

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KARIŞIM KÜLTÜR KULLANILARAK KARANLIK FERMANTASYON
YÖNTEMİYLE BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ**

Zeynep YILMAZER HİTİT

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12/08/2016

Zeynep YILMAZER HİTİT

ÖZET

Doktora Tezi

KARIŞIM KÜLTÜR KULLANILARAK KARANLIK FERMANTASYON YÖNTEMİYLE BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ

Zeynep YILMAZER HİTİT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent AKAY

Yapılan çalışmada, *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültürünün kullanıldığı karanlık fermantasyon yöntemiyle biyohidrojen üretim prosesinin verimini arttırmak amacıyla, substrat derişimi/bileşimi (patates, zenginleştirilmiş patates, pancar, glikoz vb.) katkı maddeleri (demir, amonyum, *Enterobacter aerogenes* vb.) ve mikroorganizma aktarım oranı etkilerinin incelenmesinin ardından belirlenen optimum koşullarda sistem tanımlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Doktora tezi kapsamında öncelikle karanlık fermantasyon ile biyohidrojen üretim veriminin artırılabilmesi için optimum ve ekonomik açıdan uygun besi ortamı (patates suyu, zenginleştirilmiş patates suyu, şeker pancarı, glikoz) derişimi ve bileşimi 1 g/L glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu olarak belirlenmiştir. İkinci adımda seçilen zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında, *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültür oranı (C:E) çalışmaları gerçekleştirilmiş ve en yüksek biyohidrojen verimine 10:1 aktarım oranında ulaşılmıştır . Üçüncü adımda ise zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamı ve 10:1 (C:E) karışım kültür oranında, katkı maddelerinin (demir, amonyum, magnezyum, nikel) farklı derişimlerde besi ortamına ilavesinin biyohidrojen üretim verimine etkisi incelenmiştir. Yapılan küçük ölçek çalışmalarının ardından belirlenen; besi ortamı, mikroorganizma aktarım oranı ve katkı maddelerinin derişimi ile biyoreaktörde fermantasyon çalışmalarına geçilmiştir. Biyohidrojen üretim veriminin en yüksek olduğu katkı maddeleri ile zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında, 10:1 (C:E) karışım kültür oranında mikroorganizmalar çoğaltılarak, dinamik analiz ile pH' ın zamanla değişimi incelenmiştir. Sistemi tanımlayan en uygun modelin belirlenmesi için YEKK ile sistem tanımlama çalışmaları yapılmış ve bulunan modelin kullanıldığı kontrol algoritmaları (PID, STGMV) ile pH kontrolü gerçekleştirilmiştir.

Ağustos 2016, 204 sayfa

Anahtar kelimeler: Biyohidrojen, karanlık fermantasyon, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes*, karışım kültür, biyoreaktör, sistem tanımlama, pH kontrol

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

BIOHYDROGEN PRODUCTION via DARK FERMENTATION METHOD by USING MIXED CULTURE

Zeynep YILMAZER HİTİT

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Bülent AKAY

In this study, concentration/composition of medium (potato juice, enriched potato juice, sugar beet, glucose), concentration of adding agents (iron, ammonium, *Enterobacter aerogenes* etc.), inoculum ratio of microorganisms were determined and after, determined optimum conditions were applied in system identification, in order to increase the efficiency of biohydrogen production by dark fermentation using mixed cultures of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*.

In this thesis first, optimally and economically suitable medium type (potato juice, enriched potato juice, sugar beet, glucose), concentration and composition were determined as enriched potato juice with 1 g/L glucose in biohydrogen production with dark fermentation method. The second step, with selected enriched potato juice as a growth medium, mixed cultures of pure strains of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes* inoculation ratios (C:E) were performed and higher hydrogen yield was achieved in the ratio of 10:1 C:E. The third step, with enriched potato juice and inoculation ratio of 10:1 (C:E), different concentrations of adding agents (iron, ammonium, magnesium, nickel) were added to growth medium to observe which has an effect on biohydrogen production yield. Bioreactor studies were started with determined enriched potato juice with adding agents as a growth medium and inoculation ratio of 10:1 (C:E) after small scale experiments. Afterwards dynamic analysis was performed to observe the change of pH with time in bioreactor. Recursive Least Square Method was used to determine the most suitable model, which identifies the system most, and pH control studies (PID, STGMV) were performed with that convenient model.

August 2016, 204 pages

Key Words: Biohydrogen, dark fermentation, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes*, co-culture, mixed culture, bioreactor, system identification, pH control

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktorama başladığım, çalışmak istediğim konu da dahi kararsız olduğum günlerde tavsiye ve yol göstermeleriyle biyohidrojen dünyasına adım atmamı sağlayan ve sonuna yaklaştığım çalışmalarım süresince yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım sorunlarda bilgi ve deneyimleriyle bana çözüm yolları bulan danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Bülent AKAY'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürü bir borç bilirim.

Bitmek tükenmek bilmeyen pozitif enerjisi, yüzünden eksik olmayan gülümsemesi, mükemmeliyetçiliği ve sonsuz sabrıyla çalışmalarım süresince gece gündüz demeden her an yanımda olan, bilime ve bilgiye ulaşmamda yol gösteren, bütün öğrencilerine olduğu gibi bana da anne şefkati ile yaklaşarak en sıkıntılı anlarımda bile beni rahatlatan canım hocam Yrd. Doç Dr. Suna ERTUNÇ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Havva BOYACIOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde bulunan, fikirleri ile doktora süresince yardımlarını esirgemeyen, çalışma tarzına ve olaylara farklı açıdan bakışına hayran olduğum, analizlerim sırasında değerli öğrencilerinden dahi yardım almamı sağlayan saygıdeğer Prof. Dr. Ali SINAĞ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) sonsuz teşekkür ederim.

12A4343003 numaralı alt yapı projemizi destekleyerek, doktora tezimin ilerlemesine ve bitirmeme olanak veren, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğüne (BAP) sonsuz teşekkür ederim.

TÜBİTAK 2214/A Doktora Sırası Araştırma Bursu ile danışmanlığında çalışmama beni hiç tanınamasına rağmen izin vererek, gerek bilimsel gerek sosyal anlamda görüşlerine sonsuz saygı duyduğum, gelişmemde oldukça payı olan, hiçbir zaman pes etmeme ve devam etme gerekliliğini ve herşeyi sorgulamayı öğreten, her zaman pozitif olmamı sağlayan, Why not? Go a head! cümlesi ile her zaman teşvik eden, destekleyen ve güvenen, yeri geldiğinde önceliklerin değişmesi gerekliliğini savunan, pozitiften de öte sevgili Prof. Dr. Patrick HALLENBECK'e (University of Montreal) ve bu değerli bilim insanı ile çalışmama olanak veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK'a, University of Montreal'e ve 1 yıl süresince yurtdışı görevlendirilmemde maddi manevi desteklerini esirgemeyen öncelikle Ankara Üniversitesi Rektörlüğü, Mühendislik Fakültesi ve Kimya Mühendisliği Bölüm'üne minnettarlığımı belirterek, destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Benim için dünyayı anlamlı kılan, çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen, sevgiyi, sarılmayı, huzuru, başı dik olmayı, sevmeyi, değer vermeyi, güzel sözlerle insanların kalbini rahatlatmayı öğrendiğim, başarılarımla mutlu olup, üzüldüğümde hüznlenen, şu an bu aşamaya gelmiş olmamda büyük emekleri olan Canım Babam İlhami YILMAZER'e, Canım Annem Hüsniye YILMAZER'e ve

evliliğim neticesinde kazandığım anneden öte Nermin HİTİT'e ve tüm aileme minnettarım, sizleri seviyorum.

Doğum günü hediyesi olduğum, her zaman beni seven, yönlendiren, önemseyen, yanımda olan, zor günlerimi sesinde atlattığım, tarifi zor bir duygusallıkta hayran olduğum ve sevdiğim canımdan öte, canım Ablam Arzu YILMAZER AĞAOĞLU ve dünyaya getirdiği baldan öte Toprak ve Rüzgar AĞAOĞLU fındıklarını ve sevgili eniştem, abim Cengiz AĞAOĞLU'nu çok seviyorum ve destekleri için sonsuz teşekkür ediyorum.

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevdiğim, sevildiğimi bildiğim, sevindiğim, hüznlendiğim, başarılarıyla gurur duyduğum, bir çok zorluğu birlikte atlattığım sevgili arkadaşlarım, Berçem ve Emrah DÜZOL, Furkan ve Simten SOYSAL, Ceren ATİLA ve Murat DİNÇER, Zafer ÇIPLAK, Rahime SONGÜR, Baran ÖZYURT, Şule CAMCIOĞLU, Yavuz GÖKÇE, Ceren KARAMAN, İsmail BAYRAM, Işıl GÜRTEN İNAL, Pınar KOCABAŞ, Nilüfer VURAL ve ailesi, Ayşen ve Rıfat PINAR, Evşen ve Ümit TAŞTAN, canım kuzenim Burak YILMAZER ve eşi Miray MERMER YILMAZER, canım kuzenim İhsan Bora TUFAN, kardeşten öte Birce Gül AKÇAY, Zafer ERDOĞMUŞ, Asım AĞCAN, Selen ve Turgay ERAY, Nida ve Fatih GÜR, Selin ve Barkın GÜNER, Oğuzhan VERDİ, Carolina LAZARO ZAMPOL, Franziska TREPKE, Sucheera Emily K, Raja SHERTEEL, Khorcheska BATYROVA, Justin HAKIMMUZAULA, Olcay MET, Gustavo BALDUINO' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgiden de öte varlığı ile hayatımı tamamlayan, ne olursa olsun yüzündeki tebessümü ile her an, her daim yanı başımda olan, desteğini, özverisini hiçbir zaman esirgemeyen, uzaklıklara hiç tereddüt etmeden göğüs geren, hatta uzaklıkları yakınlıklara çevirebilen, “gel sevgilim gidelim” cümlesiyle hayatımıza anlam katan belki de yön veren, “ben” değil “biz” olmanın mükemmelliğini her daim hissettiren, hayatımda bana sunulan en büyük hediye canım sevgilim, hayat arkadaşım, eşim Kıvanç HİTİT'e ve minik oğullarımız Yoda ve Jedi'ya minnettarım, sizleri gerçekten çok seviyorum.

Zeynep YILMAZER HİTİT

Ankara, Ağustos 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. KURAMSAL TEMELLER.....	13
3.1 Mikroorganizmaların Sınıflandırılması.....	13
3.2 Bakteri.....	13
3.3 Bakterinin Tarihçesi	14
3.4 Bakteri Hücre Yapısı.	15
3.5 <i>Clostridium butyricum</i> ve <i>Enterobacter aerogenes</i> Mikroorganizmaları.	18
3.6 Biyohidrojen.	20
3.6.1 Fermantasyon	20
3.6.1.1 Foto fermantasyon	20
3.6.1.2 Karanlık fermantasyon.....	22
3.6.1.2.1 Karanlık fermantasyonu etkileyen faktörler.....	23
3.6.1.3 Ardışık (sequential) fermantasyon	26
3.6.1.4 Birleşik (combined) fermantasyon.....	28
3.7 Sistem Tanımlama.....	30
3.7.1 Sistem tanımlamanın uygulanması.....	31
3.7.2 Sistem tanımlama için kullanılan parametrik yöntemler.....	31
3.7.3 Sistem tanımlamada kullanılan sinyaller.....	32
3.7.4 Sistem modelleri	33
3.7.4.1 Doğrusal modeller.	35
3.7.5 Model parametrelerinin hesaplanması.	38
3.7.5.1 En küçük kareler yöntemi (EKK).	38
3.7.5.2 Yinelemeli en küçük kareler yöntemi (YEKK).	41

3.8 Kontrol Yöntemleri.....	45
3.8.1 Biyoreaktörde pH'ın geliştirilmiş minimum varyans yöntemi ile kontrolü	46
3.8.1.1 GMV yöntemi	46
3.8.1.2 Sistem modeli.....	48
3.8.1.3 Pseudo Random Binary Sequence (PRBS) etki.....	51
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	52
4.1 Besi Ortamı Türü ve Değişiminin Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi	52
4.1.1 Besi ortamı türü.	52
4.1.1.1 Mikroorganizma aktarımı.....	52
4.1.1.2 Besi ortamı hazırlanışı	53
4.1.2 Besi ortamı türü, anaerobik ortam ve otoklav sıcaklığının etkisi.....	54
4.1.2.1 Mikroorganizma aktarımı.....	54
4.1.2.2 Besi ortamının hazırlanışı.....	56
4.1.2.3 Deney ortamlarının anaerobik koşula getirilmesi.....	58
4.1.2.4 Deney yöntemi.	59
4.1.2.4.1 Set 1 deney.	59
4.1.2.4.2 Set 2 deney.	60
4.1.3 Besi ortamı türü, değişimi ve mikroorganizma çoğalma sıcaklığı.....	61
4.1.3.1 Mikroorganizma aktarımı.....	61
4.1.3.2 Besi ortamı hazırlanışı.	62
4.2 Karışım Kültür Aktarım Oranının Etkisi.	63
4.2.1 Mikroorganizma aktarımı.....	63
4.2.2 Mikroorganizma aktarım oranları.....	66
4.3 Katkı Maddeleri ile Zenginleştirilen Besi Ortamlarının Etkisi.....	67
4.4 Biyoreaktörde Dinamik Analiz ve Sistem Tanımlama	68
4.5 pH Kontrolün Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi.....	69
4.6 Gaz Toplama Sistemi.	71
4.7 Gaz Kromatografi ile Hidrojen Gazı Analizi.	71
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	72
5.1 Besi Ortamı Bileşimi ve Değişiminin Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi.....	72
5.1.1 Besi ortam türü.....	72
5.1.2 Besi ortamı türü, anaerobik ortam ve otoklav sıcaklığı.	75

5.1.2.1 Set1 121 °C otoklavlamalı deney sonuçları.	75
5.1.2.2 Set2 131 °C otoklavlamalı deney sonuçları.	79
5.1.3 Besi ortamı türü, derişimi ve mikroorganizma çoğalma sıcaklığı.....	86
5.2 Karışım Kültür Aktarım Oranının Etkisi.	88
5.2.1 Tek set.	88
5.2.2 Set 1-2-3.....	90
5.3 Katkı Maddeleri ile Zengileştirilen Besi Ortamlarının Etkisi.	94
5.4 Biyoreaktörde Dinamik Analiz ve Sistem Tanımlama.	105
5.4.1 Kalibrasyon çalışmaları.....	105
5.4.1.1 pH probu kalibrasyonu.	105
5.4.1.2 Pompa kalibrasyonu.	105
5.4.2 Biyoreaktörde fermentasyon çalışmaları.....	107
5.4.2.1 Açık-hat fermentasyon.	107
5.4.2.2 Ayar değişkeni seçimi.	109
5.4.2.3 Asit-baz çifti derişiminin belirlenmesi.	110
5.4.2.4 Biyoreaktörün dinamik analiz sonuçları.	115
5.4.2.4.1 Mikroorganizmasız besı ortamına verilen pozitif ve negatif etki.	115
5.4.2.4.2 Mikroorganizmalı besı ortamına verilen pozitif etki.....	116
5.4.2.5 Sistem tanımlama ile sistemin parametrik modelinin belirlenmesi.	118
5.4.2.5.1 Mikroorganizmasız ortamda sistemin parametrik modelinin belirlenmesi.	119
5.4.2.5.2 Mikroorganizmalı ortamda sistemin parametrik modelinin belirlenmesi.	125
5.5 Biyoreaktörde pH Kontrol Çalışmaları.	131
5.5.1 Teorik PID kontrol çalışmaları.....	132
5.5.1.1 PID parametrelerinin hesaplanması.	132
5.5.1.2 MATLAB simulink programıyla PID kontrol.	133
5.5.1.3 MATLAB YEKK algoritmalı PID kontrol.	134
5.5.1.3.1 Mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortam modelinin PID kontrolü.	135
5.5.2 Teorik GMV kontrol çalışmaları.....	139
6. TÜBİTAK 2214/A KAPSAMINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR	144
6.1 Araştırmanın Amacı.	144

6.2 Mikroorganizma ve Büyütme Ortamı.....	144
6.3 Besi Ortamları.	145
6.4 Asit Hidrolizi.	145
6.5 Analiz Yöntemleri.	146
6.5.1 Hidrojen gaz üretimi ve analizleri.	146
6.5.2 DNS yöntemi ile glikoz derişiminin belirlenmesi.	146
6.5.3 Bradford boyama metodu ile kuru hücre ağırlığı-protein korelasyonu.	147
6.5.4 Petri kabına dökme (pour plate) ve yayma(spread plate) yöntemleri ile canlı hücre sayımı.....	148
6.5.5 Kimyasal oksijen ihtiyacı (Chemical oxygen demand, COD).	149
6.6 Deney Sonuçları.....	151
6.6.1 Kalibrasyon doğruları.	151
6.6.2 Karışım kültürle biyohidrojen üretimine besi ortamı derişiminin etkisi. ...	153
6.6.3 Mikroorganizma aktarım oranının, glikozdan biyohidrojen üretimine etkisi.	155
6.6.4 Mikroorganizma aktarım oranının, zenginleştirilmiş patatesten biyohidrojen üretimine etkisi.	157
6.6.5 <i>C. butyricum</i> , <i>E. aerogenes</i> ve <i>R. palustris</i> ile ardışık (sequential) fermantasyon.	160
6.6.6 <i>C. butyricum</i> ve <i>R. palustris</i> ile birleşik (combined) fermentasyon.....	170
7. TARTIŞMA VE YORUM.	179
KAYNAKLAR.	185
EKLER.....	190
EK 1 Teorik Sistem Tanımlama için MATLAB Programı.	191
EK 2 Teorik PID Kontrolü için MATLAB Programı.....	193
EK 3 Teorik GMV Kontrolü için MATLAB Programı.....	197
ÖZGEÇMİŞ.....	202

SİMGELER DİZİNİ

A....R	Kesikli zaman girdi/çıktı modelde yer alan polinomlar
a	Genlik seviyesi
C_s	Substrat derişimi (g substrat/L)
C_{s0}	Başlangıç substrat derişimi (g substrat/L)
C_x	Mikroorganizma derişimi (g kuru hücre/L)
e(t)	Gürültü
E	Ardışık fark vektörü
E_A	Aktivasyon enerjisi (kmol/J)
F_s	Substrat akış hızı (ml/dk)
H	Henry sabiti
J	GMV Yöntemi için maliyet fonksiyonu
K	Yatışkın hal kazancı
K_c	Oransal sabit
K_M	Monod sabiti (g substrat/L)
N	PRBS girdi sinyali periyodu
$N_{min,max}$	Minimum ve maksimum karıştırıcı hızları (devir/dk)
N_O	Oksijen molar akısı
P(t)	Kovaryans matris
Q_e	Hata sinyali
Q_o	Kontrol çıkış sinyali
r	Set noktası
r_o	Mikroorganizma özgül oksijen aktarım hızı
r_x	Mikroorganizma çoğalma hızı (g kuru hücre/L st)
R	Evrensel gaz sabiti
s(t)	t anında sisteme etki eden sinyal
t	Zaman (s, dk veya st)
t_d	Kesikli zaman
T	Sıcaklık
T_{sw}	Kare dalga periyodu
T_p	PRBS girdi sinyali toplam periyodu

$u(t)$	Ayarlanabilen değişken (Glikoz akış hızı, L/dk)
$u_c(t)$	Sürekli zaman girdi sinyali
$u_d(t)$	Kesikli zaman girdi sinyali
V	Maliyet fonksiyonu
V_R	Reaktör hacmi (L)
$x(t)$	Ara değişken
$y(t)$	Çıktı değişkeni (Çözünmüş oksijen derişimi, mg/L)
$\hat{y}(t)$	Modelden elde edilen çıkış değişkeni
Y	Ardışık veri vektörü

Yunan Alfabeti

Δ	Fark işleci ($\Delta = 1 - q^{-1}$)
Φ	Pse output (yalancı çıktı)
$\varepsilon(t)$	Gerçek çıkış değişkeni ile model çıkış değişkeni arasındaki fark
θ	Parametre vektörü
λ	Unutma çarpanı
μ	Mikroorganizma özgül çoğalma hızı (h^{-1})
μ_{max}	Mikroorganizma özgül çoğalma hızı (h^{-1})
τ	Zaman sabiti
τ_D	Türevsel zaman sabiti
τ_I	İntegral zaman sabiti
τ_r	Yükselme zamanı
φ	Veri vektörü
φ^T	Veri vektörünün transpozu
ϕ	Ardışık veri vektörü
ϕ^T	Ardışık veri vektörünün transpozu

Kısaltmalar

ARMAX	Auto Regressive Moving Average with Exogenous
CARMA	Controlled Auto Regressive Moving Average
COD	Kimyasal oksijen ihtiyacı
DO	Çözünmüş oksijen derişimi
EKK	En Küçük Kareler Yöntemi
FF	Foto fermantasyon
GMV	Genelleştirilmiş Minimum Varyans Kontrol
HY	Hidrojen verimi
IAE	Hata mutlak değeri integrali
ISE	Hata karesi integrali
KF	Karanlık fermantasyon
MV	Minimum Varyans Kontrol
OD	Optik yoğunluk
PID	Oransal-İntegral-Türevsel Kontrol
RQ	Solunum oranı
YEKK	Yinelemeli En Küçük Kareler Yöntemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Mikroorganizmaların sınıflandırılması	13
Şekil 3.2 Bakterilerin şekilsel yapıları.	14
Şekil 3.3 Bakteri hücre yapısı.	16
Şekil 3.4 Gram negatif ve gram pozitif hücreler arasındaki yapısal farklılıklar.	17
Şekil 3.5 Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri.	20
Şekil 3.6 t anında giriş değişkeni $u(t)$, çıkış değişkeni $y(t)$ ve gürültü $e(t)$ içeren bir dinamik sistem	30
Şekil 3.7 Sistem tanımlama akış diyagramı.	32
Şekil 3.8 a. Bir kesikli $u_d(t)$ sinyali, b. Kesikli sinyalin sürekli zaman eşdeğeri $u_c(t)$	34
Şekil 3.9 Eşitlik 3.10 ile verilen model yapısının blok diyagramı.	35
Şekil 3.10 Yinelemeli parametre hesaplama yönteminin şematik gösterimi.	42
Şekil 3.11 Sistem yalancı-çıkışının blok diyagramı.	48
Şekil 3.7 PRBS sinyalinin şematik gösterimi	51
Şekil 4.1 Mikroorganizma aktarım adımları.	52
Şekil 4.2 Patates ortamının hazırlık aşaması.....	53
Şekil 4.3 Şeker pancarı ortamının hazırlık aşaması.	54
Şekil 4.4 Mikroorganizma canlandırma ortamı liver hazırlığı.....	55
Şekil 4.5 Gliserin ortamından 62 g/L liver ortamına mikroorganizma aktarımı.....	55
Şekil 4.6 Liver ortamından 400 g/L patates ortamına mikroorganizma aktarımı.	55
Şekil 4.7 Toplam hazırlanan besi ortamlarından glikoz ölçümü için 100'er mL ayırma.	56
Şekil 4.8 Hazırlanan patates, pancar ve glikoz besi ortamları.	57
Şekil 4.9 Deney tasarımı.	58
Şekil 4.10 121 °C lik deney seti besi ortamlarından N_2 gazı geçirme yöntemi.	58
Şekil 4.11 121 ve 131 °C lik deney seti besi ortamlarının anaerobik kabin yöntemi ile o oksijensiz hale getirilmesi.....	59
Şekil 4.12 121 °C da otoklavlanmış N_2 li ve kabinli besi ortamlarına liver'dan 2 mL aktarılacak gerçekleştirilen deney.	59
Şekil 4.13 70. h sonundaki gaz toplama şişeleri ve mikroorganizmalı besi ortamları..	60
Şekil 4.14 90. h sonundaki gaz toplama şişeleri ve mikroorganizmalı besi ortamları...	61
Şekil 4.15 Mikroorganizma canlandırma ortamı liver.	61

Şekil 4.16 Besi ortamlarının hazırlık aşaması (7x2 adet besi ortamları).	62
Şekil 4.17 <i>E. aerogenes</i> canlandırma aşamaları.....	64
Şekil 4.18 Katı besi ortamından sıvı besi ortamına aktarım.	65
Şekil 4.19 Liver ortamında mikroorganizma canlandırma.	65
Şekil 4.20 Techfors S biyoreaktör deney düzeneği.....	69
Şekil 4.21 On-line pH kontrolü sistemi.....	70
Şekil 4.22 Gaz toplama şişeleri.....	71
Şekil 5.1 Farklı besi ortamlarında hidrojen üretim sistemi.....	72
Şekil 5.2 Farklı besi ortamlarının kümülatif gaz üretimine etkisi.....	73
Şekil 5.3 Farklı besi ortamlarında gaz oluşum hızı.....	73
Şekil 5.4 Patates ve pancar ortamlarının kümülatif gaz üretimine etkisi.....	74
Şekil 5.5 Saf glikoz derişiminin kümülatif gaz üretimine etkisi.....	74
Şekil 5.6 Oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarında üretilen gaz hacmi (121°C) a. Azot geçirerek, b. Anaerobik kabinde.	76
Şekil 5.7 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının gaz üretim hacmi a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı.....	77
Şekil 5.8 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının gaz üretim hacmi.	77
Şekil 5.9 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının gaz üretim hacmi a. Azot geçirilerek, b. Anaerobik kabinli.	78
Şekil 5.10 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının kümülatif gaz hacmi a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı	78
Şekil 5.11 Oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarında üretilen gaz hacmi (131°C) a. Azot geçirerek, b. Anaerobik kabinde.	80
Şekil 5.12 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının gaz üretim hacmi a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı.....	81
Şekil 5.13 131 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının kümülatif gaz hacmi.	81

Şekil 5.14 131 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının gaz üretim hacmi	
a. Azot geçirilerek, b. Anaerobik kabinli..	82
Şekil 5.15 131 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının kümülatif gaz hacmi	
a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı.....	82
Şekil 5.16 Gaz kromatografi sonuçları.....	84
Şekil 5.17 Farklı besi ortamı bileşimlerinde kümülatif gaz hacimleri	
a. 28 °C, b. 37 °C.....	86
Şekil 5.18 H ₂ veriminin substrat derişimi ile değişimi.	88
Şekil 5.19 Farklı aktatım oranlarında kümülatif gaz hacimleri.....	89
Şekil 5.20 Farklı mikroorganizma aktarım oranlarında hacimce %H ₂ içeriği.	89
Şekil 5.21 H ₂ veriminin mikroorganizma aktarım oranları ile değişimi	
a. Substrat kütlesi başına verim, b. Substrat molü başına verim	90
Şekil 5.22 Kümülatif gaz hacimleri a. Set 1, b. Set 2, c. Set 3.....	91
Şekil 5.23 GC gaz analiz sonuçları.	92
Şekil 5.24 H ₂ veriminin mikroorganizma aktarım oranları ile değişimi	
a. Substrat kütlesi başına verim, b. Substrat molü başına verim.....	93
Şekil 5.25 Demirsülfat (A) ve magnezyum (D) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi.....	98
Şekil 5.26 Nikel klorür (C) ve amonyum klorür (B) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi.....	98
Şekil 5.27 Magnezyum klorür (D) ve amonyum klorür (B) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi.....	99
Şekil 5.28 Magnezyum klorür (D) ve nikel klorür (C) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi.	99
Şekil 5.29 Fe, Ni, NH ₄ , Mg nin biyohidrojen üretim verimine etkisi	
a. Kümülatif gaz hacmi, b. Hacimce %H ₂ içeriği, c. Verim değeri.	100
Şekil 5.30 İkili katkı maddelerinin biyohidrojen üretim verimine etkisi	
a. Kümülatif gaz hacmi, b. Hacimce %H ₂ içeriği, c. Verim değeri..	101
Şekil 5.31 Üçlü katkı maddelerinin biyohidrojen üretim verimine etkisi	
a. Kümülatif gaz hacmi, b. Hacimce %H ₂ içeriği, c. Verim değeri..	102
Şekil 5.32 Kümülatif gaz hacminin zamanla değişimi.....	103
Şekil 5.33 GC kromatografi sonuçları.	104

Şekil 5.34 Katkı maddelerinin biyohidrojen üretim verimine etkisi.....	104
Şekil 5.35 pH değerine karşı bilgisayar sinyali değişimi.	105
Şekil 5.36 Asit pompası için gösterge değerine karşı akış hızının değişimi kalibrasyonu.	106
Şekil 5.37 Baz pompası için gösterge değerine karşı akış hızının değişimi kalibrasyonu.	106
Şekil 5.38 Baz pompası için gösterge değerine karşılık Simulink çıktısı kalibrasyonu.	107
Şekil 5.39 Biyoreaktörde fermentasyon süresi boyunca pH değişimi.	108
Şekil 5.40 Kümülatif gaz hacminin zamanla değişimi.....	108
Şekil 5.41 Gaz üretiminin zamanla değişimi.	109
Şekil 5.42 Eklenen 0.5 M'lık H_2SO_4 hacmi ile pH değişimi.	110
Şekil 5.43 Eklenen 0.1 M'lık H_2SO_4 hacmi ile pH değişimi.	111
Şekil 5.44 Eklenen 0.05 M'lık H_2SO_4 hacmi ile pH değişimi..	111
Şekil 5.45 Eklenen 0.3 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi.	112
Şekil 5.46 Eklenen 0.2 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi.	112
Şekil 5.47 Eklenen 0.1 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi.	113
Şekil 5.48 0.1 M H_2SO_4 ile pH değeri düşürülen besi ortamına eklenen 0.2 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi.....	114
Şekil 5.49 0.05 M H_2SO_4 ile pH değeri düşürülen besi ortamına eklenen 0.3 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi.....	114
Şekil 5.50 pH 6.0 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış hızında ve 0.0257 mL/min sabit baz akış hızında yatışkın koşulda işletilen sistemde baz akış hızına 0.0257 mL/min'den 0.354 mL/min pozitif ve 0.354 mL/min'den 0.178 mL/min'e negatif etki verilmesi durumunda sistemin cevabı.	116
Şekil 5.51 pH 6.0 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış hızında ve 0.01 mL/min sabit baz akış hızında yatışkın koşulda işletilen sistemde baz akış hızına verilen pozitif etkiler durumunda sistemin cevabı.	117
Şekil 5.52 Verilen etkiler karşısında % H_2 içeriğinin zamanla değişimi.	118
Şekil 5.53 Mikroorganizmaasız ortamda pH 6 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış hızında ve 0.0257 mL/min sabit baz akış hızında yatışkın koşulda işletilen sistemde baz akış hızına 0.0257 mL/min'den 0.354 mL/min pozitif etki verilmesi durumunda sistemin cevabı.....	119

Şekil 5.54 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $P=1000$ iken λ' nin V_N ile değişimi.	121
Şekil 5.55 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı P değerlerinde, $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde iken λ' nin V_N ile değişimi.	122
Şekil 5.56 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $\lambda =0.97$ iken P 'nin V_N ile değişimi.	123
Şekil 5.57 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı λ değerlerinde, $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde iken P 'nin V_N ile değişimi.	123
Şekil 5.58 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı unutma çarpanı değerlerinde, $P=1000$ iken n 'nin V_N ile değişimi.	124
Şekil 5.59 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı kovaryans matris başlangıç değerinde, $\lambda =0.97$ iken n 'nin V_N ile değişimi.	125
Şekil 5.60 Mikroorganizmalı ortamda pH 5.1 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış 0.25 mL/min sabit baz akış hızında hızında yatışkın koşulda işletilen sistemde baz akış hızına 0.25 mL/min'den 0.4 mL/min'e verilen pozitif etki durumunda sistemin cevabı.	126
Şekil 5.61 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $P=1000$ iken λ' nin V_N ile değişimi.	127
Şekil 5.62 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı P değerlerinde, $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde iken λ' nin V_N ile değişimi.	127
Şekil 5.63 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $\lambda =0.96$ iken P 'nin V_N ile değişimi.	128
Şekil 5.64 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı λ değerlerinde, $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde iken P 'nin V_N ile değişimi.	129

Şekil 5.65 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı unutma çarpanı değerlerinde, $P=1000$ iken n 'nin V_N ile değişimi.	129
Şekil 5.66 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı P değerinde, $\lambda=0.96$ iken n 'nin V_N ile değişimi.....	130
Şekil 5.67 Biyohidrojen üretiminde deneysel sistem tanımlamada basamak etki, $n_a=3$ $n_b=2$, $\lambda=0.96$, $P=1000$	131
Şekil 5.68 Simulink kapalı devre diyagramı.	133
Şekil 5.69 Mikroorganizmasız ortam modelinde set noktasına 3.5'ten 6.0'a pozitif basamak etki verilmesi durumunda sistemin PID kontrolü....	134
Şekil 5.70 Mikroorganizmalı ortam modelinde set noktasına 3.5'ten 6.0'a pozitif basamak etki verilmesi durumunda sistemin PID kontrolü.....	134
Şekil 5.71 Mikroorganizmasız ortam modelinde sabit set noktalı sistemin Teorik PID kontrolü ($ISE=491.119$).	136
Şekil 5.72 Mikroorganizmalı ortam modelinde sabit set noktalı sistemin Teorik PID kontrolü ($ISE=207.4805$).	136
Şekil 5.73 Mikroorganizmasız ortam modelinde kare dalga'nın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü ($ISE=10073$).	137
Şekil 5.74 Mikroorganizmalı ortam modelinde kare dalga'nın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü ($ISE=4629$).	137
Şekil 5.75 Mikroorganizmasız ortam modelinde rastgele dalga'nın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü ($ISE=362.78$).	138
Şekil 5.76 Mikroorganizmalı ortam modelinde rastgele dalga'nın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü ($ISE=165.53$).	138
Şekil 5.77 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen ARMAX modelin sabit set noktalı Teorik GMV kontrolü ($ISE=377.49$).	140
Şekil 5.78 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen ARMAX modelin sabit set noktalı Teorik GMV kontrolü ($ISE=232.52$).	140
Şekil 5.79 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen ARMAX modelin kare dalga etkisinde Teorik GMV kontrolü ($ISE=394.79$).	141
Şekil 5.80 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen ARMAX modelin kare dalga etkisinde Teorik GMV kontrolü ($ISE=261.48$).	142
Şekil 5.81 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen ARMAX modelin rastgele etkide Teorik GMV kontrolü ($ISE=212.83$).	143

Şekil 5.82 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen ARMAX modelin rastgele etkide Teorik GMV kontrolü (ISE=354.26).....	143
Şekil 6.1 H ₂ içeriği kalibrasyon grafiği.....	151
Şekil 6.2 DNS yöntemi ile glikoz kalibrasyonu.....	151
Şekil 6.3 Patatesin glikoz içeriği kalibrasyonu.	152
Şekil 6.4 Kuru hücre ağırlığı - protein korelasyonu.....	152
Şekil 6.5 Kimyasal oksijen ihtiyacı, COD kalibrasyonu.....	152
Şekil 6.6 Hidrojen veriminin farklı besi ortamı derişimleri ile değişimi.	154
Şekil 6.7 Hidrojen veriminin C:E aktarım oranları ile değişimi.	156
Şekil 6.8 Mikroorganizma aktarım oranı ile kuru kütle ağırlığının etkisi.....	157
Şekil 6.9 Hidrojen verimi.....	159
Şekil 6.10 <i>C. butyricum</i> ve <i>E. aerogenes</i> 'in farklı aktarım oranında ve farklı besi ortamı derişiminde kuru hücre ağırlığının değişimi.	159
Şekil 6.11 Toplam hidrojen verimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H ₂ veriminin, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H ₂ veriminin, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H ₂ veriminin, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimii.	166
Şekil 6.12 Toplam hidrojen üretimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H ₂ üretiminin, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H ₂ üretiminin, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H ₂ üretiminin, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi.....	167
Şekil 6.13 Foto hidrojen verimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H ₂ veriminin, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H ₂ veriminin, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H ₂ veriminin, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi.	169

Şekil 6.14 Son <i>R. palustris</i> sayımı için 2 ve 3 boyutlu grafikler.	
a. <i>R. palustris</i> sayımının, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. <i>R. palustris</i> sayımının, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. <i>R. palustris</i> sayımının, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi.	170
Şekil 6.15 Hidrojen verimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H ₂ veriminin, 15 g sabit besi ortamı derişiminde, tampon derişimi ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H ₂ veriminin, 50 mM sabit tampon derişiminde, besi ortamı derişimi ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H ₂ veriminin, 3 kat sabit mikroorganizma aktarımında, besi ortamı ve tampon derişimi ile değişimi.	175
Şekil 6.16 COD giderimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. COD gideriminin, 3 kat sabit mikroorganizma aktarımında, besi ortamı ve tampon derişimi ile değişimi.....	176
Şekil 6.17 Glikoz tüketimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. Glikoz tüketiminin, 3 kat sabit mikroorganizma aktarımında, besi ortamı ve tampon derişimi ile değişimi.....	176
Şekil 6.18 Dökme (pour plate) metodu ile <i>Rhodopseudomonas palustris</i> ve <i>Clostridium butyricum</i> 'un 3. ve 14. günde canlı hücre sayımı.	177

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Literatürde ardışık fermantasyon ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar	27
Çizelge 3.2 Literatürde birleşik fermantasyon ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar.	29
Çizelge 3.3 Eşitlik 3.11'e göre elde edilen değişik model yapıları.....	36
Çizelge 4.1 <i>Enterobacter aerogenes</i> mikroorganizması besi ortamları.....	64
Çizelge 4.2 Set 1 aktarım oranları (90 mL substrat üzerine eklenen mikroorganizma miktarları).	66
Çizelge 4.3 Set1-2-3 mikroorganizma aktarım oranları ve substrat miktarları.....	67
Çizelge 5.1 Farklı besi ortamlarında üretilen kümülatif gaz hacimleri	75
Çizelge 5.2 121 °C de otoklavlanmış besi ortamlarının glikoz analiz sonuçları.....	85
Çizelge 5.3 135 °C de otoklavlanmış besi ortamlarının glikoz analiz sonuçları.....	85
Çizelge 5.4 Gaz kromatografi sonuçlarından yola çıkılarak hesaplanan verim değerleri.....	87
Çizelge 5.5 Katkı maddelerinin minimum ve maksimum derişim aralığı.	95
Çizelge 5.6 Deney tasarım matrisi (gerçek değerler).....	95
Çizelge 5.7 Deney tasarım sonuçları.....	96
Çizelge 5.8 Biyohidrojen üretim verimini arttırmada ANOVA sonuçları.....	97
Çizelge 5.9 Anlamlılık testi.....	97
Çizelge 5.10 Mikroorganizmasız ortamda baz akış hızına 0.0257 mL/min'den 0.354 mL/min'e pozitif basamak etki verilmesi sonucunda kestirim performans kriterleri.	120
Çizelge 5.11 Mikroorganizmalı ortamda baz akış hızına 0.25 mL/min'den 0.4 mL/min'e pozitif basamak etki verilmesi sonucunda kestirim performans kriterleri.	126
Çizelge 5.12 Model parametreleri ve Cohen coon yöntemi ile hesaplanan PID parametreleri.	132
Çizelge 5.13 Deneme yanılma ile hesaplanan PID parametreleri.....	133
Çizelge 6.1 Patates suyunun glikoz içeriği.	153
Çizelge 6.2 Patates suyu deney sonuçları.	154
Çizelge 6.3 1 g/L glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu deney sonuçları.	154
Çizelge 6.4 Bakteriyal protein ölçümü ile kuru hücre ağırlığı kestirimi.....	155

Çizelge 6.5 Deney sonuçları.	156
Çizelge 6.6 Mikroorganizma aktarım oranı ve kullanılan besi ortamı bileşimleri.	158
Çizelge 6.7 Aktarım oranı deneysel sonuçları.	158
Çizelge 6.8 Foto fermentasyonda üç bağımsız değişkenli Box-Behnken deney sonuçları.	161
Çizelge 6.9 Toplam hidrojen verimi, mmol H ₂ / g COD ANOVA sonuçları.	163
Çizelge 6.10 toplam hidrojen üretimi, mmol H ₂ ANOVA sonuçları.	163
Çizelge 6.11 Foto fermentasyon H ₂ verimi, mmol H ₂ / g COD ANOVA sonuçları. ..	164
Çizelge 6.12 <i>R. palustris</i> canlı hücre sayımı, CFU/mL ANOVA sonuçları.	164
Çizelge 6.13 Başlangıç glikoz içeriği.	171
Çizelge 6.14 Box Behnken deney tasarımının sonuçları.	172
Çizelge 6.15 Toplam hidrojen verimi, mol H ₂ /mol glikoz için ANOVA sonuçları. ...	173
Çizelge 6.16 Hidrojen üretimi (mmol H ₂) için ANOVA sonuçları.	173
Çizelge 6.17 Glikoz tüketimi ,% için ANOVA sonuçları.	174
Çizelge 6.18 COD giderimi (%) için ANOVA sonuçları.	174

1. GİRİŞ

Birincil enerji kaynaklarının dönüştürülmesi ile elde edilen ikincil enerjilere “enerji taşıyıcısı” denir. Hidrojen de 21. yüzyıla damgasını vuracak, taşınabilen, taşınmasında çok az enerji kaybı olan, tükenmez, temiz, kolaylıkla ısı, elektrik ve mekanik enerjiye dönüşebilen, karbon içermeyen ve hafif olan bir enerji taşıyıcısıdır (Eral 1998).

Hidrojen doğada en çok bulunan element olmanın yanı sıra, tüm yakıtlar içerisinde birim kütle başına enerji içeriği en yüksek olanıdır. Ayrıca hidrojenin yakıt olarak kullanıldığı enerji sistemlerinde atmosfere atılan ürün sadece su veya su buharıdır. Bu nedenle hidrojen kullanımı ile çevresel kalitenin iyileşmesi beklenmektedir. Ancak hidrojen doğada serbest halde bulunmaz. Bu nedenle hidrojen üretilmelidir.

Artan yakıt ihtiyacına karşın rezervlerin her geçen gün azalması 1990’lardan beri hidrojene olan ilgiyi giderek arttırmıştır (Kim ve Han 2006). Bugün dünyada yaklaşık % 90 oranında fosil enerji kaynakları kullanılmaktadır. Ancak fosil yakıtların kullanımı birçok çevresel probleme yol açmaktadır. Fosil yakıtların yanması sonucu oluşan karbondioksit küresel ısınmaya sebep olduğu için yenilenebilir bir enerji kaynağı olan hidrojen önem kazanmıştır.

Hidrojen termokimyasal ve biyolojik metotlarla üretilmektedir. Biyolojik hidrojen üretim proseslerinde işletim çevre sıcaklığı ve basıncında gerçekleştirildiği için daha az enerji tüketimi söz konusudur. Bu prosesler düşük enerji tüketimine sahip oldukları ve yenilenebilir kaynakların kullanımı açısından yeni bir alan yarattıkları için çevre dostudur (Das ve Veziroglu 2001). Günümüzde hidrojenin %40’ı doğal gazdan, %30’u ağır yağlar ve naftadan, %18’i kömürden, %4’ü elektrolizden ve yaklaşık %1’i biyokütleden üretilmektedir (Gülşen vd. 2014).

Enerji alanındaki darboğazın aşılması üzerine çalışmaların yoğunlaştığı günümüzde, sürdürülebilir bir gelişme ve atık miktarının azaltılması dikkate alındığında, yenilenebilir kaynaklardan biyohidrojen üretimi önemli ölçüde dikkat çekmektedir. Atık

maddelerin kullanımı ve temiz enerji kaynağı üretimi, biyohidrojen üretim proseslerinin tercih edilmesindeki en önemli unsurlardır (Gülşen vd. 2014).

Hidrojen fosil yakıtlar, su ve biyokütle gibi değişik hammaddelerden üretilmektedir. Endüstriyel anlamda ise daha çok fosil yakıtlardan, özellikle doğalgazın buhar reformasyonu ile elde edilmektedir. Ancak son yıllarda hidrojen üretiminin biyolojik yollarla gerçekleştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Biyohidrojen üretimi uygun sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilebilmesi, çevre kirliliğine yol açmaması, üretimi esnasında organik atıkların kullanılması nedeniyle ekonomik; önemli yan ürünlerin oluşması nedeniyle de avantajlıdır.

Biyolojik hidrojen üretimi sistemlerinde, algler, siyanobakteriler (mavi-yeşil algler), fotosentetik bakteriler ve anaerobik bakteriler kullanılmaktadır. Birçok anaerobik organizma karbonhidrat içeren organik atıklardan hidrojen gazı üretebilmektedir. Bunların arasında en yaygın olanlar spor oluşturabilen *Clostridia* türleridir. Birçok çalışmada; *C. butyricum*, *C. thermolacticum*, *C. pasteurianum* ve *C. bifermentans* bu amaçla kullanılmıştır. Clostridium türleri karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz gibi basit şekerlerin yanında nişasta, selüloz gibi kompleks şekerleri de kullanabilmektedir. Clostridium türlerinin dışında *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *E. alvei*, *T. thermosaccharolyticum*, *Desulfotomaculum geothermicum*, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, *Klebsiella oxytoca* HP1 organizmaları kullanılarak hidrojen gazı üretimi gerçekleştirilmiştir. *Enterobacter aerogenes* türü fakültatif anaerobik olup, hidrojen üretimi Clostridium türleriyle karşılaştırılabilir düzeydedir. Üretilen hidrojen gazının inhibisyon etkisi ihtimaline karşı sistemden sürekli olarak uzaklaştırılmalıdır (Genç 2010).

Biyolojik olarak hidrojen, doğrudan biyofotoliz, dolaylı biyofotoliz, fotofermantasyon ve karanlık fermentasyon olmak üzere 4 farklı proses ile üretilmektedir. Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde anaerobik bakteriler karanlık koşullarda organik substratları ayrıştırarak hidrojen üretirler. Bu yöntemin en büyük dezavantajı yüksek organik substrat maliyetine karşılık düşük hidrojen verimi elde edilmesidir. Hidrojen

gazı üretiminde glikoz, sukroz, laktoz gibi ayrıştırılması kolay şekerlerin kullanımı arzu edilir. Ancak saf karbonhidratların ham madde olarak kullanılması pahalıdır. Bu nedenle hidrojen gazı üretiminde karbonhidrat içeriği zengin gıda endüstrisi atıklarının kullanılması önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu bileşiklerin karmaşık yapısı biyolojik olarak parçalanmalarını zorlaştırmaktadır ve önişleme tabii tutulması gerekmektedir (Eral 1998). Literatürde karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde kullanılan birincil ve ikincil substratlar; glikoz, nişasta, patates, melas, peynir altı suyu, şeker kamışı küspesi hidrolizatı, şeker pancarı küspesi hidrolizatı, kasava küspesi, atık su vb.'dir (Fırat 2009).

Yapılan doktora tezinin amacı, karışım kültürün kullanıldığı (*Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültürü) karanlık fermantasyonla biyohidrojen üretim prosesini etkileyen parametrelerden pH, substrat (patates, peynir altı suyu, şeker pancarı, glikoz, patates nişastası vb.) ve katkı maddelerinin (demir, amonyum, magnezyum, nikel) etkilerinin incelenmesi ve sistemi tanımlayan en uygun modelin bulunması ile biyohidrojen üretim veriminin ayarlanması ve arttırılmasıdır. Hallenbeck ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada saf kültürün kullanıldığı büyük ölçekli hidrojen üretiminin ekonomik olarak uygun olmadığı görülmüştür. Bu sorunu gidermek için iki saf kültürün birlikte kullanımı önerilmiştir ve %50 lik artış elde edilmiştir (Hallenbeck 2012). Ortamın pH'ı ise mikroorganizmaların yapısında bulunan enzimlerin işlevlerini tam olarak yerine getirebilmeleri ve ortamdaki substratları kullanma verimleri üzerinde etkilidir (Kim vd. 1999, Yokoi vd. 2001, Fang ve Liu 2002, Logan vd. 2003, Khanal vd. 2004, Liu ve Shen 2004, Crabbe vd. 2005, Li vd. 2008, Alalayah vd. 2008,). Uygun pH değerinin sağlanamaması hidrojen üretim veriminin azalmasına neden olmaktadır (Khanna vd. 2011). Literatürde yapılan çalışmalarda en uygun pH değeri aralığı 5.2-5.5 olarak deneysel çalışmalarla belirlenmiştir (Li vd. 2008). pH kontrolünün yapılmadığı çalışmalarda ise, pH'ın 6.8'den 4.2-4.5'e kadar düştüğü gözlenmiştir. pH'ın 5.5 değerinde kontrol edildiği deneysel çalışmalarda ortamda bulunan glikoz tamamen tüketilerek, hidrojen üretim veriminin pH kontrolü olmayan deneylere göre %35-50 arasında arttığı gözlemlenmiştir (Wang ve Wan 2008, Wang vd. 2009, Phowan vd. 2010, Khanna vd. 2011).

Şimdiye kadar olan karışım kültürle fermantatif hidrojen üretimindeki çalışmalarda, genellikle substratların ve derişimlerinin, sıcaklığın ve pH değerlerinin fermantatif hidrojen üretime etkileri incelenmiştir ancak inorganik katkı maddeleri özellikle metal iyonlarının hidrojen üretime etkisi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Anaerobik bakteri ile fermantatif hidrojen üretiminde katkı maddelerinden demir, hidrojenin oksidasyonunu katalizleyen veya protonu indirgeyen iki ana başlıkta incelenen nikel-demir (Ni-Fe) ve sadece demir (Fe-Fe) hidrojenazlar açısından önemlidir. Bundan dolayı, demir hidrojenaz enziminin aktivitesini etkileyerek fermantatif hidrojen üretimini etkilemektedir (Wang ve Wan 2008). Aynı şekilde diğer bir katkı maddesi olan azot hidrojen üreten bakterinin üremesinde önemli rol oynar ve genellikle amonyak azot kaynağı olarak kullanılır. Uygun amonyak derişim aralığında amonyak hidrojen üretime yararlı olmasına rağmen yüksek derişimlerde kullanımı bakterinin hücre içi pH değerini değiştirmesinden dolayı inhibe edicidir (Wang vd. 2009) ve derişiminin belirlenmesi gerekmektedir. Hidrojen üreten *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının reaktördeki eser miktarda oksijenden inhibe olmasından dolayı fakültatif anaerob olan *Enterobacter aerogenes* ilavesi ile oksijenin tüketilmesiyle karışım kültürle hidrojen üretimi gerçekleştirilerek verim arttırılabilmektedir (Phowan vd. 2010). Bunun yanı sıra L-cysteine.HCl.H₂O, Na-thioglycolate gibi indirgen maddelerin de besi ortamındaki oksijenin tüketilmesinde kullanılabileceği ve böylece sağlanması çok zor olan anaerobik koşulların gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (Phowan vd. 2010, Khanna vd. 2011, Kargi ve Özmihci 2010).

Tez kapsamında öncelikle karanlık fermantasyon ile biyohidrojen üretim veriminin arttırılabilmesi için optimum ve ekonomik açıdan uygun besi ortamı (glukoz, patates suyu, peynir altı suyu, şeker pancarı, patates nişastası) derişimi ve bileşimi belirlenmiştir. İkinci adımda seçilen zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında, *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültür oranı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Üçüncü adımda ise zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamı ve 10:1 (C:E) karışım kültür oranında, katkı maddelerinin (demir, amonyum, magnezyum, nikel) farklı derişimlerde besi ortamına ilavesinin biyohidrojen üretim verimine etkisi incelenmiştir. Yapılan küçük ölçek çalışmalarının ardından belirlenen; besi ortamı,

mikroorganizma aktarım oranı ve katkı maddelerinin derişimi ile biyoreaktörde fermentasyon çalışmalarına geçilmiştir. Biyohidrojen retim veriminin en yüksek olduğu katkı maddeleri ile zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında, 10:1 (C:E) karışım kültür oranında mikroorganizmalar çoğaltılarak, dinamik analiz ile pH' ın zamanla değişimi incelenmiştir. Sistemi tanımlayan en uygun modelin belirlenmesi için YEKK ile sistem tanımlama çalışmaları yapılmış ve bulunan modelin kullanıldığı kontrol algoritmaları (PID, GMV) ile pH kontrolü gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizma çoğalmasına etki eden ve bu tez kapsamında kontrol edilen parametre olan pH en uygun değerinin bulunarak biyoreaktörün bu koşulda işletilmesi ve kontrol edilmesi ürün verimi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle pH değerinin kontrolüne yönelik çalışmalara ilk olarak anaerobik koşullarda 10:1 (C:E) oranında *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında (1 g/L glikoz, 1.5 g/L FeSO₄ ve 1 g/L MgCl₂) 4 L alışma hacminde gerçekleştirilen açık – hat biyoreaktör işletiminde, prosesin 25 saatlik işletim süresi boyunca pH değişimini ve biyohidrojen üretim hacmini belirlemek amacıyla deneysel çalışma ile başlanmıştır. Kontrol edilen değişken olarak seçilen pH' ın herhangi bir kontrol yöntemiyle denetlenmediği durumda zamanla değişimini incelemek amacıyla gerçekleştirilen deneyde diğer tüm biyoreaktör işletim parametreleri sabit tutularak hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. İşetim koşulları, 37 C sıcaklık ve 600 rpm karıştırma hızına ayarlanarak reaktörün kontrol algoritması (IRIS V.2) ile sabit tutulmuştur. Ölçek büyütme aşamasının son adımında biyoreaktöre aktarılan karışım kültürün, zenginleştirilmiş patates suyu ortamında havasız koşullarda fermentasyon süresince pH değişimi MATLAB programının Simulink ara yüzünde oluşturulan model yardımıyla kaydedilmiştir. 25 saatlik fermentasyon boyunca pH 6.00'dan 4.59 değerine dşmştir.

Belirlenen optimum çalışma koşullarında sistemin dinamik davranışını incelemek amacıyla sistem tanımlama çalışmalarına geçilmiştir. Biyoreaktörde gerçekleştirilen dinamik çalışmalar kapsamında ayarlanabilen giriş değişkeni olan baz akış hızına verilen pozitif basamak etkiye prosesin cevabı ve kontrollu değişken olan pH'ın zamanla değişimi verileri elde edilmiştir. Bu alışmalar mikroorganizmasız ve

mikroorganizmalı ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu incelemelerde baz derişiminin çoğalmayı inhibe edici olduğu derişim değęerlerinin üzerine çıkılmamasına dikkat edilerek, istenilen işletim şartlarında en uygun baz akış hızının belirlenmesine çalışılmıştır. PID kontrol parametrelerinin belirlenmesi amacıyla prosesin birinci mertebeden ölü zamanlı modeli de “Doğrusal Regresyon” yöntemi ile belirlenmiştir. Prosesin girdi-çıkıı verileri yardımıyla sistemi tanımlayan doğrusal ARMAX tipi bir girdi-çıkıı modeli elde edilmiştir. Model parametrelerinin hesaplanmasında YEKK Yöntemi kullanılmıştır. Sistemi ifade eden en uygun parametrik modelin bulunması amacıyla farklı kovaryans matrisin başlangıç değeri, unutma çarpanı değeri ve model mertebesi için çalışmalar yapılmıştır.

Azot gazı geçirilerek oluşturulan anaerobik koşullarda 10:1 (C:E) oranında *C. butyricum* ve *E. aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı 4 L çalışma hacmine sahip kesikli bir biyoreaktörde pH kontrolüne yönelik yapılan çalışmada teorik olarak iki farklı kontrol yöntemi uygulanmıştır. Bunlardan ilki PID kontrol diğeri ise STGMV kontrol yöntemleridir. Biyoreaktörün işletim şartları belirlenerek ayar değışkeni olarak baz akışı hızı seçilmiş ve baz akış hızının çıkış değışkeni olan pH değeriinde etkili olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle baz akış hızı ayar değışkeni olarak seçilmiştir. Teorik çalışmalarda MATLAB programlama dilinde yazılmış olan program kullanılmıştır. PID kontrol parametreleri Cohen-Coon parametre hesaplama yöntemi ile hesaplanmıştır. Ancak MATLAB paket programında yazılan YEKK algoritması kullanan PID kontrol algoritması Cohen-Coon parametre hesaplama yöntemi ile bulunan parametreler ile sistemin kontrolünü sağlayamamıştır. Bu nedenle PID parametrelerinin sisteme en uygun değeri deneme-yanılma yöntemiyle bulunmuştur. STGMV kontrol PID kontrolden oldukça başarılı bulunmuştur. Gerek ISE değeri gerekse ayar değışkeninin davranışı STGMV kontrolde pH kontrol açısından daha uygundur. PID kontrol ayar değışkeninde salınımlara neden olmaktadır. Oysa ki mikroorganizmalı çalışmalarda ayar değışkeni hassas davranmalıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Liu vd. (2004), Başlangıç koşulları pH= 4.0 – 9.0, demir konsantrasyonu 1.2 – 100 mg/L, azot konsantrasyonu (NH_4HCO_3) 0.56 – 11.28 g/L ve nişasta konsantrasyonu 2 – 32 g/L iken hidrojen üretimi ve uçucu yağ asidi (VFA) üretimi üzerine çalışılmıştır. Nişasta substrat olarak kullanılarak bakteri karışım kültürleriyle 35°C 'de kesikli deneyler gerçekleştirilmiştir. Nişasta derişimi 15 g/L iken optimum pH, demir konsantrasyonu ve azot konsantrasyonu sırasıyla 7.0 – 8.0, 10 mg/L ve 5.64 g/L olarak belirlenmiştir. VFA'lar genel olarak asetatın ana bileşen olduğu asetat, propiyonat ve butirat şeklinde elde edilmiştir. Maksimum spesifik hidrojen üretim hızı optimum çevre şartları altında nişasta konsantrasyonu 15 g/L iken, 146 mg/L – VSS.d ve hidrojen verimi 178 mL/g nişasta olarak belirlenmiştir. (VSS: volatile suspended solids: uçucu içeren katılar). Nişasta konsantrasyonu 2 g/L iken maksimum hidrojen verimi 194 mL/g-nişasta olarak belirlenmiştir. Nişasta konsantrasyonu 24 g/L iken maksimum hidrojen üretim hızı 237 mL/g-VSS.d olarak bulunmuştur.

Asada vd. (2006), Agar jelde glikozdan, co-immobilize kültür laktik asit bakterisi *Lactobacillus delbrueckii* NBRC13953 ile fotosentetik bakteri *Rhodobacter sphaeroides* RV kullanılarak hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Glikoz hidrojene gazına maksimum 7.1 mol hidrojen /mol glikoz verimi ile dönüştürülmüştür.

Pattra vd. (2008), *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile hidrojen üretiminde substrat olarak kullanılan şeker kamışı küspesi farklı H_2SO_4 derişimlerinde (% 0.25-7.0 v/v) ve reaksiyon süresinde (15-240 dakida), 121 °C ve 1.5 kgcm⁻² basınç altında otoklavda hidrolize edilmiştir. Optimum koşullara %0.5 H_2SO_4 derişimi ve 60 dakika reaksiyon süresi ile ulaşılmıştır (24.5 g COD/L toplam glikoz içeriği). Bu koşullar altında 11 g glikoz/L, 11.29 g ksiloz/L, 2.22 g arabinoz/L, 2.48 g asetik asit/L ve 0.12 g/L furfural derişimleri elde edilmiştir. Sonrasında clostridium mikroorganizması SCB hemiselüloz hidrolizatından biyohidrojen üretiminde başlangıç pH'ı ve substrat derişimlerinin etkileri araştırılmıştır. Başlangıç pH'ının 5.5 ve başlangıç şeker derişiminin 20 g-COD/L olduğu durumlarda en iyi hidrojen verimine (1.73 mol H_2 /mol

toplam şeker) ve hidrojen üretim hızına ($1611 \text{ mL/H}_2 \text{ L}^{-1}\text{gün}^{-1}$) ulaşılmış ve literatürle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar SCB hemiselüloz hidrolizatının *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile hidrojen üretiminde substrat olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Wang ve Wan (2008), 35 °C ve başlangıç pH 7’de kesikli işletim ile karışım kültür kullanılarak, glikozdan fermentatif hidrojen üretiminde 0-1500 mg/L aralığında demir derişiminin biyohidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. Deney sonuçları, belirli derişimde demir iyonlarının karışım kültürle biyohidrojen üretim hızını, kümülatif hidrojen miktarını ve hidrojen verimini arttırdığı gözlenmiştir. Maksimum kümülatif hidrojen miktarı olan 302.3 mL ve maksimum hidrojen verimi 311.2 mL/g glikoz demir iyonlarının sırasıyla 300 ve 350 mg/L olduğu durumda elde edilmiştir. Karışım kültür ile ana çözünebilir metabolitler etanol, asetic asit, butirik asit ve eser miktarda veya hiç propiyonik asit üretilmiştir. Glikoz parçalama verimi demir iyonlarının 0-1500 mg/L artışıyla azalmaktadır, fakat demir derişiminin 350 mg/L’den düşük olduğu durumlarda, glikoz parçalanma verimi yüksek sayılabilir düzeyde olup %96.25-98.78, yükselen demir derişiminde değişime neden olmamaktadır. Demir iyonlarının belirli derişim aralığı biyokütle üretim verimini arttırmaktadır. Demir iyon derişimi 100-750 mg/L aralığında yüksek biyokütle üretim verimi 259.2 – 334.2 mg/g glikoz olarak görülmüştür. Son pH değerinde demir iyonlarının 0-1000 mg/L artışında azalan bir eğilimi olduğu ve en düşük son pH değerine demir iyon derişimin 1000 mg/L olduğu durumda gözlenmiştir.

Wang vd. (2009), bu çalışmada yeni izole edilmiş *Clostridium butyricum* W5 mikroorganizması ile melas kullanılan kesikli hidrojen üretim prosesinde fermentasyon parametrelerinin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Hidrojen verimi ve üretim hızı, bakteriyel biyokütle ve asetik, laktik ve butirik asit içeren VFAs (volatile fatty acids) ölçülmüştür. Fermentasyonu etkileyen parametrelerden karbon ve azot derişimleri, büyüme sıcaklığı ve pH’ı, inokulasyon büyüklüğü incelenmiştir. Hidrojen verimi ve üretimi açısından en iyi sonuçlara; 39 °C, pH 6.5 da, 9×10^4 hücre/mL başlangıç hücre derişimi, 100 g/L melas ve 1.2 g NH_4NO_3 derişimlerinde ulaşılmıştır. Hidrojen üretim hızı 17.38 mmol/h/L’ye karşı maksimum hidrojen verimi 1.85 mol hidrojen/ mol heksoz

olarak bulunmuştur. Deneysel çalışmalar melas derişiminin artmasıyla asetik / butirik asit oranının sabit kaldığını ancak istenmeyen ürün laktik asitin arttığını göstermiştir. Femantasyon süresince etanol, bütanol ve aseton gibi çözücülere rastlanmamıştır. Hidrojen fermantasyonunda çok az miktarda propiyonik asite rastlanmıştır. İstatistik analiz, hidrojen veriminin hücre büyümesiyle üstel olarak attığını ve hidrojen verimi ile asetik/butirik asit oranı arasında herhangi bir korelasyon olmadığını göstermiştir

Phowan vd. (2010), bu çalışmanın amacı *E. aerogenes* TISTR 1468 mikroorganizmasının, kullanılmadığı durum ve *Clostridium butyricum* ile kullanıldığı durumun karşılaştırılarak, indirgen madde olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Kesikli karanlık fermantasyonda substrat olarak asit ile hidrolize edilmiş kasava küspesi kullanılmıştır. Başlangıç pH' ının (5-8) ve glikoz derişiminin (5-40 CODL⁻¹) biyohidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar *Clostridium* ve *Enterobacter* karışım kültürünün gecikme fazını düşürdüğü ve kasava küspesi hidrolizatından 458 mL maksimum kümülatif hidrojen üretimi ile hidrojen üretiminde indirgen madde olmaksızın sadece *Clostridium* mikroorganizması kullanılarak üretilenden yaklaşık %14.5 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Karışım kültürün kullanıldığı hidrojen üretiminde optimum koşullar; 25 g COD L⁻¹ glikoz derişimi ve 5.5 pH olarak bulunmuştur. En yüksek hidrojen üretimi (HP), Spesifik hidrojen üretim hızı (SHPR), ve hidrojen verimi (HY) sırasıyla 357 mL, 3.385 mL H₂L⁻¹gün ve 345.8 mL H₂g⁻¹COD_{,indirgen} bulunmuştur. Sonuçlar kasava küspesi hidrolizatının substrat olarak kullanılabilirliğini ve *Enterobacter aerogenes* mikroorganizmasının *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile hidrojen üretiminde indirgen madde olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Kargı ve Özmihci (2010), hidrojen gaz oluşumu ve verimini arttırmak amacıyla, buğday nişasta tozu ile karanlık-foto fermantasyonda karışım kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yüksek hidrojen verimini ve oluşum hızını vermesi amacıyla ısıtılmış işlem görmüş anaerobik çamur ve *Clostridium beijerinckii* (DSMZ 791T) saf kültürü iki farklı foto fermantasyon bakterisi olan *Rhodobacter sphaeroides* (RS-NRRL ve RS-RV) mikroorganizmaları karıştırılarak uygun karışım oranları belirlenmiştir. Anaerobik çamur ve RS-NRRL karışımı en yüksek kümülatif hidrojen miktarını (CHF=140 mL),

en yüksek verimini ($0.36 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glikoz) ve spesifik hidrojen oluşum hızını ($2.5 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ biomass h}^{-1}$) sağlamıştır. Karanlık ve foto bakterileri ile nişasta hidrolizatının glikozunun kullanıldığı karanlık fermantasyon sırasında (70 h) hidrojen eşzamanlı üretilmiştir. Bununla birlikte uzun adaptasyon periodundan sonra, sadece foto fermantasyon bakterisi karanlık fermantasyondan türetilen VFA'dan hidrojen üretmiştir

Genç (2010), Biyohidrojen üretim proseslerinin ticarileştirilmesindeki en önemli kısıtlama, düşük hidrojen verimi ve üretim hızıdır. Bu engelleri gidermek için, mikrobiyal topluluğun geliştirilmesi, mikroorganizmaların genetik değişikliği, metabolik yolizi mühendisliği (rekabet edici reaksiyonların elenmesi), biyoreaktör tasarımının geliştirilmesi (organizma tipi, pH, substrat yüklemesi, reaktör tipi, substrat tipi gibi biyoproses parametrelerinin optimizasyonu), H_2 kısmı basıncının ayarlanması gibi biyohidrojen üretim proseslerinin farklı alanlarında ilerlemeler elde edilmiştir.

Kargı ve Ozmihci (2011), biyohidrojen üretimi için karanlık fermantasyon deneyleri buğday nişasta çözeltisinden (10 g/L) peryodik besleme ve atık uzaklaştırma ile gerçekleştirilmiştir. *Clostridium butyricum* NRRL 1024 ve *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 karışım kültürü 1/1 başlangıç biyokütle oranı ile kullanılmıştır. Biyohidrojen üretiminde buğday nişastasının besleme hızının biyohidrojen üretim hızı ve verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Substrat besleme hızı $0.54\text{-}5.52 \text{ g/gün}$ ($\text{HRT } \frac{1}{4} \text{ } 6\text{e}60 \text{ h}$) arasında değişmektedir. En yüksek hidrojen oluşum hızı (280 mL/gün), hacimsel hidrojen oluşum hızı ($1857 \text{ mL H}_2/\text{L gün}$) ve VFAs derişimine, 5.52 g/gün ($\text{HRT } \frac{1}{4} \text{ } 6 \text{ h}$) substrat besleme hızında ulaşılmıştır. En yüksek hidrojen verimine ($109 \text{ mL H}_2 \text{ g TS}^{-1}$) 1.38 g/gün besleme hızında elde edilmiştir.

Keskin ve Hallenbeck (2012), şeker pancarı melası ve siyah kamış şeker endüstrisinin iki önemli atığıdır. Biyolojik hidrojen üretiminde yüksek miktarda sukroz içermelerinden dolayı uygun substratlardır. Fotofermantasyon, şeker dahil farklı substratları verimli bir şekilde hidrojene çevirme kapasitesindedir. Şeker pancarı melası, siyah kamış ve sukrozdan fotofermantasyon ile hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Tek basamaklı fotofermantasyon ile şeker pancarı melasından (1 g/L şeker) 10.5 mol

H₂/mol sukroz, siyah kamıştan (1 g/L şeker) 8 mol H₂/mol sukroz ve saf sukrozdan 14 mol H₂/mol sukroz biyohidrojen verimine ulaşılmıştır ve iki basamaklı sistemlere enerji girişi ve işletim maliyetlerini azalttığından alternatif olarak gösterilmiştir.

Hallenbeck vd. (2013), fotosentetik bakteri *Rhodobacter capsulatus* JP91 ile glikozdan fotofermantasyon ile hidrojen üretimi sürekli reaktörde gerçekleştirilmiştir. Üç farklı kalma süresinde (HRT; 24, 48, 72 h) stabil ve yüksek hidrojen verimine ulaşılmıştır. Hidrojen üretim hızı 0.57 ile 0.81 mmol/h arasında değişiklik arz ederken optik yoğunluk (OD_{600 nm}) farklı HRT'ler için benzer özellikler göstermiştir. Glikoz tüketim hızı ise 24 h'lık HRT'de 48 ve 72 saatliğe göre daha yüksektir. En yüksek hidrojen verimine 9 mol H₂/mol glikoz, 24 h HRT'de ulaşılmıştır. Sonuçlar, glikoz ile sürekli işletilen tek basamaklı fotofermantatif hidrojen üretim veriminin, iki basamaklı hidrojen üretimine ve karışım kültür çalışmalarına kıyasla yaklaşık stokiyometrik verime yakınlığı doğrultusunda daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Reungsang ve Sreela-or (2013), Anaerobik karışım kültür kullanılarak ananas atığından hidrojen üretimini etkileyen parametreleri optimize etmek amacıyla istatistiksel deney yöntemi uygulanmıştır. Plackett-Burman yöntemi substrat derişiminin, başlangıç pH'ının ve FeSO₄ derişiminin istatistiksel olarak (p<0.05) hidrojen üretim potansiyeli (Ps) ve spesifik hidrojen üretim hızı (SHPR) üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Önemi belirlenen üç farklı parametre cevap yüzey metodu central composit design (CCD) yöntemi ile optimize edilmiştir. Substrat derişiminin 25.76 g toplam şeker/L, başlangıç pH'ının 5.56 ve FeSO₄ derişiminin 0.81 g/L olduğu durumlarda maksimum 5489 mL H₂/L Ps, 1.83 mol H₂/mol glikoz ve 77.31 mL H₂/g askıda katı uçucu.h SHPR değerlerine ulaşılmıştır.

Ozyurt vd. (2014), karanlık fermantasyon ile biyohidrojen üretiminde mikroorganizma saklama koşullarının ve farklı besi ortamlarının hidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. Besi ortamı olarak peyniraltı suyu, patates suyu ve zenginleştirilmiş patates suyu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde peyniraltı suyu ile üretilen gaz miktarı diğer ortamlara göre 2.5 kat daha fazladır. Diğer ortamlar da 69–92 saat

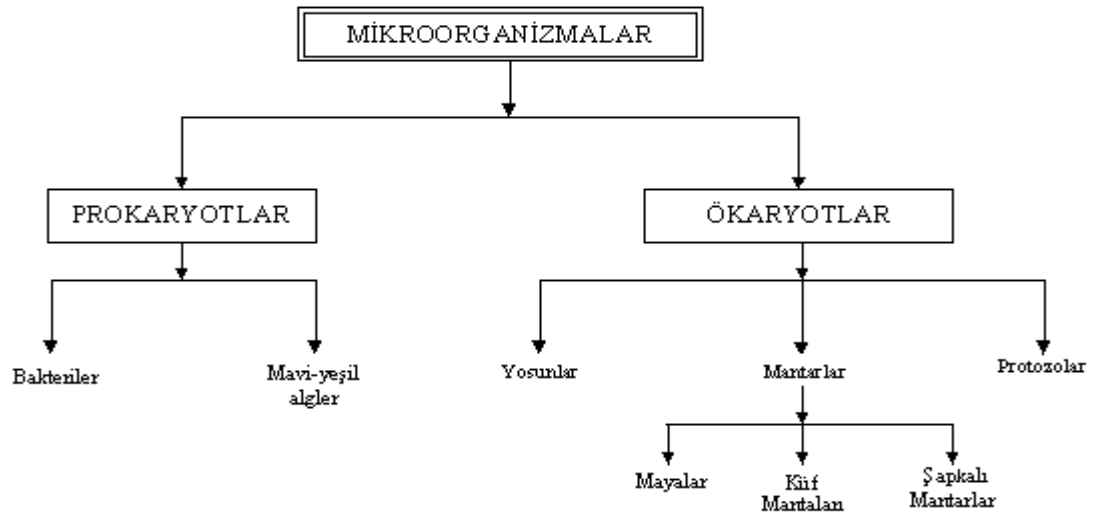
sonunda gaz üretimi dururken, peyniraltı suyu ile yapılan çalışmada ancak 141 saat sonunda gaz üretimi sona ermiştir. Patates ortamlarında ise hiçbir kimyasal eklenmemiş patates ortamında, kimyasallı patates ortamına göre %30 daha fazla gaz miktarı elde edilmiştir. Bu da patates ortamı ile yapılan çalışmayı, daha ekonomik hale getirmiştir.

Liu vd. (2015), karanlık fermantasyon (DFB) ve fotofermantasyon (PFB) bakterilerinin birleştirilmesi atık biyokütlenin tamamının geri dönüşümüne olanak verdiğinden hidrojen üretiminde kullanılabilir. Ancak şu ana kadar yapılan karışım kültür çalışmaları, karanlık fermantasyon atığının karmaşık önışlemleri veya karanlık ve fotofermantasyonun dengesizliğinden sıkıntı çekmiştir. Bu çalışmada, organik substratı tamamen bioenerjiye dönüştürecek birleştirilmiş karanlık ve fotofermantasyon reaktörü (IDPFR) geliştirilmiştir. *Ethanoligenens harbinense B49* ve *Rhodopseudomonas faecalis RLD-53* mikroorganizmaları karanlık ve foto bölümlerine bir membran aracılığı ile ayrılmış, böylece *E. harbinense B49*'ın karanlık bölümde ürettiği asetat özgürce *R. faecalis RLD-53*'e karbon kaynağı olmak üzere foto bölümüne geçiş yapabirmiştir. Hidrojen verimi foto bölümünün hacminin artmasıyla artmış ve 3.38 mol H₂/mol glikoz verimine 1:4 (karanlık:foto) bölüm oranında ulaşılmıştır. IDPFR reaktöründe hidrojen verimi ayrıca fosfat tampon derişiminden, glikoz derişiminden ve karanlık: fotosentetik bakteri oranından etkilenmektedir. Maksimum hidrojen verimine fosfat tampon derişiminin 20 mmol/L, glikoz derişiminin 8 g/L ve karanlık: fotosentetik bakteri oranının 1:20 olduğu durumda 4.96 mol H₂/mol glikoz olarak ulaşılmıştır.

3. KURAMSAL TEMELLER

3.1 Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

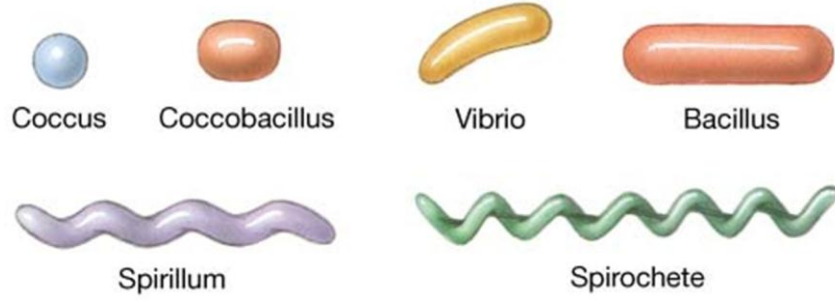
Mikroorganizmalar şekil 3.1’den görülebileceği gibi iki ana grupta incelenmektedir. Bunlar; prokaryotlar ve ökaryotlardır. Her iki grubun da alt grupları bulunmaktadır. Prokaryotlar; bakteriler ve mavi-yeşil algler olmak üzere iki alt grupta, ökaryotlar ise; mantarlar, algler ve protozoa olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir.



Şekil 3.1 Mikroorganizmaların sınıflandırılması (Pekin 1979)

3.2 Bakteri

Bakteri, birkaç mikrometre uzunluğunda küresel (coccus) spiral (spirillum), virgül (vibrio) ve çubuksu (bacillus) yapıya sahip, tek hücreli mikroorganizma grubundandır. Yeryüzündeki her ortamda bakteriler mevcuttur. Örneğin; toprakta, deniz suyunda, okyanusun derinliklerinde, yer kabuğunda, deride, hayvanların bağırsaklarında, asitli sıcak su kaynaklarında, radyoaktif atıklarda dahi üreyebilen türleri bulunmaktadır (Fredrickson vd. 2004). Bakterilerin araştırıldığı bilim dalı mikrobiyolojinin alt birimi bakteriyolojidir.



Şekil 3.2 Bakterilerin şekilsel yapıları

3.3 Bakterinin Tarihçesi

Bakteriler ilk defa 1676'da Antonie van Leeuwenhoek tarafından, kendi tasarımı olan tek mercekli bir mikroskopla gözlemlenmiştir (Porter 1976). Onlara "animalcules" (hayvancık) adını takmış, gözlemlerini Kraliyet Derneği'ne (Royal Society'ye) yazılmış bir dizi mektupla yayımlamıştır. Bacterium adı çok daha sonra, 1838'de Christian Gottfried Ehrenberg tarafından kullanıma sokulmuş, Antik Yunanca "küçük asa" anlamına gelen βακτήριον -α (bacterion -a)'dan türetilmiştir. Latince kullanımıyla bacteria, bakteri sözcüğünün çoğulu, bacterium ise tekildir.

Louis Pasteur 1859'da fermentasyonun mikroorganizmaların büyümesi sonucu meydana geldiğini ve bu büyümenin yoktan varoluş yoluyla olmadığını gösterdi. (Genelde fermentasyon kavramıyla ilişkilendirilen maya ve küfler, bakteri değil, mantardır.) Kendisiyle aynı dönemde yaşamış olan Robert Koch ile birlikte Pasteur, hastalık-mikrop teorisi'nin erken bir savunucusu olmuştur. Robert Koch tıbbi mikrobiyolojide bir öncü olmuş, kolera, şarbon ve verem üzerinde çalışmıştır. Verem üzerindeki araştırmalarında Koch mikrop (germ) teorisini kanıtlamış, bundan dolayı da kendisine Nobel Ödülü verilmiştir. Koch postülatları'nda bir canlının bir hastalığın nedeni olduğunu belirlemek için gereken testleri ortaya koymuştur; bu postülatlar günümüzde hâlâ kullanılmaktadır.

On dokuzuncu yüzyılda bakterilerin çoğu hastalığın nedeni olduğu bilinmesine rağmen, antibakteriyel bir tedavi mevcut değildi (Thurston 2000). 1910'da Paul Ehrlich

Treponema pallidum 'u (frengiye neden olan spiroket) seçici olarak boyamaya yarayan boyaları değiştirerek bu patojeni seçici olarak öldüren bileşikler elde etti, böylece ilk antibiyotiği geliştirmiş oldu (Schwartz 2004). Ehrlich, bağışıklık üzerine yaptığı çalışmasından dolayı 1908 Nobel ödülünü kazanmış, ayrıca bakterilerin kimliğini tespit etmek için boyaların kullanılmasına öncülük etmiştir; çalışmaları Gram boyası ve Ziehl-Neelsen boyasının temelini oluşturmuştur.

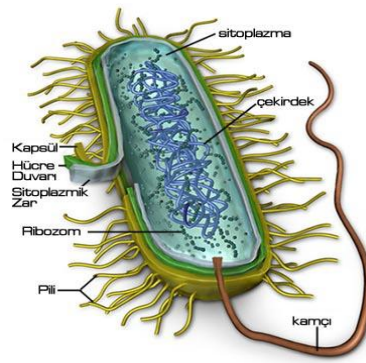
Bakterilerin araştırılmasında büyük bir aşama, arkelerin bakterilerden farklı bir evrimsel soya ait olduklarının 1977'de Carl Woese tarafından anlaşılmasıdır (Woese ve Fox 1977). Bu yeni filogenetik taksonomi, 16S ribozomal RNA'nın dizilenmesine dayandırılmış ve üç alanlı sistem'in parçası olarak prokaryot alemi 2 evrimsel alana bölünmüştür (Woese vd. 1990).

3.4 Bakteri Hücre Yapısı

Bakteriler, basit canlılar olmalarına karşın özel birçok biyolojik özelliklerden sorumlu çok iyi gelişmiş hücre yapısına sahiptir. Bu özelliklerden birçoğu sadece bakterilere özeldir ve arkelerde veya ökaryot canlılarda bulunmamaktadır. Bakteriler; kendilerinden daha büyük canlılara kıyasla daha basit yapılara sahip oldukları ve deneysel olarak kolayca değişime uğratılabildikleri için, yapıları çok iyi anlaşılmış ve kendisinden daha gelişmiş canlılarda da bulunan birçok biyokimyasal özelliğin bakterilerde bulunduğu ortaya çıkmıştır.

Bakterilerde hücre zarfı, hücre zarı ve hücre duvarından oluşmaktadır. Diğer organizmalarda olduğu gibi; bakteri hücre duvarı, bakteriye yapısal bütünlük sağlamaktadır. Prokaryot canlılarda, hücre duvarının ilk görevi hücre içi protein konsantrasyonunun hücre dışı protein konsantrasyonundan oldukça büyük olması sonucu ortaya çıkan turgor basıncından hücreyi korumaktır. Bakteri hücre duvarı, diğer organizmalardan farklı olarak peptidoglikandan oluşmaktadır. Peptidoglikan, değişen N-asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) parçalarının eşit miktarda bir araya gelmesiyle oluşan bir polisakkarittir. Peptidoglikan hücre duvarının

sıklığından ve hücre şeklinin oluşmasından sorumludur. Bu yapı, göreceli olarak oldukça fazla pora sahiptir ve küçük maddelere karşı bir bariyer görevi görmemektedir. Tüm bakteri hücre duvarları (mikoplazma gibi birkaç bakteri hariç) peptidoglikan içermesine karşın, tümü aynı yapısal özellik göstermezler. Bakterilerde yaşam için hücre duvarı bulunduğundan - ve ökaryotlarda bulunmadıklarından - antibiyotikler insan hücrelerine zarar vermeden hücre duvarı sentezini bozarak bakteri enfeksiyonlarını durdururlar.

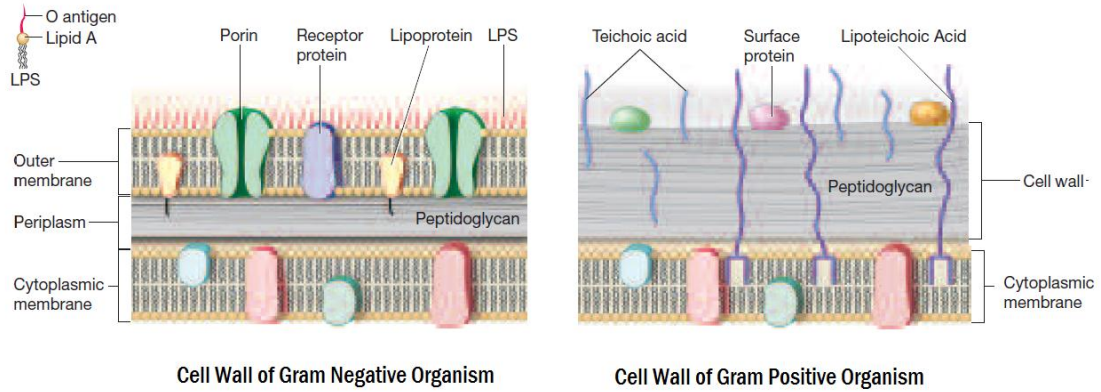


Şekil 3.3 Bakteri hücre yapısı

İki temel tip bakteri hücre duvarı vardır: biri Gram-pozitif diğeri de Gram-negatif. Bu farklılaşma Gram boyasıyla boyanıp boyanmama durumuna göre değişmektedir. Her iki hücre duvarı tipi için de 2 nanometreden küçük maddeler porlardan geçebilmektedir. Eğer bakteri hücresi tamamen ortadan kalkmışsa protoplast, kısmen ortadan kalkmış ya da zarar görmüşse sferoplast olarak isimlendirilir. Penisilin gibi β -Laktam antibiyotikleri peptidoglikan yapısındaki çapraz zincirleri kırarak yapısını bozar. İnsan gözyaşında bulunan lizozim enzimi de bakterinin hücre duvarını eriterek vücudun savunmasına katkı sağlar.

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı, bu duvarın %95'ini oluşturan kalın bir peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır. Bu oran Gram-negatiflerde %5-10'dur. Bazı Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı glikozamin'lere ve muramikasit'lere saldıran lizozim ile tamamen parçalanabilmektedir. Fakat *Staphylococcus aureus* gibi bazı

Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı lizozime karşı dirençlidir. Çünkü bu bakteriler, hücre duvarlarının muramikasit kısımlarındaki 6. karbonda O-asetil grubuna sahiptir. Gram-pozitif hücrelerin duvarlarında teikoik asit ve bazı polisakkaritler bulunmaktadır. Teikoik asit bunlardan en yaygın olanıdır. Bu madde, ribitol fosfat ve gliserol fosfattan oluşmakta ve sadece Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarının yüzeylerinde yer alırlar. Fakat teikoik asitin fonksiyonu tam olarak anlaşılamamıştır ve tartışmalıdır. Gram-pozitif hücre duvarının önemli bileşenlerinden biri de lipoteikoik asittir. Bu maddenin fonksiyonlarından biri de bakteriye antijenik özellik katmaktır. Teikoik asidin hücre zarı ile bağlantısı bulunmamasına karşın lipoteikoik asidin hücre zarı lipid tabakası ile bağlantısı vardır.



Şekil 3.4 Gram negatif ve gram pozitif hücreler arasındaki yapısal farklılıklar

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı Gram-pozitiflerin tersine oldukça incedir. Bu sebeple de darbelere daha duyarlıdır. Gram-negatif bakterilerde hücre zarının hemen yakınında bir peptidoglikan tabaka bulunmakla beraber ilk hücre duvarı katmanından biraz uzakta aynı yapıya sahip bir ikinci yapı daha bulunmaktadır. Bu yapılar, Gram boyasında bakterinin boyanmamasında etkili olur. Dış yapı lipopolisakkarit ve fosfolipid içerir. Dış katmanın sahip olduğu lipopolisakkaritler sıklıkla bakterilerin alt türlerinde değişiklik gösterir ve antijen özelliği göstermektedir. Endotoksin olarak da adlandırılan lipopolisakkaritler, polisakkarit ve lipid A'dan oluşmaktadır ve bakteri toksisitesinden sorumludur. Gram-negatif bakterilerin peptidoglikan tabakaları arasında periplazmik boşluk olarak adlandırılan bir yapı bulunmaktadır. Bu yapı, madde alışverişinde görevli proteinler ve parçalayıcı enzimler içerir.

Bakteriyel hücre zarı; ikili fosfolipid katmanından oluşmuştur. Bu sebeple de diğer canlılarda olduğu gibi hücre zarı seçici geçirgen özellik gösterir ve madde alışverişinde görev alır. Bu fonksiyonlara ek olarak prokaryot hücre zarları enerji üretimi için gerekli protomotor kuvvetin üretilmesinden sorumlu yapı ve maddeleri içerir. Ökaryotların tersine bakteriyel hücre zarında sterol bulunmaz (mikoplazmalar gibi bazı bakteriler hariç). Fakat bakteriler, sterolün görevini üstlenen ve sterol benzeri bir madde olan hopanoidleri içerir. Yine ökaryotların tersine bakteriyel hücre zarı oldukça geniş çeşitlilikte yağ asidi içerir. Bu yağ asitleri, tipik doymuş ve doymamış yağ asidi yapısıyla beraber metil, hidroksil ve hatta siklik gruplar içerir. Bu yağ asitlerinin oranları, bakteri tarafından ayarlanarak hücre zarının akışkanlığı düzenlenir.

Fosfolipidler gibi yağ asidi molekülleri de yüklü moleküllere karşı geçirgen değildir. Ancak porin adı verilen proteinler vasıtasıyla pasif taşıma ile iyonlar, sakkaritler ve aminoasitler taşınır. Bu moleküller hücre zarının sitoplazmaya bakan sitoplazmik membran ile dış yüzeye bakan dış membran arasında periplazma denilen aralıkta bulunmaktadır. Periplazma, peptidoglikan tabaka ve maddelerin bağlanmasını sağlayan veya hidrolizis ve hücre dışı sinyallerin alınmasından sorumlu proteinleri içerir. Periplazma yüksek peptidoglikan ve protein içeriği nedeniyle akışkan olmaktan çok jel tipi bir yapıya sahiptir. Dış membran ile sitoplazmik membran arasında bulunmasından dolayı, alınan sinyaller ve bağlanan maddeler; içinde gömülü olarak bulunan taşıyıcı proteinler ve sinyal proteinleri sayesinde taşınmaktadır.

3.5 *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* Mikroorganizmaları

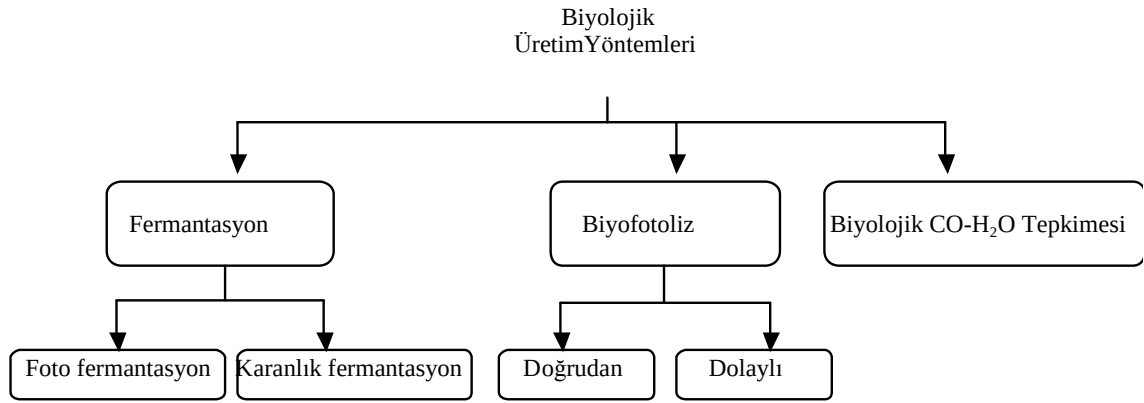
Mikroorganizma olarak adlandırılan ve çoğunlukla tek hücreli olan küçük canlılar insan yaşamını pek çok şekilde etkiler. Bu küçük canlılar insan, hayvan, bitki hastalıklarına ve besin maddelerinin bozulmalarına neden oldukları için zararlı görünmelerine karşın besin, ilaç ve kimya sanayinde birçok maddenin üretilmesinde ve yeryüzündeki canlı hayatının devamını etkileyen kritik faaliyetlerin yerine getirilmesinde insanlık yararına önemli rol oynarlar. Çok sayıda bakteri çeşidi bulunmaktadır. Bu çalışmada *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* bakterileri esas alınmıştır.

Clostridium butyricum, mezofilik, spor oluşturan, çubuk şeklinde, gram pozitif ve katı anaerobik (oksijensiz ortamda çoğalan) bir mikroorganizmadır (Tanasupawat vd. 2014). Toprak, sediment, canlı ağaçların çürüyen bölümleri, sağlıklı çocuk ve erişkinlerin dışkıları, bozuk süt ve peynir ürünlerinde görülmektedir (Cato vd. 1986, Meng vd. 1997, Wiegel vd. 2006). İnsan patojeni olarak bildirilmemesine karşın, insan ve hayvanlar için Asya ülkelerinde probiyotik olarak yaygın kullanım alanı bulunmaktadır (Seki vd. 2003). *Clostridium* türleri fermentasyon ile çeşitli asit ve alkol üretimini gerçekleştirmektedir. Başlıca ürünleri; butirik asit, farklı derişimlerde asetik asit, laktik asit ve/veya etanol, propanol veya butanoldür. Besin kaynağı olarak glikoz, sukroz, laktoz ve maltoz veya karmaşık yapıdaki nişasta ve selülozu kullanmaktadır. Gelişmesi için en uygun sıcaklık aralığı 28-37 °C'dir. pH değeri ise 6-7 aralığında maksimum çoğalma sağlar. *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının yaygın olarak kullanıldığı alan bu tez kapsamında olduğu gibi karanlık fermentasyon yöntemiyle biyohidrojen üretimidir.

Enterobacter aerogenes ise, mezofilik, çubuk şeklinde, gram negatif, fakültatif (oksijenli ve oksijensiz ortamda çoğalabilen) bir mikroorganizmadır. Toprak, su, süt ürünleri ile hayvan ve insan bağırsaklarında bulunmaktadır. *Enterobacter aerogenes* çeşitli besin kaynakları glikoz, galaktoz, fruktoz, sukroz, maltoz ve laktoz'dan karanlık fermentasyon ile (Yokoi ve Haruhiko 1995) biyohidrojen üretiminde saf kültür olarak veya *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile karışım kültür oluşturarak kullanılmaktadır. *Clostridium butyricum* mikroorganizması karanlık fermentasyon yöntemi ile en çok H₂ üreten mikroorganizmadır. Ancak O₂ varlığında H₂ üretimini durdurmaktadır. *Enterobacter aerogenes* hem H₂ üreticisi (*Clostridium butyricum*, *Enterobacter aerogenes*'den 2 kat fazla H₂ üretimi yapabilmektedir) hem de O₂ tüketicisidir. Yürütülen doktora tezi kapsamında *Clostridium butyricum* ile birlikte *Enterobacter aerogenes* kullanımının amacı, oksijeni yok etmek için kullanılan L-cysteine katkı maddesinin kullanımının ortadan kaldırılmasının yanısıra, H₂ üretimine katkıda bulunmasının sağlanmasıdır. Gelişmesi için en uygun sıcaklık aralığı 30-37 °C'dir. pH değeri ise 6-7 aralığında maksimum çoğalma sağlar.

3.6 Biyohidrojen

Biyohidrojen kavramı, yenilenebilir enerji kaynaklarından (güneş, su, organik atıklar) hidrojenin biyolojik ya da fotobiyolojik yolla üretimi için kullanılmaktadır. Bu amaçla bazı bakteriler ve mikroalglerden yararlanılmaktadır. Bunlar algler, siyanobakteriler, fotosentetik ve fermantif bakterilerdir. Biyolojik hidrojen üretimi üç farklı grupta incelenir; fermantasyon, biyofotoliz ve biyolojik CO-H₂O tepkimesi yöntemleridir ve şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri

3.6.1 Fermantasyon

3.6.1.1 Foto fermantasyon

Fotosentetik bakteriler, biyokütle ve organik asitlerden nitrogenaz enzimini ve güneş enerjisini kullanarak hidrojen üretme kapasitesine sahiptir. Son yıllarda bu konu ile ilgili çalışmalarda, girdi olarak endüstriyel ve tarımsal atıklar kullanılmaya başlanmıştır.

Fotosentetik bakterileri kullanmanın avantajları şu şekilde sıralanabilir (Uyar 2008) :

- a.Yüksek substrat dönüşüm etkisine sahiptirler.
- b. Çeşitli çevre şartlarına göre (aerobik, anaerobik, ışıklı ya da ışıksız) fonksiyonel hale gelerek dayanabilirler.
- c.Geniş aralıktaki ışık spektrumunda çalışılabilir ve yüksek ışık yoğunluğuna dayanabilirler.

Fotosentetik bakteriler, fotofermantasyon sonunda uygun organik bileşikler ortama verildiğinde, azot yokluğu gibi stres koşulları altında iken ve oksijensiz ortamda büyütüldüklerinde hidrojen üretebilmektedirler (Meyer vd. 1978, Nandi ve Sengupta 1998). Oksijen ve amonyum iyonları hidrojen üretimini baskılayan yani negatif yönde etkileyen iki önemli faktördür. Bu mikroorganizmalar oksijensiz fotosentez yaptıklarından dolayı nitrogenaz enziminin oksijene duyarlılığı bir problem olarak ortaya çıkmamaktadır.

Fotosentetik bakterilerle hidrojen üretimi sırasında, nitrogenaz ve hidrogenaz enzimleri rol oynar. Nitrogenazdan başka hücrelerin redoks durumlarına göre hidrojen katalizi ile ilgili iki yönlü çalışan hidrogenaz (reversible) ve hidrojen tüketen hidrogenaz (uptake hydrogenase) enzimleri baskılanır ya da aktive olurlar. En iyi moleküler hidrojen üretimi bu üç enzim aktivitesinin dengelendiği durumlarda olmaktadır. Ortamdaki organik asitler hidrojen ve karbondioksite dönüştürülmektedir (Nandi ve Sengupta 1998) .

Hidrojen üretim hızını etkileyen faktörler incelendiğinde, hidrojen üretiminin, üretime katılan enzimler veya çevresel faktörler tarafından etkilendiği bulunmuştur (Benemann ve Hallenbeck 2002, Melis 2002). Işık önemli bir etken olarak ortaya çıkmakta, ışığın yoğunluğu, dağılımı hidrojen üretimini etkilemektedir. Ayrıca, azotlu bileşiklerin konsantrasyonu, indirgenmiş bileşiklerin konsantrasyonu, besi ortamının pH değeri, sıcaklık, tuz miktarı, ortamın oksijen içermesi ve ortamdaki farklı metaller de üretim hızını etkileyen diğer faktörler arasındadır. Bunun yanı sıra fotobiyoreaktörün tipi, özellikle fotobiyoreaktör yüzey/hacim oranı hidrojen üretimini etkileyen faktörler arasındadır. Hidrojen üretimini sınırlayan fiziksel değerler tam olarak

oluşturulamadığından, hidrojen verimi istenilen düzeyde değildir ve üretimin artırılması gelecekteki temel hedeflerdendir.

3.6.1.2 Karanlık fermantasyon

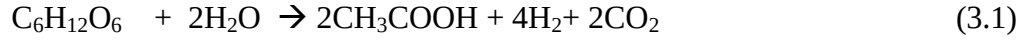
Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi süresince, anaerobik bakteriler organik substratları kullanarak karanlık şartlarda hidrojen üretirler. Bu proses “karanlık hidrojen fermantasyonu” olarak adlandırılır. Çünkü kullanılan anaerobik bakteriler ışığa ihtiyaç duymazlar. Birçok anaerobik mikroorganizma karbonhidrat içeren substratları kullanarak hidrojen üretebilir. Bu mikroorganizmalar arasında *Enterobacter*, *Bacillus* ve *Clostridium* türleri öne çıkmaktadır. Hidrojen üretimi bakterilerde bulunan hidrogenaz aktivitesi ile gerçekleştirilmektedir.

Karanlık fermantasyon reaksiyonu ile şeker, aminoasit ve doymuş asit metabolizması sonucunda H_2 , CO_2 ve diğer indirgenen maddeler üretilir (Fırat 2009).

Fermantatif prosesler için kullanılan biyokütlenin biyolojik parçalanabilir olması, yüksek miktarlarda elde edilebilir olması, pahalı olmaması ve yüksek karbonhidrat içeriğine sahip olması gerekir. Glikoz ve laktoz gibi kolaylıkla biyolojik parçalanmaya uğrayan saf, basit şekerler tercih edilir fakat bunlar yüksek miktarlarda kolaylıkla elde edilemezler ve nispeten pahalıdırlar (Şentürk ve Büyükgüngör 2010). Bunun yerine çeşitli biyokütle atıkları tercih edilmelidir.

Anaerobik fermantasyonda üretilen gaz H_2 , CO_2 , CH_4 , CO ve bazı hidrojen sülfidlerin karışımıdır. Bu yüzden yüksek saflıkta hidrojen elde etmek için ayırma aşaması gereklidir. Fermantasyon prosesi asetik, butirik ve daha önemli bir problem olan diğer organik asitleri üretir. Bu asitler organik kimyasal üretim yönündeki metabolik akışı yönlendirerek hidrojen verimini baskılayabilir. Aynı zamanda bu asitlerin üremesi sistemdeki komplekslik ve maliyete ek olarak daha sonrasında atıksu arıtımını gerektirir. Bu işlemlerden herhangi birinin hidrojen üretimini maksimum yapmak ve prosesi basitleştirmek için elimine edilmesi gerekebilir (Şentürk ve Büyükgüngör 2010).

Aşağıda karanlık fermantasyon yönteminde gerçekleşen tepkimeler gösterilmiştir.



3.6.1.2.1 Karanlık fermantasyonu etkileyen faktörler

Hidrojen üretim proseslerinde yüksek verimde ürün elde edebilmek için, pH , sıcaklık, substrat türü ve derişimi, HRT (Hidrolik Alıkonma Süresi) , mikroorganizma türü, yan ürün oluşumu, hidrojen kısmi basıncı, ölçek büyütme oranı ve katkı maddeleri gibi parametrelerin optimum değerlerde işletilmesi gerekmektedir.

- **pH:** Hidrojen üretimi ve organik asitlerin oluşumu pH değerinde düşüşe neden olmaktadır. Eğer pH kontrol edilmez ise fermantasyonun sonuna doğru çözücüler oluşabilir. Bu da hidrojen üretiminin gerilemesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda hidrojen üretiminde, optimum pH değeri 6-7 arasında tespit edilmiştir (Fırat 2009).
- **Kısmi Basıncı:** Sıvı fazdaki hidrojen kısmi basıncı, H₂ üretimine etki eden en önemli faktörlerden biridir. Hidrojen üretiminin temeli reoksidenin ferrodoksine indirgenmesi tepkimesi ve hidrojen taşıyıcı koenzimlerdir. Bu reaksiyonlar sıvı fazdaki hidrojen artışından olumsuz etkilenirler. Hidrojen derişimi arttığı zaman, metabolik yol izi ile laktat, etanol, aseton, bütanol veya alanin gibi substratlar üretilmektedir. Bu substratlar üretilen hidrojen miktarının azalmasına neden olurlar. Literatürde sıvı fazdaki hidrojen kısmi basıncını azaltmak için N₂ püskürtmesi ya da karıştırma yapılarak ortamdaki hidrojenin uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- **HRT:** Sürekli işletimlerde hidrojen verimini etkileyen diğer bir parametre de hidrolik alıkonma süresi (HRT)'dir. Anerobik mikroorganizmalar ile atık sular kullanılarak 0.5 gün optimum HRT değerinde maksimum hidrojen üretim etkisi

incelendiğinde, HRT 0.5 günden 3 güne artırıldığında hidrojen üretim hızının 198 mmol/ L.gün'den 34mmol/ L. gün 'e düştüğü görülmüştür. Bu nedenle HRT ile hidrojen veriminin ters orantılı olduğu söylenebilir (Fırat 2009).

- **Sıcaklık:** Uygun aralıkta sıcaklık artışı, hidrojen üreten bakterinin yeteneğini artırır. Fakat çok yüksek seviyelerdeki sıcaklık azaltır (Genç 2010).
- **Mikroorganizma:** Hidrojen üreten mikroorganizmalar zorunlu anaeroblardır. Bundan dolayı, argon, azot, hidrojen gazı ve *L-cysteine*. HCl gibi indirgeyici maddeler ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak için kullanılırlar. Ancak indirgeyici madde kullanımı prosesin maliyetini artırıcı bir etkidir. Bu olumsuzluğu ortadan kaldırmak için fakültatif mikroorganizmalar ile karışım kültür çalışmalarına ağırlık verilmiştir. Örneğin *Enterobacter aerogenes* fakültatif bir anaerobtur ve *clostridia* türleri karışım kültür oluşturarak hidrojen üretebilir. *Clostridium butyricum* ile hidrojen üretiminde *Enterobacter aerogenes* kullanarak indirgeyici madde olmaksızın yüksek verimde hidrojen üretilmektedir (Fırat 2009).
- **Susstrat:** Fermantasyon için üç farklı biyokütleden söz edilebilir; şeker içeren biyokütle (şeker pancarı, şeker kamışı), nişastalı biyokütle (patates, hububat), lignoselülozik biyokütle (çimen, ağaç, saman). Bu biyokütleler çeşitli tarımsal atıklar olabileceği gibi biyokütle işleyen endüstrilerden kaynaklanabilen atıklar da (pancar küspesi, melas, patates kabuğu, elma küspesi, buğday kepeği) olabilmektedir. Şeker, nişasta ve selülozdan fermantatif hidrojen üretimi üzerine çok sayıda araştırmalar yapılmıştır (Genç 2010).
- **Yan ürün:** Karanlık fermantasyonu diğer proseslerden ayıran avantajlarından biri de değerli yan ürünler oluşmasıdır. Oluşan ürünler; organik asitler (laktik asit, formik asit, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit) ve alkollerdir (etanol, propanol, butanol, 2,3-Butanediol). Optimum H₂ verimine son ürün olarak asetik asit oluşumu ile ulaşılmaktadır. Ancak uygulamada, yüksek H₂ 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 üstün bir mikroorganizmadır. Heksoz kullanılarak propiyonat üretimi ve üretilen asetik asit kullanılarak etanol oluşumu eşitliklerinde H_2 tüketilmektedir. Bu yüzden propiyonat ve etanol üretimi engellenmelidir (Fırat 2009).

- **Ölçek Büyütme Oranı:** Ölçek büyütme oranı büyüdükçe ölçek büyütme sayısı artar. Ölçek büyütme mikroorganizmanın en aktif zamanında (üstel çoğalma fazında) yapılmalıdır. Üretim ortamı ile ortam mümkün olduğunca aynı içerikte olmalıdır. Çalışma hacminin en az % 5'i kadar aktarım yapılmalıdır. Ölçek büyütme oranı gecikme fazı açısından önemlidir (Jackson 1990).
- **Katkı maddeleri :** Biyohidrojen üretimi fermentasyon süresince önemli ölçüde mikronutrientlere ihtiyaç duymaktadır. Na, Mg, Ni ve Fe mikroorganizmada hidrojen metabolizmasını önlenli ölçüde etkileyen iz metallerdir. Bu elementler bakteri enzim kofaktörü, taşıma prosesi ve dehidrogenazda ihtiyaç duyulmaktadır. Anaerobik bakteri ile fermentatif hidrojen üretiminde katkı maddelerinden demir, hidrojenin oksidasyonunu katalizleyen veya protonu indirgeyen iki ana başlıkta incelenen nikel-demir (Ni-Fe) ve sadece demir (Fe-Fe) hidrojenazlar açısından önemlidir. Demir, hidrojenaz enziminin aktivitesini arttırmasından dolayı fermentatif hidrojen üretimini etkilemektedir (Wang ve Wan 2008). Aynı şekilde diğer bir katkı maddesi olan azot hidrojen üreten bakterinin üremesinde önemli rol oynar ve genellikle amonyak azot kaynağı olarak kullanılır. Amonyak uygun derişim aralığında hidrojen üretimine yararlı olmasına rağmen, yüksek derişimlerde kullanılırsa bakterinin hücre içi pH değerini değıştirmesinden dolayı inhibe edici özelliğı vardır (Wang vd. 2009). Bundan dolayı uygun amonyak derişiminin belirlenmesi gerekmektedir.

Doktora tezi kapsamında substrat türü/derişimi, katkı maddesi, karışım kültür ile mikroorganizma aktarım oranı ve pH üzerine deneysel çalışmalar ayrıntılı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.1.3 Ardışık (sequential) fermentasyon

Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi fermentasyon süresince çoğalma ortamında biriken organik asitlerin pH değerini düşürmesi sonucunda yüksek verim elde edilmesini engellemektedir. Bu amaçla pH kontrolün sağlanamadığı durumlarda fotosentetik bakterilerin karanlık fermentasyon ile üretilen besi ortamındaki organik asitleri kullanarak hidrojen üretme kapasitesi araştırılmış ve iki aşamalı biyohidrojen üretimi literatürde yerini almıştır. Karanlık ve foto fermentasyonun ardışık işletiminde karanlık fermentasyonda sadece ürün olarak asetik asit üretimi gerçekleştiğinde, maksimum teorik hidrojen verimi 12 mol H₂/mol glikoz değerine yükseleceği öngörülmüştür. Ancak foto fermentasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için karanlık fermentasyon atığının belirli ön işlemlerden geçmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu gerekliliklerden ikisi toplam organik asitlerin ve amonyum derişiminin sırasıyla 2500 mg/L ve 40 mg/L'den düşük olmasıdır. Ayrıca glikozun karanlık fermentasyonda tamamen tükenmemesi, fotofermantatif bakterinin yol izini organik asit kullanımından glikoza kaydırarak uzun süreli düşük H₂ üretim verimine neden olmaktadır.

Deneysel olarak 12 mol H₂/mol glikoz değerine ulaşmak, karanlık fermentasyon süresince üretilen çeşitli organik asitler, substratın mikroorganizma üremesinde kullanımı ve PHB oluşumu nedeniyle mümkün olamamaktadır. Ekonomik açıdan uygun biyohidrojen üretim prosesi oluşturmak için en az 8 mol H₂/mol glikoz verimine ulaşmak bir çok araştırmacının başlıca amacıdır. Bu amaçla bir çok deney tasarımı farklı mikroorganizmalar, farklı işletim türleri, farklı işletim parametreleri ile gerçekleştirilmiştir. Ardışık fermentasyon ile biyohidrojen üretimi çizelge 3.1'de verilmiştir. Tablo 3.1'de (Argun ve Kargi 2011) görüldüğü üzere en yüksek ardışık fermentasyon ile biyohidrojen verimine, 10 g/L şeker patates nişastasının besi ortamı olarak kullanıldığı kesili işletim durumunda 7.2 mol H₂/ mol glikoz olarak ulaşılmıştır. Ardışık fermentasyon yöntemi ile biyohidrojen üretiminde sıklıkla karşılaşılan verim birimi, hacim başına kimyasal oksijen giderimidir (g COD/L). Nedeni, organik bileşiklerin fermentasyon süresince ne kadarının yakılarak H₂'ne dönüştüğünün göstergesidir.

Çizelge 3.1 Literatürde ardışık fermantasyon ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar

Substrat türü ve derişimi	Karanlık fermantasyon (KF) mo	Fotofermantasyon (FF) mo	KF verimi ^a	FF verimi ^a	KF işletim türü	FF işletim türü
Hidrolize Cassava nişastası (25g/l)	Ön ısıtmalı aktivasyon çamuru	<i>Rhodopseudomonas plaustris</i>	2.0	0.86	Kesikli	Kesikli
Şeker pancarı melası (15g sukroz/L)	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	hup_mutant of <i>R. capsulatus</i>	2.10	4.75	Kesikli	Kesikli
Öğütölmüş arpa çözeltisi (6.7 g nişasta/L)	Anaerobik çamur	<i>Rhodobacter</i> sp. RV	1.87	2.68	Kesikli	Kesikli
Cassava nişastası (10.4 g/L)	Anaerobik karışım kültür (genellikle <i>Clostridium</i> sp.)	Fotosentetik karışım kültür (genellikle <i>Rhodobacter palustris</i>)	2.53	3.54	Kesikli	Kesikli
Glikoz (20 g/L)	<i>Clostridium saccharolyticus</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-	4.8	-	Kesikli
Sukroz (17.81 g/L)	<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	<i>Rhodopseudomonas plaustris</i> WP3-5	1.90	3.22	Kesikli	Kesikli
Sukroz (17.81 g/L)	<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	<i>Rhodopseudomonas plaustris</i> WP3-5	0.49 3.28	2.24 2.53	Kesikli Kesikli	Kesikli Sürekli (HRT=1 2h)
Şeker patates nişastası (10 g/L)	<i>Clostridium butyricum</i> ve <i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39 karışım kültürü	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> M-19	2.4	4.6	Tekrarlı kesikli	Tekrarlı kesikli
Şeker patates nişastası (10 g/L)	<i>Clostridium butyricum</i> ve <i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39 karışım kültürü	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> M-19	2.7	4.5	Tekrarlı kesikli	Tekrarlı kesikli
Atık aktivasyon çamuru (10.1 g COD/L)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-	160.5 ^b	Sürekli (HRT= 3 d)	Sürekli (HRT=5 d)
Öğütölmüş arpa (10 g/L)	Anaerobik çamur	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (NRRLB1727)	-	0.45 ^c	Sürekli HRT=1 2 h	Sürekli HRT=72 h

^a mol H₂/mol glikoz

^b mL H₂/g toplam organik asit

^c mol H₂/mol asetat

3.6.1.4 Birleşik (combined) fermantasyon

Birleşik fermantasyon, karanlık ve fotofermantasyonun tek bir reaktör içerisinde birlikte gerçekleştirilmesidir. Bu fermantasyonda amaç, karanlık fermantasyon bakterileri tarafından üretilen organik asitlerin, fotofermantatif bakteriler aracılığıyla kullanılarak H_2 ve CO_2 e dönüştürülmesidir. Toplamda teorik olarak 12 mol H_2 /mol glikoz karanlık ve foto fermantasyonda elde edilebilmektedir. Termodinamik olarak aynı dönüşümü sağlamak ancak 600 °C ve 34.5 MPa basınçta mümkün olabilmektedir. Ancak birleşik fermantasyon ile bu dönüşüm oda sıcaklığında, düşük hızda gerçekleştirilebilmektedir. Biyokütlenin hidrolizi ve karanlık-foto fermantasyon eş anlı işlemektedir. Tipik bir birleşik fermantasyon, uygun karanlık ve fotofermantasyon mikroorganizma aktarım oranında, 5 g/L başlangıç glikoz derişiminde, pH 7 ve 30 °C, Fe (III) ve Mo katkısıyla karanlık/foto aydınlatmasıyla gerçekleştirilmektedir. Birleşik fermantasyonda en büyük problem fotofermantatif bakterilerin karbonhidratları fermente ederek, karanlık fermantasyon bakterilerine organik asitleri oluşturmalarında engel teşkil etmeleridir. Fotofermantatif bakterilerin karbonhidrat kullanımına adapte olmaları, metabolizmalarını organik asit kullanımına dönüştürme süresini arttırmaktadır. Başka bir deyişle fotosentetik bakterilerin, üreme ve ürün oluşturma işlemi, sırasıyla glikozu öncelikli olarak kullanmasının ardından uzun bir lag fazdan sonra organik asitleri kullanımı ile hidrojen üretmeye başlaması durumudur. Bu davranış, organik asitlerin ortamda birikmesi sonucu pH değerinin oldukça düşmesinden kaynaklı, karanlık ve fotofermantasyonu inhibe etmesine neden olmaktadır. Organik asitlerin ortamdan eşzamanlı ayrılması, düşük karbonhidrat kullanımı, uygun mikroorganizma çifti seçimi bu problemin üstesinden gelmeyi sağlayabilir. Birleşik fermantasyonda işletim koşullarının, ortam koşullarının değişimine oldukça hassas olan fotofermantatif bakteriye yakın olarak seçilmesi (pH 7, 150 mV, 30 °C) önerilmektedir. Birleşik fermantasyonda, sürekli işletimde, etkin organik asit fermantasyonu için alıkonma süresinin (HRT) 6 günden fazla olması önerilmektedir.

Birleşik fermantasyon, literatürde ardışık fermantasyonun çalışıldığı kadar çalışılamamıştır. Çizelge 3.2’de (Argun ve Kargi 2011) birleşik fermantasyon çalışmaları ayrıntılı olarak verilmiştir.

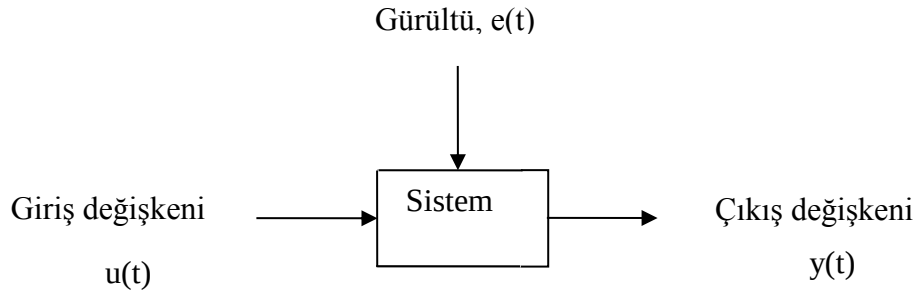
Çizelge 3.2 Literatürde birleşik fermantasyon ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar

Mikroorganizmalar	Substrat	Işık kaynağı	Işık yoğunluğu	Üretim hızı ^a	Verim ^b	Reaktör işletim türü
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702 ve <i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM 158	Glikoz (5 g/L)	Tungsten	135 W/m ²	-	0.86	Kesikli
<i>Clostridium butyricum</i> ve <i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	Glikoz (9 g/L)	Akkor	4 klux	20.83	1.98	Kesikli
<i>Clostridium acidisoli</i> ve <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Sukroz (11.43 g/L)	-	4 klux	-	5.08	Kesikli
Anaerobik çamur ve <i>Rhodobacter sphaeroid</i> NRRL-1727	Öğütülmüş arpa nişastası (12.8 g/L)	Tungsten ve halojen	6	1.40	0.36	Kesikli
Anaerobik çamur ve <i>Rhodobacter</i> sp RV	Öğütülmüş arpa nişastası (4.3 g/L)	Halojen	270 W/ m ²	6.7	1.45	Kesikli
Anaerobik çamur ve <i>Rhodobacter</i> sp NRRL B-1727, <i>Rhodobacter</i> sp DSMZ-158, <i>Rhodobacterpseudomonas palustris</i> DSMZ-127, <i>Rhodobacter</i> sp RV karışımı	Öğütülmüş arpa nişastası (4.1 g/L)	Florosan	9.5 klux	3.86	1.16	Kesikli
Anaerobik çamur ve <i>Rhodobacter</i> sp NRRL B-1727, <i>Rhodobacter</i> sp DSMZ-158, <i>Rhodobacterpseudomonas palustris</i> DSMZ-127, <i>Rhodobacter</i> sp RV karışımı	Öğütülmüş arpa nişastası (3.9 g/L)	Florosan	9.5 klux	7.12	1.03	Kesikli
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NBRC13953 ve <i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Glikoz (4.5 g/L)	Halojen	0.19 uEinstein /m ² s	41.27	7.1	Kesikli
<i>Clostridium butyricum</i> ve <i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	Glikoz (6 g/L)	Akkor	8 klux	33.85	4.13	Kesikli
<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49 ve <i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	Glikoz (6 g/L)	Akkor	4 klux	17.2	3.1	Kesikli
<i>Clostridium butyricum</i> ve <i>Rhodobacter</i> sp. M-19	Nişasta (50 g/L)	Akkor	5 klux	16.5	6.6	Yarı kesikli tekrarlı
Anaerobik çamur ve <i>Rhodobacter</i> sp NRRL B-1727	Öğütülmüş arpa tozu (10 g/L)	Florosan	5 klux	18.1 mLH ₂ /h	1.32	Yarı kesikli
<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM-791 ve <i>Rhodobacter</i> sp. RV	Öğütülmüş arpa tozu (5g/L)	Halojen ve florasen	10 klux	5.95	0.6	Sürekli

Doktora tez önerisinde bulunmamasına karşın, biyohidrojen üretiminde zengin bir deneyime sahip olmak ve biyohidrojen verimini arttırmak amacıyla, Tübitak 2214/A Doktora sırası araştırma bursu aracılığıyla, Montreal Üniversitesi, İmmunoloji ve Mikrobiyoloji bölümünde Prof. Dr. Patrick C. Hallenbeck danışmanlığında 1 yıl süresince araştırmacı olarak çalışarak ardışık ve birleşik fermantasyon ile biyohidrojen üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.7 Sistem Tanımlama

Sistem tanımlama (system identification), kontrol algoritmasında yer alan büyük öneme sahip ve zaman alan bir işlemdir. Şekil 3.6’ da verilen dinamik bir sistem deneysel verilerden yararlanılarak modellenir.



Şekil 3.6 t anında giriş değişkeni $u(t)$, çıkış değişkeni $y(t)$ ve gürültü $e(t)$ içeren bir dinamik sistem

Sistemlerin modellenmesi değişik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Giriş değişkenine birim basamak etki verildiğinde elde edilecek çıkış değişkeni değerlerinin grafiksel olarak değerlendirilmesi buna bir örnektir. Diğer bir yol matematiksel model kullanmaktır. Bunun için diferansiyel ve fark eşitliklerinden yararlanılır. Bu tür modeller sistemin dinamik davranışını yeterince tanımlamaktadır. Matematiksel modeller birçok alanda ve uygulamada oldukça yararlıdır. Matematiksel model oluşturmanın basitçe iki yolu vardır.

1. Modelleme: Basit fizik kanunları, kütle-enerji dengeleri bir prosesi tanımlamak için kullanılan analitik bir yaklaşımdır.
2. Sistem tanımlama: Deneysel veriler kullanılarak modelin belirlendiği bir yöntemdir. Kestirilen model ile deneysel veriler karşılaştırılarak uygunluğu araştırılır.

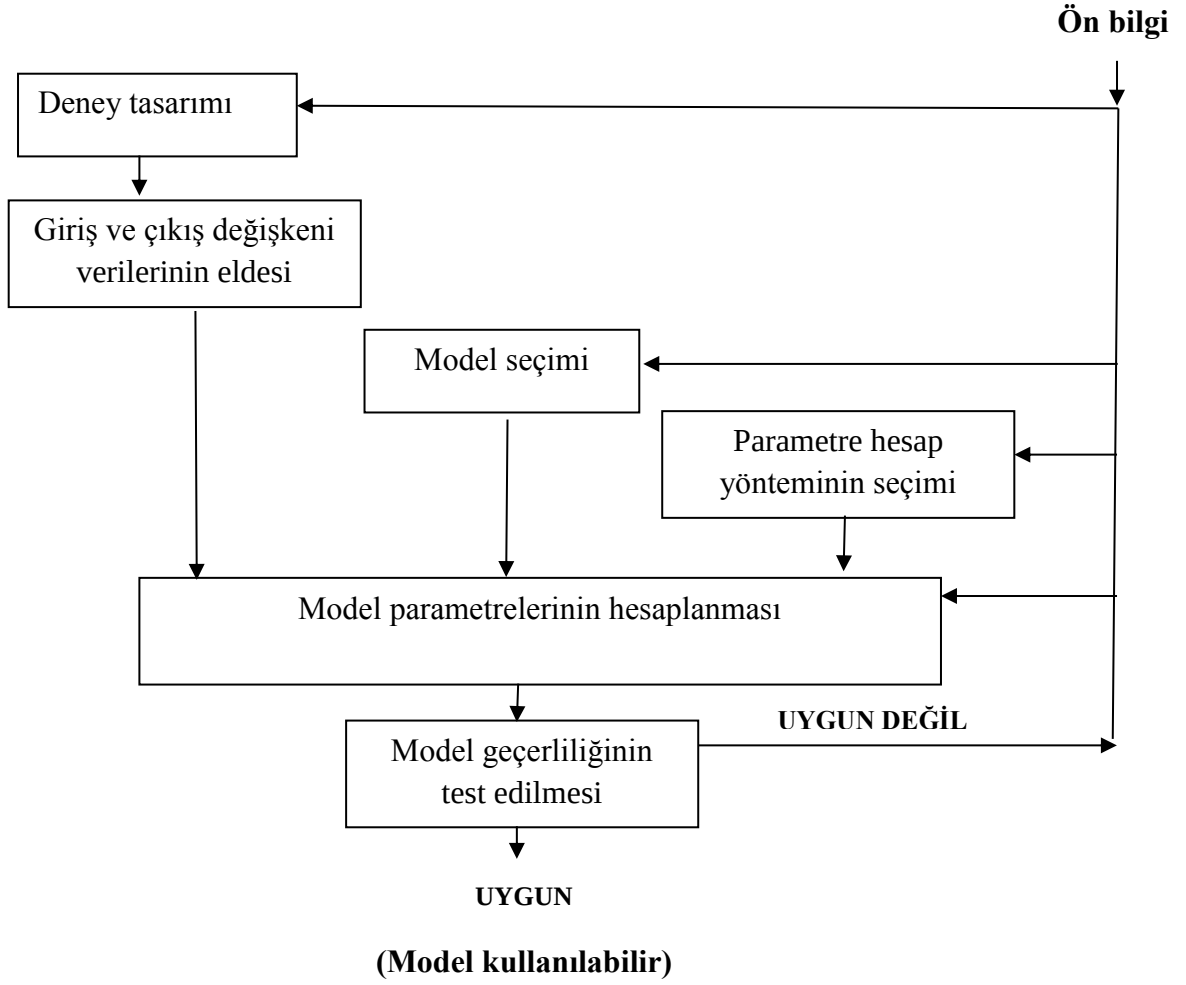
Biyoteknolojik sistemlerde canlı yapılar olan mikroorganizmalar kullanıldığı için prosesi kütle ve enerji denklilikleri ile tanımlamak oldukça zordur. Bu gibi durumlarda sistem tanımlama yöntemlerinin kullanılması daha uygundur.

3.7.1 Sistem tanımlamanın uygulanması

Tanımlama ile ilgili uygulamalar sisteme bir etki verilmesi (girdi sinyali olarak basamak, kare, sinüsoidal veya rastgele sinyal (PRBS kullanılarak) ve belli zaman aralıklarında çıkış değişkeni verilerinin elde edilmesiyle gerçekleştirilir. Kaydedilen giriş-çıkış değişkeni verileri kullanılarak prosesin parametrik modeli önerilir. Modeldeki bilinmeyen parametreler bulunur. Pratikte bu parametreler iterasyon yapılarak tahmin edilir. Daha sonra elde edilen model test edilir. Bu yöntem şekil 3.7’de verilmiştir.

3.7.2 Sistem tanımlama için kullanılan parametrik yöntemler

Sisteme uygulanan girdi sinyalleri sonucunda oluşan çıkış değişkeni verileri kullanılarak, seçilen deney şartlarındaki sistemin dinamik davranışına ilişkin modelin parametrelerinin bulunması sağlanır. Yinelemeli En Küçük Kareler Yöntemi (Recursive Least Square Estimation, RLS) bu yöntemlerden biridir.



Şekil 3.7 Sistem tanımlama akış dıyagramı (Akay 1998)

3.7.3 Sistem tanımlamada kullanılan sinyaller

Sistem tanımlama çalışmalarına ilk olarak girdi sinyalinin seçilmesi ile başlanır. Verilecek etkilerden bazıları basamak, kare dalga, rastgele, sahte rastgele ikili ardışık etki (PRBS)'dir. Çoğu zaman sistemi tanımlamak için kesikli zaman modeller kullanılır. Bu amaçla giriş ve çıkış değişkeni sinyalleri kesikli zamanda kaydedilir. Aşağıda girdi sinyallerine bazı örnekler verilmiştir.

1. Basamak etki: Sisteme basamak etki aşağıdaki gibi verilir.

$$u(t) = \begin{cases} 0 & t < 0 \\ u_0 & t > 0 \end{cases} \quad (3.3)$$

Basamak etkinin sisteme verilebilmesi için gürültünün sistem dinamiğini etkilemeyecek büyüklükte olması şarttır. Sisteme uygulanacak olan u_0 değeri seçilerek uygulanır.

2. Kare dalga sinyal: Kare dalga sinyal kolay oluşturulabilen ve sınırlı bir genlik aralığına sahip bir sinyal çeşididir. Sisteme uygulanacak kare dalganın genliği, frekans sistem dinamiğine göre, periyot ise sistemin zaman sabitinin yaklaşık altı katı olacak şekilde belirlenebilir.

3. Sinüs girdi: Bu tip sinyaller Eşitlik 3.4'teki şekilde ifade edilebilir. Burada a_j genlik, w_j frekans ($0 < w_j < \pi$) ve ϕ_j ise faz açısıdır.

$$u(t) = \sum_{j=1}^m a_j \sin(w_j t + \phi_j) \quad (3.4)$$

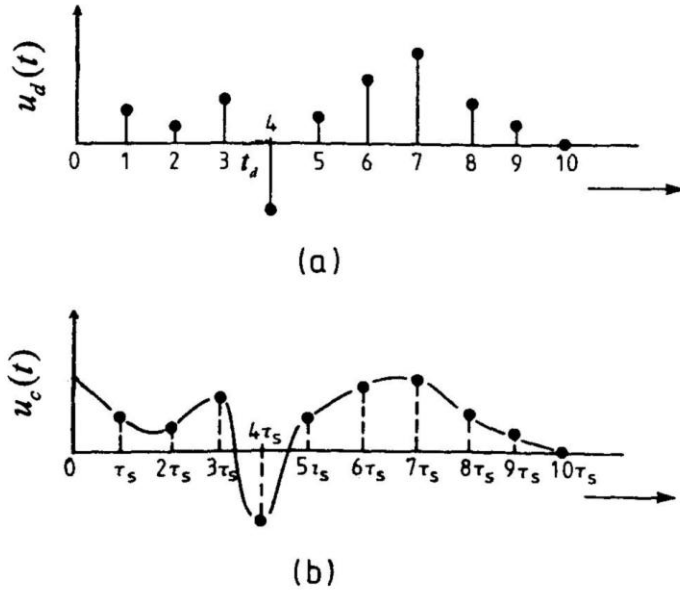
Bu çalışmada girdi sinyali olarak basamak, kare ve rastgele etki seçilmiştir.

3.7.4 Sistem modelleri

Sistem modelleme çalışmalarında kütle ve enerji denklikleri kullanılmakta, sistem tanımlamada ise deneysel olarak elde edilen veriler yardımıyla en uygun model bulunarak model sınama testlerinden geçirilmektedir.

Şekil 3.6'da verilen bir sistem ele alındığında $u(t)$ ve $y(t)$ kesikli zaman yapısındadır ve zaman simgesi (t) bir tamsayıdır (Şekil 3.8.a). Genellikle kesikli zaman değerleri, $(u_d(t))$ sürekli zaman sinyali olan $u_c(t)$ 'den Şekil 3.8.b'de gösterildiği gibi elde edilebilir.

τ_s örnekleme zamanı olmak üzere, c alt indisi ile sürekli sinyal gösterilirse $u_d(t)$ kesikli dizi, $u_c(t)$ 'ye karşılık gelen değerlerden elde edilir.



Şekil 3.8 a. Bir kesikli $u_d(t)$ sinyali, b. Kesikli sinyalin sürekli zaman eşdeğeri $u_c(t)$

Şekil 3.6'da verilen sistem gürültüsüz doğrusal fark eşitliği halinde aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$x(t) + a_1 x(t-1) + \dots + a_{na} x(t-na) = b_0 u(t) + b_1 u(t-1) + \dots + b_{nb} u(t-nb) \quad (3.5)$$

Burada $x(t)$, gürültü içermeyen çıktı değerleridir. Geriye kaydırma operatörü q^{-1} Eşitlik 3.6'daki gibi tanımlanırsa,

$$q^{-1} x(t) = x(t-1) \quad (3.6)$$

Eşitlik 3.5'te verilen fark modeli, kesikli zaman iletim fonksiyonu şeklinde Eşitlik 3.7'deki gibi yazılabilir.

$$x(t) = \frac{B}{A} u(t) \quad (3.7)$$

Burada A ve B, q^{-1} terimlerinin polinomları şeklinde tanımlanmıştır.

$$A(q^{-1}) = 1 + a_1 q^{-1} + \dots + a_{na} q^{-na} \quad (3.8)$$

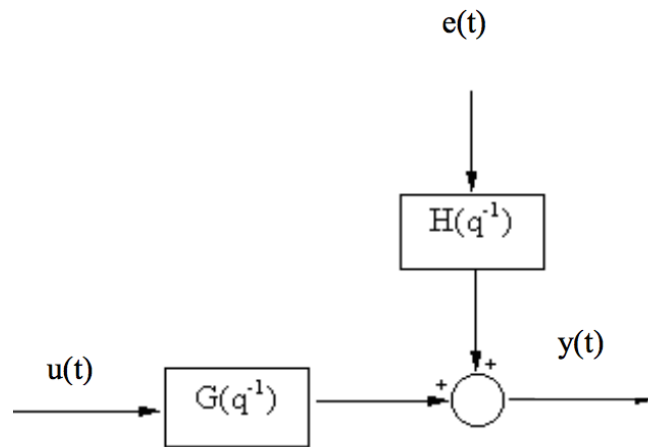
$$B(q^{-1}) = b_0 + b_1 q^{-1} + \dots + b_{nb} q^{-nb} \quad (3.9)$$

3.7.4.1 Doğrusal modeller

Modelin seçimi sistem tanımlamanın en önemli basamaklarından biridir. Tek giriş değişkeni ve tek çıkış değişkeni olan sistemlerde kesikli zaman yapısında bir doğrusal model yapısı genel olarak aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir.

$$y(t) = G(q^{-1}; \theta)u(t) + H(q^{-1}; \theta)e(t) \quad (3.10)$$

Burada $y(t)$ bir na boyutlu çıkış değişkeni, $u(t)$ bir nb boyutlu girdi değişkeni, $e(t)$ sıfır ortalamalı ve birbirinden bağımsız benzer dağılımlı rastgele değerlerden oluşmuş yüküdür. Bu tür yükler beyaz gürültü (white noise) olarak adlandırılır. Bu şekilde adlandırılmasının nedeni tüm frekanslarda sabit bir değişime sahip olmasıdır. Eşitlik 3.10'da $G(q^{-1}; \theta)$ bir $(na|nb)$ boyutlu filtre, $H(q^{-1}; \theta)$ bir $(na|na)$ boyutlu filtre ve q^{-1} geriye kaydırma işlemcisidir. Eşitlik 3.10 ile verilen modelin blok diyagramı şekil 3.9'da gösterilmiştir (Söderström ve Stoica 1989).



Şekil 3.9 Eşitlik 3.10 ile verilen model yapısının blok diyagramı

Eşitlik 3.10 A, B, C, D ve F polinomları ile gösterilirse Eşitlik 3.11'deki gibi genel bir model yapısı oluşturulur.

$$A(q^{-1})y(t) = \frac{B(q^{-1})}{F(q^{-1})}u(t) + \frac{C(q^{-1})}{D(q^{-1})}e(t) \quad (3.11)$$

Eşitlik 3.11'de yer alan A, B, C, D, F polinomları aşağıdaki gibi verilmiştir.

$$A = 1 + a_1 q^{-1} + \dots + a_{na} q^{-na} \quad (3.12)$$

$$B = b_0 + b_1 q^{-1} + \dots + b_{nb} q^{-nb} \quad (3.13)$$

$$C = 1 + c_1 q^{-1} + \dots + c_{nc} q^{-nc} \quad (3.14)$$

$$D = d_0 + d_1 q^{-1} + \dots + d_{nd} q^{-nd} \quad (3.15)$$

$$F = 1 + f_1 q^{-1} + \dots + f_{nf} q^{-nf} \quad (3.16)$$

Buna göre Eşitlik 3.11'de verilen genel model yapısı bazı düzenlemelerle çizelge 3.3'te verilen model yapılarını oluşturur (Ljung 1987).

Bu çalışma kapsamında ARMAX tipi modeller ele alınmıştır.

Çizelge 3.3 Eşitlik 3.11'e göre elde edilen değişik model yapıları

Eşitlik 3.11 de kullanılan polinomlar	Oluşan model yapısı
AB	ARX
AC	ARMA
ABC	ARMAX
ABD	ARARX
ABCD	ARARMAX

ARMAX (CARMA) model (Auto Regressive Moving Avarage with eXogenous):

$$A(q^{-1})y(t) = B(q^{-1})u(t) + C(q^{-1})e(t) \quad (3.17)$$

Tipi modellerdir. Eşitlik 3.17 ile gösterilen model fark eşitliği şeklinde yazılırsa Eşitlik 3.18 bulunur.

$$y(t) + a_1y(t-1) + \dots + a_nay(t-na) = b_1u(t-1) + \dots + b_nby(t-nb) + e(t) + c_1e(t-1) + \dots + c_nce(t-nc) \quad (3.18)$$

Eşitlik 3.18 düzenlenerek aşağıdaki model elde edilir.

$$y(t) = \frac{B(q^{-1})}{A(q^{-1})}u(t) + \frac{C(q^{-1})}{A(q^{-1})}e(t) \quad (3.19)$$

$$G(q^{-1}; \theta) = \frac{B(q^{-1})}{A(q^{-1})} \quad \text{ve} \quad H(q^{-1}; \theta) = \frac{C(q^{-1})}{A(q^{-1})} \quad (3.20)$$

Bu eşitlik matris şeklinde yazılacak olursa veri vektörü (ϕ) ve parametre vektörü (θ) sırasıyla Eşitlik 3.21 ve 3.22'deki şekilde tanımlanır.

$$\phi^T = [-y(t-1) \dots -y(t-na) \quad u(t-1) \dots u(t-nb) \quad e(t-1) \dots e(t-nc)] \quad (3.21)$$

$$\theta^T = [a_1 \dots a_{na} \quad b_0 \dots b_{nb} \quad c_1 \dots c_{nc}] \quad (3.22)$$

Böylece çıkış değişkenini veri ve parametre vektörüne bağlayan Eşitlik 3.23 elde edilir.

$$y(t) = \phi^T(t)\theta + e(t) \quad (3.2)$$

Burada $\phi^T(t)$ ile θ arasında doğrusal bir ilişki vardır. Bu nedenle “parametre bakımından doğrusal model” denir ve parametre hesaplama algoritmalarının başlangıç noktasıdır. ARMAX model, integrasyon ile ARIMAX modele dönüşür. ARIMAX model yavaş düzensizliği olan sistemleri tanımlamada faydalı bir model türüdür. Bu durumda $y(t)$ yerine Eşitlik 3.24 kullanılır.

$$\Delta y(t) = y(t) - y(t - 1) \quad (3.24)$$

3.7.5 Model Parametrelerinin Hesaplanması

3.7.5.1 En Küçük Kareler Yöntemi (EKK)

Eşitlik 3.24 ile tanımlanan parametreler bakımından doğrusal model göz önüne alınarak, $y(1)$, $y(2)$, ..., $y(N)$ ve $\phi(1)$, $\phi(2)$, ..., $\phi(N)$ kadar N tane ölçüm değeri olduğunda aşağıdaki eşitlikler yazılabilir.

$$\begin{aligned} y(1) &= \phi^T(1)\theta + e(1) \\ y(2) &= \phi^T(2)\theta + e(2) \\ &\vdots \\ y(N) &= \phi^T(N)\theta + e(N) \end{aligned} \quad (3.25)$$

Yukarıdaki eşitlikler vektörler olarak ifade edilirse,

$$Y = \begin{bmatrix} y(1) \\ y(2) \\ \vdots \\ y(N) \end{bmatrix}, \quad \phi = \begin{bmatrix} \phi^T(1) \\ \phi^T(2) \\ \vdots \\ \phi^T(N) \end{bmatrix}, \quad E = \begin{bmatrix} e(1) \\ e(2) \\ \vdots \\ e(N) \end{bmatrix} \quad (3.26)$$

$$Y = \phi\theta + E \quad (3.27)$$

$\hat{\theta}$ tahmin edilen parametre olmak üzere modelden elde edilen çıkış değişkeni ($\hat{y}$) Eşitlik 3.28'deki gibi yazılır.

$$\hat{y}(t) = \phi^T(t)\hat{\theta} \quad (3.28)$$

Sistemde ölçülen çıkış değeri ile modelden elde edilen çıkış değerinin farkı tahmin hatası olarak tanımlanır ve $\varepsilon(t)$ olarak simgelenir. Tahmin hatası Eşitlik 3.29'da tanımlanmıştır.

$$\varepsilon(t) = y(t) - \hat{y}(t) = y(t) - \phi^T(t)\hat{\theta} \quad (3.29)$$

N tane ölçüm için Eşitlik 3.29 yeniden düzenlenirse, Eşitlik 3.30 elde edilir.

$$\begin{aligned} \varepsilon(1) &= y(1) - \hat{y}(1) = y(1) - \phi^T(1)\hat{\theta} \\ \varepsilon(2) &= y(2) - \hat{y}(2) = y(2) - \phi^T(2)\hat{\theta} \\ &\vdots \\ \varepsilon(N) &= y(N) - \hat{y}(N) = y(N) - \phi^T(N)\hat{\theta} \end{aligned} \quad (3.30)$$

$\varepsilon(t)$ matris şeklinde yazılırsa,

$$\varepsilon(t) = \begin{bmatrix} \varepsilon(1) \\ \varepsilon(2) \\ \vdots \\ \varepsilon(N) \end{bmatrix} \quad (3.31)$$

olarak ifade edilir.

$$\varepsilon(t) = Y - \phi\hat{\theta} \quad (3.32)$$

Eşitlik 3.32'deki θ 'nın En Küçük Kareler (EKK) yöntemi ile hesaplanması için Eşitlik 3.33'te verilen maliyet fonksiyonunun minimum yapılması gerekir. Bu durumda bulunan $\hat{\theta}$ kestirilen parametre vektörüdür (Söderström ve Stoica 1989).

$$V = \sum_{t=1}^N \varepsilon^2(t) = \varepsilon^T \varepsilon = \|\varepsilon\|^2 \quad (3.33)$$

Burada $\|\cdot\|$ öklid vektörüdür. Eşitlik 3.33'teki ε yerine Eşitlik 3.32'deki değeri yazılırsa aşağıda verilen 3.34 eşitliği elde edilir.

$$\begin{aligned} V &= (Y - \phi\hat{\theta})^T (Y - \phi\hat{\theta}) \\ &= Y^T Y - \phi^T \hat{\theta}^T Y - (Y^T \phi \hat{\theta} + \phi^T \phi \hat{\theta}^T \hat{\theta}) \end{aligned} \quad (3.34)$$

Bu eşitliği minimum yapan $\hat{\theta}$ değerini bulmak için türev alınır ve sıfıra eşitlenirse Eşitlik 3.35 bulunur.

$$\begin{aligned} \frac{\partial V}{\partial \hat{\theta}} &= -2\phi^T Y + 2\phi^T \phi \hat{\theta} = 0 \\ &= -2(Y - \phi\hat{\theta})\phi = 0 \end{aligned} \quad (3.35)$$

Eşitlik 3.35 ile en küçük kareler yöntemi ile hesaplanmış model parametre vektörü bulunur.

$$\hat{\theta} = (\phi^T \phi)^{-1} \phi^T Y \quad (3.36)$$

Eşitlik 3.36 aşağıdaki gibi bir başka şekilde de ifade edilebilir.

$$\hat{\theta} = \left[\sum_{t=1}^N \varphi(t) \varphi^T(t) \right]^{-1} \sum_{t=1}^N \varphi(t) y(t) \quad (3.37)$$

En küçük kareler yöntemi oldukça yaygın kullanılan bir yöntem olmasına karşılık adaptif ve öngörmeli kontroller için uygun değildir. Çünkü En küçük kareler yöntemi ile veriler depolanır ve parametre hesabı off-line olarak yapılır.

En küçük kareler yönteminde, eşitlik 3.37'nin her t anında çözülmesi gerekir ki bu da her zaman adımında matrisin boyutlarının daha da büyümesi demektir. Bu şekilde bir çözüm Yinelemeli En Küçük Kareler Yöntemi ile bu yapılabilir. Yinelemeli parametre hesaplama yönteminde her adımda hesaplanan parametre ve yeni alınan veriler kullanılarak yeni bir parametre hesabı yapılmaktadır (Ljung 1987).

3.7.5.2 Yinelemeli En Küçük Kareler Yöntemi (YEKK)

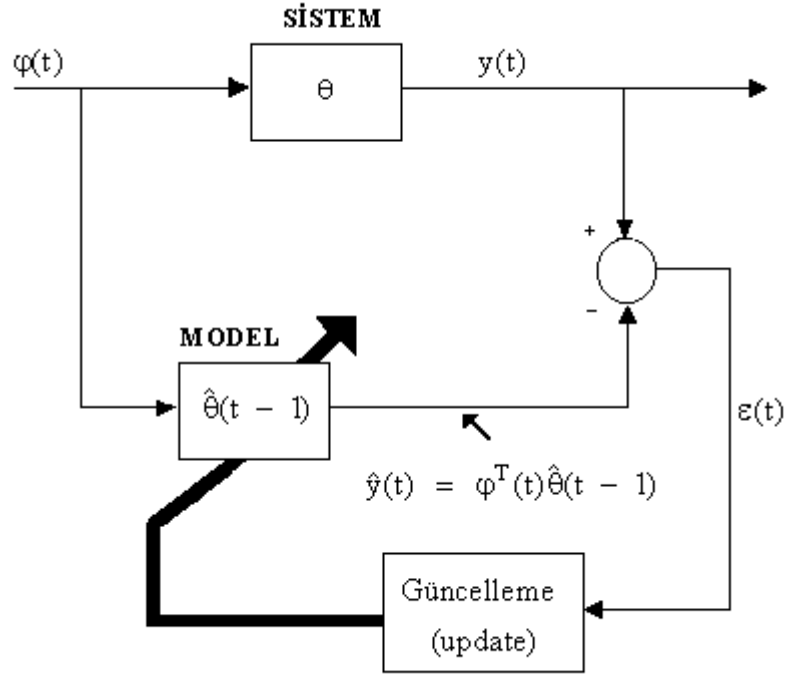
Yinelemeli En Küçük Kareler (YEKK) yöntemi ile on-line parametre tahmini yapmak mümkündür. Şekil 3.10'da verildiği gibi, geçmiş verilere dayanan model parametreleri ($\hat{\theta}(t - 1)$) ile gelen yeni giriş ve çıkış değişkeni değerleri yeni çıkış değişkeninin değerini ($\hat{y}(t)$) hesaplamakta kullanılır. Bu hesaplanan yeni değer $y(t)$ ile karşılaştırılır ve aradaki fark $\varepsilon(t)$ bulunur. Bir önceki adımda hesaplanmış olan $\hat{\theta}(t - 1)$ yeni hesaplanan $\hat{\theta}(t)$ ile güncellenir. Bu yöntem yinelemeli parametre hesaplaması olarak adlandırılır (Wellstead ve Zarrop 1991). Herhangi bir t anındaki parametre hesabı aşağıda verilen eşitlikle ifade edilebilir.

$$\hat{\theta}(t) = (\phi^T(t)\phi(t))^{-1}\phi^T(t)Y(t) \quad (3.38)$$

Burada,

$$Y(t) = \begin{bmatrix} y(1) \\ y(2) \\ . \\ . \\ y(t) \end{bmatrix}, \quad \phi(t) = \begin{bmatrix} \phi^T(1) \\ \phi^T(2) \\ . \\ . \\ \phi^T(t) \end{bmatrix} \quad (3.39)$$

olarak verilmiştir.



Şekil3.10 Yinelemeli parametre hesaplama yönteminin şematik gösterimi (Akay 1998)

Bir sonraki örnekleme zamanındaki (t+1) parametrenin hesaplanması Eşitlik 3.40'da verilmiştir.

$$\hat{\theta}(t + 1) = (\phi^T(t + 1)\phi(t + 1))^{-1}\phi^T(t + 1)Y(t + 1) \quad (3.40)$$

Burada $\phi(t + 1)$ ve $Y(t + 1)$ aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$\phi(t + 1) = \begin{bmatrix} \phi(t) \\ \phi^T(t + 1) \end{bmatrix}, \quad Y(t + 1) = \begin{bmatrix} Y(t) \\ y^T(t + 1) \end{bmatrix} \quad (3.41)$$

Bu eşitlikler kullanılarak düzenleme yapılırsa Eşitlik 3.45 elde edilir.

$$\begin{aligned} \phi^T(t + 1)\phi(t + 1) &= [\phi^T(t)\phi(t + 1)] \begin{bmatrix} \phi(t) \\ \phi^T(t + 1) \end{bmatrix} \\ &= \phi^T(t)\phi(t) + \phi(t + 1)\phi^T(t + 1) \end{aligned} \quad (3.42)$$

Verilen $\phi(t + 1)$ ile eski matrisler $\phi^T(t)\phi(t)$ 'den, yeni matris $\phi^T(t + 1)\phi(t + 1)$ kolaylıkla güncellenir. Fakat her zaman adımında matrisin tersini almak gerekir. Bununla birlikte $\phi^T(t + 1)Y(t + 1)$ teriminin de güncelleştirilmesi şarttır. Eşitlik 3.43 kullanılarak Eşitlik 3.44 denklemi bulunur.

$$\begin{aligned}\phi^T(t + 1)Y(t + 1) &= [\phi^T(t)\phi(t + 1)] \begin{bmatrix} Y(t) \\ y(t + 1) \end{bmatrix} \\ &= \phi^T(t)Y(t) + \phi(t + 1)y(t + 1)\end{aligned}\quad (3.43)$$

Kovaryans matris tanımlanacak olursa aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$P(t) = [\phi^T(t)\phi(t)]^{-1}\quad (3.44)$$

Eşitlik 3.44, Eşitlik 3.42'ye uygulanırsa,

$$P(t + 1)^{-1} = P(t)^{-1} + \phi(t + 1)\phi^T(t + 1)\quad (3.45)$$

Denklemi bulunur. $P(t)$ tanımı kullanılarak ve $\hat{\theta}(t - 1)$ ile $\hat{\theta}(t)$ 'nin yazılması durumunda,

$$\hat{\theta}(t + 1) = P(t + 1)\phi^T(t + 1)Y(t + 1)\quad (3.46)$$

$$\hat{\theta}(t) = P(t)\phi^T(t)Y(t)\quad (3.47)$$

elde edilir. Eşitlik 3.46'daki $\phi^T(t + 1)Y(t + 1)$ ifadesi yerine Eşitlik 3.43'teki karşılığı yazılacak olursa,

$$\hat{\theta}(t + 1) = P(t + 1)[\phi^T(t)Y(t) + \phi(t + 1)y(t + 1)]\quad (3.48)$$

elde edilir. Bu eşitlik düzenlenirse, Eşitlik 3.49 denklemi bulunur.

$$\hat{\theta}(t + 1) = P(t + 1)\phi^T(t)Y(t) + P(t + 1)\phi(t + 1)y(t + 1)\quad (3.49)$$

Eşitlik 3.49'dan, Eşitlik 3.50 bulunmaktadır.

$$\hat{\theta}(t)Y(t) = P^{-1}(t)\hat{\theta}(t) \quad (3.50)$$

Aynı zamanda Eşitlik 3.45'ten aşağıdaki ifade elde edilebilir.

$$\phi^T(t)Y(t) = P^{-1}(t+1)\hat{\theta}(t) - \phi(t+1)\phi^T(t+1)\hat{\theta}(t) \quad (3.51)$$

Eşitlik 3.40'daki $\phi^T(t)Y(t)$ yerine Eşitlik 3.51'deki karşılığı yazılırsa,

$$\begin{aligned} \hat{\theta}(t+1) &= P(t+1)[P^{-1}(t+1)\hat{\theta}(t) - \phi(t+1)\phi^T(t+1)\hat{\theta}(t)] + \\ &\quad P(t+1)\phi(t+1)y(t+1) \\ &= \hat{\theta}(t) - P(t+1)\phi(t+1)\phi^T(t+1)\hat{\theta}(t) + P(t+1)\phi(t+1)y(t+1) \\ &= \hat{\theta}(t) + P(t+1)\phi(t+1)[y(t+1) - \phi^T(t+1)\hat{\theta}(t)] \end{aligned} \quad (3.52)$$

elde edilir. Yukarıdaki ifadede (t+1) anındaki tahmin hatası (prediction error),

$$\varepsilon(t+1) = y(t+1) - \phi^T(t+1)\hat{\theta}(t) \quad (3.53)$$

şeklinde tanımlanırsa, (t+1) anındaki hesaplanan parametre vektörü Eşitlik 3.54'te verilen denklem şekilde bulunur.

$$\hat{\theta}(t+1) = \hat{\theta}(t) + P(t+1)\phi(t+1)\varepsilon(t+1) \quad (3.54)$$

P(t+1) matrisini hesaplarken ihtiyaç duyulan matrisin tersini alma kuralı uygulanır.

$$(A + BCD)^{-1} = A^{-1} - A^{-1}B(C^{-1} + DA^{-1}B)^{-1}DA^{-1} \quad (3.55)$$

Eşitlik 3.56'da,

$P^{-1}(t)=A$, $\phi(t+1)=B$, $C=1$ ve $\phi^T(t+1)=D$ olarak alınırsa,

$$P(t+1) = P(t) - P(t)\phi(t+1)[1 + \phi^T(t+1)P(t)\phi(t+1)]^{-1}\phi^T(t+1) \quad (3.56)$$

yazılabilir. Bu eşitlikte $[1 + \varphi^T(t + 1)P(t)\varphi(t + 1)]$ skaler bir değer olduğu için paydaya alınabilir.

$$P(t + 1) = P(t) - \frac{P(t)\varphi(t + 1)\varphi^T(t + 1)P(t)}{1 + \varphi^T(t + 1)P(t)\varphi(t + 1)} \quad (3.57)$$

Elde edilen bu ifade ile kovaryans matrisin yeni değeri bulunur. Burada matrisin tersi alınmaz. Bu nedenle de işlemler daha da kolaylaşır. YEKK algoritması Eşitlik 3.53, 3.54 ve 3.56'dan oluşmakta olup kullanılan algoritma aşağıda verilmektedir.

Algoritma:

t+1 anında,

- i) Yeni veriler kullanılarak $\varphi(t + 1)$ vektörü oluşturulur.
- ii) Eşitlik 3.53 'ten $\varepsilon(t + 1)$ hesaplanır.
- iii) Eşitlik 3.56'dan $P(t + 1)$ hesaplanır.
- iv) Eşitlik 3.54 ile parametre vektörü güncelleştirilir.
- v) Bir sonraki örnekleme zamanına kadar beklenir ve ilk adıma geri dönülür.

Clostridium butyricum ve *Enterobacter aerogenes* mikroorganizmasının çoğaltıldığı kesikli bir biyoreaktörde pH kontrolü ile biyohidrojen üretimine yönelik olan Doktora Tezi kapsamında prosesin modellenmesi amacıyla, yapılan teorik çalışmalarda YEKK Yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen değerlendirmeler grafikleri ve sonuçları Bölüm 5'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.8 Kontrol Yöntemleri

Yeterli proses performansını elde edebilmek, işletim koşullarını tasarlanan değerlerde tutabilme ile sağlanır (Bailey ve Ollis 1986). Prosese; pompa hızı, akış koşulları, karıştırıcı hızı ve diğer işletim koşulları ile girerek, kararsızlıklara neden olan önceden tahmin edilemeyen bozukluklar ve prosesteki kimyasal değişimlerden dolayı, kontrol

genellikle belirlenmiş koşullar korunarak sağlanır. Bazen kesikli reaktör performansı pH veya sıcaklık gibi proses koşulları değiştirilerek düzeltilebilir.

Bazı proses kontrol yöntemleri;

- Oransal-İntegral-Türevsel kontrol (PID)
- Kendinden ayarlamalı ('Self-tuning') kontrol
- İçsel model ('Internal model') kontrol
- Uyarlamalı ('Adaptive') kontrol
 - 'Model-free adaptive' kontrol
 - 'Fuzzy adaptive' kontrol
 - 'Decoupling' kontrol
 - 'Generalized predictive' kontrol (GPC)
 - 'Generalized minimum variance' kontrol (GMV)

3.8.1 Biyoreaktörde pH'ın genelleştirilmiş minimum varyans (GMV) yöntemi ile kontrolü

3.8.1.1 GMV yöntemi

Kimyasal bir proses için, istenen özelliklere sahip üretim ve güvenlik iki önemli işletim hedefidir. Bunlar başarıldıktan sonraki hedef, sistemin işletiminin nasıl daha karlı yapılacağıdır. Sistemin işletim şartları otomatik ya da elle değiştirilerek ekonomik hedef olan karı maksimum yapılır. İşte kontrol sistemleri de ekonomik hedefe benzer bir maliyet fonksiyonunun (cost function) minimize edilmesi temeline dayanır.

Minimum Varyans Tekniği (MV) Aström ve Wittenmark tarafından 1973'te aşağıdaki maliyet fonksiyonunu minimize etmeye dayanmak üzere ortaya konmuştur.

$$J(u, t) = E\{(y_{t+k} - r_{t+k})^2\} \quad (3.58)$$

Burada y ile çıktı değişkeni, r ile set noktası ve u ile ayarlanabilen değişken ifade edilmektedir. Bu maliyet fonksiyonu, t anında seçilen uygun bir u_t ile minimize edilir. Ancak MV tekniği için uygulamalarda bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bunlar;

1. on-line parametre ayarlamadaki problemler
2. minimum olmayan faz sistemlerinin kontrolünde zayıflık
3. zaman gecikimi bilinmeyen veya değişken sistemlerde iyi kontrol gerçekleştirilememesi olarak sıralanabilir.

İşte MV tekniğinde karşılaşılan bu güçlükleri ortadan kaldırmak üzere Clarke ve Gawthrop tarafından 1972’de MV tekniğinde bazı modifikasyonlar yapılarak Genelleştirilmiş Minimum Varyans (GMV) tekniği ortaya konmuştur. Bu tekniğin maliyet fonksiyonu aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir.

$$J(u, t) = E\{(y_{t+k} - r_{t+k})^2 + \lambda u_t^2\} \quad (3.59)$$

Ancak bu ifadenin kullanımıyla da sıfırdan farklı set noktası varlığında sıfır yatışkın hale ulaşılamadığından modifiye edilmesi gerekmiştir.

$$J(u, t) = E\{(y_{t+k} - r_{t+k})^2 + \lambda (\Delta u_t)^2\} \quad (3.60)$$

Bu maliyet fonksiyonunu kullanan GMV tekniği, istenen amaca oldukça yakın kalmak için minimum bir çıktı değişimini sürdürürken, λ ’yı mümkün olduğunca küçük alarak kapalı hat kararlılığını korumaya dayanır. Bu maliyet fonksiyonunu genel olarak şöyle ifade edebiliriz;

$$J(u, t) = E\{\phi^2(t+k)\} \quad (3.61)$$

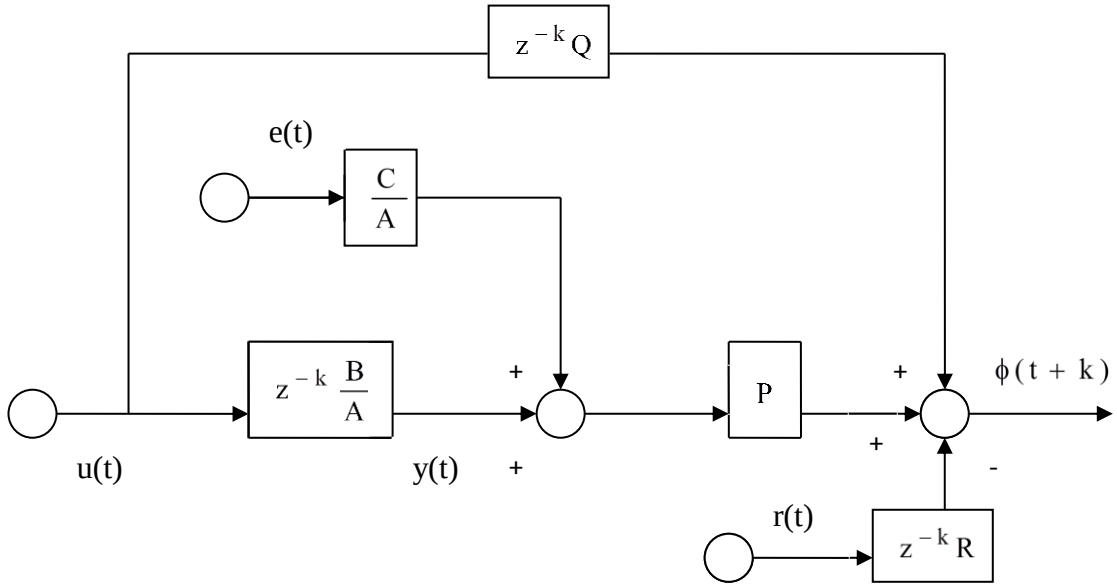
GMV yaklaşımı yukarıdaki eşitlikle genel olarak ifade edilen maliyet fonksiyonunu minimize etmek üzere aşağıdaki eşitlikle verilen bir $\phi(t+k)$ sistem yalancı çıktısını kullanır.

$$\phi(t+k) = Py(t+k) + Qu(t) - Rr(t) \quad (3.62)$$

Şekil 3.11'deki akım şemasından da görüldüğü gibi $\phi(t+k)$ sistem yalancı çıktısı, bir ileri besleme terimi (Q) ve çıktı ile set noktasının filtrelenmesini (P,R) içerir. Yalancı çıktı $\phi(t+k)$ 'yı elde etmek üzere $y(t+k)$ ile ifade edilen sistem çıktısının tanımlanması gerekmektedir. Bu da sistem modelinin oluşturulmasını gerektirir.

3.8.1.2 Sistem modeli

Pratikte proseslerin modellerinin uygun ve ekonomik olarak oluşturmak zordur. Çoğu zaman sistemi etkileyen tüm parametreleri içeren sistem modelleri de karmaşıklığa yol açar. Sistem modeli, doğrusal bir girdi-çıkı modeli olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.11 Sistem yalancı-çıkısının blok diyagramı

$$y(t) + a_1 y(t-1) + \dots + a_{n_a} y(t-n_a) = b_0 u(t-k) + b_1 u(t-k-1) + \dots + b_{n_b} u(t-k-n_b) \quad (3.63)$$

Bu model kesikli transfer fonksiyonu olarak ifade edilebilir.

$$y(t) = \frac{B}{A} u(t - k) \quad (3.64)$$

Burada B ve A polinomları, sırasıyla sistemin kutupları ve sıfırlarıdır. Bir prosesin kutup ve sıfırlarından birisi birim çemberin dışında ise sırasıyla sistem kararsızdır ve minimum olmayan faz özelliği gösterir.

Yukarıdaki eşitlikte verilen sistem modelinde sistem çıktısı $y(t)$ yük etkisi içermemektedir. Ancak prosesin kontrol edilen değişkeni üzerinde etkili olan rastgele yükler de sistem modelinde yer almalıdır. Buna göre rastgele yük ifadesini de içeren CARMA sistem modeli Eşitlik 3.65 ile ifade edilmiştir.

$$y(t) = \frac{B}{A} u(t - k) + \frac{C}{A} e(t) \quad (3.65)$$

Eşitlik 3.62’de verilen yalancı-çıkıtı ifadesinde, $y(t + k)$ sistem çıktısı yerine 3.65 no’lu eşitlikten değeri yazılırsa yalancı-çıkıtı ifadesi şu şekli alır:

$$j(t + k) = \frac{PB + QA}{A} u(t) + \frac{PC}{A} y(t + k) - Rr(t) \quad (3.66)$$

Buna göre maliyet fonksiyonu, yalancı-çıkıtının değişimlerinin minimizasyonunu içerecektir.

$$J = E\{\phi^2(t + k)\} \quad (3.67)$$

GMV algoritması şöyle şekillenir; öncelikle hata terimi geçmişteki, şimdiki ve gelecekteki verileri içerecek şekilde parçalara ayrılıp düzenlenir.

$$\frac{PC}{A} y(t + k) = Ee(t + k) + z^{-k} \frac{G}{A} e(t) \quad (3.68)$$

$$PC = AE + z^{-k} G \quad (3.69)$$

Eşitlik 3.69'da yer alan AE ifadesinin, ofseti de içeren geliştirilmiş CARMA modelinden elde edilen değeri yerine yazılır.

$$Ay(t + k) = Bu(t) + Ce(t + k) + d \quad (3.70)$$

$$AEy(t + k) = BEu(t) + CEe(t + k) + Ed \quad (3.71)$$

Gerekli düzenlemeler yapılarak yalancı-çıktı şu şekilde elde edilir.

$$\phi(t + k) = \frac{1}{C} [(BE + QC)u(t) + Gy(t) - CRr(t) + Ed] + Ee(t + k) \quad (3.72)$$

Eşitlik 3.72 ile ifade edilen yalancı-çıktıyı düzenleyip sıfıra eşitleyerek maliyet fonksiyonu minimize edilir.

$$Fu(t) + Gy(t) - Hr(t) + Ed = 0 \quad (3.73)$$

$$F = BE + QC \quad (3.74)$$

$$H = CR \quad (3.75)$$

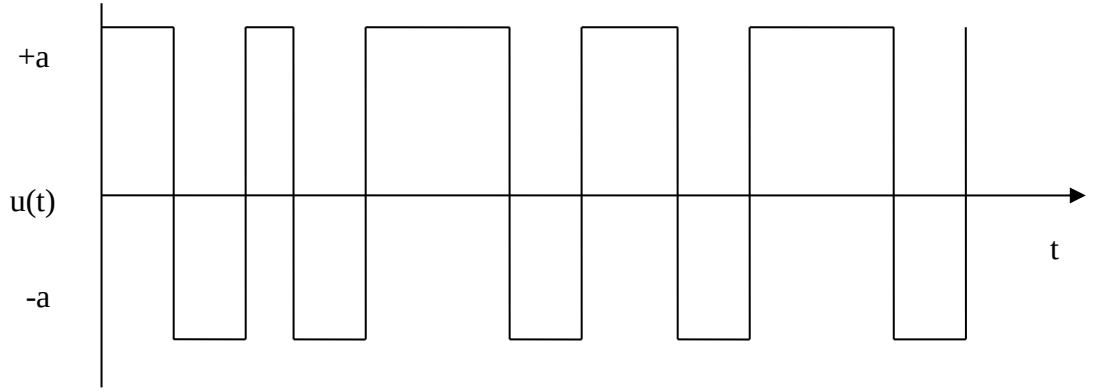
GMV kontrol kanunu, ayarlanabilen değişkeni şu şekilde ifade eder;

$$u(t) = \frac{Hr(t) - Gy(t) - Ed}{F} \quad (3.76)$$

Eşitlik 3.76'da verilen kontrol kanununda yer alan E,F,G,H polinomlarının katsayılarının bir hesaplama yöntemi kullanılarak belirlenmesi gerekir. Bu amaçla PRBS sinyalleri ve yinelemeli en küçük kareler (YEKK) kullanılmıştır.

3.8.1.3 Pseudo Random Binary Sequence (PRBS) etki

PRBS etki, parametre tahmini için test sinyali olarak kullanılır. PRBS'nin prosese verdiği etkiler prosesin işletim şartları içinde olmalıdır. Şekil 3.12'de PRBS sinyallerinin şematik gösterimi verilmiştir. Şekil 3.12'den de görüldüğü gibi, ayarlanabilen değişken $+a$ ile $-a$ değerlerini eşit olasılıkla farklı sıklıkta alır. Bir prosesin model parametrelerinin belirlenmesi için PRBS etki verildiğinde kullanılan tekrarlamalı hesaplama yöntemi yinelemeli en küçük kareler (YEKK) 'dir.



Şekil 3.12 PRBS sinyalinin şematik gösterimi

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Karanlık fermantasyon ile biyohidrojen üretim prosesini etkileyen parametreler adım adım 5 farklı basamakta incelenmiş ve materyal yöntemleri ayrı ayrı anlatılmıştır. Bunlar sırası ile;

- Besi ortamı bileşimi ve derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisi
 - ✓ Besi ortamı türü
 - ✓ Besi ortamı türü, anaerobik ortam ve otoklav sıcaklığı
 - ✓ Besi ortamı türü, derişimi ve mikroorganizma çoğalma sıcaklığı
- Karışım kültür aktarım oranının etkisi
- Katkı maddeleri ile zenginleştirilen besi ortamlarının etkisi
- Biyoreaktörde dinamik analiz ve sistem tanımlama
- Biyoreaktörde pH kontrol çalışmaları

4.1 Besi Ortamı Bileşimi ve Derişiminin Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi

4.1.1 Besi ortamı türü

4.1.1.1 Mikroorganizma aktarımı

Farklı maddeler besi ortamı olarak kullanılıp, KCTC'den (Korean Collection for Type Cultures) liyofilize halde alınan KCTC 2201 katalog numaralı zorunlu anaerobik *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile hidrojen üretim verimleri incelenmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere farklı besi ortamları olarak şeker pancarı suyu, patates suyu ve saf glikoz ortamları seçilmiştir. Mikroorganizma saklama koşulları, uzun periyotta çoğalma ve hidrojen üretim performansının değişmemesi açısından önemlidir. Bu amaçla +4 °C'de saklanan kaynak liverdan, 50 mL'lik liver ortamına 1:10 ölçek büyütme adımı ile ilk aktarım gerçekleştirilmiştir. 23 saat süresince inkübasyon sağlanıp ikinci ölçek büyütme adımı olan 70 mL'lik 400 g/L patates ortamına aktarım gerçekleştirilmiştir. Tekrar 23 saat süresince inkübasyon sağlanıp 100 mL'lik glikoz, patates ve şeker pancarı ortamlarına aktarım yapılmış ve farklı besi ortamlarındaki

(patates suyu, şeker pancarı suyu ve glikoz) performansları incelenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Mikroorganizma aktarım adımları

4.1.1.2 Besi ortamlarının hazırlanışı

Yapılan çalışmada öncelikle biyohidrojen üretim veriminin arttırılabilmesi için optimum ve ekonomik açıdan en uygun besi ortamı türü ve derişiminin belirlenmesi amacıyla farklı besi ortamları (şeker pancarı, patates suyu, saf glikoz) anaerobik ortamda hazırlanmıştır.

Patates ortamı: Patatesler soyulup, istenen miktarlarda tartılıp (400 g/L), meyve sıkacağı yardımı ile suyu sıkılarak çalışma hacmi olan 100 mL'ye bidistile su ile tamamlanmıştır. Nişastanın glikoza parçalanması amacıyla sıkılan patates suyu yarım saat süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla kaynatılmıştır. Anaerobik ortamın sağlanması için 30 dk boyunca N_2 gazı patates ortamından geçirilmiş ve köpük oluşumunu ve dolayısıyla ortam kaybını engellemek amacıyla 1 damla köpük kırıcı eklenmiştir. Daha sonra hem nişastayı parçalamak hem de H_2 üretiminde steril ortamın sağlanması için yüksek sıcaklık ve basınç altında (121 °C ve 1.2 atm) 20 dk süresince otoklavda ön işleme tabi tutulmuştur.



Şekil 4.2 Patates ortamının hazırlık aşaması

Şeker pancarı ortamı: Ankara şeker fabrikasından alınan şeker pancarı soyulup, istenen miktarlarda tartılıp (400 g/L), meyve sıkacağı yardımı ile suyu sıkılarak çalışma hacmi olan 100 mL'ye bidistile su ile tamamlanmıştır. Anaerobik ortamın sağlanması için 30 dk boyunca N_2 gazı patates ortamından geçirilmiş ve köpük oluşumunu ve dolayısıyla ortam kaybını engellemek amacıyla 1 damla köpük kırıcı eklenmiştir. Daha sonra hem sukrozu parçalamak hem de H_2 üretiminde steril ortamın sağlanması için 121 °C ve 1.2 atm'de 20 dk süresince otoklavda ön işleme tabi tutulmuştur.



Şekil 4.3 Şeker pancarı ortamının hazırlık aşaması

Saf glikoz ortamı: Farklı derişimlerde (7.5, 10 ve 20 g/L) glikoz tartılarak çalışma hacmi olan 100 mL'ye bidistile su ile tamamlanmıştır. Anaerobik ortamın sağlanması için 30 dk boyunca N_2 gazı patates ortamından geçirilmiş ve köpük oluşumunu ve dolayısıyla ortam kaybını engellemek amacıyla 1 damla köpük kırıcı eklenmiştir. Daha sonra H_2 üretiminde steril ortamın sağlanması için yüksek sıcaklık ve basınç altında (121 °C ve 1.2 atm) 20 dk süresince otoklavda ön işleme tabi tutulmuştur.

4.1.2 Besi ortamı türü, anaerobik ortam ve otoklav sıcaklığının etkisi

4.1.2.1 Mikroorganizma aktarımı

Deneylerde kullanılmak üzere üç farklı zengin karbon kaynaklı besi ortamları; şeker pancarı, patates ve saf glikoz ortamları kullanılmıştır. Mikroorganizmanın gaz üretim performansını arttırmak için öncelikle canlandırma ortamı olan liver da çoğaltma gerçekleştirilmiştir. 62 g/L hazırlanan liver ortamından anaerobik koşulun sağlanması için 30 dk boyunca N_2 gazı geçirilerek, 121 °C ve 1.2 atm de 20 dk boyunca sterilizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Mikroorganizma canlandırma ortamı liver hazırlığı

Mikroorganizma saklama koşulları, uzun periyotta çoğalma ve hidrojen üretim performansının değişmemesi açısından önemlidir. Bu amaçla -40 °C’de saklanan gliserin ortamından 2 mL alınarak mikroorganizma canlandırma ortamı olan 100 mL’lik 62 g/L liver (Şekil 4.5) ortamına 1:50 mikroorganizma aktarım oranı ile aktarım gerçekleştirilmiştir. 48 saat süresince inkübasyon sağlanıp ikinci ölçek büyütme adımı olan 50 mL’lik 400 g/ L patates ortamına aynı mikroorganizma aktarım oranı 1:50 ile aktarım gerçekleştirilmiştir. 23 saat süresince inkübasyon sağlanıp; sonrasında 100 mL’lik glikoz, patates ve şeker pancarı ortamlarına 2 mL aktarım yapılmış ve farklı besi ortamlarındaki performansları incelenmiştir.

1. Adım: Gliserin → 62 g/L liver



48. saatin sonu

Şekil 4.5 Gliserin ortamından 62 g/L liver ortamına mikroorganizma aktarımı

2. Adım: Liver → 400 g/L patates



23. saatin sonu

Şekil 4.6 Liver ortamından 400 g/L patates ortamına mikroorganizma aktarımı

4.1.2.2 Besi ortamlarının hazırlanışı

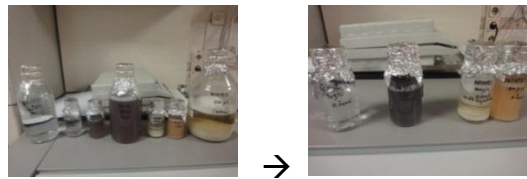
Yapılan çalışmada öncelikle biyohidrojen üretim veriminin arttırılabilmesi için, optimum ve ekonomik açıdan en uygun besi ortamı türünün belirlenmesi ve otoklav sıcaklığının besi ortamları üzerine etkisini incelemek amacıyla, farklı besi ortamları; patates suyu; şeker pancarı suyu, glikoz çözeltisi kullanılarak, 121°C ve 131 °C’de 2 set deney hazırlığı yapılmıştır.

Patates ortamı: Patatesler soyulup, 480 g tartılıp, meyve sıkacağı yardımı ile suyu sıkılarak (240 mL patates suyu) çalışma hacmi olan 1200 mL’ye bidistile su ile tamamlanmıştır. 30 dk süresince manyetik karıştırıcıda nişastanın küçük moleküllere parçalanabilmesi amacıyla kaynatılmıştır.

Pancar ortamı: Ankara Şeker fabrikasından alınan pancarlar soyulup, 400 g tartılıp, meyve sıkacağı yardımı ile suyu sıkılarak (230 mL pancar suyu) çalışma hacmi olan 1000 mL’ye bidistile su ile tamamlanmıştır.

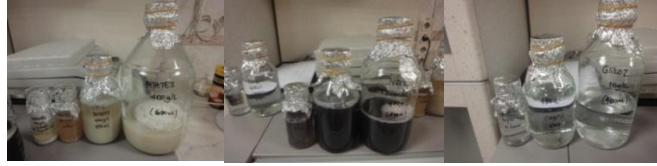
Glikoz ortamı: 10 g/L derişiminde glikoz çözeltisi hazırlanmıştır.

Hazırlık aşamasında herhangi derişim değişiminden kaçınmak ve deneylerin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla ortamlar toplu olarak hazırlanmış (Şekil 4.7) ve sonrasında istenen miktarda bölünmüştür. Otoklavlama öncesinde ise her bir besi ortamından, başlangıç glikoz derişimlerini belirlemek amacıyla 100’er mL çözelti ayrılmıştır. Patates suyu için ayrıca kaynatma yapıldığından, kaynatma sonrasında glikoz derişiminde değişiklik gözlemleneceği düşünülerek 100 mL ayrılmıştır.



Şekil 4.7 Toplam hazırlanan besi ortamlarından glikoz ölçümü için 100'er mL ayırma

Hazırlanan 3 farklı tip besi ortamından otoklav öncesi, glikoz ölçümü için 100'er mL ayrıldıktan sonra, 900'er mL kalan çözeltiler, otoklavlama işlemi için 121 °C ve 131 °C sıcaklıklar (set1 ve set 2) olmak üzere 2'ye ayrılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Hazırlanan patates, pancar ve glikoz besi ortamları

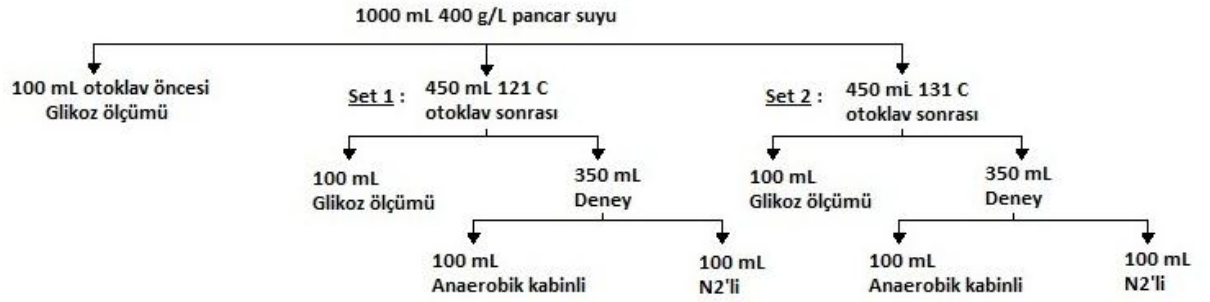
Set 1: Nişastanın ve sakkarozun, glikoza parçalanması ve steril ortamın sağlanabilmesi amacıyla besi ortamları **121 °C** ve 1.2 atm 20 dk süresince otoklavda kaynatılmıştır.

Set 2: Nişastanın ve sakkarozun, glikoza parçalanması ve steril ortamın sağlanabilmesi amacıyla besi ortamları **131 °C** ve 1.2 atm 20 dk süresince otoklavda kaynatılmıştır.

Otoklavlama işleminden sonra, Set 1 ve Set 2 kendi aralarında, azot geçirilerek oksijensiz hale getirilmiş ortamlar ve anaerobik kabin ile oksijensiz hale getirilmiş ortamlar olmak üzere tekrar ikiye ayrılmıştır (her set 6 besi ortamı; 3 farklı tür substrat, 2 farklı oksijensiz ortamdan oluşmaktadır). Burada amaç, anaerobik kabinli ortamlar ile azot geçirilmiş ortamlarda, mikroorganizma üretiminin karşılaştırılmasıdır. Ayrıca otoklav sonrası her bir besi yerinden 100'er mL glikoz ölçümü için ayrılmıştır.

Hazırlanmış ortamlar, 100'er mL vidalı kapaklı borosilikat cam şişelere alınmış, parafilmle ve alüminyum folyo ile ağızları kapatılarak +4 °C'de dolapta saklanmıştır.

Besi ortamı pancar ile, örnek deney tasarımı Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 Deney tasarımı

4.1.2.3 Deney Ortamlarının Anaerobik Koşula Getirilmesi

121 °C ve 131 °C’de iki set halinde oluşturulan deney sisteminde ortamların mikroorganizmanın çoğalma ortamı olan anaerobik hale getirilebilmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar;

Besi ortamlarından N₂ gazı geçirme yöntemi: Otoklavlanmış, sonrasında 25 °C oda sıcaklığında bekletilmiş besi ortamlarından (patates, pancar, glikoz) 30 dk boyunca N₂ gazı geçirilmesi (Şekil 4.10)



Şekil 4.10 121 °C’lik deney seti besi ortamlarından N₂ gazı geçirme yöntemi

Anaerobik kabin yöntemi : Otoklavlanmış, sonrasında 25 °C oda sıcaklığında bekletilmiş besi ortamlarının (patates, pancar, glikoz) N₂ gazı ile oksijensiz hale getirilmiş anaerobik kabinde 30 dk boyunca tutulması (Şekil 4.11)



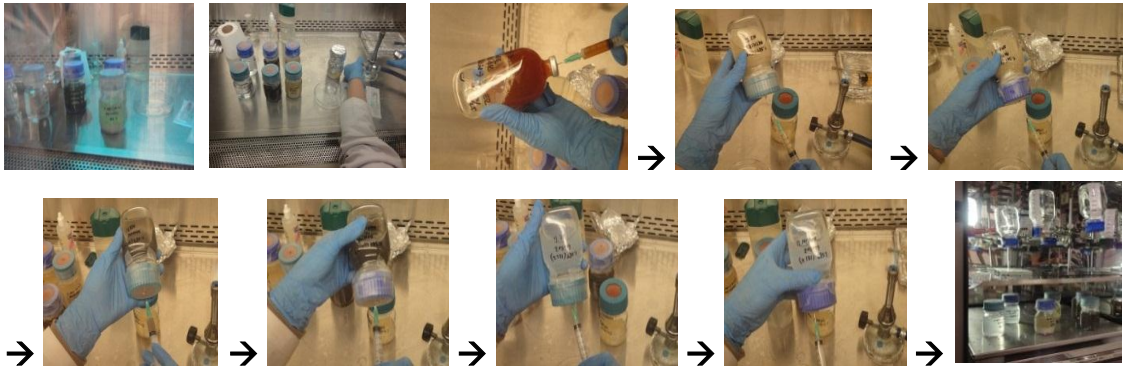
30 dk

Şekil 4.11 121 ve 131 °C'lik deney seti besi ortamlarının anaerobik kabin yöntemi ile oksijensiz hale getirilmesi

4.1.2.4 Deney yöntemi

4.1.2.4.1 SET 1 Deney

121 °C sıcaklıkta otoklavlanarak hazırlanan, N₂ gazı geçirilerek ve anaerobik kabin kullanımı ile oksijensiz hale getirilen besi ortamları, UV ışık altında steril kabin'de steril ortamın sağlanması için bekletilmiştir. Sonrasında N₂ gazı ve kabin yöntemi ile oksijensiz hale getirilen 6 adet besi ortamına (patates, pancar, glikoz) 1:50 mikroorganizma aktarım oranı ile liverdan 2 mL aktarım gerçekleştirilmiştir. Aktarım sonrasında 70 saat süresince mikroorganizma çoğalması ve gaz toplama şişeleri yardımıyla gaz çıkışı gözlemlenmiştir. Adım adım yapılan işlemler Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12 121 °C da otoklavlanmış N₂ li ve kabinli besi ortamlarına liver'dan 2 mL aktarılarak gerçekleştirilen deney

70 saatlik biyokimyasal üretim sonunda mikroorganizmalı besi ortamları, glikoz ölçer, refraktometre ve HPLC analiz yöntemleri kullanılarak glikoz derişimlerinin belirlenebilmesi için +4 °C buz dolabında saklanmıştır. Gaz toplama şişeleri ise üretilen gaz içeriklerinin belirlenmesi adına oda sıcaklığında GC analizi için bekletilmektedir.

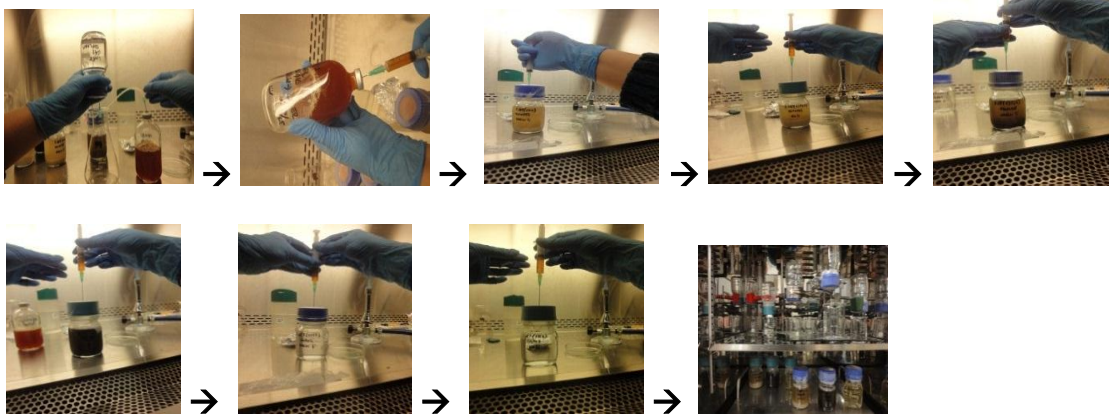


Şekil 4.13 70. saat sonundaki gaz toplama şişeleri ve mikroorganizmalı besi ortamları

4.1.2.4.2 SET 2 Deney

131 °C sıcaklıkta otoklavlanarak hazırlanan, N₂ gazı geçirilerek ve anaerobik kabin kullanımı ile oksijensiz hale getirilen besi ortamları, UV ışık altında laminar flow'da steril ortamın sağlanması için bekletilmiştir. Sonrasında N₂ gazı ve kabin yöntemi ile oksijensiz hale getirilen 6 adet besi ortamına (patates, pancar, glikoz) 1:50 mikroorganizma aktarım oranı ile 62 g/L'lik liver dan 2 mL aktarım gerçekleştirilmiştir. Aktarım sonrasında 70 saat süresince mikroorganizma çoğalması ve gaz toplama şişeleri yardımıyla gaz çıkışı gözlemlenmiştir. Adım adım yapılan işlemler Şekil 4.14'te verilmiştir.

90 saatlik biyokimyasal üretim sonunda mikroorganizmalı besi ortamları, glikoz ölçer, refraktometre ve HPLC analiz yöntemleri kullanılarak glikoz derişimlerinin belirlenebilmesi için +4 °C'de buz dolabında saklanmıştır. Gaz toplama şişeleri ise üretilen gaz içeriklerinin belirlenmesi adına oda sıcaklığında GC analizi için bekletilmektedir.

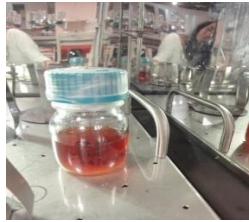


Şekil 4.14 90. saat sonundaki gaz toplama şişeleri ve mikroorganizmalı besi ortamları

4.1.3 Besi ortamı türü, derişimi ve mikroorganizma çoğalma sıcaklığı

4.1.3.1 Mikroorganizma aktarımı

Mikroorganizmanın gaz üretim performansını arttırmak için öncelikle canlandırma ortamı olan liver da çoğaltma gerçekleştirilmiştir. 62 g/L hazırlanan liver ortamından anaerobik koşulun sağlanması için 30 dk boyunca N_2 gazı geçirilerek, 121 °C ve 1.2 atm de 20 dk boyunca sterilizasyon sağlanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Mikroorganizma canlandırma ortamı liver

Mikroorganizma saklama koşulları, uzun periyotta çoğalma ve hidrojen üretim performansının değişmemesi açısından önemlidir. Bu amaçla +4 °C'de saklanan liver ortamından 2 mL alınarak mikroorganizma canlandırma ortamı olan 100 mL'lik 62 g/L liver ortamına 1:50 mikroorganizma aktarım oranı ile aktarım gerçekleştirilmiştir. 48 saat süresince inkübasyon sağlanıp sonrasında 100 mL'lik glikoz, patates ortamlarına 2

mL aktarım yapılmış ve farklı tür ve derişimlerdeki besi ortamlarındaki performansları incelenmiştir.

4.1.3.2 Besi ortamının hazırlanışı

Biyohidrojen üretim veriminin arttırılabilmesi için optimum ve ekonomik açıdan en uygun besi ortamı derişiminin ve farklı sıcaklıkların çoğalmaya etkisinin belirlenebilmesi amacıyla 28 ve 37 °C’de iki farkı set deney hazırlığı yapılmıştır. Yapılan çalışmada 28 ve 37 °C sıcaklıkta eşanlı gerçekleştirilecek deneyler için 1 adet 400 g/L’lik patates suyu, 5 adet farklı glikoz derişiminde 400 g/L’lik patates suları (eklenen glikozlar sırası ile 1, 5, 7.5, 10 ve 20 g/L) ve 1 adet saf glikoz çözeltisi 121 °C de otoklavlanarak patates suyundaki nişastanın glikoza dönüşümü sağlanmıştır.

Patates ortamı: Patatesler soyulup, 600 g tartılıp, meyve sıkacağı yardımı ile suyu sıkılarak (335 mL patates suyu) çalışma hacmi olan 1500 mL’ye bidistile su ile tamamlanmıştır. 30 dk süresince manyetik karıştırıcıda nişastanın küçük moleküllere parçalanabilmesi amacıyla kaynatılmıştır.

Glikoz ortamı: 7.5 g/L derişiminde 200 mL glikoz çözeltisi hazırlanmıştır.

Hazırlık aşamasında herhangi derişim değişiminden kaçınmak ve deneylerin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla ortamlar toplu olarak hazırlanmış (Şekil 4.16) ve sonrasında istenen hacimlerde kullanılmıştır.



Şekil 4.16 Besi ortamlarının hazırlık aşaması (7x2 adet besi ortamları)

4.2 Karışım kültür aktarım oranının etkisi

Literatür araştırması, farklı tür ve özellikteki mikroorganizmaların birlikte kullanımının H₂ üretim verimini arttırdığını göstermiştir. Bu kapsamda zorunlu anaerobik bir bakteri olan *Clostridium butyricum* ile fakültatif bir mikroorganizma olan *Enterobacter aerogenes* mikroorganizması seçilmiştir. *Clostridium butyricum* mikroorganizması karanlık fermantasyon yöntemi ile en çok H₂ üreten mikroorganizmadır. Ancak O₂ varlığında H₂ üretimini durdurmaktadır. *Enterobacter* ise hem H₂ üreticisi (*Clostridium butyricum* *Enterobacter aerogenes*'ten 2 kat fazla H₂ üretimi yapabilmektedir) hem de O₂ tüketicisidir. Bu çalışmada *Enterobacter aerogenes* kullanılarak, oksijeni yok etmek için kullanılan L-cysteine katkı maddesinin kullanımının ortadan kaldırılması hem de H₂ üretimine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, belirlenen optimum besi ortamında (1g/L glikoz ile zenginleştirilmiş 400g/L patates suyu) *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* mikroorganizmasının aktarım oranlarının belirlenerek karışım kültür şeklinde kullanımının H₂ üretim verimi üzerine etkisinin incelenmiştir.

4.2.1 Mikroorganizma aktarımı

Yapılan çalışmada biyohidrojen üretim verimini arttırmak amacıyla, *C. butyricum* ve *E. aerogenes* mikroorganizmaları kullanıldığından mikroorganizma canlandırması ve aktarımları önem taşımaktadır. Mikroorganizmalar son ölçek büyütme adımı olan reaktöre aktarılmadan önce kendi büyüme ortamlarında çoğaltılmıştır. Bu amaçla iki mikroorganizmanın canlandırma ve aktarımları ayrı ayrı ayrıntılı bir şekilde açıklanacaktır.

Enterobacter aerogenes mikroorganizmasının aktarım aşamaları :

KCTC'den (Korean Collection for Type Cultures) liyofilize halde alınan KCTC 2190 katalog numaralı fakültatif *Enterobacter aerogenes* mikroorganizması, Çizelge 4.1'de verilen derişimlerde hazırlanan 50 mL'lik canlandırma ortamına açılmıştır.

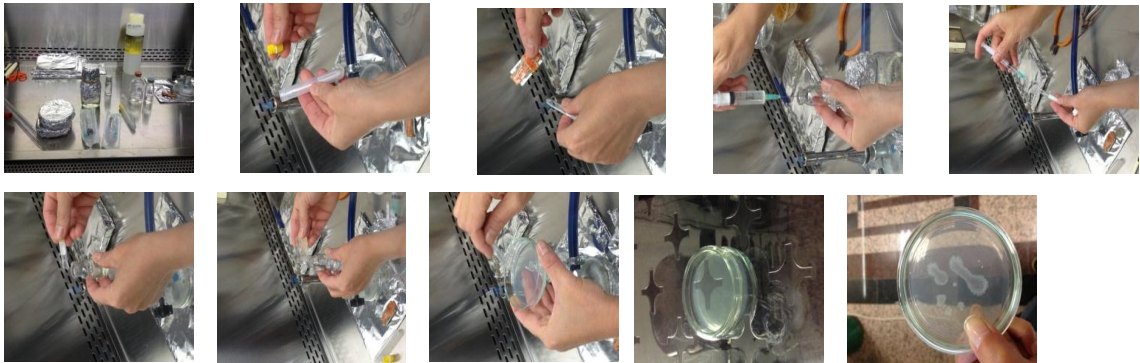
Çizelge 4.1 *Enterobacter aerogenes* mikroorganizması besi ortamları

İçerik	Canlandırma ortamı derişimi, g/L	Katı besi ortamı derişimi, g/L	Sıvı besi ortamı derişimi, g/L
Meat ekstract	3	3	3
Pepton	5	5	5
Agar	-	15	-
Bidistile su	1	1	1

Canlandırma aşamaları;

- Ampül kırılarak içerisindeki liyofilize mikroorganizma 0.5 mL’lik canlandırma ortamına atılır ve çözünmesi için iyice karıştırılır.
- Çözünen mikroorganizma 5 mL’lik canlandırma ortamına dökülür.
(5.5 mL’lik mikroorganizmalı canlandırma ortamı 5.5 mL’lik %20’lik gliserol (gliserin) içerisine dökülür ve -70 °C’de saklanır.)
- Kalan son damlacıklar petrideki katı besi ortamına damlatılır ve 30 °C’de aerobik ortamda 23 saat süresince inkübe edilir.
- Petrideki tek koloniden 10 mL’lik canlandırma ortamına aktarım yapılır. 23 saat 30 °C’de inkübasyon sağlanır. 23 saat sonrasında mikroorganizmalı ortam eş hacimde %20’lik gliserol’e alınarak -70 °C’de saklanır.
- Petri kabında çoğalan mikroorganizmanın tek kolonisinden alınarak eğik agara aktarım yapılır. 30 °C’de 23 saat süresince inkübe edilir.
- Her 15 günde bir periyodik olarak katı besi ortamına aktarım yapılır.

Şekil 4.17’de canlandırma aşamaları verilmiştir.



Şekil 4.17 *E. aerogenes* canlandırma aşamaları

Sıvı besi ortamı

Deney öncesinde *Enterobacter aerogenes*'in eğik agarda çoğaltıldığı katı besi ortamından sıvı besi ortamına 1:50 mikroorganizma aktarım oranı ile aktarım yapılır. 30 °C'de 23 saat süresince inkübasyon sağlanıp sonrasında farklı aktarım oranlarında *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile 100 mL'lik besi ortamlarına aktarım yapılmıştır.



Şekil 4.18 Katı besi ortamından sıvı besi ortamına aktarım

Clostridium butyricum mikroorganizmasının aktarım aşamaları :

Önceki çalışmalarda da kullanılan *Clostridium butyricum* mikroorganizmanın gaz üretim performansını arttırmak için öncelikle canlandırma ortamı olan liver da çoğaltma gerçekleştirilmiştir. 20 ve 50 mL'lik 62 g/L hazırlanan liver ortamları 121 °C ve 1.2 atm'de 20 dk boyunca sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon sonrasında 30 dk boyunca N₂ gazı geçirilerek anaerobik koşul sağlanmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Liver ortamında mikroorganizma canlandırma

Mikroorganizma saklama koşulları, uzun periyotta çoğalma ve hidrojen üretim performansının değişmemesi açısından önemlidir. Bu amaçla +4 °C'de saklanan eski liver ortamından 0.4 mL alınarak mikroorganizma canlandırma ortamı olan 20 mL'lik

62 g/L liver ortamına 1:50 mikroorganizma aktarım oranı ile aktarım gerçekleştirilmiştir. 37 °C de 23 saat süresince inkübasyon sağlanıp sonrasında 50 mL'lik 62 g/L liver ortamına 1 mL mikroorganizma aktarımı yapılmıştır. 37 °C'de 23 saat süresince inkübasyon sağlanıp sonrasında farklı aktarım oranlarında *Enterobacter aerogenes* mikroorganizması ile 100 mL'lik besi ortamlarına aktarım yapılmıştır.

4.2.2 Mikroorganizma aktarım oranları

Set 1:

Karışım kültür aktarım oranlarının belirlenebilmesi için, 1 g/L glikoz eklenmiş 400 g/L'lik sabit derişimdeki patates suyundan 90'ar mL alınarak, *C. butyricum* ve *E. aerogenes* aktarım oranının aynı olduğu **C:E; 1:1**, *E. aerogenes* 'in sabit tutulduğu, *C. butyricum* 'un değişkenlik gösterdiği aktarım oranları **C:E; 2:1 4:1, 10:1** ve *C. butyricum* 'un sabit tutularak *E. aerogenes* 'in değişkenlik gösterdiği aktarım oranları **C:E; 1:2, 1:4 1:10** ile **7 adet** farklı aktarım oranlarında çalışılmıştır. Burada aktarım oranları çizelge 4.2' de açıklamalı şekilde verilmiştir.

Çizelge 4.2 Set 1 aktarım oranları (90 mL substrat üzerine eklenen mikroorganizma miktarları)

Clostridium butyricum, mL	Enterobacter aerogenes, mL	Aktarım oranı, C:E
1.8	1.8	1:1
3.6	1.8	2:1
7.2	1.8	4:1
18	1.8	10:1
1.8	3.6	1:2
1.8	7.2	1:4
1.8	18	1:10

Set 1,2,3:

Bir önceki deney setinde gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre 3 farklı set deney planı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Set1-2-3 mikroorganizma aktarım oranları ve substrat miktarları

SET 1			SET 2			SET 3		
Substrat + Bidist, mL	^a C.b., mL	^b E.a., mL	Substrat, mL	C.b., mL	E. a., mL	Substrat, mL	C. b., mL	E.a., mL
90 + 8	1	1	98	1	1	90	5	5
90 + 7	2	1	97	2	1	90	6.65	3.35
90 + 5	4	1	95	4	1	90	8	2
90 + 1	8	1	91	8	1	90	9	1.12
90 + 7	1	2	97	1	2	90	3.35	6.65
90 + 5	1	4	95	1	4	90	2	8
90 + 1	1	8	91	1	8	90	1.12	9
90 + 8	2	0	98	2	0	90	10	0
90 + 0	0	2	98	0	2	90	0	10
90 + 1	8 (C.b)	1(^c L)	91	8 (C.b)	1 (L)	90	9 (C.b)	1.12 (L)

^aC.b. : *Clostridium butyricum*

^bE.a. : *Enterobacter aerogenes*

^cL: L-cysteine

Set1; bidistile su ile seyreltilerek 100 mL'ye tamamlanan besi ortamlarında, Set 2; besi ortamı ile değiştirerek 100 mL'ye tamamlanan besi ortamlarında, Set 3 ise 90 mL sabit besi ortamına, kalan 10 mL'lik hacmi paylaşılacak şekilde oluşturulan aktarım oranlarını temsil etmektedir. Ayrıca katkı maddesi olarak, L-cysteine (L) ve *E. aerogenes*'in karşılaştırılması amacıyla *Clostridium butyricum* (C.b.) ile L-cysteine (L) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3 Katkı Maddeleri ile Zenginleştirilen Besi Ortamlarının Etkisi

Şimdiye kadar olan karışım kültürle fermantatif hidrojen üretimindeki çalışmalarda, genellikle substratların ve derişimlerinin, sıcaklığın ve pH değerlerinin fermantatif hidrojen üretimine etkileri incelenmiştir ancak inorganik katkı maddeleri özellikle metal iyonlarının hidrojen üretimine etkisi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Anaerobik bakteri ile fermantatif hidrojen üretiminde katkı maddelerinden demir, hidrojenin oksidasyonunu katalizleyen veya protonu indirgeyen iki ana başlıkta incelenen nikel-demir (Ni-Fe) ve sadece demir (Fe-Fe) hidrojenazlar açısından önemlidir. Demir ve düşük nikel derişimi, hidrojenaz enziminin aktivitesini arttırmasından dolayı fermantatif hidrojen üretimini etkilemektedir. Aynı şekilde diğer bir katkı maddesi olan azot, hidrojen üreten bakterinin üremesinde önemli rol oynar ve genellikle amonyak azot kaynağı olarak kullanılır. Amonyak uygun derişim aralığında

hidrojen üretimine yararlı olmasına rağmen, yüksek derişimlerde kullanılırsa bakterinin hücre içi pH değerini değiştirmesinden dolayı inhibe edici özelliği vardır. Bundan dolayı uygun amonyak derişiminin belirlenmesi gerekmektedir. Diğer bir katkı maddesi Mg^{2+} derişiminin Zhao ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada 0.1-0.6 g/L biyohidrojen üretim verimini arttırdığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada biyohidrojen üretim verimini arttırmak amacıyla, belirlenen optimum besi ortamında (1g/L glikoz ile zenginleştirilmiş 400g/L patates suyu) ve 10:1 C:E aktarım oranı ile katkı maddelerinden demir, azot, nikel ve magnezyumun eklendiği besi ortamlarının Design Expert paket programı ile deney tasarımı yapılarak optimum derişim değerleri belirlenmiştir.

4.4 Biyoreaktörde Dinamik Analiz ve Sistem Tanımlama

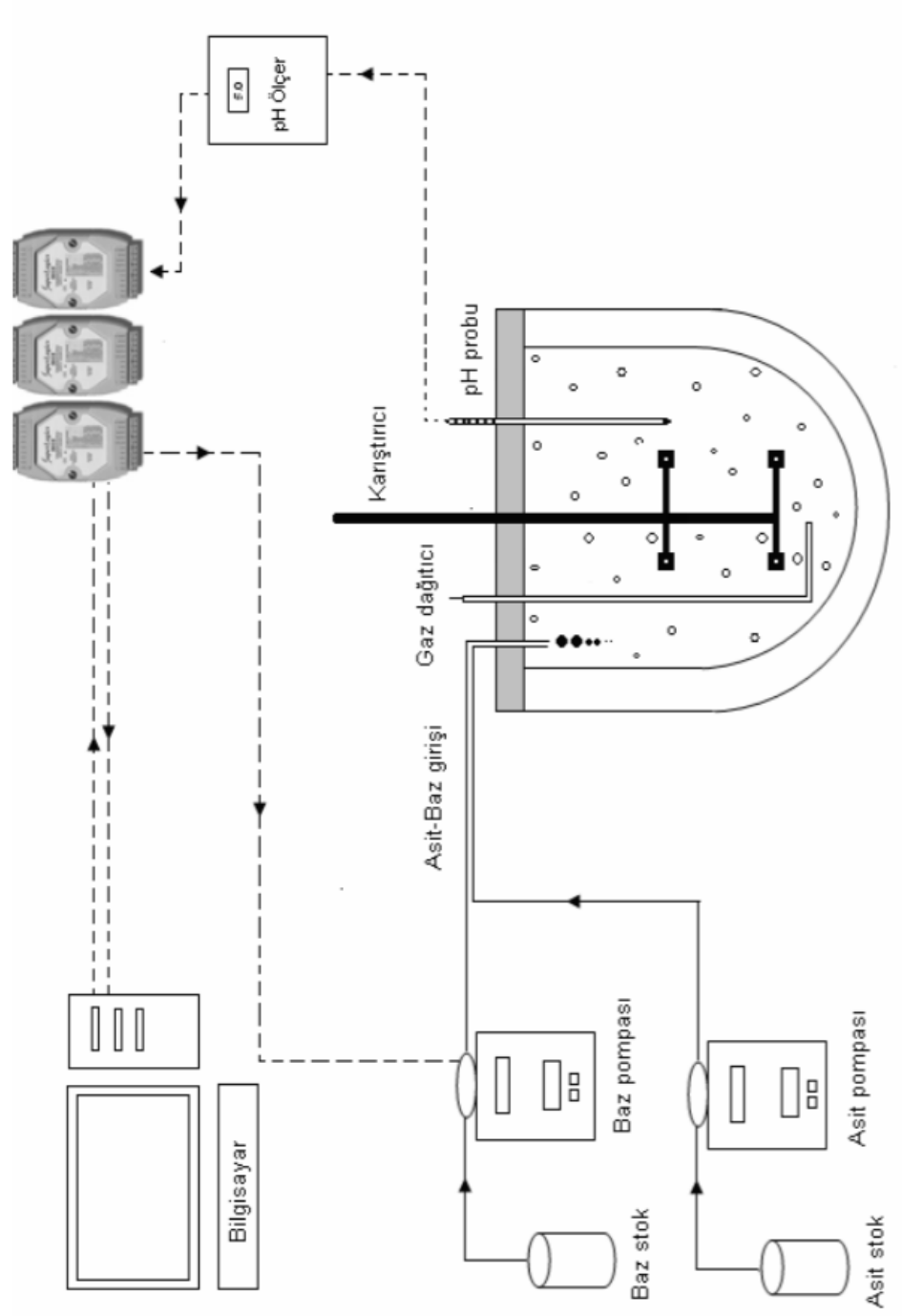
Anaerobik koşullarda 10:1 (C:E) oranında *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında (1 g/L glikoz, 1.5 g/L $FeSO_4$ ve 1 g/L $MgCl_2$) 4 L çalışma hacminde gerçekteştirilen açık – hat biyoreaktör işletiminde, prosesin 25 saatlik işletim süresi boyunca pH değişimini ve biyohidrojen üretim hacmini belirlemek amacıyla deneysel çalışma şekil 4.20’de verilen Techfors S biyoreaktör ile gerçekteştirilmiştir. Kontrol edilen değişken olarak seçilen pH’ ın herhangi bir kontrol yöntemiyle denetlenmediği durumda zamanla değişimini incelemek amacıyla gerçekteştirilen deneyde diğer tüm biyoreaktör işletim parametreleri sabit tutularak hidrojen üretimi gerçekteştirilmiştir. İşetimin koşulları, 37 °C sıcaklık ve 600 rpm karıştırma hızına ayarlanarak reaktörün kontrol algoritması (IRIS V.2) ile sabit tutulmuştur. Ölçek büyütme aşamasının son adımında biyoreaktöre aktarılan karışım kültürün, zenginleştirilmiş patates suyu ortamında havasız koşullarda fermentasyon süresince pH değişimi MATLAB programının Simulink ara yüzünde oluşturulan model yardımıyla kaydedilmiştir.



Şekil 4.20 Techfors S biyoreaktor deney düzeneği

4.5 pH kontrolün Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi

Azot gazı geçirilerek oluşturulan anaerobik koşullarda 10:1 (C:E) oranında *C. butyricum* ve *E. aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı 4 L çalışma hacmine sahip kesikli bir biyoreaktörde pH kontrolüne yönelik yapılan çalışmada teorik olarak iki farklı kontrol yöntemi uygulanmıştır. Bunlardan ilki PID kontrol diğeri ise GMV kontrol yöntemleridir. Önceki bölümlerde anlatıldığı üzere biyoreaktörün işletim şartları belirlenerek ayar değişkeni olarak baz akışı hızı seçilmiş ve baz akış hızının çıkış değişkeni olan pH değerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Teorik çalışmalarda Ek 1-3 te verilen MATLAB’da yazılmış olan program kullanılmıştır. Yapılan çalışmada sistem tanımlama ve on-line pH kontrolü amacıyla kullanılan sistem şekil 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21 On-line pH kontrolü sistemi

4.6 Gaz Toplama Sistemi

Karanlık fermantasyon yöntemi ile yapılan deneylerde açığa çıkan gazın toplanması için dereceli gaz toplama sistemi tasarlanmıştır. Reaksiyon esnasında oluşan gaz karışımı ters çevrilmiş içi su dolu bir şişeye ucunda şırınga olan hortumla verilmiş ve çıkan gaz ile birlikte şişenin içindeki suyun çıkış hacmine göre oluşan gaz miktarına ulaşılmıştır. Kullanılan sistem şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22 Gaz toplama şişeleri

4.7 Gaz Kromatografi ile Hidrojen Gazı Analizi

Toplanan gazın (H_2 ve CO_2) hacimce % derişimi gaz kromatografi cihazı ile belirlenmiştir. Bunun için analizler Shimadzu GC-2010 Plus gaz kromatografi cihazında Pre TCD (ısıl iletkenlik dedektörü) dedektörüyle gerçekleştirilmiştir. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 200 °C ve 250 °C ’dir. Enjeksiyon, gaz sampler enjeksiyon bloğuna yapılmış, split modda çalışılmıştır. Split oranı 50’dir. Kolon olarak “Supelco Analytical Carboxen1010Plot 30mx0.32mm” kullanılmıştır. Kolon sıcaklık programı yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C’de başlatılmış, burada 2 dk beklendikten sonra 5 °C/dk artışla 100 °C’ye çıkılmıştır. Toplam program 14 min olup make up akışı 6 mL/min’dir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 Besi Ortamı Bileşimi ve Derişiminin Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi

5.1.1 Besi ortamı türü

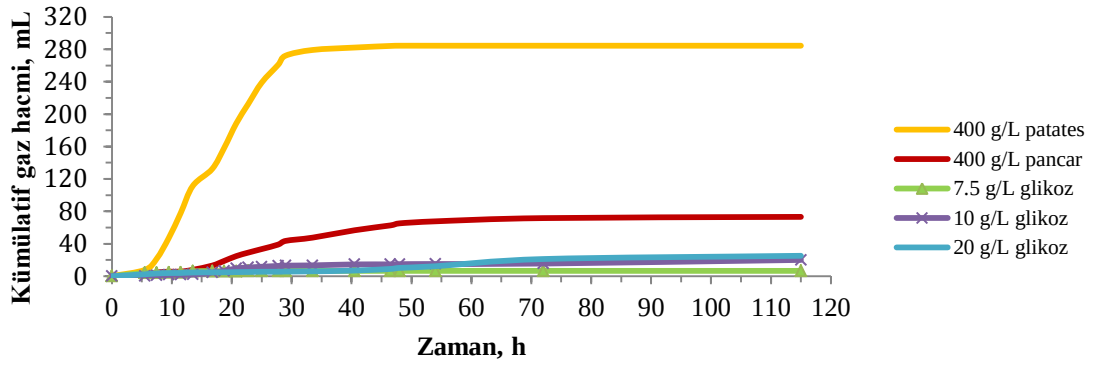
İlk olarak liverdan aktarılmış patates kaynağından 100 mL’lik üç farklı tip (patates, şeker pancarı ve saf glikoz), beş farklı derişimdeki (400 g/L patates; 400 g/L şeker pancarı, 7.5-10-20 g/L glikoz) besi ortamlarına yapılan aktarımlarda hidrojen üretim verimleri incelenmiştir. Bu amaçla liverdan alınan 5 mL *Clostridium butyricum* mikroorganizması aktivitesinin arttırılması amacıyla 50 mL’lik liver ortamına aktarılmıştır. 23 saat 28 °C’de inkübasyon sonrasında 70 mL’lik patates ortamına 7 mL aktarım gerçekleştirilmiştir ve 23 saat 28 °C’de inkübe edilmiştir. Son adımda beş farklı ortamdan pH ayarı yapılmaksızın azot geçirilmiş ve tıpa ile kapatılarak anaerobik koşullar sağlanmıştır. Tüm 100’er mL’lik ortamlara 70 ml’lik kaynaktan 7’şer ml aktarım yapılarak sıcaklığı 28 °C’ye ayarlanmış inkübatörde deneyler gerçekleştirilmiştir. Aktarım yapılmış besi ortamları şekil 5.1’de gösterilmiştir.



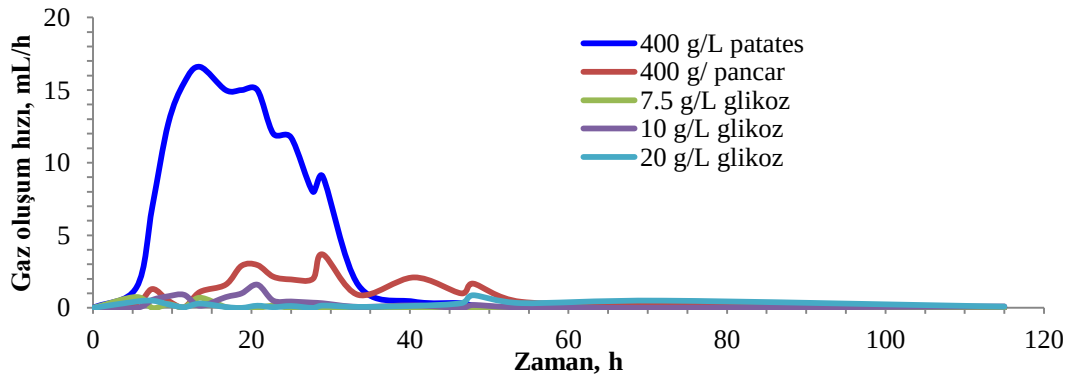
Şekil 5.1 Farklı besi ortamlarında hidrojen üretim sistemi

Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde anaerobik bakteriler karanlık koşullarda organik substratları ayrıştırarak hidrojen üretirler. Farklı besi ortamları kullanıldığı durumda üretilen kümülatif ve toplanan gaz hacimleri sırasıyla şekil 5.2 ve 5.3’te verilmiştir. Şekil 5.2’den, 400 g/L’lik patates ortamının gaz üretiminde önemli bir rol

oynadığı görülmüştür. 115 saatlik fermentasyon sonucunda patates ortamında mikroorganizma üstel çoğalma fazının 5.5-33. saatler arasında olduğu görülmüştür. Şekil 5.3'ten ise, yaklaşık 285 mL gaz üretiminin 279 mL'si üstel çoğalma fazında gerçekleşmiştir.



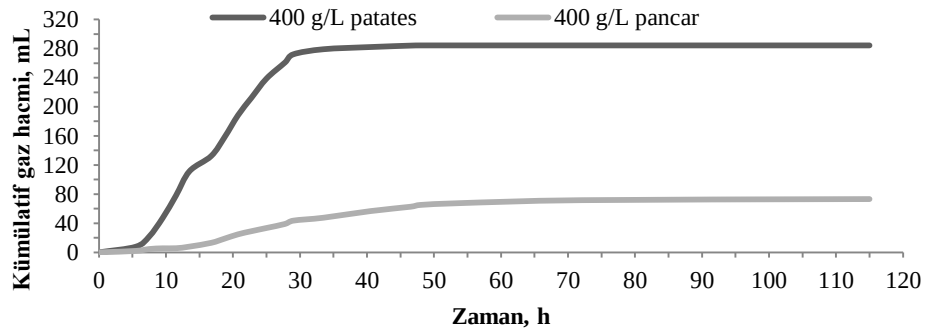
Şekil 5.2 Farklı besi ortamlarında kümülatif gaz üretimi



Şekil 5.3 Farklı besi ortamlarında gaz oluşum hızı

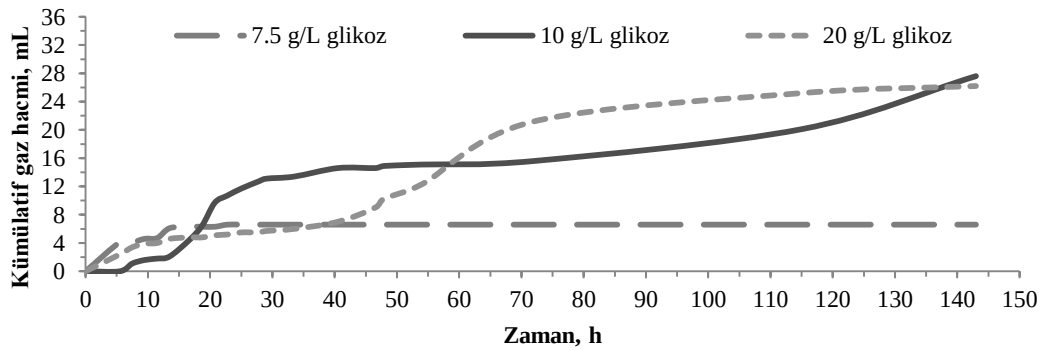
Daha ayrıntılı incelemek için, şekil 5.4'te verilen 115 saatlik periyotta gerçekleştirilmiş deneyde elde edilen sonuçlar incelendiğinde aynı derişimde hazırlanmış patates ortamının, şeker pancarına kıyasla daha yüksek kümülatif gaz hacmi vermesi aşılama kaynağı olarak patates ortamının kullanılması (mikroorganizma adaptasyonu) ve patates ortamının mikroorganizma çoğalmasında aktif rol oynayan zengin mineral içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca hidrojen gazı üretiminde glukoz, sukroz, laktoz gibi ayrıştırılması kolay şekerlerin kullanımı arzu edildiğinden, nişastanın glikoza

parçalanabilmesi amacıyla patates ortamı yarım saat sürecince kaynatılmıştır. Ancak aynı işlemin şeker pancarına uygulanmaması ve böylece sukrozun glikoza göre daha büyük molekül yapısına sahip olması mikroorganizmanın substratı kullanımını zorlaştırmış ve bu durum gaz hacminin düşüşüne neden olmuştur. Bu gibi belirsizlikleri engellenmek adına glikoz analizi ile substratlardaki glikoz içeriğinin belirlenmesi uygun görülmüştür.



Şekil 5.4 Patates ve pancar ortamlarının kümülatif gaz üretimine etkisi

Saf glikoz derişimlerinin kümülatif gaz üretimine etkisinin incelendiği şekil 5.5'ten patates ve pancar besi ortamlarının yanında gaz hacimlerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu durum mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için sadece glikoz kaynağının yeterli olmamasından kaynaklanmaktadır. Glikozun yanı sıra çeşitli tuzlar ve minerallerle besi ortamlarının zenginleştirilmesi ile bu sorunun çözüleceği düşünülmektedir. Farklı glikoz derişimleri kendi aralarında kıyaslandığında ise glikoz derişiminin artması ile gaz hacminin arttığı görülmektedir. Daha yüksek derişimler denenerek herhangi bir substrat inhibisyonunun olup olmadığı incelenecektir.



Şekil 5.5 Saf glikoz derişiminin kümülatif gaz üretimine etkisi

Çizelge 5.1’de farklı besi ortamlarında üretilen kümülatif gaz hacimleri verilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere en yüksek kümülatif gaz hacmine 400 g/L’lik patates ortamında ulaşılmıştır.

Çizelge 5.1 Farklı besi ortamlarında üretilen kümülatif gaz hacimleri

Besi ortamları	Patates (400 g/L)	Pancar (400 g/L)	Glikoz (7.5 g/L)	Glikoz (10 g/L)	Glikoz (20 g/L)
Kümülatif gaz hacmi, mL	284.35	73.2	6.6	20.1	25.2

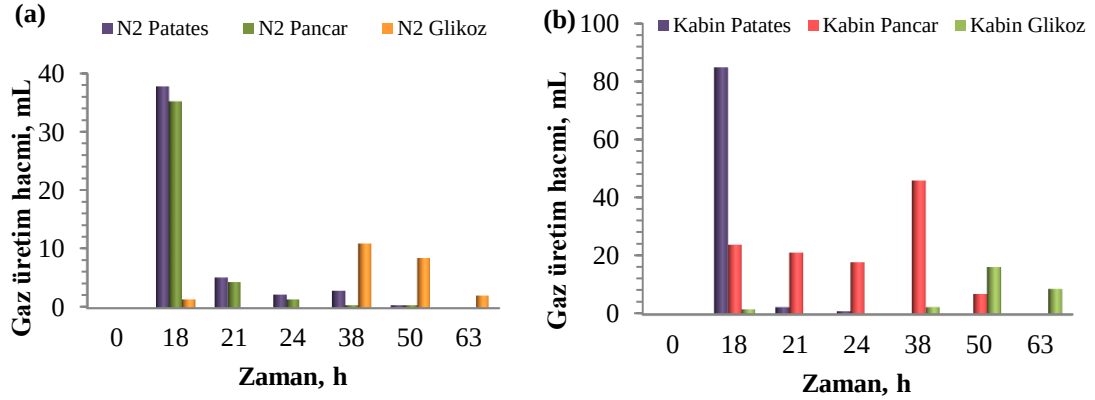
5.1.2 Besi ortamı türü, anaerobik ortam ve otoklav sıcaklığı

5.1.2.1 SET 1 121 °C otoklavlamalı deney sonuçları

İlk olarak gliserinde aktarılmış liver kaynağından 100 mL’lik üç farklı tip (patates ve şeker pancarı), iki farklı oksijensiz ortam sağlama yöntemi (N₂ li ve kabinli ortamlar) ile besi ortamlarına yapılan aktarımlarda hidrojen üretim verimleri incelenmiştir. Bu amaçla gliserinden alınan 2 mL *Clostridium butyricum* mikroorganizması aktivitesinin arttırılması amacıyla 100 mL lik 62 g/L liver ortamına aktarılmıştır. 48 saat 28 °C’de inkübasyon sağlanmıştır. İkinci adımda, 121 °C de otoklavlanmış ilk üç farklı ortamdan (400 g/L patates suyu, 400 g/L pancar suyu ve 10 g/L glikoz çözeltisi) pH ayarı yapılmaksızın azot geçirilmiş ve tıpa ile kapatılarak anaerobik koşullar sağlanmıştır. Diğer üç farklı ortam (400 g/L patates suyu, 400 g/L pancar suyu ve 10 g/L glikoz çözeltisi) ise anaerobik kabin kullanılarak oksijensiz hale getirilmiştir. 100’er mL’lik ortamlara, kaynaktan 2’şer mL aktarım yapılarak, 28 °C’ye ayarlanan inkübatörde deneyler gerçekleştirilmiştir.

121 °C’de otoklavlanmış farklı besi ortamları ile gerçekleştirilen deneyde azot geçirerek ve kabinde bekletilerek oksijensiz hale getirilen ortamlarda gaz üretim hacmi Şekil 5.6’da karşılaştırılmıştır. Şekil 5.6’dan da görüleceği gibi 18. saatte 3 farklı ortamda da en yüksek gaz çıkışına rastlanmıştır ve kabinde bekletilmiş patates ortamının diğer ortamlara ve N₂ geçirilmiş ortama göre daha fazla gaz ürettiği gözlemlenmiştir. 18. saat

sonrasında patates ve glikoz ortamlarında bir durgunluk yaşanmış ve pancar ortamı diğer ortamlara (özellikle de kabinde bekletilmiş olanı) üstünlük sağlamıştır. 38. saat sonrasında ise patates ve pancar ortamında gaz çıkışı durmuş, ancak az da olsa glikoz çözeltisinde gaz çıkışı gözlemlenmiştir.

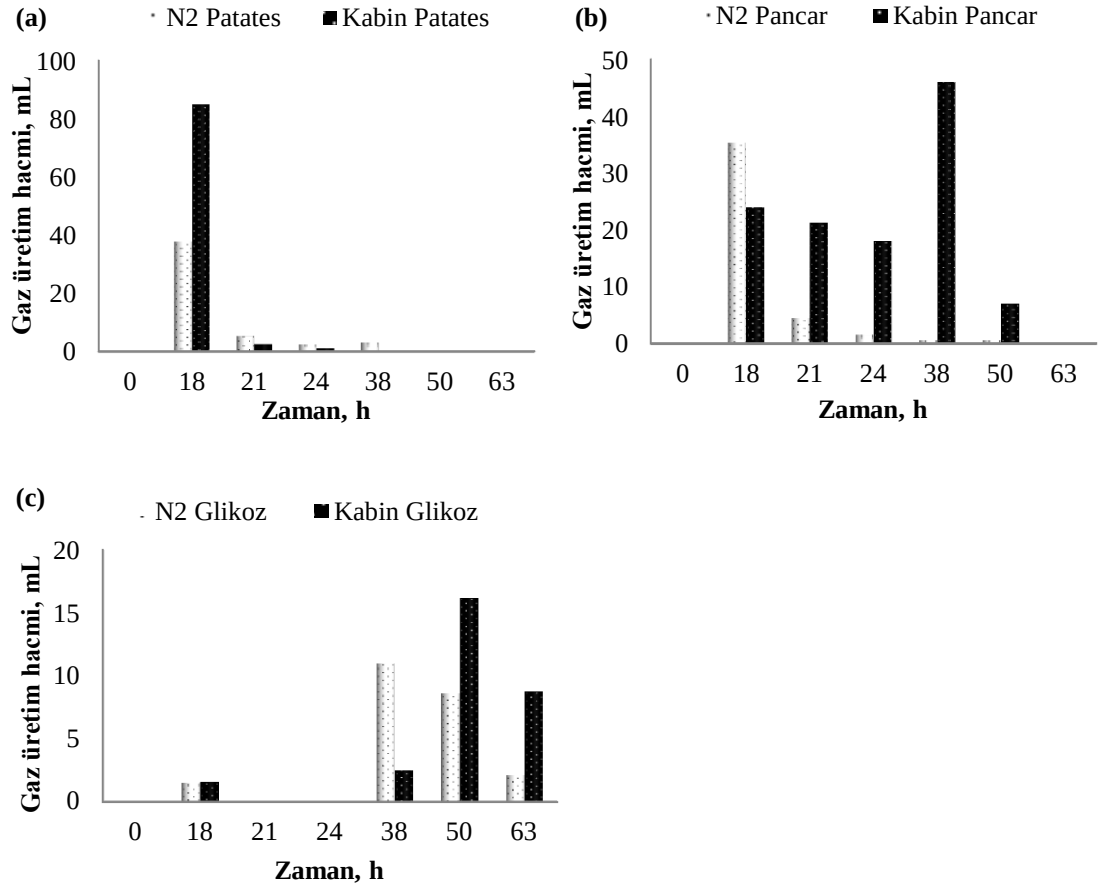


Şekil 5.6 Oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarında üretilen gaz hacmi (121°C)
a. Azot geçirerek, b. Anaerobik kabinde

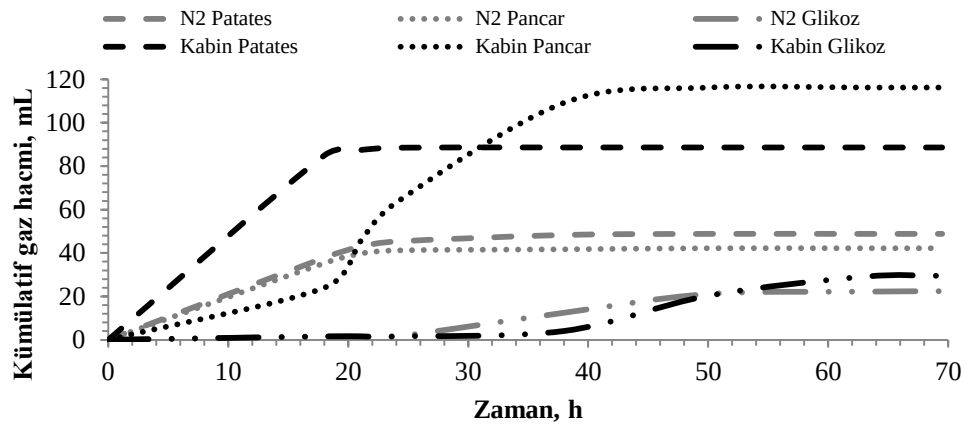
Şekil 5.7’den görüldüğü üzere azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamları kendi aralarında kıyaslandığında kabinli ortamın gaz çıkışının daha yüksek olduğu sonucuna varılmaktadır. Buradan anaerobik kabinin *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının çoğalacağı oksijensiz ortamı sağladığı sonucuna varılmaktadır.

121 °C’de otoklavlanmış ve iki farklı oksijensiz ortam sağlama yöntemi ile anaerobik hale getirilmiş 3 farklı tip besi ortamlarına maksimum hidrojen üretimini gözlemlemek üzere aktarılan 2 mL *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının kümülatif gaz üretimi şekil 5.8’de verilmiştir.

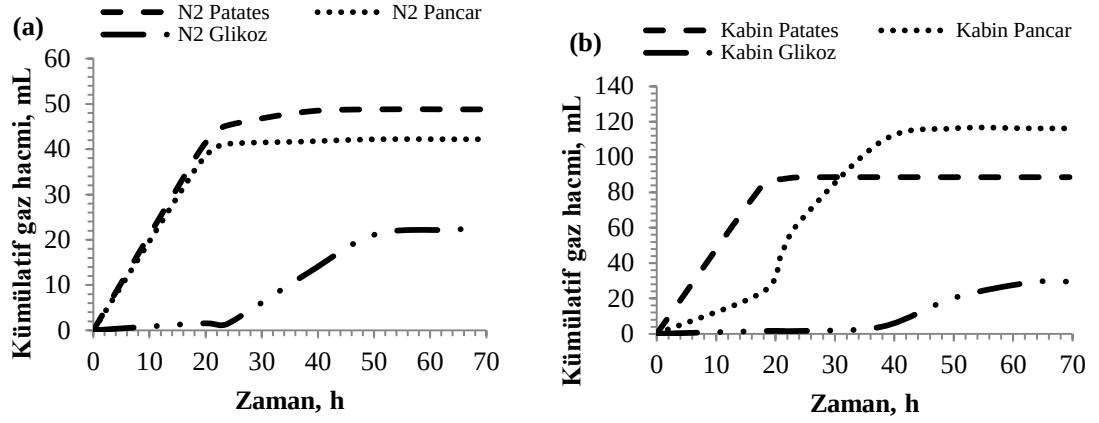
70 saatlik deney sonrasında en yüksek gaz çıkışına kabinde bekletilerek oluşturulmuş oksijensiz ortamlı besi ortamı 400 g/L pancar suyunda ulaşılmıştır.



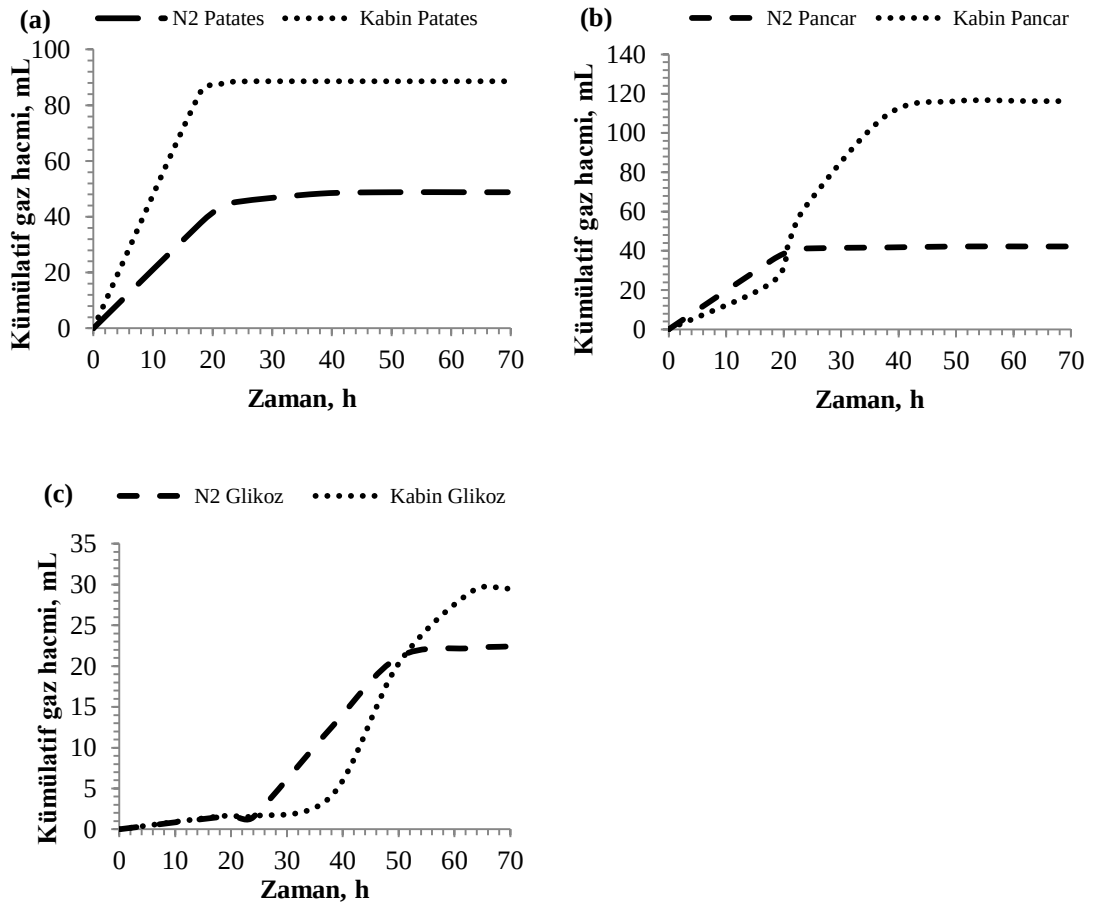
Şekil 5.7 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besı ortamlarının gaz üretim hacmi
a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı



Şekil 5.8 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besı ortamlarının kümülatif gaz hacmi



Şekil 5.9 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarında kümülatif gaz hacmi a. Azot geçirilerek, b. Anaerobik kabinli



Şekil 5.10 121 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının kümülatif gaz hacmi a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı

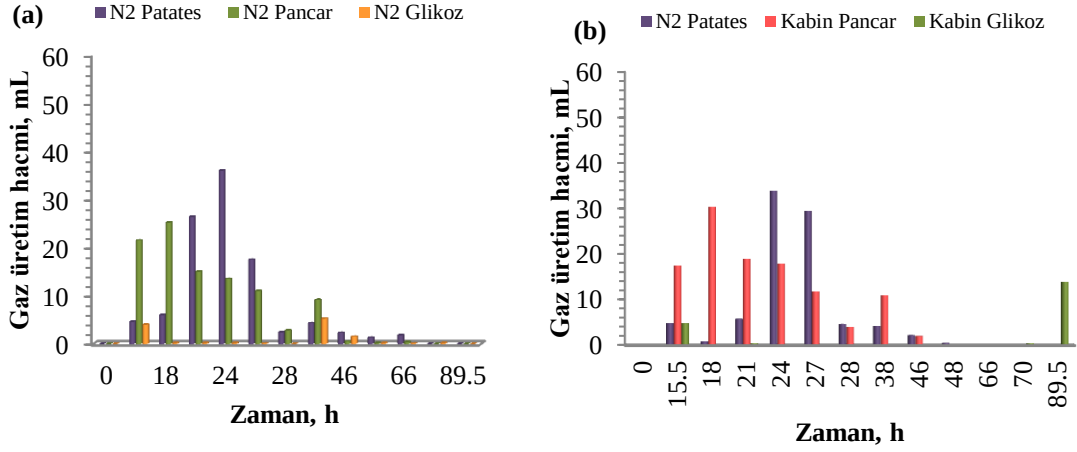
Ortamlar azotlu ve anerobik kabinli olmak üzere ikiye ayrılıp incelendiğinde (Şekil 5.9), en yüksek kümülatif gaz çıkışının azotlu ortamda patates suyu ortamı, anaerobik kabinli ortamda oluşturulan besi ortamları arasında ise pancar suyu ortamı olduğu gözlemlenmiştir. Ancak azotlu ortamın yanılmaması gerektiği çıkan gaz miktarından anlaşılmaktadır. N₂'li ortamdaki patates 48.8 mL kümülatif gaz hacmine ulaşırken, anaerobik kabinli ortamda pancar 116.6 mL kümülatif gaz hacmine ulaşmıştır. Bu ayrımı görebilmek için şekil 5.10'da ortamlar kendi aralarında incelenmiştir. İnceleme sonucunda anaerobik kabin ile oksijensiz hale getirilen ortamlarda en yüksek kümülatif gaz çıkışına ulaşıldığı görülmüştür.

5.1.2.2 SET 2 131 °C Otoklavlamalı Deney Sonuçları

İkinci sette gliserinden aktarılmış liver kaynağından 100 mL'lik üç farklı tip (patates ve şeker pancarı), iki farklı oksijensiz ortam sağlama yöntemi (N₂'li ve kabinli ortamlar) ile besi ortamlarına yapılan aktarımlarda hidrojen üretim verimleri incelenmiştir. Bu amaçla 1. Sette hazırlanmış olan 62 g/L liver ortamı kullanılmıştır. 131 °C de otoklavlanmış ilk üç farklı ortamdan (400 g/L patates suyu, 400 g/L pancar suyu ve 10 g/L glikoz çözeltisi) pH ayarı yapılmaksızın azot geçirilmiş ve tıpa ile kapatılarak anaerobik koşullar sağlanmıştır. Diğer üç farklı ortam (400 g/L patates suyu, 400 g/L pancar suyu ve 10 g/L glikoz çözeltisi) ise anaerobik kabin kullanılarak oksijensiz hale getirilmiştir. Tüm 100'er mL'lik ortamlara 100 ml'lik kaynaktan 2'şer mL aktarım yapılarak sıcaklığı 28 °C'ye ayarlanmış ve 90 saatlik deney inkübatörde deneyler gerçekleştirilmiştir.

131 °C otoklavlanmış farklı besi ortamları ile gerçekleştirilen deneyde azot geçirerek ve kabinde bekletilerek oksijensiz hale getirilen ortamlar Şekil 5.11'de karşılaştırılmıştır. Şekil 5.11'den görüldüğü gibi 18. saatte kadar iki farklı oksijensiz ortam sağlama yönteminde de pancardan elde edilen gaz diğer ortamlara göre çok daha yüksektir (N₂ li ortam→ 25.2 mL, kabinli ortam→30.5 mL). 24. Ve 27. saatte pancarlı ortamda durgunluk gözlenirken patates ortamında gaz üretim hızı artmıştır. Genel olarak en yüksek gaz çıkışına 24. Saatte N₂ li ve anaerobik kabinde oluşturulmuş 2 farklı ortamda (pancar ve patates) rastlanmıştır ve kabinde bekletilmiş patates ortamının diğer

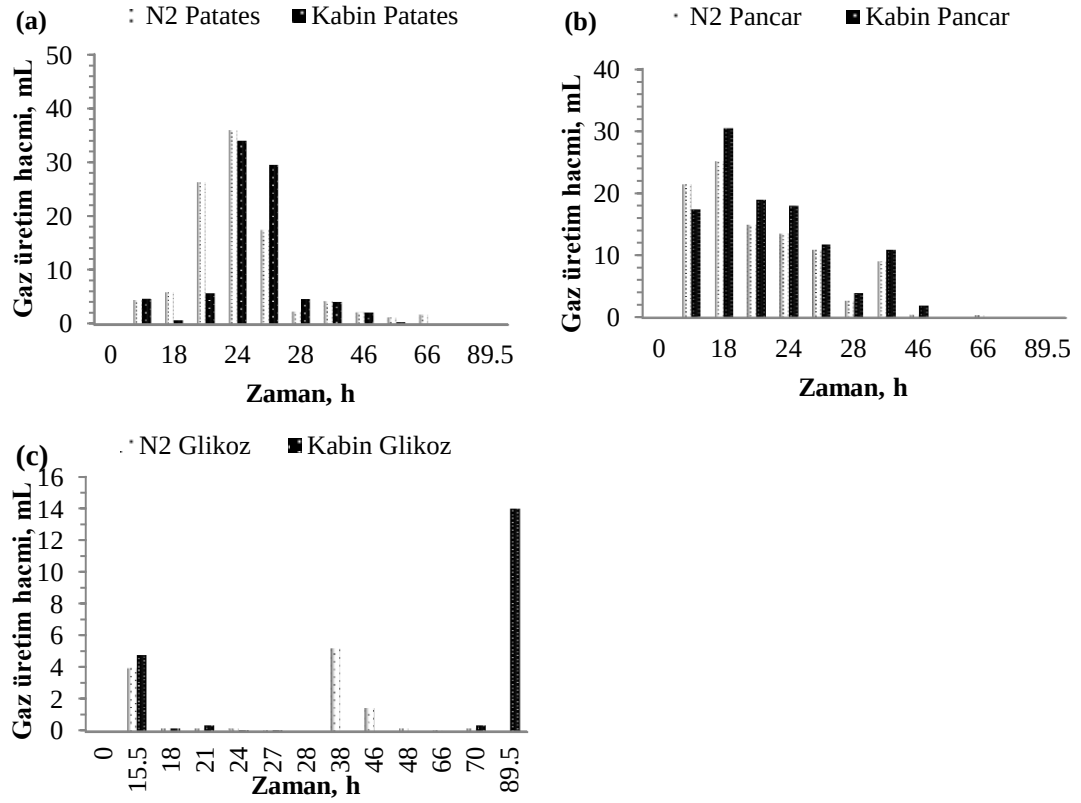
ortamlara ve N₂ geçirilmiş ortama göre daha fazla gaz ürettiği gözlemlenmiştir. Glikoz ortamlarında ise gaz çıkışı ancak 38. saatlerde görülmeye başlanmıştır.



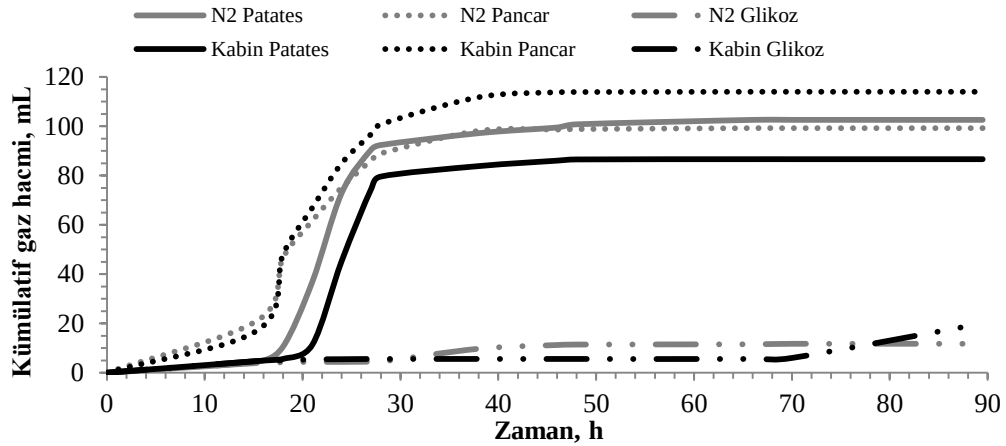
Şekil 5.11 Oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarında üretilen gaz hacmi (131°C)
a. Azot geçirerek
b. Anaerobik kabinde

Şekil 5.12'den görüldüğü üzere azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamları kendi aralarında kıyaslandığında kabinli ortamın gaz çıkışının daha yüksek olduğu sonucuna varılmaktadır. Buradan anaerobik kabinin *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının çoğalacağı oksijensiz ortamı sağladığı sonucuna varılmaktadır.

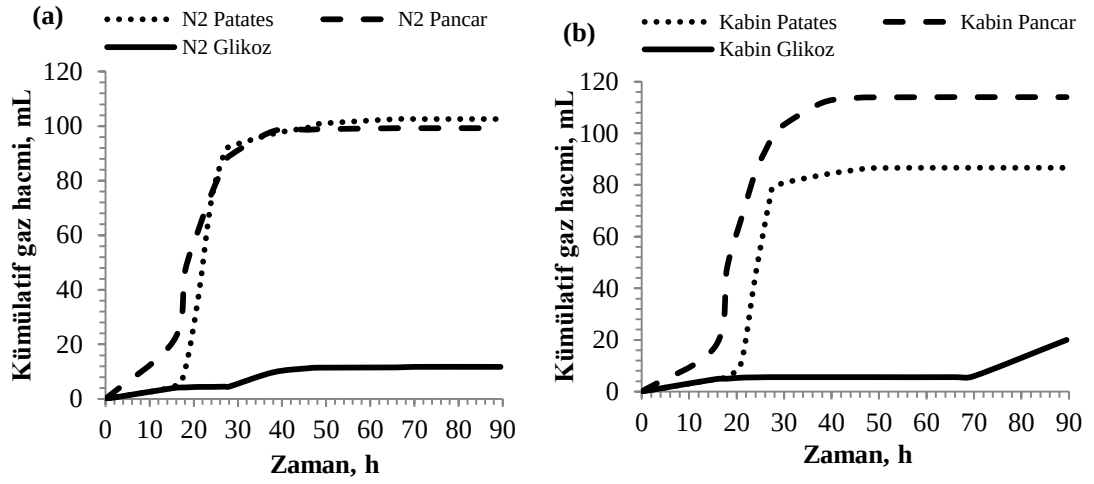
131 °C'de otoklavlanmış ve iki farklı oksijensiz ortam sağlama yöntemi ile anaerobik hale getirilmiş 3 farklı tip besi ortamlarına maksimum hidrojen üretimini gözlemlemek üzere aktarılan 2 mL *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının kümülatif gaz üretimi Şekil 5.13'te verilmiştir. 90 saatlik deney sonrasında en yüksek gaz çıkışına kabinde bekletilerek oluşturulmuş oksijensiz ortamlı besi ortamı 400 g/L pancar suyunda ulaşılmıştır.



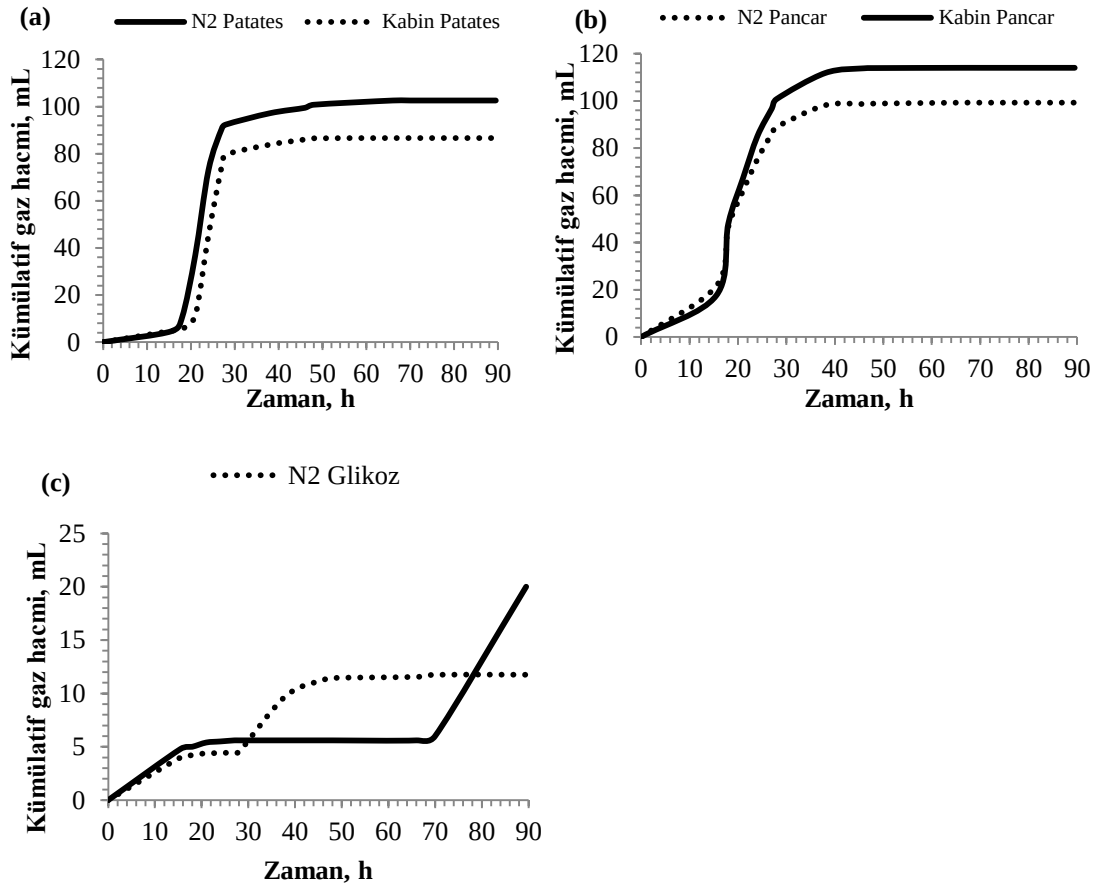
Şekil 5.12 131 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının gaz üretim hacmi
a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı



Şekil 5.13 131 °C’de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının kümülatif gaz hacmi



Şekil 5.14 131 °C'de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarında kümülatif gaz hacmi
a. Azot geçirilerek, b. Anaerobik kabinli



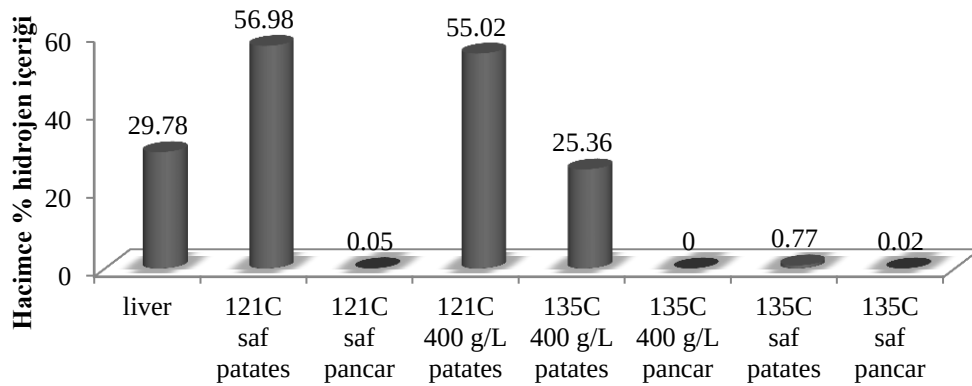
Şekil 5.15 131 °C'de otoklavlanmış, azot geçirerek ve anaerobik kabinde oksijensiz hale getirilmiş farklı besi ortamlarının kümülatif gaz hacmi
a. Patates ortamı, b. Pancar ortamı, c. Glikoz ortamı

Ortamlar azotlu ve anerobik kabinli olmak üzere ikiye ayrılıp incelendiğinde (Şekil 5.14), en yüksek kümülatif gaz çıkışının azotlu ortamda patates suyu ortamı, anaerobik kabinli ortamda oluşturulan besi ortamları arasında ise pancar suyu ortamı olduğu gözlemlenmiştir. Ancak azotlu ortamın yanılmaması gerektiği çıkan gaz miktarından anlaşılmaktadır. N₂ li ortamdaki patates 102.6 mL kümülatif gaz hacmine ulaşırken, anaerobik kabinli ortamda pancar 114 mL kümülatif gaz hacmine ulaşmıştır. Bu ayrımı görebilmek için şekil 5.15'te ortamlar kendi aralarında incelenmiştir. İnceleme sonucunda anaerobik kabin ile oksijensiz hale getirilen ortamlarda en yüksek kümülatif gaz çıkışına ulaşıldığı görülmüştür.

İki farklı set deney birlikte ele alınacak olursa;

- N₂ gazı ve anaerobik kabin kullanarak oksijensiz ortamın sağlandığı deneylerde anaerobik kabin ile oksijenin uzaklaştırıldığı durumda gaz üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak N₂ gazı geçirilerek oksijensiz hale getirme işlemi ile oksijen tamamen uzaklaştırılamamaktadır. Ancak anaerobik kabinin bu durumda oldukça başarılı olduğu yapılan deneysel çalışma ile kanıtlanmıştır.
- 121 ve 131 °C'de otoklavlanmış besi ortamlarının glikoz derişimlerinin değişmediği glikoz ölçer ve refraktometre ile belirlenmiştir. Ayrıca iki farklı sıcaklıkta hazırlanan besi ortamlarından elde edilen kümülatif gaz miktarları da değişmemiştir. 121 °C'de deneylere devam edilebilir. Ancak HPLC cihazı ile bu durum kanıtlanmalıdır.
- Besi ortamı olarak kullanılan 3 farklı kaynaktan *Clostridium butyricum* mikroorganizması ile hidrojen üretiminde en yükzek gaz üretime pancar suyu ile ulaşılmıştır. 100 mL 400 g/L lik pancar suyundan 116 mL gaz üretimi gerçekleştirilmiştir.
- Gaz içeriklerinin belirlenebilmesi açısından GC analiz ile toplanan gaz şişeleri analizlenmelidir.

Biyohidrojen üretim veriminin artırılabilmesi için, optimum ve ekonomik açıdan en uygun besi ortamı türünün ve derişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Otoklav sıcaklığının besi ortamları üzerine etkisini incelemek amacıyla, farklı besi ortamları; patates suyu; şeker pancarı suyu, glikoz çözeltisi kullanılarak, 121°C ve 131 °C’de iki set deney yapılmıştır. 121 °C ve 131 °C’de iki set halinde oluşturulan deney sisteminde ortamların mikroorganizmanın çoğalma ortamı olan anaerobik hale getirilebilmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar anaerobik kabin kullanımı ve besi ortamından azot gazı geçirilmesidir. Kısaca farklı otoklav sıcaklarının besi ortamları üzerindeki etkisi ile birlikte, farklı anaerobik koşullar altında, farklı tür ve derişimdeki besi ortamlarının biyohidrojen üretim verimine etkisi incelenmiştir. ODTÜ merkez laboratuvarında HPLC cihazı ile besi ortamlarının başlangıç ve deney sonrası glikoz içerikleri belirlenmiştir. Gaz kromatografi cihazı ile de üretilen hidrojen belirlenmiştir. % H₂ içeriklerinden kullanılması gereken otoklav sıcaklığı, anaerobik koşul, besi ortamı türü ve derişimi belirlenmiştir. Deney sıcaklığı 28 °C’ dir. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.



Şekil 5.16 Gaz kromatografi sonuçları

Şekil 5.16’den gaz kromatografi sonuçlarından görüldüğü gibi 121 °C de otoklavlanmış saf patates suyu %56.98 H₂ ve 400 g/L’lik patates suyu %55.02 H₂ içermektedir. Saf patates suyunun kullanımı ekonomik olmayacağından 400 g/L’lik patates suyunun kullanımı uygun görülmüştür.

Çizelge 5.2 121 °C de otoklavlanmış besi ortamlarının glikoz analiz sonuçları

Glikoz derişimi, mg/mL	400 g/L patates	400 g/L pancar	Saf patates	Saf pancar
Otoklav öncesi	2.014	5.001	5.333	27.731
Otoklav sonrası	2.635	10.342	11.075	65.504
Deney sonrası	* t.e.	9.554	* t.e.	57.237

* t.e. : tespit edilemedi (eser miktarda)

Çizelge 5.3 135 °C de otoklavlanmış besi ortamlarının glikoz analiz sonuçları

Glikoz derişimi, mg/mL	400 g/L patates	400 g/L pancar	Saf patates	Saf pancar
Otoklav öncesi	2.014	5.001	5.333	27.731
Otoklav sonrası	2.521	13.527	9.678	83.329
Deney sonrası	* t.e.	14.517	* t.e.	85.463

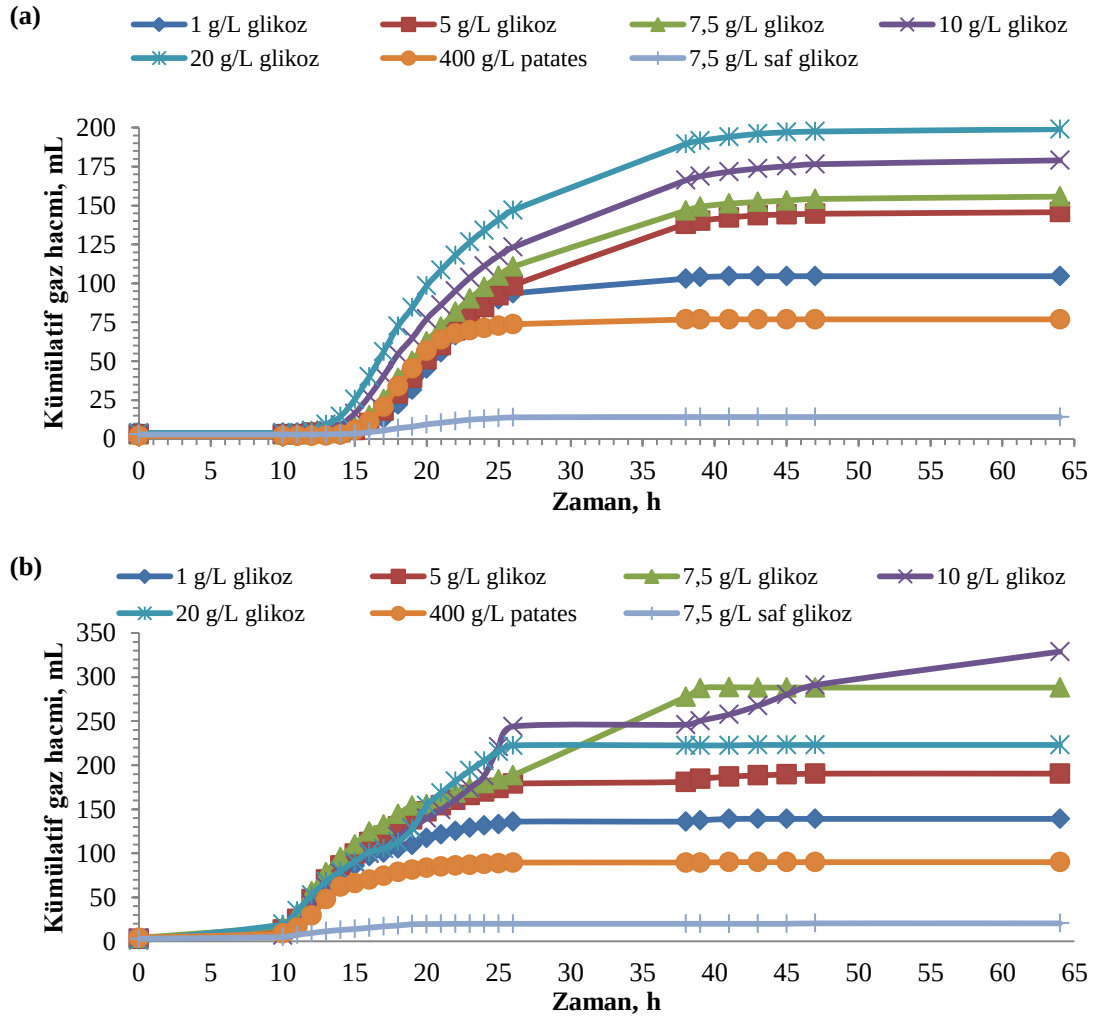
* t.e. : tespit edilemedi (eser miktarda)

Çizelge 5.2 - 5.3' te farklı sıcaklıklarda otoklavlanmış besi ortamlarının glikoz içerikleri ODTÜ merkez laboratuvarında HPLC cihazı ile analizlenmiştir. Analizlerden görüldüğü üzere farklı otoklav sıcaklıkları nişasta veya sukrozu parçalamada önemli bir artışa neden olamamaktadır. Bu amaçla 121 °C'de otoklav sıcaklığı uygun görülmüştür. Pancardaki yüksek glikoz miktarları düşünülenin aksine mikroorganizmalar tarafından kullanılamamıştır ki gaz kromatografi sonuçları bunu açıklamaktadır. 400 g/L lik patates suyuna karşılık saf patates suyundaki 5 kat fazla glikoz miktarı mikroorganizmanın gaz üretiminde ancak %1'lik artışa neden olduğundan kullanılması ekonomik açıdan uygun görülmemiştir. 400 g/L patates suyunun derişimi otoklav sonrası 2.635 g/L olarak alınmış bundan sonraki çalışmalara da referans olacak niteliktedir.

Sonuç olarak 121 °C'de sterillemiş ve parçalanmış, azot gazı geçirilerek (anaerobik kabin içerisinde oksijensiz hale getirmek ekonomik açıdan uygun değildir) oksijensiz hale getirilmiş 400 g/L'lik patates suyu ile hidrojen üretimi en yüksek değerine ulaşmıştır.

5.1.3 Besi ortamı türü, derişimi ve mikroorganizma çoğalma sıcaklığı

Yapılan çalışmada, 1 adet 400 g/L'lik patates suyu, 400 g/L'lik patates suları üzerine eklenen 5 adet farklı glikoz derişimleri (eklenen glikozlar sırası ile 1, 5, 7.5, 10 ve 20 g/L) ve 1 adet saf glikoz çözeltisi ((1+5+1) x 2 besi ortamları) kullanılarak 28 ve 37 °C sıcaklıklarda eşanlı gerçekleştirilen deney sonuçları Şekil 5.17'de verilmiştir.



Şekil 5.17 Farklı besi ortamı bileşimlerinde kümülatif gaz hacimleri
a. 28 °C, b. 37 °C

Şekil 5.17 a'dan 28 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen deney setinde, 400 g/L patates suyu üzerine eklenen 20 g/L glikoz derişimindeki çoğalma ortamının en yüksek kümülatif gaz hacmini (200 mL) verdiği görülmüştür. Şekil 5.17 b'den ise 37 °C sıcaklıkta

gerçekleştirilen deney setinde, 400 g/L patates suyu üzerine eklenen 10 g/L glikoz derişimindeki çoğalma ortamının en yüksek kümülatif gaz hacmini (325 mL) verdiği görülmüştür. İki farklı sıcaklıkta yapılan deney setlerinde 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen deneyin gecikme fazını kısaltması ve kümülatif gaz üretiminde daha yüksek hacme ulaşması sonraki çalışmalar için en uygun sıcaklığın 37 °C olması gerekliliğini göstermiştir.

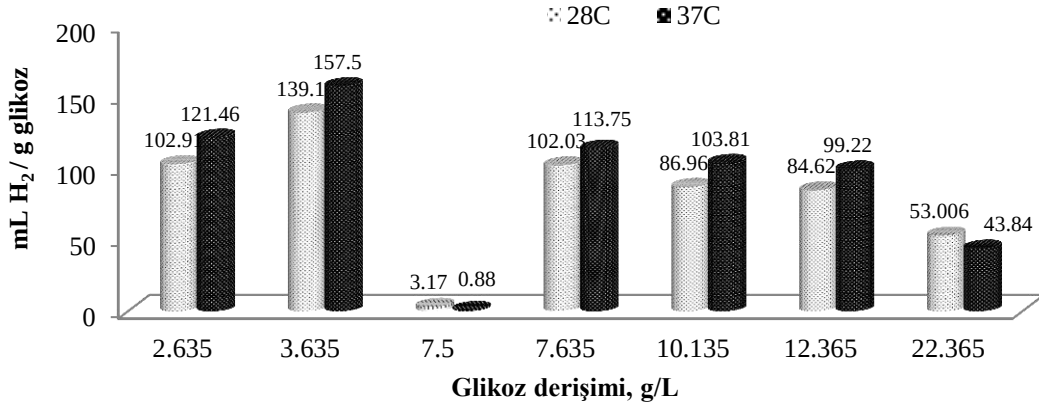
Kümülatif gaz hacminin yüksek olması istenen bir durumdur ancak ulaşılacak istenen nokta kümülatif gaz hacmindeki H₂ içeriğinin ve substrat başına H₂ nin yüksek olmasıdır. Bu amaçla çizelge 5.4'te gaz kromatografi sonuçlarından yola çıkılarak hesaplanan verim değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.4 Gaz kromatografi sonuçlarından yola çıkılarak hesaplanan verim değerleri

Eklenen glikoz, g/L	Cs, g/L	T, °C	Kümülatif gaz hacmi, mL	%H ₂ , v/v	Kümülatif gaz hacmindeki H ₂ hacmi, mL	H ₂ verimi, mL H ₂ / g glikoz	H ₂ verimi, mol H ₂ /mol glikoz
-	2.635	28	77	35.42	27.27	102.91	0.83
		37	90	35.56	32.004	121.46	0.98
1	3.635	28	104.6	48.12	50.53	139.81	1.13
		37	139.1	40.76	56.70	157.5	1.28
-	7.5	28	14.2	16.74	2.37	3.17	0.026
		37	20.5	3.22	0.66	0.88	0.00712
5	7.635	28	145.7	53.22	77.54	102.03	0.83
		37	190.5	45.38	86.45	113.75	0.92
7.5	10.135	28	155.7	56.41	87.83	86.96	0.70
		37	288.2	36.38	104.85	103.81	0.84
10	12.365	28	179	59.73	106.92	84.62	0.69
		37	329	38.10	125.36	99.22	0.80
20	22.365	28	199	60.29	119.98	53.006	0.43
		37	223	44.5	99.24	43.84	0.35

Çizelge 5.4' ten görüldüğü üzere GC analizi ile en yüksek % H₂ içeriğine 28 °C'de gerçekleştirilen 20 g/L lik substrat ile ulaşılmıştır. H₂ içeriği her ne kadar yüksek olsa da substrat başına verim oldukça düşüktür. Bu amaçla farklı derişimlerdeki substratlara karşılık H₂ içerikleri grafiğe geçirilmiştir.

Şekil 5.18’den görüldüğü üzere glikoz derişimi 3.635 g/L’den sonra H₂ veriminde düşüş gözlenmiştir. Bu amaçla sonraki çalışmalar için H₂ verimini yükseltmek amacıyla, **en uygun çoğalma sıcaklığı 37 °C ve en uygun substrat derişiminin 400 g/L patates suyu üzerine eklenen 1 g/L’lik glikoz (3.635 g/L) olduğu** görülmüştür.

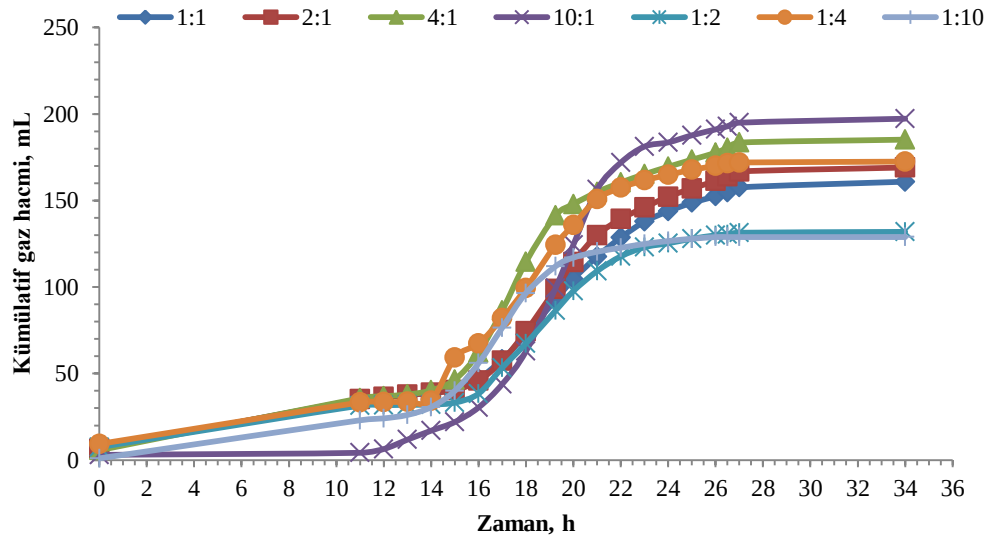


Şekil 5.18 H₂ veriminin substrat derişimi ile değişimi

5.2 Karışım Kültür Aktarım Oranının Etkisi

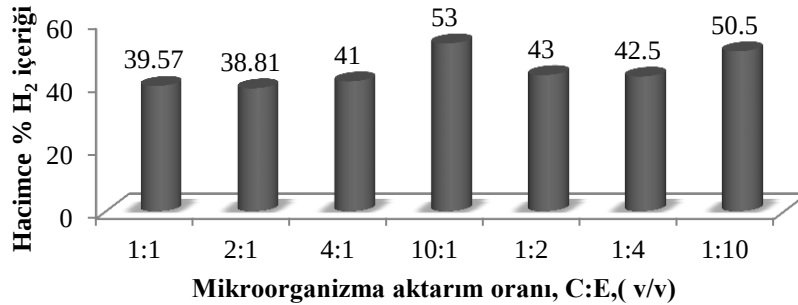
5.2.1 Tek set

Yapılan çalışmada, 7 adet 1 g/L eklenmiş 400 g/L’lik patates suları kullanılarak 37 °C, 1:1, 2:1, 4:1, 10:1, 1:2, 1:4 ve 1:10 mikroorganizma aktarım oranında gerçekleştirilen deney sonuçları şekil 5.19’ da verilmiştir. Şekilden 5.19 ’dan görüldüğü üzere sadece kümülatif gaz hacimlerine bakıldığında biyohidrojen üretim veriminin en yüksek olduğu C:E aktarım oranları sırasıyla 10:1 > 4:1 > 1:4 > 2:1 > 1:1 > 1:2 > 1:10 ‘dur. Buradan *Clostridium butyricum*’ un baskın olduğu 10:1 oranının en yüksek çıkması doğru sonuca ulaştığımızın göstergesidir.

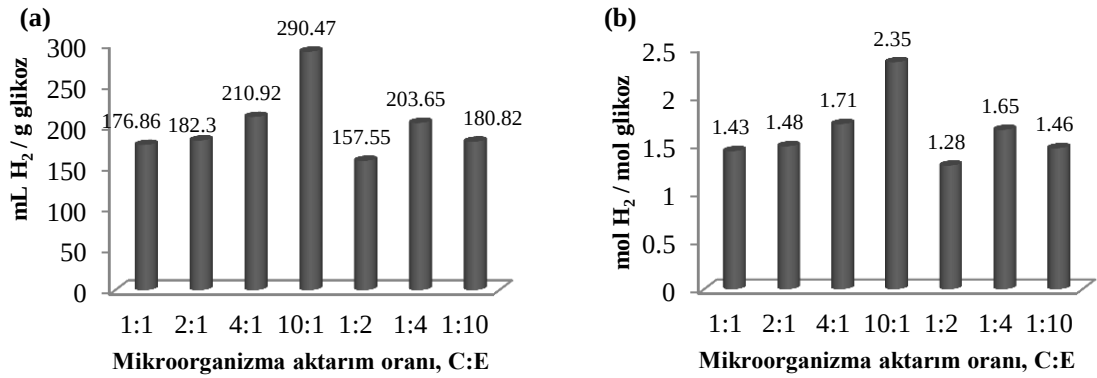


Şekil 5.19 Farklı aktarım oranlarında kümülatif gaz hacimleri

Kümülatif gaz sonuçlarından yola çıkarak H_2 veriminin arttığını söylemek hata getireceğinden mutlaka GC analizi yapılmalıdır. Bu kapsamda yapılan GC analiz sonuçları şekil 5.20’de verilmiştir. GC sonuçlarından yola çıkarak hesaplanan H_2 verim değerleri ise şekil 5.21’de verilmiştir. GC analiz sonuçlarına bakıldığında C:E→10:1 aktarım oranının kümülatif gaz sonuçlarına bakıldığında da benzer şekilde en yüksek gaz miktarının verildiği görülmektedir. 1:10 aktarım oranı kümülatif gaz hacmi grafiğinde gaz içeriği açısından sonda olmasına rağmen H_2 içeriği açısından 10:1’den sonra gelmektedir. Bu bağlamda verim grafiği incelenerek doğru sonuca ulaşılmıştır.



Şekil 5.20 Farklı mikroorganizma aktarım oranlarında hacimce % H_2 içeriği



Şekil 5.21 H₂ veriminin mikroorganizma aktarım oranları ile değişimi
a. Substrat kütlesi başına verim, b. Substrat molü başına verim

Mikroorganizma aktarım oranının hidrojen üretim verimine etkisi için şekil 5.21'e bakıldığında kümülatif gaz hacmi grafiği ile aynı trendin olduğu görülmektedir. Bu durumda 1:10 mikroorganizma aktarım oranının H₂ içeriği her ne kadar yüksek görünse de substrat başına bakıldığında verimin düştüğü gözlenmiştir. Bu durumda en yüksek hidrojen veriminin ve kümülatif gaz hacminin ulaşıldığı deney sonuçları sırasıyla **C:E aktarım oranları nın 10:1 > 4:1 > 1:4 > 2:1 > 1:1 > 1:2 > 1:10** olduğu durumudur. En yüksek verim **C:E** aktarım oranının **10:1** olduğu durumda **2.35 mol H₂ / mol glukoz** olarak bulunmuştur.

5.2.2 SET1-2-3

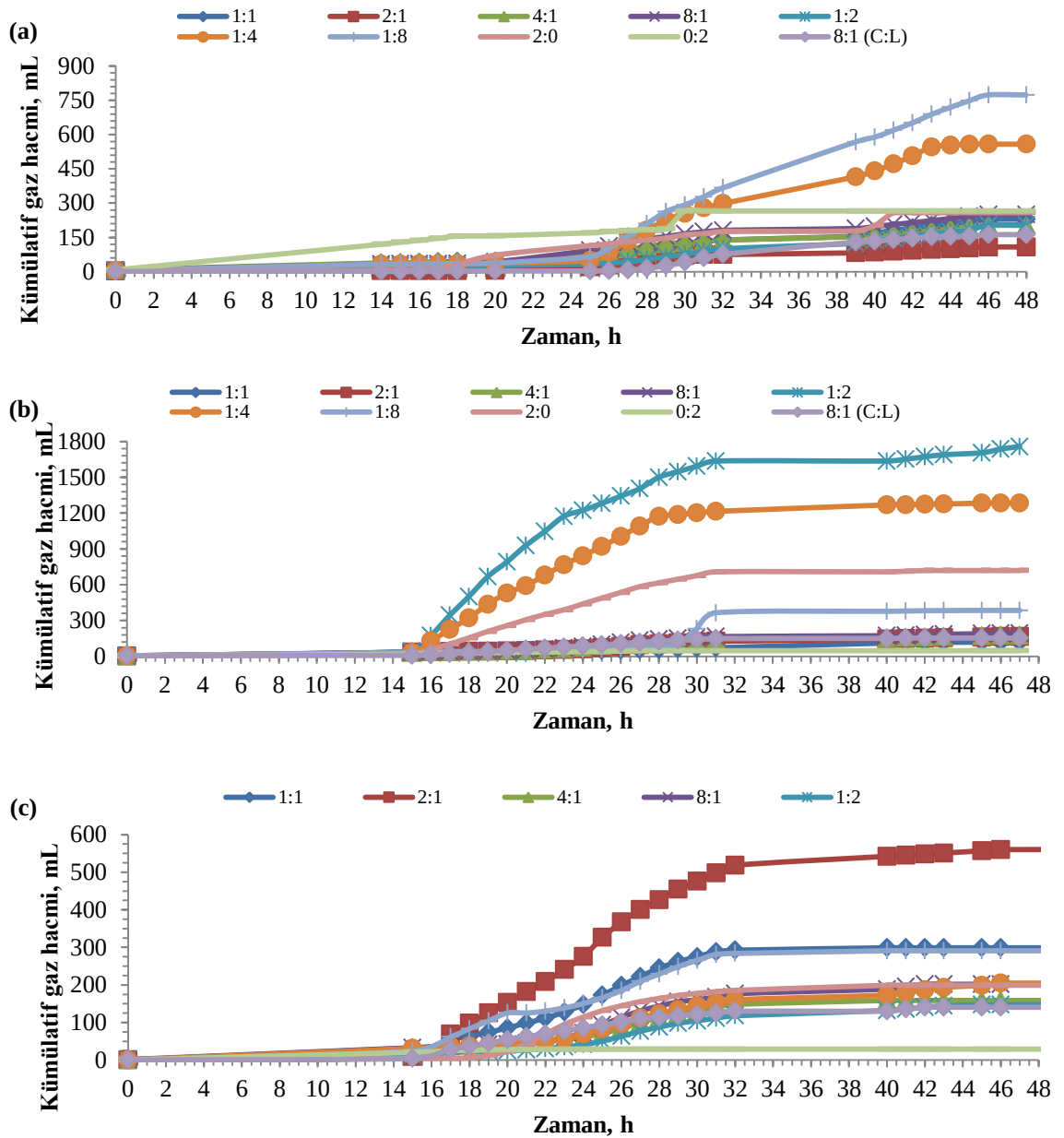
İlk yapılan deney ışığında reaksiyon hacminin sabit tutularak deneylerin tekrar planlanması gerekliliği düşünülmüştür. Bu amaçla 3 farklı set deney tasarımı yapılmıştır.

Set 1: 100 mL çalışma hacmi için sabit mikroorganizma aktarım oranlarında substratı bidistile su ile seyrelterek,

Set 2 : 100 mL çalışma hacmi için sabit mikroorganizma aktarım oranlarında substratı besi ortamı ile deriştirerek,

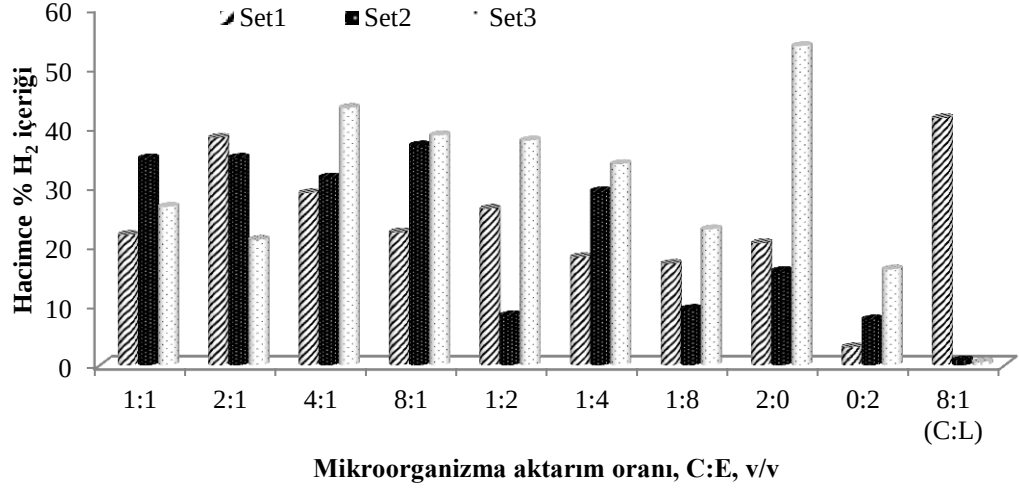
Set 3: 100 mL çalışma hacmi için, 90 mL sabit substratlarda mikroorganizma aktarım oranlarını 100 mL'ye tamamlayacak şekilde oranlayarak

Aynı zamanda *E. aerogenes*'in katkı maddesi olarak kullanıldığı durumlar ile L-cysteine katkı maddesinin kullanılması durumunun karşılaştırılması amacıyla setlerin son adımında *C. butyricum* ve L-cysteine (C:L) deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Sonuçlar toplu olarak verilecek olursa, yapılan deney kapsamında kümülatif gaz hacimleri, GC sonuçları ve GC sonuçlarından yola çıkılarak hesaplanan verim değerleri Şekil 5.22'de verilmiştir.



Şekil 5.22 Kümülatif gaz hacimleri
a. Set 1, b. Set 2, c. Set 3

Öncelikle şekil 5.22’ den görüldüğü üzere üretimde bu derece yüksek miktarda gaz çıkışı yapılan çalışmalara bakıldığında beklenen bir durum değildir. GC sonuçları da bu beklenmeyen durumu doğrulamaktadır (Şekil 5.23)

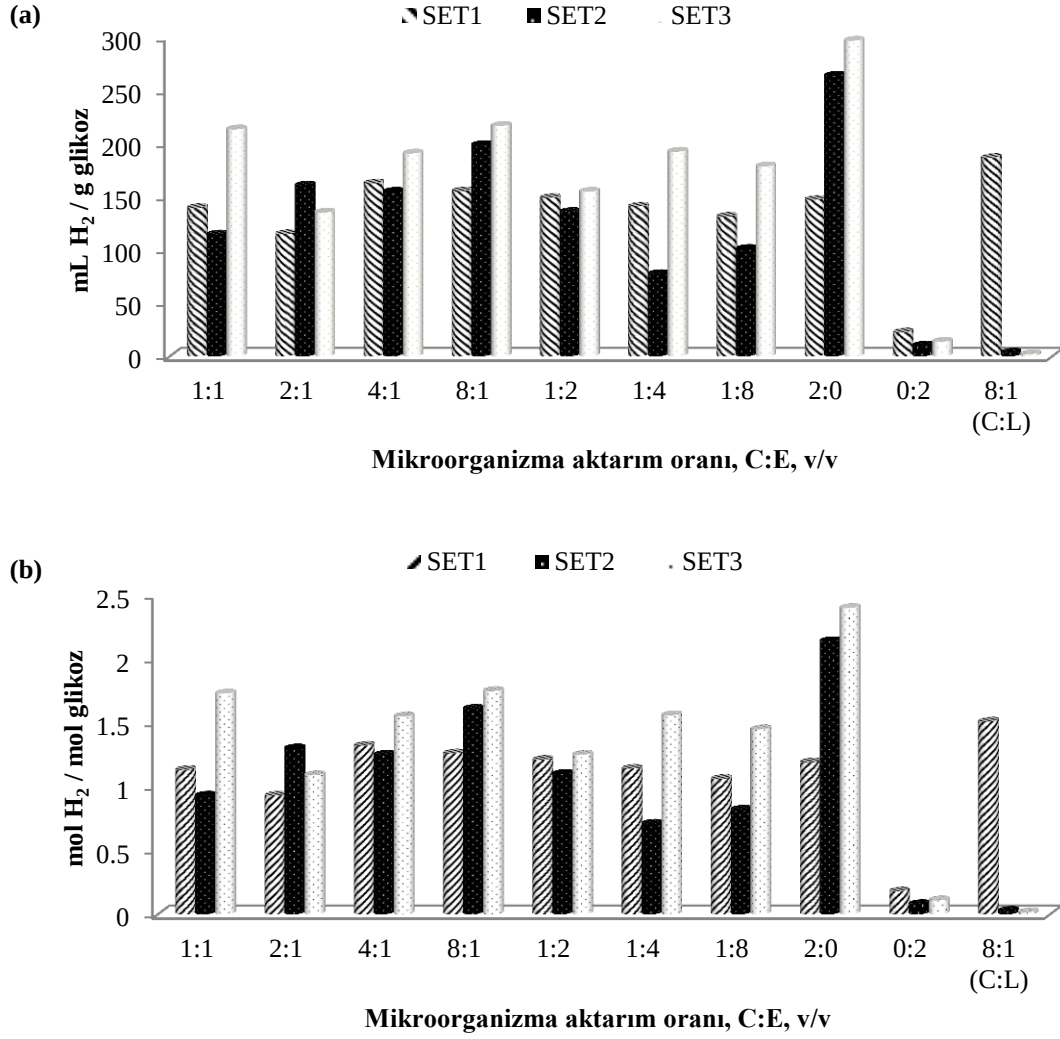


Şekil 5.23 GC gaz analiz sonuçları

Sistemde lastik tıpların uzun süredir kullanımından kaynaklanabilecek kaçakların olabileceğinden şüphelenilmektedir. Ayrıca inkübatörde 37 °C sabit sıcaklığı korumak üzere içerideki hava akışının yüksek olması da hem reaktöre hem de gaz toplama şişelerine havanın dolabileceğinin göstergesi olabilir. Hava eğer reaktörlere doluyorsa *C. butyricum* içeriğinin anaerobik ortam koşullarını sağlayamamasından üremeyi durduruyor olabilir. Aynı zamanda gaz toplama şişelerine hava doluyorsa ki pikler havanın içeriğinin göstergesi H₂ gaz toplama şişelerinden kaçıyor olabilir. Her iki koşulda da gaz toplama sisteminin değiştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Aksilikler göz önüne alınmaz ise, yapılan 3 set deney sonuçlarına bakıldığında kümülatif gaz hacminin yüksek olduğu aktarım oranlarında GC analiz sonuçları ve verim hesabına göre farklılıklar görülmektedir. Set 1’e bakıldığında C:L, 8:1 aktarım oranında en yüksek verime (**1.51 molH₂/mol glikoz**) ulaştığı görülmektedir. Set 2 'de ise en yüksek verime (**2.14 molH₂/mol glikoz**) sadece *Clostridium butyricum*’un kullanıldığı 2:0 aktarım oranında ulaşılmıştır. Set 3 ‘te ise Set 2 ile benzer şekilde en

yüksek verime ($2.4 \text{ molH}_2/\text{mol glikoz}$) sadece *Clostridium butyricum*'un kullanıldığı 2:0 aktarım oranında ulaşılmıştır. Bu oran bir önceki çalışmada 10:1 aktarım oranındaki mikroorganizmanın ulaştığı verim ile yaklaşık aynıdır.



Şekil 5.24 H_2 veriminin mikroorganizma aktarım oranları ile değişimi
a. Substrat kütlesi başına verim, b. Substrat molü başına verim

Sırayla C:E oranları ile Set 1, 2 ve 3 ün verimleri,

Set 1 → C:L > 4:1 > 8:1 > 1:2 > 2:0 > 1:4 > 1:1 > 1:8 > 2:1 > 0:2

Set 2 → 2:0 > 8:1 > 2:1 > 4:1 > 1:2 > 1:1 > 1:8 > 1:4 > 0:2 > C:L

Set 3 → 2:0 > 8:1 > 1:1 > 1:4 > 4:1 > 1:8 > 1:2 > 2:1 > 0:2 > C:L

Setlerden görüldüğü üzere en yüksek biyohidrojen üretim verimine sadece *Clostridium butyricum*'un olduğu 2:0 aktarım oranında ulaşılmıştır. *C. butyricum* tek başına çok daha iyi sonuç vermiştir. Bu durum *Enterobacter aerogenes*'in yeterince oksijensiz ortamı sağlayamamasından kaynaklanabilir. Bir diğer etken ise *E. aerogenes*' in *C. butyricum*'un üremesini inhibe edici düzeyde olabileceğidir. Fazla *E. aerogenes* kullanıldığı oranlarda *E. aerogenes*'in *C. butyricum*'u baskılamasından kaynaklı üretim verimi düşmüş olabilir.

Genel bir değerlendirme yapılacak olursa, çoğalma sıcaklığı, substrat türü ve derişiminin incelendiği deney setinden **1 g/L glikoz ile zenginleştirilmiş 400 g/L'lik patates suyunun** substrat olarak kullanımı en yüksek biyohidrojen verimine ulaştırdığından uygundur. Aynı zamanda çoğalma ortamı sıcaklığı **37 °C** olarak bulunmuştur.

Mikroorganizma aktarım oranları için yapılan deney setlerinden karışım kültür kullanımının uygunluğu belirlenmiştir. En yüksek hidrojen verimine **10:1 mikroorganizma karışım kültüründe** elde edilmiştir.

5.3 Katkı Maddeleri ile Zenginleştirilen Besi Ortamlarının Etkisi

Model katsayılarının belirlenmesinde iki seviyeli faktöriyel deney tasarımı (2^n) kullanılmıştır. Bu amaçla çıkış değişkeni olarak biyohidrojen üretim verimi ve bütirik asit/ asetik asit oranı (B/A) seçilmiştir. 100 mL'lik patates ortamlarına eklenecek bağımsız değişkenler demirsülfat (A), amonyum klorür (B), nikel klorür (C) ve magnezyum klorür (D) katkı maddelerinin herbirinin literatür araştırması sonucunda minimum ve maksimum derişimleri belirlenmiş ve çizelge 5.5 'te verilmiştir. Katkı maddelerinin derişimleri ile deney tasarım matrisi ise çizelge 5.6'da verilmiştir.

Çizelge 5.5 Katkı maddelerinin minimum ve maksimum derişim aralığı

Katkı maddesi	Minimum (-1) derişim, mg/L	Maksimum (+1) derişim, mg/L
A: FeSO₄	0	1500
B: NH₄Cl	0	38214
C: NiCl₂	0	50
D: MgCl₂	0	1000

Çizelge 5.6 Deney tasarım matrisi (gerçek değerler)

Run	FeSO ₄ (A)	NH ₄ Cl (B)	NiCl ₂ (C)	MgCl ₂ (D)
1	1500	38214	0	1000
2	0	0	50	1000
3	1500	0	0	0
4	1500	38214	50	0
5	0	38214	50	0
6	0	0	0	0
7	1500	38214	0	0
8	0	38214	50	1000
9	0	0	50	0
10	1500	0	50	0
11	0	38214	0	1000
12	1500	38214	50	1000
13	0	38214	0	0
14	1500	0	50	1000
15	1500	0	0	1000
16	0	0	0	1000

Deney tasarım matrisi doğrultusunda yapılan deneyler sonucunda biyohidrojen üretim veriminin ve bütirik asit/asetik asit oranının katkı maddeleri ile değişimi çizelge 5.7’de verilmiştir.

Çizelge 5.7’den görüldüğü üzere NH₄Cl miktarında hatta varlığında biyohidrojen üretim verimi ve B/A oranı azalma eğilimindedir. Bu durum yüksek NH₄Cl varlığında oluşan ürünlerin H₂’yi kullanarak propiyonik asit oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Bu istenmeyen bir durumdur. En yüksek hidrojen verimine FeSO₄ ve MgCl₂ varlığında, en düşük hidrojen verimine ise dört katkı maddesinin eş anlı bulunduğu durumda ulaşılmıştır. Bu durum katkı maddelerinin birbirini ters yönde etkilediğinin göstergesidir.

Çizelge 5.7 Deney tasarım sonuçları

Run	FeSO ₄	NH ₄ Cl	NiCl ₂	MgCl ₂	H ₂ verimi, molH ₂ /mol glikoz	Bütirik asit/asetik asit
1	1500	38214	0	1000	0.589	0.6
2	0	0	50	1000	1.28	1.97
3	1500	0	0	0	1.721	1.9
4	1500	38214	50	0	0.385	0.48
5	0	38214	50	0	0.449	0.43
6	0	0	0	0	1.431	1.72
7	1500	38214	0	0	0.421	0.39
8	0	38214	50	1000	0.64	0.55
9	0	0	50	0	1.81	1.72
10	1500	0	50	0	1.632	1.8
11	0	38214	0	1000	0.4	0.6
12	1500	38214	50	1000	0.279	0.52
13	0	38214	0	0	0.497	0.45
14	1500	0	50	1000	1.647	1.96
15	1500	0	0	1000	2.318	1.84
16	0	0	0	1000	2.15	1.77

Proses parametrelerinin design expert ile optimizasyonunda 2⁴ faktöriyel dizaynda gerçek değerlerle elde edilen model Eşitlik 5.1 de kodlanmış değerlerle elde edilen model Eşitlik 5.2 de verilmiştir.

$$Y = 1.58 - 4.67 \cdot 10^{-6} A - 2.92 \cdot 10^{-5} B + 2.90 \cdot 10^{-3} C + 6.09 \cdot 10^{-4} D + 6.52 \cdot 10^{-8} AD - 9.79 \cdot 10^{-8} BC - 1.63 \cdot 10^{-8} BD - 1.83 \cdot 10^{-5} CD + 4.83 \cdot 10^{-10} BCD \quad (5.1)$$

$$Y = 1.10 + 0.021A - 0.65B - 0.088C + 0.060D + 0.024AD + 0.069BC - 0.040BD - 0.11CD + 0.21BCD \quad (5.2)$$

Çizelge 5.8’de biyohidrojen üretim verimi için modelin ANOVA sonuçları verilmiştir. Model katsayılarının belirlenmesinde R² 0.9723 bulunmuştur. İstatistiksel analiz güven aralığı %95’te gerçekleştirilmiştir. Genellikle modelin anlamlı olabilmesi için Fischer’in varyans oranı F değeri p olasılık değerinden büyük olmalıdır. Bu çalışmada anlamlı terimlerden lineer etkiyi yaratanın B (amonyum klorür) derişimi (0.0001 < 0.05) , birbirleri ile etkileşimi yaratanın BCD derişimi (p <0.049) olduğu ANOVA çizelgesinde görölmektedir. Bu durum demirsülfat, nikel klorür ve magnezyum klorürün bir etkisi olmadığını söylese de aslında modelden pozitif etkileyen terimlerin A, D ve AD olduğu rahatlıkla görölebilmektedir. B ve C terimlerinin ise biyohidrojen üretim verimini negatif etkilediği için anlamlı görölmektedir.

Çizelge 5.8 Biyohidrojen üretim verimini arttırmada ANOVA sonuçları

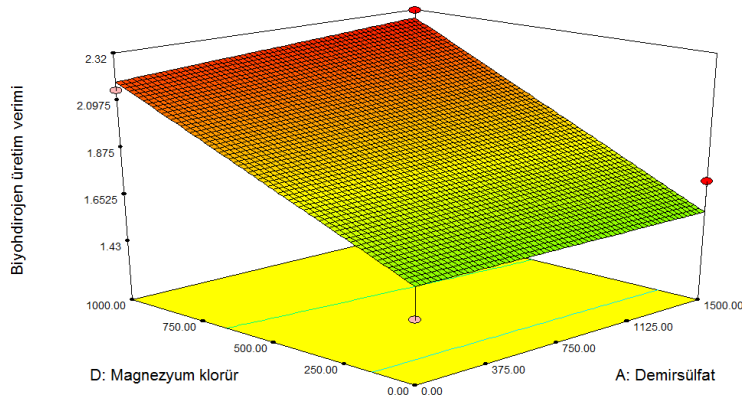
Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F değeri	p- değeri
Model	7.39	9	0.82	23.36	0.0005
A- Demir sülfat	$7.041.10^{-3}$	1	$7.014.10^{-3}$	0.20	0.6706
B- Amonyum klorür	6.67	1	6.67	189.85	<0.0001
C- Nikel klorür	0.12	1	0.12	3.51	0.11
D-Magnezyum klorür	0.057	1	0.057	1.63	0.2489
AD	$9.555.10^{-3}$	1	$9.555.10^{-3}$	0.27	0.6206
BC	0.075	1	0.075	2.14	0.1937
BD	0.026	1	0.026	0.74	0.4226
CD	0.21	1	0.21	5.87	0.0516
BCD	0.21	1	0.21	6.06	0.0490
Residual	0.21	6	0.035		
Toplam	7.60	15			

$R^2 = 0.9723$, adjusted $R^2 = 0.9306$

Bağımsız değişkenlerin birbirleri ile etkileşimlerinin biyohidrojen üretimi üzerinde etkisini daha iyi analiz edebilmek için Student t test değerleri ve p değerleri Çizelge 5.9’da verilmiştir. Student t değerleri her katsayının kendi standart hatalarına bölünerek Desing Expert programı ile hesaplanmıştır. büyüklük olarak, en büyük t değeri (+ veya – olsun) ve en küçük p değeri katsayının anlamlılığını pekiştirmektedir. Bu durumda en yüksek etki çizelgeden de görüldüğü üzere B derişimi (amonyum sülfat) üzerindedir (t=-0.76 ve p=-0.53)

Çizelge 5.9 Anlamlılık testi

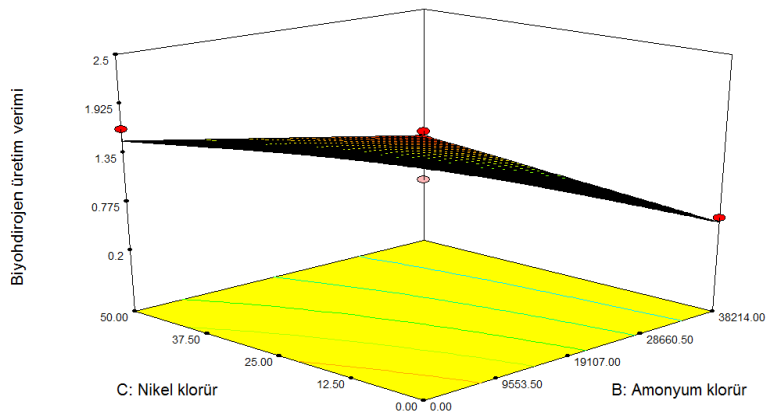
Bağımsız değişkenler	Katsayılar	Standart hata	t- değeri	p- değeri
A- Demir sülfat	0.021	0.047	- 0.094	0.14
B- Amonyum klorür	- 0.65	0.047	- 0.76	- 0.53
C- Nikel klorür	- 0.088	0.047	- 0.20	0.027
D-Magnezyum klorür	0.060	0.047	- 0.055	0.17
AD	0.024	0.047	- 0.090	0.14
BC	0.069	0.047	- 0.046	0.18
BD	- 0.040	0.047	- 0.15	0.074
CD	- 0.11	0.047	- 0.23	$1.08.10^{-3}$
BCD	0.12	0.047	$6.68.10^{-4}$	0.23



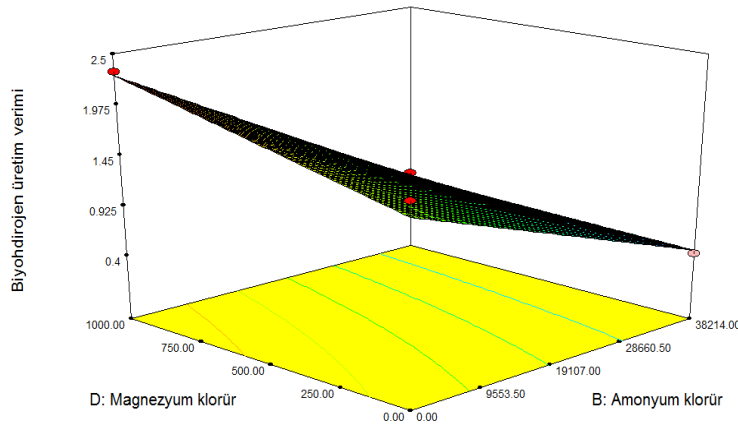
Şekil 5.25 Demirsulfat (A) ve magnezyum (D) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi

Şekil 5.25'te B (amonyum klorür) ve C (nikel klorür) derişimlerinin yokluğunda A (demirsulfat) ve D (magnezyum) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisi görülmektedir. Biyohidrojen üretim veriminin A ve D derişiminin artışıyla doğru orantılı olduğu belirlenmiştir.

Şekil 5.26' da A ve D derişimlerinin yokluğunda C ve B derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisi görülmektedir. Biyohidrojen üretim veriminin C ve B derişiminin artışıyla ters orantılı olduğu belirlenmiştir.

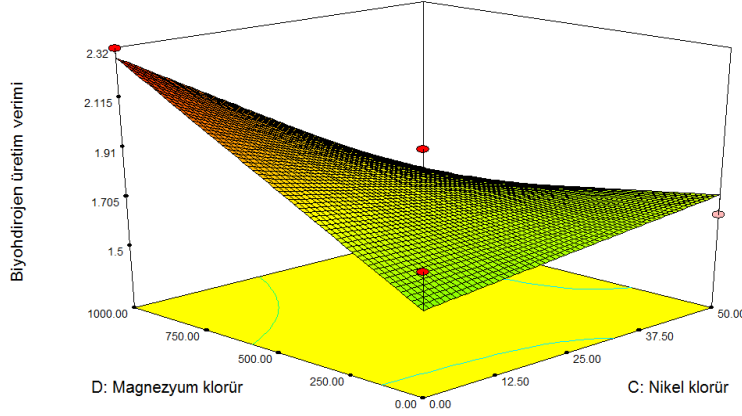


Şekil 5.26 Nikel klorür (C) ve amonyum klorür (B) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi



Şekil 5.27 Magnezyum klorür (D) ve amonyum klorür (B) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi

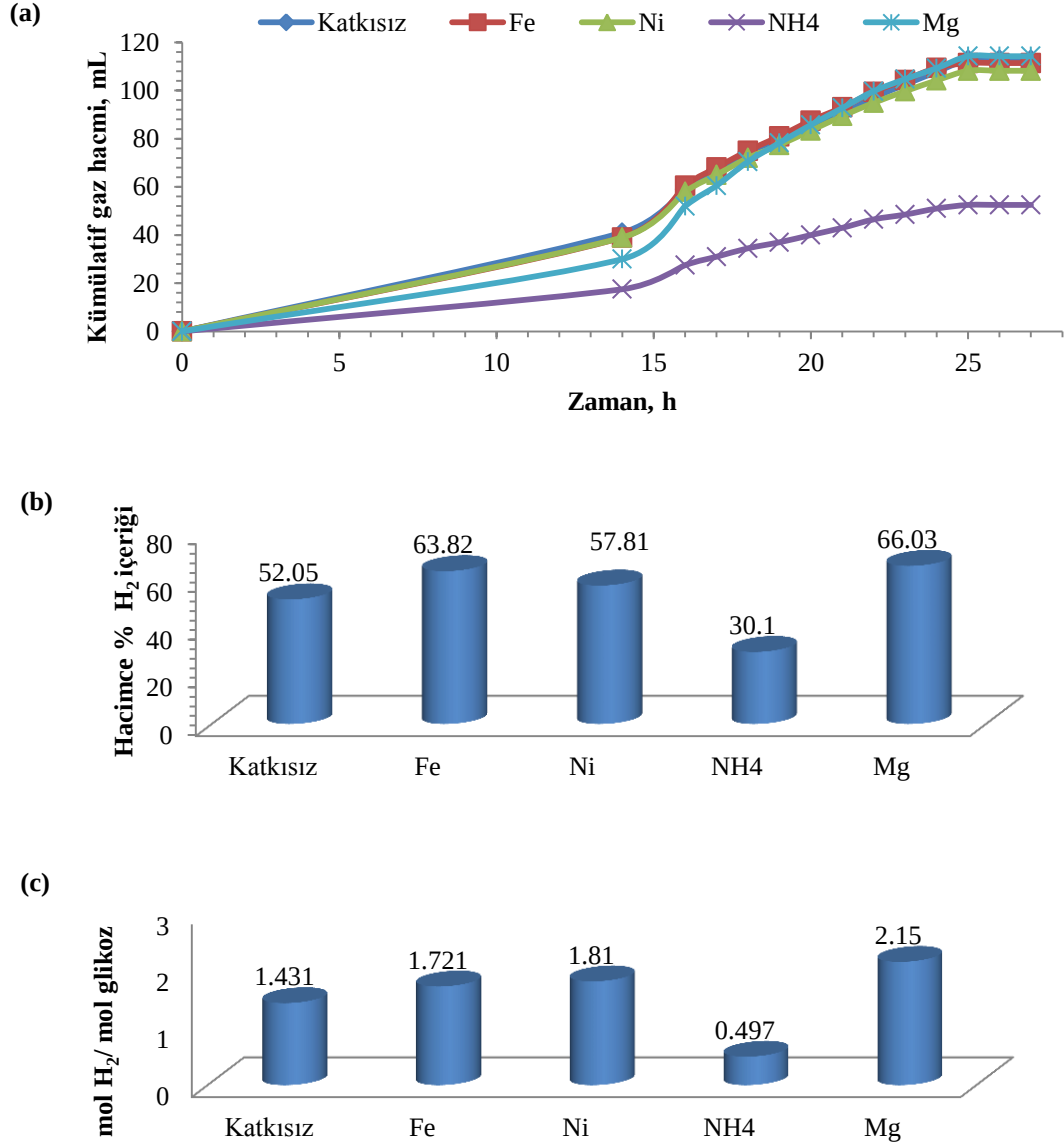
Şekil 5.27 'de da A ve C derişimlerinin yokluğunda D ve B derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisi görülmektedir. Biyohidrojen üretim veriminin D derişimi ile doğru orantılı, B derişiminin artışıyla ise ters orantılı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.28 Magnezyum klorür (D) ve nikel klorür (C) derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisinin cevap yüzeyi

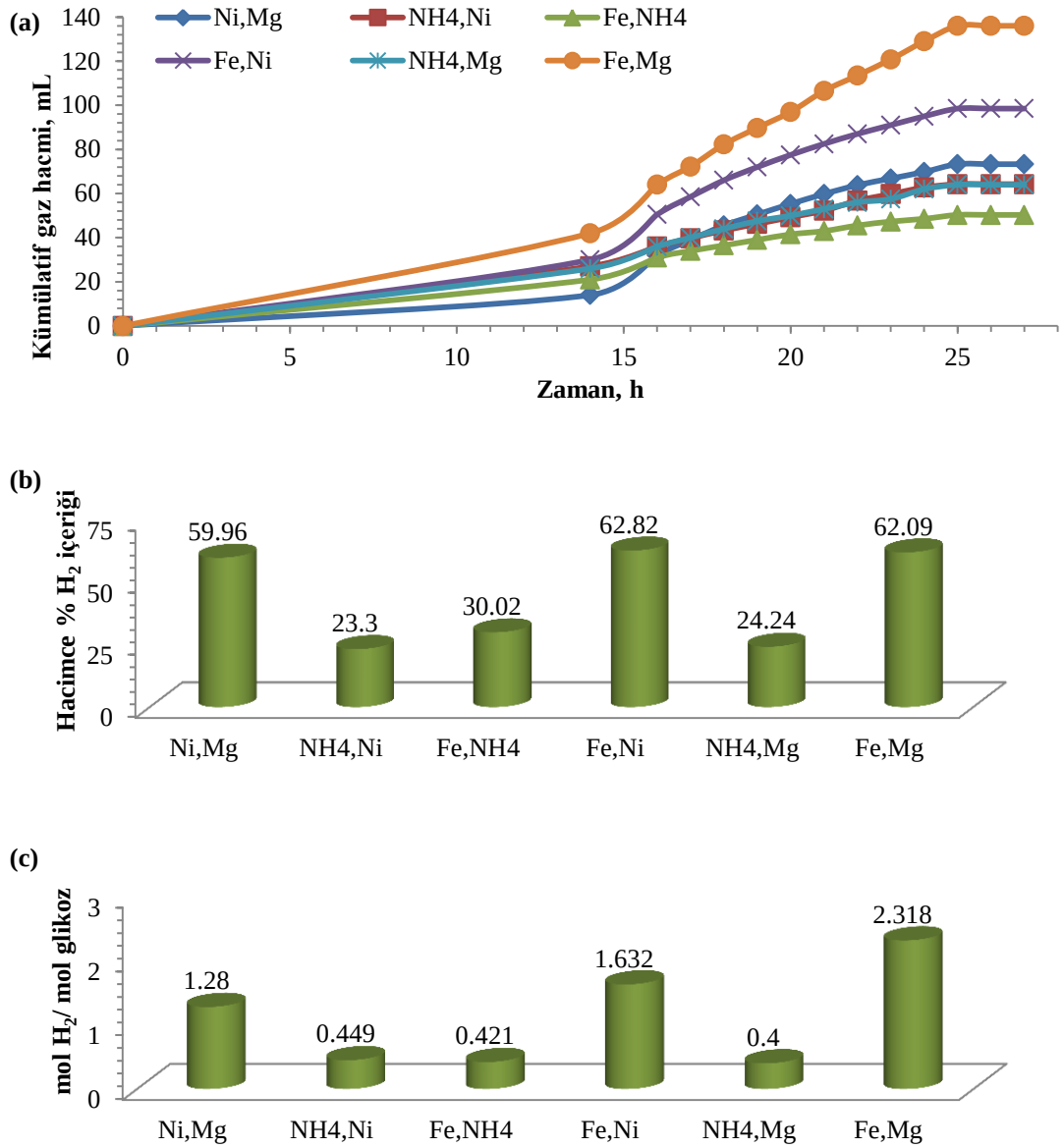
Şekil 5.28'de A ve B derişimlerinin yokluğunda D ve C derişiminin biyohidrojen üretim verimine etkisi görülmektedir. Biyohidrojen üretim veriminin D ve C derişimi ile doğru orantılı olduğu belirlenmiştir.

Katkı maddelerinin etkisinin en doğru şekilde değerlendirilebilmesi için her bir katkı maddesi teker teker ele alınmıştır. Öncelikle yalnızca besi ortamında FeSO_4 , NH_4Cl , MgCl_2 ve NiCl_2 nin varlığının hidrojen verimi üzerine etkisi araştırılmıştır.



Şekil 5.29 Fe, Ni, NH_4 , Mg nin biyohidrojen üretim verimine etkisi
a. Kümülatif gaz hacmi, b. Hacimce % H_2 içeriği, c. Verim değeri

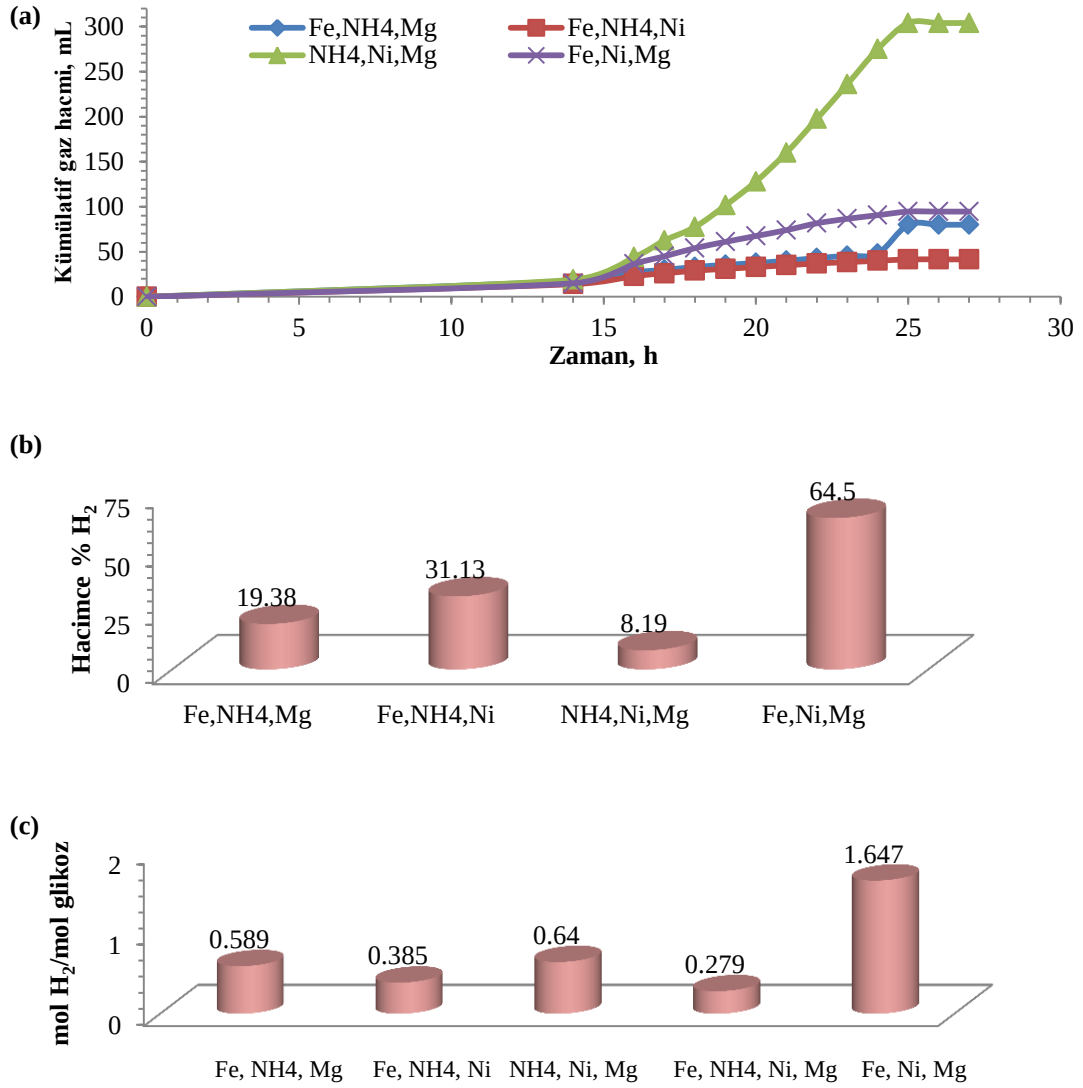
Şekil 5.29'dan görüldüğü üzere en yüksek kümülatif gaz hacmi, % H_2 ve biyohidrojen verimi MgCl_2 'nin bulunduğu ortamda elde edilmiştir. Katkı maddelerinin ikili etkileşimlerini görmek için veriler grafiğe geçirilmiş ve şekil 5.30'da verilmiştir.



Şekil 5.30 İkili katkı maddelerinin biyohidrojen üretim verimine etkisi
a. Kümülatif gaz hacmi, b. Hacimce %H₂ içeriği, c. Verim değeri

Şekil 5.30'dan görüldüğü üzere ikili etkileşimde en yüksek kümülatif gaz hacmine FeSO₄ ve MgCl₂ katkı maddelerinin varlığında erişilmiştir. GC sonuçlarına bakıldığında en yüksek %H₂ miktarına FeSO₄ ve NiCl₂'nin varlığında ulaşılmıştır ancak verim değeri FeSO₄ ve MgCl₂ olduğu durumda en yüksek değerine ulaşmıştır.

Katkı maddelerinin üçlü etkileşimlerini görmek için veriler grafiğe geçirilmiş ve şekil 5.31’ de verilmiştir.

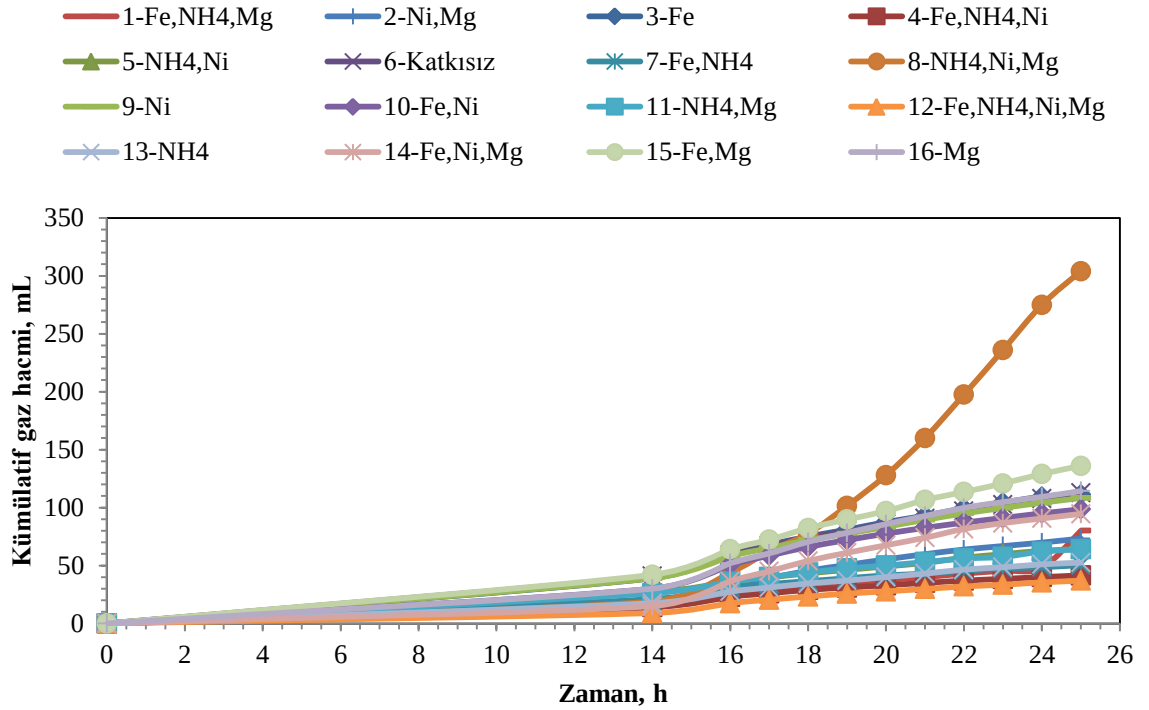


Şekil 5.31 Üçlü katkı maddelerinin biyohidrojen üretim verimine etkisi
a. Kümülatif gaz hacmi, b. Hacimce %H₂ içeriği, c. Verim değeri

Şekil 5.31’den görüldüğü üzere ikili etkileşimde en yüksek kümülatif gaz hacmine NH₄Cl, NiCl₂ ve MgCl₂ katkı maddelerinin varlığında erişilmiştir. GC sonuçlarına ve verim değerine baktığımızda en yüksek %H₂ miktarına FeSO₄, NiCl₂ ve MgCl₂’nin varlığında ulaşılmıştır.

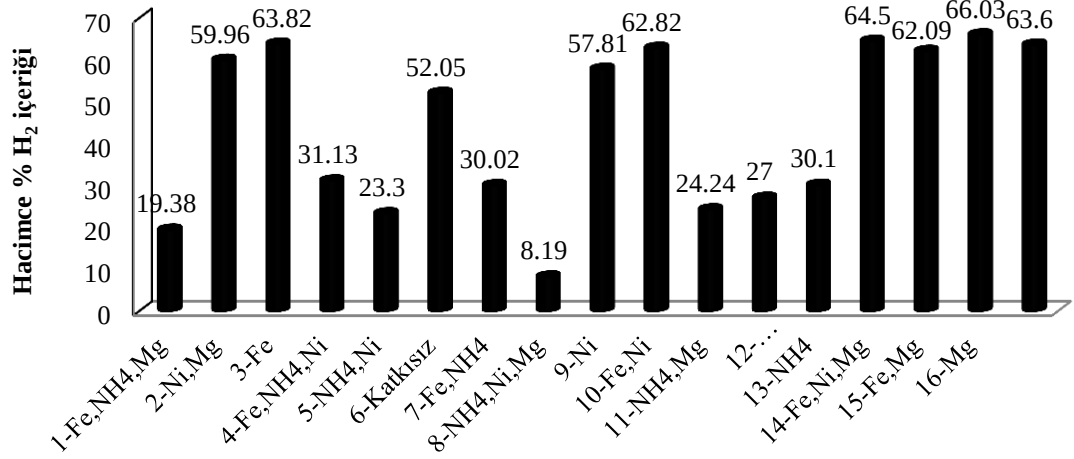
Dört katkı maddesinin bulunduğu besi ortamında ise kümülatif gaz hacmi, %H₂ ve biyohidrojen verimi en düşük değerini almıştır. Dört katkı maddesinin kullanımı biyohidrojen üretimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Sonuç olarak toplu olarak bakıldığında şekil 5.32’de katkı maddeleri varlığında kümülatif gaz hacminin zamanla değişimi verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en yüksek gaz hacmi NH₄Cl, MgCl₂ ve NiCl₂ katkı maddelerinin eklendiği ortamda ulaşılmıştır.



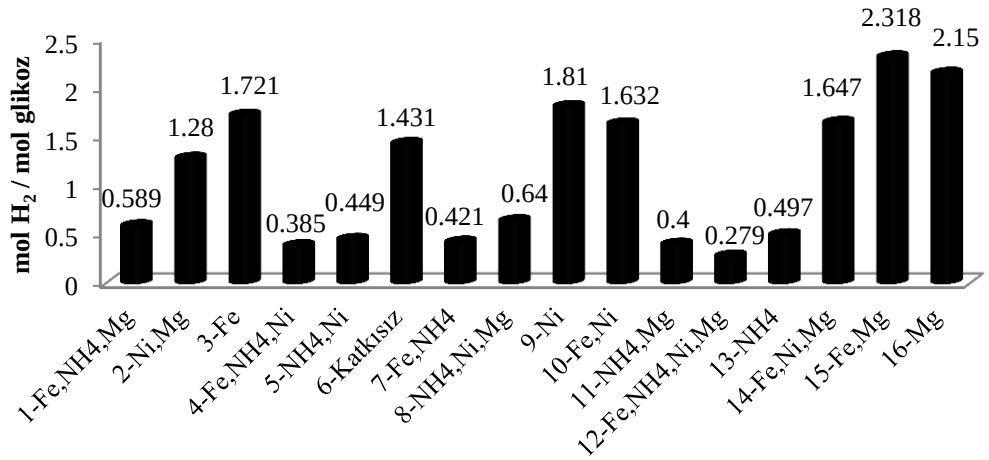
Şekil 5.32 Kümülatif gaz hacminin zamanla değişimi

Şekil 5.32 her ne kadar NH₄Cl, MgCl₂ ve NiCl₂ katkı maddelerinin eklendiği ortamın en yüksek kümülatif gaz hacmini verdiğini gösterse de şekil 5.33 GC sonuçlarından görüldüğü üzere en düşük %H₂ içeriği bu üç katkı maddesinin eklendiği durumda görülmüştür. Bu durum kümülatif gaz hacminin tek başına hidrojen üretimi için yeterli bir sonuç olmadığını, özellikle gaz içeriğinin ölçülmesi ve sonrasında tüketilen besi ortamı miktarı ile verim hesabı yapılması gerektirdiğini göstermiş bulunmaktadır.



Şekil 5.33 GC kromatografi sonuçları

Biyohidrojen verimine toplu olarak bakıldığında en yüksek verim değerine **1.5 g/L FeSO₄ ve 1 g/L MgCl₂**'nin bulunduğu ortamda ulaşılmıştır (Şekil 5.34).



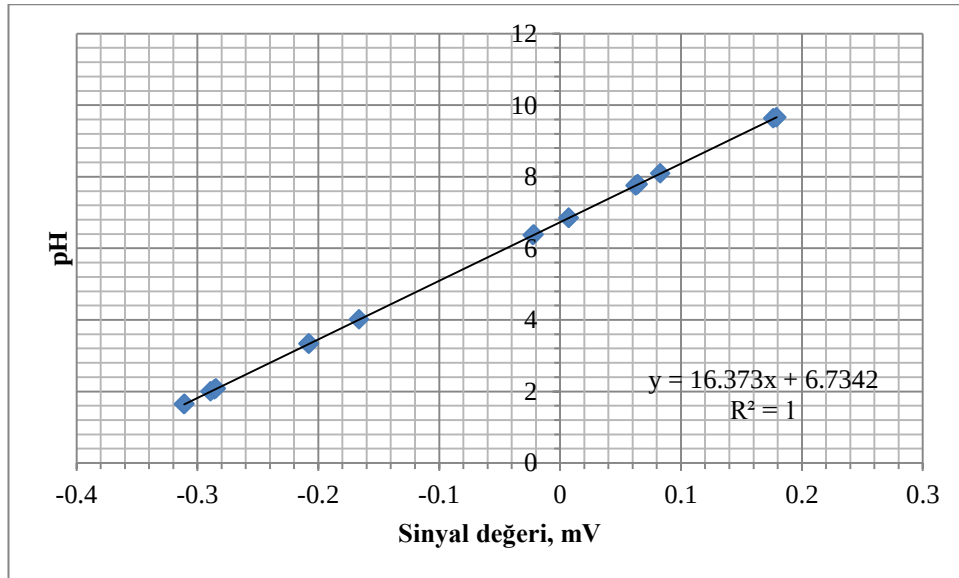
Şekil 5.34 Katkı maddelerinin biyohidrojen üretim verimine etkisi

5.4 Biyoreaktörde Dinamik Analiz ve Sistem Tanımlama

5.4.1 Kalibrasyon çalışmaları

5.4.1.1 pH probu kalibrasyonu

Dinamik ve kontrol deneylerinde kullanılacak olan pH probunun gösterge değeri ve bilgisayar sinyali değerleri arasındaki bağıntıyı bulmak amacıyla kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. pH probu için oluşturulan kalibrasyon doğrusu şekil 5.35’te verilmiştir.

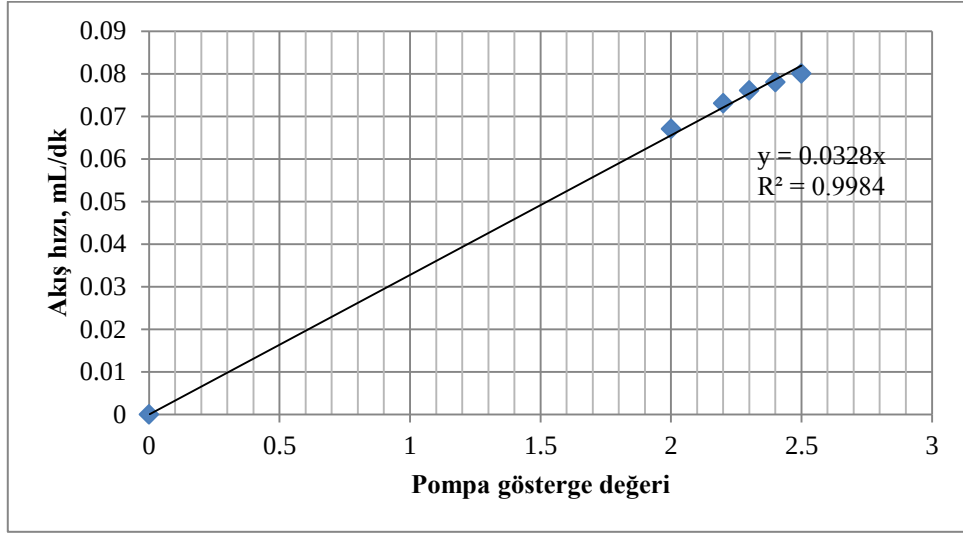


Şekil 5.35 pH değerine karşı bilgisayar sinyali değişimi

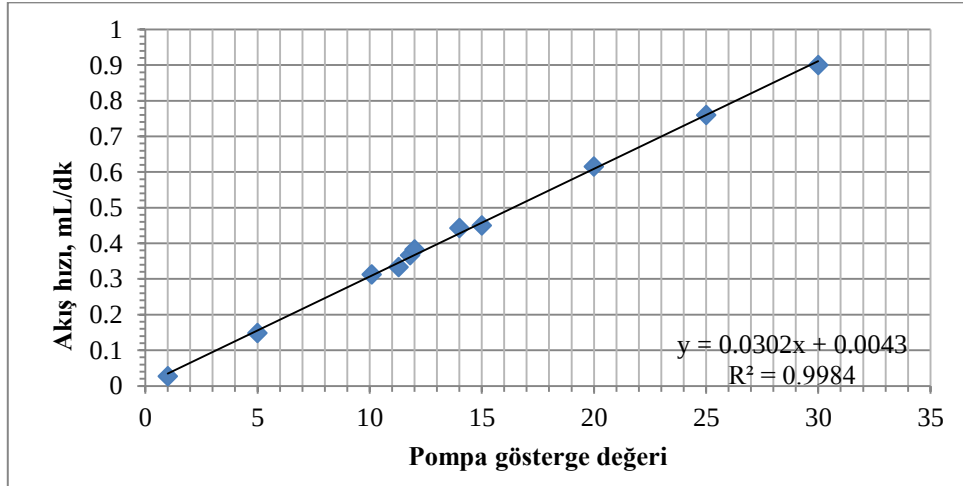
5.4.1.2 Pompa kalibrasyonu

Dinamik ve kontrol deneylerinde kullanılacak olan asit ve baz pompalarının gösterge değeri ve bilgisayar sinyali değerine karşılık elde edilen akış hızı değerlerinin bulunması amacıyla kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

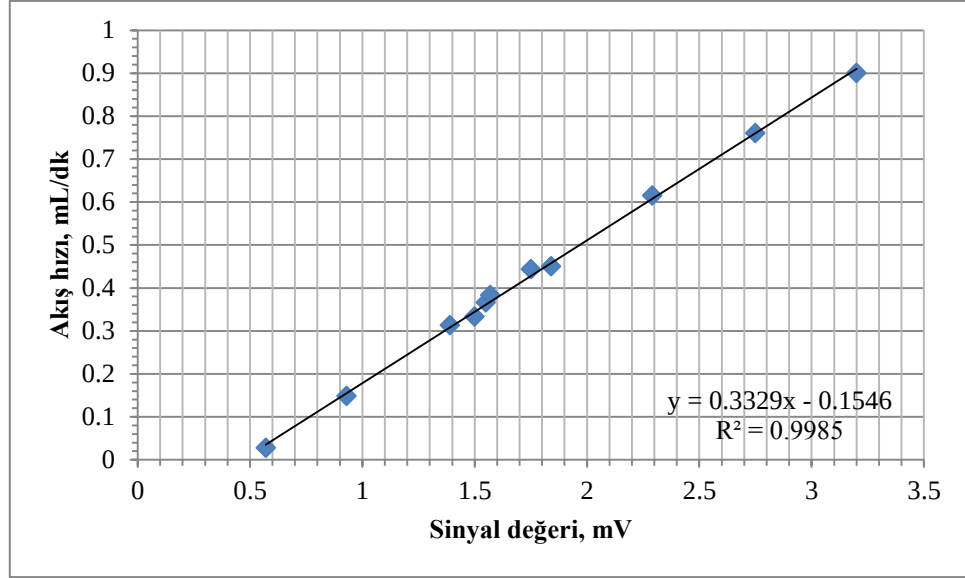
Asit ve baz pompalarının gösterge değeri ile akış hızı arasındaki ilişki için oluşturulan kalibrasyon doğruları sırasıyla şekil 5.36 ve 5.37’ de, baz pompası ile bilgisayar sinyali arasındaki ilişki için oluşturulan kalibrasyon doğrusu ise şekil 5.38’de verilmiştir.



Şekil 5.36 Asit pompası için gösterge değerine karşı akış hızının değişimi kalibrasyonu



Şekil 5.37 Baz pompası için gösterge değerine karşı akış hızının değişimi kalibrasyonu



Şekil 5.38 Baz pompası için gösterge değerine karşılık Simulink çıktısı kalibrasyonu

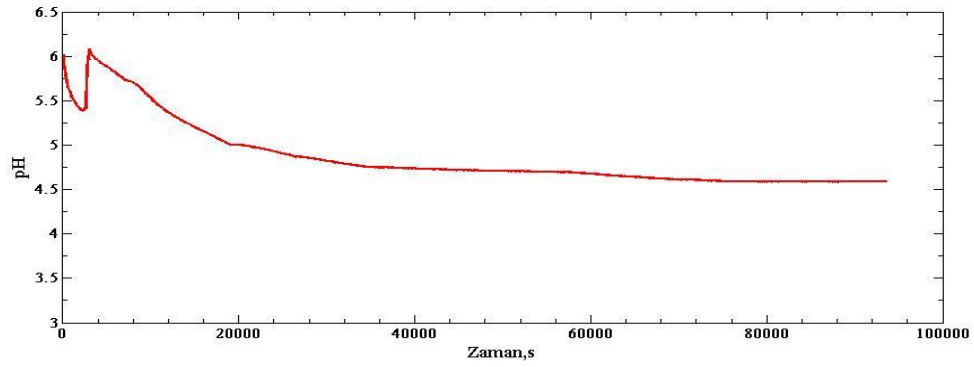
5.4.2 Biyoreaktörde fermantasyon çalışmaları

Fermantasyon çalışmaları kapsamında biyoreaktörde gerçekleştirilen, açık hat fermantasyon deneyi, dinamik deneyler, sistem tanımlama deneyleri ile kontrol deneyleri anlatılacaktır.

5.4.2.1 Açık-hat fermantasyon

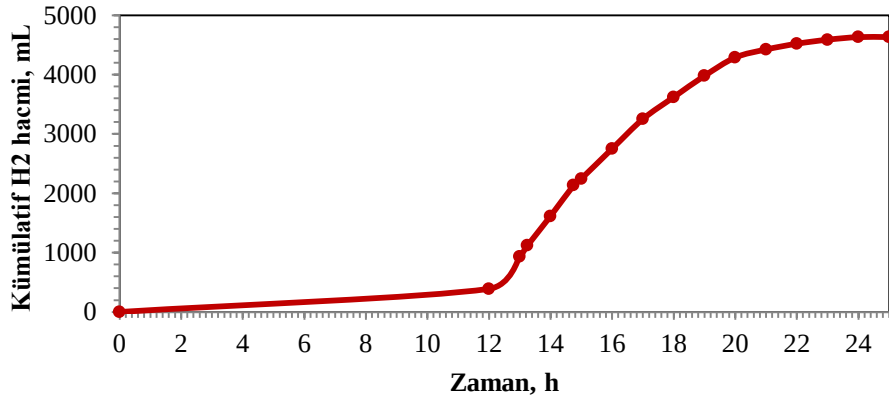
Anaerobik koşullarda *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında (1 g/L glikoz, 1.5 g/L FeSO₄ ve 1 g/L MgCl₂) gerçekleştirilen açık – hat biyoreaktör işletiminde, prosesin 25 saatlik işletim süresi boyunca pH değişimini ve biyohidrojen üretim hacmini belirlemek amacıyla deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir. Kontrol edilen değişken olarak seçilen pH' ın herhangi bir kontrol yöntemiyle denetlenmediği durumda zamanla değişimini incelemek amacıyla gerçekleştirilen deneyde diğer tüm biyoreaktör işletim parametreleri sabit tutularak hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. İşletim koşulları, 37 °C sıcaklık ve 600 rpm karıştırma hızına ayarlanarak reaktörün kontrol algoritması (IRIS

V.2) ile sabit tutulmuştur. Ölçek büyütme aşamasının son adımında biyoreaktöre aktarılan karışım kültürün, zenginleştirilmiş patates suyu ortamında havasız koşullarda fermantasyon süresince pH değişimi MATLAB programının Simulink ara yüzünde oluşturulan model yardımıyla kaydedilmiştir. 25 saatlik fermantasyon boyunca pH 6.00'dan 4.590 değerine düşmüştür. pH' ın zamanla değişimi şekil 5.39' da verilmiştir. Fermantasyon mikroorganizmanın eklendiği andan itibaren pH 6 değerine getirilerek başlatılmıştır. Şekilden de görüldüğü üzere mikroorganizma aktarımı sırasında pH 5.5 değerine düşmüş sonrasında 2 M NaOH ile pH 6 değerine yükseltilmiştir.



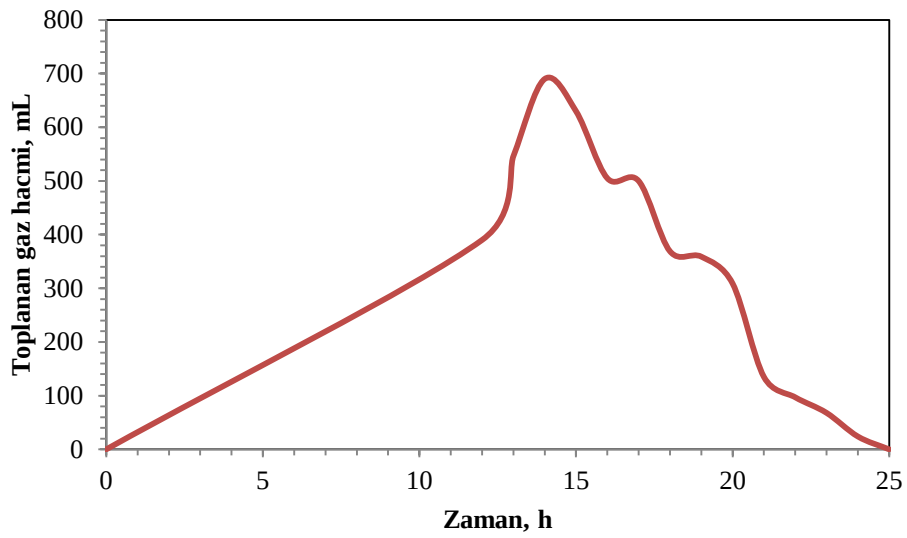
Şekil 5.39 Biyoreaktörde fermantasyon süresi boyunca pH değişimi

Biyotepkime sonucunda oluşan gaz, 12 saat sonrasında gaz toplama şişelerine toplanmaya başlanmış ve zamanla kaydedilen kümülatif gaz hacmi sonuçları şekil 5.40'da verilmiştir.



Şekil 5.40 Kümülatif gaz hacminin zamanla değişimi

25 saatlik fermentasyon sonucunda 4632 mL gaz toplanmıştır. Kümülatif gaz hacminin %H₂ içeriği GC kromatografi ile % 65.65 olarak bulunmuştur. Toplanan 4632 mL kümülatif gaz hacminin substrat başına hidrojen hacmi (verim) 208.82 mL H₂/ g glikoz olarak hesaplanmıştır. Diğer bir ifadeyle 4000 mL zenginleştirilmiş patates ortamında üretilen H₂ gazının verimi 1.691 mol H₂ /mol glikoz'dur. pH' da meydana gelen düşmeye bağlı olarak düşük pH değerlerinde hidrojenaz enzim aktivitesinin azalmasından dolayı üretilen gaz hacmi de azalarak sabitlenmiştir. Üretilen gaz miktarının zamanla değişimi şekil 5.41' de verilmiştir.



Şekil 5.41 Gaz üretiminin zamanla değişimi

Sonuçlardan görüldüğü üzere 25 saatlik fermentasyon süresi sonunda gaz üretimi küçük ölçek çalışmalarında olduğu gibi tamamen durmaktadır. Bu sebeple prosesin işletim süresi 24 h olarak belirlenmiştir.

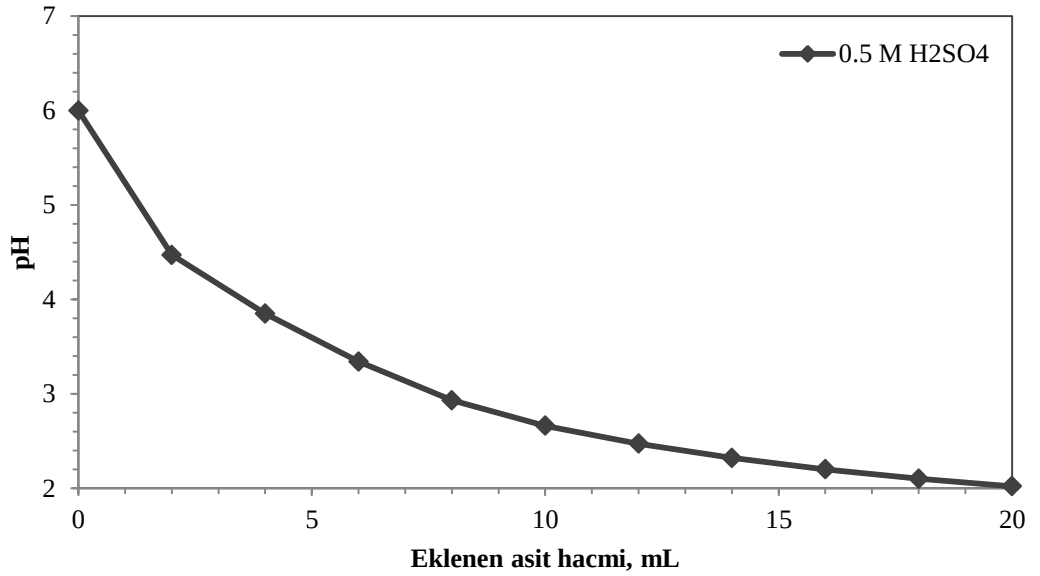
5.4.2.2 Ayar değişkeni seçimi

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, pH ayarlamada asit olarak H₂SO₄ veya HCl, baz olarak NaOH veya KOH kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışmada, H₂SO₄ – NaOH asit – baz çiftinin kullanılmasına karar verilmiştir.

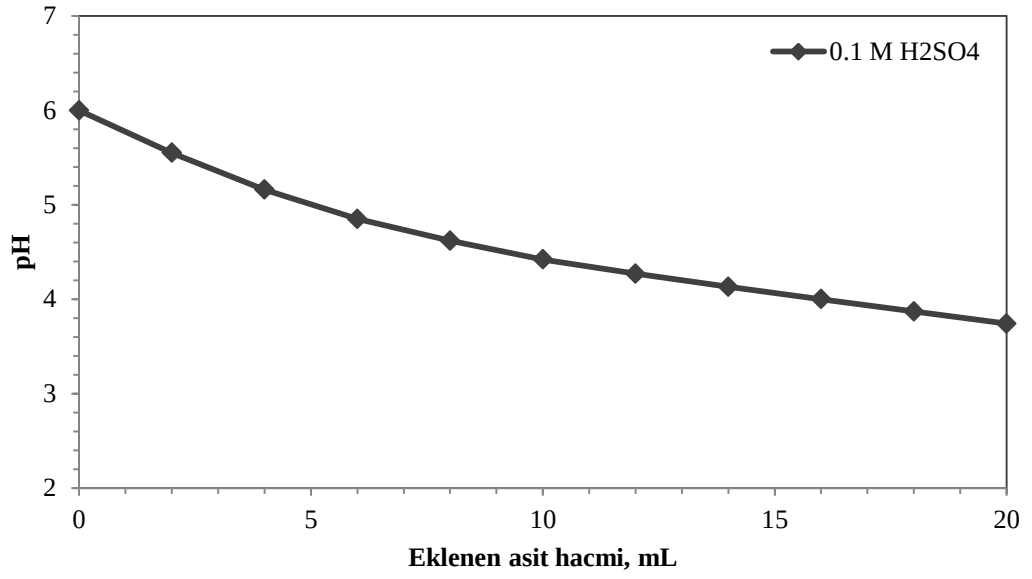
5.4.2.3 Asit – baz çifti derişiminin belirlenmesi

Asit – baz derişimi belirleme çalışmaları, kullanılacak asit – baz hacminin, toplam reaksiyon hacminin % 10 ‘unu aşmamasına dikkat edilmiştir. Buna göre 4 L’lik çalışma hacminde, eklenecek asit ve baz hacimleri en fazla 200’er mL olacak şekilde belirlenmiştir.

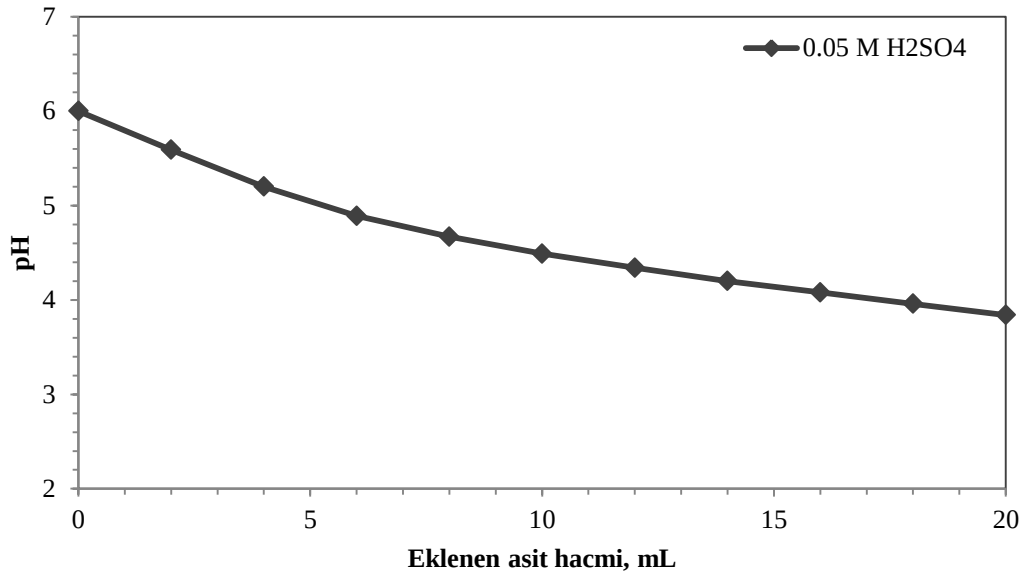
Dinamik ve kontrol deneylerinde kullanılacak asit, baz derişimlerinin ve hacimlerinin belirlenmesi için açık hat işletimindeki pH düşüşünü simüle edecek ve bu düşüşü karşılayabilecek asit – baz derişimleri için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 400 mL’lik besi ortamlarına öncelikle 0.5 M, 0.1 M ve 0.05 M’lık sülfirik asit çözeltileri küçük hacim adımları halinde eklenmiştir. Eklenen asit hacmine karşılık pH değerindeki değişimler grafiğe geçirilerek, pH düşüş eğrisinin açık – hat biyoreaktör işletimi deneylerindeki düşüşe benzer olan eğri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar şekil 5.42 – 5.44’ te verilmiştir.



Şekil 5.42 Eklenen 0.5 M’lık H₂SO₄ hacmi ile pH değişimi



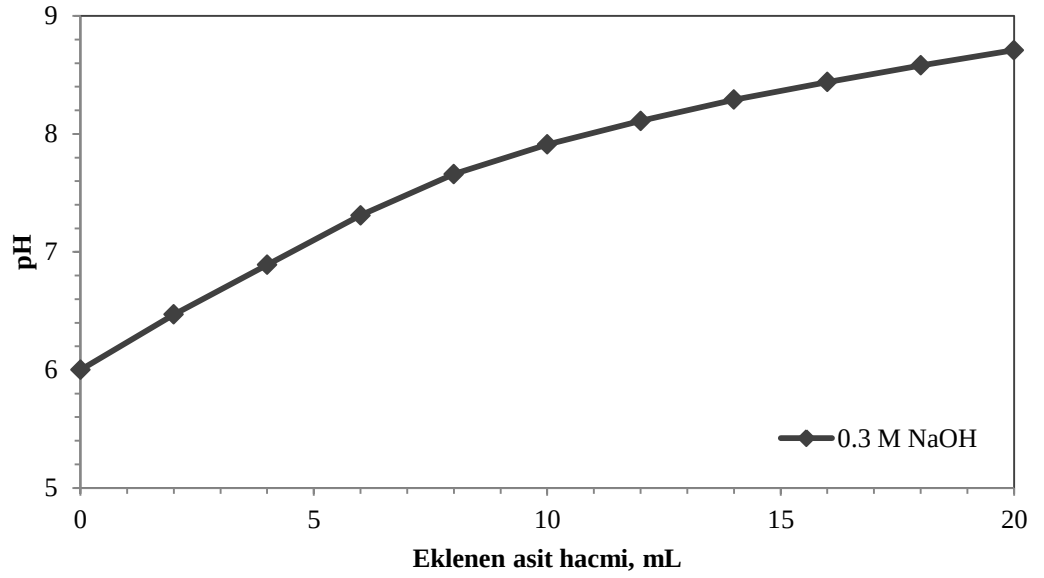
Şekil 5.43 Eklenen 0.1 M'lık H_2SO_4 hacmi ile pH değişimi



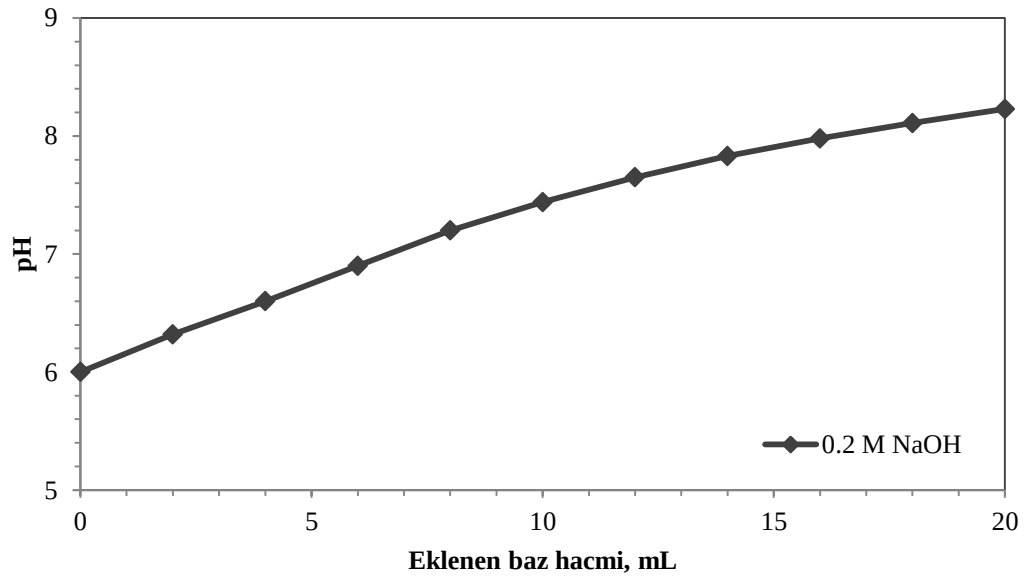
Şekil 5.44 Eklenen 0.05 M'lık H_2SO_4 hacmi ile pH değişimi

Yapılan çalışmalarda, mikroorganizmalı açık-hat biyoreaktör işletimi deneylerindeki pH düşüşüne benzer olan grafiği veren sülfirik asit derişiminin 0.1 M olduğu belirlenmiştir. Baz olarak kullanılacak olan ayar değişkeni sodyum hidroksit derişim değerinin ise en az 0.1 M'lık sülfirik asidin ortama verdiği H^+ iyonlarını nötrleştirebilecek derişimde OH^- iyonu derişimi sağlaması gerektiğinden ve mikroorganizma çoğalmasının üstel

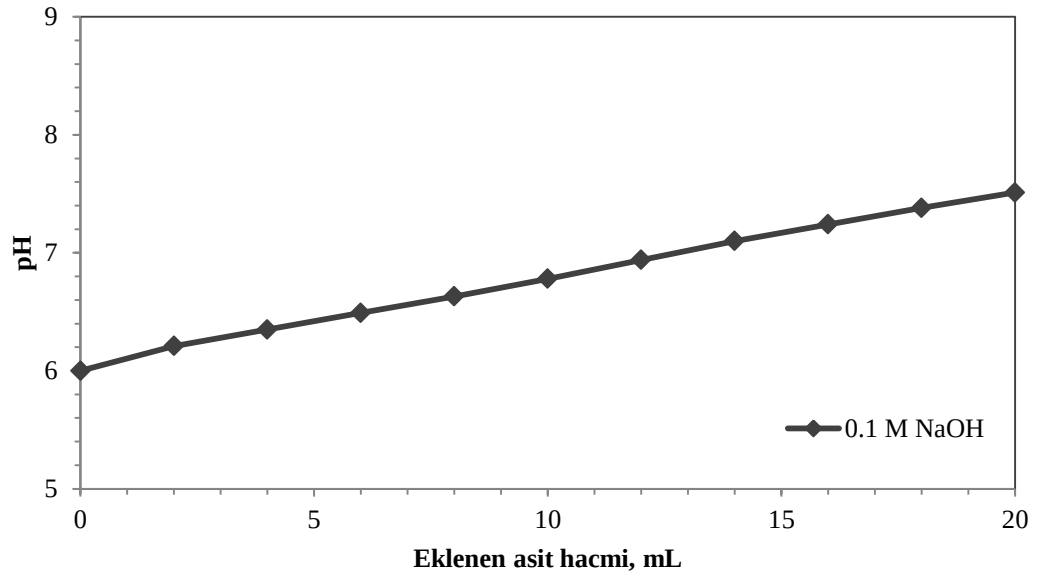
fazında gözlenen pH düşmesini karşılayabilecek derişimde olması gerektiğinden 0.3 M olarak seçilmiştir. Yapılan varsayımı doğrulamak amacıyla besi ortamlarına 0.3 M, 0.2M ve 0.1 M'lık sodyum hidroksit çözeltileri küçük hacim adımları halinde eklenmiştir (Şekil 5.45 – 5.47).



Şekil 5.45 Eklenen 0.3 M'lık NaOH hacmi ile pH değışimi



Şekil 5.46 Eklenen 0.2 M'lık NaOH hacmi ile pH değışimi

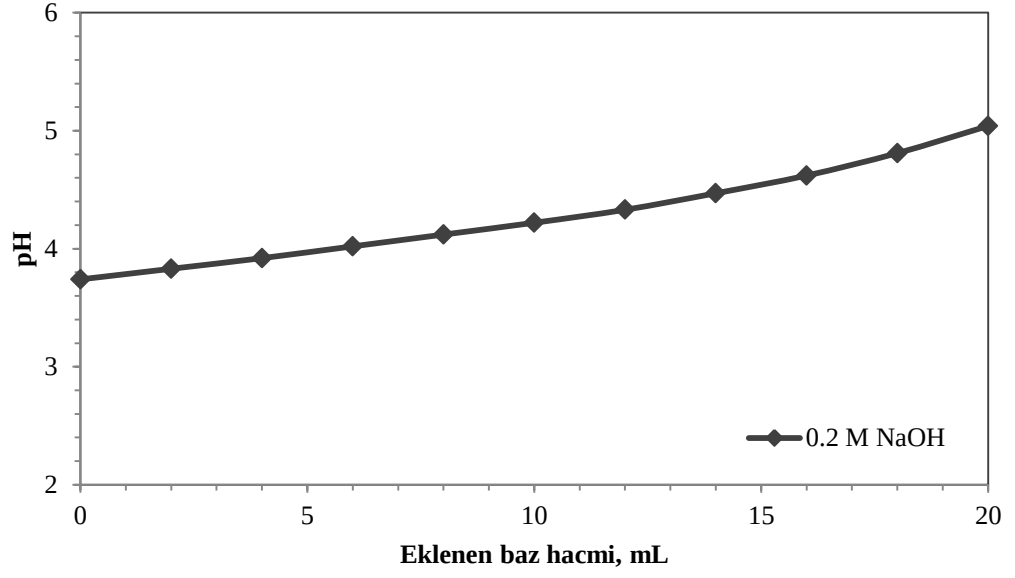


Şekil 5.47 Eklenen 0.1 M’lık NaOH hacmi ile pH değişimi

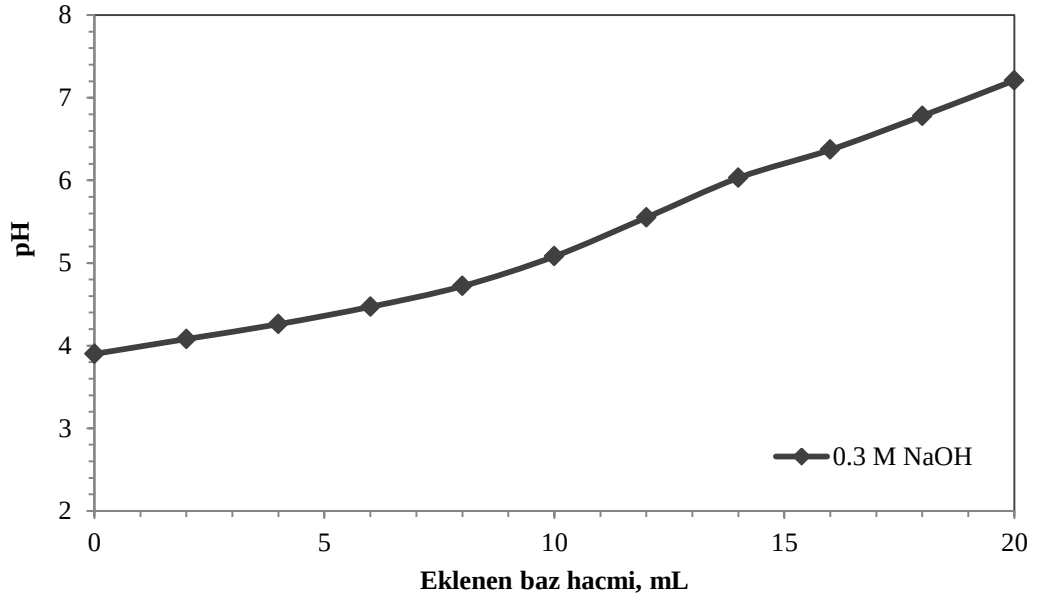
pH 6 değerinde sabitlenmiş ortamlara eklenen baz derişimleri yerine farklı bir çalışma daha gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.43’ten görüldüğü üzere, 0.1 M H_2SO_4 ile pH değeri 6’dan 3.74’e düşmüştür. pH 3.74 değerindeki ortama aynı miktarda 0.2 M’lık NaOH eklemesi sonucunda pH 6 değerine şekil 5.48’den görüldüğü üzere ulaşılammış, baz derişimi asit derişimini kompanze edemeyerek ancak 7.04 değerine gelebilmiştir.

Ancak Şekil 5.44 ’ten görüldüğü üzere, 0.05 M H_2SO_4 ile pH değeri 6’dan 3.90’a düşmüştür. Şekil 5.49’ a bakıldığında, pH 3.90 değerindeki ortama aynı miktarda 0.3 M’lık NaOH eklemesi sonucunda pH değeri 7.21 değerine ulaşabilmiştir.

Sonuç olarak asit – baz çifti olarak sülfirik asit – sodyum hidroksit seçilmiş ve seçilen asit ve baz derişimleri sırası ile 0.1 M ve 0.3 M olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.48 0.1 M H_2SO_4 ile pH değeri düşürülen besi ortamına eklenen 0.2 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi



Şekil 5.49 0.05 M H_2SO_4 ile pH değeri düşürülen besi ortamına eklenen 0.3 M'lık NaOH hacmi ile pH değişimi

5.4.2.4 Biyoreaktörün dinamik analiz sonuçları

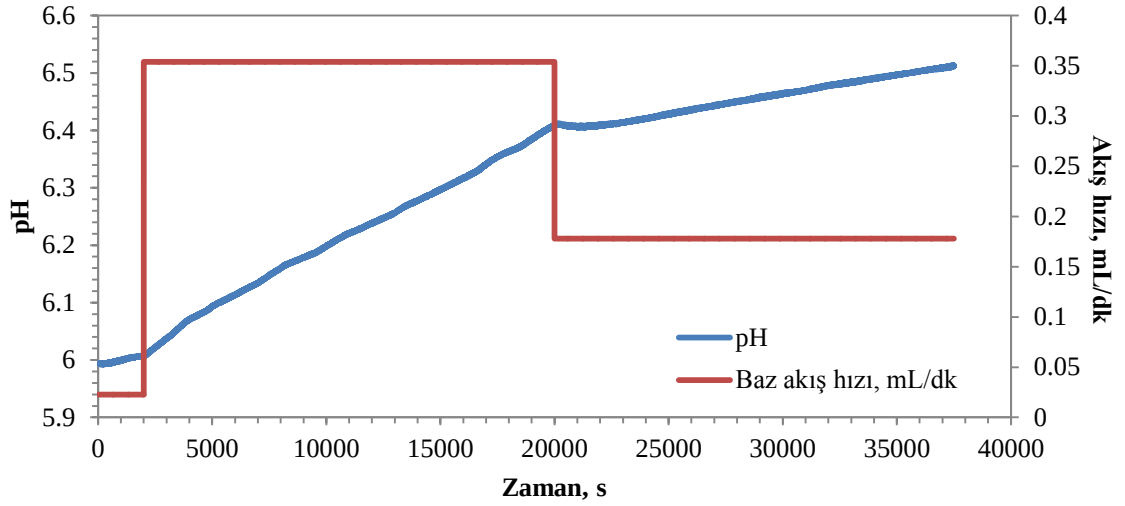
Mikroorganizmaların çoğalma performanslarını etkileyen faktörlerin başında gelen pH'ın fermantasyon ile hidrojen üretimi süresince optimum değerinde tutulması gerekmektedir. 25 saatlik fermantasyon süresi boyunca bütirik ve asetik asit oluşumu nedeniyle pH düşüşü gözlenmektedir. Bu yüzden ilk olarak pH'ın kontrolü için bir ayar değişkeninin seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla pH düşüşünü karşılayacak baz akış hızı ayar değişkeni olarak seçilmiştir. Etkin bir kontrol gerçekleştirebilmek için baz akış hızının pH' ın üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla mikroroganizmalı ve mikroroganizmasız besi ortamlarına pozitif ve negatif etkiler verilerek pH değişimi incelenmiştir.

Dinamik çalışmalar, MATLAB programında Simulinkte hazırlanan model ile pompaya farklı basamak etkilerin verilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

5.4.2.4.1 Mikroorganizmasız besi ortamına verilen pozitif ve negatif etki

Biyoreaktöre 4 L zenginleştirilmiş besi ortamı beslenmesinin ardından 30 dk süresince içerisinden azot geçirilerek reaktörün in-situ DO probu yardımıyla anaerobik ortamın sağlandığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmada sistemde asit olarak 0.1 M H_2SO_4 , baz olarak ise 0.3 M NaOH kullanılmıştır. 37 °C sabit sıcaklık ve 600 rpm sabit karıştırma hızında işletilen zenginleştirilmiş besi ortamı pH 6 değerinde 0.075 mL/dk sabit asit akış hızı ve 0.0257 mL/dk sabit baz akış hızında yatışkın koşula getirilmiştir. Mikroorganizmasız yapılan çalışmada asit akış hızı sabit tutularak 2000 s sonunda baz akış hızına 0.0257 mL/dk'dan 0.354 mL/dk'ya pozitif basamak etki verilmiştir.

Verilen 0.354 mL/dk pozitif etkinin ardından 20000 s sonunda negatif bir basamak etki verilmiştir. Basamak etkinin büyüklüğü 0.354 mL/dk' dan 0.178 mL/dk'dır. Sistem verilen negatif etkiye olumlu bir sonuç verememiştir. Ancak bir önceki pozitif etkinin eğiminden daha küçük bir eğimle pH'ın yükselme durumu gözlenmiştir. Verilen pozitif ve negatif etkiler şekil 5.50'de verilmiştir.



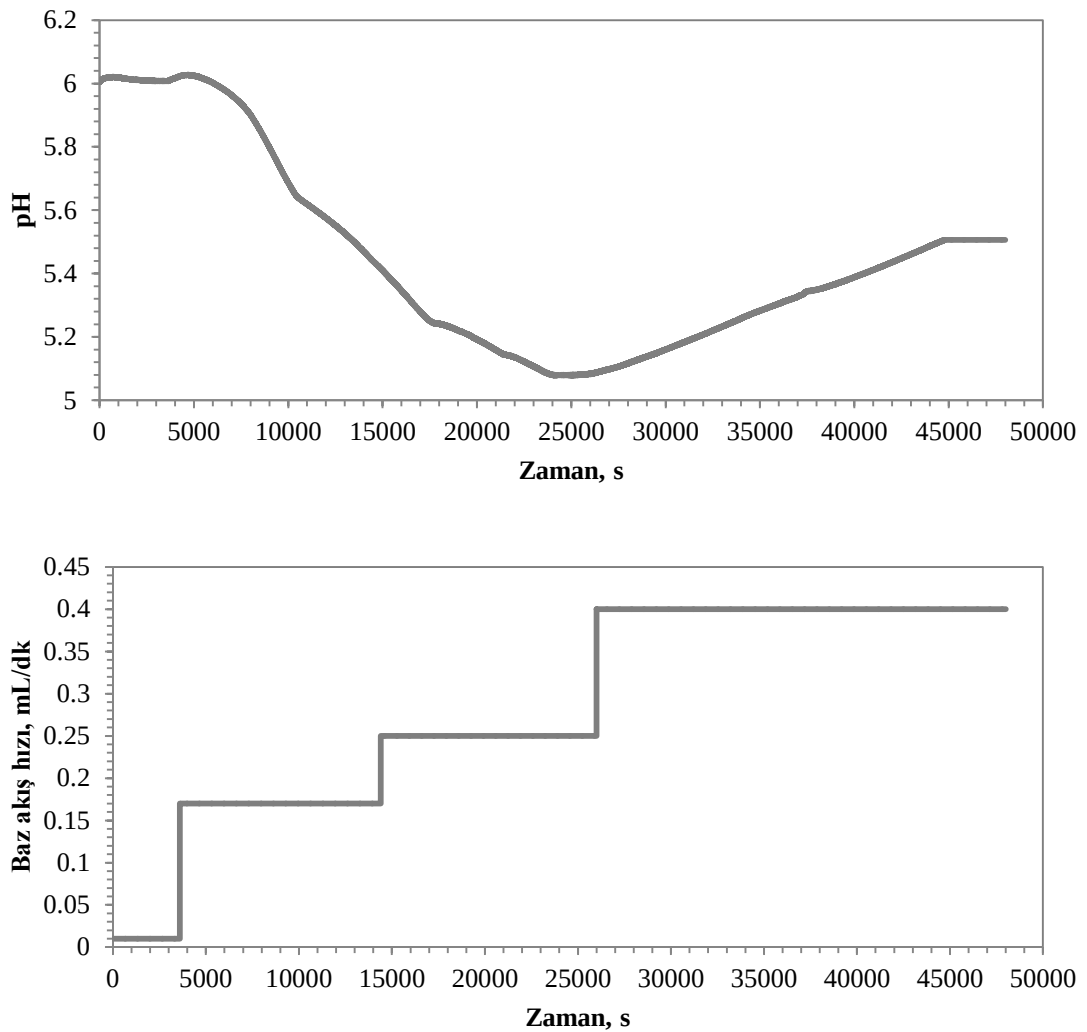
Şekil 5.50 pH 6.0 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış hızında ve 0.0257 mL/min sabit baz akış hızında yatışkın koşulda işletilen sistemde baz akış hızına 0.0257 mL/min'den 0.354 mL/min pozitif ve 0.354 mL/min'den 0.178 mL/min'e negatif etki verilmesi durumunda sistemin cevabı

Şekilden görüleceği üzere verilen pozitif etki sonucunda sistem pH'ı 6.0'dan 6.41'e ve negatif etki sonucunda ise pH 6.41'den 6.5 değerine yükselmiştir.

5.4.2.4.2 Mikroorganizmalı besi ortamına verilen pozitif etki

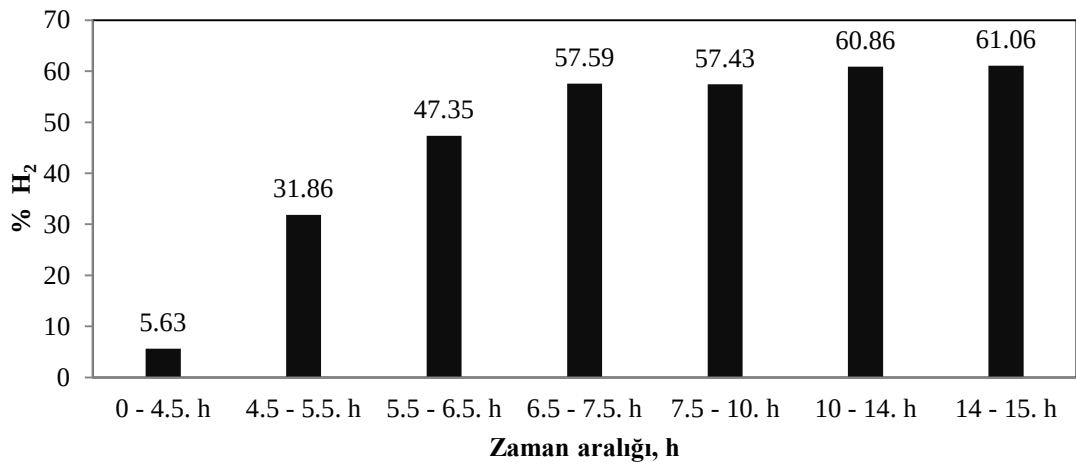
Biyoreaktöre 4 L zenginleştirilmiş besi ortamı beslenmesinin ardından 30 dk süresince içerisinde azot geçirilerek reaktörün in-situ DO probu yardımıyla anaerobik ortamın sağlandığı gözlenmiştir. 37 °C derece sabit sıcaklıkta ve 600 rpm sabit karıştırma hızında işletilen zenginleştirilmiş besi ortamına steril koşullarda ölçek büyütme adımının son aşaması olan 1:50 mikroorganizma aktarım oranında *C. butyricum* ve *E. aerogenes* 10:1 oranında aktarılmıştır. Sistem pH 6 değerinde 0.075 mL/dk sabit asit akış hızı ve 0.01 mL/dk sabit baz akış hızında yatışkın koşula getirilmiştir. Mikroroganizmalı ortamda yapılan çalışmada asit akış hızı sabit tutularak 3600 s sonunda baz akış hızına 0.01 mL/dk'dan 0.17 mL/dk'ya pozitif basamak etki verilmiştir. Ancak mikroorganizma çoğalması sırasında bütirik ve asetik asit oluşumundan kaynaklı pH düşüşünü 0.17 mL/dk baz akış hızı karşılayamamıştır. Bu durumda 14400 s sonunda baz akış hızına 0.17 mL/dk'dan 0.25 mL/dk pozitif etki verilmiştir. Aynı şekilde baz akış hızı mikroorganizma çoğalmasından kaynaklı verilen

pozitif etkiyi görememiştir. Verilen etkiyle yatışkın koşula gelen besi ortamına 26000 s sonunda baz akış hızına 0.25 mL/dk' dan 0.4 mL/dk'ya pozitif basamak etki verilmiş ve sistem 46000 s'de yatışkın koşula gelmiştir. Mikroorganizmalı ortamda gerçekleştirilen sistemin verilen pozitif etkilere cevabı şekil 5.51'de verilmiştir. Şekilden görüleceği üzere verilen ilk pozitif etki sonucunda sistem pH'ı 6.0'dan 5.47'ye, ikinci pozitif etkide pH 5.47'den 5.08'e düşerek mikroorganizma çoğalmasının yarattığı pH düşüşünü karşılayamamıştır. Verilen son pozitif etkide ise 5.08'den 5.5'e yükselerek mikroorganizma çoğalması ile pH düşüşünü engelleyebilmiştir.



Şekil 5.51 pH 6.0 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış hızında ve 0.01 mL/min sabit baz akış hızında yatışkın koşula işletilen sistemde baz akış hızına verilen pozitif etkiler durumunda sistemin cevabı

Mikroorganizmalı ortamda verilen etkiler ile birlikte 15 saatlik deney süresi boyunca gaz şişelerinde kümülatif 5737 mL gaz toplanmış ve GC kromatografi yardımıyla her bir şişenin H_2 içeriği belirlenmiştir. Dinamik etki altında toplanan kümülatif gaz hacminin, açık hat fermantasyonda toplanan miktardan yaklaşık 1000 mL fazla olduğu gözlenmiştir. Açık hat fermantasyonda gaz toplama şişelerinin her birinin H_2 yüzdesi yaklaşık aynı bulunmuş ancak dinamik etkiler altında toplanan gazın H_2 yüzdesi her bir şişede farklılık göstermiştir. Şekil 5.52’de % H_2 içeriğinin zamanla değişimi verilmiştir.



Şekil 5.52 Basamak etki deneyinde % H_2 içeriğinin zamanla değişimi

Şekil 5.52’den de görüldüğü üzere baz akış hızına 0.25 mL/dk’dan 0.4 mL/dk’ya etki verildiği durum olan yaklaşık 7.5 - 14. h aralığında mikroorganizmanın ürettiği % H_2 içeriği artmıştır. Bu durum kontrol çalışmalarında pH değeri 6’da tutulduğunda % H_2 değerinin artacağına kanıt teşkil etmektedir.

5.4.2.5 Sistem tanımlama ile sistemin parametrik modelinin belirlenmesi

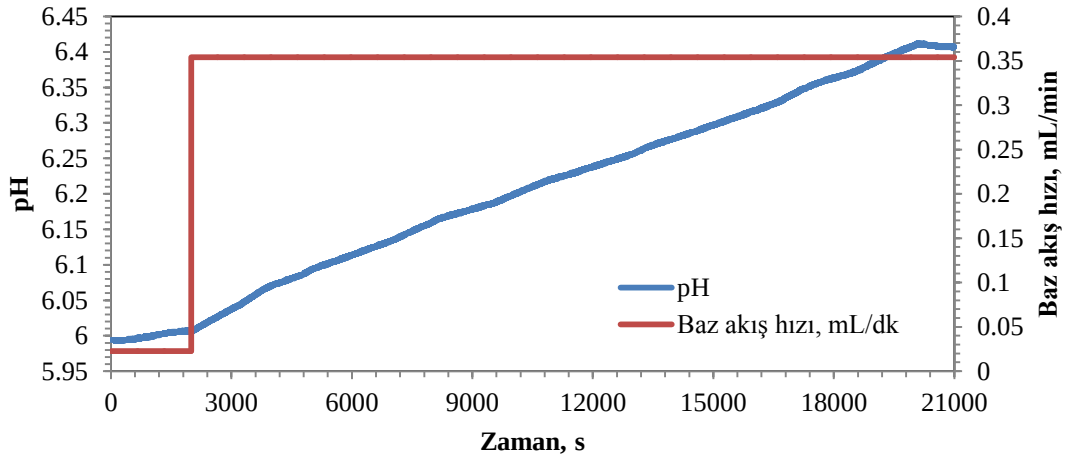
Bu bölüm kapsamında, mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortamda sistemin parametrik modelinin belirlenmesi amacıyla, Bölüm 5.4.2.4’te elde edilen deneysel veriler MATLAB paket programında yazılmış olan YEKK algoritmasında kullanılmıştır. Sistemi ifade eden en uygun ARMAX modelin bulunması amacıyla farklı

kovaryans matris başlangıç değeri (P), unutma çarpanı değeri (λ) ve model mertebesi için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda kestirim performans kriterleri olan maliyet fonksiyonu (V_N) ve ortalama hata değerinin toplamı (M) göz önüne alınarak model uygunluğuna karar verilmiştir. En iyi model parametrelerinin hesaplandığı sistemde, ölçülen sistem çıkış değişkeni ile modelden hesaplanan çıkış değişkeni arasındaki farkın karelerinin toplamı (V_N) ve ortalaması (M) azalacaktır.

Mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı iki farklı dinamik veri kullanılarak yapılan çalışmada bulunan iki ARMAX model kıyaslanarak kontrol çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

5.4.2.5.1 Mikroorganizmasız ortamda sistemin parametrik modelinin belirlenmesi

Mikroorganizmasız besi ortamında baz akış hızına pozitif basamak etki verilerek YEKK algoritmasında kullanılacak olan deney verileri elde edilmiştir. Zamanla pH değişimi şekil 5.53'te verilmiştir.



Şekil 5.53 Mikroorganizmasız ortamda pH 6 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış hızında ve 0.0257 mL/min sabit baz akış hızında yatışkın koşulda işletilen sistemde baz akış hızına 0.0257 mL/min'de 0.354 mL/min pozitif etki verilmesi durumunda sistemin cevabı

Ayar değişkeni olan baz akış hızı ve kontrollü değişken pH'ın zamanla değişim verileri ile en uygun ARMAX modelin bulunması amacıyla farklı unutmaya çarpanı (0.96-1), kovaryans matrisin başlangıç değeri (1,10,100,1000) ve model mertebelerinde ($na_2nb_1, na_2nb_2, na_3nb_1, na_3nb_2$) YEKK algoritması çalıştırılmış ve en uygun ARMAX model yapısının bulunması için karşılaştırma hata kareleri toplamı (V_N) ve ortalama (M) değerlerine göre yapılmıştır. Kestirim performansı açısından karşılaştırılan değerler çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.10 Mikroorganizmasız ortamda baz akış hızına 0.0257 mL/min'den 0.354 mL/min'e pozitif basamak etki verilmesi sonucunda kestirim performans kriterleri

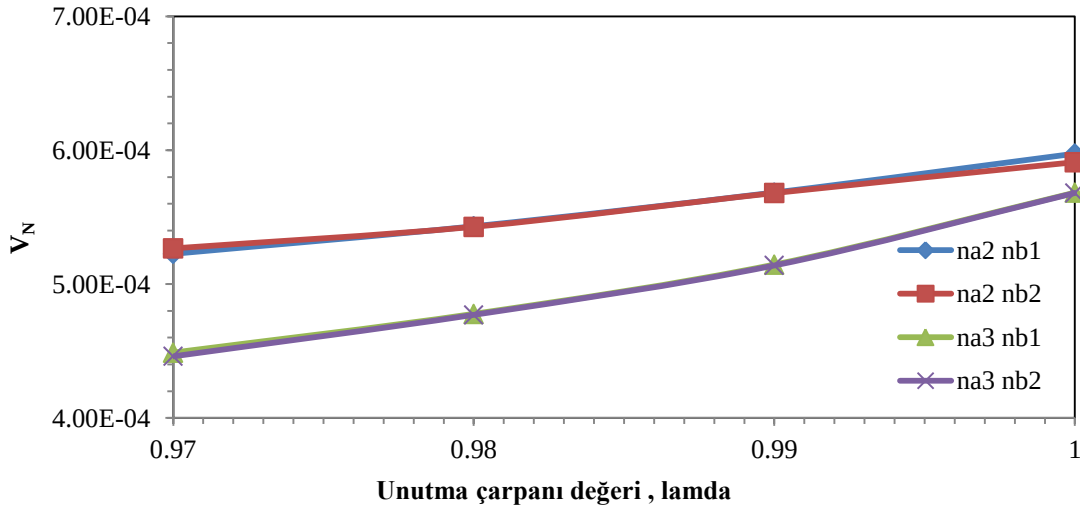
Kestirim performans kriterleri		Mertebeler							
		na=2, nb=1		na=2, nb=2		na=3, nb=1		na=3, nb=2	
λ	P	V_N	M	V_N	M	V_N	M	V_N	M
0.96	1	0.010	$3.01 \cdot 10^{-4}$	$1.58 \cdot 10^{23}$	$-1.76 \cdot 10^6$	0.0048	$1.94 \cdot 10^{-4}$	$4.20 \cdot 10^{14}_5$	$1.66 \cdot 10^{69}$
	10	$6.07 \cdot 10^{-4}$	$2.66 \cdot 10^{-5}$	$5.99 \cdot 10^{133}$	$-6.79 \cdot 10^{63}$	$4.76 \cdot 10^{-4}$	$1.08 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{30}_8$	$1.01 \cdot 10^{151}$
	100	$5.07 \cdot 10^{-4}$	$-1.72 \cdot 10^{-7}$	$6.58 \cdot 10^{157}$	$6.97 \cdot 10^{75}$	$4.27 \cdot 10^{-4}$	$-6.99 \cdot 10^{-6}$	$8.79 \cdot 10^{20}_9$	$3.48 \cdot 10^{101}$
	1000	$5.037 \cdot 10^{-4}$	$-2.56 \cdot 10^{-6}$	$1.70 \cdot 10^{226}$	$-5.08 \cdot 10^{109}$	$4.23 \cdot 10^{-4}$	$-8.86 \cdot 10^{-6}$	$8.15 \cdot 10^{20}_0$	$-4.40 \cdot 10^{97}$
0.97	1	0.0105	$3.158 \cdot 10^{-4}$	0.0110	$3.14 \cdot 10^{-4}$	0.0049	$2.02 \cdot 10^{-4}$	0.0049	$2.02 \cdot 10^{-4}$
	10	$6.30 \cdot 10^{-4}$	$2.02 \cdot 10^{-5}$	$7.64 \cdot 10^{-4}$	$2.28 \cdot 10^{-5}$	$5.04 \cdot 10^{-4}$	$4.36 \cdot 10^{-6}$	$4.99 \cdot 10^{-4}$	$7.26 \cdot 10^{-6}$
	100	$5.26 \cdot 10^{-4}$	$-8.75 \cdot 10^{-6}$	$5.23 \cdot 10^{-4}$	$-5.07 \cdot 10^{-6}$	$4.54 \cdot 10^{-4}$	$-1.46 \cdot 10^{-5}$	$4.53 \cdot 10^{-4}$	$-1.65 \cdot 10^{-5}$
	1000	$5.23 \cdot 10^{-4}$	$-1.08 \cdot 10^{-5}$	$5.27 \cdot 10^{-4}$	$-1.50 \cdot 10^{-5}$	$4.49 \cdot 10^{-4}$	$-1.61 \cdot 10^{-5}$	$4.46 \cdot 10^{-4}$	$-1.32 \cdot 10^{-5}$
0.98	1	0.0109	$3.33 \cdot 10^{-4}$	0.0109	$3.30 \cdot 10^{-4}$	0.0051	$2.10 \cdot 10^{-4}$	0.0051	$2.06 \cdot 10^{-4}$
	10	$6.54 \cdot 10^{-4}$	$1.15 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	$1.11 \cdot 10^{-5}$	$5.34 \cdot 10^{-4}$	$-5.85 \cdot 10^{-6}$	$5.34 \cdot 10^{-4}$	$-8.12 \cdot 10^{-6}$
	100	$5.47 \cdot 10^{-4}$	$-2.03 \cdot 10^{-5}$	$5.46 \cdot 10^{-4}$	$-2.04 \cdot 10^{-5}$	$4.83 \cdot 10^{-4}$	$-2.67 \cdot 10^{-5}$	$4.82 \cdot 10^{-4}$	$-2.88 \cdot 10^{-5}$
	1000	$5.43 \cdot 10^{-4}$	$-2.25 \cdot 10^{-5}$	$5.43 \cdot 10^{-4}$	$-2.25 \cdot 10^{-5}$	$4.78 \cdot 10^{-4}$	$-2.76 \cdot 10^{-5}$	$4.77 \cdot 10^{-4}$	$-2.98 \cdot 10^{-5}$
0.99	1	0.0113	$3.55 \cdot 10^{-4}$	0.0113	$3.48 \cdot 10^{-4}$	0.0053	$2.17 \cdot 10^{-4}$	0.0053	$2.09 \cdot 10^{-4}$
	10	$6.84 \cdot 10^{-4}$	$-1.48 \cdot 10^{-6}$	$6.84 \cdot 10^{-4}$	$-2.51 \cdot 10^{-6}$	$5.75 \cdot 10^{-4}$	$-2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.74 \cdot 10^{-4}$	$-2.50 \cdot 10^{-5}$
	100	$5.72 \cdot 10^{-4}$	$-3.63 \cdot 10^{-5}$	$5.71 \cdot 10^{-4}$	$-3.65 \cdot 10^{-5}$	$5.20 \cdot 10^{-4}$	$-4.49 \cdot 10^{-5}$	$5.19 \cdot 10^{-4}$	$-4.75 \cdot 10^{-5}$
	1000	$5.68 \cdot 10^{-4}$	$-3.90 \cdot 10^{-5}$	$5.68 \cdot 10^{-4}$	$-3.91 \cdot 10^{-5}$	$5.15 \cdot 10^{-4}$	$-4.59 \cdot 10^{-5}$	$5.14 \cdot 10^{-4}$	$-4.85 \cdot 10^{-5}$
1	1	0.0118	$3.77 \cdot 10^{-4}$	0.0118	$3.47 \cdot 10^{-4}$	0.0056	$2.04 \cdot 10^{-4}$	0.0056	$1.76 \cdot 10^{-4}$
	10	$7.16 \cdot 10^{-4}$	$-5.33 \cdot 10^{-5}$	$7.16 \cdot 10^{-4}$	$-5.64 \cdot 10^{-5}$	$6.27 \cdot 10^{-4}$	$-9.62 \cdot 10^{-5}$	$6.27 \cdot 10^{-4}$	$-1.02 \cdot 10^{-4}$
	100	$6.01 \cdot 10^{-4}$	$-9.36 \cdot 10^{-5}$	$6.00 \cdot 10^{-4}$	$-9.41 \cdot 10^{-5}$	$5.74 \cdot 10^{-4}$	$-1.25 \cdot 10^{-4}$	$5.74 \cdot 10^{-4}$	$-1.28 \cdot 10^{-4}$
	1000	$5.97 \cdot 10^{-4}$	$-9.66 \cdot 10^{-5}$	$5.91 \cdot 10^{-4}$	$-9.67 \cdot 10^{-5}$	$5.68 \cdot 10^{-4}$	$-1.25 \cdot 10^{-4}$	$5.68 \cdot 10^{-4}$	$-1.29 \cdot 10^{-4}$

- Unutmaya çarpanı etkisi

Sistem tanımlama ve GMV kontrol yöntemi içerisinde yer alan Yinelemeli En Küçük Kareler (YEKK) yönteminde en uygun model parametrelerinin kestirim performansına

etki eden unutma çarpanı (λ) kriteri bulunmaktadır. Unutma çarpanı YEKK yönteminde kaç verinin hesaba katılacağına göstergesi olup 0.90 - 1.0 değişmektedir. Düşük λ değerleri uzak kestirim ve uzun süreli hesaplama getirirken, yüksek λ değerleri çok fazla hesap yükü getireceğinden tercih edilmemektedir. Unutma çarpanı, kontrol performansını geliştirmek üzere ayar parametresi olarak kullanılmaktadır. Kontrol çalışmalarının başında sistemde en uygun unutma çarpanı değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada seçilen λ değer aralığı 0.96 – 1 arasında değişmektedir. Çizelge 5.10'dan görüldüğü üzere $n_a=2$ $n_b=2$ ve $n_a=3$ $n_b=2$ mertebelerinde λ değerinin 0.96 olduğu durumda değerler çok yüksek çıkmıştır. Bu durumun uzak kestirimden kaynaklandığı düşünülmektedir. λ değeri 0.97 sonrasında ise V_N değerlerinde artma gözlenmektedir.

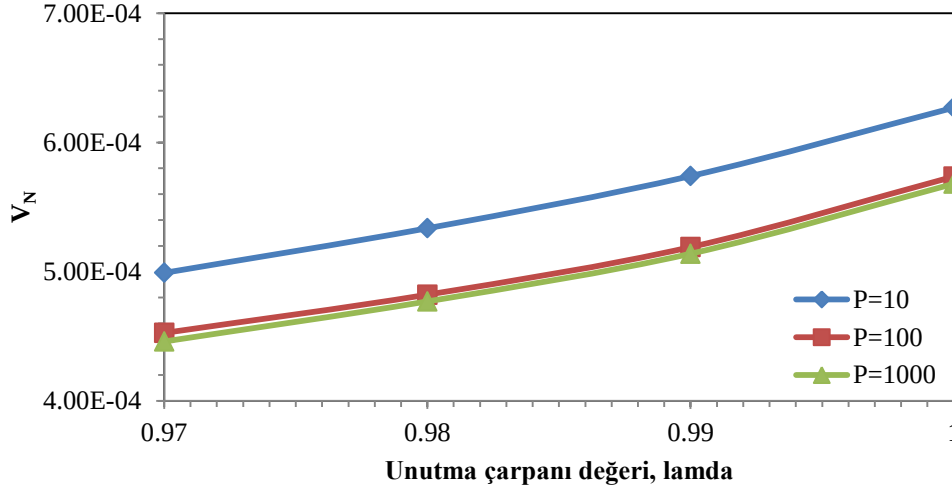
En iyi performans gösteren unutma çarpanı değerinin belirlenmesi için sabit $P=1000$ değerinde ve farklı mertebelerde, unutma çarpanının maliyet fonksiyonu ile değişimi Şekil 5.54'te verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde $\lambda=0.97$ iken ulaşılmıştır.



Şekil 5.54 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $P=1000$ iken λ 'nın V_N ile değişimi

En iyi performans gösteren unutma çarpanı değerinin belirlenmesi için sabit $n_a=3$ $n_b=2$ değerinde ve farklı kovaryans matris başlangıç değerlerinde, unutma çarpanının maliyet

fonksiyonu ile değişimi Şekil 5.55’te verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $\lambda=0.97$ ve $P=1000$ değerinde ulaşılmıştır.



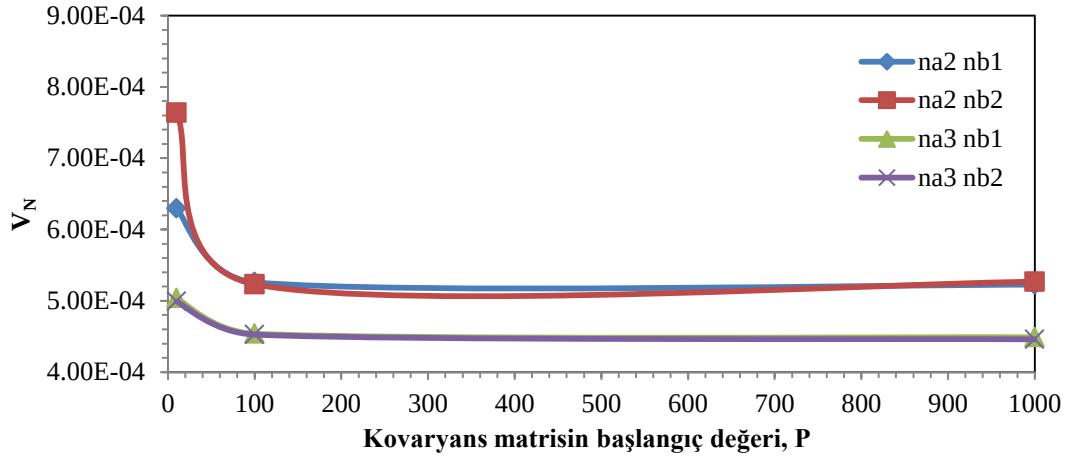
Şekil 5.55 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı P değerlerinde, $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde iken λ 'nın V_N ile değişimi

- Kovaryans matrisin başlangıç değerinin etkisi

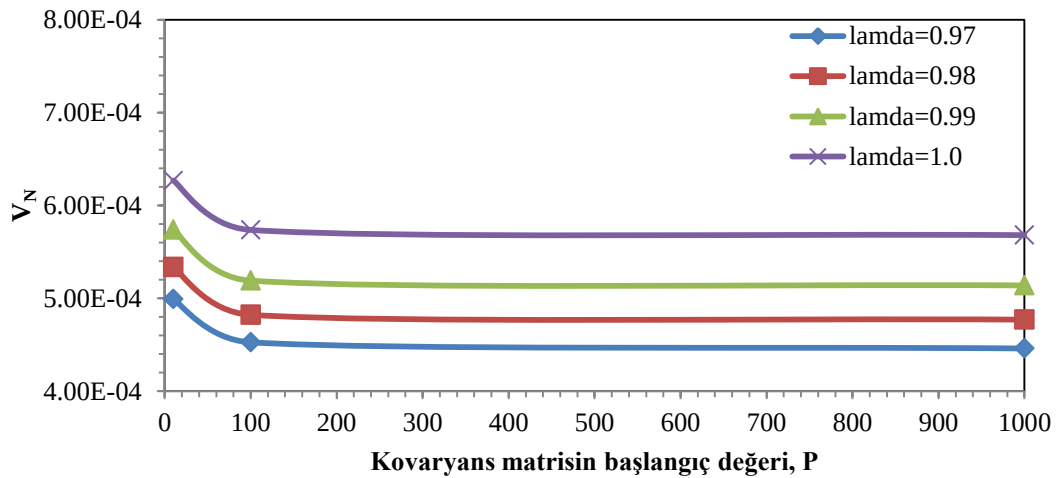
Sistem tanımlama ve GMV kontrol yöntemi içerisinde yer alan Yinelemeli En Küçük Kareler (YEKK) yönteminde en uygun model parametrelerinin kestirim performansına etki eden kovaryans matrisin başlangıç değerinin (P) kriteri bulunmaktadır. Unutma çarpanı değerinin 1-10000 arasında değişmektedir. Düşük P değeri V_N değerini büyüttüğünden, yüksek P değeri ise çok fazla hesap yükü getirdiğinden istenmeyen değerlerdir. Bu çalışma için aralık 1-1000 arasında seçilmiştir. Çizelgeden 5.10' dan görüldüğü üzere unutma çarpanının arttığı ve model mertebesinin azaldığı durumlarda V_N değerlerinde artma gözlenmektedir.

En iyi performans gösteren kovaryans matrisin başlangıç değerinin belirlenmesi için sabit $\lambda = 0.97$ değerinde ve farklı mertebelerde, kovaryans matrisin başlangıç değerinin maliyet fonksiyonu ile değişimi şekil 5.56'da verilmiştir. Şekil 5.56'dan görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $P=1000$ ve $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde ulaşılmıştır. Şekil 5.57'de ise sabit $n_a=3$ $n_b=2$ değerinde ve farklı unutma çarpanı değerlerinde, kovaryans

matrisin başlangıç değerinin maliyet fonksiyonu ile değişimi görülmektedir. Şekilden görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $P=1000$ ve $\lambda=0.97$ unutma çarpanı değerinde ulaşılmıştır.



Şekil 5.56 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $\lambda=0.97$ iken P 'nin V_N ile değişimi

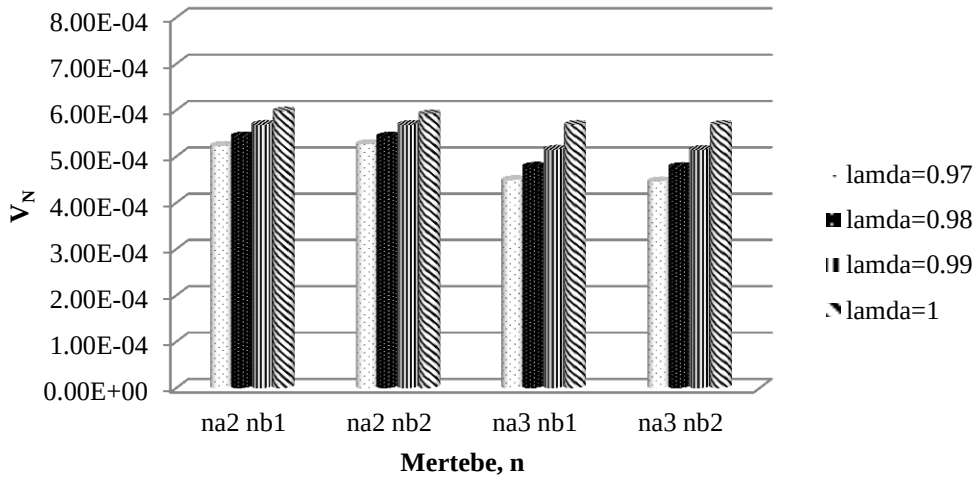


Şekil 5.57 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı λ değerlerinde, $na=3$ $nb=2$ mertebesinde iken P 'nin V_N ile değişimi

- Model mertebesinin etkisi

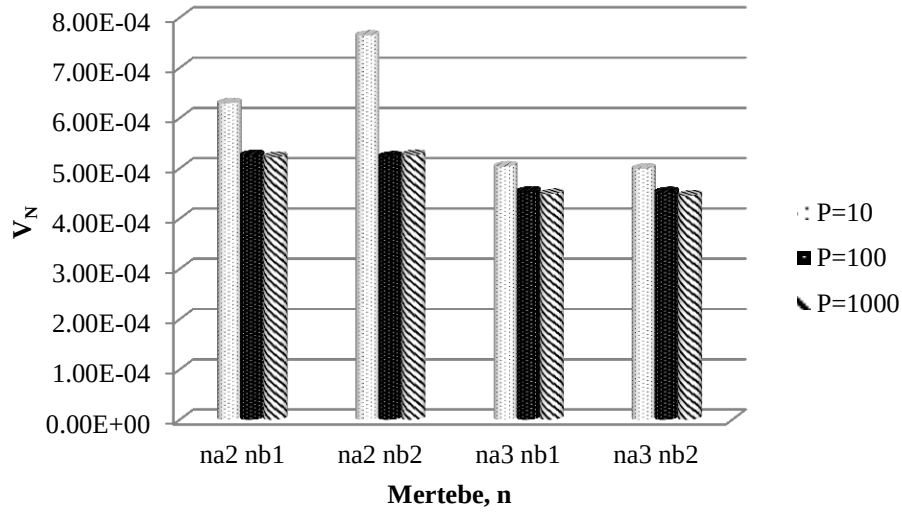
Sistem tanımlama ve GMV kontrol yöntemi içerisinde yer alan Yinelemeli En Küçük Kareler (YEKK) yönteminde model mertebesi, en uygun model parametrelerinin

kestirim performans kriterlerinden biridir. Model mertebesinin anlamlı bir parametrik model oluşturmak için derecesinin yüksek olmaması gerekmektedir. Hatta model mertebeleri artarken V_N değerlerinde kayda değer değişimler olmadığında düşük mertebeli modeller tercih edilebilmektedir. Bu çalışma için $na_2nb_1, na_2nb_2, na_3nb_1, na_3nb_2$ olmak üzere 4 farklı model mertebesinde kestirim gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.10’ dan görüldüğü üzere model mertebesinin arttığı durumlarda V_N değerlerinde azalma gözlenmektedir.



Şekil 5.58 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı unutma çarpanı değerlerinde, $P=1000$ iken n ’nin V_N ile değişimi

En iyi performans gösteren model mertebesinin belirlenmesi için sabit $P=1000$ değerinde ve farklı unutma çarpanı değerlerinde, mertebenin maliyet fonksiyonu ile değişimi şekil 5.58’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en düşük V_N değerine λ ’nın 0.97 olduğu durumda $na=3$ $nb=2$ mertebesinde ulaşılmıştır. Şekil 5.59’da ise sabit $\lambda=0.97$ değerinde ve farklı kovaryans matris başlangıç değerlerinde, mertebenin maliyet fonksiyonu ile değişimi görülmektedir. Şekil 5.58’den görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $\lambda=0.97$ ve $na=3$ $nb=2$ mertebe durumunda ulaşılmıştır.

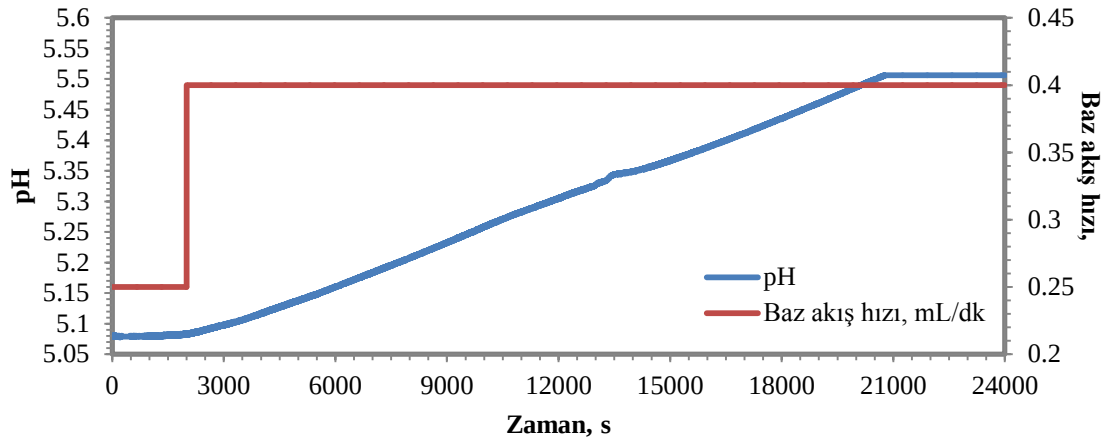


Şekil 5.59 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı kovaryans matris başlangıç değerinde, $\lambda = 0.97$ iken n 'nin V_N ile değişimi

5.4.2.5.2 Mikroorganizmalı ortamda sistemin parametrik modelinin belirlenmesi

Mikroorganizmalı besi ortamında baz akış hızına pozitif basamak etki verilerek YEKK algoritmasında kullanılacak olan deney verileri elde edilmiştir. Zamanla pH değişimi şekil 5.60'da verilmiştir.

Ayar değişkeni olan baz akış hızı ve kontrollü değişken pH'ın zamanla değişim verileri ile en uygun ARMAX modelin bulunması amacıyla farklı unutma çarpanı (0.96-1), kovaryans matrisin başlangıç değeri (1,10,100,1000) ve model mertebelerinde ($na_2nb_1, na_2nb_2, na_3nb_1, na_3nb_2$) YEKK algoritması çalıştırılmış ve en uygun ARMAX model yapısının bulunması için karşılaştırma hata kareleri toplamı (V_N) ve ortalama (M) değerlerine göre yapılmıştır. Kestirim performansı açısından karşılaştırılan değerler çizelge 5.11'de verilmiştir.



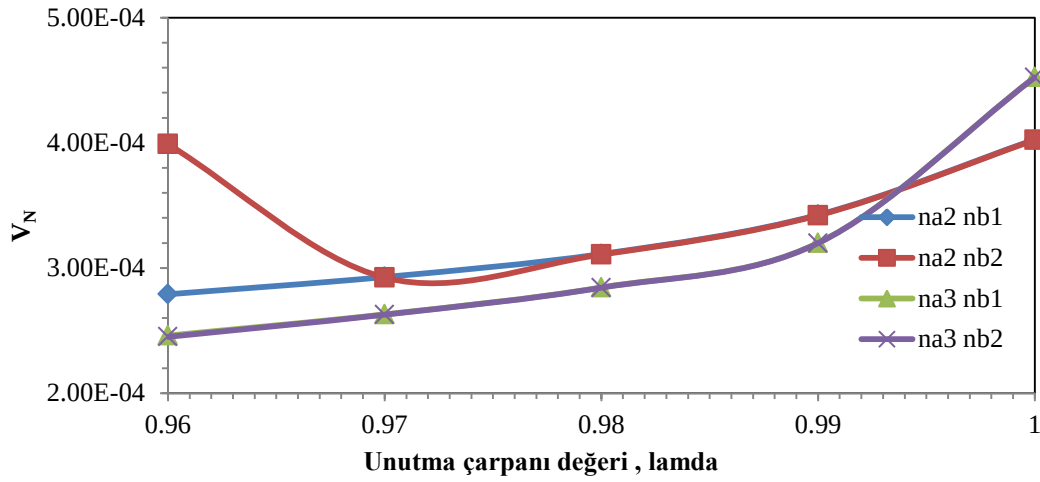
Şekil 5.60 Mikroorganizmalı ortamda pH 5.1 değerinde 0.075 mL/min sabit asit akış 0.25 mL/min sabit baz akış hızında hızında yatışkın koşullarda işletilen sistemde baz akış hızına 0.25 mL/min'den 0.4 mL/min'e verilen pozitif etki durumunda sistemin cevabı

Çizelge 5.11 Mikroorganizmalı ortamda baz akış hızına 0.25 mL/min'den 0.4 mL/min'e pozitif basamak etki verilmesi sonucunda kestirim performans kriterleri

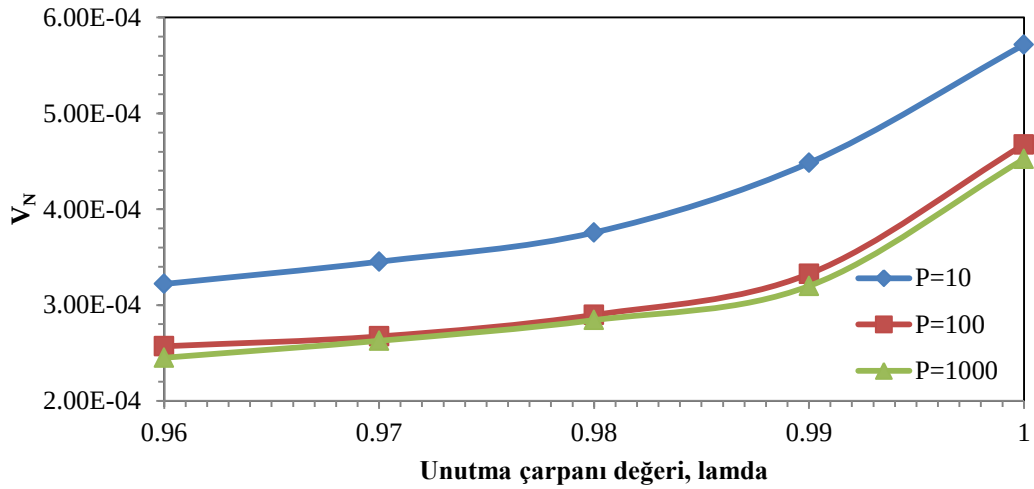
Kestirim performans kriterleri		Mertebeleer							
		na=2, nb=1		na=2, nb=2		na=3, nb=1		na=3, nb=2	
λ	α	V_N	M	V_N	M	V_N	M	V_N	M
0.96	1	0.0136	$4.27 \cdot 10^{-4}$	0.0136	$4.18 \cdot 10^{-4}$	0.0063	$3.06 \cdot 10^{-4}$	0.0063	$2.96 \cdot 10^{-4}$
	10	$4.20 \cdot 10^{-4}$	$4.46 \cdot 10^{-5}$	$4.18 \cdot 10^{-4}$	$5.0790 \cdot 10^{-5}$	$3.25 \cdot 10^{-4}$	$4.79 \cdot 10^{-5}$	$3.22 \cdot 10^{-4}$	$5.49 \cdot 10^{-5}$
	100	$2.82 \cdot 10^{-4}$	$7.91 \cdot 10^{-6}$	$2.77 \cdot 10^{-4}$	$2.29 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	$2.23 \cdot 10^{-5}$	$2.57 \cdot 10^{-4}$	$1.94 \cdot 10^{-5}$
	1000	$2.79 \cdot 10^{-4}$	$4.34 \cdot 10^{-6}$	$3.99 \cdot 10^{-4}$	$1.43 \cdot 10^{-6}$	$2.46 \cdot 10^{-4}$	$1.92 \cdot 10^{-5}$	$2.45 \cdot 10^{-4}$	$2.72 \cdot 10^{-5}$
0.97	1	0.0141	$4.41 \cdot 10^{-4}$	0.0141	$4.22 \cdot 10^{-4}$	0.0066	$3.22 \cdot 10^{-4}$	0.0066	$3.07 \cdot 10^{-4}$
	10	$4.24 \cdot 10^{-4}$	$4.11 \cdot 10^{-5}$	$4.42 \cdot 10^{-4}$	$4.16 \cdot 10^{-5}$	$3.46 \cdot 10^{-4}$	$5.05 \cdot 10^{-5}$	$3.45 \cdot 10^{-4}$	$5.09 \cdot 10^{-5}$
	100	$2.96 \cdot 10^{-4}$	$4.98 \cdot 10^{-6}$	$2.95 \cdot 10^{-4}$	$9.49 \cdot 10^{-6}$	$2.68 \cdot 10^{-4}$	$2.51 \cdot 10^{-5}$	$2.67 \cdot 10^{-4}$	$2.87 \cdot 10^{-5}$
	1000	$2.93 \cdot 10^{-4}$	$1.66 \cdot 10^{-6}$	$2.92 \cdot 10^{-4}$	$6.76 \cdot 10^{-6}$	$2.63 \cdot 10^{-4}$	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.63 \cdot 10^{-4}$	$2.61 \cdot 10^{-5}$
0.98	1	0.0146	$4.54 \cdot 10^{-4}$	0.0147	$4.15 \cdot 10^{-4}$	0.0068	$3.36 \cdot 10^{-4}$	0.0069	$3.08 \cdot 10^{-4}$
	10	$4.71 \cdot 10^{-4}$	$3.19 \cdot 10^{-5}$	$4.76 \cdot 10^{-4}$	$2.96 \cdot 10^{-5}$	$3.74 \cdot 10^{-4}$	$4.99 \cdot 10^{-5}$	$3.76 \cdot 10^{-4}$	$4.78 \cdot 10^{-5}$
	100	$3.15 \cdot 10^{-4}$	$-1.34 \cdot 10^{-6}$	$3.14 \cdot 10^{-4}$	$2.86 \cdot 10^{-6}$	$2.90 \cdot 10^{-4}$	$2.61 \cdot 10^{-5}$	$2.90 \cdot 10^{-4}$	$2.95 \cdot 10^{-5}$
	1000	$3.11 \cdot 10^{-4}$	$-3.86 \cdot 10^{-6}$	$3.11 \cdot 10^{-4}$	$1.60 \cdot 10^{-6}$	$2.84 \cdot 10^{-4}$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	$2.84 \cdot 10^{-4}$	$2.76 \cdot 10^{-5}$
0.99	1	0.0152	$4.71 \cdot 10^{-4}$	0.0153	$3.95 \cdot 10^{-4}$	0.0071	$3.21 \cdot 10^{-4}$	0.0072	$2.66 \cdot 10^{-4}$
	10	$5.18 \cdot 10^{-4}$	$1.13 \cdot 10^{-4}$	$5.34 \cdot 10^{-4}$	$3.49 \cdot 10^{-6}$	$4.42 \cdot 10^{-4}$	$1.72 \cdot 10^{-5}$	$4.48 \cdot 10^{-4}$	$1.06 \cdot 10^{-5}$
	100	$3.48 \cdot 10^{-4}$	$-1.28 \cdot 10^{-5}$	$3.47 \cdot 10^{-4}$	$-9.30 \cdot 10^{-6}$	$3.33 \cdot 10^{-4}$	$1.92 \cdot 10^{-5}$	$3.32 \cdot 10^{-4}$	$2.19 \cdot 10^{-5}$
	1000	$3.42 \cdot 10^{-4}$	$-1.25 \cdot 10^{-5}$	$3.42 \cdot 10^{-4}$	$-6.54 \cdot 10^{-6}$	$3.20 \cdot 10^{-4}$	$2.44 \cdot 10^{-5}$	$3.20 \cdot 10^{-4}$	$2.92 \cdot 10^{-5}$
1	1	0.0158	$5.42 \cdot 10^{-4}$	0.0161	$3.41 \cdot 10^{-4}$	0.0075	$4.00 \cdot 10^{-4}$	0.0076	$2.55 \cdot 10^{-4}$
	10	$5.88 \cdot 10^{-4}$	$-8.55 \cdot 10^{-6}$	$6.30 \cdot 10^{-4}$	$-3.09 \cdot 10^{-5}$	$5.56 \cdot 10^{-4}$	$1.91 \cdot 10^{-7}$	$5.72 \cdot 10^{-4}$	$-1.93 \cdot 10^{-5}$
	100	$4.07 \cdot 10^{-4}$	$-1.69 \cdot 10^{-5}$	$4.02 \cdot 10^{-4}$	$-1.46 \cdot 10^{-5}$	$4.68 \cdot 10^{-4}$	$-1.34 \cdot 10^{-5}$	$4.67 \cdot 10^{-4}$	$-1.24 \cdot 10^{-5}$

- **Unutma çarpanı etkisi**

Mikroorganizmalı ortamda yapılan deney sistemi için seçilen λ değer aralığı 0.96 – 1 arasında değişmektedir. Çizelgeden görüldüğü üzere λ değeri 0.96 sonrasında V_N değerlerinde artma gözlenmektedir. En iyi performans gösteren unutma çarpanı değerinin belirlenmesi için sabit $P=1000$ değerinde ve farklı mertebelerde, unutma çarpanının maliyet fonksiyonu ile değişimi şekil 5.61’de verilmiştir. Şekil 5.61’den, en düşük V_N değerine $na=3$ $nb=2$ mertebesinde $\lambda=0.96$ iken ulaşılmıştır.



Şekil 5.61 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $P=1000$ iken λ 'nın V_N ile değişimi



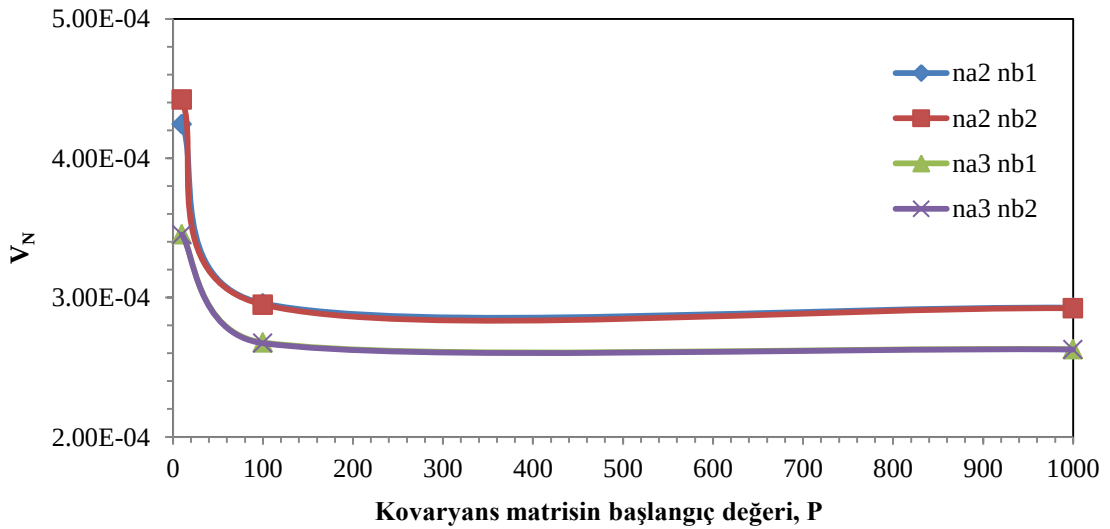
Şekil 5.62 Mikroorganizmalı ortam verileri ile gerçekleştirilen kestirim için farklı P değerlerinde, $na=3$ $nb=2$ mertebesinde iken λ 'nın V_N ile değişimi

En iyi performans gösteren unutma çarpanı değerinin belirlenmesi için sabit $n_a=3$ $n_b=2$ değerinde ve farklı kovaryans matris başlangıç değerlerinde, unutma çarpanının maliyet fonksiyonu ile değişimi şekil 5.62’de verilmiştir. Şekil 5.62’den görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $\lambda=0.96$ ve $P=1000$ değerinde ulaşılmıştır.

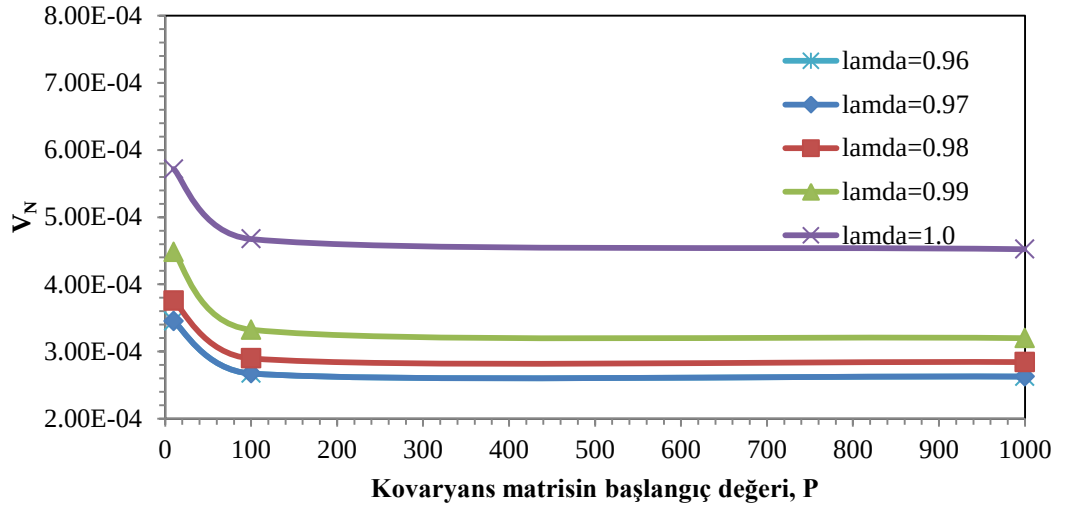
- **Kovaryans matrisin başlangıç değerinin etkisi**

Mikroorganizmalı ortamda yapılan çalışma için aralık 1-1000 arasında seçilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere unutma çarpanının ve model mertebesinin arttığı durumlarda V_N değerlerinde artma gözlenmektedir.

En iyi performans gösteren kovaryans matrisin başlangıç değerinin belirlenmesi için sabit $\lambda =0.96$ değerinde ve farklı mertebelerde, kovaryans matrisin başlangıç değerinin maliyet fonksiyonu ile değişimi şekil 5.63’ te verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $P=1000$ ve $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde ulaşılmıştır. Şekil 5.64’te ise sabit $n_a=3$ $n_b=2$ değerinde ve farklı unutma çarpanı değerlerinde, kovaryans matrisin başlangıç değerinin maliyet fonksiyonu ile değişimi görülmektedir. Şekilden görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $P=1000$ ve $\lambda =0.96$ unutma çarpanı değerinde ulaşılmıştır.



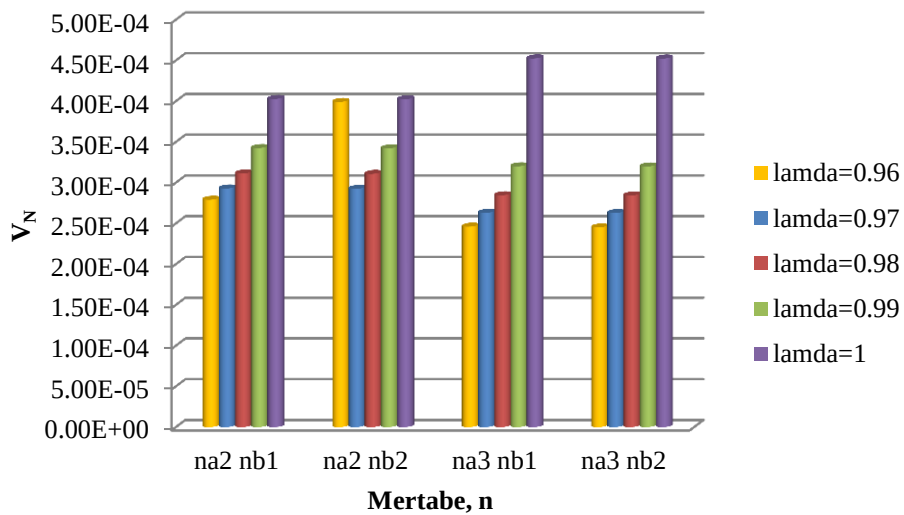
Şekil 5.63 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı model mertebelerinde, $\lambda =0.96$ iken P’nin V_N ile değişimi



Şekil 5.64 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı λ değerlerinde, $n_a=3$ $n_b=2$ mertebesinde iken P'nin V_N ile değişimi

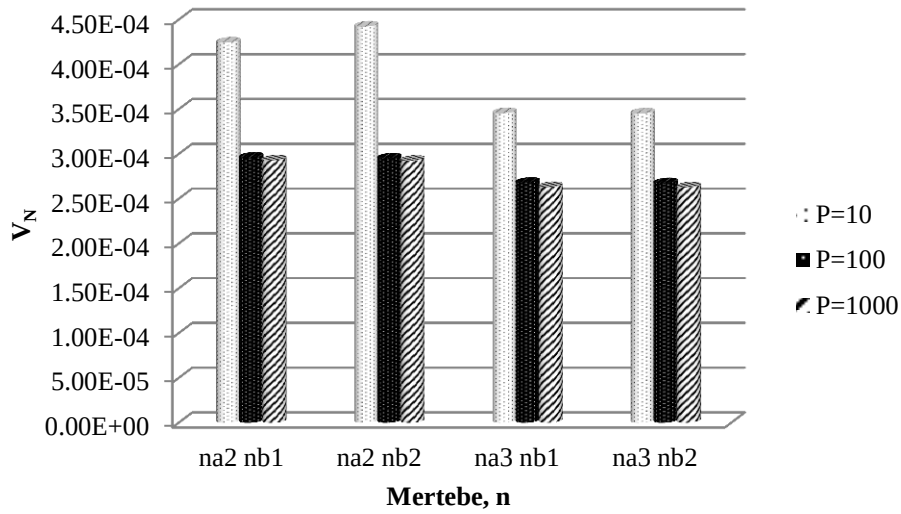
- Model mertebesinin etkisi

Mikroorganizmalı ortamda yapılan çalışmada $na_2nb_1, na_2nb_2, na_3nb_1, na_3nb_2$ olmak üzere 4 farklı model mertebesinde kestirim gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.11' den görüldüğü üzere model mertebesinin arttığı durumlarda V_N değerlerinde azalma gözlenmektedir.



Şekil 5.65 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı unutma çarpanı değerlerinde, $P=1000$ iken n'nin V_N ile değişimi

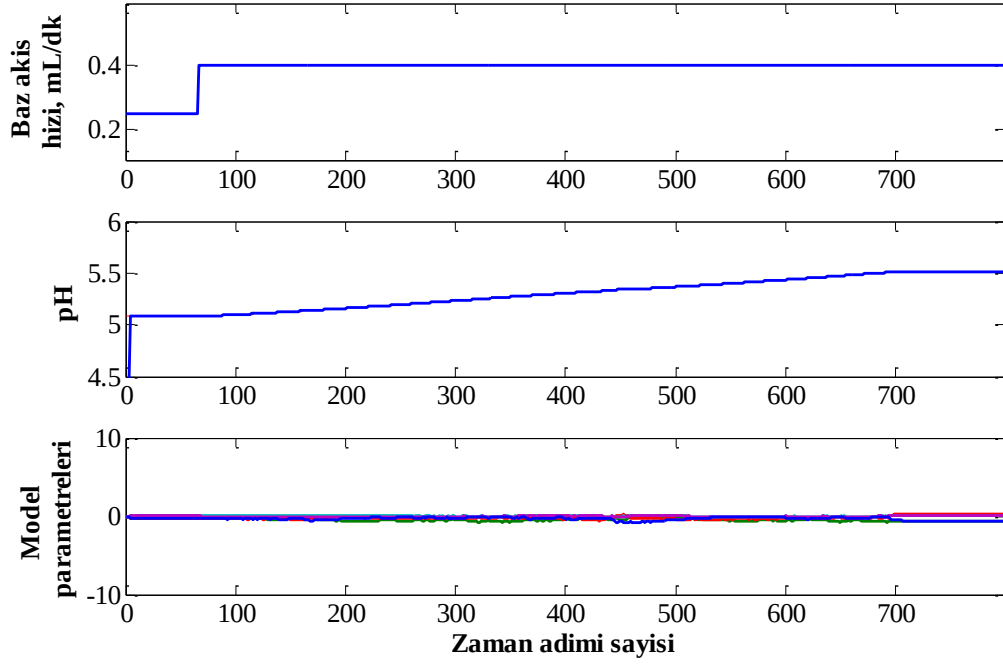
En iyi performans gösteren model mertebesinin belirlenmesi için sabit $P=1000$ değerinde ve farklı unutma çarpanı değerlerinde, mertebenin maliyet fonksiyonu ile değişimi şekil 5.65'te verilmiştir. Şekil 5.65'ten görüldüğü üzere en düşük V_N değerine lamdanın 0.96 olduğu durumda $na=3$ $nb=2$ mertebesinde ulaşılmıştır. Şekil 5.66' da ise sabit $\lambda =0.96$ değerinde ve farklı kovaryans matris başlangıç değerlerinde, mertebenin maliyet fonksiyonu ile değişimi görülmektedir. Şekil 5.66'dan görüldüğü üzere en düşük V_N değerine $\lambda =0.96$ ve $na=3$ $nb=2$ mertebe durumunda ulaşılmıştır.



Şekil 5.66 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen verilerle gerçekleştirilen kestirim için farklı P değerinde, $\lambda =0.96$ iken n 'nin V_N ile değişimi

Mikroorganizmalı ortamın deney verileri ile gerçekleştirilen sistem tanımlama çalışmaları mikroorganizmasız ortamda yapılandan çok daha düşük V_N değerine ulaşmıştır. En iyi performans gösteren ARMAX modele unutma çarpanının 0.96, kovaryans matris değerinin 1000 ve mertebenin $na=3$ $nb=2$ olduğu durumda ulaşılmıştır. Sistemi tanımlayan ARMAX model eşitlik 5.3'te, YEKK kestirimi ise Şekil 5.67'de verilmiştir.

$$y(t) - 0.5686y(t-1) - 0.6675y(t-2) + 0.2453y(t-3) = 0.1071u(t-1) + 0.0194u(t-2) + e(t-1) \quad (5.3)$$



Şekil 5.67 Biyohidrojen üretiminde deneysel sistem tanımlamada basamak etki, $n_a=3$ $n_b=2$, $\lambda=0.96$, $P=1000$

5.5 Biyoreaktörde pH Kontrol Çalışmaları

C. butyricum ve *E. aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı kesikli bir biyoreaktörde pH kontrolüne yönelik yapılan çalışmada teorik olarak iki farklı kontrol yöntemi uygulanmıştır. Bunlardan ilki PID kontrol diğeri ise GMV kontrol yöntemleridir. Önceki bölümlerde anlatıldığı üzere biyoreaktörün işletim şartları belirlenerek ayar değişkeni olarak baz akışı hızı seçilmiş ve baz akış hızının çıkış değişkeni olan pH değerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Teorik çalışmalarda MATLAB’da yazılmış olan program kullanılmış, kullanılan programlar EK2-3’te verilmiştir.

5.5.1 Teorik PID kontrol çalışmaları

5.5.1.1 PID parametrelerinin hesaplanması

Biyoreaktörde PID ile pH kontrolünde, kontrol parametrelerinin bulunması amacıyla Cohen Coon ve deneme yanılma yöntemleri kullanılmıştır. Mikroorganizmalı ve mikroorganizmasız besi ortamlarında baz akış hızına pozitif basamak etki verilmesi sonrasında çizilen proses reaksiyon eğrisinde, eğri geçirme yöntemi ile elde edilen 1. Mertebe ölü zamanlı sistem model parametreleri K_p , τ ve θ bulunmuş ve bulunan model parametreleri Cohen coon parametre hesaplama yönteminde kullanılarak PID kontrol parametreleri hesaplanmıştır.

Mikroorganizmalı ve mikroorganizmasız besi ortamlarının, eğri geçirme yöntemi ile bulunan model parametreleri ve bulunan model parametrelerinin kullanıldığı Cohen coon ile hesaplanan PID kontrol parametreleri çizelge 5.12’de verilmiştir.

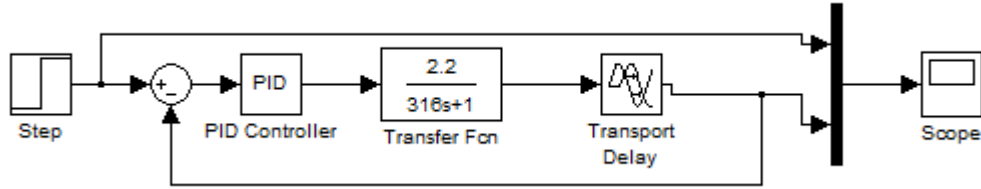
Hesaplanan PID kontrol parametrelerinin pH kontrolünü sağlayabilirliğinin test edilmesi amacıyla Matlab Simulink programında ve Matlab programında yazılan PID kontrol algoritmasında iki farklı şekilde denenmiştir.

Çizelge 5.12 Model parametreleri ve Cohen coon yöntemi ile hesaplanan PID parametreleri

Modeller	Model Parametreleri			Cohen Coon Yöntemi ile hesaplanan PID parametreleri		
	K_p , dk/min	τ , min	θ , min	K_c	τ_I	τ_D
Mikroorganizmasız besi ortamı	1.218	263	33	9.038	78.404	11.903
Mikroorganizmalı besi ortamı	2.2	316	33	5.99	79.05	11.98

5.5.1.2 MATLAB simulink programında PID kontrol

Cohen Coon Parametre Hesaplama Yöntemi ile hesaplanan PID parametreleri Şekil 5.68’de verilen Matlab Simulink programında denenmiş ancak hesaplanan PID parametrelerinin pH kontrolünü gerçekleştiremediği görülmüştür. Bu amaçla deneme yanılma ile PID parametreleri bulunmuştur. Mikroorganizmalı ve mikroorganizmasız besi ortamlarının pH kontrolü için deneme yanılma ile bulunan PID parametreleri çizelge 5.13’te verilmiştir.

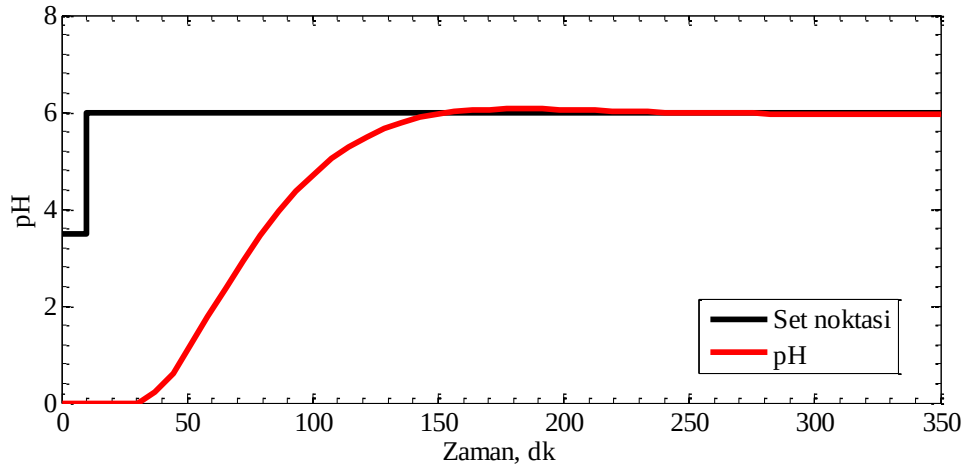


Şekil 5.68 Simulink kapalı devre diyagramı

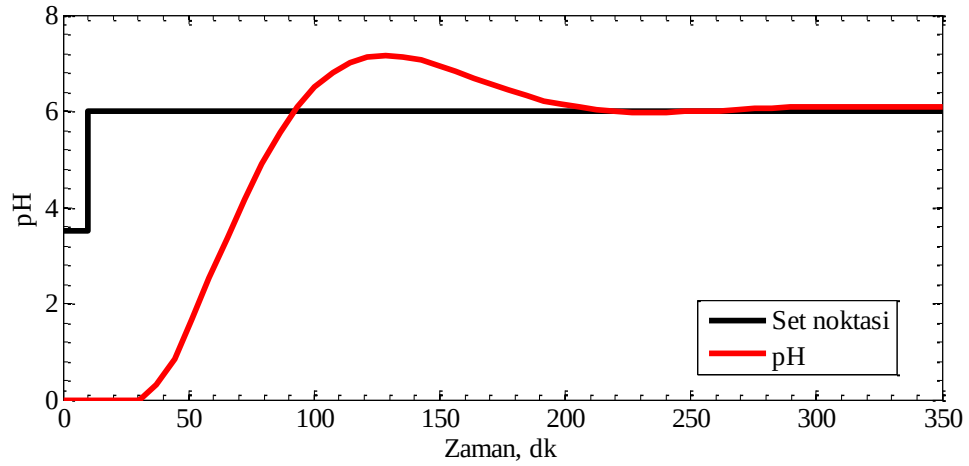
Çizelge 5.13 Deneme yanılma ile hesaplanan PID parametreleri

Modeller	Deneme Yanılma Yöntemi ile hesaplanan PID parametreleri		
	K_c	τ_I	τ_D
Mikroorganizmasız besi ortamı	3.02	0.011	0.001
Mikroorganizmalı besi ortamı	2.82	0.011	0.001

Deneme yanılma parametre belirleme yöntemiyle bulunan PID parametrelerinin pH kontrolünü istenilen set noktasında gerçekleştirdiği görülmüştür (Şekil 5.69 ve 5.70).



Şekil 5.69 Mikroorganizmasız ortam modelinde set noktasına 3.5'ten 6.0'a pozitif basamak etki verilmesi durumunda sistemin PID kontrolü



Şekil 5.70 Mikroorganizmalı ortam modelinde set noktasına 3.5'ten 6.0'a pozitif basamak etki verilmesi durumunda sistemin PID kontrolü

5.5.1.3 MATLAB YEKK algoritmalı PID kontrol

Simulink yardımıyla şekil 5.69 ve 5.70'te PID kontrol ile pH kontrolünün gerçekleşmiş olduğu gözlenmiştir. Ancak ayar değişkeni olan baz akış hızının davranışını gözlemlemek ve hata kareleri toplamı (ISE) ile kontrol performansını değerlendirmek amacıyla, ARMAX model parametrelerinin YEKK algoritması ile güncellendiği PID kontrol programı MATLAB programlama dilinde yazılmıştır. Bu amaçla sistem

tanımlamada mikroorganizmalı ve mikroorganizmasız ortamların en iyi performans gösteren ARMAX modelleri (unutma çarpanının 0.96, kovaryans matris değerinin 1000 ve mertebenin $n_a=3$ $n_b=2$) model parametrelerinin başlangıç değerleri olarak kullanılmıştır. Mikroorganizmalı ortamın modeli eşitlik 5.4'te mikroorganizmasız ortamın modeli eşitlik 5.5'te verilmiştir.

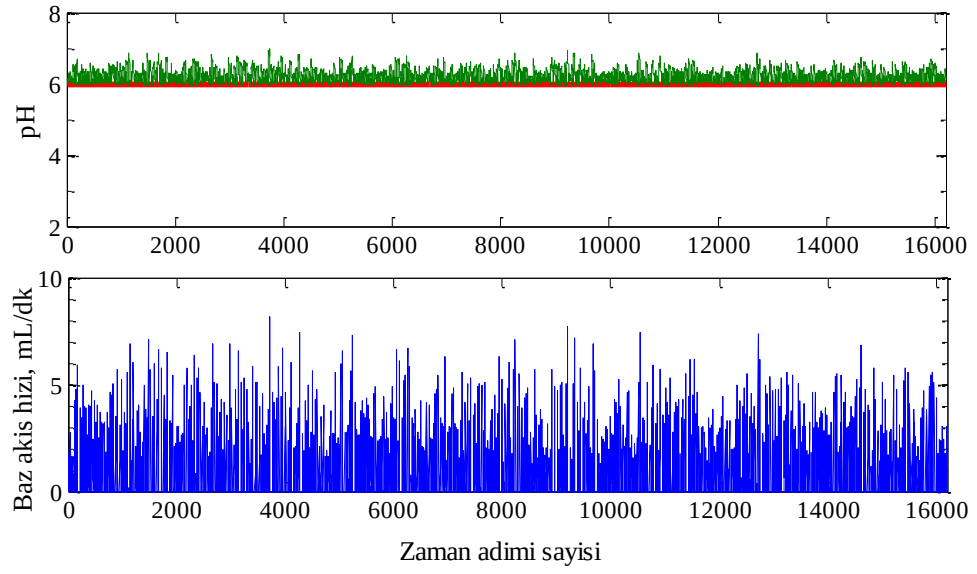
$$y(t) - 0.5686y(t-1) - 0.6675y(t-2) + 0.2453y(t-3) = 0.1071u(t-1) + 0.0194u(t-2) + e(t-1) \quad (4.4)$$

$$y(t) - 0.8922y(t-1) - 0.6556y(t-2) + 0.5560y(t-3) = 0.1002u(t-1) + 0.0132u(t-2) + e(t-1) \quad (4.5)$$

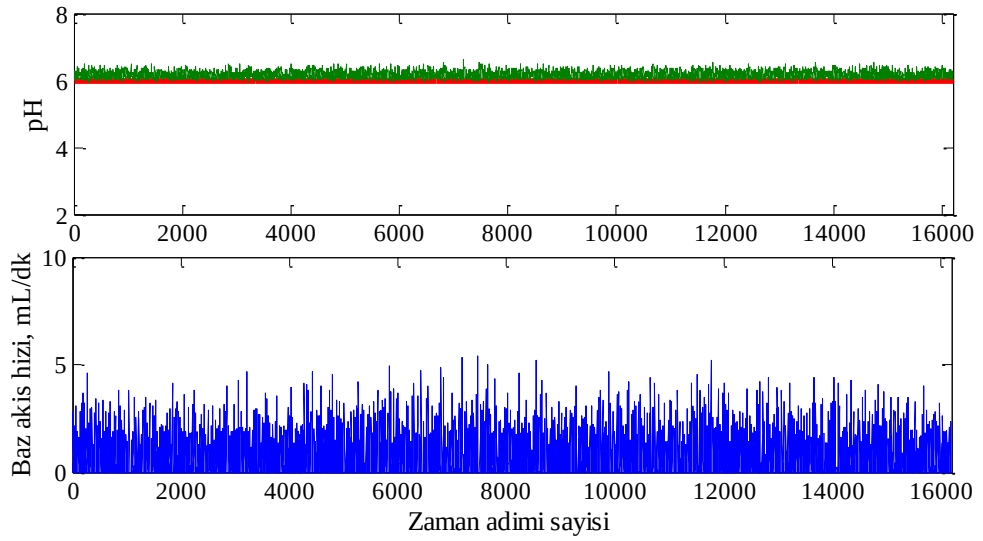
5.5.1.3.1 Mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortam modelinin PID kontrolü

Simulink programına benzer şekilde Cohen coon ile bulunan PID kontrol parametreleri kontrolü sağlayamamıştır. Deneme yanılma ile bulunan PID parametreleri $K_c = 32.80$, $\tau_I = 2.38$ ve $\tau_D = 0.22$ olarak bulunmuş, mikroorganizmasız ortamın ARMAX modeli başlangıç model değerleri olarak kullanılmıştır ve pH kontrol 3 farklı etki altında gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada hem kontrol edicinin gürbüzlüğünün test edilmesi hem de tam bir fermantasyon prosesi boyunca kontrol edicinin davranışının benzetimi amacıyla pH kontrol mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı elde edilen modellerde, 3 farklı etki altında gerçekleştirilmiştir. İlk etki pH değeri 6'da sabit set noktası takibi olarak belirlenmiş ve kontrol edicinin gürbüzlüğü test etmek için gürültü değeri olarak $e=0.015$ seçilmiştir. 16000 s zaman adımı boyunca sabit set noktası pH 6'da gerçekleştirilen mikroorganizmasız ortamın pH kontrol sonucu Şekil 5.71'de mikroorganizmalı ortamın pH kontrol sonucu ise Şekil 5.72'de verilmiştir. ISE değeri ise sırasıyla 491.119 ve 207.4805 olarak hesaplanmıştır.



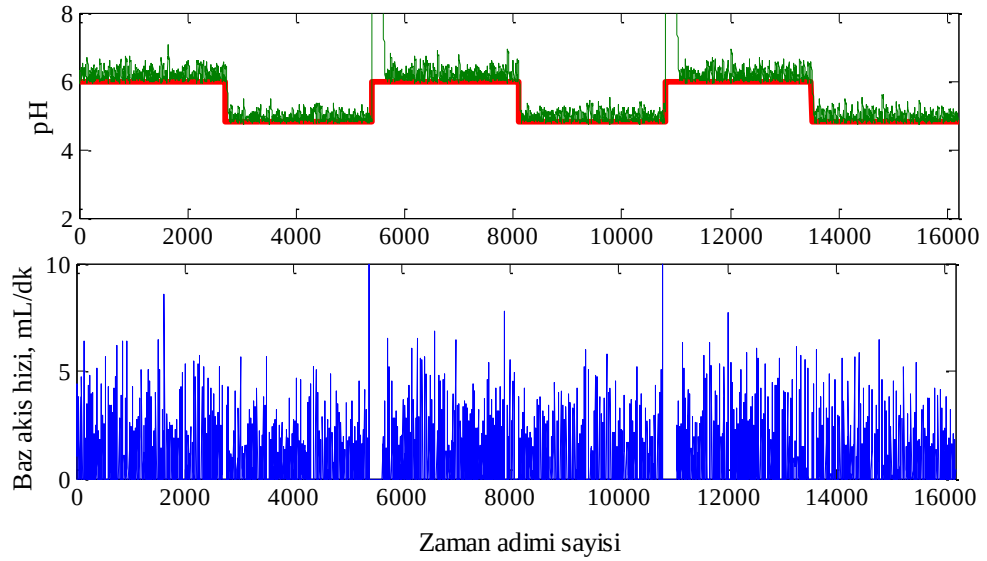
Şekil 5.71 Mikroorganizmasız ortam modelinde sabit set noktalı sistemin Teorik PID kontrolü (ISE=491.119)



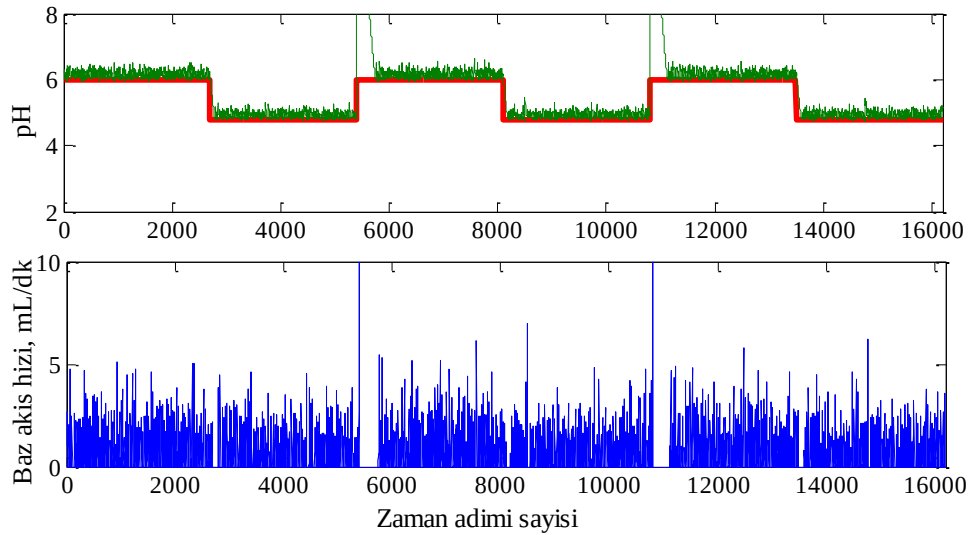
Şekil 5.72 Mikroorganizmalı ortam modelinde sabit set noktalı sistemin Teorik PID kontrolü (ISE=207.4805)

Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen modelin PID ile pH kontrolü, ISE değerine ve ayar değişkeninin davranışına bakıldığında daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Teorik pH'ın PID ile kontrolünde ikinci etki kare etkidir. Gürültü değeri olarak $e=0.015$ seçilmiş ve 16000 s zaman adımı boyunca kare etki altında gerçekleştirilen mikroorganizmasız ortamın pH kontrol sonucu şekil 5.73'te ve mikroorganizmalı ortamın pH kontrolü Şekil 5.74'te verilmiştir. ISE değerleri ise sırasıyla 10073 ve 4629 olarak hesaplanmıştır.



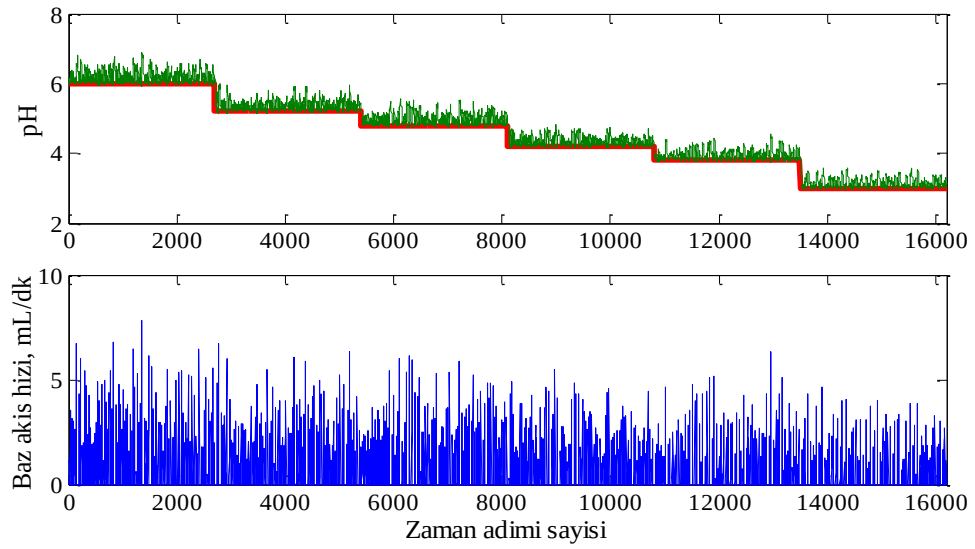
Şekil 5.73 Mikroorganizmasız ortam modelinde kare dalganın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü (ISE=10073)



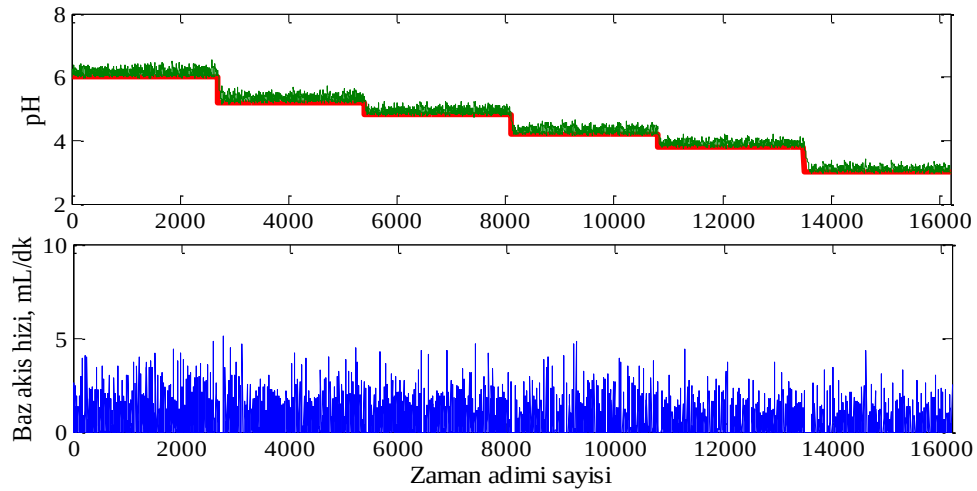
Şekil 5.74 Mikroorganizmalı ortam modelinde kare dalganın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü (ISE=4629)

Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen modelin PID ile pH kontrolü, ISE değerine ve ayar değişkeninin davranışına bakıldığında daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortam modellerinde PID kontrol çalışmalarının son adımında set noktası değişimi adına rastgele etki kullanılmıştır. Sabit genlikli rastgele etki PID kontrol sonuçları şekil 5.75 ve 5.76’da verilmiştir. Genlik 3000 de sabit tutulmuştur. ISE değeri sırası ile 362.68 ve 165.53 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.75 Mikroorganizmasız ortam modelinde rastgele dalganın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü (ISE=362.78)



Şekil 5.76 Mikroorganizmalı ortam modelinde rastgele dalganın kullanıldığı sistemin Teorik PID kontrolü (ISE=165.53)

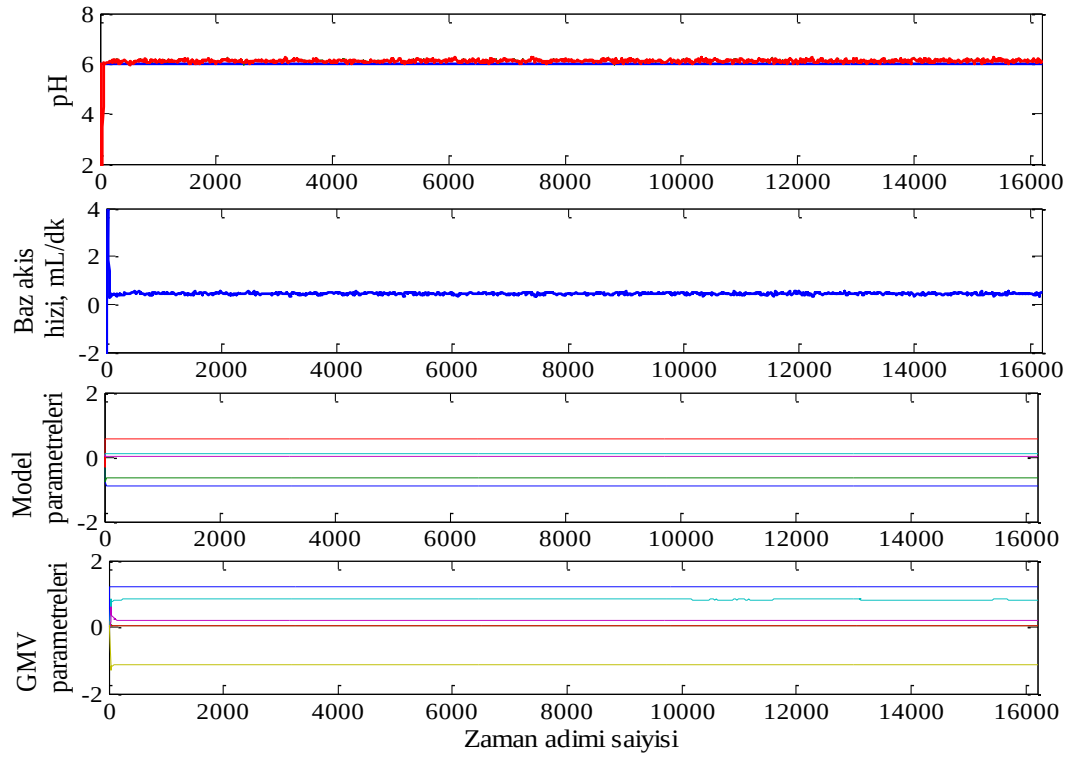
Verilen üç farklı etkide kontrol performansı açısından en düşük ISE değerine rastgele etkide ulaşılmıştır. Üç farklı etkinin PID ile pH kontrolü sağladığı gözlenmiş ancak ayar değişkeninin oldukça salınım yarattığı gözlenmiştir.

5.5.2 Teorik GMV kontrol çalışmaları

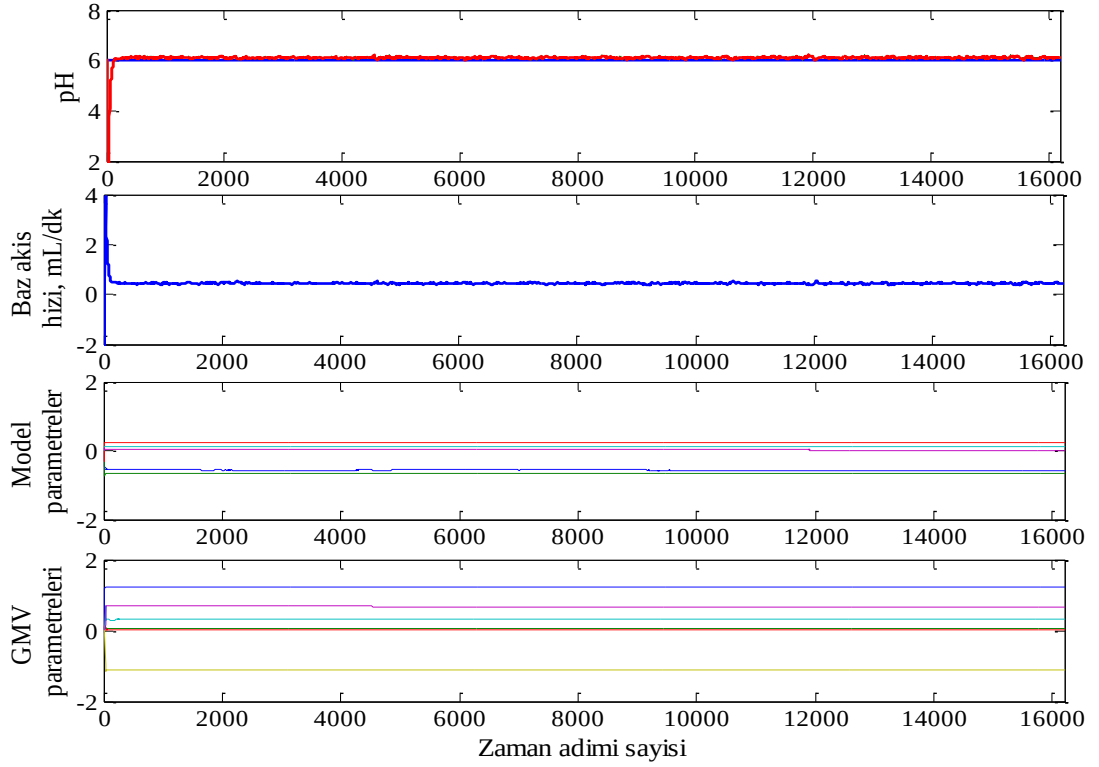
Anaerobik koşullarda *C. butyricum* ve *E. aerogenes* mikroorganizmasının çoğaltıldığı kesikli biyoreaktörde dinamik çalışmalar sırasında mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortamda sistemin giriş değişkenine verilen pozitif basamak etki sonucunda elde edilen veriler MATLAB paket programında yazılan YEKK algoritmasında sistem tanımlama amacıyla kullanılmıştır. Farklı kovaryans matris, unutma çarpanı ve mertebeler için denemeler yapılmış, sistemi tanımlayan en uygun parametrik model belirlenmiştir. PID kontrolde olduğu gibi mikroorganizmalı ve mikroorganizmasız ortam için bulunan ARMAX modeller MATLAB programlama dilinde yazılan GMV kontrol algoritmasında kullanılmıştır.

Çalışmanın bu bölümünde mikroorganizmalı ve mikroorganizmasız ortamda YEKK algoritması ile elde edilen en uygun modeller için 3 farklı etki altında (sabit set noktası, kare dalga ve rastgele dalga) teorik GMV kontrol algoritması pH kontrol için gerçekleştirilmiştir. Algoritmada deneme yanılma yöntemi ile $P=1.0001$, $Q=1.1005$ ve $R=1.1001$ seçilmiştir.

Öncelikle kontrol algoritmasının sabit set noktası takibi için 16000 zaman adımı boyunca sabit set noktası olarak $pH=6$ 'nın kullanıldığı durumda GMV kontrol gerçekleştirilmiştir. Sabit set noktası ile yapılan çalışmaya ait mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortam modellerininin GMV kontrol grafikleri şekil 5.77 ve 5.78'de verilmiştir. Genliğin 3000'de ve gürültünün 0.015 değerinde sabit tutulduğu durumda ISE değerleri sırası ile 377.49 ve 232.52 olarak hesaplanmıştır.



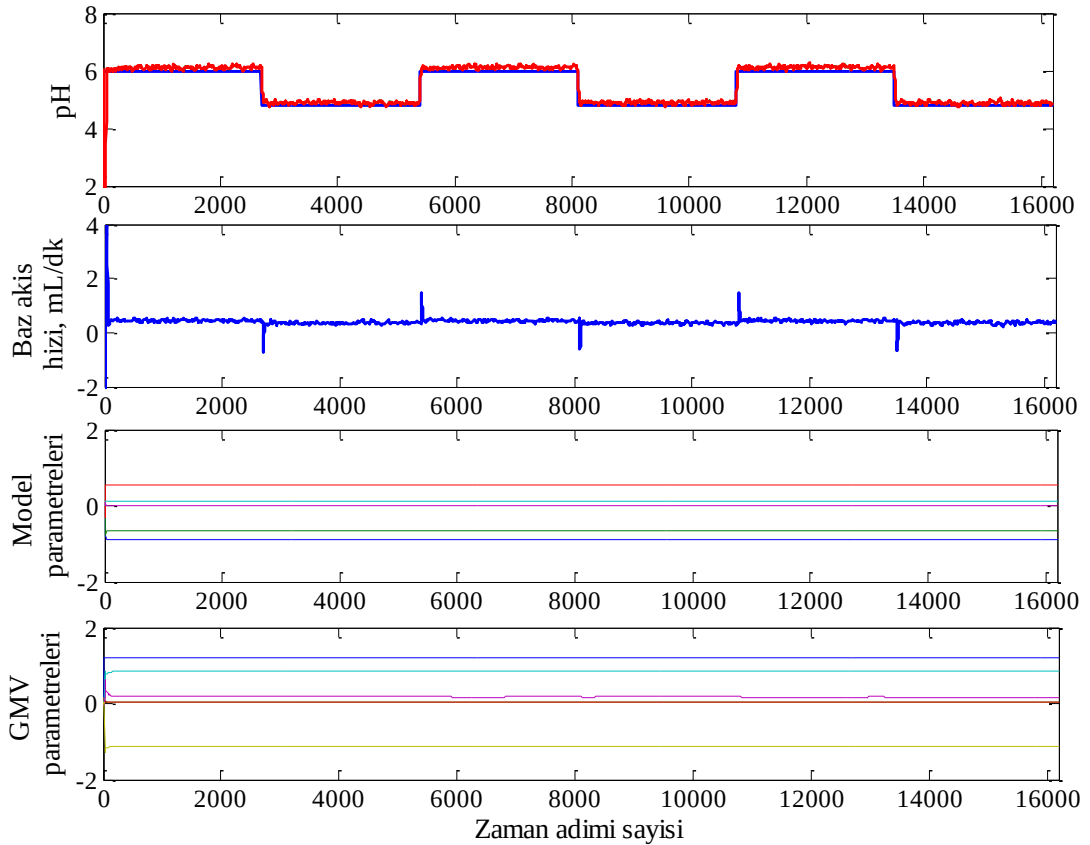
Şekil 5.77 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen ARMAX modelin sabit set noktalı Teorik GMV kontrolü (ISE=377.49)



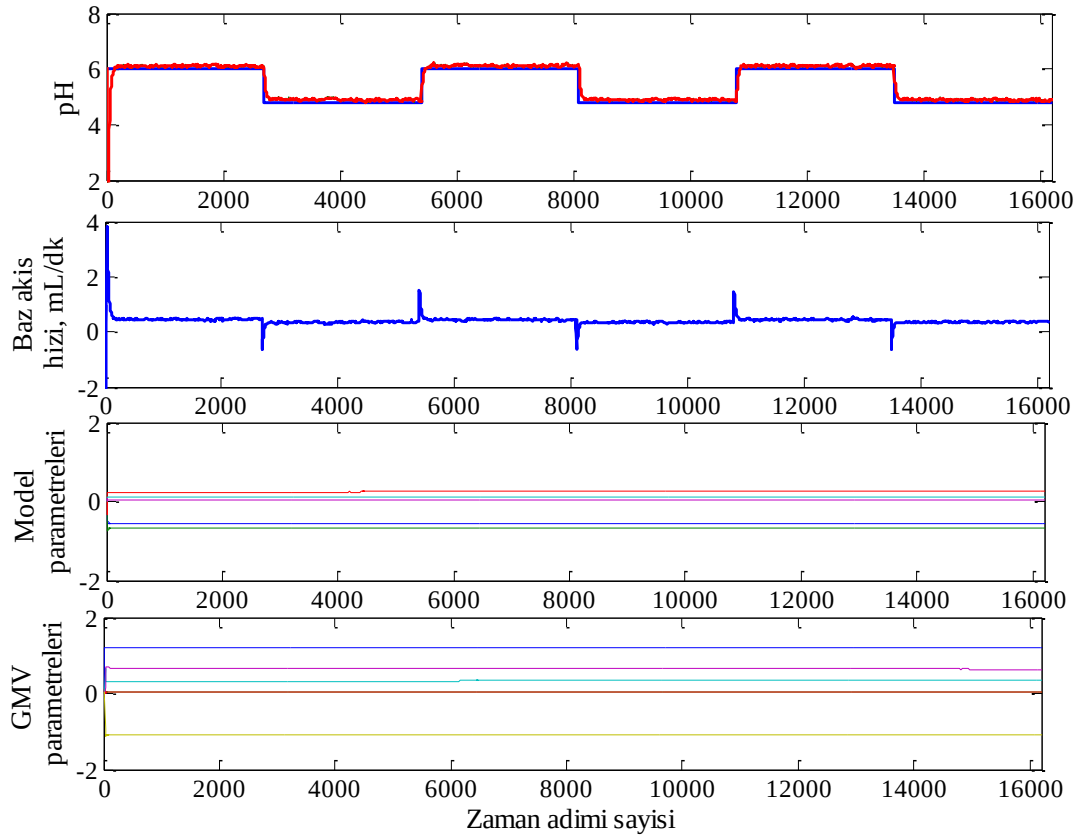
Şekil 5.78 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen ARMAX modelin sabit set noktalı Teorik GMV kontrolü (ISE=232.52)

Şekil 5.77 - 5.78'e bakıldığında ayar değişkeni ve kontrollü değişken arasında çok fark olmadığı ancak ISE değerleri göz önünde tutulduğunda mikroorganizmalı ortamın kontrol edicisinin performansının daha başarılı olduğu söylenebilmektedir.

Teorik pH'ın GMV ile kontrolünde ikinci etki kare etkidir. Gürültü değeri olarak $e=0.015$ seçilmiş ve 16000 s zaman adımı boyunca kare etki altında gerçekleştirilen mikroorganizmasız ortamın pH kontrol sonucu şekil 5.79'da ve mikroorganizmalı ortamın pH kontrolü şekil 5.80' de verilmiştir. ISE değerleri ise sırasıyla 394.79 ve 261.48 olarak hesaplanmıştır. Şekil 5.79 - 5.80'e bakıldığında ayar değişkeni ve kontrollü değişken arasında çok fark olmadığı ancak ISE değerleri göz önünde tutulduğunda mikroorganizmalı ortamın kontrol edicisinin performansının daha başarılı olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 5.79 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen ARMAX modelin kare dalga etkisinde Teorik GMV kontrolü (ISE=394.79)

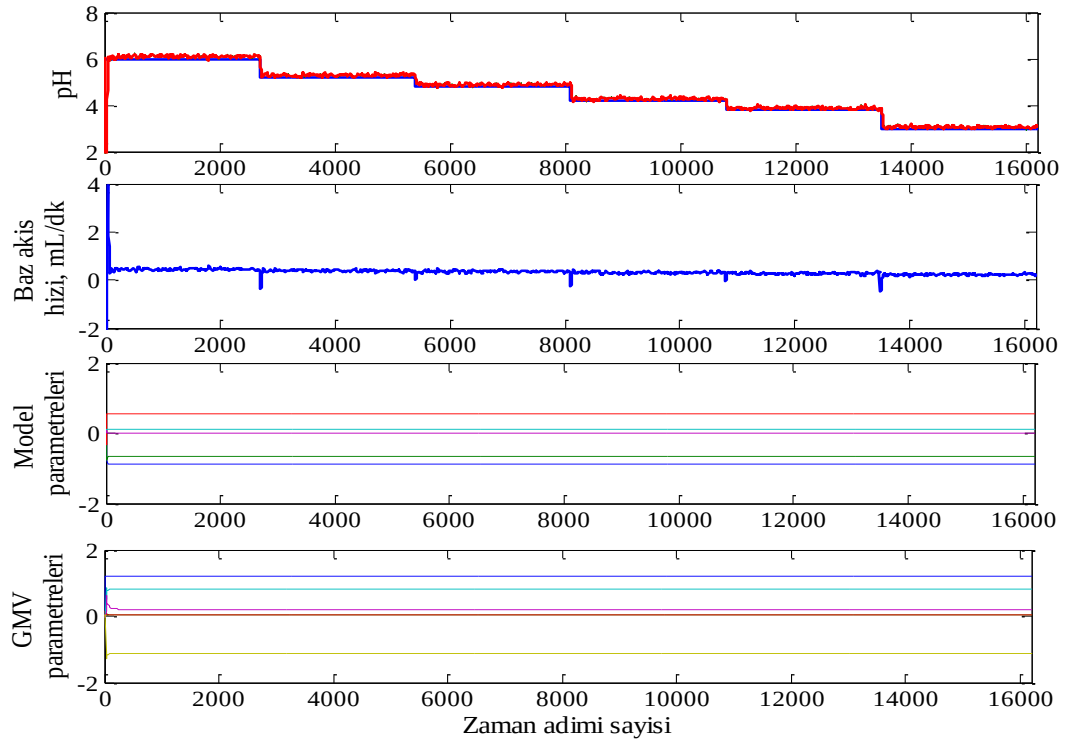


Şekil 5.80 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen ARMAX modelin kare dalga etkisinde Teorik GMV kontrolü (ISE=261.48)

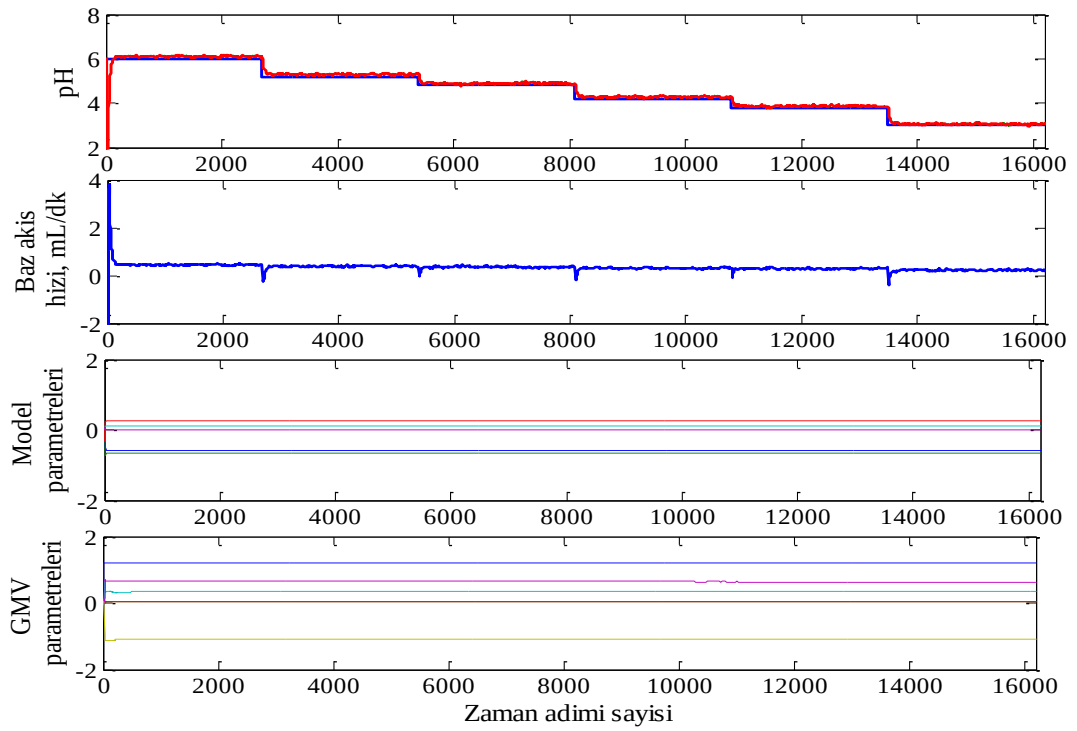
Mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortam modellerinde GMV kontrol çalışmalarının son adımında set noktası değişimi için rastgele etki kullanılmıştır. Sabit genlikli rastgele etki GMV kontrol sonuçları şekil 5.81 - 5.82’de verilmiştir. Genlik 3000 de sabit tutulmuştur. ISE değeri sırası ile 354.26 ve 212.83 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 5.81 ve 5.82’ye bakıldığında ayar değişkeni ve kontrollü değişken arasında çok fark olmadığı ancak ISE değerleri göz önünde tutulduğunda mikroorganizmalı ortamın kontrol edicisinin performansının daha başarılı olduğu söylenebilmektedir.

Kontrol sonuçlarını beraber değerlendirecek olursak, GMV kontrol PID kontrolden oldukça başarılı bulunmuştur. Gerek ISE değerleri gerekse ayar değişkeninin davranışı GMV kontrolde uygundur. PID kontrol ayar değişkeninde salınımlara neden olmaktadır. Oysa ki mikroorganizmalı çalışmalarda ayar değişkeni hasas davranmalıdır.



Şekil 5.81 Mikroorganizmasız ortamdan elde edilen ARMAX modelin rastgele etkide Teorik GMV kontrolü (ISE=212.83)



Şekil 5.82 Mikroorganizmalı ortamdan elde edilen ARMAX modelin rastgele etkide Teorik GMV kontrolü (ISE=354.26)

6. TÜBİTAK 2214/A KAPSAMINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

6.1 Araştırmanın Amacı

TÜBİTAK 2214/A kapsamında doktora teziyle bütünlük içeren çalışmanın amacı, karanlık fermantasyon yöntemi ile *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* 'in karışım kültür oranlarının hidrojen verimine etkisinin araştırılması sonucunda oluşan optimum mikroorganizma aktarım oranının bulunması ve doktora çalışmasına ek olarak bulunan optimum mikroorganizma aktarım oranı ile ardışık ve birleşik fermantasyon yöntemleri kullanılarak biyohidrojen üretim veriminin artırılmasıdır.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi tarafından görevlendirilmenin yapıldığı, Montreal Üniversitesi Mikrobiyoloji, İmmunoloji ve İnfektoloji Bölümünde Prof. Dr. Patrick C. Hallenbeck danışmanlığında Montreal / Kanada'da 1 yıl süresince gerçekleştirilmiştir.

6.2 Mikroorganizma ve Büyütme Ortamı

Çalışmalarda kullanılan zorunlu anaerobik bakteri *Clostridium butyricum* (B-1024), fakültatif anaerobik bakteri *Enterobacter aerogenes* (B-115) ve fakültatif fototrofik bakteri *Rhodospseudomonas palustris* "NRRL-Agricultural Research Service" kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.

C. butyricum, anaerobik kabin içerisinde katı ve sıvı canlandırma ortamı olan GP'ye aktarılmış ve 37 °C'de çoğaltılmıştır. Canlandırılmış *C. butyricum* mikroorganizması sıvı GP ortamına aktarılmış ve 1 gün süresince çoğaltılan mikroorganizma uzun dönemde saklanmak amacıyla steril %30 gliserol eklenmiş ve -80 °C'de saklanmıştır. TGY'da canlandırılmış *E. aerogenes* mikroorganizması ise sıvı TGY ortamına aktarılmış ve 1 gün süresince çoğaltılan mikroorganizma uzun dönemde saklanmak amacıyla steril %30 gliserol eklenmiş ve -80 °C'de saklanmıştır.

C. butyricum mikroorganizması, 100 mL'lik, %1 glikoz, %2 polipepton, %0.2 KH_2PO_4 , %0.05 maya özütü, %0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren GP ortamına, -80 °C de saklanan ortamdan 1mL aktarılarak, 37 °C'de, pH 6.8'de anaerobik koşullarda 15 h süresince ön çoğaltma gerçekleştirilmiştir. *E. aerogenes* mikroorganizması ise, 100 mL'lik, %0.1 glikoz, %0.5 tryptone, %0.1 K_2HPO_4 , %0.5 maya özütü içeren TGY ortamına, -80 °C de saklanan ortamdan 1mL aktarılarak, 37 °C'de , pH 6.8, 150 rpm karıştırma hızında, aerobik koşullarda 9 h süresince ön çoğaltma gerçekleştirilmiştir.

R. palustris mikroorganizması ardışık ve birleşik fermantasyonda kullanılmak üzere, 100 mL'lik, %0.3 maya özütü, %0.3 pepton, 4 mL %7.5 'lik CaCl_2 KH_2PO_4 , 1.2 mL %20'lik $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren YPS ortamına, -80 °C de saklanan ortamdan 1mL aktarılarak, 30 °C'de, ışık altında, anaerobik koşullarda 3-4 gün süresince ön çoğaltma gerçekleştirilmiştir.

6.3 Besi ortamları

Deneysel çalışmalarda, Quebec, Kanada'da, Patates Dobec Inc. tarafından üretilen sarı taze patates kullanılmıştır. Patatesler soyulmuş, tartılmış ve meyve sıkacağı yardımıyla suyu sıkılmıştır. 100, 50, 25, 15,10 ve 5 g tartılmış ve sıkılmış patates suları 1 L'ye mili-Q suyu ile tamamlanmıştır. Karanlık fermantasyon ile karışım kültür kullanılarak gerçekleştirilen optimum besi ortamı derişiminin belirlenebilmesi amacıyla yukarıda verilen derişimler kullanılmıştır. Ayrıca yapılan deneysel çalışmalara bağlı olarak, patatesin glikoz içeriğinin zenginleştirilmesi amacıyla 0.5, 1, 1.5 ve 2.5 g/L derişimde glikoz eklemesi yapılmıştır. Bütün deneysel çalışmalarda patates suyu sterilize edilmeden kullanılmıştır.

6.4 Asit Hidrolizi

Patates suyu içerisindeki glikoz derişiminin belirlenmesi amacıyla, örnekler %1 (v/v) son hacimde derişik HCl eklemesi ile 121 °C'de 10 dk süresince otoklavlanarak nişastanın glikoza parçalanması sağlanmıştır. İşlem sonrasında, otoklavdan alınan

hidrolize olmuş patates suyu oda sıcaklığına soğutularak glikoz içeriği micro plate okuyucu ile 515 nm’de 3.5- dinitrosalisilik asit (DNS) analiz yöntemi ile belirlenmiştir.

6.5 Analiz Yöntemleri

6.5.1 Hidrojen gaz üretimi ve analizleri

Biyohidrojen üretim deneyleri, 100 mL çalışma hacminde 160 mL’lik şişelerle zenginleştirilmiş patates suyu ortamında, *C. butyricum*, *E. aerogenes* ve *R. palustris* mikroorganizmalarının karışım kültürü ile gerçekleştirilmiştir. Karanlık fermantasyon deneyleri 37 °C’de, fotofermantasyon çalışmaları ise 30 °C’de gerçekleştirilmiştir. Deney başlangıcı ve bitişi olmak üzere, analizlerde kullanılmak üzere iki kere örnek alımı gerçekleştirilmiştir.

Hidrojen gaz analizi, termal iletkenlik dedektörüne ve 1m uzunluğunda moleküler elek dolgusu içeren 5A kolonuna sahip Shimadzu, GC-8A Gaz kromatografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanılmıştır. Enjeksiyon portu ve kolon sıcaklığı sırasıyla 110 ve 60 °C olup akım 70 mA’dır. Karanlık fermantasyonda her 3 saatte bir hidrojen ölçülürken, fotofermantasyonda bu süre gün aşırı, üretilen hidrojen miktarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

6.5.2 DNS yöntemi ile glikoz derişiminin belirlenmesi

%1.6 NaOH, %0.9 3,5 dinitrosalisilik asit, %28.22 potasyum sodium tartarat içeriğine sahip DNS çözeltisi, asit hidrolizi ile nişastanın glikoza dönüşümü sonrasında, glikoz derişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır. Glikoz analizi, Bio-tek Instruments, Inc. EL800 model Universal Microplate Reader ile gerçekleştirilmiştir. DNS metodu aşağıda verilmiştir.

- Asit hidrolizi ile glikoza parçalanmış nişasta örneğinden 0.05 mL alınarak üzerine 0.05 mL su ile seyretme sonrasında 0.1 mL DNS çözeltisi eklenir

- Örnek 10 dakika süresince 90 °C su banyosunda kaynatılır.
- Buz banyosu yardımıyla kaynatılan örnek 3 dakika süresince soğutulur.
- Çok süre geçmeden 515 nm’de absorbands ölçümü gerçekleştirilir.

Not: Kalibrasyon grafiği 0-1 g/L aralığında derişimi bilinen glikoz çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir.

6.5.3 Bradford boyama metodu ile kuru hücre ağırlığı- protein korelasyonu

Mikroorganizma çoğalması, besi ortamı olarak heterojen sistemlerin kullanılması durumunda, ortamda besi ortamı partikülleri ve mikroorganizmanın eş anlı bulunması dolayısıyla, spektrofotometrik yöntemlerle belirlenememektedir. Bu durumda kuru hücre ağırlığı – protein korelasyonu önerilmiştir.

Öncelikle belirli derişimlerde kuru hücre ağırlığı belirlenmelidir. Kuru hücre ağırlığı ölçüm prosedürü aşağıda verilmiştir.

- 0.45 um gözeneklilikte selüloz asetat filtresi numaralandırılarak, 24 saat süresince 105⁰C’de kurutulmuştur ve hassas terazi de ağırlıkları ölçülmüştür (A).
- Mikroorganizmalar zengin besi ortamlarına aktarılmış ve 24 saat süresince inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- Çoğalan mikroorganizmalardan 20 mL hacminde örnek alınarak, seyreltilmiş ve UV- absorbandsları 600 nm’de Shimadzu UV-2101PC UV-Vis Scanning Spektrofotometre aracılığı ile ölçülmüştür.
- 20 mL’lik örnekler vakum altında filtrelenmiş ve mikroorganizmalı filtre kağıtları 24 saat süresince 105⁰C’de ağırlığında bir değişiklik olmayana dek kurutulmuş ve hassas terazide ölçülmüştür (B)
- Hesaplama şu şekilde yapılmıştır
$$\text{Kuru hücre ağırlığı (g/L)} = ((B-A) \cdot 1000 \text{ mL}) / (\text{örnek hacmi, mL})$$

- Kuru hücre ağırlığına karşı absorban değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

Protein miktarı ise Bradford dye metodu uygulanarak ölçülmüştür. Protein ölçüm prosedürü aşağıda verilmiştir.

- 1 gün süresince zengin besi ortamında çoğaltılmış mikroorganizmadan 20 mL alınmış ve 8000xg, 4 °C’de 15 dakika süresince santrifüjlenmiş süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Elde edilen pellet %0.9 NaCl (w/v) ile yıkanmış ve 8000xg’de 10 dakika süresince santrifüjlenmiş ve supernatantı uzaklaştırılmıştır.
- Pellet üzerine 2 mL 0.2 M NaOH eklenmiş ve hidrolizlenmiş pellet 8000xg’de 15 dakika süresince 4 °C’de santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant 0.4 N NaOH kullanılarak seyreltilmiştir (kalibrasyon doğrusu oluşturulurken de aynı işlem uygulanmıştır).
- Örnek ölçümü şu şekilde gerçekleştirilmiştir; 20 µL örnek, 80 µL su, 100 µL 0.4N NaOH, 2 mL Comassie Brilliant Blue reagent eklenerek 5 dakika süresince beklenerek
- 595 nm dalga boyunda UV Spektrofotometerde ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Not: Kalibrasyon grafiği, 0.025-0.4 mg/mL aralığında derişimi bilinen bovine serum albümin kullanılarak elde edilmiştir.

6.5.4 Petri kabına dökme (pour plate) ve yayma (spread plate) yöntemleri ile canlı hücre sayımı

Petri kabında sayım yöntemleri canlı mikroorganizma sayımında uygulanmaktadır. Katı agar ortamında 300 den fazla mikroorganizma kolonilerinin sayımı oldukça zor olduğundan seri seyreltme işlemi gerekmektedir. Petri kabına dökme veya yayma yöntemleri canlı hücre sayımı için sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Dökme yöntemi çoğunlukla anaerobik mikroorganizmaların sayımında kullanılmaktadır. Sayılan bütün koloniler hesaplanarak koloni oluşturma birimi (CFU) adı altında tanımlanmaktadır.

Sonrasında CFU üreme ortamındaki mikroorganizma sayısını vermesi adına seyreltme faktörü ile çarpılmaktadır.

Petri kabına dökme (pour plate) yönteminde, mikroorganizmanın seri seyreltme işlemi steril ringer çözeltisi ile gerçekleştirilmektedir. Steril ringer çözeltisinin içeriği, 1 L milik suda çözünen 7.2 g/L NaCl, 0.37 g/L KCl ve 0.17 g CaCl₂'den oluşmaktadır. Hazırlanan çözeltinin pH değeri 7.3 veya 7.4 değerine ayarlandıktan sonra 0.22 µm gözeneğe sahip filtre kağıdı ile filtrelenir ve otoklavlanarak sterillenir. Petri kabına dökme yönteminde, steril ringer çözeltisi ile seyreltilen mikroorganizmalardan petri kabının ortasına 1 mL örnek mikropipet yardımıyla koyularak üzerine yaklaşık 20 mL otoklavlanan ve yaklaşık 50 °C'ye soğutulmuş steril katı besi ortamı dökülür. Canlı mikroorganizma sayımı için petri kapları 4-5 gün süresince anaerobik kabinde inkübe edilir. Petri kabı dökme metodu *C. butyricum* gibi katı anaerobik mikroorganizmaların çoğalmasında kullanılan avantajlı bir yöntemdir.

Petri kabına yayma (spread plate) metodu da steril ringer çözeltisi kullanılarak seyreltilen mikroorganizmanın katı besi ortamı yüzeyine 0.1 mL yayılması ile gerçekleştirilir. Yayma metodunun avantajı 24-48 içerisinde canlı mikroorganizma sayımının gerçekleştirilebilmesidir.

6.5.5 Kimyasal oksijen ihtiyacı (Chemical oxygen demand, COD)

Bir çok besin, su atığı, nişasta, selüloz, melas ve damıtma alkol atıkları biyohidrojen üretiminde kullanılan besi ortamlarıdır. Bu nedenle bu sayılan besi ortamlarının fermentasyon süresince tüketimi, biyohidrojen veriminin g glikoz veya g COD başına hesaplanmasında büyük önem arz etmektedir. Ayrıca bu ölçüm, besi ortamı tüketim veriminin belirlenmesine yardımcı olabilmektedir. Genel anlamda, atıklardan biyohidrojen üretiminde hidrojen verimi birim olarak mol H₂/g COD'dir.

Kimyasal oksijen ihtiyacı (COD), organik maddenin dekompozisyonu ve inorganik kimyasalların oksidasyonu için gerekli oksijen olarak tanımlanmaktadır. COD değerinin

birimi L örnek başına tüketilen oksijen miligramı olarak verilir. COD, organik atıkların kullanılmasıyla üretilen biyohidrojen substrat tüketimini belirlemek için kullanılır.

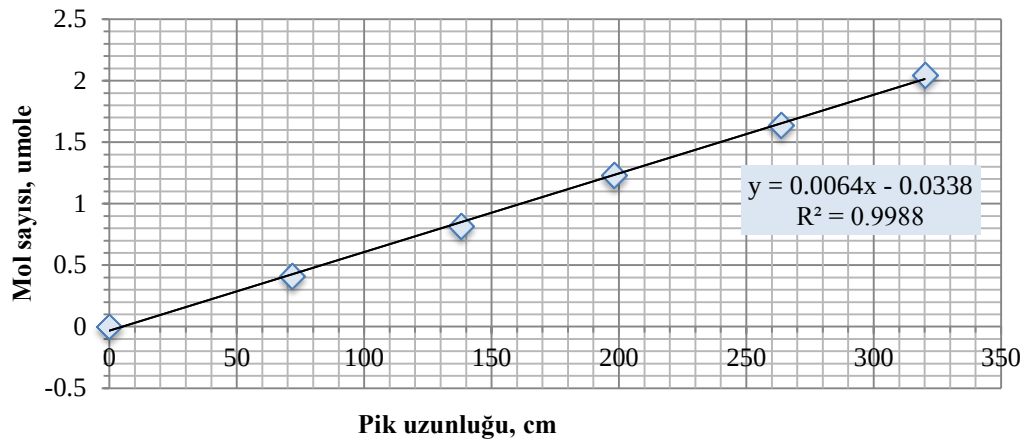
COD ölçümü, öncelikle 3 farklı çözelti hazırlanarak gerçekleştirilir. Bunlardan ilki 0.01667 M standart potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) sindirim (digestion solution) çözeltisidir. Bu çözelti, öncesinde $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2h süresince kurutulmuş 4.903 g $K_2Cr_2O_7$ 'in, 500 mL distile suya eklenmesinin ardından, 167 mL derişik H_2SO_4 , 33.3 g $HgSO_4$ 'ün çözeltiye eklerek çözünmesi ile oda sıcaklığına soğuması beklenerek distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanacak ikinci çözelti sülfirik asit çözeltisidir. Bu amaçla 5.5 g $Ag_2SO_4/kg\ H_2SO_4$ oranında derişik H_2SO_4 kullanılarak yaklaşık olarak 10.12 g Ag_2SO_4 'ün 1 L derişik H_2SO_4 içerisinde bırakılması ve 1 veya 2 gün süresince karanlık bir ortamda tamamen çözünmesinin beklenmesidir. 2 gün sonunda çözelti yavaş bir şekilde karıştırılır. Son çözelti, kalibrasyon doğrusunun çizilebilmesi için potasyumhidrojenfitalat (KHP) standard çözeltisinin hazırlanmasıdır. 1 g KHP maddesi önceden, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ fırında yaklaşık sabit ölçüm alınana kadar (2h) kurutulmalıdır. Sonrasında 425 mg kurutulmuş KHP 1 L distile suya eklenmiştir. KHP çözeltisi steril koşullarda, taze kullanılmalı ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmelidir. KHP teorik olarak ağırlık başına 1.176 mg $O_2/mg\ COD$ 'ye sahipken hazırlanan çözeltinin hacim başına teorik COD miktarı 500 $\mu\text{g}\ O_2/mL$ 'dir (APHA).

COD ölçüm yönteminde öncelikle ölçüm yapılacak tüpler ve kapakları %20'lik H_2SO_4 ile kontaminasyonu engellemek için yıkanmalıdır. Sonrasında 2.5 mL örnek ve 1.5 mL $K_2Cr_2O_7$ çözeltisi tüp içine koyulur. Sonrasında 3.5 mL sülfirik asit çözeltisi eklenir. Kapaklar sıkıca kapatılır ve vortekslenerek karıştırılır. Tüpler $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye sahip fırında 2 h süresince ısıtılır. Ve oda sıcaklığına soğutulan tüpler UV spektrofotometresi ile 600 nm dalga boyunda ölçülür (APHA 1998).

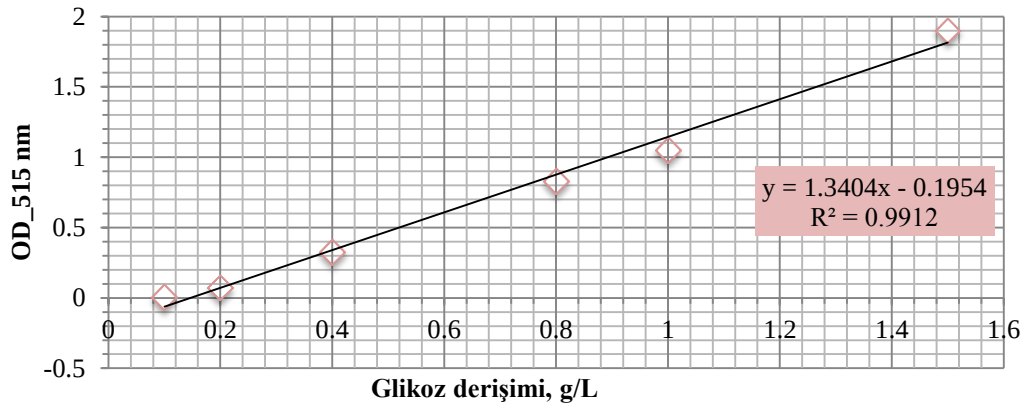
6.6 Deney Sonuçları

6.6.1 Kalibrasyon doğruları

Çalışma kapsamında hidrojen içeriği, glikoz ve patates suyunun glikoz içeriği, kuru hücre ağırlığı, bakteri protein ölçümü ve kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) için kalibrasyon doğruları çizilmiştir.



Şekil 6.1 H₂ içeriği kalibrasyon grafiği



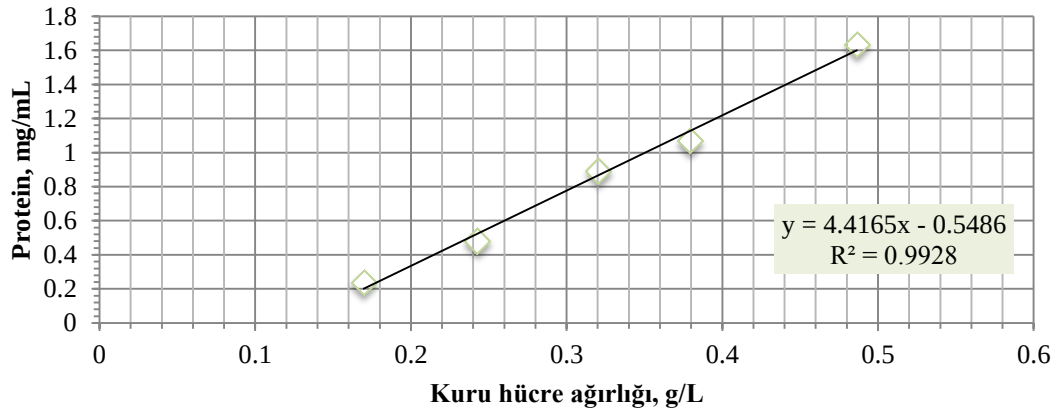
Şekil 6.2 DNS yöntemi ile glikoz kalibrasyonu

Asit hidrolizi nişastayı glikoza parçalamak için derişik HCL ile gerçekleştirilmiştir ve patatesin glikoz içeriği DNS yöntemi ile ölçülmüştür. Patates suyunun glikoz içeriği

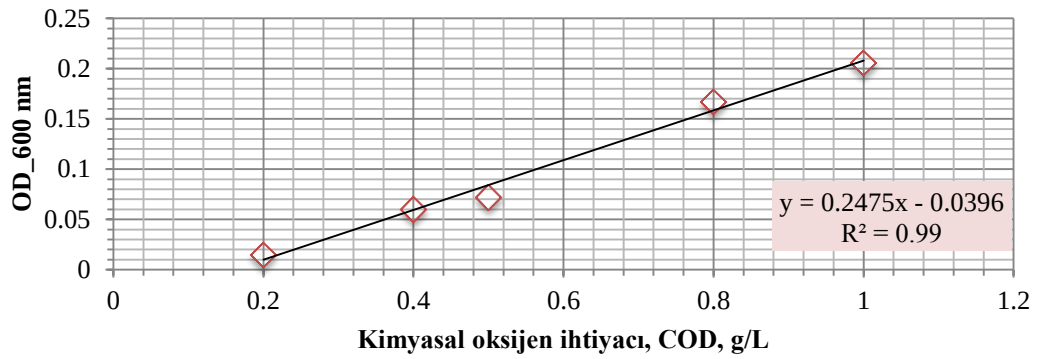
glikoz kalibrasyonu ve patates kalibrasyonu korelasyonunun kestiriminden 6.4785 g patatesin 1 g glikoza eşdeğer olduğu görülmüştür.



Şekil 6.3 Patatesin glikoz içeriği kalibrasyonu



Şekil 6.4 Kuru hücre ağırlığı - protein korelasyonu



Şekil 6.5 Kimyasal oksijen ihtiyacı, COD kalibrasyonu

6.6.2 Karışım kültürle biyohidrojen üretimine besi ortamı derişiminin etkisi

Sabit 1:1 (C:E, v/v) mikroorganizma aktarım oranında farklı besi ortamı derişimlerinde iki set deney gerçekleştirilmiştir. Besi ortamı derişimleri 1 L'ye miliq su ile seyreltilmiş 1-100 g sıkılmış patates suyundan oluşmaktadır. İlk deney setinde yalnızca patates suyu, ikinci sette ise 1 g/L glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu kullanılmıştır. Besi ortamlarının fermentasyon öncesi ve sonrası, başlangıç ve son glikoz içerikleri DNS yöntemi ile belirlenmiş ve çizelge 6.1'de verilmiştir. Hidrojen verimi fermentasyon süresince glikoz tüketiminden hesaplanmıştır. Deney sonuçları çizelge 6.2 - 6.3'te verilmiştir.

Çizelge 6.1 Patates suyunun glikoz içeriğı

Besi ortamı, g	Patates suyunun glikoz derişimi , g/L		Glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyunun glikoz derişimi, g/L	
	Başlangıç	Son	Başlangıç	Son
100	13.961	11.219	17.408	10.723
	13.961	11.772	17.408	9.217
50	6.087	4.983	7.087	5.144
	6.087	5.737	7.087	5.379
25	2.890	2.143	3.782	2.756
	2.890	3.014	3.782	2.947
10	1.700	0.921	2.278	1.762
	1.700	1.098	2.278	1.764
1	0.154	0.151	1.191	0.286
	0.154	0.155	1.191	0.264

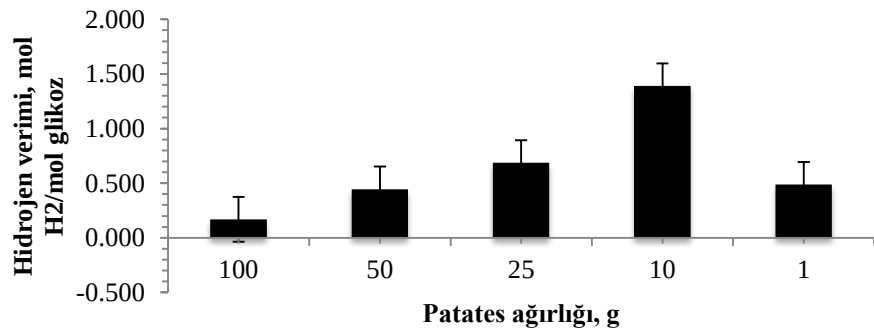
Çizelge 6.1-6.3'ten görüldüğü üzere 10 g'ın üzerindeki derişimler hidrojen veriminin düşmesine neden olmaktadır. Bu durumda, 10 g patates suyunun 1 g/L glikoz ile zenginleştirildiğı patates suyu derişimi optimum besi ortamı olarak seçilmiş ve yaklaşık 2 g/L glikoz içeriğine sahip olduğı bulunmuştur. Hidrojen veriminin farklı besi ortamı derişimleri ile değışimi şekil 6.6'da verilmiştir.

Çizelge 6.2 Patates suyu deney sonuçları

Besi ortamı, g	Kümülatif hidrojen hacmi, mL	Glikoz tüketimi, g/L	Hidrojen verimi, molH ₂ /mol glikoz	Ortalama± Standard sapma
100	43.7	2.742	0.305	0.366±0.0869
	58.6	2.190	0.428	
50	45.3	1.104	0.529	0.846±0.449
	18.2	0.350	1.163	
25	41.8	0.748	0.398	-1.129±2.16
	42.4	-0.123	-2.657	
10	42.1	0.779	0.262	0.283±0.029
	32.8	0.602	0.303	
1	35.2	0.004	-	-
	32.2	0.000	-	

Çizelge 6.3 1 g/L glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu deney sonuçları

Besi ortamları, g	Kümülatif hidrojen hacmi, mL	Glikoz tüketimi, g/L	Hidrojen verimi, molH ₂ /mol glikoz	Ortalama± Standard sapma
100	73.7	6.685	0.181	0.170±0.014
	66.45	8.192	0.160	
50	61.4	1.943	0.431	0.446±0.0205
	67.3	1.708	0.460	
25	57.9	1.025	0.800	0.688±0.158
	54.6	0.835	0.577	
10	57.3	0.516	1.465	1.392±0.103
	56.4	0.514	1.319	
1	35.2	0.905	0.448	0.489±0.059
	31.4	0.927	0.531	



Şekil 6.6 Hidrojen veriminin farklı besi ortamı derişimleri ile değişimi

Bakteriyal protein ölçümünden kestirilen kuru hücre ağırlığı en yüksek besi ortamı derişiminde, yüksek protein ölçümü dolayısıyla yüksek kuru hücre ağırlığına ulaşıldığını göstermiştir. Ancak yüksek bakteri miktarı hidrojen verimini arttırmakta besi ortamı kadar etkili olamadığından, yüksek besi ortamı derişiminde hidrojen veriminin düştüğü çizelge 6.4'te görülmektedir.

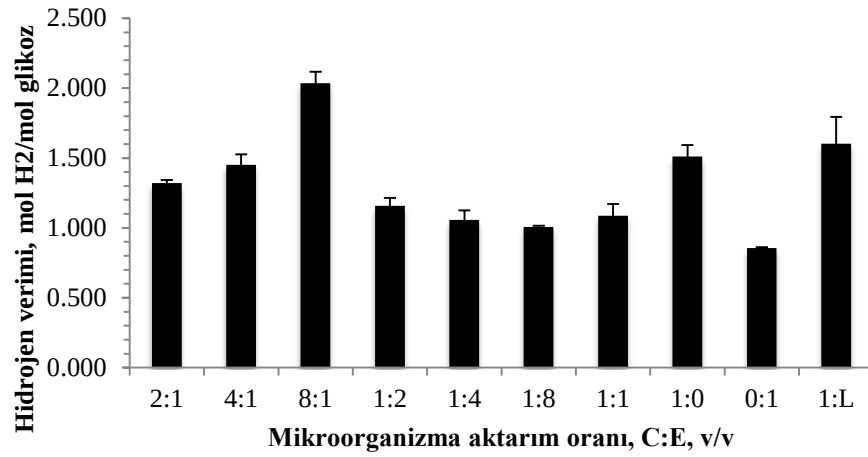
Ayrıca yüksek içerikte nişasta içeren besi ortamları derişimi, asit hidrolizi sonrasında DNS yöntemi ile glikoz içeriğinin belirlenmesinde zorluğa neden olmaktadır.

Çizelge 6.4 Bakteriyel protein ölçümü ile kuru hücre ağırlığı kestirimi

Besi ortamı, g	Bakteriyal protein ölçümünden kestirilen kuru hücre ağırlığı, g/L	
	Patates suyu	Zenginleştirilmiş patates suyu
100	0.322	0.509
	0.388	0.528
50	0.114	0.339
	0.129	0.364
25	0.114	0.287
	0.114	0.239
10	0.048	0.258
	0.053	0.209
1	0.055	0.075
	0.071	0.141

6.6.3 Mikroorganizma aktarım oranının, glikozdan biyohidrojen üretimine etkisi

Tekrarlı deneyler *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* in farklı aktarım oranlarında (C:E), 5 kez seyreltilmiş GP ortamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hidrojen verimleri glikoz tüketimi üzerinden hesaplanmış ve sonuçlar çizelge 6.5 ve şekil 6.7'de verilmiştir.



Şekil 6.7 Hidrojen veriminin C:E aktarım oranları ile değişimi

Çizelge 6.5 Deney sonuçları

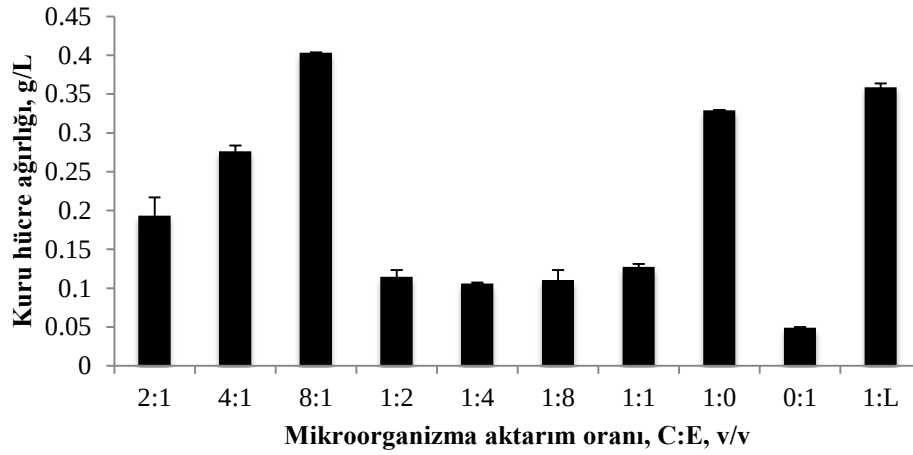
C :E aktarım oranı, v/v	Kümülatif hidrojen, mL	Glikoz tüketimi, g/L	Hidrojen verimi, molH ₂ /mol glikoz	Ortalama± Standard sapma
2:1	79.7	1.662	1.337	1.320±0.025
	73.9	1.599	1.302	
4:1	76.2	1.718	1.398	1.451±0.074
	76.7	1.557	1.504	
8:1	115.2	1.776	1.978	2.035±0.082
	119.6	1.788	2.093	
1:2	71.9	1.559	1.118	1.159±0.057
	82.7	1.619	1.199	
1:4	72	1.572	1.105	1.056±0.069
	71.5	1.681	1.007	
1:8	72	1.731	1.014	1.007±0.010
	71.8	1.810	1.000	
1:1	76.3	1.436	1.146	1.087±0.084
	72.3	1.681	1.027	
1:0	67.5	1.058	1.568	1.509±0.083
	68	0.996	1.451	
0:1	65.5	1.470	0.860	0.856±0.006
	66	1.490	0.852	
C:L	83	1.545	1.466	1.601±0.192
	94.2	1.657	1.737	

Biyohidrojen üretiminde mikroorganizma aktarım oranının mikroorganizma davranışındaki etkisinin gözlemlenebilmesi için karbon kaynağı olarak glikoz kullanımı tercih edilmiştir. Sadece *C. butyricum* mikroorganizmasının aktarıldığı (C:E, 1:0) deney sistemi haricinde bütün deneylerde kullanılan 2 g/L glikoz neredeyse tamamen tükenmiştir. Yüksek glikoz tüketimi, yüksek hidrojen verimine neden olurken, C.

butyricum'un yüksek mikroorganizma aktarım oranı (C:E, 8:1) yüksek hidrojen verimine ulaşmayı sağlamıştır.

Üretilen en yüksek kümülatif hidrojen hacmi, hidrojen verimi ve kuru hücre ağırlığı sırasıyla; 117.4 mL, 2.035 mol H₂/mol glikoz ve 0.4 g/L olarak aktarım oranının 8:1 olduğu durumda ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, şekil 6.7-6.8'den görüldüğü üzere, literatüre uyumlu olarak, baskın hidrojen üreticisi *C. butyricumun* *E. aerogenes*'e kıyasla yüksek aktarım oranı, yüksek verim ve kuru hücre ağırlığına ulaşmayı sağlamaktadır.



Şekil 6.8 Mikroorganizma aktarım oranının kuru hücre ağırlığına etkisi

6.6.4 Mikroorganizma aktarım oranının zenginleştirilmiş patatesten biyohidrojen üretimine etkisi

Mikroorganizma aktarım oranının biyohidrojen üretim etkisini incelemenin amaçlandığı üç farklı set deney, yaklaşık 2 g/L glikoz içeriğine sahip zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamı ile gerçekleştirilmiştir ve deney koşulları çizelge 6.6'da verilmiştir.

Çizelge 6.6 Mikroorganizma aktarım oranı ve kullanılan besi ortamı bileşimleri

SET 1			SET 2			SET 3		
Saf su ile seyreltilen besi ortamı (s+w), mL	C, mL	E, mL	Besi ortamı, mL	C, mL	E, mL	Besi ortamı, mL	C, mL	E, mL
90 + 8	1	1	98	1	1	90	5	5
90 + 7	2	1	97	2	1	90	6.65	3.35
90 + 5	4	1	95	4	1	90	8	2
90 + 1	8	1	91	8	1	90	9	1.12
90 + 7	1	2	97	1	2	90	3.35	6.65
90 + 5	1	4	95	1	4	90	2	8
90 + 1	1	8	91	1	8	90	1.12	9
90 + 8	1	0	98	1	0	90	10	0
90 + 0	0	1	98	0	1	90	0	10
90 + 1	8 (C)	1(L)	91	8 (C)	1 (L)	90	9 (C)	1.12 (L)

Aktarım sonrası son hacmin sabit olması için,

Set 1; Besi ortamı 100 mL'ye distile su ile seyreltilerek tamamlanmıştır

Set 2; 100 mL'ye tamamlama besi ortamı ile yapılmıştır

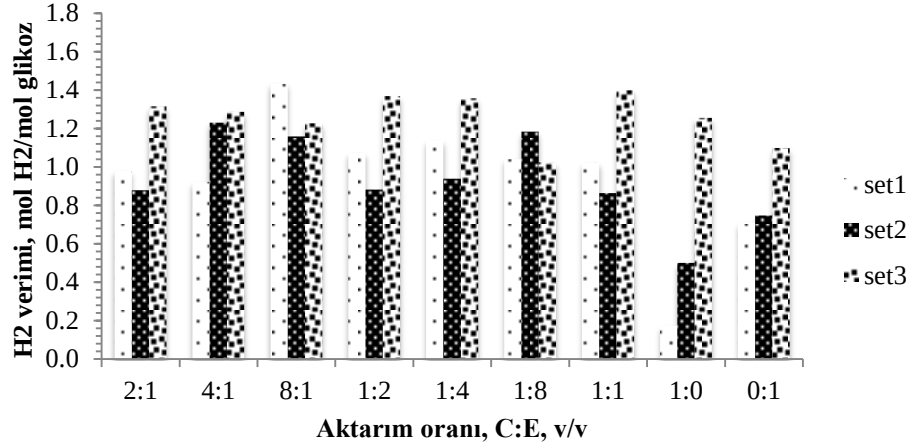
Set 3; Aktarım oranı ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 6.7 Aktarım oranı deneysel sonuçları

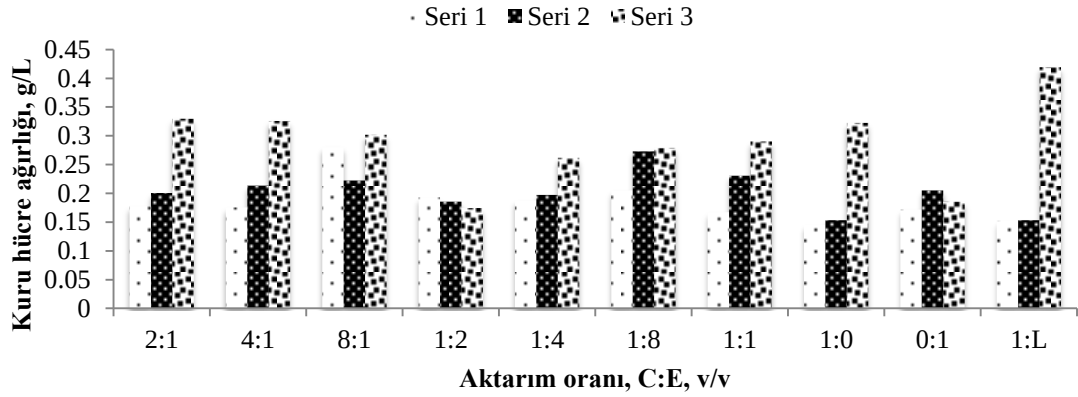
Aktarım oranı, C:E, v/v	Kümülatif hidrojen, mL			Glikoz tüketimi, g/L			Hidrojen verimi, molH ₂ /mol glikoz		
	SET1	SET2	SET3	SET1	SET2	SET3	SET1	SET2	SET3
2:1	52	56.5	71.8	0.960	1.144	1.153	0.979	0.879	1.314
4:1	52	61.5	73.8	1.053	0.956	1.156	0.921	1.230	1.286
8:1	77.5	70	72.3	1.040	1.130	1.102	1.431	1.158	1.226
1:2	51.2	68	66	0.890	1.241	1.052	1.073	0.881	1.367
1:4	52.1	54.8	58.7	0.872	1.153	0.934	1.137	0.938	1.356
1:8	52.7	59.1	56.3	1.005	1.006	1.223	1.040	1.184	1.023
1:1	53.5	53.5	69.7	0.866	1.037	1.059	1.021	0.862	1.398
1:0	31.7	59.6	79	0.878	1.130	0.832	0.174	0.499	1.255
0:1	44.5	49	51.9	1.031	1.109	0.979	0.711	0.746	1.097
1:L	39.1	39	61.5	0.364	0.407	0.193	2.041	1.849	8.569

Bütün deney setlerinde 2 g/L glikoz içeriğinde zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamı olarak kullanılmıştır. İlk set deneyde 90 mL besi ortamı şişelere doldurulmuş ve 100 mL'ye tamamlama aktarım oranına bağlı olarak su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir.

İkinci deney setinde aktarım oranına bağlı olarak hacim besisi ortamı ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Üçüncü deney setinde ise çalışma hacmi olan 100 mL mikroorganizma aktarım oranı ile sağlanmıştır.



Şekil 6.9 Hidrojen verimi



Şekil 6.10 *C. butyricum* ve *E. aerogenes* 'in farklı aktarım oranında ve farklı besisi ortamı derişiminde kuru hücre ağırlığının değışimi

Yapılan 3 farklı set deney sonucunda en yüksek kümülatif hidrojen hacimine ve hidrojen verimine C:E aktarım oranının **8:1** olduğu durumda, sırasıyla; **77.5 mL** ve **1.431 mol H₂/mol glikoz** olarak ulaşılmıştır. *E. aerogenes* yerine L-cysteine'in anaerobik koşulları sağlamak amacıyla kullanıldığı aktarım oranı durumunda, C:L düşük besisi ortamı tüketimi (0.3 g/L) ile yüksek verime ulaşılmış gibi göstermektedir ancak yanıltıcı olmaması gerekmektedir.

6.6.5 *C. butyricum*, *E. aerogenes* ve *R. palustris* ile ardışık (sequential) fermentasyon

Biyolojik hidrojen üretimi iki basamakta karanlık ve foto fermentasyonun ayrı işletimi veya karışım kültür kullanımı ile tek basamakta gerçekleştirilebilmektedir. İki basamaklı yöntemin avantajı, karanlık ve foto fermentasyonun işletim koşullarını ayrı ayrı denetleyebilme imkanı ile optimum değerlere ulaşmasının sağlamasıdır. Bu çalışmada iki basamaklı karanlık ve foto fermentasyon ardışık şekilde karbon kaynağı olarak nişasta ve glikoz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *C. butyricum* ve *E. aerogenes* mikroorganizmasının bir önceki bölümlerde ayrıntılı olarak ele alındığı aktarım oranı olan 8:1’de karanlık fermentasyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Karanlık fermentasyon atığının kullanıldığı foto fermentasyon basamağında *R. palustris* mikroorganizması ile gerçekleştirilen biyohidrojen üretimi, foto fermentasyon besi ortamı olan karanlık fermentasyon atığının seyreltme oranı, pH ve aktarım oranının optimum değerlerinin belirlenebilmesi için, yüzey yanıt metodu (RSM) da bulunan Box Behnken yöntemi ile deneysel tasarım gerçekleştirilmiştir.

Karanlık fermentasyon ortamı patates suyu ve glikoz içermektedir. 20 g patates tartılmış, soyulmuş ve suyu sıkılarak hacmi 1 L’ye milik su ile tamamlanmıştır. Sonrasında ortama 2 g/L glikoz ile 0.56 g/L FeSO₄ ilave edilmiştir. Zenginleştirilmiş patates suyunun glikoz içeriği yaklaşık 3.787 g/L’dir. Başlangıç pH’ı 6 değerine ayarlamıştır. Deneyler 100 mL çalışma hacmindeki şişelerde gerçekleştirilmiştir. Şişelerdeki tepe boşluğu 15 dk süresince Argon gazı ile süpürülmüş ve anaerobik ortam sağlanmıştır. 37 °C ve 150 rpm karıştırma hızında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. C:E aktarım oranı önceki çalışmalarda belirlenmiş olan 8:1 değerinde gerçekleştirilmiştir.

Karanlık fermentasyonu takiben foto fermentasyon basamağına geçilmiş, aynı şekilde deneyler 100 mL çalışma hacmine sahip şişelerde, 30 °C, 150 rpm, 50 W/m² ışık yoğunluğunda, anaerobik ortamda gerçekleştirilmiştir. Foto fermentasyonda kullanılan karbon kaynağı karanlık fermentasyon atığı (DFE) deneyler öncesinde önişlemeden geçirilmiştir. Öncelikle atık 10 min süresince 10000 rpm de karanlık fermentasyon bakterisinin uzaklaştırılması amacıyla santrifüjlenmiş ve sonrasında 0.45 um gözenek

çapındaki filtreden geçirilmiştir. DFE deney tasarımına uygun olarak 2 ve 5 kat miliq su ile seyreltilmiştir. Ortam foto fermentatif mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmesi adına 5 mL/L RCV süper tuz çözeltisi ile tamamlanmıştır. pH değerleri 6.5, 7.5 ve 8.5 olarak ayarlanmıştır. Nitrojen kaynağı olarak 7 mM sodyum glutamat kullanılmıştır. Aktarım sonrasında 15 dk süresince argon gazı geçirilerek anaerobik ortam sağlanmıştır. Aktarım oranı deney tasarım yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Box Behnken deney sonuçları Çizelge 6.8’de verilmiştir.

Toplam hidrojen verimi, toplam hidrojen üretimi, foto fermentasyon hidrojen verimi ve son *R. palustris* canlı hücre sayımı sonuçları verilmiştir.

Çizelge 6.8 Foto fermentasyonda üç bağımsız değişkenli Box-Behnken deney sonuçları

Deney	Foto bakteri, mL		DFE seyreltme oranı		pH		^a Toplam H ₂ Verimi (Y ₁)	^b Toplam H ₂ Üretimi (Y ₂)	^c Foto H ₂ verimi (Y ₃)	^d Son <i>R. palustris</i> (Y ₄)
	X ₁	Code	X ₂	Code	X ₃	Code				
1	3	-1	2.5	0	8.5	1	4.60	1.46	3.11	44.4
2	3	-1	0	1	7.5	0	2.28	0.66	0.001	30.9
3	3	-1	2.5	0	6.5	-1	4.22	1.34	2.66	44.2
4	3	-1	5	-1	7.5	0	6.86	1.04	4.19	54.0
^e 5	9	0	2.5	0	7.5	0	5.18	1.51	3.67	54.9
^e 6	9	0	2.5	0	7.5	0	5.33	1.62	3.95	54.2
7	9	0	0	1	6.5	-1	3.32	0.66	0.03	58.2
8	9	0	2.5	0	7.5	0	5.36	1.56	3.91	37.8
^e 9	9	0	5	-1	6.5	-1	7.21	1.11	4.78	56.9
10	9	0	0	1	8.5	1	2.35	0.66	0.02	27.3
11	9	0	5	-1	8.5	1	6.44	0.98	3.49	20.3
^e 12	9	0	2.5	0	7.5	0	5.15	1.49	3.63	17.1
13	15	1	2.5	0	8.5	1	4.69	1.55	3.29	44.7
14	15	1	2.5	0	6.5	-1	4.68	1.49	3.22	33.3
15	15	1	5	-1	7.5	0	6.27	0.95	3.21	58.7
16	15	1	0	1	7.5	0	2.42	0.66	0.03	25.8

^aToplam hidrojen verimi, mmol H₂/g COD, ^bToplam hidrojen üretimi, mmol

^cFoto fermentasyon hidrojen verimi, mmol H₂/g COD, ^dSon *R. palustris* canlı hücre sayısı, CFU/mL

^eMerkez noktalar

Elde edilen modeller;

$$Y1_{\text{kodlu}} = 5.25+0.009X_1+2.05X_2-0.17X_3-0.18X_1X_2-0.095X_1X_3+0.049X_2X_3-0.54X_1^2-0.25X_2^2-0.17X_3^2$$

$$Y1_{\text{gerçek}} = -7.38+0.42X_1+0.99 X_2+2.43X_3-0.012 X_1X_2-0.016X_1X_3+0.02X_2X_3-0.01X_1^2-0.04X_2^2-0.17X_3^2$$

$$Y2_{\text{kodlu}}=1.54+0.02X_1+0.18 X_2+0.005 X_3-0.024X_1X_2-0.012X_1X_3-0.034X_2X_3-0.054X_1^2-0.66X_2^2-0.029X_3^2$$

$$Y2_{\text{gerçek}} =-1.57+0.05X_1+0.72X_2+0.5X_3-1.61X_1X_2-2.07 X_1X_3-0.01 X_2X_3-1.5X_1^2-0.11 X_2^2-0.03X_3^2$$

$$Y3_{\text{kodlu}}=3.79-0.03X_1+1.95 X_2-0.096X_3-0.254X_1X_2-0.096X_1X_3-0.32X_2X_3-0.47X_1^2-1.46X_2^2-0.25X_3^2$$

$$Y3_{\text{gerçek}} =-17.71+0.39X_1+3.07X_2+4.09X_3-0.02X_1X_2-0.02X_1X_3-0.13X_2X_3-0.01X_1^2-0.23 X_2^2-0.25X_3^2$$

$$Y4_{\text{kodlu}}=5.9E8+1.7E8X_1+2.6E8X_2-4E7X_3+7.4E7X_1X_2-2.4E7X_1X_3+7.3E6X_2X_3+8E7X_1^2-3.6E8X_2^2-2.6E6X_3^2$$

$$Y4_{\text{gerçek}} =-4.5E7+5.7E6X_1+3.2E8X_2-2.8E7X_3+5E6X_1X_2-4E6X_1X_3+2.9E6X_2X_3+2.2E6X_1^2-5.7E7X_2^2-2.6E6X_3^2$$

Çizelge 6.9 Toplam hidrojen verimi, mmol H₂/ g COD ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-değeri Prob>F	
Model	35.59	9	3.95	31.69	0.0002	önemli
A- Palustris aktarımı	6.880E-004	1	6.880E-004	5.513E-004	0.9432	
B- Seyreltme	33.65	1	33.65	269.60	<0.0001	
C- pH	0.23	1	0.23	1.86	0.2211	
AB	0.13	1	0.13	1.06	0.3437	
AC	0.036	1	0.036	0.29	0.6117	
BC	9.632E-003	1	9.632E-003	0.077	0.7905	
A ²	1.16	1	1.16	9.33	0.0224	
B ²	0.26	1	0.26	2.08	0.1990	
C ²	0.11	1	0.11	0.9	0.3801	
Residual	0.75	6	0.12			
Lack of fit	0.72	3	0.24	21.32	0.0159	önemli
Pure error	0.034	3	0.011			
Cor Total	36.34	15				

Çizelge 6.9'dan, 31.69 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda B ve A² önemli parametrelerdir ve R²=0.9794'dir.

Çizelge 6.10 Toplam hidrojen üretimi, mmol H₂ ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-değeri Prob>F	
Model	2.03	9	0.23	37.17	0.0001	önemli
A- Palustris aktarımı	3.086E-003	1	3.086E-004	0.51	0.05022	
B- Seyreltme	0.26	1	0.26	42.99	0.0006	
C- pH	1.906E-004	1	1.906E-004	0.031	0.8650	
AB	2.338E-003	1	2.338E-003	0.39	0.5573	
AC	6.143E-004	1	6.143E-004	0.10	0.7609	
BC	4.743E-003	1	4.743E-003	0.78	0.4103	
A ²	0.012	1	0.012	1.93	0.2138	
B ²	1.74	1	1.74	287.21	<0.0001	
C ²	3.450E-003	1	3.450E-003	0.57	0.4790	
Residual	0.036	6	6.058E-003			
Lack of fit	0.026	3	8.705E-003	2.55	0.2310	önemli değil
Pure error	0.010	3	3.411E-003			
Cor Total	2.06	15				

Çizelge 6.10'dan, 37.17 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda B ve B² önemli parametrelerdir ve R²=0.9824'dir.

Çizelge 6.11 Foto fermentasyon H_2 verimi, mmol H_2 / g COD ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-değeri Prob>F	
Model	74.9	9	8.32	6.5	0.0168	önemli
A- Palustris aktarımı	0.84	1	0.84	0.66	0.4475	
B- Seyreltme	59.41	1	59.41	46.43	0.0005	
C- pH	0.63	1	0.63	0.49	0.5101	
AB	2.59	1	2.59	2.03	0.2045	
AC	0.068	1	0.068	0.053	0.8258	
BC	1.56	1	1.56	1.22	0.3115	
A ²	0.83	1	0.83	0.65	0.4518	
B ²	5.29	1	5.29	4.13	0.0883	
C ²	3.69	1	3.69	2.88	0.1406	
Residual	7.68	6	1.28			
Lack of fit	6.78	3	2.26	7.56	0.0654	önemli
Pure error	0.90	3	0.30			
Cor Total	82.58	15				

Çizelge 6.11’den, 28.92 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda B ve B² önemli parametrelerdir ve R²=0.9775’tir.

Çizelge 6.12 *R. palustris* canlı hücre sayımı, CFU/mL ANOVA sonuçları

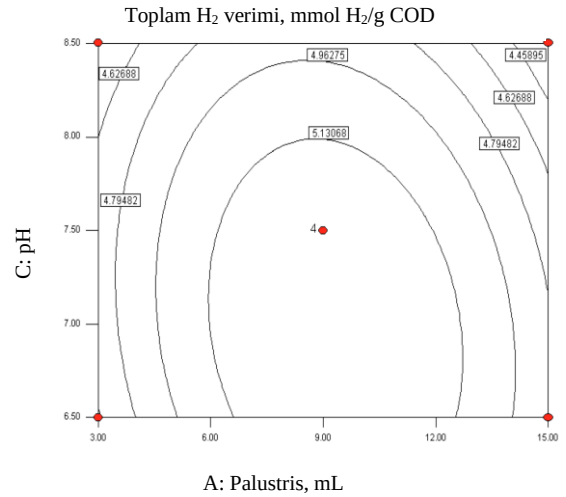
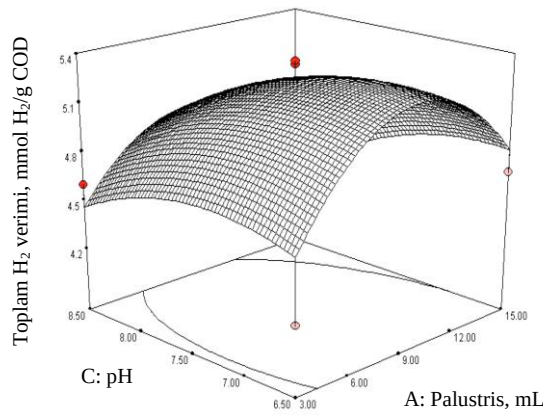
Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F Değeri	p-değeri Prob>F	
Model	1.325 E+018	9	1.472 E+17	12.67	0.0029	önemli
A- <i>R. palustris</i> aktarım	2.332 E+017	1	2.332 E+17	20.08	0.0042	
B- Seyreltme	5.217 E+017	1	5.217 E+17	44.91	0.0005	
C- pH	1.272 E+016	1	1.272 E+16	1.09	0.3357	
AB	2.190 E+016	1	2.190 E+16	1.89	0.2188	
AC	2.209 E+015	1	2.209 E+15	0.19	0.6780	
BC	2.102 E+014	1	2.102 E+14	0.018	0.8974	
A ²	2.536 E+016	1	2.536 E+16	2.18	0.1900	
B ²	5.073 E+017	1	5.073 E+17	43.67	0.0006	
C ²	2.756 E+013	1	2.756 E+13	2.373E-003	0.9627	
Residual	6.970 E+016	6	1.162 E+16			
Lack of fit	5.925 E+016	3	1.975 E+16	5.67	0.0941	önemli değil
Pure error	1.046 E+016	3	3.486 E+15			
Cor Total	1.394 E+018	15				

Çizelge 6.12’den 12.67 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda A, B ve B² önemli parametrelerdir ve R²=0.9775’tir.

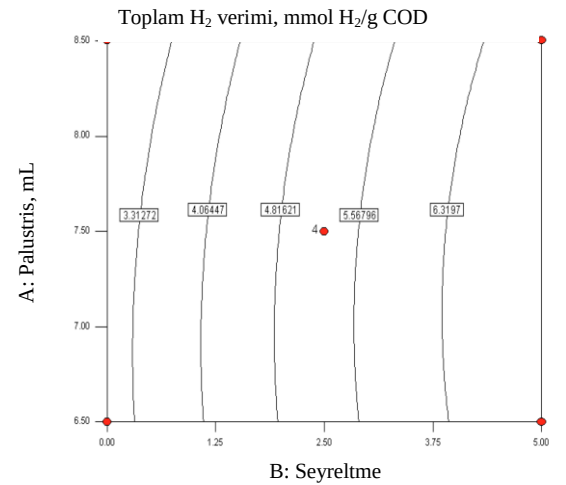
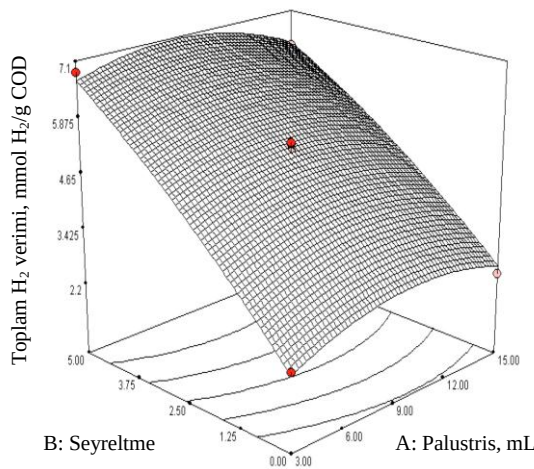
Toplam hidrojen verimi, toplam hidrojen üretimi, foto fermentasyon verimi ve son *R. palustris* hücre sayımının mikroorganizma aktarımı, seyreltme oranı ve pH ile değişimi

2 ve 3 boyutlu kontur grafiklerinde şekil 6.11-14 (b-c) verilmiştir. Şekillerden görüldüğü üzere bütün yanıtlarda en yüksek etki pH ve palustris aktarım oranının yanı sıra seyreltme oranıdır. Şekil 6.11 a'da pH ve *R. palustris* arasındaki ilişki verilmiştir ve en yüksek toplam hidrojen verimine pH 7.5 , *R. palustris* aktarımının 9 ve seyreltme oranının 2.5 kez olduğu durumda ulaşılmıştır. Ancak, Şekil 6.11 b ve c'de seyreltme oranının etkisinin çok yoğun olmasından kaynaklı pH ve aktarım oranının etkisi yanıtım içinde kaybolmuştur. Toplam hidrojen verimi düşük besi ortamı derişiminden dolayı seyreltme oranının arttırılmasıyla artmaktadır. Çünkü verim tanımı besi ortamı başıdır. Ancak mikroorganizmanın çoğalmasına yetecek miktarda besi ortamı olmayışı verimi düşürmektedir.

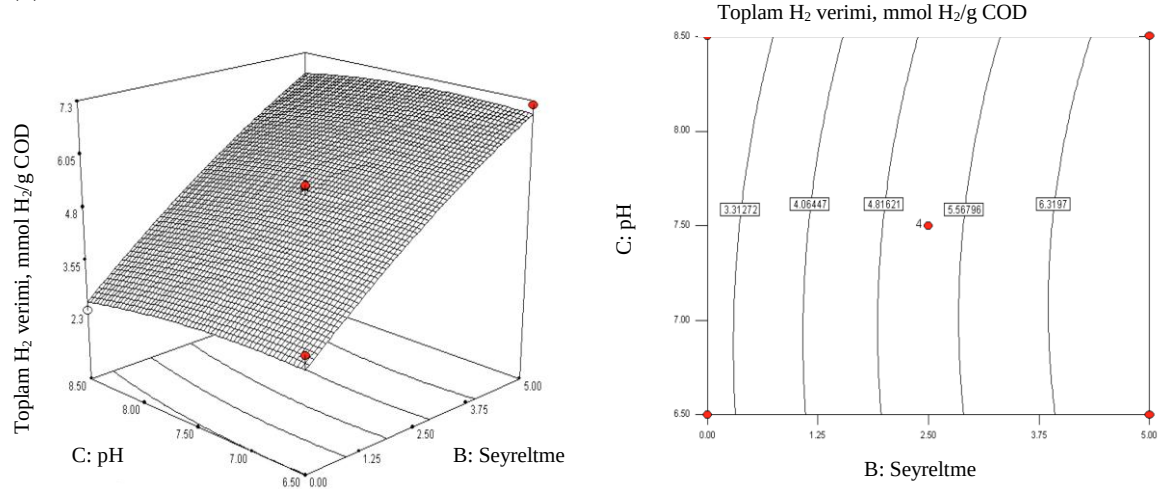
(a)



(b)



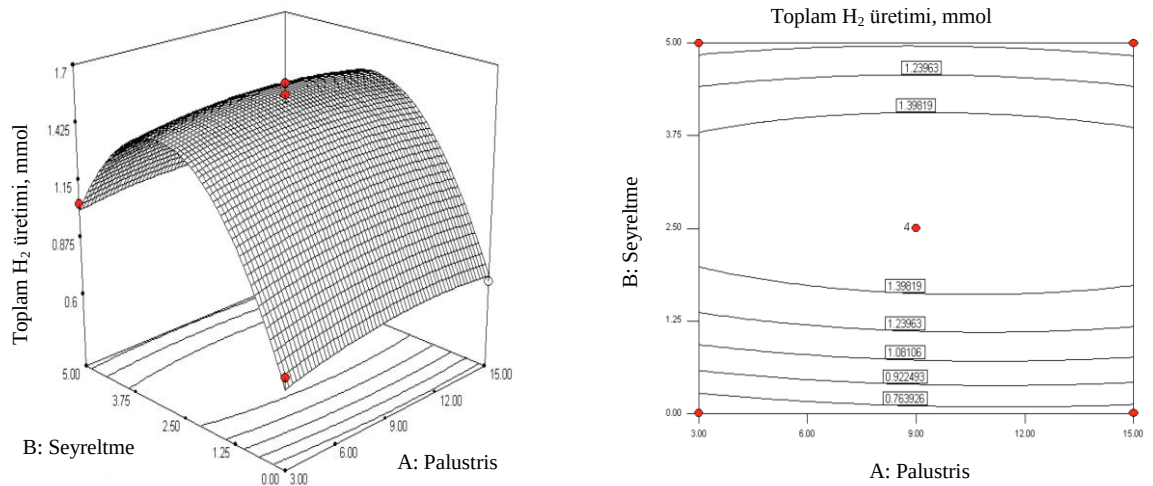
(c)



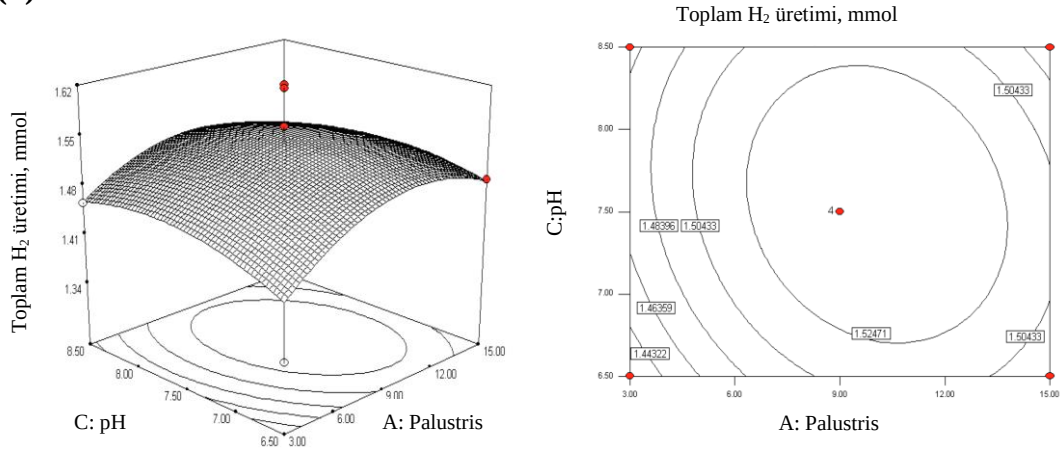
Şekil 6.11 Toplam hidrojen verimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H₂ veriminin, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H₂ veriminin, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H₂ veriminin, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi

Şekil 6.12 a-c'den görüldüğü üzere hidrojen üretimi (Y₂) genellikle besi ortamı derişimi ile ilgilidir. En yüksek hidrojen üretimine besi ortamı seyreltme oranının 2.5 kat olduğu durumda ulaşılmıştır. Bu derişimde en yüksek etkinin görölmesinin nedeni, yüksek derişimde (en az seyreltme) oldukça çok organik asit birikimi, düşük derişimde (en çok seyreltme) ise besi ortamı azlığındandır. Şekil 6.12 b'de seyreltme oranının 2.5 katta sabit olduğu durumda, *R. palustris* aktarımı ve pH etkileşimi daha görünürdür ve en yüksek üretime merkez noktasında ulaşılmıştır.

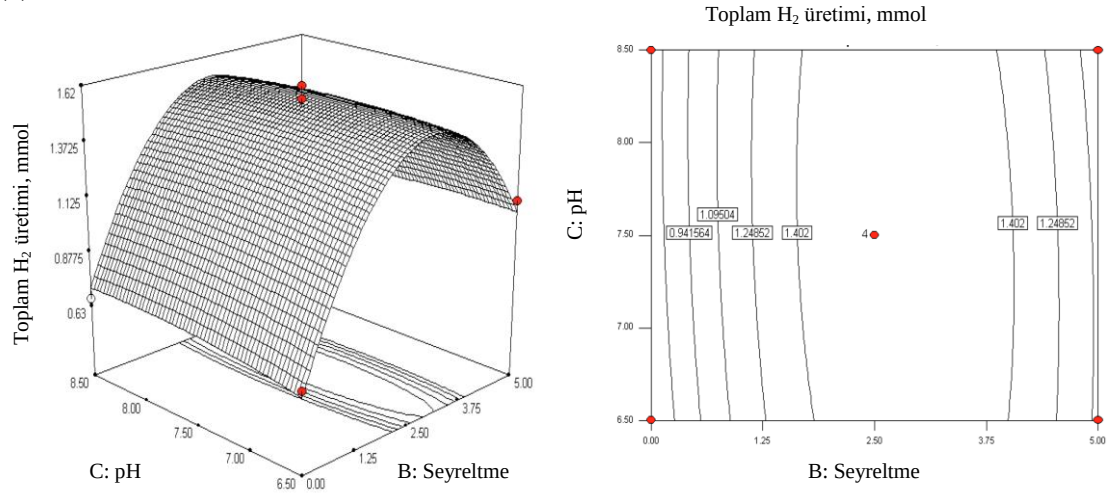
(a)



(b)



(c)



Şekil 6.12 Toplam hidrojen üretimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler

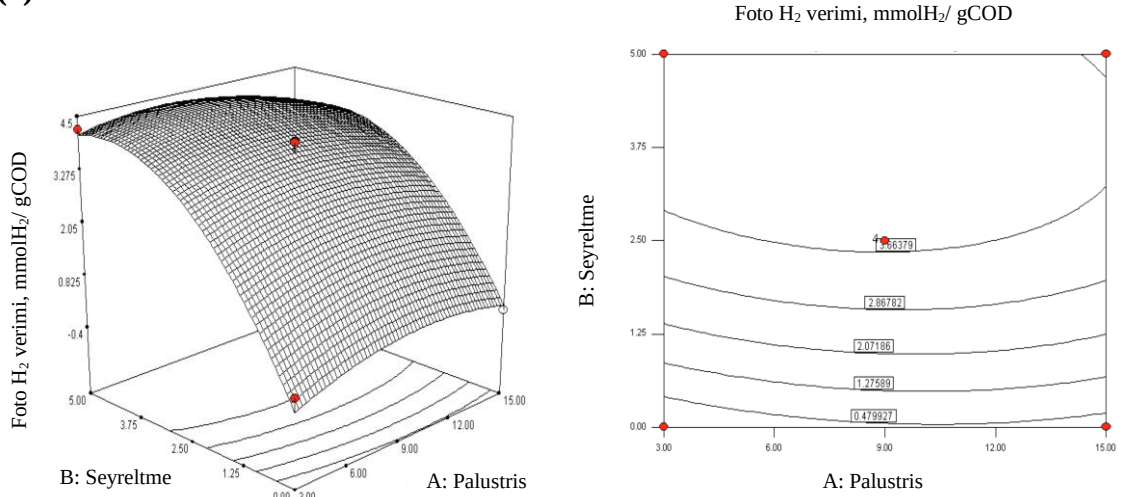
a. H₂ üretiminin, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H₂ üretiminin, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H₂ üretiminin, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi

Üçüncü yanıt, poto fermentasyonda elde edilen verimdir (Y₃). Şekil 6.13 a-c'den görüldüğü üzere foto fermentasyon güçlü bir şekilde organik asit birikiminden dolayı diğer yanıtlarda olduğu gibi karanlık fermentasyon atığının seyreltme oranından etkilenmiştir. Toplam hidrojen üretim verimi olan yanıt düşük organik asit derişiminden kaynaklı (Y₁) seyreltme oranının artmasıyla artmaktaydı, ancak foto fermentasyon verimine (Y₃) bakacak olursak, seyrelme oranının 2.5 kat fazla olduğu durumda verimde hafif bir düşüş gözlenmektedir. Bu davranış fotofermantatif mikroorganizmanın yüksek besli ortamında ve daha fazla besin tüketerek verimin

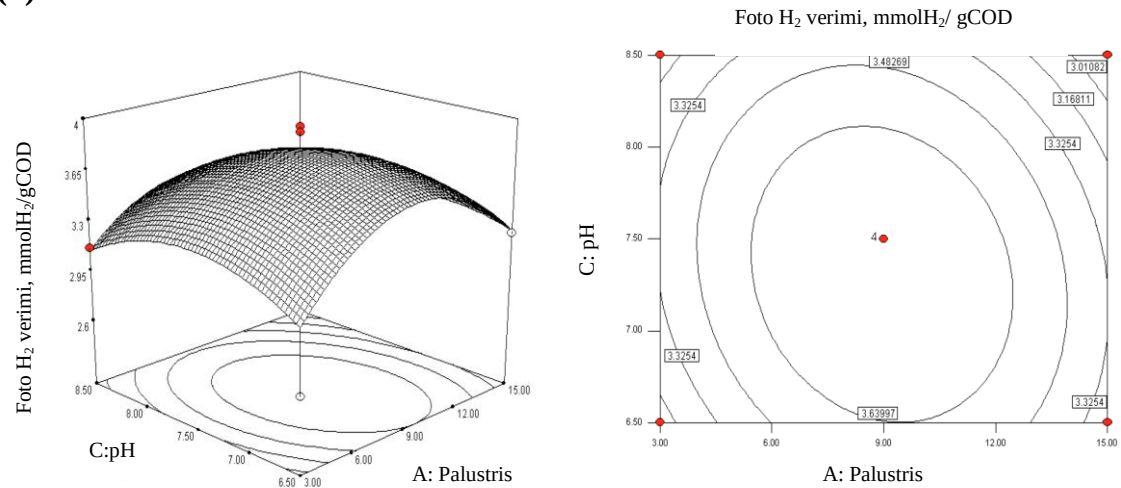
düşmesine neden olan düşük besi ortamı derişiminde dahi, COD giderim başarısını göstermektedir.

Son yanıtım *R. palustris* mikroorganizmasının davranışını gözlemlemek adına gerçekleştirilen, seyreltme oranı, pH ve başlangıç mikroorganizma aktarım oranının son *R. palustris* üzerine etkisini gözlemlemektir. Bu amaçla dökme metodu (pour plate) uygulanmıştır. Şekil 6.14 a-c'den görüldüğü üzere diğer yanıtlarda olduğu gibi seyreltme oranı *R. palustris* canlı hücresinde (Y₄) oldukça etkilir.

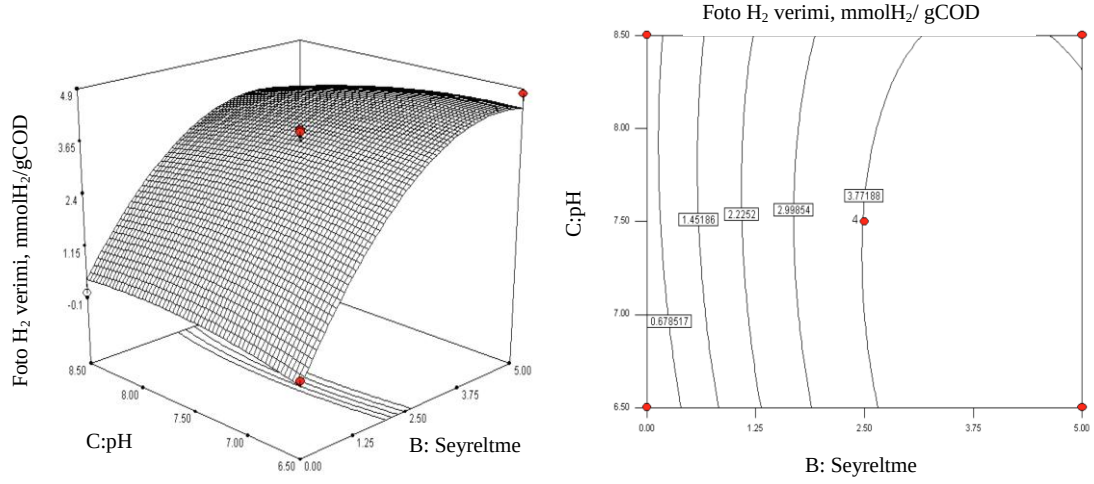
(a)



(b)

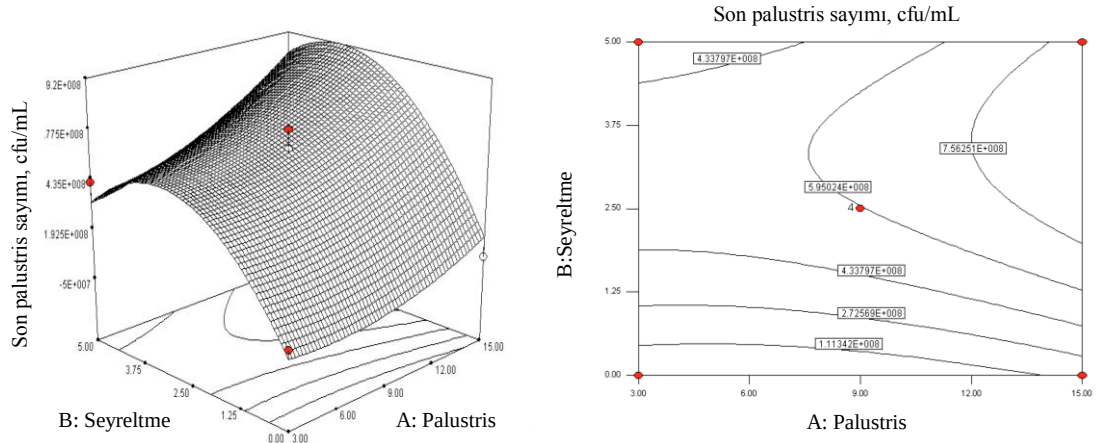


(c)

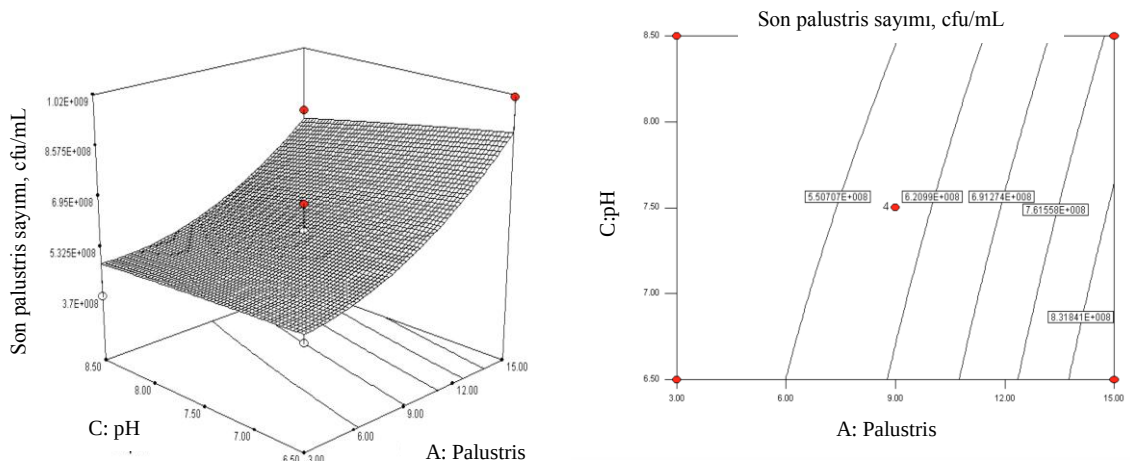


Şekil 6.13 Foto hidrojen verimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H₂ veriminin, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H₂ veriminin, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H₂ veriminin, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi

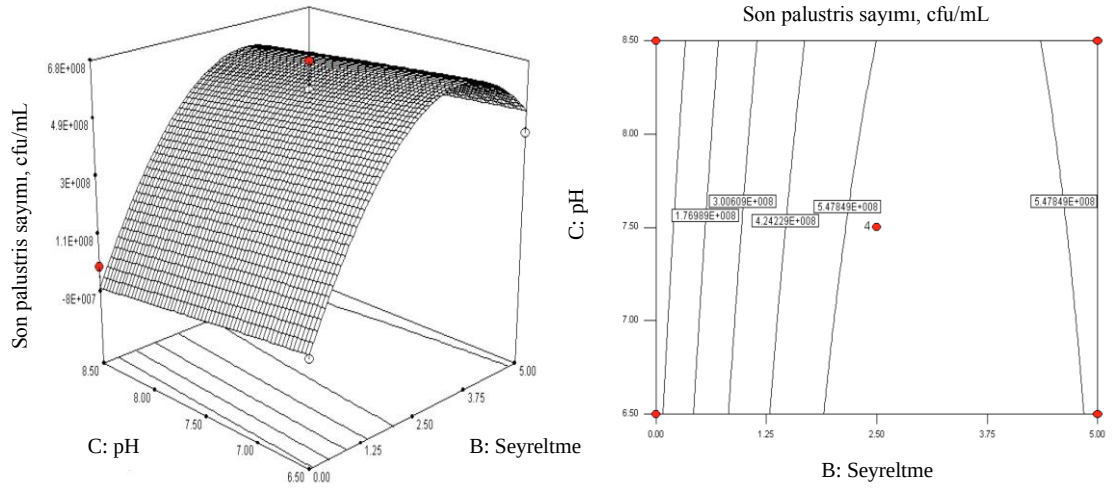
(a)



(b)



(c)



Şekil 6.14 Son *R. palustris* sayısı için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. *R. palustris* sayısının, sabit 7.5 pH değerinde, seyreltme oranı ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. *R. palustris* sayısının, 2.5 kat sabit seyreltme oranında, pH ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. *R. palustris* sayısının, 9 mL sabit mikroorganizma aktarımında, pH ve seyreltme oranı ile değişimi

Sonuç olarak ardışık, karanlık ve foto fermentasyonda, karanlık fermentasyon atığının besi ortamı olarak kullanıldığı foto fermentasyon basamağında, DFE seyreltme oranının, pH ve mikroorganizma aktarımının yanında, biyohidrojen üretiminde oldukça büyük öneme sahip olduğu görülmüştür. Şu kesinlikle göz önünde bulundurulmalıdır ki, besi ortamı bileşimi ve derişimi belirlenmeden, optimum pH ve mikroorganizma aktarım oranının belirlenmesi yüksek hidrojen verimi, hidrojen üretimi, yüksek COD giderimi açısından yeterli olamamaktadır. Bu nedenle öncelikle besi ortamı bileşimi belirlenmelidir.

6.6.6 *C. butyricum* ve *R. palustris* ile birleşik (combined) fermentasyon

C. butyricum ve *R. palustris* mikroorganizmalarının karışım kültürü ile hidrojen verimi ve üretiminin arttırılabilmesi için karanlık ve foto fermentasyon birleşik (combined) fermentasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tek basamaklı fermentasyonun avantajı az iş gücü ve düşük maliyet açısından kullanılmaktadır ancak, mikroorganizmalar farklı besi ortamlarına ihtiyaç duyduğundan, besi ortamı bileşiminin optimum değeri belirlenmelidir. Hidrojen verimini arttırmak amacıyla, bağımsız değişkenler olarak

seçilen besi ortamı derişimi (glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu), bufer derişimi ve mikroorganizma aktarım oranı (P:C) yüzey yanıt metodu (RSM) olan Box Behnken tasarımı (BBD) ile belirlenmiş ve deney tasarımı uygulanmıştır. Deneyler *Clostridium butyricum* and *Rhodopseudomonas palustris* mikroorganizmalarının farklı oranlarında aktarımıyla, besi ortamı olarak patates nişastası/glikoz kullanılarak 30 °C, 50 W/m² ışık yoğunluğunda ve 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. En yüksek hidrojen verimine (HY) 6.4 mol H₂/mol glikoz olarak besi ortamı derişiminin 15 g/L, tampon derişiminin 50 mM ve mikroorganizma aktarım oranının (P:C, v/v) 3 olduğu durumda ulaşılmıştır.

Bufer ve besi ortamı derişiminin hidrojen verimi üzerinde oldukça yüksek etkisi olduğu görülmüş, nedeninin ise karanlık ve foto fermentative bakterilerin optimum pH değerinde üretim gerçekleştirme ihtiyacı olarak tanımlanmıştır.

Birleşik fermentasyon besi ortamı patates ve glikoz kullanılarak hazırlanmıştır. Patatesler yıkanmış, soyulmuş, tartılmış (100 g) ve suyu çıkarılmıştır. Patates suyu miliq su kullanılarak 1 L'ye tamamlanmış ve üzerine glikoz eklenmiştir. Glikoz ile zengileştirilmiş patates suyunun glikoz denklik derişimi Çizelge 6.13'te verilmiştir. Ortam 0.56 g/L FeSO₄-EDTA, azot ihtiyacı için 1 g/L maya özütü, 5 mL/L RCV super tuz çözeltisi ile desteklenmiştir. 7.6 pH değerindeki tampon çözeltisi deney tasarımına bağlı olarak eklenmiştir. Deneyler 100 mL çalışma hacmine sahip şişelerde gerçekleştirilmiştir. Aktarım sonrasında, şişelerdeki tepe boşluğu 15 dk süresince Argon gazı ile süpürülmüş ve anaerobik ortam sağlanmıştır. 30 °C, 40 W/m² ışık yoğunluğunda ve 120 rpm karıştırma hızında inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 6.13 Başlangıç glikoz içeriği

Patates suyu seyreltme oranı	Eklenen glikoz, g/L	Toplam glikoz içeriği, g/L
20x	0.5	0.697
6.67x	1.5	1.841
2.5x	2.5	3.160

Anahtar parametrelerinin optimizasyonu için, 3^k Box-Behnken Design (Annadurai et al., 1999) Design Expert programı (StatEase, Inc., USA) kullanılarak hidrojen veriminin artırılması amacıyla kullanılmıştır. Hidrojen verimi (Y₁), toplam hidrojen üretimi (Y₂), glikoz tüketimi (Y₃) ve COD giderimi (Y₄) yanıtım olarak seçilmiş bunun yanı sıra, mikroorganizma aktarım oranı (P:C, v/v) (X₁), bufer derişimi (X₂) ve besi ortamı derişimi (X₃) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Box-Behnken tasarım sonuçları Çizelge 6.14’te verilmiştir.

Çizelge 6.14 Box Behnken deney tasarımının sonuçları

Deneme	^a P:C, v/v		Bufer derişimi (mM)		Besi ortamı derişimi (g/l)		^b Hidrojen verimi (Y ₁)	^c Hydrojen üretimi (Y ₂)	Glikoz tüketimi (%) (Y ₃)	COD giderimi (%) (Y ₄)
	X ₁	Code	X ₂	Code	X ₃	Code				
1	1	-1	20	-1	15	0	0.7	0.5	71.5	44.4
2	1	-1	50	0	5	-1	1.7	0.7	52.3	30.9
3	1	-1	50	0	25	1	1.4	2.0	76.5	44.2
4	1	-1	80	1	15	0	1.0	0.7	80.9	54.0
^d 5	3	0	50	0	15	0	5.5	3.6	77.5	54.9
^d 6	3	0	50	0	15	0	7.3	4.7	79.1	54.2
^d 7	3	0	50	0	15	0	6.0	3.8	77.5	58.2
8	3	0	20	-1	5	-1	4.7	2.0	57.5	37.8
^d 9	3	0	50	0	15	0	8.5	5.5	72.3	56.9
10	3	0	80	1	5	-1	0.3	0.1	34.6	27.3
11	3	0	80	1	25	1	1.1	1.4	72.4	20.3
12	3	0	20	-1	25	1	0.1	0.1	71.1	17.1
13	5	1	50	0	25	1	3.7	4.5	74.7	44.7
14	5	1	20	-1	15	0	0.2	0.1	66.5	33.3
15	5	1	80	1	15	0	4.0	3.3	76.0	58.7
16	5	1	50	0	5	-1	2.8	1.2	57.1	25.8

^a*R. palustris*:*C. butyricum* mL/mL

^bmol H₂/mol glikoz

^cKesikli işletim sonunda toplam hidrojen üretimi, mmol

^dmerkez noktaları

$$Y1_{kodlu} = 6.82 + 0.74X_1 + 0.092X_2 - 0.38X_3 + 0.88X_1X_2 + 0.31X_1X_3 + 1.36X_2X_3 - 2.25X_1^2 - 3.12X_2^2 - 2.16X_3^2$$

$$Y1_{gerçek} = -6.16 + 2.78X_1 + 0.24X_2 + 0.34X_3 + 0.015X_1X_2 + 0.015X_1X_3 + 4.5E-003X_2X_3 - 0.56X_1^2 - 3.47E-003X_2^2 - 0.021X_3^2$$

$$Y3_{kodlu} = 76.6 - 0.85X_1 - 0.3X_2 + 11.7X_3 - 3.131E-003X_1X_2 - 1.7X_1X_3 + 6.05X_2X_3 + 1.7X_1^2 - 4.55X_2^2 - 13.1X_3^2$$

$$Y3_{gerçek} = 33.98 - 1.7X_1 + 0.2X_2 + 4.3X_3 - 5.21869E-005X_1X_2 - 0.08X_1X_3 + 0.02X_2X_3 + 0.4X_1^2 - 5.05605E-003X_2^2 - 0.13X_3^2$$

$$Y_{4_{\text{kodlu}}} = 56 - 1.4X_1 + 9.9X_2 + 6.96X_3 + 3.95X_1X_2 + 1.4X_1X_3 - 9.35X_2X_3 + 7.55X_1^2 - 15.98X_2^2 - 27.2X_3^2$$

$$Y_{4_{\text{gerçek}}} = -67.7 - 16.4X_1 + 2.4X_2 + 10.2X_3 + 0.07X_1X_2 + 0.07X_1X_3 - 0.03X_2X_3 + 1.9X_1^2 - 0.02X_2^2 - 0.3X_3^2$$

Çizelge 6.15 Toplam hidrojen verimi, mol H₂/mol glikoz için ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F	
Model	94.28	9	10.48	4.21	0.0471	Önemli
A-P:C (mL/mL)	4.43	1	4.43	1.78	0.2306	
B-Bufer derişimi (mM)	0.067	1	0.067	0.027	0.8748	
C-Besi ortamı derişimi (g/L)	1.16	1	1.16	0.47	0.5194	
AB	3.11	1	3.11	1.25	0.3064	
AC	0.38	1	0.38	0.15	0.7108	
BC	7.39	1	7.39	2.97	0.1356	
A ²	20.18	1	20.18	8.11	0.0292	
B ²	38.99	1	38.99	15.67	0.0075	
C ²	18.58	1	18.58	7.47	0.0340	
Residual	14.92	6	2.49			
Lack of Fit	9.49	3	3.16	1.75	0.3291	Önemli değil
Pure Error	5.43	3	1.81			
Cor Total	109.21	15				

Çizelge 6.15'ten 4.21 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda A², B² ve C² önemli parametrelerdir.

Çizelge 6.16 Hidrojen üretimi (mmol H₂) için ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F	
Model	40.92	9	4.55	8.09	0.0297	önemli
A-P:C (mL/mL)	1.32	1	1.32	2.34	0.2005	
B-Bufer derişimi (mM)	3.46	1	3.46	6.15	0.0682	
C-Besi ortamı derişimi (g/L)	2.10	1	2.10	3.74	0.1254	
AB	2.09	1	2.09	3.72	0.1259	
AC	0.13	1	0.13	0.24	0.6499	
BC	5.58	1	5.58	9.93	0.0345	
A ²	8.11	1	8.11	14.42	0.0191	
B ²	7.53	1	7.53	13.41	0.0216	
C ²	1.53	1	1.53	2.72	0.1746	
Residual	2.25	4	0.56			
Lack of Fit	3.729E-003	1	3.729E-003	4.985E-003	0.9482	Önemli değil
Pure Error	2.24	3	0.75			
Cor Total	43.17	13				

Çizelge 6.16'dan 8.09 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda BC, A² ve B² önemli parametrelerdir.

Çizelge 6.17 Glikoz tüketimi, % için ANOVA sonuçları

Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F	
Model	2034.24	9	226.03	5.17	0.0292	önemli
A-P:C (mL/mL)	5.80	1	5.80	0.13	0.7281	
B-Bufer derişimi (mM)	0.88	1	0.88	0.020	0.8917	
C-Besi ortamı derişimi (g/L)	1088.07	1	1088.07	24.90	0.0025	
AB	3.922E-005	1	3.922E-005	8.975E-007	0.9993	
AC	11.11	1	11.11	0.25	0.6321	
BC	146.61	1	146.61	3.36	0.1167	
A ²	11.67	1	11.67	0.27	0.6238	
B ²	82.83	1	82.83	1.90	0.2177	
C ²	687.28	1	687.28	15.73	0.0074	
Residual	262.17	6	43.70			
Lack of Fit	235.74	3	78.58	8.92	0.0527	Önemli değil
Pure Error	26.43	3	8.81			
Cor Total	2296.41	15				

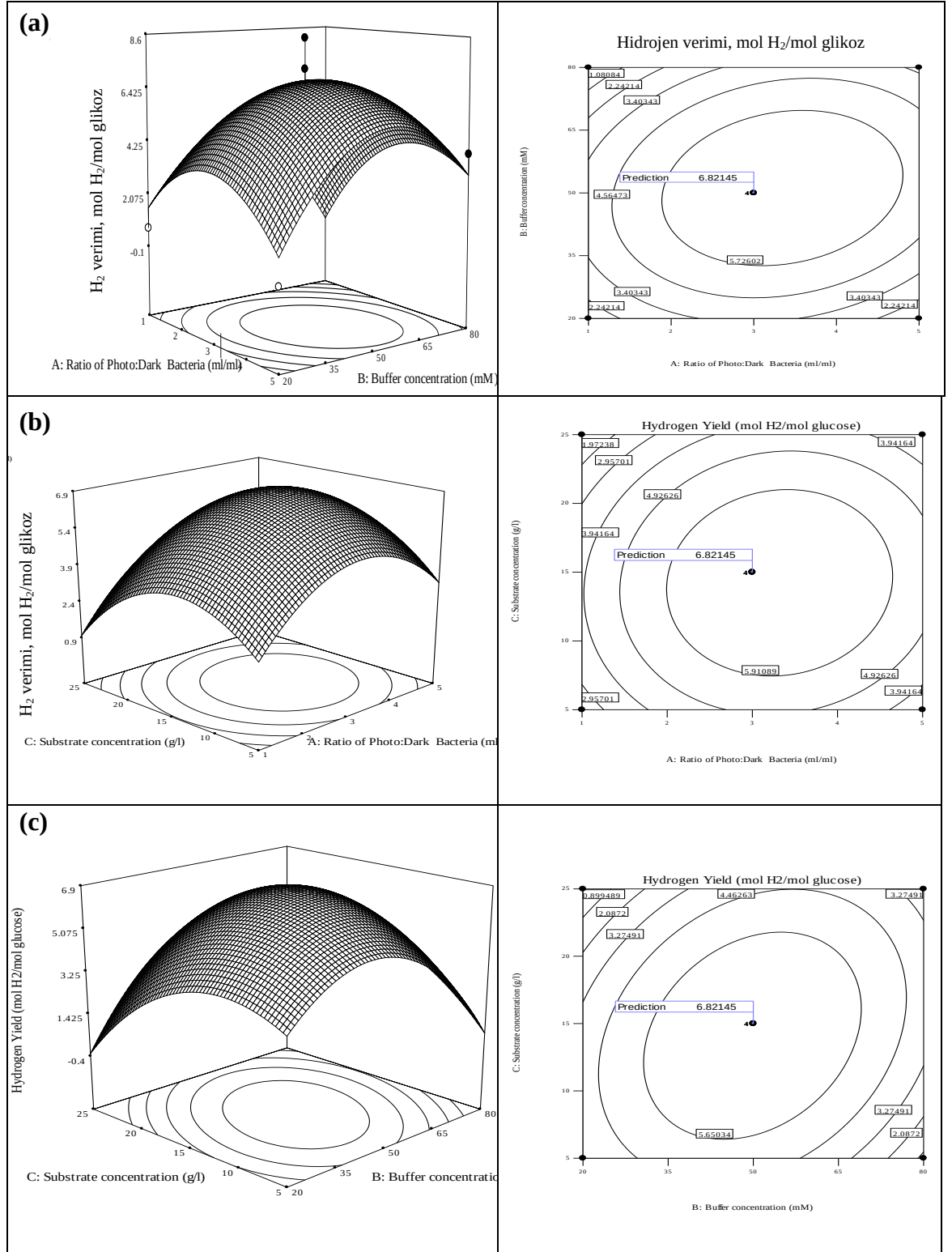
Çizelge 6.17’den, 5.17 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda C ve C² önemli parametrelerdir.

Çizelge 6.18 COD giderimi (%) için ANOVA sonuçları

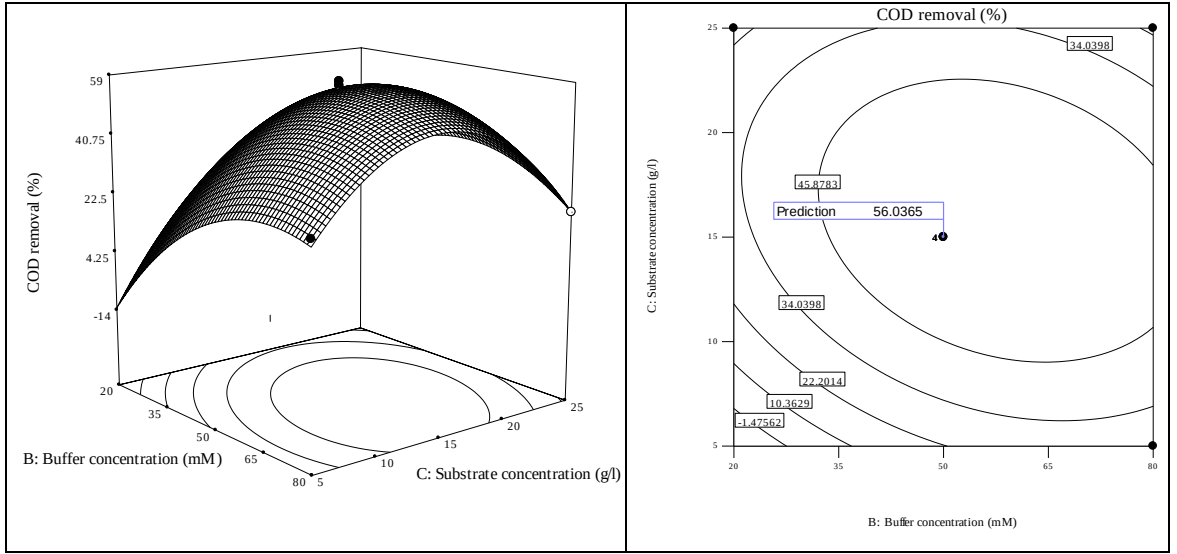
Kaynak	Karelerin toplamı	df	Karelerin ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F	
Model	2976.97	9	330.77	55.26	0.0002	önemli
A-P:C (mL/mL)	15.44	1	15.44	2.58	0.1691	
B-Bufer derişimi (mM)	519.12	1	519.12	86.73	0.0002	
C-Besi ortamı derişimi (g/L)	258.10	1	258.10	43.12	0.0012	
AB	62.50	1	62.50	10.44	0.0232	
AC	8.01	1	8.01	1.34	0.2996	
BC	174.75	1	174.75	29.20	0.0029	
A ²	182.32	1	182.32	30.46	0.0027	
B ²	817.51	1	817.51	136.58	< 0.0001	
C ²	2366.99	1	2366.99	395.45	< 0.0001	
Residual	29.93	5	5.99			
Lack of Fit	19.64	2	9.82	2.87	0.2014	Önemli değil
Pure Error	10.28	3	3.43			
Cor Total	3006.89	14				

Çizelge 6.18’den, 55.26 F değeri modelin önemini göstermektedir. Bu durumda B, C, AB, BC, A², B² ve C² önemli parametrelerdir.

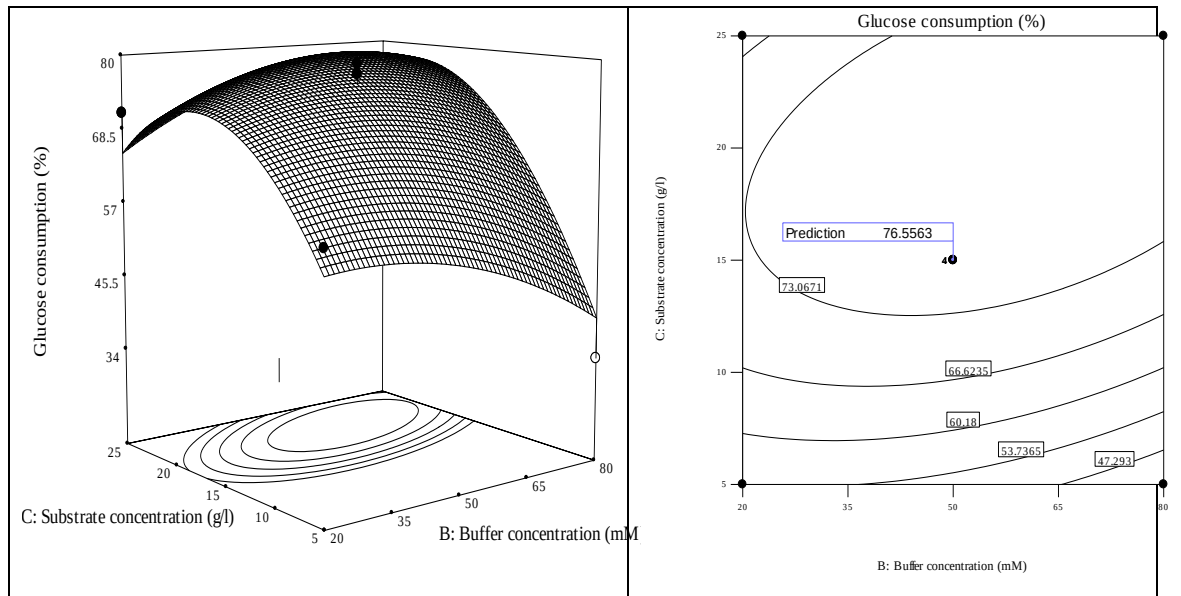
Karışım kültür ile hidrojen üretiminde hidrojen verim, üretim, glikoz tüketim ve COD giderim sonuçları verilmiştir.



Şekil 6.15 Hidrojen verimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. a. H_2 veriminin, 15 g sabit besi ortamı derişiminde, tampon derişimi ve mikroorganizma aktarım oranı ile b. H_2 veriminin, 50 mM sabit tampon derişiminde, besi ortamı derişimi ve mikroorganizma aktarım oranı ile c. H_2 veriminin, 3 kat sabit mikroorganizma aktarımında, besi ortamı ve tampon derişimi ile derişimi



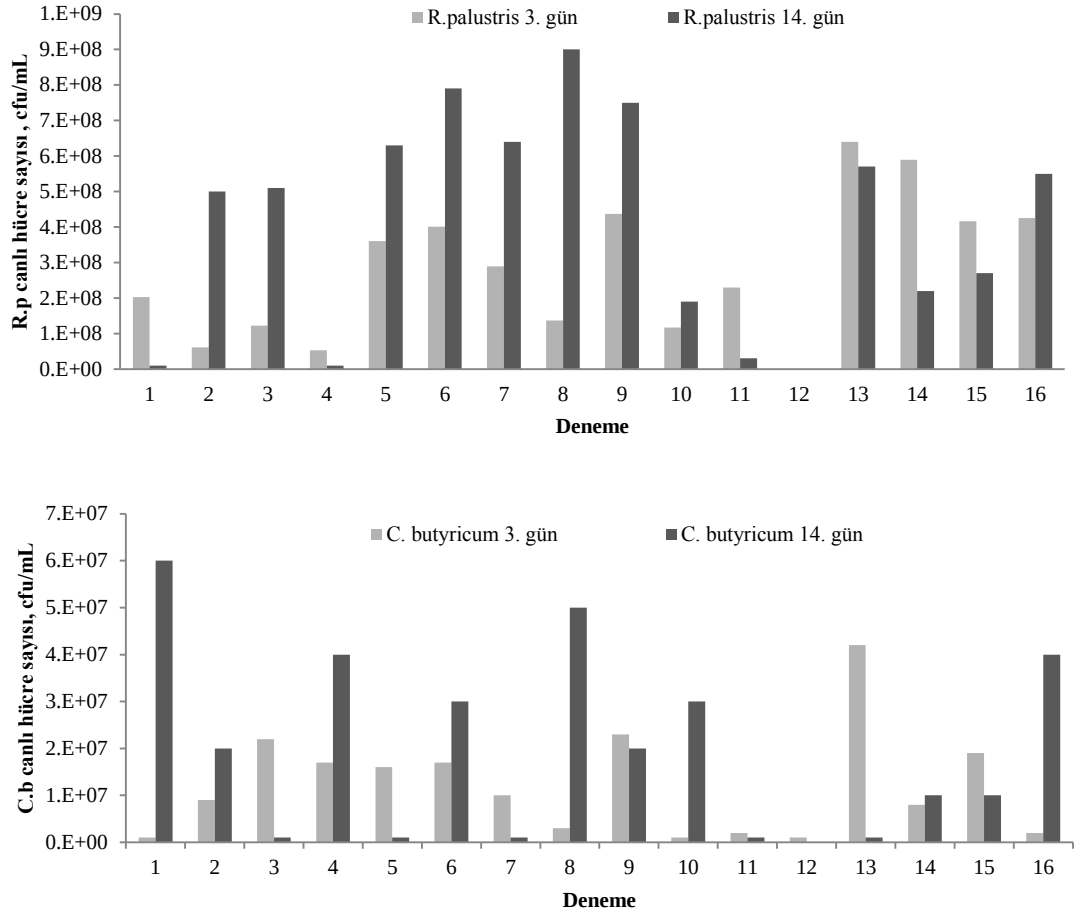
Şekil 6.16 COD giderimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. COD gideriminin, 3 kat sabit mikroorganizma aktarımında, besi ortamı ve tampon derişimi ile değışimi



Şekil 6.17 Glikoz tüketimi için 2 ve 3 boyutlu grafikler. Glikoz tüketiminin, 3 kat sabit mikroorganizma aktarımında, besi ortamı ve tampon derişimi ile değışimi

En yüksek hidrojen verimine (HY) 6.4 ± 1.3 mol H_2 /mol glikoz olarak besi ortamı derişiminin 15 g/L, tampon derişiminin 50 mM ve mikroorganizma aktarım oranının (P:C) 3 kat olduğu optimum koşullarda ulaşılmıştır. Bufer ve besi ortamı derişiminin hidrojen verimi üzerinde oldukça yüksek etkisi olduğu görülmüş, nedeninin ise karanlık

ve foto fermentative bakterilerin optimum pH değerinde üretim gerçekleştirme ihtiyacı olarak tanımlanmıştır. Maksimum COD giderimi 56 ± 1.9 olarak bulunmuştur. Organik asitlerin birikimi, pH düşüşü olmasa da karanlık ve fotofermantatif mikroorganizma çoğalmasını inhibe edici özelliği ile mikroorganizmaların karbonhidrat kullanımını ve COD giderimini engelleme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 6.18 Dökme (pour plate) metodu ile *Rhodopseudomonas palustris* ve *Clostridium butyricum* 'un 3. ve 14. günde canlı hücre sayımı

Dökme (pour plate) metodu ile *Rhodopseudomonas palustris* ve *Clostridium butyricum* 'un fermentasyon ortamındaki davranışlarının izlenebilmesi için 3. and 14. günde canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.18'den açıkça görülmektedir ki *Rhodopseudomonas palustris* *Clostridium butyricum* 'dan beklenildiği üzere daha yüksek mikroorganizma sayısına sahiptir. Bu durumun nedeni *Rhodopseudomonas palustris* 'in hidrojen kapasitesi ve *Clostridium butyricum* 'un tampon ve besi

ortamından daha fazla etkileniştir. 14. gün sonunda *Rhodopseudomonas palustris*'in en yüksek hücre derişimine en düşük fosfat tampon derişimi ve en düşük besi ortamı derişiminde ulaşılmıştır (run 8). Ancak hidrojen verimi ve üretimi merkez noktası değerinin neredeyse yarısı kadardır. Bu durumda, pH değerini istenen değerde tutmak için, düşük tampon derişimi (20 mM) düşük derişimlerde etkili olurken (5 g/L), besi ortamı azlığı hidrojen üretimi için yeterli olamamaktadır. Ayrıca iki mikroorganizma için de besi ortamının en yüksek değerde olduğu durumda (25 g/L) ve düşük tampon derişiminde (20 mM) hiçbir canlı mikroorganizmaya rastlanmamıştır (run 12). Bu durum pH değerinin yüksek besi ortamında 5.14 değerine düşmesi ile tampon derişiminin düşüşü karşılayamaması ve üretimin durmasıyla sonuçlanmıştır. Diğer bir taraftan tampon derişiminin yüksek olması 3. günden sonra *Rhodopseudomonas palustris*'in mikroorganizma sayısını düşürmüştür. Bu davranış, besi ortamının iyonik gücünün oluşturduğu ozmotik etkinin, mikroorganizma toleransının besi ortamında düşmesinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak besi ortamı derişimi ve fosfat tampon ilavesinin mikroorganizma çoğalmasında etkili olduğu açıkça görülmüştür.

7. TARTIŞMA ve YORUM

Doktora tezi kapsamında öncelikle karanlık fermantasyon ile biyohidrojen üretim veriminin arttırılabilmesi için optimum ve ekonomik açıdan uygun besi ortamı (glikoz, patates suyu, peynir altı suyu, şeker pancarı, patates nişastası) derişimi ve bileşimi belirlenmiştir. İkinci adımda seçilen zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında, *Clostridium butyricum* ve *Enterobacter aerogenes* karışım kültür oranı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Üçüncü adımda ise zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamı ve 10:1 (C:E) karışım kültür oranında, katkı maddelerinin (demir, amonyum, magnezyum, nikel) farklı derişimlerde besi ortamına ilavesinin biyohidrojen üretim verimine etkisi incelenmiştir. Yapılan küçük ölçek çalışmalarının ardından belirlenen; besi ortamı, mikroorganizma aktarım oranı ve katkı maddelerinin derişimi ile biyoreaktörde fermantasyon çalışmalarına geçilmiştir. Biyohidrojen üretim veriminin en yüksek olduğu katkı maddeleri ile zenginleştirilmiş patates suyu besi ortamında, 10:1 (C:E) karışım kültür oranında mikroorganizmalar çoğaltılarak, dinamik analiz ile pH' ın zamanla değişimi incelenmiştir. Sistemi tanımlayan en uygun modelin belirlenmesi için YEKK ile sistem tanımlama çalışmaları yapılmış ve bulunan modelin kullanıldığı kontrol algoritmaları (PID, GMV) ile pH kontrolü gerçekleştirilmiştir. Deneysel bulgular aşağıda sıralanmıştır.

Bulgular;

1. **121 °C** de sterillenmiş ve parçalanmış, **azot gazı geçirilerek** (anaerobik kabin içerisinde oksijensiz hale getirmek ekonomik açıdan uygun değildir) oksijensiz hale getirilmiş **400 g/L'lik patates suyu** ile hidrojen üretimi en yüksek değerine ulaşmıştır.
2. İki farklı sıcaklıkta yapılan deney setlerinde 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirilen deneyin lag fazını kısaltması ve kümülatif gaz üretiminde daha yüksek hacme ulaşması sonraki çalışmalar için **en uygun sıcaklığın 37 °C** olması gerekliliğini göstermiştir.

3. H_2 verimini yükseltmek amacıyla karbon kaynağınca zenginleştirilen besi ortamının, **en uygun besi ortamı derişiminin 400 g/L patates suyu üzerine eklenen 1 g/L'lik glikoz (3.635 g/L)** olduğu görülmüştür.
4. Mikroorganizma aktarım oranları için yapılan deney setlerinden karışım kültür kullanımının uygunluğu belirlenmiştir. En yüksek hidrojen verimine **10:1 mikroorganizma karışım kültüründe** elde edilmiştir.
5. Besi ortamı zenginleştirmede katkı maddeleri ile yüksek verim değerine **1.5 g/L $FeSO_4$ ve 1 g/L $MgCl_2$** 'nin bulunduğu ortamda ulaşılmıştır.
6. Belirlenen besi ortamı türü, bileşimi, mikroorganizma aktarım oranı ile biyoreaktör çalışmalarına başlanmıştır. 4 L çalışma hacmine sahip biyoreaktörde öncelikle açık hat fermantasyon gerçekleştirilmiş pH'ın kontrolsüz ortamda değişimi incelenmiştir.
7. **Açık hat fermantasyon** sonrasında fermantasyon süresince pH düşüşünü karşılayabilecek mikroorganizma çoğalmasını engellemeyecek asit baz çifti seçilmiştir.
8. Seçilen asit baz çiftleri ile yatışkın koşul deneyleri gerçekleştirilmiş ve ardından farklı dinamik etkiler altında **pH değişimi** incelenmiştir. Dinamik çalışmalar, MATLAB programında Simulinkte hazırlanan model ile pompaya farklı basamak etkilerin verilmesi ile gerçekleştirilmiştir.
9. Mikroorganizmasız ve mikroorganizmalı ortamda sistemin parametrik modelinin belirlenmesi amacıyla dinamik etkilerden elde edilen deneysel veriler MATLAB paket programında yazılmış olan YEKK algoritmasında kullanılmıştır. Sistemi ifade eden en uygun ARMAX modelin bulunması amacıyla farklı kovaryans matris başlangıç değeri (**P**), unutma çarpanı değeri (**λ**) ve mertebelerde algoritma çalıştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda kestirim

performans kriterleri olan maliyet fonksiyonu V_N ve ortalama hata değerin toplamı M göz önüne alarak model uygunluğuna karar verilmiştir.

10. Sistemi tanımlayan en uygun **ARMAX** modele mikroorganizmalı ortamda gerçekleştirilen dinamik deney verileri ile; $P=1000$, $\lambda=0.97$ ve mertebe **na3 nb2** iken ulaşılmıştır.

11. *C. butyricum* ve *E. aerogenes* karışım kültürünün çoğaltıldığı kesikli bir biyoreaktörde pH kontrolüne yönelik yapılan çalışmada teorik olarak iki farklı kontrol yöntemi uygulanmıştır. Bunlardan ilki **PID kontrol** diğeri ise **GMV kontrol** yöntemleridir.

12. **GMV kontrol PID kontrolden oldukça başarılı** bulunmuştur. Gerek ISE değerleri gerekse ayar değişkeninin davranışı GMV kontrolde pH kontrol açısından daha uygundur. PID kontrol ayar değişkeninde salınımlara neden olmaktadır. Oysa ki mikroorganizmalı çalışmalarda ayar değişkeni hassas davranmalıdır.

Tübitak 2214/A Doktora sırası araştırma bursu aracılığıyla, Montreal Üniversitesi, İmmunoloji ve Mikrobiyoloji bölümünde Prof. Dr. Patrick C. Hallenbeck danışmanlığında 1 yıl süresince araştırmacı olarak çalışılmış, araştırma bulguları aşağıdaki şekilde verilmiştir.

İlk gerçekleştirilen deney setinde amaç, karanlık fermantasyon yöntemi ile biyohidrojen üretiminde *C. butyricum* için oksijensiz ortamın sağlanmasında *E. aerogenes*'in katkı madesi olarak varlığının ve yokluğunun biyohidrojen üretim ortamındaki davranışının incelenmesidir. Deneyler sabit C:E aktarım oranında (1:1) öncelikle besi ortamının biyohidrojen üretimine etkisinin araştırılması ile başlamıştır. Bu amaç doğrultusunda 100-1 g aralığında glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu kullanılmıştır. Sonuçlardan 10 g üzerindeki patates suyu derişiminin hidrojen verimini düşürdüğü ve ayrıca DNS yöntemi ile glikoz ölçümünde zorluklara neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca glikoz ile zenginleştirilen patates ortamının hidrojen verimini arttırdığı görülmüştür. Sonuç

olarak sabit 1:1 (v/v) C:E aktarım oranında ulaşılan en yüksek verim 1.392 ± 0.103 mol H_2 /mol glikoz olarak besi ortamı derişiminin yaklaşık 2 g/L glikoz içeriğine sahip, 1 g/L glikoz ile zenginleştirilmiş 10 g patates suyu olduğu belirlenmiştir.

İkinci deney seti, 2 g/L glikoz kullanılarak üretilen biyohidrojenle mikroorganizma aktarım oranının etkisinin araştırılmasıdır. Sonuçlar hidrojen üretimi için, sadece *C.butyricum* un olduğu deney hariç besi ortamındaki glikozun neredeyse tamamının kullanıldığını göstermiştir. Düşük glikoz tüketimi, kümülatif hidrojen ve glikoz tüketimi açısından, yüksek biyhidrojen verimine ulaşmayı sağlamıştır ancak C:E'nin 8:1 durumunda ürettiği kadar üretim gerçekleşmemiştir. Katkı maddesi olarak anaerobic ortamın sağlanması açısından L-cysteine kullanımı, *C.butyricum* un tek başına kullanıldığı duruma göre hidrojen verimini %6.1 arttırmıştır. Sonuç olarak, C:E 8:1 mikroorganizma aktarım oranında, en yüksek kümülatif hidrojene, hidrojen verimine ve mikroorganizma kuru kütle ağırlığına sırasıyla, 117.4 mL, 2.035 ± 0.082 mol H_2 /mol glikoz ve 0.4 g/L olarak ulaşılmıştır.

Üçüncü deney setinde, üç farklı deney seti gerçekleştirilmiş ve sonuçlardan C:E 8:1 mikroorganizma aktarım oranının seyreltilmiş besi ortamında en yüksek kümülatif hidrojene, hidrojen verimine ve glikoz tüketimine sırasıyla, 77.5 mL, 1.431 mol H_2 /mol glikoz and 1.040 g/L olarak ulaştığı görülmüştür. 3 farklı set deneyde de en düşük kümülatif hidrojen ve glikoz tüketimine anaerobic ortamı sağlaması amacıyla *E.aerogenes* yerine eklenen L-cysteine durumunda ulaşılmıştır. Bu durum L-cysteine'in inhibisyona neden olduğunun açıkça kanıtıdır.

Dördüncü deney seti *C. butyricum* ve *E. aerogenes*'in karanlık fermantasyon aşamasında, *R. palustris*'in ise karanlık fermantasyon atığını (DFE) besi ortamı olarak kullandığı fotofermantasyon aşamasında kullanıldığı ardışık (sequential) fermantasyondur. Karanlık fermantasyon atığının kullanıldığı foto fermantasyon basamağında *R. palustris* mikroorganizması ile gerçekleştirilen biyohidrojen üretimi, foto fermantasyon besi ortamı olan karanlık fermantasyon atığının seyreltme oranı (DFE), pH ve aktarım oranının optimum değerlerinin belirlenebilmesi için, yüzey yanıt

metodu (RSM) da bulunan Box Behnken yöntemi ile deneysel tasarım gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak ardışık, karanlık ve foto fermantasyonda, DFE seyreltme oranının, pH ve mikroorganizma aktarımının yanında, biyohidrojen üretiminde oldukça büyük öneme sahip olduğu görülmüştür. Şu kesinlikle göz önünde bulundurulmalıdır ki, besi ortamı bileşimi ve derişimi belirlenmeden, optimum pH ve mikroorganizma aktarım oranının belirlenmesi yüksek hidrojen verimi, hidrojen üretimi, yüksek COD giderimi açısından yeterli olamamaktadır. Bu nedenle öncelikle besi ortamı bileşimi belirlenmelidir. En yüksek toplam biyohidrojen verimine 7.21 mmol H₂/ g COD olarak merkez noktasında, DFE'nin 2.5 kat, pH'ın 7.5 ve mikroorganizma aktarımının 3 kat olduğu durumda ulaşılmıştır ve deneysel tasarım ile 4 bağımlı değişken, toplam hidrojen verimi, hidrojen üretimi, foto fermantasyon verimi ve son *R.palustris* canlı hücre sayımı için kuadratik modeller elde edilmiştir.

Beşinci ve son deney setinde, *C. butyricum* ve *R. palustris* mikroorganizmalarının karışım kültürü ile hidrojen verimi ve üretiminin artırılabilmesi için karanlık ve foto fermantasyon birleşik (combined) fermantasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tek basamaklı fermantasyonun avantajı az iş gücü ve düşük maliyet açısından kullanılmaktadır ancak, mikroorganizmalar farklı besi ortamlarına ihtiyaç duyduğundan, besi ortamı bileşiminin optimum değeri belirlenmelidir. Hidrojen verimini arttırmak amacıyla, bağımsız değişkenler olarak seçilen besi ortamı derişimi (glikoz ile zenginleştirilmiş patates suyu), bufer derişimi ve mikroorganizma aktarım oranı (P:C) yüzey yanıt metodu (RSM) olan Box Behnken tasarımı (BBD) ile belirlenmiş ve deney tasarımı uygulanmıştır. Deneyler *Clostridium butyricum* and *Rhodopseudomonas palustris* mikroorganizmalarının farklı oranlarında aktarımıyla, besi ortamı olarak patates nişastası/glikoz kullanılarak 30 °C, 50 W/m² ışık yoğunluğunda ve 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. En yüksek hidrojen verimine (HY) 6.4 mol H₂/mol glikoz olarak besi ortamı derişiminin 15 g/L, tampon derişiminin 50 mM ve mikroorganizma aktarım oranının (P:C, v/v) 3 olduğu durumda ulaşılmıştır. Deneysel tasarım ile 3 bağımlı değişken, hidrojen verimi, hidrojen üretimi, glikoz tüketimi ve COD giderimi için kuadratik modeller elde edilmiştir.

Bu Doktora Tezi;

1. Anaerobik koşullarda kesikli biyoreaktörde *C. butyricum* ve *E. aerogenes* mikroorganizması ile biyohidrojen üretiminde pH kontrolüne yönelik gerçekleştirilen, dinamik analiz, sistem tanımlama, teorik PID ve STGMV metodunun uygulanması
2. Çalışmanın ardışık (sequential) ve birleştirilmiş (combined) fermentasyon yöntemleri ile zenginleştirilmesi
3. Besi ortamı türü, katkı maddeleri, mikroorganizma aktarım oranının optimum koşullarının bulunarak biyoreaktör çalışmalarına geçilmesi

açısından farklı bir çalışma olarak değerlendirilebilir.

Yapılan çalışmada elde edilen bulgulara göre daha sonra yapılacak çalışmalar için öneriler aşağıda sunulmuştur.

- a) Kendinden ayarlamalı Genelleştirilmiş Prediktif Kontrol (GPC), Self-Tuning PID Kontrol (STPID) gibi kontrol yöntemleri uygulanabilir.
- b) Parametre tahminleri için YEKK Yöntemi yerine genetik algoritma, yapay sinir ağları gibi optimizasyon yöntemleri kullanılabilir.
- c) pH ve glikoz derişimi kontrolü bir arada yapılarak çok değişkenli kontrol sistemleri gerçekleştirilebilir. Bunun için çok çeşitli kontrol yöntemleri kullanılabilir.
- d) En iyi ve en uygun üretimi gerçekleştirmek için değişken set noktası tasarımı yapılabilir. Çeşitli biyotepkime değişkenlerini ilgili set noktalarında tutabilmek için farklı kontrol algoritmaları kullanılabilir.
- e) Farklı karışım kültür kullanımı ile biyohidrojen üretimi arttırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abo-Hashesh, M., Desaunay, N. and Hallenbeck, P.C. 2013. High yield single stage conversion of glucose to hydrogen by photofermentation with continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* JP91, *Bioresource Technology*, 128:513-7.
- Akay, B. 1998. Karıştırılmalı kesikli biyoreaktörde optimum sıcaklığın doğrusal olmayan model öngörmeli kontrolü, Doktora Tezi. AÜ, Ankara
- Alalayah, W.M., Kalil, M.S., Kadhum, A.A., Jahim, J. M. and Alauj, N.M. 2008. Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *Int. Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7392-7396.
- Argun, H. and Kargi, F. 2011. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International J. of Hydrogen Energy*, 36: 7443-7459.
- Asada Y., Tokumoto M. and Aihara Y. 2006. Hydrogen production by co-cultures of *Lactobacillus* and photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:1509-1513.
- Aström, K.J. and Wittenmark, B. 1973. On Self-Tuning Regulators. *Automatica*, 9, 185-199.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, Mc Graw Hill, New York.
- Benemann, J.R. and Hallenbeck P.C. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 27:1185–1193.
- Cato, E.P., George, W.L. and Finegold, S.M. 1986. Genus *Clostridium*. In: Sneath PH A, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 1141-1200.
- Clarke, D.W. and Gawthrop, P.J. 1975. Self Tuning Controller. *Proc. IEE*, 122 (9) , 929-934.
- Crabbe, E., Ferchichi, M., Gil, G., Hintz, W. and Almadidy, A. 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*, 120, 402–409.
- Daniel, R. Omstead. *Computer Control of Fermentation Processes*, Raritan, New Jersey

- Das, D. and Veziroğlu, T.N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28.
- Eral, M. 1998. Tübitak-TTGV Bilim-Teknoloji-Sanayi Tartışmaları Platformu, Enerji Teknolojileri Politikası Çalışma Grubu Raporu, Ankara.
- Fang, H. and Liu, H. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Biosource Technology*, 82, 87-93.
- Fırat, G. 2009. Biyohidrojen Üretiminde Dinamik Analiz. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Fredrickson, J., Zachara, J. and Balkwill, D. 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (7): 4230-41.
- Genç, N. 2010. Fermantatif biyohidrojen üretim proseslerinde hidrojen veriminin geliştirilmesindeki yaklaşımlar. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları, 26 (3): 225-239.
- Gülşen, H.E., Kumbur, H. ve Koyuncu, G. 2014. Hidrojen Enerjisi, Üretim Mekanizmaları ve Çevresel Önemi. 2nd International Symposium on Innovative Technologies in Engineering And Science, 18-20 June, Karabuk University, Turkey.
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., Skonieczny, M.T. and Yargeau, V. 2009. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian Journal of Microbiol*, 49, 48-59.
- Hapoğlu, H. 1993. Self-Tuning Control of Packed Distillation Columns, Ph. D. Thesis, University of Wales, s.1-308.
- Jackson, A.T. 1990. *Process Engineering in Biotechnology*.
- Kargi, F. and Ozmihci, S. 2010. Comparison of different mixed cultures for biohydrogen production from ground wheat starch by combined dark and light fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37:341-347.
- Kargi, F. and Ozmihci, 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.

- Keskin, T. and Hallenbeck, P.C. 2012. Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermentation. *Bioresource Technology*, 112:131-6.
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L. and Sung, S. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energy*; 29: 1123–31.
- Khanna, N., Kotay, S. M., Gilbert, J. J. and Das, D. 2011. Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter Cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *Journal of Biotechnology* 152, 9-15.
- Kim, D. and Han, S. 2006. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, 31:2158-2169.
- Kim, M., Moon, K., Lee, I., Lee, T. and Sung, C. 1999. Hydrogen gas production by fermentation from sugars using *Clostridium butyricum* NCIB 9576. *San'oeb misaengmul haghoeji*, 27, 62–69.
- Li, Z., Wang, H., Tang, Z., Wang, X. and Bai, J. 2008. Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose. *Int. J. of Hydrogen Energy*, 33, 7413–7418.
- Liu, B., Xie, G., Wang, R., Xing, D., Ding, J., Zhou, X., Ren, H., Ma, C. and Ren, N. 2015. Simultaneous hydrogen and ethanol production of cascade utilization of mono-substrate in integrated dark and photo-fermentative reactor. *Biotechnology for Biofuels*, 8:8.
- Liu, G. and Shen J. 2004. Effect Of Culture and Medium Conditions on Hydrogen Production From Starch Using Anaerobic Bacteria. *Journal of Biosci and Bioengineering*, 98(4), 251-256.
- Logan, B., Sang, O. and Ginkel, S.V. 2003. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science and Technology*, 37, 5186-5190.
- Melis, A. 2002. Green Alga Hydrogen Production: Progress, Challenges and Prospects. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, pp.1217–1228.
- Meng, X., Karasawa, T., Zou, K., Kuang, X., Wang, X., Lu, C., Wang, C., Yamakawa, K. and Nakamura, S. 1997. Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2160- 2162.

- Meyer, J., Kelley, B.C. and Vignais, P.M. 1978. Effect of Light on Nitrogenase Function and Synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 136(1):201–8.
- Nandi, R. and Sengupta, S. 1998. Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Critical Rev Microbiol*; 24(1):61–84.
- Ozyurt, B., Hitit, Z.Y., Demirtas, G.F., Ertunc, S. Hapoglu, H. and Akay, B. 2014. Biological hydrogen production: effects of inoculation and production media. *Int. J. of Global Warming*, 6:2/3, 350-365.
- Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M. and Reungsang, A. 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:5256-5265.
- Pekin, B. 1979. *Biyokimya Mühendisliği*. Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.
- Phowan, P., Reungsang, A. and Danvirutai, P. 2010. Bio-hydrogen production from cassava pulp hydrolysate using co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology*, 9: 348-354.
- Porter, J.R. (1976). Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological reviews* 40 (2): 260–269. F
- Reungsang, A. and Sreela-or, C. 2013. Bio-hydrogen production from pineapple waste extract by anaerobic mixed cultures. *Energies*, 6(4), 2175-2190.
- Schwartz, R. 2004. Paul Ehrlich's magic bullets. *N. Engl. J. Med.* 350 (11): 1079–80.
- Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T., Miyagawa, N., Tanaka, M., Komiyama, A. and Kurata, S. 2003. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatr Int*, 45: 86-90.
- Shuler, M.L. and Kargi, F. 1992. *Biyoproses Engineering Basic Concepts*, Prentice Hall, New Jersey.
- Soderström, T. and Stoica, P. 1989. *System Identification*, Prentice Hall, New York.
- Stephanopoulos, G. 1984. *Chemical Proses Control*, Prentice Hall, New Jersey.
- Şentürk, İ. and Büyükgüngör, H. 2010. An Examination Of Used Different Waste Materials And Biohydrogen Production Methods , Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, SAMSUN.

- Tanasupawat, S., Prasirtsak B., Pakdeeto, A. and Thongchul, N. 2014. Characterization and fermentation products of *Clostridium butyricum* strains isolated from Thai soils. *J. of App. Pharmaceutical Sci.*, 4:20-23.
- Thurston, A. 2000. Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis. *Aust. N. Z. J. Surg.* 70 (12): 855–61.
- Yokoi, Haruhiko, 1995. Characteristics of Hydrogen Production by Aciduric *Enterobacter aerogenes* Strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol. 80 No. 6: 571-574.
- Yokoi, H., Saitsu, A.S., Uchida, H., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 2001. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *J. Biosci Bioeng*;91:58–63.
- Wang B., Wan, W. and Wang, J. 2009. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresource Technology* 100, 1211–1213.
- Wang, J. and Wan, W. 2008. Effect of Fe^{2+} concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures, *International Journal of Hydrogen Energy* 33,1215 – 1220.
- Wiegel, J., Tanner, R. and Rainey, F.A. 2006. An introduction to the family Clostridiaceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E, eds. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd ed., vol. 4, New York: Springer, pp. 654–678.
- Woese, C. and Fox, G. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (11): 5088–5090.
- Woese, C., Kandler, O. and Wheelis, M. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (12): 4576–4579.
- Wellstead, P.E. and Zarrop, M.B. 1991. *Self –Tuning System Control and Signal Processing*, John Wiley and Sons, Great Britain.
- Wilke, C.R. 1981. High productivity anaerobic fermentation with dense cell culture, *Advances in Biotechnology*, 1, Pergamon, New York, 539-545.

EKLER

EK 1 Teorik Sistem Tanımlama İçin Matlab Programı

EK 2 Teorik PID Kontrolü İçin Matlab Programı

EK 3 Teorik GMV Kontrolü İçin Matlab Programı

EK 1 TEORİK SİSTEM TANIMLAMA İÇİN MATLAB PROGRAMI

```
% ***** YİNELEMELİ EN KÜÇÜK KARELER YÖNTEMİ *****
%                                     (Dogrusal Modeller)
% ***** Recursive least square parameter estimation *****

% Sistem modeli :  $y(t)=(q-1)B(q-1)/A(q-1)u(t) + e(t)$  (ARMAX)

clear

normglukoz1;

bul1=fopen('glukozt.txt','w');
bul2=fopen('glukozu.txt','w');
bul3=fopen('glukozy.txt','w');
bul4=fopen('glukozyk.txt','w');
bul5=fopen('glukozparametre.txt','w');
%bul6=fopen('glukoznedir.txt','w');

for i=1:53;
    r(i)=u(i);
    b(i)=y(i);
end

u=r;
y=b;

teta=5;
L=teta;
nB=2;
nA=3;
lamda=0.9

sp=1;                % örnekleme aralığı
simutime=52;         % benzetim süresi

t=0:sp:simutime;
itno=length(t);

% -----Başlangıç koşulları-----

alfa=1000
P=alfa*eye(L);      % Kovaryans matrisi

for n=1:nA+1
    tetaest(:,n)=0.0*ones(L,1);    % Parametre matrisi
    phi(:,n)=zeros(L,1);           % Veri matrisi
    eps(n)=0;                      % Hata
end

% -----Parametre tahmini (Parameter estimation)-----

for n=nA+2:itno
    phi(:,n)=[-y(n-1:-1:n-nA) u(n-1:-1:n-nB)]'
    eps(n)=y(n)-phi(:,n)'*tetaest(:,n-1);
    %P=(P-(P*phi(:,n)*phi(:,n)')*(1+phi(:,n)'*P*phi(:,n)))/%unutma
    %çarpımı olmadığı durum
    P=(1/lamda)*(P-(P*phi(:,n)*phi(:,n)')*(lamda+phi(:,n)'*P*phi(:,n)));
    tetaest(:,n)=tetaest(:,n-1)+P*phi(:,n)*eps(n);

    %nedir(n)=(phi(:,n)'*tetaest(:,n-1))

    yk(n)=phi(:,n)'*tetaest(:,n)
    res(n)=y(n)-yk(n);
```

```

    hata(n)=(y(n)-yk(n))^2;
    ISE=sum(hata)

end

NORM=norm((y-yk)/y)

ISE1=sum(hata)

%-----Model geçerlilik sınama testleri-----
test

% ----- Grafikler-----
fprintf(bul1,'%5.2f\n',t);
fprintf(bul2,'%3.2f\n',u);
fprintf(bul3,'%3.4f\n',y);
fprintf(bul4,'%3.4f\n',yk);
parametreler=[tetaest];
fprintf(bul5,'%3.4f    %3.4f    %3.4f    %3.4f    %3.4f\n',parametreler);
%fprintf(bul6,'%3.4f\n',nedir);

figure(1)

subplot(311)
plot(t,u)
axis([0 simutime 0 100])
%title('girdi sinyali (kare dalga)')
%xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('glikoz akış hızı (L/dak)')

subplot(312)
plot(t,y,'r',t,yk,'b')
axis([0 simutime 1 3])
%title('Gerçek ve kestirilen çıktı')
%xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('DO (mg/L)')

subplot(313)
plot(t,tetaest)
axis([0 simutime -2.5 2.0])
%title('Gerçek Parametreler ve Kestirilen parametreler')
xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('parametreler')

%figure(2)
%plot(t, tetaest)
%axis([0 simutime -1.2 2])
%title('Tahmin edilen parametreler')
%xlabel('zaman adımı')
%ylabel('teta')

fclose(bul1)
fclose(bul2)
fclose(bul3)
fclose(bul4)
fclose(bul5)

```

EK 2 TEORİK PID KONTROLÜ İÇİN MATLAB PROGRAMI

```
% PID
% Havva-Bulent-Suna 20 Agustos 2001
% Process Control Research Lab.
%

clear
bul1=fopen('pidkaret.txt','w');
bul2=fopen('pidkarew.txt','w');
bul3=fopen('pidkareu.txt','w');
bul4=fopen('pidkarey.txt','w');

% ----- Actual System parameters -----
%B=[ 0.6 0.1];
%A=[1 -1.2 0.8];
%Benim sicaklik sistemi
%A=[1 -0.567 -0.428];
%B=[0.3035 -0.2574];
%Havvan'in DO tanimlamasindan
%A=[1 -0.5637 -0.3898];
%B=[0.026 -0.0611 0.0941];

A=[1 -1.6871 0.9175 -0.226];
B=[0.0001 0.0002];

nA=3;
nB=2;
nC=1;

% ----- C polynomial (filter) -----
C=[1];

% ----- PID parameters -----
% KC=2632.009;
% KI=184.169;
% KD=27.5656;

KC=32.177
KI=2.5597
KD=0.216

%KC=32.80232076
%KI=2.376816266
%KD=0.219876506

% ---- Reference Input (Set-point) & Other settings ----
sp=1; %sampling period
simutime=21000; %simulation time
t=0:sp:simutime; %time axis
itno=length(t); %total iteration
%
% for k=1:itno
%     if k<=3000
%         w(1,k)=0.7;
%     end
```

```

% end
% for k=3000:itno
%     if 3000<k<=6000
%         w(1,k)=1.0;
%     end
% end
%
% for k=6000:itno
%     if 6000<k<=9000
%         w(1,k)=0.5;
%     end
% end
%
% for k=9000:itno
%     if 9000<k<=12000
%         w(1,k)=0.7;
%     end
% end
%
% for k=12000:itno
%     if 12000<k<=15000
%         w(1,k)=1.0;
%     end
% end
%
% for k=15000:itno
%     if 15000<k<=18000
%         w(1,k)=0.7;
%     end
% end
%
% for k=18000:itno
%     if 18000<k<=21000
%         w(1,k)=0.5;
%     end
% end
%
% for k=4400:itno
%     if 4400<k<=5400
%         w(1,k)=1.0;
%     end
% end

w=3+sign(sin((2*pi*t)/5000)); %set point
%w=0.5*ones(1,itno);
%for i=1:itno
%    w(i)=2;
%end

% ----- Noise -----
%u=sign(sin((2*pi/50)*t));
%a=1:maxtime+1;
%rand('seed');
e=0.005*randn(1,itno);

%y=filter(B,A,u)+filter(C,A,e);

% ----- Parameter and data vectors -----
teta=[A(2:4) B C]'; % true parameters

```

```

% ----- Algorithm -----
for m=1:4
    u(m)=1.0;
    er(m)=0.01;
    y(m)=0.01;
    att(m)=1.0;
    attm1(m)=1.0;
    attm2(m)=1.0;
    attm3(m)=1.0;
end

% -----Parametre tahmini (Parameter estimation)-----

for n=5:itno

    y(n)=[-y(n-1:-1:n-nA) u(n-1:-1:n-nB) e(n-1:-1:n-nC)]*teta;
    er(n)=w(n)-y(n);
    %att(n)=(KC+(KC*sp/2*KI)+(KC*KD/sp))*er(n);
    %attm1(n)=(KC*sp/2*KI)-KC-(2*KC*KD/sp))*er(n-1);
    %attm2(n)=(KC*KD/sp)*er(n-2);
    %attm3(n)=(att(n)+attm1(n)+attm2(n)); %attm3 delta u değerini ifade
    eder
    att(n)=(KC)+(KC*sp/KI)+(KC*KD/sp))*er(n);
    attm1(n)=(KC)+(2*KC*KD/sp))*er(n-1);
    attm2(n)=(KC*KD/sp)*er(n-2);
    attm3(n)=att(n)-attm1(n)+attm2(n);
    u(n)=(attm3(n)*1)+u(n-1));
u(n)=u(n)*1.0 ;
    if u(n)<=0.0 u(n)=0.0;
    elseif u(n)>=200.0 u(n)=200.0;
    else u(n)=u(n);
    end

    hata(n)=(w(n)-y(n))^2;

end

ISE=sum(hata)

fprintf(bul1,'%5.2f\n',t);
fprintf(bul2,'%3.2f\n',w);
fprintf(bul3,'%3.4f\n',u);
fprintf(bul4,'%3.4f\n',y);

figure(1)
subplot(311)
plot(t,w,t,y)
axis([0 simutime 0 3])
%title('Set-point, system output')
xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('Glikoz derişimi (g/L)')

subplot(312)

plot(t,u)
axis([0 simutime -0.5 200.0])

```

```
%title('control signal')
xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('Glikoz akış hızı (mL/dak)')

fclose(bul1)
fclose(bul2)
fclose(bul3)
fclose(bul4)
```

EK 3 TEORİK STGMV KONTROLÜ İÇİN MATLAB PROGRAMI

```
% Self-Tuning Generalized Minimum Variance Control (GMV)
%
% System Model:
%       $A(q^{-1})y(t) = B(q^{-1})u(t-1) + (C(q^{-1})/D)e(t)$ 
% where
%       $D=1-q^{-1}$  ; difference operator
%
% Havva-Bulent-Suna 7 Agustos 2001
% Process Control Research Lab.
%

clear
bul1=fopen('gmvt.txt','w');
bul2=fopen('gmvw.txt','w');
bul3=fopen('gmvu.txt','w');
bul4=fopen('gmvy.txt','w');
bul5=fopen('gmvarmaxparametre.txt','w');
bul6=fopen('gmvpseo.txt','w');
bul7=fopen('gmvkontparametre.txt','w');

% ----- Actual System parameters -----

%Zeynep glukoz tanimlamasindan na=2 nb=3
%A=[1 -1.5692 0.5828];
%B=[0.00026 0.00002 0.00021];

%Zeynep glukoz tanimlamasindan na=3 nb=2
A=[1 -1.6871 0.9175 -0.2226];
B=[0.0001 0.0002];

% ----- C polynomial (filter) -----
C=[1];
D=[1 -1]; % difference operator (delta)
F=[1 0.7];
G=[1 1 1 1];
H=[1];
% ----- Initial estimates for A and B -----
Bi=[1 -0.1];
Ai=[1 -1 0.6 -0.6];
Fi=[1 0.2 -0.1];
Gi=[1 1 1];
Hi=[1];

% ----- Design parameters -----
P=1; % Minimum prediction horizon
Q=0.040; % Maximum prediction horizon
R=1.9; % Control horizon
dg=1;
% ----- Degree of polynomials -----
lA=length(A);
nA=lA-1;
lB=length(B);
nB=lB;
nC=length(C);
lF=length(F);
nF=lF;
lG=length(G);
```

```

nG=1G;
lH=length(H);
nH=lH;
lt=nA+nB;
lt2=nF+nG+nH;

% ---- Reference Input (Set-point) & Other settings -----

sp=3;                                %sampling period
simutime=16200;                       %simulation time
t=0:sp:simutime;                      %time axis
itno=length(t);                      %total iteration

for k=1:itno
    if k<=900
        w(1,k)=0.7;
    end
end
for k=900:itno
    if 900<k<=1500
        w(1,k)=1.0;
    end
end
for k=1500:itno
    if 1500<k<=1700
        w(1,k)=0.5;
    end
end
for k=1700:itno
    if 1700<k<=2700
        w(1,k)=0.7;
    end
end
for k=2700:itno
    if 2700<k<=3600
        w(1,k)=1.0;
    end
end
for k=3600:itno
    if 3600<k<=4200
        w(1,k)=0.7;
    end
end
for k=4200:itno
    if 4200<k<=4400
        w(1,k)=0.5;
    end
end
for k=4400:itno
    if 4400<k<=5400
        w(1,k)=1.0;
    end
end
end

```

```

%w=0.75+0.25*sign(sin((2*pi*t)/1500));
%w=0.5*ones(1,itno);
% ----- Noise -----
%u=sign(sin((2*pi/50)*t));
%a=1:maxtime+1;
%rand('seed');
e=0.005*randn(1,itno);

%y=filter(B,A,u)+filter(C,A,e);

% ----- forgetting factor -----
lamda=1.0;
Pm=1000*eye(1t);
Pt=1000*eye(1t2);
% ----- Parameter and data vectors -----
teta=[A(2:lA) B C]'; % true parameters
%tetaest=[Ai(2:lA) Bi]'; % estimated parameters
tetaesti=[Fi(1:lF) Gi Hi]';

% ----- Algorithm -----
for uy=1:lA+2
    u(uy)=1.0;
    u1(uy)=1.0;
    y(uy)=0.5;
end

%PV=tetaest';
%PR=tetaesti';
%ye=[zeros(lA,1)'];
for n=1:lA+2
    tetaest(:,n)=0.01*ones(1t,1); % Parametre matrisi
    phi(:,n)=zeros(1t,1); % Veri matrisi
    eps(n)=0; % Hata
end
%PV=tetaest';
for n=1:lA+2
    tetaesti(:,n)=0.01*ones(1t2,1); % Parametre matrisi
    phi2(:,n)=zeros(1t2,1); % Veri matrisi
    eps2(n)=0; % Hata
    %w(n)=2;
end

% -----Parametre tahmini (Parameter estimation)-----

for n=lA+2:itno
    %w(n)=2;
    y(n)=[-y(n-1:-1:n-nA) u(n-1:-1:n-nB) e(n-1:-1:n-nC)]*teta;
    phi(:,n)=[-y(n-1:-1:n-nA) u(n-1:-1:n-nB)]';
    eps(n)=y(n)-phi(:,n)'*tetaest(:,n-1);
    Pm=(Pm-
(Pm*phi(:,n)*phi(:,n)'+Pm)/(lamda+phi(:,n)'*Pm*phi(:,n)))/lamda;
    tetaest(:,n)=tetaest(:,n-1)+Pm*phi(:,n)*eps(n);
    yk(n)=phi(:,n)'*tetaest(:,n);
    res(n)=y(n)-yk(n);

    pseudo(n)=(P*y(n))+(Q*u(n-dg))-(R*w(n-dg));

```

```

    phi2(:,n)=[u(n-dg:-1:n-dg+1-nF) y(n-dg:-1:n-dg+1-nG) w(n-dg:-1:n-
dg+1-nH)]';
    eps2(n)=pseudo(n)-phi2(:,n) '*tetaesti(:,n-1);
    Pt=(Pt-
(Pt*phi2(:,n)*phi2(:,n) '*Pt)/(lamda+phi2(:,n) '*Pt*phi2(:,n)))/lamda;
    tetaesti(:,n)=tetaesti(:,n-1)+Pt*phi2(:,n)*eps2(n);
    %pseudotahmin(n)=phi2(:,n) '*tetaesti(:,n);
    %PR=[PR;tetaesti'];
    f0(n)=tetaesti(1,n);
    f1(n)=tetaesti(2,n);
    f2(n)=tetaesti(3,n);
    g0(n)=tetaesti(4,n);
    g1(n)=tetaesti(5,n);
    h0(n)=tetaesti(6,n);
    %u(n)=- (g0(n)*y(n)+(g1(n)*y(n-1)))-
(h0(n)*w(n))/((f0(n))+(f1(n)*u(n-1))-(f2(n)*u(n-2)));
    u(n)=( -(g0(n)*y(n)+g1(n)*y(n-1))-(h0(n)*w(n)))-f1(n)*u(n-1)-
f2(n)*u(n-2))/f0(n);
    %u(n)=( -(g0*y(n)+g1*y(n-1))-(h0*w(n)))-f1*u(n-1)-f2*u(n-2))/f0;
    %u(n)=- (g0*y(n)+(g1*y(n-1)))- (h0*w(n))/((f0)+(f1*u(n-1))-(f2*u(n-
2)));

hata(n)=(w(n)-y(n))^2;
end

NORM=norm((y-yk)/y)

ISE=sum(hata)

fprintf(bul1,'%5.2f\n',t);
fprintf(bul2,'%3.2f\n',w);
fprintf(bul3,'%3.4f\n',u);
fprintf(bul4,'%3.4f\n',y);
parametreler=[tetaest];
fprintf(bul5,'%4.4f      %4.4f      %4.4f      %4.4f
%4.4f\n',parametreler);
fprintf(bul6,'%3.4f\n',pseudo);
parametrelerkont=[tetaesti];
fprintf(bul7,'%4.4f      %4.4f      %4.4f      %4.4f      %4.4f
%4.4f\n',parametrelerkont);

figure(1)
subplot(311)
plot(t,w,t,y,t,yk)
axis([0 simutime 0 2])
%title('Set-point, system output')
%xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('glikoz (g/L)')

subplot(312)
plot(t,u)
axis([0 simutime -10 50])
%title('control signal')
%xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('Glikoz akış hızı (mL/dak)')

subplot(313)

```

```

plot(t,tetaest)
axis([0 simutime -2 2])
%title('estimated system parameters')
xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('parametreler')

figure(2)
subplot(311)
plot(t,pseudo)
axis([0 simutime -1 1])
%title('pseudo output')
xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('pseudo output')

subplot (312)
plot(t,tetaesti)
axis ([0 simutime -2 2])
%title('stimated GMV control parameters')
xlabel('zaman adımı sayısı')
ylabel('GMV parametreleri')

fclose(bul1)
fclose(bul2)
fclose(bul3)
fclose(bul4)
fclose(bul5)
fclose(bul6)
fclose(bul7)

```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep YILMAZER HİTİT

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 05.12.1982

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu

Lise : Özel Arı Lisesi (2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2006)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (2009)

Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (2016)

SCI Yayınlar

Hitit, Z.Y., Boyacioglu, H., Ozyurt, B., Ertunc, S., Hapoglu, H. And Akay, B. 2014. Self- tuning GMV Control of Glucose Concentration in Fed-Batch Baker's Yeast Production. Applied Biochemistry and Biotechnology, 8:172, pp. 3761-75

Ozyurt, B., Hitit, Z., Demirtaş, G., Ertunc, S., Hapoglu, H. And Akay, B. 2014. Biological hydrogen production: Effects of inoculation and production media. International Journal of Global Warming, 6: 2/3, pp 350-365

Uluslararası Kongreler

Yilmazer Z., Akay B., Ertunc S., Alpbaz M., Hapoglu H., 2009. Application of Adaptive Control to Substrate Profile Trajectories In Fed-Batch Yeast Fermentation. International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, BIOTECH METU, Ankara,Turkey (*poster*)

Yilmazer Z., Akay B., Ertunc S., Alpbaz M., Hapoglu H., Boyacioglu H., 2010. Substrate Concentration Control of S.cerevisiae in Fed-batch Cultivation. Eastern Mediterranean Chemical Engineering Conference, EMCC-6, Antalya, Turkey (*poster*)

- Yilmazer Z., Ertunc S., Hapoglu H., Alpbaz M., Ozyurt, B., Akay B., 2011. Application of Generalized Minimum Variance (GMV) control to fed-batch fermentation, EuroPact 2011 2nd European Conference on Process Analytics and Control Technology, Glasgow, Scotland, UK (*poster*)
- Yilmazer Z., Ertunc S., Hapoglu H., Alpbaz M., Ozyurt, B., Akay B. 2011. A novel approach for prediction of dissolved oxygen concentration and pH values in a yeast fermentation, EuroPact 2011 2nd European Conference on Process Analytics and Control Technology, Glasgow, Scotland, UK (*poster*)
- Giwa, S.O., Yilmazer Z., Polat K., Alpbaz M., Hapoglu H. 2011. Investigation of Current Density Effect on Electrocoagulation Reactor Temperature in Petrochemical Wastewater Treatment. 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, ECM9, Cesme, Izmir, Turkey (*poster*)
- Yilmazer Z., Ozyurt B., Ertunc S., Alpbaz M., Akay B., 2012. Dynamic Analysis and Linear Modeling of pH Behaviour in Biohydrogen Production Using RLS Estimation Method. 7th Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Countries, EMCC7, Corfu, Greece (*poster*)
- Ozyurt B., Yilmazer Z., Ertunc S., Hapoglu H., Akay B. 2012. pH Control in Biohydrogen Production: A Theoretical and Comparative Study. 7th Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Countries, EMCC7, Corfu, Greece (*poster*)
- Yilmazer Z., Ozyurt B., Ertunc S., Alpbaz M., Hapoğlu H., Akay B., 2012. Effects of Stirrer Speed and Inoculation Ratio on Biohydrogen Production Yield. International Conference on Recycling and Reuse, R&R, Istanbul, Turkey (*poster*)
- Ozyurt B., Demirtas G., Yilmazer Z., Ertunc S., Hapoğlu H., Akay B. 2012. “Effects of Different Growth Media on Biohydrogen Production”, International Conference on Recycling and Reuse, R&R, Istanbul, Turkey (*oral*)
- Hitit Z.Y., Demirtas G., Ertunc S., Alpbaz M., Akay B. 2014. Dynamic Analysis and Linear Modelling of pH Behaviour for Clean Energy Production: BIOHYDROGEN. International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering, Greenchemse, Barcelona, Spain (*oral*)
- Hitit, Z.Y. and Hallenbeck, P.C. 2016. Optimization of Process Variables in Fermentative Hydrogen Production. Journee de la Recherche du Departement de microbiologie, University of Montreal, (*poster*)
- Hitit, Z.Y. and Hallenbeck, P.C. 2016. Effect of Inoculum Ratio on Dark Fermentative Hydrogen Production. ICEBWEM 2016: 18th International Conference on Energy, Biomass, Waste and Environmental Management, Montreal, Canada, (*poster*)

Ulusal Kongreler

Yilmazer, Z., Akay, B., Ertunc, S., Albaz M. ve Hapoglu H. 2010. Yarı-kesikli Ekmek Mayası Üretiminde Sistem Tanımlama. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, UKMK9, Ankara, Türkiye (*oral*)

Hitit, Y. Z., Ertunc S., Vural N., Sınağ A. ve Akay B. 2014. Sıcaklık ve Substrat Derişiminin Biyohidrojen Üretim Verimine Etkisi”, Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, UKMK11, Eskişehir, Türkiye (*oral*)

Zeynep Yilmazer Hitit, Suna Ertunc ve Bülent Akay 2015. Biyohidrojen Üretiminde pH Kontrol: PID ve STGMV Benzetimleri, Otomatik Kontrol Türk Milli Komitesi Ulusal Toplantısı, TOK2015, Denizli, Türkiye (sözlü- ulusal)

Diğer Akademik Faaliyetler

Araştırma görevlisi: Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2007)

BAP Project: Proje no: 12A4343003. Karışım kültür ve katkı maddelerinin kullanıldığı biyohidrojen üretim prosesinin pH kontrolü ile veriminin arttırılması. 04/24/2012 – 04/24/2015.

Erasmus+: Dynamic Analysis and Linear Modelling of pH Behaviour for Clean Energy Production: BIOHYDROGEN. Mobility Training Program 07/29/2014 – 07/31/2014, Barcelona, Spain

Tübitak 2214/A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı II. Dönem Bursiyeri
Proje: Karışım kültür kullanılarak biyohidrojen üretimi (Biohydrogen production by using mixed cultures), University of Montreal, Department of Microbiology, Infectology and Immunology, Montreal, Canada, 08/06/2015 - 08/06/2016.