



## Fermentatif biyohidrojen üretim proseslerinde hidrojen veriminin geliştirilmesindeki yaklaşımlar

**Nevim GENÇ**

*Kocaeli Üniv., Müh. Fa., Çevre Müh. Böl., İZMİT*

### ÖZET

Biyohidrojen üretim proseslerinin ticarileştirilmesindeki en önemli kısıtlama, düşük hidrojen verimi ve üretim hızıdır. Bu engelleri gidermek için, mikrobiyal topluluğun geliştirilmesi, mikroorganizmaların genetik değişikliği, metabolik yolizi mühendisliği (rekabet edici reaksiyonların elenmesi), biyoreaktör tasarımının geliştirilmesi (organizma tipi, pH, substrat yüklemesi, reaktör tipi, substrat tipi gibi biyoproses parametrelerinin optimizasyonu), H<sub>2</sub> kısmı basıncının ayarlanması gibi biyohidrojen üretim proseslerinin farklı alanlarında ilerlemeler elde edilmiştir. Bu derleme yazı fermentasyonla hidrojen veriminin geliştirilmesinde bu yaklaşımlardaki ilerlemeleri tanımlar.

### Anahtar Kelimeler

Biyohidrojen,  
Biyoreaktör,  
Biyokimyasal yollizleri, Hidrojen  
üreten enzimler, Hidrojen kısmı  
basıncı, Karanlık fermentasyon

## Approaches towards Improvement of Hydrogen Yield in Fermentative Biohydrogen Production Processes

### ABSTRACT

Major constraints to the commercialization of biohydrogen production processes include lower hydrogen yields and rates of hydrogen production. To overcome these drawbacks, advances in different areas of biohydrogen production processes have been carried out, which are development of microbial consortium, genetic modification of the microorganisms, metabolic pathway engineering (elimination of competing reactions), the improvement of the bioreactor design (optimization of bioprocess parameters such as type of organism, pH, substrate loading, type of reactor, type of substrate), H<sub>2</sub> partial pressure, etc. This review describes advances in these approach towards improvement of hydrogen yield by fermentation.

### Keywords

Biohydrogen,  
Bioreactor,  
Biochemical pathways,  
Hydrogen-producing enzymes  
Hydrogen partial pressure,  
Dark fermentation,

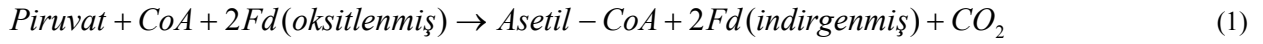
\* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-posta: [ngenc@kocaeli.edu.tr](mailto:ngenc@kocaeli.edu.tr)

## 1. GİRİŞ

Biyohidrojen çok yüksek enerji içeriğine (143 GJ/ton) sahip olup, elektrik üretimi için geleneksel yakıt hücrelerinde kullanıldığında sadece suyun meydana geldiği temiz enerjidir. Ayrıca, biyohidrojen düşük çözünürlüğe sahip bir gazdır, kolaylıkla sudan ayrılır, saflaştırılır ve enerji taşıyıcısı olarak kullanılır. Biyohidrojen üretiminde kullanılan bir yaklaşım biyokütlenin (karbonhidratlar, atıksular, yan ürün olarak oluşan atıklar) fermentasyonudur, bu biyokimyasal yol karanlık fermentasyon veya fermentatif hidrojen üretimi olarak bilinir [1].

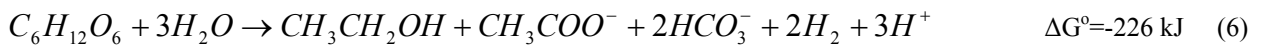
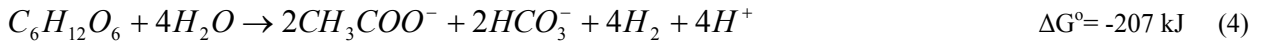
Karanlık hidrojen fermentasyonu genellikle anoksik veya anaerobik şartlar altında (elektron alıcısı olarak oksijenin olmadığı ortam) meydana gelen bir olaydır. Bakteri organik substrat üzerinde büyürken (heterotrofik büyüme), bu substratlar büyüme için

yapı taşlarını temin etmek ve metabolik enerji sağlamak için oksidasyon ile parçalanırlar. Bu oksidasyon sonucu elektronlar üretilir. Elektriksel nötralliteyi korumak için bu elektronların bertaraf edilmesi gerekir. Aerobik veya oksik ortamlarda, oksijen indirgenerek suyu oluşturur. Anaerobik veya anoksik ortamlarda, proton gibi bileşikler elektron alıcısı olarak davranır ve moleküler hidrojene indirgenir. Glukozun hidrojene fermentasyonunda, glukoz katabolizmasının bir ürünü olan piruvat, asetil-CoA'ya oksitlenir (reaksiyon 1). Asetil-CoA asetil fosfata dönüşebilir ve ATP üretilir. Asetil-CoA, son olarak asetat, bütirat, etanol gibi metabolitlere dönüşür. Piruvatın asetil-CoA'ya oksidasyonu ferrodoksini (Fd) indirger. İndirgenmiş Fd hidrojenaz ile okside olarak oksitlenmiş Fd'yi üretir ve moleküler hidrojen olarak elektronlar salınır (reaksiyon 2) [2].



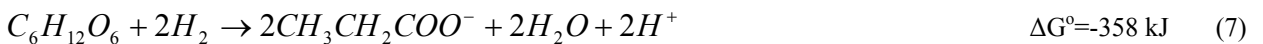
Teorik olarak 1 mol glukozdan 12 mol hidrojen üretilebilir (reaksiyon 3). 3,4,5,6 reaksiyonların standart Gibbs serbest enerjileri değerlendirildiğinde reaksiyon 3'ün termodinamik olarak uygun olmadığı görülür [3, 4, 5]. Glukozdan 4,5,6 olası fermentatif

hidrojen üretim reaksiyonları, 4 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz üretim hızı ile en çok arzu edilen son ürünün asetat olduğunu göstermektedir. Teorik olarak KOİ'nin %33'ü glukozdan hidrojene dönüşür, enerjinin kalan kısmı ise asetata dönüşür [6].



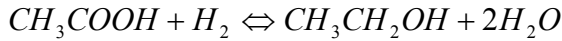
Organik maddelerden fermentatif hidrojen üretiminde ana metabolitler asetat ve bütirat olduğu halde, bütirat daha baskındır, çünkü Gibbs serbest enerji değeri düşüktür [7].

Önceki reaksiyonların aksine, propiyonatın üretimi (reaksiyon 7) hidrojen üretimini düşürür. *Clostridium acetivum* gibi homoasetojenlerin aktivitesi ile hidrojen (reaksiyon 8) veya glukoz (reaksiyon 9) tüketimi meydana gelebilir.



Pratikte ana ürün olarak bütirathı fermentasyon etkili hidrojen üretim yolizi olduğu düşünülür. Uçucu yağ asitleri (VFAs) asidojenik bakterilerin tek ürünü değildir, etanol veya bütanol gibi endüstriyel solventlerin üretimi için de çok önemli organizmalardır. Hidrojen/VFA'nın üretim eğilimi, alkollerin üretimi ile ters orantılıdır, hidrojen/VFA üretimi yükseldikçe, alkol üretimi düşmektedir [6].

Gerçek verimler teorik olarak mümkün olan 4 mol H<sub>2</sub>/ mol hekzos' den daha düşüktür, tipik olarak <1-2,5 mol H<sub>2</sub>/mol hekzos. Bütirik asit ana fermentasyon ürünü olarak üretildiği zaman sadece 2 mol H<sub>2</sub> üretilebilir. Hidrojen verimi, fermentasyon ürünü olarak laktik asit, propiyonik asit ve etanol gibi indirgenmiş organik bileşikler üretildiği zaman çok düşüktür, çünkü bunlar, karbonhidrat fermentasyonlarında ana hidrojen üretim reaksiyonlarını dışında gerçekleşen metabolik yozizlerinin en son ürünleridir [8].



(10)

#### Fermentatif H<sub>2</sub> üretimini etkileyen faktörler

**Saf ve karışık kültür:** Hidrojen üreten mikroorganizmalar dört ana grupta toplanır [9]:

1. Sitokrom sistemi içermeyen zorunlu anaerobik heterotroflar (*clostridia*, *micrococci*, *methanobacteria* vb).
2. Sitokrom içeren heterotrofik fakültatif anaeroblar, hidrojen üretmek için formatı parçalar.
3. Sitokrom sistemli gruptaki tek zorunlu anaerob *Desulfovibrio desulfuricans*
4. İndirgenmiş NADH'den H<sub>2</sub> geliştiren fotosentetik bakteriler

Fermentatif biyohidrojen üretiminde saf veya karışık kültür kullanılabilir. Saf kültürde, mikrobiyal hücrelerin büyük agregatları (kümeleri) olan flok veya granülleri oluşturma yeteneği ender bir özelliktir, fakat karışık kültürler için bu durum seçici bir özelliktir. Kullanılan kültürün bu özelliği, mikroorganizmaların sistemde etkin olarak tutunabilmesinde önemlidir. Karışık kültür kullanılmasının çok sayıda potansiyel avantajları vardır. Endüstriyel hidrojen fermentasyonları, sadece çok az ön arıtım ile, kolaylıkla elde edilebilen karmaşık yapıdaki hammaddelerin kullanıldığı steril olmayan şartlar altında yapılması gerekmektedir. Karışık mikrobiyal topluluk, steril olmayan şartlarda büyüdüğü için bu amaç için uygundur. Ayrıca hidrolizle ilgili birtakım aktivitelerde bulunabilirler

Başarılı biyolojik hidrojen üretimi için, homoasetojenler ve metanojenler gibi hidrojen kullanan mikroorganizmaların aktivitelerinin engellenmesi gerekir. Engelleme genellikle aşımın ısı arıtımı ile spor oluşturan fermente edici bakterinin dışındaki tüm mikroorganizmaların öldürülmesi ile başarılmıştır. Diğer bir metot ise yüksek seyrelme hızlarında veya düşük pH'da reaktörlerin işletilmesini kapsar. Hidrojen üretimini artırmak için işletme çevresel şartların optimize edilmesinde önemli çabalar gösterilmiştir. Örneğin propiyonik asit üreten bakteri (reaksiyon 7), etanol üreten bakteri (reaksiyon 10) ve homoasetojenler (reaksiyon 8) ile hidrojen tüketiminin önlenmesi ve indirgeyici eşdeğerlerin hidrojenazlar ile protonların indirgenmesine doğru yönlendirilmesi önemli çabalardır. Düşük hidrojen kısmı basıncında biyoreaktörün işletimi, her iki çabayı da başarıya ulaştırdığı görülmüştür [8].

ve çevre şartlarındaki değişimlere karşı potansiyel olarak çok dayanıklıdır. Bu avantajlarına karşın, karışık mikrobiyal topluluğun kompozisyonu zamana karşı değişerek hidrojen verimi ve üretim hızında düşmeye neden olur [10, 11].

Saf kültürlerin kullanılması ile yüksek hidrojen verimleri elde etmek mümkün olduğu halde, endüstriyel uygulamalar için uygun değildir, çünkü saf kültür çeşitli hidrojen kullanıcıları tarafından (metanojenler veya sülfat indirgeyen bakteriler) kolaylıkla bulaşarak kirlenebilir. Ayrıca steril ve anaerobik şartlar denemeler boyunca korunmalıdır, ancak bu durumu büyük endüstriyel ölçelerde sağlamak güçtür. Bunun yanında saf türler ile birlikte, pahalı indirgeyici araçlar kullanmak gerekebilir [11]. *Clostridium* sp., *Enterobacter* sp., *Rhodospseudomonas* sp., *Citrobacter* sp., *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gibi mikroorganizmalar üzerine çeşitli araştırmalar mevcuttur. *Clostridium* sp. ve *Enterobacter* sp. etkili hidrojen üreticileridir. *Enterobacter* sp.'nin önemli avantajı oksijene gösterdikleri dirençtir. *Clostridium* sp. ise oksijene aşırı derecede hassasiyet gösterir, bu durum ciddi işletme problemlerine sebep olabilir (havadan bulaşma yolu ile). Bununla birlikte, *Clostridia*, *Enterobacter* sp.'dan önemli ölçüde yüksek hidrojen verimine sahiptir (iki katından daha çok), ayrıca nütrient yokluğu sıcaklık artışı gibi uygun olmayan çevresel şartlarda spor biçimini alabilirler [6].

Hallenbeck ve diğ., [11] tarafından yapılan çalışmada saf kültürün kullanıldığı büyük ölçekli hidrojen üretiminin ekonomik olarak uygun olmadığı görülmüştür. Bu sorunu gidermek için iki saf kültürün birlikte kullanımı önerilmiştir. *Enterobacter aerogenes*'in *Clostridium butyricum* ile birlikte kullanıldığı (indirgeyici madde ilavesi yapılmadan) fakültatif anaerobik karışık kültür kullanılarak elde edilen hidrojen verimi, indirgeyici ajan ile birlikte *C. butyricum*'nun tek başına kullanıldığı sistem ile kıyaslandığı zaman karışık kültürün hidrojen üretiminde yaklaşık %50'lik artış elde edildiği saptanmıştır. İki türün birlikte kullanımı hidrojen üretimini artırması yanında pahalı indirgeyici madde kullanımını da gidermiş olur. Üç farklı bakteri içeren karışık kültür kullanılarak arıtma çamurundan hidrojen üretiminin incelendiği çalışma sonuçları saf kültür kullanılarak elde edilen maksimum H<sub>2</sub> veriminden yaklaşık %25 daha yüksek verim elde edildiğini göstermiştir [12].

**Hidrolik alıkonma süresi (HRT) ve organik yükleme hızı (OLR):** HRT, sürekli sistemde işletilen reaktörlerde hidrojen üretim hızını/ verimini potansiyel olarak etkileyen bir faktördür. Ayrıca, HRT substratın fermentasyonu sırasında ürün bileşimini de etkilediği görülmüştür. En uygun HRT, çeşitli faktörlere (reaktör şekli, kullanılan substrat ve belirli mikroorganizma veya mikrobiyal topluluklar) bağlı olarak her bir sistemin belirli bir özelliğidir. Uygun aralıkta HRT artışı bakterilerin hidrojen üretim yeteneğini artırır, fakat çok yüksek seviyelerdeki HRT azaltır [11, 13]. Wongtanet ve diğ., [14] tarafından yapılan çalışmada, sürekli karıştırmalı tank reaktöründe (CSTR) anaerobik karışık kültürde, 35°C'de ve pH 5,5'de HRT'nin 3 günden 1 güne azalması hidrojen verimini 0,66'dan 1,24 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz'a artırmıştır.

Hidrojen üretim hızı, OLR ve HRT gibi parametrelerin uygun seçilmesi ile geliştirilebilir. Özellikle kısa HRT ve yüksek OLR, hacimsel hidrojen üretim hızını artırdığı kabul edilir. Fermentasyon prosesinin ölçek büyütülmesi aşamasında, kabul edilebilir orandan yüksek OLR, reaktör boyutunu azaltmak için arzu edilir, fakat hidrojen molar verimi ile reaktör boyutu arasındaki denge durumu da önemlidir. Davila-Vazquez ve diğ., [1] tarafından sürekli sistemde peynir altı suyu ile yapılan biohidrojen üretiminde HRT ve OLR'nin etkinliği araştırılmıştır. En yüksek hacimsel hidrojen üretim hızı (46,61 mmol H<sub>2</sub>/L saat), 6 saat HRT'de 138,6 g laktoz/L gün OLR'de bulunmuştur. Termofilik şartlarda yapılan benzer bir çalışmada, HRT 1 gün olarak alındığı zaman, farklı OLR'de (g

KOİ/L gün)(47; 35; 21) hidrojen üretim hızının (sırası ile 3; 9; 6 mmol H<sub>2</sub>/g KOİ) istatistiksel olarak önemli bir değişim yaratmadığı saptanmıştır. 40 g KOİ/L gün sabit OLR'de farklı HRT'de (gün) (3,5; 2; 1) hidrojen üretim hızı 22; 15 ve 5 mmol H<sub>2</sub>/g KOİ olarak belirlenmiştir [15].

Sürekli biyohidrojen üretim çalışmalarında hidrojen üretim hızı artışının yanı sıra biyogazın hidrojen içeriği de önemlidir. Yapılan çalışmalarda, gaz miktarının farklı OLR'ler ile değiştiği, gazdaki hidrojen derişiminin %44-52 gibi yüksek seviyelerde dengede kaldığı saptanmıştır [16].

**Substrat:** Fermentatif hidrojen üretiminin sürdürülebilirliği kullanılan substrata bağlıdır. Substratın fiziksel-kimyasal özellikleri prosesin tüm verimliliğini kuvvetli biçimde belirler. Sürdürülebilir biyohidrojen üretimi için hammadde, yüksek karbonhidrat içeriği, çok düşük miktarda ön arıtım gereksinimi, fermentatif dönüşüm ve enerji geri kazanımına uygun yeterli bir derişim, kaynağın sürdürülebilirliği ve düşük maliyet ölçütlerini sağlamalıdır.

İşletme açısından yüksek substrat derişimleri tercih edilmektedir, çünkü potansiyel olarak yüksek hacimsel üretim hızına sebep olurlar [17]. Genel olarak, atığın biyolojik parçalanabilirliği, hidrojen üretiminin ana kaynağı olan karbonhidrat içeriğine bağlıdır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki karbonhidratça zengin atığın hidrojen üretim potansiyeli, yağ veya proteince zengin atığına göre 20 kat büyüktür [6].

Kullanılabilecek substratlar dört ana grupta sınıflandırılır [6]: Saf substratlar (katabolik yollarla tanımlanmış oldukları için temel deneysel çalışmalar için uygundur, ancak yüksek maliyetinden dolayı endüstriyel ölçekte kullanım için uygun değildir); enerji bitkileri (birim alan başına yüksek verim, yüksek şeker içeriği, düşük lignin içeriği ve toprak işleminin kolay olması istenir); katı atıklar (kentsel atıklar ve besin işleyen endüstriden kaynaklanan atıklar bu grup içinde değerlendirilir); endüstriyel atıksular (yüksek derişimde organik bileşikler (KOİ) içeren atıksular uygundur), yüksek oranda kolaylıkla parçalanabilen bileşikler (karbonhidratlar), yüksek sıcaklık). Nişasta ve selüloz içeren atıklar, gıda endüstrisi atıkları ve arıtma çamurları bu amaç için kullanılabilen atıklardır. Karmaşık yapıdaki substratlardan elde edilen özgül hidrojen verimleri saf substratlardan daha düşüktür, ancak ekonomik açıdan bakıldığında çok sürdürülebilirdir [6,18].

**Nütrient:** Azot hidrojen üreten bakterinin büyümesi için ana nütrientlerden biridir. Bu yüzden uygun azot seviyesi sağlanmalıdır. Bu amaçla en çok kullanılan azot kaynağı amonyak azotudur. Fosfat nütrient değerinin yanı sıra tamponlama kapasitesinden dolayı da hidrojen üretimi için gereklidir. Fosfat derişiminin artması ile hidrojen üretimi artar ancak yüksek seviyelerde azalacaktır [13]. Optimum N, P, C/N, C/P oranları üzerine anlaşma sağlanamamıştır, bu ise kullanılan deneysel şartlardan ileri gelmektedir.

**Metal iyonu:** Metal iyonunun yüksek derişimleri hidrojen üreten bakteri aktivitesini engelleyebilir, iz seviyedeki metal iyonları ise fermentatif hidrojen üretimi için gereklidir. Fe<sup>+2</sup>, hidrojenaz için ana iyon olduğu için önemlidir. Ağır metallerin zehirliliği de hidrojen üretim sistemlerinde dikkate alınmalıdır. Yapılan çalışmalarda bazı metallerin zehirlilik seviyeleri Cu>Ni-Zn>Cr>Cd>Pb düzeninde verilmiştir [13].

Mineral tuz içeriği de hidrojen üretimini etkiler. Uygun içerik ile elde edilen hacimsel hidrojen üretim hızı (VHPR), geleneksel asidojenik nütrient formülasyonu ile elde edilen değerden % 66 daha yüksektir. Demirin yanı sıra magnezyum, sodyum ve çinko ve bakteriyal enzim kofaktörleri, taşınım prosesleri ve dehidrojenaz için gerekli oldukları için VHPR'yi etkileyen önemli iz metallerdir [19].

**Sıcaklık:** Uygun aralıktaki sıcaklık artışı, hidrojen üreten bakterilerinin aktivitesini artırır, fakat yüksek sıcaklıklarda azaltır. Yapılan çalışmalar uygun sıcaklığın her zaman aynı olmadığını göstermiştir [13].

VHPR üzerine sıcaklığın etkisi, glukozun asetata dönüşümünün Gibbs serbest enerjisindeki ve standart entalpisindeki değişim ve teorik verim göz önünde bulundurulması ile termodinamik olarak açıklanabilir. Asetat oluşum reaksiyonunun (reaksiyon 4) Gibbs serbest enerjisi ( $\Delta G^{\circ} = -207$  kJ/mol) ve entalpisindeki değişim ( $\Delta H^{\circ} = +90,69$  kJ/mol), reaksiyonun kendiliğinden meydana gelebileceğini ve reaksiyonun endotermik olduğunu gösterir. Van't Hoff denklemi denge sabiti üzerine sıcaklığın etkisini açıklamada kullanılabilir (denklem 11)[19].

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = -\frac{\Delta H^{\circ}}{R} \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (11)$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{[H_2]_1^4 [CO_2]_1^2 [CH_3COOH]_1^2}{[H_2]_2^4 [CO_2]_2^2 [CH_3COOH]_2^2} \quad (12)$$

Sıcaklık artarsa, denge kinetik sabiti de artar, çünkü reaksiyon endotermiktir ( $\Delta H^{\circ}$  pozitif işarete sahip). Bu yüzden glukoz fermentasyon sıcaklığının artışı, H<sub>2</sub> derişimini artıracaktır. Yüksek sıcaklıklar mikroorganizma aktivitesini etkileyen proteinlerin termal denaturasyonuna neden olabilir. Ayrıca termofilik proseslerin diğer potansiyel dezavantajı artan enerji maliyetidir. Bu reaktörleri ısıtmak için gereken enerji, hidrojen üretimindeki verim artışı ile karşılanacağını fayda-maliyet analizi yapılması sureti ile görmek gerekir [19, 17].

**pH:** pH, metabolizma yolizi gibi hidrojenaz aktivitesini de etkileyebildiği için hidrojen üreten bakteri aktivitesinde ve fermentatif hidrojen üretiminde önemli bir faktördür. Uygun aralıkta pH artışı hidrojen üreten bakterinin gücünü artırır, fakat yüksek pH azaltır [13]. Yüksek fermentasyon hızları yüksek oranda organik asit oluşumundan dolayı sistemi asidifikasyona götürür. Bu durum ürün dağılımını ve hücre yaşamını etkiler [17]. Fermentatif bakteriler asitleri daha ileri seviyelere parçalayamaz. Asit birikimi kültürün pH'ını belirgin bir biçimde düşürür ve ardından bakteriyal hidrojen üretimi engellenmiş olur. Bakteri 5'den daha düşük pH değerlerinde dayanamaz ve böylece asit üretimini azaltacak bir yol veya belirli biyokimyasal reaksiyonları meydana getirecek bir yol zorunluluğu ortaya çıkar. H<sub>2</sub> üretimi için çok düşük pH limitli asidürik fakültatif anaerobların (bu fakültatif anaerobların alkali tüketimi azdır) kullanımı bir alternatif olabilir [2].

Hücre büyümesi için uygun pH, yüksek hidrojen potansiyeli elde etmek için gereken uygun pH ile aynı olmadığı belirtilmiştir. Örneğin basit bir substratı parçalamak için *Clostridia* için en uygun pH 4,7-7,0 iken yüksek verim pH 9,0'da belirlenmiştir. Skonieczny ve Yargeau [20], tarafından yapılan çalışmada *C. beijerinckii* saf anaerobik bakteri ile hidrojen üretim hızına substrat derişimi ve ilk pH'ın etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki en yüksek hidrojen üretim hızı yüksek pH ve yüksek glukoz derişiminde meydana gelmiştir. pH 6,1 ve 3 g KOİ/L glukoz derişiminde en yüksek dönüşüm görülmüştür (10,3 ml H<sub>2</sub>/g KOİ L), pH 6,3 ve 2,5 g KOİ/L substrat yüklemesinde en yüksek üretim hızı (71 ml H<sub>2</sub>/saat L) elde edilmiştir.

Substrat derişimi arttığı ve HRT azaldığında, VHPR artar. Bununla birlikte, düşük HRT’de, mikrobiyal yıkanma mikrobiyal büyümeden daha büyük olabilir. Bu yüzden, reaktörde düşük derişimdeki biyokütle, azalan VFA üretimine ve yüksek pH’a neden olur. Yüksek substrat derişimi reaktörde VFA’nın birikimine ve düşük pH’a sebep olur. VFA birikimi hidrojen üreten bakteriyi, hidrojen üretimini azaltan solvent üretimine sevk eder ve hücre ölümüne sebep olur. Reaktörde düşük pH, eğer mikroorganizmalar asidik olmayan ortamdan geliyorsa mikroorganizma aktivitesini engeller. Ayrıca, pH azalırken ayrışmayan asitlerin (asetik, bütirik) oranları artar, ayrışmayan formlar hücre membranından geçebilir, membran pH farkı zayıflar ve hücre spor halini alır veya ölür. Ayrıca, kesikli sistemlerde substrat derişimi arttığında hidrojenin kısmı basıncı artar ve mikroorganizmalar alkol üretimine başlar, böylece hidrojen üretimi engellenir [19].

Yüksek derişimde ayrılmış asitler, çözeltinin iyonik gücünü artırır ve sistemin, hidrojen üretiminden solvent üretimine dönmesine sebep olur. Düşük pH’da polar olmayan ayrışmamış asitler hücre duvarından geçebildiğinden dolayı engelleyici etki meydana gelir, hücre içinde çok yüksek pH olması durumunda proton salınır. Bu durum enerji ihtiyacı artışına sebep olur. Bir etki olarak, glikolizden dolayı glukoz akışı azalır. Hücre içi asit derişimini koruyacak ana parametre, hücre dış ortamının pH’ıdır. Hidrojen üretimi için uygun pH 5-7 aralığındadır, en uygun değer ise 5,5’dir. Asetik ve bütirik asitin ayrışmamış formlarının etkisi düşük pH (pH<4,5)’da büyüktür, hücre büyümesini engeller. Karışık kültürler için uygun pH konusunda öngörde bulunmak doğru olmayacaktır [21].

**Enzim:** Biyohidrojen üretimi, mikroorganizmalarda bulunan hidrojen üreten enzimlere bağlıdır. Bu enzimler çok basit redoks reaksiyonunu katalizler:  $(2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2)$ . Bu reaksiyonu gerçekleştiren enzimlerin birçoğu, aktif yerlerinde karmaşık metalli gruplar ve özel proteinler içerirler. Birçok hidrojen üretim sitemi tarafından kullanılan üç ana hidrojen üreten enzim (nitrojenazlar, [NiFe]-hidrojenazlar, ve [FeFe]-hidrojenazlar) vardır. Nitrojenazlar, azotu amonyağa fikse eden reaksiyonu katalizler ve aynı anda protonların ( $H^+$ ) hidrojene zorunlu indirgenmesini sağlar. [NiFe]-hidrojenazlar, hidrojen üretiminde nitrojenazlardan 15 kat daha etkilidir. [NiFe]-hidrojenazlar sadece hidrojen üretmez ayrıca onlar uptake hidrojenazlar (hidrojen tüketen enzimler) olarak da iş yapabilir, hidrojenden elektronları kullanır ve onları nikotinamid adenin

dinükleotid fosfatı (NAD(P)) indirgemekte kullanır. En etkili hidrojen üretim enzimi [FeFe]-hidrojenazlardır, nitrojenazlardan 1000 kat daha iyi aktiviteye sahiptir, [NiFe]-hidrojenazlardan 10-100 kat daha iyi aktiviteye sahiptir. [FeFe]-hidrojenazlar çevrelerine bağlı olarak ya hidrojen üretir yada tüketebilirler. Bu enzimlerin üçü genel olarak oksijene hassastırlar ve uygun hızda hidrojen üretmek için oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. [NiFe]-hidrojenazlar, ve [FeFe]-hidrojenazlar anaerobik mikroorganizma karışımı veya saf kültürler tarafından karanlık fermentasyonlarda kullanılabilir. Bu reaksiyonlarda oksijen üretilmediği veya tüketilmediği için, her iki hidrojenaz tipinin oksijen tarafından pasif hale sokulması çok az olasıdır [22].

## BİYOLOJİK $H_2$ ÜRETİMİNDE FİZYOLOJİK SINIRLAMALAR

Termodinamik açıdan, atıksuda çözünen substratlar yüksek entropi durumunda olduğu için, mekanik yollar ile yanma entalpilerini elde etmek biraz güçtür. Aksine, biyolojik proseslerde mikroorganizmalar, endüstriyel atıksu ve çamur gibi yüksek su içerikli organik kaynaklardan enerjiyi geri kazanabilir. Bu nedenle, biohidrojen üretimi entropi azaltıcı bir prostestir, mekanik veya kimyasal sistemler ile bu gerçekleşmez [23]. Hidrojen üretiminde termodinamik sınırlamalar mevcuttur [24, 25, 8].

Organik substratlardan hidrojen üretimi, elektronların hücre içi elektron taşıyıcı moleküllerden protonlara transferini kapsayan hidrojenaz reaksiyonunun termodinamikleri ile sınırlanmıştır. Protonlar kötü elektron alıcılarıdır ( $E'_{H_2} = -414$  mV); bu yüzden, elektron vericisi kuvvetli indirgeyici ajan olmalıdır.

Ferrodoksin düşük potansiyele sahip ( $E'_{Fd} \approx -400$  mV) protonları hidrojene indirgeyebilen demirli-kükürtlü proteindir. Diğer önemli hücre içi elektron taşıyıcısı, NADH, yüksek redoks potansiyeline sahiptir ( $E'_{NADH} = -320$  mV). Protonları indirgemek için indirgenmiş ferrodoksin ve NADH’in yeteneği, gerçek şartlar altında net reaksiyonun redoks potansiyeli ile belirlenir. Ferrodoksin ve NADH’nin oksitlenmiş ve indirgenmiş formlarının hücre içi derişimleri yaklaşık eşit kabul edildiği zaman, denklem (13)’den daha büyük hidrojen kısmı basıncında hidrojen üretimi termodinamik olarak uygun olmaz.

$$P_{H_2, \max} \leq \exp \left\{ \frac{2F(E'_{H_2} - E'_x)}{RT} \right\} \quad (13)$$

Burada  $E_x^{o'}$  elektron vericisinin redoks potansiyelini,  $F$  Faraday sabitini,  $R$  ideal gaz sabitini,  $T$  gerçek sıcaklığı göstermektedir. Ferrodoksin için, hidrojen kısmı basıncı  $\sim 0,3$  atm ( $3 \times 10^4$  Pa)'dan daha az olduğu sürece hidrojen üretimi devam edebilir; NADH için hidrojen kısmı basıncı  $\sim 6 \times 10^{-4}$  atm (60 Pa)'dan az olmalıdır. Bu değerler, elektron vericilerinin oksitlenmiş ve indirgenmiş formlarının eşit derişimde olduklarını kabul eder. İndirgenmiş ferrodoksinin oksitlenmiş ferrodoksinine oranı birden büyük olursa çok yüksek hidrojen kısmı basıncı sağlanabilir [8].

Hekzoslar birkaç yolizi ( Embden-Meyerhoff-Parnas (yani glikoliz) veya Entner-Doudoroff) ile piruvata metabolize olabirler. Bu yolizlerinin her ikisinde 1 mol hegzos başına 2 mol piruvat ve 2 mol NADH üretilir. Bu yüzden 1 mol hegzos metabolizması sonucu 2 mol hidrojen oluşur. Hidrojen kısmı basıncı yeterince düşük ise ( $< 60$  Pa), üretilen NADH hidrojen üretimi için kullanılabilir(en iyi durumda 1 mol hegzos başına 2 mol hidrojen), fakat NADH'nın çoğu bütirat fermentasyonu gibi diğer fermentasyon yolizleri ile de yükseltgenebilir. Bazı fermentasyon ürünleri (etanol ve laktat gibi) piruvat metabolizması için alternatif yolizlerini ifade eder. Bu anlamda, onlar genel olarak 1 mol hegzos başına 2 mol'den daha az hidrojen üreten sistemler olarak bilinirler [8].

### H<sub>2</sub> veriminin düşük olmasının sebepleri

Fermentatif biyohidrojen üretim proseslerinin ticarileştirilmesindeki en önemli kısıtlayıcılarından biri düşük hidrojen verimleridir. Bu verim prosesin ekonomik olarak uygulanmasını güçleştirir. Pratikte yüksek hidrojen verimleri asetat ve bütirat fermentasyon ürünleri karışımı ile karakterize edilmekle birlikte, düşük hidrojen verimleri propiyonat ve indirgenmiş en son ürünler (alkoller, laktik asit) ile anılır. Düşük hidrojen verimi, fermentasyon birimlerinin hücre biyokütlesi üretecek ve hidrojen üretmeyecek bir gelişim ile optimize edilmelerinin doğal bir sonucudur. Böylece, substratın (piruvat) bir kısmı ATP üretmek için kullanılır, ürün (asetat) oluşur. Bundan başka, bazı organizmalarda gerçek hidrojen verimi bir veya daha fazla uptake hidrojenazın (üretilen hidrojenin bir kısmını tüketen hidrojenaz) varlığı yüzünden azalır. Stokiyometrik verime sadece dengeye yakın şartlar altında ulaşılabilir, ki bu çok yavaş bir hızı ve/veya çok düşük hidrojen kısmı basıncını ifade eder. Yapılan çalışmalarda stokiyometrik değerden daha düşük değerler elde edilmiştir [2].

Hidrojen ve VFA, mikroorganizmaların hızlı büyüme ve yatışkın büyüme safhalarında üretilebilir. Hızlı büyüme safhasında en yüksek değere ulaşır, alkol üretiminden dolayı ise yatışkın safhada azalır. Doğal fermentasyonda maksimum hidrojen verimine, yukarıda ifade edildiği gibi biokütle üretimi olduğu ve hidrojen üretilmediği için ulaşamaz. Ayrıca, fermente edici hücreler tarafından hidrojen üretimi bakteriyal metabolizma için enerjinin israfıdır ve bu yüzden bu hücrelerde hidrojen geri kazanımını sağlayacak mekanizmalar mevcut. İlaveten, hidrojen verimi, ürünün kısmı basıncı ile negatif olarak etkilenir. Büyüme ihmal edilirse teorik olarak hegzos şekerlerindeki elektronların %33'ü hidrojene, substrat elektronlarının %66'sı VFA üretimine kanalize olur [19].

### FERMENTATİF H<sub>2</sub> ÜRETİMİNİN ARTIRILMASINDA UYGULANAN YAKLAŞIMLAR

Anaerobik karanlık fermentasyon ile glukozun CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>'e tam bir parçalanmasını sağlamak biraz güçtür. H<sub>2</sub> fermentasyonunda substratların enerji potansiyellerinin yalnızca %10-20'si H<sub>2</sub> olarak geri kazanılabilir [7]. Bu verim, mevcut kimyasal veya elektrokimyasal hidrojen üretim proseslerine alternatif olarak ekonomik bakımdan çok düşük olduğu görülür. Bu prosesin geliştirilmesi üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda genetik olarak değişikliğe uğramış mikroorganizmaların gelişimi, reaktör tasarımının geliştirilmesi, hücrelerin tutuklanmasında farklı katı yapıların kullanımı, iki safhalı proseslerin geliştirilmesi ve H<sub>2</sub> üretim hızının yükseltilmesi üzerinde durulmuştur [26]. Endüstriyel ölçekte uygulanabilmesi için atık materyali etkili olarak işleyebilecek mikrobiyal kültürler gereklidir. Atık materyalden hidrojen üretimi iki amaca (temiz enerji üretimi ve biyoyileştirme) hizmet edecektir [12].

Aşağıdaki bölümlerde hidrojen üretiminin geliştirilmesi için önerilen yaklaşımlar ele alınmıştır.

### Yeni H<sub>2</sub> üreticilerinin izolasyonu ve özellikleri

Hidrojen üretim teknolojileri açısından, herhangi bir şekilde doğal olarak izole edilen mikroorganizmanın stokiyometrik değerden daha fazla miktarda hidrojen üretebileceği açıklanmamıştır. Bu değerden daha yüksek hidrojen üretebilecek yeni türlerin izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu türlerden bazıları şöyle; hidrojeni hem büyüme hem de yatışkın safhada üretebilen *Enterebacter asburiae* SNU-1, inorganik azotlu ortamda etanol-asetat tipli

fermentasyonu yapabilen termofilik hidrojen üreticisi *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2, CO<sub>2</sub>'e bağımlı *Citrobacter* sp. Y19, *Rhodospseudomonas palustris* P4, çok geniş aralıkta substrattan hidrojen üretebilen yeni son derece termofil *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* [11, 27]. Termofilik bakterilerin kullanıldığı yüksek sıcaklıktaki hidrojen üretimi, hidrojen tüketen bakterilerinin bulaşmasını önleyen bir proses olarak tanımlanır. *Thermoanaerobacterium* sp. ve *Thermotage* sp. gibi etkili hidrojen üreten bakteriler bu amaç için kullanılmıştır [21].

IIT Kharagpur Biohidrojen Grubu, hidrojen üretiminin geliştirilmesi için *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 yüksek verimli tür ile karışık mikrobiyal topluluğu kullanarak iki safhalı proseste fermentatif hidrojen üretimi üzerine çalışmışlardır. Yapılan çalışmalarda *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08'in pH 6,5'da 36°C'de farklı karbon kaynakları ile hidrojen üretiminde uygun olduğu bulunmuştur (en yüksek hidrojen verimi 2,9 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz). Bu organizmanın çift mutant türünün H<sub>2</sub> verimini önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Bunun sebebi *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08'nin tüm alkollere karşı çok hassas olduğu, mutantlarının ise alkol ve asitlerin öldürücü derişimlerini tolere edebilmesidir. Rekombinant (yeni mikroorganizma) türlerinin kullanıldığı fermentatif hidrojen üretiminin yapılabirliği incelendiğinde *E. coli* BL-21 rekombinantı ile 3,1 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz verimi elde edildiği saptanmıştır. Herhangi bir organizmanın endüstriyel açıdan uygunluğu, H<sub>2</sub> üretimi için organizmanın farklı karbon kaynağı kullanabilme yeteneği ile artar. Sonuçlar *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08'nin amilaz, selülaz, lipaz gibi bazı hidrolize neden olan enzimleri üretebildiği ve H<sub>2</sub> üretimi için atıkta mevcut çeşitli karbon tiplerini kullanabildiğini göstermiştir [12].

### H<sub>2</sub> kısmi basıncının ayarlanması

Kısmi basınç veya sıvı fazda H<sub>2</sub> derişimi, fermentatif H<sub>2</sub> üretimini etkileyen ana faktörlerden biridir. Yüksek H<sub>2</sub> kısmi basıncı, hidrojenaz aktivitesini azaltması ile ve termodinamik olarak uygun olmayan H<sub>2</sub> üretim reaksiyonlarını meydana getirmesi ile H<sub>2</sub> üretiminde negatif etki yaratır [7]. Asetatın hidrojene dönüşüm reaksiyonu ılımlı sıcaklıklarda termodinamik olarak elverişsizdir ( $\Delta G^{\circ}=+104,6$  kJ/mol) ve kuvvetli dereceden hidrojen kısmi basıncı ile belirlenir. Hidrojen üretimi yolizleri H<sub>2</sub> derişimlerine karşı hassastır ve son ürünün engelleyici etkisine maruz kalırlar. Hidrojen derişimleri artarken H<sub>2</sub> sentezi azalır ve metabolik

yolizleri laktat, etanol, aseton, butanol veya alanin gibi indirgenmiş substrat üretimine doğru kayar. Sürekli hidrojen sentezi için 60 °C'de pH<sub>2</sub><50kPa, 70 °C'de <20kPa ve 98 °C'de <2kPa basınç gereklidir [2].

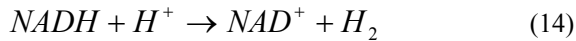
Le Chatelier prensibine göre, reaksiyon 4'in dengesi, reaksiyonun gaz halindeki ürünlerden birinin veya her ikisinin giderilmesi ile sağa kayacaktır. Sistemin toplam basıncının azaltılması ile H<sub>2</sub> kısmi basıncında azalma reaksiyon dengesini sağa kaydıracak ve böylece hidrojen üretimi artacaktır [28]. Das [12] tarafından yapılan çalışmada kesikli fermentasyon prosesinde kısmi basıncın 760 mmHg'dan 380 mmHg'ya düşürülmesi, molar hidrojen verimini %34 artırdığı belirlenmiştir.

Kısmi basıncın azaltılmasında ilk girişim, reaktörün tepesindeki CO<sub>2</sub>'i, KOH kullanılarak gidermektir, bu şekilde kısmi basınç %87'ye kadar azaltılabilir. Bu durum hidrojen verimini 1,4'den 2 mol/mol glukoz'a artırır. H<sub>2</sub> kısmi basıncını azaltmak için diğer bir yol gaz püskürtmedir. Özgül H<sub>2</sub> üretim hızı N<sub>2</sub> püskürtme şartları altında 1,5'den 3,1 ml H<sub>2</sub>/dakika g biyokütle'ye arttığı belirlenmiştir. Mandal ve diğ., [28] tarafından yapılan çalışmada kesikli fermentasyon prosesinde toplam basıncın düşürülmesi ile H<sub>2</sub> kısmi basıncındaki 760 mmHg'dan 380 mmHg'ya olan azalma, H<sub>2</sub> verimini 1,9'dan 3,9 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz'a artırmıştır. Reaktördeki toplam basıncın düşürülmesi arzu edilen reaksiyon dengesini sağlar ve böylece istenmeyen solvent oluşum yolizi ile oluşabilecek herhangi bir inhibisyon olasılığı engellenmiş olur. Ayrıca işletme basıncının düşürülmesi ile oluşan düşük hidrojen kısmi basıncı, etanol ve/veya organik asitler gibi indirgenmiş yan ürünlerin üretimine yönlendirilen H<sub>2</sub> tüketimini engeller. Alkol üretimi, NADH gibi indirgeyici eşdeğerler biçiminde H<sub>2</sub> tüketimini kapsadığı için şekerin alkollere metabolizması için uygun fermentasyon şartları H<sub>2</sub> üretimini azaltır. Ayrıca, gazın sıyırılması, reaktörün üst kısmında sıvı faz ile gaz faz arasında basınç farklılığının artışı ile çözünmeyi kolaylaştırır. CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> gaz bileşenlerinin derişimlerinin sistemde azalması özellikle önemlidir, çünkü homoasetojenez reaksiyonu genel olarak üretilen gazdaki H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> derişimleri ile bağlantılıdır. Bu gaz bileşenlerinin derişimlerinin düşürülmesi homoasetojenez reaksiyonunu engeller. Reaktördeki işletme basıncının düşürülmesinin önemli bir katkısı da lag süresini (aşılamanın başlangıcından gaz üretiminin başlamasına kadar geçen süre) düşürmesidir. Ayrıca düşük işletme basıncında pH değişiminin daha az olduğu belirlenmiştir.



H<sub>2</sub> kısmı basıncının azaltılmasında gazın püskürtülmesi faydalı bir metottur. Bu yöntemin diğer faydası reaktörde karıştırmayı geliştirmesidir. Kim ve diğ., [7] tarafından sürekli sistemde H<sub>2</sub> üretimi üzerine gaz püskürtmenin etkisi incelenmiştir. Püskürtme gazı olarak N<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gazları ile reaktörden elde edilen biyogazın kullanıldığı çalışmada N<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gazların püskürtülmesi ile elde edilen H<sub>2</sub> verimi ve özgül hidrojen üretim hızı (SHPR), biyogazın kullanımı ile elde edilen değerden daha yüksek olmuştur. Yani N<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gazların püskürtülmesi ile elde edilen H<sub>2</sub> kısmı basıncı azalması H<sub>2</sub> fermentasyonu için faydalı bir etki yaratmıştır. CO<sub>2</sub> püskürtme hızı 100'den 300 ml/dakika'ya arttığı zaman H<sub>2</sub> veriminin 1,40'dan 1,68 mol H<sub>2</sub>/mol tüketilen hezoz'a arttığı belirlenmiştir. En iyi performans 300 ml/dakika ile elde edilmiştir. CO<sub>2</sub> kullanımının diğer bir pozitif etkisi ileri sürülmüştür. Yüksek CO<sub>2</sub> kısmı basıncı H<sub>2</sub> üreten bakteri üzerinde çok küçük etkiye sahiptir, fakat H<sub>2</sub> üreten bakteriler ile rekabet halinde olan asetojenler ve laktik asit bakterileri gibi diğer mikroorganizmalar üzerinde engelleyici etkisi yaratmaktadır.

CO<sub>2</sub>'nin sistemde bulunması da hidrojen verimini tayin eder, çünkü hücreler CO<sub>2</sub>, piruvat ve NADH'nın kullanılması yolu ile suksinat ve format sentezler. NADH glukozun piruvata fermentatif dönüşümünden oluşur ve NADH'nin yeniden yükseltgenmesi hidrojeni meydana getirir (reaksiyon 14). Böylece, kültür ortamından etkili olarak CO<sub>2</sub> giderimi, NADH tüketimini önler ve hidrojen verimini artırır. CO<sub>2</sub> inert gaz püskürtülmesi ile veya membran temelli proseslerin uygulanması ile giderilebilir. Sadece Ar gibi inert gazlar değil, hidrojen de CO<sub>2</sub> gideriminde etkilidir. Metot ayrıca ekonomiktir, çünkü üretilen hidrojen, giderici gaz olarak kullanılırsa, üniteye gaz karışımını ayırmaya ihtiyaç kalmaz [29, 2].



Reaktörde hidrojen kısmı basıncının düşürülmesi ile hidrojen üretimini geliştirmek için bazı farklı uygulamalar da denenmiştir. Bunlardan vakum uygulamasının hidrojen verimi üzerine çok az etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Aşırı doygunluğu önlemek için güçlü karıştırma, karışık sıvıdan çözünmüş hidrojeni gidermek için hidrojene geçirgen membran ve azotun kullanımı ve sürekli basıncın tahliye edilmesi gibi metotlar hidrojen üretimini önemli ölçüde geliştirmiştir. Azot gazının kullanılması hidrojen verimini artırması yanında

prosesin dengesini de geliştirdiği saptanmıştır. Bu metodun dezavantajı ise biyogazdaki hidrojen içeriğinin seyrelmesinden dolayı hidrojenin geri kazanım maliyetinin artmasıdır [30].

### Metabolik yolizinin değişimi

Mikroorganizmaların biyohidrojen üretiminin artırılması için, metabolik yolizi alanında çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Zorunlu anaerob mikroorganizmalarda yapılan çalışmalar, en önemli problemlerden birinin, fermentasyon son ürünlerinin birikimi ile hidrojen üretiminin engellenmesini göstermiştir. Asetik ve bütirik asitlerin üretimi ve birikimi, düşük hidrojen verimi meydana getirir ve toplam 19 mM ayrışmamış asit derişimi solvent oluşumunu başlatır. Farklı *Clostridium* türleri, farklı oranlarda son ürün meydana getirir, bu yüzden hidrojen üretim potansiyeli etkilenir. Glukozdan hidrojen veriminin artırılması için bütirik asit oluşumunun önlenmesi ve asetik asit üretiminin artışı sağlanmalıdır. Asetat üretiminin 4 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz'a artması ekonomik olarak yeterli değildir. Bu değeri 8-9 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz'a artırabilmek için, yan ürün olarak üretilen asetat yeni geliştirilen mikrobiyal yakıt hücre-bazlı proses kullanılarak hidrojene dönüştürülebilir. Fakültatif anaerob olan *E. coli* ile yapılan çalışmada hidrojen üretiminin artırılması için çeşitli metotlar önerilmiştir (laktat üretimi, suksinat üretimi veya herikisi). Bu çalışmalar karbonun format oluşumuna yönlendirilmesi ile hidrojen üretiminin artırılacağını göstermiştir [31, 22].

Metabolik yolizlerinin değiştirilmesi ile metabolik ürün olan organik asitlerin oluşumu engellenerek hidrojen verimi artırılabilir. Fermentasyon sırasında oluşan fazla miktardaki indirgeyici eşdeğerlerin bertarafı, hidrojen üreten fakültatif anaeroblarda en önemli sınırlayıcı faktörlerden biridir. Bu aşırı indirgeyici eşdeğerler, proton redüksiyonu yolu ile bertaraf edilebilir, hidrojenaz ve elektron taşıyıcılar yardımı ile durum kolaylaştırılır ve organizmalar hidrojen oluşumuna yönlendirilir. Bu göz önünde bulundurulduğunda hidrojenaz aktivitesi ile metabolik yükseltgenme reaksiyonlarında salınan elektronların bertarafında bakteriyal hidrojen üretimini bir araç olarak düşünmek doğru olacaktır [2].

Fermentasyon bakterisinin her biri, propiyonik asit fermentasyonu, bütirik asit fermentasyonu, etanol fermentasyonu veya laktik asit fermentasyonu gibi özel fermentasyon tiplerine sahiptir. Ekolojik faktörler değiştiği zaman, fermentasyon tipi

değişme bile, fermentasyon bakterisi tüm son ürünlerinin dönüşüm oranını değiştirecektir [32].

**Bütirik asit tipli hidrojen üretim fermentasyonunun dengesi:** İki safhalı anaerobik biyolojik arıtım süresince, asit üretim safhasında çoğunlukla bütirik asit tipli fermentasyon meydana gelir. Bütirik asit tipli fermentasyonun en son fermentasyon ürünleri genel olarak bir miktar propiyonik asit içerir. Sıvı faz ana son ürün olarak bütirik asit ve asetik asit içerir. Belirli şartlar altında, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları sırasında ortam metabolizma ürünleri  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ile  $\text{NAD}^+$  arasında bir denge farkı vardır, bu yüzden fermentasyon prosesi çoğu kez denge durumundan sapar. Mikroorganizma metabolizmasının ayarlanması ile yükseltgenme-indirgenme prosesini denge durumunda veya denge durumuna yakın durumda korumak için çoğu kez propiyonik asit dönüşüm hızı artırılır. Literatür göstermiştir ki, pH 5,5'den küçük veya 6'dan daha büyük olduğu zaman, fermentasyon ürünü başlıca asetik asit ve bütirik asit; pH 5,5 ile 6 arasında olduğunda propiyonik asit dönüşüm hızı önemli ölçüde artmıştır. Asit üreten bakteri düşük pH'da büyüdüğü halde, birçok mikroorganizma gibi, asit üreten bakterinin çoğalması için en uygun pH nötraldır. pH 6'dan daha fazla olduğu zaman, organizmalar, bütirik asit tipli fermentasyonda denge durumunu sağlamak için  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ( $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ) tamamen kullanılabilir. Anabolizma, bu pH sınırı içinde fermentasyon yolunu kontrol eder. Normal anabolizma ve çok yüksek ATP verimini sağlamak için asetik asit ve bütirik asit kullanılır. Bütirik asit tipli fermentasyon için en dezavantajlı pH aralığı 5,5-6 dır.

**Etanol tipli hidrojen üretimi fermentasyonunun dengesi:** Fermentasyon tipi, iki ana faktör ile sınırlanmıştır; mikroorganizma popülasyonu ve sınırlayıcı ekolojik faktörler (pH, sıcaklık ve benzeri). Hidrojen kısmı basıncı etanol tipli fermentasyon için güçlü faktör olarak düşünülmelidir. Reaktördeki hidrojen kısmı basıncı, etanol dönüşüm hızını büyük ölçüde etkiler. Etanol, hidrojen kısmı basıncı  $10^4$  Pa'dan fazla olduğu zaman birikebilir. Hidrojen kısmı basıncı  $10^4$  Pa'nın altında olduğu zaman, etanol asetik asite dönüşecektir.

Uçucu yağ asitlerine (VFAs) ilaveten oluşan etanol, bütanol ve laktat gibi indirgenmiş son ürünler H atomları içerir, ki bunlar gaz olarak salınmazlar. Bu yüzden alkol üretimi düşük hidrojen verimine neden olur. Hidrojen verimini artırmak için, bakteriyel metabolizma alkoller (etanol, bütanol) ve indirgenmiş asitlerden (laktat), VFAs doğru yönlendirilmelidir.

İki alt birim içeren hidrojenaz, sitoplazmik taraf üzerinde NADH (indirgeyici eşdeğer) ile ve periplazmik taraf üzerinde protonlar ile etkileşim içindedir. NADH genellikle glikoliz yolu ile glukozun piruvata katabolizması ile üretilir. Piruvatin etanol, butanediol, laktik asit ve bütirik asite dönüşümü NADH yükseltgenmesini gerektirir. NADH derişimi, bu alkolik ve asidik metabolitlerin oluşumu engellenecek olursa artacaktır. Bu sırası ile NADH yükseltgenmesi yolu ile hidrojen verimini de artıracaktır [2].

Etanol tipli fermentasyon, bütirat ve propiyonat tip fermentasyonlara kıyasla daha iyi biyohidrojen üretim kapasitesine sahiptir. Laboratuvar ölçeğinde yapılan sürekli işletmelerde elde edilen en uygun şartlar şu şekildedir: sıcaklık  $35^\circ\text{C}$ , pH 4,0-4,5, OPR (yükseltgenme indirgenme potansiyeli) -100 mV, HRT 4-6 saat, OLR 40-70 kg KOİ/m<sup>3</sup> gün, giriş alkalinitesi ( $\text{CaCO}_3$ ) 300 mg/L. Asidojenik reaktörde en yüksek sürekli hidrojen üretim hızı  $5,7 \text{ m}^3 \text{ H}_2/\text{m}^3$  gün olarak belirlenmiştir ve uygun şartlar altında yaklaşık 1 kg KOİ, 5,4 mol hidrojen üretecektir [33].

### Genetik yaklaşım

$605 \text{ mg H}_2/\text{saat L}$  şimdiye kadar açıklanan en yüksek verimliliktedir. Fakat bu proses hala ticari olarak uygun değildir [31]. Hidrojen veriminin geliştirilmesi,  $\text{H}_2$  üreten bakterinin genetik değişimi ile sağlanabilir. Fermentatif hidrojen üreten bakterinin, hidrojen produktivitesinin artırılması için genetik olarak birkaç yöntem mevcuttur [2]. Bunlar:

1. Substrat (glukoz) kullanılabilirliğini artıran selülozlar, yarıselülozlar ve lignoselülozların aşırı oluşumu
2. Uptake hidrojenazın (hidrojen tüketen hidrojenaz) elenmesi
3.  $\text{H}_2$  geliştiren hidrojenazların aşırı oluşumu

Hidrojenaz biyolojik hidrojen üretim proseslerinin en önemli enzimidir. [NiFe]-hidrojenaz hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalarda bulunan uptake hidrojenazdır, oysa [Fe]-hidrojenaz anaerobik mikroorganizmalarda öncelikli olarak hidrojene indirgenmesini katalizler. Uptake hidrojenazın varlığında  $\text{H}_2$  gazı kullanıldığı ve tüketildiği için, net  $\text{H}_2$  üretiminde azalma görülür. Bu yüzden genetik mühendisliği uptake hidrojenazın üretiminden sorumlu geni elemeyi veya dönüştürmeyi hedefler. Bu ise genin pasif hale getirilmesi ile yapılabilir [31].

Genetik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalar ile hidrojen üretiminin geliştirilmesinde, metabolik

yalozu ve genom düzeni bilindiği için en çok kullanılan mikroorganizma *Escherichia coli*'dir. *Escherichia coli* ile hidrojen üretimi, uptake hidrojenazın aktivitesinin yitirilmesi ile artırılabilir, böylece hidrojenin bir kısmı geri kazanılabilir, ayrıca hidrojen üretimi olmaksızın format okside eden format hidrojenazlar N ve O'nin aktivitesinin yitirilmesi ile de benzer durum elde edilebilir [19].

### Biyoreaktör tasarımı

Fermentatif hidrojen üretim sistemleri, genel olarak iki reaktörden ibarettir. İlki asidojenik reaktör olup hidrojen (ve CO<sub>2</sub>) ve kolaylıkla parçalanabilen organik bileşikler üretir. İkincisi metanojenik reaktör olup metan üretir. Asidojenik safhada oluşan substrat kolay parçalanabilir olduğu için, bazı yüksek hızlı anaerobik reaktör tipleri ikinci adım olarak kullanılabilir. Nispeten düşük miktarda KOİ hidrojene dönüştüğü için (çok iyi substratlar için maksimum %25, normal olarak %5-10) ikinci adım, kalan organik maddenin daha ileri parçalanması için gereklidir [6].

Biyohidrojen üretimi özel biyoreaktör şekilleri ile geliştirilebilir. Böylece uzun zaman dönemlerinde (aylar) durağan olan ve işletme parametrelerindeki kısa süreli dalgalanmalara direnç gösteren sağlam sistemler elde edilir. Ayrıca, çok uygun hacimsel üretim hızları elde edilir. Biyohidrojen fermentasyonları kesikli ve sürekli sistemlerde işletilebilir. Kesikli sistemler endüstriyel uygulamalar için uygun değildir, sürekli veya yarı sürekli yapılması önerilir. Ancak katı substratlar için sürekli olmayan veya yarı sürekli reaktör tipleri kullanılmaktadır [6]. Sürekli karıştırmalı tank reaktörleri (CSTR) basit inşa, kolay işletim ve etkili homojen karışım sağlar. Bununla birlikte bu reaktörlerde HRT, mikrobiyal büyüme hızını kontrol eder ve bu nedenle HRT organizmaların maksimum büyüme hızlarından daha büyük olmalı, çünkü çok büyük seyrelme hızları mikroorganizmaların dışa yıkanmasına sebep olur. Mikrobiyal biyokütlenin derişimi ve büyümesi, HRT'den bağımsız kıldığında yüksek hücre derişimleri elde edilebilir, böylece yüksek hacimsel üretim hızı ve miktarının teşvik edilmesi mümkündür [17, 10]. CSTR'de hidrojen üretimi üzerine HRT'nin etkisi incelenmiştir. HRT 3 günden 2 ve sonra 1 güne düşürüldüğü zaman, hidrojen üretim hızı sırası ile 1,78; 2,49; 3,34 L H<sub>2</sub>/L gün'e artmıştır. HRT 1 gün olduğunda gazın hidrojen içeriği %38,49'den %73,91'e değişmiştir. Hidrojen verimi HRT 3 günden 1 güne azaldığında 0,19'dan 1,24 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz'a artmıştır [14].

Teorik olarak, yüksek HRT hidrojen tüketebilen (örneğin metanojenler) yavaş büyüyen bakterinin büyümesine izin verebilir, ancak bu durum deneysel olarak doğrulanmamıştır [6]. Steril olmayan sistemlerde metanojenler tarafından hidrojen kaybının azaltılmasında pH 5,5-6,5, HRT>6 saat ve karışık kültürün ısı-şok işlem ve asetilen gibi ön işlemler ile sağlanabilir [5].

CSTR'ler sürekli fermentatif hidrojen üretimi için çok sık çalışılan reaktör tipidir. Bununla birlikte bazı dezavantajlara sahiptir. Genel olarak CSTR sistemler, pH ve HRT gibi çevresel şartların değişimine çok hassastır. Ayrıca, yüksek seyrelme hızı (veya kısa alıkonma süresi) biyokütlenin dışa yıkanmasına sebep olabilir. Yukarı akışlı anaerobik çamur örtü (UASB) reaktörleri, yüksek arıtım verimliliği, kısa HRT ve mükemmel proses dengesinden dolayı sürekli fermentatif hidrojen üretimi için çok iyi seçenektir. Yapılan çalışmalar UASB'nin CSTR'den daha durağan ve daha yüksek hacimsel hidrojen üretim hızına sahip olduğunu göstermiştir. UASB'nin olası bir dezavantajı, işleme alınmasının uzun zaman almasıdır. Reaktörde biyokütle alıkonmasını artırmak için uygun bir yaklaşım hücreyi tutuklayarak veya granülasyonunu sağlayarak kullanmaktır [11].

Biyoreaktörlerin pratik işletimi açısından yüksek hücre yoğunluğu gereklidir. Bu amacı gerçekleştirmek için bazı mikrobiyal destek taşıyıcısı kullanılıp tutuklanmış hücreli çeşitli reaktör sistemleri elde edilmiştir. Bu tutuklanmış kültürler, süspansiyon hücrelere karşı bazı avantajlara sahiptir, tutuklanmış kültürlerde sistemden hücrenin dışa yıkanması engellenerek yüksek hücre derişimi elde edilir ve hücre geri kazanımı ve geri döngüsü desteklenir. Tutuklama materyali olarak, lignoselülozik polimerler kullanılmıştır. Pirinç sapı, küspe ve hindistan cevizi lifi gibi çeşitli polimerler bu amaç için denenmiştir. Taşıyıcı olarak hindistan cevizi lifi, tüm kullanılan taşıyıcı materyaller arasında en yüksek H<sub>2</sub> üretim hızı göstermiştir [12]. Destek ortamına tutuklanmış hücrelerin kullanıldığı çalışmalarda genel olarak en iyi sonucu aktif karbon vermiştir [6, 2]. Tutuklanmış hücreli biyoreaktörler en iyi performans göstermekle birlikte bu tip reaktörlerde gazın (H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'in ) tutulacağını göz önünde tutmak gerekir, bu aşırı olması durumunda pH değişiminden dolayı mikroorganizmalar engellenebilir [19].

Guo ve diğ., [34] tarafından yapılan çalışmada karışık kültürün aktif karbona tutuklanması ile oluşan granüler çamur yataklı reaktörde hidrojen üretimi

incelenmiştir. En yüksek hidrojen üretim hızı, 4 saat HRT'de, 4,42 pH'da, 1 g nişasta/L gün OLR şartlarında 1,64 L/L gün olarak bulunmuştur. Toplam biyogazın hacimsel hidrojen içeriği %35-65'i olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma, aside dayanıklı bakterinin 3,95 gibi düşük pH'da bile yaşayabildiğini ve aktif olarak hidrojen üretebildiğini göstermiştir. Bu durum, süspanse büyüyen bakterilere kıyasla aşırı asitli ortamlara karşı aktif karbon taşıyıcılarının tutuklanan biyofilmleri koruyucu etkisinden dolayı olduğu saptanmıştır. Bu tarz sistemlerin diğer potansiyel avantajı şudur; düşük pH ve düşük sıcaklıkta işletim, pH kontrolü için gerekli alkali maliyetini düşüren, sürekli işletimde sıcaklık kontrolü için daha az enerji girdisi sağlayan faydalı bir işletme yöntemini oluşturur.

CSTR'de mikrobiyal biokütlenin alıkonulması, doğal flok yada granül oluşturuçuların kullanımı, inert materyaller üzerine mikroorganizmanın tutuklanması, mikrobiyal bazlı biyofilmler veya mikroorganizmaları tutan membranların kullanımı gibi farklı şekillerde yapılabilir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki granüller biyofilmlere karşı üstün performans (ortalama olarak üç kat daha yüksek) gösterirler. Genelde CSTR'ye karşı bu tip reaktörlerin en önemli ilerlemesi büyük oranda artan hacimsel üretim hızıdır, bazı durumlarda 50 kattan daha fazla olabilir. Ayrıca bu tip reaktörler karışık mikrobiyal topluluklar için uygundur, potansiyel problem ise metan oluşumu yolu ile hidrojen kaybıdır. Hücre büyümesi, uzun süre direkt olarak HRT ile kontrol edilemediği için, yavaş büyüyen metanojenler, yüksek sıvı hızlarında bile gelişebilirler [10].

CSTR'de hidrojen üreten biyokütle uygun şartlar altında kendi kendine granüle veya floküle olabileceği belirlenmiştir. CSTR'de biokütle derişimini artırmak için biyofilmlerde veya suni granüllerde (katyonik poliakrilamid gibi) biyokütleyi tutuklayarak hidrojen verimi üç kat artabilmektedir, ancak büyük granüllerde kütle transferi sınırlayıcı faktör olmaktadır. Paket yataklı reaktörde biyokütle ya granüllere yada biyofilmlere tutuklanır veya paket ortamında tutuklanır. Akış modeli, çok az karışım piston akış modelidir. Yapılan çalışmalar yüzey alanı büyütülmüş kil ve aktif karbonun, gözenekli ortam olarak kullanılmasının verimin geliştirilmesinde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Membran tip reaktörlerde ise membran karışık sıvıdan çamuru tutar ve böylece yüksek biyokütle derişiminde reaktör işletilebilir [30].

Yüksek hidrojen verimi, yüksek hızlı biyoreaktörlerde hipertermofilik bakteri kullanımı ile elde edilebilir. Bu reaktörler çok yüksek yüzey alanlı paket materyalinin olduğu anaerobik kırma taşı filtreler olup içinde biofilm oluşumu sağlanmıştır. Reaktörden buharın sıyrılması ile düşük H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> kısmı basınç sağlanabilir. Bu prosesi işletmek için gerekli enerji, bu tip reaktörlerde üretilen hidrojen gazının yanma değerinden en az dört kat düşüktür. Tutuklanmış hücrenin kullanıldığı boru biçimindeki biyoreaktörlerde diğer önemli bir problem, gazın yukarı kaldırma etkisidir. Bu problemin giderilmesinde, sivri ve paralel kenar biyoreaktörler kullanılabilir. Tüp şeklindeki biyoreaktörler ile karşılaştırıldığında paralelkenarlı biyoreaktör kullanımı ile gazın kaldırma etkisi %67 azaldığı görülmüştür [2].

Reaktörde gaz kısmı basıncının azaltılarak hidrojen üretim veriminin artırılması için yeni bir yaklaşım olarak reaktör boyutunun artırılması düşünülmüştür. Reaktörün yüzey alanının artması ile üretilen gaz basıncının azalması, hidrojen üretimini önemli ölçüde geliştirir. Yapılan çalışmada reaktör boyutunun 125 ml ve 2L olması durumunda hidrojen veriminin sırası ile 269 ml/g kullanılan glukoz ve 448 ml/g kullanılan glukoz olduğu bulunmuştur. Büyük reaktörün kullanımı ile fermentasyon ortamında gaz ürünlerin etkisini azalır ve bakteriyal verimlilik ve biyokütle derişimi artar [25].

Hidrojen verimini artırmak için biyoproses parametrelerinin optimizasyonu önemli bir konudur. Ghosh ve Hallenbeck [35] tarafından *Escherichia coli* DJT135 türü için istatistiksel yöntem kullanılarak optimizasyon yapılmıştır. Glukoz derişimi ile pH ve glukoz derişimi ile sıcaklık birbiri ile bağımlıdır ve hidrojen verimi üzerinde önemli bir etkileşime sahiptir. Sıcaklık ve pH'nın interaktif etkisi ise önemsizdir. En yüksek hidrojen verimi (1,69 mol H<sub>2</sub>/mol), en uygun şartlar altında (75 mM glukoz derişimi, 35 °C ve pH 6,5) elde edilmiştir.

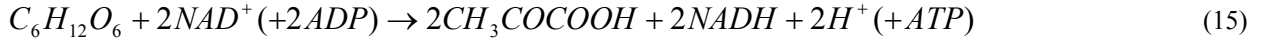
### Diğer yaklaşımlar

Hidrojen üretimini artıracak diğer bir yaklaşım aktif hidrojenaza ilaveten, kolay elde edilebilir/zengin elektron kaynağının ve biyokimyasal elektron pompasının araştırılmasını kapsar. NADH yolizi ile hidrojenin gelişimi, kalıntı NADH'nın yeniden yükselttiği metabolik reaksiyon ile oluşur (reaksiyon 14). Bu nedenle, metabolik reaksiyonlar, kalıntı NADH miktarını artıracak şekilde kontrol edilebilirse hidrojen verimi daha da artacaktır. Teorik olarak fermentatif hidrojen verimi, hidrojen üretimi

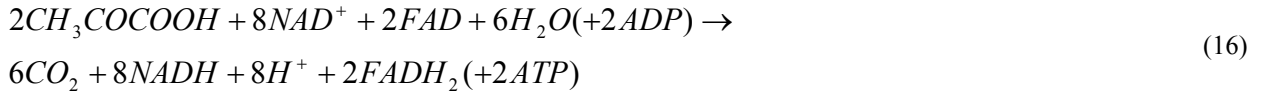
için hidrojenaza sahip aerobik/anaerobik bakteri kullanımı ile reaksiyona giren 1 mol glukoz başına 10 mol'e kadar artabileceği açıklanmıştır. NADH aerobik şartlar altında oksijen tarafından yeniden yükseltgenecektir, NADH'nin yeniden yükseltgenmesi hidrojen üretimini engelleyecektir. Bu nedenle, en yüksek verim, aerobik olarak elektron

taşınım zincirinin NADH-dehidrojenaz karmaşık yapısının engellenmesi ile sağlanacaktır. Aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri, aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi toplam 10 mol NADH üretir ( TCA döngüsü ile 8 mol, glikolizden 2 mol) [2].

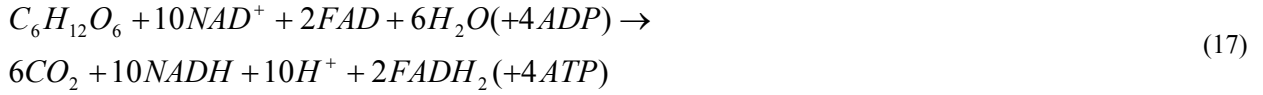
Glikoliz



TCA döngüsü



İki denklem birleştirilse



Aerobik yükseltgenmede TCA döngüsü ile büyük miktardaki NADH'nin üretimi ile yüksek verime ulaşılabilir, ayrıca ya oksijenle yada diğer yüksek redoks potansiyeline sahip elektron alıcıları ile elektron taşınım zinciri vasıtası ile FADH<sub>2</sub> yeniden yükseltgenecektir.

## 2. SONUÇ

Teorik olarak 1 mol glukozdan 12 mol hidrojen sağlanabildiği halde, doğada bunu sağlayacak mevcut bir metabolik yoluzi yoktur, çünkü bu yoluzinde hücre büyümesi mümkün değildir. Fakültatif anaeroblar tüketilen 1 mol glukozdan 2 mol hidrojen üretirler, oysa zorunlu anaeroblar 4 mol hidrojen üretirler [22].

Biyolojik hidrojen üreten proseslerde bazı engellemeler mevcuttur. Bunlardan bazıları şu şekildedir:

- Prosesin hidrojen verimi ticari uygulamalar için düşüktür
- Bazı biokütle hammaddesinin işlenmesi ekonomik değildir. Atık biyokütle ve/veya enerji bitkilerinin yetiştirilmesi, hasatı, taşınması ve ön arıtımı için ekonomik metotların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.
- Metabolik olarak 4 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz'dan daha fazla hidrojeni endüstriyel olarak üretebilecek mikroorganizma yoktur.
- O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> kısmı basıncına hidrojenazın hassasiyeti, düşük proses verimliliğine sebep olur.

- Hidrojen üreten bakteri metabolizması ve bu bakterinin H<sub>2</sub> derişimine tolerans seviyesi üzerine bilgiler yetersizdir.

Bu engellemelerin üstesinden gelmek için bazı bilimsel ilerlemeler ve teknik gelişmeler gereklidir [31].

Biyohidrojen üretim proseslerinde VFA ve solvent derişimi dağılımları ve onların fraksiyonları hidrojen üretiminin izlenmesi için faydalı bir göstergedir [36]. Hidrojen üretim performansını ilişkilendirmek için bütiratın asetata oranının kullanımı, homoasetojenlerin büyümesinden dolayı uygun değildir [37].

Organik asitler (asetat ve bütirat) ve H<sub>2</sub> gibi yan ürünler ile H<sub>2</sub> üretiminin engellenmesi önemli bir konudur. Bu son ürünlerin birikimi fermentasyonu, asit oluşumundan solvent oluşumuna döndürür. Solvent oluşumu, H<sub>2</sub> verimi ve hidrojenaz aktivitesinin önemsiz derecede geliştiği kabul edilmiştir. Anaerobik kültürde solvent oluşumu pH<5,5, 0,3 ile 50mM arasında ayrışmamış asit derişimi ve >0,5 atm H<sub>2</sub> kısmı basıncında başlar. Yüksek hidrojen kısmı basıncı hidrojenaz aktivitesini engellediği bilinmektedir. Sürdürülebilir H<sub>2</sub> üretimi elde etmek için karışık kültür bazı materyaller üzerine tutuklanmıştır. Tutuklanmış kültürde üretilen H<sub>2</sub>, serbest kültürden elde edilenden birkaç kat daha fazla olduğu için, sonuçlar bu girişimi desteklemiştir. Ancak kötü mekanik durağanlık ve dayanıklılık gözlenmiştir [5].

Biyohidrojen üretimi mevcut yolizinde hidrojen üretimini yapan enzimlerin homologlarının artırılması ile veya rekabet edici yolizlerinin pasif hale getirilmesi ile de sağlanabilir. Stokiyometrik dönüşüm oranına, yeni ilave yolizleri ile veya hibrid iki safhalı sistemlerin geliştirilmesi ile substrat dönüşümü tamamlanarak ulaşılabilir [10]. Asidojenik bakteri karanlık fermentasyon ile hidrojen üretir, bu esnada organik substratlar VFA'lara ve alkollere dönüşür. Bu çözünür metabolitler, ışığın varlığında faaliyet gösteren fotosentetik bakteri ile foto fermentasyon yolu ile hidrojen üretmek için daha ileri kullanılabilir. Bu yüzden karanlık ve foto fermentasyonun birlikte kullanımı ile oluşan hibrid sistemler teorik olarak maksimum verim sağlar [38].

Gerek bioproses parametrelerinin optimizasyonu gerekse mikrobiyal popülasyonlara uygulanabilecek genetik yaklaşımlar ile stokiyometrik değerde hidrojen verimine ulaşılması üzerine araştırmalar devam etmektedir. Laboratuvar düzeyinde olan bu araştırma sonuçlarının endüstriyel ölçekte de uygulanabilmesi bu yöndeki çabaları daha da teşvik edecektir.

#### KAYNAKLAR

- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de Leon-Rodriguez, A., Flores, E.R., Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 4296-4304, 2009.
- Nath, K., Das, D., Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 520-529, 2004.
- Alvarez, M.J., Biomethanization of the organic fraction of municipal solid waste, pp 1-43, IWA Publishing, London, 2003.
- Manish, S., Banerjee, R., Comparison of biohydrogen production processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 279-286, 2008.
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M., Hydrogen production by fermentative consortia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1000-1013, 2009.
- Bartacek, J., Zabranska, J., Lens, P.N.L., Developments and constraints in fermentative hydrogen production, *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1, 201-214, 2007.
- Kim, D.H., Han, S.K., Kim, S.H., Shin, H.S., Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2158-2169, 2006.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wreenn, B.A., Domiguez-Espinosa, R., Production of bioenergy and biochemical from industrial and agricultural wastewater, *Trends in Biotechnology*, 22, 477-485, 2004
- Nandi, R., Sengupta, S., Microbial Production of Hydrogen: An Overview, *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1), 61-84, 1998.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?, *Trends in Biotechnology*, 27, 287-297, 2009.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., Skonieczny, M.T., Yargeau, V., Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production, *Indian J Microbiol*, 49, 48-59, 2009.
- Das, D., Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7349-7357, 2009.
- Wang, J., Wan, W., Factors influencing fermentative hydrogen production: A review, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799-811, 2009.
- Wongtanet, J., Sang, B.I., Lee, S.M., Pak, D., Biohydrogen production by fermentative process in continuous stirred-tank reactor, *International Journal of Gren Energy*, 4, 385-395, 2007.
- Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7441-7447, 2009.
- Krupp, M., Widmann, R., Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 4509-4516, 2009.
- Hallenbeck, P.C., Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7379-7389, 2009.
- Kapdan, I.K., Kargı, F., Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582, 2006.
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatrisme-Mondragon, F., de Leon-Rodriguez, A., Rosales-Colunga, L.M., Razo-Flores, E., Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 7, 27-45, 2008.
- Skonieczny, M.T., Yargeau, V., Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and substrate

- concentration, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 3288-3294, 2009.
21. Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Hassan, M.A., Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 3277-3287, 2009.
  22. Mathews, J., Wang, G., Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 7404-7416, 2009.
  23. Kotay, S.M., Das, D., Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials, International Journal of Hydrogen Energy, 33, 258-263, 2008.
  24. Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Domiguez-Espinosa, R., Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater, Trends in Biotechnology, 22, 477-485, 2004.
  25. Alshiyab, H.S., Kalil, M.S., Hamid, A.A., Yusoff, W.M.W., Improvement of Biohydrogen Production under Increased the Reactor Size by *C. acetobutylicum* NCIMB 13357, American Journal of Environmental Science, 5, 33-40, 2009.
  26. Das, D., Veziroğlu, T.N., Advances in biological hydrogen production process, International Journal of Hydrogen Energy, 33, 6046-6057, 2008.
  27. Callı, B., Chung, L.C., Arslan, D., Vanbroekhoven, K., H<sub>2</sub> production potential in thermophilic mixed fermentation, Journal of Environmental Science and Health Part A, 44, 78-86, 2009.
  28. Mandal, B., Nath, K., Das, D., Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*, Biotechnol Lett, 28, 831-835, 2006.
  29. Das, D., Veziroğlu, T.N., Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, International Journal of Hydrogen Energy, 26, 13-28, 2001.
  30. Li, C., 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.
  31. Das, D., Khanna, N., Veziroğlu, T.N., Recent Developments in Biological Hydrogen Production Processes, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 14, 57-67, 2008.
  32. Li, Y.F., Ren, N.Q., Chen, Y., Zheng, G.X., Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria, International Journal of Hydrogen Energy, 32, 755-760, 2007.
  33. Ren, N.Q., Li, Y.F., Wang, A.J., Li, J.Z., Ding, J., Zadsar, M., Hydrogen production by fermentation: Review of a new approach to environmentally safe energy production, Aquatic Ecosystem Health & Management, 9, 39-42, 2006.
  34. Guo, W.Q., Ren, N.Q., Chen, Z.B., Liu, B.F., Wang, X.J., Xiang, W.S., Ding, J., 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, 2008.
  35. Ghosh, D., Hallenbeck, P.C., Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135, Bioresource Technology, 101, 1820-1825, 2010.
  36. Lin, C.Y., Chang, C.C., Hung, C.H., Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures, International Journal of Hydrogen Energy, 33, 2445-2453, 2008.
  37. Chen, W.H., Sung, S., Chen, S.Y., Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 227-234, 2009.
  38. Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., Chen, K., Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 1780-1786, 2009.