

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nazrin MURGUZOVA**

***Miscanthus giganteus*'DAN DARK FERMENTASYON İLE  
BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ ÜZERİNE FİZİKOKİMYASAL  
VE ENZİMATİK ÖN İŞLEMLERİN ETKİSİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA-2020**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Miscanthus giganteus*'DAN DARK FERMENTASYON İLE  
BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ ÜZERİNE FİZİKOKİMYASAL VE  
ENZİMATİK ÖN İŞLEMLERİN ETKİSİ**

**Nazrin MURGUZOVA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 17/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM  
DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Fatih MATYAR  
ÜYE

.....  
Dr. Öğr. Üyesi Ali Eslem KADAK  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
**Kod No:**

**Prof. Dr. Mustafa GÖK**  
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.**  
**Proje No: FYL-2018-10429**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Miscanthus giganteus*'DAN DARK FERMENTASYON İLE  
BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ ÜZERİNE FİZİKOKİMYASAL VE  
ENZİMATİK ÖN İŞLEMLERİN ETKİSİ**

**Nazrin MURGUZOVA**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM  
Yıl:2020, Sayfa: 59

Jüri : Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM  
: Prof. Dr. Fatih MATYAR  
: Dr. Öğr. Üyesi Ali Eslem KADAK

Bu çalışmada *Miscanthus giganteus* kullanılarak lignoselülozik biyohidrojen üretimi araştırılmıştır. Biyokütle hidrolizasyonunda kimyasal kullanmadan 120 ve 135°C sıcaklıklarda otoklavda, kimyasal kullanarak yapılan ön hidroliz çalışmalarında zayıf asidik % 0,5 ve % 1 sülfürik asit, zayıf bazik % 0,5 ve % 1 NaOH kimyasal uygulamalar 121 ve 135°C'de belirlenmiştir. Kimyasal uygulama sonucunda oluşan hidrolizat biyolojik ön işlem için Viscoamyl Flow selüloz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ön hidroliz çalışmalarında en yüksek şeker hidrolizi % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 135°C sıcaklıkta 60 dakika ön işleme elde edilmiş olup enzimatik hidroliz ile birlikte toplamda 27,43 g indirgen şeker elde edilmiştir. Bazik ön işlemi takip eden hidrolizasyonda ise 18,67 g indirgen şeker elde edilmiştir. Biyohidrojen üretimine ön işlem tekniklerinin etkisinin belirlendiği çalışmada asidik ön işlem sonucu elde edilen hidrolizattan 15,45 L, bazik ön işlemde elde edilen hidrolizattan 14,74 L biyohidrojen üretimi yapılmıştır. Biyohidrojen üretimine başlangıç pH etkisinin belirlendiği çalışmada başlangıç pH'ı 6,5'e ayarlandığında 15,45 L, pH 5,5'e ayarlandığında ise 17,16 L biyohidrojen üretimi sağlanmıştır. Hidrolizat konsantrasyonunun etkisinin araştırıldığı çalışmada 50g indirgen şeker hidrolizatından pH 5,5'te 17,16L biyohidrojen üretilirken oran 100g indirgen şeker'e çıkarıldığında 25,3 L'ye çıkmıştır. Şeker oranının artışı biyohidrojen üretiminde baskılayıcı etki yaratmış ve verimde düşme gözlenmiştir.

Bu çalışma ile *Miscanthus giganteus* biyokütlesinin kimyasal, fiziksel ve biyolojik ön işlemler yapılarak biyohidrojen ve fermentatif enerji kaynaklarının üretiminde kullanılabilecek önemli bir materyal olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyohidrojen, *Miscanthus giganteus*, Dark Fermentasyon, Enzimatik hidroliz

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# THE EFFECT OF PHYSICOCHEMICAL AND ENZYMATIC PRETREATMENT ON BIOHYDROGEN PRODUCTION BY DARK FERMENTATION FROM *Miscanthus giganteus*

Nazrin MURGUZOVA

ÇUKUROVA UNIVERSTY  
THE INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLGY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM  
Year:2020, Pages: 59  
Jury : Assoc. Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM  
: Prof. Dr. Fatih MATYAR  
: Ass. Prof. Dr. Ali Eslem KADAK

In this study, biohydrogen production from biomass was investigated using *Miscanthus giganteus*. The biomass were hydrolysed without using chemicals by autoclave at 121 and 135°C for 60 min. Chemical prehydrolysis were conducted by using weakly acidic 0.5 % and 1% sulfuric acid, weakly basic 0.5% and 1% NaOH chemical applications at 121 and 135°C for 60 min. The Viscoamyl Flow cellulose enzyme used for biological pretreatment after chemical pretreatment of biomass. In the pre-hydrolysis studies shows that, acidic and enzymatic hydrolysis combination was suitable for biomass hydrolysis. 27.43 g of reducing sugar was obtained under acidic 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 135°C degrees for 60 minutes and enzymatic pretreatment conditions. But 18.67 g of reducing sugar was obtained basic and enzymatic pretreatment conditions. Effect of pretreatment techniques on biohydrogen production was determined and 15.45 L biohydrogen was obtained from acidic pretreatment and 14.74 L biohydrogen was obtained from basic pretreatment of biomass. The effect of the initial pH on the biohydrogen production were determined at pH 6.5 and 5.5 and maksimum biohydrogen production was obtained at pH 5.5 as 17.16 L biohydrogen but biohydrogen production was decreased initial pH increase 6.5 maksimum biohydrogen production was obtained as 17.16 L at pH 6.5. In this study, 17.16 L biohydrogen was produced from 50 g reducing sugar hydrolysate at pH 5.5 and the ratio increased to 25.3L when increasing to 100g reducing sugar. But biohydrogen production yield was decreased increasing of the hydrolysate concentrations. The increasing in the sugar ratio was a suppressing effect on biohydrogen production for this reason yield of the biohydrogen was decreased.

*Miscanthus giganteus* biomass is an important energy plant. It may be use for the production of biohydrogen and alternative renewable bioenergy products after the chemical, physical and biological pretreatment.

**Key words:** Biohydrogen, *Miscanthus giganteus*, Dark fermentation, Enzymatic hydrolysis

## GENİŞLETİŞMİŞ ÖZET

Uzun yıllardır kullanılan fosil yakıtların neden olduğu küresel ısınma ile mücadele etmek için yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelmek ve bu kaynakların etkili bir şekilde kullanılması önemli çevresel konulardan birisidir.

Temiz enerji denildiği zaman enerji teknolojilerinde iki temel alan aklı gelmektedir. Bunlardan ilki enerji kaynağı olarak yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Diğerleri ise enerji verimliliği ve enerji verimliliği ile ilgili teknolojilerdir. Güneş, rüzgar, barajlar, jeotermal ve biyokütle enerjileri yenilenebilir enerji kaynakları olarak günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enerji verimliliği ile ilgili teknolojilerle alakalı olarak elektrikli araçlar, kojenerasyon sistemleri son zamanlarda gündem konusu olan önemli başlıklardır. Özellikle küresel ısınma ve karbon emisyonundan ileri gelen iklim değişikliğinin önüne geçilmesi için fosil yakıtların yerine yenilenebilir orijinli yakıtlar ile yer değiştirmesi büyük adımlardan birisidir. Özellikle biyoteknolojik yöntemlerin sanayinin her alanına girmesi ve işleri kolaylaştırması birçok probleme çözüm üretmek için alternatif bir yoldur.

Bu çalışmada biyoteknolojik uygulamalardan dark fermentasyon ile lignoselülozik biyohidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Anaerobik dark fermentasyon ve fotofermentasyon mikroorganizmalar tarafından karbonhidratlardan biyohidrojen üretiminin yapıldığı proseslerdir. Bu amaçla enerji bitkilerinden *Miscanthus giganteus* kullanılmıştır. Lignoselülozik ürünlerin mikrobiyal fermentasyonda fizikokimyasal ön işlemlere maruz bırakılmadan direk kullanılması düşük verime neden olmaktadır. Zira selülozun, hemiselülozun ve yapıdaki ligninin parçalanması doğal mikrobiyal faaliyetler ile oldukça zor olmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada kimyasal olarak % 0,5 ve % 1 zayıf sülfürik asit ve zayıf sodyum hidroksit kullanılarak 121 ve 135°C sıcaklıklarda hidroliz işlemleri yapılmış, bu işlemleri takip eden selülaz enzim uygulaması yapılmıştır.

Anaerobik dark fermentasyonda yapılan hidroliz işlemleri sonucunda asidik ön işlemlerden % 1 zayıf sülfürik asitin 135°C'deki uygulamasıyla enzimatik hidrolizin verimi artmıştır. Zayıf asidik ön işlem ve enzimatik hidroliz ile toplamda 27,43g indirgen şeker elde edilmiştir. Lignoselülozik biyokütleden biyohidrojen üretimi üzerine başlangıç pH'ın etkili olduğu ve çalışılan pH değerleri arasında en iyi verimin pH 5.5'de olduğu belirlenmiştir. Biyokütleden elde edilen indirgen şekerlerin reaktöre beslenmesi ve şeker konsantrasyonunun biyohidrojen üretimi üzerine etkisine bakıldığında şeker konsantrasyonunun artışının biyohidrojen üretiminde çok etkili olmadığı hatta verimin düştüğü belirlenmiştir. Şeker oranının artışı biyohidrojen üretiminde baskılayıcı etki yaratarak, biyohidrojen üretimi üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmiştir.

Bu çalışmada kullanılan lignoselülozik biyokütle Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi tarımsal araştırma deneme sahalarında üretilmiştir. Endüstriyel bitkilerin üretimi ve kullanımı oldukça önemli çalışmalar arasında olup çalışmada kullanılan *Miscanthus giganteus* biyokütlesi kimyasal, fiziksel ve biyolojik ön işlemler yapılarak biyohidrojen ve fermentatif enerji kaynaklarının üretiminde kullanılabilir önemli bir materyal olduğu söylenebilir.

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımnda bana yardım eden öncelikle tez danıőmanım Doç. Dr. Aygöl Küçükgülmez YANDIM'a ve Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a teşekkür ediyorum.

Çalışmalar sırasında emeği geçen Dr. Recep İrfan NAZLI'ya teşekkür ediyorum.

Laboratuvarda benimle birlikte çalıőan ve zaman geçirdiğim tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana büğüne kadar destek olan başta annem Gülsafa GASIMOVA ve babam İslam MURGUZOV'a teşekkür ediyorum.

Bu süreçte benimle birlikte yol alan eőim Osman GÜLNAZ, kızlarım Saadet Ela GÜLNAZ ve Nilay GÜLNAZ'a sevgilerimi iletiyorum.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ .....	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİŞMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Hidrojen .....	3
1.2. Hidrojen Üretim Teknikleri .....	4
1.2.1. Elektroliz ile Sudan Hidrojen Üretimi .....	4
1.2.2. Termokimyasal Yöntemlerle Hidrojen Üretimi .....	4
1.2.3. Biyolojik Yöntemler .....	5
1.2.3.1. Mikrobiyal Biyohidrojen Üretimi ve Dark Fermentasyon.....	6
1.3. Lignoselülozik Biyokütle Yapısı ve Enerji Üretimi .....	10
1.3.1. Lignoselülozik Biyokütle ve Önişlem Teknikleri.....	14
1.3.2. Selulaz Enzimi .....	15
1.3.3. Enerji Bitkilerinden Biyohidrojen Üretimi .....	17
1.4. <i>Miscanthus giganteus</i> .....	18
1.5. Çalışmanın Amacı .....	18
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	21
3. MATERYAL VE METOD .....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitki ve Aşı Kültürleri .....	25
3.1.1.1. <i>Miscanthus giganteus</i> .....	25
3.1.1.2. Mikrobiyal Aşı Kültürü .....	26

3.2. Metod.....	27
3.2.1. Mikrobiyal Aşı Kültürü Hazırlanması.....	27
3.2.2. <i>Miscanthus giganteus</i> Kimyasal ve Enzimatik Hidrolizi .....	28
3.2.3. Gaz Analizi.....	30
3.2.4. <i>Miscanthus giganteus</i> 'un Selüloz, Hemiselüloz ve Lignin Analizi... 30	
3.2.5. DNS Yöntemi ile İndirgen Şeker Tayini .....	31
3.2.6. Hidroliz Ürünlerde Şeker Tayini .....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	33
4.1. Anaerobik reaktör ve Aşı kültürü.....	33
4.1. Biyokütle Hidrolizinde Fiziko Kimyasal Ön İşlemler.....	34
4.2. Biyohidrojen Üretiminde Ön İşlem Tekniklerinin Etkisi.....	38
4.3. Biyohidrojen Üretimine Sıcaklığın Etkisi .....	41
4.4. Biyohidrojen Üretimine pH'ın Etkisi .....	42
4.5. Biyohidrojen Üretimine Hidrolizat Konsantrasyonunun Etkisi .....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR .....	49
ÖZGEÇMİŞ .....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 1.1. Bazı Yakıtların Enerji Değerlerinin Karşılaştırılması.....	3
Çizelge 4.1. <i>Miscanthus giganteus</i> Ön İşlem Öncesi ve Sonrası Selüloz, Hemiselüloz ve Lignin Oranları.....	35





## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 1.1. Selüloz Molekülünün Yapısı .....	11
Şekil 1.2. Hemiselüloz Molekülünün Yapısı .....	12
Şekil 1.3. Nişasta Molekülünün Yapısı.....	12
Şekil 1.4. Lignin Molekülünün Yapısı.....	13
Şekil 1.5. Lignoselulozin Yapının Enzimatik Parçalanması .....	17
Şekil 3.1. Çalışmada Kullanılan <i>Miscanthus giganteus</i> , Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Deneme Alanı.....	25
Şekil 3.2. Biyohidrojen Üretiminde Kullanılan Aşı Kültürü .....	26
Şekil 3.3. Biyohidrojen Üretiminde kullanılan Reaktör Sistemi.....	27
Şekil 3.4. Otoklavda Hidrolize Edilen <i>Miscanthus giganteus</i> Örneklerinin Kimyasal Hidrolizi .....	29
Şekil 3.5. Hidrolize Edilen <i>Miscanthus giganteus</i> Örneklerinin Kimyasal Hidrolizi.....	29
Şekil 3.6. DNS Glikoz Standart Eğrisi.....	32
Şekil 4.1. Batch Kültürde Asidik Bazık Ön İşlemlerden Üretilen Biyohidrojen (Başlangıç pH 6.5, Sıcaklık 37°C, İndirgen Şeker Oranı 50 g/Reaktör).....	39
Şekil 4.2. Enzimatik Hidrolizattan Üretilen Kümülatif Biyohidrojen (Başlangıç pH 6.5, Sıcaklık 37°C, İndirgen Şeker Oranı 50 g/Reaktör). .....	41
Şekil 4.3. Asidik Hidrolizattan Üretilen Kümülatif Biyohidrojen Kontrol Glikoz (Başlangıç pH 5.5 ve 6.5, Sıcaklık 37°C, İndirgen Şeker Oranı 50 g/Reaktör).....	43
Şekil 4.4. Hidrolizat Konsantrasyonunun Etkisi ve Kümülatif Hidrojen Üretimi Kontrol Glikoz (Başlangıç pH 5.5, Sıcaklık 37 °C, İndirgen Şeker Oranı 50-100 g/Reaktör).....	46



## SİMGELER VE KISALTMALAR

HRT	: Alıkonma Zamanı
LPG	: Sıvı Propan Gaz
LNG	: Sıkıştırılmış Doğal Gaz
Kj	: Kilojul
KOI	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
TS	: Toplam Katı
Mj	: Megajul
Nm <sup>3</sup>	: Normal Metre Küp
NaOH	: Sodyum Hidroksit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sülfürik Asit
DNS	: Dinotro Salisilik Asit
FPU	: Filtre Kağıdı Testi



## 1. GİRİŞ

Dünyada enerji tüketimi hızla artarken, fosil yakıt rezervleri de o kadar hızlı tükenmektedir. Bu şekilde giderek artan emisyonların sonucu olarak iklim değişikliği ve küresel ısınma gibi durumları da beraberinde getirmektedir. İklim değişikliği insanoğlunun aktiviteleri sonucu oluşan bir olaydır. İklim değişikliğinin önüne geçilmesi için yenilenebilir enerji kaynakları kullanılarak karbon emisyonunun düşürülmesi, sürdürülebilir ve çevreci enerji kaynaklarına yönelmek zorunlu hale gelmektedir.

Temiz enerji denildiği zaman enerji teknolojilerinde iki temel alan akla gelmektedir. Bunlardan ilki enerji kaynağı olarak yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Diğeri ise enerji verimliliği ve enerji verimliliği ile ilgili teknolojilerdir. Güneş, rüzgar, barajlar, jeotermal ve biyokütle enerjileri yenilenebilir enerji kaynakları olarak günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enerji verimliliği ile ilgili teknolojilerle alakalı olarak elektrikli araçlar, kojenerasyon sistemleri son zamanlarda gündem konusu olan önemli başlıklardır. Özellikle küresel ısınma ve karbon emisyonundan ileri gelen iklim değişikliğinin önüne geçilmesi için fosil yakıtların yerine yenilenebilir orijinli yakıtlar ile yer değiştirmesi büyük adımlardan birisidir (Dow ve Downing, 2006).

Fosil yakıtların kullanılması ve çevre kirliliğinin bu şekilde devam etmesi halinde 2100 yılında ortalama sıcaklığın 5,8°C artacağı tahmin edilmektedir (Dow ve Downing, 2006). Küresel iklim değişikliği ile ilgili yapılan birçok araştırmada sel baskınlarının, fırtınaların, hortum ve kasırgaların oluşacağı söylenmektedir (Mills, 2009).

Yenilenebilir enerji kaynakları arasında biyokütle enerjisi oldukça büyük öneme sahiptir. Sürdürülebilir biyoenerji çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Bu amaçla enerji üretimi amaçlı, gıda olarak kullanılmayan ürünlerin ziraati yapılmakta, tarıma elverişli olmayan topraklar bu ürünlerin yetiştirilmesinde

kullanılmakta, biyoteknolojik ürünlerin bu amaçla geliştirilip yüksek enerji içerikli, yüksek biyokütle verimliliği olan ürünler kullanılmaktadır.

Biyokütle, hidroelektrik, rüzgar, güneş, jeotermal, deniz ve hidrojen gibi yenilenebilir enerji kaynakları dünyanın gelecekte enerji ihtiyacını karşılayacak yegane kaynaklardır. Küresel enerji ihtiyacının yaklaşık yarısı, 2040 yılında yenilenebilir kaynaklardan elde edilecektir. Hidrojen enerjisi gelecekte fosil yakıtlara göre daha ucuz, sürdürülebilir, daha az çevre kirliliği yaratacak önemli bir yakıt kaynağı olarak kullanılacaktır. Hidrojenin yanması sonucunda sadece su açığa çıkması, karbondioksit ve karbon monoksit gibi gazların oluşmaması yakıt kaynaklı sera gazı etkisinin ortadan kaldırılmasında etkili olacaktır (Turner ve ark., 2007).

Hidrojenin en ucuz üretimi fosil kaynaklar kullanılarak elde edilmektedir. Özellikle doğalgazın buhar reformasyonu ve kömürün gazlaştırılması en çok kullanılan yöntemler arasındadır. Şu anda hidrojen üretiminin yaklaşık %50 'si doğalgazın buhar reformasyonu ile gerçekleştirilmektedir. En pahalı hidrojen üretimi ise suyun elektrolizi yöntemidir (Ramachveran ve Menon, 1998).

Hidrojen enerjisi, temiz ve tükenmez bir yenilenebilir enerji kaynağıdır. Gelecekteki enerji üretim sistemleri hidrojen yakıtını temel olarak dizayn edilmektedir. Biyolojik olarak yenilenebilir kaynaklardan üretilen biyohidrojen, sürdürülebilir bir enerji kaynağı olarak görülmektedir. Hidrojen enerjisinin avantajları arasında hidrojenin yanma sonucunda su buharı oluşmakta, çevreye zarar verecek sera gazlarından karbondioksit ve türevleri oluşmamaktadır (Armor, 2005). Otomobillerde hidrojen yakıt pilleri kullanılarak daha güvenli araçlar üretilebilecektir. Elektrik üretiminde türbinlerin yerine yakıt hücreleri kullanılarak elektrik üretimi yapılırken oluşacak ısıda kullanılacak önemli bir enerji kaynağıdır. Hidrojenin metal hidrit şeklinde depolanması güvenli ve daha kolay olacaktır (Dong ve ark., 2007).

### 1.1. Hidrojen

Hidrojen geleceğin yakıtı olarak kabul edilen yenilenebilir enerji kaynaklarından biridir. Hidrojen günümüzde kimya sektöründe ve birçok endüstri alanında kullanılan önemli bir hammaddedir. Hidrojen periyodik cetveldeki ilk elementtir. Moleküler ağırlığı 2.016 g/mol, normal atmosfer basıncında ve oda sıcaklığındaki yoğunluğu 0.0838 kg/m<sup>3</sup>, kaynama sıcaklığı 252,74°C, donma sıcaklığı-259,18°C'dir.

Hidrojen (285.9 KJ.mol<sup>-1</sup>) enerji taşımaktadır, diğer yakıtlar ile kıyaslandığında petrol ve metandan 3 kat daha yüksek enerjiye sahiptir. Tablo 1'de hidrojen ile diğer yakıt türlerinin enerji değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 1.1. Bazı Yakıtların Enerji Değerlerinin Karşılaştırılması (Scragg, 2009)

Yakıt Tipi	Enerji (Mj/kg)
Petrol	47,4
LPG (sıvı)	48,8
LNG (sıvı)	50
Hidrojen (sıvı)	141,9
Hidrojen (gaz)	141,9
Metan (gaz)	50,2

Hidrojen; sanayide doymuş yağ üretiminde, doymuş çift karbon bağlarında oksijenin uzaklaştırılmasında, hava taşımacılığında gaz balonlarının doldurulmasında, enerji depolama sistemlerinde, elektronik endüstrisinde, silikon üretiminde, roket yakıtlarında, hidrojen yakıt hücrelerinde ve daha birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidrojen evrende en fazla, dünya üzerinde üçüncü en fazla bulunan elemendir. Hidrojenin yüksek reaktivitesinden dolayı doğada diğer elementlere bağlı olarak bulunmasına neden olur. Bu nedenle atmosferde çok düşük konsantrasyonlarda (1 ppm) serbest halde bulunmaktadır (Armaroli ve Balzani, 2011).

## 1.2. Hidrojen Üretim Teknikleri

Hidrojen günümüzde yaygın olarak birçok farklı yöntem kullanılarak üretilmekte ve kullanılmaktadır. Hidrojen sadece enerji üretimi amaçlı olarak değil endüstrinin birçok alanında kullanılması nedeniyle, uzun yıllardan beridir üretimi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Moleküler formdaki hidrojen birçok farklı kaynaktan farklı şekillerde üretilir. Suyun elektrolizi, termokimyasal yöntemler ve biyolojik olmak üzere üç şekilde hidrojen üretimi yapılabilmektedir (Carmo ve ark., 2013).

### 1.2.1. Elektroliz ile Sudan Hidrojen Üretimi

Elektroliz, su moleküllerinin elektrik ve bir elektroliz cihazı kullanarak doğrudan hidrojen ve oksijen moleküllerine ayrılması işlemidir. Suyun elektrolizi ile suyu meydana getiren iki molekül hidrojen ve bir molekül oksijen elektrik akımı ile gaz formunda ayrıştırılabilmektedir. En yaygın kullanılan elektroliz teknikleri alkali elektroliz, katı oksit elektrolizleri, tuzlu su elektroliz teknikleridir (Carmo ve ark., 2013).

### 1.2.2. Termokimyasal Yöntemlerle Hidrojen Üretimi

Bu yöntemler ile Hidrojen üretiminde biyokütle ve doğal gaz gibi birçok farklı ürün kullanılmaktadır. Bileşiklerde bağlı bulunan hidrojen termokimyasal tepkimeler ile ayrıştırılıp moleküler hidrojen üretimi gerçekleştirilir.

*Buhar reformasyonu;* katalizör varlığında su buharı ve doğal gazdan alınan metan'ın karbondioksit ve hidrojene dönüştürülmesidir. Metan kaynağı olarak doğal gaz, kaya gazı, biyogaz ve çöp gaz sistemlerinden elde edilen gazlar kullanılabilir. Doğal gaz kullanıldığında % 72 verimlilikte hidrojen üretimi sağlanan bu yöntemde, diğer metan kaynakları kullanıldığında metan gazının saflaştırılması gerekmektedir. Aksi takdirde oluşacak hidrojen gaz karışımının safsızlıklardan arındırılması gerekmektedir. Günümüzde hidrojenin % 96'sı doğal

gazdan su buharı kullanılarak yapılan reforming yöntemi ile üretilmektedir (Ramachveran ve Menon, 1998).

*Biyokütleden termokimyasal yöntemle hidrojen üretimi*; bu yöntemde yüksek basınç ve yüksek sıcaklıklarda biyokütle sıvı veya gaz forma dönüştürülerek gazlaştırma ve piroliz işlemleri yapılmaktadır (Demirbas, 2001). Gazlaştırma biyokütlenin hidrojen, karbon dioksit, karbonmonoksit, metan, hafif ve ağır hidrokarbon moleküllere dönüşmesidir. Biyokütlenin pirolizi ile oksijensiz ortamda 500-800°C sıcaklıklarda sıvı biyolojik petrol ve kömür oluşumu sağlanmaktadır. Gaz fazında tıpkı gazlaştırma da olduğu gibi hidrojen, karbon dioksit, karbon monoksit, metan, hafif ve ağır hidrokarbonlar oluşmaktadır. Çıkan ürünlerden katalitik yöntemler ile hidrojen üretimi sağlanabilmektedir (Ramachveran ve Menon, 1998).

### 1.2.3. Biyolojik Yöntemler

Biyolojik hidrojen üretiminin moleküler temelinde bakteriyel hidrojenaz enzimleri bulunmaktadır. Hidrojenazlar, mikrobiyal hücrenin sitoplazmasında veya periplazmasında bulunur. Hidrojenazlar Fe hidrojenazlar, Ni-Fe hidrojenazlar ve Ni-Fe-Si hidrojenazlara olarak sınıflandırılabilir. *Clostridium*'lar hidrojenaz enzimleri ile hidrojen üretimi gerçekleştirebilmektedir. Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri diğer fizikokimyasal yöntemlere göre daha çevreci ve alternatif bir yöntem olup, organik atıklar biyohidrojen üretiminde kullanılabilen yegane biyokütle kaynaklarıdır (Macaskie ve ark., 2005).

Doğada biyohidrojen üreten siyanobakteriler, anaerobik bakteriler ve fermentatif bakteriler olarak üç grup mikroorganizma bulunur. Siyanobakteriler, ışık enerjisi varlığında fotosentez yoluyla suyu doğrudan hidrojen ve oksijene dönüştürürler. Fotosentetik bakteriler organik asitler kullanarak, anaerobik bakteriler organik maddeleri elektron ve enerji kaynağı olarak kullanıp hidrojen üretimi yapabilirler. Fotofermantasyon, organik materyallerin fotosentetik bakteriler tarafından güneş ışığı varlığında hidrojen ve karbondioksit üretimi yapılan

proseslerdir. Biyofotoliz, yenilenebilir kaynaklardan temiz enerji kaynağı arasında sürdürülebilir, çevre dostu proseslerdir. Siyanobakteriler ve yeşil algler suyu güneş ışığı varlığında moleküler hidrojen ve oksijene kadar ayırmaktadır (Rahman ve ark., 2016).

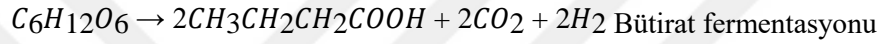
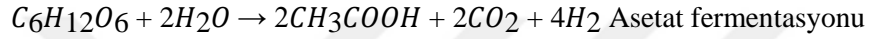
Anaerobik dark fermentasyon ve fotofermentasyon mikroorganizmalar tarafından karbohidratlardan biyohidrojen üretiminin yapıldığı proseslerdir. Hidrojen üreten mikroorganizmalardan *Clostridium* türleri *Clostridium butyricum*, *Clostridium termolactium*, *Clostridium pasteurianum* ve *Clostridium bifermentans* zorunlu anaerob, gram pozitif, çubuk şeklinde ve spor oluşturan organizmalardır (Chenlin ve Fang 2007).

### **1.2.3.1. Mikrobiyal Biyohidrojen Üretimi ve Dark Fermentasyon**

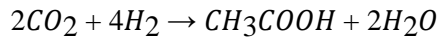
Dark fermentasyon ile biyohidrojen üretim mekanizması genel olarak oksijensiz koşullarda fermentatif bakteriler tarafından organik maddenin oksitlenmesi sonucunda hidrojenin elektron alıcısı olarak moleküler hidrojene indirgenmesidir (Das ve Veziroglu, 2008). Biyohidrojen üretiminde dark fermentasyon ile fermentatif bakteriler organik atıkları bertaraf ederken bunun yanında hidrojen üretimi de sağlamaktadır. Fermentatif hidrojen üretimi ya hidrojenaz ya da nitrojenaz'a bağlı metabolik yolla gerçekleşmektedir (Sinha ve Pandey, 2011). Dark fermentasyonda karbohidrat bakımından zengin substratlar kullanılarak anoksik şartlarda biyolojik hidrojen üretiminin yapıldığı önemli bir prosesdir. Protonlar anoksik şartlardan moleküler hidrojenin üretiminde elektron akseptörü olarak görev yaparlar. Karbohidratlardan fermentatif olarak biyohidrojen üretiminde nitrojenaz yolu yerine hidrojenaz yolu fermentatif karbohidratlardan biyohidrojen üretiminde yüksek hidrojen üretimi düşük maliyet tercih edilmektedir (Redwood ve ark., 2008). Dark fermentasyonda karbohidratlar karbon kaynağı olarak kullanılmakta, fermentasyon sonucunda son ürün olarak asetat, bütirat, propiyonat, laktik asit ve etanol gibi ürünler oluşmaktadır (Guo ve ark., 2010). Hidrojen üreten bakterilerin çoğunluğu zorunlu anaerob bakteriler olup

*Clostridium*'lar, rumen bakterileri, metanojenik bakteriler, arkealar bu grupta sıralanabilir. Bunun yanı sıra bazı fakültatif anaerob bakterilerden *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* dışında bazı aerobik bakterilerde *Alcaligenes*, *Basillus*'lar biyo hidrojen üretimi yapabilmektedir (Guo ve ark., 2010).

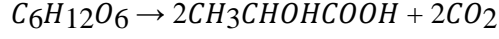
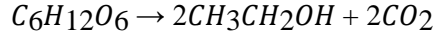
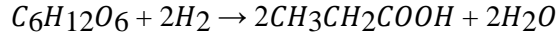
Biyohidrojen üretiminde üretilen hidrojen miktarı son ürüne göre değişiklik göstermektedir. Glikozdan hidrojen üretiminde son ürün asetat ise maksimum 4 mol hidrojen/ mol glikoz üretilmektedir (Hawkes ve ark., 2002).



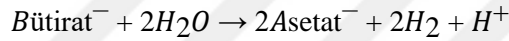
Bakterilerin çoğu pürivat metabolizması ile hidrojen üretimi gerçekleştirmektedir. Pürivata bağlı hidrojen üretim prosesi oldukça kompleks bir yol olup substrat, kültür, reaktör tipi, sıcaklık pH, nütrientlere bağlıdır. Pürivat asetil CoA'ya okside edilir. Asetil CoA'da ATP'ye dönüşür, son ürün olarak asetat, bütirat etanol oluşur (Wang ve Jin, 2009). Fakültatif anaerob bakteriler 1 mol glikoz'dan 2 mol, zorunlu anaerob bakteriler 1 mol glikozdan 4 mol hidrojen üretmektedir (Das ve Veziroglu, 2008). Biyohidrojen üretimi sırasında karışık kültürler kullanıldığında, ortamda asetojenik bakterilerden *Clostridium thermoaceticum* ve *Clostridium aceticum* bulunması olumsuz etkiler yaratmaktadır. Üretilen hidrojen bu bakteriler tarafından karbon dioksitle birleştirilerek asetat'a dönüştürür ve hidrojen ortamda tüketilir (Guo ve ark., 2010).



Son ürün Propiyonat'ta hidrojen tüketen bir ürün olup eğer son ürün etanol ve laktik asit ise sıfır hidrojen tüketimi olur (Guo ve ark., 2010).



Biyolojik olarak hidrojen üretiminde sintropik bakteriler reaksiyon ortamında oluşan son ürünlerden imkansız fermentasyon olayları gerçekleştirebilirler. Etanolden, propiyonattan ve bütirattan asetat oluşumu sırasında moleküler hidrojen üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Azbar ve Levin, 2012).



Dark fermentasyonun sınırlılıkları arasında düşük hidrojen verimi bulunmaktadır, düşük verimin nedeni dark fermentasyonda fakültatif anerobların olmasından ileri gelmektedir ancak fakültatif anaerob bakteriler zorunlu anerob bakterilere göre oksijene karşı toleranslıdır. Ancak burum dark fermentasyonun avantajları arasında yer almaktadır. Dark fermentasyonda karışık kültür kullanmanın avantajı vardır bu durum substrat sterilizasyonu ortadan kaldırarak işletme proseslerini kolaylaştırmaktadır (Wang ve Jin, 2009). Karışık kültürlerle hidrojen üreten bakterilerin zenginleştirilmesinde asit-baz gibi kimyasallar ile ön muameleler, havalandırma, ısıtma ve kimyasal ön işlemler gerektirmektedir.

Dark fermentasyonda ısıl ön işlem en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Dark fermentasyonda optimum sıcaklık mezofilik 37°C ve termofilik olarak 55°C'dir. Yüksek sıcaklıklarda proteinlerin denatüre olması mikrobiyal aktiviteyi de etkilemektedir. Mikrobiyal hidrojen üretiminde sıcaklık ile alakalı

olarak iki grup organizma bulunmaktadır. Bunlardan ilk grup 30-40°C sıcaklıkta yaşayan mezofiller, 45-55°C ve daha üstü sıcaklıklarda aktif olan termofilik bakterileridir. En yaygın biyohidrojen üretim yöntemleri arasında sıcaklığın etkisi ön plana çıkmakta ve bu durumda daha çok mezofilik yöntemler tercih edilmektedir. Sıcaklık bakterilerin metabolizmalarını etkilediği için oluşan ara ürünleri etkilemektedir, sıcaklık ayrıca çözünmüş hidrojenin oranını etkilediği için oldukça etkili bir parametredir (Leung ve ark., 2006).

### 1.2.3.2. Dark Fermentasyonda Hidrojen Üretimini Etkileyen Parametreler

Biyohidrojen üretim proseslerinde dark fermentasyonu etkileyen prosesin çalışması ile ilgili parametreler arasında sistemin pH'ı, sıcaklığı, kullanılan substrat türü ve konsantrasyonu, HRT (Hidrolik Alıkonma Süresi), proses içindeki mikroorganizma türü, fermentasyon sürecunda oluşan yan ürünler, hidrojenin kısmi basıncı sıralanabilir.

pH : biyolojik hidrojen üretim prosesleri mikrobiyal fermentasyon sonucu gerçekleşmektedir. Fermentasyon sırasında kullanılan substrat mikrobiyal faaliyet sonucunda organik asitlere kadar parçalanırken sistemin pH değerinde düşüşe neden olmaktadır. Sistemde pH kontrol edilmesi gereken önemli bir parametredir. Zira proses süresince pH kontrol edilmez ise fermentasyon yolu değişerek biyohidrojen üretimi yerine çözücüler yönüne doğru kayar. Bu da hidrojen üretiminin gerilemesine neden olmaktadır. Optimum biyohidrojen üretimi için, optimum pH değeri 5-6 arasında olmaktadır (Vazquez ve Varaldo 2008).

Hidrojenin kısmi Basıncı: Hidrojen üretiminin temeli hidrojen üretiminden sorumlu hidrojenazlardır. Ortamda hidrojen bulunması hidrojenazlar üzerinde inhibitör etki yaratmaktadır.

Alıkonma süresi: Sürekli sistemlerde substrat alıkonma süresi önemli bir parametre olup, düşük alıkonma süreleri karışık kültürlerde hidrojen tülketen

bakterilerin eleminasyonuna neden olmakta, oluşan inhibitör organik asitlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Leung ve ark., 2006).

**Sıcaklık:** dark fermentasyonda mezofilik sıcaklıklar tercih edilmekte, termofilik sıcaklıklar hem uygulama güçlükleri oluşturmakta, hemde substratın ısıltılması için enerji gerektirmektedir (Genç, 2010).

**Mikroorganizma:** Hidrojen üreten bakteriler anaerob fakültatif anerob bakterilerdir. Dark fermentasyonda saf kültür yerine karışık kültür kullanılmaktadır. Saf kültürlerin muhafaza edilmesi kontaminasyona karşı korunması oldukça zordur (Phowan ve ark., 2010).

**Hammadde:** Dark fermentasyonda kullanılan karbon kaynakları basit şekerler, nişastalı ürünler, lignoselülozik biyokütle, organik atıklar, endüstriyel ürünler vb. gibi bileşenlerden oluşmaktadır (Genç 2010).

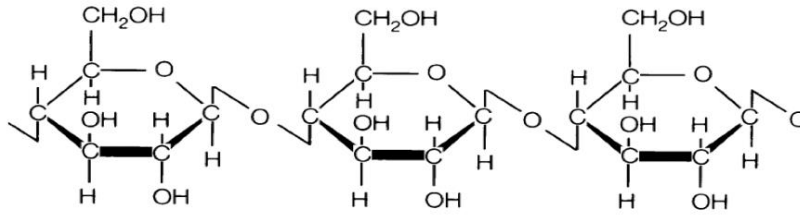
**Son ürünler:** dark fermentasyonda mikrobiyal faaliyet sonucu oluşan son ürünlerin bir avantajı değerli ürünler olması, dezavantajı ise oluşan hidrojen miktarının inhibe olmasıdır. Dark fermentasyonda laktik asit, formik asit, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, etanol, propanol, butanol, 2,3-Butanediol, aseton gibi birçok ara ve son ürün oluşmaktadır. Yüksek biyohidrojen verimi bütirik asit oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Düşük verim ise propiyonat, laktik asit ve alkollerin oluşumu ile meydana gelmektedir. *Clostridia* türleri özellikle *Clostridium butyricum*, bütirik asit oluşumunda dark fermentasyonda önemli rol oynamaktadır (Leung ve ark., 2006).

### **1.3. Lignoselülozik Biyokütle Yapısı ve Enerji Üretimi**

Biyokütle enerjisi doğada en fazla bulunan yenilenebilir enerji kaynaklarından biridir. Zirai atıklar, ormanlar, enerji bitkileri, evsel ve kırsal bölgelerde atılan gıda atıkları yanı sıra bahçe atıkları ve algler enerji üretiminde kullanılabilen önemli biyokütle kaynaklarıdır. Biyokütle kaynaklarında biyokütlenin yapısı nişasta, selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır. Nişasta, selüloz ve hemiselüloz glikoz molekülerinin polimerik olarak oluşturduğu

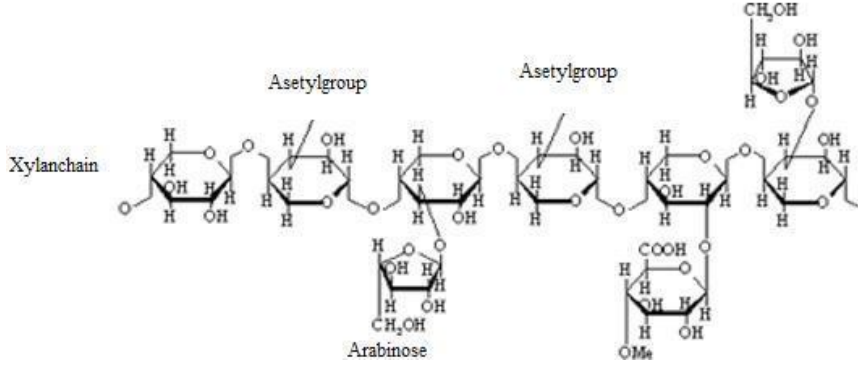
önemli bitkisel makromoleküllerdir. Bu moleküller biyokütlenin hidrolizi ile kolaylıkla fermente edilebilir ve fermentasyon sonucunda hidrojen, etanol, bütanol gibi ürünlere dönüştürülebilmektedir. Lignoselülozik biyoküteller genel olarak % 25-50 selüloz, %20-40 hemiselüloz ve %15-35 oranlarında ligninden oluşmaktadır. Zirai atıklar ve gıda atıkları çoğunlukla nişasta içerikli atıklardır (Sun ve Cheng, 2002).

*Selüloz*; Doğada en fazla bulunan bitkisel kökenli doğal bir polimerdir. Yaklaşık olarak 7000-15000 D-glikoz birimlerinin  $\beta$  (1,4) glikozidik bağları ile bağlanmış homopolimerdir (Yu ve ark., 2007). İki glikoz molekülünden sellobiyoz, sellobiyoz moleküllerinden de daha büyük yapı selüloz oluşturulur. Selüloz molekülü kristal yapıda olup düşük yüzey alanına sahiptir ve suda çözünmez. Enzimatik ve kimyasal etkilere karşı oldukça dirençlidir (Yu ve ark., 2007).



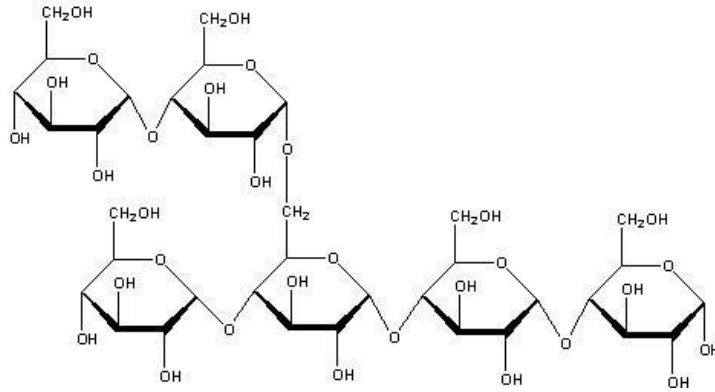
Şekil 1.1. Selüloz Molekülünün Yapısı

*Hemiselüloz*; selüloz gibi benzer yapısı olan hemiselüloz bir heteropolimerdir. Yapısında en fazla ksiloz bulunur. Dallanmış yapısı farklı şeker monomerlerinden pentozlardan ksiloz arabinoz, hegzozlardan galaktoz, mannoz, glikoz ve şeker asitlerinden D-glukuronik asit gibi monomerlerin  $\beta$  (1,4) glikozidik bağları ile bağlanması ile oluşmaktadır. Hemiselüloz lignin ve selüloza bağlanarak lignoselülozik yapıyı oluşturmaktadır (Ren ve ark., 2009).



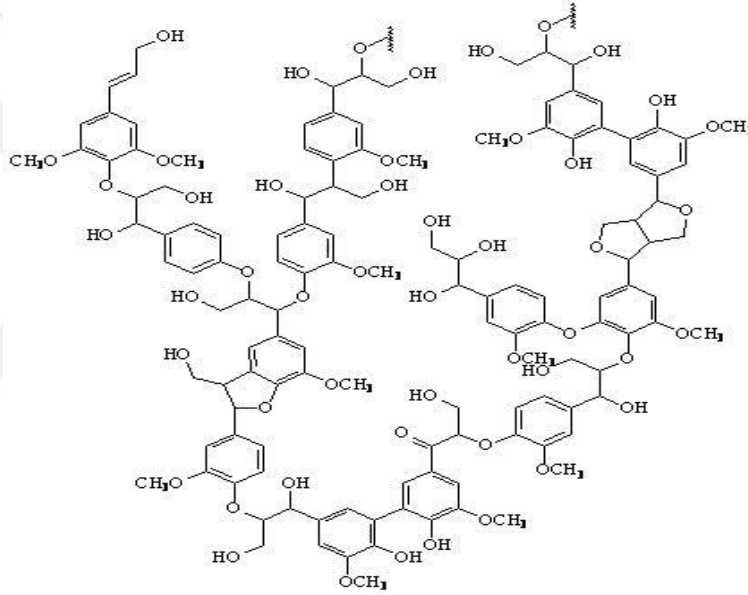
Şekil 1.2. Hemiselüloz Molekülünün Yapısı

*Nişasta*; patates, mısır, pirinç, buğday gibi zirai ürünlerin en temel bileşenidir. Nişastanın suda çözünmeyen formu  $\alpha$ -1,4- glikozit bağları ile bağlı lineer kısım amiloz olarak, suda çözünen  $\alpha$ -1,6 bağları ile dallanmış yapısı amilopektin olarak adlandırılır. Nişasta molekülleri yarı kristal yapıda olup enzimatik ve kimyasal olarak hidrolize oldukça hassas moleküllerdir ve kolayca parçalanabilmektedir (Mars, 2010; Toor ve ark., 2011).



Şekil 1.3. Nişasta Molekülünün Yapısı

*Lignin*; lignoselülozik biyokütlenin yapısında bulunan aromatik yapıdaki bir polimerdir. Oldukça dallanmış polifenolik bir makromoleküldür.  $\rho$ -hidroksifenilpropan üniteleri birbirlerine bağlanarak oldukça stabil amorf bir yapı oluşturmaktadır. Lignin protein ve diğer organik bileşiklere karbon-karbon bağı ve eter bağları ile bağlanarak kompleks yapıyı oluştururlar. Lignin molekülünün yapısında monomerik fenilpropan molekülleri, p-koumaril, koniferil ve sinaptil alkol yapıları görülebilmektedir. Genel olarak lignin ağaç ana yapısında selüloz ve hemiselüloz molekülleri arasında bağlayıcı bir çimento görevi yapmaktadır.



Şekil 1.4. Lignin Molekülünün Yapısı

Lignin sert ağaç, yumuşak ağaç ve çimen lignini olarak sınıflandırılabilir. Yumuşak ağaç lignini koniferil alkollerden ve az miktarda p-Koumaril alkolden oluşmaktadır. Sert ağaç lignini %8 p-Hidroksifenilpropan (koumaril alkolden oluşur), eşit miktarda koniferil ve sinaptil alkol moleküllerinden oluşur. Çim lignini sinaptil, koniferil ve p-hidroksifenilpropan moleküllerinden oluşur. P-koumaril alkol yan zincirleri esterleşip p-koumarik asit şekline dönüşür. Bu yapı enzimatik ve kimyasal etkilere karşı oldukça dirençli bir moleküldür (Balat, 2010).

### 1.3.1. Lignoselülozik Biyokütle ve Ön İşlem Teknikleri

Lignoselülozik biyokütlenin önemli karbohidrat kaynakları olup, biyolojik olarak parçalanabilir olan bu ürünlerden biyogaz, biyoetanol, bütanol gibi önemli endüstriyel ürünler üretilmektedir. Ligno selülozik biyokütlenin yapısında bulunan selüloz ve hemiselülozun ön işlemler ile fermentasyonda kullanılabilir monosakkaritlere kadar parçalanması için buhar patlatma, sıcak su ile ön işlem, alkali ve asidik ön işlem ve biyolojik ön işlem uygulamaları veya bu uygulamaların kombinasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Hosseini ve Shah, 2009; Srinivasan ve Ju, 2010).

*Buhar patlatma*, bu teknik en yaygın kullanılan ön işlem metodlarından biridir. Kapalı kaplarda yüksek basınç altında 1 dakikadan 5 dakikaya kadar ısıtılma maruz bırakılıp daha sonra hızlı soğutma ile lignoselülozik biyokütlerdeki selüloz-hemiselüloz yapısının ayrılmasını sağlamaktadır. Buhar patlatmadaki amaç selüloz ve hemiselülozun daha sonraki enzimatik parçalanma için biyokütlenin hazırlanmasıdır (Hendriks ve Zeeman, 2008). Buhar patlatma işlemleri sırasında suyun asidik davranışı ve işlemler sırasında oluşan asidik bileşenler hemiselülozun hidrolizasyonu sağlamaktadır (Balat ve ark., 2008).

*Sıvı sıcak su*, su yüksek basınç altında buharlaşmadan 200-230°C sıcaklıklara kadar ısıtılarak bu sıcaklıklarda biyokütle ısıtılma maruz bırakılmaktadır. Bu işlem birkaç dakika sürmekte ve hemiselülozun %90'dan fazlası hidrolize olmaktadır. Buhar patlatma işlemlerine göre daha etkili olan sıvı sıcak su yönteminde çok fazla su kullanılması bir dezavantajdır (Hendriks ve Zeeman, 2008).

*Zayıf asidik ön işlem*, en yaygın kullanılan fizikokimyasal biyokütle hidroliz yöntemlerinden biridir. Asit kullanımı lignoselülozik biyokütleden yüksek oranda şeker elde etmeyi sağlamaktadır. Bu amaçla sülfürik asit, hidroklorik asit, nitrik asit ve fosforik asit yaygın olarak kullanılan asitlerdir. Ancak hem ucuz hemde kullanım kolaylığı nedeni ile sülfürik asit en çok tercih edilen asittir. Zayıf

asidik ön işlem çalışmalarında sıcaklık 160-220°C arasında olup, işlem süresi birkaç dakikadır. Asit konsantrasyonu düşük veya yüksek olarak selüloz ve hemiselülozun parçalanma oranına göre belirlenmektedir. Çok yüksek asit konsantrasyonu kullanılması bazı inhibitör yan ürün oluşturduğu için tercih edilmemektedir. Zayıf asit kullanımı ise verimlilik açısından avantajlı olmasından dolayı tercih edilmektedir (Mosier ve ark., 2005; Hendriks ve Zeeman 2008).

*Zayıf alkali ön işlemler*, lignoselülozik materyalin yapısında bulunan ligninin uzaklaştırılmasında etkili bir uygulamadır. Alkali ön işlemler diğer yöntemlere göre düşük basınçta, düşük sıcaklıklarda uygulanan ancak uzun zaman alan proseslerdir (Mosier ve ark., 2005).

*Biyolojik ön işlemler*, mantar ve bakteriler düşük sıcaklıklarda ve düşük basınçlarda lignoselülozik biyokütleden lignin uzaklaştırmak için kullanılan bir yöntemdir (Zhang ve ark., 2019). Birçok mantar 20-30°C sıcaklıkta ürer ve lignini parçalamaktadır. *Phanerochaete chrysosporium* optimum üreme sıcaklığı 40°C olup 50°C'de yaşar ve lignini çok hızlı parçalama yeteneği vardır. Günde 1 gram *Phanerochaete chrysosporium* 3g lignin parçalayabilmektedir. Biyolojik ön işlemler lignin parçalama ve uzaklaştırma için oldukça etkili bir yöntem olup toksik veya inhibitör bir yan ürün oluşturmamaktadır (Balat ve ark., 2008). Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik ön işlemler ile parçalanması çevreci olduğu kadar toksik yan ürünlerde oluşturmamaktadır. Bu amaçla yaygın olarak termofil bakterilerden ve *Trichoderma reesei*'den izole edilen selülaz'lar ve ksilanazlar kullanılmaktadır (Sun ve Cheng, 2002).

### 1.3.2. Selülaz

Bitkiler tarafından üretilen selüloz genellikle hemiselüloz, lignin, pektin ve diğer maddelerden oluşan bir matris içinde bulunur, bu da lignoselülozik biyokütleyi oluşturur, ancak mikrobiyal selüloz oldukça saftır, daha yüksek bir su içeriğine sahiptir ve uzun zincirlerden oluşur. C4 karbonundaki -OH grubu ile C1

karbonu arasındaki asetal fonksiyonlar aracılığıyla bağlanmış birkaç yüz ila binlerce  $\beta$ -1,4 D-glikoz biriminden oluşmaktadır (Jagtap ve Rao, 2005).

Selüloz zincirleri içinde yüksek derecede hidrojen bağları, 3-boyutlu kafes benzeri bir yapı oluşturabilirken, amorf selüloz, yüksek derecede hidrojen bağlarından yoksundur ve yapı daha az oluşturulmaktadır. Selülozun fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküller arası etkileşimler, çapraz bağ reaksiyonları, polimer uzunlukları ve fonksiyonel grupların tekrar eden birimleri ve polimer zincirleri boyunca dağılımı ile tanımlanır.

Başlangıçta, doğal selülozun (selüloz I) kristalin yapısı X-ışını kırınımı ile incelenmiştir ve hafif kristalin mikrofibriller oluşturan paralel bir yönde iki katlı bir vida eksenine sahip iki selüloz zincirine bağlı iki monoklinik birim hücre olarak tanımlanmıştır (Gardner ve Blackwell, 2004; Klemm ve ark., 2005). Doğal selülozun, selüloz I formundan selüloz II, III ve IV keşfedilmiştir (Gardner ve Blackwell, 2004). Selüloz I, termodinamik olarak daha az kararlı bir yapı iken, selüloz II en kararlı yapıdır (Klemm ve ark., 2005).

Selülozun biyolojik olarak parçalanmasında farklı enzimler görev yapmaktadır. Bunlar endoglukanazlar (EC 3.2.1.4), ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.74), sellobiohidrolazlar (EC 3.2.1.91) ve  $\beta$ -glukosidazlar (EC 3.2.1.21)'dir (Li ve ark., 2020).

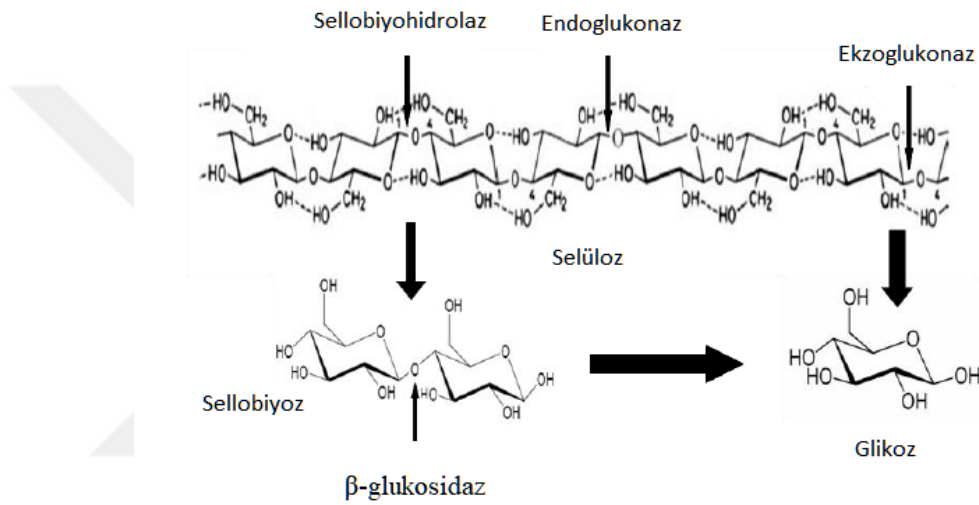
Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4) selülozun çözünür ve amorf bölgelerindeki rastgele bulunan glikozidik bağları hidrolize eder ve uzun selüloz şeritlerine keserek yeni uçlar üretir. Bu işlem, polimer uzunluğunda hızlı bir azalmaya ve şeker konsantrasyonunun azaltılmasında kademeli bir artışa neden olur.

Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.74) selüloz zinciri ve oligosakkaritleri yüksek depolimerizasyon özelliği ile  $\beta$ -glikoz birimlerine parçalar.

Selobiohidrolazlar (EC 3.2.1.91) selüloz zincirlerini indirgeyici ve indirgeyici olmayan uçlardan 2 birim (selobiyoz) çıkararak hidrolize eder. Bu işlemle indirgen şekerlerin hızlı bir şekilde serbest kalması sağlanır.

$\beta$ -Glukozidazlar (EC 3.2.1.21), selülozun parçalanması ile oluşan oligosakkarit ürünlerini glikoza kadar dönüştürür (Bhat ve Bhat, 1997).

Bu enzimatik bileşenler, selülozun parçalanmasını ve daha sonra  $\beta$ -glukoza biyolojik dönüşümü kolaylaştırmak için sinerjistik bir sistemde sırayla etki ederler. Şekil 1.5'de lignoselulozik bir yapının enzimatik parçalanması verilmiştir (Beguin ve Aubert, 1994).



Şekil 1.5. Lignoselulozin Yapının Enzimatik Parçalanması (Beguin ve Aubert, 1994).

### 1.3.3. Enerji Bitkilerinden Biyohidrojen Üretimi

Lignoselulozik biyokütle mikrobiyal olarak biyohidrojen üretiminde kullanılacak polimerik karbohidratlardan oluşmaktadır (Zheng ve ark., 2014). Zira atıklar veya enerji bitkileri kullanılarak mikrobiyal biyohidrojen üretimi düşük maliyetli bir yöntemdir (Guo ve ark., 2010). pH fermentatif hidrojen üretiminde önemli bir faktördür ve bakterilerin hidrojenaz aktivitesini etkilemekte ve karışık kültürlerde sadece hidrojen verimi değil, bakterilerin metabolik yollarını da değiştirmektedir. Düşük pH değerlerinde uçucu organik asitlerin kültür ortamında aşırı üretimi bakterilerin hidrojenaz enzimlerini inhibe etmektedir

(Wang ve Jin, 2009; Ghimire ve ark., 2015). Yapılan birçok çalışmada gıda atıklarında biyohidrojen üretiminde pH 5-6, enerji bitkileri ve hayvansal atıkların kullanıldığı sistemlerde nötral pH değerleri, nişastalı ürünlerin substrat olarak kullanıldığı sistemlerde pH 4.7-5.7 optimum pH koşulları olarak belirtilmektedir (Lay, 2000; Guo ve ark., 2010).

#### 1.4. *Miscanthus giganteus*

Buğdaygiller (*Gramineae*) familyasından olan *Miscanthus giganteus* 57 kromozomlu triploid kısır bir melezdir. 76 kromozomlu tetraploid *Miscanthus sacchariflorus* ile 36 kromozomlu diploid *Miscanthus sinensis*'in çaprazlanması ile ortaya çıkmıştır (Greef ve Deuter, 1993). Ana vatanı Japonya'nın güneyindeki tropikal bölgelerdir. Filotu veya Fil çimeni diye bilinmektedir. 3.5-4 metreye ulaşan boyu, yüksek biyokütle verimi ile uzun yıllar hayvan yemi ve altlık olarak kullanılmıştır. Son yıllarda yüksek biyokütle verimi nedeniyle yenilenebilir enerji bitkileri arasında üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır (Tumuluru ve ark., 2012).

*Miscanthus* çok yıllık bir C4 bitkisidir ve su gereksinimi ve azot gereksinimi oldukça fazladır. Bir kere ekildikten sonra yumru şeklindeki rizomları tarlada kalmakta, sürekli tohum ihtiyacı olmadan üremeye devam etmektedir. Filotunun kardeşlenme yeteneği yüksek olup 20-30 tane köke kadar gelişim sağlayabilmektedir. Biyokütle verimi Avrupada en yüksek olarak Yunanistan'da 4400 kg/da, İspanya'da 3400 kg/da olduğu belirtilmektedir (Jones ve Walsh, 2007). Biyokütle verimi yüksek olması, tarımının kolay ve ucuz olması nedeniyle *Miscanthus* fizikokimyasal yöntemler ile şekerleştirme, piroliz ile kömürleştirme, sıvılaştırma ve gazlaştırma gibi enerji üretim sistemlerinde ucuz ve sürdürülebilir bir hammadde olma niteliği taşımaktadır (Tumuluru ve ark., 2012).

#### 1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada küresel ısınmanın en önemli sebeplerinden olan karbon emisyonunun önüne geçmek için daha çevreci ve yanma sonucunda karbondioksit

yerine su açığa çıkaran, karbon emisyonunu sıfırlayan yenilenebilir, yüksek enerji içerikli bir yakıt potansiyeli olan biyohidrojen üretiminde enerji bitkilerinden *Miscanthus giganteus* kullanılarak, kimyasal ve enzimatik hidrolizasyon ürünlerinden dark fermentasyon ile biyohidrojen üretimi ve dark fermentasyona ön işlem ürünlerinin, pH'ın, hidrolizat konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.





## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Li ve ark. (2020), şeker kamışı melasından endüstriyel biyohidrojen üretiminde *Ginkgo biloba* yapraklarının kullanarak verim artışı sağlamışlardır. Şeker kamışı melasına *Ginkgo biloba* yapraklarının eklenmesi ile üretilen biyohidrojen verimi % 28,03 oranında artmıştır. Maksimum verim 1.58 mol- $H_2$ /mol-hegzoz şeker kamışı melası olarak belirlenmiştir.

Kim ve ark. (1999), *Clostridium butyricum* ile glikoz, laktoz, nişasta ve gliserin kullanılarak biyohidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç pH'sı 6.8'de 12–16 saatlik fermentasyon süresi boyunca pH'nın 4.2'ye düştüğü, bu durumda kullanılan substratın tam olarak tüketilmediği, pH 5.5'e ayarlanıp burada sabit tutulduğunda hem hidrojen üretiminde artış olduğu hemde kullanılan substratların tamamının tüketildiği görülmüştür.

Plangklang ve ark. (2012) *Clostridium butyricum* ile şeker kamışı suyundan biyohidrojen üretiminde immobilize olmuş bakterilerin immobilize olmamış bakterilere göre hidrojen üretim hızlarının 1,2 kat daha fazla olduğunu belirtmektedirler. İmmobilize olmuş kültürün optimum biyohidrojen üretim koşulları olarak başlangıç pH'sı 6.5, başlangıç şeker konsantrasyonu ise 25 g KOI/L sukroz olarak belirlenmiştir. Hidrojen verimi 3.11 L hidrojen/L substrat gün ve 1,34 mol hidrojen/mol hegzoz olarak tespit edilmiştir. Batch fermentasyonda hidrojen verimi 3,5 L hidrojen/L substrat gün ve 1.52 mol hidrojen/mol hegzoz olarak belirtilmektedir. Sürekli beslemede batch kültüre göre daha fazla hidrojen üretimi sağlandığı bunun nedeninin batch kültürde oluşan metabolik ara ürünlerin hidrojen üretimini inhibe ettiğinden dolayı olduğunu belirtmişlerdir.

Pattra ve ark. (2008), şeker kamışı posasının farklı konsantrasyonlarda sülfürik asit (% 0,25-7) ile 15-240 dakika otoklavda ısıl ön işleme hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada optimum hidrolizasyon şartları, %0,5 sülfürik asit, 60 dakika otoklav süresi olarak belirlenmiştir. Bu şartlarda 24,5 KOI/L toplam şeker üretimi gerçekleşmiştir. Hidrolizat içeriği 11 g glikoz/L, 11.29 g arabinoz/L,

2,48 g asetik asit/L ve 0,12 g/L furfural olarak belirlenmiştir. Şeker kamışı posası kullanılarak *Clostridium butyricum* ile biyohidrojen üretimi üzerine hidrolizat konsantrasyonları ve pH'ın etkisi araştırılmıştır. En iyi hidrojen üretimi pH 5,5'de 20 g KOI/L hidrolizat besleme konsantrasyonunda 1.73 mol Hidrojen/mol toplam şeker olarak belirlenmiştir. Çalışmada reaktörün biyohidrojen üretim hızı 1611 mL hidrojen/L gün olarak belirlenmiştir.

Khullar ve ark. (2013) *Miscanthus giganteus*'un kimyasal ve enzimatik hidrolizinde biyokütle partikül çapının hidrolizasyona etkisini araştırmışlardır. 0.08, 2 ve 6 mm farklı partikül çaplarındaki örnekler sıcak su, zayıf asit ve amonyum hidroksit ile tübüler reaktörde 160-240 derece sıcaklıklarda farklı zaman aralılarında ön işleme maruz bırakılmıştır. Enzimatik hidroliz işlemleri kimyasal ön işlemden çıkan katı ürünlerin yıkandıktan sonra, %10 katı oranında sitrat tamponunda 50°C sıcaklıkta Accellerase karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzimatik işlem sonunda katı-sıvı kısmı ayrılıp hidroliz şeker ürünleri belirlenmiştir. Hidroliz ürünlerinde en yüksek enzimatik hidrolizasyon 0.08 mm partikül çapındaki *Miscanthus* örneklerinde gerçekleşmiş ve glukoz verimi % 19-23 olarak belirlenmiştir. Seyreltik amonyumhidroksit ile muamelede kisloz oranında %25 oranında bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Sagnak ve ark. (2011) atık buğday tanelerinin pH 3'te ve 90°C sıcaklıkta otoklavda 15 dakikalık asidik ön hidrolizasyonu ile elde edilen çözünmüş şekerlerden, dark fermentasyon ile biyohidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar en yüksek hidrojen üretimi değerlerini 10g/L şeker konsantrasyonunda 1.46 mol Hidrojen/mol glikoz olarak belirlemiş ve asidik ön hidroliz işleminin atık buğdaylardan biyohidrojen üretiminde etkili bir ön işlem olduğunu tespit etmişlerdir.

Mirza ve ark. (2019) mor kükürt bakterileri kullanılarak ön işleme maruz bırakılmadan şeker kamışı posasından fotofermentatif biyohidrojen üretimini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, ham posadan 148-513 mM hidrojen /L olarak üretim sağlanmıştır. Maksimum hidrojen üretimi 1.96 mol Hidrojen/mol şeker

olarak 30 °C sıcaklıkta, pH 7 ve ışık yoğunluğu 120-150 W/m<sup>2</sup> olarak elde edilmiştir. Glikoz karbon kaynağı olarak kullanıldığında 5.94 mol Hidrojen/mol şeker üretim belirlenmiştir.

Wong ve ark. (2019) süt atıksuyu kullanılarak çöp sızıntı suyundan alınan aşı çamurundan dark fermentasyon ile biyohidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç pH değerinin biyohidrojen üretimi üzerine etkisini belirlemişlerdir. Optimum başlangıç pH değeri 6 olarak 37°C sıcaklıkta maksimum 113,2 mmol hidrojen/g KOI elde edilmiştir.

Khanna ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, glikoz kullanarak *Enterobacter cloacae* ile biyohidrojen üretiminde pH'ın kontrol altına alınmadığı başlangıç pH'ının 6.5'e ayarlandığı durumda en yüksek biyohidrojen üretim verimi 2.2 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz iken pH 6.5'te kontrol altında tutulduğu durumda hidrojen üretim verimi artmış ve üretilen biyohidrojen oranı 3.1 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz olarak belirlenmiştir.

Becerra ve ark. (2019) tarafından tekilla vinası kullanılarak yapılan dark fermentasyon ile biyohidrojen çalışmasında, yüksek şeker oranlarında biyohidrojen üretiminin baskılandığı ve vinas ekstrelerinin içeriğindeki fenolik bileşenlerin aktif kömür kullanarak uzaklaştırılması ile biyohidrojen üretiminin arttığı belirtilmiştir. Optimum hidrojen üretimi, sürekli beslemeli reaktörde 1.39L hidrojen/L gün olarak aktif kömürle detoksifiye edilmiş tekilla vinasının 5 g KOI şeker konsantrasyonu kullanılarak elde edilmiştir.

Zhang ve ark. (2019) fotofermentatif ve dark fermentasyonla mısır saplarından biyohidrojen üretiminde maksimum kümülatif hidrojen üretimini fotofermentatif yöntemle 141.42 mL/g TS olarak elde etmişlerdir. Dark fermentasyonda ise fotofermentatif yöntemle göre çok düşük biyohidrojen üretimi 36.08 mL/g TS belirlenmiştir. Bunun nedeninin selülozik yapının dark fermentasyonda yeterince parçalanamaması olduğu belirtilmiştir. Fotofermentatif hidrojen üretiminde organik asit üretimi az olurken dark fermentasyonda fazla olmakta ve fazla olan bu asit oranının hidrojen üretimini baskıladığı belirtilmiştir.

Turhal ve ark. (2019) kavun ve ağaç kavunu meyve atıklarından dark fermentasyonla hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Batch kültürde 0,74 ve 37 g TS/L arasında katı madde ile besleme yapılmış, en yüksek biyohidrojen verimi yüksek katı ve şeker oranlarında elde edilmiştir. Hidrojen üretimi 37g katı oranında 80,62 ml hidrojen/L saat olarak belirlenmiştir. Bu oran doğal mikroflora ile elde edilirken, ısıyla ön işleme maruz bırakılan aktif çamur ilavesiyle hidrojen üretiminin 351,12 hidrojen /L saat olarak yaklaşık 4 kat arttığı belirtilmiştir.

Kim ve ark. (2013) biyokütleden hidrojen üretimine, odun kullanmışlar ve odundan akışkan yataklı gazlaştırma ünitesinde hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Gazlaştırma için hava kullanılmış, gazlaştırma ünitesinin içindeki parametrelere bağlı olarak odun beslemesi yapılmış ve beslemeye bağlı olarak gaz bileşimi değişiklik göstermiştir. Üretilen hidrojen daha önceki araştırmalardan oldukça yüksek olup, gazın kalorifik değeri 4,7 MJ/Nm<sup>3</sup>, hidrojen konsantrasyonu % 16,1, metan oranı % 5,3 olarak belirtilmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitki ve Aşı Kùltürleri

###### 3.1.1.1. *Miscanthus giganteus*

Çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan *Miscanthus giganteus* (filotu), Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Tarla Bitkileri Araştırma ve Uygulama alanından 08.02.2017 yılında temin edilmiştir (Şekil 3.1.). Toplanan numuneler 105°C sıcaklıkta, etüvde 24 saat süre ile kurutulmuştur. Kurutulan örnekler laboratuvar tipi değirmen ile öğütüldükten sonra ağız kapalı plastik bidonlarda nem almayacak şekilde karanlıkta ve oda sıcaklığında çalışmalarda kullanmak üzere saklanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada Kullanılan *Miscanthus giganteus*, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Deneme Alanı.

**3.1.1.2. Mikrobiyal Aşı Kùltürü**

Dark fermentasyon çalışmalarında kullanılacak karışık mikrobiyal aşı kùltürü için Osmaniye katı atık düzenli depolama sahasından sızıntı suyu alınmıştır. Alınan örnek Şekil 3.2'deki gibi zenginleştirilip çoğaltılmıştır. Çalışmalarda Şekil 3.3'teki karıştırmalı reaktör düzeneği kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Biyohidrojen Üretiminde Kullanılan Aşı Kùltürü



Şekil 3.3. Biyohidrojen Üretiminde kullanılan Reaktör Sistemi

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Mikrobiyal Aşı Kültürü Hazırlanması

Osmaniye düzenli katı atık depolama sahasından alınan çöp sızıntı suyu laboratuvara 5L ağzı kapalı şişelerde getirilmiştir. Anaerobik kabin içinde sızıntı suyu örneklerinden 2L alınarak önce pH'sı 6'ya ayarlanmış ve kaynar su banyosunda üç saat süre ağzı kapalı cam şişede ısıl ön işleme tabi tutulmuştur. Isıl ön işlemeden sonra 37°C sıcaklığa kadar soğumaya bırakılan örnek içerisine 60 g/L glikoz, 10 g/L pepton, 0.6 g/L maya özütü, 0.25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g/L  $K_2HPO_4$ , 1 g/L  $KH_2PO_4$  ve 0.1 g/L l-sistein  $HCl \cdot H_2O$  şeklinde hazırlanan sentetik besin çözeltilisinden 250 mL eklenmiştir (Sağnak ve ark., 2011). Örnek inkübasyona bırakılmadan önce anaerobik kabin içinde %20 karbondioksit, %80 azot gazı karışımından geçirilip 37°C ve 55°C sıcaklıklarda ayrı ayrı inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübatördeki örnekler hergün sabah, öğlen ve akşam olmak üzere günde 3 kez karıştırılmıştır. Mikrobiyal aktivite sonucu oluşan gaz karışımı dereceli silindir ile ölçülmüş ve oluşan gaz numunesinde hidrojen üretimi olup olmadığı kontrol edilmiştir. İnkübatörde 37 derece sıcaklıkta 3. günde gaz oluşumu gözlenmiş ve analizde % 45 hidrojen ölçülmüştür. Termofilik inkübasyonda 55°C sıcaklıkta üreme ve gaz oluşumu 6 gün boyunca belirlenmemiştir.

Çalışmalarda kullanılmak üzere 37°C'deki kültür sentetik besiyeri ile çalışma süresi boyunca beslenerek muhafaza edilmiş ve çalışmalarda 20L'lik karıştırılmalı reaktöre 1L aşı kültürü ve 1L sentetik besi ortamı ilave edilerek kültürün gelişmesi sağlandıktan sonra deneylerde kullanılmıştır.

### **3.2.2. *Miscanthus giganteus* Kimyasal ve Enzimatik Hidrolizi**

Asidik ön işlem çalışmaları otoklav kullanılarak 121°C ve 135°C sıcaklıkta biyokütle yoğunluğu %10 kuru ağırlık olacak şekilde otoklavda 60 dakika süreyle %0,5 ve %1 sülfürik asit konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Otoklavdan çıkarılıp soğumaya bırakılan örnekler Şekil 3.4'de görülmektedir. Enzimatik hidroliz çalışmalarında Şekil 3.5'deki asit, alkali ve ısı ile ön işleme tabi tutulan ve yıkanıp kurutulan örneklerden 50g *Miscanthus* örneği kullanılmıştır. Hidrolizatların pH'ları 6'ya ayarlanarak enzimatik ön hidrolize alınmıştır.



Şekil 3.4. Otoklavda Hidrolize Edilen *Miscanthus giganteus* Örneklerinin Kimyasal Hidrolizi



Şekil 3.5. Hidrolize Edilen *Miscanthus giganteus* Örneklerinin Kimyasal Hidrolizi

Alkali ön işlem çalışmaları otoklav kullanılarak 121°C ve 135°C sıcaklıkta biyokütle yoğunluğu % 10 kuru ağırlık olacak şekilde otoklavda 60 dakika süre ile NaOH konsantrasyonu % 0,5 ve % 1 olarak çalışılmıştır. Hidrolizatların pH'ları 6'ya ayarlanarak enzimatik ön hidrolize alınmıştır.

Kimyasal ön hidroliz çalışmalarında kontrol olarak asit ve alkali çözelti kullanmadan 121°C ve 135°C sıcaklıkta biyokütle yoğunluğu % 10 kuru ağırlık olacak şekilde otoklavda 60 dakika süre ile sulu fazda ısı ön işlemler gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatların pH'ları 6'ya ayarlanarak enzimatik ön hidrolize alınmıştır.

Enzimatik hidroliz Viscamyl flow enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Viscamyl Flow 132 FPU/g filtre kağıdı selulaz aktivitesine sahiptir (Genencore, USA). Hidrolizasyondan çıkan numuneler filtreden geçirilip katı-sıvı faz ayrıldıktan sonra katı faz 2 kez çeşme suyu ile yıkanmış ve 105°C 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Sabit ağırlığa kadar kuruyan örneklerden enzimatik hidroliz için 50g alınarak sitrik asit ile pH'sı 6 ayarlanan çözeltiye (%10 kuru madde) substrat enzim karışımı 30 FPU/g olacak şekilde enzim eklenmiştir. Hazırlanan karışım ağzı kapalı şişelerde 55°C sıcaklıkta su banyosunda 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Her gün 1 ml numune alınarak DNS ile indirgen şeker tayini yapılmıştır. 3 gün sonunda örnekler vakum filtrasyonu ile whatman GF/C cam filtre kullanılarak filtre edilmiştir. Sıvı kısım +4°C'de biyohidrojen üretiminde reaktöre besleme yapmak ve analizlerde kullanmak üzere saklanmıştır.

### 3.2.3. Gaz Analizi

Çalışmalarda üretilen gaz içeriğinin analizi için MRU vario plus gaz analizörü kullanılmıştır. Hidrojen ölçümleri termal iletkenlik dedektörü (TCD), karbondioksit ölçümleri infrared dedektörle yapılmıştır.

### 3.2.4. *Miscanthus giganteus*'un Selüloz, Hemiselüloz ve Lignin Analizi

Örneklerin selüloz, hemiselüloz ve lignin analizi Vansoset ve ark. (1991) yöntemine göre yapılmıştır. 0,5mm'ye kadar öğütülmüş örneklerin analizleri yöntemde belirtilen aşamalar takip edilerek Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde bulunan Ankom Fiber Analiz Cihazı (A 220-A 2000) kullanılarak yapılmıştır.

### 3.2.5. DNS Yöntemi ile İndirgen Şeker Tayini

Hidrolize ürünlerin toplam indirgen şeker analizi Miller'in DNS yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Miller, 1959).

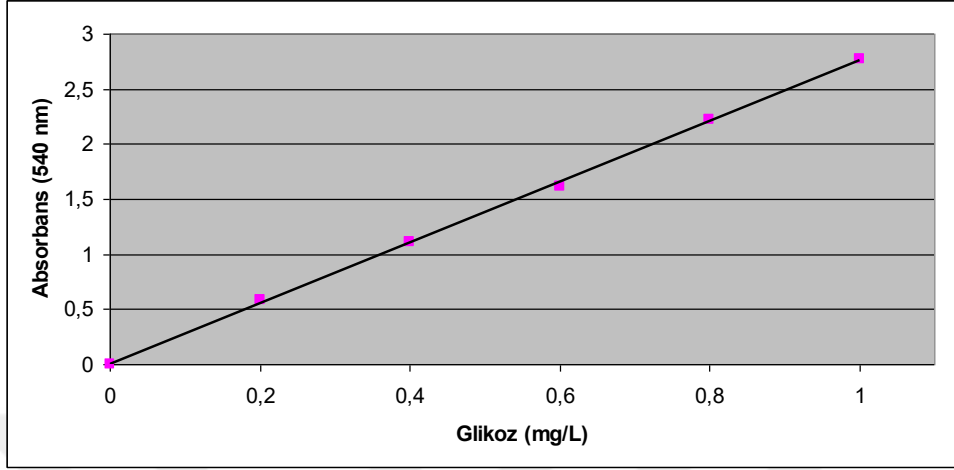
DNS çözeltisinin hazırlanışı; 1g DNS, 50 mL 2M NaOH çözeltisinde çözülüp, üzerine 30 g sodyum potasyum eklenmiştir. Çözeltinin hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Sitrat tamponu; 0.05M sitrat tamponu hazırlamak için 210g sitrik asit 750 mL saf su içinde çözülür, çözeltinin pH'sı NaOH ile 4.3'e ayarlandıktan sonra çözelti hacmi son hacmi 1L tamamlanarak hazırlanmıştır.

### 3.2.6. Hidroliz Ürünlerde Şeker Tayini

Temiz bir tüpe alınan 1mL hidrolizat üzerine 3mL DNS çözeltisi eklendikten sonra kaynayan sıcak su banyosunda 5 dakika bekletilmiş ve oda sıcaklığında soğutulmuştur. Daha sonra saf su ile seyreltme yapılarak spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı okumalar yapılmıştır. Köre olarak saf su ve DNS çözeltisi kullanılmıştır.

İndirgen şeker tayini için glikoz kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.6). Eğrinin regresyon analizinde  $y=2.7569+0.0048x$  denklemi,  $R^2$  sonucu 0.9995 olarak belirlenmiştir. Çalışmalarda hidroliz sonucu açığa çıkan indirgen şeker oranları bu denklemden hesaplanarak belirlenmiştir.



Şekil 3.6. DNS Glukoz Standart Eğrisi

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. Anaerobik Reaktör ve Aşı Kültürü

Mikrobiyal hidrojen üretiminde karışık kültür kullanımı saf kültür kullanılarak yapılan çalışmalara göre daha uygulanabilir ve daha stabildir. Karışık kültür ortamlarının avantajları, çalıştırma ve kontrol kolaylığı ve çok farklı substrat madde kullanım olanağının olmasıdır. Saf kültür kullanımı ile daha yüksek verimde biyohidrojen üretimi yapılabilmesine rağmen, saf kültürün endüstriyel olarak uygulanması, kontamine olmadan korunması oldukça zordur (Wang ve Jin, 2009).

Karışık kültür kullanımında metanojen, asetojen ve sülfat indirgeyen bakterin ortamdaki uzaklaştırılması için hazırlanan aşı kültürlerine ısıl şok, asidik veya alkali ön işlem, havalandırma, kloroform, sodyum 2-bromoethanesulfonate gibi çeşitli kimyasal maddeler kullanmak gerekmektedir (Sinha ve Pandey, 2011).

Bu çalışmada, Osmaniye düzenli katı atık depolama sahasından alınan çöp sızıntı suyu kaynar su banyosu içerisinde ön işleme alınarak ortamdaki hidrojeni kullanarak metan üreten metanojen bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Hazırlanan aşı kültüründe 37°C sıcaklıkta üreme gözlenirken, 55°C sıcaklıkta üreme gözlenmemiştir. 37°C sıcaklıkta üreyen bakteriler üçüncü günde toplamda 280 mL gaz oluşturmuştur. Yapılan analizde oluşan gaz içeriği % 45 hidrojen % 53 karbondioksitten oluşmaktadır. Oluşan biyohidrojen miktarı sentetik besi ortamı ile yapılan besleme ile beşinci günde % 55 hidrojen, % 44 karbondioksit'e kadar yükselmiştir.

Biyohidrojen üretiminde aşı olarak karışık kültür kullanıldığında, biyoreaktör içindeki baskın türler sıcaklık, pH, substrat, aşı tipi, aşı ön işlem uygulamalarına ve çalışma koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Genç, 2010). Aşı kültürü ısıl ön işlemler ile değişebileceği gibi fermentasyonun çalışmasına

bağlı olarak mikrobiyal popülasyonda değişimler olmaktadır. Iyer ve ark. (2004) hidrojen üretiminde biyolojik hidrojen üretiminde 30 saatlik alıkonma süresinde mikrobiyal popülasyonun *Bacillaceae* ve *Enterobacteriaceae* içerdiğini, bu sürenin 10 saate düşmesi ile *Clostridium*'ların ortamda baskın tür olduğunu belirlenmiştir. 10 saatlik alıkonma zamanında sıcaklığın 30°C'den 37°C'ye yükseltilmesi ile ortamda *C. acetobutylicum*'a doğru değiştiği belirtilmiştir.

#### 4.1. Biyokütle Hidrolizinde Fiziko Kimyasal Ön İşlemler

Selüloz ve hemiselülözün hidroliz ürünleri polimerik yapıyı oluşturan beş karbonlu ve altı karbonlu şekerlerdir. Lignoselülozik biyokütleden şekerler ve türevlerinin farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemler ile üretilmesi, sanayide biyolojik temelli metan, biyohidrojen, etanol ve bütanol gibi enerji ürünlerinin üretiminde kullanılabilen önemli karbon kaynaklarıdır.

Kimyasal hidroliz ürünlerinin üretilmesinde kullanılan ısı işlem, asitler, bazlar ve alkoller oluşan üründe birçok ara ürün meydana getirmektedir. Bu ara ürünler biyolojik fermentasyonda fermentasyonun verimini düşürebilecek ve bazende fermentasyonun yolunu değiştirerek farklı ürünlerin oluşmasına neden olacak inhibitörlerdir. Bu nedenle hidrolizasyon çalışmalarında inhibitör maddelerin oluşmaması veya oluşan inhibitörlerin ortamdan uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Lignoselülozik ürünlerden şeker ve türevlerinin üretilmesinde kimyasal ön işlemlerden sonra enzimatik hidrolizin yapılması, hammaddelerin uzun süre kimyasal ve ısı işlemine maruz kalmaması oldukça önemli bir konudur (Gandla ve ark., 2018).

Bu çalışmada hiçbir işleme maruz bırakılmadan tarladan toplanarak laboratuvara getirilen *Miscanthus* örneklerinin selüloz oranı %43,7, hemiselüloz oranı %22, lignin oranı %9,7, kül oranı ise %16,44 olarak belirlenmiştir. *Miscanthus giganteus*'un hidrolizasyonu üzerine farklı sıcaklık, süre, sülfürik asit ve sodyum hidroksit konsantrasyonlarının (%0,5 ve %1) etkisi belirlenmiştir. Ön

hidroliz işlemlerine tabi tutulan örnekler daha sonra enzimatik hidrolizasyona alınarak lignoselülozik indirgen şeker üretimi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1’de asidik ön hidroliz sonuçları verilmiştir. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi ön işlem sırasında kimyasal kullanılmayan örneklerde sadece sulu çözeltinin sıcaklık ile muamelesi sonucunda selüloz oranı %43,7’den %49,8’e yükselmiş ancak hemiselüloz ve lignin oranında büyük farklar olmamıştır. Asidik ve alkali ön işlemlerde selüloz oranında artış gözlenirken hemiselüloz oranları düşüş gözlenmiştir. Lignin oranı ise asidik uygulamada artarken alkali uygulamada düşmüştür.

Çizelge 4.1. *Miscanthus Giganteus* Ön İşlem Öncesi ve Sonrası Selüloz, Hemiselüloz ve Lignin Oranları

İşlemler	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin
Ön işlem yapılmamış örnek	43,7	22	9,7
% 0.1 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (135°C, 60 dakika)	54,5	7,8	13,5
%1 NaOH (135°C, 60 dakika)	53,7	4,3	6,7
Su (135°C 60 dakika)	49,8	23,5	11,4

Ön hidroliz çalışmaları üzerine sıcaklığın etkisi 121 ve 135°C sıcaklıklarda otoklavda, asit konsantrasyonunun etkisi %0,5 ve %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak, %10 katı biyokütle oranında gerçekleştirilmiştir. 50 gr numune kullanılarak yapılan çalışmalarda, 121°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları %0,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda 6,27 g, %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda 7,16 g olarak, 135°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları %0,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda 6,88 g, %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda 8,03 g olarak DNS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Numuneler filtreden geçirilip katı-sıvı faz ayrıldıktan sonra katı fazdan enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz çalışmalarında 135°C sıcaklıkta hidroliz edilen ürünler kullanılmıştır. 135°C sıcaklıkta asidik ön

işlemden sonra enzimatik hidroliz ile elde edilen toplam indirgen şeker oranları % 0,5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda enzimatik hidroliz sonucunda 22,43 g indirgen şeker, % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda ön hidrolize olan örnek için enzimatik hidroliz sonucunda 27,43 g olarak belirlenmiştir.

Alkali ön hidroliz çalışmaları üzerine sıcaklığın etkisi 121 ve 135°C sıcaklıkta otoklavda %0,5 ve % 1 NaOH konsantrasyonlarında, % 10 katı biyokütle (50 g) oranında gerçekleştirilmiştir. 121°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları % 0,5 NaOH konsantrasyonunda 2,55 g, % 1 NaOH konsantrasyonunda 5,90 g olarak, 135°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları % 0,5 NaOH konsantrasyonunda 4,01g ve % 1 NaOH konsantrasyonunda 6,23 g olarak belirlenmiştir.

Numuneler filtreden geçirilip enzimatik ön işleme alındığında 135°C sıcaklıkta alkali ön işlemden sonra enzimatik hidroliz ile elde edilen toplam indirgen şeker oranları % 0,5 NaOH konsantrasyonunda ön hidrolize olan örnek için 16,44 g ve % 1 NaOH konsantrasyonunda ön hidrolize olan örnek için 18,67 g olarak belirlenmiştir.

Kimyasal kullanılmadan yapılan ön hidroliz çalışmalarında 121°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları 1,34g ve 135°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları 2,06g olarak belirlenmiştir. Numuneler enzimatik ön işleme alındığında elde edilen indirgen şeker oranları 121°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile ön hidrolize olan örnek için 6.41 g ve 135°C sıcaklıkta 60 dakika süre ile sıvı faza geçen şeker oranları 9,36 g olarak belirlenmiştir.

Kimyasal kullanılmadan yapılan hidroliz işlemlerine göre asidik ön işlemde 121°C sıcaklıkta %1 asit konsantrasyonunda %12, 135°C sıcaklıkta ise %14 daha fazla indirgen şeker sıvı faza geçmiştir. % 1 asit konsantrasyonunda 121°C sıcaklıkta açığa çıkan şeker oranında sıcaklık 135°C'ye çıktığında sıvı faza geçen indirgen şeker oranında %10,8 artış olduğu belirlenmiştir. Ön hidroliz çalışmalarında en yüksek şeker verimi % 1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 135°C sıcaklıkta 60 dakika

ön işlem ve bunu takip eden enzimatik hidroliz ile elde edilmiştir. 135°C sıcaklıkta asidik ön işlemi takip eden enzimatik işlem sonucunda açığa çıkan toplam indirgen şeker oranı 27,43 g olarak belirlenmiştir. Alkali ön işlem çalışmalarında % 1 NaOH ile 135°C sıcaklıkta 60 dakika ön işlem ile 18,67 g indirgen elde edilmiştir. Bu oran asidik ön işlem ile karşılaştırıldığında % 32 daha düşük bir oran olduğu görülmektedir. Asidik veya alkali ön işlemlerde kimyasal konsantrasyonu, biyokütle ile sıcaklık etki süresi önemli bir parametre olduğu bu çalışmada optimum hidroliz şartları %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, % 10 biyokütle konsantrasyonu ve 60 dakika etki süresi olarak belirlenmiştir.

De Vrije ve ark. (2009) *Miscanthus* bazik ön işlemlerle 70°C sıcaklıkta hidrolizini gerçekleştirmişler ve % 12 sodyum hidroksit uygulamasının % 77 lignin uzaklaştırdığı, enzimatik hidroliz ile birlikte biyokütlenin %33'ünün monosakkaritlere dönüştürüldüğü belirtilmektedir.

Lignoselülozik biyokütlenin asitle ön işlemi sonrasında mikroorganizmalar tarafından şekere dönüştürme işlemleri daha kolay olmaktadır. Asit hidrolizi, lignin yapısına zarar vermeden, hemiselülozun çözünmesinden ve selülozun basit şekerlere ayrışmasına yardımcı olmaktadır. Ancak asit hidrolizde verim yüksek sıcaklıklarda olmaktadır. Yüksek sıcaklığın bir de dezavantajı olup 110°C'nin üzerindeki sıcaklıklar, furfural ve 5-hidroksimetil furfural gibi toksik bileşiklerin oluşmasına neden olmaktadır (Talebna ve ark., 2010).

Hernandez ve ark. (2013) %1 seyreltik sülfürik asit kullanarak *Moringa oleifera* meyvelerini ön işlemlerden geçirmişler ve en yüksek şeker verimini 160°C sıcaklıkta 20 dakika süreyle ön işleme maruz tutulan örnekten elde etmişlerdir. Bu yüksek sıcaklıkta 4,04 g/L hidroksimetilfurfural oluşumunun yanı sıra formik ve levulinik asitlerde oluşmuştur. *Miscanthus* alkali (NaOH) ve asidik (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) önhidrolizi ve sonrasında yapıdan ligninin uzaklaştırılması için enzimatik işlemlerde Cellic CTec2 enzimi kullanılmıştır. NaOH ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ön işlemlerden

sonra sırası ile % 46,0 ve 32,2 lignin uzaklaştırılmış, enzimatik hidroliz ile % 29,3 ve 47,7 glikoz dönüşümü sağlanmıştır.

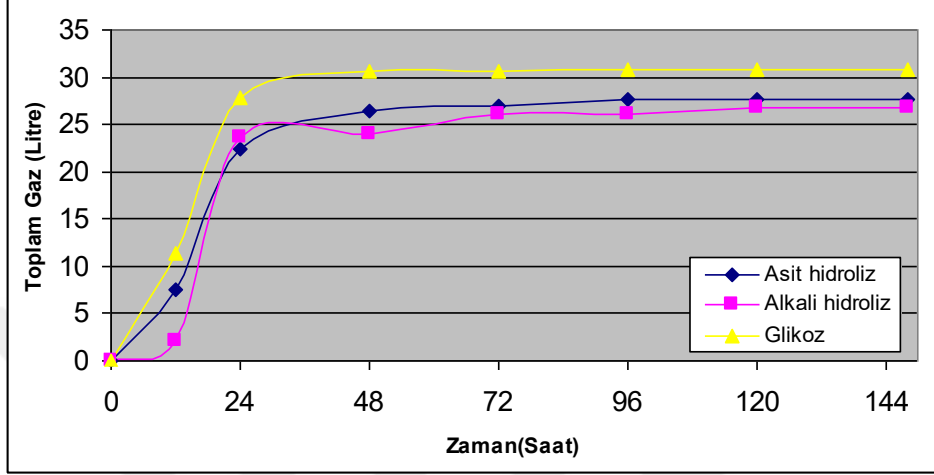
#### 4.2. Biyohidrojen Üretiminde Ön İşlem Tekniklerinin Etkisi

Dark fermentasyonla biyohidrojen üretiminde lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi önemli bir parametredir. Ön işleme tabi tutulmamış biyokütlenin mikrobiyal hidrolizi dark fermentasyonda sınırlayıcı etkiye sahiptir (Monlau ve ark., 2013). Bu nedenle lignoselülozik biyokütle gibi kompleks yapılar fiziksel, kimyasal biyolojik veya bu ön işlemlerin kombinasyonlarından geçirilmelidir (Hendriks ve Zeeman, 2009; Mussoline ve ark., 2012).

Biyohidrojen üretim deneyleri laboratuvar ölçekli sürekli karıştırmalı 20L reaktörde karıştırma hızı 10 devir/dakika olacak şekilde, 37°C sıcaklıkta, batch kültür olarak gerçekleştirilmiştir. Asidik ön hidroliz ve bazik ön hidroliz çalışmalarında elde edilen indirgen şeker oranları karşılaştırıldığında 50 g numuneden asidik ön hidroliz ile çözeltiliye 8,3 g indirgen şeker geçtiği, bazik ön hidrolizde 6,23 g indirgen şeker geçtiği belirlenmiştir. Her iki numune daha sonra enzimatik ön hidrolize alındığında asidik ön hidrolizden sonra 50 g örnek kullanılarak yapılan enzimatik hidrolizle 27,43g indirgen şeker, bazik hidrolizasyon sonucunda yapılan enzimatik hidrolizle 18,67g indirgen şeker elde edilmiştir. Toplam olarak asidik işlemleri takip eden enzimatik hidrolizle 35,73 g indirgen şeker, alkali işlemleri takip eden enzimatik hidrolizle 24,9g indirgen şeker elde edilmiştir.

Lignoselülozik ürünlerin içeriğindeki bazı bileşenler asitte ve bazı bileşenlerde alkali ortamda çözünen maddelerdir. Her bileşenin farklı olması nedeniyle biyohidrojen üretiminde bu yapıların üretime etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için kimyasal ön hidroliz çalışmalarında elde edilen şeker çözeltileri ile enzimatik hidroliz şeker çözeltileri karıştırılmış ve biyohidrojen üretimi için reaktöre besleme yapılmıştır. Çalışmada glikoz standart olarak kullanılmış ve reaktöre toplam 50 g/20L olacak şekilde indirgen şeker beslemesi yapılmıştır. Çalışmada 12. saat, 24, 48, 72, 96, 120 ve 148. saatlerde oluşan gaz miktarları ve

gaz içeriği analiz edilerek kümülatif olarak üretilen toplam gaz miktarları Şekil 4.1’de verilmiştir.



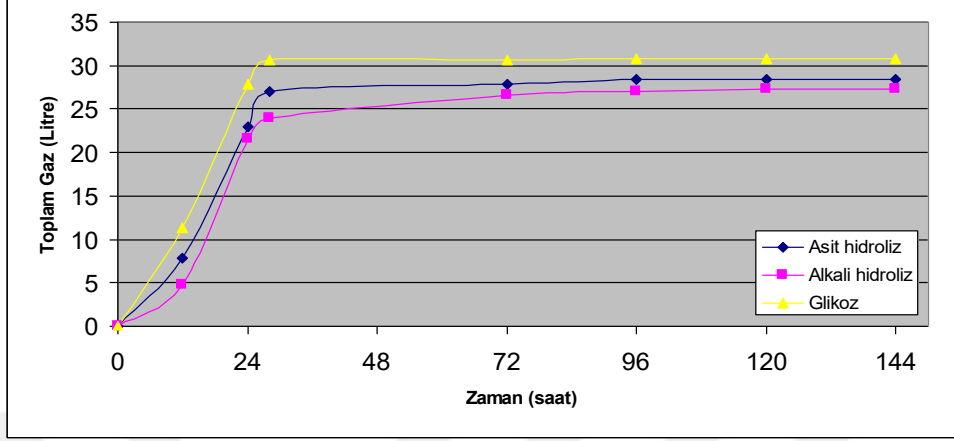
Şekil 4.1. Batch Kültürde Asidik Bazik Ön İşlemlerden Üretilen Biyohidrojen (Başlangıç pH 6.5, Sıcaklık 37°C, İndirgen Şeker Oranı 50 g/Reaktör).

148 saat sonunda asidik ön işleme elde edilen biyohidrojen ve karbondioksit karışımı % 56 Hidrojen ve % 43,6 karbondioksit olarak belirlenmiştir. Üretilen toplam gaz miktarları 27,6L’dir. Alkali ön işlem sonucunda üretilen toplam gazın biyohidrojen ve karbondioksit karışımı %55 Hidrojen ve %44 karbondioksit olarak belirlenmiş ve toplam 26,8L gaz elde edilmiştir. Kontrol amaçlı kullanılan glikoz’dan elde edilen biyohidrojen ve karbondioksit karışımında % 55 Hidrojen ve % 44,2 karbondioksit olup toplam gaz miktarı 30,8L’dir.

Çalışmada standart olarak kullanılan glikozun 50g’dan toplamda 16,94L hidrojen üretilmiştir. Asidik hidroliz ürünleri ile oluşan hidrojen miktarı kullanılan 50g indirgen şeker hidrolizatından 15,45L ve alkali hidroliz ürünleri ile oluşan hidrojen miktarı kullanılan 50g indirgen şeker hidrolizatından 14,74L olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada asidik ve alkali ön hidrolizi takip eden enzimatik hidroliz ürünlerinin toplamından alınan biyohidrojen oranları karşılaştırıldığında

asidik ön hidroliz ile % 4,5 daha fazla biyohidrojen üretimi sağlandığı görülmektedir. Her iki işlemin standart glikozla karşılaştırılması yapıldığında asidik ön işlem hidrolizatından üretilen hidrojen miktarı % 8,8, bazik ön işlemle alınan hidrolizatta % 13 oranında daha düşük biyohidrojen üretimi gerçekleşmiştir. Standart olarak glikoz ile asidik veya alkali hidrolizatların arasındaki farkın hidrolizatların kimyasal işlemleri sırasında açığa çıkan hidroksimetil furfural, asetik asit gibi yan ürünlerden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Bu nedenle aynı çalışma asidik ve alkali ön işlem sonrasında çıkan katı fazın bol su ile yıkanıp daha sonra sadece enzimatik hidrolizi ile yapılarak elde edilmiş şeker çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir. 148 saat sonunda asidik ön işlemle elde edilen biyohidrojen karışımı % 55 Hidrojen, % 44 karbondioksit ve toplam gaz miktarı 28,4L'dir. Alkali ön işlem sonucunda alınan indirgen şekerlerden üretilen biyohidrojen karışımı % 55 Hidrojen, % 44 karbondioksit ve toplam gaz 27,3L'dir. Asidik ve enzimatik hidrolizattan elde edilen hidrojen miktarı 15,90L ve alkali ve enzimatik hidrolizattan elde edilen hidrojen miktarı 15,28L olarak belirlenmiştir. Sadece asidik ve alkali ön işlemi takip eden enzimatik hidrolizat kullanıldığında hidrojen verimi toplam asidik indirgen şeker ürünlerine göre %3 ve bazik indirgen şeker ürünlerine göre %3.5 artış olduğu belirlenmiştir. Hidrolizasyonun biyohidrojen üretiminde etkili olduğu, asidik ve bazik hidrolizatların biyohidrojen üretiminde baskılayıcı ara ürünler içerdiği söylenebilir.



Şekil 4.2. Enzimatik Hidrolizattan Üretilen Kümülatif Biyohidrojen (Başlangıç pH 6.5, Sıcaklık 37°C, İndirgen Şeker Oranı 50 g/Reaktör).

Ön işlemler selülozun parçalanarak yüzey alanının genişlemesi ve lignin hemiselüloz bileşiminden ayrılmasına neden olmaktadır (Saratale ve ark., 2008). Bu yöntemler dark fermentasyonla biyohidrojen üretimini olumlu yönde etkilemektedir. Kongjan ve Angelidaki (2010) 180 °C sıcaklıkta 15 dakika ön işleme alınmış lignoselülozik yapıdan hemiselülozun azalmış, selüloz ve lignin miktarı artmış ancak bunun yanında hidroksimetil furfural oluşumu gözlenmiştir. Lignoselülozik ürünlerde farklı ön işlem uygulamaları çözülmüş şekerler yanı sıra inhibitör etkili birçok yan ürünler meydana getirebilmektedir. Bu nedenle en uygun hidroliz yönteminin seçilmesi oldukça önemlidir (Jönsson ve ark., 2013).

### 4.3. Biyohidrojen Üretimine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık fermentatif hidrojen üretiminde önemli bir parametre olup, mikroorganizmaların metabolik olaylarında, büyümelerinde ve substrat hidroliz aşamalarında etkilidir. Fermentatif hidrojen üretiminde mezofilik, 25-40°C, termofilik 40-60°C ve hipertermofilik sıcaklıklarda çalışmalar yapılmıştır (Sinha ve Pandey, 2011). Teorik olarak glikozdan hidrojen üretimine (4.0 mol-H<sub>2</sub>/mol glikoz) en yakın verim ekstrem termofil bakteriler ile elde edilmiştir (Munro ve

ark., 2009). Termofil bakterilerin enzimleri daha stabil olduğu için ve substrat parçalanmasında ve hidrojen üretiminde termofilik koşullar mezofilik koşullara göre daha etkili olduğu belirtilmektedir (Hafez ve ark., 2012).

Fermentatif biyohidrojen üretiminde mezofilik ortam koşullarında bakteriler selüloz gibi kompleks molekülleri etkili bir şekilde parçalayamamakta (Ngo ve ark., 2012), bu nedenle dışardan selülozu parçalayabilecek bir enzim gerekmektedir. Bununla birlikte *Clostridium* 'lar selülozu parçalayabildiği gibi hidrojen üretimi için gerekli hidrojenaz enzimlerini de içermektedirler (Lin ve ark., 2007; Liu ve ark., 2008). Bu çalışmada aşı kültürü oluşturulurken mezofilik şartlarda biyohidrojen üreten karışık kültür oluşturulmuş ancak 55°C'de 6 gün boyunca gaz oluşumu sağlanamamıştır. Bu nedenle çalışmada mezofilik kültür ve şartlar kullanılmış olup tüm biyohidrojen üretim çalışmaları 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

#### 4.4. Biyohidrojen Üretimine pH'ın Etkisi

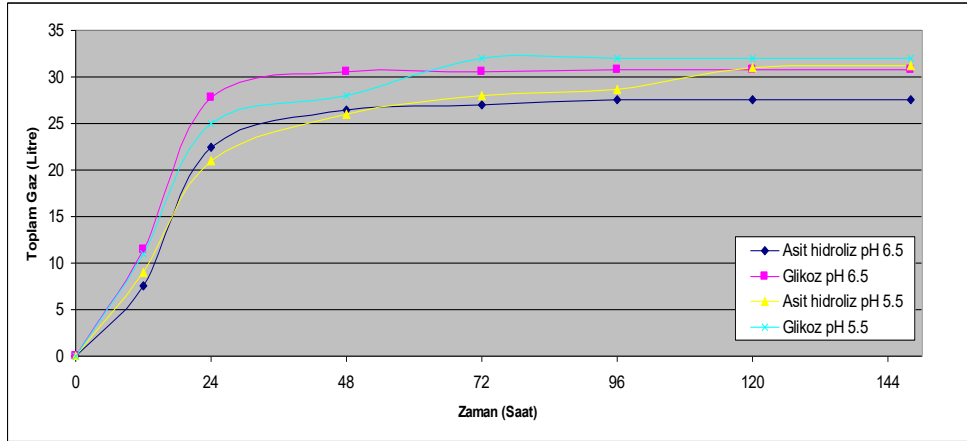
pH mikroorganizmaların üremesi, metabolik aktiviteleri üzerine etkili önemli çevresel parametlerden biridir. Enzimler belirli pH aralıklarında optimum aktivite göstermektedir. Hücre içi ve dışı hidrojen iyon konsantrasyonu mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini etkileyerek substrat son ürün dönüşümü ve metabolik yolda değişmektedir. Özellikle fermentasyon ortamının pH değeri hidrojen üretiminde önemli bir parametredir (Craven 1988). Fermentatif biyo hidrojen üretiminde optimum pH değerinin altında veya üzerinde mikrobiyal hidrojen üretiminde metabolik yol hidrojenik fazdan solventojenik faza doğru değişmektedir. pH fermentasyon ortamındaki mikrobiyal çeşitliliği ve hücre membran yük dengesini etkileyerek fermentasyon yolunu ve son ürün oluşumunu etkilemektedir (Temudo ve ark., 2007).

Bu çalışmada mezofilik dark fermentasyon ile biyohidrojen üretiminde pH'ın etkisinin araştırıldığı denemede, reaktöre bağlı olan pH metre ile sürekli pH ölçümü yapılmış ve mikrobiyal faaliyet sonucunda meydana gelen pH değişimi

kaydedilmiştir. Biyohidrojen üretimi üzerine pH etkisinin belirlendiği bu çalışma başlangıç pH'ı 5.5 ve 6.5 olarak iki farklı pH değeri çalışılarak karşılaştırılmıştır. Çalışmalar 20L reaktörde, 37°C sıcaklıkta, 50 g indirgen şeker/reaktör olacak şekilde ön hidroliz ürünleri ve kontrol olarak glikoz kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen kümülatif gaz miktarları Şekil 4.3'de verilmiştir.

Başlangıç pH'sının 6.5 olduğu denemede 148 saat sonunda asidik ön işleme elde edilen biyohidrojen karışımı %56 Hidrojen, %43,6 karbondioksit ve toplam gaz miktarı 27.6L olarak belirlenmiştir. Kontrol amaçla kullanılan glikoz'dan üretilen biyohidrojen karışımı %55 Hidrojen, %44,2 karbondioksit ve toplam gaz miktarı 30,8L olarak belirlenmiştir.

Başlangıç pH'sının 5.5 olduğu denemede 148 saat sonunda asidik ön işleme elde edilen biyohidrojen karışımının %55 Hidrojen, %44 karbondioksit olduğu ve toplam gaz miktarının 31,2L olarak belirlenmiştir. Kontrol amaçla kullanılan glikoz'dan elde edilen biyohidrojen karışımı %55 Hidrojen, %44 karbondioksit ve toplam gaz miktarı 32L'dir.



Şekil 4.3. Asidik Hidrolizattan Üretilen Kümülatif Biyohidrojen Kontrol Glikoz (Başlangıç pH 5.5 ve 6.5, Sıcaklık 37°C, İndirgen Şeker Oranı 50 g/Reaktör).

Biyohidrojen üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi değerlendirildiğinde, pH'nın 5.5 olduğu çalışmada pH 6.5'e göre hem standart glikozun kullanıldığı kontrol deneyinde hemde *Miscanthus* hidrolizlerinin kullanıldığı çalışmalarda üretilen biyohidrojen miktarlarında artış olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada başlangıç pH'ının 5.5'e ayarlandığında pH 6.5'e göre standart glikozda %3,75, *Miscanthus* hidrolizatının kullanıldığında %11,5'lik bir artış olduğu belirlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda dark fermentasyonda optimum pH değerinin 5.5 olduğunu (Liu ve ark., 2008), batch çalışmalarda biyohidrojen üretiminde optimum pH'ın sukroz kullanılırken 5.5-5.7 olduğu belirtilmektedir (Wang ve ark., 2005). pH bakterilerdeki hidrojenaz enzimlerindeki Fe hidrojenazın aktivitesini düşürmekte bundan dolayı düşük pH değerleri hidrojen üretimini engellemektedir (Kargı ve Özmişci, 2011). Atık sular kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada karıştırmalı reaktörde bira sanayi atıklarından da hidrojen üretiminde optimum pH'sının 5.8 olduğu belirtilmektedir (Lay ve ark., 2005).

Yapılan çalışmalarda maksimum hidrojen verimi için pH 5-6 bulunmuştur. Birçok anaerobik çalışmada başlangıç pH'sı ile yapılan araştırmada biyohidrojen üretim sonunda fermentasyon ortamının pH değeri 4-4.8'lere kadar düştüğü görülmüştür (Kim ve ark., 1999). pH'nın düşmesinin sebebi substrata bağlı olarak oluşan organik asitlerdir. Yapılan çalışmalarda pH 5.8'deki hidrojenaz aktivitesi pH 4.5 değerine göre 2,2 kat daha fazladır (Vazquez ve Varaldo, 2008).

#### **4.5. Biyohidrojen Üretimine Hidrolizat Konsantrasyonunun Etkisi**

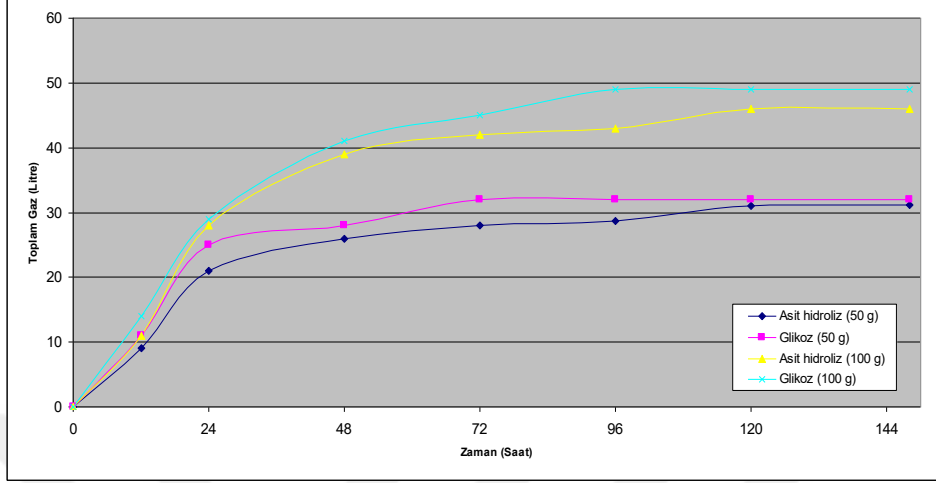
Dark fermentasyonda bugüne kadar birçok araştırmada protein ağırlıklı atıklar, şeker ağırlıklı atıklar, yağ kaynaklı atıklar, basit şekerler gibi birçok farklı substrat çalışmaları yapılmıştır. Lignoselülozik ürünlerden yapılan biyo hidrojen çalışmalarında lignoselülozik ürünlerin kompleks yapılarından dolayı hidrolizasyonla açığa çıkan glikoz, ksiloz, fruktoz, arabinoz, mannozlar, sukroz,

maltoz vs. ürünler kullanılmaktadır. Fermentatif biyohidrojen üretiminde sadece kullanılan substratın değil substratın konsantrasyonunda etkisi vardır.

Biyohidrojen üretimi üzerine hidrolizat konsantrasyonunun etkisi 37°C sıcaklıkta, batch kültür olarak gerçekleştirilmiştir. Hidrolizat konsantrasyonunun etkisi 50 ve 100 g indirgen şeker/reaktör olarak, başlangıç pH değeri 5.5 olarak çalışılmıştır. Kontrol olarak glikoz kullanılmıştır. Çalışmada 12. saat, 24, 48, 72, 96, 120 ve 148. saatlerde oluşan gaz miktarları ve gaz içeriği analiz edilerek, kümülatif üretilen toplam gaz miktarları Şekil 4.4'de verilmiştir.

Hidrolizat konsantrasyonunun 50 g olduğu denemede 148 saat sonunda asidik ön işleme elde edilen biyohidrojen ve karbondioksit karışımı %55 Hidrojen ve %44 karbondioksit'ten ve üretilen toplam gaz miktarı 31,2L olarak belirlenmiştir. Kontrol amaçla kullanılan glikoz'dan elde edilen biyohidrojen ve karbondioksit karışımının içeriği %55 Hidrojen ve %44 karbondioksitten, üretilen toplam gaz miktarı 32L'dir.

Hidrolizat konsantrasyonunun 100 g olduğu çalışmada 148 saat sonunda asidik ön işleme elde edilen biyohidrojen ve karbondioksit karışımının içeriği %55 Hidrojen ve %44 karbondioksit olup, üretilen toplam gaz miktarı 46L'dir. Kontrol amaçla kullanılan glikoz'dan edile edilen biyohidrojen ve karbondioksit karışımının içeriği % 55 Hidrojen ve % 44 karbondioksit olup, üretilen toplam gaz miktarı 49 L'dir. Substrat konsantrasyonunun artışı üretilen gaz miktarını arttırmış ancak birim substrat başına düşen gaz miktarında azalma olduğu görülmektedir. 50g substrattan 100 g substrata çıkıldığında üretilen gaz miktarları yüzdesel olarak değerlendirildiğinde *Miscanthus* hidrolizati kullanıldığında %16.4, kontrol amaçla glikoz kullanıldığında %15 azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Hidrolizat Konsantrasyonunun Etkisi ve Kümülatif Hidrojen Üretimi Kontrol Glukoz (Başlangıç pH 5.5, Sıcaklık 37 °C, İndirgen Şeker Oranı 50-100 g/Reaktör).

Yüksek substrat konsantrasyonlarında mikrobiyal faaliyetle yüksek asit üretimi olmakta ve bu durum hücrelerin lizi olup ölmesine neden olabileceği gibi biyohidrojen üretimi yerine metabolik aktiviteyi solventojenik faza yönlendirmektedir. Fermentasyon sırasında oluşan asetat, bütirat gibi yan ürünler mikrobiyal aktiviteyi inhibe etmektedir. Bütirik asidin fermentasyon ortamında miktarının artması saf kültür *Clostridium butyricum*'un ve karışık kültürde diğer bakteriyel aktiviteyi inhibe ettiği belirtilmektedir (Heyndrickx ve ark., 1987; Van den Heuvel ve ark., 1988).

De Vrije ve ark. (2009) enzimatik *Miscanthus* hidrolizatı ile yaptıkları çalışmada *C. saccharolyticus* ve *T. neapolitana* kullanarak termofilik hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Optimum şeker konsantrasyonunun 17g/L olduğunu belirtmişlerdir.

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

- Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılması hem çevreci bir uygulama olup hemde kısa bir zaman sonra tükenecek fosil yakıtların yerini alabilecek ekonomik bir uygulamadır. Ancak yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılması sadece yeterli olmayıp bu kaynakların sürdürülebilir olmasında üzerinde durulması gerek önemli konulardandır. Bu nedenle gıda amaçlı olarak kullanılmayan enerji bitkilerinin tarıma uygun olmayan alanlarda yetiştirilmesi uygun olacaktır.
- Bu çalışmada lignoselülozik biyokütleden dark fermentasyonla biyohidrojen üretiminde *Miscanthus giganteus* kullanılmıştır. Çalışmada lignoselülozik biyokütle, fizikokimyasal ve enzimatik ön işlemlerden sonra biyohidrojen üretiminde kullanılmıştır.
- Biyokütlenin hidroliz çalışmalarında asidik ve alkali ön işlemlerden %1 sülfürik asit konsantrasyonunda, otoklavda yapılan ısıl ön işlem denemelerinde 135°C sıcaklıkta daha iyi sonuç alınmıştır. Fizikokimyasal ön işlemlerden sonra yapılan enzimatik hidroliz çalışmalarında %1 sülfürik asit ve 135°C sıcaklıkta 60 dakika ön işleme tabi tutulmuş örneklerde yüksek verim elde edilmiştir.
- Dark fermentasyonla biyohidrojen üretimine optimum pH 5.5, substart konsantrasyonu 50 g/20 L reaktör olarak belirlenmiş, bu şartlarda üretilen gazın içeriği %55 hidrojen ve %44 karbondioksit ve kümülatif gaz miktarının 31,2 L olduğu belirlenmiştir.
- Mevcut çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, lignoselülozik ürünlerden fizikokimyasal ve biyolojik ön işlemlerden sonra yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyohidrojen üretiminin yapılabileceği görülmektedir.

- Hidrojen üretim yöntemlerinden olan biyolojik hidrojen üretimi ve bunun bir alt uygulaması olan karanlık fermantasyonla hidrojen üretimi, enerji verimliliği ve temiz enerji üretimi açısından avantajlı görünmektedir.
- Sonuç olarak;
  - Fizikokimyasal yöntemlerle biyokütle hidrolizasyonuna enzimatik biyolojik yöntemlerin eklenmesi,
  - Biyohidrojen üretiminde mezofilik yöntemlerin kullanılması,
  - Lignoselülozik atık ürünlerinde bu amaçla kullanılması,
  - Hidrojenin yaygın bir yakıt olarak kullanılması için çalışmalar yapılması gelecek ve çevre için büyük önem arz etmektedir.
- Dark fermentasyonla biyohidrojen üretimini etkileyen birçok parametre olmasından dolayı yapılacak çalışmalarda bu parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.
- Yakın gelecekte dark fermentasyon ile biyohidrojen üretimi yapabilen endsütriyel sistemlerin kurulması ve optimizasyon çalışmalarının bu sistemlerde gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Armaroli, N., Balzani, V., 2011. The Hydrogen Issue. *ChemSusChem*, 4(1), 21-36.
- Armor, J.N., 2005. Catalysis and the Hydrogen Economy. *Catalysis Letters*, 101(3-4), 131-135.
- Azbar, N., Levin, D. 2012. State of the Art And Progress in Production of Biohydrogen. Bentham Science Publishers.
- Balat, M., 2010. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.
- Becerra, M.G., Muro, M.M., Garcia, L.A., Juarez, O.A., 2019. Biohydrogen Production From Tequila Vinasses: Effect of Detoxification With Activated Charcoal On Dark Fermentation Performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44, 31860-31872.
- Beguin, P., Aubert, J.P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Reviews*, 13, 25-58.
- Bhat, M.K., Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15, 583-620.
- Carmo, M., Fritz, D. L., Mergel, J., Stolten, D., 2013. A Comprehensive Review on PEM Water Electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4901-4934.
- Chenlin, L., Fang, H., 2007. Fermentative Hydrogen Production From Wastewater ve Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science ve Technology*, 37, 1-39.
- Craven, S.E., 1988. Increased Sporulation of *Clostridium perfringens* in a Medium Prepared with the Prereduced Anaerobically Sterilized Technique or With Carbon-Dioxide or Carbonate. *Journal of Food Protection*, 51(9), 700-706.

- Das, D., Veziroglu, T.N., 2008. Advances in Biological Hydrogen Production Processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046-6057.
- De Vrije, T., Bakker, R., Budde, M., Lai, M., Mars, A., Claassen, P.A.M., 2009. Efficient Hydrogen Production From The Lignocellulosic Energy Crop *Miscanthus* by The Extreme Thermophilic Bacteria *Caldicellulosiruptor Saccharolyticus* And *Thermotoga Neapolitana*. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 12-27.
- Demirbas, A., 2001. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 42(11), 1357-1378.
- Dong, G.X., Wu, B.R., Zhu, L., Du, J. 2007. Microstructure and Electrochemical Properties of Low-Temperature Hydrogen Storage Alloy Used in Ni/MH Batteries. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 17, 941-944.
- Dow, K., Downing, T., 2006. *The Atlas of Climate Change: Mapping The World's Greatest Challenge*. Los Angeles: University of California Press.
- Gandla, M.L. Martin, C., Jönsson, L.J., 2018. Analytical Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Conversion to Biofuels and Bio-Based Chemicals. *Energies*, 11.
- Gardner, K.H., Blackwell, J., 2004. The structure of native cellulose. *Biopolymers*, 13, 1975- 2001.
- Genç, N., 2010. Fermentatif biyohidrojen üretim proseslerinde hidrojen veriminin geliştirilmesindeki yaklaşımlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları*, 26(3), 225-239.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A Review On Dark Fermentative Biohydrogen Production From Organic Biomass: Process Parameters and Use of by Products. *Applied Energy*, 144, 73–95.

- Greef, J.M., Deuter, M., 1993. Syntaxonomy of *Miscanthus giganteus*, *Angewandte Botanik*, 67, 87-90.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J.P., 2010. Hydrogen Production From Agricultural Waste By Dark Fermentation: A Review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10660–73.
- Hafez, H., Nakhla, G., El Naggar, H., 2012. Biological Hydrogen Production. In: Sherif SA, editor. *Handbook of hydrogen energy*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable Fermentative Hydrogen Production: Challenges For Process Optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347.
- Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–8.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2008. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10–18.
- Hernaandez, E. Garcia, A., Lopez, M., Puls, J., Parajo, J.C., Martiin, C., 2013. Dilutesulphuricacidpretreatmentand enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* empty pods. *Industrial Crops and Products*, 44, 227–231.
- Heyndrickx, M., De Vos, P., Thibau, B., Stevens, P., De Ley, J., 1987. Effect of Various External Factors on the Fermentative Production of Hydrogen Gas from Glucose by *Clostridium butyricum* Strains in Batch Culture System. *Applied Microbiology*, 9, 163-168.
- Hosseini, S.A., Shah, N., 2009. Multiscale modelling of hydrothermal biomass pretreatment for ship size optimization. *Bioresource Technology*, 100, 2621-2628.
- Jagtap, S., Rao, M., 2005. Purification and properties of a low molecular weight 1,4-beta-d-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl

- cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 329, 111-116.
- Jones, M.B., Walsh, M., 2007. Miscanthus, for energy and fibre, Earthscan UK, 192p.
- Jönsson, L. J., Aliksson, B., Nilvebrant, N.O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. Biotechnology for Biofuels, 6(1), 16.
- Iyer, P., Bruns, M.A., Zhang, H., Van Ginkel, S., Logan, B.E., 2004. H<sub>2</sub>-Producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. Applied Microbiology and Biotechnology, 66(2), 166-73.
- Kargı, F., Ozmiğçı, S., 2011. Dark Fermentative Bio-hydrogen Production from Waste Wheat Starch Using Co-culture with Periodic Feeding: Effects of Substrate Loading Rate. International Journal of Hydrogen Energy, 36, 7089-7093.
- Khanna, N, Kotay S.M., Gilbert, J.J., Das, D., 2011. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. Journal of Biotechnology, 152(1-2), 9-15.
- Khullar E., Dien B., Kent, R., Tumbleson, M., Singh, V., 2013. Effect of Particle Size on Enzymatic Hydrolysis of Pretreated *Miscanthus*. Industrial Crops and Products, 44, 11–17.
- Kim, M., Moon, K., Lee, I., Lee, T., Sung, C. 1999. Hydrogen gas production by fermentation from sugars using *Clostridium butyricum* NCIB 9576. Korean Society for Applied Microbiology, 27, 62–69.
- Kim, Y. D. Yang, C.W., Kim, B.J., Kim, K.S., Lee, J.W., Moon, J.H., Yang, W., Yu, T.U., Lee, U.D., 2013. Air-blown gasification of woody biomass in a bubbling fluidized bed gasifier. Applied Energy, 112, 414-420.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, HP., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material A. Bohn, Polymer Science, 44, 3358-3393.

- Kongjan, P., Angelidaki, I., 2010. Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: Effect of reactor configuration. *Bioresource Technology*, 101, 7789–7796.
- Lay, J., 2000. Modeling and Optimization of Anaerobic Digested Sludge Converting Starch to Hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 267–78.
- Lay, J.J., Tsai, C.J., Huang, C.C., Chang, J.J., Chou, C.H., Fan, K.S., Chang, J.I., Hsu, P.C., 2005. Influence of pH and Hydraulic Retention Time on Anaerobes Converting Beer Processing Wastes. *Water Science and Technology*, 52, 123-129.
- Leung, D., Leung, M., Sumathy, K., Ni, D. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*, 87, 451-472.
- Li, W., Cheng, C., Cao, G., Ren N., 2020. Enhanced Biohydrogen Production From Sugarcane Molasses by adding *Ginkgo biloba* leaves. *Bioresource Technology*, 298, 122523.
- Lin, P., Whang, L., Wu, Y., Ren, W., Hsiao, C., Li, S., 2007. Biological Hydrogen Production of The Genus *Clostridium* Metabolic Study and Mathematical Model Simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 1728-1735.
- Liu, Y., Yu, P., Song, X., Qu, Y., 2008. Hydrogen Production from Cellulose by Co Culture of *Clostridium Thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium Thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2927-2933.
- Macaskie L.E., Paterson Beedle M., Creamer, N.J., Humphries, A.C., Mikheenko, I.P., Mikheenko, P.M., Penfold, D.W., Yong, P., 2005. Applications of Bacterial Hydrogenases in Waste Decontamination, Manufacture of Novel Bionanocatalysts and in Sustainable Energy. *Biochemical Society Transactions*, 33, 76-9.

- Mars, A.E., 2010. Biohydrogen Production from Untreated and Hydrolyzed Potato Steam Peels by The Extreme Thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. International Journal of Hydrogen Energy, 35, 7730-7737.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.
- Mills, D.M.M.A., 2009. Climate Change, Extreme Weather Events, and U.S. Health Impacts: What Can We Say. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 51 (1), 26-32.
- Mirza, S.S. Qazi, J. Liang, Y., Chen, S., 2019. Growth Characteristics and Photofermentative Biohydrogen Production Potential of Purple Non Sulfur Bacteria From Sugar Cane Bagasse. Fuel, 255, 115805
- Monlau, F., Trably, E., Barakat, A., Steyer, J., 2013. Two-Stage alkaline – Enzymatic Pretreatments To Enhance Biohydrogen Production from Sun flower Stalks. Environmental Science and Technology, 47, 12591-12599
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 96, 673– 686.
- Munro, S.A., Zinder, S.H., Walker, L.P., 2009. The Fermentation Stoichiometry of *Thermotoga neapolitana* and Influence Of Temperature, Oxygen, and pH on Hydrogen Production. Biotechnol Progress, 25, 1035-1042.
- Mussoline, W., Giovanni, E., Giordano, A., Lens, P., 2012. The Anaerobic Digestion of Rice Straw- A Review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 43(9), 895–915.
- Ngo, T., A., Nguyen., T., H., Bui, H.T.V., 2012. Thermophilic Fermentative Hydrogen Production From Xylose by *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. Renew Energy, 37, 174-179.
- Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Reungsang, A., 2008. Biohydrogen Production From the Fermentation of Sugarcane Bagasse Hydrolysate by

- Clostridium butyricum*, International Journal of Hydrogen Energy, 33, 5256–5265.
- Phowan, P., Reungsang, A., Danvirutai, P., 2010. Biohydrogen Production from Cassava Pulp Hydrolyzate Using Co-culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*, International Journal of Biotechnology, 9(3), 348-354.
- Plangklang, P., Reungsang, A., Pattra, S., 2012. Enhanced Bio-Hydrogen Production From Sugarcane Juice By Immobilized *Clostridium butyricum* On Sugarcane Bagasse, International Journal of Hydrogen Energy, 37, 15525-15532.
- Rahman S.N.A., Masdar M.S., Rosli M.I., Majlan, E.H., Husaini T, Kamarudin, S.K., Daud. W.R.W., 2016. Overview Biohydrogen Technologies and Application in Fuel Cell Technology. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 66, 137-162.
- Ramachveran, R., Menon, R. K., 1998. An Overview of Industrial Uses of Hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy, 23, 593–598.
- Redwood, M.D., Paterson Beedle, M., Lynne E. Macaskie, 2008. Integrating Dark and Light Biohydrogen Production Strategies: Towards The Hydrogen Economy. Reviews Environmental Science Biotechnology, 8, 149-185.
- Ren Y., Liu Z.J.W., Ren, Y., Li, G., 2009. Hydrogen Production From The Monomeric Sugars Hydrolyzed From Hemicellulose by *Enterobacter aerogenes*. Renewable Energy, 34, 2774-2779.
- Sagnak R., Kargi F., Kapdan, I.K., 2011. Biohydrogen Production From Acid Hydrolyzed Waste Ground Wheat By Dark Fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, 36, 12803-12809.
- Saratale, G.D., Chen, S., Lo, Y., Saratale, R.G., Chang, J., 2008. Outlook of Biohydrogen Production from Lignocellulosic Feedstock Using Dark Fermentation – A Review, Journal of Scientific & Industrial Research, 67, 962–979.

- Scragg, A. H., 2009. Gaseous Biofuels. In: *Biofuels: Production, Application and Development*. Wallingford, Oxon, GBR: CABI Publishing, pp. 81-104.
- Sinha, P., Pandey, A., 2011. An Evaluative Report and Challenges For Fermentative Biohydrogen Production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 7460-7478.
- Srinivasan, N., Ju, L.K., 2010. Pretreatment of Guayule Biomass Using Supercritical Carbon Dioxide-based Method. *Bioresource Technology*, 101, 9785-9791.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 4744–4753.
- Temudo, M.F., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M., 2007. Influence of the pH on (open) Mixed Culture Fermentation of Glucose: A Chemostat Study. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 69-79.
- Toor S.S., Rosendahl, L., Rudolf, A., 2011. Hydrothermal Liquefaction of Biomass: A Review of Subcritical Water Technologies. *Energy*, 36, 2328-2342.
- Tumuluru, J.S., Hess, J.R., Boardman, R.D., Wright, C.T., Westover, T.L., 2012. Formulation, Pretreatment, and Densification Options to Improve Biomass Specifications for Co Firing High Percentages With Coal. *Industrial Biotechnology*, 8, 113–132.
- Turhal, S., Turanbaev, M., Argun, H., 2019. Hydrogen Production From Melon and Watermelon Mixture By Dark Fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44, 18811-18817.
- Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M., Maness, P., Kroposki, B., Ghiardi, M., Evans, R., Blake, D. 2007. Renewable Hydrogen Production. *International Journal of Energy Research*, 32, 379-407.

- Van den Heuvel, J.C., Beftink, H.H., Verschuren, P.G., 1988. Inhibition of the Acidogenic Dissimilation of Glucose in Anaerobic Continuous Cultures by Free Butyric Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 89-94.
- Vansoset, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Method for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nostarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Vazquez, I. V., Varaldo, H. M. P. 2008. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), 1000- 1013.
- Wang, G., Mu, Y., Yu, H.Q., 2005. Response Surface Analysis to Evaluate The Influence of pH, Temperature and Substrate Concentration on The Acidogenesis of Surose Rich Wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 23, 175-184.
- Wang, X., Jin, B., 2009. Process Optimization of Biological Hydrogen Production from Molasses by a Newly Isolated *Clostridium butyricum* W5, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2, 138–144.
- Wong, Y. M., Show, P.L., Wu, T.Y., Leong, H.Y., Ibrahim, S., Juan, J.C., 2019. Production of Bio-Hydrogen From Dairy Wastewater Using Pretreated Landfill Leachate Sludge As An inoculum, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(2), 150-159.
- Yu, Y., Lou X., Wu, H., 2007. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot Compressed Water and its Comparisons with Other Hydrolysis Methods *Energy and Fuels*, 22(1), 46-60.
- Zhang, T., Jiang, D., Zhang, H., Jing, Y., Tahir, N., Zhang, Y., Zhang Q., 2019. Comparative Study on Bio-Hydrogen Production From Corn Stover: Photo-Fermentation, Dark-Fermentation And Dark-Photo Co-Fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.170>.

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y., 2014. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Biogas Production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35-53.



## ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Azerbaycan'ın başkenti Bakü'de doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladıktan sonra 2011-2015 yılları arasında Bakü Devlet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladım. 2016-2017 öğretim yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.

