

VEDYN TUOTTAMINEN SÄILÖHEINÄSTÄ PIMEÄFERMENTAATIOLLA

Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötieteen pro gradu-
tutkielma
Hanne Tähti
7.9.2007

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaatti-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteen laitos
Ympäristötieteet/Ympäristötekniologia

TÄHTI, HANNE: Vedyn tuottaminen säilöheinästä pimeäfermentaatiolla
Pro gradu: 55s.
Työn ohjaajat: FM Outi Pakarinen, Prof. Jukka Rintala
Tarkastajat: Prof. Christian Oker-Blom ja Prof. Jukka Rintala
Syyskuu 2007

Hakusanat: pimeäfermentaatio, vety, metaani, säilöheinä, NaOH-käsittely

TIIVISTELMÄ

Ilmastonmuutos ja muut ympäristöongelmat ovat lisänneet kiinnostusta uusiutuviin energialähteisiin. Yksi uusiutuvista energialähteistä on biovety, jota muodostuu anaerobisen hajoamisen seurauksena. Vedyn käyttö ei tuota kasvihuonekaasupäästöjä ja polttokennokyössä lopputuotteena muodostuu ainoastaan vesihöyryä.

Tässä työssä tutkittiin säilöheinän (timotei-nurminataseos) käyttöä vedyn ja metaanin tuoton substraattina ja NaOH-käsittelyn vaikutusta vety- ja metaanisaantoihin. Lisäksi verrattiin eri inkubointimenetelmien vaikutusta vetysaantoihin panoskokeissa. Lisäksi tutkittiin metaanintuottoa jatkokäsittelymenetelmänä vedyntuoton hydrolyysijäännökselle, sekä verrattiin näin saatuja energiamääriä.

Biologista vedyntuotantoa pimeäfermentaatiolla on tutkittu melko vähän. Pimeäfermentaatioprosessin rajoitteena ovat olleet alhaiset vetysaannot sekä fermentaatiojäännöksen jatkokäsittelyn tarpeellisuus.

Useat eri tekijät kuten pH, vedyn osapaine, lämpötila, hiilidioksidi- ja happipitoisuudet, ravinteet, redox-potentiaali, ympin ja substraatin laatu sekä näiden suhde vaikuttavat vetysaantoihin ja vedyntuottonopeuteen.

Energiakasvien käyttämistä vedyntuottoon on tutkittu hyvin vähän. Kasvien rakenne on monimutkainen, ja yleensä tarvitaan jonkinlainen esikäsittely kasvin rakenteen hajottamiseksi vedyntuottoon sopivaksi.

Säilöheinästä oli mahdollista tuottaa vetyä, mutta vetysaanto oli alhainen (5,5 ml H₂/gVS). NaOH-käsittely lisäsi vetysaantoa vain vähän, mutta metaanisaantoa se ei lisännyt. Koska säilöheinä on selluloosapitoista, olisi jonkinlainen happokäsittely ollut parempi. Vetyvaiheen kanssa NaOH-käsittely lisäsi metaanisaantoa säilöheinästä 29 %. Kaasufaasin typpihuuhteluilla oli mahdollista lisätä vetysaantoa jopa 75 %, mutta pelkkä paineenpoisto kaasufaasista ei lisännyt vetysaantoa. Vedyn tuotantotehokkuus säilöheinästä pimeäfermentaatiolla oli alhainen verrattuna metaanin tuotantotehokkuuteen. Vedyntuotto pimeäfermentaatiolla sopiikin paremmin kaksivaiheisiin prosesseihin, joko yhdistettynä metaanintuottoon tai vedyn tuottoon valofermentaatiolla.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental Science/Environmental technology

TÄHTI, HANNE: Hydrogen production by darkfermentation from grass silage

Master of Science Thesis: 55 p.

Supervisors: M.Sc. Outi Pakarinen, Prof. Jukka Rintala

Inspectors: Prof. Christian Oker-Blom, Prof. Jukka Rintala

September 2007

Key Words: darkfermentation, hydrogen, methane, grass silage, NaOH-pretreatment

ABSTRACT

Climate change and other environmental problems have increased interest to renewable energy sources. One of the renewable energy sources is biohydrogen, which is produced in anaerobic degradation. In fuel cells hydrogen can be converted to electricity, producing only water vapour as waste product.

The objectives of this study were to evaluate hydrogen and methane production from untreated and NaOH-pretreated grass silage (Timothy-Meadow fescue). Also different kinds of incubation techniques were evaluated. Also methane potential of hydrogen production residues was evaluated and energy contents of methane and hydrogen yields were calculated.

Production of hydrogen by dark fermentation has been studied only a little. The problems have been low hydrogen yields and need to treat the residue that is produced. The yield of hydrogen is affected by many factors like pH, partial pressure of H₂, temperature, carbon dioxide and oxygen concentrations, nutrient composition, redox-potential, nature of inoculum and substrate and their ratio.

There have been only few studies of energy crops as substrate for hydrogen production. Cellulosic biomass has very complex nature and is hard to convert into hydrogen without any pretreatment.

It was possible to produce hydrogen from grass silage, but the hydrogen yield was low (5,5 ml H₂/gVS). NaOH-treatment increased hydrogen yield only a little, but it didn't increase methane yield. Grass silage contains cellulose and some kind of acid treatment could have been better. NaOH-treatment combined with hydrogen production phase increased methane yield by 29 %. Flushing headspace of bottles with N₂ gas increased hydrogen yield by 75 %, but pressure release alone didn't increase hydrogen yield. Energy recovery via hydrogen production from grass silage by dark fermentation was low compared to energy recovery via methane production. Hydrogen production by dark fermentation suits in two-phase processes either combined with methane production or hydrogen production with photo fermentation.

Sisällysluettelo

TIIVISTELMÄ	2
ABSTRACT	3
1. JOHDANTO	6
2. VEDYN TUOTTAMINEN PIMEÄFERMENTAATIOLLA	8
2.1 Tuotantomenetelmät	8
2.2 Olosuhteet	11
2.2.1 Vedyn osapaine	11
2.2.2 pH	12
2.2.3 Lämpötila	14
2.2.4 Redox-potentiaali	15
2.2.5 Ravinteet	15
2.2.6 Hiilidioksidi	17
2.2.7 Happi	18
2.2.8 Bakterikanta	18
2.2.9 Substraatin vaikutus vedyn tuottoon	19
2.2.10 Substraatti:ympäri -suhde ja substraatin konsentraatio	20
3. KASVIT VEDYNTUOTON SUBSTRAATTEINA	21
3.1 Biomassa ja kasvin rakenne	21
3.1.1 Selluloosa	22
3.1.2 Hemiselluloosa	22
3.1.3 Ligniini	22
3.1.4 Täkkelys	23
3.2 Vedyn tuotto kasveista	23
3.2.1 Alkalinen esikäsittely	25
3.2.2 Fermentaatioon soveltuvat kasvit ja timotei-nurminata –seos	25
4. PANOSKOKEET VEDYN TUOTON MÄÄRITTÄMISESSÄ	26
5. AINEISTO JA MENETELMÄT	29
5.1 Substraatit ja ympäri	29
5.2 NaOH-uutto	30
5.3 Vedyntuottokoe	30
5.4 Metaanin tuottaminen vedyntuottovaiheen jäännöksestä	31
5.5 Metaanintuottokoe	31
5.6 Panoskokeiden inkubointimenetelmien vertailu	31
5.7 Analyysit	32
6. TULOKSET	32
6.1 Vedyntuotto säilöheinästä	32
6.2 Metaanin tuottaminen vedyntuottovaiheen jäännöksestä	35
6.3 Metaanintuotto säilöheinästä	36
6.4 Inkubointimenetelmien vaikutus vetysaantoon panoskokeissa	37

7. TULOSTEN TARKASTELU	39
7.1 Metaanintuotto säilöheinästä.....	39
7.2 Vedyntuotto säilöheinästä.....	40
7.2.1 Metaboliatuotteet.....	40
7.3 Metaanin tuottaminen vedyntuottovaiheen jäännöksestä.....	41
7.4 NaOH-käsittely.....	42
7.5 Panoskokeiden inkubointimenetelmän kehittäminen.....	43
7.6 Vedyn ja metaanin tuotantotehokkuuksien vertailu.....	44
8. JOHTOPÄÄTÖKSET	45
9. KIITOKSET	46
KIRJALLISUUSLUETTELO	47

1. Johdanto

Fossiiliset polttoaineet ovat tällä hetkellä pääasiallisin energialähde maailmalla. Niiden saatavuus on kuitenkin rajallista ja ne aiheuttavat ympäristövaikutuksia, kuten kasvihuonekaasupäästöjä. Uusiutuvien energialähteiden käyttö vähentää kasvihuonekaasupäästöjä ja lisäksi uusiutuvat energialähteet voivat olla kotimaisia. Uusiutuvista energialähteistä esimerkiksi biokaasua voidaan tuottaa käyttäen erilaisia uusiutuvia materiaaleja kuten energiakäyttöön kasvatettuja kasveja tai orgaanista jätettä. Jätteiden hyödyntäminen energiantuotannossa vähentää myös jätteiden ympäristökuormitusta (Khanal ym. 2004, Oh ym. 2003).

Kioton sopimus velvoittaa teollisuusmaita vähentämään kasvihuonepäästöjä 5,2 % vuoden 1990 tasosta vuosien 2008-2012 aikana (UNFCCC 1997). Myös EU:n vuonna 2003 julkaiseman biopolttoainedirektiivin tavoitteena on lisätä eri maiden energiaomavaraisuutta, lisätä liikenteen biopolttoaineiden käyttöä, sekä vähentää riippuvuutta öljystä ja muista fossiilisista polttoaineista (Euroopan parlamentti 2003). Eduskunta on säätänyt 13.4.2007 lain biopolttoaineiden käytön edistämisestä liikenteessä, jonka mukaan liikenteen biopolttoaineiden osuus olisi vähintään 2 % vuonna 2008, vähintään 4 % vuonna 2009 ja vähintään 5,75 % vuonna 2010 (Eduskunta 2007). EU:n komissio on uusiutuvia energialähteitä koskevassa etenemissuunnitelmassaan vahvistanut yleiseksi pakolliseksi tavoitteeksi uusiutuvien energialähteiden osuuden nostamisen 20 %:iin kokonaisenergiankulutuksesta vuoteen 2020 mennessä. Lisäksi komission mukaan biopolttoaineiden osuus bensiinin ja dieselin kokonaiskulutuksesta liikenteessä tulisi olla vähintään 10 % vuoteen 2020 mennessä (Euroopan komissio 2007). EU:n komissio on ennustanut lyhyellä ja keskipitkällä aikavälillä lupaavimmin kehittyväksi liikenteen vaihtoehtoiseksi polttoaineeksi biopolttoaineita, keskipitkällä ja pitkällä aikavälillä maakaasua ja pitkällä aikavälillä vetyä (Euroopan komissio 2001).

Yksi uusiutuvista energialähteistä on vety, jota muodostuu esimerkiksi orgaanisen aineen anaerobisen hajoamisprosessin välituotteena (Madigan & Martinko 2006). Vedyn käyttö energiantuotannossa ei aiheuta lainkaan kasvihuonekaasupäästöjä. Vedyn käyttö polttokennoissa tuottaa päästöinä ainoastaan vesihöyryä (Mizuno ym. 2000). Vedyn

energiasisältö on kaikista kemiallisista polttoaineista massayksikköä kohti korkein 120 MJ/kg (vrt. metaani 50 MJ/kg ja bensiini 43 MJ/kg). Lisäksi vety on myrkytön ja sitä on turvallista siirtää putkistoissa ja sen varastointi on helpompaa kuin sähkön. Tällä hetkellä suurin osa vedystä tuotetaan käyttäen fossiilisia polttoaineita. Vetyä voidaan tuottaa myös biologisesti, hyödyntäen erilaisia yhdyskuntien, maatalouden sekä teollisuuden jätteitä ja muita uusiutuvia raaka-aineita, kuten kasveja (Fan ym. 2006c, Han & Shin 2004b).

Vetyä voidaan tuottaa biologisesti useilla eri menetelmillä: suora fotolyysi, epäsuora fotolyysi, vesi-kaasu vaihtoreaktio, valofermentaatio ja pimeäfermentaatio (Levin ym. 2004). Pimeäfermentaatiolla tarkoitetaan orgaanisen aineen hajottamista anaerobisissa olosuhteissa. Se on osoittautunut tällä hetkellä biologisista menetelmistä parhaimmaksi, sillä se on jatkuvatoiminen, se ei vaadi valoa ja vedyntuottonopeudet ovat korkeita (Das & Veziroglu 2001). Rajoitteena ovat alhaiset vetysaannot sekä prosessissa muodostuvan hydrolyysijäännöksen jatkokäsittelyn tarpeellisuus. Vetyä tuottavat bakteerit eivät kykene hajottamaan orgaanista ainesta kokonaan ja prosessissa muodostuu alhaisen molekyylipainon omaavia orgaanisia yhdisteitä. Jatkokäsittelyssä hydrolyysijäännöksestä voidaan tuottaa metaania anaerobisella prosessilla tai siitä voidaan tuottaa lisää vetyä valofermentaatiolla (Eroğlu ym. 2006, Han & Shin 2004b, Redwood & Macaskie 2006).

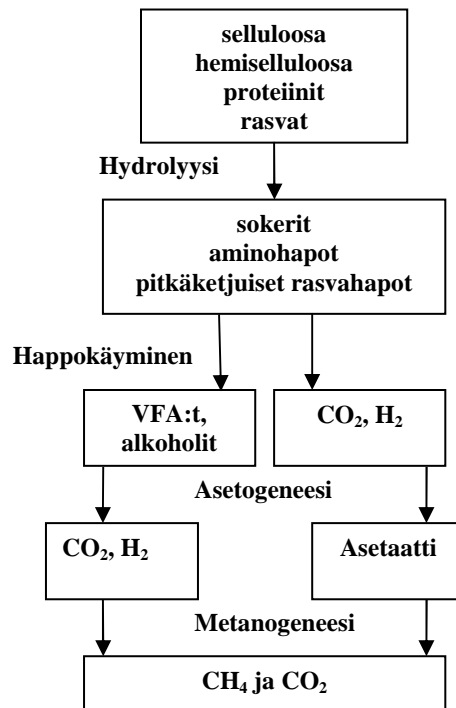
Energiakasvien hyödyntämistä vedyn tuotossa on toistaiseksi tutkittu vähän. Kasveista, kuten vehnänkorsista ja säilöheinästä on mahdollista tuottaa vetyä, mutta koska kasvien rakenne on hyvin monimutkainen, tarvitaan yleensä jonkinlainen esikäsittely kasvin rakenteen hajottamiseksi vedyntuottoon sopivaksi. Esikäsittelyinä on tutkittu mm. happo-, emäs- ja entsyymikäsittelyitä (Adsul ym. 2005, Fan ym. 2006c, deVrije ym. 2002).

Tämän työn tavoite oli tutkia säilöheinän (timotei-nurminataseos) käyttöä vedyn ja metaanin tuoton substraattina ja NaOH-esikäsittelyn vaikutusta vety- ja metaanisaantoon. Lisäksi tavoitteena oli tutkia ja vertailla erilaisten inkubointimenetelmien vaikutusta mitattuihin vetysaantoihin panoskokeissa. Lisäksi tavoitteena oli tutkia metaanintuottoa jatkokäsittelymenetelmänä vedyntuotosta muodostuneelle hydrolyysijäännökselle, sekä vertailla näin saatuja energiamääriä.

2. Vedyn tuottaminen pimeäfermentaatiolla

2.1 Tuotantomenetelmät

Anaerobinen hajoaminen on monivaiheinen prosessi, jossa orgaaninen aines hajoaa lopulta metaaniksi ja hiilidioksidiksi. Ensimmäinen vaihe on hydrolyysi, jossa hydrolyyttisten bakteerien erittämät hydrolyyttiset entsyymit hajottavat monimutkaiset orgaaniset yhdisteet, kuten selluloosan, hemiselluloosan, proteiinit ja rasvat yksinkertaisemmiksi liukoiksi yhdisteiksi, kuten sokereiksi, aminohapoiksi ja pitkäketjuisiksi rasvahapoiksi. Happokäymisessä useat bakteerit hajottavat hydrolyysituotteet edelleen haihtuviksi rasvahapoiksi (VFA), alkoholeiksi, hiilidioksidiksi (CO₂) sekä vedyksi (H₂). Asetogeneesi voi edetä kahta eri reittiä riippuen olosuhteista. Asetogeneesissä asetogeneettiset bakteerit hajottavat alkoholit ja haihtuvat rasvahapot asetaatiksi, vedyksi ja hiilidioksidiksi tai muodostavat vedystä ja hiilidioksidista asetaattia. Viimeisessä vaiheessa metanogeenit muodostavat asetaatista ja vedystä metaania (CH₄) ja hiilidioksidia. Jos metaanintuottovaihe eli metanogeenien toiminta estyy, muodostuu tuotteina vetyä, hiilidioksidia ja haihtuvia rasvahappoja (Kuva 1) (Madigan & Martinko 2006, Meulepas ym.2005, Van Ginkel ym. 2001).



Kuva 1. Anaerobisen hajoamisen vaiheet (Madigan & Martinko 2006, Meulepas ym.2005)

Metanogeenien ja muiden vetyä käyttävien bakteerien toiminta voidaan estää monella tavalla. Vetyä tuottavat bakteerit kykenevät tuottamaan itiöitä ja kestävät korkeampaa lämpötilaa sekä alhaisempaa pH:ta kuin metanogeenit. Yleisin tapa estää metanogeenien toiminta on lämpökäsittellä anaerobinen lieteympäri esimerkiksi keittämällä sitä 30-60 minuuttia. Näin saadaan valikoitua vetyä tuottavia bakteereita ei-itiöitä tuottavien vetyä käyttävien bakteerien kuten metanogeenien sijaan (Hussy ym. 2005). Myös nitraatin tai natrium bromietaanisulfonihappo (BES) lisäys, alhainen pH ja jatkuvatoimisissa reaktoreissa lyhyt viipymä estävät metanogeenien toimintaa ja vedyn tuotto voi lisääntyä (Kim ym. 2004a, Kotsopoulos ym. 2006). Lämpökäsittely saattaa olla joissain tapauksissa epäedullista vedyn tuoton kannalta, sillä siinä valikoituvat pois kaikki ei-itiöitä tuottavat fakultatiiviset anaerobit, joista osa kykenee myös vedyn tuottoon. Jäljelle jäävät itiöitä muodostavat *Clostridia*-bakteerit, jotka ovat herkkiä pienillekin määrille happea (Hussy ym. 2005, Van Ooteghem 2001).

Vetyä tuottavia bakteereja ovat mm. *Clostridia*-, *Esherichia*-, *Citrobacter*- ja *Bacillus*- suvut (Brock ym. 1984, Frobisher ym. 1974). *Clostridia*-bakteerit on jaoteltu proteolyttisiin ja sakkaryolyttisiin sen mukaan, mitä orgaanista ainesta ne fermentoivat. Proteolyttiset *Clostridia*-bakteerit hajottavat proteiineja ja aminohappoja ja sakkaryolyttiset hiilihydraatteja (Brock ym. 1984). Sakkaryolyytteja on tutkittu laajasti, sillä niiden tuottamat vetysaannot ovat suuria (Khanal ym. 2004).

Yksi tutkituista sakkaryolyyteistä on *Clostridium Butyricum*, joka tuottaa fermentaatiotuotteena butyraatin lisäksi hiilidioksidia, asetaattia ja vetyä (Stanier ym. 1971). Noin 50 % kaikista *Clostridia*-tyypin bakteereista, joita on eristetty, käyttävät tätä fermentaatioreittiä. Muita sakkaryolyyttejä ovat mm. *Clostridium arcticum*, joka tuottaa fermentaatiolopputuotteenaan propionaattia, *Clostridium coccooides*, joka tuottaa meripihkahappoa ja *Clostridium barkeri*, joka tuottaa maitohappoa (Khanal ym. 2004).

Clostridia-suvun bakteerit ovat obligaatit anaerobisia heterotrofeja (Frobisher ym. 1974). Laji tuottaa vetyä käyttämällä butyraatti-ferredoksiini-oksidoreduktaasi- ja hydrogenaasi - entsyymejä. Hydrogenaasin toiminta estyy alhaisessa pH:ssa. Joissakin tapauksissa

hydrogenaasin toiminta saattaa estyä myös korkeissa vetytitoisuuksissa (Khanal ym. 2004, Schlegel 1988).

Hiilihydraatit ovat osoittautuneet parhaimmiksi substraateiksi vedyn tuottoon pimeäfermentaatiolla. Glukoosi, heksoosin isomeerit ja polymeerit tärkkelyksen tai selluloosan muodossa muodostavat erilaisia määriä vetyä glukoosimoolia kohden riippuen fermentaatioreitistä ja lopputuotteista. Kun lopputuotteena on asetaatti, teoreettinen maksimisaanto on 4 mol H₂/mol glukoosia (Madigan & Martinko 2006).



Kun lopputuotteena on butyraatti, teoreettinen maksimisaanto on 2 mol H₂/mol glukoosia (Schlegel 1988).



Koska bakteerit tuottavat joko asetaattia, butyraattia, butanolia, etanolia, asetonia tai 2-propanolia riippuen olosuhteista (vedyn osapaine, pH), niin käytännössä korkeimmat saannot vetyä saadaan, kun lopputuotteina on sekä asetaattia että butyraattia (Brock ym. 1984, Stanier ym. 1971, Vavilin ym. 1995). Saannot ovat pienemmät, kun lopputuotteina ovat propionaatti ja pelkistyneet lopputuotteet kuten alkoholit ja maitohappo. Pelkistyneet lopputuotteet kuten etanoli, butanoli ja maitohappo sisältävät vetyä, joten vety ei vapaudu kaasuna. Jotta vedyntuotanto saataisiin maksimoitua, tulee bakteerien metabolia saada suuntautumaan pois alkoholeista ja muista pelkistyneistä lopputuotteista ja saada ne tuottamaan VFA:ita (Levin ym. 2004).

Fermentaatiossa muodostuneiden metaboliatuotteiden jakauma on tärkeä arvioitaessa vedyn tuoton tehokkuutta. Asetaatti, propionaatti, butyraatti ja etanoli ovat yleensä hiilihydraattien fermentaation lopputuotteina (Madigan & Martinko 2006, Yu & Mu 2006). *I*-butyraatti, valeraatti, *i*-valeraatti ja kapronihappo taas liittyvät proteiinien hajoamiseen (Madigan & Martinko 2006, Yu & Fang 2001). Erilaisista bakteerikannoista ja operointiolosuhteista riippuen erilaisten substraattien kohdalla lopputuotteet ja niiden jakaumat voivat olla hyvinkin erilaisia (Yu & Mu 2006).

Yleensä vedyn tuotto on tehokkainta, kun butyraatin osuus on vallitseva ja propionaatin osuus pienin (Chang ym. 2002, Han & Shin 2004, Lee ym. 2006). Propionaatin muodostuminen kuluttaa vetyä. Kun 1 mooli propionaattia muodostuu, kuluu samalla 1 mooli vetyä (Kim ym. 2006, Lee ym. 2006). Siksi suurta propionaatin tuotantoa voidaan pitää merkinä huonosta vedyn tuotannosta.

Myös *i*-butyraatin, valeraatin, *i*-valeraatin ja kapronihapon muodostuminen kuluttaa vetyä. Termodynaamisten tarkasteluiden perusteella valeraatti luultavimmin muodostuu reaktiossa, jossa vety toimii elektronien luovuttajana, ja jossa reaktio kuluttaa propionaattia ja hiilidioksidia. Kapronihapon muodostuminen kuluttaa butyraattia, vetyä ja hiilidioksidia. *I*-valeraatti ja *i*-butyraatti muodostuvat butyraatin ja valeraatin isomerisaation tuloksena (Yu ym. 2004).

pH vaikuttaa bakteerien käyttämään fermentaatioreittiin. On esitetty, että butyraatti-tyyppinen fermentaatio tapahtuu pH:n ollessa alle 5 ja propionaatti-tyyppisen fermentaatio pH:n ollessa yli 5, täten alhainen pH estäisi propionaatti-tyyppisen fermentaation (Inanc ym. 1996, Kim ym. 2004a, Lay 2000). Myös kapronihapon muodostuminen on pH:sta riippuvainen, sen sijaan valeraatin muodostuminen ei riipu pH:sta. Jos valeraatin ja kapronihapon pitoisuudet kasvavat suuriksi, saattaa solukalvojen pH-gradientti alentua ja estää solujen kaiken metabolisen toiminnan (Mu ym. 2006b).

2.2 Olosuhteet

Bakteerien metabolia muuttuu olosuhteiden, kuten pH:n sekä ravinteiden ja metaboliatuotteiden pitoisuuden mukaan. Vedyn saantoa voidaan lisätä kontrolloimalla metaboliatuotteiden koostumusta ja määrää (Tanisho ym. 1998).

2.2.1 Vedyn osapaine

Vedyn osapaine vaikuttaa merkittävästi vedyn tuottoon. Anaerobiset ja fakultatiivisesti anaerobiset bakteerit tuottavat molekulaarista vetyä hajottaessaan orgaanista ainesta. Jos molekulaarinen vety poistetaan välittömästi, lisääntyy bakteerien aktiivisuus muodostaa vetyä,

jotta termodynaaminen tasapaino säilyisi (Liang ym. 2002). Jos vetypitoisuus nousee, niin vedyn tuotto laskee, sillä bakteerit siirtyvät tuottamaan pelkistyneempiä tuotteita kuten laktaattia, etanolia, butanolia, asetonia tai alaniinia (Levin ym. 2004).

Jotta vedyn osapaine pysyisi alhaisena, on prosessista poistettava vetyä jatkuvasti. Vetyä voidaan poistaa joko jaksottaista (Owen-menetelmä) tai jatkuvaa menetelmää käyttäen (Owen ym. 1979). Vedyn tuoton todettiin olevan 43 % suurempi, kun käytettiin vedyn poistoon jatkuvaa menetelmää verrattuna jaksottaiseen Owen-menetelmään (Logan ym. 2002).

Vedyn osapaineen pitämiseksi alhaisena on kehitetty muitakin tekniikoita. Vety voidaan absorboida metalleihin kuten Pd:iin tai LaNi₅:iin. Vety voidaan poistaa keittämällä tai haihduttamalla, tai kierrättämällä kaasua (Van Groenestijn ym. 2002). Reaktoriin voidaan asentaa erilaisia kalvoja, kuten silikoni-kumi- kalvo, joiden kautta kaasu voidaan poistaa. Kalvotekniikka paransi tutkimuksen mukaan vedyn tuottoa 15 % (Liang ym. 2002). Reaktoria voidaan myös huuhdella typpi- tai argon -kaasulla, jolloin ylimääräinen vety saadaan huuhdottua pois reaktorista (Mizuno ym. 2000, Oh ym. 2002). Reaktorin huuhtelu typpikaasulla paransi vedyn tuotantoa 68 % verrattuna tilanteeseen, jossa reaktoria ei huuhdeltu (Mizuno ym. 2000).

2.2.2 pH

Tyypillisessä anaerobisessa prosessissa *Clostridia*-bakteerit tuottavat vetyä eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. Kun populaatio saavuttaa stationaarisen kasvun vaiheen, reaktio muuttuu vedyn/happojen tuotosta liuotinten, kuten asetonin, tuotantoon. Tämä muutos tapahtuu, kun pH laskee alle 4,5. Ilmeisesti VFA:iden ja vedyn kerääntyminen eksponentiaalisen kasvunvaiheessa aiheuttaa tämän muutoksen, sillä anaerobiset vetyä tuottavat bakteerit eivät kykene hajottamaan näitä happoja (Khanal ym. 2004, Oh ym. 2002). Joidenkin tutkijoiden mukaan tämä muutos tapahtuu entsyymisynteesin seurauksena pH:n ollessa yli 5,7. Siksi on tärkeää poistaa ylimääräinen vety ja pitää pH bakteerikannalle sopivalla tasolla, jotta vedyn tuotanto pysyisi käynnissä. Jos vetyä kertyy, korkean molekyylipainon omaavat hapot kuten butyraatti ja propionaatti alkavat kerääntyä ja pH laskee. Liian alhainen pH saattaa inhiboida

vedyn tuotantoa. Se voi aiheuttaa mikrobipopulaation muuntumisen vetyä kuluttavaksi populaatioksi ja aiheuttaa näin vedyn tuoton loppumisen (Khanal ym. 2004).

VFA:iden poistaminen liuksesta lisää vedyn tuottoa, sillä niiden poistaminen estää pH:n laskun liian alas. VFA:iden poistamiseen voidaan käyttää γ -alumiinioksidia (Liang ym. 2001).

pH:n vaikutusta vedyn tuottoon on tutkittu paljon ja tulokset ovat vaihtelevia. Tulosten erilaisuus selittyy osittain erilaisten bakteerikantojen ja substraattien käytöllä. Joidenkin tutkimusten mukaan optimaalinen pH vedyn tuotannolle olisi 6-8. Tätä korkeammassa tai matalammassa pH:ssa vedyn tuoton on todettu selvästi vähenevän ja pH:ssa 4 vetyä ei muodostuisi lainkaan (Liu ym. 2004, Oh ym. 2002). Tuotettaessa vetyä sakkaroosista lietepatjareaktorissa (UASB) maksimivetyosaanto ja -vedyntuottonopeus saavutettiin pH:ssa 4,2, kun tutkittavina olivat pH:t välillä 3,4-6,3 (Mu ym. 2006b). Useissa tutkimuksissa optimaalinen pH on ollut 5-5,5 (Fan ym. 2006a, Fang & Liu 2002, Lay 2000, Van Ginkel ym. 2001).

Myös inkuboinnin alku-pH vaikuttaa vedyn tuottoon. Mitä korkeampi pH on alussa, sitä pienempi on kokonaisvedyntuotto. Korkeammalla alku-pH:lla vedyn tuotto alkaa aikaisemmin ja vedyntuottonopeus on suurempi, mutta tuoton kesto on lyhyempi, joten kokonaisvedyntuotto jää alhaisemmaksi (Fang ym. 2006, Khanal ym. 2004). Mitä korkeampi alku-pH on, sitä enemmän pH laskee vedyn tuoton alkamisen jälkeen. Tämä ilmeisesti aiheutuu nopeasta vedyntuotosta, jonka seurauksena myös VFA:iden tuotto kasvaa nopeasti prosessia inhiboivalle tasolle. Jos inkuboinnin alku-pH on tarpeeksi alhainen (4,5), ehtivät vetyä tuottavat bakteerit mukautua olosuhteisiin, eikä laskevan pH:n aiheuttamaa inhiboivaa vaikutusta synny. Inkuboinnin alku-pH:n vaikutus vedyntuottonopeuteen on voimakkaampi huonommin hajoaville yhdisteille. Esimerkiksi tärkkelys on hydrolysoitava ennen kuin bakteerit voivat käyttää sitä ravintonaan, joten vedyntuottonopeus on muutenkin hitaampi kuin esimerkiksi sakkaroosilla. Tutkimuksessa, jossa tutkittiin pH:n vaikutusta prosessin lopputuotteiden jakaumaan substraatteina sakkaroosi ja tärkkelys, alku-pH vaikutti voimakkaammin tärkkelyksellä kuin sakkaroosilla (Khanal ym. 2004).

2.2.3 Lämpötila

Lämpötila vaikuttaa substraatin hajoamiseen, lopputuotteiden jakaantumiseen sekä bakteerien kasvuun ja jakaumaan fermentaatioreaktorissa (Mu ym. 2006). Fermentaatioreaktiot voivat tapahtua psykrofiilisissa (0-20 °C), mesofiilisissa (20–40°C), termofiilissa (40–65 °C) tai äärimmäisen termofiilisissa (>65 °C) olosuhteissa (Schlegel 1988).

Vedyn tuoton optimilämpötila vaihtelee riippuen bakteereista ja hiililähteestä sekä muista olosuhteista (Taulukko 1). Useimmiten termofiilisissa olosuhteissa vedyntuottonopeus ja vedyntuottopotentiaali ovat korkeammat kuin mesofiilissa olosuhteissa (Shin ym. 2004, Yu ym. 2002). Yleensä lämpötilan nostaminen kasvattaa vedyntuottopotentiaalia ja -nopeutta, sillä lämpötilan nostaminen lisää reaktionopeuksia ja bakteerien vedyn tuoton aktiivisuutta reaktiokineettisten periaatteiden mukaisesti (Lee ym. 2006). Substraatin hajoaminen saattaa noudattaa eri hajoamisreittiä termofiilisissa olosuhteissa verrattuna mesofiilisiin olosuhteisiin, joten esimerkiksi propionaatin tuotto on alhainen termofiilisissa olosuhteissa (Shin ym. 2004). Termofiiliset ja äärimmäisen termofiiliset olosuhteet estävät myös prosessin kontaminoitumista metanogeenista (Shin ym. 2004, Van Groenestijn ym. 2002). Lämpötilan noustessa kaasujen liukoisuus veteen pienenee. Mitä korkeampi lämpötila, sitä paremmin anaerobista prosessia inhiboivat kaasut (H₂, NH₃ ja H₂S) poistuvat nesteestä.

Taulukko 1. Vedyn tuoton optimilämpötiloja erilaisille ympeille ja substraateille jatkuvatoimisissa reaktoreissa ja panoskokeissa.

Ympäristö	Substraatti	Optimi lämpötila °C	Tutkitut lämpötilat °C	Viite
Jätevesiliete	Glukoosi	41	33-41	Mu ym. 2006
Y19-bakteeri	Glukoosi	36	24-40	Oh ym. 2003
Mesofiilinen ja termofiilinen bakteerikanta	Biojäte	55	35 ja 55	Shin ym. 2003
Jätevesiliete	Viinitislaamon jätevesi	55	20-55	Yu ym. 2002
Jätevesiliete	Sakkaroosi	40	30-45	Lee ym. 2006
Rikastettu viljasta	Sakkaroosi +ravinteet	35	25,35,40,45	Zhang & Shen 2006
Anaerobireaktorin liete	Kotitalousjäte	55	35 ja 55	Valdez-Vazquez ym. 2005
Lehmän lanta	Lehmän lanta	60	37-85	Yokoyama ym. 2007

Lämpötilan nostaminen ei kuitenkaan aina lisää vedyn tuottoa. Osa tärkeistä entsyymeistä ja proteiineista, jotka liittyvät solujen kasvuun ja vedyn tuottoon, kuten hydrogenaasi, saattavat inaktivoitua tai denaturoitua, jos lämpötila on liian korkea. Esimerkiksi granulalietteen muodostuminen estyi UASB-reaktorissa yli 35 °C:ssa (Lee ym. 2006).

2.2.4 Redox-potentiaali

Redox-potentiaali on kääntäen verrannollinen kaasun tuottoon, joten sen avulla voidaan ennustaa vedyn tuoton taantuminen (Hussy ym. 2005). Vedyntuoton optimi redox-potentiaali riippuu pH:sta sekä reaktorissa olevien hapettavien ja pelkistävien aineiden pitoisuuksista (Ren ym. 2007).

Tutkimuksessa, jossa ymppinä oli lämpökäsitelty lehmän lanta ja substraattina panimojäte, maksimi vedyntuotto saavutettiin redox-potentiaalilla ollessa -490 mV, kun redox-potentiaali vaihteli -410 – -540 mV:in välillä. (Fan ym. 2006a). Kun substraattina käytettiin sakkaroosia ja sokerijuurikasta, maksimi vedyntuotto saatiin, kun redox-potentiaali oli välillä -250 – -150 mV (Hussy ym. 2005).

2.2.5 Ravinteet

Vetyä tuottavat bakteerit tarvitsevat tiettyjä ravinteita ja hivenaineita aineenvaihduntaan ja kasvamiseen (Lin & Lay 2005).

Magnesium, natrium, sinkki ja rauta ovat tärkeimmät hivenaineet, jotka vaikuttavat vedyn tuottoon. Näistä magnesium on tärkein. Aineet ovat liitoksissa bakteerien entsyymien kofaktoreihin, bakteerien solun sisäisiin kuljetusprosesseihin ja dehydrogenaasiensyymien toimintaan (Lin & Lay 2005).

Rautapitoisuus vaikuttaa eri bakteerien väliseen tasapainoon ja niiden metaboliareitteihin. Raudan lisääminen ei lisää huomattavasti vedyn tuottoa, mutta sen lisääminen on kuitenkin tärkeää pidemmällä ajan jaksolla bakteeripopulaation hengissä säilymisen kannalta. Liian suuret rautapitoisuudet inhiboivat vedyntuottoa (Zhang & Shen 2006). Lämpötila vaikuttaa

raudan optimipitoisuuteen. Entsyymien, kuten hydrogenaasin toiminnan kannalta optimilämpötila on 35 °C. Kun lämpötila on tätä alhaisempi, bakteerit tarvitsevat enemmän rautaioneja pystyäkseen aktivoimaan hydrogenaasientsyymien, joka osallistuu molekylaarisen vedyn tuottamiseen. Kun lämpötila nousee, tarvittavan raudan määrä laskee (Zhang & Shen 2006). Tutkimuksessa, jossa tutkittiin rautapitoisuuden (1,2-100 mg/l) vaikutusta vedyn tuottoon, optimipitoisuus oli 10 mg Fe²⁺/l 35 °C:ssa (Liu & Shen 2004).

Mikrobit tarvitsevat aineenvaihduntaansa tyyppiä (Tanisho ym. 1998). Liian suuri typpipitoisuus saattaa kuitenkin inhiboida vedyn tuottoa (Morimoto ym. 2004). Tutkimuksessa, jossa tutkittiin vedyn tuottoa ruokajätteestä ja jätevesilietteestä, huomattiin, että kun biojätteen joukkoon lisättiin jätevesilietettä, vedyn tuotto kasvoi. Sen arveltiin johtuvan jätevesilietteessä olevasta proteiinista. Proteiinit kuten peptoni ja hiiva ovat parempia typpilähteitä kuin ammoniumsuolat tai urea *Clostridia*-suvun bakteerien aktivoinnin ja kasvun kannalta (Kim ym. 2004b).

Hiili-typpi – suhde (C/N–suhde) vaikuttaa bakteerien metaboliaan. Jos C/N–suhde on korkea, tuottavat bakteerit pelkistyneempiä lopputuotteita ja vedyn tuotto on alhainen, sillä korkealla C/N–suhteella bakteerien tyyppi saanti on rajoittunut. Kun tutkittiin optimaalista C/N–suhdetta vedyntuottoon käyttäen substraattina sakkaroosia, oli optimaalinen C/N–suhde 47 (tutkitut suhteet: 40, 47, 98 ja 130) (Lin & Lay 2004a).

Kun typpilähteenä käytettiin ammoniumvetykarbonaattia (NH₄HCO₃), maksimi vedyntuotto saavutettiin NH₄HCO₃ –pitoisuuden ollessa 5,6 g/l. Suuremmilla ja pienemmilla pitoisuuksilla vedyn tuotto laski. Vaihtelut NH₄HCO₃ –pitoisuudessa saattavat vaikuttaa vetyä tuottavien ja ei-vetyä tuottavien bakteerien väliseen tasapainoon sekaviljelmässä. Lisäys NH₄HCO₃ –pitoisuudessa lisäsi hapon tuottoa jätevedessä. Mitä enemmän NH₄HCO₃:ia lisättiin, sitä enemmän butyraattia ja propionaattia muodostui. Vaihtelut yksittäisten VFA:iden välillä ovat NH₄HCO₃ -pitoisuudesta riippuvaisia (Liu & Shen 2004). Liian suuri NH₄HCO₃ –pitoisuus lisää hiilidioksidin pitoisuutta biokaasussa, joten vedyn osuus pienenee. Suuri NH₄HCO₃ –pitoisuus saattaa myös lisätä ammoniumpitoisuutta ja inhiboida prosessia (Lin & Lay 2004b). Fosfaatti on yksi tärkeistä epäorgaanisista ravinteista, jota tarvitaan optimaaliseen vedyntuottoon. Karbonaatti ja fosfaatti vaikuttivat merkittävästi jätevesilietteen anaerobisten

mikrobien vedyntuottoon (Lin & Lay 2004b). Vedyntuottonopeutta voitiin lisätä 1,9 kertaiseksi käyttämällä sopivaa karbonaatti- ja fosfaattiyhdistelmää. Lisäämällä fosfaattia karbonaatin sijasta puskurikapasiteetin lisäämiseksi, voidaan estää nopeat pH:n muutokset ilman, että se vaikuttaisi bakteerien kasvuun ja niiden vedyntuottoon (Lin & Lay 2004b, Oh ym. 2002).

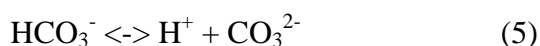
2.2.6 Hiilidioksidi

Hiilidioksidi on yksi tärkeimmistä kaasumaisista lopputuotteista anaerobisessa systeemissä (Lin & Lay 2004b). Korkea hiilidioksidipitoisuus ohjaa bakteerien metabolian pois vedyntuotannosta, sillä tietyissä olosuhteissa asetogeeniset *Clostridia* -bakteerit, kuten *C. acetium* ja *C. thermoautotrophium* tuottavat asetaattia käyttäen hiilidioksidia ja vetyä. Asetogeneesissa homoasetogeeniset bakteerit tarvitsevat hiilidioksidia ja vetyä tuottaakseen asetaattia, joten kun hiilidioksidi poistetaan, voidaan homoasetogeenien toiminta estää ja näin kasvattaa vedyn tuottoa (Liang ym. 2002, Park ym. 2005, Tanisho ym. 1998). Pienentämällä hiilidioksidin pitoisuutta kaasusta, voitiin vedyn tuottoa kasvattaa jopa 43 % (Park ym. 2005).

Hiilidioksidia liukenee veteen (H₂O), jossa se reagoi veden kanssa muodostaen hiilihappoa (H₂CO₃):



Hiilihappo puolestaan dissosioituu bikarbonaatiksi (HCO₃⁻) ja karbonaatiksi (CO₃²⁻):



Hiilidioksidin osapaineen kasvaessa myös hiilihapon pitoisuus kasvaa ja veden pH laskee (Kalff 2002). Hiilidioksidin poistaminen estää siis myös pH:n laskua (Liang ym. 2002). Reaktiot tapahtuvat myös käänteisesti, joten karbonaattipitoisuus korreloi hiilidioksidipitoisuuden kanssa. Kun syötön karbonaattipitoisuutta lisätään, kasvaa myös hiilidioksidin osuus kaasussa. Vähentämällä karbonaattien osuutta substraatissa tai jopa

korvaamalla karbonaattit fosfaateilla, voidaan lisätä vedyn osuutta kaasussa (Lin & Lay 2004b).

2.2.7 Happi

Kun käytetään puhtaita *Clostridia* -viljelmiä, on jonkin pelkistävän aineen kuten kystiinin lisääminen prosessiin tarpeellista, sillä useimmat *Clostridia*-lajit eivät siedä yhtään happea. Kuluttamalla kaiken mahdollisesti jäljellä olevan pienenkin määrän happea ja luomalla samalla pelkistävät olosuhteet, fakultatiiviset anaerobit edistävät obliigaatti anaerobien vedyn tuotantoa halvemmalla kuin jonkin kemikaalin lisäys (Hussy ym. 2005).

Osa anaerobisista bakteereista, kuten *Thermotoga neapolinata*, saattavat tarvita pieniä määriä happea, jotta ne pystyisivät tuottamaan suurempia määriä vetyä. Vaikka *T. neapolinata* kasvaa anaerobisesti, se pystyy kasvamaan ja tuottamaan huomattavia määriä vetyä, kun käytettävissä on alhaisia määriä happea. Siksi hapen poistaminen kokonaan ei ole aina välttämätöntä käytettäessä sekaviljelmiä (Van Ooteghem ym. 2001).

2.2.8 Bakterikanta

Ympäristönä voidaan käyttää joko puhdasta bakteeriviljelmää tai sekaviljelmää. Puhtaita bakterikantoja käytettäessä on useimmiten käytetty obliigaatti anaerobisia bakteereita, kuten joitain *Clostridia*-suvun lajeja, esimerkiksi *Clostridium thermolacticum* (Collet ym. 2004) ja *Clostridium butyricum* (Chen ym. 2005, Yokoi ym. 1998), sillä ne pystyvät tuottamaan parhaimmillaan 2 mol H₂/mol glukoosia. Mutta myös fakultatiivisia anaerobeja kuten *Enterobacter cloacae* (Das ym. 2002) ja *Enterobacter aerogenes* (Tanisho ym. 1998, Yokoi ym. 1998) on käytetty, vaikka niiden vedyntuottokyky on parhaimmillaankin vain 1 mol H₂/mol glukoosia, mutta ne kestävät paremmin hapen läsnäoloa (Yokoi ym. 1998).

Sekaviljelminä on käytetty mm. jäteveden puhdistamon lietettä (Lin & Cheng 2006), karjan lantaa (Fan ym. 2006b) ja multaa (Logan ym. 2002). Eri lähteistä peräisin olevat ympit voivat olla ominaisuuksiltaan hyvinkin erilaisia. Niiden biohajoavuus, substraatin hajoamiseen liittyvä viiveaika sekä niiden sisältämät bakteerimäärät voivat olla erilaisia (Moreno-Andrade

& Buitron 2004). Ymppien soveltuvuus vedyn tuottoon voi vaihdella niiden sisältämien erilaisten bakteerikantojen takia. Erityisesti vetyä tuottavien *Clostridia*-bakteerien määrä on ratkaiseva ja vaihtelee eri lähteistä olevien ymppien välillä. Kun verrattiin kolmesta eri lähteestä peräisin olevan ympin (granulaliete panimojätettä käsittelevästä UASB-reaktorista, lehmän lanta, aktiiviliete jätevedenpuhdistamolta) vedyntuottopotentialiaa, tuotti granulaliete eniten vetyä (Montes-Moncivais ym. 2006). Tästä voitiin päätellä sen sisältävän eniten fermentoivia bakteereita. Aktiivilietteen vedyntuotto oli näistä kolmesta alhaisin. Lehmän lannan sisältämät bakteerimäärät saattavat vaihdella esimerkiksi lehmille syötetyn ravinnon mukaan (Montes-Moncivais ym. 2006).

Kun verrattiin puhtaan *Bacillus Licheniformis* kannan vedyntuottokykyä sekakannan vedyntuottokykyyn, tuotti puhdas kanta 0,6 mol H₂/mol glukoosia ja sekakanta 0,4 mol H₂/mol glukoosia (Kalia 1999).

2.2.9 Substraatin vaikutus vedyn tuottoon

Erilaiset substraatit hajoavat eri tavalla ja bakteerit tuottavat niistä vaihtelevia määriä vetyä. Helposti hajoavista aineista kuten monosakkarideista (glukoosi, galaktoosi, fruktoosi) bakteerit tuottavat nopeammin ja enemmän vetyä kuin monimutkaisemmista korkeamman molekyylipainon omaavista yhdisteistä (polysakkaridit, tärkkelys, selluloosa). Monimutkaisempien yhdisteiden hajoamisessa on pitkiä viiveitä, jotka aiheuttavat viiveitä myös solunkasvuun ja vedyn tuoton alkamiseen (Oh ym. 2002).

Vedyntuotto on suurempi liukoisesta orgaanisesta aineesta kuin kiinteästä orgaanisesta aineesta. Kun substraattina oli elintarviketeollisuudesta erilaisia jätevesiä, tuotti kiinteitä aineita sisältänyt jätevesi vähiten vetyä. Kun jätevesistä tuotettuja vetymääriä verrattiin malliyhdisteistä (glukoosi ja sakkaroosi) saatuihin, tuottivat jätevedet vähemmän vetyä kuin malliyhdisteist. Jäteveden ainesosat ovat usein partikkelimaisia ja niiden molekyylipaino on korkeampi kuin yksinkertaisilla sokereilla. Polysakkaridit täytyy ensin hajottaa pienemmiksi molekyyleiksi, ennen kuin solut voivat käyttää niitä energian tuotantoon (Van Ginkel ym. 2005).

2.2.10 Substraatti:ympäri -suhde ja substraatin konsentraatio

Vedyn tuoton kannalta edullisin substraatti:ympäri -suhde riippuu ympäri ja substraatin koostumuksesta. Yleensä korkeampi substraatti:ympäri -suhde lisää vedyn tuottoa, mutta suhteen noustessa liian korkeaksi vedyn tuotto vähenee (Fan ym. 2004). Liian korkea substraatti:ympäri -suhde aiheuttaa systeemille kuormituksen, joka yhtäkkisesti nostaa vedyn osapaineen, sekä laskee pH:n, jotka voivat inhiboida vedyn tuottoa. Jos korkea kuormitus jatkuu liian pitkään, osa substraatista saattaa jäädä hyödyntämättä tai siitä muodostuu alkoholeja (Van Ginkel ym. 2001).

Panoskokeissa sopiva substraatti:ympäri -suhde vedyntuoton kannalta oli substraatti:ympäri -suhde 4, kun vedyn tuottoa tutkittiin substraatti:ympäri -suhteilla 0,38-6,4 ja ympäri oli ruohokomposti ja substraattina panimojäte. Tätä korkeammalla substraatti:ympäri -suhteella muodostui paljon alhaisen molekyylipainon omaavia yhdisteitä (kuten asetaattia ja butyraattia), jotka inhiboivat vedyn tuottoa (Fan ym. 2004).

Jatkuvatoimisissa reaktoreissa, kuten jatkuvatoimisessa täyssekoitusreaktorissa (CSTR), kuormitusta voidaan säädellä viipymällä. Vedyn tuotossa korkea kuormitus on kineettisesti edullinen, ellei substraatin konsentraatio saavuta tasoa, joka inhiboi prosessia. Tämä koskee useimpia vedyntuottosysteemejä, joissa käytetään puhdasta bakteeriviljelmää. Kuitenkin sekaviljelmässä kuten jätevesilietteellä, tilanne on monimutkaisempi, sillä dominoiva bakteerikanta saattaa muuttua viipymän mukana. Kun kuormitus nousee liian korkeaksi, se inhiboi vedyn tuottajien kasvua ja olosuhteet saattavat muuttua suotuisammiksi ei-vetyä tuottaville bakteereille (Chang ym. 2002).

Kun substraattina käytettiin sakkaroosia, korkea kuormitus johti hiilidioksidia ja propionaattia tuottavien bakteerien lisääntymiseen ja vetyä tuottavien bakteerien vähenemiseen (Chang ym. 2002). Myös käsiteltäessä jatkuvatoimisessa reaktorissa glukoosia, vedyn tuotto kasvoi, kun viipymää pidennettiin ja kuormitus pieneni (Van Ginkel & Logan 2005).

3. Kasvit vedyn tuoton substraatteina

3.1 Biomassa ja kasvin rakenne

Biomassaksi määritellään kaikki orgaaninen materiaali, joka on peräisin kasveista kuten levät, puut ja viljelykasvit. Biomassaan sitoutuu energiaa fotosynteesissä, jossa kasvit muodostavat hiilidioksidista ja vedestä auringon säteilyenergian avulla glukoosia ja happea. Biomassassa on siis auringon energiaa sitoutuneena kasvin kemiallisiin liitoksiin. Kun biomassaa käytetään energian tuottamiseen esim. polttamalla tai fermentaatiossa, hiili-, vety- ja happimolekyylien väliset sidokset katkeavat ja niihin sitoutunut energia vapautuu (Campbell ym.1999, McKendry 2002).

Biomassan kosteuspitoisuus määrittää osaltaan minkälaisella menetelmällä biomassasta kannattaa tuottaa energiaa. Kosteat biomassat, kuten ruohomaiset kasvit, soveltuvat parhaiten biologisiin prosesseihin, kuten fermentaatioon. Sen sijaan kuiva biomassa, kuten puu, soveltuu paremmin poltettavaksi tai kaasutettavaksi. Märkäprosesseja käytetään, kun materiaalin kuivaaminen vaatisi suuren määrän energiaa verrattuna siitä saatavaan energiaan (McKendry 2002).

Selluloosaa sisältävää biomassaa kutsutaan lignoselluloosaksi. Lignoselluloosa muodostuu pääosin selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä, joiden määrät vaihtelevat riippuen kasvista ja ympäristöstä. Ruohomaiset kasvit sisältävät noin 10-30 % ligniiniä, 25-40 % selluloosaa ja 25-50 % hemiselluloosaa (Malherbe & Cloete 2002). Hemiselluloosa on kiinnittyneenä vetysidoksilla selluloosan mikrosäikeisiin, jotka muodostavat tukirangan kasvisoluille. Osassa kasvisoluja on myös ligniiniä, joka antaa lisätukea, ja suojaa kasvia solutuhoilta sekä bakteereilta ja sieniltä. Näiden polymeerien lisäksi kasvit sisältävät myös muita rakennepolymeereja, kuten vahoja ja proteiineja (Taiz & Zeiger 1991).

Kun lignoselluloosa hydrolysoituu, vapautuu sokereita (D-glukoosi, D-galaktoosi, D-mannoosi, D-ksyloosi ja L-arbinoosi) ja useita muita yhdisteitä (mm. furfuraali, hydroksimetyylifurfuraali ja asetaatti), jotka ovat peräisin sokereiden ja ligniinin hajoamisesta. Jotkut sokerien ja ligniinin hajoamisen oheistuotteet saattavat kuitenkin inhiboida

fermentoivia bakteereja. Hydrolysoidusta lignoselluloosamateriaalista voidaan tuottaa metaania, vetyä ja muita fermentaatiotuotteita (Mussato & Roberto 2004).

3.1.1 Selluloosa

Selluloosa on kasvisolujen päärakennusaine (Campbell ym. 1999). Selluloosa on suoraketjuinen polymeeri, joka koostuu β -1-4 -konfiguraatiolla toisiinsa kiinnittyneistä D-glukoosi yksiköistä, jotka ovat pakkaantuneet kiteisesti ja ovat veteen liukenemattomia (Devlin & Witham 1983, Isotalo 1990). Vain harvalla eliöllä on ruoansulatuksessaan entsyymi, joka pystyy hajottamaan selluloosaa, mutta esim. lehmän pötsissä elävät bakteerit pystyvät hajottamaan selluloosan glukoosiksi (Campbell ym. 1999). Selluloosa hydrolysoituu happojen vaikutuksesta (Isotalo 1990).

3.1.2 Hemiselluloosa

Hemiselluloosa on haaroittunut polysakkaridi, joka koostuu D-ksyloosista, L-arbinoosista, D-mannoosista, D-glukoosista ja D-galaktoosista. Hemiselluloosan rakenne ja määrä vaihtelevat kasvilajikkeesta toiseen (Mosier ym. 2005). Pehmeiden puulajikkeiden (havupuut) hemiselluloosa sisältää enemmän mannoosi- ja glukoosiyksiköitä, kun taas kovat puulajikkeet (lehtipuut) ja ruohot sisältävät enemmän ksyloosia (Isotalo 1990, Malherbe & Cloete 2002). Hemiselluloosan haaroittunut rakenne tekee siitä helpommin hydrolysoituvan kuin selluloosa. Hemiselluloosat uuttuvat helposti alkalisilla vesiliuoksilla ja hydrolysoituvat happojen avulla. Hemiselluloosa hajoaa ksyloosiksi, mannoosiksi, asetaatiksi, galaktoosiksi ja glukoosiksi (Isotalo 1990).

3.1.3 Ligniini

Ligniini on kasvien soluseinän pääkomponentti selluloosan ohella. Sen tehtävänä on sitoa kasvisolut toisiinsa ja lujittaa kuitua. Se myös suojaa kasvia taudinaiheuttajilta (Taiz & Zeiger 1991). Ligniini on hyvin epäsäännöllinen ja liukenematon polymeeri. Se sisältää monimutkaisia polymeerejä, jotka koostuvat fenyylipropaniyyksiköistä. Toisin kuin selluloosa

ja hemiselluloosa, ligniiniketju ei koostu toistuvista osayksiköistä ja siksi sitä on vaikea hajottaa entsymaattisesti (Isotalo 1990).

3.1.4 Tärkkelys

Kasvit varastoivat energiaa tärkkelyksen muodossa. Tärkkelys on polymeeri, joka koostuu glukoosimonomeereista. Useimmat näistä monomeereistä ovat liittyneet toisiinsa 1-4 -liitoksella (numero 1 hiilestä numero 4 hiileen), kuten glukoosin yksiköt maltoosissa. Yksinkertaisin muoto tärkkelyksestä on amyloosi. Se on haaroittumaton. Amylopektiini on monimutkaisempi muoto tärkkelyksestä, ja siinä on haaroittuneita polymeerejä 1-6 haarautumiskohdassa. Kasvit varastoivat tärkkelystä solurakenteissa olevissa jyväsissä, joita kutsutaan plastideiksi. Tuottaessaan tärkkelystä, kasvi varastoi ylimääräisen sokerin. Sokeri voidaan myöhemmin ottaa käyttöön tästä varastosta hydrolyysillä, joka rikkoo liitokset glukoosimonomeerien väliltä (Campbell 1999).

3.2 Vedyn tuotto kasveista

Biomassan eli kasvien ja kasviperäisten jätteiden käyttöä vedyn tuoton substraatteina on toistaiseksi tutkittu vähän. Substraatteina on käytetty mm. omenan jätteitä, jyviä (Kalia 1999), herneenpalkoja (Kalia & Joshi 1995), riisi- ja vehnäleseitä sekä tofun tuotantojätettä (Noike & Mizuno 2000), riisiä, porkkanaa ja kaalia (Okamoto ym. 2000) (Taulukko 2).

Taulukko 2. Erialaisten kasvisubstraattien vedyntuottopotentiaaleja

Substraatti	Ympäristö	Vedyntuotto ml/gVS	Viite
Kaali	Anaerobinen liete (biojäte)	26,3 - 61,7	Okamoto ym.2000
Porkkana	Anaerobinen liete (biojäte)	44,8 - 70,7	Okamoto ym.2000
Riisi	Anaerobinen liete (biojäte)	19,3 - 96,0	Okamoto ym.2000
Tofun tuotantojäte	Fermentoitu soijapapu	14,0-21,0	Noike & Mizuno 2000
Riisilese	Fermentoitu soijapapu	31,0-61,0	Noike & Mizuno 2000
Vehnälese	Fermentoitu soijapapu	10,0-43,0	Noike & Mizuno 2000
Omenan jäte	Ei tiedossa	40,0 ^(a)	Kalia 1999
Rikotut jyvät	Ei tiedossa	34,0 ^(a)	Kalia 1999
Herneenpalko	Ei tiedossa	44,0 ^(a)	Kalia 1999
Vehnänkorret, ei esikäsitellyä	Karjanlantakomposti	0,5	Fan ym. 2006c
Vehnänkorret, HCl-esikäsitely	Karjanlantakomposti	68,1	Fan ym. 2006c

(a) ml /g TS

Käytettäessä kasveja tai kasvisperäisiä jätteitä substraatteina, ovat hiilihydraatit vedyn tuoton tärkein lähde. Tutkimuksessa, jossa substraatteina olivat tofun tuotantojäte sekä riisi- ja vehnälese, hiilihydraatit kuluivat nopeasti, mutta proteiinit eivät hajonneet juuri lainkaan. Siksi jäännös, joka jäi jäljelle vedyn tuoton jälkeen, sisälsi kiinteitä aineita sekä proteiineja (Noike & Mizuno 2000).

Anaerobisten bakteerien on vaikeaa hajottaa kasvin osia, kuten viljan korsia, ja tuottaa niistä vetyä, etenkin lyhyen inkubaation aikana, sillä korsien kemiallinen rakenne on monimutkainen. Kasvin korsiosat sisältävät mm. selluloosaa, hemi-selluloosaa, ligniiniä, proteiineja ja rasvoja (Fan ym. 2006c, Noike & Mizuno 2000). Tärkkelystä sisältävistä kasvinosista on helpompi tuottaa vetyä. Tärkkelys hydrolysoituu helposti glukoosiksi ja maltoosiksi happo- tai entsyymikäsittelyssä (Kapdan & Kargi 2006).

Esikäsittelemällä kasvisperäinen substraatti voidaan vedyn tuottoa kasvattaa huomattavasti. Esimerkiksi viljan ruo'ot olisi hyvä jauhaa ja sitten käsitellä joko mekaanisesti tai kemiallisesti ligniinin hajottamiseksi, jonka jälkeen niitä voidaan käyttää VFA:iden ja vedyn tuottoon (Kapdan & Kargi 2006). Esikäsittelemällä voidaan käyttää fysikaalisia, fysikaalis-kemiallisia ja biologisia menetelmiä. Esikäsittelemällä tarkoituksena on poistaa ligniini ja hemiselluloosa, vähentää selluloosan kiteisyyttä ja lisätä materiaalin huokoisuutta. Menetelmän täytyy myös edistää erilaisten sokereiden muodostumista, mutta se ei saa hajottaa niitä enempää (Sun & Cheng 2002).

Tutkimuksessa, jossa vehnän korret esikäsiteltiin keittämällä niitä laimean HCl:n kanssa, esikäsitellystä substraatista voitiin tuottaa vetyä 68,1 ml H₂/gVS, ja ilman esikäsitelyä 0,5 ml H₂/gVS. Verrattuna käsittelemättömiin vehnän korsiiin, todettiin esikäsittelemällä lisänsä liukenevan sokerin määrän 0,2 %:sta 9,6 %:iin, selluloosan määrä väheni 22,5 %:sta 15,4 %:iin ja hemiselluloosan määrä väheni 21,5 %:sta 12,9 %:iin (Fan ym. 2006c).

Esikäsittelemällä tuloksena myös kiintoainepitoisuus (TS -pitoisuus) pienenee, erityisesti ligniinin hajotessa (Kim & Holzapple 2005). Kun tutkittiin vedyntuottoa kotitalousjätteestä, riisi- ja vehnäleseiden vedyntuottopotentiaali laski, kun TS -pitoisuus kasvoi 4 %:sta ylöspäin, vaikka yli 9 % TS -pitoisuudella vedyn tuottoa vielä kuitenkin havaittiin (Noike & Mizuno 2000).

3.2.1 Alkalinen esikäsitely

Biomassan alkaliseen esikäsitelyyn käytetään emäksiä kuten natriumhydroksidia (NaOH) tai kalsiumhydroksidia (Ca(OH)₂). Alkalinen esikäsitely poistaa ligniiniosan hemiselluloosasta ja lisää selluloosan reaktiivisuutta hydrolyysissä (Hamelinck ym. 2005). Alkalisen esikäsitelyn vaikutus riippuu materiaalin ligniinipitoisuudesta (Sun & Cheng 2002). Alkalinen esikäsitely hajottaa esterisidokset kasvin soluseinässä (Wang ym. 2004). Sen seurauksena lignoselluloosamateriaalin huokoisuus lisääntyy. Laimea NaOH- käsittely turvottaa lignoselluloosaa ja lisää sen pinta-alaa. Käsittely myös vähentää rakenteiden polymerisaatiota ja kiteisyyttä, erottaa rakenteellisia sidoksia ligniinin ja hiilihydraattien välillä ja hajottaa ligniinin rakennetta (Sun & Cheng 2002). NaOH-käsitellyn kovapuun biohajoavuus lisääntyi 14 %:sta 55 %:iin ja samalla ligniinipitoisuus väheni 24-55 %:sta 20 %:iin. Myös suhteellisen alhaisen ligniinipitoisuuden (10-18 %) sisältävien korsien NaOH-käsitelyn on todettu olevan tehokasta (Sun & Cheng 2002). NaOH-käsittely lisäsi vehnän korsista saatavan sokerin määrän kolminkertaiseksi verrattuna käsittelemättömiin korsiin (Carrillo ym.2005).

Verrattuna happokäsittelyihin, emäskäsittely hajottaa vähemmän sokereita, eikä haitallisia furaanijohdannaisia muodostu (Carrillo ym. 2005). Toisaalta emäskäsittelyissä muodostuu suoloja, jotka saattavat sekoittaa käsiteltävään biomassaan (Mosier ym. 2005). Emäskäsittelyihin käytettävät reaktorit ovat halvempia kuin happokäsittelyihin käytettävät, mutta toisaalta emäskäsittelyihin käytettävät suolat ovat kalliimpia ja koska ne ovat myös haitallisia ympäristölle, aiheutuu tästä lisäkuluja jätevedenkäsittelystä ja muiden prosessissa muodostuvien jätteiden käsittelystä (Hamelinck ym. 2005).

3.2.2 Fermentaatioon soveltuvat kasvit ja timotei-nurminata –seos

Puumaiset kasvit kasvavat hitaasti ja ne muodostuvat tiukasti toisiinsa sitoutuneista kuiduista. Ruohomaisten kasvien kuidut eivät ole sitoutuneet toisiinsa niin tiukasti, joten ne sisältävät vähemmän ligniiniä. Selluloosan ja ligniinin suhteelliset määrät määrittävät sen, miten hyvin kasvi soveltuu fermentaatioprosessiin substraatiksi. Parhaiten fermentaatioprosessiin soveltuvia kasveja ovat ruoho- ja nurmikasvit sekä tärkkelys- ja sokeripitoiset kasvit (McKendry 2002).

Energiantuotantoon parhaiten soveltuva kasvi tuottaa korkean sadon (maksimi tuotto kuiva-ainetta per hehtaari), sen viljely on halpaa ja vähän energiaa kuluttavaa ja lannoitustarve vähäinen. Kasvilta vaadittavat ominaisuudet riippuvat myös paikallisesta ilmastosta sekä maaperän ominaisuuksista (McKendry 2002).

Nurmikasveja ovat nurmiheinät ja nurmipalkokasvit ja niitä viljellään yleensä useamman eri lajin seoksina (esim. timotei-nurminata). Nurmikasvit tuottavat hyvän sadon ja niiden jälkikasvukyky on hyvä. Nurmikasvit kestävät hyvin hallaa ja niitä voidaan viljellä myös pohjoisessa. Lisäksi nurmenviljely parantaa maan rakennetta ja sitoo ravinteita. Nurmet ovat monivuotisia, joten ne pitävät pellot kasvuston peitossa myös syksyllä ja keväällä (Seppänen & Komulainen 1994).

Timotei talvehtii hyvin, joten sitä voidaan viljellä koko Suomessa. Timotei on nopeasti kasvava ja siitä saadaan sato kahdesti kasvukauden aikana. Timotein juuret ovat melko lyhyet, joten kuivina kesinä timotei saattaa kärsiä kuivuudesta. Toinen Suomessa viljeltävä nurmiheinä on erityisesti säilörehu- ja laidunnurmille soveltuva nurminata. Se menestyy koko maassa. Nurminata kestää timoteita paremmin kuivuutta ja tauteja (Hyytiäinen ym. 1995). Timotei ja nurminata soveltuvat hyvin kasvatettavaksi yhdessä, sillä niiden kasvurytmit ovat lähellä toisiaan (Seppänen & Komulainen 1994). Timotei-nurminata –seoksen sato on n. 9 t TS/ha (Niemeläinen ym. 2002), ja se sisältää vesiliukoisia hiilihydraatteja n. 76 kg/tTS. Sato ja hiilihydraattipitoisuus vaihtelevat kasvuolosuhteiden mukaan (Nousiainen ym. 2003). Liukoisten hiilihydraattien määrä lisääntyy esikäsiteltäessä kasvi (Carrillo ym. 2005, Fan ym. 2006c)

4. Panoskokeet vedyn tuotton määrittämisessä

Vedyn tuottoa voidaan tutkia panoskokeilla. Panoskokeet voidaan tehdä esimerkiksi serumpulloissa, joiden koko vaihtelee 120 ml:sta 2 l:aan. Pulloihin lisätään esikäsitelty ymppi tai jokin puhdas bakteeriviljelmä, substraatti, sekä usein myös ravinneliuos. Ymppi ja substraatti voidaan annostella tietyllä ymppi:substraatti:ravinneliuos –suhteella (Fan & Chen 2004). Ymppi ja substraatti voidaan annostella myös hehkutusjäännöksen (VS) tai TS mukaan niin, että nestetilavuuden VS tai TS on jokin tietty (esim. 0,3 g/l) (Kalyuzhnyi & Davlyatshina

1997, Okamoto ym. 2000). Annostelu riippuu siitä, mitä tutkitaan. Ympin ja substraatin lisäyksen jälkeen pullot täytetään haluttuun tilavuuteen ionivaihdettulla tai tislattulla vedellä (Noike & Mizuno 2000, Van Ginkel ym. 2001). pH säädetään tarvittaessa lisäämällä joko HCl-, NaOH- tai KOH-liuosta (Khanal ym. 2004, Van Ginkel ym. 2001). Jos pH halutaan säilyttää tietyllä tasolla, voidaan lisätä puskuriliuosta. Usein puskuri sisältyy käytettyyn ravinneliuokseen (Mu ym. 2006b). Pullot suljetaan kaasutiivillä kumikorkeilla ja alumiinipuristimilla (Mizuno ym. 2000b). Kaasufaasi huuhdellaan hapettomalla kaasulla, useimmiten argon- tai typpikaasulla (Kalyuzhnyi & Davlyatshina 1997, Noike & Mizuno 2000). Usein pullot sijoitetaan ravistelijaan, joka voi olla taso- tai pyöröravistelijä (Fan ym. 2006c, Kim ym. 2004a). Kokeet suoritetaan yleensä 35-37 °C:ssa, mutta myös korkeampia ja matalampia lämpötiloja on käytetty (Kalyzhnyi & Davlyatshina 1997, Luostarinen ym. 2005, Van Ooteghem ym. 2001).

Ennen kokeiden alkua ympistä ja substraatista määritetään esimerkiksi pH, VS, TS, alkaliniteetti, redox –potentiaali, VFA, kemiallinen hapenkulutus (COD), liukoinen COD (SCOD), hiilihydraattipitoisuus, proteiinit ja Kjeldahltyppi (Chang ym. 2002, Kim ym. 2004a, Lin & Lay 2005). Se mitä määrittämiä on tarpeen tehdä, riippuu ympin ja substraatin ominaisuuksista sekä tutkittavasta asiasta. Kontrollipullojen (pullot, jotka eivät sisällä substraattia) perusteella vähennetään ympin sisältämän orgaanisen aineen hajoamisessa muodostuva vedyn määrä substraatin ja ympin yhdessä tuottamasta vedyn määrästä (Van Ginkel ym. 2001).

Pulloissa muodostuvan kaasun koostumusta mitataan ottamalla kumikorkin läpi näyte ruiskulla sopivin väliajoin ja analysoimalla näyte kaasukromatografilla (Van Ooteghem ym. 2001). Kaasu voidaan myös kerätä kaasupussiin, jolloin muodostuneen kaasun tilavuus määritetään esim. veden syrjäytys –menetelmällä (Morimoto ym. 2004). Kaasun tilavuuden määrittämiseen voidaan käyttää myös esimerkiksi kuplamittaria (Logan ym. 2002) tai respirometria (Park ym. 2005). Vetykokeissa kaasusta määritetään yleisimmin hiilidioksidin, vedyn ja metaanin osuudet kaasuseoksessa (Liu & Shen 2004).

Vedyn tuotossa on aluksi ns. viive-aika, jonka aikana itiöistä muodostuu eläviä soluja. Nämä bakteerisolut tuottavat substraatista vetyä ns. eksponentiaalisessa vaiheessa sekä lopullisessa

saturaatiovaiheessa. Modifioidun Gompertz-yhtälön (6) avulla voidaan simuloida vedyn tuottoa panoskokeissa (Van Ginkel ym. 2001).

$$H_2 = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

missä H_2 on kumulatiivinen vedyntuotto (ml), P on vedyntuottopotentialiaali (ml), t on inkubointiaika (h), λ on viiveaika (h) ja R_m on maksimi vedyntuottonopeus (ml/h). Ominaisvedyntuottopotentialiaali P_s (ml/g substraattia) lasketaan kaavalla:

$$P_s = P/m \quad (7)$$

missä m on lisätyn substraatin määrä (g).

Ominaisvedyntuottonopeus R_s lasketaan kaavalla:

$$R_s = R / \Delta VS \quad (\Delta VS = VS_{\text{kokeen alussa}} - VS_{\text{kokeen lopussa}}) \quad (8)$$

Vetyisaannot ja vedyntuottonopeus voidaan ilmaista monella tavalla, joista osa voidaan muunta toisiksi muuntokertoimien avulla (Taulukko 3).

Taulukko 3. Vetyisaannon ja vedyntuottonopeuksien erilaisia ilmaisutapoja panoskokeissa, sekä muuntokertoimet

Vetyisaanto	Viite
mol /mol heksoosia	Mizuno ym. 2000b
ml / g tärkkelystä	Liu & Shen 2004
ml / g TVS	Fan ym.2006c
mol /mol glukoosia	Tanisko ym. 1998
ml / g sakkaroosi	Lee ym. 2001
mol /mol sakkaroosi	Chen ym. 2005
ml / g COD	Khanal ym. 2004
ml / g VS	Noike & Mizuno 2000
Vedyntuottonopeus	
ml / g-VSS *d	Liu & Shen 2004
ml / l*h	Van Ginkel ym. 2001
mmol / l *d	Lin & Lay 2004a

Muuttuja	Muuntokerroin
Hiilihydraatti g	g VS
Hiilihydraatti g	1,067 g COD
Glukoosi mol	180,156 g
Sakkaroosi mol	342,296 g
H ₂ mol	44,64 ml

Panoskokeissa substraatteina voidaan käyttää erilaisia orgaanisia yhdisteitä, mutta lopputuotteet ovat silti hyvin samanlaisia. Niihin kuuluvat VFA:t, alkoholit, vety ja hiilidioksidi. Tietyissä olosuhteissa *Clostridia*-lajit siirtyvät tuottamaan vedyn ja happojen sijasta alkoholeja. Yleisimmin tuotetut hapot ovat asetaatti, propionaatti ja butyraatti ja yleisimmin tuotetut alkoholit ovat etanoli, propanoli ja butanoli (Lay ym. 2003). VFA:iden ja liuotinten tuotto tapahtuu yhtä aikaa vedyn tuoton kanssa. Siksi VFA:iden pitoisuudet ja suhteet ovat hyviä indikaattoreita vedyn tuoton seurannassa (Lin & Lay 2004a).

Vetysaannot ovat suurimmat, kun lopputuotteina ovat asetaatti ja butyraatti. Koska olosuhteiden merkitys bakteerien kykyyn tuottaa vetyä on suuri, on olosuhteita syytä seurata kokeen aikana. Seurattavia parametreja ovat pH, redox -potentiaali, alkaliniteetti, hiilihydraattipitoisuus, TS, VS sekä VFA:t ja alkoholit (Chen ym. 2005, Levin ym. 2004, Lin & Lay 2005). VFA:t ja alkoholit analysoidaan kaasukromatografilla (Fan ym. 2006a).

Panoskokeissa kaasujen (H_2 ja CO_2) osapaineet kasvavat helposti korkeiksi, jolloin bakteerit tuottavat pelkistyneempiä lopputuotteita ja kuluttavat vetyä (Levin ym. 2004, Liang ym. 2002). Myös metanogeeniset sekä homoasetogeeniset bakteerit käyttävät vetyä (Madigan & Martinko 2006, Meulepas ym. 2005). Sulfaatin, nitraatin ja raudan pelkistyminen kuluttaa myös vetyä, ja osa pelkistävästä bakteereista muodostaa ititöitä (Brock ym. 1984, Frobisher 1974).

5. Aineisto ja menetelmät

5.1 Substraatit ja ympäristö

Tässä tutkimuksessa substraatteina käytettiin säilöheinää, NaOH-uutettua säilöheinää sekä NaOH-uuton nestettä (Taulukko 4). Säilöheinä oli timotei-nurminata-seosta, joka oli säilytetty kesällä 2004 biologisen maitohappobakteeriympin avulla laakasiilossa. Heinä (95 kg) haettiin Kalmarin tilalta 1.11.2004, minkä jälkeen sitä säilytettiin $-20\text{ }^\circ\text{C}$:ssa. Kokeita varten heinä sulatettiin huoneenlämmössä ja silputtiin n. 3 cm kokoon oksasilppurilla. Ympäristönä (Taulukko 4) oli biokaasureaktorin liete Kalmarin tilalta. Biokaasureaktori on mesofiilinen ja siinä käsitellään lehmän lantaa ja makeisteollisuuden sivutuotetta. Laboratoriossa ympäristö

jälkikaasutettiin 7 päivää 35 °C:ssa, minkä jälkeen sitä säilytettiin 4 °C:ssa noin 3 viikkoa. Vetykokeita varten ymppi lämpökäsiteltiin keittämällä sitä 30 minuttia.

Taulukko 4. Substraattien (pakastuksen jälkeen) ja ympin ominaisuudet

Ymppi / Substraatti	TS % ww	VS % ww	pH	SCOD g/l
Käsitlemätön ymppi	5,6	4,3	7,9	12,0
Lämpökäsitelty ymppi	7,8	6,0	9,2	15,9
Säilöheinä	27,2	25,4	4,1	190,0 ^(a)
NaOH-käsitelty kiinteä jäännös	13,6	13,0	6,4	62,4 ^(a)
NaOH-suodos	1,2	0,7	6,4	10,3

(a) mg/gTS

5.2 NaOH-uutto

NaOH-uutto tehtiin 2 l:n lasipulloissa, joihin lisättiin 50 gTS heinää (186,6 g märkäpaino), 2 g 100 %:sta NaOH:ta ja tislattua vettä (866,4 g) siten, että kokonaisnestemäärä oli 1000 ml. Tämän jälkeen pulloja sisältöineen sekoitettiin pyöröravistelijassa 24 h huoneenlämmössä (20 °C). Käsitelyn jälkeen kasvit ja neste erotettiin toisistaan siivilöimällä ne metalliverkolla (reikäkoko n.1 mm). Kasvista ja nesteestä määritettiin TS ja VS.

5.3 Vedyntuottokoe

Substraatteina olivat käsitlemätön säilöheinä, sekä NaOH-uuton kiinteä- (heinä) ja nestefaasi. Kokeissa käytettiin 1 litran lasipulloja. Pulloihin lisättiin 100 ml lämpökäsiteltyä ymppeä. Käsitlemätöntä heinää lisättiin pulloihin niin, että ympin ja käsitlemättömän heinän VS:n suhde oli 1:2. NaOH-uuton kiinteää ja nestefaasia lisättiin pulloihin samassa suhteessa kun niitä muodostui NaOH-uutossa niin, että niiden yhteenlaskettu TS:n määrä vastasi käsitlemättömän heinän TS:n määrää (heinä 12,8 gTS, NaOH-heinä 10,5 gTS ja NaOH-neste 2,2 gTS). Kontrollina oli pelkkä ymppi. Ympin ja substraatin lisäämisen jälkeen pullot täytettiin 650 ml:n tilavuuteen tislattulla vedellä. pH säädettiin 6:een 5 M HCl:lla ja 5 M NaOH:lla. Kaikki käsittelyt tehtiin kolmena rinnakkaisena. Pullojen sisältö huuhdeltiin 2 minuutin ajan typpikaasulla nestepinnan alapuolelta ja pullot suljettiin tämän jälkeen silikonikorkeilla. Näytteet inkuboitiin 55 °C:ssa. Pullojen kaasufaasista määritettiin metaanin,

vedyn sekä hiilidioksidin pitoisuudet. Vedyntuoton loputtua pulloista otettiin 200 ml näytteet, joista määritettiin pH, SCOD ja VFA:t.

5.4 Metaanin tuottaminen vedyntuottovaiheen jäännöksestä

Vetykokeiden loputtua pulloihin lisättiin 250 ml ymppeä (käsittelemätön) sekä 50 ml tislattua vettä. Pullojen sisältö sekoitettiin ravistelemalla ja ne huuhdeltiin 2 minuuttia typpikaasulla. Tämän jälkeen kaasumääritykset tehtiin samalla tavalla kuin metaanintuottokokeessa.

5.5 Metaanintuottokoe

Substraatteina tässä kokeessa oli käsittelemätön säilöheinä, sekä NaOH-uuton kiinteä- (heinä) ja nestefaasi. Kokeissa käytettiin 1 litran lasipulloja. Pulloihin lisättiin 250 ml ymppeä. Käsittelemätöntä heinää lisättiin pulloihin niin, että ympin ja heinän VS:n suhde oli 1:1. NaOH-uuton kiinteää ja nestefaasia lisättiin pulloihin samassa suhteessa kun niitä muodostui NaOH-uutossa niin, että niiden yhteenlaskettu TS:n määrä vastasi käsittelemättömän heinän TS:n määrää (heinä 11,4 gTS, NaOH-heinä 9,3 gTS ja NaOH-neste 2,0 gTS). Ympin ja substraatin lisäämisen jälkeen pulloja täytettiin 750 ml:aan tislattulla vedellä. Kontrollina oli pelkkä ymppeä. Kaikki käsittelyt tehtiin kolmena rinnakkaisena. Pullojen täytön jälkeen pullojen sisältö sekoitettiin ravistelemalla ja niistä mitattiin pH sekä lisättiin puskuriksi vetykarbonaattia 3 g/l. Lopuksi pullojen sisältöjä huuhdeltiin 2 minuuttia typpikaasulla nestepinnan alapuolelta ja ne suljettiin silikonikorkeilla, joihin oli kiinnitetty kaasulinjat sekä kaasupussit. Näytteet inkuboitiin 35 °C:ssa. Kokeen aikana näytteistä määritettiin kaasun koostumus sekä kaasumäärä. Kokeet lopetettiin, kun päivittäinen metaanintuotto alitti 5 ml/d. Kokeiden loputtua näytteistä määritettiin pH, SCOD ja VFA:t.

5.6 Panoskokeiden inkubointimenetelmien vertailu

Substraattina kokeessa käytettiin säilöheinää. Pulloja täytettiin samoin kuin aikaisemmassa vedyntuottokokeessa (kappale 5.4). Kokeessa oli kolme erilaista kaasufaasin käsittelyä. Kontrollinäytteille ei tehty minkäänlaista käsittelyä. Niistä määritettiin ainoastaan kaasun koostumus. Toisessa käsittelyssä pulloista vapautettiin jokaisen kaasumäärityksen jälkeen

ylipaine pois, minkä jälkeen jäljelle jääneen kaasun koostumus määritettiin heti uudestaan. Kolmannessa käsittelyssä vapautettiin jokaisen kaasumäärityksen jälkeen ylipaine pois ja sen lisäksi niiden kaasutilavuutta huuhdeltiin 2 minuutin ajan typpikaasulla.

5.7 Analyysit

TS ja VS määritettiin käyttäen American Public Health Associationin standardimenetelmää (APHA 1998). COD määritettiin Suomen standardisoimisliiton SFS 5504 standardin mukaisesti (Suomen Standardoimisliitto 1988). Säilöheinän ja NaOH-käsitellyn heinän SCOD:in määrittämistä varten tehtiin 24 h kestävä uutto, jonka jälkeen näytteet suodatettiin Schleicher & Schuell GF 50 lasikuitusuodatinpaperin läpi. pH mitattiin käyttäen Metrohm 774 pH-mittaria. Kiinteän aineen (säilöheinä ja NaOH-käsitelty heinä) pH:n määrittämistä varten kasvia ja tislattua vettä sekoitettiin suhteessa 1:2, ja tästä liuoksesta määritettiin pH.

Kaasujen koostumus määritettiin Perkin Elmer Arnel Clarus 500 – kaasukromatografilla. Metaanipitoisuuden määrittämiseen käytettiin kromatografian liekki-ionisaatio detektoria (FID). Ajoasetukset olivat: injektori 225 °C, kolonniuuni 100 °C, detektori 250 °C, kantajakaasuna argon (Ar) 14 ml/min. Kolonnina oli Perkin Elmerin 30m x 0,53mm alumiinikolonne. Vetypitoisuuksien määrittämiseen käytettiin kromatografian lämmönjohtokykydetektoria (TCD). Ajoasetukset olivat: injektori 225 °C, kolonniuuni 200 °C, detektori 230 °C, kantajakaasuna argon (Ar) 15 ml/min. Kolonnina oli 30m x 0,53mm kapillaarikolonne. Kaasutilavuudet määritettiin vedensyrjäytysmenetelmällä. VFA:t määritettiin Perkin Elmer Autosystem XL kaasukromatografilla käyttäen FID:iä. Ajo-asetukset olivat injektori 230 °C, detektori 225 °C ja kolonniuuni 100-160 °C ja kantajakaasuna helium (He). Kolonnina oli HP-INNOWax 30m x 0,32mm x 25 µm kolonne.

6. Tulokset

6.1 Vedyntuotto säilöheinästä

Säilöheinän vedyntuottoa sekä NaOH-käsittelyn vaikutus säilöheinän vedyn tuottoon tutkittiin panoskokeissa, joissa substraatteina olivat säilöheinä ja NaOH-uuton kiinteä- ja nestejäte.

Esikäsittelemätön säilöheinä tuotti eniten vetyä (5,5 ml H₂/gVS_{lisätty}), kun taas NaOH-käsitelty heinä tuotti vetyä 3,2 ml H₂/gVS_{lisätty} (Taulukko 5). Kiinteä- ja nestejakeiden yhdistetty laskennallinen vetysaanto yhden heinätonnin käsittelystä oli 1,6 m³/t ww, kun taas esikäsittelemättömän säilöheinän vetysaanto oli 1,4 m³/t ww.

Kaikissa kokeissa vetypitoisuus laski ajoittain. Säilöheinällä ja NaOH-uuton nestejakeella tehdyssä kokeessa suurimmat vetypitoisuudet olivat toisena koepäivänä, jonka jälkeen vetypitoisuus laski. Säilöheinällä tehdyssä kokeessa vetypitoisuus kuitenkin nousi uudestaan koepäivänä 9. Myös NaOH-käsitellyllä heinällä tehdyssä kokeessa vetypitoisuus nousi toisena koepäivänä, mutta suurin vetypitoisuus havaittiin koepäivänä 13. (Kuvat 2).

Jos säilöheinän ja NaOH-käsitellyn heinän molemmat korkeat vetypitoisuudet huomioidaan, tuotti säilöheinä vetyä 6,9 ml/gVS_{lisätty} (lisäys 25 %) ja NaOH-käsitelty heinän tuotti 4,2 ml/gVS_{lisätty} (lisäys 30 %).

Kaikkien näytteiden pH oli kokeen alussa säädetty 6:een. Kokeen aikana säilöheinän ja NaOH-käsitellyn heinän pH laski, NaOH-nesteen pH nousi ja ympin pysyi samana (Taulukko 5).

Säilöheinän ja NaOH-käsitellyn heinän SCOD-pitoisuus nousi ja NaOH-nesteen SCOD-pitoisuus laski kokeen aikana (Taulukko 5).

VFA:sta suurimman osuuden muodostivat asetaatti, propionaatti ja butyraatti, joista asetaatin osuus kaikissa kokeissa oli suurin (1026-2197 mg/l) (Kuva 3). Myös i-butyraattia, i-valeraattia ja kapronihappoa havaittiin pieniä määriä.

NaOH-neste tuotti myös metaania, joskin tuotossa oli eroja rinnakkaisten näytteiden välillä. Näytteet A ja C olivat tuottaneet metaania 280 ml CH₄/g COD_{lisätty} ja näyte B 100 ml CH₄/g COD_{lisätty}). Näytteiden A ja C metaanipitoisuus nousi voimakkaasti koepäivinä 5.-7. Metaanintuotosta johtuen näissä kahdessa näytteessä pH:t olivat kokeen päätyttyä korkeammat (pH 7,3) kuin näytteessä B, eikä näissä kahdessa näytteessä havaittu VFA-pitoisuuksia

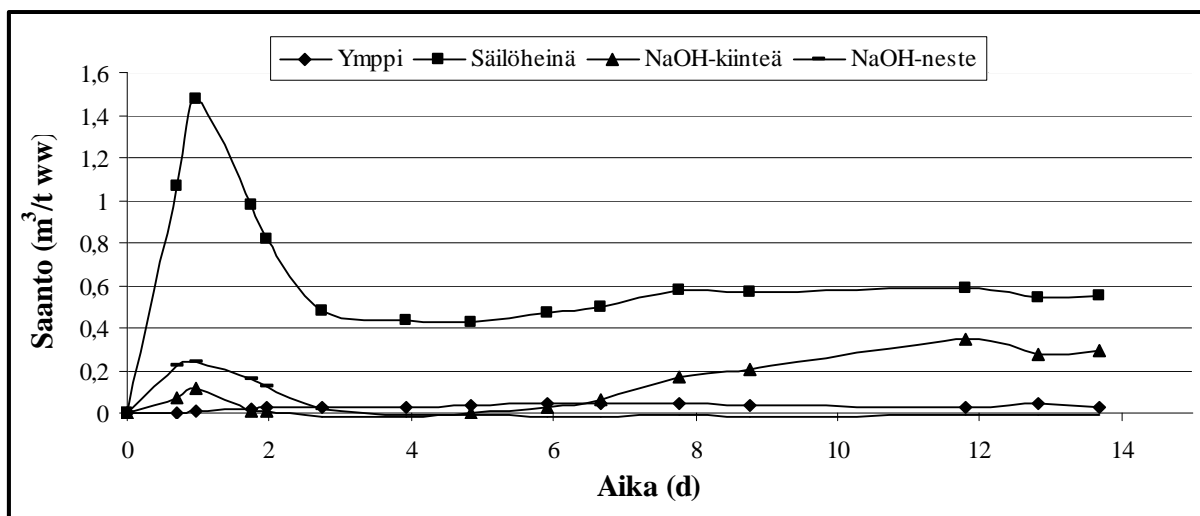
kokeiden päätyttyä. Myös SCOD-pitoisuus oli matalampi (2,5 g/l) kuin näytteessä B. Muut substraattit eivät tuottaneet metaania.

Taulukko 5. Substraattien ja ympin vetysaannot, pH ja SCOD panoskokeissa.

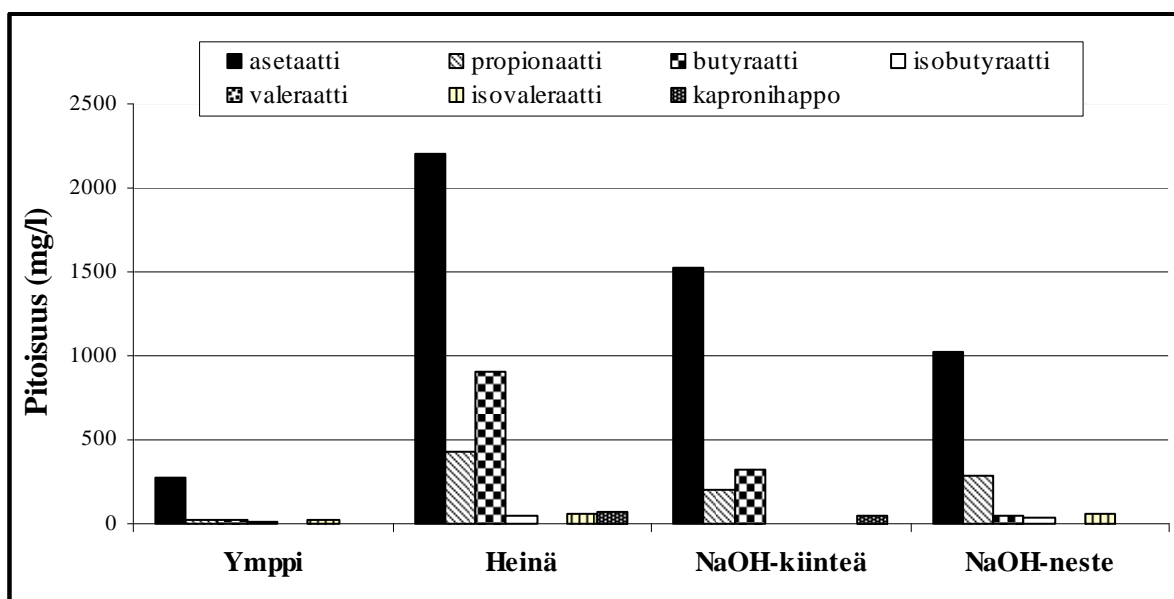
Ymppi/ Substraatti	Saanto		pH		SCOD g/l	
	ml H ₂ /g VS _{lisätty}	m ³ /t ww	Alku	Loppu	Alku	Loppu
Ymppi	0,7±0,6	0,04	6,0	6,2	2,4	2,1
Säilöheinä	5,5±0,6	1,4	6,0	5,0	6,2	7,3
NaOH-kiinteä	3,2±1,1	0,4	6,0	4,8	3,5	3,7
NaOH-neste	20,8±6,0 ^(a)	0,2	6,0	6,3 ^(b)	5,5	3,8 ^(b)

(a) ml H₂/g COD_{lisätty}

(b) vain näyte B huomioitu



Kuva 2. Substraattien ja ympin kumulatiiviset vetysaannot panoskokeissa 55 °C.



Kuva 3. Substraattien ja ympin VFA-pitoisuudet vedytuottokokeiden lopussa.

6.2 Metaanin tuottaminen vedyntuottovaiheen jäännöksestä

Vedyntuottokokeiden jälkeen muodostuvien jäännöksen metaanin tuottoa tutkittiin panoskokeilla.

Esikäsittelemätön säilöheinä ja NaOH-käsitelty heinä tuottivat eniten metaania (532 ml/gVS_{lisätty} ja 564 ml/gVS_{lisätty}) (Taulukko 6 ja Kuva 4). Mutta suhteutettuna märkäpainoon tuotti esikäsittelemätön säilöheinä eniten metaania 134 m³/t ww. Kiinteä- ja nestejakeiden yhdistetty laskennallinen metaanisaanto yhden heinätonnin käsittelystä oli 138 m³/t ww.

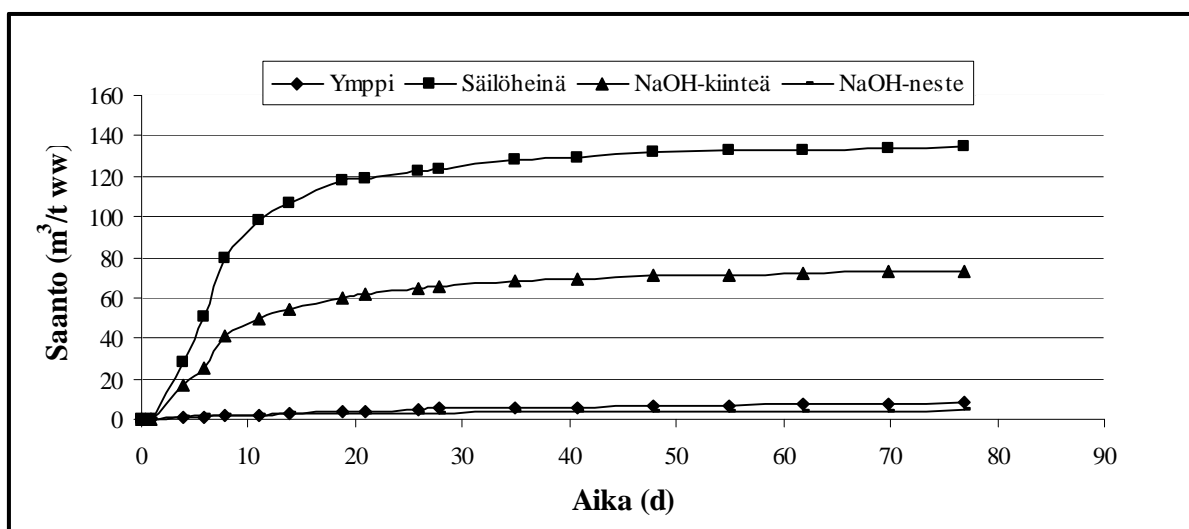
pH:n muutokset olivat vähäisiä ja kaikkien substraattien SCOD-pitoisuudet laskivat kokeen aikana (Taulukko 6).

Taulukko 6. Substraattien ja ympin metaanisaannot, pH ja SCOD vedyntuottovaiheen jälkeen panoskokeissa.

Ymppi/ Substraatti	Saanto		pH		SCOD g/l	
	ml CH ₄ /gVS _{lisätty}	m ³ /t ww	Alku	Loppu	Alku	Loppu
Ymppi	146±32	8,0	7,7	7,4	5,3	3,5
Säilöheinä	532±36	134,4	7,1	7,5	8,4	3
NaOH-kiinteä	565±49	73,0	7,1	7,4	6,2	2,9
NaOH-neste ^(a)	423±0 ^(b)	4,4	7,6	7,5	6,3	3,2

(a) vain pullo B huomioitu

(b) ml CH₄/g COD



Kuva 4. Substraattien ja ympin kumulatiiviset metaanisaannot vedyntuotto vaiheen jälkeen 35 °C:ssa.

6.3 Metaanintuotto säilöheinästä

Säilöheinän metaanin tuottoa sekä NaOH-käsittelyn vaikutusta säilöheinän metaanin tuottoon tutkittiin panoskokeissa, joissa substraatteina olivat säilöheinä ja NaOH-uuton kiinteä- ja nestejake.

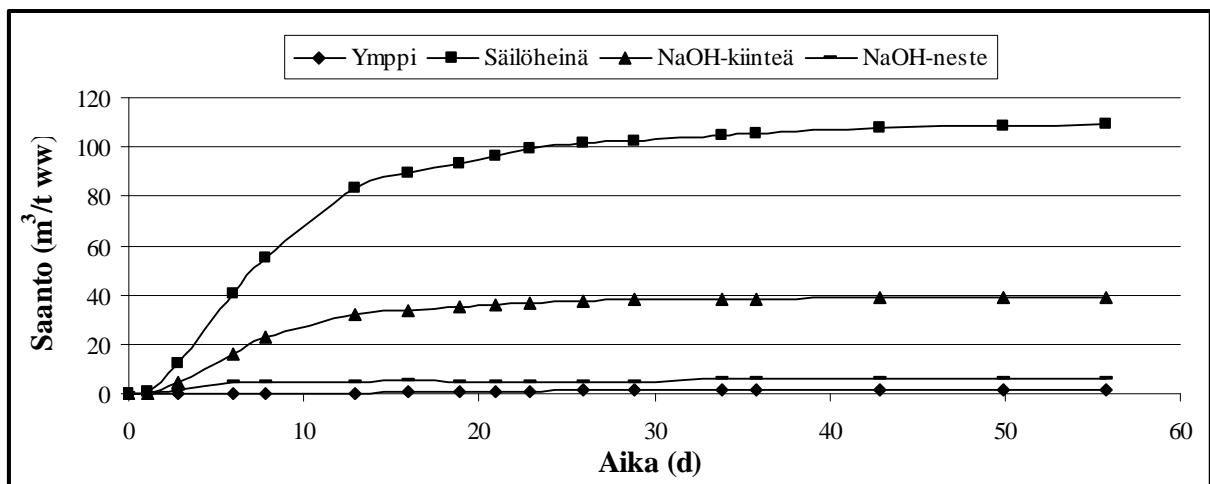
Esikäsittelemätön säilöheinä tuotti eniten metaania (432 ml CH₄/gVS_{lisätty}), kun taas NaOH-käsitelty heinä tuotti metaania 300 ml CH₄/gVS_{lisätty} (Taulukko 7). Myös suhteutettuna märkápainoon esikäsittelemätön säilöheinän tuotti eniten metaania 109 m³/t ww (Kuva 5). Kiinteä- ja nestejakeiden yhdistetty laskennallinen metaanisaanto yhden heinätonnin käsittelystä oli 84,4 m³/t ww.

Kaikkien substraattien pH oli kokeen loputtua 7,4 - 7,5 (Taulukko 7). SCOD-pitoisuus laski noin 60 % kaikilla substraatteilla (Taulukko 7). Kaikissa kokeissa VFA-pitoisuudet olivat lopussa alle määrittäysrajan.

Taulukko 7. Substraattien ja ympin metaanisaannot, pH ja SCOD panoskokeissa.

Ymppi/ Substraatti	Saanto		pH		SCOD g/l	
	ml CH ₄ /gVS _{lisätty}	m ³ /t ww	Alku	Loppu	Alku	Loppu
Ymppi	44,8±4,5	1,9	8,0	7,4	5,3	3,3
Säilöheinä	432±49	109,3	7,0	7,4	8,2	3,0
NaOH-kiinteä	300±31	38,8	7,9	7,4	6,1	2,4
NaOH-neste	492±6,8 ^(a)	5,0	8,0	7,5	7,6	2,4

(a) ml/gCOD



Kuva 5. Substraattien ja ympin kumulatiiviset metaanisaannot panoskokeissa 35 °C:ssa.

6.4 Inkubointimenetelmien vaikutus vetysaantoon panoskokeissa

Kaasufaasin paineenpoiston ja typpihuuhtelun vaikutusta vetysaantoon tutkittiin panoskokeissa.

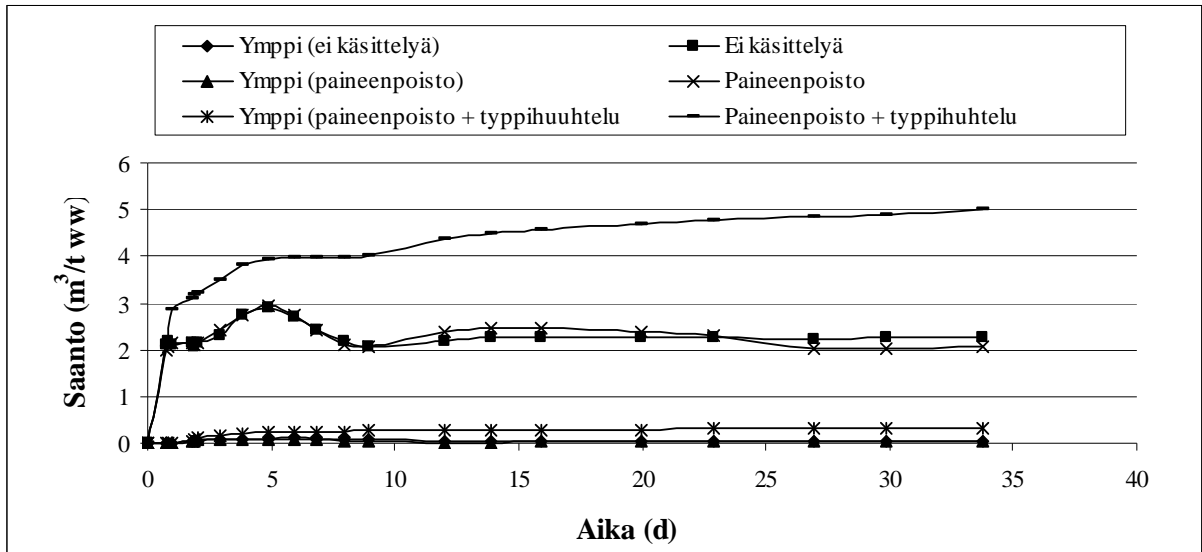
Paineen poisto ja typpihuuhtelu yhdistämällä suurin vetysaanto oli 22,7 ml/gVS_{lisätty} (5,0 m³/tww) (Taulukko 8, Kuva 6). Kaasufaasin paineen poistolla ei ollut vaikutusta vetysaantoon, joten kontrollinäytteiden ja paineenpoistolla käsiteltyjen näytteiden vetysaanto oli yhtä suuri (13,1 ml/gVS_{lisätty} / 2,8 m³/tww) (Taulukko 8, Kuva 6).

Taulukko 8. Eri käsittelyiden vetysaannot

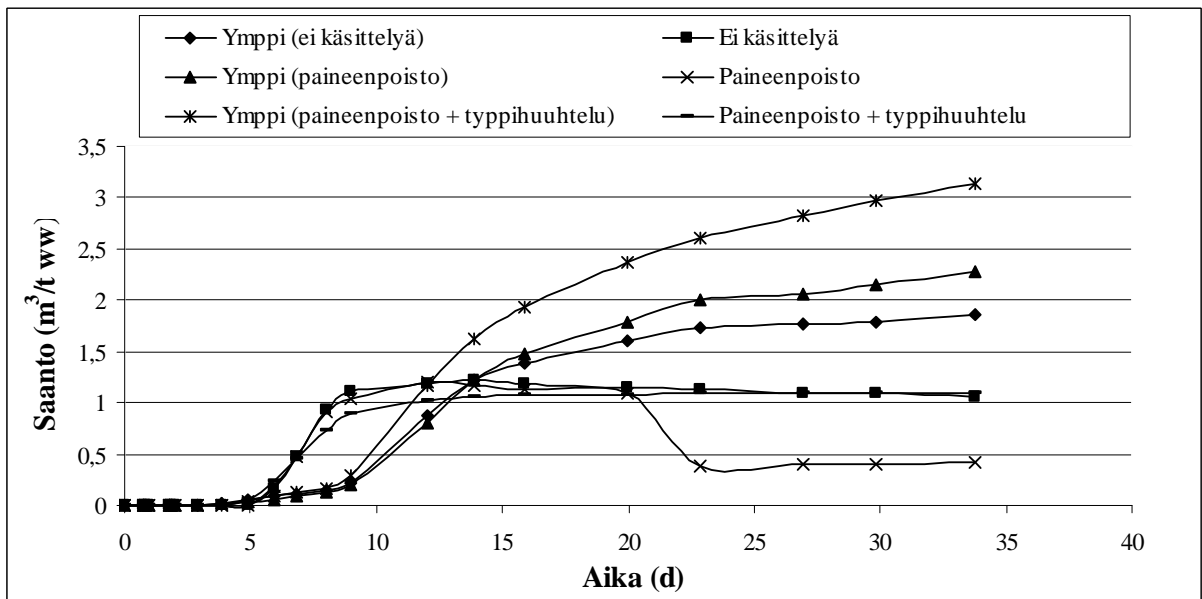
Käsittely	Ymppi saanto ml H ₂ /gVS _{lisätty}	Substraatti saanto ml H ₂ /gVS _{lisätty}
Ei käsittelyä	2,1±1,5	13,1±3,2
Paineen poisto	1,9±1,6	13,1±1,5
Paineen poisto+typpihuuhtelu	5,4±5,3	22,7±2,9

Kaikkien näytteiden pH:t säädettiin kokeiden aluksi 6:een. Ymppien pH:t nousivat 6,5:een, paitsi yhdistetyllä paineenpoistolla ja typpihuuhtelulla käsitelty ymppi, jonka pH nousi 6,9:ään. Kaikissa substraateilla tehdyissä kokeissa pH:t laskivat 5:een.

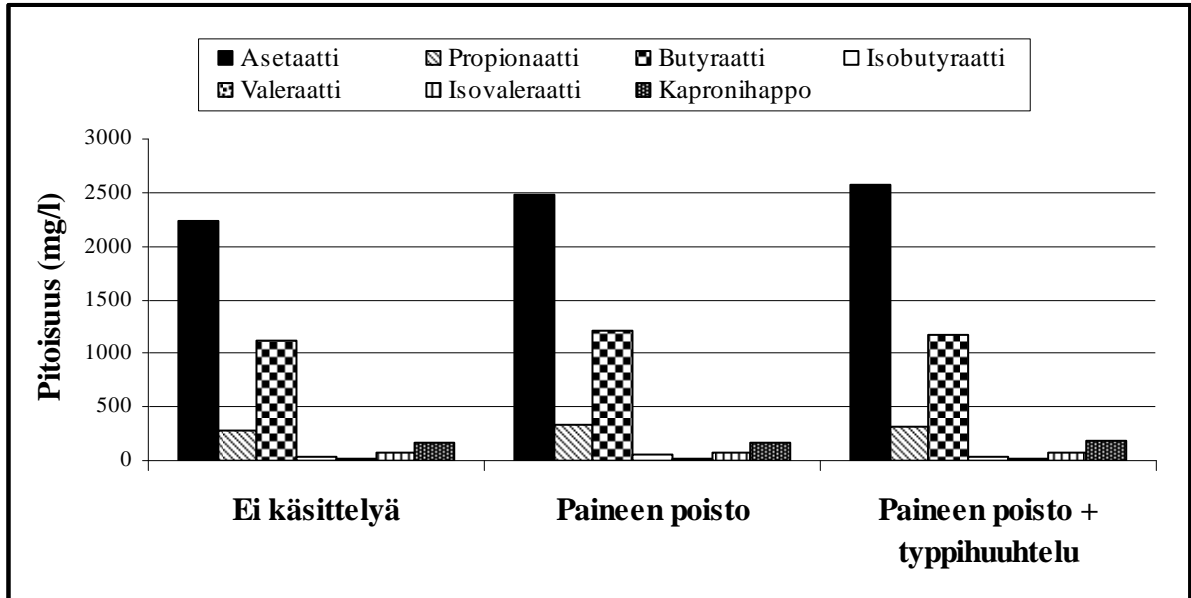
Kaikki substraatit tuottivat myös metaania. Ympit tuottivat metaania enemmän kuin substraatit (Kuva 7). VFA:sta suurimman osuuden muodostivat asetaatti, propionaatti ja butyraatti, joista asetaatin osuus kaikissa kolmessa käsittelyssä oli suurin (2237-2577 mg/l) (Kuva 8).



Kuva 6. Substraattien ja ymppeiden kumulatiiviset vetysaannot eri inkubointimenetelmillä.



Kuva 7. Substraattien ja ymppeiden kumulatiiviset metaanisaannot eri inkubointimenetelmillä. Substraattinäytteiden metaanisaantoihin sisältyy ympin metaanisaannot.



Kuva 8. Eri inkubointimenetelmien vaikutus VFA-pitoisuuksiin kokeiden lopussa.

7. Tulosten tarkastelu

7.1 Metaanintuotto säilöheinästä

Metaanintuottoa substraateista (säilöheinä, NaOH-käsitelty heinä ja NaOH-neste) tutkittiin, jotta voitiin verrata suoraan substraateista saatuja saantoja, vedyntuottovaiheen jäännöksen metaanisaantoihin (kappaleet 7.3 ja 7.6).

Säilöheinän metaanisaanto (432 ml/gVS) oli suurempi verrattuna vastaavaan säilöheinällä tehtyyn kokeeseen, jossa säilöheinän metaanisaanto oli 306 ml/gVS (Lehtomäki ym. 2007). Esimerkiksi kasvin korjausaika voi vaikuttaa kasvin metaanisaantoon, minkä takia säilöheinän metaanisaanto saattaa vaihdella (Lehtomäki ym. 2006).

NaOH-esikäsitelyssä muodostunut neste tuotti enemmän metaania (492 ml CH₄/g COD), kuin on teoreettisesti mahdollista (teoreettinen maksimisaanto 350 ml CH₄/g COD) (Michaud ym. 2005). Joissakin tapauksissa ympäristö ja substraatti voivat tuottaa enemmän metaania yhdessä, kuin mitä molemmat tuottaisivat erikseen synergia vaikutuksen ansiosta (Lehtomäki ym. 2007).

7.2 Vedyntuotto säilöheinästä

Esikäsittelemättömästä säilöheinästä oli mahdollista tuottaa vetyä, mutta vetysaanto oli pieni 5,5 ml/gVS_{lisätty}. Vertailukohtaa muihin tutkimuksiin on vähän, sillä energiakasvien vedyntuottopotentiaalia ei ole juurikaan tutkittu. Toisessa säilöheinän vedyntuottopotentiaalia tutkivassa tutkimuksessa vetyä saatiin 16 ml/gVS (Ronkainen ym.) ja tutkimuksessa, jossa substraattina olivat esikäsittelemättömät vehnänkorret vetyä saatiin 0,5 ml/gVS (Fan ym. 2006c). Hiilihydraattipitoinen, alhaisen ligniinipitoisuuden omaava orgaaninen materiaali on parasta vedyn tuottamiseen. Säilöheinä (timotei-nurminata seos) sisältää n. 76 g/kgTS vesiliukoisia hiilihydraatteja, n. 28 g/kgTS ligniiniä ja n. 271 g/kgTS selluloosaa (Nousiainen ym. 2003), joten siitä on mahdollista tuottaa vetyä. Jonkinlainen esikäsitteleminen olisi kuitenkin tarpeen selluloosan hajottamiseksi glukoosiksi vetysaannon kasvattamiseksi.

Kaikilla substraateilla vetypitoisuus laski ajoittain kokeiden aikana. Vetyä voivat kuluttaa homoasetogeenit, metanogeenit ja sulfaatinpelkistäjäbakteerit (Madigan & Martinko 2006, Meulepas ym.2005). Kokeissa ei havaittu metaania (paitsi NaOH-neste), joten ympäristö on todennäköisesti sisältänyt homoasetogeenia. Homoasetogeenit tuottavat asetaattia käyttäen vetyä ja hiilidioksidia (Madigan & Martinko 2006).

Säilöheinän, NaOH-heinän sekä ympin rinnakkaisissa näytteissä oli sekä vedyn tuotossa, että kulumisessa eroja. Kiinteiden substraattien (säilöheinä ja NaOH-heinä) annostelu on hankalaa niin, että jokaiseen pulloon saataisiin täsmälleen sama koostumus. Myöskään käytetyn ympin koostumus ei ollut kovin tasalaatuista, vaikka se sekoitettiin hyvin ennen kokeiden alkua. On siis mahdollista, että eri pulloissa sisälsivät jossain määrin erilaisen bakteeri- ja substraattikoostumuksen, joka selittää rinnakkaisten näytteiden eron.

7.2.1 Metaboliatuotteet

Pimeäfermentaatioissa muodostuu lisäksi aina VFA:ita. VFA:iden pitoisuuden ja jakauman perusteella voidaan arvioida vedyn tuoton tehokkuutta. VFA:ista suurimman osan muodostivat asetaatti, butyraatti ja propionaatti, joista asetaatin osuus oli kaikissa kokeissa suurin. Sen osuus oli 59-79 %. Butyraatin osuus oli 3-24 % ja propionaatin osuus 6-20 %. Muiden

rasvahappojen, kuten i-butyraatin, valeraatin, i-valeraatin sekä kapronihapon osuudet vaihtelivat 0-5 % välillä. Asetaatin, propionaatin, butyraatin ja vedyn muodostuminen on merkki hiilihydraattien hajoamisesta, kun taas korkeamman molekyyllipainon omaavien VFA:iden kuten i-butyraatin, valeraatin, i-valeraatin ja kapronihapon muodostuminen on merkki proteiinien hajoamisesta (Madigan & Martinko 2006).

Erilaiset sakkarylyttiset *Clostridium*-lajin bakteerit olivat todennäköisesti vastuussa vedyntuotosta, sillä sakkarylyttiset *Clostridiat* fermentoivat sokereita ja tärkkelystä tuottaen butyraattia, asetaattia, vetyä sekä hiilidioksidia (Brock ym. 1984). Myös proteolyttisiä *Clostridia*-bakteereita on todennäköisesti ollut läsnä, sillä säilöheinä sisältää proteiinia 156 g/kgTS (Nousiainen ym. 2003) ja lopputuotteissa havaittiin pieniä määriä i-butyraattia, valeraattia, i-valeraattia ja kapronihappoa.

Yleensä butyraatin tuotanto liitetään korkeaan vedyn tuotantoon (Chang ym. 2002, Han & Shin 2004, Lee ym. 2006), ja butyraatin ja asetaatin suhdetta voidaan pitää hyvänä indikaattorina vedyn tuoton tehokkuudelle (Khanal ym. 2004, Mu ym. 2006b). Myös tässä tutkimuksessa butyraatin määrä korreloi vedyntuoton kanssa. Käsittelemätön säilöheinä tuotti vetyä 1,4 m³/ww, ja lopputuotteet sisälsivät 24 % butyraattia, ja asetaatti-butyraatti –suhde oli 0,41. Sen sijaan NaOH-neste, jonka vedyn tuotto oli pienin, 0,2 m³/ww, lopputuotteet sisälsivät vain 3,28 % butyraattia ja asetaatti-butyraatti –suhde oli 0,05. Propionaatin tuotto liitetään huonoon vedyntuottoon (Lee ym. 2006). NaOH-nesteen lopputuotteista 20 % oli propionaattia, kun muiden substraattien lopputuotteista propionaattia oli 10-12 %.

7.3 Metaanin tuottaminen vedyntuottovaiheen jäännöksestä

NaOH-käsitelystä säilöheinästä ja käsittelemättömästä säilöheinästä voitiin tuottaa vedyntuotossa muodostuneesta jäännöksestä enemmän metaania, kuin ilman vetyvaihetta. NaOH-käsitelystä heinästä voitiin tuottaa 88 % suurempi metaanisaanto ja käsittelemättömästä säilöheinästä 23 % suurempi metaanisaanto vedyntuottovaiheen jäännöksestä kuin ilman vetyvaihetta. NaOH-nesteen metaanisaanto oli sen sijaan 33 % pienempi vedyntuottovaiheen jäännöksestä kuin ilman vetyvaihetta. NaOH-nesteen SCOD- ja VFA-pitoisuudet ennen vedyntuottovaihetta olivat suuremmat kuin NaOH-käsitellyn heinän.

NaOH -käsittelyssä osa kasvin kiinteästä aineesta, kuten hemiselluloosa ja ligniini muuttuvat osittain liukoisiksi (de Vrije ym. 2002). NaOH-neste oli tuottanut jo vetyvaiheessa metaania, joten sen VFA-pitoisuus oli vetyvaiheen jälkeen pienempi kuin muilla substraateilla, eikä siitä tämän takia voitu tuottaa enää metaania varsinaisessa metaanintuottovaiheessa.

Kiinteiden substraattien (käsitlemätön heinä ja NaOH-käsitelty heinä) vedyntuottovaihe on toiminut biologisena esikäsittelynä ja metaanintuotto on parantunut. Myös toisessa tutkimuksessa huomattiin, että vedyntuottovaiheen jälkeinen metaanintuottovaihe tuotti 21 % enemmän metaania, kuin yksivaiheinen metaanintuottoprosessi (Liu ym.2006).

Näyttäisi siltä, että yhdessä NaOH-käsittelyn kanssa vedyntuottovaihe sopii esikäsittelyksi tuottaessa metaania säilöheinästä.

7.4 NaOH-käsittely

NaOH-käsittelyn vaikutus vedyn ja metaanin tuottoon säilöheinästä tutkittiin sekä vedyntuotto- että metaanintuottokokeissa. Metaanintuottokokeessa NaOH-käsittely vähensi metaanin tuottoa. Kun käsittelemättömän säilöheinän saanto oli 109,3 m³/tww, oli NaOH-käsitellyn heinän sekä nesteen yhdistetty saanto 84,4 m³/tww. Lignoselluloosan hydrolyysissä saattaa muodostua ja vapautua prosessia inhiboivia yhdisteitä kuten heikkoja happoja, furaanijohdannaisia ja fenoliyhdisteitä. Esim. fenoliyhdisteitä muodostuu ligniinin osittaisessa hajoamisessa (Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000).

Yhdessä vedyntuottovaiheen kanssa NaOH-käsittely oli parantanut metaanintuottoa verrattuna käsittelemättömään heinään. Kun käsittelemättömän heinän saanto oli 134 m³/t ww, oli NaOH-käsitellyn heinän sekä nesteen yhdistetty saanto 141 m³/t ww. Tähän laskettiin mukaan myös vetyvaiheen NaOH-nesteen metaanintuotto.

Vetykokeessa NaOH-käsittely oli lisännyt vetysaantoa 0,2 m³/t ww (12 %), mutta esimerkiksi tutkimuksessa, jossa käsiteltiin selluloosa pitoista jätettä NaOH:lla, kasvoi vetysaanto 69 % (Fan ym. 2006b). Tässä tutkimuksessa NaOH-uutto tehtiin huoneenlämmössä, mutta muissa tutkimuksissa, joissa NaOH-käsittelyä on käytetty, on käsittely tehty korkeammissa

lämpötiloissa (50-100 °C) (Fan ym. 2006b, de Vrije ym. 2002). Kokeessa säilöheinä silputtiin n. 3 cm:n partikkelikokoon ennen käsittelyä. Käsittely olisi voinut olla tehokkaampi, mikäli heinä olisi silputtu tai jauhettu huomattavasti pienempään partikkelikokoon. Kun elefanttiheinää (*Miscanthus*) käsiteltiin NaOH:lla, mitä korkeampi (tutkitut lämpötilat 50 °C, 70 °C ja 95 °C) käsittelylämpötila oli, ja mitä pienempään (<1 mm) partikkelikokoon heinä oli silputtu, sitä tehokkaammin ligniini hajosi (de Vrije ym. 2002).

NaOH-esikäsittelyä käytetään yleensä ligniinipitoisille materiaaleille, kuten puulle, sillä NaOH-käsittely hajottaa ligniinin rakennetta (Sun & Cheng 2002). Selluloosapitoisille materiaaleille käytetään usein happokäsittelyä, kuten HCl-käsittelyä. HCl-esikäsittelyn on todettu lisäävän liuennan sokerin määrää, sekä vähentävän selluloosan ja hemiselluloosan määrää selluloosapitoisesta materiaalista kuten heinänkorsista (Fan ym. 2005). Kun verrattiin NaOH-esikäsittelyn ja HCl-esikäsittelyn vaikutusta vedyn tuotantoon selluloosapitoisesta jätteestä, lisäsi HCl-esikäsittely vedyntuottoa yli 400 % verrattuna NaOH-käsittelyyn (Fan ym. 2006b).

Timeotei-nurminataseos sisältää ligniiniä noin 28 g/kgTS ja selluloosaa noin 271 g/kgTS (Nousiainen ym. 2003), joten mahdollisesti HCl-esikäsittelyn käyttäminen olisi ollut sopivampi kokeessa käytetylle substraatille.

7.5 Panoskokeiden inkubaatiomenetelmän kehittäminen

Kaasufaasin paineenpoiston ja typpihuuhtelun vaikutusta vetysaantoon tutkittiin panoskokeissa. Kaasufaasin typpihuuhtelulla vetysaanto kasvoi 75 %. Myös muissa tutkimuksissa vetysaannot ovat kasvaneet 48-68 % huuhdeltaessa reaktoria typpikaasulla (Hussy ym. 2005, Mizuno ym. 2000). Fermentaatiolopputuotteena muodostuu vedyn ohella myös hiilidioksidia. Hiilidioksidipitoisuuden on myös todettu vaikuttavan vedyn muodostumiseen, joten hiilidioksidin poistaminen kaasufaasista, esimerkiksi huuhtelemalla kaasufaasia typpikaasulla, lisää vedyn tuottoa (Tanisho ym. 1998). Paineenpoistolla kaasufaasista ei ollut vaikutusta vetysaantoon. Paineen poiston yhteydessä hiilidioksidin ja vedyn poistuma oli noin 10 %, mikä ei ilmeisesti vaikuttanut vedyn eikä hiilidioksidin osapaineesiin tarpeeksi, että se olisi kasvattanut vedyn tuottoa.

Kaikissa pulloissa muodostui jossain vaiheessa metaania, mutta ymppipulloissa sitä muodostui huomattavasti enemmän kuin substraattipulloissa. Ilmeisesti substraatin läsnäolo on jollain tavalla inhiboinut metanogeenisten bakteerien toimintaa. Ymppipullojen pH:t nousivat kokeen aikana, sillä metanogeenit kuluttivat vedyn tuotossa syntyneet happamoittavat VFA:t.

Kun vetysaantoja verrattiin aiempien vedyntuotokokeiden vetysaantoihin, olivat saannot 2-4 kertaa suurempia. Myös butyraatin osuudet sekä butyraatti-asettaatti –suhteet olivat suurempia kuin aiemmissa vedyntuotokokeissa. Mutta inkubointimenetelmäkokeessa, ei eri menetelmien välillä huomattu riippuvuutta vetysaantojen ja butyraatin osuuden ja butyraatti-asettaatti –suhteen välillä, vaikka käyttämällä typpihuuhtelua saatiinkin suurimmat vetysaannot. Toisaalta VFA-pitoisuuksia ei seurattu kokeen aikana, vaan vasta kokeen loputtua. Ja koska kaikki eri menetelmät olivat tuottaneet metaania, on tämä vaikuttanut kokeen lopussa analysoituihin VFA-pitoisuuksiin.

7.6 Vedyn ja metaanin tuotantotehokkuuksien vertailu

Kokeissa tuotetun metaanin ja vedyn energiasisällöt laskettiin tehollisten lämpöarvojen mukaan (Taulukko 9). Vedyn energiakäytössä käytetään vedylle vedyn ylempää lämpöarvoa (high heating value = HHV), koska matalan lämpötilan polttokennoilla voidaan hyödyntää vedyn koko stokiometrinen lämpöarvo. Metaanille käytetään tehollista eli alemmaa lämpöarvoa (low heating value =LHV). Vedyn HHV on 39 kWh/kg ja metaanin LHV on 14 kWh/kg (Anonyymi 1999).

Taulukko 9. Kokeissa tuotetut vety- ja metaanisannot timotei-nurminata seoksesta hehtaaria kohti.

	Käsittelemätön heinä MWh/ha	NaOH-käsitelty heinä+neste MWh/ha
Vety	0,16	0,17
Metaani	36,5	29,1
Metaani 2 ^(a)	44,8	46,9
Vety+metaani 2	45,0	47,1

(a) Metaani 2 = vedyntuottovaiheen jälkeen tuotettu metaani

Vetysaannot olivat kokeessa pieniä, ja vaikka vedyn lämpöarvo on lähes kolminkertainen metaaniin verrattuna, olivat vedyn energiamäärät pieniä. Vetykaasun tiheys on pieni (0,09

kg/m³) verrattuna metaanin tiheyteen (0,72 kg/m³), joten metaanin lämpöarvo tilavuusyksikköä kohti on itse asiassa huomattavasti suurempi (3,15-kertainen) vetyyn verrattuna (Levin ym. 2007). Jos haluttaisiin saada energiamäärältään metaanisaantoja (30-40 MWh/ha) vastaava määrä vetyä, olisi vetysaannon pitänyt olla 1000-1300 ml/g VS (260-350 m³/t ww). Tällainen saanto on itse asiassa mahdoton, sillä maksimisaanto vetyä voi olla 4 mol H₂/mol glukoosia, joka vastaa n. 500 ml/gVS.

Kanadalaisessa tutkimuksessa verrattiin maatalouden peltojätteestä tuotetun vedyn ja metaanin tuotantotehokkuuksia. Tuotettaessa peltojätteestä metaania oli tuotantotehokkuus 41,5 %, kun taas vedyllä se oli 8,2 % (Levin ym. 2007).

Valoa hyödyntävät bakteerit kuten *Rhodospseudomonas capsulata* käyttävät pimeäfermentaation oheistuotteina syntyviä VFA:ita vedyn tuottoon valofermentaatioissa (Shi & Yu 2006). Yhdistämällä valofermentaatio- ja pimeäfermentaatioprosessi teoreettinen vetysaanto on 12 mol H₂/mol glukoosia, kun pimeäfermentaation maksimi teoreettinen saanto yksinään on 4 mol H₂/mol glukoosia (Redwood & Macaskie 2006). Joten käyttämällä valofermentaatiota pimeäfermentaation jatkokäsittelynä voidaan vetysaanto kasvattaa jopa kolminkertaiseksi (Eroğlu ym.2006, Shi & Yu 2006). Jos saanto voitaisiin valofermentaation kanssa kolminkertaistaa, olisi vetysaannon tässä kokeessa pitänyt olla n. 300-400 ml/gVS, jotta olisi päästy energiamääriltä samaan luokkaan metaanin kanssa.

Esikäsitellyistä maissin korsista on vetyä saatu parhaimmillaan 150 ml/gVS (Zhang ym. 2007) ja käyttäen substraattina helpommin hajoavaa biojätteen ja jäteveden sekoitusta on saanto ollut 180 ml/g VS:ää (Lay ym. 1999).

8. Johtopäätökset

Tässä työssä tutkittiin säilöheinän (timotei-nurminataseos) käyttöä vedyn ja metaanin tuoton substraattina ja NaOH-käsittelyn vaikutusta vety- ja metaanisaantoihin. Lisäksi verrattiin eri inkubointimenetelmien (kaasufaasin typpihuuhtelu ja paineenpoisto) vaikutusta vetysaantoihin panoskokeissa. Lisäksi tutkittiin metaanintuottoa jatkokäsittelymenetelmänä vedyntuoton jäännökselle, sekä verrattiin näin saatuja energiamääriä.

Säilöheinästä oli mahdollista tuottaa vetyä, mutta saannot olivat pieniä. NaOH-esikäsitteily paransi vedyntuottoa noin 12 %, mutta parempi esikäsitteilymenetelmä olisi ollut jonkinlainen happokäsittely, kuten HCl-käsittely, sillä säilöheinä sisältää selluloosaa, jonka hajottamisessa hapot ovat osoittautuneet emäksiä tehokkaammiksi.

Typpihuuhtelu paransi vedyntuotantoa 75 %, mutta paineenpoistolla ei ollut vaikutusta vetysaantoon.

Säilöheinän metaanisaanto oli verrattavissa muihin vastaaviin tutkimuksiin. NaOH-käsittelyllä ei ollut vaikutusta metaanisaantoon.

Vedyntuottovaiheen jäännös tuotti noin 29 % enemmän metaania kuin metaanintuotto säilöheinästä ilman vetyvaihetta. Joten vedyntuottovaihetta yhdessä NaOH-esikäsitteilyn kanssa voitiin pitää hyvänä esikäsitteilymenetelmänä tuotettaessa säilöheinästä metaania.

Vedyn tuotantotehokkuus säilöheinästä pimeäfermentaatiolla oli alhainen verrattuna metaanin tuotantotehokkuuteen. Vetyä voitiin tuottaa vain 0,16 MWh/ha, kun taas metaania voitiin tuottaa 37 MWh/ha. Vedyntuotto pimeäfermentaatiolla sopiikin paremmin kaksivaiheisiin prosesseihin, joko yhdistettynä metaanintuottoon tai vedyn tuottoon valofermentatiolla.

9. Kiitokset

Haluan kiittää prof. Jukka Rintalaa mahdollisuudesta tehdä tämä työ, sekä neuvoista ja ohjauksesta. Lisäksi haluan kiittää työni toista ohjaajaa Outi Pakarista, joka jaksoi antaa neuvoja myös äityslomansa aikana.

Kiitokset myös Nordic Energy Research:ille, joka rahoitti Pohjoismaista biovetyprojektia, jonka osana tämä työ toteutettiin.

Kirjallisuusuuttelo

Adsul, M.G., Ghule, J.E., Shaikh, H., Singh, R., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V., Varma, A.J. 2005: Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 62: 6-10.

Anonyymi 1999: Industrial inorganic chemicals and products: an Ullmann's encyclopedia. Volume 3: Fertilizers to hydrogen. Weinheim: Wiley-VCH. s. 2430.

APHA 1998: Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington DC, U.S.A. 20. painos.

Brock, T., Smith, D.W. & Madigan, M.T. 1984: *Biology of Microorganisms*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall. 4.painos.

Campbell, N.A., Reece, J.B. & Mitchell, L.G. 1999: *Biology*. Menlo Park (Calif.): Addison-Wesley Longman. 5. painos.

Carrillo, F., Lis, M.J., Colom, X., López-Mesas, M. & Valdeperas, J. 2005: Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. *Process Biochem.* 40: 3360-3364.

Chang, J.S., Lee, K.S. & Lin, P.J. 2002: Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. - *Int J Hydrogen Energy.* 27: 1167-1174.

Chen, W.M., Tseng, Z.J., Lee, K.S. & Chang, J.S. 2005: Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy.* 30: 1063-1070.

Das, D., Badri, P.K., Kumar, N. & Bhattacharya, P. 2002: Simulation and modeling of continuous H₂ production process by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using different bioreactor configuration. *Enzyme Microb Technol.* 31: 867-875.

Das, D. & Veziroglu, T.N. 2001: Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy.* 26: 13-28.

Devlin, R.M. & Witham, F.H. 1983: *Plant physiology*. Boston, Mass.: Willard Grant. 4. painos.

Eduskunta 2007: Laki biopolttoaineiden käytön edistämisestä liikenteessä 13.4.2007/446. Astuu voimaan 1.1.2008.

Eroğlu, E., Eroğlu, I., Gündüz, U., Türker, L. & Yücel, M. 2006: Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 1527-1535.

Euroopan komissio 2001: COM(2001)370. Valkoinen kirja: Eurooppalainen liikennepolitiikka vuoteen 2010: valintojen aika.

Euroopan komissio 2007: KOM(2006)848. Komission tiedonanto neuvostolle ja Euroopan parlamentille. Uusiutuvia energialähteitä koskeva etenemissuunnitelma - Uusiutuvat energialähteet 2000-luvulla: kestävämmän tulevaisuuden rakentaminen.

Euroopan parlamentti 2003: 2003/30/EY. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi biopolttoaineista.

Fan, K.S. & Chen, Y.Y. 2004: H₂ production through anaerobic mixed culture: effect of batch S₀/X₀ and shock loading in CSTR. *Chemosphere*. 57: 1059-1068.

Fan, K.S., Kan, N.R. & Lay, J.J. 2006a: Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Biores Technol.* 97: 84-89.

Fan, Y.T., Zhang, G.S., Guo, X.Y. Xing, Y. & Fan, M.H. 2006b: Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. *Biomass Bioenergy*. 30: 493-496.

Fan, Y.T., Zhang, Y.H., Zhang, S.F. Hou, H.W. & Ren, B.Z. 2006c: Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Biores Technol.* 97: 500-505.

Fang, H.H.P. & Liu, H. 2002: Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Biores Technol.* 82: 87-93.

Fang, H.H.P., Li, C. & Zhang, T. 2006: Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 683-692.

Frobisher, M., Hinsdill, R.D. & Goodheart, C.R. 1974: *Fundamentals of Microbiology*. Philadelphia, PA : Saunders. 9. painos.

Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G. & Faaij, A. 2005: Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*. 28: 384-410.

Han, S.K. & Shin, H.S. 2004: Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 569-577.

Han, S.K. & Shin, H.S. 2004b: Performance of an innovative two-stage process converting food waste to hydrogen and methane. *J. Air & Waste Manage.* 54: 242-249.

Han, S.K., Kim, S.H. & Shin, H.S. 2005: UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste. *Process Biochem.* 40: 2897-2905.

Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. 2003: Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnol Bioeng.* 84: 619-626.

- Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R. & Hawkes, S.L. 2005: Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int J Hydrogen Energy*. 30: 471-483.
- Hyytiäinen, T., Hedman-Partanen, R. & Hiltunen, S. 1995: *Kasvintuotanto 2*. Helsinki : Kirjayhtymä.
- Inanc, B., Matsui, S. & Ide, S. 1996: Propionic acid accumulation and controlling factors in anaerobic treatment of carbohydrate: effects of H₂ and pH. *Water Sci Technol*. 34 (5-6): 317-325.
- Islam R, Cicek N, Sparling R, & Levin D. 2006: Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72: 576-583.
- Isotalo, K. 1990: *Puu- ja sellukemia*. Helsinki: Valtion painatuskeskus.
- Kalff, J. 2002: *Limnology: Inland water ecosystem*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Kalia, V.C.& Joshi, A.P. 1995: Conversion of waste biomass (pea-shells) into hydrogen and methane through anaerobic digestion. *Biores Technol*. 53:165-168.
- Kalia, V.C. 1999: Future fuels via microbial digestion of waste. *Bioenergy News*. 3: 21-23.
- Kalyuzhnyi, S.V. & Davlyatshina, M.A. 1997: Batch anaerobic digestion of glucose and its mathematical modeling. I. kinetic investigations. *Biores Technol*. 59: 73-80.
- Kapdan, I.K. & Kargi, F. 2006: Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol*. 38: 569-582.
- Kim, D.H., Han, S.K., Kim, S.H. & Shin, H.S. 2006: Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 2158-2169.
- Kim, I.S., Hwang, M.H., Jang, N.J., Hyun, S.H. & Lee, S.T. 2004a: Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 1133-1140.
- Kim, S.H., Han, S.K. & Shin, H.S. 2004b: Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 1607-1616.
- Kim, S. & Holtzapple, M.T. 2005: Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biores Technol*. 96: 1994-2006.
- Khanal, S.K., Wen-Hsing Chen W.H., Li, L. & Sung, S. 2004: Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 1123-1131
- Kotsopoulos, T.A., Zeng, R.J. & Angelidaki, I. 2006: Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C). *Biotechnol Bioeng*. 94: 296-302.

- Lay, J.J. 2000: Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng.* 68: 269–278.
- Lay, J.J., Fan, K. S., Chang, J. & Ku, C. H. 2003: Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *Int J Hydrogen Energy.* 28: 1361-1367.
- Lee, Y.J., Miyahara, T. & Noike, T. 2001: Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Biores Technol.* 80: 227-231.
- Lee, K.S., Lo, Y.S., Lo, Y.C., Lin, P.J. & Chang, J.S. 2004: Operation strategies for biohydrogen production with a high –rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme Microb Technol.* 35: 605-612.
- Lee, K.S., Lin, P.J. & Chang, J.S. 2006: Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced activated carbon carriers. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 465-472.
- Lehtomäki, A., Viinikainen, T. & Rintala, J. 2006: Screening boreal energy crops and crop residues for methane biofuel production. –Teoksessa Lehtomäki, A. 2006: *Biogas Production from Energy Copr Residue.* Jyväskylä studies in biological and environmental science 163.
- Lehtomäki, A., Huttunen, S. & Rintala, J. 2007: Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. *Resour Conserv Recycl.* 51: 591-609.
- Levin, D.B., Pitt, L. & Love, M. 2004: Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 173-185.
- Levin, D.B., Islam, R., Cicek, N. & Sparling, R. 2006: Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int J Hydrogen Energy.* 31:1496-1503.
- Levin, D.B., Zhu, H., Beland, M., Cicek, N. & Holbein, B.E. 2007: Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Biores Technol.* 98: 645-660.
- Liang, T.M., Cheng, S.S. & Wu, K.L. 2002: Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int J Hydrogen Energy.* 27:1157-1165.
- Liang, T.M., Wu, K.L. & Cheng, S.S. 2001: Effect of γ -alumina on anaerobic hydrogen production. *Proceedings of 9 thWorld congress of Anaerobic digestion.*
- Lin, C.Y. & Cheng, C.H. 2006: Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 832-840.
- Lin, C.Y. & Lay, C.H. 2004a: Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 41-45.

- Lin, C.Y. & Lay, C.H. 2004b: Effect of carbonate and phosphate concentration on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 275-281.
- Lin, C.Y. & Lay, C.H. 2005: A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 30: 285-295.
- Liu, D., Liu, D., Zeng, R.J. & Angelidaki, I. 2006: Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res*. 40: 2230-2236.
- Liu, G. & Shen, J. 2004: Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *J Biosci Bioeng* 98: 251-256.
- Logan, B.E., Oh, S.E., Kim, I.S. & Van Ginkel, S. 2002: Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol*. 36: 2530-2535.
- Luostarinen, S., Ronkainen, O. & Rintala, J. 2005: Anaerobic on-site wastewater treatment at low temperatures. -Teoksessa. Luostarinen, S. 2005: Anaerobic On-Site Wastewater Treatment at Low Temperatures. *Jyväskylä studies in biological and environmental science* 158.
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M. 2006: Brock biology of microorganism. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall. 11. painos.
- Malherbe, S. & Cloete, T.E. 2002: Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 1: 105-114.
- McKendry, P. 2002: Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Biores Technol*. 83: 37-46.
- Meulepas, R.J.W., Nordberg, Å., Mata-Alvarez, J. & Lens, P.N.L. 2005: Methane production from wastewater, solid waste and biomass. -Teoksessa: Biofuels for fuel cells. s.123-125.
- Michaud, S., Bernet, N., Buffière, P. & Delgenès, J.P. 2005: Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. *Process Biochem*. 40: 2751-2755.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, L.D. & Noike, T. 2000: Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Biores Technol*. 73: 59-65.
- Mizuno, O., Ohara, T., Shinya, M. & Noike, T. 2000b: Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora. *Water Sci Technol*. 42: (3-4) 345-350.
- Montes-Moncivais, A., Moreno, G. & Buitron, G. 2006: Hydrogen production from wastewater: inoculum selection. *Proceedings Venice. Biomass and Waste to Energy Symposium*.
- Moreno-Andrade, I. & Buitron, G. 2004: Influence of the origin of the inoculum on the anaerobic biodegradability test. *Water Sci Technol*. 49 (1): 53-59.

- Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A.A.Y., Ngan, M.A., Fakhru'l-Razi, A., Iyuke, S.E. & Bakir, A.M. 2004: Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 709-713.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. & Ladisch, M. 2005: Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores Technol*. 96: 673-686.
- Mu, Y., Zheng, X.J., Yu, H.Q. & Zhu, R.F. 2006: Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 780-785.
- Mu, Y., Yu, H.Q. & Wang, Y. 2006b: The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere*. 64: 350-358.
- Mussatto, S. I. & Roberto, I.C. 2004: Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Biores Technol*. 93: 1-10.
- Niemeläinen, O., Virkajärvi, P., Järvenranta, K., Miettinen, E., Jauhiainen, L., Alakukku, L., Hakala, K., Kontturi, M., Nissinen, O. 2002: Nurmen satopotentiaali Suomessa ja nurmen kasvua ja kestävyyttä vähentävät tekijät ja niiden torjunta. Teoksessa: Toimituskunta Oiva Niemeläinen, Mari Topi-Hulmi. Nurmirehun kilpailukyvyyn parantaminen -tutkimusohjelman päätösseminaari 18.4.2002. Suomen Nurmijhdistyksen julkaisu 17: p. 53-66.
- Noike, T. & Mizuno, O. 2000: Hydrogen fermentation of organic municipal wastes. *Water Sci Technol*. 42 (12):155-162.
- Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003: Prediction of the digestibility of primary growth and regrowth grass silages from chemical composition, pepsin-cellulase solubility and indigestible cell wall content. *Anim Feed Sci Technol*. 110: 61-74.
- Oh, S.E., Van Ginkel, S. & Logan, B.E. 2003: The relative effectiveness of pH control and heat treatment for engaging biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol* 37: 5186-5190.
- Oh, Y.K., Seol, E.H., Lee, E.Y. & Park, S. 2002: Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas Palustris* P4. *Int J Hydrogen Energy*. 27: 1373-1379.
- Okamoto, M., Miyahara, O., Mizuno, O. & Noike T. 2000: Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Sci Technol*. 41 (3): 25-32.
- Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, Jr., J.B., Young L.Y. & McCarty, P.L. 1979: Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res*. 13: 485-493.

- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B. 2000: Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Biores Technol.* 74: 25-33.
- Park, W., Hyun, S.H., Oh, S.E., Logan, B.E. & Kim, I.S. 2005: Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ Sci Technol.* 39: 4416-4420.
- Redwood, M.D. & Macaskie, L.E. 2006: A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 1514-1521.
- Ren, N.Q., Chua, S.Y., Tsang, Y.F., Wang, Y.J. & Sin, N. 2007: Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Biores Technol.* 98: 1774-1780.
- Ronkainen, O., Lehtomäki, A. & Rintala, J. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: the effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *Lähetetty: Int J Hydrogen Energy.*
- Seppänen, H. & Komulainen M. 1994: Nurmenviljely. *Maaseutukeskusten Liiton julkaisu* no 872.
- Shi, X.Y. & Yu, H.Q. 2006: Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodospseudomonas capsulate*. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 1641-1647.
- Shin, H.S., Youn, J.H. & Kim, S.H. 2004: Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 1355-1363.
- Schlegel, H.G. 1988: *General microbiology.* Cambridge : Cambridge University Press. 6. painos.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M. & Adelberg, E.A. 1971: *General Microbiology.* London: Macmillan. 3. painos.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores Technol.* 83: 1-11.
- Suomen Standardoimisliitto 1988: SFS5504, Veden kemiallisen hapenkulutuksen (COD_{Cr}) määrittäminen suljetulla putkimenetelmällä, hapetus dikromaattilla. Suomen standardoimisliitto, Helsinki.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1991: *Plant physiology.* Redwood City (Calif.): Benjamin/Cummings.
- Tanisho, S. Kuromoto, M. & Kadokura, N. 1998: Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *Int J Hydrogen Energy.* 23: 559-563.
- UNFCCC United Nations Framework Convention on Climate Change 1997: Kioton ilmastopöytäkirja.

- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi F. & Poggi-Varaldo, H.M. 2005: Semi-continuous solid substrate anaerobic reactor for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrogen Energy*. 30: 1383-1391.
- Van Ginkel, S., Sung, S. & Lay, J.J. 2001: Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. *Environ Sci Technol*. 35: 4726 -4730.
- Van Ginkel, S., Oh, S.E. & Logan, B. E. 2005: Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewater. *Int J Hydrogen Energy*. 30: 1535-1542.
- Van Ginkel, S. & Logan, B. 2005: Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Res*. 39: 3819-3826.
- Van Groenestijn, J.W., Hazewinkel, J.H.O., Nienoord, M. & Bussmann, P.J.T. 2002: Energy aspect of biological hydrogen production in high rate bioreactor operated in the thermophilic temperature range. *Int J Hydrogen Energy*. 27:1141-1147.
- Van Ooteghem, S.A., Beer, S.K. & Yue, P.C. 2001: Hydrogen production by the thermophilic bacterium *Thermotoga neopolitana*. *Proceedings of the 2001 DOE Hydrogen Program Review*.
- Vavilin, V.A., Rytow, S.W. & Lokshina, S.A. 1995: Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. *Biores Technol*. 54: 171-177.
- de Vrije, T. de Haas, G. G., Tan, G. B., Keijsers E. R. P. & Claassen P.A.M. 2002: Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *Int J Hydrogen Energy*. 27: 1381-1390.
- Wang, Y., Spratling, B.M., ZoBell, D. R., Wiedmeier, R. D. & McAllister, T. A. 2004: Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. *J Anim Sci*. 82: 198-208.
- Zhang, M.L., Fan, Y.T., Xing, Y., Pan, C.M., Zhang, G.S. & Lay, J.J. 2007: Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass Bioenergy*. 31: 250-254.
- Zhang, Y. & Shen, J. 2006: Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 441-446.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S. & Takasaki, Y. 1998: H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett*. 20: 143-147.
- Yokoyama, H., Waki, M., Moriya, N., Yasuda, T., Tanaka, Y. & Haga, K. 2007: Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74: 474-483.

Yu, H.Q. & Fang, H.H.P. 2001: Acidification of mid- and high-strength dairy wastewaters. *Water Res.* 35: 3697-3705.

Yu, H.Q. & Mu, Y. 2006: Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II: Reactor performance in 3-year operation. *Biotechnol Bioeng.* 94: 988-995.

Yu, H., Zhu, Z., Hu, W. & Zhang, H. 2002: Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy.* 27: 1359-1365.