-kulture glavni problem je teškoća postizanja više optimalnih uslova za koegzistirajuće kulture kao i potrošnja redukujućeg šećera sa bakterijama koje ne proizvode  $H_2$ .

Sa druge strane dvostepeni proces (hidroliza – biovodonik), gde hidroliza celuloza može da se izvršiti korišćenjem mešane ili čiste mikrobne kulture, a hidrolizat (više redukujućih šećera) uklanja posle određenog perioda (ili kontinualno) radi kasnije proizvodnje  $H_2$ , povećava prinos  $H_2$ .

Taguchi et al, [145] hidrolizovali su celulozu i koristili hidrolizat za fermentaciju sa *Clostridium* sp i tokom perioda od 81 sata stacionarne kulture organizmi su potrošili 0,92 mmol glukoze/h i proizveli 4,10 mmol  $H_2$ /h. Ista kultura je takođe korišćena za proizvodnju  $H_2$  iz čiste ksiloze ili glukoze i enzimatskog hidrolizata Avicel celuloze ili ksilana. Prinos  $H_2$  iz hidrolizata bio je veći nego iz ugljovodonika dostižući prinos od 19,6 i 18,6 mmol  $H_2$  po g potrošenog supstrata respektivno, [145]. Lo et al je zabilježio da izolovan mikrobiološki konzorcijum (NS) može efikasno hidrolizovati čistu karboksil metil celulozu (CMC) i sirove celulozne materijale. U poređenju sa termofilnim uslovima, gde se zahtijevala najviša hemijska i enzimska hidroliza [24], njihov sistem treba da ima prednost u praktičnoj primjeni usled manjeg zahteva za energijom. U njihovoj studiji hidrolizovan CMC (10 g/l) dao je bolji prinos  $H_2$  (1,09 celuloze/g celuloze) tokom šaržnog procesa korišćenjem *C. Pasterianum* za tamnu fermentaciju, [24]. Mada se dvostepenim procesom može postići bolji prinos  $H_2$  usled sposobnosti optimizacije hidrolize i proizvodnje biovodonika individualno, troškovi dvo-stepenog procesa su često viši nego jednostepenog.

## 4. ZAKLJUČAK

Fermentativna proizvodnja  $H_2$  iz celuloznih sirovina ili iz lignoceluloznog otpada može biti konkurentna sa dobijanjem vodonikom iz fosilnih goriva čime se obezbeđuje vjerodostojan pristup praktičnoj proizvodnji biovodonika. Obnovljive

tehnologije dobijanja H<sub>2</sub>, koje koriste malo vrijednu otpadnu biomasu kao sirovinu, imaju veliku mogućnost da postanu konkurentne u pogledu troškova proizvodnje iako je trenutno skuplja proizvodnja H<sub>2</sub> iz biomase nego dobijanje H<sub>2</sub> iz prirodnog gasa. Infrastruktura za skladištenje, transport i korišćenje H<sub>2</sub> takođe treba da bude uspostavljena. Jedan od načina da se postignu niski troškovi dobijanja biovodonika je razvoj efikasnijih i ekonomski povoljnijih bioprocasa za proizvodnju H<sub>2</sub> iz celuloznih sirovina. Optimizacija procesa koji koriste ili jednostepenu ili dvostepenu konverziju celuloze u biovodonik treba da bude završena. Za vrijeme tamne fermentacije vodonika, anaerobna bakterija može dati H<sub>2</sub> tokom konvertovanja organskih supstrata u isparljive masne kiseline i alkohole. Za postizanje većeg prinosa energije i manjeg nivoa hemijskog kiseonika u efluentu, ovi rastvorljivi metabiliti (organske kiseline i alkoholi) mogu biti dalje iskorišćeni fotofermentacijom koristeći fotosintetsku bakteriju kao što je purpurna nesumporna bakterija. Pri tome kao rezultat imamo veću proizvodnju H<sub>2</sub> kao i veću sposobnost uklanjanja hemijskog kiseonika. Integracioni proces, koji kombinuje tamnu i foto fermentaciju H<sub>2</sub>, može biti efikasniji energetski proces kojim se povećava proizvodni kapacitet H<sub>2</sub> i unapređuje povraćaj energije iz celuloznih sirovina i perspektiva u budućnosti. Svakako, ovo još zahtijeva obimna istraživanja u cilju poboljšanja i unapređenja postojećih fermentativnih procesa proizvodnje H<sub>2</sub> u zavisnosti od unapređenja prinosa H<sub>2</sub> i brzine, zajedno sa unapređenjem korišćenja efikasnosti ili sirovih celuloznih materijala ili hidrolizata celuloze.

#### Zahvalnica

Istraživanja u ovom radu deo su projekta „Obnovljive sirovine kao reaktanti za dobijanje ekološki prihvatljivih materijala” ugovor broj 19/6-020/961-109/14 koji finansira Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske.

#### 5. LITERATURA

- [1] A. Demirbas, *Progress and recent trends in biofuels*, Prog Energy Combustion Science, 33 (2007) 1–18.
- [2] Organization of the Petroleum Exporting Countries (OPEC): <http://www.opec.org/home/>.
- [3] M. K. Bhat, *Cellulases and related enzymes in biotechnology*, Biotechnol Adv, 18 (2000) 355–383.
- [4] UNDP, *Energy and the Challenge of Sustainability*, World Energy Assessment (United Nations Development Programme,) 2000.
- [5] A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. J. R. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak & C. L. Liotta, *The path forward for biofuels and biomaterials*, Science, 311 (2006) 484–489.

- [6] Y. H. P. Zhang & L. R. Lynd, *Toward an aggregated understanding enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems*, *Biotech Bioeng*, 88 (2004) 797–824.
- [7] L. T. Fan, M. M. Gharpuray & Y. H. Lee, *Cellulose Hydrolysis* (Springer-Verlag, Berlin, Germany) 1987, 1–68.
- [8] J. Nowak, M. Florek, W. Kwiatek, J. Lekki, P. Chevallier, E. Zieba, et al. *Composite structure of wood cells in petrified wood*, *Mater Sci Eng*, 25 (2002) 119–130.
- [9] A. Singh & K. Hayashi, *Microbial cellulase, protein architecture, molecular properties and biosynthesis*, *Adv Appl Microbiol*, 40 (1995) 1–44.
- [10] I. M. Rajoka & A. K. Malik, *Cellulase production by *Cellulomonas b zotea* cultured in media containing different cellulosic substrates*, *Biores Technol* 59 (1997) 21–27.
- [11] R. C. Kuhad, A. Singh & K. E. Eriksson, *Microorganisms enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls*, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 57 (1997) 45–125.
- [12] C. S. Gong, N. U. Cao, J. Du & G. T. Tsao, *Ethanol production by renewable sources*, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 65 (1999) 207–241.
- [13] M. Kumakura, *Preparation of immobilized cellulase beads and their application to hydrolysis of cellulosic materials*, *Process Biochem*, 32 (1997) 555–559.
- [14] DOEUS, *Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda*, DOE/SC-0095 (US Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, USA) 2006: [www.doeermestolive.org/biofuels/](http://www.doeermestolive.org/biofuels/).
- [15] C. Schubert, *Can biofuels finally take center stage?*, *Nat Biotechnol*, (2006) 777–784.
- [16] D. Puppen, *Environmental evaluation of biofuels*, *Period Polytech Soc Man Sci*, 10 (2002) 95–116.
- [17] I. K. Kapdan & F. Kargi, *Biohydrogen production from waste materials*, *Enzyme Microbial Technol*, 38 (2006) 569–582.
- [18] U. Bossel, *Well-to-Wheel Studies, Heating Values, and the Energy Conservation Principle* (European Fuel Cell Forum) 2003.
- [19] S. Dunn, *Perspectives towards a hydrogen future*, *Cogen On Site Power Product*, 3 (2002) 55–60.
- [20] K. Vijayaraghavan & M. A. M. Soom, *Trends in biological hydrogen production— a review*, *Int J Hydrogen Energy*, (2004) doi:10.1016/j.ijhydene.2004.10.007.
- [21] J. D. McMillan, *Pretreatment of lignocellulosic biomass*, in (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, edited by M. E. Himmel, J. O. Baker & R. P. Overend (American Chemical Society, Washington, DC) 1994, 292–324.
- [22] Y. Sun & J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, *Biores Technol*, 83 (2002) 1–11.

- [23] E. B. N. Graminha, A. Z. L. Gonçalves, R. D. P. B. Pirota, M. A. A. Balsobre, R. Da Silva & E. Gomes, *Enzyme production by solidstate fermentation: Application to animal nutrition*, *Animal Feed Sci Technol*, 144 (2008) 1–22.
- [24] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple & M. Ladisch, *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, *Bioresour Technol*, 96 (2005) 673–686.
- [25] National Research Council, *Committee on Biobased Industrial Products, Biobased Industrial Products—Priorities for Research and Commercialization* (National Academy Press) 1999.
- [26] K. W. Lin, M. R. Ladisch, D. Schaefer, C. H. Noller, V Lechtenberg & G. T. Tsao, *Review on effect of pretreatment on digestibility of cellulosic materials*, *AIChE Symp Ser*, 77 (1981) 102–106.
- [27] L. R. Lynd, R. T. Elander & C. E. Wyman, *Likely features and costs of mature biomass ethanol technology*, *Appl Biochem Biotechnol*, 57/58 (1996) 741–761.
- [28] E. Palmqvist & B. Hahn-Hagerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*, *Biores Technol*, 74 (2000) 25–33.
- [29] P. Chandrakant & V S. Bisaria, *Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol*, *Critical Rev Biotechnol*, 18 (1998) 295–331.
- [30] L. Cadoche & G D. López, *Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes*, *Biol Wastes*, 30 (1989) 153–157.
- [31] M. V. Sivers & G. Zacchi, *A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine*, *Biores Technol*, 51 (1995) 43–52.
- [32] K. L. Mackie, H. H. Brownell, K. L. West & J. N. Saddler, *Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood*, *J Wood Chem Technol*, 5 (1985) 405–425.
- [33] M. T. Holtzapple, J. H. Jun, G. Ashok, S. L. Patibandla & B. E. Dale, *The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment*, *Appl Biochem Biotechnol*, 28/29 (1991) 59–74.
- [34] M. Mes-Hartree, B. E. Dale & W. K. Craig, *Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 29 (1988) 462–468.
- [35] J. Schurz & T. K. Ghose, *Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein Symp Proc* (IIT, New Delhi) 1978, 37.
- [36] A I. Hatakka, *Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 18 (1983) 350–357.
- [37] D E. Akin, L L. Rigsby, A. Sethuraman, W. H.–III. Morrison, G. R. Gamble & K. E. L. Eriksson, *Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus**, *Appl Environ Microbiol*, 61 (1995) 1591–1598

- [38] J. M. Odom & J. D. Wall, *Photoreduction of H<sub>2</sub> from cellulose by an anaerobic bacterial coculture*, Appl Environ Microbiol, 45 (1983) 1300–1395.
- [39] S. M. Lewis, L. Montgomery, K. A. Garleb, L. L. Berger & G. C. Jr. Fahy, *Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on in vitro degradation of cellulosic substrates by mixed ruminal microorganisms and Bacteroides succinogene S85*, Appl Environ Microbiol, 54 (1988) 1163–1169.
- [40] A. L. Demain, M. Newcomb & J. H. D. Wu, *Cellulase, clostridia, and ethanol*, Microbiol Mol Biol Rev, 69 (2005) 124–154.
- [41] R. M. Brown & I. M. Saxena, *Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers*, Plant Physiol Biochem, 38 (2000) 57–67.
- [42] B. E. Dale, *Biobased industrial products: bioprocess engineering where cost really counts*, Biotechnol Prog, 15 (1999) 775–776.
- [43] M. K. Bhat & S. Bhat, *Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications*, Biotech Adv, 15 (1997) 583–620.
- [44] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl & I. S. Pretorius, *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*, Microbiol Mol Biol Rev, 66 (2002) 506–577.
- [45] P. Y. H. Zhang, M. E. Himmel & J. R. Mielenz, *Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies*, Biotechnol Adv, 24 (2006) 452–481.
- [46] S. J. B. Duff & W. D. Murray, *Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol*, a review, Biores Technol, 55 (1996) 1–33.
- [47] F. Fukumori, T. Kudo, N. Sashihara, Y. Nagata, K. Ito & K. Horikoshi, *The third cellulase of alkalophilic Bacillus sp. strain N-4: evolutionary relationships within the cel gene family*, Gene, 76 (1989) 289–298.
- [48] H. Hayashi, M. Takehara, T. Hattori, T. Kimura, S. Karita, K. Sakka & K. Ohmiya, *Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes xynA and xynB and characterization of XynA from Clostridium thermocellum*, Appl Microbiol Biotechnol, 51 (1999) 348–357.
- [49] V. S. Bisaria, *Bioprocessing of Agro-residues to glucose and chemicals*, in *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, edited by A. M. Martin (Elsevier London) 1991, 210–213.
- [50] K. Boominathan & C. A. Reddy, *cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*, Proc Natl Acad Sci (USA), 89 (1992) 5586–5590.
- [51] J. R. Cherry & A. L. Fidantsef, *Directed evolution of industrial enzymes: an update*, Curr Opin Biotechnol, 14 (2003) 438–443.
- [52] O. Kirk, T. V. Borchert & C. C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*, Curr Opin Biotechnol, 13 (2002) 345–351.
- [53] J. B. Van Beilen & Z. Li, *Enzyme technology, an overview*, Curr Opin Biotechnol, 13 (2002) 338–342.
- [54] X. L. Huang & M. H. Penner, *Apparent substrate inhibition of the Trichoderma reesei cellulase system*, J Agric Food Chem, 39 (1991) 2096–2100.



- [55] A. O. Converse, R. Matsuno, M. Tanaka & M. Taniguchi, *A model for enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme*, *Biotechnol Bioeng*, 32 (1988) 38–45.
- [56] M. Schulein, *Protein engineering of cellulases*, *Biochim Biophys Acta*, 1543 (2000) 239–252.
- [57] D. B. Wilson, *Studies of Thermobifida fusca plant cell wall degrading enzymes*, *Chem Rec*, 4 (2004) 72–82.
- [58] E. G. Hibbert, F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley & P. A. Dalby, *Directed evolution of biocatalytic processes*, *Biomol Eng*, 22 (2005) 11–19.
- [59] C. Schmidt-Dannert & F. H. Arnold, *Directed evolution of industrial enzymes*, *Trends Biotechnol*, 17 (1999) 135–136.
- [60] H. Tao & V. W. Cornish, *Milestones in directed enzyme evolution*, *Curr Opin Chem Biol*, 6 (2002) 858–864.
- [61] M. E. Himmel, W. S. Adney, J. O. Baker, R. A. Nieves & S. R. Thomas, *Cellulases: structure, function and applications*, in *Handbook on Bioethanol*, edited by C E Wyman 1993, 144–161.
- [62] E. Kim, D. C. Irwin, L. P. Walker & D. B. Wilson, *Factorial optimization of a six-cellulase mixture*, *Biotechnol Bioeng*, 58 (1998) 494–501.
- [63] J. Sheehan & M. Himmel, *Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for bioethanol*, *Biotechnol Prog*, 15 (1999) 817–827.
- [64] L. P. Walker, C. D. Belair, D. B. Wilson & D. C. Irwin, *Engineering cellulase mixtures by varying the mole fraction of Thermomonospora fusca E5 and E3, Trichoderma reesei CBH1 and Caldocellum saccharolyticum  $\beta$ -glucosidase*, *Biotechnol Bioeng*, 42 (1993) 1019–1028.
- [65] G. Kyazze, R. Dinsdale, F. R. Hawkes, A. J. Guwy, G. C. Premier & I. S. Donnison, *Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora*, *Biores Technol*, 99 (2008) 8833–8839.
- [66] J. Bockris, *The Origin of Ideas on a Hydrogen Economy and Its Solution to the Decay of the Environment*, *Int J Hydrogen Energy*, 27 (2002) 731–740.
- [67] J. Maddy, S. Cherryman, F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, Premier G C & Cole S, *Hydrogen* (University of Glamorgan, Pontypridd, Wales) 2003.
- [68] C. C. Elam, C. E. Gregoire Padro, G. Sandrock, A. Luzzi, P. Lindblad & E. F. Hagen, *Realizing the hydrogen future: the International Energy Agency's efforts to advance hydrogen energy technologies*, *Int J Hydrogen Energy*, 28 (2003) 601–607.
- [69] D. Boyles, *Bio-energy Technology-Thermodynamics and Costs* (John Wiley & Sons, New York), (1984) 8–13.
- [70] C. J. Winter, *Into the hydrogen energy economy—milestones*, *Int J Hydrogen Energy*, 30 (2005) 681–685.
- [71] K. Nath & D. Das, *Hydrogen from biomass*, *Curr Sci*, 85 (2003) 265–271.

- [72] J. N. Armor, *The multiple roles for catalysis in the production of H<sub>2</sub>*, *Appl Catal A: Gen*, 176 (1999) 159–176.
- [73] S. M. Kotay & D. Das, *Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials*, *Int J Hydrogen Energy*, 33 (2008) 258–263.
- [74] J. H. Yoon, S. J. Sim, M. Kim & T. H. Park, *High cell density culture of Anabaena variabilis using repeated injection of carbon dioxide for the production of hydrogen*, *Int J Hydrogen Energy*, 27 (2002) 1265–1270.
- [75] D. Das & T. N. Veziroglu, *Hydrogen production by biological processes a survey of literature*, *Int J Hydrogen Energy*, 26 (2001) 13–28.
- [76] M. Momirlan & T. Veziroglu, *Current status of hydrogen energy*, *Renewable Sustainable Energy Rev*, 6 (2002) 141–79.
- [77] Y. Asada & J. Miyake, *Photobiological hydrogen production*, *J Biosci Biotechnol*, 88 (1999) 1–6.
- [78] M. L. Ghirardi, L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum & A. Melis, *Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>*, *Trends in Biotechnol*, 18 (2000) 506–511.
- [79] H. Koku, O. Erolu, U. Gündüz, M. Yücel & L. Türker, *Aspects of metabolism of hydrogen production by Rhodospirillum rubrum*, *Int J Hydrogen Energy*, 27 (2002) 1315–1329.
- [80] M. W. Adams, L. E. Mortenson & J. S. Chen, *Hydrogenase*, *Biochim Biophys Acta*, 594 (1980) 105–176.
- [81] M. V. Vignais, B. Billoud & J. Meyer, *Classification and phylogeny of hydrogenases*, *FEMS Microbiol Rev*, 25 (2001) 455–501.
- [82] J. Gorman, *Hydrogen the next generation*, *Sci News*, 162 (2002) 235–236.
- [83] P. A. M. Claassen, M. A. W. Budde, E. W. J. Niel & G. J. de Vrije, *Utilization of biomass for hydrogen fermentation*, in *Biofuels for Fuel Cells: Renewable Energy from Biomass Fermentation (Integrated Environmental Technology Series)*, edited by P. Len., P. Westermann, M. Haberbauer & A. Moreno (IWA Publishing, London) 2005, 221–230.
- [84] J. P. Belaich, M. Bruschi & J. L. Garcia, *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen Transfer* (Plenum Press, New York, USA) 1990, 37.
- [85] V. A. Boichenko & P. Homann, *Photosynthetic hydrogen production in prokaryotes and eukaryotes occurrence mechanism and functions*, *Photosynthetica*, 30 (1994) 527–552.
- [86] R. Schulz, *Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria*, *J Mar Biotechnol*, 4 (1996) 16–22.
- [87] J. Appel & R. Schulz, *Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising*, *J Photochem Photobiol B Biol*, 47 (1998) 1–11.
- [88] P. C. Hallenbeck & J. R. Benemann, *Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes*, *Int J Hydrogen Energy*, 27 (2002) 1185–1193.

- [89] Y. Guan, M. Deng, X. Yu & W. Zang, *Two stage photo-production of hydrogen by marine green algae Platymonas subcordiformis*, Biochem Eng J, 19 (2004) 69–73.
- [90] A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi & M. Seibert, *Sustainable photohydrogen production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green algae Chlamydomonas reinhardtii*, Plant Physiol, 122 (2000) 127–135.
- [91] T. V. Laurinavichene, I. V. Tolstygina, R. R. Galiulina, M. Ghirardi, M. Seibert & A. A. Tsygankov, *Dilution methods to deprive Chlamydomonas reinhardtii cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction*, Int J Hydrogen Energy, 27 (2002) 1245–1249.
- [92] M. L. Ghirardi, L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert & E. Greenbaum et al, *Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>*, Tibtech, 18 (2000) 506–511.
- [93] E. Fascetti & O. Todini, *Rhodobacter sphaeroids RV cultivation and hydrogen production in a one and two stage chemostat*, Appl Microbial Biotechnol, 44 (1995) 300–305.
- [94] D. He, Y. Bultel, J. P. Magnin, C. Roux & J. C. Willison, *Hydrogen photosynthesis by Rhodobacter capsulatus and its coupling to PEM fuel cell*, J Power Sources, 141 (2005) 19–23.
- [95] D. B. Levin, L. Pitt & M. Love, *Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application*, Int J Hydrogen Energy, 29 (2004) 173–185.
- [96] J. Benemann, *Hydrogen biotechnology: progress and prospects*, Nat Biotechnol, 14 (1996) 1101–1103.
- [97] R. Nandi & S. Sengupta, *Microbial production of hydrogen: an overview*, Crit Rev Microbiol, 24 (1998) 61–84.
- [98] K. S. Lee, J. F. Wu, Y. S. Lo, Y. C. Lo, P. J. Lin & J. S. Chang, *Anaerobic hydrogen production with an efficient carrierinduced granular sludge bed bioreactor*, Biotechnol Bioeng, 87 (2004) 648–657.
- [99] E. Fascetti, E. D. 'Addario, O. Todini & A. Robertiello, *Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes*, Int J Hydrogen Energy, 23 (1998) 753–760.
- [100] A. A. Y. Atif, A. Fakhru'l-Razi, M. A. Ngan, M. Morimoto, S. E. Iyukeand & N. T. Veziroglu, *Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora*, Int J Hydrogen Energy, 30 (2005) 1393–1397.
- [101] J. Woodward, M. Orr, K. Cordray & E. Greenbaum, *Enzymatic production of biohydrogen*, Nature, 405 (2000) 1014–1015.
- [102] S. Van Ginkel, S. Sung & J. J. Lay, *Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration*, Environ SciTechnol, 35 (2001) 4726–4730.
- [103] Y. Liu, P. Yu, X. Song & Y. Qu, *Hydrogen production from cellulose by co-culture of Clostridium thermocellum JN4 and Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum GD17*, Int J Hydrogen Energy, 33 (2008) 2927–2933.

- [104] D. B. Levin, R. Islam, N. Cicek & R. Sparling, *Hydrogen production by Clostridium thermocellum 27405 from cellulosic biomass substrates*, Int J Hydrogen Energy, 31 (2006) 1496–1503.
- [105] Y. Ueno, T. Kawai, S. Sato, S. Otsuka & M. Morimoto, *Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora*, J Ferm Bioeng, 79 (1995) 395–397.
- [106] C. C. Chen, C. Y. Lin & J. S. Chang, *Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate*, Appl Microbiol Biotechnol, 57 (2001) 56–64.
- [107] J. J. Lay, *Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen*, Biotechnol Bioeng, 68 (2000) 269–278.
- [108] S. Y. Wu, C. H. Hung, C. N. Lin, H. W. Chen, A. S. Lee, J. S. Chang, *Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge*, Biotechnol Bioeng, 93 (2006) 934–946.
- [109] H. Yokoi, A. S. Saitsu, H. Uchida, J. Hirose, S. Hayashi & Y. Takasaki, *Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue*, J Biosci Bioeng, 91 (2001) 58–63.
- [110] C. Collet, N. Adler, J. P. Schwitzguébel & P. Péringier, *Hydrogen production by Clostridium thermolacticum during continuous fermentation of lactose*, Int J Hydrogen Energy, 29 (2004) 1479–1485.
- [111] G. Liu & J. Shen, *Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria*, J Biosci Bioeng, 93 (2004) 251–256.
- [112] D. Evvyernie, K. Morimoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka & K. Omiya, *Conversion of chitinous waste to hydrogen gas by Clostridium paraputrificum M-21*, J Biosci Bioeng, 91 (2001) 339–343.
- [113] C. C. Wang, C. W. Chang, C. P. Chu, D. J. Lee, B. V. Chang & C. L. Liao, *Producing hydrogen from wastewater sludge by Clostridium bifermentans*, Biotechnol, 102 (2003) 83–92.
- [114] H. H. P. Fang, T. Zhang & H. Liu, *Microbial diversity of mesophilic hydrogen producing sludge*, Appl Microbiol Biotechnol, 58 (2002) 112–118.
- [115] H. S. Shin, J. H. Youn & S. H. Kim, *Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis*, Int J Hydrogen Energy, 29 (2004) 1355–1363.
- [116] Y. K. Oh, M. S. Park, E. H. Seol, S. J. Lee & S. Park, *Isolation and characterization of hydrogen-producing bacteria from granular sludge of an upflow anaerobic sludge blanket reactor*, Biotechnol Bioprocess Eng, 8 (2003) 54–57.
- [117] H. Yokoi, T. Tokushige, J. Hirose, S. Hayashi & Y. Takasaki, *Hydrogen Production by immobilized cells of aciduric Enterobacter aerogenes strain HO-39*, J Ferment Bioeng, 83 (1997) 481–484.
- [118] S. Tanisho & Y. Ishiwata, *Continuous hydrogen production from molasses by bacterium Enterobacter aerogenes*, Int J Hydrogen Energy, 19 (1994) 807–812.

- [119] B. Fabiano & P. Perego, *Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by Enterobacter aerogenes*, Int J Hydrogen Energy, 27 (2002) 149–156.
- [120] N. Kumar & D. Das, *Enhancement of hydrogen production by Enterobacter cloacae IIT-BT 08*, Process Biochem, 35 (2000) 589–593.
- [121] T. Kanai, H. Imanaka, A. Nakajima, K. Uwamori, Y. Omori & T. Fukui et al., *Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, Thermococcus kodakaraensis KOD1*, J Biotechnol, 116 (2005) 271–282.
- [122] L. Minnan, H. Jinli, W. Xiaobin, X. Huijuan, C. Jinzao & L. Chuannan et al., *Isolation and characterization of a high H<sub>2</sub>-producing strain Klebsiella oxytoca HP1 from a hot spring*, Res Microbiol, 156 (2005) 76–81.
- [123] K. J. Wu, G. D. Saratale, Y. C. Lo, S. D. Chen, W. M. Chen, Z. J. Tseng & J. S. Chang, *Fermentative production of 2, 3 butanediol, ethanol and hydrogen with Klebsiella sp. isolated from sewage sludge*, Bioresour Technol, 99 (2008) 7966–7970.
- [124] H. H. P. Fang & H. Liu, *Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture*, Bioresour Technol, 82 (2002) 87–93.
- [125] J. J. Lay, Y. J. Lee & T. Noike, *Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste*, Water Res, 33 (1999) 2579–2586.
- [126] J. J. Lay, *Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose*, Biotechnol Bioeng, 74 (2001) 281–287.
- [127] B. Dabrock, H. Bahl & G. Gottschalk, *Parameters affecting solvent production by Clostridium pasteurium*, Appl Environ Microbiol, 58 (1992) 1233–1239.
- [128] S. K. Khanal, W. H. Chen, L. Li & S. Sung, *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products*, Int J Hydrogen Energy, 29 (2004) 1123–1131.
- [129] H. Yokoi, R. Maki, J. Hirose & S. Hayashi, *Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes*, Biomass Bioenergy, 22 (2002) 389–395.
- [130] C. Y. Lin & C. H. Lay, *Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora*, Int J Hydrogen Energy, 29 (2004) 41–45.
- [131] H. Yokoi, T. Tokushige, J. Hirose, S. Hayashi & Y. Takasaki, *H<sub>2</sub> production from starch by mixed culture of Clostridium butyricum and Enterobacter aerogenes*, Biotechnol Lett, 20 (1998) 143–147.
- [132] Y. Ueno, S. Haruta, M. Ishii & Y. Igarashi, *Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora*, J Biosci Bioeng, 92 (2001) 397–400.
- [133] M. Morimoto, M. Atsuko, A. A. Y. Atif, M. A. Ngan, A. Fakhru'l-Razi & S. E. Iyuke et al., *Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora*, Int J Hydrogen Energy, 29 (2004) 709–713.
- [134] C. C. Chen & C. Y. Lin, *Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen producing reactor*, Adv Environ Res, 7 (2003) 695–699.

- [135] T. Zhang, H. Liu & H. H. P. Fang, *Biohydrogen production from sta in wastewater under thermophilic conditions*, J Environ Manag, 69 (2003) 149–15
- [136] J. Giallo, C. Gaudin & J. P. Belaich, *Metabolism and solubilization cellulose by Clostridium cellulolyticum H10*, Appl Environ Microbiol, 49 (19) 1216–1221.
- [137] C. Y. Lin & R. C. Chang, *Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose*, J Chem Technol Biotechnol, 74 (1999) 498–5
- [138] N. Q. Ren, J. Z. Li, B. K. Li, Y. Wang & S. R. Liu, *Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system*, Int J Hydrogen Energy, 31 (2006) 2147–2157.
- [139] K. J. Wu, J. S. Chang & C. F. Chang, *Biohydrogen production using suspended and immobilized mixed microflora*, J Chin Inst Chem Eng, 37 (2006) 545–550.
- [140] J. S. Chang & S. M. Yang, *Application of artificial neural network coupled with sequential pseudo-uniform design to optimization of membrane reactors for hydrogen production*, J Chin Inst Chem Eng, 37 (2006) 395–400.
- [141] R. Sparling, D. Risbey & H. M. Poggi-Valardo, *Hydrogen production from inhibited anaerobic composters*, Int J Hydrogen Energy, 22 (1997) 563–566
- [142] I. V. Vazquez, R. Sparling, D. Risbey, S. N. Rinderknecht & Poggi-Valardo, *Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastewater*, Bioresour Technol, 96 (2005) 1907–1913.
- [143] T. DeVrije, G. G. deHaas, G. B. Tan, E. R. P. Keijsers & P. A. I. Claassen, *Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by Thermotoga elfii*, Int J Hydrogen Energy, 27 (2002) 1381–1390.
- [144] F. Taguchi, N. Mizukami, K. Yamada, K. Hasegawa & T. T. Saito, *Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by Clostridium sp. strain No. 1*, Enzyme Microbiol Technol, 17 (1995) 147–150.
- [145] F. Taguchi, K. Yamada, K. Hasegawa, T. Takisaito, & K. Hara, *Continuous hydrogen production by Clostridium sp. Strain No. 2 from cellulose hydrolyzate in aqueous two phase system*, J Ferment Bioeng 82 (1996) 80–83.
- [146] B. E. Logan, S. E. Oh, I. S. Kim & S. Van Ginkel, *Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers*, Environ S Technol, 36 (2002) 2530–2535.
- [147] H. Liu, T. Zhang & H. P. P. Fang, *Thermophilic H<sub>2</sub> production from cellulose containing wastewater*, Biotechnol Lett, 25 (2003) 365–369.
- [148] R. Datar, J. Huang, P. C. Maness, A. Mohagheghi, S. Czernik & E. Chonnet, *Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process*, Int J Hydrogen Energy, 32 (2007) 932–939.
- [149] G. Kyazze, R. Dinsdale, F. R. Hawkes, A. J. Guwy, G. C. Premier & S. Donnison, *Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora*, Bioresour Technol, 2008.
- [150] C. Y. Lin & W. C. Hung, *Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures*, Int J Hydrogen Energy, 33 (2008) 3660–3667.

- [151] A. Wang, N. Ren, Y. Shi & D. J. Lee, *Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture- Clostridium acetobutylicum X9 and Ethanoigenens harbinense B49*, Int J Hydrogen Energy, 33 (2008) 912–917.
- [152] Y. C. Lo, M. D. Bai, W. M. Chen & J. S. Chang, *Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy*, Biores Technol, 99 (2008) 8299–8203.
- [153] I. Ntaikou, H. N. Gavala, M. Kornaros & G. Lyberatos, *Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using Ruminococcus albus*, Int J Hydrogen Energy, 33 (2008) 1153–1163.
- [154] T. A. D. Nguyen, J. P. Kima, M. S. Kim, Y. K. Oh & S. J. Sim, *Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, Thermotoga maritime and Thermotoga neapolitana in batch fermentation*, Int J Hydrogen Energy, 33 (2008) 1483–1488.
- [155] N. J. Patni & J. K. Alexander, *Utilization of glucose by Clostridium thermocellum: presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts*, J Bacteriol, 105 (1971) 220–225.
- [156] N. J. Patni & J. K. Alexander, *Catabolism of fructose and mannitol by Clostridium thermocellum: presence of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase, fructose-1-phosphate kinase, phosphoenol-pyruvate: mannitol phosphotransferase, and mannitol-1-phosphate dehydrogenase in cell extracts*, J Bacteriol, 105 (1971) 226–231.
- [157] T. K. Ng, P. J. Weimer & J. G. Zeikus, *Cellulolytic and physiological properties of Clostridium thermocellum*, Arch Microbiol, 114 (1977) 1–7.
- [158] L. R. Lynd & H. G. Grethlein, *Hydrolysis of dilute acid pretreated hardwood and purified microcrystalline cellulose by cell-free broth from Clostridium thermocellum*, Biotechnol Bioeng 29 (1987) 92–100.
- [159] L. R. Lynd, H. G. Grethlein & R. H. Wolkin, *Fermentation of cellulose substrates in batch and continuous culture by Clostridium thermocellum*, Appl Environ Microbiol, 55 (1989) 3131–3139.
- [160] K. Ohmiya, K. Maeda & S. Shimizu, *Purification and properties of endo-2-1,4-glucanase from Ruminococcus albus*, Carbohydr Res 166 (1987) 145–155.
- [161] K. Ohmiya, K. Nagashima, T. Kajino, E. Goto, A. Tsukada & S. Shimizu, *Cloning of the cellulase gene from Ruminococcus albus and its expression in Escherichia coli*, Appl Environ Microbiol, 54 (1988) 1511–1555.
- [162] B. A. Dehority, *Hemicellulose degradation by rumen bacteria*, Fed Proc, 32 (1973) 1819–1825.

## FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSIC RENEWABLE RESOURCES AND HYDROGEN PRODUCTION

**Abstract:** Using cheap renewable raw materials such as lignocellulosic feedstock for hydrogen production by fermentation has great significance and potential to give major contribution to future clean energy. Using hydrogen as an promising alternative energy source for fossil fuels is increasing. Hydrogen is a clean, renewable high energy fuel that does not contribute the greenhouse gas effect. The main challenges in developing hydrogen production is the low hydrogen yields due to poor efficiency on direct microbial assimilation of cellulosic materials. From this reason, in the world today occur considerable research efforts to improve the pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic materials. The development of effective cellulase enzymes, optimization and improvement of the fermentation process as well as engineering approaches to application processes are the basis of the increased popularity of the lignocellulosic feedstock. Research on the genomics combined with genetic engineering offer a wide range of opportunities to improve the performance of using cellulosic raw material in the production of hydrogen. This paper provides an overview of key technologies in the world today that research and development biohydrogen production from lignocellulosic feedstocks.

**Key words:** biofuels, biohydrogen, cellulase, dark fermentation, lignocellulose, saccharification.