

## Anaerobik fermantasyonla biyohidrojen üretim verimine etki eden faktörler

İlknur Şentürk<sup>1\*</sup>, Hanife Büyükgüngör<sup>2</sup>

01.07.2014 Geliş/Received, 24.09.2014 Kabul/Accepted

### ÖZ

Geleceğin en önemli enerji taşıyıcısı olarak kabul edilen hidrojenin anaerobik fermantasyonla biyolojik yoldan elde edilmesinde ortam koşulları ve çalışma parametreleri oldukça önemlidir. Aşı mikroorganizma türü, pH, sıcaklık, kullanılan substrat, reaktörde oluşan H<sub>2</sub>'nin kısmi basıncı, fermantasyon işlemi sırasında oluşan son ürünler, reaktördeki azot ve fosfor konsantrasyonu, metal içeriği, reaktör içerisindeki karışımın HRT'si, kullanılan enzimler ve reaktör içerisindeki metabolik reaksiyonlar açığa çıkacak H<sub>2</sub> verimini kuvvetle etkilemektedir. Sürekli sistemde H<sub>2</sub> üretimine geçilmeden önce tüm bu parametreler için maksimum işletme koşulları belirlenmelidir. Çünkü çalışma koşullarındaki iyileşme biyohidrojen üretim verimini olumlu yönde etkileyecektir. Bu derleme makale gerekli en uygun çalışma koşullarını araştırmak ve bu koşullar hakkında detaylı bilgi vermek amacıyla hazırlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Anaerobik fermantasyon, biyohidrojen, önartım

## Factors influencing fermentative biohydrogen production by anaerobic fermentation

### ABSTRACT

In the achieved from biological way with anaerobic fermentation of accepted hydrogen as an energy carrier the most important of the future ambient conditions and operating parameters are considerably important. Type of seed microorganism, pH, temperature, the used substrate, partial pressure of H<sub>2</sub> formed in the reactor, last products occurred during fermentation process, nitrogen and phosphorus concentration in the reactor, metal content, HRT of the mixture in the reactor, the used enzymes, and metabolic reactions in the reactor strongly influences to be released H<sub>2</sub> efficient. Before from H<sub>2</sub> production at the continuous system, the maximum operating conditions for all these parameters should be determined. Because improvement in working conditions will positively affect the efficiency of biohydrogen production. This review article was prepared to investigate the need optimal operating conditions and to provide detailed information about these conditions.

**Keywords:** Anaerobic fermentation, biohydrogen, pretreatment

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun - ilknurg@omu.edu.tr

2 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun - hbuyukg@omu.edu.tr

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Hidrojen üretimi için kullanılan her metot, farklı bir enerji kaynağı (termal (ısı), elektroliz (elektrik) ya da fotolitik (ışık enerjisi) vs.) gerektirdiği için enerji ihtiyacı yüksektir ve çevresel açıdan her zaman yararlı değildir. Bu açıdan bakıldığında hidrojen üretimi, özellikle de biyolojik hidrojen üretimi, alternatif ve yenilenebilir enerji kaynağı olarak oldukça önemli gözükmektedir.

Biyolojik olarak yenilenebilir kaynaklardan mikroalg ve bakteriler tarafından üretilen biyohidrojen, sürdürülebilir enerji kaynağı için ümit verici bir alternatiftir. Karanlık fermantasyon ile H<sub>2</sub> üretimi, karbonhidratlarca zengin substratlar üzerinde karanlıkta büyüyen anaerobik bakteri ile gerçekleştirilir. Ancak H<sub>2</sub> fermantasyonunda, substratların enerji potansiyellerinin yalnızca %10-20'si H<sub>2</sub> olarak geri kazanılabilir [1]. Bu verim, mevcut kimyasal veya elektrokimyasal hidrojen üretim prosesleri ile karşılaştırıldığında ekonomik bakımdan çok düşük olduğu görülür. Özellikle reaktör tasarımı ve işletme parametreleri konusundaki yoğun araştırmalar, prosesin geliştirilmesi için halen devam etmektedir [2].

## 2. ANAEROBİK FERMANTASYONLA H<sub>2</sub> ÜRETİMİ (H<sub>2</sub> PRODUCTION WITH ANAEROBIC FERMENTATION)

Havasız arıtma, farklı mikroorganizma gruplarının birlikte yardımlaşarak rol aldığı oldukça kompleks bir biyokimyasal süreçtir. Bununla birlikte başlıca 2 ana grup mikroorganizmanın, asit bakterileri ve metan bakterileri, esas görevi üstlendiği bilinmektedir. Bu iki grup da kendi arasında her biri ikişer alt gruba ayrılmaktadır. Başlıca anaerobik mikroorganizma grupları aşağıda verilmiştir [3]:

Asit bakterileri	Bütirik ve propiyonik asit üretenler
	Asetik asit üretenler
Metan bakterileri	Asetik asit kullananlar
	Hidrojen kullananlar

Biyolojik olarak bozunabilir kompleks organik maddelerin, anaerobik şartlarda ayrışması, genel olarak üç safhadan meydana gelmektedir:

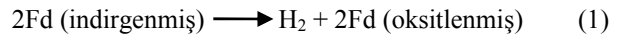
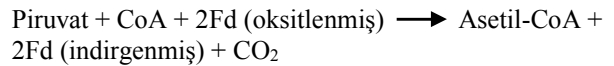
1. Yüksek molekül ağırlıklı katı ve çözünmüş organik maddelerin hidrolizi,
2. Düşük molekül ağırlıklı organik maddelerin, asit bakterilerince uçucu yağ asitlerine ve ardından asetik aside dönüştürülmesi,

3. Asetik asit, H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'den metan üretimi [3].

Karanlık fermantasyon, oksijensiz (anoksik) ya da anaerobik koşullar (oksijenin elektron alıcısı olarak kullanılmadığı durumlar) altında gerçekleşir. Geniş bir bakteri grubu, birincil metabolizmalarının muadillerini bertaraf etmek için, protonları hidrojene indirger. Diğer bir ifadeyle, bir bakteri organik bir besinin üzerinde büyüdüğüde (heterotrofik büyüme) bu besinler oksidasyon ile parçalanarak, büyüme için metabolik enerjinin eldesinde ve hücresel yapı taşlarının sentezinde kullanılır. Oksidasyon prosesi, elektriksel nötrlüğün bertaraf edilmesi için elektronların üretilmesinde kullanılmaktadır.

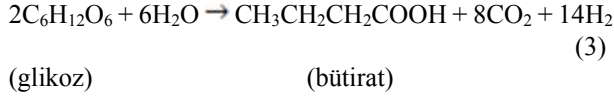
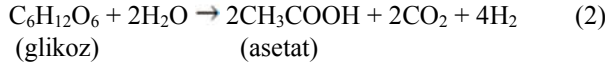
Aerobik (oksijenli) ortamlarda, oksijen indirgenerek suya dönüşür. Anaerobik ya da oksijensiz ortamlarda ise, diğer bileşiklere elektron alıcısı (proton) olarak ihtiyaç vardır ve bu bileşikler moleküler hidrojene (H<sub>2</sub>) indirgenir. Anaerobik ortamlardaki alternatif elektron alıcılarına diğer bir örnek, nitratın azot gazına (N<sub>2</sub>) ya da sülfatın H<sub>2</sub>S'e indirgenmesidir. Eğer bir organik bileşik, elektron alırsa başka bir organik bileşiğe dönüşür. Örneğin mikrobiyal bütanol üretimi, bütirik asidin indirgenmesi ile oluşur. Mikroorganizmalarda, elektron alıcı enzimlerin indirgenmesini katalizleyen spesifik enzimler bulunur. Örneğin hidrojen üreten mikroorganizmalarda bulunan hidrojenaz enzimleri, H<sub>2</sub> üretiminde rol oynar [4].

Hidrojen fermantasyon prosesinde glikoz, glikolitik yol izi ile ilk olarak piruvat'a dönüştürülür. Piruvat, asetil-CoA'ya okside olur. Asetil-CoA, metabolik yol izinde asetil-fosfata dönüştürülür. Bu dönüşme işlemi ATP elde edilirken, yan ürün olarak asetat oluşur. Piruvatın, asetil-CoA'ya oksidasyonu için, ferrodoksinin (Fd) indirgenmesi gereklidir. İndirgenmiş ferrodoksin, hidrojenaz enzimi tarafından oksidasyona uğratılır ve bu işlem sırasında, moleküler H<sub>2</sub> üretilir [5]. Reaksiyon kısaca aşağıdaki eşitlikteki gibi özetlenebilir;



Anaerobik fermantasyon, oldukça basit bir proses yardımı ile geniş spektrumda kullanılabilir substratlardan (organik madde içeriği yüksek organik atıklar dahil) hidrojen üretimini mümkün kılar. Üstelik fermentatif H<sub>2</sub> üretimi, dışarıdan ışık kaynağına gereksinim duymaz ve genellikle yüksek miktardadır. Fermantasyon prosesi için, karbonhidratlar (başlıca glikoz) karbon kaynağı olarak tercih edilir ve hidrojen üretimi, organik asit (asetat, bütirat vs.) ve/veya alkol üretimi ile birlikte

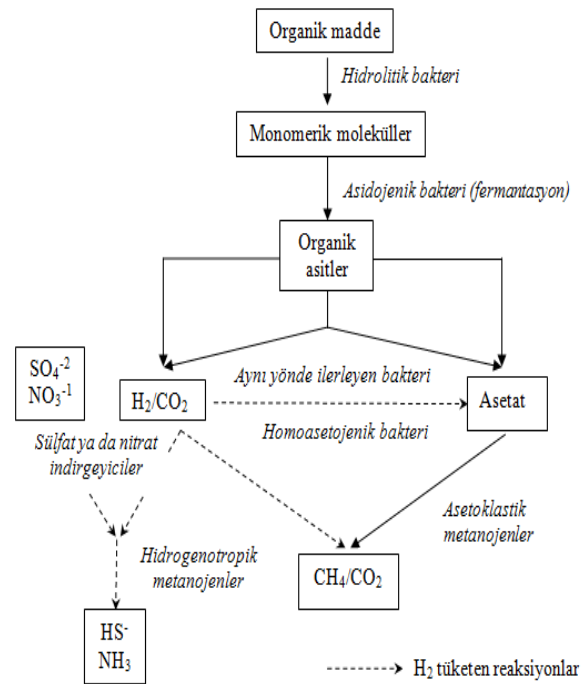
gerçekleşir. Bu proses, aşağıdaki eşitlikler ile gösterilmiştir [5];



Anaerobik proste, birden fazla organik asit üretimi olmaktadır. Bu durum da, H<sub>2</sub> üretim verimini düşürmektedir. Genellikle, üretim için izlenen ana yol, asetat ve bütirat üzerindedir. Bu sebeple H<sub>2</sub> üretim verimi, asetat/bütirat oranı üzerinden hesaplanır [5]. 1 mol glukozdan 4 mol H<sub>2</sub> elde edilmesi, nispeten düşük enerji kullanımı ile sonuçlanır. Çünkü teorik olarak kimyasal oksijen ihtiyacının sadece %33'ü, glukozdan H<sub>2</sub>'ye dönüştürülebilir. Enerjinin geriye kalan kısmı ise çoğunlukla uçucu yağ asitlerine (VFA) (asetat, bütirat) dönüşür. Bu nedenle hidrojen üretimi her zaman, ikinci aşama olan metan üretim prosesi ya da diğer VFA/solvent kullanım prosesleri ile birleştirilmelidir [2, 6].

Anaerobik fermantasyon, organik maddeden hidrojen üretmek için mikroorganizmaların kullanıldığı fotosentetik proseslere benzer. Fakat fotosentetik sistemlere kıyasla daha avantajlıdır. Daha basittir, daha az pahalıdır ve hidrojen üretiminde çok daha hızlıdır. Ayrıca fermentatif yolla organik atıklardan H<sub>2</sub> üretmek, büyük öneme sahiptir. Çünkü bu şekilde hidrojen üretimi sonucunda, sadece organik atıklar artılmaz, aynı zamanda temiz enerji de üretilir. Fakat anaeroblar, ışık enerjisini kullanma yeteneğine sahip değildir ve bu yüzden substratı tamamen parçalamak için kalıtsal termodinamik enerji bariyerini aşma yeteneğinden yoksundur. Birçok diğer hidrojen üreten organizmada olduğu gibi hidrogenaz enzimi, anaerobik bakteri içindeki hidrojen üreten reaksiyonların katalizlenmesinden sorumludur. Hidrojen verimini maksimize edebilmek için, substrat metabolizması, alkol ya da indirgenmiş asit üretiminden daha çok uçucu yağ asidi üretimi yönünde yürütülmelidir. Şu anda anaerobik bakteriden elde edilen maksimum hidrojen verimleri, geleneksel reformasyon teknikleri ile karşılaştırıldığı zaman fermentatif prosesi ekonomik açıdan çekici kılmamaktadır. Ancak geliştirilecek olan yeni teknolojiler ve metabolizma mühendisliğindeki ilerlemeler ile, fermantasyon yol izinin ideal olan asetat fermantasyonu yönünde kaydırılmasıyla verimin daha da artacağı düşünülmektedir [7].

Şekil 1'den de görüldüğü üzere anaerobik fermantasyonda üretilen gaz H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO ve bazı hidrojen sülfürlerin karışımından oluşur [8]. Bu yüzden yüksek saflıkta hidrojen elde etmek için, bu gaz karışımı içerisinde hidrojeni ayırmak gerekir. Ayırma işlemi sonrasında hidrojenin hangi kalitede olması gerektiği, kullanım tipine bağlıdır ve bu kaliteyi yakalamak için gerekli gaz artımı birkaç aşama gerektirebilir. Hidrojence zengin fermantasyon gazı içinde bulunabilen H<sub>2</sub>S, siloksanlar, su, amonyak ve CO<sub>2</sub> gibi bileşikler (özellikle de H<sub>2</sub>S ve siloksanlar), pahalı fiziksel-kimyasal metotlar kullanılarak giderilmektedir. Bu nedenle daha az maliyetle biyolojik arıtım proseslerini gerçekleştirmek için, çalışmalar yapılmalıdır [6].



Şekil 1. Mikrobiyal konsorsiyum aracılığı ile organik maddenin anaerobik parçalanmasında hidrojenin rolü (Hydrogen role in the anaerobic degradation of organic matter by microbialconsortia) [9]

### 3. FERMENTATİF H<sub>2</sub> ÜRETİMİNİ ETKİLEYECEK FAKTÖRLER (FACTORS INFLUENCING FERMENTATIVE H<sub>2</sub> PRODUCTION)

Hidrojen fermantasyonunun kritik zorlukları, düşük hidrojen dönüşüm verimliliği ve stabil olmayan hidrojen üretimidir. Prosesin verimi kullanılan aşı, substrat türü ve miktarı, reaktör tipi, ortamdaki metal iyonları, sıcaklık, pH, inorganik besin maddeleri, çalışma koşulu vs. gibi birçok faktörden etkilenir [10]. pH, hidrolik alıkonma süresi, sıcaklık vs. gibi çalışma parametrelerini optimize etmek ve reaktör tasarımını geliştirmek, hidrojen dönüşüm verimliliğini artırabilir. Stabil olmayan

hidrojen üretiminin, hidrojen üreten bakterinin metabolik değişime uğramasından dolayı kaynaklandığı düşünülür ve bu durum mikrobiyal üreme çalışması ile minimize edilebilir [11]. Aşağıdaki bölümde bu faktörlerin etkisi ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

### 3.1. Aşı Mikroorganizma Türü ve Aşıya Uygulanan Ön İşlemlerin Etkisi (Effect of Type of Seed Microorganism and Pretreatment)

Tablo 1. Hidrojen açığa çıkaran bakterilerin sınıflandırılması (Classification of hydrogen evolution bacteria)

Mevcut enerji biçimi	H <sub>2</sub> gelişim enzimi	Bakteri sınıfı		Bakteri türü	Elektron verici	
Fotosentez yapan	Hidrojenaz	Yeşil alg		<i>Chlamydomonas</i>	Su	
			Mavi yeşil alg	Heterocyst	<i>Chlorella</i>	Su
				Non-Heterocyst	<i>Anabaena</i>	Su
	Nitrogenaz	Fotosentetik bakteri	Sülfür bakterisi değil		<i>Oscillatoria</i>	Su
				Sülfür bakterisi	<i>Rhodospseudomonas</i>	Organik Madde (Organik asitler)
					<i>Rhodobacter</i>	Organik asitler
Fotosentez yapmayan	Hidrojenaz	Zorunlu anaerob		<i>Rhodospirillum</i>	Sülfatlar	
				<i>Chromatium</i>	Sülfatlar	
				<i>Thiocapsa</i>	Organik madde	
	Nitrogenaz	Azot sabitleyici bakteri	Fakültatif anaerob		<i>Clostridium</i>	Organik madde (Şekerler)
					<i>Methanobacterium</i>	Organik madde (Şekerler)
				Fakültatif aerob	<i>Escherichia</i>	Şekerler
		Fakültatif anaerob	<i>Azotobacter</i>	Şekerler		
			<i>Clostridium</i>	Şekerler		
			<i>Klebsiella</i>	Şekerler		

Sayırsız saf kültür bakterisi, çeşitli substratlardan hidrojen üretmek için kullanılmaktadır. *Clostridium* (oksijene duyarlı), *Enterobacter* (fakültatif anaerob) ve *Bacillus* (aerob) türleri fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için aşı olarak, çok yaygın biçimde kullanılan saf kültürlerdir. *C. Butyricum*, *C. Beijerinckii*, *C. Acetobutyricum* ve *C. Bifermentatns* gibi *Clostridium* türleri gram pozitif, çubuksu, kuvvetli anaerobtur ve endospor oluşturur. Halbuki *Enterobacter* gram negatif, çubuksu ve fakültatif anaerobtur. Anaerobik H<sub>2</sub> üretimini içeren çalışmaların çoğunda, *Clostridium* bakterisi kullanılmıştır.

Fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için saf kültür bakterinin kullanıldığı çoğu çalışma, substrat olarak glikoz kullanılarak kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Fakat organik atıktan sürekli H<sub>2</sub> üretimi, prosesin ticarileştirilmesi, enerji üretimi ve atık azaltım hedeflerine ulaşmak için daha uygundur [14].

Toprak, sediman, kompost, aerobik ve anaerobik çamur ve benzeri doğal ortamlarda hidrojen üretme yeteneğine

Hidrojen üretme yeteneği olan mikroorganizmalar, Tablo 1'de görüldüğü üzere anaerobik bakteri, fermantasyon bakterisi, aerobik bakteri, fotosentetik bakteri ve alg olarak sınıflandırılmıştır [12]. Tablo 2'de ise, anaerobik bakteri sınıfındaki çeşitli mikroorganizmalarla hidrojen üretimi karşılaştırılmıştır [13].

sahip bakteri geniş ölçüde bulunmaktadır. Günümüzde bu materyallerden elde edilen karışık bakteri kültürü, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için aşı kaynağı olarak kullanılmaktadır [15]. Karışık kültür kullanılan fermentatif H<sub>2</sub> üretim prosesi, saf kültür kullanılarak yapılan çalışmaya göre daha uygulanabilir ve hidrojen üretimi proses süresince daha stabildir. Çünkü çalıştırmak daha basittir ve kontrol etmek daha kolaydır ve daha kapsamlı bir ham madde kaynağına sahiptir [15]. Ancak aşı olarak karışık kültür kullanıldığında, biyoreaktör içindeki öncelikli baskın türler sıcaklık, pH, substrat, aşı tipi, aşı ön artımı, hidrojen kısmi basıncı vb. gibi çalışma koşullarına bağlı olarak değişir. Aşıya ön artım uygulaması, karışık kültür içinde bulunan mikrobiyal toplulukların değişmesi ile hidrojen üretimini artırmak için kullanılmaktadır. Uygulanan ön artımın amacı, H<sub>2</sub> tüketen bakteri aktivitesini kesmektir.

Tablo 2. Çeşitli mikroorganizmalarla hidrojen üretimi (Hydrogen production by various microorganisms) [13]

Organizma	Substrat	Çalışma şekli	pH/ Sıcaklık	Maksimum H <sub>2</sub> üretimi (L H <sub>2</sub> /L kültür ortamı)	Verim (mol H <sub>2</sub> /mol substrat)
<b>Anaerobik bakteri</b>					
<i>C. butyricum</i> EB6	POME*	Kesikli	5,5/37°C	3,2	-
<i>C. butyricum</i> ATCC19398	Glikoz (3 g/L)	Kesikli	7,2/35°C	0,94	1,8
<i>C. acetobutyricum</i> M121	Glikoz (3 g/L)	Kesikli	7,2/35°C	0,88	2,29
<i>C. tyrobutyricum</i> FYa102	Glikoz (3 g/L)	Kesikli	7,2/35°C	0,63	1,47
<i>C. beijerinckii</i> L9	Glikoz (3 g/L)	Kesikli	7,2/35°C	1,19	2,81
<i>C. thermolacticum</i>	Laktoz (10 g/L)	Sürekli	7,0/58°C	-	3,0
<i>C. thermocellum</i> 27405	Delignifiye edilmiş ağaç lifi	Kesikli	6,3/60°C	-	1,6
<i>C. tyrobutyricum</i>	Glikoz (5 g/L)	Sabit	HRT 2 saat	7,2 L H <sub>2</sub> /L gün	223 mL/g heksoz
<b>Fakültatif anaerobik bakteri</b>					
<i>E. aerogenes</i> ATCC29007	Glikoz (118,06 mM)	Kesikli	6,13/38°C		425,8 mL H <sub>2</sub> (g kuru hücre saat) <sup>-1</sup>
<i>Klebsiella oxytoca</i> HP1	Glikoz (10 g/L)	Kesikli	7,0/65°C	87,5 mL H <sub>2</sub> /L saat	1,0
<i>Citrobacter</i> sp. Y19	Glikoz (10 g/L)	Kesikli	7,0/36°C	32,2 mmol H <sub>2</sub> /g hücre saat	2,49
<i>E. asburiae</i> SNU-1	Glikoz (25 g/L)	Kesikli	7,0/30°C	398 mL H <sub>2</sub> /L saat	-
<b>Termofilik bakteri</b>					
<i>T. thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Sakkaroz (10 g/L)	Kesikli	6,25/60°C	12,12 mmol H <sub>2</sub> /L gün	2,53
<i>T. saccharolyticum</i> JW/SL-YS485	Ksiloz (4 g/L)	Kesikli	6,2/55°C	-	0,88
<i>T. maritima</i> DSM3109	Glikoz (7,5 g/L)	Kesikli	6,5/65°C	0,275	1,67
<i>T. neapolitana</i> DSM4359	Glikoz (10 g/L)	Kesikli	7,0/65°C	0,29	1,84
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM8903	Sakkaroz (10 g/L)	Kesikli	7,0/70°C	8,4 mmol H <sub>2</sub> /L	5,9

\* Hurma yağı fabrikası çıkış suyu

Örneğin *Clostridium* ve *Bacillus* türleri, endospor oluşumundan dolayı, H<sub>2</sub> tüketen metanojenlere kıyasla daha yüksek sıcaklıkları tolere edebilirler. Diğer taraftan H<sub>2</sub> üreten bakteri, H<sub>2</sub> tüketen metanojenlere kıyasla daha düşük pH'larda büyüyebilir [16]. Son yıllardaki çalışmalar, mikroflora dağılımının fermantasyon koşulları ile ilgili olduğunu göstermiştir [17]. Eğer çevresel bir koşul değişirse, anaerobik karışık kültürde mikroorganizmaların çeşitliliği değişebilir. Iyer ve diğ., [18] bir H<sub>2</sub> üretim reaktöründe farklı koşullar altında bakteriyel popülasyondaki değişimleri izlemek için pH 5,5'de glikoz kullanılan bir sürekli karıştırmalı tank reaktörde (CSTR) çalışmıştır. 30 saatlik hidrolik alıkonma zamanında popülasyon daha farklılık gösteriyorken (*Bacillaceae* ve *Enterobacteriaceae*

içeriyor), 10 saatlik hidrolik alıkonma zamanında yalnızca *Clostridiaceae* belirlenmiştir. 10 saatlik hidrolik alıkonma zamanında sıcaklık 30 °C'den 37°C'ye değiştiği zaman, *Clostridium acidisoli*'a ait popülasyondan *C. acetobutylicum*'a ait popülasyona bir popülasyon değişimi olmuştur.

Saf kültür kullanımı ile daha yüksek H<sub>2</sub> verimine ulaşılmasına rağmen, saf kültür endüstriyel uygulamalar için uygun değildir. Çünkü saf kültür, metanojenler ya da sülfat indirgeyen bakteri gibi çeşitli hidrojen kullanıcıları tarafından kolaylıkla kontamine olabilir [6]. Bunların yanı sıra doğal atık materyalleri parçalamak için saf kültür uygulaması, atık içerisindeki çeşitli organik bileşikleri parçalamak için farklı bakteri türlerine ihtiyaç duyulmasından dolayı uygun değildir ve bu tür gerçek atıksu akımlarını sterilize etmek için gerekli maliyet de

çok yüksektir. Teknik açıdan uygulanabilir prosesler için, doğal kaynaklardan elde edilen karışık kültürler ve steril olmayan substrat kaynakları ile çalışılmalıdır. Fakat karışık kültürden H<sub>2</sub> üretimi sırasında, bazı engellerle karşılaşmaktadır. Bu engellerden birisi, karışık kültür içinde hidrojen üreten bakteri ve moleküler H<sub>2</sub> kullanımıyla enerji elde edebilen H<sub>2</sub> tüketen anaerobların çeşitli tiplerinin (metanojen, asetojen ve sülfat indirgeyen bakteriler) bir arada bulunmasıdır [19]. Karışık kültür kullanımıyla H<sub>2</sub> üretmek için metanojenler, asetojenler ve sülfat indirgeyen bakterinin aktivitesi önlenmeli ve aşı hidrojen üreten bakteri ile zenginleştirilmelidir. Karışık kültür içindeki hidrojen üreten bakteri aktivitesini zenginleştirmek için uygulanan ön arıtım metotları çoğunlukla şunlardır: ısı şok, asidik ve/ya da bazik ön arıtım, havalandırma, dondurma ve çözme, kloroform, sodyum 2-bromoethanesulfonate ya da 2-bromoethanesulfonic asit ve iodopropane gibi çeşitli kimyasal maddelerle temas [10]. Ancak aşılama koşulları, çalışılan ön arıtım metodu, her ön arıtım metodunun spesifik koşulu ve substrat türü arasındaki farklılıklar en iyi verimin alındığı ön arıtım metodunun seçimi konusunda bazı uyumsuzluklara sebep olmaktadır [15].

### 3.2. pH'ın Etkisi (Effect of pH)

pH, hidrojen üreten bakterinin aktivitesini ve fermentatif H<sub>2</sub> üretimini etkileyen önemli bir faktördür. Çünkü hem hidrogenaz aktivitesini hem de metabolik yol izini etkiler. Ayrıca pH, hidrojen tüketen metanojenik aktivitenin önlenmesi için de önemlidir. Hidrojen üretim verimliliği ve çözünebilir metabolitlerin bileşimi, pH'daki değişime duyarlıdır. Başlangıç pH'sının, yüksek hidrojen üretim hızı ve elde edilecek optimum dönüşüm verimliliği arasında hassas bir denge kurduğunu söylenebilir. Kabul edilebilir aralık dışında kalan pH değeri, bakteri metabolizmasını değiştirerek hidrojen üretimini sınırlayabilir ve sistem başarısızlığına yol açarak mikrobiyal popülasyon kaymasına (özellikle karışık kültürde) sebep olabilir.

Çoğu çalışmada H<sub>2</sub> üretimi için optimum pH değeri, 6 ve 8 arasındadır [10]. Karışık mikrofloranın kullanıldığı bazı çalışmalar da ise, 4,2 ve 5 gibi düşük pH' larda ve kuvvetli asidik koşullarda maksimum verimin alındığı görülmüştür [10]. Karbonhidratlardan hidrojen üretimi için optimum pH, 5,2-7,0 arasında değişmekle birlikte ortalama pH değeri, 6'dır [14]. Literatüre göre, pH 6'da en yüksek hidrojen üretim performansı sağlanmıştır [20]. Farklı çalışmaların sonuçları fermentatif yol üzerinden H<sub>2</sub> üretiminin zayıf asidik koşullarda daha iyi desteklendiğini göstermiştir. Başlangıç pH'ı, kesikli sistem H<sub>2</sub> üretiminde mikroorganizmanın aktif hale geçmesi için gerekli süreyi etkilemektedir. 4-4,5 aralığındaki düşük başlangıç pH'ında, 9 civarındaki

yüksek başlangıç pH'ı seviyesine kıyasla, mikroorganizmanın aktif hale geçmesi için gerekli sürenin daha uzun olduğu görülmüştür [21]. Başlangıç pH'ı yükseltildiğinde ise, H<sub>2</sub> üretim verimi azalmıştır. Yüksek başlangıç pH'ının tamponlama kapasitesini eş zamanlı olarak azaltan kısıtlayıcı seviyede yağ asidi üretimine sebep olması, H<sub>2</sub> üretimindeki azalmanın nedeni olarak rapor edilmiştir. Sonuç olarak bakteri ortamdaki hızlı değişime adapte olamamış ve tükenmeye başlamıştır. Fakat diğer tarafta, daha düşük başlangıç pH'ındaki fermantasyon ortamı bakteri için tercih edilmemesine rağmen, bakterilerin bu koşullara adaptasyonu ile daha uzun süre orta hızda dereceli olarak H<sub>2</sub> üretilenmiştir. Çünkü düşük başlangıç pH'sında üretilen asidin seviyesi, pH'da etkili bir düşüş yaratacak seviyede değildir. Sonuç olarak; potansiyel H<sub>2</sub> üreticiler, uygun pH koşullarında ulaşılan nispeten tutarlı bir ortamda daha uzun süre hayatta kalabilirler [10, 22].

Karanlık fermantasyon sırasında organik asitlerin sentezi, pH'ın düşmesine neden olur. Eğer pH'ın düşüşü kontrol altında tutulmazsa, solvent üretimi (etanol, bütanol, aseton) gerçekleşebilir. Asit birikiminden dolayı, pH'ın 4,5'e düşmesi tipik olarak solvent üretimini tetikleyecek ve hidrojen üretimini düşürecektir [23]. Fermantasyon ortamına pepton ilavesinin ani pH düşüşünü engellediği, organik asitlerin ve pH etkisinin hidrojen üretimi üzerine etkisinin araştırılmasına izin verdiği rapor edilmiştir [24]. Protein içeren maddelerin substrat olarak kullanımının, pH'ın sürdürülmesi için faydalı olduğu bilinmektedir. Fermantasyon ortamına protein içeren maddelerin eklenmesi ile pH 6-8 arasında sürdürülebilir ve sistemin inhibisyonu minimize edilir. Bu strateji, pH'ı 5,5 ve 6,5 arasında (optimum hidrojen üretimi için) tutmaya yardımcı olduğu için solvent üretim fazı oluşmaz [9].

Valdez-Vazquez ve Poggi-Varaldo [9] düşük pH'da metan üretiminin durduğunu ve esas gaz olan H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>'nin oluştuğunu bildirmiştir. pH 5 civarındaki düşük pH'nın, metanojen aktivitesini sınırlandırmak ve H<sub>2</sub> üreticilere zengin bir aşı elde etmek için gerekli olduğu rapor edilmiştir. Genelde H<sub>2</sub> üretimi için optimum pH, 5 ve 6,5 arasında değişir [9]. Fakat hidrojen üretimi için rapor edilen optimum pH değerleri, çelişkili ve tutarsızdır. Örneğin; arıtma çamurunun [21] kesikli fermantasyonu için optimum başlangıç pH'ı 11 iken, melas [25] ve glikozun [26] sürekli fermantasyonu için optimum pH, sırasıyla 7 ve 5,5'tir [19].

Karışık kültür ile fermentatif H<sub>2</sub> üretiminde, 6'dan daha yüksek pH değerlerinde metanojenlerin oluşma riski artabilir. pH 6'ya çıkarıldığında 6 saatten daha kısa hidrolik alıkonma süresinde (HRT), CSTR içerisinde metanojenlerin gelişimi rapor edilmiştir [27]. Fakat bazı araştırmacılar, prosesin sürekliliğine katkıda bulunabilen

6,5-6,6 pH değerlerinde, sürekli H<sub>2</sub> üretim sisteminde, metanojenik popülasyon oluşumu gözlenmediğini bildirmiştir [28].

Baskın çözünebilir metabolit olarak propiyonik ve asetik asit oluşumu ile birlikte, 5,0-6,8 pH aralığında genellikle en yüksek H<sub>2</sub> üretimi rapor edilmesine rağmen [29], etanol ve asetik asit öncelikle baskın çözünebilir metabolit olduğu zaman, 4,5-5,0 pH aralığında yüksek H<sub>2</sub> üretimi alınan çalışmalar da sunulmuştur [30]. Düşük pH değerlerinde çalışmak, metanojen ve homoasetojenleri baskılar [30] ve pH kontrolü için baz tüketimini de azaltır [19]. Karışım sıvısındaki gerçek pH, yağ asitlerinin üretiminden dolayı dereceli olarak azalmakla birlikte pH azalmanın derecesi substrat ve çamur konsantrasyonları, sıcaklık, süreklilik ve bunun gibi birçok faktöre bağlıdır.

Genelde, kesikli ve sürekli çalışmaların her ikisinde de başlangıç pH'ı, hidrojen üretim oranı ve verimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Fakat gözlenen artış sürekli değildir. Yukarıda tartışıldığı ve Tablo 3'de verildiği üzere, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için gerekli olan optimum başlangıç pH'ı konusunda bir fikir birliğine varılamamıştır. Bu durum kullanılan aşı türü, substrat konsantrasyonu ve tipi, diğer çalışma koşulları ve çalışılan aralıktaki başlangıç pH'larındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır [7].

Reaktörde düşük derişimdeki biyokütle, VFA üretiminin azalmasına ve yüksek pH'a, yüksek substrat derişimi ise, reaktörde VFA'nın birikimine ve düşük pH'a sebep olur. VFA birikimi hidrojen üreten bakteriyi, hidrojen üretimini azaltan solvent üretimine sevk ederek hücrenin ölümüne yol açar. Reaktörde düşük pH, eğer mikroorganizmalar asidik olmayan ortamdan geliyorsa mikroorganizma aktivitesini engeller. Ayrıca pH azalırken, ayrışmayan asitlerin (asetik, bütirik) oranları artar, ayrışmayan formlar hücre membranından geçebilir, membran pH farkı zayıflar, hücre spor halini alır veya ölür. Ayrıca kesikli sistemlerde substrat derişimi arttığında, hidrojenin kısmı basıncı artar ve mikroorganizmalar alkol üretimine başlar. Böylece hidrojen üretimi engellenir [2, 16]. Yüksek derişimde ayrışmış asitler, çözeltinin iyonik gücünü artırır ve sistemin, hidrojen üretiminden solvent üretimine dönmesine sebep olur. Düşük pH'da polar olmayan ayrışmamış asitler hücre duvarından geçebildiği için, engelleyici etki meydana gelir. Hücre içinde pH çok yüksekse, proton salınır. Bu durum enerji ihtiyacı artışına sebep olur. Bir etki olarak, glikolizden dolayı glikoz akışı azalır. Hücre içi asit derişimini koruyacak ana parametre, hücre dış ortamının pH'ıdır. Hidrojen üretimi için uygun pH aralığı 5-7, en uygun değer ise 5,5'dir. Asetik ve bütirik asitin ayrışmamış formlarının etkisi düşük pH

(pH<4,5)'da büyüktür ve hücre büyümesini engelleyici özelliktedir. Ancak bu bölümde sunulan bilgiler ve literatür çalışmaları göz önünde tutulduğunda, karışık kültürler için uygun pH konusunda öngörüle bulunmanın doğru olmayacağı açıkça ortadadır [13].

### 3.3. Sıcaklığın Etkisi (Effect of Temperature)

Sıcaklık fermentatif H<sub>2</sub> üretimi üzerinde etkili olan en önemli çalışma parametrelerinden biridir. pH gibi, hem metabolik yol izini (pathway) hem de hidrojenaz aktivitesini etkilediği için H<sub>2</sub> üretimi ve hidrojen üreten bakterinin aktivitesi sıcaklıktaki değişimden etkilenmektedir [10, 15]. Uygun bir aralıkta artan sıcaklık, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi süresince hidrojen üreten bakterinin H<sub>2</sub> üretme yeteneğini artıracaktır. Fakat sıcaklığı çok yüksek seviyede artırmak, artan verimin azalmasına sebep olacaktır. Ayrıca sıcaklıktaki değişim etanol, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit konsantrasyonunu etkilediği için, buna bağlı olarak H<sub>2</sub> verimi de etkilenmektedir [15].

Karanlık fermentatif H<sub>2</sub> üretim reaksiyonları, farklı sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilmektedir. Reaksiyonlar, 25-40°C (mezofilik), 40-65°C (termofilik), 65-80°C (aşırı termofilik) ve >80°C (hipertermofilik) sıcaklıkta yürütülebilir. Reaktördeki çalışma koşullarındaki farklılıklardan dolayı (substrat, aşı ve diğer proses koşulları), farklı sıcaklık aralıklarında elde edilen hidrojen verimlerini karşılaştırmak zordur. Çizelge 4'de fermentatif H<sub>2</sub> üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi karşılaştırılmıştır. Ancak tam bir kıyaslama yapabilmek için hidrojen verimlerinde birimsel eşitlik sağlanamamıştır. Hidrojen üreten *Clostridium sp.*'nin çoğu mezofilik koşulları tercih ettiği için, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi alanındaki çalışmaların büyük bölümü mezofilik sıcaklıklarda yapılmıştır (yaklaşık 37°C) [6]. Literatüre göre karanlık fermentatif H<sub>2</sub> üretimi, mezofilik sıcaklıklarda çok yaygın olarak uygulanır [20]. Termofilik koşullar ise, çok daha az tercih edilir [10]. Termofilik H<sub>2</sub> prosesleri, H<sub>2</sub> üretimi için yüksek verim vermesine rağmen, bu tür prosesler genellikle düşük hacimsel üretim hızları ile karakterize edilir. Çünkü birçok termofilik mikroorganizma, sıvı kültür içinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşamaz. Düşük hacimsel üretim hızları ise, bu organizmaların faydalı kullanımını sınırlar [31]. Yüksek sıcaklıklar, mikroorganizma aktivitesini etkileyen proteinlerin doğal özelliklerini kaybetmesine neden olabilir. Ayrıca termofilik proseslerin diğer potansiyel dezavantajı, artan enerji maliyetidir. Bu reaktörleri ısıtmak için gereken enerji, üretilen hidrojen ile karşılanacağı için fayda-maliyet analizi yapılarak sistemin ekonomik açıdan uygun olup olmadığı belirlenmelidir.

Tablo 3. Fermentatif biyohidrojen üretimi üzerine farklı pH'ların etkisi (Effect of different pH on fermentative biohydrogen production) [10]

Aşı	Substrat	Başlangıç pH'ı		Verim
		Çalışılan aralık	Optimum pH	
Kompost	Sukroz	4,5-6,5	4,5	214 mL/g KOİ
Anaerobik çamur	Nişasta	5,0-7,0	5,0	1,1 mol/mol heksoz
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sukroz	5,0-6,5	5,5	2,78 mol/mol sukroz
Atık aktif çamur	Gıda atık suyu	4,0-8,0	6,0	4,71 mmol/g KOİ
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Sukroz	4,0-8,5	6,2	2,53 mol/mol heksoz
<i>Citrobacter</i> Y-19	Glikoz	4,0-9,0	7,0	11,7 mmol/g hücre saat
<i>Citrobacter</i> CDN-1	Glikoz	4,5-6,5	5,0	2,1 mol/mol glikoz
<i>Enterobacter clocae</i> IIT-BT-08	Sukroz	4,5-7,5	6,0	6,0 mol/mol sukroz
Karışık kültür	Sukroz	3,4-6,3	4,2	1,61 mol/mol glikoz
Anaerobik çürütülmüş çamur	Pirinç bulamacı	4,0-7,0	4,5	346 mL/g nişasta

Tablo 4. Fermantatif biyohidrojen üretimi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi (Effect of different temperatures on fermentative biohydrogen production)

Aşı	Substrat	Sıcaklık		Hidrojen Verimi
		Çalışılan aralık	Optimum değer	
<i>Citrobacter</i> CDN-1	Glikoz	27-40	30	2,1 mol/mol glikoz
<i>Ethanoligenes harbinense</i> YUAN-3	Glikoz	20-44	37	1,34 mol/mol glikoz
Anaerobik çamur	Glikoz	25-55	40	275,1 mL/g glikoz
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Sukroz	40-80	60	2,53 mol/mol heksoz
Kentsel arıtma çamuru	Sukroz	30-55	40	3,88 mol/mol sukroz
Kentsel arıtma çamuru	Nişasta	37-55	55	1,44 mmol/g nişasta
İnek gübresi	İnek gübresi	37-75	60	743 mL/kg inek gübresi
Anaerobik çürütülmüş çamur	Organik atık	37-55	55	360 mL/g uçucu katı

### 3.4. Kullanılan Substrat ve Konsantrasyonunun Etkisi (Effect of the Used Substrate and Its Concentration)

Fermentatif H<sub>2</sub> üretiminin sürdürülebilirliği, kullanılan substrata bağlıdır ve substratın fiziksel kimyasal özellikleri prosesin tüm verimliliğini kuvvetle belirler. Laboratuvar çalışmaları çoğunlukla saf substratlar (glikoz, sakkaroz, nişasta ve selüloz gibi) üzerine odaklanmasına rağmen, pilot ölçekli uygulamalar daha kompleks substratların kullanımını gerektirir.

Sürdürülebilir biyohidrojen üretimi için kullanılacak ham maddenin bazı kriterleri karşılaması gerekir. Bu kriterler şu şekilde verilebilir:

- Ham madde, özellikle sürdürülebilir kaynaklardan üretilen karbonhidrat olmalıdır [6].
- Fermentatif dönüşüm, enerji kazanımını tercih edilebilir yapacak yeterli konsantrasyona sahip olmalıdır.
- Açığa çıkan enerji, kullanım açısından tercih edilebilir olmalıdır.

➤ Ham madde, düşük maliyetli olmalı ve minimum ön arıtım gerektirmelidir.

➤ Bulunabilirlik ve parçalanabilirliği yüksek sürdürülebilir kaynaklar olmalıdır [32, 33].

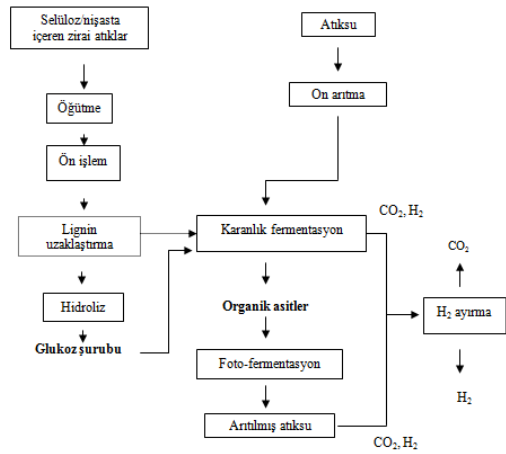
Hidrojen, sadece karbonhidratlardan elde edilebildiği için, birçok substrat H<sub>2</sub> üretimi için kullanılamaz. Yağlar ve proteinler gibi, kullanılabilir substratların sayısı genişletilebilirse prosesin uygulanabilirliği artacaktır. Nişasta ve selüloz gibi kompleks karbonhidratlar ise, heksoz moleküllerine (glikoz) ayrıldıktan sonra hücrenin ihtiyaç duyduğu enerjiyi üretmek için daha ileri bir aşamaya ayrışır. Ancak bu şekilde, H<sub>2</sub> üretimi için uygun hale gelmiş olur. Şekil 2'de, selüloz ve nişasta içeren tarımsal atık ve gıda sanayi atıksuyundan hidrojen üretimi özetlenmiştir [33].

Tercih edilen karbon kaynakları arasında glikoz ve sukroz, fermentatif hidrojen üretimi çalışmalarında sıklıkla kullanılan substratlardır. Nişasta ya da selüloz



gibi daha kompleks karbonhidratlar ve melas gibi karbonhidratça zengin atıklar da, hidrojen üretim çalışmalarında daha dar kapsamlı olsa substrat kaynağı olarak kullanılabilir [19]. Çünkü karbonhidratça zengin atıksu ve katı atıkların birçoğunda bu maddeler bulunur.

Biyohidrojen üretiminde kullanılan diğer substrat kaynakları, protein ve yağca zengin atıklardır. Bu tip atıklar, karbonhidratça zengin atıklar ile karşılaştırıldığında bulunabilirlikleri az olmasına rağmen, organik atıkların biyolojik dönüşümü ile hidrojen eldesi için, potansiyel besinlerdir. Çalışmalarda kullanılan substratların çoğu şu şekilde tanımlanmaktadır; polisakaritler: selüloz; heksozlar: glikoz; pentozlar: ksiloz, arabinoz ya da disakaritler: sükröz ve maltoz. Substrat olarak kullanılacak olan ham maddenin maliyeti, hidrojen üretim prosesinin ekonomik olması yönünden önem arz eder. Bu nedenle toksik olmayan endüstriyel atıksular ve bazı biyolojik parçalanabilir karbonhidratları içeren atıksular (örneğin; peyniraltı atıksuyu, kentsel katı atık sızıntı suyu, şeker ve melas üretim fabrikalarından çıkan atıksu, yemekhanelerden çıkan gıda atığı ya da gıda işleme fabrikası atıksuyu, alkol üretim prosesinden çıkan atıksu, nişasta üreticileri atığı, pirinç şarabı, makarna fabrikası, yağ fabrikası, ekmek mayası ve bira fabrikası atıksuları vb.), farklı işletme parametrelerine sahip fermentatif hidrojen üretim prosesleri için kullanılabilir [7, 34].



Şekil 2. Nişasta veya selüloz içeren tarımsal atıklar ve gıda endüstrisi atıksularından biyohidrojen üretim şeması (A schematic diagram for biohydrogen production from cellulose/starch containing agricultural wastes and food industry wastewaters)

Bazı kompleks substratlar (atık aktif çamur, birincil çamurlar, domuz gübresi vb.) kompleks yapılarından

dolayı fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için uygun değildir. Fakat ön arıtmadan sonra, hidrojen üreten bakteri tarafından kullanılabilirler. Kentsel atıksu arıtma tesisinden çıkan atık aktif çamur, yüksek seviyede organik madde içerir. Bu yüzden H<sub>2</sub> üretimi için potansiyel bir substrattır. Uygun ön arıtım işlemleri uygulandıktan sonra atık aktif çamurdan hidrojen üretmek için, hidrojen üreten bakterinin yeteneği geliştirilebilir. Tablo 5’de, atık aktif çamurdan fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için uygulanan farklı ön arıtım metotları ve elde edilen sonuçlar özetlenmiştir. Optimum şartların sağlanması için atık aktif çamura uygulanacak en uygun ön arıtım metodu, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için kullanılan aşı, substrat ve çalışma koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterir [7].

Fang ve diğ., [35] yaptığı çalışmada, H<sub>2</sub> fermantasyonu için pirinç bulamacı ve gıda proses atığı kullanmıştır. Pirinç bulamacı ile 6 farklı konsantrasyonda (2,2; 5,5; 8,3; 11,0; 13,8 ve 22,1 g karbonhidrat/L) çalışmalar yapılmış ve 5,5 g karbonhidrat/L konsantrasyonda, 15,4 mM/g karbonhidrat H<sub>2</sub> ile en yüksek verim rapor edilmiştir. Maksimum verim alınan konsantrasyon değeri üzerine çıkıldığında, H<sub>2</sub> verimi sürekli olarak azalmıştır. Verimdeki bu azalma, biyoreaktör içinde üretilen yüksek konsantrasyonda VFA ve alkol üretiminden kaynaklanabilir. Diğer tarafta Yang ve Shen [36], substrat olarak nişasta kullanmışlar ve çözünebilir nişastanın konsantrasyonundaki artıştan (5, 10, 20, 30 ve 40 g nişasta/L) H<sub>2</sub> üretiminin önemli derecede etkilenmediğini ancak; 20 g/L nişasta konsantrasyonunda daha fazla H<sub>2</sub> üretildiğini rapor etmişlerdir. Literatürden elde edilen veriler, optimum substrat konsantrasyonunun farklı koşullar altında değiştiğini göstermektedir. Bu nedenle her çalışma için, en iyi koşulların tanımlanması oldukça önemlidir.

Tablo 5. Atık aktif çamura uygulanabilecek ön arıtım metotları (Pretreatment methods for waste activated sludge)

Aşı	Reaktör tipi	Ön arıtım metodu	En uygun metot	Maksimum hidrojen verimi
<i>Clostridium bifermentans</i>	Kesikli	Dondurma ve çözme, ultrasonikasyon, asidifikasyon, sterilizasyon ve metanojenik inhibisyon	Dondurma ve çözme	2,1 mmol/g KOİ
<i>Clostridium bifermentans</i>	Kesikli	Dondurma ve çözme, ultrasonikasyon, asidifikasyon, sterilizasyon	Dondurma ve çözme	4,1 g/kg kuru katı
<i>Pseudomonas sp.</i> GZ1	Kesikli	Sterilizasyon, mikrodalga ve ultrasonikasyon	Sterilizasyon	15,02 mL/gTKOİ
<i>Eubacterium multiforme/ Paenibacillus polymyxa</i>	Kesikli	pH 11'de alkali ön arıtım	pH 11'de alkali ön arıtım	16,6 mL/g kuru katı

### 3.5. H<sub>2</sub> Kısmi Basıncının Etkisi (Effect of H<sub>2</sub> Partial Pressure)

Sıvı safha içindeki hidrojenin kısmi basıncı, H<sub>2</sub> üretimini etkileyecek önemli faktörlerden biridir. H<sub>2</sub>'nin kısmi basıncındaki azalma, verimin artmasını sağlarken; artan H<sub>2</sub> kısmi basıncının etkisi, daha yüksek besleme gücünün kullanımını sınırlayabilir. Hidrojen konsantrasyonu arttığı için, metabolik yol izi hidrojen yerine indirgenmiş ürünlerin üretimi yönünde kayar. Yüksek konsantrasyonda H<sub>2</sub> elde etmek için, metanojenler tarafından tüketilmeden ya da H<sub>2</sub> üretiminin baskılanmasına sebep olmadan önce, hidrojen sistemden yapay olarak giderilmelidir [37]. Reaktör içerisinde H<sub>2</sub>'nin kısmi basıncındaki azalma, hidrojen üretimini artırabilir. Sıvı içindeki H<sub>2</sub> konsantrasyonu arttığı zaman, hidrojen üretim reaksiyonları daha az tercih edilir [32].

Kesikli testlerde gaz basıncının aralıklı olarak serbest bırakılması ile hidrojen üretiminin % 43'e kadar arttığı rapor edilmiştir [38]. Argon ya da azot gazı püskürtmek sureti ile hidrojen kısmi basıncını azaltmak da sürekli kültür içindeki H<sub>2</sub> üretim verimini artırmaktadır. Doğal ekosistemlerde ise düşük H<sub>2</sub> kısmi basıncı, hidrojen üreten bakteriler ve metanojenler gibi hidrojen tüketen bakteriler arasındaki aynı yönlü ortaklık aracılığı ile sağlanır [19].

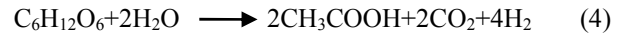
Diğer bir parametre olan karıştırma hızı da, H<sub>2</sub> verimini etkilemektedir. Artan karıştırıcı hızının, çözünmüş H<sub>2</sub> konsantrasyonunu daha da düşürdüğü görülmüştür [32].

### 3.6. Fermantasyon Son Ürünlerinin Etkisi (Effect of Fermentation Last Products)

Anaerobik karışık kültür ile biyohidrojen üretimi karışık kültür sisteminin davranışından ve hidrojenin çevresel koşullara duyarlılığından dolayı çok kompleks bir biyolojik sistemdir. Anaerobik karışık aşı çamur, farklı biyolojik özelliklere sahip çeşitli fermentatif bakteri türleri ve sporlarından oluşur. Her grup farklı bir biyokimyasal yolu tercih eder ve kendi türüne özgü bir

yan ürün ya da son ürün üretir. Bir bakteri grubu biyohidrojen üretiyorken, diğer bir bakteri grubu onu tüketebilir. Diğer tarafta bazı bakteri türleri çevresel koşullar uygunsa, hidrojeni hem üretilen hem de tüketebilir. Bu duruma en iyi örnek, biyohidrojen üretimine karşı asetat oluşumudur.

Asetik asit son ürün olduğu zaman, teorik olarak maksimum 4 mol H<sub>2</sub> elde edilir.

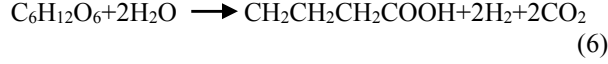


*C. acetium* gibi Clostridia'nın bazı türleri, H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'i asetata dönüştürmekle aşağıdaki reaksiyonda olduğu gibi H<sub>2</sub> verimini düşürebilir. Bu yüzden artan asetat üretimi, H<sub>2</sub> veriminin arttığına dair bir kanıt değildir [32].



Bakteriyel fermantasyon, mikroorganizmanın büyümesi ve sürekliliği için gerekli enerjiyi elde ederken bir substrat kaynağına ihtiyaç duyar ve metabolik yol izi süresince organik asit, alkol ve hidrojen gibi bazı ara ürünler üretilir. Fermantasyon yol izi süresince ara ürün olarak H<sub>2</sub> üretimi, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve laktik asit gibi fermantasyon son ürünlerinden etkilenir (Eşitlik 4-6).

En yüksek teorik H<sub>2</sub> verimi, fermantasyon son ürünü olarak asetat oluşumu ile ilişkili olmasına rağmen; pratikte en yüksek H<sub>2</sub> verimi, asetat ve bütirat fermantasyon ürünlerinin karışımı ile ilişkilidir. Karışımın asetik asit ve bütirat içeriği propiyonattan daha yüksek olduğu zaman, H<sub>2</sub> verimi daha da yüksektir. Bütirat son ürün olduğunda ise, 1 mol glikoz başına maksimum 2 mol H<sub>2</sub> elde edilir. Fakat bu bilgilere rağmen, fermantasyon yol izi ve hidrojen üretim yeteneği arasındaki ilişki tam olarak çözülememiştir [39].



Kullanılan organik besin maddeleri ve bakteri türlerine bağlı olarak açığa çıkan organik asitler (malat, laktat, propiyonat, bütirat ve/ya da asetat), anaerobik bakterinin fermentatif metabolizması ile desteklenemez ve bunların H<sub>2</sub>'ye dönüşümü enerji açısından tercih edilebilir bir reaksiyon değildir. Bu yüzden bu organik asitler, büyüme ortamında birikir ve mikroorganizma büyüme hızlarında azalmaya sebep olduğu için H<sub>2</sub> üretim verimi azalır. Sonuç olarak H<sub>2</sub> üretim reaksiyon süresi, nispeten kısa olabilir ve verim organik asitlerin birikiminden dolayı azalabilir [40].

Biyohidrojen üretimi, anaerobik fermantasyon prosesinde laktatın üretimi ile negatif olarak etkilenir. Gerçekte laktat, karanlık fermantasyon ile H<sub>2</sub> üretimi için esas problemdir. Büyük miktarda laktat üretilirse, *Laktobasillus* türü laktat fermantasyon bakterisi fermantasyon ortamında baskın olabilir. Laktat üreten bakteri baskınsa, piruvat reaksiyonlarında hidrojenin tüketiminden dolayı H<sub>2</sub> üretilemeyebilir. Sıvı alkoller H<sub>2</sub> üretiminde tercih edilmeyen diğer ürünlerdir. Laktat üreten bakteri, diğer anaerobik fermentatif bakteriler ile uyum sağlayabildiği için ayarlanmış pH ve sıcaklık altında laktat üretimi mümkün değildir. Bu durum sık sık meydana gelmesine rağmen, anaerobik fermantasyonla biyohidrojen üretimi için çok önemli bir risktir. Ek olarak laktat, anaerobik karışık kültür içindeki *Clostridia sp.* tarafından üretilebilir. Laktat ile H<sub>2</sub> üretilebilse bile, H<sub>2</sub> verimi düşüktür ve H<sub>2</sub> üretim hızı, bütirat ve asetat gibi diğer yol izlerinden daha yavaştır.

Propiyonatın oluşumu ve birikimi, hidrojen oluşumundaki verimsizlik ve toksik etkisinden dolayı sistem için diğer bir problemdir. Normal olarak propiyonik asit, diğer ürünler ile birlikte üretilir. Fakat asidik ve konvansiyonel anaerobik proseslerde, diğer ürünler artıyor iken propiyonat seviyesi azalır. Propiyonatın birikimi, sistem için büyük bir risktir. Çünkü bu koşullar altında, ne hidrojen ne de diğer ürünler üretilebilir. pH 5,3 ya da daha düşük pH değerlerinde, asidik fermentatif proses içinde propiyonat üretimi önlenemez [41].

Özellikle de aseton ve bütanol gibi bazı ara ürünlerin oluşumu ile de, hidrojen üretimi negatif olarak etkilenir. Asetat üretildiği zaman var olan 2H<sup>+</sup> kullanılarak, aseton üretilebilir. Bütanolün, bütirat yolizinden çıkan 4H<sup>+</sup> kullanılarak üretilebildiği de bilinmektedir [30].

Hidrojen, çoğunlukla bütirat, asetat ve etanol yol izi ile üretilebilir. Etanol, sistem içindeki stabil fonksiyonundan dolayı, fermentatif hidrojen için önemli bir üründür.

Literatür araştırması gösteriyor ki etanol, anaerobik karışık kültür içindeki bütün ürünler ile bir arada olabilir. H<sub>2</sub> verimini etkileyen etanol oluşumunun, optimum seviyesini bulmak önemlidir. Ren ve diğ., [42] yaptığı çalışmada, asetat/etanol oranı yaklaşık olarak 1 olduğunda en iyi hidrojen veriminin elde edildiğini rapor etmiştir.

H<sub>2</sub>, ara ürünlerin her biri ile üretilse de üretilmesi de sistem onlardan sadece birini üretse bile, inhibisyon etkisinden dolayı, hidrojen üretim hızı azalabilir ya da durabilir. H<sub>2</sub> verimini maksimize etmek için, bakterinin metabolizması alkolden (etanol, bütanol) ve uçucu yağ asitleri yönünden indirgenmiş asitlerden (laktat) uzakta yönetilmelidir [43]. Çünkü ayrıştırılmayan asitler, hücre membranından geçebilir, transmembran pH değişim derecesini düşürebilir ve bu yüzden hücre ölümüne ya da spor oluşumuna sebep olabilir [19].

### 3.7. Azot ve Fosfor Konsantrasyonunun Etkisi (Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentration)

Azot, protein nükleik asit ve enzimler için çok önemli bir bileşen olmasından dolayı hidrojen üreten bakterinin büyümesi için gerekli en önemli besin maddelerinden biridir.

Bu yüzden uygun miktarda azot ilavesi, hidrojen üreten bakterinin büyümesine ve fermentatif H<sub>2</sub> üretimine olumlu yönde etki edecektir. Bu amaçla en çok kullanılan azot kaynağı, amonyak azotudur. Fosfor, besin değeri ve tamponlama kapasitesinden dolayı hidrojen üretimi için gereklidir. Azot ve fosfor konsantrasyonunu artırmak, verimi artırır. Fakat fazla miktarda artış, artan verimin

azalmasına sebep olacaktır. Bu nedenle uygun C/N ve C/P oranı, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için gereklidir. Kullanılan deneysel şartlardan dolayı optimum N, P, C/N, C/P oranları hususunda, ortak bir karara varılamamıştır [2, 15].

Tablo 6. Fermentatif biyohidrojen üretimi üzerine farklı metal iyonlarının etkisi (Effect of different metal ions on fermentative biohydrogen production)

Aşı	Substrat	Reaktör tipi	Metal iyonu	Konsantrasyon (mg/L)		Hidrojen verimi
				Çalışılan aralık	Optimum kons.	
Anaerobik çamur	Nişasta	Kesikli	Fe <sup>2+</sup>	0-4000	150	279,9 mL/g nişasta
Anaerobik çamur	Glikoz	Kesikli	Fe <sup>2+</sup>	0-1500	350	311,2 mL/g glikoz
<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i> N1-4 (ATCC13564)	Glikoz	Kesikli	Fe <sup>2+</sup>	1-100	25	7,73 mL/saat
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glikoz	Kesikli	Fe <sup>2+</sup>	0-1000	25	408 mL/g glikoz
Anaerobik çamur	Palm yağı işleme atıksuyu	Kesikli	Fe <sup>2+</sup>	2-400	257	6,33 L/L
Çürütülmüş çamur	Glikoz	Kesikli	Ni <sup>2+</sup>	0-50	0,1	296,1 mL/g glikoz
Hidrojen üreten bakteri B49	Glikoz	Kesikli	Mg <sup>2+</sup>	1,2-23,6	23,6	2360,5 mL/Lsaat
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glikoz	Kesikli	Mg <sup>2+</sup>	0-1000	0,0	77,5 mL/L saat
Anaerobik çamur	Glikoz	Kesikli	Cu <sup>2+</sup>	0-400	400	1,74 mol/mol glikoz
Çürütülmüş çamur	Sukroz	Sürekli	Ca <sup>2+</sup>	0-300	150	3,6 mol/mol
Kentsel atık çamur	Sukroz	Sürekli	Ca <sup>2+</sup>	0-27,2	27,2	2,19 mol/mol sukroz
Anaerobik çamur	Glikoz	Kesikli	Zn <sup>2+</sup>	0-500	250	1,73 mol/mol glikoz

### 3.8. Metal İyonunun Etkisi (Effect of Metal Ion)

Yüksek metal iyonu konsantrasyonu, H<sub>2</sub> üreten bakterinin aktivitesini sınırlandırabilmesine rağmen iz miktarda metal iyonu, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için gereklidir. Ortamda bulunması hidrogenaz enzimi açısından gerekli olduğundan Fe<sup>2+</sup>, fermentatif H<sub>2</sub> üretimi için çok geniş ölçüde araştırılan bir metal iyonudur.

Biyohidrojen üretimi, fermantasyon süresince bakteriyel metabolizma için gerekli mikronütrientleri gerektirir. Na, Mg, Zn ve Fe gibi elementlere bakteriyel enzimin kofaktörü, taşınım prosesleri ve dehidrogenaz tarafından ihtiyaç duyulduğu için, mikroorganizmalar içindeki H<sub>2</sub> metabolizmasını etkileyen önemli iz metallerdir. Tablo

6'da fermentatif H<sub>2</sub> üretimi üzerine farklı metallerin etkisi incelenmiştir [10].

Ağır metallerin zehirliliği de, hidrojen üretim sistemlerinde dikkate alınmalıdır. Yapılan çalışmalarda bazı metallerin zehirlilik seviyelerinin, Cu>Ni-Zn>Cr>Cd>Pb şeklinde değiştiği görülmüştür [15].

Mineral tuz içeriği de, hidrojen üretimini etkiler. Uygun içerik ile elde edilen hacimsel hidrojen üretim hızı (VHPR), geleneksel asidojenik nütrient formülasyonu ile elde edilen değerden %66 daha yüksektir. Demirin yanı sıra magnezyum, sodyum ve çinko, bakteriyel enzim kofaktörleri, taşınım prosesleri ve dehidrogenaz için gerekli olduğundan VHPR'yi etkileyen önemli iz metallerdir [16].

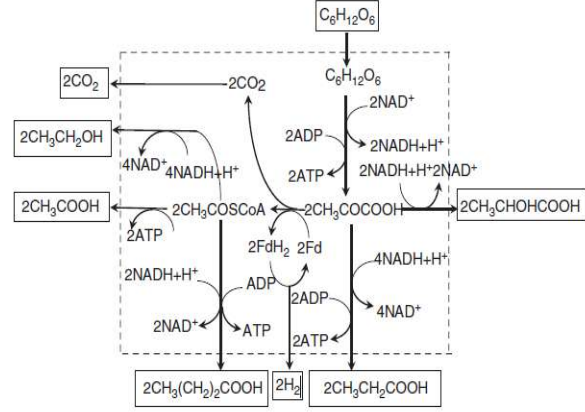
### 3.9. Hidrolik Alınma Süresi (HRT) (Hydraulic Retention Time)

HRT, sürekli sistemde işletilen reaktörlerde hidrojen üretim hızını ve/ya da verimini potansiyel olarak etkileyen bir faktördür. Ayrıca HRT'nin, substratın fermantasyonu sırasında ürün bileşimini de etkilediği görülmüştür. En uygun HRT, çeşitli faktörlere (reaktör şekli, kullanılan substrat, belirli mikroorganizma veya mikrobiyal topluluklar) bağlı olarak değişmekle birlikte, her sistem için belirli bir özelliktir. Uygun aralıkta HRT artışı bakterilerin hidrojen üretim yeteneğini artırır. Fakat çok yüksek seviyelerdeki HRT, azaltır [2]. Wongtanet ve diğ., [44] 35°C'de ve pH 5,5'de CSTR'de anaerobik karışık kültür ile yaptıkları çalışmada, HRT'yi 3 günden 1 güne azalttıklarında, hidrojen veriminin 0,66'dan 1,24 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz'a arttığını rapor etmiştir.

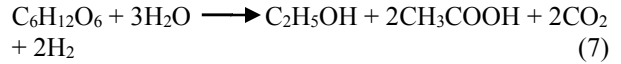
Çok düşük HRT'de çalışmak, biyokütle yıkanmasına yol açabilir. Ancak çok yüksek HRT'de çalışmak da, uygun değildir. Çünkü yüksek seviyede uçucu yağ asidi birikimiyle, hidrojen üretiminin inhibisyonuna yol açabilir [19]. Esasen kısa HRT'de, hidrojen tüketiciler, birincil olarak da metanojenler, ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu nedenle HRT'nin kontrolü, aşırı çamurun ön arıtımı olmaksızın hidrojen tüketicileri sınırlandırmak için diğer bir strateji olabilir. Lin ve Jo [45], metan üretimini tamamen inhibe edebilmek amacıyla, 8 saate kadar HRT'yi kademeli olarak azaltarak anaerobik ardışık kesikli reaktörde hidrojen üretim verimini artırmayı başarmışlardır.

### 3.10. Metabolik Kayma (Metabolic Shift)

Şekil 3'de karbonhidratların fermantasyonu ile oluşan olası fermantasyon ürünleri gösterilmektedir [42]. Pratikte yüksek H<sub>2</sub> verimleri, asetat ve bütirat fermantasyon ürünlerinin karışımı ile düşük H<sub>2</sub> verimi ise, alkol ve laktik asit gibi indirgenmiş son ürünler ve propiyonat ile ilişkilidir [43]. Fakat düşük pH değerleri gibi (4,5-5,0) özel çevresel koşullar altında, etanol tip fermantasyon ile H<sub>2</sub> elde edilebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 3. Bazı diğer yan ürünler ve fermentatif hidrojen oluşumu için örnek yol izi (Fd, Oksitlenmiş ferredoksin; FdH<sub>2</sub>, İndirgenmiş ferredoksin) (Representative pathways of fermentative hydrogen evolution and some other by-products (Fd, oxidized ferredoxin; FdH<sub>2</sub>, reduced ferredoxin).



Bu yüzden etanol oluşumu, her zaman düşük hidrojen üretim veriminin işareti değildir. Hidrojen üretecek bakterinin metabolik yol izi, çeşitli çevresel faktörlerden önemli derecede etkilendiği için bu durum çok iyi bir şekilde araştırılmalıdır [29].

### 3.11. Enzim (Enzyme)

Biyohidrojen üretimi, mikroorganizmalarda bulunan hidrojen üreten enzimlere bağlıdır. Bu enzimler, çok basit redoks reaksiyonlarında (2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup> → H<sub>2</sub>) katalizör olarak görev yapar. Bu reaksiyonu gerçekleştiren enzimlerin birçoğu, aktif yerlerinde karmaşık metali gruplar ve özel proteinler içerirler. Birçok hidrojen üretim sistemi tarafından kullanılan üç ana hidrojen üreten enzim (nitrogenazlar, [NiFe]-hidrojenazlar ve [FeFe]-hidrojenazlar) vardır.

Nitrogenazlar, azotu amonyağa bağlayan reaksiyonu katalizler ve aynı anda protonların (H<sup>+</sup>) hidrojene zorunlu indirgenmesini sağlar.

[NiFe]-hidrojenazlar, hidrojen üretiminde nitrogenazlardan 15 kat daha etkilidir. [NiFe]-hidrojenazlar, sadece hidrojen üretmez ayrıca onlar uptake hidrojenazlar (hidrojen tüketen enzimler) olarak da görev alabilir. Hidrojenden gelen elektronları nikotinamid adenindinükleotid fosfatı (NAD(P)) indirgemekte kullanır.

En etkili hidrojen üretim enzimi, [FeFe]-hidrojenazlardır. Nitrogenazlardan 1000 kat, [NiFe]-hidrojenazlardan ise 10-100 kat daha iyi aktiviteye

sahiptir. [FeFe]-hidrojenazlar, çevrelerine bağlı olarak ya hidrojen üretir ya da tüketirler. Bu enzimlerin üçü, genel olarak oksijene hassastırlar ve uygun hızda hidrojen üretmek için oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. [NiFe]-hidrojenazlar ve [FeFe]-hidrojenazlar, anaerobik mikroorganizma karışımı veya saf kültürler tarafından karanlık fermantasyonlarda kullanılabilir. Bu reaksiyonlarda oksijen üretilmediği veya tüketilmediği için, her iki hidrojenaz tipinin oksijen tarafından pasif hale getirilme olasılığı çok düşüktür [2].

#### 4. SONUÇ (CONCLUSION)

Gelecekte olması muhtemel enerji krizlerine çözüm arayışları geçmişten bugüne artan bir hızda devam etmektedir. Bu yönde ortaya atılan çözüm önerilerinden bir tanesi de önemli bir enerji taşıyıcısı olan hidrojenin enerji kaynağı olarak kullanımının ve üretiminin artırılması yönündedir. Hidrojen üretim yöntemlerinden olan biyolojik hidrojen üretimi ve bunun bir alt uygulaması olan karanlık fermantasyonla hidrojen üretimi, enerji verimliliği ve temiz enerji üretimi açısından avantajlı gözükmektedir. Ancak derleme çalışmamızda da anlatıldığı üzere, anaerobik fermantasyonla H<sub>2</sub> üretimini etkileyen pek çok faktör vardır. Çalışma parametrelerini optimize etmek ve reaktör tasarımını geliştirmek yapılan çalışmalarda hidrojen üretim verimliliğini artıracaktır. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak olan karanlık fermantasyonla biyohidrojen üretim çalışmalarından, daha önce yapılmış çalışmalara kıyasla daha olumlu sonuçlar alınabilmesi için makalemizde belirtilen faktörlerin optimizasyonuna ayrıca önem verilmesi gerektiği açıkça ortadadır. Yapılmış ve yapılmakta olan çalışmalar da ilerleme kaydedilmesi durumunda hem karanlık fermantasyon ile elde edilen hidrojen veriminde artış gözlenecek, hem de ticari açıdan uygulanabilirliği artacaktır.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] D.H. Kim, S.K. Han, S.H. Kim, H.S. Shin “Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, pp 2158-2169, 2006
- [2] N. Genç, “Fermentatif biyohidrojen üretim proseslerinde hidrojen veriminin geliştirilmesindeki yaklaşımlar”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(3), pp 225-239, 2010
- [3] İ. Öztürk “Anaerobik arıtma ve uygulamaları”, 2. Baskı, Su vakfı, İstanbul, 2007
- [4] E. Aksöyek “İmmobilize biyoreaktörde hidrojen üretiminin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir, 291147, 2011
- [5] K. Nath, D. Das “Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, pp 520-529, 2004
- [6] J. Bartacek, J. Zabranska, L. Piet “Developments and constraints in fermentative hydrogen production”, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, pp 201–214, 2007
- [7] H. Hafez “A novel system for biological hydrogen production from wastes”, PhD Thesis, Studies The University of Western, School of Graduate and Postdoctoral, London, Ontario, Canada, ISBN:978-0-494-73366-0, 2010
- [8] M. Ni, D.Y.C. Leung, M.K.H. Leung, K. Sumathy, “An overview of hydrogen production from biomass”, *Fuel Processing Technology*, 87, pp 461-472, 2006
- [9] I.M. Valdez-Vazquez, H. Poggi-Varaldo “Hydrogen production by fermentative consortia”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, pp 1000–1013, 2009
- [10] P. Sinha, A. Pandey “An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, pp 7460-7478, 2011
- [11] S.M. Kotay, D. Das “Biohydrogen as a renewable energy resource- prospects and potentials”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, pp 258-263, 2008
- [12] J. Miyake, T. Matsunaga, A.S. Pietro, “Biohydrogen II An Approach to Environmentally Acceptable Technology”, *Permagon*, 2001
- [13] M.L. Chong, V. Sabaratnam, Y. Shirai, A. Hassan “Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, pp 3277-3287, 2009
- [14] C.L. Li, H.H.P. Fang “Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures”, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, pp 1-39, 2007
- [15] J. Wang, W. Wan “Factors influencing fermentative hydrogen production: A review”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, pp 799–811, 2009
- [16] G. Davila-Vazquez, S. Arriaga, F. Alatrisme-Mondragon, A. Leon-Rodriguez, L.M. Rosales-Colunga, E. Razo-Flores, “Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives”, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7, pp 27-45, 2008
- [17] F.R. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D.L. Hawkes, “Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora:

- Principles and progress”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, pp 172-184, 2007
- [18] P. Iyer, M.A. Bruns, H. Zhang, V.S. Ginkel, B.E. Logan, “H<sub>2</sub> producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum”, *Microbial Biotechnology*, 66, pp 166–173, 2004
- [19] B. Baghchehsaraee “Batch and continuous biohydrogen production using mixed microbial culture”, PhD Thesis, The University of Western Ontario, School of Graduate and Postdoctoral Studies, London, Ontario, Canada, ISBN:978-0-494-54265-1, 2009
- [20] L. Özkan “Dark fermentative biohydrogen production from sugar-beet processing wastes”, MSc. Thesis, Middle East Technical University, The Graduate school of natural and applied sciences, Ankara, 259209, 2009
- [21] M.L. Cai, J.X. Liu, Y.S. Wei, “Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment”, *Environmental Science & Technology*, 38 (11), pp 3195-3202, 2004
- [22] S.K. Khanal, W.H. Chen, L. Li, S. Sung, “Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, pp 1123-1131, 2004
- [23] K. Vijayaraghavan, D. Ahmad, M. Khairil Bin Ibrahim, H. Naemmah Binti Herman, “Isolation of hydrogen generating microflora from cow dung for seeding anaerobic digester”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 6, pp 708–720, 2006
- [24] S.S. Cheng, S.M. Chang, S.T. Chen, “Effects of volatile fatty acids on a thermophilic anaerobic hydrogen fermentation process degrading peptone”, *Water Science and Technology*, 46 (4/5), pp 209–214, 2002
- [25] C.H. Chau, J.J. Lay, “In: A mixture design approach to hydrogen-producing anaerobes using molasses”, *Proceedings of Anaerobic Digestion*, Montreal, Canada, 2, pp 856-861, 2004
- [26] S.E. Oh, P. Lyer, M.A. Bruns, B.E. Logan, “Biological hydrogen production using a membrane bioreactor”, *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (1), pp 119-127, 2004
- [27] H.H.P. Fang, H. Liu, “Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture”, *Bioresource Technology*, 82 (1), pp 87-93, 2002
- [28] K.S. Fan, N.R. Kan, J.J. Lay, () “Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR”, *Bioresource Technology*, 97 (1), pp 84-89, 2006
- [29] N.Q. Ren, B.Z. Wang, J.C. Huang, () “Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor”, *Biotechnology and Bioengineering*, 54 (5), pp 428-433, 1997
- [30] M.H. Hwang, N.J. Jang, S.H. Hyun, I.S. Kim, “Anaerobic biohydrogen from ethanol fermentation: the role of pH”, *Biotechnology*, 111, pp 297-309, 2004
- [31] P.C. Hallenbeck, “Fundamentals of the fermentative production of hydrogen”, *Water Science and Technology*, 52 (1-2), pp 21-29, 2005
- [32] F.R. Hawkes, R. Dinsdale, D.L. Hawkes, I. Hussy, “Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, pp 1339–1347, 2002
- [33] I.K. Kapdan, F. Kargı, “Biohydrogen production from waste materials”, *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (5), pp 569–582, 2006
- [34] X. Wu, “Fermentative hydrogen production from liquid swine manure with glucose supplement using an anaerobic sequencing batch reactor”, PhD Thesis, The University of Minnesota, A dissertation submitted to the faculty of the graduate school, United States Code, UMI Number: 3366955, 2009
- [35] H.H.P. Fang, C.L. Li, T. Zhang, “Acidophilic biohydrogen production from rice slurry”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, pp 683-692, 2006
- [36] H. Yang, J. Shen, “Effect of ferrous iron concentration on anaerobic biohydrogen production from soluble starch”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (15), pp 2137-2146, 2006
- [37] S. Tanisho, M. Kuromoto, N. Kadokura, “Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 23 (7), pp 559-563, 1998
- [38] Logan, B.E. Oh, S.E. Kim, I.S. Ginkel, S.V. (2002) “Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers”, *Environmental Science & Technology*, 36, pp 2530-2535.
- [39] N. Ren, Y. Li, A. Wang, J. Li, J. Ding, M. Zadsar, “Hydrogen production by fermentation: Review of a new approach to environmentally safe energy production”, *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 9 (1), pp 39-42, 2006a
- [40] A. Malis, M.R. Melnicki, “Integrated biological hydrogen production”, *Hydrogen Energy*, 31, pp 1563-1573, 2006
- [41] Y. Mu, H.Q. Yu, G. Wang, “Evaluation of three methods for enriching H<sub>2</sub>-producing cultures from anaerobic sludge”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (4), pp 947-953, 2007
- [42] N. Ren, J. Li, B. Li, Y. Wang, S. Lui, “Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale

- bioreactor system”, *Hydrogen Energy*, 31, pp 2147-2157, 2006b
- [43] D.B. Levin, L. Pitt, M. Love, “Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, pp 173-185, 2004
- [44] J. Wongtanet, B.I. Sang, S.M. Lee, D. Pak, “Biohydrogen production by fermentative process in continuous stirred-tank reactor”, *International Journal of Green Energy*, 4, pp 385-395, 2007
- [45] C.Y. Lin, C.H. Jo, “Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78, pp 678-684, 2003