

Biyolojik hidrojen üretim prosesleri

N. GENÇ*

Kocaeli Üniv., Mühendislik Fak., Çevre Müh. Böl., İZMİT

Özet

Hidrojen alternatif yakıt olarak büyük bir potansiyele sahip temiz bir enerji taşıyıcısıdır. Hidrojen üretimi için çeşitli teknolojiler vardır. Biyolojik hidrojen üretim prosesleri termokimyasal ve elektrokimyasal proseslere kıyaslandığında daha çevre dostu ve çok az enerji yoğunluklu olduğu bulunmuştur. Hidrojen biyolojik olarak biofotoliz, foto-fermentasyon ve karanlık-fermentasyon veya bu proseslerin kombinasyonu ile üretilebilir. Literatüre göre, maksimum hidrojen verimi 7,1 mol H₂/mol glukoz olarak bulunmuştur. Düşük hidrojen verimi ve düşük hidrojen üretim hızı bu proseslerin ticarileşmesinde en önemli engeldir. Genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmaların gelişimi, prosesin işletme şartlarının iyileştirilmesi, kombine proseslerin gelişimi gibi ilerlemeler biohidrojen teknolojisinin hızlı bir şekilde ticarileşmesini sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Biohidrojen, biofotoliz, foto- ve karanlık- fermentasyon, kombine proses

Biological hydrogen production processes

Abstract

Hydrogen is a clean energy carrier which has a great potential to be an alternative fuel. There are a variety of technologies for hydrogen production. Biological hydrogen production processes are found to be more environment friendly and less energy intensive as compared to thermochemical and electrochemical processes. Hydrogen can be produced biologically by biophotolysis, photo-fermentation and dark-fermentation by combination of these processes. According to literature, maximum hydrogen yield is found to be 7.1 mol H₂/mol glucose. However, major bottlenecks for the commercialization of these processes are lower H₂ yield and rate of H₂ production. The advancements such as the development of genetically modified microorganism, improvement of operational conditions of process, development of combined process to improve energy conversion efficiency should allow for rapid commercialization of biohydrogen technology.

Keywords: Biohydrogen, biophotolysis, photo- and dark-fermentation, combined process

* Nevim GENÇ, e-mail: ngenc@kocaeli.edu.tr, Tel: 0 262 5514750

1-Giriş

Hidrojen yüksek enerji değerine sahip bir yakıttır (3042 cal/m³). Yandığı zaman oluşan ana ürün su olduğu için kirlilik yaratmayan bir yakıt olduğu düşünülür. Diğer gaz halindeki yakıtlara kıyaslandığında çevreye ve insanlara zararsızdır. Hidrojen başlıca fosil yakıtlardan, biyokütleden ve sudan çeşitli metotlar kullanılarak üretilir. Bu proseslerden buhar reformasyon, kömür gazlaştırma ve suyun elektrolizi metotlarında enerji kaynağı olarak fosil yakıtlar bazen de hidroelektrik kullanılır. Termokimyasal ve elektrokimyasal metotlar yoğun enerji kullanırlar ve her zaman için çevreye dost değildirler. Örneğin termal metotlar ısı enerjisi, elektrolitik metotlar elektrik enerjisi fotolitik metotlar ışık enerjisi kullanır. Yenilenebilir olmayan enerji kaynaklarının kullanılması ve sürdürülebilir olmaması bir dezavantaj oluşturmaktadır. Biyolojik hidrojen üretim prosesleri ise çevre sıcaklığı ve basıncında işletildiği için daha az enerji tüketimi söz konusudur. Bu prosesler düşük enerji tüketimine sahip oldukları ve yenilenebilir kaynakların kullanımı açısından yeni bir alan yarattıkları için çevre dostudur [1]. Günümüzde hidrojenin %40'ı doğal gazdan, %30'u ağır yağlar ve naftadan, %18'i kömürden, %4'ü elektrolizden ve yaklaşık %1'i biyokütleden üretilmektedir. Enerji alanındaki darboğazın aşılması üzerine çalışmaların yoğunlaştığı günümüzde, sürdürülebilir bir gelişme ve atık miktarının azaltılması dikkate alındığı zaman, yenilenebilir kaynaklardan biyohidrojen üretimi önemli ölçüde dikkat çekmiştir. Atık maddelerin kullanımı ve temiz enerji kaynağı üretimi, biyohidrojen üretim proseslerini tercih edilebilir bir yaklaşım yapmaktadır. Burada, bu gerçekler ışığında biyohidrojen üretim prosesleri değerlendirilmiştir.

2-Biyolojik hidrojen üretim prosesleri

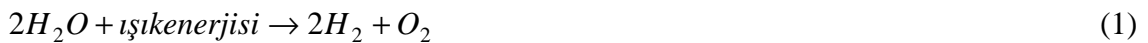
Sürdürülebilir gelişme ve atık oranının azaltılmasına olan ilginin artmasından dolayı son yıllarda biyohidrojen üretimi üzerine olan çalışmalarda da büyük artış gözlenmiştir. Biyolojik hidrojen üretim prosesleri aşağıdaki bölümlerde detaylı olarak açıklanmıştır.

2.1- Yeşil alg ve mavi-yeşil alg (cyanobacter) kullanılarak suyun biyofotolizi

Yeşil alg ve mavi-yeşil algler, su moleküllerini hidrojen iyonuna ve oksijene direkt ve indirekt biyofotoliz ile parçalarlar.

2.1.1- Direkt biyofotoliz

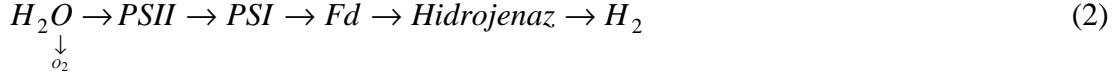
Bu proseste güneş enerjisi direkt olarak fotosentetik reaksiyonlar ile suyu hidrojen iyonu ve oksijene ayırır. Üretilen hidrojen iyonları, hidrojenaz enzimi ile hidrojen gazına dönüşür [2, 3]. Biyofotoliz prosesinde kullanılan Fe-hidrojenaz aktivitesi oksijene karşı hassas olduğu için özel şartlar gereklidir. Yeşil alg ile suyun hidrojene dönüşümü reaksiyon (1) ile ifade edilir.



Yeşil bitkilerde sadece CO₂ indirgenmesi meydana gelir, çünkü hidrojen oluşumunu sağlayan enzimler yani hidrojenaz yoktur. Mikroalgler, hem ökaryotik (yeşil algler gibi) hem de prokaryotik (cyanobacteria veya mavi-yeşil algler), hidrojenaz enzimine sahiptirler ve uygun şartlar altında hidrojen üretebilirler. Direkt biyofotoliz reaksiyonunda elektronlar sudan iki fotosistem (PSII ve PSI) aracılığı ile hidrojene akar.

Direkt biyofotoliz suyun parçalanması PSII ve ferredoxin-indirgenmesi fotosistem PSI den meydana gelir [4].

İyi bilinen H₂ üreten yeşil alg, *Chlamydomonas reinhardtii*, anaerobik şartlar altında ya H₂ üretebilir ya da elektron vericisi olarak H₂ kullanabilir. Üretilen hidrojen iyonları, hücrelerde hidrojenaz enzimi varlığı ile elektronlu (indirgenmiş ferredoksin tarafından verilmiş) ortamda hidrojen gazına dönüşür. Fotosistem II (PSII) elektronlar üretir, bu elektronlar fotosistem I (PSI) tarafından absorbe olan ışık enerjisini kullanan ferredoksin (Fd) transfer olur. Hidrojenazın varlığında H₂ üretimi için indirgenmiş ferredoksinde direkt olarak elektronları hidrojenaz kabul eder [5].

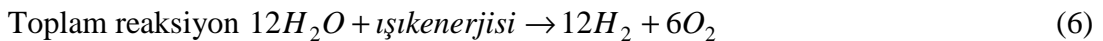
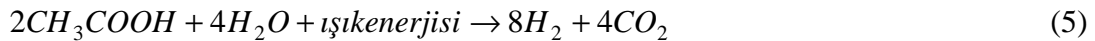
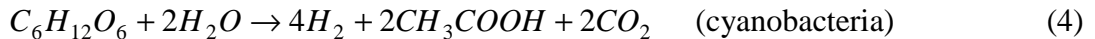
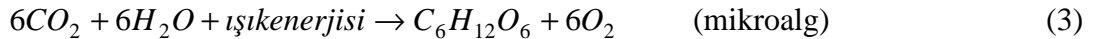


Alg ile hidrojen üretimi, yenilenebilir kaynak olarak ucuz ve hemen hemen her yerde bulunabilen suyun kullanımı ve hava kirleticilerinden biri olan CO₂ tüketimi açısından ekonomik ve sürdürülebilir metot olarak düşünülebilir. Mikroorganizmalar hidrojene ilaveten oksijen de üretir. Üretilen oksijenin hidrojenaz enzimi üzerine kuvvetli bir engelleyici etkisi bu prosesin en önemli sınırlayıcı etmenidir. Oksijenin etkisini önlemek için oksijene daha az hassas organizmaların tanımlanması, hidrojen ve oksijen döngülerinin ayrılması, ve\veya fotosentezin (oksijen üretimi) solunuma (oksijen tüketimi) oranının değiştirilmesi çalışmaları başlamıştır. Çözeltiye sülfat ilavesinin oksijen üretimi ve hassasiyetini, bununla birlikte hidrojen üretim mekanizmasını da baskıladığı belirlenmiştir [6]. Düşük hidrojen üretim potansiyeli ve hiçbir atığın kullanılmıyor olması diğer dezavantajlarıdır [3]. Direkt biyofotoliz prosesi 1 atm oksijen basıncına yakın kısmi basınçta işletilmelidir. Direkt biyofotolizde literatürde açıklanan hidrojen üretim hızı 0,07 mmol/saat L dır [2]. Bu proses oldukça zayıf ve hassas bir yapıya sahiptir. Hız oldukça düşüktür (diğer fotosentetik reaksiyonların onda birinden daha az), kısa ömürlüdür (yaklaşık 15 dakika devam eder). Bütün bunların sebebi O₂ birikimine bağlanmıştır [4].

2.1.2- İndirekt biyofotoliz

Direkt biyofotolizde gözlenen O₂'nin engelleyici etkisinden kaçınmak için, indirekt biyofotoliz önerilmiştir. İndirekt biyofotoliz şu adımlardan meydana gelir:

1. Fotosistemde biyokütlenin oluşumu
2. Alg hücrelerindeki glukozun 1 molu başına 2 mol asetat ve 4 mol hidrojenin aerobik karanlık fermentasyonda üretimi
3. 2 mol asetatın hidrojene dönüşümü



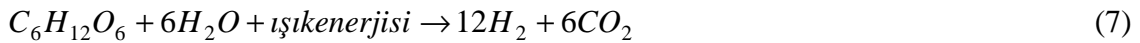
İlk olarak N₂ yokluğunda nitrojenaz ile H₂ üretebilen azotu bağlayabilen cyanobacteria incelenmiş [4]. Cyanobacteria enerji kaynağı olarak güneş enerjisi ve karbon kaynağı olarak CO₂ kullanımına sahiptir. Hücreler, hücresel maddeleri üretmek için ilk olarak CO₂ alırlar ve ardından hidrojen üretimi için kullanılırlar [2].

Cyanobacteria iyi bilinen bir mavi-yeşil alg olup büyük ve farklı bir fotoototrofik mikroorganizma grubunu teşkil eder. Fotosentetik pigmentler içerir ve oksijenli ortamda fotosentez yapabilir. Hidrojen, hem hidrojenaz hem de nitrojenaz enzimleri ile üretilir. Azotu bağlayabilen veya bağlayamayan cyanobacteria türleri mevcuttur. Cyanobacteria'nin gereksinimleri, hava (N₂ ve O₂), su, mineral tuzlar ve ışıktır [5]. Cyanobacteria veya mavi-yeşil alg gram pozitif bakteridir [1]. *Anabaena cylindrica* en iyi bilinen hidrojen üreten cyanobacterium'dur. Fakat bir başka hidrojen üreten cyanobacterium olan *Anabaena variabilis* yüksek hidrojen veriminden dolayı son yıllarda çok daha fazla dikkat çekmiştir [5]. *Anabaena variabilis*'in mutant türünün indirekt biyofotolizinde hidrojen üretim hızı 0,355 mmol/saat L olarak açıklanmıştır [2].

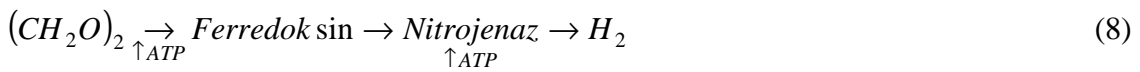
Nitrojenazın aktivitesi oksijen ile engellenir. Bu yüzden hidrojen üretimi anaerobik şartlar altında meydana gelir. H₂'nin foto üretimi üzerine CO₂'nin engelleyici etkisi açıklanmış olmakla birlikte, hidrojen gelişim safhasında CO₂ bazı kültürler için gereklidir. Düşük CO₂ derişimlerinin (%4-18 w/v) büyüme evresinde hücre yoğunluğunu artırarak sonraki evrede daha yüksek hidrojen üretimine yol açtığı belirtilmiştir [5]

2.2- Fotosentetik bakteri ile organik bileşiklerden hidrojen üretimi

Moleküler hidrojen üreten fotosentetik mikroorganizma güneş enerjisi varlığında indirgenmiş bileşikleri (organik asitleri), azotun yetersiz olduğu şartlar altında nitrojenaz ile katalizler. Bu mikroorganizmalar suyu parçalamada yeterince etkili değildir. Bununla birlikte anaerobik şartlar altında, bu mikroorganizmalar elektron vericisi olarak asetik asit gibi basit organik asitleri kullanmaya yeteneklidirler. Bu elektronlar, ATP formunda enerji kullanan ferredoksin ile nitrojenaza taşınır. Azot mevcut olmadığı zaman, nitrojenaz enzimi protonu hidrojen gazına indirgeyebilir. Hidrojen üretim reaksiyonu aşağıda verilmiştir [2]



Fotofermentasyon prosesindeki biyokimyasal yoluzi ise aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir [5].



CO, fotosentetik bakteri ile mikrobiyal değişim reaksiyonunun kullanıldığı hidrojen üretimi için de kullanılabilir.



Literatürde 145-160 mmol/ saat L derecesinde hidrojen üretim hızı rapor edilmiştir [2].

Bu prosesin en önemli faydaları [1]:

- 1- Yüksek teorik dönüşüm verimine sahip oluşu
- 2- Farklı biyolojik sistemlerde aktivitenin yitilmesi problemine sebep olan O₂-gelişim olmayışı
- 3- Geniş spektrumdaki ışığın kullanılabilirliği

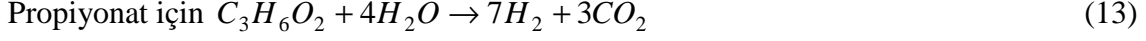
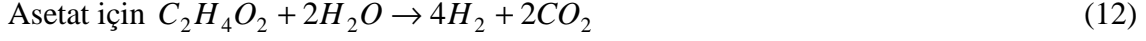
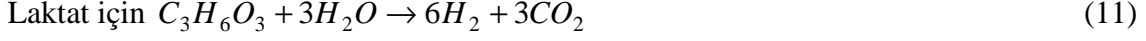
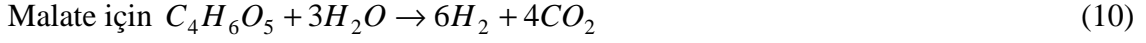
4- Atıklardan türeyebilen organik substratları ve onları tüketebilmesi, atıksu arıtımı ile birlikte kullanım potansiyeline sahip oluşu

Fotosentetik mikroorganizma, anaerobik ortamda ışığa bağımlı elektron taşınım işlemi ile organik bileşiklerden hidrojen üretir. Fotosentetik bakterinin en uygun büyüme sıcaklığı 30-35°C aralığı ve pH'ı 7,0 dır [3]. Fotosentetik bakterinin kullanımındaki avantaj, bu organizmaların çok yönlü metabolik yeteneğine sahip oluşu ve PSII'nin olmayışıdır, böylece H₂ üretiminin O₂ ile engellenmesi önlenmiş olur. Bu bakterilerin fotosentezi yürütebilmesi için organik veya inorganik elektron kaynağına ihtiyacı vardır. Geniş aralıktaki ucuz bileşikleri kullanabilir. Pek çok organik atığın kullanımı bu konuda uygun bulunmuştur [5]. Endüstriyel atıklardan hidrojen gazı üretiminde en önemli problemlerden biri ışığın nüfuziyetini azaltan atıksuyun rengidir. Yüksek amonyak derişimlerinin nitrojenaz enzimini engellemesi ile hidrojen verimliliğini azaltması da diğer bir problemdir. Endüstriyel atıklardaki yüksek organik madde içeriği (KOİ) ve bazı zehirli bileşikler (ağır metaller, fenoller ve PAH), hidrojen üretiminden önce ön arıtım ile giderilmelidir [3].

Fotosentetik mikroorganizmalar arasında, mor fotosentetik bakterilerin çok iyi hidrojen ürettiği bilinmektedir [7]. Fotofermentatif hidrojen üretiminde mor kükürtsüz bakteri (PNS), güneş ışığı veya suni ışıktan elde edilen ışık enerjisi ile elektron vericisi olarak küçük zincirli organik asitleri kullanabilir. Fotosentetik bakterilerin bu özelliği, karanlık fermentasyon çıktılarının daha ileri seviyede parçalanması ve H₂ üretiminin tamamlanmasında kullanım imkanını da artırır. PNS bakterisi ile biokimyasal proses nitrojenaz tarafından katalizlenir. Bu yüzden, yeterli ATP kaynağı, etkili fotofermentatif hidrojen üretimi için ana parametrelerden biridir. Işıktan elde edilen enerji, PNS bakteriyeye organik asitlerin hidrojene dönüşümünde termodinamik bariyeri yenmesine imkan verir. PNS bakterisi geniş dalga boyu aralıktaki ışığı (522-860 nm) absorbe etme yeteneğine sahip olup, hidrojen üretim mekanizması membran üzerinden elektron transfer işleminden ibarettir. Tungsten ve lüminesans tipte suni ışık kullanılması durumunda, anoksik ortamda hidrojen üretimi için 11,7±2,9 W/m², hücre büyümesi için ise 7,3±1,5 W/m² üniform ışık yoğunluğu kullanılabilir. Uygun değerden daha yüksek bir ışık yoğunluğu, hem biyokütlenin büyümesi, hem de PNS bakterileri tarafından hidrojenin foto üretimi için herhangi bir engelleyici etkiye yol açmaz. Fotobiyoreaktörün tasarımı, uygun ışık kullanımı ve ışığın nüfuziyeti, yüksek hidrojen üretim verimi için esastır. Basak ve Das (2009) tarafından yapılan çalışmada üniform ışık dağılımının sağlandığı silindirik halka şeklindeki reaktörde hidrojen verimi 1 mol DL malik asit başına 4,5±0,05 mol H₂ olarak elde edilmiştir. Teorik olarak ise 1 mol DL malik asit başına 6 mol H₂ elde edilebilmektedir [8].

Rhodobacter sphaeroides anaerobik şartlar altında nitrojenaz-hidrojenaz enzim sistemi ile organik asitten hidrojen üretebilen en iyi bilinen PNS bakterisidir. Kapdan ve diğ., (2009) tarafında asitle hidrolize edilmiş buğday nişastası ile fotofermentatif hidrojen üretiminde üç farklı *Rhodobacter sphaeroides* türünün etkinliği incelenmiştir [9]. Sonuçlar göstermiştir ki, hidrojen üretim verimleri R-RV türü için 1,23 mol H₂/mol glukoz R-DSMZ için 0,97 mol H₂/mol glukoz R-NRLL için 0,82 mol H₂/mol glukoz olmuştur. Hidrojen veriminde bakteri türü olduğu kadar tüketilen organik asitler de etkilidir. Uyar ve diğ., (2009) tarafından *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ile farklı uçucu yağ asitleri içeren ortamdaki fotofermentatif hidrojen üretimi incelenmiştir [10]. 30-33°C'de 150-200W/m² ışık yoğunluğunda 6,7 pH'da işletilen fotoreaktörde mikrobiyal hidrojen üretiminin belirlenmesinde substrat dönüşüm verimliliği

değerlendirilmiştir. Substrat dönüşüm verimliliği büyüme veya alternatif biyosentezden daha ziyade hidrojen üretimi için kullanılan substratın ne oranda olduğunun ölçüsüdür. Bazı substratlar için reaksiyonlar şu şekildedir:



Çalışmada en yüksek substrat dönüşüm verimliliği ve hidrojen üretim hızı, en kısa lag süresi (aşılamanın başlaması ile gaz üretiminin başlaması arasında geçen süre) ve en yüksek hidrojen miktarı malate içeren ortamda elde edilmiştir, butirat ise en düşük miktarda kalmıştır. Bunun sebebi ise butiratın poli-β- hidroksibütirat (PHB) maddesine kolay dönüşüm olasılığı ile açıklanmıştır. PHB üretimi, fotohidrojen üretimi ile rekabet eder; bu rekabetin sebebi ise PHB üretimi ve hidrojen üretiminde organik asitlerin metabolizmasından oluşan aynı indirgeyici gücün kullanılmalarıdır. Yapılan çalışmada substrat karışımının fotofermentasyonu sırasında ise substrat dönüşümü ve hidrojen üretiminin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Fotofermentasyon performansı mikrobiyal kültürün tipine ve karbon kaynağına olduğu kadar ışık yoğunluğuna da bağlı olarak değişir. Işık yoğunluğunun artması, hidrojen verimi ve üretim hızı üzerinde pozitif etki yaratır, fakat ışık dönüşüm verimi üzerine ters etkiye sahiptir [11]. Karanlık şartlar altındaki hidrojen üretimi genel olarak ışınlanmış şartlarda elde edilenden düşüktür. Bununla birlikte ışık/ karanlık döngüler, hidrojen üretim hızını ve hücre derişimlerini sürekli ışınlanmaya kıyasla biraz daha artırdığı belirlenmiştir [3].

Obeid ve diğ., (2009) tarafından yapılan çalışmada *Rhodobacter capsulatus* ile fotofermentasyon ile hidrojen üretiminde ışık yoğunluğunun etkisi incelenmiştir [12]. Karbon ve hidrojen kaynağı olarak laktatın kullanıldığı çalışmada ışık yoğunluğunun artışı ile hidrojen üretim hızının arttığı görülmüştür. 50000 lux'de hidrojen üretim hızı, 6000 lux'de elde edilenden 6 kat yüksek olmuştur. Ayrıca ışık yoğunluğunun artışı biyokütle üretimini de artırmıştır. Işık yoğunluğunun 6000 lux'den 50000 lux'e çıkması biyokütle üretimini ifade eden protein derişimini 3,1g/L'den 4 g/L'ye artırmıştır.

Daha önce de ifade edildiği üzere nitrojenaz, fotosentetik bakteri ile hidrojen gaz üretimini hızlandıran ana enzimdir. Enzimin aktivitesi oksijen, amonyak veya yüksek N/C oranında engellenmiş olur. Bu yüzden sınırlandırılmış amonyum ve oksijensiz şartlar gereklidir. Hidrojen gazı üretimini azot kaynağı olarak albumin, glutamat ve maya ekstraktı gibi proteinler artırırken, amonyak tuzları varlığında düştüğü belirlenmiştir. Yüksek azot derişimlerinde metabolizmanın değişmesi sonucu organik maddenin hidrojen üretiminden daha ziyade hücre sentezine kanalize olması, aşırı biyokütle büyümesine ve ışık yayınının azalmasına sebep olur. Amonyak tükendikten sonra ise hidrojen üretim aktivitesi gerçek seviyesine dönebilir. Karbonhidratın varlığında amonyak gideriminin artacağı ve hidrojen üretiminin teşvik edileceği rapor edilmiştir. Yüksek seviyede amonyak içeren atıksudan hidrojen üretimi için amonyak giderimi ve hidrojen üretim prosesini içeren iki safhalı sistemler önerilmiştir [3].

Foto-fermentatif bakteride hidrojenaz hidrojen gazı kullanan bir enzimdir, ve bu yüzden nitrojenaz aktivitesine antagonistiktir (düşmandır). Hidrojenaz aktivitesi, hidrojen gazı üretimini sınırlayacaktır. Hidrojenazı eksik foto-fermentatif bakteri mutant kültürleri 2-3 kat daha fazla hidrojen üretebilmektedir [3].

2.3-Organik bileşiklerden fermentatif hidrojen üretimi (Karanlık fermentasyon)

Hidrojen, karbonhidratça zengin substrat üzerinde karanlıkta büyüyen anaerobik bakteri ile de üretilebilir. Fermentasyon yolizine ve en son ürüne bağlı olarak glukozdan farklı miktarda hidrojen üretilebilir. Laboratuvar denemelerinde hidrojen üretim hızı 77 mmol/saat L olarak elde edilmiştir [2]. Organik atıkların anaerobik asetojenizinde üç tip fermentasyon meydana gelir; bunlar propiyonik asit, bütirik asit ve etanol tipli fermentasyondur. Aynı işletme koşullarında yapılan çalışma göstermiştir ki organik atıktan hidrojen üretiminde etanol tipli fermentasyon (2,96 mol/kg MLVSS gün), propiyonik asit (0,022 mol/kg MLVSS gün) ve bütirik asit (0,57 mol/kg MLVSS gün) tipli fermentasyondan daha uygun olduğu bulunmuştur [13].

Endüstriyel üretim için fermentasyon ile hidrojen üretimi bazı avantajlara sahiptir. Bunlar [1]:

- 1-Fermentatif bakteri yüksek hidrojen gelişim hızına sahiptir
- 2-Fermentatif bakteriler organik maddeden gün ve gece boyunca sabit olarak hidrojen üretebilirler
- 3-Fermentatif bakteriler, üretim sisteminde iyi bir büyüme hızına sahiptirler

Bundan dolayı hidrojen üretiminde fermentatif üretim prosesleri fotokimyasal proseslerden çok daha avantajlıdır. Hidrojen üretim hızı, eşirilebilir ve zengin elektron kaynağı ve aktif hidrojenaz faktörlerinin bileşimi ile en yüksek seviyesine ulaşabilir [1].

Fermentatif elektron üretimi: Heterotrofik organizmalarda, anaerobik büyüme şekli, enerji üreten reaksiyonlarda meydana gelen elektronların tabiatı gereği özel problemler ortaya koyar. Bu durum özellikle biyosentetik aktivite için, enerji kaynağı olarak hizmet eden büyük miktarda organik bileşikler parçalandığı zaman gözlenir. Bundan dolayı zorunlu ve fakültatif anaerobların metabolizmasında elektron akışını düzenlemek için çeşitli kontroller gereklidir. Bunlardan biri bazı organizmaların hidrojenaz aktivitesi ile moleküler hidrojen (H₂) formunda aşırı elektronları uzaklaştırmasıdır.

Piruvatın parçalanma yolizi, reaksiyon (15)'de görüldüğü gibi, asetil-CoA ve format oluşturur.

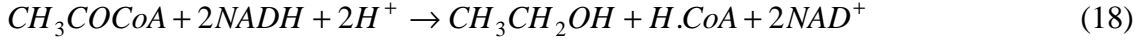


Format parçalanması ise reaksiyon (16) gereği H₂ meydana getirir.



Asetil CoA hem asetati (reaksiyon 17) hem de etanolü (reaksiyon 18) meydana getirir.

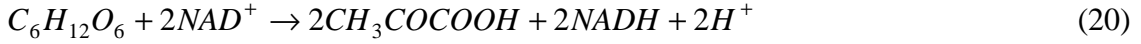




Hidrojen gelişimi için diğer yolizi, NADH yolizi olarak tanımlanır. Bu yolizinde, hidrojen reaksiyon (19) gereği NADH'nin yeniden oksidasyonu ile üretilir.



Bu NADH, glukozun piruvata fermentatif dönüşümü sırasında oluşur. Bu yolizi reaksiyon (20)'de gösterilmiştir.



Aktif Hidrojenaz: Hidrojenaz enzimi fermentatif hidrojen üretiminde önemli rol oynar.

2.3.1- Fermentatif hidrojen üretimini etkileyen faktörler

Substrat: Kimyasal içerik dikkate alındığında termofilik fermentasyon için üç farklı biokütleden söz edilebilir [14].

- Şeker içeren biyokütle (şeker pancarı, şeker kamışı)
- Nişastalı biyokütle (patates, hububat)
- Lignoselülozik biyokütle (çimen, ağaç, saman)

Bu biyoküteller çeşitli tarımsal atıklar olabileceği gibi biyokütle işleyen endüstrilerden kaynaklanabilen atıklar da (pancar küspesi, melas, patates kabuğu, elma küspesi, buğday kepeği) olabilmektedir. Şeker [15, 16], nişasta [17, 18] ve selülozdan [19] fermentatif hidrojen üretimi üzerine çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Magnusson ve diğ., (2008) tarafından işlem görmemiş farklı selülozik atıkların *Clostridium thermocellum* ile parçalanabilirliği değerlendirilmiştir [20]. Elde edilen sonuçlar laboratuvar saflığındaki α -selüloz ile kıyaslandığı zaman, atıkların hidrojen üretiminde iyi bir potansiyel ve değerli son ürünler elde edildiğini göstermiştir. 5 g/L atık kullanılması ile elde edilen hidrojen üretimi 1,18-1,27 mmol H₂/g glukoz arasında iken 1,1 g/L α -selüloz kullanılması ile elde edilen hidrojen üretimi ise 0,76 mmol H₂/g glukoz olmuştur. Urbaniec ve Grabarczyk, (2009) tarafından çeşitli biyokütellerin (şeker pancarı, patates, buğday kepeği, sıkıştırılmış pancar küspesi ve buğday sapı) fermentatif hidrojen üretim verimlilikleri değerlendirilmiştir [14]. İncelenen atıklardan en yüksek hidrojen verimi, düşük su içeriğinden dolayı (yaklaşık %10) buğday kepeği ve buğday sapında elde edilmiştir.

Bazı substratlar, karmaşık yapılarından dolayı fermentatif hidrojen üretimi için ideal değildirler. Bu atıklara bazı ön işlemler uygulandıktan sonra kullanılabilirler. Örneğin atıksu arıtım ünitelerinden oluşan atık aktif çamura ultrasonikasyon, asidifikasyon, dondurma ve çözündürme, sterilizasyon, metan bakterilerinin engellenmesi ve mikrodalga gibi uygun ön işlemleri uygulandıktan sonra kullanılabilir [21]. Biyokütleye uygulanan ön işlem metodu ham maddenin tipine bağlı olarak değişir. Sukroz içeren biyokütlerde ön işlem adımı, meyve suyunun ekstre edilmesini içerir. Nişasta ve lignoselülozik biyokütlenin ön işlemi, polisakkaritlerin basit şekerlere dönüşümünde hidroliz adımı gerektiğinden dolayı çok karmaşıktır. Fermentasyon biriminden önce ligninin giderimi önemli bir problemdir. Çünkü selüloz ve

hemiselülozun aksine lignin basit şekerlere dönüşmez ve hidrojen üreten mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilir.

Biyohidrojen Üreten Bakteri: Anaerobik şartlarda hidrojen üretebilen çok sayıda mikroorganizma tipi vardır. Zorunlu anaerobik bakteriler en genel sınıftır. Bununla birlikte hidrojenaz enzimi bulunan birkaç fakültatif bakteri de, hidrojen üreticisi olarak tanımlanmıştır. Bunlar zorunlu anaerobik bakteriden daha düşük hidrojen üretim hızına sahiptirler. Anaerobik bakteriler tarafından hidrojen üretiminde iki yoluzi vardır, bunlar bütirat yoluzi veya asetat yoluzi. Teorik olarak asetat yoluzi ile 1 mol glukozdan 4 mol hidrojen üretilebilir, bütirat yoluzinde ise 2 mol hidrojen üretilir.

Fakültatif anaerob, oksijenin mevcut olduğu durumda aerobik solunum ile ATP üretir ve anaerobik fermentasyona dönme eğilimindedir. Zorunlu anaerobik bakterilerin büyümesi, iz miktardaki oksijenin engelleyici etkisinden dolayı oldukça güçtür. L-cysteine gibi indirgeyici ajanların kullanılması, anaerobik ortamın korunmasında alternatif bir yoldur, ancak işletim maliyetini artıracaktır [22, 23]. L-cysteine fermentasyon sistemlerinde yükseltgenme-indirgenme potansiyeli (ORP) değerini baskılar. L-cysteine ilavesinden sonra ORP değeri -171mV'dan -226~-272mV seviyelerine düşmüştür. Ayrıca L-cysteine bakteri tarafından substrat kullanım hızını artırabilir. 0,6 mM L-cysteine ilavesi hidrojen verimini %15,2 artırmıştır [24]. Maliyet artışına karşın co-kültürün kullanılması önerilmektedir. Böyle bir durumda indirgeyici ajan kullanmaksızın bir mikroorganizma türü sıvıdaki çözünmüş oksijeni tüketerek ortam diğer mikroorganizma türünün hidrojen üretimini yapabileceği anaerobik şartlar sağlanmış olacaktır [22].

Reaktör Tipi: Geleneksel tam karışımli sürekli reaktörlerde, çok kısa hidrolik alıkonma sürelerinde (HRT) biyokütlenin dışarıya yıkanması söz konusudur. Bu suretle karışık sıvıdaki biyokütle derişimi ve hidrojen üretimi sınırlanır. Tutuklanmış-hücreli reaktörler bu tip reaktörlere bir alternatiftir. HRT'nin artışı, hidrojen üreten bakterinin hidrojen üretimini artıracak, ancak çok yüksek seviyedeki HRT azaltacaktır [21]. Sürekli reaktörlerde hidrolik alıkonma süresi ve organik yükleme hızı gibi parametrelerin uygun seçilmesi ile hidrojen üretim verimi artırılabilir. Hacimsel hidrojen üretim hızı artıkça reaktör boyutu küçülür ve sürdürülebilirlik ve temiz enerji üretimi için reaktörün maliyeti azalmış olur [25]. Bunun yanı sıra sabit gaz üretiminin sağlanması için işletme parametrelerine dikkat edilmelidir [26].

Babu ve diğ., (2009) tarafından fermentatif H₂ üretimi ve substrat parçalanması üzerine bağı ve süspanse büyümeye sahip reaktörlerin etkisi incelenmiştir [27]. Elde edilen sonuçlar gösterdi ki, hidrojen verimi ve substrat giderimi bağı büyümeye sahip biyofilm reaktöründe (28,98 mmolH₂/gün, 1,25 kgKOİ/m³ gün), süspanse büyümeli reaktörden (20,93 mmolH₂/gün, 1,08 kgKOİ/m³ gün) daha yüksek olmuştur.

Azot ve Fosfor: Protein, nükleik asit ve enzimlerin yapısında azot bulunduğu için hidrojen üreten bakterinin büyümesinde azot çok önemlidir [21]. Uygun derişimde amonyak azotu fermentatif hidrojen üretimi için faydalıdır, yüksek derişimlerde ise hidrojen üretimini inhibe edebilir, çünkü bakterinin hücre içi pH'ını değiştirebilir, enerji gereksinimini artırabilir veya belirli enzimleri inhibe edebilir. Fermentatif hidrojen üretimi sırasında 0,1 g N/L amonyak derişiminde en yüksek hidrojen verimliliği (298,8 mL/g glukoz) elde edilmiştir [28]. Fosfata ise hem nütrient değeri hem de tamponlama kapasitesi özelliğinden dolayı gereksinim duyulur [21].

Metal İyonu: Katyonlar ATP sentezinde, NAD yükseltgenme/indirgenmesinde ve enzim aktivitesinde önemli rol oynarlar. Uygun derişimlerde olduğu takdirde mikrobiyal metabolizmayı artırır. Fakat aşırı derişimlerde, yüksek osmotik basınç ve yanlış enzim bağlantısı yaratması sebebi ile hücrenin aktivite kaybına ve plasmolizine sebep olabilir. Sodyum pek çok atıksuda bulunması ve tamponlayıcı madde olarak kullanılan kimyasallarda yer alması bakımından en önemli katyon olmuştur. Kim ve diğ., (2009) tarafından sodyumun zehirleyici etkisi incelenmiştir [29]. Sonuçlar göstermiştir ki 6 g Na⁺/L den yüksek sodyum derişimlerine ani maruz bırakılması durumunda substrat giderim verimliliği ve mikrobiyal katabolizmanın engellendiği, metabolik yoluzinin değişimi ile hidrojen üretiminin düştüğü saptanmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada 1,87 g/L üstündeki sodyum derişimlerinin metan üretimini engellediği 2,75 g/L de ise zehirleyici etki gösterdiği saptanmıştır [30]. Fe²⁺ yokluğunda hidrojen üreten fermentatif bakteri büyümesi, metabolizması ve hidrojen üretim yeteneği etkilenecektir. Demir hidrojenaz için gereklidir. Mg²⁺, önemli bir etkileyici faktördür. Magnezyum önemli bir kofaktördür. Glikoliz prosesinde stoplazmadaki yaklaşık 10 enzimin Mg²⁺ ile aktive olması beklenir [22, 23].

Sıcaklık: Uygun aralıkta sıcaklık artışı, hidrojen üreten bakterinin yeteneğini artırır. Fakat çok yüksek seviyelerdeki sıcaklık azaltır. Mezofilik aralık için en uygun sıcaklık 37 °C, termofilik aralık için ise 55 °C'dır.

Asidin engelleyici etkisi ve pH değişimi: Hidrojen asidojeniz prosesinde tek ürün değildir, asetat, bütirat ve etanol aynı zamanda meydana gelir. Kültür ortamı yüksek şeker ile beslendiği zaman üretilen yüksek derişimdeki asitler hidrojen üretimini engeller. Yüksek derişimde çözünmeyen asitlerin olması halinde, çözeltinin iyonik gücü artar ve prosesin yönü hidrojen üretiminden organik çözücü üretimine doğru döner. Polar olmayan ayrışmayan asitler, düşük pH'da hücre duvarından nüfuz ettiği zaman yüksek iç pH'ında hücre içindeki protonlar salınır ve inhibisyon etkisi meydana gelir. Bu enerji ihtiyacı artışına sebep olur. Hücre içi asit derişimini koruyacak ana parametre hücre dış ortamının pH'ıdır. Hidrojen üretimi için optimum pH 5-7 aralığındadır, optimum 5,5 dır [22].

Hidrojen kısmı basıncı: Standart fermentatif yoluzi teorik olarak maksimum 4 mol H₂/mol glukoz üretir. Uygulamada yaygın olarak 2,4-3,2 mol H₂/mol glukoz olarak gözlenir. Üretilen gaz H₂, CO₂, CH₄, CO ve bazı hidrojen sülfidler içerir. Bu yüzden saflaştırılması gerekir. Karanlık fermentasyon proseslerinde hidrojen kısmı basıncı önemli bir faktördür, çünkü hidrojen basıncı artıkça hidrojen üretimi azalır [6]. Hidrojen üretimindeki ana enzim hidrojenaz tersinir olarak okside olur ve ferrodoksini indirger. İndirgenmiş ferrodoksinin oksidasyonu sıvı fazdaki hidrojen derişimi arttığı zaman oluşamaz ve oksitlenmiş ferrodoksin indirgenmesi meydana gelecektir. Kısacası sıvı fazdaki hidrojen, protona okside olacak, böylece hidrojen verimi azalır [22]. Bu sınırlamaya kesin çözüm, hidrojen üretilirken uzaklaştırılmasıdır. Kısmı basıncın azaltılması için vakum uygulanması, azot ve hidrojen geçirebilen membranların kullanımı, güçlü karıştırma ve inert gazın püskürtülmesi gibi yöntemler uygulanabilmekte [31, 32].

2.4- Fotosentetik ve fermentatif bakterinin kullanıldığı hibrit sistemler

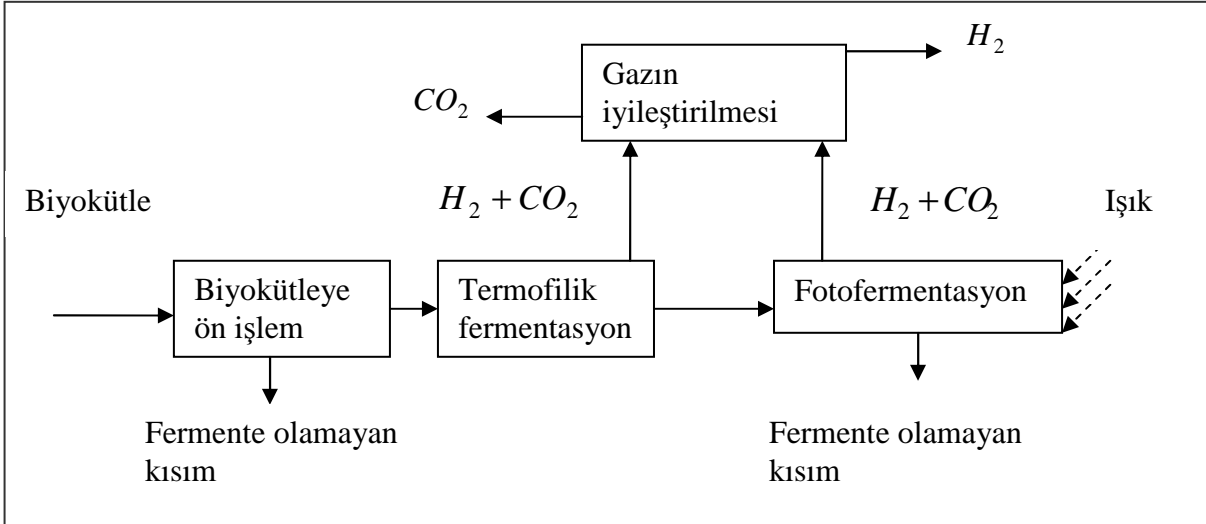
1 mol glukozun tam olarak parçalanmasında 12 mol hidrojen üretilir. Ancak glukozun hidrojen ve karbondioksit tam parçalanması mümkün değildir, çünkü bu reaksiyonun

gerçekleşmesi termodinamik olarak mümkün değildir. Dış enerji kaynağı ile (fotofermentasyonda foton-enerjisi) teorik olarak 1 mol glukoz başına 12 mol hidrojen üretebilir. Ancak bu proses ışığın yokluğunda işletilemez. Diğer taraftan dış enerjinin yokluğunda (karanlık fermentasyon durumunda) fermentatif bakteri ile 1 mol glukozun oksidasyonunda maksimum 4 mol hidrojen ve bazı yan ürünler meydana gelir. Yan ürün olarak sadece asetat meydana geldiği zaman reaksiyon (4) gibidir. Karanlık fermentasyon safhasında üretilen asetat, fotosentetik bakteri ile hidrojen üretmek için oksitlenebilir (reaksiyon 5) [2].

Bundan dolayı en yüksek verimde sürekli hidrojen üretimi, karanlık- ve fotofermentasyon metotlarının kombine edilmesi ile sağlanabilir [2]. Ekonomik biyohidrojen üretimi için 8 mol H₂/mol glukoz yeterli olacağı ifade edilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda karanlık fermentasyonla 2,5 mol H₂/mol glukoz üretilbildiği, kombine veya ard arda gelen fermentasyonlar ile bu değer 7 mol H₂/mol glukoz'a çıkabildiği ifade edilmiştir [9].

Karanlık ve fotofermentasyon kombine sistemlerinde, ilk adım karmaşık organik kaynağın asit veya enzimatik hidroliz adımı ile şekere dönüşümüdür. İkinci adım, karanlık fermentasyonda asetojenik anaerobik organizmalar ile uçucu yağ asitlerine (VFA), hidrojene ve CO₂'ye dönüşümü, en son adım ise foto heterotrofik bakteri ile bu yağ asitlerinin CO₂ ve H₂'ye daha ileri fermentasyonudur [33]. Şekil 1'de kombine sistemlerin genel akış şeması verilmiştir. Kombine sistemler hidrojen veriminin artırılmasında uygun bir strateji olarak önerilir. Su ve diğ., (2009) tarafından kombine sistemde nişastadan hidrojen üretimi değerlendirilmiştir [34]. Sukroz ve glukoz, biyohidrojen üretiminin ticarileştirilmesi için pahalı substrat olduğu düşünülür. Nişasta ise dünyada çok fazla bulunan bir organik bileşiktir, etkili düşük maliyetli substrat olarak hizmet eder. Çalışmada karanlık fermentasyon safhasında, ısı ile ön işlemden geçirilerek metanojenik aktivitesi engellenmiş anaerobik çamur, fotofermentasyon safhasında *Rhodospseudomonas palustris* kullanılmıştır. Nişasta jelatin haline getirildikten sonra ve enzimatik hidrolizden sonra kullanıldığı zaman, maksimum hidrojen verimi sırası ile 240,4 den 258,5 ve 276,1 ml H₂/g nişasta'ya artmıştır. Karanlık fermentasyondaki metabolitler (başlıca asetat ve butirat) fotofermentasyonda substrat olarak kullanılmıştır. En yüksek hidrojen verimi 131,9 ml H₂/g nişasta olmuştur. Kombine sistemde, en yüksek hidrojen verimi, sadece karanlık fermentasyonda 240,4 mlH₂/g nişasta'dan 402,3 ml H₂/g nişasta'ya artmıştır. Kombinasyon sistemlerinin ticari uygulamalar için iyi bir potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir.

Fotofermentasyonda en önemli problemler besin ihtiyacının karşılanması, çevresel şartların (T=30-35°C, pH=6,8-7,5, ışık yoğunluğu=4-6 klux) kontrolü ve yüksek VFA derişimi (>2500 mg/L) ve NH₄-N (>50 mg/L) nin sebep olduğu engelleyici etkilerdir. [33].



Şekil 1: İki safhalı hibrit sistemler [14]

Foto- ve karanlık fermentasyon teknolojileri bazı dezavantajlara sahiptir. Fotofermentasyonla H_2 üretiminde en önemli konulardan biri organik asit kaynağıdır. Saf organik asitlerin kullanımı ekonomik değildir. Diğer taraftan bu proseslerde kullanılan organik atıklar saf kimyasallar olmadığı için organik asitlere ilaveten fotobakteriler ile metabolize edilemeyen nişasta ve selüloz gibi maddeler de içerir. Bu olumsuzlukları gidermek için asidojenikler ile H_2 üretiminin geliştirildiği, metan üretiminin engellendiği ve organik asitlerin meydana geldiği anaerobik prosesler önerilmektedir. Fakat bu proseslerde teorik olarak bile 1 mol glukoz başına 4 mol den daha fazla hidrojen üretilmemektedir. Bu proseslerin olumsuzluklarını önleyecek metotlardan biri her iki prosesi tek prosese entegre etmektir, yani karanlık asidojenik fermentasyon H_2 ve organik asitler üretecek ve mor fotofermentatif bakteriler H_2 üretimi için organik asitleri kullanacak. Entegre proseslerin optimize edilmesi halinde atık arıtımı ile aynı anda yüksek H_2 çıktısı elde etmek mümkün olacaktır [35].

Srikanth ve diğ.,(2009) tarafından karanlık fermentasyon ile üretilen uçucu yağ asitlerinin (asetik asit ve bütirik asit) fotofermentasyon ile hidrojen üretiminde birincil substrat olarak uygunluğu değerlendirilmiştir [36]. Deney sonuçları göstermiştir ki asetik asitin en yüksek H_2 üretimi ve substrat parçalanması (3,51 mol /kg KOİ gün ve 1,22 kgKOİ/m³ gün), bütirik asitten (3,33 mol/kg KOİ gün ve 1,19 kgKOİ/m³ gün) yüksek olmuştur. Bunun sebebi asetik asitin basit yapısı ve kolay parçalanabilirliğidir. Karanlık ve fotofermentasyonun birlikte kullanımı substrat olarak atıksu kullanıldığı zaman ekonomik bakımdan gelecek vaad eden ideal bir yol olarak görülür.

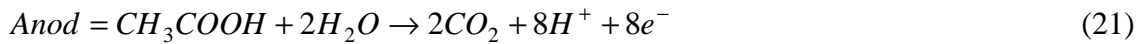
Kombine sistemlerde ilk basamak olan karanlık fermentasyon çıktısının tanımlanması, ardından gelen fotofermentatif H_2 üretim sisteminin başarısını etkilemektedir. Bu yüzden kombine sistemlerde her iki adım birlikte düşünülerek optimize edilmelidir. Belokopytov ve diğ., (2009) tarafından nişastanın fermentatif hidrojen üretiminde fotofermentatif hidrojen üretimini engelleyebilecek faktörlerin etkisi incelenmiştir [35]. Amonyum giderilmesinin ve demir iyonu ilavesinin fermentatif hidrojen üretimini artırdığı ve ardından gelen fotofermentatif hidrojen üretimi için faydalı olabileceği açıklanmıştır. 0,5 mM derişimdeki amonyum, mor bakteri ile hidrojenin fotoüretimi için uygun olabileceği ifade edilmektedir. 10 mg/L derişiminde çinko ilavesi metanojenleri engellediği, fakat fotofermentatif üretimi engellemediği gözlenmiştir.

Ardışık sistemlerden oluşan kombine hidrojen üretim sistemlerine diğer bir alternatif karanlık ve ışık fermentasyonların aynı reaktör içinde yapılan sistemlerdir (burada karanlık ve ışık fermentasyonlar aynı fermentasyon ortamında meydana gelir). Bu sistemde aynı anda VFA'nın oluşumu (karanlık fermentasyon) ve fermentasyonu (ışık fermentasyon) ile toplam fermentasyon süresinin azaltılması ve ortamda VFA birikiminin önlenmesi avantajlarına sahiptir. Böylece karanlık fermentasyon ile üretilen yüksek VFA derişimleri ile oluşan engelleyici etki giderilmiş olur. Argu ve diğ., (2009) tarafından yapılan çalışmada aynı fermantörde öğütülmüş buğday nişastasının kombine karanlık-foto fermentasyonunda hidrojen üretimi incelenmiştir [33]. Karanlık fermentasyon için ısı ile ön işlem görmüş asidojenik çamur, fotofermentasyon için *Rhodobacter sp.* karışımı kullanılmıştır. En yüksek kümülatif hidrojen oluşumu (76 ml), hidrojen verimi (176 ml H₂/g nişasta) ve oluşum hızı (12,2 ml H₂/g biyokütle saat) 1/7= karanlık/foto biokütle oranında elde edilmiştir. Foto ve karanlık fermentasyonun tek başına uygulanması durumunda elde edilen hidrojen verimleri kombine fermentasyondan biraz daha yüksek bulunmuştur. Ancak 1/7= karanlık/foto biyokütle oranında elde edilen kombine fermentasyonda elde edilen hidrojen üretim hızı foto ve karanlık fermentasyonun tek başına uygulanması durumunda elde edile hızdan (5 ml H₂/g biokütle saat) önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu kombine sistemin kullanımı hidrojen verimliliğini geliştirmesinin yanısıra fermentasyon süresini de azalttığı belirlenmiştir.

Karanlık ve fotofermentasyon birimlerinin ard arda kullanıldığı hibrit sistemler, karanlık veya foto-fermentasyon prosesinin tek olarak kullanıldığı sistemlere karşı belli avantajlara sahip. Hidrojen üretiminde karanlık fermentasyon çıktısı, foto fermentasyon için yeterli miktarda organik asit sağlar. Böylece organik asit mevcudiyeti ile oluşabilecek sınırlamalar engellenmiş olacaktır. Fotofermentatif bakteri ile organik asitlerin daha ileri kullanımı daha iyi çıkış kalitesi sağlayacaktır. Prosesin iki mikrobiyal bileşeni için ortam içeriği ve çevresel şartların uyumu sağlanarak sistem kontrol edilebilecektir. Anaerobik fermentasyon çıktısında amonyak derişimi ve C/N oranı, fotosentetik bakteri için engelleyici düzeyde olmamalıdır. Fotofermentasyondan önce, fotosentetik bakterinin uygun performans gösterebileceği pH=7 ve organik asit derişiminin düzenlenebilmesi için karanlık fermentasyon çıktılarının seyreltilmesi ve nötralizasyonu gereklidir[3].

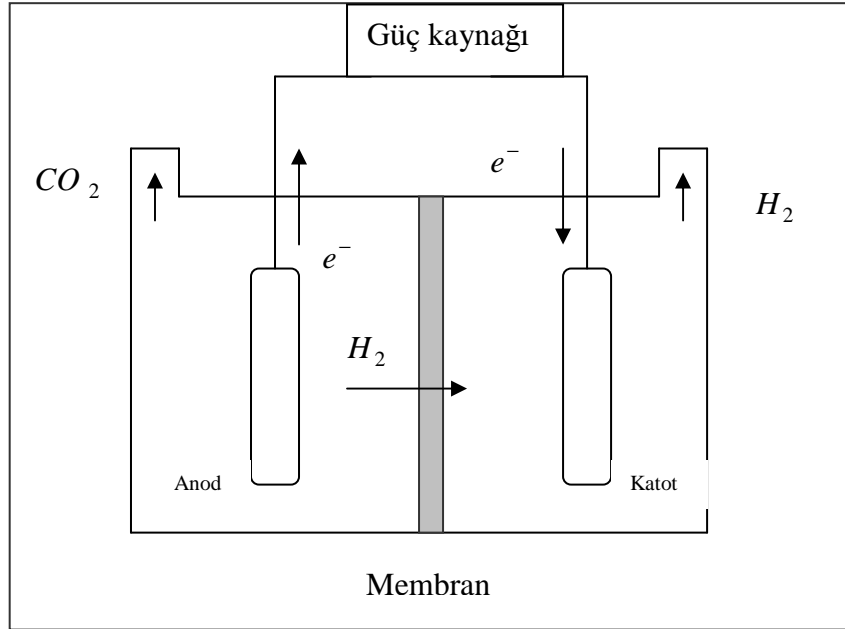
2.5- Biyokatalizlenmiş elektroliz

Hidrojen üretmek için asetatı (veya karanlık fermentasyon çıktısının) oksitlemenin diğer bir yolu, güneş enerjisi yerine elektrik enerjisi formunda dış enerjinin sağlanmasıdır. Bu yaklaşımda asetat elektroliz hücresinin anodik bölgesinde yer alır, ve bakteri ile üretilen protonlar ve elektronlar katotda toplanır (katot, hidrojen üretim reaksiyonunu katalizleyen platin elektrodudur). Anodik ve katodik reaksiyonlar reaksiyon (21) ve (22)'de verilmiştir [2].



Katotta hidrojen üretmek için yaklaşık 100mV gereklidir. 250 mV'da 1 mol asetat başına 2,9 mol H_2 üretimi (ortalama olarak %73 verim) elde edilmiştir. Benzer şekilde 500 mV'da asetat ile $53 \pm 3,5$ verim elde edilmiştir [2].

Alg ve fotosentetik bakteri sudan ototrofik olarak hidrojen gazı üretmek için gün ışığı kullanabilir, fakat verimlilikleri düşüktür. Birçok uzman bu prosesler için yüksek yüzey alanı gerektiğinden dolayı asla uygulanabilir olamayacağı görüşündedir. Glukoz gibi karbonhidratlar ve nişasta ve selüloz gibi polisakkaritler, ortalama $2,5 \pm 4,3 \text{ m}^3/\text{m}^3\text{gün}$ hızında hidrojen gazına fermente olabilirler. Fermentasyonda çözünen organik yan ürünlerin hidrojene dönüşümü endotermik reaksiyon ile olur, dış enerji girdisi olmaksızın bu moleküller hidrojene dönüşemez. Bakteri tarafından kullanılan metot ise gün ışığına bağlıdır. Yapılan çalışmalarda, mikrobiyal yakıt hücrelerini (MFC) temel alan elektroliz tipteki prosesler hidrojen gazı üretmek için kullanılabileceği ortaya çıkmıştır [37]. MFC'de, bakteri organik maddeyi okside eder, CO_2 ve protonları solusyonun içine salar ve elektronları elektroda (anoda) salar. Elektronlar anoddan katoda doğru akar, katotta elektronlar oksijenin indirgenmesinde tükenir. Katotta oksijen mevcut olduğu zaman, akım üretilebilir, fakat oksijen olmadığında, akım üretimi kendilinden oluşmaz. Bununla birlikte akım üretimi anod ve katot arasında küçük voltaj uygulanması ile (pratikte $>0,2V$) yaratılırsa, hidrojen gazı protonların indirgenmesi ile katotta üretilir. Bu proses elektrohidrojenesis veya mikrobiyal elektroliz olarak, reaktör ise mikrobiyal elektroliz hücresi (MEC) olarak adlandırılmıştır. İki bölmeli MEC'nin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir. MEC, önceden biyokatalizlenmiş elektroliz hücresi (BEC) veya biyoelektrokimyasal olarak desteklenmiş mikrobiyal reaktör (BEAMR) olarak da ifade edilmiştir. MEC hidrojen üreten bir elektroliz reaktörüdür oysa MFC elektrik üreten bir yakıt hücresidir [37, 6, 5].



Şekil 2: İki bölmeli MEC [37]

Wagner ve diğ., (2009) tarafından yapılan çalışmada domuz gübresi atıksuyunun MEC prosesinde metan ve hidrojen üretimi incelenmiştir [38]. Atıksuyun MEC sisteminde hidrojen üretilirken başarılı bir şekilde arıtıldığı ve $0,9-1,0 \text{ m}^3/\text{m}^3$ gün seviyesinde hidrojen üretildiği saptanmıştır.

2.6- Çok safhalı entegre prosesler

Ham maddeden hidrojen üretiminin artırılması için çok safhalı hidrojen üretim prosesleri düşünülmüştür. İlk olarak karanlık fermentasyonu müteakiben foto fermentasyonun olduğu iki safhalı prosesler ele alınmıştır. Üç hatta dört safhalı farklı şekillerde de olabileceği ifade edilmiştir. Bu süreçte biyokütle ilk olarak karanlık fermentasyon reaktörüne beslenir, reaktörün çıkışı yüksek organik asit içeriğinde olduğu için fotofermentasyon prosesine gönderilir. Bu proses asıl olarak kızıl ötesi ışığı kullandığı için güneş ışığı önce direkt fotoliz reaktöründen (burada görünür ışık kullanılır, fakat kızıl ötesi ışığı kullanılmaz) filtrelenir. Daha ileri safha olarak ise mikrobiyal elektroliz hücresinin kullanımı önerilmiştir [6].

Çeşitli hidrojen üretim metotları içinde karanlık fermentasyon düşük enerji gereksinimi, yüksek hidrojen verimi, organik atık maddenin kullanılabilirliği gibi sebeplerden dolayı en çok tercih edilendir. Ancak elde edilen çıktı metan üretimi için uygun bir substrat olan yüksek VFA'lar içeriyor olması bir dezavantaj oluşturur. Bunu önlemek için önerilen iki safhalı anaerobik sistem, fermentatif hidrojen üretimi ve metan fermentasyonundan oluşur [30, 39, 40]. Hidrojen ve metan üretimi ayrı reaktörlerde gerçekleşir. Böyle sistemlerde ilk safhada yavaş büyüyen asidojenler ve hidrojen üreten organizmalar bulunur. Burada VFA'lar ve hidrojen üretilir. İkinci safhada yavaş büyüyen asetojenler ve metanojenler bulunur, bu safhada VFA'lar metan ve CO₂ ye dönüşür. Wang ve Zhao, (2009) tarafından besin atıklarının iki safhalı anaerobik arıtımı incelenmiştir [41]. En uygun şartlar altında en yüksek H₂ ve CH₄ verimleri sırası ile 0,065 ve 0,546 m³/kg uçucu katı gün olmuştur. Teorik en yüksek verimleri ise 0,118±0,001 ve 0,611±0,015 m³/kg uçucu katı olmuştur. Biyoparçalanabilirlik analizleri ise giren KOİ'nin %5,78'inin ilk safhada hidrojene dönüştüğü, ikinci safhada ise giren KOİ'nin %82,18'inin metana dönüştüğü bulunmuştur.

Sonuç

Biyohidrojen üretimi konusunda yapılan çalışmalar farklı işletme şartlarında (reaktör tipi, çevresel şartlar, kullanılan substrat vb.) yapıldığı için elde edilen sonuçların karşılaştırılması güçtür. Tablo 1'de farklı biyohidrojen yöntemlerinin hidrojen üretim, hızları avantaj ve dezavantajları ile birlikte sunulmuştur.

Pratikte etkili ve ekonomik olarak uygun bir hidrojen üretim prosesinin işletilmesi son derece önemli bir konudur. Bu yönde çeşitli stratejiler açıklanmıştır. Organik substratların karanlık fermentatif dönüşümü ile veya foto-biyolojik prosesle H₂ üretimi iki işlevinden (substrat giderimi ve H₂ üretimi) dolayı çok önemlidir. Fermentasyonla H₂ üretimi metabolik ürün olarak organik asit oluşumu ile birlikte görülür, ancak bu mikroorganizmalar asitleri parçalayamaz. Bu eriyen asit metabolitlerinin oluşumu ve birikimi sistemde pH'ın aşırı düşmesine sebep olur ve H₂ üretim prosesini engeller. Asidofilik şartlar metanojenik prosesi baskılar ve organik kaynaklardan H₂ formunda enerji dönüşümü sadece %15 seviyelerinde kalır. Atıksuda kullanılmayan karbon kaynağının ilave hidrojen üretimi için kullanımı, prosesin pratik uygulanabilirliğini destekleyecektir [36].

Biyolojik yöntemler içinde karanlık fermentasyon, yenilenebilir hidrojen üretiminde etkili bir yoldur. Bunun birkaç sebebi vardır. İlk substrat olarak kolaylıkla bulunabilen

atığı kullanıyor olmasıdır. Gerekli reaktörün tasarımı basittir ve çok iyi bilinen anaerobik arıtımı temel alan bir teknolojiyi kullanır. Bu prosesin en uygun şartlarda işletimi için biyoproses parametrelerinin analizi yapılmalı, rekabet edici reaksiyonlar önlenmeli, H_2 kısmı basıncı azaltılmalı ve termofilik türlerin kullanımı teşvik edilmelidir. Fermentatif parçalanmada substrat dönüşümünü tamamlamak için ikinci safha olarak uygulanabilecek prosesler önerilmiştir, bunlar metan fermentasyonu, fotofermentasyon ve MEC'dır[42].

Tablo 1: Biyohidrojen üretim proseslerinin karşılaştırılması [5, 6]

Proses	Avantajları	Dezavantajları	H_2 üretim hızı (mmol/L saat)
Direkt biyofotoliz	Su ve güneş ışığından direkt olarak H_2 üretilebilir, güneş enerjisi dönüşümü oldukça yüksektir.	Yüksek ışık yoğunluğu gerekli, O_2 sistem için zararlı, düşük fotokimyasal verimlilik elde edilir.	0,07
İndirekt biyofotoliz	Cyanobacteria sudan H_2 üretebilir, nitrojenaz enzimi H_2 üreten ana enzimdir	H_2 parçalanmasını durdurmak için hidrojeni uzaklaştıran hidrojenaz enzimi giderilmelidir.	0,355
Foto-fermentasyon	Farklı atık madde ve geniş spektrumdaki ışık kullanılabilir	O_2 nitrojenaz üzerinde inhibitör etki yaratır. Işık dönüşüm verimliliği çok düşüktür, sadece %1-5	0,16
Karanlık fermentasyon	Işık olmaksızın tüm gün boyunca H_2 üretilebilir. Farklı karbon kaynakları substrat olarak kullanılabilir, yan ürün olarak değerli metabolitler üretir, anaerobik prosesdir, bu yüzden oksijenin sınırlanması problemi yoktur.	Fermentör çıkışının daha ileri arıtımına ihtiyaç vardır. O_2 , hidrojenaz için kuvvetli bir engelleyicidir. Üretilen gaz karışımı CO_2 içerir, özel ayırma teknikleri ile ayrılması gerekir	8,2-121

Biyolojik hidrojen üretim prosesleri düşük verim ve üretim hızlarına sahip oluşu, bu proseslerin pratik uygulamalarında büyük bir engel oluşturmaktadır. Substrattaki karbon ve protonun üçte ikisi diğer ürünlere dönüşür. Hidrojen üretim hızı ve verimini artırmak için birkaç yaklaşım önerilmiştir. Bu yaklaşımlardan ilki geleneksel üretim tekniklerinde biohidrojen üretiminin artırılması olarak ele alınmıştır. Bu kapsamda reaktörün tipi ve mikrobiyal kültür seçimi, mevcut metabolik yolizinde değişikliklerin sağlanması ele alınmıştır. İkinci yaklaşımda ise substrat dönüşümünün tamamlanması düşünülmektedir. Pratik biohidrojen fermentasyon prosesi ya stokiyometrik dönüşümü sağlayacak ilave yolizlerinin girişimi ile yada iki safhalı sistemlerin geliştirilmesi ile sağlanabilecektir [43].

Hidrojen üreten bakterinin üretilmesi üzerine yeni tekniklerin gelişiyor olması, olağan dışı mikroorganizma ve enzim türleri üzerine çalışmaların yoğunlaşmış olması ve modern biyoteknoloji ile hidrojen üretim verimliliğinin artırılması hidrojen enerjisinin geleceği açısından ümit verici yeniliklerdir [23]. Biyolojik hidrojen üretim proseslerinin geniş aralıkta yenilenebilir substart kaynakları kullanılarak yüksek hidrojen verimliliğinde işletilmesi ile büyük ölçekte uygulanabilirliği artacaktır [44].

Hidrojen yenilenebilir biyokütleden üretilmesi durumunda yenilenebilir temiz enerji taşıyıcısı olarak kabul edilir. Bu kapsamda özellikle tarımsal atıklar, evsel ve evsel nitelikli endüstriyel atıklar öncelikle düşünülmelidir. Gıda işleme proseslerinden

kaynaklanan atıklar, yüksek karbonhidrat, protein ve lipit içeriğinde dolayı alternatif enerji üretimi için büyük potansiyele sahiptir. Bununla birlikte gıda işleme atıklarının etkili kullanımı için atığın ana bileşenlerinin dikkatli analizi ve olası dönüşüm proseslerinin (termal, kimyasal ve biyolojik enerji prosesleri) ekonomik analizi yapılmalıdır. Örneğin süt işleme atıkları hem laktik asit ve propiyonik asit gibi değerli kimyasalların üretiminde kullanılabilir, hem de etanol, metan veya hidrojen üretiminde de kullanılabilir. Atıklar için dönüşüm prosesi tasarlanacağı zaman tüm olası problemler ve oluşabilecek ilave maliyetler göz önünde bulundurulmalıdır. Ekonomik ve çevresel faydalar sağlayan prosesi seçmek için, proses tasarımında ekonomik analizler yapılmalıdır. Enerji dönüşüm metodu belirleneceği zaman, atığın potansiyelini optimize etmek için farklı enerji formları arasında en iyi seçenek analiz edilmelidir. Yüksek protein ve/veya yağ asiti içeren atıklar ile hidrojen fermentasyonu ve gazlaştırma metotları, etanol ve metan üretiminden daha uygun olacaktır. Enerji üretim verimliliğini en yükseğe çıkarmak ve potansiyel problemleri en aza indirmek için farklı proseslerin bileşimi düşünülebilir [45].

Kaynaklar

- [1] Das, D. ve Veziroğlu, T.N., Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, **International Journal of Hydrogen Energy**, 26, 13-28, (2001).
- [2] Manish, S. ve Banerjee, R., Comparison of biohydrogen production processes, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 279-286, (2008).
- [3] Kapdan, İ.K. ve Kargı, F., Bio-hydrogen production from waste materials, **Enzyme and Microbial Technology**, 38, 569-582, (2006).
- [4] Benemann, J.R., Hydrogen production by microalgae, **Journal of Applied Phycology**, 12, 291-300, (2000).
- [5] Das, D. ve Veziroğlu, T.N., Advances in biological hydrogen production processes, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 6046-6057, (2008).
- [6] Holladay, J. D., Hu, J., King, D. L. ve Wang, Y., An overview of hydrogen production Technologies, **Catalysis Today**, 139, 244-260, (2009).
- [7] Melnicki, M. R., Bianchi, L., Philippis, R. D. ve Melis, A., Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria, **International Journal of Hydrogen Energy**, 2008, 33, 6525-6534, (2008).
- [8] Basak, N. ve Das, D., Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: A case study, **Biomass and Bioenergy**, 33, 911-919 (2009).
- [9] Kapdan, İ. K., Kargı, F., Öztekin, R. ve Argun, H., Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter sp.*, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 2201-2207, (2009).

- [10] Uyar, B., Eroğlu, İ. ve Yücel, M., Gündüz, U., Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 4517-4523, (2009).
- [11] Nath, K. ve Das, D., Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process, **International Journal of Hydrogen Energy**, 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.11.065
- [12] Obeid, J., Magnin, J. P., Flaus, J. M., Adrot, O., Willison, J. C. ve Zlatev, R., Modelling of hydrogen production in batch cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 180-185, (2009).
- [13] Li, J., Zheng, G., He, J., Chang, S. ve Qin, Z., Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor, **Biotechnology Advances**, 27, 573-577, (2009).
- [14] Urbaniec, K. ve Grabarczyk, R., Raw materials for fermentative hydrogen production, **Journal of Cleaner Production**, 17, 959-962, (2009).
- [15] Davila-Vazquez, G., Alatrisme-Mondragon, F., de Leon-Rodriguez, A. ve Razo-Flores, E, 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, (2008).
- [16] Chen, W.H., Sung, S. ve Chen, S.Y., Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effect, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 227-234, (2009).
- [17] Argun, H., Kargi, F. ve Kapdan, İ.K., Öztekin, R, Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 6109-6115, (2008).
- [18] Lin, C.Y., Chang, C.C. ve Hung, C.H., Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed culture, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 2445-2453, (2008).
- [19] Lin, C.Y. ve Hung, W.C., Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 3660-3667, (2008).
- [20] Magnusson, L., Islam, R., Sparling, R., Levin, D. ve Çiçek, N., Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 5398-5403, (2008).
- [21] Wang, J. ve Wan, W., Factors influencing fermentative hydrogen production: A review, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 799-811, (2009).

- [22] Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y. ve Hassan, M.A., Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation, **International Journal of Hydrogen Energy**,34, 3277-3287, (2009).
- [23] Liu, X., Ren, N., Song, F., Yang, C. ve Wang, A., Recent advances in fermentative biohydrogen production, **Progress in Natural Science**,18, 253-258, (2008).
- [24] Yuan, Z., Yang, H., Zhi, X. ve Shen J., Enhancement effect of L-cysteine on dark fermentative hydrogen production, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 6535-6540, (2008).
- [25] Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., Leon-Rodriguez, A. ve Roza-Flores, E., Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 4296-4304, (2009).
- [26] Krupp, M. ve Widmann, R., Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 4509-4516, (2009).
- [27] Babu, V. L., Mohan, S. V. ve Sarma, P. N., Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 3305-3312, (2009).
- [28] Wang, B., Wan, W. ve Wang J, Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures, **Bioresource Technology**, 100, 1211-1213, (2009).
- [29] Kim, D. H., Kim, S. H. ve Shin, H. S., Sodium inhibition of fermentative hydrogen production, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 3295-3304, (2009).
- [30] Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Premier, G.C. ve Hawkes, D.L., Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously, **Biotechnology and Bioengineering**, 97, 759-770, (2007).
- [31] Li, C. ve Fang, H.H.P., Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 37, 1-39, (2007).
- [32] Kraemer, J.T. ve Bagley, D.M., Improving the yield from fermentative hydrogen production, **Biotechnology Letters**, 29, 685-695, (2007).
- [33] Argun, H., Kargı, F. ve Kapdan İ.K., Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 4305-4311, (2009).

- [34] Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. ve Cen, K., Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 1780-1786, (2009).
- [35] Belokopytov, B.F., Laurinavichius, K.S., Laurinavichene, T.V., Ghirardi, M.L., Seibert, M. ve Tsygankov, A.A., Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 2. Optimization of starch-dependent fermentative hydrogen production, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 3324-3332, (2009).
- [36] Srikanth, S., Mohan, S.V., Devi, M.P., Peri, D. ve Sarma, P.N., Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process optimization and combined performance evaluation, **International Journal of Hydrogen Energy**, 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.05.095.
- [37] Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V.M., Sleutels, T.H.J.A., Jeremiasse, A.W. ve Rozendal, R.A., Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter, **Environmental Science and Technology**, 42, 8630-8640, (2008).
- [38] Wagner, R.C., Regan, J.M., Oh, S.E., Zuo, Y. ve Logan, B.E., Hydrogen and methane production from swine wastewater using microbial electrolysis cells, **Water Research**, 43, 1480-1488, (2009).
- [39] Chu, C.F., Li, Y.Y., Xu, K.Q., Ebie, Y. ve Inamori, Y., A pH- and temperature-phase two-stage process for hydrogen and methane production from food waste, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 4739-4746, (2008).
- [40] Xie, B., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. ve Cen, K., Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency, **International Journal of Hydrogen Energy**, 33, 5006-50011, (2008).
- [41] Wang, X. ve Zhao, Y., A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process, **International Journal of Hydrogen Energy**, 34, 245-254, (2009).
- [42] Hallenbeck, P.C., Fermentative hydrogen production: Principles, progress and prognosis, **International Journal of Hydrogen Energy**, 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.12.080
- [43] Hallenbeck, P.C. ve Ghosh, D., Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?, **Trends in Biotechnology**, 27, 5, 287-297, (2009).
- [44] Mathews, J. ve Wang, G., Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production, **International Journal of Hydrogen Energy**, 2009, doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.05.078
- [45] Digman, B. ve Kim, D.S., Review: Alternative energy from food processing wastes, **Environmental Progress**, 27, 524-537, (2008).