

Atıkların Biyohidrojen Üretim Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Biohydrogen Production Potential of Wastes

Nevim GENÇ*

Kocaeli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 41380, İzmit

Geliş Tarihi/Received : 14.01.2011, Kabul Tarihi/Accepted : 06.03.2011

ÖZET

Bu makalede, enerji bitkileri, lignoselülozik kalıntılar, atık ve atıksular gibi biyohidrojen üretiminde kaynak olabilecek potansiyel biyokütle tipleri tartışılmıştır. Fermentatif biyohidrojen üretimi için uygun substratın seçiminde karşılanması gereken ana ölçüt, elde edilebilirliği, maliyeti, karbonhidrat içeriği (şekerler ve karbonhidratlar gibi kolay fermente olabilen bileşiklerin yüksek oranda olması) ve biyoparçalanabilirliğidir (yüksek derişimde parçalanabilir organik bileşiklerin ve düşük derişimde mikrobiyal aktiviteye inhibitör bileşiklerin olması). Nişasta ve şeker esaslı biyokütle ve atıklar hidrojen üretimi için mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla fermente olabildiği halde, lignoselülozik biyokütlenin ön arıtılmış olması gerekir. Ön arıtım, biyokütlenin fiziksel ve kimyasal yapısal özelliklerinin değiştirilmesi için uygulanır. Genel olarak, lignoselülozik biyokütlenin ön arıtım metotları, yapısal özelliklerinin değiştirilmesi için kullanılan araçlara göre üç ana tipe ayrılabilir: mekanik, fizikokimyasal ve biyolojik.

Anahtar Kelimeler : *Fermentatif hidrojen üretimi, Enerji bitkileri, Lignoselülozik atık, Gıda atığı/Atıksuyu, Substratın ön arıtımı.*

ABSTRACT

In this article, types of potential biomass that could be the source for biohydrogen generation such as energy crops, lignocellulosic residues, waste and wastewaters are discussed. The major criteria that have to be met for the selection of substrates suitable for fermentative biohydrogen production are availability, cost, carbohydrate content (high proportion of readily fermentable compounds such as sugars and carbohydrates) and biodegradability (a high concentration of degradable organic compounds and low concentration of inhibitory to microbiological activity compounds). Although starchy and sugar based biomass and wastes are readily fermentable by microorganisms for hydrogen generation, lignocellulosic biomass needs to be pretreated. Pretreatment is carry out for altering the structural features of biomass which are classified as physical or chemical. In general, pretreatment methods of lignocellulosic biomass can be divided into three main types, according to the means used for altering its structural features: mechanical, physicochemical and biological.

Keywords : *Fermentative hydrogen production, Energy crops, Lignocellulosic waste, Food waste/Wastewater, Pretreatment of substrate.*

1. GİRİŞ

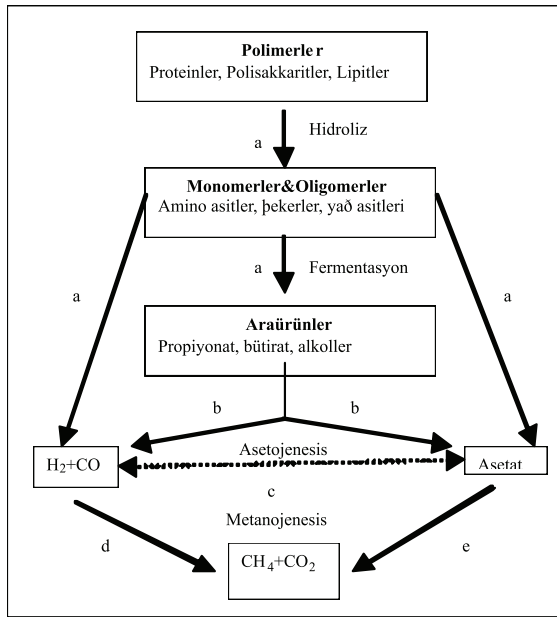
Enerji krizi ve çevrenin bozulması, günümüzde global sürdürülebilir gelişimde iki ana konudur. Enerji tüketiminin % 80'ninin üzerinde fosil yakıtlara bağlı olduğu kabul edilmektedir (Guo v.d., 2010b). Bu durum sadece iklim değişimi ve global ısınmaya değil ayrıca doğal enerji kaynaklarının hızla tükenmesine de neden olur. Bundan dolayı hemen hemen tüm dünya ülkeleri temiz ve yenilenebilir enerji kaynaklarına ilgi duymuştur. Uluslararası Enerji Ajansının 1998

verilerine göre dünya enerji ihtiyacının % 14'ü biyokütleden sağlanmıştır. Biyokütle geleceğin yakıtı olarak nitelendirilen gaz ve sıvı yakıtlara (etanol, metanol, metan ve hidrojen gibi) biyolojik olarak dönüşebilir (Antonopoulou v.d., 2008). Son on yıldaki araştırmalar biyoetanol ve biyodizel üretimi üzerine odaklanmıştır. Tahıl, şeker kamışı ve palmye yağı gibi gıda ürünleri kullanılarak yapılan bu ilk biyoyakıt üretimi, dünyanın gazolin veya dizele bağımlılığını hafifletecek olası alternatif olarak görülmüştür. Bununla birlikte, bu durum

* Yazışılan yazar/Corresponding author. E-posta adresi/E-mail address : ngenc@kocaeli.edu.tr (N. Genç)

dolaylı olarak gıda fiyatlarının artışına sebep olmuş ve böylece son günlerdeki global gıda krizine katkı sağlamıştır. Bundan dolayı, bitkilerin, tarımsal kalıntılar dahil, biyoyakıt dönüşümü ile ikincil biyoyakıt üretimi, yenilenebilir enerji yönündeki ilerlemede esas oluşturmuştur. Atıktan biyogaz gibi alternatif enerji kaynakları üretiminde, özellikle biyohidrojen göz önünde bulundurulması gerektiği ifade edilmektedir (Guo v.d., 2010b).

Atıksu veya organik katı atıklar gibi yenilenebilir, ucuz ve bol bulunan kaynaklardan hidrojen üretiminde anaerobik işlem geniş ölçüde kullanılmaktadır. Fermentatif hidrojen üretimi olarak da tanımlanan bu işlemde saf veya karışık mikrobiyal topluluk tarafından anaerobik ortamda karmaşık organik polimerler (protein ve polisakaritler gibi) fermentatif bakteri (a) ile monomerlere hidrolizlenir, fermentatif bakteriler monomerleri düşük molekül ağırlıklı organik asitler alkol karışımlarına fermente eder. Fermentasyon ürünleri asetojenesis olarak isimlendirilen işlem ile zorunlu hidrojen üreten asetojenik bakteri (b) tarafından asetik asit ve hidrojene daha ileri oksitlenir. Asetojenesis ayrıca asetojenler ve homoasetojenler (c) tarafından hidrojen ve karbon dioksitten asetat üretimini de kapsar. Hidrojen üreten asetojenik bakteri (b) hidrojenotrofik metanojenler (d) ile büyür. Son olarak asetoclastik metanojenler (e) asetatı metan ve karbon dioksit dönüştürür (Şekil 1) (Li ve Fang, 2007; Valdez-Vazquez, ve Poggi-Varaldo, 2009; Angenent v.d., 2004).

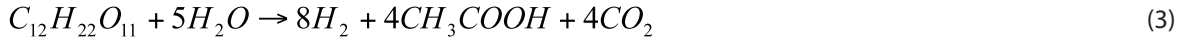
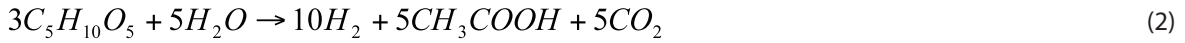
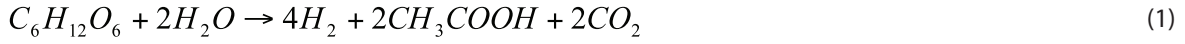


Şekil 1. Organik polimerlerin anaerobik yol izi (Li ve Fang, 2007).

Teorik olarak karbonhidratlar, yağlar ve proteinler bakımından zengin herhangi bir organik madde fermentatif biyohidrojen üretimi için olası bir substrat olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte yapılan çalışmaların gösterdiği gibi fermentatif işlem sırasında hidrojenin ana kaynağı karbonhidratlardır, bu yüzden şekerler ve/veya karmaşık karbonhidratlarca zengin biyokütle ve atıkların, biyohidrojen üretimi için en uygun substrat olduğu anlaşılmıştır (Li ve Fang, 2007). Farklı substratların hidrojen üretim potansiyelleri karşılaştırıldığında, karbonhidrat bakımından zengin atıkların (pirinç ve patates) hidrojen üretim potansiyellerinin, ortalama olarak yağ bakımından zengin atıklardan (yağlı et ve tavuk derisi) ve protein bakımından zengin atıklardan (yumurta ve yağsız et) elde edilen değerden 20 kat yüksek olduğu bulunmuştur. Fermentatif biyohidrojen üretimi için uygun substratın seçiminde yüksek karbonhidrat içeriğinin yanısıra karşılanması gereken en önemli ölçüt kolay elde edilebilir oluşu, düşük maliyeti ve yüksek biyolojik parçalanabilirliğidir. Glukoz, sukroz ve laktoz gibi basit şekerler kolayca biyolojik olarak parçalanabilir ve bu yüzden hidrojen üretimi için model substrat olarak tercih edilir. Bununla birlikte saf karbonhidrat kaynakları gerçek ölçekteki hidrojen üretimi için pahalı ham maddelerdir (Ntaikou v.d., 2010a; Kapdan ve Kargı, 2006). Glukozdan hidrojen üretimi bazı substratlar (sukroz, patates nişastası, laktat ve selüloz) ile karşılaştırılmıştır. Melas hariç (1,3 g Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)/şişe) tüm substratlar için 1 g KOİ/şişe substrat derişimleri ile denemelerin yürütüldüğü çalışmada glukoz, sukroz ve melas için lag süreleri benzer bulunmuştur (19-27 saat). Patates nişastası içeren şişeler ise çok yavaş bir biçimde gaz üretmiştir (yaklaşık olarak 40. saatte başlamıştır). Laktat ve selüloz içeren şişeler çok az hidrojen gazı üretmiştir. Bu substratların dönüşüm verimliliği, substratların hidrojen ve asetata maksimum stokiometrik dönüşümü göz önünde bulundurulup kıyaslanmıştır. Mol substrat başına üretilen mol H₂ değeri glukoz (C₆H₁₂O₆), sukroz (C₁₂H₂₂O₁₁), patates nişastası ((C₆H₁₀O₅)_n), laktat (C₃H₅O₃Na) ve selüloz ((C₆H₁₀O₅)_n) için sırası ile 0,92; 1,8; 0,59; 0,01; 0,003 bulunmuştur. Bu değer melas için hesaplanamamıştır. Substratın hidrojene en yüksek dönüşümü, glukoz ve sukrozdaki elde edilmiştir (% 23). Hidrojen dönüşüm verimliliği melas için biraz düşük bulunmuştur (% 15), fakat laktat (% 0,50) ve selüloz (% 0,075) için çok daha düşüktür (Logan v.d., 2002). Reaksiyon stokiometrisine göre 1 mol glukozun asetata dönüşümü 4 mol H₂/mol glukoz verir, fakat bütirat en son ürün olduğu zaman bu değer 2 mol H₂/mol glukoz'dur. Glukozdan elde edilen en yüksek hidrojen verimi 2-2,4 mol/mol'dür. Yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki sukroz diğer basit şekerlere

kıyaslandığında yüksek hidrojen üretim verimi sağlamıştır. Atığın hidrojen üretim verimliliğinin saf substratlar ile karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada laktoz, glukoz ve toz halindeki peynir altı suyunun (% 77 laktoz, % 11 protein (w/w) içerir) fermentatif hidrojen üretim potansiyelleri değerlendirilmiştir. Aşıl olarak anaerobik granüler çamurun kullanıldığı çalışmada laktoz için 5g substrat/L'de, pH 7,5'da 3,6 mol H₂/mol laktoz, toz halindeki peynir altı suyu için için 15 g substrat/L'de, pH 6'da 3,1 molH₂/

mol laktoz, glukoz için 5 g substrat/L'de, pH 7,5'da 1,46 mol H₂/mol substrat hidrojen üretim verimleri elde edilmiştir (Davila-Vazquez v.d., 2008). Kolay biyoparçalanabilir maddeler olan glukoz, ksiloz, sukrozun hidrojene biyodönüşümleri, zor biyoparçalanabilir olan selülozun biyodönüşümü ile karşılaştırılması denklem 1-4'de verilmiştir (Angenent v.d., 2004; Urbanice ve Grabarczyk, 2009).

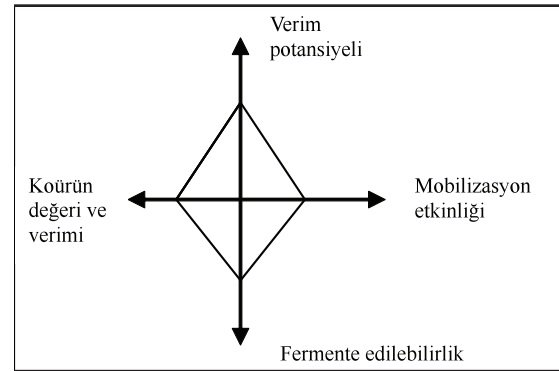


Saf substratların tam ölçekteki tesislerde kullanımı teknik ve ekonomik olarak uygun değildir. Urbaniec ve Grabarczyk (2009) tarafından hidrojen fermentasyonu için hammaddeler için dört aksisli diyagram oluşturularak teknik uygunluk haritası hazırlanmıştır (Şekil 2). Burada dikkate alınan dört ölçüt şu şekilde sıralanmıştır:

- Verim potansiyeli- maksimum hidrojen verimi
- Mobilizasyon etkinliği- hammaddedeki tüm karbonhidratların fermente olabilir şekerlere dönüşebilenin yüzdesi
- Fermente edilebilirlik-ön arıtılmış hammaddenin hidrojen fermentasyonunu geliştirmeye ve inhibe etmeye eğilimi
- Ko-ürün verimi ve değeri- önartım adımından elde edilen ko-ürünün verimi ve değerinin nitelendirilmesi

Hidrojen fermentasyonu için hammaddenin teknik uygunluğu, hammaddeye ait dörtgenin yüzey alanı ile ifade edilir.

Bu kapsamda yukarıda ifade edilen ölçütleri sağlayabilen yenilenebilir biyoküteller önem kazanmıştır. Yenilenebilir biyokütle, atık materyal olarak çeşitli endüstrilerden meydana gelen petrol kökenli olmayan çok yönlü bir kaynaktır ve sürdürülebilir biyohidrojen üretiminde potansiyel substrat kaynağı olarak işlev görür. Kullanılabilecek atık ve biyokütle için farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Birçoğunda kullanılan sınıflandırma



Şekil 2. Hammaddeye ait teknik uygunluk haritası (Urbaniec ve Grabarczyk, 2009).

ölçütü ya substratın kimyasal içeriği ve/veya biyokütle/atığın orjinidir. Genel olarak kullanılan biyokütle/atık tipleri aşağıdaki biçimde analiz edilebilir (Ntaikou v.d., 2010a).

2. ENERJİ BİTKİLERİ

Enerji bitkileri yüksek şeker ve/veya karbonhidrat içeriği ve düşük lignin içeriğinden dolayı hidrojen üretimi için uygundur. Kimyasal içeriklerine göre fermentatif hidrojen üretiminde kullanılan enerji bitkileri şeker esaslı bitkiler (örneğin tatlı sorgum, şeker kamışı ve şeker pancarı), nişasta esaslı bitkiler (örneğin mısır ve buğday), otsu (örneğin çim ve kuru ot) ve odunsu (örneğin *Miscanthus* ve kavak) lignoselüloz esaslı bitkileri içerir. Yapılan çalışmalar enerji bitkilerinin, hidrojen üretimi için oldukça uygun olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte son günlerde gıda fiyatlarının sürekli artışı

ve sürdürülebilirlik üzerine kuşku lar biyoyakıt üretimi için hammadde olarak enerji bitkilerinin kullanımına karşı tepkiler oluşturmuştur. Bazı ülkelerde çok büyük tarımsal alanlar biyoyakıt üretimi için hammadde endüstrisine dönüştürüldüğünden bu yana bu tepkiler yakıtı karşı gıda tartışması üzerine toplanmıştır. Enerji bitkilerinin kullanımına karşı ana düşünce, insan besin ihtiyacını destekleyecek bitkilerin biyoyakıt üretimine yönlendiriliyor olmasıdır. Gıda olmayan bitkilerin yetiştirilmesi durumunda bile sürdürülebilirlik konusu sorun haline gelmiştir. Bu konuya çözüm olarak, yenilebilir bitkilere rekabetçi olmayan atık ve kalıntılar gibi hammaddeler ile biyoyakıt üretimi önerilmiştir (Ntaikou v.d., 2010a).

Hidrojen üretiminde çok sık kullanılan şeker esaslı tatlı sorghum, yüksek fotosentetik verimlilikle karakterize edilmiş, senelik C_4 bitkisidir. Bu bitki yüksek biyokütle verimliliğine sahip ve zengin karbonhidrat içeriğine sahiptir. Bitkinin sapları kuru madde bazında yaklaşık % 55'i kadarı sukroz, % 3,2'si glukoz içerir. Ayrıca selüloz (% 12,4) ve hemiselüloz (% 10,2) da içerir. Tatlı sorghum biyokütlesi kolaylıkla fermente olabilen şeker bakımından zengindir ve bu yüzden fermentatif hidrojen üretimi için mükemmel bir hammadde olarak düşünülebilir. Antonopoulou v.d., (2008) tarafından yapılan çalışmada sorghum ekstraktındaki şekerden fermentatif hidrojen üretimi incelenmiştir. 5kg sorghum biyokütlesinin öğütülmüş sapları 30L musluk suyu ile 30 °C'de 1 saatte karıştırılarak şeker ekstre edilmiştir. Sıvı ekstrakt hidrojen ve metan üretiminde kullanılmıştır. Sorghum ekstraktında en yüksek hidrojen üretim hızı 6 saat alıkonma süresinde (HRT) 2550 ml H_2 /gün olarak elde edilmiştir. Ntaiko v.d., (2010b) tarafından *Ruminococcus albus* ile tatlı sorghum ekstraktından (ana şeker sukrozdur) fermentatif hidrojen üretimi, sentetik substratın model olarak kullanıldığı sistem ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Deney sonuçları hidrojen veriminin, model öngörülerinden sapması % 5-18 arasında olduğunu göstermiştir.

3. LİGNOSELÜLOZİK ATIK VE KALINTILAR

Lignoselülozik kalıntılar, şeker kamışı ve tatlı sorghum küspesi, mısır ve buğday sapı vb. gibi tarımsal kalıntılar ve ağaç kırpıntıları gibi orman kalıntılarını içerir. Enerji bitkilerinin kullanımına kıyaslandığı zaman, şeker ve nişastalı bitkilerin hasat edilmesi ve işlenmesinden sonra kalan kalıntıların (gıda endüstrisi zincirinde daha ileri işlenemeyen) işlenmesi ekonomik ve çevresel sürdürülebilirlik için çok daha iyi bir çözüm üretmesi beklenir. Bol ve hemen hemen sıfır maliyetli olmasına karşın, tarımsal ve orman kalıntıları kolaylıkla fermente

olabilen serbest şeker içermezler, kuvvetli bir şekilde lignine bağlı karmaşık karbonhidrat polimerleri (selüloz ve hemiselüloz) içerirler. Bu yüzden lignoselülozik kalıntıların hidrojene biyodönüşümü birçok durumda kolay değildir. Selülotik mikroorganizmalar kullanıldığı durumda bile, kalıntıların delignifikasyonu için bazı ön arıtım yöntemlerine maruz bırakılmalıdırlar ve ardından selüloz ve hemiselüloz yapılarının serbest kalması sağlanabilir, böylece şekerlerin salınımı ve tüketimi daha da kolaylaşır (Ntaikou v.d., 2010a).

3.1. Lignoselüloz Esaslı Biyokütle ve Atıkların Önartımı

Lignoselülozik biyokütle heterojenite ve kristalinitesinden dolayı, mikroorganizmalar tarafından direkt kullanımı son derece düşüktür (Datar v.d., 2007). İşlem görmemiş lignoselülozik ham maddelerin verimleri genel olarak 0,5-16 ml H_2 /g uçucu katı (VS) aralığındadır (Guo v.d., 2010b).

Nişasta ve şeker esaslı biyokütle ve atıklar, hidrojen üretimi için mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla fermente edilebildiği halde, lignoselülozik biyokütlenin işletilebilmesi için önartılmış olmasına gerek vardır. Biyokütledeki ana organik bileşenler ve kimyasal yapı, yakıt ve kimyasal madde üretim süreçlerinin gelişiminde son derece önemlidir. Lignoselülözün kimyasal bileşenleri dört ana bileşene ayrılabilir. Bunlar selüloz, hemiselüloz, lignin ve özüksenebilir diğer maddeler. Genel olarak ilk üç bileşen yüksek molekül ağırlığına sahiptir, en son bileşen ise küçük moleküler boyuttadır. Selüloz β ,1,4-bağlı D-glukoz birimli yüksek molekül ağırlıklı lineer polimerdir. Hemiselüloz, glukoz, mannoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, 4-o-metil glükuronik asit ve glükuronik asit kalıntıları gibi çeşitli polimerize olmuş monosakkarit karışımıdır. Hemiselülözler selülozdan daha düşük molekül ağırlık gösterir. Lignin fenil-propanoid öncü maddelerden sentezlenen aromatik polimerdir (Balat ve Kırtay, 2010). Lignoselülozik tarımsal kalıntılar % 32-47 selüloz, % 19-27 hemiselüloz ve % 5-24 ligninden oluşmaktadır. Kuru lignoselülozik maddelerin üçte ikisini oluşturan selüloz ve hemiselülözler polisakkaritlerdir. Hemiselüloz ve lignin herikisi, selülözün etrafında koruma kılıfı sağlar. Polisakkaritlerin etkili kullanımından önce hidroliz edilmeleri gereklidir. Hidroliz genel olarak önhidroliz ve selüloz hidrolizi adımlarını içerir. Lignoselülozik materyalin önhidrolizi lignini gidermek ve hemiselülözü kısmen hidrolize etmek için kullanılır, oysa selüloz hidrolizi fermente olabilen şekerlere uygulanır (Ren v.d., 2009).

Ön hidroliz, çoğu kez önartım olarak isimlendirilir, lignoselülozik biyokütlenin yapısını değiştirmek,

selülozu enzimlere (karbonhidrat polimerlerini fermente edebilen şekerlere dönüştüren enzimlere) daha kolay ulaşılabilir yapmak için gereklidir. Önhidroлиз işlemi, fiziksel olarak (mekanik parçalama ve hidrotermoliz), kimyasal (ozonla parçalama, asit hidrolizi, alkali hidroliz, oksidatif lignin giderimi ve organosolv işlemi), biyolojik (beyaz fungi) ve kombine teknikler ile yapılabilir. Ön arıtım metodunun seçimi, ardından gelen hidroliz ve fermentasyon safhasının performansı ve maliyetini etkiler. İdeal önhidroлиз prosesi minimal enerji, kimyasal ve ekipman kullanımı ile yüksek oranda fermente edilebilir şeker sağlar, ürün olan şekerin parçalanması ve kaybını önler, ardından gelen fermentasyona inhibitör oluşumunu önler ve selüloz hidroliz safhasını geliştirir (Ren v.d., 2009). Biyokütlenin partikül boyutu ve kristalinitenin azaltılması işlemi olan mekanik arıtım herhangi bir ön arıttan önce her zaman uygulanır. Partikül boyutunun azalması mevcut özgül yüzeyin artmasına ve polimerizasyon derecesinin azaltılmasına neden olur (Ntaikou v.d., 2010a). Mekanik parçalama adımı, asidojenik fermentasyon işleminde çözünürlük ve fermentasyon verimliliğini destekler (Guo v.d., 2010b). Ön arıtım adımlarının içinde biyolojik teknolojiler en çok tercih edilenidir. Bunun yanı sıra kombine sistemler de tercih edilir. Özellikle biyolojik metodların kontrolü zor ve yeterince etkili olamamasına rağmen, oda sıcaklığında işletilebilmesi, düşük miktarda inhibitör üretmesi, düşük enerji gereksinimi gibi çok önemli bazı avantajlar sunar (Ren v.d., 2009).

Biyokütle ön arıtım metodları ham maddenin tipine ve ilk formuna bağlıdır. Sukroz içeren biyokütle olması durumunda ön arıtım adımı ham özsuynun ekstre edilmesini içerir, ki bu özsuynun direkt olarak fermentöre verilebilir. Nişastalı ve lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımı, polisakaritleri basit şekerlere dönüştüren hidroliz adımını gerektirdiğinden dolayı çok karmaşıktır. Fermentasyon biriminden önce ligninin giderimi önemli bir problemdir, çünkü selüloz ve hemiselülozun aksine basit şekerlere dönüşmez, ayrıca hidrojen üreten mikroorganizmaların büyümesini engeller (Urbaniec ve Grabarczyk, 2009).

3.1.1. Fizikokimyasal Ön Arıtım

Fizikokimyasal ön arıtım sırasında, lignoselülozik biyokütle yüksek sıcaklıklarda asidik, alkali veya oksidatif şartlara maruz bırakılır. Oksitleyici ajanların, alkali, asit ve tuzların kullanıldığı ön arıtım metodları, doğrudan enerji girdisi gerektirmediği için çok sık ele alınıp incelenmiştir (Guo v.d., 2010b). Herhangi bir kimyasal ajan ilave edilmeksizin yüksek sıcaklıkların kullanımı ile de

ön arıtım gerçekleştirilebilir ve işlem basit olarak ısı arıtım olarak isimlendirilir. Fizikokimyasal ön arıtım işlemlerinin herhangi birinde, uygulanan işletme şartlarının şiddetine bağlı olarak, selüloz, hemiselüloz ve lignini birlikte tutan bağlar açılarak lignoselülozik biyokütle parçalanır ve üç polimerin kimyasal yapısında farklı derecede değişimler oluşur. Selüloz, hemiselüloz ve lignin arasında, hemiselülozlar, ısı-kimyasal arıttmaya karşı en hassas olanı olduğu için ilk parçalanan bileşendir. Lignoselülozik biyokütlenin asit arıtımı için, H_2SO_4 ve HCl gibi asitler kullanılabilir. Asit arıtım sırasında meydana gelen ana reaksiyon hemiselülozun hidrolizidir. Bu şartlar altında sırası ile ksiloz ve galaktoz, mannoz ve glukozun dehidrasyonundan dolayı furfural (FF), hidroksimetilfurfural (HMF) ve fenol oluşumu meydana gelebilir, buna karşın formik ve levülinik asitlerin üretimi de gözlenebilir (Cui v.d., 2010; Ntaikou v.d., 2010a). Lignin birçok durumda zor çözünür, fakat yüksek dereceden bölünür, selülozun enzimlere duyarlılığının artmasına sebep olur. Biyokütle üzerine seyreltik bazın ilavesini esas alan alkali ön arıtım işlemi, şişme ile iç yüzeyin artmasına, polimerizasyon derecesi ve kristalinite azalmasına, lignin ve diğer polimerler arasındaki bağların yıkımına ve lignin parçalanmasına neden olur. Bu metodların etkinliği biyokütlenin lignin içeriğine bağlıdır. Lignin başlıca alkali ön arıtım metodlarından etkilenir, lignin - karbonhidrat bağlarının kırılması ve depolimerizasyonuna sebep olur. Hemiselülozun oligomerlerine solubilizasyonu da meydana gelir, oysa selüloz yapısı çok az derecede etkilenir (Ntaikou v.d., 2010a).

Çeşitli ön arıtım teknolojilerinden buharla parçalama etkili bir seçenek olduğu ileri sürülmüştür. Buharla parçalama işleminde yüksek basınç ve sıcaklıkta kuru biyokütle buhar ile doyurulur, ardından biyokütle ısıya maruz bırakılırken küçük delikler vasıtası ile basınç ani olarak tahliye edilir. Bu sırada suyun ani evaporasyonu, biyokütlenin parçalanmasına sebep olan termo-mekanik gücü oluşturur. Bu işlem iki faz meydana getirir. Bunlar: a) hemiselülozdan oluşan çözünmüş ksiloz ve bazı glukoz, mannoz, arabinoz ve galaktoz b) lignin ve selülozca zenginleşmiş ıslak katı kısım (lignoselüloz) (Datar v.d., 2007).

Lignoselülozik tarımsal atıkların yanı sıra bol miktarda bulunan bir biyokütle de kitin içeriğine sahip karides kabuğu gibi deniz biyokütlesidir. Kitin β -1,4-glikozid bağları ile bağlı N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) homopolimeridir, ve bazı deniz organizmalarında, insektlerde, fungi ve alglerde yapısal polisakarit olarak görev alırlar. Kitin, kitinaz yardımı ile glikozid bağının hidrolizi ile mikrobiyal olarak parçalanabilir.

Kitinazlar, kitini düşük molekül ağırlıklı ürünlere parçalayabilen ve kitinin çözünürlüğünü başlatan ana enzim gurubudur. Kitinolitik bakteri (hidrojen üreten mikroorganizma) arasında, *Clostridium*, hidrojen üretmek için kitini fermente ettiği bilinir. Evvyernie v.d. (2001) tarafından *Clostridium paraputrificum* M-21 ile öğütülmüş kitin ve ham deniz ve tarımsal atıkların hidrojene dönüşümü tanımlanmıştır. Yapılan çalışmada karides kabuğu, istakoz kabuğu ve mısır lifi gibi atıklar, GlcNAc ve kitin substrat olarak kullanılmıştır. Kabuklar asit ve alkali ön arıtım işlemlerinden sonra kullanılmıştır. Önarıtımlı ve önarıtımsız/öğütülmüş kabukların hidrojen üretimi karşılaştırılmıştır. *Clostridium paraputrificum* M-21 türü, 1 mol GlcNAc'den ve 1 mol GlcNAc'ye denk öğütülmüş kitinden sırası ile 2,2 ve 1,5 mol hidrojen gazı üretmiştir. Ayrıca bu tür hidrojen gazı üretmek için öğütülmüş ham karides ve istakoz kabuklarını etkili olarak parçalamış ve fermente etmiştir, karides kabuğunun 2,6 g'dan 11,4 mmolH₂, istakoz kabuğunun 1,5 g'dan 7,8 mmolH₂ üretilmiştir. Bu atık kabuklardan hidrojen gelişimi, asit ve alkali önarıtım kullanımı ile iki kat geliştirilmiştir. Mısır lifinin hidrojen üretim veriminin glukoz ve selübiyoz ile karşılaştırılabilir ölçüde olduğu belirlenmiştir. Mısır lifi, glukoz ve selübiyoz için hidrojen verimleri sırası ile 1,1; 1,1 ve 1,4 mol H₂/mol glukoz olarak elde edilmiştir. *Clostridium paraputrificum* M-21, öğütülmüş kitin ve öğütülmüş karides kabuğu üzerinde büyütüldüğü zaman, kültürlerin süpernatantında kitinli maddelerin parçalanmasında kritik rol oynayan en önemli kitinaz türleri olarak ChiA ve/veya ChiB belirlenmiştir.

3.1.2. Biyolojik Önarıtım

Biyokütlenin enzimatik hidrolizini etkileyen sınırlayıcı faktörler iki gruba ayrılmıştır. Bunlar biyokütlenin yapısal özellikleri ve enzim mekanizmasıdır. Ön arıtım biyokütlenin fiziksel ve kimyasal yapısal özelliklerini değiştirir. Kimyasal yapısal özellikler selüloz, hemiselüloz, lignin bileşenlerini ve hemiselüloza bağlı asetil gruplarını kapsar. Fiziksel yapısal özellikler ulaşılabilir yüzey alanı, kristalinite, biyokütle matriksinde ligninin fiziksel dağılışı, polimerizasyon derecesi, gözenek hacmi ve biyokütle parçacık boyutunu kapsar.

Lignoselülozik biyokütlenin biyolojik ön arıtımı oksidasyon ile lignin parçalayabilen hem enzimler ile hem de mikroorganizmalar ile yapılabilir. Lignin hidroksil, metoksil ve karbonil gibi fonksiyonel gruplar içeren polimerik bir maddedir. Amorf heteropolimerler suda çözünmez ve optik olarak aktif değildir, bu yüzden onun parçalanması çok güçtür. Birkaç mikroorganizma türü ligninin biyolojik parçalanmasını yapabilir. Ligninin

enzimatik parçalanması özel enzimlerin (örneğin lignin peroksidaz, manganes peroksidaz, H₂O₂ üreten enzimler ve lakkaz) birlikte kullanılarak kuvvetli oksidantların oluşumu ile gerçekleşir. Mikroorganizma ve enzimatik delignifikasyon verimliliği kıyaslandığında mikroorganizmaların karbonhidratları parçalaması ve tüketimi olası bir olumsuzluk olarak görülür. Bu ise ardından gelen hidrojenbiyodönüşüm veriminin düşmesine sebep olur. Bazı mikroorganizmalar delignifikasyonda seçici olabilirler. Seçici delignifikasyonda, herhangi bir selüloz kaybı olmaksızın lignin giderilir, seçici olmayan delignifikasyonda tüm ana hücre duvarı bileşenleri parçalanır. Örneğin *Phanerochaete chrysosporium* ve *Phlebia radiata* lignini seçici olarak parçalayan beyaz funguslardır, *Pleurotus* sp. lignin ve hemiselülozları seçici olarak parçalar. En son delignifikasyon verimliliği oksijen, nem seviyesi, C/N oranı, Cu²⁺ gibi spesifik iyon derişimi parametreler ile etkilenir (Ntaikou v.d., 2010a).

Ticari açıdan gelecek vaadeden biyohidrojen üretimini geliştirmek için, düşük maliyetli ve yüksek dönüşümlü hammadde kullanılmalıdır. Nişasta ticari biyohidrojen üretimi için uygun, ucuz ve etkili bir substrattır (Kapdan ve Kargı, 2006). Nişasta, tarım ve gıda endüstrisinden elde edilen yan ürünlerde sıkça bulunan temel gıda bileşenidir. Nişasta piriç, buğday veya patates gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir. Hidrolizlenmiş nişasta, saf nişasta yerine kullanıldığı zaman daha iyi hidrojen performansı elde edildiğini yapılan araştırmalar göstermiştir. Nişastadan hidrojen üretimi, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Thermotoga neapolitana* ve *Thermococcus kodakaraensis* gibi mikrobiyal türler ile mümkündür (Mars v.d., 2010). Reaksiyon stokiyometrisine göre asetat yan ürünü ile birlikte bir gram nişastadan maksimum 553 ml hidrojen gazı üretilir. Bununla birlikte hücre sentezi için substrat kullanıldığı için verim teorik değerden daha düşük olabilir. Nişastanın biyodönüşümü için hız sınırlayıcı adım genellikle hidroliz adımıdır. Bazı etkili bakteriyel hidrojen üreticiler (*Clostridium pasteurianum* gibi) nişasta hidrolitik yeteneğinden yoksun olabilirler, bu suretle nişastayı direkt olarak asimile edemezler. Lo v.d. (2008) tarafından nişasta hammaddesinden hidrojen üretimi araştırılmıştır. Nişasta hammaddesi önce *Caldimonas taiwanensis* (hücre dışı amilaz üretebilir) bakterisi ile hidroliz edilmiştir. Hidrolizlenmiş nişasta karanlık fermentasyon biyoreaktörüne verilerek *Clostridium butyricum* CGS2 ile 0,22 L/saat L hızında H₂ elde edilmiştir.

Selülozun hidrolizi genel olarak enzimler ve kimyasallar ile yapılır. Selüloz hidrolizatları başlıca glukozlu indirgenmiş sakkaritlerden oluşur. Kimyasal işlemler teknik olarak çok daha ilerde

olduğu halde, enzimatik işlemlerin önemli teknik ilerleyişi, enzimatik işlemleri işletme ve yatırım açısından karşılaştırılabilir ölçüde düşük maliyetli yapar. Enzimatik hidroliz, ılımlı işletme şartları altında elde edilen yüksek indirgenmiş şeker verimi ve korozyon problemi yaratmaması gibi bazı önemli avantajlara sahiptir. Selülozun enzimatik hidrolizi, bakteri ve fungiden meydana gelen selülazlar ile yapılır. Selülaz üretimi için *Trichoderma* yoğun biçimde çalışılmıştır (Ren v.d., 2009). Selüloz parçalayan *Clostridium* sp. No 2, *Clostridium thermocellum* ve *Clostridium cellulolyticum* bakterilerinin hidrojen üretimi de incelenmiştir (Magnusson v.d., 2008; Taguchi v.d., 1995). Yüksek bir verim için ön arıtılmış aşının veya ko-kültürün kullanımı önerilmektedir (Chong v.d., 2009). *Clostridium thermocellum* selülozu direkt olarak parçalayabilen, asetojenik, termofilik, anaerobik bakteridir. *Clostridium thermocellum* "selülozom" adı verilen, hücre yüzeyi üzerinde karmaşık yapı teşkil eden uygun selülotik enzimleri meydana getirir. Bakteri selüloz partikülüne selülozom ile bağlanır ve selülozom içindeki enzimler selülozu etkili olarak glukoz ve selülodekstranlara parçalar ve böylece metabolizma için hücre içine taşınır. Bu mikroorganizmanın yüksek selüloz parçalama hızı ve H₂, CO₂ ve asetat sentezlemeye eğilimi, selülozik atık biyokütleden direkt olarak H₂ üretiminde bir potansiyel sunar. Optimum büyüme sıcaklığı, 60 °C, mezofilik organizmalarının büyümesini engeller. Yüksek sıcaklıklar ile birlikte gazların çözünürlüğü azaldığından dolayı, H₂ ve CO₂ gibi gaz ürünlerin etkili olarak giderilmesini sağlar (Magnusson v.d., 2008).

Tablo 1'de lignoselülozik atıklardan hidrojen üretim çalışmaları özetlenmiştir.

3.2. Ön Arıttımdan Dolayı İnhibitor Bileşiklerinin Oluşumu

Lignoselülozik biyokütlenin hem fizikokimyasal hem de biyolojik ön arıtımında, mikrobiyal metabolizmaya inhibitor olan arzu edilmeyen biyoürünler meydana gelebilir. Örneğin şeker ve karbonhidratların ısı parçalanmasında furfural (C₅H₄O₂) ve 5-hidroksimetilfurfural (C₆H₆O₃) oluşur. Bunun yanı sıra ligninin parçalanmasında fenolik bileşikler de oluşur. Bu bileşiklerin inhibitor etkilerinin şiddeti derişimlerine bağlıdır, bu yüzden etkili bir fermentasyon için ya ılımlı ön arıtım metodu seçilmeli ya da inhibitor bileşikler fermentasyon biyoreaktörüne beslenmeden önce giderilmelidir (Kongjon v.d., 2010; Ntaikou v.d., 2010a).

Lignoselülozik hidrolizatlarından inhibitörlerin gideriminde farklı detoksifikasyon metotları kullanılabilir. Metodun seçimi hidrolizat orjinine

ve fermentasyon mikroorganizmalarına bağlı olacaktır. Hücre yoğunluğunun artırılması, biyohidrojenin hacimsel verimliliğinin artırılmasında uygun bir çözüm olarak düşünülür. Bu ayrıca hidrolizat toksitesinin gideriminde de faydalıdır. Lignoselülozik önhidrolizattaki birkaç monosakkarit parçalanmasını tek kültür yapamayabilir. Ko-kültür, lignoselülozik hidrolizatlarından etkili hidrojen üretimi için tek kültürden daha iyi olabilir.

4. ATIKLAR VE ATIKSULAR

Daha önce de ifade edildiği gibi hidrojen üretimi için bir atık/atıksuyun etkili hammadde olarak nitelendirilebilmesi için ölçüt yüksek derişimde parçalanabilir organik bileşiklerin bulunması, şeker ve karbonhidratlar gibi kolaylıkla fermente olabilen bileşiklerin yüksek oranda bulunması ve mikrobiyal aktiviteye inhibitor olabilen bileşiklerin düşük derişimde bulunmasıdır. Gıda endüstrisinden gelen atıksular bu üç ölçütü sağlamaktadır. Herhangi bir ön arıtım uygulamaksızın gıda endüstrisi atıklarından oldukça yüksek hidrojen verimleri elde edilmiş. Ancak birçok durumda süreçte inhibisyona neden olan yüksek organik yüklemeyi düşürmek için ham atık seyreltilmiştir. Ayrıca bu tür atıklar süreçte üremeyi sınırlayabilen oldukça karmaşık kimyasal içerikte de olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Ntaikou v.d. 2010a). Bu tür atıkların farklı içeriğe sahip olmasından dolayı hidrojen üretim performansında çok büyük değişim gözlenmiştir (3-290 ml H₂/g VS) (Guo v.d., 2010b).

Mutfak, gıda işleme ve kentsel atıklar, karbonhidratdan farklı olarak oldukça yüksek derişimde protein ve yağa sahiptirler, bu yüzden bu atıkların hidrojene dönüşüm verimliliği, karbonhidrat esaslı atıklardan elde edilen değerden önemli ölçüde düşüktür. Yapılan çalışmalar bu durumu proteinin biyoparçalanması ile oluşan azotun hidrojeni tüketip amonyum oluşturmaya bağlamıştır (Ntaikou v.d. 2010a).

Gıda atıkları yüksek enerji içeriğine ve biyolojik parçalanabilirliğine sahiptir. İçerikleri mikrobiyal gelişim için uygun olup, % 85-95 VS ve % 75-85 nem içerir. Endüstri ve evsel kaynaklı gıda atıkları yüksek seviyede karbonhidrat ve protein içerir. Bu kapsamda patates ve elma işleyen endüstriyel atıksular, melas, peynir ve süt işleyen endüstriyel atıksular ve nişasta atıksuları düşünülebilir (Chong v.d., 2009). Örneğin dünya genelinde yılda 10⁸ ton peynir altı suyu üretilmekte olup, yüksek organik içeriğinden (60-80 g KOİ/L) dolayı kirlilik riski oluşturmaktadır (Davila-Vazquez v.d., 2009). Peynir ve süt endüstrisi atıksuyu laktoz bakımından

Tablo 1. Lignoselülozik atıkların H₂ üretim hızları ve verimleri.

Lignoselülozik Atık ve Kalıntı tipi	Lignoselülozik Atık ve Kalıntılara uygulanan ön işlem	Aşısı	İşletme şartları	H ₂ üretim hızı	H ₂ üretimi verimi	Düşünceler	Kaynak
Mısırın sap ve yaprakları	Nötr ve asidik ön işleme maruz bırakıldıktan sonra yüksek basınçlı buhar uygulandıktan sonra elde edilen hidrolizat kullanılmış.	Isıl ön işlem görmüş anaerobik çamur.			2,84 ve 3,0 mol H ₂ /mol glukoz	Substratın hidrojen dönüşüm verimliliği %71-75 olmuştur.	Datar v.d., 2007.
Kavak yaprakları	Asit ön arıtımı, kavak yapraklarının farklı derişimdeki HCl ile muamele edilmesi ve ardından NaOH ile nötralizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Enzimatik onartım ise arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase ve xylanase enzimlerinin karışımından oluşan Viscozyme (VL) ile yaprakların muamelesi ile sakarifikasyonu gerçekleştirilmiştir.	Karışık kültürden zenginleştirildi ve dominant tür <i>Clostridium pasteurianum</i> olarak tanımlandı.	%0,5 HCl %1 VL'de	2,74 mL/saat 2,17 mL/saat		Spesifik hidrojen üretim hızı HCl derişiminin (%0,5-4) artışı ile sürekli olarak azalmış, bu durum hidrojen üreten bakteriyi inhibe edebilen furfural gibi bazı inhibitörlerin HCl arıtımı ile oluşabileceğinden dolayıdır.	Cui v.d., 2010.
Mısır sapı	2 saat 90 °C'de %0,6 (wt) HCl ile muamele, ardından 72 saat, 50 °C ve 4,8 ilk pH'da <i>Trichoderma viride</i> katalizörü ile parçalanma.	Isıl ön arıtılmış nehir orjinli anaerobik çamur.	Kesikli sistem	9,58 ml/g mısır sapı.saat		Mısır sapının HCl onartımı, selülozun parçalanmasını geliştirebilir, fakat %0,6 (wt)'nin üzerindeki HCl derişimlerinin H ₂ üretimi için uygun olmayacağı belirtilmiştir. Bu ise H ₂ üreten bakterinin büyüme metabolizmasını yüksek Cl ⁻ anyon derişimlerinin inhibe edebileceği ve hidrojen üretim kapasitesini azaltabileceği şeklinde açıklanmıştır.	Wang v.d., 2010.
Mısır sapı	HCl ilavesi ile kaynatıldı ve pH 7'ye düzeltildi.	Infrared ışığında ısıl işleme maruz bırakılmış inek gübresi kompostu	Kesikli sistemde pH 7'de, 25 g/L substrat derişiminde		%1 HCl'de 2,68'den 54,9 ml/g toplam uçucu katı (TVS)'ya yükselmiş	Biogazdaki hidrojen oranı %55'den daha yüksek bulunmuştur.	Al-Alawi, 2006.
Kurutulmuş buğday özü, arpa kabuğu, zarar görmüş arpa kabuğu		<i>Clostridium thermocellum</i>	1,1 g/L α -selüloz (kontrol) 5 g/L atık		0,76 mmol H ₂ /eşdeğer g glukoz Atıklar için sırası ile 1,27; 1,24; 1,18 mmol H ₂ /eşdeğer g glukoz		Magnusson v.d., 2008.
Buğday atığı	Buğday partikülü içeren çözelti, nişastanın kısmi hidrolizi için 1,5 saat kaynatılmıştır.	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , ısı ile arıtılmış anaerobik çamur ve bu kültürlerin karışımı kullanılmıştır.		34,22; 8,19; 10,40; 32,10; 27,76 ml H ₂ /g saat	125,53; 118,98; 159,04; 222,85; 133,09 ml H ₂ /g nişasta		Argun v.d., 2009.
Buğday atığı	Hidrotermal ön arıtımından elde edilen hidrolizat kullanılmış.	Hidrojen bakterilerince zenginleştirilmiş termofilik kültür.	Kesikli sitem, %5 (v/v) hidrolizat Sürekli sitem, 3 gün HRT, %20 (v/v) hidrolizat derişimi	184±10,7 mlH ₂ /gün L	318,4±5,2 mlH ₂ /g şeker ve 178±10,1 mlH ₂ /g şeker		Kongjan v.d., 2010.

zengin atıksulardır. Yaklaşık %5 laktöz içeren peynir atıksuyu fermentasyon için uygun bir substrat olabilir. Orjinal fermentasyon ortamının % 80'ini meydana getirir ve süt yağı, iz mineraller, tuzlar ve vitaminlerin çoğuna sahiptir (Azbar v.d., 2009). Bu atıksulardan hidrojen üretiminde *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ve *Clostridium thermolacticum* kullanılmıştır (Chong v.d., 2009).

Karbonhidratlar ve peptonlar gibi organikler, hidrojen üretimi için kolaylıkla biyoparçalanabilir materyallerdir. Melas anaerobik şartlarda parçalanması kolay olan ve gıda endüstrisinde

çok kullanılan şeker fabrikalarının atığıdır. Yaklaşık olarak % 53 oranında şeker içerir (Ren v.d., 2006). Yüksek şeker oranına sahip olması hidrojen üretimi için iyi bir alternatif substrat yapmıştır. Melasın mikrobiyal fermentasyonundan oluşan çözünür kondanse melas çok çeşitli sayıda mikroorganizma, bakteriyel büyüme için gerekli nütrient ve mikrobiyal protein, amino asitler, organik asitler, vitaminler ve koenzimler gibi diğer fermentasyon ürünlerini içerir (Lay v.d., 2010). Şeker kamışı küspesi, şeker kamışı ekstraksiyon işleminden sonra kalan selüloz, hemiselüloz ve lignin içeriğine sahip atıktır. Yaklaşık % 30-35 hemiselüloz içerir. Selüloz ve hemiselülozun

hidrolizi için lif içine enzim solusyonunun girişi için lignin kuvvetli bir bariyer yaratır. Materyalin ön arıtımı, selülotik enzimlerin liflere girmesini geliştirir ve enzimatik hidrolizin verimliliği önemli ölçüde artar (Chairattanamanokorn v.d., 2009). Küspede hemiselüloz kısmının seyreltik asit arıtımı, başlıca glukoz ve ksiloz içeren küçük miktarda da arabinoz içeren çözelti meydana getirir. Selülozdaki bağlar hemiselülozdan daha kuvvetli olduğu için, küspenin seyreltik asit hidrolizinde, selüloz ve lignin ile oluşan katı atık elde edilir. Glukoz ve ksiloz hidrojen üretimi için önemli substratlar olduğu için, küspe hidrolizati hidrojen üretimi için çok ekili bir hammaddedir (Patra v.d., 2008).

Evsel ve evsel nitelikli endüstriyel atıksuların arıtımında oluşan biyolojik kökenli atık çamurların bertarafı büyük sorun teşkil etmektedir. Atık aktif çamur polisakkaritler ve proteinlerce zengindir. Bu yüzden hidrojen üretimi için potansiyel substratdır (Woo ve Song, 2010). Mikrobiyal hücrenin hidrolizi adımı, çamurun anaerobik fermentasyon hızını sınırlar ve uzun HRT'ye ihtiyaç gösterir. Atık çamurun anaerobik çürümesini geliştirmek için, en uygun yaklaşım çamurun mikrobiyal hücrelerini parçalamaktır. Çamur ön arıtımının etkisinin incelendiği çalışmada, fermentasyon sırasında karbonhidrat değişiminin proteine benzediği, ancak ön arıtım ve fermentasyondan sonra salınan ve tüketilen karbonhidrat miktarının proteinden çok az miktarda düşük olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan proteinin, hidrojen üretimi için kullanılan ana besin olduğu ifade edilmiştir (Guo v.d., 2008a). Ancak bazı araştırmalarda hidrojenin protein ve lipitlerden çok az üretildiği, buna karşın bazen saf ve karışık kültürde hidrojen üretimi için azot kaynağı olarak kullanılması gerektiği ifade edilmektedir (Kim v.d., 2004). Yapılan araştırmalarda çamur ham olarak kullanıldığında hidrojen verimleri 1,2 mgH₂/gKOİ ve 0,6 mol/kg KOİ, çamur filtratının kullanılması durumunda ise bu değer 15 mgH₂/gKOİ'ye yükseldiği ifade edilmektedir (Kapdan ve Kargı, 2006). Çamurun fermentasyonu nütrient salınımı için bir avantaj, ancak hidrojen üretimi için dezavantajdır. Filtrat kullanılması durumunda ise hidrojen üretim verimliliği herhangi bir ürün inhibisyonuna sebep olmadan yükselmektedir (Guo v.d., 2010a).

Fermentatif hidrojen üretiminde evsel nitelikli gıda atıkları ile arıtma çamurlarının birlikte çürütüldüğü çalışmalar da mevcuttur. Gıda atıklarına çamurun ilavesi proseste pH tamponlama kapasitesini geliştirir, böylece fermentasyon için uygun olan pH 5,5-6,0 sağlanır. Birlikte çürütülmesinde hidrojen veriminin artışı, besin sağlanmış olmasından ve çamur ilavesi ile sağlanan proteinin C/N oranının geliştirmesinden kaynaklanır. Çamurda mevcut

olan proteinli maddeler (pepton, et ekstraktı ve maya ekstraktı) ve biotin ve vitaminler gibi mikronütrientler hidrojen üreten bakterilerin büyümesi için zorunlu olduğu bulunmuştur (Zhu v.d., 2008).

Fermentatif hidrojen üretiminde uygun substrat ölçütlerini sağlayan diğer bir atık tipi de hayvansal atıklardır. Hayvansal gübreler üç bölümde incelenir: üriner atık (çiftlik hayvanları veya kümes hayvanlarından oluşan sulu çamur veya sıvı gübre); katı gübre veya çiftlik kapalı alanlardan gelen gübre; ve atıksular (çiftliklerdeki çeşitli işlemlerden kaynaklanan suları, yem bölmelerinden gelen atıklar, silaj suyu, dezenfektanlar ve sıvı gübreden oluşan atıksular). Hayvansal gübrelerden biyohidrojen üretimi genel olarak 4-29 ml H₂/g VS aralığındadır. Yapılan çalışmalar taze gübre kullanımının verimi artırdığını göstermiştir. Parçalanma sırasında oluşan amonyum inhibisyonuna sebep olur, ayrıca bazı gübrelerdeki yüksek sülfat içeriği, hidrojen tüketen sülfat indirgeyici bakterilerin rekabetini artırır. Azot inhibisyonunu önlemek için ilave substrat olarak glukoz ilavesi önerilmektedir (Guo v.d., 2010b). Li v.d. (2010) tarafından substrat olarak domuz çiftliğinden elde edilen atıksudan hidrojen üretimi incelenmiştir. Gübre seyreltikten sonra ve glukoz ve nütrientçe zenginleştirildikten sonra kullanılmıştır. Aşı olarak kullanılan çamur atıksu artım ünitesinden elde edilen anaerobik çamur ile sığır çiftliklerinin atıksu artım lagünlerinden elde edilen çamurların 1:1 oranında elde edilen karışımın zenginleştirildikten sonra kullanılmıştır. Optimum pH 5'de ve 16 saat HRT'de en yüksek hidrojen verimi 1,48±0,49 L-H₂/L sıvı domuz gübresidir.

Çok sayıdaki disülfid bağları ve benzersiz üç boyutlu yapısından dolayı biyolojik parçalanmaya dirençli olan keratin hayvansal atıklarda bol miktarda bulunmaktadır. Balint v.d. (2005) tarafından keratinin fermentasyonu ile hidrojen üretimi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada keratinin hidrojene dönüşümü iki safhalı sistemde yapılmıştır. Hidrojen üretimi için *Bacillus licheniformis* KK1-*Thermococcus litoralis* iyi performans gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus licheniformis* KK1 138 saatte çözünür proteinlerinin % 75'ini ortaya çıkarmıştır. *Thermococcus litoralis* ile 42 saat hidrolizlenerek elde edilen hidrolizattan yaklaşık 50-70 ml H₂/L hidrojen elde edilmiştir.

Özel bir atık tipi de biodizel üretim endüstrisinden gelen ham gliseroldür. Gliserol, biyodizel üretimi sırasında büyük miktarda üretilir. Bitkisel ve hayvansal yağların transesterifikasyon ile 100 birim biyodizel üretilmesi ile 10 birim ham

gliserol üretilir. Üretilen bu gliserol kozmetikte kullanılmaktadır. Bu atıktan *Enterobacter aerogenes* HU-101 kullanılarak hidrojen ve etanol üretiminin yapıldığı çalışma, maya ekstraktı ve trypon ilavesi gliserol atığın yüksek tuz içeriğinin seyreltmesi ile üretimin artacağını göstermiştir (Chong v.d., 2009). Mikrobiyal metabolizma göz önünde tutulduğu zaman maksimum teorik verim 1-3 mol H₂/mol gliserol olduğu kabul edilmektedir. Deneysel çalışmalarda 0,77-0,53 mol H₂/mol gliserol elde edilmiştir (Ntaikou v.d., 2010a). Tablo 2'de atıklardan hidrojen üretim çalışmaları özetlenmiştir.

5. SONUÇ

Gelecekteki enerji krizine alternatif çözüm olarak düşünülen yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Özellikle geleceğin yakıtı olarak değerlendirilen biyohidrojenin üretimi üzerine Ar-Ge çalışmalarının desteklenmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, uygulama ölçeğinde ekonomik koşullarda yüksek hidrojen üretimi üzerine odaklanmıştır. Hidrojen üretim sürecinde atıkların kullanılması ile hem atığın bertarafı için ilave bir harcama yapılması ortadan kalkmış hem de atığın bir hammadde gibi değerlendirilerek enerji üretim süreçlerinde kullanılması sağlanmıştır.

Biyolojik hidrojen üretim sistemleri ticari olarak rekabet edebilmesi için yeterli hızda hidrojen sentezleyebilmelidir. Karanlık fermentasyonda hidrojen üreten bakteriler için tercih edilen substrat karbonhidrat olduğu için yüksek karbonhidrat içerikli gıda atıkları iyi bir hammadde olabilir. Karşılaşılan bazı önemli problemler var. Bunlardan biri ürün olarak elde edilen gazın bileşimidir, karanlık fermentasyonda başlıca H₂ ve CO₂ ve az miktarda metan, CO ve H₂S içeren karışık gaz meydana gelir. Yakıt hücrelerinde biyogaz kullanıldığında bu gaz bileşimi teknik olarak sorun oluşturabilir (Digman ve Kim, 2008). Tüm yenilenebilir hidrojen üretim sistemleri hidrojen temizleme ve depolama sistemlerinin gelişimi ve integrasyonuna (eş güdümü) aynı anda gereksinim duyar (Levin ve Chahine, 2010). Diğer bir problem düşük hidrojen üretim verimliliğidir (stokiyometrik olarak % 10-20). Karbonhidratca zengin atıksularda elektron eşdeğerlerinin hidrojen olarak ~%15'den daha çok gerikazanımı beklenemez (Angenent v.d., 2004). Hidrojen fermentasyon araştırmalarının en büyük amacı üretim verimliliğini % 60-80 yapmaktır, böylece ekonomik fizibilitiyi güçlendirebilir (Digman ve Kim, 2008).

Gıda işleme atıkları alternatif enerji üretimi için büyük potansiyele sahiptir. Yüksek karbonhidrat,

protein ve lipidler çeşitli enerji tipi için kullanılabilir. Bununla birlikte atıkların etkili kullanımı için atığın ana bileşenlerinin dikkatli analizi ve olası dönüşüm süreçlerinin ekonomik analizi yapılmalıdır.

Örneğin süt işleme sürecinden oluşan atıksular hem laktik asit ve propiyonik asit gibi değerli kimyasalların üretiminde kullanılabilirken hem de etanol, metan veya hidrojen üretiminde de kullanılabilir. Gıda işleme atıklarının dönüşüm süreçlerinin tasarım aşamasında, tüm olası problemler ve bununla ortaya çıkacak ekstra maliyetler de göz önünde bulundurulmalıdır. Enerji dönüşüm metodu belirlendiği zaman, atıkların potansiyelini optimize etmek için farklı enerji formları arasında iyi bir analiz yapılmalıdır.

Yüksek protein ve/veya yağ asitleri içeren atıklarda, hidrojen fermentasyonu, metan veya etanol üretiminden daha iyi bir seçenek olabilir (Digman ve Kim, 2008).

Ülkemizde iklim ve toprak yapısı uygun olan enerji bitkilerinin planlı ve programlı tarımı ile biyohidrojen hammadde üretim potansiyeli harekete geçirilmelidir.

Sonuç olarak, ürün kalıntıları, hayvansal gübre ve gıda atıkları karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi için potansiyel olarak uygun substratlardır. Yüksek hidrojen verimi veren gıda atıklarını hayvansal gübre ve ürün kalıntıları takip eder. Gıda atıkları hidrojen kaynağı olarak büyük potansiyele sahip oldukları halde biyolojik işlemlerin performansı sadece işletme şartlarına bağlı değildir, ayrıca organik atığın kompozisyonuna da bağlıdır. Ürün kalıntıları gibi tarımsal aktiviteler ile oluşan atıkların hayvansal gübreler ile birlikte çürütülmesi tavsiye edilir. Metan biyoprosesi ile birleştirilmesi ile, arıtılmış çıktının gübre olarak kullanımı sağlanabilecektir (Guo v.d., 2010b).

Tablo 2. Atıkların H₂ üretim hızları ve verimleri.

Atık/atıksu tipi	Atık/Atıksuya uygulanan ön işlem	Aşı	İşletme şartları	H ₂ üretim hızı	H ₂ üretin verimi	Düşünceler	Kaynak
Melas atıksuyu	Isıl ön işlem	<i>Clostridium</i> sp.	320 g KOI/L-gün organik yükleme hızı, 3 saat HRT	390 mmol H ₂ /L-gün		Nütrient ilavesi gerekmediği için ticari açıdan uygun bir substrattır.	Lay v.d., 2010.
Elma işleme atıksuyu, patates işleme atıksuyu, şekerleme imalathanesi A ve B atıksuları ve evsel atıksu		Isıl işlem görmüş toprak	KOI (g/L) içerikleri sırası ile 9; 21; 0,6; 20 ve 25 kat konsantr edilmiş evsel atıksu		LH ₂ /L atıksu olarak sırası ile (0,7-0,9); (2,1-2,8) (0,1); (0,4-2,0); (0,01)		Van Ginkel v.d., 2005.
Süt endüstrisi		Anaerobik çamur ve Kimyasal ön işlem görmüş anaerobik çamur	Kesikli sistem, mezofilik şartlar		0,0018 mmol/g KOI ve 0,0317 mmol/g KOI	Aşıya uygulanan farklı ön arıtım metodları içinde en yüksek H ₂ üretim verimi kimyasal ön arıtımda belirlenmiştir.	Mohan v.d., 2008.
Melas		Kentsel atıksu arıtma tesisi çamuru	68,21 kg KOI/m ³ /gün organik yükleme hızı	0,75 m ³ /kg karışık sıvıda uçucu süspanse katı /gün		Biyogazdaki H ₂ oranı %40-52 olarak belirlenmiştir.	Ren v.d., 2006.
Peynir altı suyu	Laktik asit bakterisini yok etmek için ısıl ön işlem.	Hidrojen üreten bakterilerce zenginleştirilmiş anaerobik çamur	Termofilik şartlar; 3,5 saat HRT		22 mmol/g KOI		Azbar v.d., 2009.
Peynir altı suyu		Isıl ön işlem görmüş anaerobik çamur	Sürekli sistem, 37 °C'de, 6 saat HRT'de, 5,9 pH'da, sırası ile 92,4; 115,5 ve 138,6 g laktoz/L/gün organik yükleme hızı	23,32; 36,44 ve 46,61 (mmol H ₂ /L/saat)			Davila-Vazquez v.d., 2009.
Nişasta içeren atıksu		Hidrojen üretimi yapılan reaktörden alınan karışık kültür	Karışık kültürün aktif karbona tutuklanması ile oluşan biyofilm esaslı granül çamur yataklı reaktör, 30±1 °C'da 8 saat HRT, pH 3,95		0,11 L/g KOI	Bu tip reaktörlerin avantajları aside toleranslı bakteriler yaşayabilmesi, düşük pH ve sıcaklıkta işletilmesi.	Guo v.d., 2008b.
Sukroz, kuru yağsız süt tozu ve gıda atığı		Anaerobik çamur			234, 119 ve 101 ml/g KOI		Chen v.d., 2006.
Manyok nişastası	Ham nişasta, 112 °C, 15 dakikada jelatinize olmuş nişasta ve alfa-amilaz ve glukoamilaz ile enzimatik hidrolizlenmiş nişasta.	Isıl ön işlem görmüş anaerobik çamur.		72,5; 146,2 ve 229,3 ml/L saat		Her iki metottan sonra lag-süresi 11'den sırası ile 8 ve 5 saate azalmıştır.	Su v.d., 2009.
Nişasta		Kağıt endüstrisi arıtma çamurundan alınan ve ısıl işleme tabii tutulan karışık kültür	Kesikli sistemde pH 5,5'de Sürekli sistemde 4 saat optimum HRT'de	10,4 mmol-H ₂ /L saat 450 mmol-H ₂ /L gün			Lin v.d., 2008.
Buharda pişirilen patates kabukları	Kabukların bir kısmı alfa-amilaz ile hidroliz edildi ve ardından santrifüjlendi ve PSP-H1 (serbest glukoz derişimi 21 mM) elde edildi. Diğer kısım alfa-amilaz ve amiloglukozidaz ile hidroliz edildi ve ardından santrifüj edilerek PSP-H ₂ (serbest glukoz derişimi 407 mM) elde edildi.	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> ile <i>Thermotoga neapolitana</i> termofilik bakteriler	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> için glukoz, PSP-H1, PSP-H2 ve ham kabuklar için sırası ile 10;14; 11 ve 10 g glukoz/L <i>Thermotoga neapolitana</i> için glukoz, PSP-H1, PSP-H2 ve ham kabuklar için sırası ile 10;13; 10 ve 10 g glukoz/L	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> için sırası ile 12; 16,4; 13,3 ve 13,1 mmol/L/saat <i>Thermotoga neapolitana</i> için sırası ile 12,3; 10,6; 8,9; 12,5 mmol/L/saat		Saf glukoz ile kontrol deneylerinin yapıldığı çalışmada hidrojen üretim hızı ve hidrojen verimleri benzer bulunmuştur.	Mars v.d., 2010.
Şeker kamışı küspesi	H ₂ SO ₄ ile otoklavda asit hidrolizi yapıldıktan sonra elde edilen üst sıvı kullanılmıştır.	<i>C. butyricum</i>	20g KOI/L hidrolizat pH 5,5, 37 °C'de	1611 ml H ₂ /L gün	1,73 mol H ₂ /mol toplam şeker		Patra v.d., 2008.
Şeker kamışı küspesi	Isıl ön işlem (100 °C 2 saat) görmüş küspe <i>Trichoderma reesei</i> den türetilen cellulase ile hidrolizlendi.	Isıl ön arıtılmış anaerobik çamur	56,5 °C ve pH 5,22	7,03 ml/L/saat			Chairattan manokorn v.d., 2009.
Arıtma çamuru		Isıl ön arıtılmış anaerobik çamur	Termofilik şartlarda sürekli akışlı reaktörde, 3 gün HRT.		3,07 mmol H ₂ /g TS		Woo ve Song, 2010.

Tablo 2'nin devamı

Atık/atıksu tipi	Atık/Atıksuya uygulanan ön işlem	Aşı	İşletme şartları	H ₂ üretim hızı	H ₂ üretin verimi	Düşünceler	Kaynak
Aritma çamuru	Sterilizasyon, mikrodalga, ultrasonikasyon.	Anaerobik çamurdan izole edilen <i>Pseudomonas sp.</i> GZ1	Mezofilik şartlar, kesikli sistem, nütrient ilavesi yapılmadan.		Sterilizasyon ve mikrodalga, ultrasonikasyon uygulanması için sırası ile 15,02; 11,04 ve 4,68 ml/g toplam KOİ	lag süresi ise ultrasonikasyon, sterilizasyon ve mikrodalga için sırası ile 3, 15 ve 10 saat	Guo v.d., 2008a.
İkincil atık çamur ve filtratı	20 dakika, 121 °C'de sterilizasyon ile ön arıtılmış çamurun santrifüjlenmesi ile filtrat elde edilmiştir.	<i>Pseudomonas sp.</i>			Filtratta 4,44 mg H ₂ /g toplam KOİ; atık çamurda 1,34 mg H ₂ /g toplam KOİ		Guo v.d., 2010a.
Aritma çamuru		Pastörize edilmiş çamurdan izole edilen <i>Clostridium bifermentans</i>			0,08'den 0,9 mol/kuru katı'ya yükselme	Lag süresinde kısalma gözlenmiştir.	Wang v.d., 2004.
Tatlı sorgum şurubu	Isı uygulanarak konsantre edildikten sonra steril edilmiştir.	Isıl ön arıtılmış anaerobik çamur	25 g/L toplam şeker; 4,75 pH; 1,45 g/L FeSO ₄ ; 30-32 °C		6897 ml H ₂ /L (2,22 molH ₂ /mol heksos)		Saraphirom ve Reungsang, 2010.
Kentsel katı atık	Katı atığın organik kısmı parçalanıp su ile seyreltiltikten sonra kullanılmış.	Anaerobik çamur			205 ml H ₂ /g VS		Chu v.d., 2008.
Mutfak atığı (%95 biyolojik parçalanabilir atık içermektedir)		Isıl ön işlem görmüş anaerobik çamur	Ortam sıcaklığında (28 ±5 °C) kesikli sistem	100 °C'de ön işlem görmüş çamur ile 176,2 ml/kg toplam katı. saat		Üretilen biyogazda %55-60 hidrojen içermektedir.	Jayalakshmi v.d., 2009.
Yemekhaneden alınan gıda atığı: birincil ve ikincil çamur yoğunlaştırıcılarından alınan çamur=87:13 oranı		Isıl ön işlem görmüş anaerobik çamur		111,2 ml H ₂ /g uçucu süspanse katı. saat	122,9 ml/g karbonhidrat KOİ	Gıda atığı ve çamur sırası ile uygun ana substrat ve faydalı yardımcı substrat olmuştur.	Kim v.d., 2004.
Çamur ve kentsel katı atık karışımı		Hidrojen üreten bakteri ve ısıl ön işlem görmüş çamur			180 ve 140 ml H ₂ /g toplamVS		Lay v.d., 1999.
Birincil çamur ve atık aktif çamur (1/1) karışımı ile kafeteryadan alınan gıda atığı ile (1/1) hacimsel karışımı		Anaerobik çamur	Kesikli sistem, pH 7,0		112 ml/g ilave edilen VS	Hidrojen başlıca gıda atığından meydana gelir, gıda atığına çamurun ilavesi pH tamponlama kapasitesini sağlar	Zhu v.d., 2008.
Kentsel katı atık ile mezbaha atıkları		Mezbaha atığının arttığı reaktörden alınan mezofilik anaerobik çamur	-250 mV redoks potansiyeli, 3 gün HRT, karışım oranı (10:1) kuru ağırlık bazında		Katı atık için 52,5 ±10,1 ml/g VS _{giderilen} karışım için 71,0 ±14,0 ml/g VS _{giderilen}		Gomez v.d., 2006.
Pirinç bulamacı	Pirinç (%78,3 karbonhidrat, %6,6 protein, %3,2 lipid) 100 °C'de 30 dakika buharda ön işlem gördükten sonra kullanılmıştır.	Isıl ön işlem görmüş anaerobik çamur	5,5 g karbonhidrat/L, 37°C de, pH 4,5'da 36 saat lag süresinde	2,1 L/g-VSS gün	346 mL/g karbonhidrat		Fang v.d., 2006.
Mandıra gübresi	Asit ön arıtım (HCl ısıl işlem görmüş, ardından pH 7'ye ayarlandı), NaOH ön arıtım (NaOH ile ısıl işlem görmüş, ardından pH 7'ye ayarlandı), infrared ön arıtım (2 saat infrared fırınında maruz bırakıldı).	Infrared fırınında ısıl işleme bırakıldıktan sonra sukroz ile inkübe edilmiş mikroflora kullanılmıştır.	Kesikli ve sürekli sistem denemeleri		Kesikli sistemde asidik ön arıtılmış gübrede, pH5,0'da 70 g/L'de 31,5 ml H ₂ /g- toplamVS Sürekli sistemde pH5,0 ve 8,5'da kümülatif H ₂ verimi 40 ve 75 saatte 32 ve 16,5 ml/g- toplamVS		Xing v.d., 2010.

KAYNAKLAR

- Al-Alawi, M. 2006. "Biohydrogen Production by Anaerobic Biological Fermentation of Agriculture Waste", NATO Advanced Research Workshop on Assessment of Hydrogen Energy for Sustainable Development, Turkey.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A. and Domiguez-Espinosa, R. 2004. Production of Bioenergy and Biochemicals from Industrial and Agricultural Wastewater, Trends in Biotechnology. 22 (9), 477-485.
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K. and Lyberatos, G. 2008. Biofuels Generation from Sweet Sorghum: Fermentative Hydrogen Production and Anaerobic of the Remaining Biomass, Bioresource Technology. (99), 110-119.
- Argun, H., Kargı, F. and Kapdan, İ.K. 2009. Microbial Culture Selection for Bio-hydrogen Production from Waste Ground Wheat by Dark Fermentation, International Journal of Hydrogen Energy. (34), 2195-2200.
- Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., and Syed, H.M. 2009. Continuous Fermentative Hydrogen Production from Cheese Whey Wastewater under Thermophilic Anaerobic Conditions, International Journal of Hydrogen Energy. (34), 7441-7447.
- Balat, H. and Kırtay, E. 2010. Hydrogen from Biomass-Present Scenario and Future Prospects, International Journal of Hydrogen Energy. (35), 7416-7426.
- Balint, B., Bagi, Z., Toth, A., Rakhely, G., Perei, K. and Kovacs, K.L. 2005. Utilization of Keratin-Containing Biowaste to Produce Biohydrogen, Appl Microbiol Biotechnol. (69), 404-410.
- Chairattananamokorn, P., Penthamkeerati, P., Reungsang, A., Lo, Y.C., Lu, W.B. and Chang, J.S. 2009. Production of Biohydrogen from Hydrolyzed Bagasse with Thermally Preheated Sludge, International Journal of Hydrogen Energy. (34), 7612-7617.
- Chen, W.H., Chen, S.Y., Khanal, S.K. and Sung, S. 2006. Kinetic Study of Biological Hydrogen Production by Anaerobic Fermentation, International Journal of Hydrogen Energy. (31), 2170-2178.
- Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y. and Hassan, M.A. 2009. Biohydrogen Production from Biomass and Industrial Wastes by Dark Fermentation, International Journal of Hydrogen Energy. (34), 3277-3287.
- Chu, C.F., Li, Y.Y., Xu, K.Q., Ebie, Y., Inamori, Y. and Kong, H.N. 2008. A pH- and Temperature-Phased Two-stage Process for Hydrogen and Methane Production from Food Waste, International Journal of Hydrogen Energy. (33), 4739-4746.
- Cui, M., Yuan, Z., Zhi, X., Wei, L. and Shen, J. 2010. Biohydrogen Production from Poplar Leaves Pretreated by Different Methods Using Anaerobic Mixed Bacteria, International Journal of Hydrogen Energy. (35), 4041-4047.
- Datar, R., Huang, J., Maness, P.C., Mohagheghi, A., Czernik, S. and Chornet, E. 2007. Hydrogen Production from the Fermentation of Corn Stover Biomass Pretreated with a Steam-Explosion Process, International Journal of Hydrogen Energy. (32), 932-939.
- Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragon, F., de Leon-Rodriguez, A. and Razo-Flores, E. 2008. Fermentative Hydrogen Production in Batch Experiments Using Lactose, Cheese Whey and Glucose: Influence of initial substrate concentration and pH, International Journal of Hydrogen Energy. (33), 4989-4997.
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de Leon-Rodriguez, A. and Flores, E.R. 2009. Continuous Biohydrogen Production Using Cheese Whey: Improving the Hydrogen Production Rate, International Journal of Hydrogen Energy. (34), 4296-4304.
- Digman, B. and Kim, D.S. 2008. Review: Alternative Energy from food Processing Wastes, Environmental Progress. 27 (4), 524-537.
- Evyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Saka, K. and Ohmiya, K. 2001. Conversion of Chitinous Wastes to Hydrogen Gas by *Clostridium paraputrificum* M-21, Journal of Bioscience and Bioengineering. 91 (4), 339-343.
- Fang, H.H.P., Li, C. and Zhang, T. 2006. Acidophilic Biohydrogen Production from Rice Slurry, International Journal of Hydrogen Energy. (31), 683-692.
- Gomez, X., Moran, A., Cuetos, M.J. and Sanchez, M.E. 2006. The Production of Hydrogen by Dark Fermentation of Municipal Solid Wastes and Slaughterhouse Waste: A Two-phase Process, Journal of Power Sources. (157), 727-732.
- Guo, L., Li, X.M., Bo, X., Yang, Q., Zeng, G.M., Liao, D. and Liu, J.J. 2008a. Impacts of Sterilization, Microwave and Ultrasonication Pretreatment on Hydrogen Producing Using Waste Sludge, Bioresource Technology. (99), 3651-3658.
- Guo, W.Q., Ren, N.Q., Chen, Z.B., Liu, B.F., Wang, X.J., Xiang, W.S. and Ding, J. 2008b. Simultaneous Biohydrogen Production and Starch Wastewater Treatment in an Acidogenic Expanded Granular Sludge Bed Reactor by Mixed Culture for Long-Term Operation, International Journal of Hydrogen Energy. (33), 7397-7404.
- Guo, L., Li, X.M., Zeng, G.M. and Zhou, Y. 2010a. Effective Hydrogen Production Using Waste Sludge and its Filtrate, Energy. (35), 3557-3562.

- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H. and Steyer, J.P. 2010b. Hydrogen Production from Agricultural Waste by Dark Fermentation: A Review, *International Journal of Hydrogen Energy*. (35), 10660-10673.
- Jayalakshmi, S., Sukumaran, V. and Joseph, K. 2009. Enhancement of Hydrogen Production from Kitchen Waste Using Heat Treated Anaerobic Biogas Plant Slurry with pH Control, *Int. J. Environmental and Sustainable Development*. 8 (1), 23–35.
- Kapdan, I.K. and Kargı, F. 2006. Bio-Hydrogen Production from Waste Materials, *Enzyme and Microbial Technology*. (38), 569–582.
- Kim, S.H., Han, S.K. and Shin, H.S. 2004. Feasibility of Biohydrogen Production by Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Sewage Sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*. (29), 1607-1616.
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. And Angelidaki, I. 2010. Biohydrogen Production from Wheat Straw Hydrolysate by Dark Fermentation Using Extreme Thermophilic Mixed Culture, *Biotechnology and Bioengineering*. 105 (5), 899-908.
- Lay, C.H., Wu, J.H., Hsiao, C.L., Chang, J.J., Chen, C.C. and Lin, C.Y. 2010. Biohydrogen Production from Soluble Condensed Molasses Fermentation Using Anaerobic Fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*. 35 (24), 13445-13451.
- Lay, J.J., Lee, Y.J. and Noike, T. 1999. Feasibility of Biological Hydrogen Production from Organic Fraction of Municipal Solid Waste, *Water Research*. 33 (11), 2579-2586.
- Levin, D.B. and Chahine, R. 2010. Challenges for Renewable Hydrogen Production from Biomass, *International Journal of Hydrogen Energy*. (35), 4962–4969.
- Li, C. and Fang, H.H.P. 2007. Fermentative Hydrogen Production from Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. (37), 1-39.
- Li, Y., Zhu, J., Wu, X., Miller, C. and Wang, L. 2010. The Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from Swine Wastewater Supplemented with Glucose, *Appl Biochem Biotechnol*. (162), 1286-1296.
- Lin, C.Y., Chang, C.C. and Hung, C.H. 2008. Fermentative Hydrogen Production from Starch Using Natural Mixed Cultures, *International Journal of Hydrogen Energy*. (33), 2445-2453.
- Lo, Y.C., Chen, S.D., Chen, C.Y., Huang, T., Lin, C.Y. and Chang, J.S. 2008. Combining Enzymatic Hydrolysis and Dark-Photo Fermentation Processes for Hydrogen Production from Starch Feedstock: A Feasibility Study, *International Journal of Hydrogen Energy*. (33), 5224-5233.
- Logan, B.E., Oh, S.E., Kim, I.S. and Ginkel, S.V. 2002. Biological Hydrogen Production Measured in Batch anaerobic Respirometers, *Environ. Sci. Technol*. (36), 2530-2535.
- Magnusson, L., Islam, R., Sparling, R., Levin, D. and Çiçek, N. 2008. Direct Hydrogen Production from Cellulosic Waste Materials with a Single-Step Dark Fermentation Process, *International Journal of Hydrogen Energy*. (33), 5398-5403.
- Mars, A.E., Veuskens, T., Budde, M.A.W., van Doeveren, P.F.N.M., Lips, S.J., Bakker, R.R., de Vrije, T. and Claassen, P.A.M. 2010. Biohydrogen Production from Untreated and Hydrolyzed Potato Steam Peels by the Extreme Thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*, *International Journal of Hydrogen Energy*. (35), 7730-7737.
- Mohan, S.V., Babu, V.L. and Sarma, P.N. 2008. Effect of Various Pretreatment Methods on Anaerobic Mixed Microflora to Enhance Biohydrogen Production Utilizing Dairy Wastewater as Substrate, *Bioresource Technology*. (99), 59-67.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G. and Lyberatos, G. 2010a. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review, *Waste Biomass Valor*. (1), 21–39.
- Ntaikou, I., Gavala, H.N. and Lyberatos, G. 2010b. Application of a Modified Anaerobic Digestion Model 1 Version for Fermentative Hydrogen Production from Sweet Sorghum Extract by *Ruminococcus albus*, *International Journal of Hydrogen Energy*. (35), 3423–3432.
- Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M. and Reungsang, A. 2008. Bio-Hydrogen Production from the Fermentation of Sugarcane Bagasse Hydrolysate by *Clostridium butyricum*, *International Journal of Hydrogen Energy*. (33), 5256-5265.
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y. and Liu, S. 2006. Biohydrogen Production from Molasses by Anaerobic Fermentation with a Pilot-Scale Bioreactor System, *International Journal of Hydrogen Energy*. (31), 2147-2157.
- Ren, N., Wang, A., Cao, G., Xu, J. and Gao, L. 2009. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Hydrogen: Potential and Challenges, *Biotechnology Advances*. (27), 1051-1060.
- Saraphirom, P. and Reungsang, A. 2010. Optimization of Biohydrogen Production from Sweet Sorghum Syrup Using Statistical Methods, *International Journal of Hydrogen Energy*. 35 (24), 13435–13444.
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. and Chen, K. 2009. Improving Hydrogen Production from Cassava Starch by Combination of Dark and Photo Fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*. (34), 1780-1786.

- Taguchi, F., Mizukami, N., Saito-Taki, T. and Hasegawa, K. 1995. Hydrogen Production from Continuous Fermentation of Xylose during Growth of *Clostridium* sp. No. 2. *Can J Microbiol.* (41), 536-540.
- Urbaniec, K. and Grabarczyk, R. 2009. Raw Materials for Fermentative Hydrogen Production, *Journal of Cleaner Production.* (17), 959–962.
- Valdez-Vazquez, I. and Poggi-Varaldo, H. 2009. Hydrogen Production by Fermentative Consortia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* (13), 1000–1013.
- Van Ginkel, S.W., Oh, S.E. and Logan, B.E. 2005. Biohydrogen Gas Production from Food Processing and Domestic Wastewaters, *International Journal of Hydrogen Energy.* (30), 1535-1542.
- Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.V. and Liao, C.S. 2004. Efficient Production of Hydrogen from Wastewater Sludge, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* (79), 426-427.
- Wang, Y., Wang, H., Feng, X., Wang, X. and Huang, J. 2010. Biohydrogen Production from Cornstalk Wastes by Anaerobic Fermentation with Activated Sludge, *International Journal of Hydrogen Energy.* (35), 3092-3099.
- Woo, J.H. and Song, Y.C. 2010. Biohydrogen Production from Sewage Sludge Using a Continuous Hydrogen Fermentation System with a Heat Treatment Vessel, *KSCE Journal of Civil Engineering.* 14 (5), 673–679.
- Xing, Y., Li, Z., Fan, Y. and Hou, H. 2010. Biohydrogen Production from Dairy Manures with Acidification Pretreatment by Anaerobic Fermentation, *Environ Sci Pollut Res.* (17), 392-399.
- Zhu, H., Parker, W., Basnar, R., Proracki, A., Falletta, P., Beland, M. and Seto, P. 2008. Biohydrogen Production by Anaerobic Co-Digestion of Municipal Food Waste and Sewage Sludges, *International Journal of Hydrogen Energy.* (33), 3651-3659.