



**SAVONIA**

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO  
TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN ALA

# VEDYN TUOTANNON OPTIMOINTI LABORATORIOMITTAKAAVAN FERMENTOREILLA BIOPOHJAISILLA AINEKSILLA

TEKIJÄ:

Eevi Minkkinen

Koulutusala Tekniikan ja liikenteen ala	
Tutkinto-ohjelma Ympäristötekniikan tutkinto-ohjelma	
Työn tekijä Eevi Minkkinen	
Työn nimi Vedyn tuotannon optimointi laboratoriomittakaavan fermentoreilla biopohjaisilla aineksilla	
Päiväys	23.4.2021
Sivumäärä/Liitteet	50
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Biosfääri Pohjois-Savo -hanke, Tutkimus- ja kehityspäällikkö Harri Auvinen	
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida biovedyn tuotannon potentiaali pimeäfermentaatiolla biopohjaisilla aineksilla Biosfääri Pohjois-Savo -hankkeelle. Työ koostuu kirjallisuusselvityksestä, jossa selvitettiin biovedyn mikrobiologisia tekijöitä ja prosessiolosuhteiden optimointia. Selvityksen pohjalta työssä testattiin Biosfääri Pohjois-Savo -hankkeessa hankittua fermentori-laitteistoa biovetyä tuottaen ja laitteiston soveltuvuutta testaten biojalostusteknologiaan sekä uusien nestemäisten ja kaasumaisten tuotteiden tuottamiseen. Tavoitteena oli saada selville tutkittavien biopohjaisten aineksien vedyntuottopotentiaalit ja pohtia tulosten perusteella soveltuisivatko tutkittavat raaka-aineet potentiaalisiksi biovedyn lähteiksi. Tutkittavina biopohjaisina aineksina käytettiin elintarviketeollisuuden sivuvirtoina muodostuvia porkkana- ja kaalimassoja sekä metsäteollisuuden nollakuitua.</p> <p>Vedyn tuotannon optimoimiseksi laboratoriomittakaavan pimeäfermentaatiolla, prosessista seurattiin näytteiden kuiva-aineen (TS) ja orgaanisen aineen (VS) pitoisuuksia, haihtuvien rasvahappojen (VFA) määrää sekä näytteiden pH:ta, sähkönjohtokykyä, redox-potentiaalia (ORP) ja happipitoisuutta. Laboratoriokokeissa saadut tulokset kirjattiin Excel-tiedostoon, jonka pohjalta tulokset jalostettiin opinnäytetyöhön sekä Biosfääri Pohjois-Savo -hankkeen käyttöön.</p> <p>Valituilla biopohjaisilla aineksilla saatiin tuotettua vetyä. Suurimmat vedyn tuotannot saatiin porkkanalla. Keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali porkkanalla oli 13,92 ml/gVS ja päiväkohtainen maksimi vedyntuottopotentiaali 34,34 ml/gVS. Kaalin keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali oli 12,96 ml/gVS ja päiväkohtainen maksimi vedyntuottopotentiaali 23,64 ml/gVS. Nollakuidun vedyn tuottopotentiaali tutkittiin kahdella eri kuormituksella. Näistä suuremman kuormituksen fermentorin keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali oli 0,0794 ml/gVS ja pienemmän kuormituksen fermentorin keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali oli 0,0466 ml/gVS. Laboratoriokokeiden tuloksien perusteella porkkanalla ja kaalilla voisi olla potentiaalia biovedyn raaka-aineina, jos tarkastellaan porkkanan ja kaalin päiväkohtaisia maksimi vedyntuottopotentiaaleja. Nollakuidun potentiaali biovedyn raaka-aineena jäi alhaiseksi, sen suhteellisen hitaan biohajoavuuden vuoksi.</p>	
Avainsanat biovety, fermentori, pimeäfermentaatio, vedyntuottopotentiaali, anaerobinen hajoaminen, nollakuitu	

Field of Study Technology, Communication and Transport	
Degree Programme Degree Programme in Environmental Technology	
Author Eevi Minkkinen	
Title of Thesis Optimization of Hydrogen Production by Laboratory-scale Fermentors with Bio-based Materials	
Date 23 April 2021	Pages/Appendices 50
Client Organisation /Partners Biosfääri Pohjois-Savo -project, Research and Development Manager Harri Auvinen	
<p><b>Abstract</b></p> <p>The purpose of the thesis was to optimize the potential of biohydrogen production by dark fermentation with bio-based materials for the Biosfääri Pohjois-Savo -project. The work consists of a literature review in which the microbiological factors of biohydrogen and the optimization of dark fermentation process were investigated. On the basis of the study, the fermentor-equipment acquired in the Biosfääri Pohjois-Savo -project was tested by producing biohydrogen for its suitability for biorefining technology and the production of new liquid and gaseous products. The aim was to find out the hydrogen production potentials of the studied bio-based materials and consider on the basis of the results whether the studied raw materials would be suitable as potential sources of biohydrogen. Carrot and cabbage pulps formed as by-products of the food industry and zero fiber from the forest industry were used as the bio-based materials to be studied.</p> <p>Hydrogen yield potential was studied with laboratory-scale continuous fermentors. Samples were taken from the dark fermentation process daily. From these samples total solids (TS) and volatile solids (VS) levels, the amount of volatile fatty acids (VFA), pH, electrical conductivity, oxidation-reduction potential (ORP) and oxygen content were analyzed to optimize hydrogen production. The results obtained in the laboratory tests were combined in an Excel file, based on which the results were processed to the thesis and the use of the Biosfääri Pohjois-Savo -project.</p> <p>Hydrogen was produced with all selected bio-based materials. The largest hydrogen yield potential was obtained from carrot pulp. The average hydrogen yield potential of carrot pulp was 13.92 ml/gVS and the maximum daily hydrogen yield potential was 34.34 ml/gVS. The average hydrogen yield potential of cabbage pulp was 12.96 ml/gVS and the maximum daily hydrogen yield potential was 23.64 ml/gVS. The hydrogen yield potential of zero fiber was investigated with two different loads. Of these, the higher average hydrogen yield potential 0.0794 ml/gVS was reached with the larger load fermentor. The average hydrogen yield potential of the lower load fermentor was 0.0466 ml/gVS. Based on the results of laboratory tests, carrot and cabbage pulp could have potential as biohydrogen feedstocks. The potential of zero fiber as a raw material for biohydrogen production was low according to its relatively slow biodegradability.</p>	
<p><b>Keywords</b> biohydrogen, fermentor, dark fermentation, hydrogen yield potential, anaerobic digestion, zero fibre</p>	

## ESIPUHE

Haluan kiittää opinnäytetyön toimeksiantajaa Biosfääri Pohjois-Savo -hanketta ja hankkeen projektipäällikköä Harri Auvista mielenkiintoisesta aiheesta ja opinnäytetyön teko mahdollisuudesta. Eri-tyiskiitos opinnäytetyön ohjaajalle TKI-asiantuntijalle Maarit Janhuselle ohjauksesta, avusta ja tuesta opinnäytetyöprosessissa. Lisäksi haluan kiittää Savonia-ammattikorkeakoulun ympäristötekniikan opetus- ja tutkimusyksikön laboratorion henkilökuntaa yhteistyöstä ja avusta laboratoriotyökentelyssä. Haluan myös kiittää koko perhettäni kannustuksesta opinnäytetyöprosessin aikana.

Kuopiossa 23.4.2021

Eevi Minkkinen

## SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	7
1.1	Työn tausta ja tavoitteet .....	7
1.2	Työn tausta- ja tutkimusaineisto .....	8
1.3	Lyhenteet ja määritelmät.....	8
2	VEDYN KÄYTTÖ ENERGIANTUOTANNOSSA .....	9
2.1	Vety.....	9
2.2	Power-to-X.....	10
2.3	Vedyn käyttö Suomessa.....	11
3	VEDYN TUOTANTO BIPOHJAISISTA AINEKSISTA.....	12
3.1	Pimeäfermentaatio.....	12
3.1.1	Substraatit.....	13
3.1.2	Ravinteet.....	16
3.1.3	Bakteerikanta.....	16
3.2	Vedyn tuotannon optimointi.....	17
3.2.1	pH.....	17
3.2.2	Lämpötila.....	18
3.2.3	Vedyn osapaine.....	19
3.2.4	Sekoitus.....	19
3.2.5	Viipymäaika .....	20
3.2.6	Kuormitus.....	20
3.2.7	Happi .....	21
3.2.8	Hiilidioksidi.....	21
3.2.9	Redox-potentiaali .....	21
3.2.10	Aineenvaihduntatuotteet.....	22
4	LABORATORIOMITTAKAAVAN FERMENTAATIOKOKKEET .....	23
4.1	Laboratoriokokeiden lähtökohdat ja suunnittelu .....	23
4.2	Käytetyt reagenssit ja materiaalit .....	25
4.3	Käytetyt laitteet .....	26
4.4	Käytetyt analyysimenetelmät .....	28
5	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU .....	31
5.1	Vedyn tuotanto porkkanasta .....	31

5.2 Vedyn tuotanto kaalista .....	34
5.3 Vedyn tuotanto nollakuidusta.....	37
6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	42
7 POHDINTA .....	45
LÄHTEET .....	47

## KUVALUETTELO

KUVA 1. Vedyn tuottotavat, muokattu lähteestä (Nikolaidis & Poullikkas 2017, 597–611).....	9
KUVA 2. Power-to-X prosessikaavio, muokattu lähteestä (Calise ym. 2019, 534–536).....	10
KUVA 3. Anaerobisen hajoamisen vaiheet, mukaillen (Abdelgadir ym. 2014, 1–4).....	13
KUVA 4. Erilaisten alku pH-arvojen vaikutus vedyn saantoon (Muri ym. 2016, 1-11).....	18
KUVA 5. Päiväyslupauksen menettäneet kaali ja porkkana (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	23
KUVA 6. Nollakuitu (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	23
KUVA 7. Porkkanan ja kaalin esikäsittely vaihe vaiheelta (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	24
KUVA 8. Nollakuidun ja ionivaihdetun veden seos (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	24
KUVA 9. Peitetyt fermentorien reaktorit (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	25
KUVA 10. Laboratoriokokeissa käytetty fermentori (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	26
KUVA 11. Automaattititraattori (Minkkinen 2021, CC BY-SA) .....	27
KUVA 12. Kaasupussien laimennusjärjestelyt (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	29
KUVA 13. Kaasun koostumuksen mittausjärjestelyt (Minkkinen 2021, CC BY-SA).....	30
KUVA 14. Porkkanan vedyn ja hiilidioksidin tuotto .....	32
KUVA 15. Porkkanan vedyn tuotto ja redox-potentiaali .....	32
KUVA 16. Porkkanan vedyn tuotto ja VFA määrät.....	33
KUVA 17. Porkkanan TS- ja VS-pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot.....	34
KUVA 18. Kaalin vedyn ja hiilidioksidin tuotto .....	35
KUVA 19. Kaalin vedyn tuotto ja redox-potentiaali.....	36
KUVA 20. Kaalin vedyn tuotto ja VFA määrät.....	36
KUVA 21. Kaalin TS- ja VS-pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot .....	37
KUVA 22. Nollakuidun vedyn kumulatiivinen tuotto.....	38
KUVA 23. Nollakuidun vedyn ja rikkivedyn tuotto.....	39
KUVA 24. Nollakuidun vedyn tuotto ja redox-potentiaali.....	39
KUVA 25. Nollakuidun vedyn tuotto ja VFA määrät .....	40
KUVA 26. Nollakuidun TS- ja VS-pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot.....	41

## 1 JOHDANTO

### 1.1 Työn tausta ja tavoitteet

Kasvihuonekaasujen jatkuva lisääntyminen ilmakehässä ja sitä kautta kiihtyvä ilmastonmuutos sekä muut ympäristöongelmat ovat nousseet yhteiskuntamme suurimmiksi haasteiksi. Kasvihuonekaasujen aiheuttaman ilmastonmuutoksen hillintä vaatii kansainvälistä yhteistyötä. Tätä yhteistyötä ohjaa kansainvälinen ilmastopolitiikka, jonka ytimen muodostavat YK:n ilmastopimukset, Kioton pöytäkirja sekä viimeisin Pariisin ilmastopimus, joka astui voimaan marraskuussa 2016 ja jonka sitoumukset koskevat vuoden 2020 jälkeistä aikaa. Pariisin ilmastopimuksen tavoitteena on saavuttaa kasvihuonekaasujen päästöjen huippu, niin pian kuin mahdollista ja sen jälkeen vähentää päästöjä siten, että ihmisen aikaan saamat kasvihuonekaasujen päästöt ja päästönienlut ovat tasapainossa. (EU2019.fi 2019; Ympäristöministeriö julkaisuaika tuntematon.)

Jotta näihin tavoitteisiin päästäisiin monet maat ovat luoneet omia hiilineutraalius tavoitteita, kuten Suomi, joka pyrkii olemaan hiilineutraali vuoteen 2035 mennessä. Myös Euroopan tavoitteena on olla ensimmäinen hiilineutraali maanosa vuoteen 2050 mennessä. (Valtioneuvosto 2020.) Näihin hiilineutraalius tavoitteisiin päästäkseen tulisi fossiilisista polttoaineista luopua ja lisätä uusiutuvien energialähteiden käyttöä sekä kehittää uusia ratkaisuja luoda ympäristöystävällistä energiaa. Euroopan komissio hyväksyi heinäkuussa 2020 vetystrategian, jonka tavoitteena on kehittää uusiutuvaa vetyä eli vihreää vetyä, joka tuotetaan uusituvilla energialähteillä, kuten tuuli-, vesi- ja aurinkovoimalla. Tämän lisäksi tarvitaan kuitenkin myös muita vähähiilisen vedyn muotoja, kuten biovetyä, jotta päästöjä saadaan vähennettyä riittävän nopeasti. (Euroopan komissio 2020; Vartiainen 2020.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää pimeäfermentaatiolla tuotetun vedyn tuotannon tehokkuuteen vaikuttavat tekijät ja tämän selvityksen perusteella pyrkiä optimoimaan laboratoriomittakaavassa vedyn tuotanto käyttäen prosessin raaka-aineena biopohjaisia aineksia, jotka syntyvät prosessien sivuvirtoina. Tavoitteena on saada selville tutkittavien biopohjaisten aineksien vedyntuottopotentiaalit, lisäksi tarkoituksena on vuoden 2020 lopulla hankitun laitteiston toimivuuden ja soveltaavuuden testaaminen biojalostukseen ja kaasumaisen vedyn tuotantoon. Vedyntuottopotentiaalia tutkitaan laboratoriomittakaavan jatkuvatoimisilla fermentoreilla, joiden opinnäytetyöhön kuuluva koeajo toimii niiden ensimmäisenä testiajona. Vedyn tuotannon optimoimiseksi, prosessista seurataan näytteiden kuiva-aineen (TS) ja orgaanisen aineen (VS) pitoisuuksia, haihtuvien rasvahappojen (VFA) määrää sekä näytteiden pH:ta, sähkönjohtokykyä, redox-potentiaalia (ORP) ja happipitoisuutta. Tutkittaviksi biopohjaisiksi aineiksi on valittu sellu- ja paperiteollisuuden jätevesien puhdistusprosessin sivutuotteena syntyvä nollakuitu sekä ruoanjalostuksen sivuvirtana ja ruokahävikkinä syntyvät porkkana- ja kaalimassat.

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimii Biosfääri Pohjois-Savo: Biomassan ja biojalostusteknologioiden hyödyntäminen liiketoiminnan kasvattamisessa -hanke. Hankkeen pääkoordinaattorina toimii, Savonia-ammattikorkeakoulu oy ja muina osatoteuttajina Luonnonvarakeskus ja Itä-Suomen yliopisto. Hankkeen tavoitteena on selvittää ja demonstroida Pohjois-Savossa syntyvien sivuvirtojen jatkojalostusmahdollisuuksia uusiksi tuotteiksi.

## 1.2 Työn tausta- ja tutkimusaineisto

Työn tausta- ja tutkimusaineistona käytetään tieteellisiä artikkeleita ja raportteja sekä kirjallisuuslähteitä aiemmin tehdyistä tutkimuksista liittyen biovedyn tuottamiseen pimeäfermentaatiolla. Näiden tutkimusten tuloksia liittyen biovedyntuottopotentiaaliin eri raaka-aineilla ja olosuhteilla käytetään opinnäytetyön vedyn tuotannon tehokkuuteen vaikuttavien tekijöiden selvityksen tekemiseen ja sovelletaan opinnäytetyön fermentaatiokokeiden toteutuksessa. Tausta- ja tutkimusaineistona käytetään myös tieteellisiä artikkeleita liittyen vedyn käyttöön. Aineistona työssä toimii näiden lisäksi laboratoriokokeissa käytettävien fermentorien sekä muiden käytössä olevien laitteiden manuaalit sekä prosessin seuranta-analytiikkaan liittyvät standardit.

## 1.3 Lyhenteet ja määritelmät

Asetogeeniset bakteerit = Bakteerit, jotka muodostavat mm. vetyä.

Biovety = Vety, joka on tuotettu biologisesti.

Fermentori = Bioreaktori, joka on tarkoitettu mikrobien kasvatukseen.

Hydrolyyttiset bakteerit = Bakteerit, jotka hajottavat substraatin kiinteät hiilihydraatit, rasvat ja valkuaisaineet yksinkertaisiksi sokereiksi, pitkäketjuisiksi rasvahapoiksi ja aminohapoiksi.

Metanogeeniset bakteerit = Bakteerit, jotka muodostavat biokaasua.

Nollakuitu, 0-kuitu = Sellu- ja paperiteollisuuden sivuvirta, joka koostuu lignoselluloosasta.

ORP (Oxidation-Reduction Potential) = redox-potentiaali eli pelkistymispotentiaali

P2X, PtX = power-to-X-teknologia

Pimeäfermentaatio = Mikrobien aineenvaihduntaa, jossa ei ole valoa.

Sivuvirta = päätuotteen valmistusprosessin aikana syntyvä sivutuote

TS (Total Solids) = kuiva-ainepitoisuus

Viipymäaika, HRT (Hydraulic Retention Time) = Aika, jonka syöte on keskimäärin bioreaktorissa.

VS (Volatile Solids) = orgaanisen aineen pitoisuus

VFA (Volatile Fatty Acids) = haihtuvat rasvahapot

Ymppi = bakteerisiirros, eli herätepanos

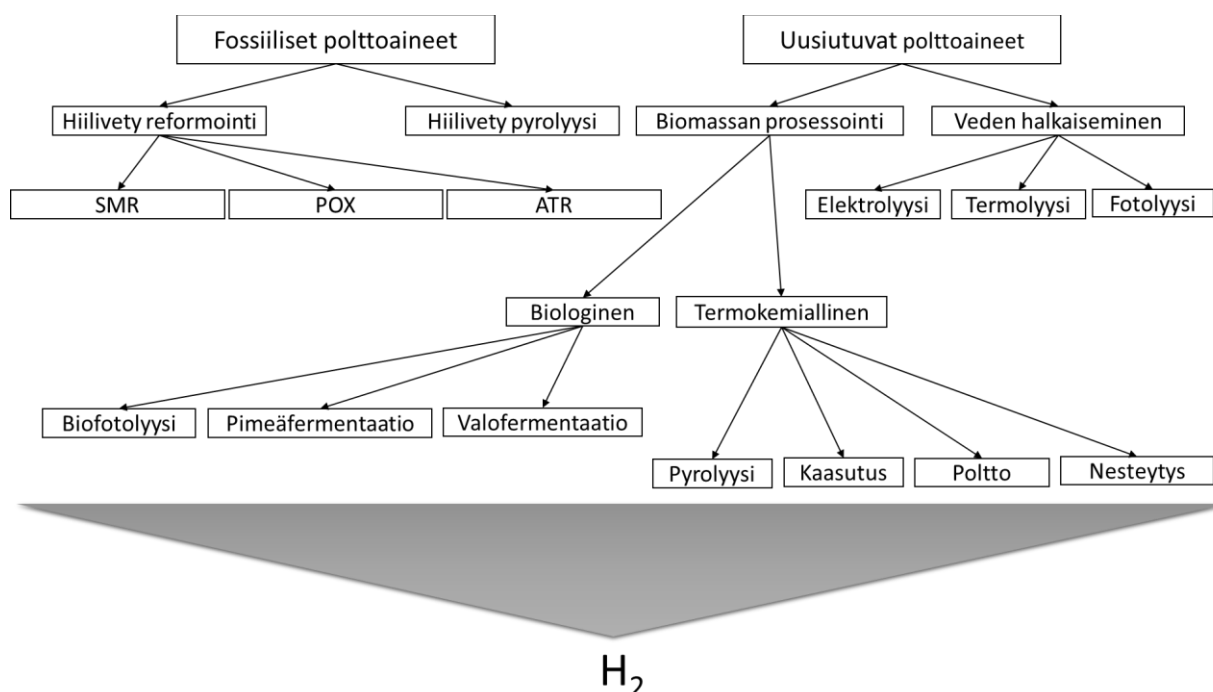


## 2 VEDYN KÄYTTÖ ENERGIANTUOTANNOSSA

### 2.1 Vety

Vetykaasu ( $H_2$ ) on lupaava energian varastointi- ja siirtoväline, jolla voi olla merkittävä rooli kasvihuonekaasupäästöjen vähentämisessä. Vety on hiilineutraali energian kantaja, sillä sen palamisen lopputuotteena syntyy vain vesihöyryä ja lämpöä. Sillä on myös suuri energiasisältö, 122 kJ/g, joka on noin 2,75 kertaa suurempi kuin hiilivetypolttoaineilla, kuten bensiinillä. Suuri energiasisältö ja vähäinen tai lähes olematon päästöjen muodostuminen käytössä tekevät vedystä potentiaalisen fossiilisten polttoaineiden korvaajan. (Pandey, Venkata Mohan, Chang, Hallenbeck & Larroche 2019, 2.)

Vedyn hiilijalanjälki riippuu täysin sen tuottotavasta, sillä vedyn käyttö polttokennoissa tuottaa sivutuotteena vain lämpöä sekä puhdasta vesihöyryä (kuva 1). Reformoinnilla fossiilisista polttoaineista tuotettua vetyä eli fossiilista vetyä, joka tuottaa hiilidioksidipäästöjä, kutsutaan harmaaksi vedyksi. Suurin osa käytetystä vedystä tuotetaan höyryreformoimalla (SMR = Steam Methane Reforming). Mikäli fossiilisilla polttoaineilla tuotettu vedyn hiilidioksidipäästöjä vähennetään hiilen talteenotolla sekä varastoinnilla (ATR = Autothermal Reforming) kutsutaan vetyä silloin siniseksi vedyksi. Turkoosiksi vedyksi kutsutaan vetyä, joka on tuotettu pyrolyysin avulla, jonka sivutuotteena muodostuu hiilimustaa. Vetyä voidaan tuottaa myös uusiutuvilla energianlähteillä, kuten aurinko- ja tuulivoimalla mm. elektrolyysiä apuna käyttäen, tällöin vetyä kutsutaan vihreäksi vedyksi, sillä se tuottaa hyvin vähän hiilidioksidipäästöjä. Mikäli vety saadaan tuotettua ilman hiilidioksidipäästöjä uusiutuvilla energialähteillä tai ydinvoimalla kutsutaan sitä silloin päästöttömäksi vedyksi. Näiden lisäksi vetyä voidaan tuottaa osittaisella hapetuksella (POX = Partial Oxidation), termokemiallisesti esimerkiksi biomassan kaasutuksella sekä biologisin keinoin, aivan kuten tässä opinnäytetyössä esimerkiksi pimeäfermentaation avulla. (Nikolaidis & Poullikkas 2017, 597–611; Motiva Oy 2020; Vartiainen 2020; TheWorldOfHydrogen julkaisuaika tuntematon.)

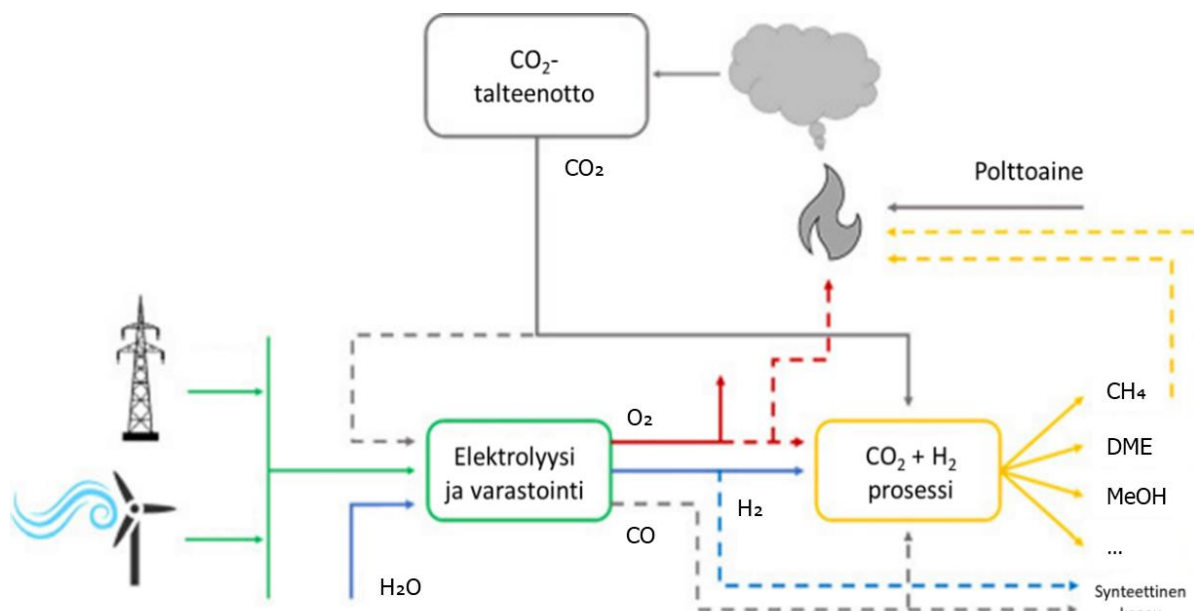


KUVA 1. Vedyn tuottotavat, muokattu lähteestä (Nikolaidis & Poullikkas 2017, 597–611)

## 2.2 Power-to-X

Maailmassa syntyy yhä enemmän sähköä uusiutuvista energialähteistä, jopa enemmän kuin markkinat kuluttavat. Teknologia on kehittynyt huomattavasti viime vuosikymmenien aikana ja uusiutuvan energian hinta on laskussa. Tästä huolimatta, jos katsomme kokonaisenergiankulutustamme, uusiutuvat energialähteet muodostavat vain pienen osan siitä. Lämmitys-, liikenne- ja teollisuusprosesseissa hallitsevat edelleen fossiiliset polttoaineet, koska nämä prosessit eivät voi toimia sähköllä, vaan tarvitsevat toimiakseen polttoainetta. Power-to-X-teknologia, lyhyemmin P2X tai PtX voi olla yksi avainteknologioista, joka voi ratkaista nämä lämmitykseen, liikenteeseen ja teollisuuteen liittyvät fossiilisten polttoaineiden aiheuttamat hiilidioksidiongelmat elektrolyysillä tuotetun vedyn avulla (kuva 2). Power-to-X-teknologian perusidea on muuttaa sähköä toiseen energiamuotoon, kuten lämmöksi, vedyksi tai synteettisiksi polttoaineiksi ja tarvittaessa takaisin sähköksi. (LUT University 2018; DW 2019.)

Esimerkiksi tuuliturbiinien tuottama ylimääräinen energia voidaan hyödyntää vedyn sähkökemialliseen valmistukseen vedestä, elektrolyysin avulla. Elektrolyysi on sähkökemiallinen prosessi, jonka avulla vesi voidaan jakaa vedyksi ( $H_2$ ) ja hapeksi ( $O_2$ ). Hapetta pidetään yleensä prosessin sivutuotteena ja se johdetaan ilmakehään, mutta sitä voitaisiin käyttää useissa sovelluksissa, esimerkiksi terästeollisuudessa ja hapettimena palamisessa. Vety on vesielektrolyysin päätuote ja edustaa ensimmäistä mahdollista P2X-prosessin lopputuotetta. Prosessin edetessä elektrolyysillä tuotettu vety voidaan yhdistää puhtaan hiilidioksidin ( $CO_2$ ) kanssa, joka on siepattu hiilidioksidikaappareiden avulla esimerkiksi valmistusprosessien ja voimalaitosten savukaasuista. Vedyn ja hiilidioksidin muodostama seos muodostaa lopputuotteena metaania ( $CH_4$ ), metanolia ( $MeOH$ ) ja dimetyylieetteriä ( $DME$ ), jotka ovat polttoaineita, joita voidaan käyttää energian tuotantoon ja kulkuvälineiden moottoreissa. Lopputuotteita voidaan käyttää myös kemianteollisuuden raaka-aineina. Power-to-X-teknologian avulla ilmasta, vedestä ja sähköstä voidaan siis valmistaa synteettisiä polttoaineita. (LUT University 2018; Calise, Dentice D'Accadia, Santarelli, Lanzini & Ferrero 2019, 534–536.)



KUVA 2. Power-to-X prosessikaavio, muokattu lähteestä (Calise ym. 2019, 534–536)

## 2.3 Vedyn käyttö Suomessa

Pääasiallinen vedyn käyttökohde Suomessa on teollisuus. Vedyn käyttö polttoaineena on ollut tois- taiseksi vielä hyvin vähäistä. Suomessa Mäntyharjulaista Woikoski Oy:ta voidaan pitää vetytalouden edelläkävijänä, yhtiö kehitti jo 1920–1930-luvulla vedyllä toimivan mäntämoottorin. Woikoski oli myös vuonna 2015 mukana hankkeessa, jonka tavoitteena oli rakentaa Pohjoismaihin 20–30 vetyau- tojen tankkauspistettä, mutta joutui luopumaan hankkeesta vuonna 2017, kysynnän puutteen vuoksi. Yhtiö ehti kuitenkin rakentaa kolme tankkauspistettä Göteborgiin, Vuosaaren sekä Mänty- harjulle. Tankkauspisteillä kävijämäärät ovat kuitenkin olleet hyvin vähäisiä ja esimerkiksi Vuosaaren tankkauspiste on tämän takia suljettu. Woikosken Mäntyharjulla sijaitsevan tankkauspistettä käyttä- vät vain yhtiön oma polttokennoilla toimiva Hyundai ix35-henkilöauto ja vetytrukki. Vetytalouden hidasteena Suomessa ovat infrastruktuurin puute ja vetyautojen hinta sekä kilpailu sähköautojen kanssa. Woikoski kuitenkin tuottaa edelleen vetyä teollisuuden käyttöön verkkosähköllä vesielektro- lyysin avulla, laitos myös kerää sivutuotevetyä eli hukkavetyä, jolloin prosessi on lähes päästötöntä. Suomessa teollisuus tuottaa taivaalle hukkavetyä siten, että vuodessa sitä riittäisi polttoaineeksi 10 000 autolle noin 20 000 kilometrille. (Nikula 2018; Uusiutuva vety tunkeutuu Suomen energiakuplaan 2020.)

Uusiutuvaan vetyyn liittyvät suuret projektit, joissa mukana olisi useampia eri toimijoita ovat Suo- messa vielä harvinaisia. Monet suuret toimijat, kuten Wärtsilä, Neste ja SSAB ovat aloittaneet omia vetyhankkeita, markkinoiden kilpailun vuoksi. Esimerkiksi Neste aikoo uusituvan vedyn avulla vähen- tää päästöjään sekä pyrkii kehittämään synteettisiä polttoaineita. Suomessa vetyhankkeet liitetään- kin usein osaksi Power-to-X teknologiaa. Muutamia laajoja usean toimijan projekteja on kuitenkin käynnissä, näistä esimerkkinä VTT:n ja suomalaisen THT Control, ruotsalaisen Powercell Sweden, ranskalaisen Mahytec ja italialaisen Linde Gas Italian yritysten tutkimusprojekti, jossa tarkoituksena on kehittää polttokennoilla toimiva sähkögeneraattori. (Uusiutuva vety tunkeutuu Suomen energiakuplaan 2020; Laatikainen 2020b.)

Suomella olisi potentiaalia kasvaa uusiutuvan vedyn aloilla, Power-to-X teknologiaa hyödyntäen. Suomessa on hyvät tuuliolosuhteet sekä maa on hyvin harvaan asutettu, tämä mahdollistaisi usei- den tuhansien uusien tuuliturbiinin rakentamisen sekä satojen elektrolyysilaitteiden sijoittamisen näi- hin tuulivoimalapuistoihin, joiden avulla vetyä saataisiin tuotettua. Tämä kustannustehokkaasti ja vähähiilisesti tuotettu vety olisi mahdollista jalostaa hiilidioksidin avulla synteettiseksi polttoaineeksi, jolloin Suomella voisi olla potentiaalia kehittyä synteettisten polttoaineiden tuottajaksi. (Laatikainen, 2020a.)

Suomelta löytyy myös melko runsaasti prosessien sivuvirtoina syntyvää materiaalia uusiutuvaan energiaan kuuluvan biovedyn tuottamiseen. Erään selvityksen mukaan teoreettinen biokaasun ener- giapotentiaali Suomessa on 24,4 TWh, josta vedyn osuus on 1,2 TWh ja metaanin 23,2 TWh. Suu- rimmat materiaali-jakeet selvityksen mukaan ovat peltobiomassat ja lannat. Myös sellu- ja paperiteol- lisuuden jätevedet voisivat olla potentiaalisia materiaaleja vedyn tuotannon kannalta. (Tähti & Rintala 2010, 1–53.)

### 3 VEDYN TUOTANTO BIOPOHJAISISTA AINEKSISTA

#### 3.1 Pimeäfermentaatio

Pimeäfermentaatio on otollinen tekniikka uusiutuvan biovedyn tuottamiseksi. Vedyn tuotanto on orgaanisen aineksen hajottamista, joka tapahtuu anaerobisesti eli hapettomasti mikrobin, yleensä *Clostridia*-, *Esherichia*-suvun bakteerien toimesta. Bakteerit käyttävät hiilihydraatteja, proteiineja ja lipidejä substraatteina muodostaen asidogeneesin kautta lopputuotteena happoja, vetyä ja hiilidioksidia. Asidogeneesi kuuluu anaerobisen hajoamisen vaiheisiin. (Ferreira & Gouveia 2020, 771–798; Ghimirea ym. 2015, 73–95.)

Anaerobinen hajoaminen on nelivaiheinen prosessi, joissa eri mikrobiryhmät hajottavat lähtömateriaalin pienemmiksi yhdisteiksi (kuva 3). Prosessin ensimmäinen vaihe on hydrolyysi eli liukoistuminen, jossa prosessin raaka-aineen eli substraatin kiinteät hiilihydraatit, rasvat ja valkuaisaineet hajoavat liukoiksi yhdisteiksi, kuten pitkäketjuisiksi rasvahapoiksi, aminohapoiksi ja yksinkertaisiksi sokereiksi (kaava 1). Hajoaminen tapahtuu hydrolyyttisten bakteerien entsyymien avulla. Hydrolyysi vaihe on erittäin tärkeä anaerobisen hajoamisen kannalta, koska fermentatiiviset mikro-organismit eivät voi käyttää polymeerejä suoraan. (Audiopek Oy, Motiva Oy, Luostarinen & Metener Oy 2013, 1–13; Abdelgadir ym. 2014, 1–4.)

*Rasvat* → *Pitkäketjuiset rasvahapot*

*Polysakkaridit* → *Monosakkaridit*

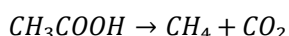
1

*Proteiinit* → *Aminohapot*

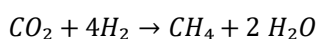
Hydrolyysiä seuraa happokäyminen, jota kutsutaan myös asidogeneesiksi tai fermentaatioksi, jossa bakteerit hajottavat hydrolyysissä syntyneet liuenneet aineet haihtuviksi rasvahapoiksi (VFA), hiilidioksidiksi (CO<sub>2</sub>) ja vedyksi (H<sub>2</sub>). Pääasiallisia happokäymisen aineenvaihduntatuotteita ovat propionihappo (propanihappo), butyraatti (voihappo), valeerihappo sekä ammoniakki. (Zhang, J. Li, Y. Li & Zhao 2014, 66–67; Abdelgadir ym. 2014, 1–4.)

Kolmas biokaasuprosessin vaihe on etikkahappokäyminen eli asetogeneesi, joka voi edetä olosuhteitten mukaan kahta eri reittiä. Asetogeneesissa asetogeneettiset bakteerit hajottavat haihtuvat rasvahapot ja muut asidogeneesin lopputuotteet hiilidioksidiksi, vedyksi ja asetaatiksi (etikkahappo) tai muokkaavat hiilidioksidista sekä vedystä asetaattia. (Abdelgadir ym. 2014, 1–4.)

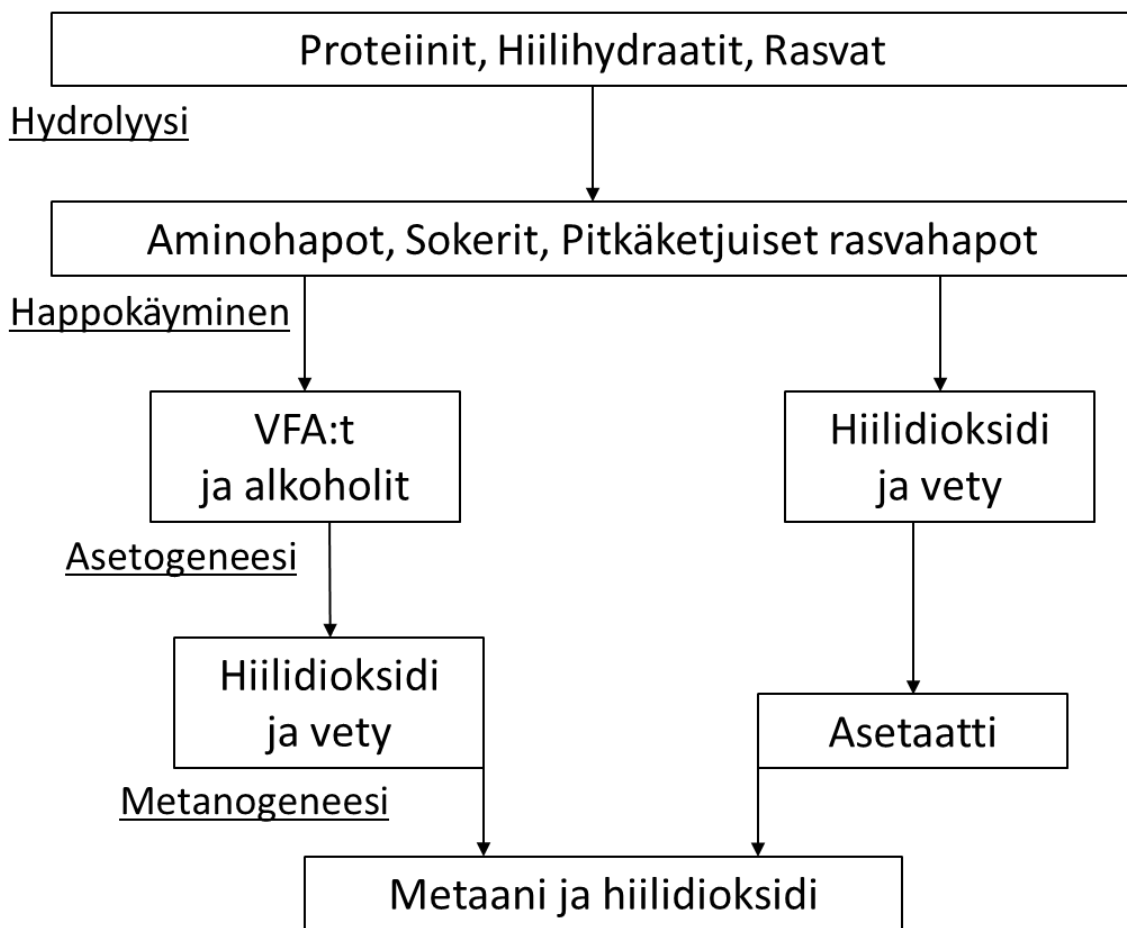
Viimeinen vaihe on metaanikäyminen eli metanogeneesi, jossa metaania muodostavat bakteerit eli metanogeenit muodostavat asetaatista ja vedystä biokaasua eli metaania (CH<sub>4</sub>) sekä hiilidioksidia (kaava 2). Metaania voi myös muodostua hiilidioksidin pelkistyessä vedyllä (kaava 3). Mikäli prosessin neljäs vaihe eli metanogeneesi estetään, syntyy asidogeneesin ja asetogeneesin lopputuotteina vetyä sekä hiilidioksidia ja haihtuvia rasvahappoja. (Audiopek Oy ym. 2013, 1–13; Abdelgadir ym. 2014, 1–4; Zhang ym. 2014, 66–67.)



2



3



KUVA 3. Anaerobisen hajoamisen vaiheet, mukailten (Abdelgadir ym. 2014, 1–4)

Metanogeneesi voidaan estää anaerobisen hajoamisen olosuhteita säätelemällä, esimerkiksi säätämällä prosessin lämpötilaa, pH:ta, viipymäaikaa ja sekoitusta. Metanogeenit ja muut vetyä käyttävät bakteerit eivät kestä yhtä korkeaa lämpötilaa, kuin vetyä tuottavat bakteerit, joten tavallisin tapa estää niiden toiminta on anaerobisen ympin lämpökäsittely, esimerkiksi keittämällä, jolloin fermentaatioprosessiin saadaan valikoitua vetyä tuottavia bakteereita. Metanogeenit sekä muut vetyä käyttävät bakteerit eivät myöskään kestä niin alhaista pH:ta, kuin vetyä tuottavat bakteerit, joten alhaisella pH:lla voidaan suosia vetyä tuottavia bakteereita. Lyhyt viipymäaika jatkuvatoimisissa reaktoreissa taas estää vetyä käyttävien bakteerien lisääntymistä, koska vetyä tuottavien bakteerien kasvunopeus on nopeampi, jonka seurauksena vedyn tuotto voi lisääntyä. Sekoitus on taas yhteydessä viipymäaikaan, sillä kun bioreaktoriin syötetyt massat sekoittuvat keskenään, poistuvan massan mukana poistuu myös massaa, joka on viipynyt reaktorissa vähemmän aikaa, vaikuttaen bakteerien lisääntymiseen. (Morimoto ym. 2004, 709–713; Hussy, Hawkes, Dinsdale, Hawkes 2005, 471–485; Lo ym. 2009, 5802–5807.)

### 3.1.1 Substraatit

Vedyn tuotannon substraateiksi eli raaka-aineiksi soveltuvat erilaiset materiaalit, jotka biohajoavat anaerobisesti. Tärkeitä kriteerejä substraatin valinnalle biovedyn tuotantoon ovat raaka-aineen kestävyys kestävän kehityksen näkökulmasta, saatavuus, hinta, orgaaninen koostumus sekä biohajoavuus. Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että vedyn saanto on suurempi liukoisesta orgaani-

sesta aineesta, kuin kiinteästä orgaanisesta aineesta, sillä liukoiset orgaaniset ainekset hajoavat helpommin. Helposti biohajoavista yhdisteistä, kuten hiilihydraateista (glukoosi, sakkaroosi, maltoosi, selluloosa ja laktoosi) koostuvat raaka-aineet, ovat osoittautuneet vedyn tuotannon kannalta parhaimmiksi. Monimutkaisemmista yhdisteistä, kuten rasvoista ja proteiineista koostuvia raaka-aineita pidetään haasteellisempina ja niiden tuottamat vetysaannot ovat toistaiseksi melko vähäisiä. Puhdistus hiilihydraattilähteet eivät kuitenkaan sellaisenaan ole kannattavia substraatteja vedyn tuotantoon. Sen sijaan erityyppiset orgaaniset jätemateriaalit tarjoavat suuremman taloudellisen potentiaalin kiertotalous näkökulman huomioiden. Näitä jätemateriaaleja ovat esimerkiksi biojätteet, teurasjätteet, kotitalouksien ja teollisuuden jätevedet, jätevesilietteet, lannat sekä kasvijätteet (taulukko 1). Joista suurin vedyntuottopotentiaali on biojätteellä (35,2–91,5 H<sub>2</sub>m<sup>3</sup>/tVS), vihanneksilla (14,2–71,0 H<sub>2</sub>m<sup>3</sup>/tVS), peltokasveilla (16,0–82,2 H<sub>2</sub>m<sup>3</sup>/tVS) ja lannalla (6,4–81,3 H<sub>2</sub>m<sup>3</sup>/tVS). Käytännössä kuitenkin vedyn saanto ei riipu vain raaka-aineen koostumuksesta, vaan myös anaerobisen hajoamisen prosessiolosuhteet, prosessin bakteerikanta ja prosessin olosuhteiden säätäminen vaikuttavat vedyn saantoon. (Pandey, Chang, Hallenbeck & Larroche 2013, 120–126; Tähti & Rintala 2010, 1–53.)

TAULUKKO 1. Erilaisia vedyn tuotannon substraatteja ja näiden vedyntuottopotentiaaleja (Tähti & Rintala 2010, 1–53).

Jättemateriaali	Keskiarvo (H <sub>2</sub> m <sup>3</sup> /tVS)	Vaihteluväli (H <sub>2</sub> m <sup>3</sup> /tVS)
Biojäte	58,1	35,2–91,5
Teurasjäte	9,7	7,7–11,1
Vihannekset	49,1	14,2–71,0
Jätevesiliete (elintarviketeollisuus)	35,0	20,0–50,0
Peltokasvit	44,5	16,0–82,2
Lanta	38,4	6,4–81,3
Jätevesiliete	21,3	13,0–25,9
Jätevedet	40,0	-

Tässä opinnäytetyössä substraatteina käytetään sellu- ja paperiteollisuuden jätevesien puhdistusprosessin sivutuotteena syntyvää nollakuitua ja ruoanjalostuksen sivuvirtana syntyviä porkkana- ja kaalimassoja. Nämä raaka-aineet sisältävät helposti hajoavia yhdisteitä, esimerkiksi nollakuitu sisältää selluloosaa, hemiselluloosaa sekä ligniiniä (Palmroth 2019, 1–59). Porkkana- ja kaalimassat taas koostuvat mm. tärkkelyksestä ja sakkaroosista sekä glukoosista ja fruktoosista. (Rosa, David & Gomes 2001, 1145–1149.)

Biovedyn tuottaminen lignoselluloosabiomassasta on kannattava vaihtoehto, sillä lignoselluloosasta koostuvat raaka-aineet eivät kilpaile tärkkelyksestä sekä erilaisista sokereista koostuvien elintarvikikasvien kanssa ja ovat myös halvempia, kuin nämä tavanomaiset maatalouden tuotteet. Lignoselluloosamateriaalit koostuvat pääosin selluloosasta, helmiselluloosasta ja ligniinistä. Bakteerit eivät voi käyttää selluloosaa suoraan vedyn tuotannon raaka-aineena. Selluloosa kuitenkin hajoaa anaerobisen hajoamisen ensimmäisessä vaiheessa eli hydrolyysissä yksinkertaisemmiksi sokereiksi, joita bak-

teerit pystyvät käyttämään substraattina vedyn tuotannossa. Lignoselluloosasta koostuvia materiaaleja ovat esimerkiksi sellu- ja paperiteollisuuden jätteet ja jätevedet, oljet sekä jyvien kuoret ja leseit. (Pandey ym. 2013, 120–126; Tähti & Rintala 2010, 1–53.)

Vedyn tuotantopotentiaaliraportteja, sellu- ja paperiteollisuuden jätteistä ja jätevesiä substraattina käyttäen, on saatavilla hyvin huonosti. Nollakuitua on kuitenkin käytetty substraattina metaanintuotopotentiaali kokeissa, jossa käsittelemätön nollakuitu tuotti keskimäärin 250 l CH<sub>4</sub>/kg panostoimisella kuivämädätys tekniikalla (Palmroth 2019, 1–59). Nollakuidun metaanintuotopotentiaalia peilattaessa teoreettiseen biokaasun energiapotentiaalın Suomessa, nollakuidulla voisi myös olla vedyntuotopotentiaalia.

Kasvimassat sisältävät tärkkelystä ja erilaisia sokereita, kuten glukoosia, fruktoosia ja sakkaroosia, jotka soveltuvat hyvin vedyn tuotantoon. Kasvimassat usein tarvitsevat kuitenkin esikäsitteilyä, esimerkiksi murskaamalla tai jauhamalla, että biomassasta saataisiin helpommin hajoavaan muotoon. (Pandey ym. 2013, 120–126.)

Valtaosaa ravinnoksi kelpaavaa maanviljelyn tuotetta ei ole kannattavaa käyttää suoraan biovedyn tuotannossa. Maanviljelyn ja ruoanjalostuksen sivuvirtana kuitenkin muodostuu biojätettä, joka koostuu näistä ravinnoksi kelpaavista tuotteista. Tätä esimerkiksi varastotappioista, naateista ja muista ruoanjalostukseen kelpaamattomista massoista muodostunutta biojätettä olisi kannattavaa lähteä käyttämään biovedyn tuotannossa. Biovedyn tuotantoon sopivia kasvimassoja ovat myös energia tarkoitukseen viljeltyt kasvit, niin kutsutut energiakasvit, kuten esimerkiksi nurmikasvit ja heinäkasperit. Nämä energiakasvit soveltuvat vedyn tuotantoon niiden korkean hiilihydraattipitoisuuden ja alhaisen ligniinipitoisuuden vuoksi. (Tähti & Rintala 2010, 1–53.)

Tässä opinnäytetyössä substraatteina käytettäviä porkkana- ja kaalimassoja on tutkittu aiemmin biovedyn tuotannossa ja ne ovat osoittaneet omaavansa vedyntuotopotentiaalin. Taulukkoon 2 on koottuna erilaisten biomassojen vedyntuotopotentiaaleja, näistä esimerkiksi kaalin vedyntuotopotentiaali on 26,3–61,7 ml/gVS ja porkkanan 44,8–70,7 ml/gVS.

TAULUKKO 2. Erilaisten biomassojen vedyntuotopotentiaaleja (Tähti 2007, 23)

Substraatti	Ympäristö	Vedyn tuotto ml/gVS
Kaali	Anaerobinen liete (biojäte)	26,3–61,7
Porkkana	Anaerobinen liete (biojäte)	44,8–70,7
Riisi	Anaerobinen liete (biojäte)	19,3–96,0
Tofun tuotantojäte	Fermentoitu soijapapu	14,0–21,0
Riisilese	Fermentoitu soijapapu	31,0–61,0
Vehnälese	Fermentoitu soijapapu	10,0–43,0
Omenan jäte	Ei tiedossa	40,0
Rikotut jyvät	Ei tiedossa	34,0
Herneenpalko	Ei tiedossa	44,0
Vehnänkorret, ei esikäsitteilyä	Karjanlantakomposti	0,5
Vehnänkorret, HCl-esikäsitteily	Karjanlantakomposti	68,1

### 3.1.2 Ravinteet

Substraatin sisältämät ravinteet vaikuttavat myös siihen, kuinka suuri sen vedyntuottopotentiaali on. Sillä ravinteet vaikuttavat vetyä tuottavien bakteerien kasvuun sekä aineenvaihduntaan ja sitä kautta vedyn saantoon. Usein kuitenkin käyttäessä hiilihydraatteja vedyn tuotannon substraatteina erilaisten ravinteiden, kuten kivennäis- ja hivenaineiden lisäykset ovat välttämättömiä, jotta tuotannosta saadaan kaikki irti. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

Esimerkiksi typen lisääminen syötteeseen nostaa vedyn kokonaissaantoa, sillä typpi on tärkeä aminohappojen rakenneosia ja sitä tarvitaan mikrobien optimaaliseen kasvuun. Typpilähteen lisääminen kuitenkin nostaa fermentaatioprosessin kustannuksia suuremmassa mittakaavassa. Lisäksi hiili/typpi-suhteella (C/N-suhte) ja hiili/fosfori-suhteella (C/P-suhte) on merkittävä vaikutus fermentaatioprosessin vakauttamisessa, vedyn saannossa ja tuotantonopeudessa. Fosfaatti toimii myös yhtenä tärkeänä ravintoaineena vedyn tuotannossa, sillä fosfaatti parantaa fermentaatioprosessin suorituskykyä. Liian suuret fosfaattipitoisuudet voivat kuitenkin ohjata bakteerien aineenvaihdunnan tuottamaan enemmän liukoisia rasvahappoja, vedyn tuotannon sijasta, jolloin vedyn saanto pienenee. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

Useat hivenaineet, kuten magnesium (Mg), natrium (Na), sinkki (Zn), rauta (Fe), kalium (K), jodi (I), koboltti (Co), mangaani (Mn), nikkeli (Ni), kupari (Cu) ja kalsium (Ca) vaikuttavat vedyn tuotantoon. Näistä tärkeimmät ovat magnesium, natrium, sinkki ja rauta, sillä niiden on todettu vaikuttavan optimaalisilla pitoisuuksilla eniten vedyn saantoon. Nämä hivenaineet toimivat entsyymien kofaktoreina eli entsyymien täytyy sitoa kyseisiä ioneja itseensä toimiakseen. Raudan on esimerkiksi osoitettu vaikuttavan vedyn tuotannon kannalta keskeisesti toimivan hydrogenaasi entsyymin toimintaan positiivisesti. Myös magnesiumionin on todettu toimivan tärkeänä kofaktorina kymmenelle erilaisella entsyymille, kuten heksokinaasille, fosfofruktokinaasilla ja fosfoglyseraattikinaasille. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

### 3.1.3 Bakterikanta

Laaja kirjo erilaisia mikro-organismeja eli bakteereja voi tuottaa vetyä anaerobisissa olosuhteissa aineenvaihduntareittiensä kautta. Mikro-organismeja, jotka selviävät anaerobisissa olosuhteissa ja tuottavat vetyä kyseisissä olosuhteissa voidaan käyttää pimeäfermentaatioissa. Nämä mikro-organismit voidaan jakaa niiden happiherkkyyden ja lämpötilavaatimusten mukaan. Mikro-organismeja, jotka vaativat täysin hapettomia eli anaerobisia olosuhteita kutsutaan obligaatiksi anaerobeiksi ja mikro-organismeja, jotka kestävät aerobisia sekä anaerobisia olosuhteita kutsutaan fakultatiivisiksi anaerobeiksi. Lämpötilavaatimusten perusteella nämä bakteerit voidaan luokitella kolmeen eri luokkaan, mesofiileihin (+20–+45 °C), termofiileihin (+45–+65 °C) ja hypertermofiileihin (+75–+110 °C). Näiden joukosta termofiilien on raportoitu saavuttavan suurimman vedyn teoreettisen saannon (4 mol H<sub>2</sub>/mol glukoosia). (Pandey ym. 2019, 83–96.)

Yleisimpiä vetyä tuottavia bakteereja ovat *Clostridia*-, *Esherichia*-suvut, näiden lisäksi myös *Citrobacter*- ja *Bacillus*-suvun bakteerit voivat tuottaa vetyä. *Clostridia*-suvun bakteerit kuuluvat obligaatiksi anaerobiseen ryhmään. *Clostridia*-suvun bakteerit tuottavat vetyä käyttämällä mm. hydrogenaasi



entsyymejä. *Clostridia*-bakteerit on jaoteltu, sen mukaan mitä orgaanista ainesta ne hajottavat, sakkaryolyyttisiin ja proteolyyttisiin. Sakkaryolyyttiset *Clostridia*-suvun bakteerit hajottavat hiilihydraatteja ja proteolyyttiset proteiineja ja aminohappoja. *Esherichia*-suvun bakteerit kuuluvat fakultatiivisiin anaerobisiin bakteereihin, niitä on helpompi käsitellä reaktorissa vedyn tuotannon aikana, sillä ne kestävät aerobisia ja anaerobisia olosuhteita, lisäksi ne myös kestävät korkeampaa vedyn osapainetta. *Esherichia*-suvun bakteerit tuottavat vetyä käyttämällä hydrogenaasi- ja formiaattivetyyaasi (FHL)-entsyymejä. (Brock, Smith & Madigan 1984; Pandey ym. 2019, 83–96.)

Bakteerisiirroksena eli ympinä toiselta nimeltään herätepanoksena, voidaan vedyn tuotannossa käyttää puhdasta bakteeriviljelmää tai sekaviljelmää. Puhtaassa bakteeriviljelmässä on vain yhtä bakteerilajia ja sekaviljelma nimensä mukaisesti taas sisältää useampaa bakteerilajia. Puhdasta bakteeriviljelmää käyttämällä on osoitettu, että eri *Clostridium sp.* voi tuottaa vetyä 1,47–2,81 mol/mol glukoosia. Lukuisat tutkimukset ovat osoittaneet, että sekaviljelmän esim. lannan käyttäminen monimutkaisten orgaanisten ainesten hajottamisessa on kannattavampaa, kuin puhtaan bakteeriviljelmän. Sillä sekaviljelmässä on läsnä erityyppisiä organismeja, joten orgaanisen aineksen hajoamiseen ja hyödyntämiseen on käytettävissä erilaisia entsyymejä. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

## 3.2 Vedyn tuotannon optimointi

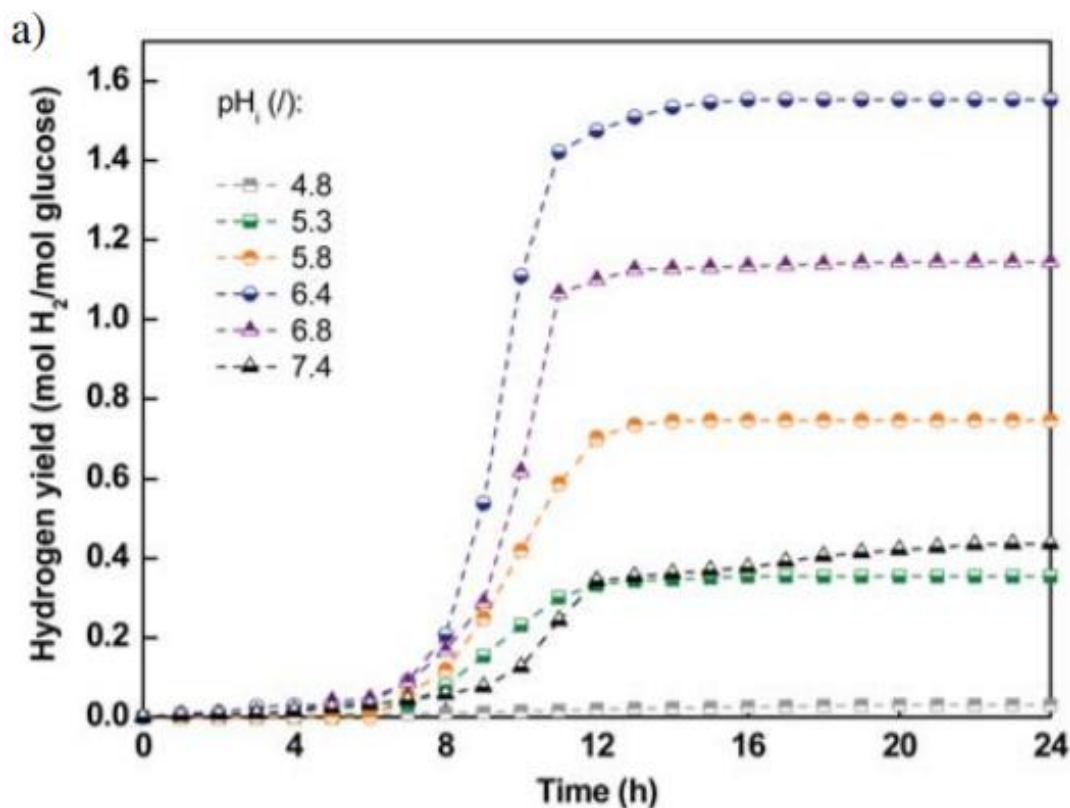
Fermentaatioprosessin raaka-aineen koostumus vaikuttaa vedyn tuotannon tehokkuuteen. Fermentaation tehokkuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat myös mikrobit ja niiden aineenvaihdunnan tuottamat metaboliatuotteet. Mikrobin aineenvaihdunta muuttuu olosuhteiden mukaan, joten olosuhteet vaikuttavat myös muodostuviin välituotteisiin. Bioreaktorissa vallitsevilla olosuhteilla on siis merkittävä vaikutus fermentaatioon ja fermentaatiolla tuotettavan vedyn saantoon. Säädettäviä olosuhteita vedyn tuotannossa ovat mm. pH, lämpötila, kuormitus, sekoitus ja viipymäaika. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

### 3.2.1 pH

Yksi vedyn tuotantoon vaikuttava parametri on pH, sillä se vaikuttaa organismien metaboliareitteihin, vaikuttamalla erilaisten soluentsyymien toimintaan. Jokaisella entsyymillä on oma optimaalinen pH-arvo, jossa kyseisen entsyymin aktiivisuus on suurin. Monet fakultatiiviset anaerobiset bakteerit tuottavat vetyä hapettamalla glukoosin pyruvaatiksi glykolyysillä. Pyruvaatin hapettumisella tuotettu loppumetaboliitti määrittää vedyn saannon. Syötteen pH vaikuttaa mm. hydrogenaasin aktiivisuuteen, joka on keskeinen entsyymi vedyn tuotannossa. Esimerkiksi, jos happokonsentraatio kasvaa bioreaktorin syötteessä, johtaa se syötteen pH-arvon laskemiseen. Tämä puolestaan laukaisee aineenvaihdunnan muutoksen kohti happojen muuttamista alkoholeiksi, jolloin vedyn tuotanto heikkenee. Hydrogenaasin toiminta siis estyy alhaisissa pH-arvoissa. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

Optimaalinen pH vedyn tuotantonopeuden maksimoimiseksi riippuu siis mikro-organismista sekä substraatista. Mikäli syötteen pH on jokin muu, kuin sen optimaalinen pH, johtaa se väistämättä vedyn kokonaistuotannon vähenemiseen. Siksi pH:n säätö on tärkeää vedyn tuotannon maksimoimiseksi. Erilaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että optimaalinen pH-arvo vedyn saannon kannalta olisi välillä 5,0–6,0. On myös tutkimuksia, joissa on osoitettu tämän optimaalisen pH-arvon olevan välillä 6,0–8,0. (Liu & Shen 2004, 251–256; Pandey ym. 2019, 83–96.)

Myös pH-arvo fermentaatioprosessin alussa vaikuttaa vedyn saantoon, sillä mitä korkeampi pH on alussa, sitä niukempi on kokonaisvedyntuotto. Tämä on seurasta siitä, että vedyn tuotto alkaa aikaisemmin ja vedyntuottonopeus on suurempi, mutta tuoton kesto on lyhyempi, jolloin kokonaisvedyntuotto jää alhaisemmaksi, kuin matalammalla alku pH-arvolla. (Khanal, Chen, Li & Sung 2004, 1123–1131; Fang, Li & Zhang 2006, 683–692.) Tutkimuksessa, jossa substraattina käytettiin yksinkertaisia hiilihydraatteja, korkein vedyn tuotantonopeus ja vedyn saanto saatiin alku pH-arvon ollessa 6,4 (kuva 4). (Muri, Osojnik, Djinović & Pintar 2016, 1–11.)



KUVA 4. Erialaisten alku pH-arvojen vaikutus vedyn saantoon (Muri ym. 2016, 1-11)

### 3.2.2 Lämpötila

Vedyn tuottaminen pimeäfermentaatiolla voi tapahtua eri lämpötiloissa bakteerien tyypin mukaan. Fermentaatio voi tapahtua mesofiilisissa (25–40 °C), termofiilisissa (40–65 °C), äärimmäisen termofiilisissa (65–80 °C) tai hypertermofiilisissa (> 80 °C) olosuhteissa. Suurin osa laboratoriomittakaavan fermentaatiokokeista on tehty mesofiilisissa olosuhteissa. (Pandey ym. 2019, 83–96.)

Lämpötilalla on merkittävä vaikutus vedyn tuotantoon, koska se vaikuttaa bakteerien kasvunopeuteen ja jakaumaan, substraatin hajoamiseen sekä lopputuotteiden jakaumaan. Lämpötilan ei kuitenkaan tulisi ylittää sen optimaalista arvoa, sillä se voi johtaa entsyymien toiminnan häiriöihin ja sitä kautta vedyn tuotannon heikkenemiseen. (Lin, Chang & Hung 2008, 2445–2453.)

Vedyn tuotannon riippuvuus käyttölämpötilasta on todettu useilla eri kokeilla. Esimerkiksi tutkimuksessa, jossa tutkittiin optimaalista lämpötilaa vedyn tuottamiseksi sekaviljelmällä välillä 30–55 °C, suurin vedyn tuotanto saatiin 45 °C:ssa (Lin ym. 2008, 2445–2453). Kun taas tutkimuksessa sekaviljelmällä lämpötilan vaihdelta välillä 15–35 °C, suurin vedyn tuotanto saatiin 35±1 °C:ssa (Lee, Lin & Chang 2006, 465–472).

On myös raportoitu, että termofiilisissa olosuhteissa vedyn saanto on suurempi, kuin mesofiilisissa olosuhteissa. Tämä luultavasti johtuu siitä, että lämpötilan nostaminen lisää bakteerien vedyn tuoton aktiivisuutta. Liian korkea lämpötila voi kuitenkin joskus heikentää vedyn tuotantoa, sillä esimerkiksi hydrogenaasi entsyymien toiminta saattaa inaktivoitua, jos lämpötila nousee liian korkeaksi. (Lee ym. 2006, 465–472.)

### 3.2.3 Vedyn osapaine

Bioreaktorissa vallitseva vedyn osapaine on hyvin merkittävä tekijä vedyn tuotannossa. Vedyn osapaine nousee bioreaktorissa anaerobisten ja fakultatiivisten anaerobisten bakteerien suorittaman orgaanisen aineksen hajottamisella tuotetun vedyn kertyessä sinne. Le Châtelier'n periaatteen mukaan tuotetun vedyn kertyminen bioreaktoriin voi nostaa vetytitoisuutta siten, että vedyn tuotto alkaa laskea, koska bakteerit siirtyvät tuottamaan pelkistyneempiä tuotteita, kuten etanolia, asetonia ja butanolia. Tutkimusten mukaan etenkin vedyn jatkuvassa tuotannossa vedyn osapaine on hyvin kriittinen tekijä vedyn tuoton kannalta. Tutkimukset ovat myös osoittaneet korrelaation bioreaktorin käyttölämpötilan ja vedyn optimaalisen osapaineen välillä. Tämän vuoksi vedyn osapaine tulisi pitää alhaalla poistamalla tuotettua vetyä järjestelmästä, tehokkaamman vedyn tuotannon ylläpitämiseksi. (Hawkes, Hussy, Kyazze, Dinsdale & Hawkes 2007, 172–184.)

Vedyn erottamiseksi tai poistamiseksi järjestelmästä on kehitetty erilaisia tekniikoita. Vetyä voidaan esimerkiksi poistaa joko jaksottaista Owen-menetelmää käyttäen tai jatkuvalla menetelmällä. Erään tutkimuksen mukaan, kun vedyn poistoon käytettiin jatkuvaa menetelmää, verrattuna jaksottaiseen Owen-menetelmään vedyn tuoton todettiin olevan 43 % suurempi. (Logan, Oh, Kim & Van Ginkel 2002, 2530–2535.) Vety voidaan myös huuhdella reaktorista pois typpi- tai argonkaasulla. Esimerkiksi erään tutkimuksen mukaan vedyn tuotanto parani 68 % bioreaktorin huuhtelulla typpikaasulla, verrattuna tilanteeseen, jossa reaktoria ei huuhdeltu. (Mizuno, Dinsdale, Hawkes, Hawkes & Noike 2000, 59–65.)

### 3.2.4 Sekoitus

Sekoituksen avulla varmistetaan, että bioreaktorissa hajottamista suorittavat mikro-organismit pääsevät kosketuksiin bioreaktoriin syötettävän materiaalin kanssa, tasataan pH:ta, sen avulla myös tasataan lämmön ja ravinteiden jakautuminen sekä varmistetaan kaasun eteneminen kaasunkeräykseen. Sekoittamisen avulla estetään lisäksi sedimenttien muodostuminen eli syötteen kerrostuminen. Mikäli bioreaktoriin syötettävää materiaalia ei sekoiteta tarpeeksi, eliömassa kerrostuu reaktorin pohjalle ja suurin osa syötteestä kertyy lähelle pintaa. Jolloin biovedyn tuotanto saattaa heikentyä. Sekoittaminen ennaltaehkäisee myös raskaista materiaaleista, kuten hiekasta muodostuvien saostumien muodostumista bioreaktorin pohjalle. Sekoittamista ei kuitenkaan saisi suorittaa liian voimakkaasti tai liian paljon, sillä näiden on havaittu vaikuttavan kaasuntuottoon alentavasti. Sekoitus on yhteydessä viipymäaikaan, sillä kun bioreaktoriin syötetyt massat sekoittuvat keskenään, poistuvan massan mukana poistuu myös massaa, joka on viipynyt reaktorissa vähemmän aikaan, vaikuttaen biovedyn tuotantoon. (Morimoto ym. 2004, 709–713; Al Seadi ym. 2008, 27–80; Audiopek Oy ym. 2013, 1–13.)

### 3.2.5 Viipymäaika

Fermentatiivisessa vedyn tuotannossa viipymäaika on ratkaiseva tekijä vedyn tuotantopotentiaalın näkökulmasta. Viipymäaika on aika, jonka syöte on bioreaktorissa, se kuitenkin vaihtelee hiukan bioreaktoriin eriaikaan syötettävien materiaalien sekoittumisen ja massojen poistamisen vuoksi. Viipymäaika on avaintekijä mikro-organismien toiminnassa, niiden kasvunopeuden perusteella. Metaania tuottavien bakteerien spesifinen kasvunopeus on hitaampi verrattuna vetyä tuottavien bakteerien kasvunopeuteen. Tutkimuksissa, joissa syötteenä on käytetty mm. jätevesilietettä, lyhytviipymäaika on pystynyt estämään hitaasti kasvavien metanogeenien lisääntymisen bioreaktorissa, jolloin vetyä tuottavat bakteerit ovat päässeet lisääntymään. (Morimoto ym. 2004, 709–713; Lo ym. 2009, 5802–5807.) Esimerkiksi tutkimuksen perusteella, jossa raaka-aineena käytettiin puhdasta bakteeriviljelmää vedyn tuotantoa, voidaan tehostaa alentamalla viipymäaikaa kahdeksasta tunnista kuuteen tuntiin. Sillä viipymäajan alentaminen vähentää propionaatin tuotantoa, mikä johtaa suurempiin vetyisaantoihin. (Zhang, Bruns & Logan 2006, 728–734.) Tutkimuksessa, jossa raaka-aineena käytettiin biojätettä optimi viipymäaika vedyn tuotannon kannalta, oli 36 tuntia, bioreaktorin ollessa jatkuva-toiminen fermentori. Optimi viipymäaikaan vaikuttaa siis fermentaatioprosessin olosuhteet sekä käytössä olevan raaka-aineen koostumus. (Ghimirea ym. 2015, 73–95.)

Viipymäaika voidaan laskea kaavalla 4 (Abdelgadir ym. 2014, 1–4).

$$HRT = \frac{V_R}{V}$$

4

Jossa,

HRT= hydraulinen viipymäaika (vrk)

$V_R$ = reaktorin tilavuus (m<sup>3</sup>)

$V$ = syöttötilavuus (m<sup>3</sup>/vrk)

### 3.2.6 Kuormitus

Kuormituksella tarkoitetaan sitä, kuinka paljon orgaanista materiaalia bioreaktoriin voidaan tiettyä aikayksikköä kohti syöttää. Bioreaktorin maksimaalinen kuormitus riippuu reaktoriin syötettävän materiaalin ominaisuuksista eli siitä kuinka helposti hajoavaa materiaalin orgaaninen aines on, esimerkiksi ruoantähteiden ja energiakasvien hajotus sallii suuremman kuormituksen kuin eläinlannan hajotus. Kuormitusta voidaan säädellä viipymäajalla, sillä viipymäaika määrittää myös reaktoriin kohdistuvan orgaanisen kuormituksen. (Audiopek Oy ym. 2013, 1–13; Abdelgadir ym. 2014, 1–4.)

Etenkin jatkuvatoimisten reaktoreiden kohdalla kuormitus vaikuttaa suuresti vedyntuottopotentiaaliin. Vedyn tuotannon kannalta korkeampi kuormitus on edullisempi, mutta kuormituksen noustessa liian korkeaksi vedyntuottopotentiaali pienenee. Ylikuormitus voi aiheuttaa vedyn osapaineen nousun ja laskee pH:n, joiden seurauksena vedyn tuotanto voi laskea, koska olosuhteet muuttuvat edullisemmaksi vetyä käyttäville bakteereille. Osa substraatista voi jäädä hyödyntämättä tai prosessi voi alkaa muodostaa alkoholeja, mikäli ylikuormitus jatkuu liian pitkään. (Van Ginkel, Sung & Lay 2001, 4726–4730; Fan & Chen 2004, 1059–1068.)

Van Ginkel & Logan (2005, 3819–3826) osoittivat tutkimuksessaan, kuormituksen vaikutuksen vedyn tuotantoon ja viipymäajan yhteyden kuormitukseen. Tutkimuksessa jatkuvatoimisessa reaktorissa

käsiteltäessä glukoosia, vedyn tuotto kasvoi, kun kuormitusta pienennettiin viipymäaikaa pidentämällä.

Orgaaninen kuormitus voidaan laskea kaavalla 5 (Al Seadi ym. 2008, 27–80).

$$OLR = \frac{m \cdot c}{V_R}$$

5

Jossa,

OLR = orgaaninen kuormitus (kgVS/m<sup>3</sup>/d)

m = bioreatoriin syötetyn materiaalin massa (t/vrk)

c = syötteen VS-pitoisuus

V<sub>R</sub> = bioreaktorin tilavuus (m<sup>3</sup>)

### 3.2.7 Happi

Happi on kriittinen parametri fermentaatioprosessissa, liennut happi on usein rajoittava tekijä korkean solutiheyden saavuttamiseksi fermentaatiolla. Solujen kasvaessa liunneen hapen kysyntä kasvaa. On tunnettua, että obliigaatti anaerobisten organismien kasvu edellyttää pelkistävien aineiden, kuten L-kysteinihydrokloridin läsnäoloa syötteen anaerobisuuden ylläpitämiseksi. Näiden pelkistävien aineiden käyttö kuitenkin lisää fermentaatioprosessin kustannuksia. Pelkistimien tarpeen poistamiseksi on tutkittu onnistuneesti sekaviljelmää, joissa fakultatiiviset anaerobit organismit kuluttavat syötteessä olevaa happea, joka auttaa anaerobisen tilan luomisessa ja siten edistävät obliigaatti anaerobisten organismien vedyn tuotantoa. (Yokoi, Saitsu, Uchida & Hirose 2001, 58–63; Eppendorf 2017, 1.)

### 3.2.8 Hiilidioksidi

Fermentaatiossa vetyä menetetään asetogeneesissa, kun vedystä ja hiilidioksidista muodostuu aseptaattia. Tämä johtuu siitä, että korkea hiilidioksidipitoisuus ohjaa joidenkin asetogeenisten bakteerien aineenvaihdunnan pois vedyn tuotannosta. On tutkittu, että hiilidioksidin vähentäminen prosessista voi lisätä vedyn saantoa 43 % (1,4 moolista 2,0 mooliin H<sub>2</sub>/mol glukoosia). Nämä tulokset osoittavat, että vedyn tuotantoa voidaan lisätä poistamalla hiilidioksidia reaktorista, jolloin todennäköisesti näiden asetogeenisten bakteerien toiminta estyy ja vedyn tuotto lisääntyy. (Park, Hyun, Oh, Logan & Kim 2005, 4416–4420.) On myös todettu, että hiilidioksidin poistaminen auttaa estämään hiilidioksidista ja vedestä muodostuneen hiilihapon aiheuttaman pH:n laskun bioreaktorissa. (Liang, Cheng & Wu 2002, 1157–1165.)

### 3.2.9 Redox-potentiaali

Redox-potentiaali on suure, joka mittaa kuinka helposti molekyyli ottaa vastaan elektroneja ja sitä kautta pelkistyy eli toimii hapettimena. Tämä tarkoittaa sitä, että mitä suurempi aineen redox-potentiaali on, sitä helpommin aine pelkistyy. (Doble & Kumar 2005, 111–122.)

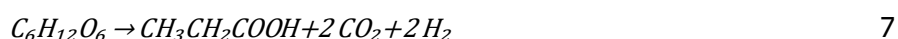
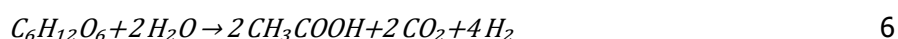
Redox-potentiaali on kääntäen verrannollinen kaasun tuottoon, eli kun redox-potentiaali kasvaa, kaasun tuotanto pienenee ja päinvastoin. Redox-potentiaalilla voidaan siis ennustaa vedyn tuo-

ton regressio. Redox-potentiaaliin vaikuttaa syötteen pH sekä reaktorissa olevien hapettavien ja pelkistävien aineiden pitoisuudet. Esimerkiksi tutkimuksessa, jossa substraattina käytettiin sakkaroosia ja sokerijuurikasta, optimi vedyntuottopotentiaali saavutettiin, kun redox-potentiaali oli välillä -250 mV– -150 mV. Samassa kokeessa redox-potentiaalilla ollessa >-150 mV vedynsaanto heikkeni. (Hussy ym. 2005, 471–485; Ren ym. 2007, 1774–1780.)

### 3.2.10 Aineenvaihduntatuotteet

Fermentatiivisessa vedyn tuotannossa metabolisten lopputuotteiden tiedetään vaikuttavan vetysaantoon. Yleisimmät näistä metabolisista liukoista lopputuotteista ovat asetaatti, etanoli, butanoli, butyraatti ja propionihappo. Prosessin olosuhteet, kuten vedyn osapaine, pH ja viipymäaika vaikuttavat vahvasti siihen, mitä liukoisia aineenvaihdunta tuotteita muodostuu. (Lee, Miyahara & Noike 2002, 694–698; Pandey ym. 2019, 83–96.)

Mikäli aineenvaihdunnan lopputuotteena syntyy propionaattia ja muita pelkistyneitä lopputuotteita, kuten alkoholeja ja maitohappoja, alentavat ne vedyn saantoa, sillä nämä pelkistyneet lopputuotteet sisältävät vetyä, siispä vety ei vapaudu kaasuna. Vedyn saannon maksimoimiseksi, tulisi prosessi suunnata tuottamaan haihtuvia rasvahappoja, pelkistyneiden aineenvaihduntatuotteiden sijaan. Vetyä saadaan teoreettisesti enintään 4 mol H<sub>2</sub>/mol glukoosia, kun lopputuotteena on asetaatti (kaava 6) ja lopputuotteen ollessa butyraatti teoreettinen maksimisaanto on 2 mol H<sub>2</sub>/mol glukoosia (kaava 7). Teoriassa suurin vedyn saanto saadaan lopputuotteen ollessa asetaatti, mutta todellisuudessa suurin vedyn saanto saadaan asetaatin ja butyraatin sekoituksella. (Levin, Pitt & Love 2004, 173–185; Zhang ym. 2014, 66–67; Abdelgadir ym. 2014, 1–4.)



Haihtuvien rasvahappojen runsas kerääntyminen prosessiin aiheuttaa kuitenkin pH:n laskemista, joka voi inhiboida vedyn tuotantoa. Esimerkiksi hydrogenaasi-entsyymin toiminta estyy alhaisessa pH:ssa, joten haihtuvien rasvahappoja tulisi poistaa prosessista, sillä niiden poistaminen lisää vedyn tuottoa. (Khanal ym. 2004, 1123–1131.)

Lee ym. (2002, 694–698) osoittivat haihtuvien rasvahappojen estävän vaikutuksen vedyn tuotantoon suorittamalla tutkimuksen, jossa he lisäsivät liukoisia aineenvaihduntatuotteita syötteeseen. Artikkelissa todettiin, että lisäämällä asetaattia, etanolia, propionihappoa ja butyraattia välillä 0–0,3 mol/l, vedyn tuotantopotentiaali, substraatin hajoamistehokkuus ja vedyn tuotannon nopeus sekä vedyn saanto romahtivat merkittävästi VFA-pitoisuuden kasvaessa.

## 4 LABORATORIOMITTAKAAVAN FERMENTAATIOKOKKEET

### 4.1 Laboratoriokokeiden lähtökohdat ja suunnittelu

Opinnäytetyössä selvitettiin biopohjaisten raaka-aineiden vedyntuottopotentiaali jatkuvatoimisia bioreaktoreita eli fermentoreja apuna käyttäen. Opinnäytetyön laboratoriokokeiden raaka-aineina käytettiin kaalia ja porkkanaa sekä nollakuitua. Kaali ja porkkana, jotka eivät enää täyttäneet päiväyslupausa saatiin Heinon Tukku Oy:lta Kuopion toimipisteeltä (kuva 5). Lisäksi ruokahävikkinä syntynyttä kaalia ja porkkanaa saatiin Antell Round ravintolalta Kuopion Novapolikselta. Sellu- ja paperiteollisuuden jätevesien puhdistusprosessin sivutuotteena syntyvä nollakuitu taas saatiin Stora Enso Oyj:n Varkauden pakkauskartonkitehtaalta (kuva 6). Bakteerisiirroksena eli ymppinä fermentaatioprosessissa käytettiin LUKE Maaningan biokaasulaitoksen käsittelyjäänöstä. Ympäri esikäsiteltiin reaktoreihin helpommin syötettäväksi siivilöimällä siitä isoimmat jakeet pois. Tämän jälkeen ympäri lämpökäsiteltiin vesihautteen avulla 30 minuutin ajan 80 °C:ssa. Lämpökäsittelyn avulla fermentaatioprosessiin valikoitiin vetyä tuottavia bakteereja metanogeenien sijaan.



KUVA 5. Päiväyslupauksen menettäneet kaali ja porkkana (Minkkinen 2021, CC BY-SA)



KUVA 6. Nollakuitu (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

Laboratoriokokeissa käytetyt kaali ja porkkana esikäsiteltiin myös helpommin hajoavaan sekä syötettävään muotoon. Ensin kaali ja porkkana pilkottiin, jonka jälkeen suoritettiin pehmentäminen keittämällä. Tämän jälkeen pehmentynyt massa syötettiin lihamyllyn läpi kaksi kertaa, jolloin lopputuloksena saatiin karkeajakoista sosetta (kuva 7). Nollakuidun korkean kuiva-aineen ja orgaanisen aineen pitoisuuden vuoksi se imeytettiin ionivaihdettuun veteen, jolloin syötteen TS- ja VS-pitoisuudet saatiin vastaamaan porkkanan ja kaalin TS- ja VS-pitoisuuksia (kuva 8). Raaka-aineita säilytettiin kokeiden ajan 7 °C:ssa kylmiössä.



KUVA 7. Porkkanan ja kaalin esikäsittely vaihe vaiheelta (Minkkinen 2021, CC BY-SA).



KUVA 8. Nollakuidun ja ionivaihdetun veden seos (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

Tämän jälkeen tutkittavien raaka-aineiden TS- ja VS-pitoisuuksien pohjalta laskettiin kullekin raaka-aineelle sopiva syöttötavoite (gVS) ja viipymäaika (pv). Syöttötavoitteen perusteella raaka-aineille laskettiin sopiva kuormitus (g/d) fermentaatioprosessin kannalta. Syöttötavoite (gVS) laskettiin raaka-aineiden VS-pitoisuuden (%) ja fermentorien 4 litran tehollisen tilavuuden perusteella. Sitten tutkittavat raaka-aineet sekä ympäri lisättiin reaktoreihin ja suoritettiin lämpötilan, pH:n sekä sekoituksen (rpm) säätö halutulle tasolle.



Ennen reaktoreiden sulkemista, niiden ilmatila huuhdeltiin typpikaasulla ( $N_2$ ), jolloin anaerobiset olosuhteet saavutettiin nopeasti ja happi saatiin poistettua. Tämän jälkeen reaktorit suljettiin liittämällä kaasuventtiileihin kaasunkeräyspusit. Pimeäfermentaation toteutumisen varmistamiseksi fermentorien reaktorit peitettiin foliolla, niin ettei valo päässyt vaikuttamaan fermentaatioprosessiin (kuva 9). Myös laboratoriotilassa työskennellessä valot pyrittiin pitämään mahdollisuuksien mukaan poissa päältä. Vetykaasun räjähdysherkkyyden vuoksi, laboratorionkoikeiden turvallisuus huomioitiin sijoittamalla laboratoriotilaan vetyhälyttimet, jotka ilmaisivat, jos ilmatilaan alkaisi vuotaa vetykaasua.



KUVA 9. Peitetyt fermentorien reaktorit (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

#### 4.2 Käytetyt reagenssit ja materiaalit

Fermentaatioprosessin vetyä tuottavien bakteerien aineenvaihdunnan ja kasvun nopeuttamista varten valmistettiin ravinneliuos, joka sisälsi eri hivenaineita ja ravinteita. Hivenaineista tärkeimpiä näistä olivat magnesium ja rauta, sillä ne toimivat kofaktoreina eli bakteerien aineenvaihduntaa kiihdyttävinä. Ravinneliuosta annosteltiin syötteeseen 33 ml syöte litraa kohden, jolloin ravintoaineita syöte kilogrammaa kohden tuli noin 30 mg. Ravinneliuosta annosteltiin syötteeseen aina raaka-aineen lisäyksen yhteydessä. Liuoksessa hiili/typpi/fosfori-suhde eli C/N/P-suhde oli 100/0,5/0,1. Alla olevassa taulukossa 3 on esitetty ravinneliuoksessa käytetyt hivenaineet ja ravinteet sekä niiden kemikaalilähteet.

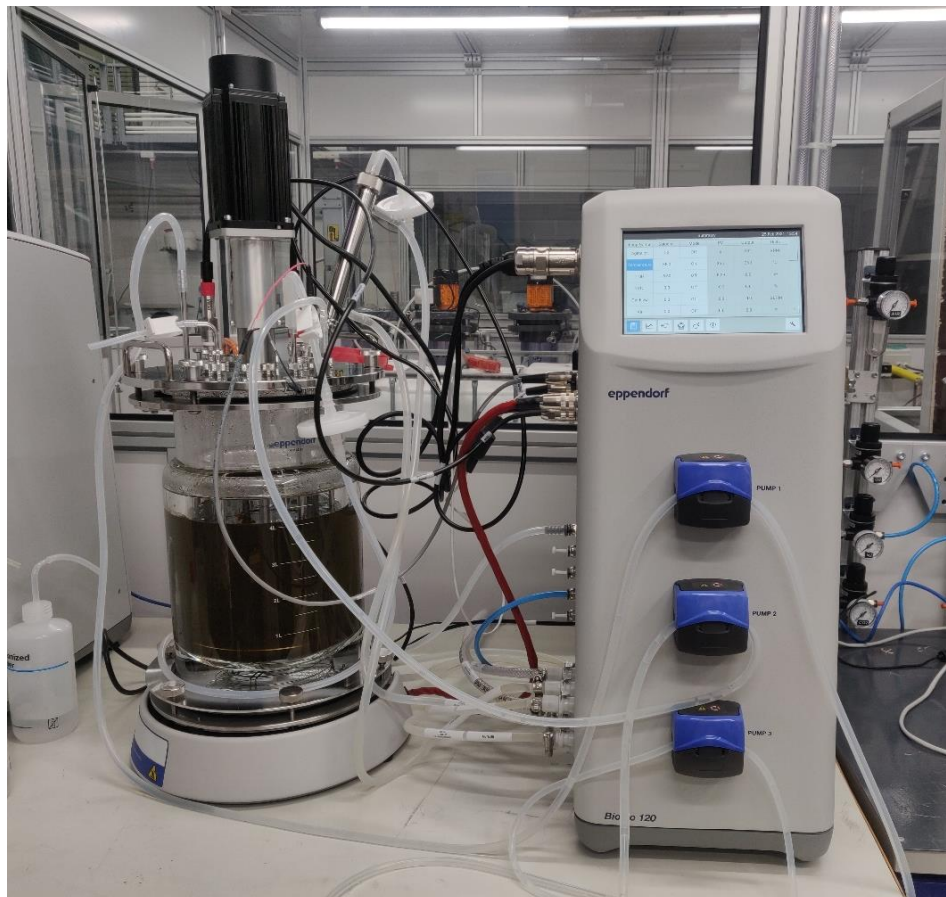
TAULUKKO 3. Ravinneliuoksessa käytetyt kemikaalit

Hivenaine	Lähde	Kemikaali
Magnesium	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Magnesiumsulfaattiheptahydraatti
Natrium	$NaCOOCH_3$	Natriumasetaatti
Sinkki	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Sinkkisulfaattiheptahydraatti
Rauta	$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7 H_2O$	Rautasulfaattiheptahydraatti
Kalium	KOH	Kaliumhydroksidi
Kalsium	$Ca(OH)_2$	Kalsiumhydroksidi
Ravinteet	Lähde	Kemikaali
Fosfori	$KH_2PO_4$	Kaliumdivetyfosfaatti
Hiili	$NaCOOCH_3$	Natriumasetaatti
Typpi	$H_2NCONH_2$	Urea

Fermentorien syötteen pH:ta säädettiin 5 M suolahapon (HCl) ja 5 M natriumhydroksidin (NaOH) avulla. Syötteeseen lisättiin natriumvetykarbonaattia (NaHCO<sub>3</sub>) puskuriskemikaaliksi hillitsemään fermentaatioprosessissa muodostuvien haihtuvien rasvahappojen aiheuttamaa pH:n alenemista. Natriumvetykarbonaattia annosteltiin 5 g syöte kilogrammaa kohden. Nollakuidun kohdalla syötteeseen lisättiin rautakloridiliuosta (FeCl<sub>3</sub>) ehkäisemään rikkivedyn muodostumista fermentaatioprosessissa. Rautakloridia annosteltiin 6 mg syöte kilogrammaa kohden. Liukoisia rasvahappoja määrittäessä automaattititraattorin titranttina toimi 0,1 M natriumhydroksidi sekä näytteiden esikäsitelyssä pH:n säätö suoritettiin 0,2 M rikkihapolla (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Laboratoriokokeissa käytettyjen kemikaaliliuosten valmistuksessa ja nollakuidun laimennuksessa käytettiin ionivaihdettua vettä.

#### 4.3 Käytetyt laitteet

Vedyn tuottopotentiaalikokeet suoritettiin kahdella Eppendorfin laboratoriomittakaavan BioFlo 120 fermentorilla, jotka sisälsivät ohjausyksikön, kaasunsyöttölinjan sekä 5 litran reaktorin, johon sisäänrakennettuna kuului pH-, liuennut happi-, lämpötila- sekä pinnankorkeuselektrodit (kuva 10). Elektrodien sekä ohjausyksikön avulla fermentaatioprosessin olosuhteita saatiin säädettyä ja ylläpidettyä osittain automaattisesti.



KUVA 10. Laboratoriokokeissa käytetty fermentori (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

Kuiva-aineen ja orgaanisen aineen määrityksissä käytettiin posliinisia lasitettuja upokkaita, joihin tutkittavat näytteet laitettiin ja punnittiin kuivatuksen sekä hehkutuksen jälkeen. Määrityksessä upokkaat jäähdytettiin eksikkaattorissa ja punnitukset tehtiin Scaltecin SBC 31 analyysivaa'alla.

Haihtuvien rasvahappojen määritykset suoritettiin Hachin TitraLab® AT1000 Series automaattititraattorilla. Näytteiden pH säädettiin arvoon 3,5 ennen VFA-määritystä. Näytteiden käsittely ja titraus suoritettiin menetelmäohjeen mukaisesti magneettisekoittajaa ja WTW:n pH 3210 mittaria, keittolevyä ja lämpömittaria apuna käyttäen. Valmistelun jälkeen näytteiden kokonais-VFA (mg CH<sub>3</sub>COOH/l) määritys suoritettiin automaattititraattorin avulla (kuva 11). Näytteiden pH-arvoja titrauksen aikana mitattiin automaattititraattorin omalla pH PHC102 elektrodilla. Laboratoriokokeissa käytetyt laitteet ja elektrodit löytyvät alla olevasta taulukosta 4.



KUVA 11. Automaattititraattori (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

Redox-potentiaali (mV) sekä sähkönjohtokyky (mS/cm) mitattiin näytteistä Hachin HQ40d multi käsimittarilla kyseisten muuttujien elektrodeja apuna käyttäen. Näytteiden pH-arvot ja happipitoisuus (%) mitattiin fermentorien sisäänrakennettujen pH- ja liuennut happielektrodien avulla.

Fermentaatioprosessissa syntyneen kaasun koostumuksen mittaaminen suoritettiin Drägerin vety-, hiilidioksidi- ja rikkivety ilmaisinputkilla sekä ilmaisinputkille sopivalla Drägerin käsikäyttöisellä Accuro putkipumpulla. Muodostuneen kaasun määrä selvitettiin Savonia-ammattikorkeakoulun rakentamalla vesikäyttöisellä tilavuudenmittasäiliöllä.

TAULUKKO 4. Laboratoriokokeissa käytetyt laitteet ja elektrodit

Laitteet ja elektrodit	Merkki	Malli	Lisätiedot
Käsimitari	Hach	HQ40d multi	
Sähkönjohtokyky-elektrodi	Hach	CDC401	Tarkkuus $\pm 0,5 \%$
ORP-elektrodi	Hach	IntelliCAL MTC101	Tarkkuus $\pm 0.02 \text{ mV}$
Fermentorit	Eppendorf	BioFlo® 120	5 l reaktori, borosilikaattilasias
pH-elektrodi	Mettler Toledo	InPro 3253 i	Tarkkuus $\pm 0,01 \text{ pH}$
Liuennot happielektrodi	Mettler Toledo	InPro 6850 i	Tarkkuus $\pm 0,1 \%$
Lämpötila-elektrodi	Eppendorf	RTD Pt100	Platinaa
Pinnankorkeuden-elektrodi	Eppendorf	Level Sensor	Ruostumatonta terästä
Hehkutusuuni	Carbolite		550 °C
Kuivatusuuni	Memmert		105 °C
Upokkaat	VWR		Posliinia, lasitus sisä- ja ulkopuolelle
Eksikkaattori	VWR		Borosilikaattilasias
Analyysivaaka	Scaltec	SBC 31	Tarkkuus $\pm 0,1 \text{ mg}$
Automaattititraattori	Hach	TitraLab® AT1000 Series	
pH-elektrodi	Hach	PHC102	Tarkkuus $\pm 0,02 \text{ pH}$
pH-mittari	WTW	pH 3210	Elektrodi: WTW 103631 SenTix 21 pH
Magneettisekoittaja	VELP Scientifica	F203A0160 MST	
Keittolevy	Heidolph	MR 3001 K	
Lämpömittari	VWR	Traceable Lollipop	Mittausalue -50 °C - + 300 °C
Putkipumppu	Dräger	Accuro	
Tilavuudenmittasäiliö			PVC-muovia

#### 4.4 Käytetyt analyysimenetelmät

Opinnäytetyön laboratoriokokeet suoritettiin Savonia-ammattikorkeakoulun ympäristötekniikan opetus- ja tutkimusyksikön laboratoriossa. Tutkittavien raaka-aineiden ja ympin kuiva-ainepitoisuudet ja orgaanisen aineen pitoisuudet määritettiin standardin SFS 3008 (1990) mukaisesti kolmena rinnakkaisena näytteenä ennen reaktoreihin syöttämistä.

Vedyn tuotannon optimointi kokeet suoritettiin kahdella laboratoriomittakaavan jatkuvatoimisella fermentorilla. Laboratoriokokeet käynnistettiin reaktoreiden ylös ajolla 25.2.2021 kaalilla ja porkkanalla. Fermentorien reaktoreihin lisättiin kokeiden käynnistämiseksi tutkittavia raaka-ainetta 200 grammaa sekä loput tilavuudesta bakteerisiirroksena toimivaa ympäriä, täyttöasteena 4 litraa syötettä. Reaktoreiden lämpötilat säädettiin 35 °C:seen ja pH 5,00–5,50 välille, sekoitus asetettiin 100 rpm ja happipitoisuus mahdollisimman alas. Kokeet toteutettiin siis jatkuvatoimisena, jolloin reaktoreista poistettiin kokeen aikana päivittäin materiaalia (poiste) ja tilalle lisättiin saman verran raaka-ainetta syöttötavoitteen mukaan (syöte). Nollakuidun vedyn tuottopotentialikokeen aloituksessa hyödynnettiin kaali ja porkkana koeajoista jäänyttä bakteerikantaa. Tutkittavan raaka-aineen vaihto toteutettiin aloittamalla nollakuidun syöttäminen suoraan reaktoreiden syötteeseen. Nollakuidun syöttäminen reaktoreihin aloitettiin 23.3.2021.

Kaalin ja porkkanan vedyn tuottopotentialikokeet kestivät kaksi viikkoa, kokeet aloitettiin reaktoreiden ylös ajon jälkeen 8.3.2021 ja kokeet lopetettiin 22.3.2021. Nollakuidun vedyntuottopotentialia tutkittiin kahdella eri kuormituksella noin puolentoista viikon ajan. Tutkiminen aloitettiin syötteen vaihdon jälkeen 29.3.2021 ja kokeet lopetettiin 6.4.2021. Vedyn tuottopotentialikokeiden aikana

reaktoreista otettiin näytteitä viitenä päivänä viikossa, joista vedyn tuotannon optimoimiseksi seurattiin TS- ja VS-pitoisuuksia, VFA määrä, pH:ta, redox-potentiaalia, sähkönjohtokykyä sekä happipitoisuutta. TS- ja VS-pitoisuudet määritettiin kokeiden alussa, puolivälissä sekä lopussa standardin SFS 3008 (1990) mukaan. VFA määrää tutkittiin kolmena päivänä viikossa ja pH:ta, redox-potentiaalia, sähkönjohtokykyä sekä happipitoisuutta seurattiin viitenä päivänä viikossa. Alla olevaan taulukkoon 5 on koottuna laboratoriokokeissa käytetyt menetelmät.

TAULUKKO 5. Laboratoriokokeissa käytetyt menetelmät

Tutkimus	Menetelmä	Lisätiedot
VFA-määritys	Savonian sisäinen menetelmä	Kaksi rinnakkaista näytettä
Redox-potentiaali	Savonian sisäinen menetelmä	Tulokset yksikössä: mV
Happipitoisuus	Savonian sisäinen menetelmä	Tulokset yksikössä: %
Sähkönjohtokyky	Standardi: SFS-EN 27888 (1994)	Tulokset yksikössä: mS/cm
pH	Standardi: SFS 3021 (1979)	
TS- ja VS-pitoisuudet	Standardi: SFS 3008 (1990)	Kolme rinnakkaista näytettä

Reaktoreihin liitetyt kaasunkeräyssussit vaihdettiin porkkanan ja kaalin kohdalla päivittäin. Nollakuitu vaati pidemmän ajan hajoamiseen fermentoinnilla, jonka vuoksi myös kaasun muodostuminen oli hitaampaa, joten nollakuidun kaasupussit vaihdettiin noin kolmen päivän välein. Muodostuneen kaasun koostumuksen mittausta suoritettiin ilmaisinputkien ja putkipumpun avulla, tutkittavia komponentteja olivat vety (%), hiilidioksidi (%) ja rikkivety ( $H_2S$ ) (%). Ennen koostumuksen mittausta kaasupusseihin kerääntynyt kaasu tuli kuitenkin laimentaa, sillä ilmaisinputkien mitta-asteikot eivät olisi riittäneet mittaamaan laimentamatonta kaasua. Kaasun laimennus suoritettiin paineilmalla siten, että kaasupussien sisällä oli noin 1/3 muodostunutta kaasua ja 2/3 paineilmaa (kuva 12).



KUVA 12. Kaasupussien laimennusjärjestelyt (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

Tämän jälkeen laimennetuista kaasupusseista suoritettiin koostumuksen mittaus. Kaasun koostumuksen mittausta suoritettiin ilmaisinputkien käyttöohjeiden mukaisesti (kuva 13). Tulokset luettiin ilmaisinputkien mitta-asteikosta ja tulokset kerrottiin ilmanpaineen korjauskertoimella  $F=1013$ /todellinen ilmanpaine (hPa). Kaasupussien tilavuuden mittausta suoritettiin tämän jälkeen vesikäyttöisen tilavuudenmittasäiliön avulla. Tilavuuksien ja koostumusprosenttien perusteella laskettiin vedyn, hiilidioksidin ja rikkivedyn määrät NTP-olosuhteissa.



KUVA 13. Kaasun koostumuksen mittausjärjestelyt (Minkkinen 2021, CC BY-SA)

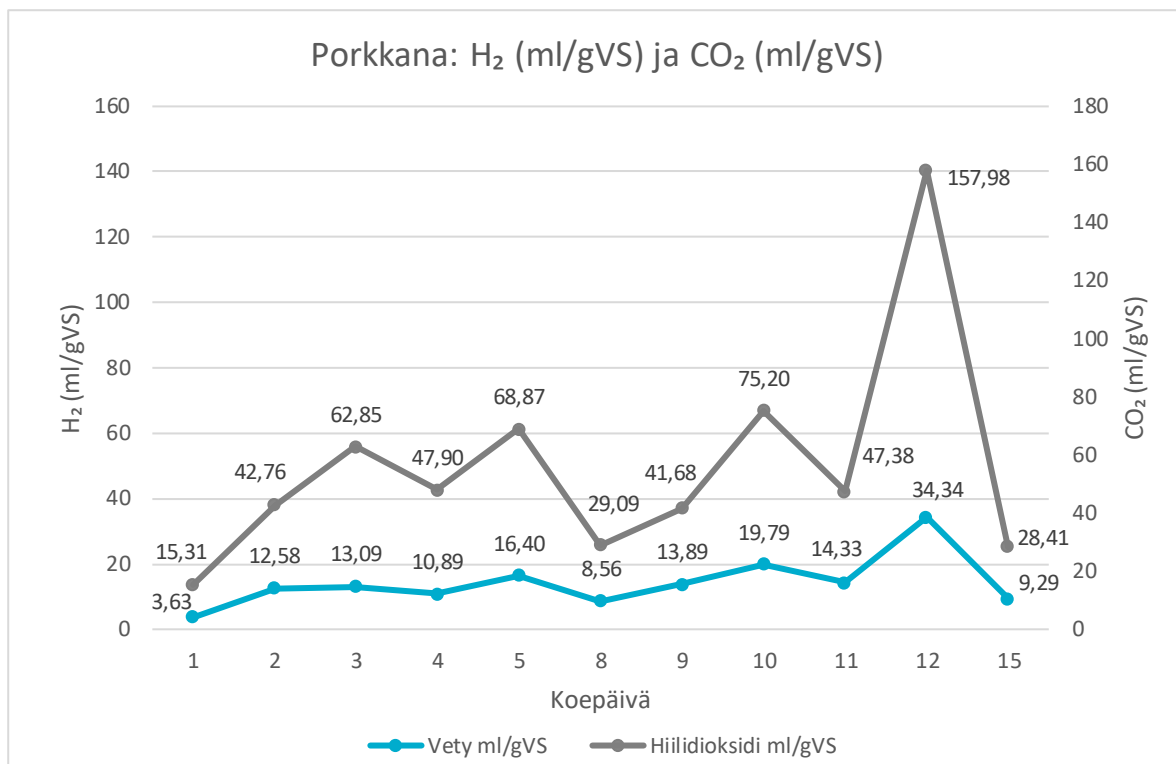
## 5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

### 5.1 Vedyn tuotanto porkkanasta

Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikokeet käynnistettiin prosessin ylös ajolla. Ylösajovaiheessa prosessia kuormitettiin 1.3.2021 alkaen neljän päivän ajan 4,04 gVS/d, viidentenä päivänä kuormitus nostettiin 24,24 gVS/d. Ylösajovaiheen jälkeen vedyn tuottoa seurattiin kahden viikon ajan. Porkkanan kohdalla prosessia ajettiin 48,48 gVS/d kuormituksella vaihtaen materiaalia viidesti viikossa, viipymääjän ollessa 6,67 pv. Koepäivänä 2 kuormitusta nostettiin 72,72 gVS/d, palaten alkuperäiseen kuormitukseen seuraavana operointipäivänä. Koepäivänä 10 prosessiin lisättiin ionivaihdettua vettä porkkanan sijasta. Materiaalin vaihtaminen ei teknisesti onnistunut, reaktorin syötteen ollessa liian paksua ja hajoamatonta. Sekoitus fermentaatioprosessin aikana pidettiin vakiona (lapasekoittimen nopeutena 100 rpm) ja prosessia operoitiin mesofiilisella lämpötila-alueella 35 °C:ssa. Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana pH pyrittiin pitämään välillä pH 5,00–5,50. Kokeiden aikana pH arvot vaihtelivat välillä pH 4,91–5,26. Arvot tippuivat kokeiden alku puolella alle pH 5,00 haihtuvien rasvahappojen muodostumisen vuoksi. Tämä kompensoitiin lisäämällä syötteeseen natriumvetykarbonaattia nostamaan puskurointikykyä. Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana seurattiin reaktorin sähkönjohtokykyä sen vaihdella välillä 5,90 mS/cm–21,50 mS/cm sekä happipitoisuutta sen vaihdella -0,6 %– -0,1 % välillä.

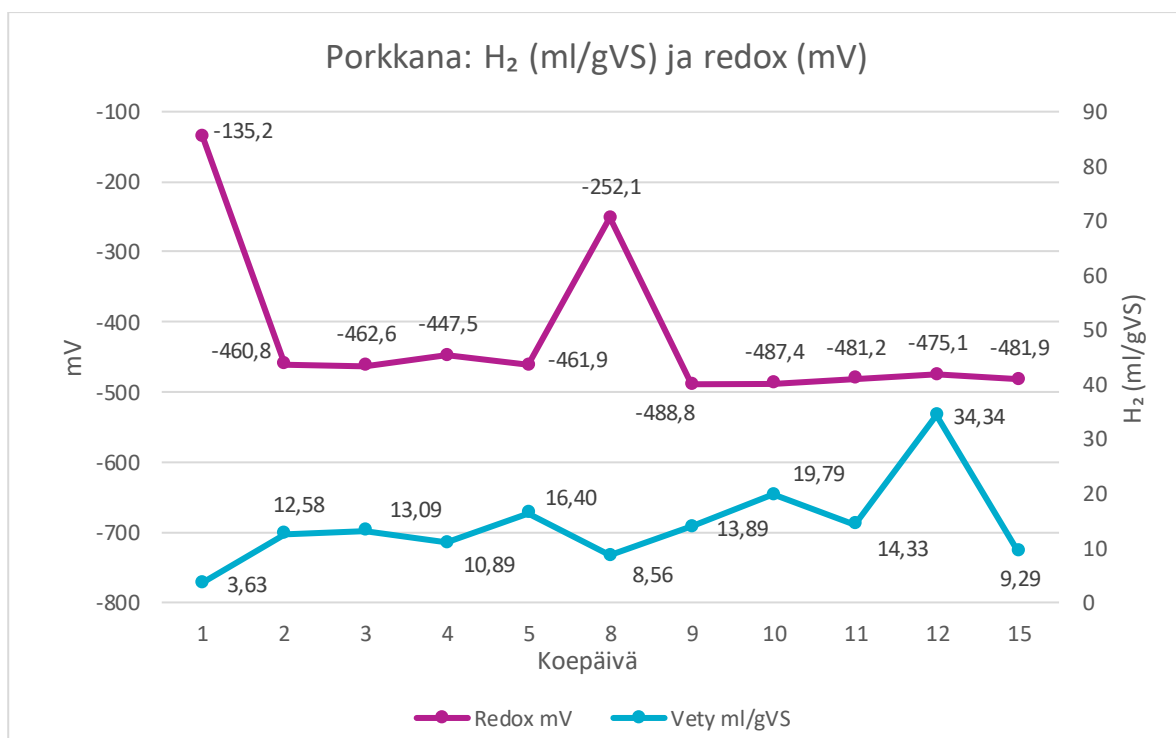
Porkkanan vedyntuottopotentiaali vaihteli laboratoriokokeiden aikana 3,63 ml/gVS–34,34 ml/gVS välillä. Keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali porkkanalla oli 13,92 ml/gVS. Alla olevasta kuvasta 14 huomataan vedyn tuoton kehittyminen kahden viikon kuluessa ja vedyn tuoton hiipuminen viikonloppujen aikana koepäivien 5 ja 12 jälkeen. Viikonloppuisin reaktoriin ei lisätty porkkanaa. Lisäksi koepäivänä 10 prosessiin lisätty ionivaihdettu vesi aiheutti laskun vedyn tuotannossa.

Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana muodostuneesta kaasusta vedyn lisäksi tutkittiin myös rikkivedyn ja hiilidioksidin pitoisuudet. Rikkivetyä muodostui tuona aikana erittäin vähän, yhteensä 1,98 ml. Hiilidioksidin pitoisuudet (ml/gVS) ovat esitettyinä alla olevassa kuvassa 14. Kuvasta huomataan vety- ja hiilidioksidipitoisuuden yhteys siten, että vetypitoisuuden kasvaessa hiilidioksidipitoisuus kasvoi ja vetypitoisuuden laskiessa hiilidioksidipitoisuus laski.



KUVA 14. Porkkanan vedyn ja hiilidioksidin tuotto

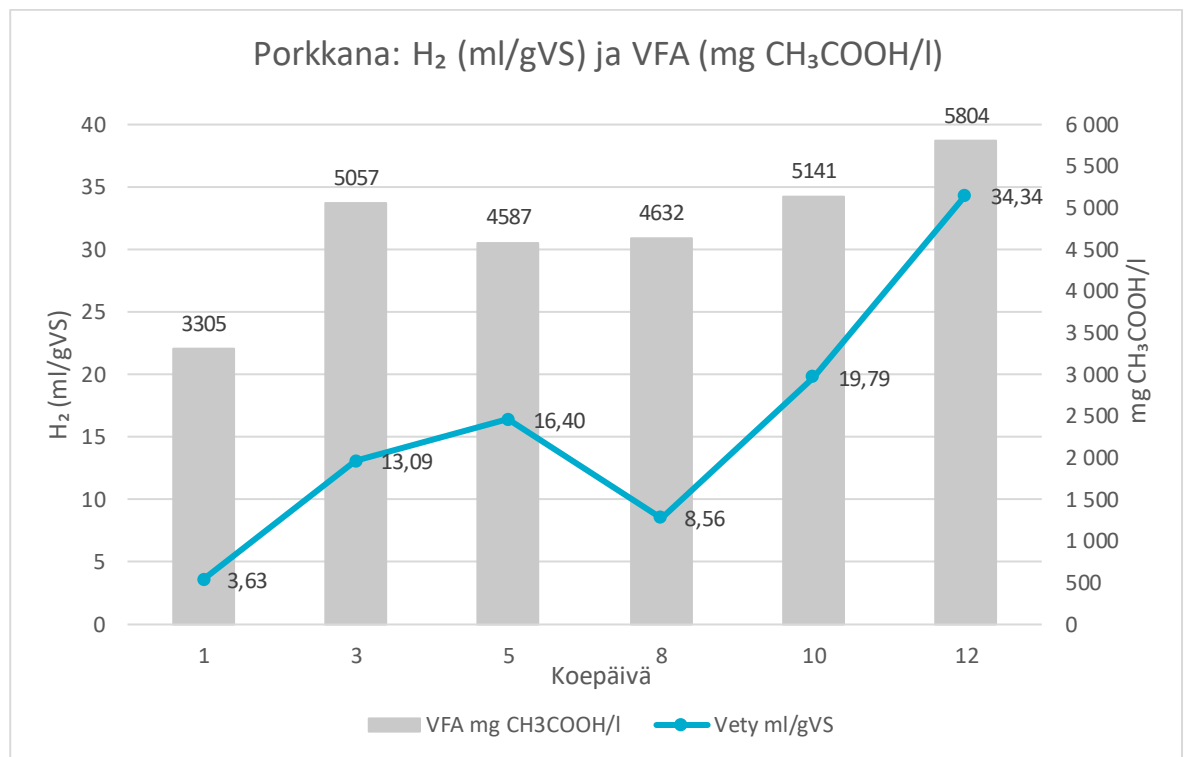
Alla olevassa kuvassa 15 on esitetty porkkanan vedyn tuotto sekä redox-potentiaali. Kuvasta huomataan redox-potentiaalın kääntäen verrannollisuus vedyn tuotantoon. Redox-potentiaalın kasvaessa vedyn tuotanto pieni, tämä on huomattavissa etenkin koepäivien 1 ja 8 kohdalla. Optimaaliseksi redox-potentiaalın mitta-alueeksi porkkanan vedyn tuottopotentiaalikoikeissa osoittautui -460 mV– -490 mV. Redox-potentiaalın ollessa > -260 mV vedyn tuotanto heikkeni.



KUVA 15. Porkkanan vedyn tuotto ja redox-potentiaali

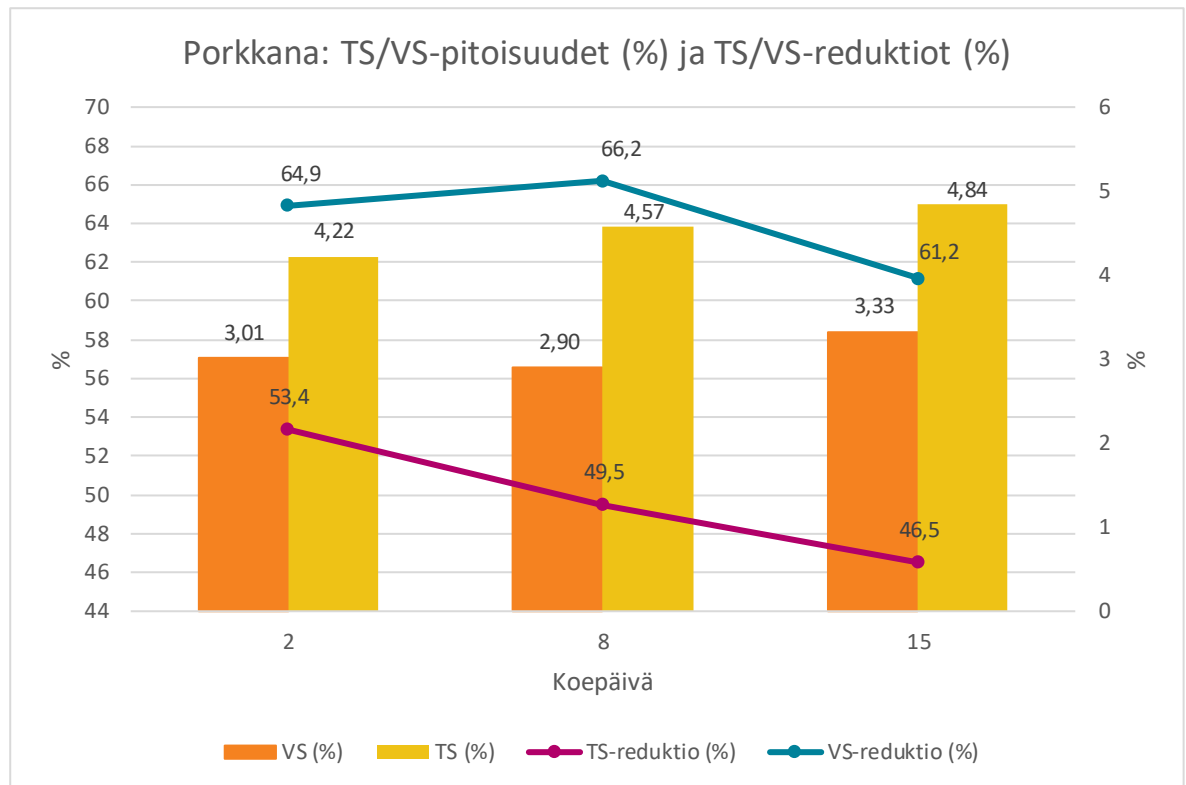


Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikoekaiden aikana tutkittiin myös reaktorin haihtuvien rasvahappojen määriä ja niiden kehitystä prosessin aikana. Alla olevassa kuvassa 16 on esitetty porkkanan vedyn tuotanto sekä reaktorin VFA määrät. Porkkanan kohdalla haihtuvien rasvahappojen määrä kasvoi fermentaatioprosessin edetessä. Porkkanan VFA määrä kokeiden alussa oli 3 305 mg  $\text{CH}_3\text{COOH/l}$ , jolloin vedyn tuotto oli 3,63 ml/gVS. Kokeiden lopussa porkkanan VFA määrä oli 5 804 mg  $\text{CH}_3\text{COOH/l}$ , jolloin vedyn tuotto oli 34,34 ml/gVS. Kuvasta 16 huomataan tämä vedyn tuoton kasvaminen VFA määrien kasvaessa. Vedyn tuoton kasvaminen VFA määrien kasvaessa on etenkin havaittavissa koepäivien 8, 10 ja 12 kohdalla.



KUVA 16. Porkkanan vedyn tuotto ja VFA määrät

Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikoekaiden aikana tutkittiin myös reaktorin TS- ja VS-pitoisuuksia. Alla olevassa kuvassa 17 on esitetty porkkanan vedyn tuottopotentiaalikoekaiden kuiva-aineen ja orgaanisen aineen pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot kokeiden aikana. Reaktoriin syötettävän porkkanan TS-pitoisuus oli 9,05 % ja VS-pitoisuus 8,58 %. Prosessia ajettiin suhteellisen tasaisella TS- ja VS-kuormalla. Vedyn tuottopotentiaalikoekaiden alussa porkkanan reaktorin TS-pitoisuus oli 4,22 % ja VS-pitoisuus 3,01 %. VS-pitoisuudet laskivat kokeiden alkupuolella, mutta kokeiden lopussa TS- ja VS-pitoisuudet olivat suuremmat kuin kokeiden alussa. Lopussa porkkanan TS-pitoisuus oli 4,84 % ja VS-pitoisuus 3,33 %. Porkkanan vedyn tuottopotentiaalikoekaiden aikana TS-reduktio oli 46,5 %–53,4 % ja VS-reduktio 61,2 %–66,2 %. TS-reduktio laski tasaisesti kokeiden edetessä, kun taas VS-reduktio kasvoi hieman kokeiden alkupuolella, laskien kuitenkin kokeiden loppupuolella.



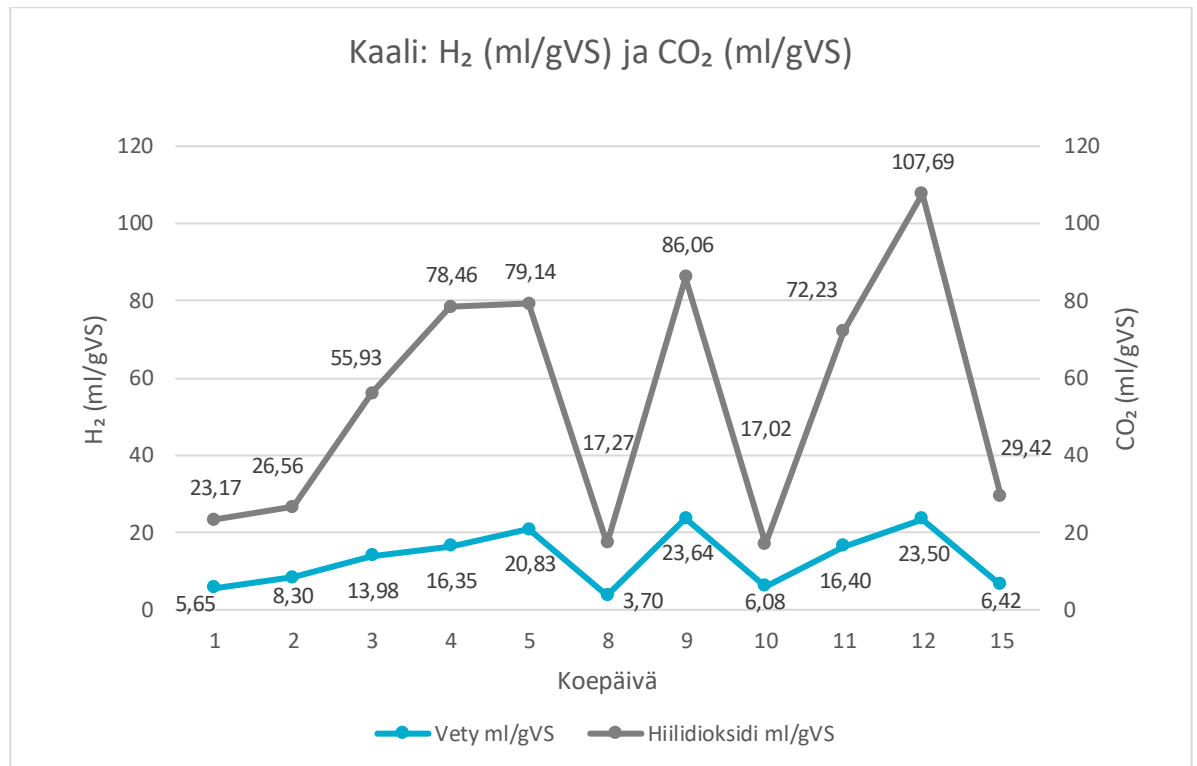
KUVA 17. Porkkanan TS- ja VS-pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot

## 5.2 Vedyn tuotanto kaalista

Kaalin vedyn tuottopotentialikokeet käynnistettiin prosessin ylös ajolla. Ylösajovaiheessa prosessia kuormitettiin 1.3.2021 alkaen neljän päivän ajan 3,12 gVS/d, viidentenä päivänä kuormitus nostettiin 24,24 gVS/d. Ylösajovaiheen jälkeen vedyn tuottoa seurattiin kahden viikon ajan. Kaalin kohdalla prosessia ajettiin 37,44 gVS/d kuormituksella vaihtamalla materiaalia viidesti viikossa, viipymäajan ollessa 6,67 pv. Koepäivänä 2 kuormitusta nostettiin 56,16 gVS/d, palaten alkuperäiseen kuormitukseen seuraavana operointipäivänä. Koepäivänä 10 prosessiin lisättiin ionivaihdettua vettä kaalin sijasta. Materiaalin vaihtaminen ei teknisesti onnistunut, reaktorin syötteen ollessa liian paksua ja hajomatonta. Sekoitusfermentaatioprosessin aikana pidettiin vakiona (lapasekoittimen nopeutena 100 rpm) ja prosessia operoitiin mesofiilisella lämpötila-alueella 35 °C:ssa. Kaalin vedyn tuottopotentialikokeiden aikana pH pyrittiin pitämään välillä pH 5,00–5,50. Kokeiden aikana pH arvot vaihtelivat välillä pH 4,82–5,47. Arvot tippuivat kokeiden alku puolella alle pH 5,00 haihtuvien rasvahappojen muodostumisen vuoksi. Tämä kompensoitiin lisäämällä syötteeseen natriumvetykarbonaattia nostamaan puskurointikykyä. Kaalin vedyn tuottopotentialikokeiden aikana seurattiin reaktorin sähkönjohtokykyä sen vaihdelta välillä 8,55 mS/cm–20,90 mS/cm sekä happipitoisuutta sen vaihdelta välillä 0,2 %–2,5 % välillä.

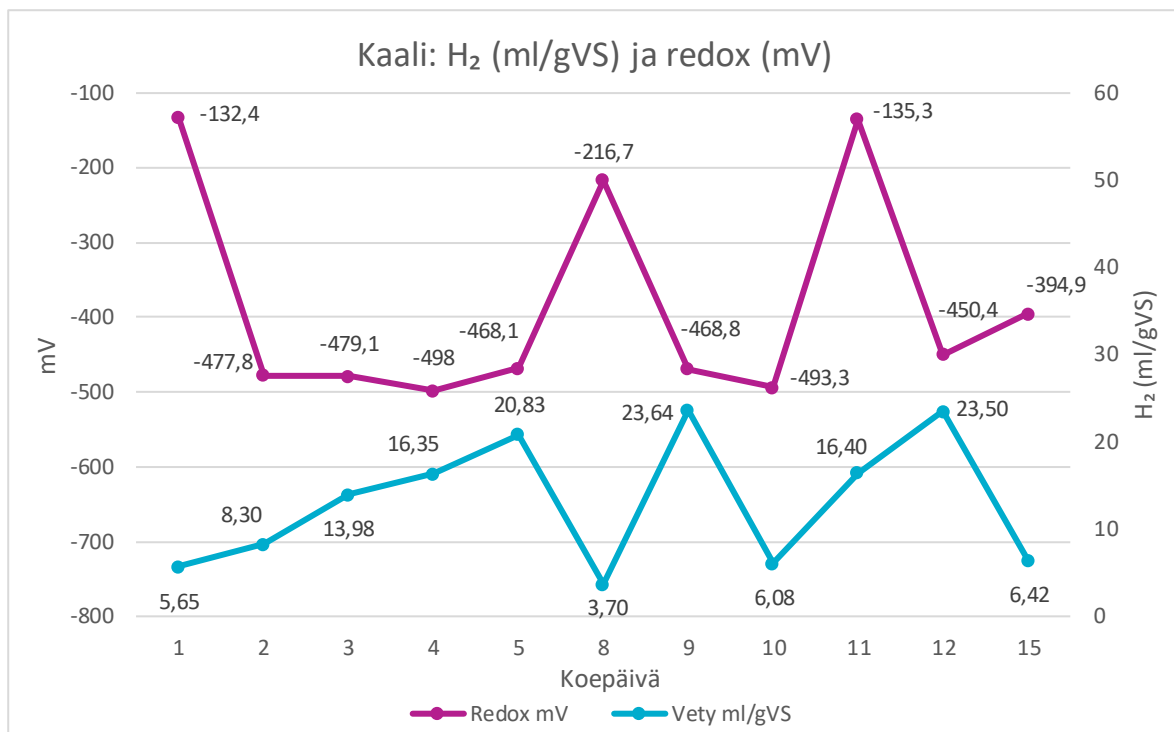
Kaalin vedyntuottopotentiali vaihteli laboratoriokokeiden aikana 3,70 ml/gVS–23,64 ml/gVS välillä. Keskiarvoinen vedyntuottopotentiali kaalilla oli 12,96 ml/gVS. Alla olevasta kuvasta 18 huomataan vedyn tuoton kehittyminen kahden viikon kuluessa ja vedyn tuoton hiipuminen viikonlopun aikana koepäivien 5 ja 12 jälkeen. Viikonloppuisin reaktoriin ei lisätty kaalia. Lisäksi koepäivänä 10 prosessiin lisätty ionivaihdettu vesi aiheutti laskun vedyn tuotannossa.

Kaalin vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana muodostuneesta kaasusta vedyn lisäksi tutkittiin myös rikkivedyn ja hiilidioksidin pitoisuudet. Rikkivetyä muodostui tuona aikana hyvin vähän, yhteensä 24,83 ml, eli jonkin verran enemmän kuin porkkanan vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana. Hiilidioksidin pitoisuudet (ml/gVS) on esitettyä alla olevassa kuvassa 18. Kuvasta huomataan vety- ja hiilidioksidipitoisuuden yhteys siten, että vetypitoisuuden kasvaessa hiilidioksidipitoisuus kasvoi ja vetypitoisuuden laskiessa hiilidioksidipitoisuus laski.



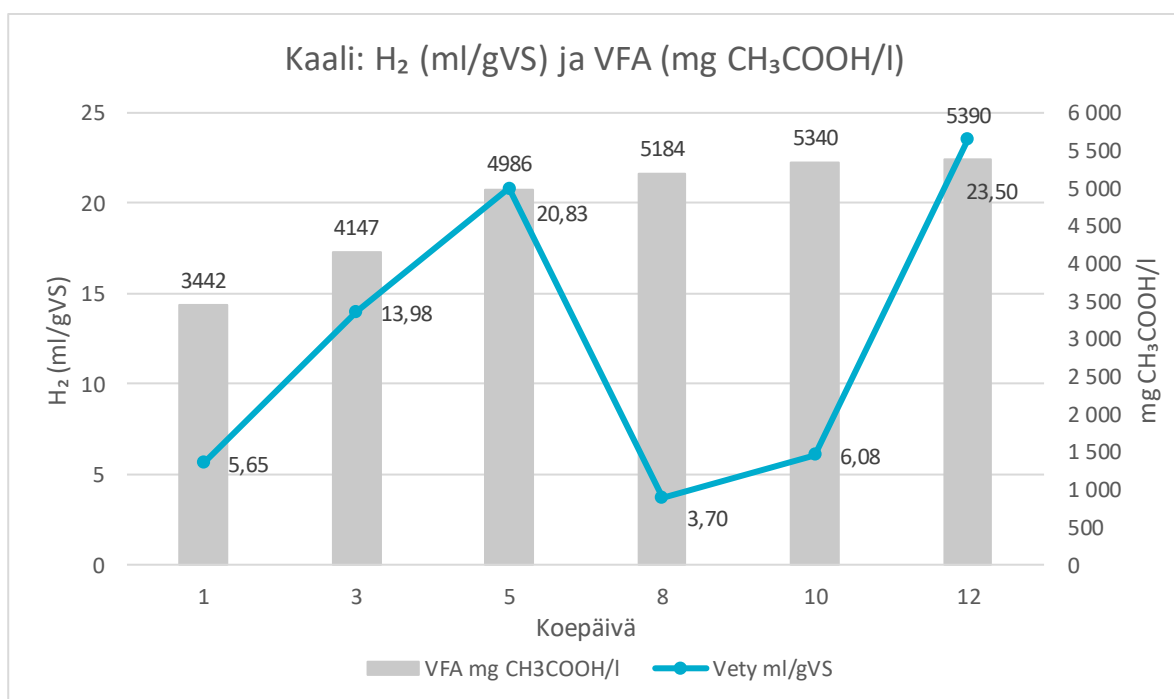
KUVA 18. Kaalin vedyn ja hiilidioksidin tuotto

Alla olevassa kuvassa 19 on esitettyä kaalin vedyn tuotto sekä redox-potentiaali. Kuvasta huomataan redox-potentiaalın kääntäen verrannollisuus vedyn tuotantoon. Redox-potentiaalın kasvaessa vedyn tuotanto pieneni, tämä on huomattavissa etenkin koepäivien 1, 8 ja 10–11 kohdalla. Optimaaliseksi redox-potentiaalın mitta-alueeksi kaalin vedyn tuottopotentiaalikoekissa osoittautui -450 mV–-500 mV. Redox-potentiaalın ollessa > -400 mV vedyn tuotanto heikkeni.



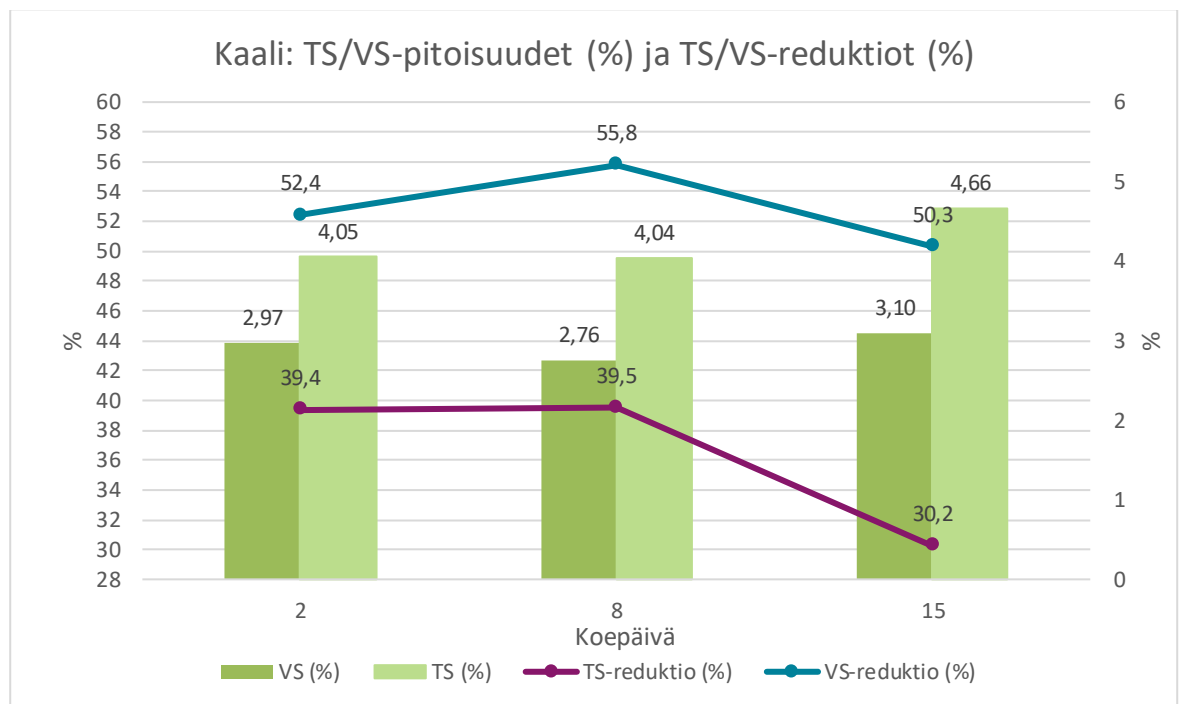
KUVA 19. Kaalin vedyn tuotto ja redox-potentiaali

Kaalin vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana tutkittiin myös reaktorin haihtuvien rasvahappojen määriä ja niiden kehitystä prosessin aikana. Alla olevassa kuvassa 20 on esitettynä kaalin vedyn tuotto sekä reaktorin VFA määrät. Kaalin kohdalla haihtuvien rasvahappojen määrä kasvoi fermentaatioprosessin edetessä. Kaalin VFA määrä kokeiden alussa oli 3 442 mg CH<sub>3</sub>COOH/l, jolloin vedyn tuotto oli 5,65 ml/gVS. Kokeiden lopussa kaalin VFA määrä oli 5 390 mg CH<sub>3</sub>COOH/l, jolloin vedyn tuotto oli 23,50 ml/gVS. Kuvasta 20 huomataan tämä vedyn tuoton kasvaminen VFA määrien kasvaessa. Vedyn tuoton kasvaminen VFA määrien kasvaessa on etenkin havaittavissa koepäivien 1, 3 ja 5 kohdalla.



KUVA 20. Kaalin vedyn tuotto ja VFA määrät

Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana tutkittiin myös reaktorin TS- ja VS-pitoisuuksia. Alla olevassa kuvassa 21 on esitettynä kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden kuiva-aineen ja orgaanisen aineen pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot. Reaktoriin syötettävän kaalin TS-pitoisuus oli 6,68 % ja VS-pitoisuus 6,24 %. Prosessia ajettiin suhteellisen tasaisella TS- ja VS-kuormalla. Vedyn tuottopotentiaalikokeiden alussa kaalin reaktorin TS-pitoisuus oli 4,05 % ja VS-pitoisuus 2,97 %. VS-pitoisuudet laskivat kokeiden alkupuolella, mutta kokeiden lopussa TS- ja VS-pitoisuudet olivat suuremmat kuin kokeiden alussa. Lopussa kaalin TS-pitoisuus oli 4,66 % ja VS-pitoisuus 3,10 %. Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden TS-reduktio oli 30,2 %–39,5 % ja VS-reduktio 50,3 %–55,8 %. TS-reduktio laski kokeiden edetessä, kun taas VS-reduktio kasvoi hieman kokeiden alkupuolella, laskien kuitenkin kokeiden loppupuolella.



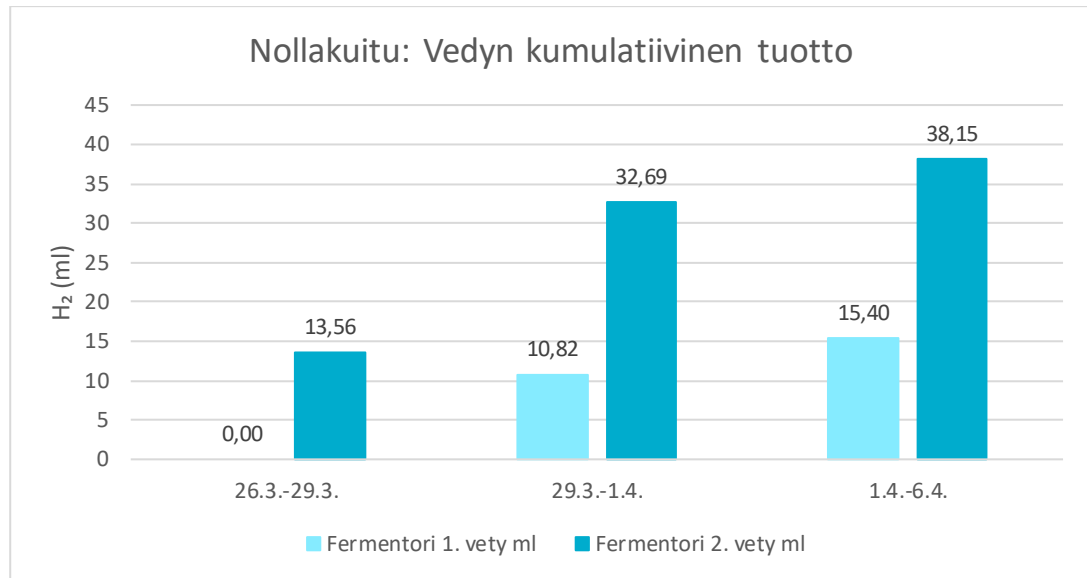
KUVA 21. Kaalin TS- ja VS-pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot

### 5.3 Vedyn tuotanto nollakuidusta

Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikokeet käynnistettiin kahdella eri fermentorilla kuormitusten vaihdellessa ja käyttäen edeltävän kokeen vedyn tuotannon mikrobikantaa. Prosessin ylösajovaiheessa reaktoreita kuormitettiin 23.3.2021 alkaen kolmen päivän ajan 30 gVS/d. Ylösajovaiheen jälkeen nollakuidun vedyn tuottoa seurattiin 9 päivän ajan. Nollakuidun vedyntuottopotentiaali tutkittiin kahdella eri kuormituksella. Fermentoria 1. ajettiin kuormituksella 30 gVS/d–120 gVS/d ja fermentoria 2. ajettiin kuormituksella 30 gVS/d–180 gVS/d, vaihtaen materiaalia joka arkipäivä. Koepäivänä 2. kuormitusta nostettiin fermentorissa 1. 60 gVS/d ja fermentorissa 2. 90 gVS/d. Pääsiäistä edeltävänä koepäivänä 4. kuormitus kaksinkertaistettiin eli fermentoria 1. kuormitettiin 120 gVS/d ja fermentoria 180 gVS/d. Viipymäaika molemmissa fermentoreissa prosessin aikana oli 6,67 pv. Sekoitus fermentaatioprosessin aikana pidettiin vakiona (lapasekoittimen nopeutena 200 rpm) ja prosessia operoitiin mesofiilillä lämpötila-alueella 35 °C:ssa. Fermentoreissa pH pyrittiin pitämään pH 5,00–5,50 välillä. Kokeiden aikana pH arvot vaihtelivat fermentorissa 1. pH 5,33–5,58 välillä ja fermento-

riissa 2. pH 5,28–5,34 välillä. Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikoekoiden aikana seurattiin reaktoreiden sähkönjohtokykyä, sen vaihdella fermentorissa 1. 7,65 mS/cm–10,06 mS/cm välillä ja fermentorissa 2. 5,65 mS/cm–10,14 mS/cm välillä sekä happipitoisuutta sen vaihdella fermentorissa 1. 0,0 %:n ja 0,4 %:n välillä ja fermentorissa 2. 0,3 %:n ja 0,7 %:n välillä.

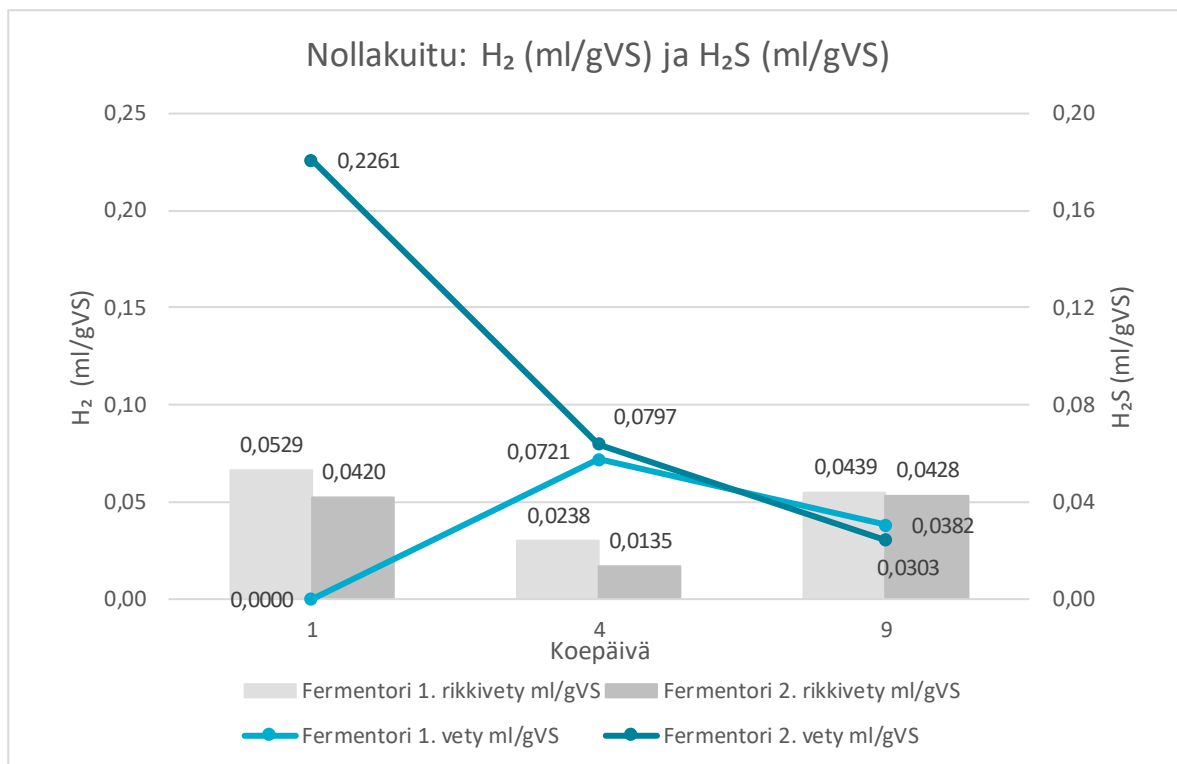
Alla olevassa kuvassa 22 on esitettyä nollakuidun kumulatiivinen vedyn tuotto. Fermentorissa 1. kumulatiivinen vedyn tuotto oli yhteensä 15,40 ml. Fermentorissa 2. kumulatiivinen vedyn tuotto oli yhteensä 38,15 ml. Kuvasta huomataan, että suuremman kuormituksen fermentori 2. tuotti noin puolet enemmän vetyä kokeiden aikana, kuin pienemmän kuormituksen fermentori 1.



KUVA 22. Nollakuidun vedyn kumulatiivinen tuotto

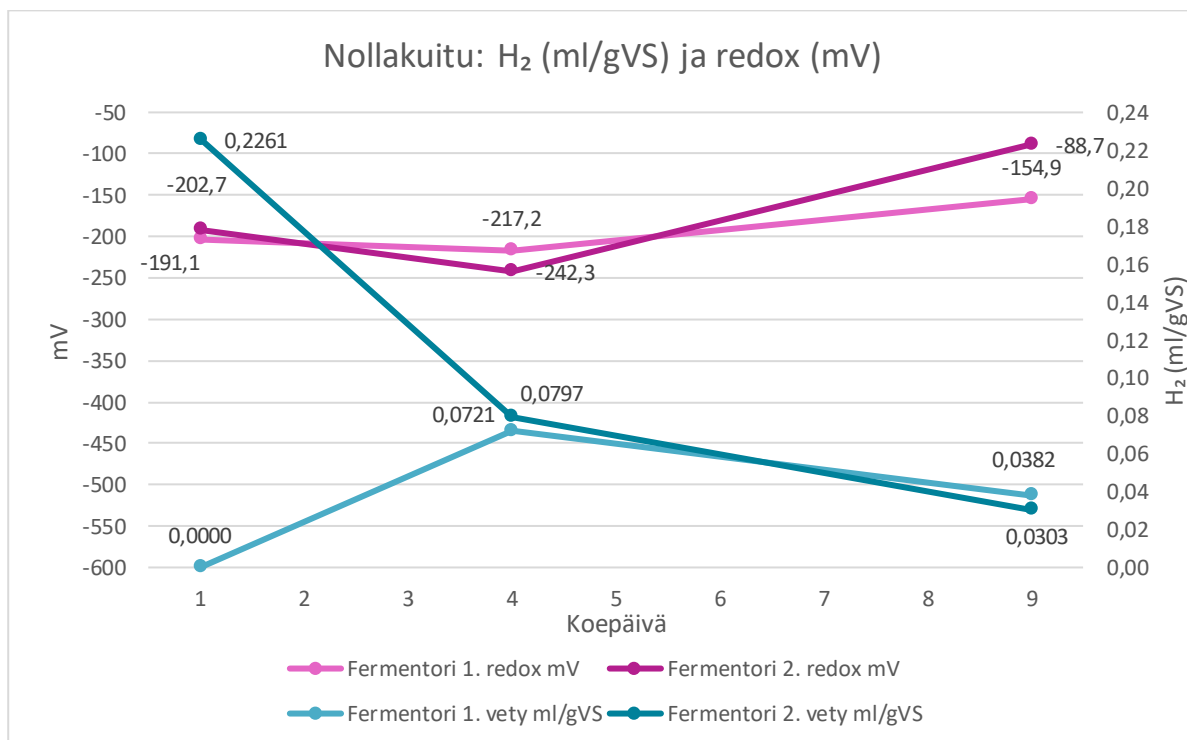
Pienemmän kuormituksen fermentorissa 1. vedyntuottopotentiaali vaihteli laboratoriokokeiden aikana 0,0 ml/gVS–0,0721 ml/gVS välillä. Keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali fermentorissa 1. oli 0,0466 ml/gVS. Suuremman kuormituksen fermentorissa 2. vedyntuottopotentiaali vaihteli laboratoriokokeiden aikana 0,0303 ml/gVS–0,2261 ml/gVS välillä. Keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali fermentorissa 2. taas oli 0,0794 ml/gVS. Alla olevasta kuvasta 23 huomataan, että fermentorin 2. vedyntuottopotentiaali oli korkeimmillaan heti koepäivänä 1. Nollakuidun vedyntuottopotentiaali fermentorissa 2. laski prosessin edetessä. Fermentorissa 1. vedyntuottopotentiaali nousi kokeiden alkupuolella, mutta laski loppua kohti.

Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikoekoiden aikana muodostuneesta kaasusta vedyn lisäksi tutkittiin myös rikkivedyn pitoisuudet. Rikkivedyn pitoisuudet (ml/gVS) on esitettyä alla olevassa kuvassa 23. Nollakuidun kohdalla molempien fermentorien bakteerien aineenvaihdunta tuotti vedyn ohella runsaasti myös rikkivetyä. Rikkivedyn muodostuminen johtuu sulfaatinpelkistäjäbakteerien toiminnasta anaerobisissa olosuhteissa, niiden kilpaillessa vedyn tuotannon bakteerien kanssa (Janhunen 2021). Tämä on huomattavissa etenkin koepäivän 9 kohdalla, jolloin rikkivedyn pitoisuus kasvoi suuremmaksi, kuin prosessin vetypitoisuus.



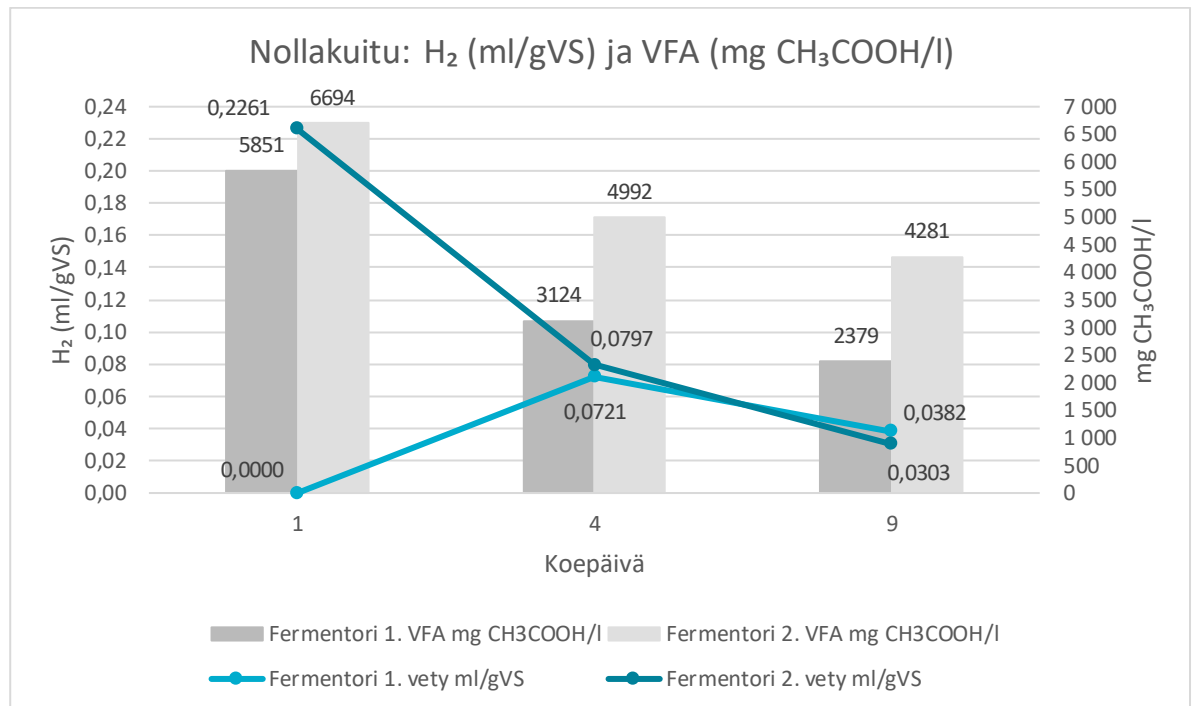
KUVA 23. Nollakuidun vedyn ja rikkivedyn tuotto

Alla olevassa kuvassa 24 on esitettyä nollakuidun vedyn tuotto sekä redox-potentiaali. Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana redox-potentiaalin yhteyttä vedyn tuotantoon oli haastavaa seurata, sillä vedyntuottopotentiaalia ei määritetty päiväkohtaisesti. Kuvasta 24 huomataan redox-potentiaalin ollessa < -200 mV vedyn tuotanto kasvoi ja redox-potentiaalin ollessa > -200 mV vedyn tuotanto heikkeni. Mittauspisteitä on kuitenkin niin vähän, ettei nollakuidun vedyn tuotantoa ja redox-potentiaalia voida verrata toisiinsa kovin luotettavasti.



KUVA 24. Nollakuidun vedyn tuotto ja redox-potentiaali

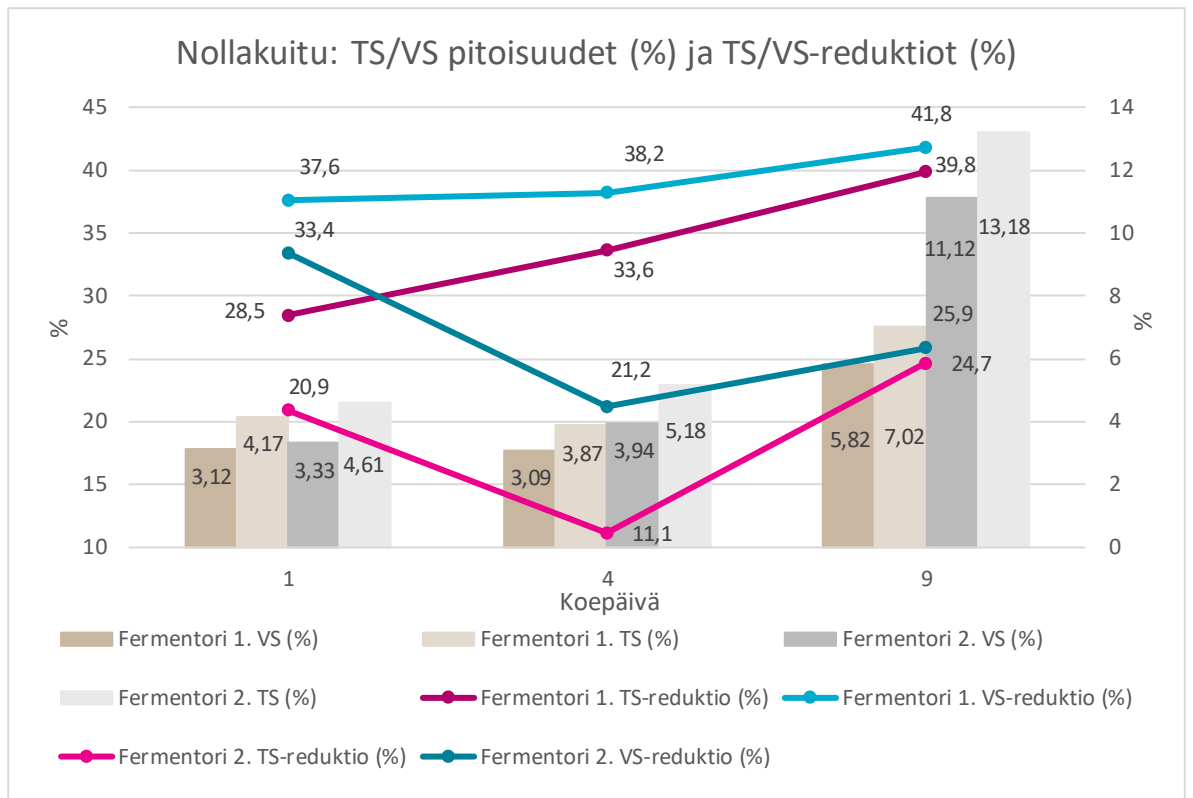
Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana tutkittiin myös reaktorin haihtuvien rasvahappojen määriä ja niiden kehitystä prosessin aikana. Alla olevassa kuvassa 25 on esitettyä nollakuidun vedyn tuotanto sekä reaktorin VFA määrät. Nollakuidun kohdalla VFA määrät lähtivät vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana laskuun. Kokeiden alussa pienemmän kuormituksen fermentorissa 1. VFA määrä oli 5 851 mg CH<sub>3</sub>COOH/l ja suuremman kuormituksen fermentorissa 2. 6 694 mg CH<sub>3</sub>COOH/l. Kokeiden lopussa VFA määrä fermentorissa 1. oli 2 379 mg CH<sub>3</sub>COOH/l ja fermentorissa 2. 4 281 mg CH<sub>3</sub>COOH/l. Kuvasta huomataan vedyn tuoton laskeminen VFA määrien laskiessa, tämä on etenkin havaittavissa koepäivien 4–9 välillä.



KUVA 25. Nollakuidun vedyn tuotto ja VFA määrät

Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana tutkittiin myös reaktoreiden TS- ja VS-pitoisuuksia. Alla olevassa kuvassa 26 on esitettyä nollakuidun kuiva-aineen ja orgaanisen aineen pitoisuuksia sekä TS- ja VS-reduktiot vedyn tuottopotentiaalikoekiden aikana. Fermentoria 1. kuormitettiin TS-pitoisuudella 5,58 %–11,67 % ja VS-pitoisuudella 5 %–10 %. Fermentoria 2. taas kuormitettiin TS-pitoisuudella 5,58 %–17,50 % ja VS-pitoisuudella 5 %–15 %. Fermentorissa 1. TS- ja VS-pitoisuudet laskivat kokeiden alku puolella, mutta kokeiden edetessä TS- ja VS-pitoisuudet nousivat hieman. Fermentorin 2. kohdalla TS- ja VS-pitoisuudet kasvoivat kokeiden edetessä koko fermentaatio-prosessin ajan. Vedyn tuottopotentiaalikoekiden alussa fermentorissa 1. TS-pitoisuus oli 4,17 % ja VS-pitoisuus 3,12 %. Fermentorissa 2. TS-pitoisuus oli 4,61 % ja VS-pitoisuus 3,33 %. Lopussa fermentorin 1. TS-pitoisuus oli 7,02 % ja VS-pitoisuus 5,82 %. Fermentorin 2. TS-pitoisuus taas oli 13,18 % ja VS-pitoisuus 11,12 %. Fermentorissa 1. nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikoekiden TS-reduktio oli 28,5 %–39,8 % ja VS-reduktio 37,6 %–41,8 %. Fermentorissa 2. nollakuidun TS-reduktio taas oli 11,1 %–24,7 % ja VS-reduktio 21,2 %–33,4 %. Fermentorissa 1. TS- ja VS-reduktiot kasvoivat melko tasaisesti vedyn tuottopotentiaalikoekiden ajan. Fermentorissa 2. TS- ja VS-reduktiot laskivat hieman kokeiden alkupuolella, mutta kasvoivat kokeiden loppua kohden.





KUVA 26. Nollakuidun TS- ja VS-pitoisuudet sekä TS- ja VS-reduktiot

## 6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida vedyn tuotanto laboratoriomittakaavan fermentoreilla biopohjaisilla aineksilla. Laboratoriokokeiden tavoitteena oli saada selville tutkittavien biopohjaisten aineksien vedyntuottopotentialit ja pohtia tulosten perusteella soveltuisiko tutkittavat raaka-aineet potentiaalisiksi biovedyn lähteeksi. Valituilla biopohjaisilla aineksilla saatiin tuotettua vetyä.

Suurimmat vedyn tuotannot saatiin porkkanalla (kuva 14). Keskiarvoinen vedyntuottopotentiali porkkanalla oli 13,92 ml/gVS ja päiväkohtainen maksimi vedyntuottopotentiali 34,34 ml/gVS. Porkkanan vedyntuottopotentiali vaihteli laboratoriokokeiden aikana 3,63 ml/gVS–34,34 ml/gVS välillä. Viikonloppuisin prosessiin ei lisätty uutta syötettä, jonka vuoksi vedyn tuotanto hiipui viikonloppujen aikana viipymääjan kasvaessa liian suureksi. Porkkanan vedyn tuottopotentialikokeiden prosessin sähkönjohtokyky vaihteli välillä 5,90 mS/cm–21,50 mS/cm sekä happipitoisuus välillä -0,6 % – -0,1 %. Näillä vaihteluväleillä ei todettu olevan suurta merkitystä porkkanan vedyn tuotantoon. Porkkanan vedyn tuottopotentialikokeiden tuloksista huomataan myös vedyn tuoton ja hiilidioksidin tuoton yhteys. Sillä vedyn tuoton kasvaessa myös hiilidioksidin tuotto kasvoi ja vedyn tuoton laskiessa hiilidioksidin tuotto laski. Porkkanan vedyn tuottopotentialikokeiden aikana todettiin redox-potentiaalinkin kääntäen verrannollisuus vedyn tuotantoon. Kokeiden tuloksista on huomattavissa vedyn tuoton laskeminen redox-potentiaalinkin kasvaessa ja vedyn tuoton kasvaminen redox-potentiaalinkin laskiessa. Optimaaliseksi redox-potentiaalinkin mitta-alueeksi porkkanan vedyn tuottopotentialikokeissa osoittautui -460 mV– -490 mV. Redox-potentiaalinkin ollessa > -260 mV vedyn tuotanto heikkeni (kuva 15).

Porkkanan vedyn tuottopotentialikokeiden aikana tutkittiin myös reaktorin haihtuvien rasvahappojen määriä, näistä tuloksista huomataan haihtuvien rasvahappojen määrän kehittymisen yhteys raaka-aineen hajoavuuteen ja sitä kautta vedyntuottopotentialiin. Helpommin hajoavalla porkkanalla VFA määrät kasvoivat fermentaatioprosessin edetessä (kuva 16). Lisäksi haihtuvien rasvahappojen muodostumisesta johtuva pH:n aleneminen todettiin laboratoriokokeiden aikana. Porkkanan vedyn tuottopotentialikokeiden aikana VFA määrät kasvoivat, jonka vuoksi myös pH arvot laskivat alle pH 5,00. Porkkanan vedyn tuottopotentialikokeiden aikana seurattujen reaktoreiden kuiva-aineen- ja orgaanisen aineen pitoisuuksien sekä TS- ja VS-reduktion yhteys vedyntuottopotentialiin oli huomattavissa. Sillä helpommin hajoavan ja siten vetyä paremmin tuottavan porkkanan TS- ja VS-pitoisuudet laskivat kokeiden alku puolella. TS- ja VS-pitoisuudet nousivat kuitenkin kokeiden loppua kohti kuormituksen kasvaessa, jolloin reaktorissa olleet bakteerit eivät ehtineet hajottaa materiaalia riittävän nopeasti. Hajoavuuden ja vedyn tuoton yhteys huomataan myös porkkanan TS- ja VS-reduktioita tarkasteltaessa. Reduktion ollessa suurempi, myös raaka-aineen hajoavuus ja sitä kautta vedyn tuotanto oli parempi. Opinnäytetyön laboratoriokokeissa parhaiten vetyä tuottaneella porkkanalla TS-reduktio oli 46,5 %–53,4 % ja VS-reduktio 61,2 %–66,2 % (kuva 17).

Kaalin keskiarvoinen vedyntuottopotentiali oli 12,96 ml/gVS ja päiväkohtainen maksimi vedyntuottopotentiali 23,64 ml/gVS. Kaalin vedyntuottopotentiali vaihteli laboratoriokokeiden aikana 3,70 ml/gVS–23,64 ml/gVS välillä (kuva 18). Viikonloppuisin prosessiin ei lisätty uutta syötettä, jonka vuoksi vedyn tuotanto hiipui viikonloppujen aikana viipymääjan kasvaessa liian suureksi, aivan kuin porkkanan kohdallakin. Kaalin vedyn tuottopotentialikokeiden prosessin sähkönjohtokyky vaihteli välillä 8,55 mS/cm–20,90 mS/cm sekä happipitoisuus 0,2 %–2,5 % välillä. Näillä vaihteluväleillä ei

todettu olevan suurta merkitystä kaalin vedyn tuotantoon. Kaalin kohdalla huomataan myös vedyn tuoton ja hiilidioksidin tuoton yhteys. Sillä vedyn tuoton kasvaessa myös hiilidioksidin tuotto kasvoi ja vedyn tuoton laskiessa hiilidioksidin tuotto laski. Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden tuloksista huomataan sama redox-potentiaalin ja vedyn tuoton kääntäen verrannollisuus, kuin porkkanan kohdalla. Kokeiden tuloksista on huomattavissa vedyn tuoton laskeminen redox-potentiaalin kasvaessa ja vedyn tuoton kasvaminen redox-potentiaalin laskiessa. Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeissa optimaaliseksi redox-potentiaalin mitta-alueeksi osoittautui  $-450\text{ mV}$ – $-500\text{ mV}$ . Redox-potentiaalin ollessa  $> -400\text{ mV}$  vedyn tuotanto heikkeni (kuva 19).

Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden tuloksista huomataan myös haihtuvien rasvahappojen määrän kehittymisen yhteys raaka-aineen hajoavuuteen ja sitä kautta vedyntuottopotentiaaliin. Helpommin hajoavalla kaalilla VFA määrät kasvoivat fermentaatioprosessin edetessä (kuva 20). Lisäksi haihtuvien rasvahappojen muodostumisesta johtuva pH:n aleneminen todettiin laboratoriokokeiden aikana. Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana VFA määrät kasvoivat, jonka vuoksi myös pH arvot laskivat alle pH 5,00. Kaalin vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana seurattujen reaktoreiden kuiva-aineen- ja orgaanisen aineen pitoisuuksien sekä TS- ja VS-reduktion yhteys vedyntuottopotentiaaliin oli myös huomattavissa. Sillä helpommin hajoavan ja siten vetyä paremmin tuottavan kaalin kohdalla TS- ja VS-pitoisuudet laskivat kokeiden alku puolella. TS- ja VS-pitoisuudet nousivat kuitenkin kokeiden loppua kohti kuormituksen kasvaessa, jolloin reaktorissa olleet bakteerit eivät ehtineet hajottaa materiaalia riittävän nopeasti. Hajoavuuden ja vedyn tuoton yhteys huomataan myös raaka-aineiden TS- ja VS-reduktioita tarkasteltaessa. Reduktion ollessa suurempi, myös raaka-aineen hajoavuus ja sitä kautta vedyn tuotanto oli parempi. Kaalilla TS-reduktio oli 30,2 %–39,5 % ja VS-reduktio 50,3 %–55,8 % (kuva 21).

Nollakuidun kohdalla vedyntuottopotentiaalit jäivät melko alhaisiksi. Vedyntuottopotentiaalia tutkittiin kahdella eri kuormituksella, näistä suuremman kuormituksen fermentori 2. tuotti enemmän vetyä kokeiden aikana, yhteensä 38,15 ml ja pienemmän kuormituksen fermentori 1. yhteensä 15,40 ml (kuva 22). Keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali nollakuidulla fermentorissa 2. oli 0,0794 ml/gVS ja pienemmän kuormituksen fermentorissa 1. keskiarvoinen vedyntuottopotentiaali taas oli 0,0466 ml/gVS. Nollakuidun kohdalla päivänkohtaisesti kaasua ei muodostunut mitattavissa olevia määriä, vaan muodostuneen kaasun mittaukset suoritettiin noin kolmen päivän välein. Fermentorissa 2. vedyntuottopotentiaali oli suurimmillaan heti kokeiden alussa, mutta tämä on luultavasti seurausta siitä, että reaktorissa oli vielä hajoamatonta aikaisemman vedyn tuottopotentiaalikokeen materiaalia, joka nosti vedyntuottopotentiaalia. Nollakuidun vedyn tuottopotentiaalikokeiden aikana vedyn tuotto laski kokeiden loppua kohti molemmissa fermentoreissa, samalla rikkivedyn pitoisuus kasvoi. Nollakuidun kohdalla molempien fermentorien bakteerien aineenvaihdunta tuotti vedyn ohella runsaasti rikkivetyä. Rikkivedyn muodostuminen oli seurausta sulfaatinpelkistäjäbakteerien toiminnasta. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien toiminnan edellytyksenä on riittävän korkea rikkikonsentraatio, jonka nollakuitu mahdollisti. Kyseiset bakteerit käyttävät vetyä hyödykseen muodostaen rikkivetyä eli osa muodostuneista vety-molekyyleistä sitoutui rikkimolekyyleihin muodostaen rikkivetyä. Rikkivedyn tuotannosta muodostui samalla suoraan kilpailija vedyn tuotannolle, jonka vuoksi rikkivedyn pitoisuus kasvoi vety-pitoisuutta suuremmaksi kokeiden lopussa (kuva 23). (Janhunen 2021) Kokeiden aikana seurattiin myös reaktoreiden sähkönjohtokykyä, nämä arvot vaihtelivat fermentorissa 1. 7,65

mS/cm–10,06 mS/cm välillä ja fermentorissa 2. 5,65 mS/cm–10,14 mS/cm välillä. Happipitoisuus fermentorissa 1. vaihteli tuona aikana 0,0 %:n ja 0,4 %:n välillä ja fermentorissa 2. 0,3 %:n ja 0,7 %:n välillä. Näillä vaihteluväleillä ei todettu olevan suurta merkitystä vedyn tuotantoon. Nollakuidun vedyn tuottopotentialikokeiden aikana redox-potentiaalin yhteyttä vedyn tuotantoon oli haastavaa seurata, sillä vedyntuottopotentialia ei määritetty päiväkohtaisesti. Nollakuidun kohdalla redox-potentiaalin ollessa < -200 mV vedyn tuotanto kasvoi ja redox-potentiaalin ollessa > -200 mV vedyn tuotanto heikkeni (kuva 24). Redox-potentiaalin ja nollakuidun vedyn tuotannon yhteyttä ei voida kuitenkaan verrata toisiinsa kovin luotettavasti vähäisen mittausdatan vuoksi.

Nollakuidun vedyn tuottopotentialikokeiden tuloksista huomataan myös haihtuvien rasvahappojen määrän kehittymisen yhteys raaka-aineen hajoavuuteen ja sitä kautta vedyntuottopotentialiin. Heikommin hajoavan nollakuidun kohdalla VFA määrät laskivat prosessin edetessä (kuva 25). Nollakuidun kohdalla pH 5,00 alituksia ei myöskään tapahtunut, sillä haihtuvien rasvahappojen muodostuminen oli selvästi vähäisempää. Nollakuidun vedyn tuottopotentialikokeiden aikana seurattujen reaktoreiden kuiva-aineen- ja orgaanisen aineen pitoisuuksien sekä TS- ja VS-reduktion yhteys vedyntuottopotentialiin oli huomattavissa. Heikommin hajoavan ja vetyä huonommin tuottavan nollakuidun kohdalla TS- ja VS-pitoisuuksien laskua ei ollut niin selkeästi havaittavissa. Nollakuidun kohdalla TS- ja VS-pitoisuuksien kasvu kokeiden loppua kohti oli myös selkeämpää, tämä johtui nollakuidun heikosta hajoavuudesta. Sama huomataan myös raaka-aineiden TS- ja VS-reduktioita tarkasteltaessa. Heikoiten vetyä tuottaneella nollakuidulla, pienemmällä kuormituksella TS-reduktio oli 28,5 %–39,8 % ja VS-reduktio 37,6 %–41,8 %. Suuremmalla kuormituksella TS-reduktio oli 11,1 %–24,7 % ja VS-reduktio 21,2 %–33,4 % (kuva 26).

Keskiarvotulokset porkkanalla ja kaalilla jäivät alhaisemmaksi verrattaessa tuloksia opinnäytetyön tausta- ja tutkimusaineistojen vedyn tuottopotentialikokeiden referenssiarvoihin. Näissä tutkimuksissa porkkanan vedyntuottopotentialia vaihteli 44,8 ml/gVS–70,7 ml/gVS välillä ja kaalin vedyntuottopotentialia vaihteli 26,3 ml/gVS–61,7 ml/gVS välillä (Tähti 2007, 23). Opinnäytetyön vedyn tuottopotentialikokeiden porkkanan ja kaalin päiväkohtaisia maksimi vedyntuottopotentialiaaleja verrattaessa näihin tausta- ja tutkimusaineistojen referenssiarvoihin, päästään jo melko lähelle näitä aiemmin toteutettujen tutkimusten tuloksia. Nollakuidun vedyntuottopotentialia tutkittiin kahdella eri kuormituksella, molemmilla kuormituksilla vedyntuottopotentialit jäivät alhaisiksi. Kirjallisuudessa ei ollut saatavilla nollakuidun vedyntuottopotentialiaaleille referenssiarvoja, joten nollakuidulle saatuja vedyntuottopotentialiaaleja ei voitu verrata vastaaviin tutkimustuloksiin. Laboratoriokokeiden tuloksien perusteella voidaan todeta, että porkkanalla ja kaalilla voisi olla potentialiaaleja biovedyn raaka-aineina, jos tarkastellaan porkkanan ja kaalin päiväkohtaisia maksimi vedyntuottopotentialiaaleja. Nollakuidulla keskiarvoiset vedyntuottopotentialit molemmilla kuormituksilla jäivät melko alhaiseksi opinnäytetyön laboratoriokokeiden olosuhteilla.

## 7 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää pimeäfermentaatiolla tuotetun vedyn tuotannon tehokkuuteen vaikuttavat tekijät ja tämän selvityksen perusteella pyrkiä optimoimaan laboratoriomittakavassa vedyn tuotanto käyttäen prosessin raaka-aineena biopohjaisia aineksia. Tarkoituksena oli myös päästä ensitestaamaan fermentorien toimivuutta ja soveltavuutta biojalostukseen ja kaasumaisen vedyn tuotantoon.

Opinnäytetyön vedyn tuottopotentialikokeiden perusteella voidaan todeta, että fermentorit soveltuvat biojalostukseen, kaasumaiseen vedyn tuotantoon ja bioliuostutkimuksiin. Fermentorien ensimmäinen koeajo suoritettiin pitkälti manuaalisesti, joka vaikutti mahdollisesti jonkin verran vedyn tuottopotentialikokeiden tuloksiin. Esimerkiksi raaka-aineiden syöttäminen reaktoreihin suoritettiin manuaalisesti. Tämän vuoksi reaktorin venttiilejä availtiin syötön ja poiston ajaksi, jolloin osa muodostuneesta kaasusta vapautui ilmaan, jonka vuoksi todellisuudessa vedyn saannot olisivat mahdollisesti hieman suuremmat. Kokeiden aikana huomattiin myös, että reaktoreiden TS- ja VS-pitoisuuden kasvassa sekoitus heikkeni hieman, jonka seurauksena fermentaatioprosessin lämpötila alkoi aaltoilla  $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  halutun  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tämä myös saattoi vaikuttaa vedyn tuotannon optimointiin. Sekoituksen heikkeneminen luultavasti johtui siitä, etteivät fermentorit sovellu laitevalmistajan osoittamaan 7 %:n kuiva-ainepitoisuuteen saakka. Opinnäytetyössä käytetyistä materiaaleista porkkanan ja nollakuidun TS-pitoisuudet ylittivät tuon TS-pitoisuuden. Kokeissa käytetyn kaalin TS-pitoisuus taas oli 6,68 % eli fermentorien kapasiteetin rajoilla. Tämän perusteella voidaan todeta, että teknisesti laitteisto soveltuu mieluummin hieman alhaisemmille TS-pitoisuuksille, kuin mitä opinnäytetyön materiaalien TS-pitoisuudet olivat.

Muodostuneen kaasun koostumuksen mittausta oli myös yksi tutkimuksen epävarmuustekijöistä. Vedyn tuotantokokeita ei aiemmin ollut tehty Savonia-ammattikorkeakoulun ympäristötekniikan opetus- ja tutkimusyksikön laboratorioissa, joten sitä varten ei ollut olemassa valmiita optimaalista mittaustapaa. Koostumuksen mittauksessa osa muodostuneesta kaasusta menetettiin, arviolta noin 100 ml/pumppaus, jonka vuoksi todellisuudessa vedyn saannot olisivat hieman suuremmat (Dräger 2020). Kaasun koostumuksen keskipoikkeama mittauksissa oli  $\pm 10 \text{ } \%$ – $15 \text{ } \%$ , joka myös vaikuttaa tutkimustulosten todenmukaisuuteen (Dräger 2020). Aiheutuneiden virhelähteiden vuoksi jatkuvatoimisen vedyn mittauksen kehittämien olisi tarpeellista jatkotutkimuksia ajatellen. Mittaustekniikkaa voisi esimerkiksi kehittää vastaamaan biokaasumittausten tekniikkaa, jossa kaasuanalysaattorin avulla mitataan muodostuneen kaasun koostumus. Tämä vaatisi käytännössä kaasuanalysaattorin, joka pystyy tunnistamaan korkeat vetytitoisuudet ilman kaasun laimennusta.

Opinnäytetyön laboratorioskokeilla saatiin tuotettua vetyä jokaisella tutkimukseen valitulla biopohjaisella raaka-aineella. Opinnäytetyön vedyn tuottopotentialikokeiden porkkanan ja kaalin päiväkohtaisia maksimi vedyntuottopotentialeja verrattaessa vastaavien tutkimusten referenssiarvoihin, päästään referenssiarvojen alarajalle. Nollakuidun kohdalla kirjallisuudessa ei ollut saatavilla nollakuidun vedyntuottopotentialeille referenssiarvoja, joten nollakuidulle saatuja vedyntuottopotentialeja ei voitu verrata vastaaviin tutkimustuloksiin. Nollakuidun heikon biohajoavuuden vuoksi vedyntuotto-

tentiaalit opinnäytetyön olosuhteilla jäivät melko alhaiseksi. Nollakuidun kohdalla tulisikin jatkotutkimuksissa kiinnittää huomiota siihen, kuinka nollakuidun hajoamista voisi tehostaa tai vaikuttaisiko viipymääjan pidentäminen positiivisesti vedyn tuotantoon.

## LÄHTEET

- Abdelgadir, Awad, Chen, Xiaoguang, Liu, Jianshe, Xie, Xuehui, Zhang, Jian, Zhang, Kai, Wang, Heng & Liu, Na 2014. Characteristics, Process Parameters, and Inner Components of Anaerobic Bioreactors. Pdf-tiedosto. Julkaistu 23.1.2014. [https://www.researchgate.net/publication/261141070-\\_Characteristics\\_Process\\_Parameters\\_and\\_Inner\\_Components\\_of\\_Anaerobic\\_Bioreactors](https://www.researchgate.net/publication/261141070-_Characteristics_Process_Parameters_and_Inner_Components_of_Anaerobic_Bioreactors). Viitattu 11.1.2021.
- Al Seadi, Teodorita, Rutz, Dominik, Prassl, Heinz, Köttner, Michael, Finsterwalder, Tobias, Volk, Silke & Janssen, Rainer 2008. Biogas Handbook. <https://lemvigbiogas.com/BiogasHandbook.pdf>. Viitattu 13.1.2021.
- Audiopek Oy, Motiva Oy, Luostarinen, Juha & Metener Oy 2013. Biokaasun tuotanto maatilalla. Pdf-tiedosto. Julkaistu 2/2013. [https://www.motiva.fi/files/6958/Biokaasun\\_tuotanto\\_maatilalla.pdf](https://www.motiva.fi/files/6958/Biokaasun_tuotanto_maatilalla.pdf). Viitattu 10.1.2021.
- Brock, Thomas D., Madigan, Michael T., & Smith, David W. 1984. *Biology of Microorganisms*. 4. painos. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- Calise, Francesco, D'Accadia, Massimo Dentice, Santarelli, Massimo, Lanzini, Andrea & Ferrero, Domenico 2019. *Solar hydrogen production: Processes, systems and technologies*. 1. painos. Academic Press.
- Doble, Mukesh & Kumar, Anil 2005. Degradation of Dyes. Teoksessa *Biotreatment of Industrial Effluents*. Verkkokirja. Butterworth-Heinemann, 111-122. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965260500117>. Viitattu 16.1.2021.
- Dräger 2020. Käyttöohjeet. Julkaistu 19.7.2020. Viitattu 14.4.2021.
- DW 2019. Environment. Verkkojulkaisu. Power-to-X: The secret to a 100% renewable energy system?. Päivitetty 19.12.2019. <https://www.dw.com/en/power-to-x-the-secret-to-a-100-renewable-energy-system/a-51662014>. Viitattu 12.1.2021.
- Eppendorf 2017. A Guide to Calibration on the BioFlo® 120 and BioFlo® 320: Dissolved Oxygen Sensors. Pdf-tiedosto. Julkaistu 5/2017. [https://www.eppendorf.com/productmedia/doc/en/-234698/Fermentors-Bioreactors\\_Protocol\\_040\\_BioFlo-120\\_BioFlo-320.pdf](https://www.eppendorf.com/productmedia/doc/en/-234698/Fermentors-Bioreactors_Protocol_040_BioFlo-120_BioFlo-320.pdf). Viitattu 14.1.2021.
- EU2019.fi 2019. Ilmastojohtajuus. Verkkojulkaisu. Ilmaston lämpeneminen ja päästövähennystavoitteet. <https://eu2019.fi/prioriteetit/ilmastojohtajuus/paastovahennystavoitteet>. Viitattu 10.1.2021.
- Fan, Kuo-Shuh & Chen, Ya-Yun 2004. H<sub>2</sub> production through anaerobic mixed culture: effect of batch S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> and shock loading in CSTR. *Chemosphere* 57 (9), 1059-1068. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653504006988>. Viitattu 16.1.2021.
- Ferreira, Alice & Gouveia Luisa 2020. Microalgal biorefineries. Teoksessa *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Verkkokirja. Academic Press, 771-798. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128185360000282>. Viitattu 11.1.2021.
- Ghimirea, Anish, Frunzo, Luigi, Pirozzi, Francesco, Trably, Eric, Escudie, Renaud, Lens, Piet N.L. & Esposito, Giovanni 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy* 144 (15), 73-95. <https://www.sciencedirect.com/journal/applied-energy/vol/144/suppl/C>. Viitattu 11.1.2021.
- Fang, Herbert H.P., Li, Chenlin & Zhang, Tong 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (6), 683-692. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319905002508>. Viitattu 16.1.2021.

- Hawkes, Freda R., Kyazze, Godfrey, Hussy, Ines, Dinsdale, Richard & Hawkes, Dennis L. 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy* 32 (2), 172-184. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319906003247>. Viitattu 14.1.2021.
- Hussy, Ines, Hawkes, Freda R., Dinsdale, Richard & Hawkes, Dennis L. 2005. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy* 30 (5), 471-485. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319904001806>. Viitattu 10.1.2021.
- Janhunen, Maarit 2021. TKI-asiantuntija. Savonia-ammattikorkeakoulu. Tiedonanto. 21.4.2021.
- Khanal, Samir Kumar, Chen, Wen Hsing, Ling, Li & Sung, Shihwu 2004. Biological Hydrogen Production: Effects of Ph and Intermediate Products. *International Journal of Hydrogen Energy* 29 (11), 1123-1131. [https://www.researchgate.net/publication/222960757\\_Biological-Hydrogen-Production-Effects-of-Ph-and-Intermediate-Products](https://www.researchgate.net/publication/222960757_Biological-Hydrogen-Production-Effects-of-Ph-and-Intermediate-Products). Viitattu 15.1.2021.
- Euroopan komissio 2020. Uutiset. Verkkojulkaisu. Komission strategiat ilmastoneutraaliuden saavuttamiseksi: katse energiajärjestelmään ja vetyyn. Päivitetty 8.7.2020. [https://ec.europa.eu/finland/news/hydrogen\\_200708\\_fi](https://ec.europa.eu/finland/news/hydrogen_200708_fi). Viitattu 8.1.2021.
- Laatikainen, Tuula 2020a. Puhdas vety tuo monia uusia vähähiilisiä bisnesmahdollisuuksia Suomelle. *Tekniikka & Talous* 18.11.2020. <https://www.tekniikkatalous.fi/uutiset/puhdas-vety-tuo-monia-uusia-vahahiilisia-bisnesmahdollisuuksia-suomelle/eb6c3fc8-9edb-4228-bb5c-591caf5cff23>. Viitattu 20.1.2021.
- Laatikainen, Tuula 2020b. Vedyllä toimiva sähkögeneraattori rakenteilla. *Tekniikka & Talous* 27.11.2020.
- Lee, Kuo-Shing, Lin, Ping-Jei & Chang, Jo-Shu 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (4), 465-472. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319905001278>. Viitattu 16.1.2021.
- Lee, Young Joon, Miyahara, Takashi & Noike, Tatsuya 2002. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77 (6), 694-698. [https://www.researchgate.net/publication/227848049\\_Effect\\_of\\_pH\\_on\\_microbial\\_hydrogen\\_fermentation](https://www.researchgate.net/publication/227848049_Effect_of_pH_on_microbial_hydrogen_fermentation). Viitattu 15.1.2021.
- Levin, David B., Pitt, Lawrence & Love, Murray 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29 (2), 173-185. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319903000946>. Viitattu 15.1.2021.
- Liang, The-Ming, Cheng, Sheng-Shung & Wu, Kung-Long 2002. Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11-12), 1157-1165. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S036031990200099X>. Viitattu 16.1.2021.
- Lin, Chiu-Yue, Chang, Chao-Chi & Hung, Chun-Hsiung 2008. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (10), 2445-2453. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319908002139>. Viitattu 16.1.2021.
- Liu, Guangzhen & Shen, Jianquan 2004. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98 (4), 251-256. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172304002774>. Viitattu 22.1.2021.



- Lo, Yung-Chung, Su, Yi-Chen, Chen, Chun-Yen, Chen, Wen-Ming, Lee, Kuo-Shing & Chang, Jo-Shu 2009. Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology* 100 (23), 5802-5807. <https://www.science-direct.com/science/article/abs/pii/S0960852409007469>. Viitattu 13.1.2021.
- Logan, Bruce E., Oh, Sang-Eun, Kim, In S. & Van Ginkel, Steven 2002. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. *Environmental Science and Technology* 36 (11), 2530-2535. [https://www.researchgate.net/publication/11298839\\_Biological\\_Hydrogen\\_Production\\_Measured\\_in\\_Batch\\_An aerobic\\_Respirometers](https://www.researchgate.net/publication/11298839_Biological_Hydrogen_Production_Measured_in_Batch_An aerobic_Respirometers). Viitattu 15.1.2021.
- LUT University 2018. Uutiset. Verkkojulkaisu. Power-to-x (P2X) – Mitä se tarkoittaa ja miten se mullistaa energian- ja ruoantuotannon. Päivitetty 14.11.2018. [https://www.lut.fi/uutiset/-/asset\\_publisher/h33vOeufOQWn/content/power-to-x-p2x-%E2%80%93-mita-se-tarkoittaa-ja-miten-se-mullistaa-energia-ja-ruoantuotannon-](https://www.lut.fi/uutiset/-/asset_publisher/h33vOeufOQWn/content/power-to-x-p2x-%E2%80%93-mita-se-tarkoittaa-ja-miten-se-mullistaa-energia-ja-ruoantuotannon-). Viitattu 12.1.2021.
- Minkkinen, Eevi 2021. Valokuvat. 18.3.2021. Kuopio: Eevi Minkkisen kokoelmat.
- Mizuno, Osamu, Hawkes, Freda R., Dinsdale, Richard, Noike, Tatsuya & Hawkes, Dennis L. 2000. Enhancement of Hydrogen Production from Glucose by Nitrogen Gas Sparging. *Bioresource Technology* 73 (1), 59-65. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852499001303>. Viitattu 18.1.2021.
- 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. *International Journal of Hydrogen Energy* 29 (7), 709-713. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319903002489>. Viitattu 13.1.2021.
- Motiva Oy 2020. Kestävä liikenne ja liikkuminen. Verkkojulkaisu. Polttokennoauto. Päivitetty 4.8.2020. [https://www.motiva.fi/ratkaisut/kestava\\_liikenne\\_ ja\\_liikkuminen/nain\\_liikut\\_vii-saasti/valitse\\_auto\\_vii-saasti/autotyypit/polttokennoauto](https://www.motiva.fi/ratkaisut/kestava_liikenne_ ja_liikkuminen/nain_liikut_vii-saasti/valitse_auto_vii-saasti/autotyypit/polttokennoauto). Viitattu 15.1.2021.
- Muri, Petra, Osojnik, Gasan, Djinović, Petar & Pintar, Albin 2016. Biohydrogen Production from Simple Carbohydrates with Optimization of Operating Parameters. Pdf-tiedosto. Julkaistu 3/2016. [https://www.researchgate.net/publication/298209185\\_Biohydrogen\\_Production\\_from\\_Simple\\_Carbohydrates\\_with\\_Optimization\\_of\\_Operating\\_Parameters](https://www.researchgate.net/publication/298209185_Biohydrogen_Production_from_Simple_Carbohydrates_with_Optimization_of_Operating_Parameters). Viitattu 22.1.2021.
- Nikolaidis, Pavlos & Poullikkas, Andreas 2017. A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 67, 597-611. [https://www.researchgate.net/publication/308309135\\_A\\_comparative\\_overview\\_of\\_hydrogen\\_production\\_processes](https://www.researchgate.net/publication/308309135_A_comparative_overview_of_hydrogen_production_processes). Viitattu 4.2.2021.
- Nikula, Paula 2018. Suomi tupruttaa taivaalle arvokasta polttoainetta – hukkavety riittäisi vuosittain 10 000 auton menovedeksi. *Kauppalehti* 1.4.2018. <https://www.kauppalehti.fi/uutiset/suomi-tupruttaa-taivaalle-arvokasta-polttoainetta-hukkavety-riittaisi-vuosittain-10-000-auton-menovedeksi/491e2f13-33ec-39c4-8081-00d770add35c>. Viitattu 20.1.2021.
- Palmroth, Henry 2019. Panomädätetyn nollakuidun hyödyntämiskohteet. Opinnäytetyö. Biotuote -ja prosessitekniiikka. Tampereen ammattikorkeakoulu. [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/266429/Palmroth\\_Henry.pdf?sequence=2](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/266429/Palmroth_Henry.pdf?sequence=2). Viitattu 18.1.2021.
- Pandey, Ashok, Chang, Jo-Shu, Hallenbeck, Patrick & Larroche, Christian 2013. *Biohydrogen*. 1. painos. Elsevier.
- Pandey, Ashok, Mohan, S. Venkata, Chang, Jo-Shu, Hallenbeck, Patrick C., & Larroche, Christian 2019. *Biohydrogen*. 2. painos. Elsevier.
- Park, Wooshin, Hyun, Seung H., Oh, Sang-Eun, Logan, Bruce E. & Kim, In S. 2005. Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases biological hydrogen production. *Environmental Science and Technology* 39 (12), 4416-4420. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es048569d>. Viitattu 16.1.2021.

- Ren, N.Q., Chua, H., Chan, S.Y., Tsang, Y.F., Wang, Y.J. & Sin, N 2007. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Technology* 98 (9), 1774-1780. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S09608524-06003543>. Viitattu 14.1.2021.
- Rosa, Eduardo, David, Maria Manuela & Gomes, Maria H. 2001. Glucose, fructose and sucrose content in broccoli, white cabbage and Portuguese cabbage grown in early and late seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (12), 1145-1149. [https://www.researchgate.net/publication/229495484\\_Glucose\\_fructose\\_and\\_sucrose\\_content\\_in\\_broccoli\\_white\\_cabbage\\_and\\_Portuguese\\_cabbage\\_grown\\_in\\_early\\_and\\_late\\_seasons](https://www.researchgate.net/publication/229495484_Glucose_fructose_and_sucrose_content_in_broccoli_white_cabbage_and_Portuguese_cabbage_grown_in_early_and_late_seasons). Viitattu 18.1.2021.
- Uusiutuva vety tunkeutuu Suomen energiakuplaan 2020. *Tekniikka & Talous* 24.4.2020, Uutiset 12-13.
- The World Of Hydrogen julkaisuaika tuntematon. What is hydrogen and how is it made? Verkkojulkaisu. <https://www.theworldofhydrogen.com/gasunie/what-is-hydrogen/>. Viitattu 14.1.2021.
- Tähti, Hanne 2007. Vedyn tuottaminen säilöheinästä pimeäfermentaatiolla. Pro gradu. Bio- ja ympäristötieteiden laitos. Ympäristötieteet, Jyväskylän yliopisto. [https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/7224/URN\\_NBN\\_fi\\_jyu-2007794.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/7224/URN_NBN_fi_jyu-2007794.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Viitattu 17.1.2021.
- Tähti, Hanne & Rintala, Jukka 2010. Biometaanin ja -vedyn tuotantopotentiaali Suomessa. Pdf-tiedosto. Julkaistu 12.8.2010. [https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/37062/T-%C3%83%C2%A4hti\\_Hanne\\_2010.pdf?sequence=1](https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/37062/T-%C3%83%C2%A4hti_Hanne_2010.pdf?sequence=1). Viitattu 17.1.2021.
- Valtioneuvosto 2020. Hallitusohjelma. Verkkojulkaisu. Hiilineutraali ja luonnon monimuotoisuuden turvaava Suomi. <https://valtioneuvosto.fi/marinin-hallitus/hallitusohjelma/hiilineutraali-ja-luonnon-monimuotoisuuden-turvaava-suomi>. Viitattu 6.1.2021.
- Van Ginkel, Steven., Sung, S. & Lay, J. J. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology* 35 (24), 4726-4730. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11775145/>. Viitattu 16.1.2021.
- Van Ginkel, Steven & Logan, Bruce 2005. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research* 39 (16), 3819-3826. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135405003945>. Viitattu 16.1.2021.
- Vartiainen, Eero 2020. Fortum. Verkkojulkaisu. Vetytalous tulee – ennemmin tai myöhemmin. Päivitetty 4.9.2020. <https://www.fortum.fi/tietoa-meista/blogi/forthedoers-blogi/vetytalous-tulee-ennemmin-tai-myohemmin>. Viitattu 8.1.2021.
- Ympäristöministeriö julkaisuaika tuntematon. Euroopan unionin ilmastopolitiikka. Verkkojulkaisu. <https://ym.fi/euroopan-unionin-ilmastopolitiikka>. Viitattu 6.1.2021.
- Yokoi, Haruhiko, Saitsu, Akio, Uchida, Hiroyuki, Hirose, Jun, Hayashi, Sachio & Takasaki, Yoshiyuki 2001. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (1), 58-63. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172301801122>. Viitattu 14.1.2021.
- Zhang, Husen, Bruns, Mary Ann, & Logan, Bruce E. 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research* 40 (4), 728-734. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135405006809>. Viitattu 13.1.2021.
- Zhang, J. Z., Li, J., Li, Y. & Zhao, Y. 2014. Hydrogen Generation, Storage and Utilization. Pdf-tiedosto. Julkaistu 4/2014. [https://www.researchgate.net/publication/28594805-8\\_Hydrogen\\_Generation\\_Storage\\_and\\_Utilization](https://www.researchgate.net/publication/28594805-8_Hydrogen_Generation_Storage_and_Utilization). Viitattu 10.1.2021.