

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ATIK KAĞIT HAVLUDAN KARANLIK FERMENTASYON İLE  
HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GÜLİZAR ONARAN**

**DENİZLİ, TEMMUZ - 2016**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



ATIK KAĞIT HAVLUDAN KARANLIK FERMENTASYON İLE  
HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLİZAR ONARAN

DENİZLİ, TEMMUZ - 2016

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Gülizar ONARAN tarafından hazırlanan "ATIK KAĞIT HAVLUDAN KARANLIK FERMENTASYON İLE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 14.07.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Doç. Dr. Hidayet ARGUN



Üye  
Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN  
Dokuz Eylül Üniversitesi



Üye  
Yrd. Doç. Dr. Levent GÜREL  
Pamukkale Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.08.2016 tarih ve 29/114... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez alışması TÜBİTAK tarafından 113Y187nolu proje ile desteklenmiştir.**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

G. ONARAN

GÜLİZAR ONARAN

## ÖZET

**ATIK KAĞIT HAVLUDAN KARANLIK FERMENTASYON İLE HİDROJEN GAZI  
ÜRETİMİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GÜLİZAR ONARAN  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI:DOÇ.DR. HİDAYET ARGUN)**

**DENİZLİ, - 2016**

Bu tez kapsamında atık kağıt havludan kesikli işletme modunda karanlık fermentasyon ile hidrojen gazı üretimi araştırılmıştır. Bu kapsamda başlangıç biyokütle, substrat ve C/N/P/Fe oranının hidrojen üretim verimi ve spesifik hidrojen üretim hızı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Deneylerde besi maddesi olarak kullanılan şeker çözeltisi 200 g/L atık kağıt havlunun %5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 105°C'de 3.5 saat süreyle asit hidrolizi sonucunda elde edilmiştir. Başlangıç biyokütle konsantrasyonu olarak 0.1-6.0 g/L noktaları arasında çalışılmış ve en yüksek hidrojen üretim verimi 0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz olarak 0.875 g biyokütle/L'de elde edilmiştir. Ancak 0.1 g/L'de benzer verim (0.905 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz) ve daha yüksek özgül hidrojen üretim hızına (188.81 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saate) ulaşıldığı, ayrıca işletme kolaylığı açısından 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonunun daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Başlangıç substrat konsantrasyonu için 5-40 g glikoz/L arasında çalışılmış ve en yüksek hidrojen üretim verimi (0.498 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz) ve özgül hidrojen üretim hızı (226.67 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saate) 21 g glikoz/L'de elde edilmiştir. En uygun C/N/P/Fe oranının belirlenmesi için Design-Expert yazılımında bulunan Box-Behnken yüzey tepki metodu ile optimizasyon yapılmıştır. Buna göre yapılan deneyler sonucunda en yüksek hidrojen üretim verimi (0.656 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz) ve özgül hidrojen üretim hızı (241.64 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saate) 100/5/9/0.3'lik C/N/P/Fe oranında tespit edilmiştir. Bu şartlarda gerçekleştirilen doğrulama deneyi sonucunda bulunan hidrojen üretim verimi ve özgül hidrojen üretim hızı değerleri sırasıyla 0.525 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz ve 243.14 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saate olup, beklenen verim ve hız değerleri ile uyumlu çıkmış ve modelin güvenilirliği teyit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Hidrojen, karanlık fermentasyon, atık kağıt havlu, asit hidroliz, Box-Behnken

# ABSTRACT

## HYDROGEN PRODUCTION FROM WASTE PAPER TOWEL BY DARK FERMENTATION

MSC THESIS

GULIZAR ONARAN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
ENVIRONMENTAL ENGINEERING

(SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. HIDAYET ARGUN)

DENİZLİ, 2016

In this thesis, hydrogen gas production from waste paper towel by batch dark fermentation was studied. In this context the effects of initial biomass and substrate concentrations and the effect of C/N/P/Fe ratio on hydrogen production yield and specific hydrogen production rate (SHPR) were investigated. Sugar containing hydrolyzate was used as substrate and this solution was obtained by acid hydrolysis of 200 g/L waste paper towel with %5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 105°C for 3.5 hours. For the experiments where the initial biomass concentration was varied between 0.1-6.0 g/L the highest hydrogen production yield (0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glucose) was obtained at 0.875 g/L biomass concentration. However, similar hydrogen production yield (0.905 mol H<sub>2</sub>/mol glucose) and SHPR (188.81 mL H<sub>2</sub>/g biomass.hours) was obtained at 0.1 g/L, which is more favourable to be used due to practical considerations. For the experiments where the initial substrate concentration was varied between 5–40 g/L, the highest hydrogen production yield (0.498 mol H<sub>2</sub>/mol glucose) and SHPR (226.67 mL H<sub>2</sub>/g biomass.hours) were obtained at substrate concentration of 21 g glucose/L. Effects of C/N/P/Fe on hydrogen formation yield and rate were analyzed using the Box-Behnken statistical experiment design tool in the software Design-Expert. The optimum C/N/P/Fe ratio resulting highest hydrogen production yield (0.656 mol H<sub>2</sub>/mol glucose) and SHPR (241.64 mL H<sub>2</sub>/g biomass.hours) was predicted by the software as 100/5/9/0.3. A confirmation experiment at this condition resulted similar yield (0.525 mol H<sub>2</sub>/mol glucose) and SHPR (243.14 mL H<sub>2</sub>/g biomass.hours) indicating the reliability of the model.

**KEYWORDS:** Hydrogen, dark fermentation, waste paper towel, acid hydrolysis, Box-Behnken

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı.....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1 Hidrojen.....	4
2.2 Hidrojen Üretim Yöntemleri.....	5
2.2.1 Biyofotoliz.....	8
2.2.2 Işıklı Fermentasyon.....	9
2.2.3 Karanlık Fermentasyon.....	10
2.3 Literatür Özeti.....	17
<b>3. MATERYAL ve METOTLAR.....</b>	<b>29</b>
3.1 Mikroorganizma.....	29
3.2 Atık Kağıt Havlu.....	29
3.3 Deneysel Çalışmalar.....	30
3.3.1 Atık Kağıt Havlunun Ön İşlenmesi.....	30
3.3.2 Karanlık Fermentasyon.....	31
3.4 Analitik Yöntemler ve Hesaplamalar.....	34
3.4.1 Hidrojen Gazı Analizi.....	34
3.4.2 Toplam Şeker Analizi.....	34
3.4.3 Selüloz Derişimin Belirlenmesi Hesabı.....	34
3.4.4 5-HMF Analizi.....	35
3.4.5 Toplam Uçucu Yağ Asidi Analizi.....	35
3.4.6 Biyokütle Konsantrasyon Analizi.....	35
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
4.1 Karanlık Fermentasyon.....	36
4.1.1 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Hidrojen Üretimine Olan Etkisi.....	36
4.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Hidrojen Üretimine Olan Etkisi.....	42
4.1.3 C/N/P/Fe Oranının Hidrojen Üretimine Olan Etkisi.....	49
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>59</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>68</b>
EK A: Başlangıç biyokütle konsantrasyonunun hidrojen üretimine olan etkisi.....	68
EK B: Başlangıç substrat (şeker) konsantrasyonunun hidrojen üretimine olan etkisi.....	73
EK C: C/N/P/Fe oranının hidrojen üretimine olan etkisi.....	79
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>96</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 2.1: a) Birim glikoz başına bütirat ve hidrojen oluşturmak için izlenenmetabolizmik yol izi. b) Birim glikoz başına asetat ve hidrojen oluşturmak için izlenen metabolizmik yol izi. (Fd<sub>ok</sub>: oksitlenen ferrodoksin, Fd<sub>ind</sub>: indirgenen ferrodoksin) (Morales vd. 2015 uyarlanmıştır).....12
- Şekil 2.2: Selüloz/nişasta içeren tarımsal atıklar ve gıda sanayi atık suları içeren biyolojik hidrojen üretimi proses diyagramı (Kapdan ve Kargı 2006).....14
- Şekil 2.3: Ön-muamelenin lignoselülozik yapıya potansiyel etkisinin şematik görüntüsü (Adıgüzel 2013).....15
- Şekil 4.1: Kümülatif hidrojen gazının farklı biyokütle konsantrasyonları (g/L) için zamana göre değişimi. ■ 0.1, ◆ 0.5, ○ 0.875, ◇ 1.0, △ 1.5, ▲3.0, x 6.0.....37
- Şekil 4.2: Maksimum kümülatif hidrojen hacminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.....37
- Şekil 4.3: (o) Özgül hidrojen üretim hızı (ÖHÜH) ile (■) Hidrojen üretim veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.....39
- Şekil 4.4: Toplam uçucu yağ asidi oluşum veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.....40
- Şekil 4.5: 0.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu deneyi için TUYA (mg/L) (■), glikoz (mg/L) (▲)ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.....41
- Şekil 4.6: Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için kümülatif hidrojen (mL) üretiminin zamana göre değişimi. (◇) 6, (▲) 15, (■) 21, (●) 30, (□) 41.....43
- Şekil 4.7: Hidrojen (o) ve toplam uçucu yağ asidi-TUYA (□) üretim verimlerinin farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları için değişimi.....45
- Şekil 4.8: Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonlarına göre değişimi.....46
- Şekil 4.9: 21 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen karanlık fermentasyon deneyinde kümülatif hidrojen üretiminin (Δ), glikoz (g/L) (◇), TUYA (g/L) (□), biyokütle (g/L) (o) konsantrasyonlarının zamana göre değişimi. ....47
- Şekil 4.10: Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.....53

Şekil 4.11: Hidrojen üretim veriminin farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.....	53
Şekil 4.12: Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında Fe/C oranına göre değişimi.....	54
Şekil 4.13: Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.....	55
Şekil 4.14: Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.....	56
Şekil 4.15: Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı P/C oranlarında Fe/C oranına göre değişimi.....	56
Şekil 4.16: N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.003 optimum oranlarda işletilen karanlık fermentasyon deneyine ait TUYA (g/L) (■), glikoz (g/L) (▲) ve kümülatif hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.....	57

# TABLO LİSTESİ

## Sayfa

Tablo 2.1: Biyohidrojen üretimi için kullanılan biyokütle atıkları ve işleniş şekilleri (Holladay ve diğ. 2008).....	5
Tablo 2.2: Biyohidrojen üretimi için kullanılan biyokütle atıkları ve işleniş şekilleri (Holladay ve diğ. 2008).....	6
Tablo 2.3: Biyolojik Hidrojen Üretim yolları (Das ve Veziroğlu 2001).....	7
Tablo 2.4: Biyolojik hidrojen üretim yollarının avantajları ve dezavantajları (Das ve Veziroğlu 2008).....	7
Tablo 2.5: Literatürde çeşitli hammaddeler için farklı karanlık fermentasyon şartlarında gerçekleşen deneyler ve sonuçları.....	25-28
Tablo 4.1: Farklı biyokütle konsantrasyonları için Gompertz eşitliği katsayıları....	38
Tablo 4.2: Biyokütle deneyi başlangıç ve sondaki glikoz ve TUYA konsantrasyonları.....	40
Tablo 4.3: Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için Gompertz katsayıları ( $X_0$ : 0.15 g/L, $V_0$ : 45 mL).....	44
Tablo 4.4: Deney başlangıcı ve sonundaki substrat (glikoz) ve toplam uçucu yağ asiti (TUYA) konsantrasyonları.....	44
Tablo 4.5: Optimum başlangıç substrat (21 g/L) ve biyokütle (0.15 g/L) konsantrasyonlarında işletilen karanlık fermentasyon doğrulama deneyi Gompertz eşitliği katsayıları ve verimleri.....	47
Tablo 4.6: Box-Behnken istatistiksel deney tasarım değerleri ve sonuçları tablosu.....	49
Tablo 4.7: Hidrojen üretim verimine ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.....	51
Tablo 4.8: Özgül hidrojen üretim hızına ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.....	52

## SEMBOL LİSTESİ

<b>KF</b>	: Karanlık Fermentasyon
<b>UYA</b>	: Uçucu Yağ Asidi
<b>TUYA</b>	: Toplam Uçucu Yağ Asidi
<b>KOİ</b>	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
<b>ORP</b>	: İndirgenme Yükseltgenme Potansiyeli
<b>ÖHÜH</b>	: Özgül Hidrojen Üretim Hızı
<b>HÜH</b>	: Hidrojen Üretim Hızı
<b>HÜV</b>	: Hidrojen Üretim Verimi
<b>UAKM</b>	: Askıda Uçucu Katı Madde
<b>TUAKM</b>	: Toplam Askıda Uçucu Katı Madde
<b>KSUAKM</b>	: Karışık Sıvı Askıda Uçucu Katı Madde

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans dönemim ve tez çalışmamam boyunca bilgisini, yardımını esirgemeyen ve kariyerimde gelişmeye yardımcı olan tez danışmanım Doç. Dr. Hidayet Argun'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmama ve bana maddi destekte bulunan TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Pamukkale Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde Prof.Dr. Osman Nuri Ağdağ hocam başta olmak üzere tüm hocalarıma sabır, anlayış ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda ve tez yazım aşamasında bana destek olan Siaka Dao, Dr. Tufan Topal ve canım arkadaşım Araş. Gör. Roda Gökçe Yılmaz'a en içten teşekkürlerimi iletiyorum. Her zaman yanımda olan, eğitim hayatım boyunca bana destekçi olan ve olmaya devam edecek aileme ve canım kardeşim Gülşah Onaran'a sonsuz teşekkür ederim.

# 1. GİRİŞ

Gelişen teknolojiyle birlikte enerji tüketimi ve bunların sonucunda çevre kirliliği gün geçtikçe artmaktadır. Geçmişte olduğu gibi günümüzde de enerji üretiminde fosil kaynaklardan yoğun bir şekilde yararlanılmaktadır. Fosil kaynaklı yakıtların kullanımıyla birlikte atmosfere kükürt oksitler, azot oksitler, karbon monoksit gibi hava kirliliğine sebep olan emisyonlar salınmaktadır. Ayrıca bu yakıtların rezervleri de gün geçtikçe azalarak tükenme noktasına gelmiştir. Bunların sonucunda meydana gelen küresel ısınma ve buzulların erimesi gibi birçok somut faktörün ortaya çıkması, yenilenebilir ve temiz enerji üretimi alanındaki çalışmaları hızlandırmıştır. Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı çevre ile daha uyumlu, sürdürülebilir ve çeşitli avantajlar sunmaktadır. Rüzgar, güneş, biyokütle gibi çeşitli kaynaklar kullanılarak yenilenebilir enerji üretimi yapılabilmektedir. Yenilenebilir enerji üretimi var olan bir kaynağı tüketmeye değil, o kaynağı belirli süreçlerde tekrar tekrar kullanmayı esas alır. Rüzgar, güneş ve biyokütlenin yanında jeotermal, tarımsal, dalga, hidrolik gibi doğada var olan ve var olmaya devam eden kaynaklar yenilenebilir enerji sistemlerini oluşturur.

Dünyada olduğu gibi Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde ve Türkiye’de de giderek yenilenebilir enerji kullanımı artmaktadır. Yenilenebilir enerji kaynağı kullanımında AB ülkelerinin 2020 yılında ki hedefi bu enerji türünün toplam enerjideki payını %20’ye çıkartmaktır. Türkiye’nin ise elektrik üretiminde yenilenebilir enerji kaynağı payı %30 olarak hedeflenmiştir (Gromke ve Rensberg 2011).

Biyokütle, yeşil bitkilerin güneş enerjisini fotosentez yolu ile kimyasal enerjiye dönüştürerek depolanması sonucu ile meydana gelen biyolojik kütle ve buna bağlı organik madde kaynakları olarak tanımlanmaktadır (Çetiner 2009). Biyokütle karbonhidratça zengin tarımsal atıklar, organik yemek atıkları, organik içeriği yüksek evsel veya endüstriyel atıksular ve atıksu arıtma tesisi çamurları vb. içerisinde bulunabilmektedir (Kapdan ve Kargı 2006). Biyokütle diğer yenilenebilir enerji kaynaklarına göre daha bol üretilmesi nedeniyle avantajlar sunmaktadır. Ayrıca güneş ve rüzgar gibi mevsimsel ve bölgesel etmenlere bağlı olmadığı içinde daha geniş kullanım alanına sahiptir. Örneğin; AB ülkelerinde 2008 yılına göre biyokütlenin yenilenebilir enerji içerisindeki payı %19’dur (Gromke ve Rensberg 2011).

Biyokütleden biyoenerji elde edilmesi için çeşitli kaynaklar kullanılabilir. Bunun için özel bitkiler yetiştirilebildiği gibi, kullanılmış katı, sıvı atıklardan da yararlanılabilir. Biyokütlenin değerlendirilmesi ile elde edilebilen kıymetli ürünlerden birisi de hidrojen gazıdır. Hidrojen, doğada en yaygın bulunan elementtir. Hidrojen gazı renksiz, kokusuz olup zehirli değildir (Chong ve diğ. 2009). Hidrojen gazı diğer fosil kaynaklar gibi kullanıldığında çevreye sera gazı salınımı yapmaz. Çevre dostu olmasının yanında hidrojen, 122 kJ/g yüksek enerji içeriği ile hidrokarbon yakıtlarına göre yaklaşık 3 kat daha fazla enerji içerir. Hidrojen gazının yakıt olarak kullanımında karşılaşılan en büyük sorun doğada serbest halde bulunmaması ve geleneksel yollarla üretiminde fazla enerjiye ihtiyaç duyulmasıdır (Kapdan ve Kargı 2006). Anaerobik çürütücülerden gelen metan ile asitojenik fermentasyon sonucunda oluşan hidrojenin yakıt hücrelerinde yakılma işlemi karşılaştırıldığında hidrojenin metana göre enerji verimliliğinde avantajlı olduğu söylenmek zorundadır (Méndez-Vilas 2013).

Hidrojen gazı termokimyasal, elektrokimyasal ve biyolojik metotlarla üretilir. Bunlar arasında biyolojik yollar ile hidrojen üretimi avantajlar sunmaktadır. Lignoselülozik atıklar da biyolojik hidrojen üretiminde kullanılabilir. Bu tür atıkların hidrojen üretiminde kullanılabilmesi için nişasta ve şeker içeren atıklara göre daha farklı ön işlemlere tabi tutulması gerekir. Çünkü lignoselülozik atıklar içerisinde hazır fermente edilebilir şekerler bulunmayıp, bu bileşikler selüloz, hemiselüloz ve ligninin oluşturduğu karmaşık ve korunaklı bir yapı içerisinde saklı bulunur dolayısıyla bu korunaklı yapının kırılarak içerisindeki fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkartılması gerekir. Kağıt atıkları da ucuz yoldan kolay ulaşılabilen önemli bir selülozik biyokütle kaynağıdır. Kağıtlar %85-99 selüloz, %0 hemiselüloz ve %0-15 lignin içeriklerine sahiptirler. Kağıtta bulunan selüloz çeşitli yollar ile fermente edilebilir şekere indirgenebilir ve kıymetli ürünler oluşturulmasında kullanılabilir (Salam ve diğ. 2013).

Bu tez kapsamında; ciddi şekilde atık oluşumuna neden olan atık havlu kağıtlardan karanlık fermentasyon yöntemi kullanılarak hidrojen gazı üretimi üzerinde çalışılmıştır.

## 1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı selüloz içeriği yüksek olan atık havlu peçeteden karanlık fermentasyon ile hidrojen gazı üretmektir. Bu kapsamda hem atık giderimi hem de temiz yakıt üretimi hedeflenmiştir. Tez çalışması üç aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama deneyi başlangıç biyokütle konsantrasyonunun optimizasyonu hedeflenirken, ikinci aşama deneyi başlangıç substrat konsantrasyonunun optimizasyonu hedeflenmiştir. Son aşama deneyinde ise C/N/P/Fe oranının optimizasyonu çalışılmıştır. Bütün deneyler kesikli işletim ve mezofilik şartlarda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar matematiksel eşitlikler ve istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiş ve bu konuda yapılabilecek bilimsel çalışmalar için önerilerde bulunulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Hidrojen

Hidrojen evrende en çok bulunan element olduğu düşünülmesine rağmen gezegenimizde saf halde bulunmaz (Mallada ve M nendez 2008). Hidrojen genellikle oksijen, karbon ve diğer elementler ile birleşik oluşturarak suda, fosil yakıtlarda ve sayısız hidrokarbon bileşiklerde bulunmaktadır (Penner 2006). Hidrojen, bir proton ve bir elektrondan oluşan ve periyodik cetvelin başında bulunan en hafif elementtir. Dünya'da bulunan maddelerin %90'ından fazlası hidrojen içermektedir. Güneş ise çoğunlukla hidrojenden oluşur (Butcher 2014). Ayrıca dünyanın güneşten aldığı enerji, hidrojenin füzyon tepkimesi sonucunda helyuma dönüşmesi ile ortaya çıkar (Aslan 2007). Hidrojen gazının doğal formu iki atomludur ve H<sub>2</sub> olarak adlandırılır (www.fuelcells.org ). Hidrojen gazı hafif olmasının yanında tüm fosil kaynaklara göre birim ağırlığı başına 122 kJ/g gibi yüksek enerji içerir (Kapdan ve Kargı 2006).

Hidrojen doğal yollarla elde edilen bir gaz olmayıp, su, fosil kaynaklar veya biyokütle gibi çeşitli hammaddelerden üretilen endüstriyel bir gazdır (Kardaş 2005). Hidrojen; birincil enerji kaynağı değil, bir enerji taşıyıcısıdır. Hidrojen,  rneğin benzin, elektrik ve merkezi ısıtma gibi diğer enerji taşıyıcıları ile birlikte bir enerji kaynağından üretilir. Enerji taşıyıcısı, örneğin, ısıtma, nakliye ya da aydınlatma gibi bir enerji hizmet talebini enerji kaynağından son kullanıcıya aktarır. Hidrojen eğer enerji servisi için kullanılacak ise son kullanım için mutlaka ısı, mekanik çalışma veya elektriğe dönüştürülmelidir (Aam 2004). Hidrojen gazı, kullanım verimi yüksek ayrıca evre dostu bir yakıttır. Çünkü oksijen ile birlikte yüksek enerji değerinde yakıldığında sadece su oluşur ve bu hidrojen, sudan sürdürülebilir olarak üretilmeye devam eder.

Bir enerji taşıyıcısı ve yakıt olarak hidrojenin taşıdığı potansiyel bilinmekte ve bu gaz 21. yüzyılın yakıtı olarak kabul edilmektedir ( zt rk ve diğ. 2005).

## 2.2 Hidrojen Üretim Yöntemleri

Hidrojen, yenilenebilir enerji kaynaklarından (örneğin; güneş) üretilen, asla değiştirmek zorunda olmadığı kalıcı bir enerji kaynağıdır (Veziroğlu 2003). Hidrojen üretiminde geleneksel veya biyolojik metotlar kullanılabilir. Geleneksel yollarla hidrojen gazı eldesi termokimyasal, elektrokimyasal gibi yüksek sıcaklık, basınç ve enerji kullanılarak yapılan ve çoğu zaman çevre dostu olmadıklarından dolayı biyolojik metotlar önemli bir alternatif olmaktadır (Genç 2009). Biyolojik metotların avantajları arasında; ılımlı koşullarda (25°C, 1 atm) gerçekleşebilmesi, CO (karbonmonoksit) ve HC (hidrokarbon) oluşumunun olmaması ve atıkların ham madde olarak kullanılabilirliği sayılabilir (Onaran ve Argun 2014). Tablo 2.1’de farklı ham maddelerden farklı üretim verimlerinde hidrojen gazı üretim yöntemleri karşılaştırılmıştır.

**Tablo 2.1:** Hidrojen üretimi için yöntemler, hammaddeleri ve verimleri (Holladay ve diğ. 2008).

Hidrojen Üretim Yöntemleri	Kaynaklar	Verimler (%)	İşlem Süresi
Buhar Dönüşüm	Hidrokarbonlar	70 - 85	Hızlı
Kısmi Oksidasyon	Hidrokarbonlar	60 - 75	Hızlı
Ototermal Dönüşüm	Hidrokarbonlar	60 - 75	Kısa
Plazma Dönüşüm	Hidrokarbonlar	9 - 85	Uzun
Sıvı Faz Dönüşüm	Karbonhidratlar	35 - 55	Orta
Amonyak Dönüşüm	Amonyak	Uygulanabilir Değil	Kısa
Biyokütle Gazifikasyonu	Biyokütle	35 - 50	Hızlı
Fotoliz	Güneş Işığı + Su	0.5	Uzun
Karanlık Fermantasyon	Biyokütle	60 - 80	Uzun
Işıklı Fermentasyon	Biyokütle + Güneş Işığı	0.1	Uzun
Mikrobiyal Elektroliz Hücreleri(MEC)	Biyokütle + Elektrik	78	Uzun
Alkali Elektroliz Cihazı	Su (H <sub>2</sub> O) + Elektrik	50 - 60	Hızlı
Polimer Membran elektrolitler(PEM)	Su (H <sub>2</sub> O) + Elektrik	55 - 70	Kısa
Katı Oksit Elektroliz Hücresi	Su (H <sub>2</sub> O) + Elektrik + Isı	40 - 60	Orta
Termokimyasal Su Ayrışımı	Su (H <sub>2</sub> O) + Isı	Uygulanabilir Değil	Uzun
Fotoelektrokimyasal Su Ayrışımı	Su (H <sub>2</sub> O) + Güneş Işığı	12.4	Uzun

Tablo 2.1'de görüldüğü gibi termal yöntemlerle hidrojen gazı üretimi diğer yöntemlere göre daha hızlı ve verimleri daha yüksektir. Buna rağmen pahalı ve çevre açısından olumsuz etkiler bırakmaktadır. Hidrokarbonlardan hidrojen gazı üretiminde temel aşamalar; hidrokarbonun buhar, hava veya oksijen ile ısıtılıp, su ve hammaddenin parçalanması ile oluşur (Das ve Veziroğlu, 2001). Bu işlemin sonucunda H<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> üretilir. Bu yöntemde hem sınırlı olan fosil kaynaklar tüketilmekte hem de fazlaca karbon salınımı gerçekleşmektedir. Ayrıca hidrokarbonları parçalamak için yüksek sıcaklığa da ihtiyaç duyulmaktadır. Bir diğer yöntem suyun elektrolizidir. Suyun hidrojen üretiminde kullanılmasının sebeplerinden biri suyun %11.2'sinin hidrojenden oluşmasıdır. Dünya hidrojen üretiminin %20'sini oluşturan bu yöntemle en saf hidrojen elde edilebilir. 1950'lerde çok kullanılan bu yöntem artık günümüzde daha az kullanılmaktadır (Beşergil 2009). Biyokütlenin gazlaştırılması ile hidrojen gazı üretimi de hidrokarbonlardan hidrojen üretimine benzemektedir ve dolayısıyla yüksek sıcaklık ve basınç gerektirmektedir. Bu işlem sonucunda da metan, hidrojen ve karbonoksit oluşur.

Ham madde kaynağı olarak biyokütleden, karanlık fermentasyon gibi biyolojik bir proses ile de hidrojen gazı üretimi mümkündür. Burada hidrojen gazı üretiminin ılımlı şartlarda ve fosil yakıt gerektirmeyen kaynaklardan gerçekleştirilebilmesi bu prosesi diğer geleneksel yöntemler ile hidrojen üretimi açısından avantajlı kılmaktadır. Tablo 2.2'de çeşitli hammaddelerden hidrojen üretimi için izlenilmesi gereken yollar hakkında genel bilgiler verilmektedir.

**Tablo 2.2:** Biyohidrojen üretimi için kullanılan biyokütle atıkları ve işleniş şekilleri (Holladay ve diğ. 2008).

BİYOKÜTLE KAYNAĞI	GÖRÜŞLER
Niştalı tarımsal atıklar ve gıda endüstrisi atıkları	Niştadan glikoz ve maltoz hidroliz ile elde edilmeli, ardından organik asitlere ve en sonda hidrojene dönüştürülmeliler.
Selülozlu tarımsal atıklar ve gıda endüstrisi atıkları	İnce şekilde öğütülüp, delignifikasyon aşamasından geçirilip niştalı gibi işlenebilir.
Karbonhidratça zengin endüstriyel atıklar	İstenmeyen yabancı maddeler ve besin dengesi için ön arıtma gerekli olabilir, daha sonra niştalı gibi işlenebilir.
Atıksu arıtma tesisinde oluşan atık çamurlar	Ön arıtma gerekli olabilir daha sonra da organik asitlere ve en son olarak hidrojen dönüşüm sağlanır.

Atık, içeriğine göre belirli ön işlemden geçirildikten sonra verimli bir şekilde hidrojen gazı üretiminde kullanılabilir. Örneğin; lignin içeriği yüksek olan maddelerde fermente edilebilir şekere ulaşabilmek için öncelikle lignin giderimi yapılması

gerekmektedir. Atıkların yüzey alanları da hem ön arıtmada hem de fermentasyon üretiminde etkilidir. Bu yüzden atığın gerekli boyutlara getirilmesi önemlidir. Tablo 2.3 biyolojik hidrojen üretim metotlarını özetlemektedir.

**Tablo 2.3:** Biyolojik hidrojen üretim yolları (Das ve Veziroğlu 2001)

1.	Suyun biyofotolizi
2.	Işıklı Fermentasyon
3.	Karanlık Fermentasyon
4.	Işıklı ve Karanlık Fermentasyon Bakterilerini Kullanan Hibrit Sistemler

Biyolojik hidrojen üretim yollarının türlerine göre değişen avantajları ve dezavantajları vardır. Bunlar Tablo 2.4'de özetlenmiştir.

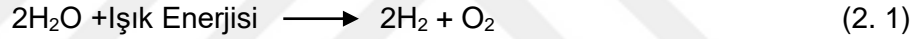
**Tablo 2.4:** Biyolojik hidrojen üretim yollarının avantajları ve dezavantajları (Das ve Veziroğlu 2008).

Biyohidrojen üretim yolu	Avantajlar	Dezavantajlar
Direkt Biyo-fotoliz	Hidrojen üretiminde su ve güneş ışığını doğrudan kullanırlar. Güneş enerjisinin dönüşümü bitkilerle karşılaştırıldığında yaklaşık 10 kat daha fazladır.	Yüksek yoğunlukta ışığa ihtiyaç duyarlar. Oluşan oksijen sistem için tehlikelidir. Elde edilen fotokimyasal verimi düşüktür.
İndirekt Biyo-fotoliz	<i>Cyanobacteri</i> sudan H <sub>2</sub> üretebilir. Atmosferdeki N <sub>2</sub> oranını düzeltebilir.	Hidrojenaz enziminin alımı H <sub>2</sub> 'nin degradasyonunu durdurmak için kaldırılmalıdır. Gaz karışımının %30 O <sub>2</sub> içerir.
Işıklı Fermentasyon	Geniş spektrumlu ışık enerjisi buradaki bakteri tarafından kullanılabilir. Çeşitli organik atıklar kullanılabilir.	O <sub>2</sub> varlığı nitrojenaza inhisiyon etki yapar. Işık dönüşüm verimliliği oldukça düşüktür (%1-5).
Karanlık Fermentasyon	Işık olmadan bütün gün H <sub>2</sub> üretimi gerçekleşebilir. Çeşitli substratlar karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Bütirik, laktik ve asetik asit gibi çeşitli yan ürünler üretilebilir. Anaerobik procestir, bundan dolayı O <sub>2</sub> limitleyici değildir.	O <sub>2</sub> hidrojenaz için güçlü inhibitördür. Elde edilebilir hidrojen verimi nispeten düşüktür. Hidrojen verimi artıka fermentasyon termodinamik olarak elverişsiz hale gelir. Üretilen gaz karışımı içinden CO <sub>2</sub> 'nin ayrılması gerekir.

## 2.2.1 Biyofotoliz

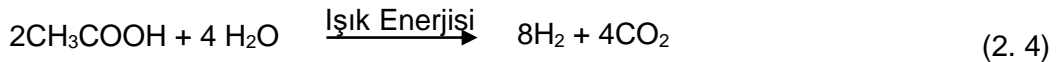
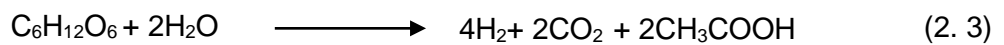
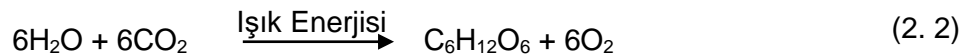
Biyofotolizde suyun algler yardımıyla hidrojen ve oksijene parçalanması sağlanır. Biyofotoliz doğrudan ve dolaylı olmak üzere ikiye ayrılır. Güneş ışığı altında suyun biyofotoliz ile hidrojen üretimi temiz bir yaklaşım olarak kabul edilir. Bununla birlikte, düşük H<sub>2</sub> gazı verimliliği, ışık gereksinimi ve açığa çıkan oksijenin hidrojenaz enzimleri üzerindeki inhibisyonu biyofotolizin başlıca dezavantajlarıdır (Genç 2009).

Direkt (doğrudan) biyofotoliz sürecinde elektronlar sudan iki fotosistem (PSII ve PSI) aracılığı ile hidrojene akar (Genç 2009). PSI; CO<sub>2</sub> azalması için indirgeyici üretecek fotosistem, PSII; oksijen açığa çıkaran ve suyu ayrıştıran sistemdir (Şentürk ve Büyükgüngör 2015). Yeşil alg, *Cyanobacteria* gibi mikro algler hidrojenaz barındırdıklarından dolayı CO<sub>2</sub> azalımı değil hidrojen üretimi yaparlar. Bu aşamada PSII ışık enerjisini absorbladığı zaman elektronlar üretilir. Bu elektronlar PSI tarafından absorbe edilen ışık enerjisini kullanarak ferrodoksine (Fd) transfer edilir. Daha sonra hidrojenaz enzimi hidrojen üretimi için indirgenmiş Fd'den elektronları kabul eder (Genç 2009, Şentürk ve Büyükgüngör 2015).



Denklem (2.1) direkt (doğrudan) biyofotoliz reaksiyonunu özetlemektedir (Levin ve diğ. 2004). Burada su yeşil algler tarafından doğrudan güneş enerjisi ile hidrojen ve oksijene parçalanır. Üretilen hidrojen iyonları hidrojenaz enzimleri yardımıyla hidrojen gazına dönüşürler. Suyun ve güneş ışığının ulaşılabilirliği kolay olduğundan dolayı bu yöntem tercih edilebilir. Fakat suyun parçalanmasında ortaya çıkan oksijenin ortamda birikmesiyle hidrojenaz enzimleri inhibe olur. Bu da hidrojen gazının oluşumunu olumsuz etkiler. Literatürde doğrudan biyofotolizin hidrojen üretim hızı 0.07 mmol/saat.L olarak belirtilmiştir (Manish 2008). Hızın düşük olması ve oksijen inhibisyonu bu prosesin uygulanabilirliğini azaltmaktadır.

Eşitlik (2. 2), (2.3) ve (2.4) dolaylı yoldan biyofotoliz reaksiyonlarını özetlemektedir. (2.2) numaralı reaksiyon mikro-algler tarafından, (2.3) numaralı ise *Cyanobacteria* tarafından gerçekleştirilir.

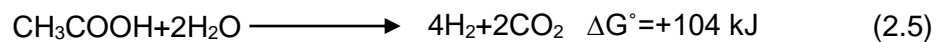


Burada öncelikle mikro-algler karbondioksiti kullanarak fotosentez işlemini tamamlayarak glikoz üretir. *Cyanobacteria* ise glikozu parçalayarak asetik asit ve hidrojen üretir. Hidrojen üretimi hem hidrojenaz hem de nitrojenaz enzimleri ile yapılabilir. *Cyanobacteria* gereksinimleri N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, su, mineral tuzlar ve ışıktır. (2.4) numaralı eşitlikte asetatin hidrojene dönüşümü verilmiştir. Bu sistem ile hidrojen üretimi hava kirliliğinin nedenlerinden olan CO<sub>2</sub> tüketilmesinden dolayı çevre dostu bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Benemann 1997). Fakat verim, hız ve diğer gereksinimlerden dolayı ekonomik değildir. Literatüre göre dolaylı fotoliz için rapor edilen hidrojen üretim hızı 0.333 mmol/saat.L'dir (Genç 2009).

### 2.2.2 Işıklı Fermentasyon

Işıklı fermentasyon prosesinde fotosentetik bakteriler UYA'ları anoksik koşullarda H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> dönüştürürler (Argun ve Kargi, 2011, Tao ve diğ. 2006, Nath ve Das, 2004). Moleküler H<sub>2</sub> üretebilen bu mikroorganizmalar, güneş veya suni ışık enerjisinin altında indirgenmiş bileşikleri örneğin organik asitleri azot elementinin yetersiz olduğu şartlarda nitrojenaz ile katalizler. Fotosentetik bakteriler suyu parçalamada yeterli değildir. Fakat anaerobik şartlarda basit organik asitleri elektron verici olarak kullanırlar. Elektronlar ATP formunda enerji kullanan ferredoksin ile nitrojenaza taşınırlar. Azotun yokluğunda nitrojenaz enzimi protonu hidrojen gazına indirgeyebilir. Fotosentetik mikroorganizmaların, hidrojen üretiminde glikoz, sukroz gibi karbon kaynaklarının yerine UYA'yı tercih ederler. Fotosentetik bakterinin kullanılmasında ki avantaj PS II sürecinin olmayışı bunun sonucunda hidrojen üretiminin oksijen ile inhibe edilmeyişidir (Gülşen ve diğ. 2014).

Işıklı fermentasyon ile hidrojen gazı üretiminde mor kükürtsüz bakteriler en yaygın bilinen türlerdir (*Rhodobacter sphaeroides O.U001*, *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides-RV*, *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodospseudomanas palustris* ve *Rhodospirillum rubrum*'dur (Basak ve Das 2007). Eşitlik 2.5, asetik asitten ışıklı fermentasyon ile hidrojen üretimini özetlemektedir.



Buna göre teorik olarak 1 mol asetik asitten 4 mol hidrojen gazı üretilebilir. Ayrıca bu yöntemle hidrojen üretimi biyofotolize göre daha hızlı (145-160 mmol/saat.L) gerçekleşir (Gülşen ve diğ. 2014).

Işıklı fermentasyon ile hidrojen gazı üretiminde önemli olan parametreler; başlangıç UYA konsantrasyonu, pH, sıcaklık, karıştırma hızı, ışık türü, ışık yoğunluğu, kullanılan ışığın dalga boyu olarak sıralanabilir. UYA konsantrasyonun 1800-2500 mg/L aralığında olması gerektiği rapor edilmiştir (Argun ve Kargı 2011). Tavsiye edilen pH çalışma aralığı 6.8-7'dir. Halojen, floresans, tungsten vb. Işık kaynakları aydınlatma amacıyla kullanılabilir. Sıcaklığın 30-35°C aralığında olması tavsiye edilmektedir (Genç 2009). Ekstra besin kaynağı olarak demir ve molibdateklenmesi nitrojenaz enzimi üzerinde etkilidir. Ayrıca kullanılan ortamın amonyak içeriğinin 20µM üzerinde olması nitrojenaz enzimi üzerinde inhibisyona neden olur (Argun ve Kargı 2011).

Organik asitlerin substrat olarak kullanılabilir olması ışıklı fermentasyonun en büyük avantajlarından biridir. Bu sistemin dezavantajları ise karbon kaynağı olarak seçilen malat ve laktatın azlığı, deney boyunca ışık dağılımının homojen olmayışı ve sistemin hidrojen üretiminin PHB sentezine kaymasıdır (Argun ve Kargı 2011).

### **2.2.3 Karanlık Fermentasyon**

Karanlık fermentasyon (KF) prosesi spor oluşturan anaerobik ve anoksik bakteriler tarafından karbonhidratların kullanılması ile gerçekleşir. Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi ışıklı fermentasyona göre daha hızlıdır. Gece ve gündüz gaz üretimi yapılabilir ve ilave ışık kaynağına ihtiyaç duyulmaz (Das ve Veziroğlu 2001).

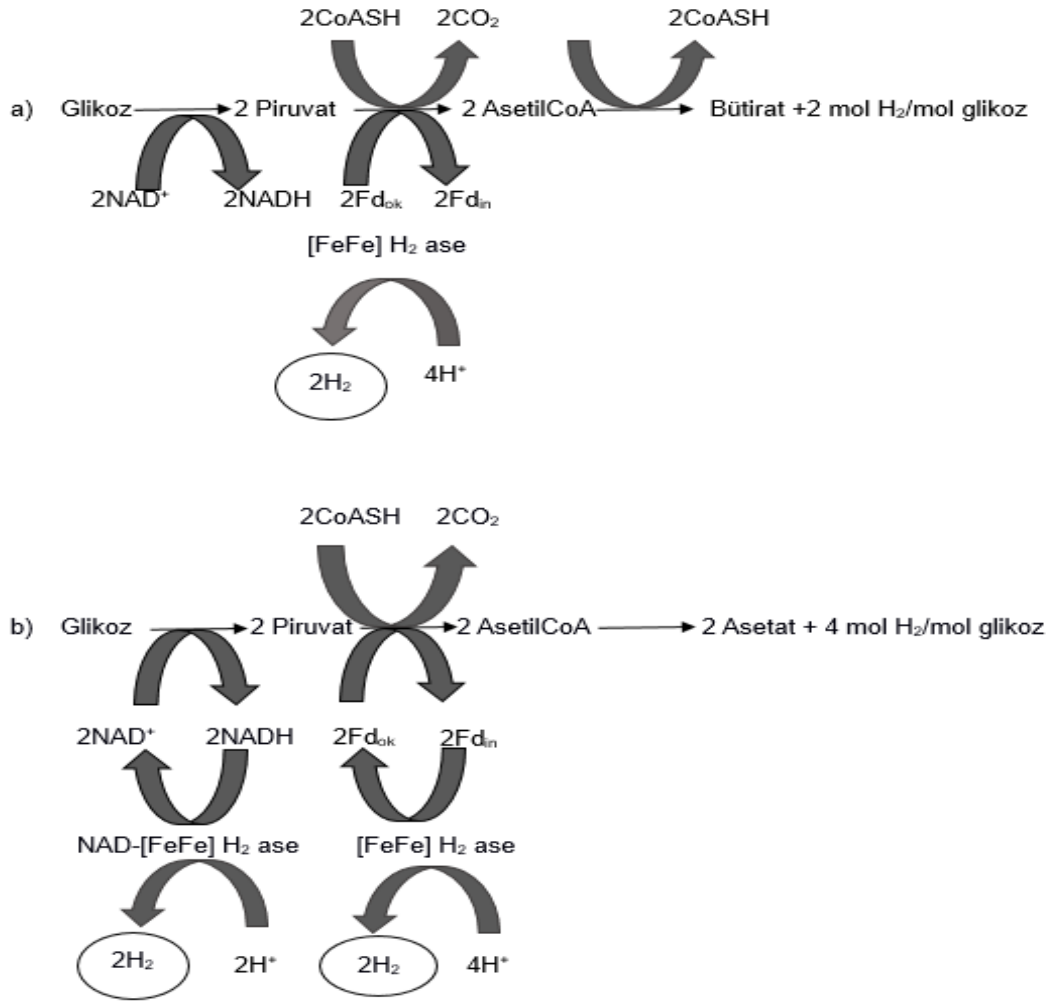
KF metabolizmasının işleyişine ve oluşan ürünlere göre metabolik yollar değişebilir. Anaerobik parçalanma basamaklarından biri olan asidojen safhada organik materyaller parçalanarak ortamda hidrojen, karbondioksit, organik asit ve diğer ürünler oluşur. Burada oluşan organik asit türlerine göre fermentasyonun tipi belirlenir. Bunlar propiyonik asit tipli, bütirik asit tipli ve etanol tipli fermentasyon olarak adlandırılır (Li ve diğ. 2009).

KF, anaerobik koşullarda gerçekleştiği için mikroorganizmalar hidrojen iyonu gibi elementleri elektron alıcısı olarak kullanabilirler. Bu reaksiyonların gerçekleşmesinde hidrojenaz enzimleri aktif rol oynar (Şentürk ve Büyükgüngör 2015).

Çeşitli substratların katabolizması sırasında oluşan piruvatların anaerobik metabolizmaları mikrobiyal hidrojen üretimini tetikler. Örneğin KF'da çok kullanılan

glikozun parçalanması sonucunda piruvat oluşur. Piruvat, asetil CoA'ya okside olur. Asetil CoA metabolizma yol izi ile asetil fosfata dönüştürülür. Bu proseste ATP elde edilirken aynı zamanda yan ürün olarak asetat oluşur. Piruvatın asetil CoA'ya oksidasyonunda indirgenmiş ferrodoksin (Fd) gereklidir. İndirgenmiş Fd hidrojenaz enzimi tarafından oksidasyona uğratılır bunun sonucunda Fd ve moleküler hidrojen üretir (Nath ve Das 2004).

Karbonhidrat kullanılarak gerçekleşen anaerobik karanlık fermentasyon sonucunda asetik, bütirik ve propiyonik asit oluşur (Kapdan ve Kargı, 2006). Karbonhidrat kaynağı olarak glikoz kullanıldığında hidrojen gazı ile birlikte baskın olarak asetik ve bütirik asit oluşur (Nath ve Das 2004). Teoride karanlık fermentasyonda yan ürün olarak üretilen uçucu yağ asitleri (UYA) türüne göre hidrojen verimleri değişir. Şekil 2.1'de 1 mol glikoz için hidrojen üretim aşamaları, yan ürün olarak bütirat Şekil 2.1a ve asetat Şekil 2.1b, özetlenmiştir. Yalnızca asetik asit oluşursa 1 mol glikoz başına 4 mol hidrojen gazı oluşur. Bütirik asitte 1 mol glikoz başına 2 mol hidrojen üretilirken, propiyonik asit üretiminde 1 mol glikoza 1 mol hidrojen gazı tüketilir. Laktik asit veya etanol üretiminde hidrojen üretimi veya tüketimi gerçekleşmez. Asetik asitin ve bütirik asitin beraber oluştuğu sistemlerde teorikte 1 mol glikoza 2.5 mol hidrojen üretimi gerçekleşir (Argun ve Kargı 2011).



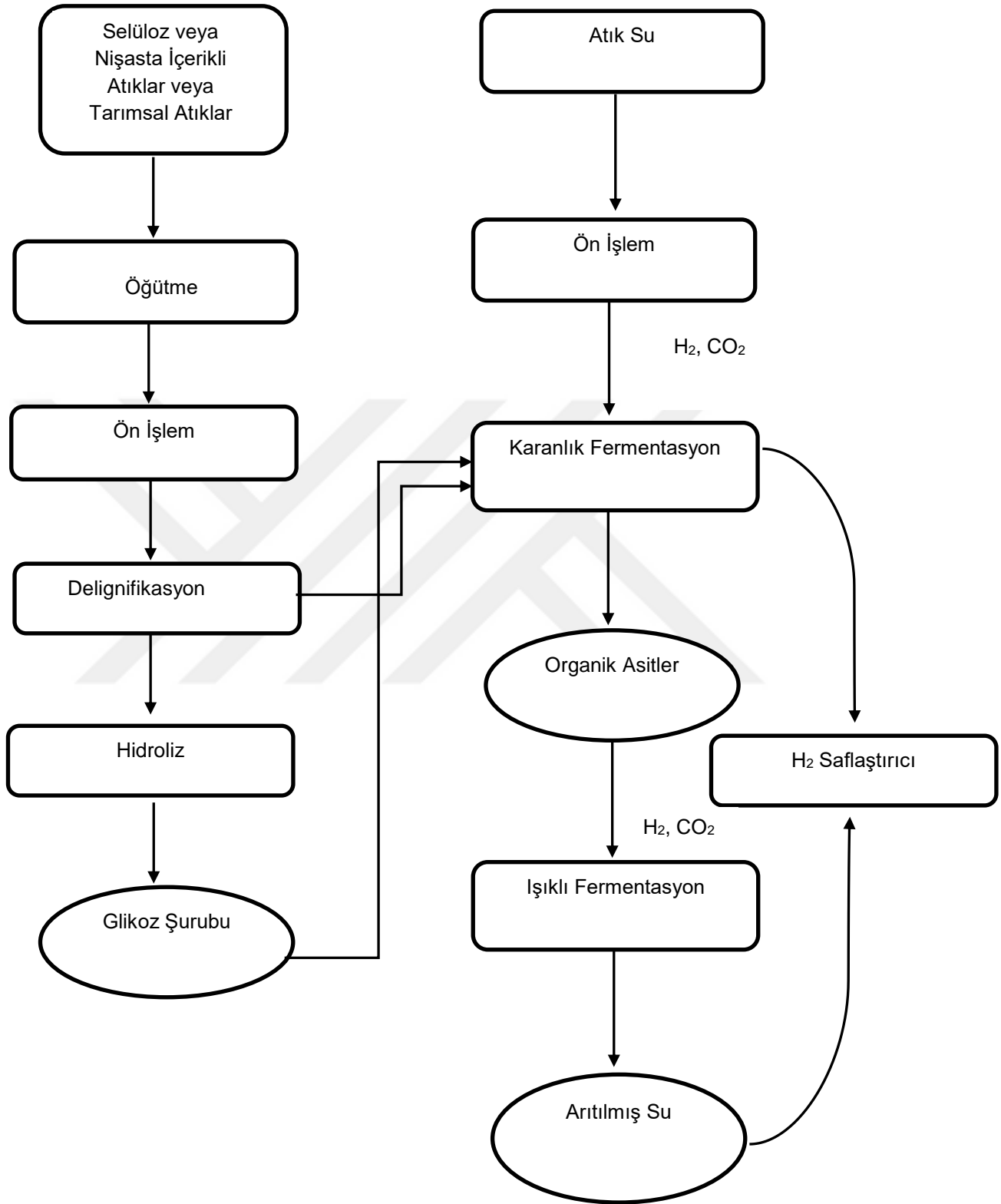
**Şekil 2.1:** a) Birim glikoz başına bütirat ve hidrojen oluşturmak için izlenen metabolizmik yolizi. b) Birim glikoz başına asetat ve hidrojen oluşturmak için izlenen metabolizmik yolizi. (Fd<sub>ok</sub>: oksitlenen ferrodoksin, Fd<sub>ind</sub>: indirgenen ferrodoksin) (Morales ve diğ. 2015'den uyarlanmıştır).

UYA'ların ortamda birikmesi ve ileriki bir basamakta parçalanamaması karanlık fermentasyon çıkış suyunda kirlilik yükünün birikmesine neden olur bu nedenle çıkış suyunda oluşan bu TUYA'lardan ışıklı fermentasyon ile hidrojen üretimi bu olumsuzlukların bertarafına katkı sağlayacaktır. Eşitlik 2.6'da glikoz molekülünün asetik asit ve hidrojene dönüşümünü özetlemektedir. Gibbs serbest enerjisinin negatif olması reaksiyonun kendiliğinden gerçekleştiği ve ekstra enerjiye ihtiyaç duyulmadığını göstermektedir.



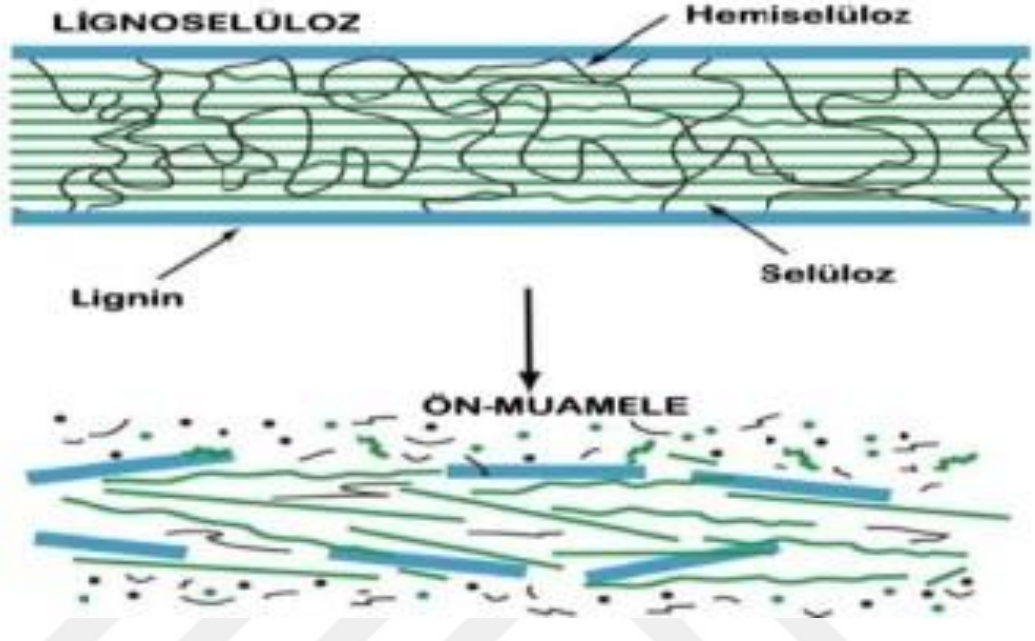
KF prosesinde farklı substratlardan hidrojen üretilmesi mümkündür. Örneğin birincil nesil enerji bitkileri yetiştirilip kullanılabilirdiği gibi atık maddelerden de hidrojen üretilir. KF ile hidrojen üretiminde nişasta ve selüloz içeren tarımsal atıklar, gıda endüstrisi gibi karbonhidratça zengin atıksular ve atıksu arıtma çamurları ham madde olarak değerlendirilebilir. Nişasta içeren atıkların selüloz içeren atıklara göre hidrojen üretiminde kullanımı daha kolaydır. Çünkü nişastadan fermente edilebilir şekerlerin eldesi selüloza göre daha kolaydır.

Örneğin selüloz içeren tarımsal atıklar fiziksel veya kimyasal ön arıtım işlemlerine tabi tutulduktan sonra fermentasyonda kullanılabilir. Şekil 2.2 bu tür atıklardan hidrojen üretim basamaklarını özetlemektedir.



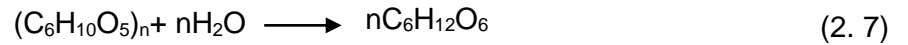
**Şekil 2.2:** Selüloz/nişasta içeren tarımsal atıklar ve gıda sanayi atık suları içeren biyolojik hidrojen üretimi proses diyagramı (Kapdan ve Kargı 2006).

Bu işlemlerin amacı fermentasyon için yapısal ve içeriksel engelleyicileri ayırmak, lignoselülozik yapıyı gevşetmek ve böylece enzimatik hidrolizi ve selüloz ya da hemiselülozdan fermente edilebilir şeker oluşum miktarını artırmaktır (Adıgüzel 2013). Şekil 2.3'de ön işleme tabi tutulan lignoselülozik atığın nasıl bir değişim geçirdiği anlatılmaya çalışılmıştır.



**Şekil 2.3:** Ön-muamelenin lignoselülozik yapıya potansiyel etkisinin şematik gösterimi (Adıgüzel 2013).

Hidroliz işlemleri fizikokimyasal veya enzimatik olabilir. Eşitlik (2.7)'de selülozun hidrolizini açıklayan genel denklem verilmiştir. Kimyasal hidrolizde en yaygın olarak asit hidrolizi kullanılır bu işlem enzimatik hidrolize göre daha ucuzdur, ancak hidroliz esnasında oluşan toksik bileşikler bu yöntemin uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır.



Asit hidroliz için  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $H_3PO_4$  gibi asit türleri çeşitli koşullarda ısı ile birlikte atığa uygulanır. Asit hidrolizi ile amaçlanan lignoselülozik atığın lignin yapısını gevşetmek, uzun selüloz zinciri kırıp daha basit yapıdaki glikoz moleküllerine ulaşmaktır. Ortaya çıkan glikoz fermente edilebilir özelliktedir.

Asit hidrolizi seyreltik asit veya konsantre asit kullanılarak gerçekleştirilir. Konsantre asit hidrolizi oda sıcaklığında ve %50'in üzerinde asit konsantrasyonu uygulanarak gerçekleşir. Bu süreçte kullanılan asit,  $\beta$ -glycosidic bağların

kırılmasından sonra glikoz ve oligosakkaritlerin oluşumu için selülozun şişmesini, çözünmesini ve dekrizalleşmesini destekler. Seyreltik asit hidrolizinde ilk olarak uzun selüloz zinciri küçük zincir yüksek polimerizasyon derece (DP) selüloza dönüşür. Yüksek DP küçük DP oligomerlere ve daha sonra da oligomerler glikoza dönüşür. Bu işlemlerin yanında 5-HMF (5-hydroxymethylfurfural) gibi birçok ara ürün oluşur. Teorik olarak 1 selülozdan 0.77 g 5-HMF üretilir (Argun ve Onaran 2016).

Asit hidrolizinde glikozun yanında çeşitli organik asitler veya selülozik atığın içeriğinin asit ve sıcaklık ile reaksiyonundan biyokütleyle inhibisyon etkisi yaratabilecek HMF'nin yanında değişik toksik maddeler, tuzlar oluşabilir. Detoksifikasyon yöntemleri kullanılarak bu toksik maddeler giderilebilir. Detoksifikasyon yöntemleri; kireç, aktif karbon adsorpsiyonu, reçine gibi değişik fiziksel ve kimyasal metotlardır (Nissilä ve diğ. 2012, Lee ve diğ. 2011).

Bu tez çalışmasında gerekli glikoz şurubu seyreltik asit hidrolizi kullanılarak elde edilmiştir. Seyreltik asit hidrolizinin tercih edilmesinin sebebi; düşük kimyasal kullanımı, reaksiyon için gerekli sıcaklığın düşük olması, hızlı olması ve glikoz zincirlerini parçalama özelliğinin yüksek olmasındandır. Toksik maddelerin gideriminde ise aktif karbon adsorpsiyonu kullanılmıştır.

Substrata ilave olarak ortama konulan azot, fosfat, demir vb. besin maddeleri oranı da hidrojen üretim veriminde etkilidir. Bu besin maddelerinin oranı kullanılan substrata ve mikroorganizma kültürüne göre değişiklik gösterebilir. Azot; protein, nükleik asit veya enzimlerin yapısında bulunduğu için önemlidir. Fakat fazla azot miktarı hücrenin pH dengesini bozduğundan inhibisyon yapabilir (Genç 2009). Benzer şekilde bir diğer önemli besin maddesi olan fosfor da hem mikrobiyal gelişme de hem de biyokimyasal reaksiyonları tamponlamada önemlidir (Ghimire ve diğ. 2015). Ayrıca hidrojen üretiminde etkisi olan hidrojenaz enzimi içerdiği metal iyonlarına göre 2 sınıfa ayrılır. Bunlar [Fe-Fe] hidrojenazlar ve [Ni-Fe] hidrojenazlardır. Bakterilerin büyük çoğunluğunda [Ni-Fe] hidrojenazları bulunurken, az bakteride [Fe-Fe] hidrojenazları vardır. Karanlık fermentasyon prosesinde bu metal iyonlar katılarak hidrojenaz enzimi faaliyetleri artırılabilir (Taherdanak ve diğ. 2016).

KF prosesinde sıcaklık faktörü de kullanılan bakteri türüne göre değişmektedir. Mikroorganizmaların aktivitelerini maksimum yerine getirebilmesi için en uygun sıcaklığın seçilmesi gerekir. Fermentasyon, mezofilik (25-40°C), termofilik(40-65°C), ekstrem termofilik (65-80°C) veya hipertermofilik (> 80°C) koşullarda gerçekleştirilebilir (Levin ve Chahine 2010).

Ortam koşullarına göre değişen pH değerinin de hidrojen gazı üretimi üzerine önemli etkisi vardır. Başlangıç pH'ı dışında sistem işletildiği süreç boyuncada pH'ın

kontrol edilmesi gereklidir. Çünkü karanlık fermentasyonda üretilen organik asitler ortamın asitlik derecesini artırır. Asitliğin artıp, pH'nın düşmesi ile hidrojenaz enziminin aktivitesi olumsuz etkilenir. pH arttıkça hidrojen üretimi artar fakat yüksek pH'larda üretim azalır.

Hidrojen üretiminde karışık bakteri kültürü de kullanılabilir. Fakat karışık kültürün içinde bulunan metanojenler, homo-asetojenler gibi hidrojen tüketen bakterilerin giderilmesi gerekir. Karışık kültürden biyolojik hidrojen üretimini zenginleştirmek için temel olarak ısı-şok, asit, baz, havalandırma, dondurma-çözdürme, kloroform, sodyum 2- bromoetansülfonat veya 2-bromoetansülfonik asitve iyodopropan kullanılan ön işlemler rapor edilmiştir ( Wang ve Wan 2009).

KF, genel olarak kesikli veya sürekli işletim modlarından birinde gerçekleşir. Literatürde, glikoz ve sukroz gibi substratlar için genellikle kesikli işletim modu kullanılırken,organik atıklarda sürekli işletim modu kullanılmaktadır (Wang ve Wan 2009).

Hidrolik alıkonma süresinin (HAS) sürekli olarak işletilen reaktörlerde hidrojen ve yan ürün oluşumu üzerine etkisi vardır. Uygun HAS belirlemede substrat türü, reaktör tipi ayrıca mikroorganizma türü de önemlidir. HAS, uygun aralıklarda artıkça bakterilerin hidrojen üretime potansiyellerini artırır fakat yüksek HAS'leri azaltır (Şentürk ve Büyükgüngör 2015).

### 2.3 Literatür Özeti

Karanlık fermentasyon prosesi ışıklı fermentasyon ve biyofotolize göre daha yüksek verimlere sahiptir. Buna rağmen, substrattan hidrojene dönüşüm verimi düşüktür. Bunun sebebi çeşitli formlarda yan ürünün oluşumudur (Chandrasekhar ve diğ. 2015). KF prosesinde genel olarak, spor oluşturan Clostridium türleri, Enterobacter sp, Bacillus sp, ve bazı termofilik bakteriler kullanıldığı gibi ayrıca anaerobik asitojenik çamurda bu amaç için en yaygın kullanılan kültürleri içeren çamur türleridir (Argun ve Kargı 2011). Chin ve diğ. (2003) Clostridium acetobutylicum süspansiyon kültürünü kullanarak beslemeli kesikli reaktörde hidrojen üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. Hidrojen üretmek için mevcut ortam pH ve sıcaklığın sırasıyla 6 ve 37°C olduğu belirtilmiştir. Biyoreaktörün yükleme hacmi 650 mmol H<sub>2</sub>/L kültür ile verimi yaklaşık 2.0 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz olmuştur. Asetat ve bütirat oluşumu metabolitlerin yaklaşık %80'i oluşmuş ve bu iki tür

metabolitin hidrojen üretimi potansiyeline inhibe etkisi olduğu belirtilmiştir (Chin ve diğ. 2003).

Magnusson ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmada hiçbir ön arıtma yapmadan selülozik maddeden hidrojen üretmeyi amaçlamıştır. Deneylerde *Clostridiumthermocellum* ATCC 27405 termofilik bakteri türünü kullanılmıştır. Substrat olarak ise işlenip kurutulmuş tahıl, arpa kabuğu ve yanık kirli arpa kabuğu kullanılmıştır. Başlangıç substrat konsantrasyonu 5 g/L ve çalışma hacmi 26 mL'dir. Deneyler 60°C yapılmıştır. Deneylerin sonucunda en iyi verim olarak 1.27 mmol H<sub>2</sub>/glikoz işlenip kurutulmuş tahıldan elde edilmiştir. Diğerlerin de ise arpa kabuğu 1.24 mmol H<sub>2</sub>/glikoz, atık arpa kabuğun ise 1.18 mmol H<sub>2</sub>/glikoz olarak rapor edilmiştir (Magnusson ve diğ. 2008).

Saripan ve Reungsang (2014) eşzamanlı sakkarfikasyon ve fermentasyon ile selülozdan termofilik koşullar altında fil gübresi aşısı ile hidrojen üretimini incelemişlerdir. Model substratın hazırlanmasında karboksimetil selüloz (CMC) kullanılmıştır. Deneylerde başlangıç pH, sıcaklık, ve substratın etkileri araştırılmıştır. 120 mL serum şişelerinde 70 mL çalışma hacminde deneyler gerçekleştirilmiştir. Maksimum hidrojen verimine ve hızına 55°C sıcaklıkta, pH 7 ve CMC substrat konsantrasyonu 0.25 g/L iken ulaşılmıştır. Bu optimal koşullarda maksimum hidrojen verimi 7.22±0.62 mmol H<sub>2</sub>/g CMC<sub>eklenen</sub>, hidrojen üretim hızı ise 73.4±3.8 mL H<sub>2</sub>/L saat olarak bulunmuştur (Saripan ve Reungsang 2014).

Chu ve diğ. (2010) pamuğu hidroliz yapıp, hidrolizatta fermentasyon deneyleri yapmışlardır. Deneylerde başlangıç substrat şeker konsantrasyonunu ve başlangıç pH değerlerinin hidrojen üretimine etkileri incelenmiştir. Deneyler 37°C'de yapılmıştır. Başlangıç şeker konsantrasyonu 15 g R-şeker/L ve başlangıç pH'sı 8.2 iken verim 0.99 mol H<sub>2</sub>/mol R-şeker elde edilmiştir. Bu çalışma da Gompertz Eşitlik Modeli simülasyonu kullanılarak 30 g/L substrat konsantrasyonunda ve 8.4 başlangıç pH'sın da maksimum hidrojen üretim hızı olan 253 mL H<sub>2</sub>/h/L ulaşılmıştır (Chu ve diğ. 2010).

Li ve diğ. (2012) çim silajından karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi üzerine çalışmışlardır. Çim silajını hem substrat hem de bakteri kaynağı olarak kullanmışlardır. Öncelikle pH değerini 4'ün altında tutarak laktik asit fermentasyonu ile çimden silaj üretilmiştir. Bu çalışmada silajın fermentasyonu başarılı olmuştur. Bu aşamadan sonra silaj nötralize edilerek hidrojen üretimi çalışılmıştır. 25-200 g silaj/L başlangıç substrat konsantrasyon aralığında deneyler yapılmıştır. Deney sırasında

sıcaklık 37°C, pH 7.0'de tutulmuştur. Metanojenlerin inhibisyonu için ortama 2-bromoethanesulfonic asit eklenmiştir. En yüksek hidrojen verimi 37.85.8 mLH<sub>2</sub>/ g silaj olarak 25 g silaj/L konsantrasyonunda elde edilmiştir. Çözünür metabolitler olarak asetat ve bütiratın son konsantrasyonları sırası ile 1.5 0.2 ve 0.50.00 g/L olarak kayıt edilmiştir. 25 g/L silaj konsantrasyonundaki ortamda bakteri içeriği *Ruminobacillus xylanolyticum*, *Acetanaerobacterium elongatum* ve *Clostridium populeti* olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre pH nötralizasyonu ile çim silajının içinde bulunan doğal bakteriler ile hidrojen üretiminin gerçekleşebileceği teyit edilmiştir (Li ve diğ. 2012).

Argun ve diğ. (2008<sup>a</sup>) anaerobik çamur ile atık buğday tozu kullanarak karanlık fermentasyon yöntemi ile hidrojen gazı üretimi üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışma kapsamında hidrojen üretim verimine ve özgül hidrojen hızına C/N ve C/P oranların etkisini incelemişlerdir. Kullandıkları çözültide N ve P oranları yetersiz olduğundan ekstra N ve P eklemesi yapılmıştır. Box–Wilson istatistiksel deney tasarım yöntemi kullanılarak deney seti tasarlanmıştır. C/N oranı 20-200, C/P oranı ise 50-1000 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Hidrojen üretim verimi ve özgül hidrojen üretim hızı C/N ve C/P oranlarındaki artış ile artmıştır. Bunun sonucunda hidrojen üretimi için gerekli azot ve fosfat içeriklerinin düşük seviyelerde olabileceği rapor edilmiştir. Maksimum hidrojen üretim verimi ve özgül hidrojen üretim hızı sırasıyla 281 mL H<sub>2</sub>/g nişasta ve 98 mL H<sub>2</sub>/gbiyokütle.saat olarak kaydedilmiştir. Bu değerlere C/N oranı 200 ve C/P oranı 1000 olduğunda ulaşılmıştır. Sonuç olarak atık buğday tozu çözültisinden hidrojen üretimi için gerekli C/N/P oranı 100/0.5/0.1 olarak belirtilmiştir (Argun ve diğ. 2008<sup>a</sup>).

*Thermoanaerobacterium* bakterilerinin baskın olduğu çamur ile palm yağı atığı (POME) kullanılarak 60°C ardışık kesikli anaerobik reaktörde C/N, C/P oranlarının ve demir konsantrasyonunun hidrojen üretiminde etkisi incelenmiştir. Buna göre merkezi bir kompozit tasarım cevap yüzey metodolijisi (RSM) kullanılarak hidrojen verimi ve POME giderimi optimize edilmiştir. RSM analizinde optimum değerler 257 mgFe<sup>+</sup>/L, C/N 74 ve C/P 559 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerde tahmin edilen hidrojen üretim verimi 6.5 L H<sub>2</sub>/L POME ve KOİ giderim verimi %58' dir. Yapılan kontrol deneylerinde ise gerçek değerler 6.33 LH<sub>2</sub>/LPOME ve KOİ giderim verimi %55 olarak bulunmuştur (O-Thong 2008).

Lakshmidivi ve Muthukmar (2010) kağıt ve kağıt hamuru atıklarını enzimatik hidroliz uyguladıktan sonra karanlık fermentasyon işlemi yapmışlardır. Karanlık

fermentasyon işlemi 1500 mL şişelerde 1000 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Ortama 900 mL sterilize edilmiş kağıt ve kağıt atığı hamuru konulmuş ve 100 mL *E.aerogenes* (MTCC 2822) içeren aşı eklenmiştir. Besin maddelerinin de ilavesinden sonra deney 35±2°C'de 150 rpm karıştırma ve pH 7'de gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda biyogaz hesabı, şeker giderimi, uçucu yağ asidi oluşumu, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değişimi ve renk giderimi ölçümleri yapılmıştır. 22 g/L başlangıç şeker konsantrasyonuna göre maksimum hidrojen verimi 2.03 mol H<sub>2</sub>/mol şeker ve hidrojen üretim hızı 225 mmol H<sub>2</sub>/g hücre/saat olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi atıklarının biyohidrojen üretimi için ham madde olarak kullanılabilirliğini göstermektedir (Lakshmidevi ve Muthukmar 2010).

Pendyala ve diğ. (2013) sentetik olarak hazırlanan yiyecek ve kağıt atıklarına önce termal olarak ön işlem uygulayıp daha sonra yine ön işlem geçirmiş karışık anaerobik kültür ile karanlık fermentasyon işlemi yapmışlardır. Deneylerde başlangıç pH, başlangıç linoelik asit (LA) konsantrasyonu ve kimyasal oksijen ihtiyacının (KOİ) hidrojen ve metan gazının üretimi üzerine etkisi Box-Behnken deney dizaynına göre tasarlanmıştır. Deneyde kullanılan sentetik atık kompozisyonu: %13(wt) pişmiş pirinç, %13(wt) pişmiş makarna, %10 (wt) ekmek, ayrıca %18 (wt) baklagiller, %10 (wt) patates, %8 (wt) marul, %8 (wt) brokoli, %10 (wt) elma, %10 (wt) muz bunlara ek olarak 50 g kağıt ve 50 g oluklu mukavva 1.5 litre su içinde karıştırılmıştır. Bu karışım blenderdan geçirilip, buhar basınçlı reaktörde ısı işlem uygulanmıştır. Daha sonra örnek süzülüp atık karakterizasyonu yapılmıştır. Fermentasyon deneyleri 800 rpm karıştırma hızı ile 37°C'de yapılmıştır. Box-Behnken dizaynına göre 1.6 g/L LA, 5.93 pH ve 9.34 gKOİ/L başlangıç koşullarında tahmini maksimum hidrojen verimi 87 mL/gKOİ veya 98 mL H<sub>2</sub>/gUK olarak hesaplanmıştır. Ana mikrobiyal kültürde pH 5 de LA ve LA'sız koşullarda saptanan bakteri türleri *Clostridium* sp., *Enterococcus asini*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactobacillus gallinarum*'dur (Pendyala ve diğ. 2013).

Wang ve Wan (2008<sup>a</sup>) tarafından yapılan çalışmada karışık kültür kullanılarak glikozdan hidrojen üretim potansiyelinde sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Sıcaklık aralığı olarak 20 - 55°C seçilmiş ve bu sıcaklıklarda kesikli deneyler yapılmıştır. Başlangıç pH'si 7 olarak ayarlanan deneylerde 20 – 40°C sıcaklık aralığında substratın giderim verimi ile hidrojen üretim verimi sıcaklık ile birlikte artış göstermiştir. Maksimum substrat giderimi %98.1, ve en yüksek kümülatif hidrojen üretim ve hidrojen üretim verimi sırasıyla 269.9 mL ve 275.1 mL H<sub>2</sub>/g glikoz olarak bulunmuştur. Bu sonucun elde edildiği koşullarda lag fazı da 7 saat olarak rapor

edilmiştir. Karışık kültürler ile hidrojen üretiminde fermentasyon sıcaklığının optimize edilebilmesi için geliştirilen genişletilmiş Ratkowsky modelleri kullanılmış ve bunların sonucunda 40°C'nin en uygun sıcaklık olduğu belirtilmiştir (Wang ve Wan 2008<sup>a</sup>).

Mu ve diğ. (2006) anaerobik kültür ile glikozdan mezofilik sıcaklık aralıklarında hidrojen üretim potansiyellerini araştırmıştır. Sıcaklık aralığı olarak 33 – 41°C seçilmiş, bu sıcaklık aralığında sıcaklık arttıkça hidrojen üretim verimi, glikoz tüketimi ve hidrojen üretimi artmıştır. Buna rağmen özgül hidrojen üretim hızı ise 33 - 39°C aralığında artmış, 41°C'ye yükseldikçe azalmıştır. Burada oluşan ürünlerin dağılımı da büyük ölçüde sıcaklık değişiminden etkilenmiştir. Üretilen hidrojen miktarı, hidrojen verimi ve büyüme hızının sıcaklık ile doğrusal ilişkilerinin olduğu bulunmuştur (Mu ve diğ. 2006).

Fang ve Liu (2002) araştırmalarında glikozdan hidrojen üretimi üzerinde pH etkisini incelemişlerdir. pH 4.0-7.0 aralığında sıcaklık 36 °C ve 6 saat hidroliz alıkonma süresinde yapılan deneylerde glikoz giderimi, hidrojen ve organik asit üretim verimleri %90'ın üzerine çıkmıştır. Bu çalışmada optimum pH değeri olarak 5.5 belirlenmiş, bu pH'da biyogaz karışımının %65±2 hidrojenle oluştuğu belirtilmiştir. Ayrıca birim glikoz başına oluşan hidrojen ve özgül hidrojen üretim hızları sırasıyla 2.1±0.1 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz ve 4.6±0.4 L H<sub>2</sub>/g UAKM.gün olarak rapor edilmiştir. Çıkış sıvı karışımında ise asetat (%15.3-34.1), bütirat (%31.2-45.6) ve bunlara ilaveten az miktarda diğer UYA ürünleri ve alkol bulunmuştur (Fang ve Liu 2002).

Lee ve diğ. (2002) soya küspesi mikrobiyal florası ve sukroz çözeltisi kullanarak, hidrojen üretiminde kültür üzerine pH'ın etkisini incelemişlerdir. pH 3-12 değerleri arasında deneyler yapılmıştır. pH 3.0, 11 ve 12'de hidrojen üretimi gözlenmemiş, ayrıca 5.0-5.5 arasında da düşük hidrojen üretimi rapor edilmiştir. Deney karışımında pH değeri birden düşmüş ve 30 saatte hidrojen üretimine başlanmıştır. pH 6.0-10.0 arasında metan gazının oluşumu gözlenmemiştir. Sukroz giderimi, başlangıç pH değeri 3.0 ile 9.0 arasında arttıkça artmış, maksimum sukroz giderimi ise (%95) pH 9.0'da gözlenmiştir. Maksimum hidrojen üretim verimi ve hidrojen üretim hızı pH 9'da 126.9 cm<sup>3</sup>/g sukroz ve 36.3 cm<sup>3</sup>/g UAKM.saate olarak bulunmuştur. Maksimum UYA ve alkol oluşum verimleri sırasıyla 0.7g KOİ/g sukroz (pH 8) ve 128 mg KOİ/g sukroz (pH 9) olarak kaydedilmiştir (Lee ve diğ. 2002).

Wang ve Wan (2008<sup>b</sup>) çamura 5 farklı (asit, baz, ısıl şok, havalandırma ve kloroform) ön arıtma metotları uygulamıştır. Tüm testler ısıl şok ön işlemlili çamurun fermentasyon ile glikozdan hidrojen üretimine uygun olduğunu göstermiştir. Isıl şok uygulanan çamur ile yapılan deneyde maksimum hidrojen üretim hızı, hidrojen verimi, substrat giderimi ve biyokütle konsantrasyonu sırasıyla 215.4 mL, 120.4 mL/saat, 221.5 mL/g glikoz, %97.2 ve 1739 mg/L olarak rapor edilmiştir (Wang ve Wan 2008<sup>b</sup>).

Lin ve diğ.'nin (2008) yaptığı bir çalışmada pH 7.1'de 30-55 °C arasında ve 12 saat hidroliz alıkonma süresinde ksiloldan (20 g KOİ/L) hidrojen üretimi araştırılmıştır. *Clostridia* bakteri türünün baskın olduğu artıma çamuru kültüründe sıcaklığa bağlı hidrojen gazı üretimi, verimi, üretim hızı ve özgül hidrojen üretim hız değerleri sırasıyla %25.1-42.2 (v/v), 0.4–1.4 mol H<sub>2</sub>/mol xylose, 0.06–0.24 mol H<sub>2</sub>/L gün ve 0.02–0.10 mol H<sub>2</sub>/g UAKM.gün aralığında değişmiş ve 50°C işletme sıcaklığında en yüksek değerlerine ulaşmıştır. Termodinamik analiz yönteminde hidrojen üretim hızı ve Arrhenius eşitliği kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve bunlara göre aktivasyon enerjisinin 74.7 kJ/mol olduğu gösterilmiştir (Lin ve diğ. 2008).

Zahedi ve diğ. (2014) belediye katı atıklarının organik kısımlarından termofilik-kuru karanlık fermentasyon ile mikrobiyal topluluğun gelişimi ve hidrojen gazı üretimi üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışmalarda dokuz farklı organik yükleme hızı (9-220 g TUK/l/gün) kullanılmıştır. Popülasyon dinamikleri üzerine yapılan çalışmada OYO (9-110 g TUK/l/gün) artması ile *Eubacteria:Archaea* ve *Hydrolytic-acidogenic bacteria* (HABs):*acetogens* aralarındaki ilişki de artmıştır. Bu durum belediye katı atıklarının organik kısımlarındaki mikrobiyal içerikten kuvvetli olarak etkilenmiştir. Asetojenlerin ve Archeaların varlığı ile mikroorganizmalar substrattan metansız biyogaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Maksimum hidroliz değeri %63 ± 7 olarak 110 g TUK/l/gün OYO olarak kaydedilmiştir. OYO 28 - 43 g TUK/l/gün arasındayken yüksek asidifikasyon verimine (%57-60) ulaşılmıştır (Zahedi ve diğ. 2014).

Ren ve arkadaşları (2006) pilot ölçekte sürekli işletilen anaerobik fermentasyon reaktörünü (yaklaşık hacmi 1.48 m<sup>3</sup>) 200 günden fazla sürede işletmişlerdir. Bu biyolojik hidrojen üretim reaktörü 3.11-85.57 kg KOİ/m<sup>3</sup> reaktör/gün arasındaki OYO değerlerinde ve melas kullanılarak çalıştırılmıştır. Biyogaz ve hidrojen verimi OYO'nun 3.11–68.21 kg KOİ/m<sup>3</sup> reaktör/gün aralığındaki artışı ile orantılı artmış fakat daha yüksek OYO değerlerinde düşmüştür. Biyogaz içeriğinde

CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> ölçülmüş ve H<sub>2</sub> yüzdesi %40 - 52 arasında değişmiştir. Maksimum hidrojen üretim hızı 5.57 m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> reaktör/gün ve özgül hidrojen üretim hızı 0.75 m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/kg KSUAKM/gün olarak rapor edilmiştir. OYO değeri 35–55 kg KOİ/m<sup>3</sup> reaktör/gün aralığında KOİ giderimi başına hidrojen verimi 26.13 mol/kg'dır (Ren ve diğ. 2006).

Lin ve diğ. (2008) kesikli ve sürekli testlerin fermentatif hidrojen üretimine etkisini incelemiştir. Substrat olarak nişasta, mikrobiyal kültür olarak da kağıt fabrikası artıma çamuru kullanılmış ve sıcaklık 35°C' de (KOİ 20 g/L) deneyler yapılmıştır. Kesikli deneylerde pH ve substrat test aralıkları sırasıyla 5-7 ve 5-60 g KOİ/L olarak belirlenmiş, bunların doğrultusunda hem sürekli reaktörlerde hidrolik alıkonma süresinin (HAS) hidrojen üretimindeki etkisi hem de hidrojen verimi ve hidrojen üretim hızındaki değişimler çalışılmıştır. Deney sonuçlarına göre başlangıç pH değerinin hidrojen verimine ve hidrojen üretim hızına etkisinin olduğu görülmüştür. Optimum başlangıç pH 5.5'de maksimum hidrojen verimi ve hidrojen üretim hızı sırasıyla 1.1 mol H<sub>2</sub>/mol heksoz ve 10.4 mmol H<sub>2</sub>/L/saat ve bütirat konsantrasyonu 7700 mg KOİ/L olmuştur. Sürekli hidrojen üretiminde, optimum HAS değeri 4 saat olarak bulunmuştur. HAS değeri 4 iken sırasıyla hidrojen üretim verimi ve hidrojen üretim hızı 1.5 mol H<sub>2</sub>/mol heksoz ve 450 mmol H<sub>2</sub>/L/saat olarak bulunmuştur. Bu noktada düşük bütirat konsantrasyonu diğer noktalara göre daha düşük olup 3000 mg KOİ/L olarak kayıt edilmiştir (Lin ve diğ. 2008).

Zhang ve diğ. (2006) çamurdan hidrojen üretimi için yeni bir yaklaşımda bulunmuşlar ve hızlı granül yapan, 37°C'de işletilen anaerobik sürekli karıştırmalı reaktör geliştirmişlerdir. Mikrobiyal granülasyonun teşvik edilmesi için kullanılan kültür 24 saat süre ile pH 5.5'den 2.0'a kaydırılarak asit inkübasyonuna tabi tutulmuştur. Kültür inkübasyondan sonra pH'sı 5.5'de sabitlenmiş ve reaktör 12, 6, 2, 1 ve 0.5 hidrolik alıkonma sürelerinde işletilmiştir. Asit inkübasyonun başlatılması ve granülün 114 saat geliştirilmesinden sonra mikrobiyal toplama hemen gerçekleştirilmiştir. Granül çamur formu biyokütlenin 32.2 g UAKM/L'ye kadar tutulmasını kolaylaştırmış ve hidrojen üretimini geliştirmiştir. 10 g/L başlangıç glikoz konsantrasyonunda HAS değeri düşükçe hidrojen üretim hızı ve hidrojen verimi artmıştır. 0.5 saatlik HAS'de granül çamur tabakası bir kez sabit olmuş ve hidrojen üretim hızı (3.20 L H<sub>2</sub>/L.saat ), hidrojen üretim verimi (1.81 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz) maksimum değerlere ulaşmıştır. (Zhang ve diğ. 2006).

Tablo 2.5'de farklı substrat ve karanlık fermentasyon şartlarında hidrojen gazı üretim verimleri ve hızları özetlenmiştir. Tabloda görüldüğü gibi aynı substrat kullanılsa bile kullanılan kültür türlerine göre hidrojen üretim verimi ve hızı değişebilir. Substratın ön artıma işlemleri de hidrojen oluşumunu etkileyen önemli aşamalardan biridir. Başlangıç substrat ve biyokütle konsantrasyonları, pH, sıcaklık ve bunların yanı sıra C/N/P gibi nutrient oranları da hidrojen üretimini artıran veya limitleyen faktörlerdir.



**Tablo 2. 5:** Literatürde çeşitli hammaddeler için farklı karanlık fermentasyon şartlarında gerçekleşen deneyler ve sonuçları.

Aşı Kültür Türü	Substrat Türü	Substrat Ön Arıtma	KF İşletim Koşulları	Reaktör Tipi	HÜV	HÜH	ÖHÜH	Kaynaklar
Evsel atıksu arıtma çamuru	Tarımsal mantar atığı (lignoselülozik)	İki basamaklı asit ön arıtma (40°C 20dk %55H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +40°C 20dk %6.9H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	20 g KOİ/L substrat konsantrasyonu pH: 7.0 37°C inkübatör sıcaklığı	Kesikli	2.52 mol H <sub>2</sub> /g KOİ	4.38 L/L/gün	-	(Li ve diğ. 2011)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glikoz	-	Glikoz yükleme hızı:8.3g/Lreaktör/saat Glikoz besleme debisi: 1.6 mL/da HRT: 2.1 dak	Sürekli	1.08 mol H <sub>2</sub> /mol glikoz	89-220 mL/saat aralığında glikoz kons. değişikçe değişmiş	680-1270 mL/g glikoz /Lreaktör	(Zhang ve diğ. 2006)
Evsel atıksu arıtma çamuru	Sukroz ve ananas atığı	-	10-30 gKOİ/L arasındaki substrat konsantrasyonları pH:7.5 inkübatör sıcaklığı 37°C 125rpm	Kesikli	2.46 mol H <sub>2</sub> /molsukroz veya 5.25 molH <sub>2</sub> /gKOİ	745 ml/L/saat	-	(Wang ve diğ. 2006)

**Tablo 2.5:** Literatürde çeşitli hammaddeler için farklı karanlık fermentasyon şartlarında gerçekleşen deneyler ve sonuçları (devamı).

Aşı Kültür Türü	Substrat Türü	Substrat Ön Arıtma	KF İşletim Koşulları	Reaktör Tipi	HÜV	HÜH	ÖHÜH	Kaynaklar
İnek gübresi kompostu	Mısır sapı	Seyreltik HCl asit ile 30 dk kaynatıldı.	15g/L substrat konsantrasyonu pH:7 36 °C 90 rpm	Kesikli	149.69 mL H <sub>2</sub> /g TVS	7.6 mL H <sub>2</sub> /saat	-	(Zhang ve diğ. 2007)
Evsel atıksu çamuru	Glikoz	-	20 g/L substrat konsantrasyonu pH:6.5 40 °C HRT: 4 saat	Sürekli karıştırmalı tank reaktör (CSTR)	1.54 mol H <sub>2</sub> /mol glikoz	0.97 L/saat/L	-	(Wu ve diğ. 2007)
İnek Gübresi	Mısır Sapı	Alkali Hidrolizi(%0.75NaO H108°C 0.5 saat) ve Selüloz Enzim hidroliz	15 g/L substrat konsantrasyonu 35°C 150 rpm	Kesikli	163.1mL H <sub>2</sub> /g mısırsapı	110 mL/L/saat	-	(Yang ve diğ.2015)
<i>Biohydrogen bacterium R3</i>	Yemek Atığı (katı hal fermentasyonu)	Glikoamiloz ve proteaz hidrolizi	%5(w/v) yemek atığı (21.7gglikoz/L) 37 °C pH:4-4.6	Kesikli	52.4mL H <sub>2</sub> /g yemekatığı (294.47 mL H <sub>2</sub> /g glikoz), 2mol H <sub>2</sub> /mol glikoz	210.7mmol H <sub>2</sub> /L	249.5 mL H <sub>2</sub> /g glikoz	(Han ve diğ. 2015)

**Tablo 2. 5:** Literatürde çeşitli hammaddeler için farklı karanlık fermentasyon şartlarında gerçekleşen deneyler ve sonuçları (devamı).

Aşı Kültür Türü	Substrat Türü	Substrat Ön Arıtma	KF İşletim Koşulları	Reaktör Tipi	HÜV	HÜH	ÖHÜH	Kaynaklar
Evsel atıksu	Sukroz ve Sülfat	-	20 gKOİ/L substrat konsantrasyonu 3 gSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L pH:5.5 35°C HRT:4 saat	Sürekli karıştırmalı tank reaktör (CSTR)	4.7 mol H <sub>2</sub> /mol sukroz	874 mmol H <sub>2</sub> /L.gün	432 mmol H <sub>2</sub> /g VSS.gün	(Chen ve diğ. 2007)
Kağıt hamur çamuru (kağıt fabrikası atıksu arıtma)	Kağıt Atığı	Alkali(%3NaOH 121°C 2saat ve enzimatik ön işlem	0.5:3.5 (kağıt atığı:kâğıt hamur çamuru) pH:6 C/N:40	Sürekli	151.70 mL H <sub>2</sub> /g TVS	-	-	(Chairattanamano korn ve diğ. 2012)
Termofilik mikrobiyal topluluk (TC 52)	Sekiz farklı ticari kağıt	-	pH:6.7 60 °C	Kesikli	6 mmol H <sub>2</sub> /g kurusubstrat	-	-	(Carver ve diğ. 2015)

**Tablo 2. 5:** Literatürde çeşitli hammaddeler için farklı karanlık fermentasyon şartlarında gerçekleşen deneyler ve sonuçları (devamı).

Aşı Kültür Türü	Substrat Türü	Substrat Ön Arıtma	KF İşletim Koşulları	Reaktör Tipi	Hidrojen Üretim Verimi	Hidrojen Üretim Hızı	Özgül Hidrojen Üretim Hızı	Kaynaklar
Pakmaya Fabrikası anaerobik çamuru	Kağıt Atığı	Asit Hidroliz (pH2.2 121 °C 90 dak)	3.84 g glikoz/L substrat konsantrasyonu 0.5 g/L biyokütle konsantrasyonu pH:6.8	Kesikli	140 mL H <sub>2</sub> /g toplamşeker 1.01 mol H <sub>2</sub> /mol glikoz	5.49 mL H <sub>2</sub> /saat	18.9 g glikoz/L için 0.51 mL H <sub>2</sub> /gbiyokütle.saat	(Eker ve Sarp 2016)
<i>Clostridium thermocellum</i> (DSMZ 1237)	Kağıt fabrikası atıklarından kaynaklı lignoselül ozik lifler	-	60°C inkübatörde 2Hz çalkalama derecesi başlangıç pH:7.1 son pH:5.83 5k/cm <sup>3</sup>	Kesikli	11.20 molH <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	-	-	(Moreau ve diğ. 2014)
Mondi Kağıt fabrikası anaerobik arıtma çamuru	Atık Havlu Kağıdı	Asit Hidroliz (%5H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 105 °C 3saat30dakika)	21 g glikoz/L substrat konsantrasyonu ve 0.1 gbiyokütle/L biyokütle konsantrasyonlu C/NP/Fe:100/5/9/0.3 pH:5.5-6.0 36 °C inkübatör sıcaklığı	Kesikli	0.525 mol H <sub>2</sub> /mol glikoz	2.86 mL H <sub>2</sub> /saat	243.14 mL H <sub>2</sub> /gbiyokütle.saat	Bu Çalışmada

### 3. MATERYAL ve METOTLAR

#### 3.1 Mikroorganizma

Tez kapsamında yürütülen karanlık fermentasyon deneylerinde, İzmir'in Tire ilçesinde bulunan MONDİ Kağıt Fabrikası'ndan getirilen anaerobik çamur kullanılmıştır. Bu anaerobik çamur, hidrojen tüketimine neden olan metanojen ve homo-asetojenlerinin aktivitelerini sonlandırmak için kaynatılmıştır. Böylece metanojen ve homo-asetojenler yerine hidrojen oluşumunda etkili olan spor oluşturan bakterilerin baskın hale gelmesi sağlanmıştır. Kaynatma işlemi, çeker ocak altında ısıtıcılı mıknatıslı karıştırıcı üzerinde yapılmıştır. Bir saat süren kaynatma işleminde çamurun pH'sı 5.9'da sabit tutulmuştur. Kaynatma işleminden sonra gerekli biyokütle konsantrasyonunu elde etmek için çamur, 36°C'de iki gün süre ile inkübe edilmiştir. İki gün sonunda standart metotlara (metot numarası:2540D) göre yapılan askıda katı madde deneyi ile biyokütle konsantrasyonu belirlenmiştir (Eugene ve diğ. 2012) Besi ortamında karbon kaynağı olarak 10 g/L şeker içeren asit ile ön işlemden geçirilmiş atık kağıt havlu hidrolizati kullanılmıştır. Asit hidrolizati koşulları 200g/L atık kağıt havlunun 135°C ve pH 1'de 15 dakika otoklavlanması ile elde edilmiştir. C/N/P/Fe oranı 100/2/0.2/0.5 olacak şekilde NH<sub>4</sub>Cl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ilaveleri yapılmıştır. Bu temel nütrientlerin dışında ortama 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 0.1 g/L L.sistein.HCl eklenmiştir. Besi sıvısı üzerinde bulunan gaz faz argon gazı ile yaklaşık 5 dakika süpürülerek ortamdaki oksijen uzaklaştırılmış böylelikle anaerobik ortam koşulları sağlanmaya çalışılmıştır.

#### 3.2 Atık Kağıt Havlu

Deneylerde ham madde olarak Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi tuvaletlerinde biriken atık el kurulama kağıt havluları kullanılmıştır. %100 selülozdan oluşan bu atık, karanlık fermentasyon ile H<sub>2</sub> üretimi için önemli bir ham madde özelliği taşımaktadır. Kullanılan atık kağıt havlunun kompozisyon analizleri Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Akredite Atıksu Laboratuvarında yaptırılmıştır. Bu analizlerin yapılmasında toplam azot (TN), toplam fosfor (TP) ve

toplam karbon (TC) için sırasıyla ISO 11261, EPA 3051A+SM 4500 PD ve BS EN 13137 metotları kullanılmıştır (ISO 1995, Eugene ve diğ. 2012, EN. BS. 2009). Yapılan analizler sonucunda elde edilen TN, TP ve TC içerikleri sırasıyla 470 mg/kg, <1 mg/kg ve 574.162 mg/kg olarak belirlenmiştir

### 3.3 Deneysel Çalışmalar

#### 3.3.1 Atık Kağıt Havlunun Ön İşlenmesi

Atık kağıdın ön işlenmesinin amacı karanlık fermentasyonda kullanılacak substrat için glikoz çözeltisi elde edilmesidir. Bunun için atık, asit hidrolizine tabi tutulmuştur. Asit hidrolizi öncesinde toplanılan kağıt havlu atıkları makas yardımıyla kesildikten sonra 50°C'de etüvde 48 saat süreyle kurutulmuştur. Asit hidrolizinin amacı selüloz molekülleri arasındaki bağları kırıp glikoz şurubu elde etmektir. Burada asit türü olarak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seçilmiştir. Asit hidrolizi Pamukkale Üniversitesi Çevre Mühendisliği bölüm laboratuvarında bulunan otoklavda (HIRAYAMA HG-50) gerçekleştirilmiştir (Katı/sıvı oranı: 0.2 (w/w), asit yüzdesi: %5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sıcaklık: 105°C, süre: 3.5 saat). Hidroliz sonrası oluşan hidrolizat dikkatlice süzöldükten sonra üst suyu buzdolabında +4°C' de karanlık fermentasyon deneylerine kadar saklanmıştır. Hidrolizatta şeker ve HMF analizleri yapılmıştır. Otoklav işleminde gözlemlenen buharlaşma olayı nedeniyle hidrolizatta ölçülen glikoz ve HMF konsantrasyonları buharlaşmadaki su kaybı dikkate alınarak Eşitlik (3.1)' e göre tekrar düzeltilmiştir (Breuer ve diğ. 2014).

$$C_D = C_S \times (V_S/V_D) \quad (3.1)$$

burada C<sub>D</sub>; buharlaşma dikkate alınarak düzeltilen glikoz veya 5-HMF konsantrasyonu (g/L), V<sub>S</sub>; asit hidrolizi sonrası hidrolizat toplam hacmi (L), V<sub>D</sub>; asit hidrolizi öncesi kağıt ve asit çözeltisi toplam hacmi (L) temsil etmektedir.

Hidroliz esnasında meydana gelen 5-HMF'nin karanlık fermentasyonda kullanılan mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etki yaratacağından dolayı hidrolizat içerisindeki 5-HMF aktif karbon adsorpsiyonu ile giderilmiştir. Giderim için iki aşamalı aktif karbon adsorpsiyonu uygulanmıştır. Bu işlem; 40°C, 150 rpm ve 20 saat sürede çalkalıyıcıda gerçekleştirilmiştir. Toz aktif karbonlar Denizli'de bulunan meyve suyu fabrikasından (Konfrut A.Ş) temin edilmiştir. Birinci aşamada, 5 g/L FA

toz aktif karbon ile hidroliz sonucunda oluşan karamelize renk ve bir miktar 5-HMF giderilmiştir. İkinci aşama da ise SH tipi toz aktif karbon ile birlikte 5-HMF büyük ölçüde giderilmiştir. Aktif karbon asorpsiyonundan önce 883.86 mg/L civarında olan 5-HMF konsantrasyonu, işlemden sonra 0.41 mg/L seviyesine inmiştir. Elde edilen hidrolizat, 3 M KOH baz çözeltisi ile nötralize edilip istenilen glikoz konsantrasyonu için karanlık fermentasyon öncesinde seyreltilmiştir. Seyretilen hidrolizatta 5-HMF konsantrasyonu 0 mg/L'ye düşmüştür.

### 3.3.2 Karanlık Fermentasyon

Karanlık fermentasyon deneyleri, kesikli şartlarda, 300 mL boro-silikat serum şişelerinde, pH 5.5-6'da mezofilik koşullarda (36°C) inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Anaerobik koşullar, ortama L-Cystein.HCl ilavesi ve üst sıvı boşluğunun Argon gazı ile süpürülmesiyle sağlanmıştır. Deney süresince sıvı ve gaz numuneler alınarak gerekli ölçümler yapıp, fermentasyonun performansı takip edilmiştir. Deney şişelerinden alınan sıvı numuneler katı partiküllerinden arındırılmak amacı ile santrifüjlenmiştir. Daha sonra kalan berrak sıvı fazda şeker ve toplam uçucu organik asit ölçümleri yapılmıştır. Şeker konsantrasyonu ölçümleri fenol-asit yöntemi ile toplam uçucu organik asit (TUYA) konsantrasyonu ise spektrofotometrik yöntem kullanılarak analitik kitler yardımıyla ölçülmüştür. Deney esnasında toplam gaz ölçümleri, sıvı yer değiştirme metoduyla belirlenmiştir. Gaz konsantrasyonu ise gaz kromatografi (GC) cihazında ölçülmüştür. Sıvı yer değiştirme kaplarında %2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve %10 NaCl içerikli çözelti kullanılmıştır (Logan ve diğ. 2002). Deney boyunca oluşan hidrojen gazı eşitlik 3.2'ye göre kümülatif olarak toplanıp hesaplanmıştır (Logan ve diğ. 2002). Deney süresince hesaplanan kümülatif hidrojen oluşum verileri Eşitlik 3.3'de verilen Gompertz eşitliği (Lee ve diğ. 2008) ile korele edilerek maksimum hidrojen üretim potansiyeli, lag faz süresi ve hidrojen üretim hızı hesaplanmıştır.

$$V_{H_2,i} = V_{H_2,i-1} + V_w CH_{2,i} + V_{G,i} CH_{2,i} - V_{G,i-1} CH_{2,i-1} \quad (3.2)$$

burada  $V_{H_2,i}$  ve  $V_{H_2,i-1}$  (i)' inci ve (i-1)' inci koşullardaki kümülatif H<sub>2</sub> hacmini (mL),  $V_w$  sıvı yer değiştirme sisteminde ölçülen toplam gaz hacmini (mL),  $CH_{2,i}$  ve  $CH_{2,i-1}$  (i)' inci ve (i-1)' inci koşullarda ölçülen hidrojen gazı yüzdelerini,  $V_{G,i}$  ve  $V_{G,i-1}$  ise (i)' inci ve (i-1)' inci koşullarda şişede bulunan sıvı üstü hava boşluk hacmini (mL) temsil etmektedir.

$$H(t) = P \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m e}{P} (\lambda - t) \right] + 1 \right\} \quad (3. 3)$$

burada P; hidrojen üretim potansiyeli (mL), R<sub>m</sub>; hidrojen üretim hızı (mL H<sub>2</sub>/saat), λ; lag faz periyod (saat), t; fermentasyon süresi (saat)'dir.

Karanlık fermentasyon sürecinin yorumlanmasında Eşitlik (3.4)'te gösterilen özgül hidrojen üretim hızı ve Eşitlik (3.5)'te verilen hidrojen üretim verimi kullanılmıştır.

$$\dot{O}H\ddot{U}H = R_m / (V_o X_o) \quad (3. 4)$$

burada, V<sub>o</sub>; başlangıç sıvı hacmi (L), X<sub>o</sub>; başlangıç biyokütle konsantrasyonu (g X/L), R<sub>m</sub>; gompertz eşitliğinde elde edilen hidrojen üretim hızı (mL H<sub>2</sub>/saat).

$$Y = \Delta H_2 / \Delta S \quad (3. 5)$$

burada, Y; mol H<sub>2</sub>/mol substrat, ΔH<sub>2</sub>; deney boyunca üretilen kümülatif hidrojen (mol) ve ΔS; tüketilen substrat (mol glikoz).

Hidrojen gazı mol sayısı Eşitlik 3.6'ya göre hesaplanmıştır.

$$PV = nRT \quad (3. 6)$$

bu eşitlikte n; mmol hidrojen gazı, P; 1 atm, V<sub>H<sub>2</sub></sub>; üretilen hidrojen gazı hacmi (mL), R; ideal gaz sabiti (0.082 Latm/molK), T; sıcaklık (K).

Karanlık fermentasyon deneylerinin ilk aşaması olan başlangıç biyokütle konsantrasyonunun hidrojen üretimine etkisinin araştırılması çalışmaları 300 mL'lik serum şişelerinde 45 mL çalışma hacminde mezofilik şartlarda (T:36°C, pH:5.5-6.0) inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Deney esnasında tüm şişelerde biyokütle konsantrasyonu haricindeki diğer şartlar sabit tutulmuştur. Biyokütle konsantrasyonları ise 0.1, 0.5, 0.875, 1, 1.5, 3, 6 g/L olarak değiştirilmiştir. Deney başlangıç şeker konsantrasyonu 7 g glikoz/L olarak belirlenmiştir. Tüm şişelerdeki substrat konsantrasyonu aynı hidrolizat kullanılarak elde edilmiştir. Glikoz ve biyokütle dışında ortama 2.8 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.9 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ve 0.2 g/L L.sistein.HCl eklenmiştir.

Karanlık fermentasyon ile hidrojen gazı üretim sürecinde başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek adına 300 mL'lik serum şişelerinde 45 mL çalışma hacimlerinde deney yapılmıştır. Deney mezofilik şartlarda (T:36°C, pH: 5.5-

6.0), kesikli işletme sistemi ile inkübatörde yapılmıştır. Bu deney şişelerinin tümünde substrat konsantrasyonları hariç diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Substrat konsantrasyonları 6, 15, 21, 30, 41 g/L olarak değiştirilmiştir. Ortama ilave edilen biyokütle konsantrasyonu 0.15 g/L, nutrient miktarları ise 0.1 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 mg/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (EDTA'lı) ve 0.1 g/L L.sistein.HCl olarak belirlenmiştir.

Karanlık fermentasyonun son aşaması olan C/N/P/Fe oranının hidrojen üretim verimine ve özgül hidrojen üretim hızına etkisini incelemek amacı ile Desin-Expert 8.01 yazılımında bulunan Box-Behnken Yüzey Tepki (BBYT) metodu kullanılmıştır. N/C ( $X_1$ ), P/C ( $X_2$ ) ve Fe/C ( $X_3$ ) oranları bağımsız değişkenler olarak seçilirken hidrojen üretim verimi (HÜV) (mol  $H_2$ /mol glikoz) ( $Y_1$ ) ve özgül hidrojen üretim hızı (ÖHÜH) (mL  $H_2$ /g biyokütle.sa) ( $Y_2$ ) ise amaç fonksiyonları olarak seçilmiştir. Bu düzenlemeye göre bağımsız değişkenlerin aralıkları N/C oranı için ( $X_1$ ): 0-0.05 (g/g), P/C oranı için ( $X_2$ ): 0-0.1 (g/g) ve Fe/C oranı için ( $X_3$ ): 0-3.13x10<sup>-3</sup> (g/g) kararlaştırılmıştır. (BBYT) yöntemi ile oluşturulan 15 deneyden oluşan set iki kere yapılmış olup deneylerin bitiminde her nokta için hidrojen üretim verimi ve ÖHÜH değerleri hesaplanmıştır. Bu tasarımda C/N, C/P, C/Fe oranları bağımsız değişken olarak seçilirken, hidrojen üretim verimi (HÜV) ve özgül hidrojen üretim hızı (ÖHÜH) amaç fonksiyonu olarak seçilmiştir. Deney sonuçları Eşitlik 3.7 ile korele edilerek denklem katsayıları belirlenmiştir.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (3.7)$$

burada, Y amaç fonksiyonunu (hidrojen oluşum verimi YHÜV veya özgül hidrojen üretim hızı YÖHÜH). b harfleri ise fonksiyonun katsayılarıdır (b<sub>0</sub>: eşitlik sabiti, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>, lineer, b<sub>12</sub>, b<sub>13</sub>, b<sub>23</sub>, etkileşim, b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub>, b<sub>33</sub> kuadratik katsayılarıdır).

Deney tasarımında bulunan bütün noktalar 300 mL serum şişelerinde, 36°C inkübatörde, başlangıç glikoz ve biyokütle konsantrasyonları sırasıyla 20 g/L ve 0.1 g/L olacak şekilde inkübatörde statik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

### **3.4 Analitik Yöntemler ve Hesaplamalar**

#### **3.4.1 Hidrojen Gazı Analizi**

Karanlık fermentasyon deneylerinde oluşan gaz karışımındaki hidrojen gazı konsantrasyonu gaz kromatografisinde belirlenmiştir. Bunun için Agilent 7820A model cihaz kullanılmıştır. Cihazda ölçüm amaçlı kullanılan kolon özellikleri; Supelco, Carboxen™ 1010 PLOT Fused Silica Capillary Column, 30 m x 0.53 mm, U.S. Patents 5-549-445 ve 5-607-580'dir. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanılmıştır. N<sub>2</sub> debisi 8 mL/dak olup, fırın, giriş ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla; 110, 230 ve 250 °C' dir. Cihazda standart kalibrasyon gazları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisini kullanılarak hidrojen gazının konsantrasyonu belirlenmiştir. Numune ölçümleri öncesi standart gaz ile cihazın doğru ölçüm yapıp yapmadığı kontrol edilmiştir.

#### **3.4.2 Toplam Şeker Analizi**

Toplam şeker analizi glikoz cinsinden fenol-asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (DuBois ve diğ. 1956). Bunun için analitik saflıkta 0-100 mg/L glikoz aralığında kalibrasyon eğrisi çıkartılmıştır. Ölçümler 487 nm'de Hach Lange (DR 5000) UV-visible spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

#### **3.4.3 Selüloz Derişimin Belirlenmesi Hesabı**

Kullanılan atık havlunun içerisinde bulunan selüloz fenol-asit yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (DuBois ve diğ. 1956). Fenol-asit yöntemi uygulanmadan önce atık havlu hidroliz edilerek içerisindeki tüm selüloz moleküllerinin kırılıp glikoza dönüşmesi sağlanmıştır (Ferrer ve diğ. 2013). Bu işlem için önce atık havlu kağıt bir saat boyunca çeker ocağın altında %72'lik konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> asit çözeltisinde bekletilmiştir. Bir saatin sonunda çözelti ¼ oranında seyreltilip 121 °C bir saat süreyle otoklavlanmıştır. Sonrasında hidrolizatta fenol-asit yöntemi uygulanarak çıkan glikoz konsantrasyonunu 1.1 selülozdan glikoza dönüşüm katsayısına bölünerek selüloz konsantrasyonu hesaplanmıştır. Buna göre 10 g/L atık havlunun hidrolizi sonucu belirlenen selüloz konsantrasyonu 10.00±0.2

g/L olarak ölçülmüştür. Böylece atık kağıdın %100 selülozdan oluştuğu teyit edilmiştir.

#### **3.4.4 5-HMF Analizi**

Hidrolizatta asit hidroliz ile meydana gelen 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF) ölçümleri 280 nm dalga boyunda Hach Lange (DR 5000) UV-visible spektrofotometre kullanılarak tayin edilmiştir. Bu analiz için 5-HMF standardı (Sigma-Aldrich W501808 Aldrich, 5-HMF,  $\geq$  %99 purity) kullanılarak çeşitli konsantrasyon noktaları için çözeltiler hazırlanıp kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Zhang ve diğ. 2013) ve bu denklem numunede bulunan bilinmeyen 5-HMF konsantrasyonunun tespit edilmesinde kullanılmıştır.

#### **3.4.5 Toplam Uçucu Yağ Asidi Analizi**

Karanlık fermentasyon sıvı numunelerinde toplam uçucu yağ asidi konsantrasyonu Merck (Spectroquant, 1.01763.0001) marka kitler kullanılarak fotometrede (PhotoLab S12) ölçülmüştür.

#### **3.4.6 Biyokütle Konsantrasyon Analizi**

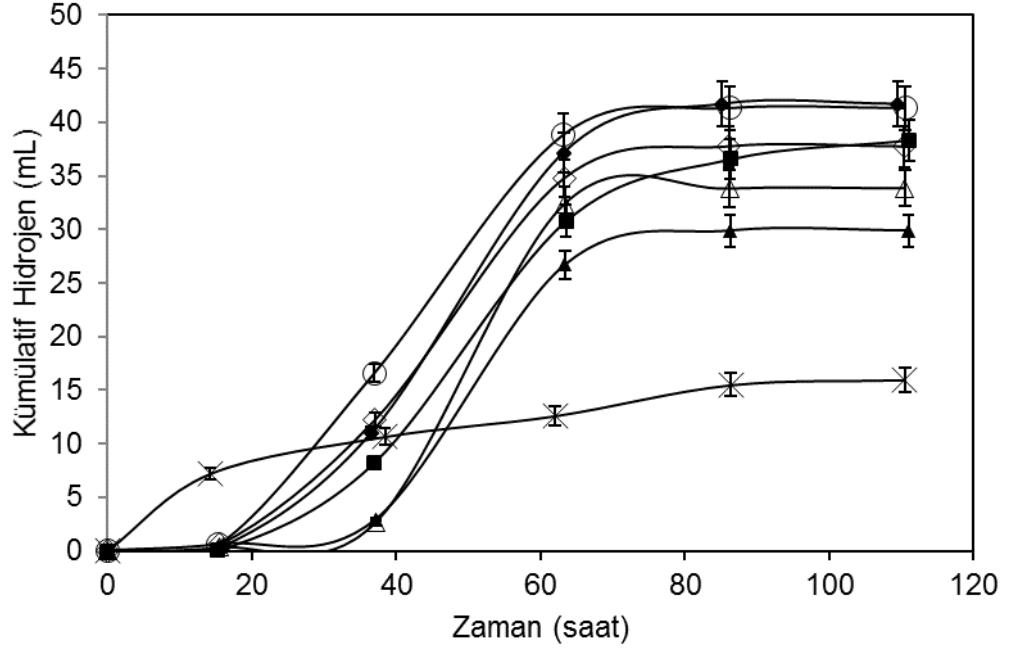
Biyokütle konsantrasyonu standart metotlar No: 2540D'e göre yapılmıştır (Eugene ve diğ. 2012).

## 4. BULGULAR

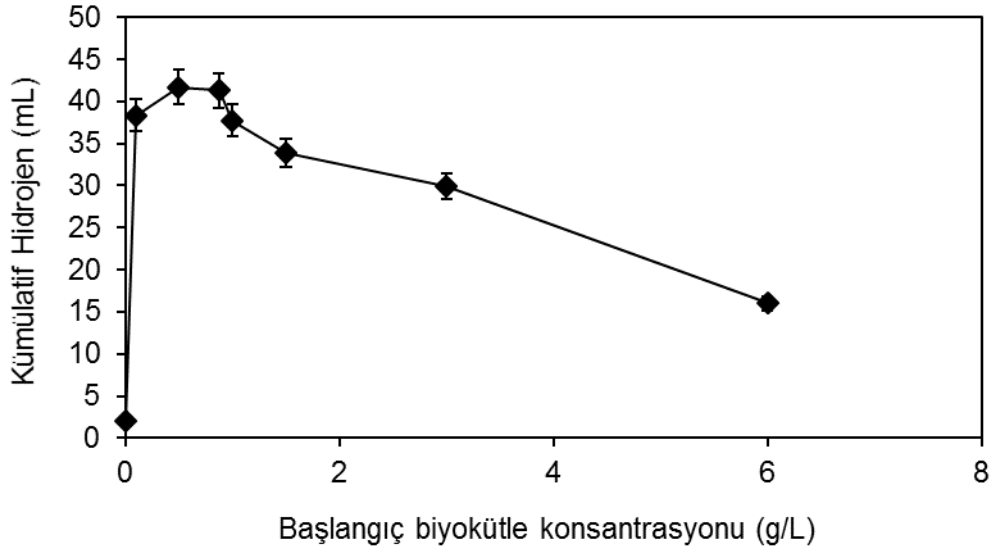
### 4.1 Karanlık Fermentasyon

#### 4.1.1 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Hidrojen Üretimine Olan Etkisi

Farklı başlangıç biyokütle konsantrasyonları için kümülatif hidrojen gazı hacminin zamana göre değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. 6 g/L biyokütle konsantrasyonu hariç diğer noktaların adaptasyon süreleri 20 saat olduğu görülmüştür. Tüm koşullar için üretilen maksimum hidrojen gazı hacimleri 15 ile 45 mL arasında değişim göstermiştir. Hidrojen yüzdesi ise %5-13 olarak ölçülmüştür. En yüksek kümülatif hidrojen gazı hacmi (41.69 mL) 0.5 g/L biyokütle konsantrasyonunda elde edilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 0.5 g/L'den daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında kümülatif hidrojen gazı hacmi giderek azalmıştır. Organizma ilavesi yapılmayan kontrol şişesinde (121°C 30 dakikada otoklav kullanılarak sterilize edilmiştir) herhangi bir gaz çıkışı gözlenmemiş olup, organizma ilavesinin hidrojen üretimi üzerinde etkisi görülmüştür. 0.1 ile 1 g/L arasında elde edilen kümülatif hidrojen gazı hacimlerinde çok büyük bir fark gözlenmiştir. En düşük kümülatif hidrojen gazı üretimi miktarı 6 g/L'de 15.98 mL olmuştur.



**Şekil 4.1:** Kümülatif hidrojen gazının farklı biyokütle konsantrasyonları (g/L) için zamana göre değişimi. ■ 0.1, ◆ 0.5, ○ 0.875, ◇ 1.0, △ 1.5, ▲ 3.0, x 6.0.



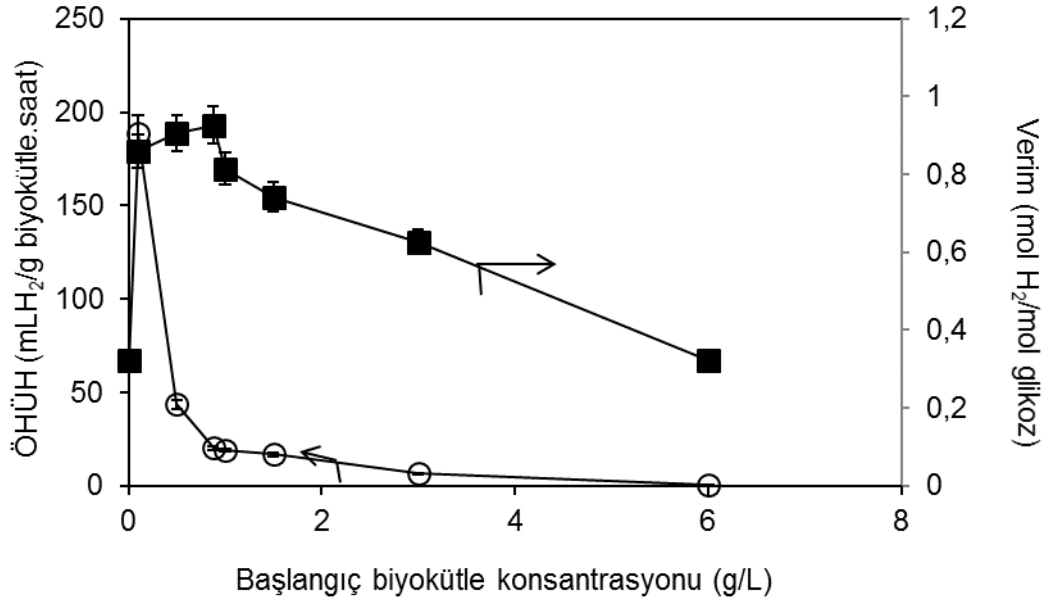
**Şekil 4.2:** Maksimum kümülatif hidrojen hacminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.

Tüm biyokütle konsantrasyonlarına ait hidrojen üretim verileri Gompertz eşitliği ile Statistica bilgisayar programında regresyon analizi ile korele edildikten sonra elde edilen katsayılar Tablo 4.1’de verilmiştir. Tablo 4.1’de verilen değerler ile Şekil 4.1 ve 4.2’deki hidrojen üretimleri uyumlu olduğu görülmektedir. Maksimum hidrojen üretim potansiyelleri (P) önce 0.1 g/L’den 0.5 g/L’ye kadar artış gösterdikten sonra 6 g/L’ye kadar azalış göstermiştir. Hidrojen üretim hızı değerleri ise 0.1 g/L’den 0.875 g/L’ e kadar artmış, daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında azalmıştır. Şekil 4.1 incelendiğinde adaptasyon süreleri yaklaşık 20 saat civarındayken, Gompertz eşitliğine göre bu süre 30-37 saat seviyelerinde hesaplanmıştır. Bunun nedeni regresyon analizi sırasında Statistica programının hız için eğim hesabını 30-37. saatlerde başlatması olmuştur. Yapılan regresyon analizleri için elde edilen korelasyon katsayıları 0.98’ in üzerinde çıkararak hesaplanan Gompertz katsayılarının güvenilir olduğu anlaşılmıştır.

**Tablo 4.1:** Farklı biyokütle konsantrasyonları için Gompertz eşitliği katsayıları.

Başlangıç biyokütle konsantrasyonu (g/L)	P (mL H <sub>2</sub> )	R (mL H <sub>2</sub> /saat)	λ (saat)	R <sup>2</sup>
0.1	38.45	1.02	29.13	0.99
0.5	42.04	1.39	28.69	0.99
0.875	41.45	1.54	26.21	0.99
1	37.89	1.36	28.16	0.98
1.5	33.84	1.18	36.72	0.99
3	30.01	1.26	35.83	0.98
6	15.88	0.26	5.93	0.98

Özgül hidrojen üretim hızları (ÖHÜH), hidrojen üretim veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 4.3’te verilmiştir. Buna göre 0.875 g/L’ye kadar hidrojen üretim verimi artarak bu noktada maksimum değeri olan 0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz’a ulaşmıştır. Diğer taraftan hidrojen verimi biyokütle konsantrasyonun artmasıyla birlikte düşerek 6 g/L’de 0.322 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz değeri elde edilmiştir. En yüksek ÖHÜH değeri 188.81 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat ile 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonunda elde edilmiştir. ÖHÜH biyokütle konsantrasyonunun artışıyla birlikte azalmıştır.

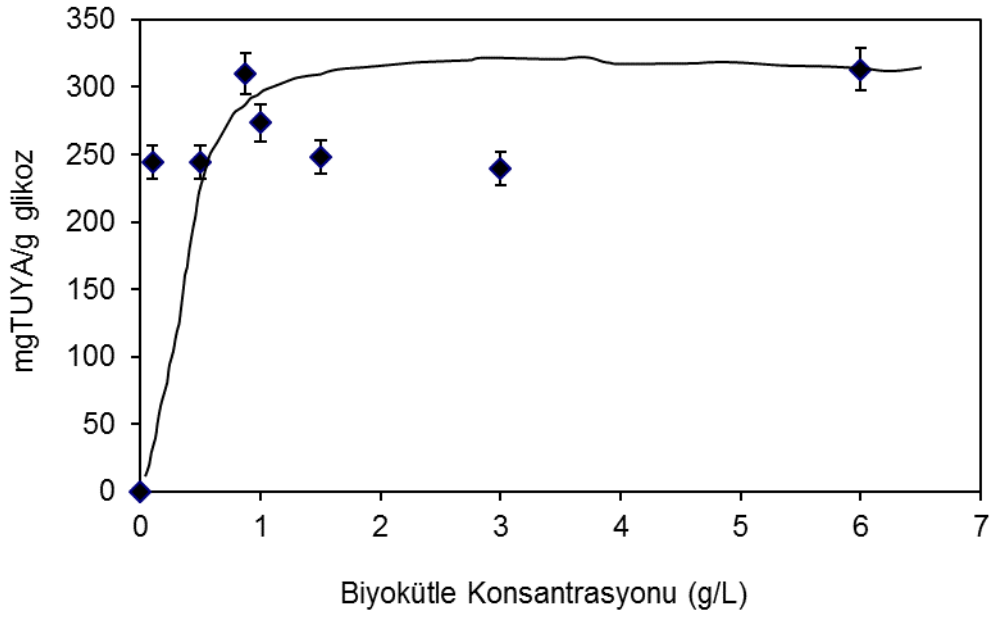


**Şekil 4.3:** (o) Özgül hidrojen üretim hızı (ÖHÜH) ile (■) Hidrojen üretim veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.

Deney verilerine göre hesaplanan toplam uçucu yağ asidi oluşum verimlerinin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Tablo 4.2'te görüldüğü gibi biyokütle konsantrasyonun artışıyla birlikte TUYA konsantrasyonu da belirli bir seviyeye kadar artmıştır. TUYA konsantrasyonu deney başlangıcında ortalama 300 mg/L olup, deney sonunda tüm koşullarda 2500 mg/L'ye yaklaşmıştır. Birim glikoz tüketimi başına oluşan TUYA miktarı Şekil 4.4'te verilmiştir. Buradan da görüldüğü gibi TUYA verimi aşı ilavesi ile birlikte 250-350 mg TUYA/g glikoz seviyelerine çıktıktan sonra sabitlenmiştir.

**Tablo 4.2:** Biyokütle deneyi başlangıç ve sonundaki glikoz ve TUYA konsantrasyonları.

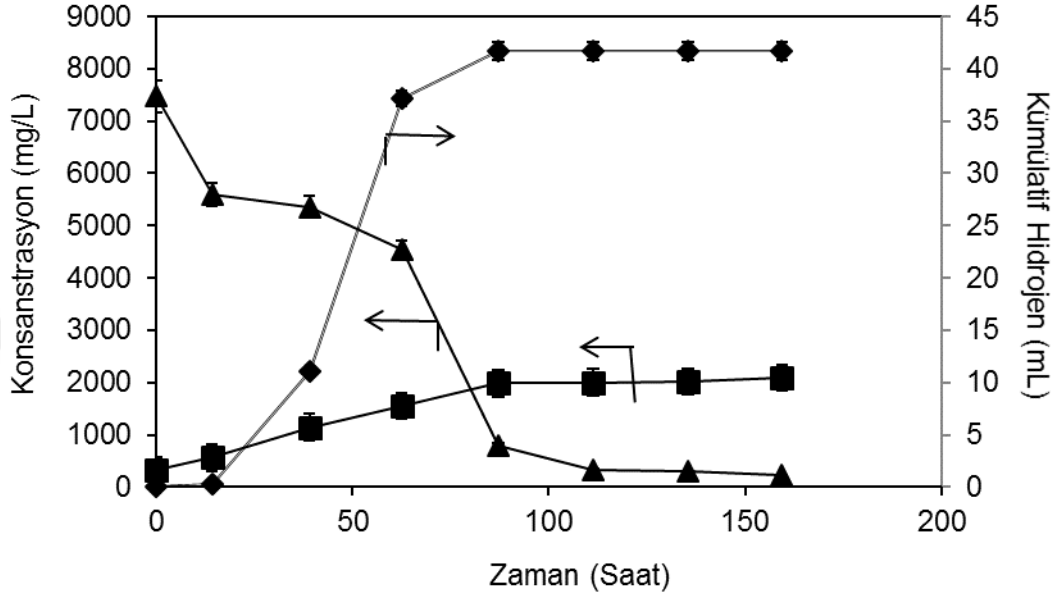
Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonu (g/L)	Glikoz <sub>baş.</sub> (g/L)	Glikoz <sub>son</sub> (g/L)	TUYA <sub>baş.</sub> (g/L)	TUYA <sub>son</sub> (g/L)
0.1	7.39	0.36	0.32	2.04
0.5	7.47	0.22	0.32	2.09
0.875	7.27	0.23	0.32	2.50
1.0	7.54	0.24	0.30	2.30
1.5	7.58	0.24	0.29	2.11
3.0	7.79	0.27	0.26	2.06
6.0	8.07	0.25	0.34	2.79



**Şekil 4.4:** Toplam uçucu yağ asidi oluşum veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi

5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu için kümülatif hidrojen üretimi, TUYA ve substrat değişimleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Buna göre parametrelerin

zamana göre değişimi kesikli işletim ile uyumu çıkmıştır. Glikoz verimli bir şekilde tüketilirken hidrojen ve TUYA'da artış gözlenmiştir. Tüm değerler 110 saat sonra sabitlenmiştir. Deney sonunda kümülatif hidrojen hacmi 41.69 mL, TUYA 2092 mg/L seviyelerinde glikoz konsantrasyonu ise 230 mg/L seviyesinde kalmıştır.



**Şekil 4.5:** 0.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunda TUYA (mg/L) (■), glikoz (mg/L) (▲) ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) hacminin zamana göre değişimi.

Elde edilen sonuçlar 1.0 g/L altında olan başlangıç biyokütle konsantrasyonları için kümülatif hidrojen hacminin ve hidrojen üretim verimlerinin birbirlerine yakın olduğunu göstermektedir. En yüksek ÖHÜH değeri ise 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonunda 188.81 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat olarak tespit edilmiştir. 1.0 g/L altında kalan biyokütle konsantrasyonları kendi aralarında incelendiğinde 0.1 g/L'nin daha avantajlı olduğu söylenebilir. Çünkü, büyük bir reaktörün az miktarda biyokütle ile beslenmesi çok miktarda biyokütle ile beslenmesinden ekonomik ve uygulama açısından daha avantajlıdır.

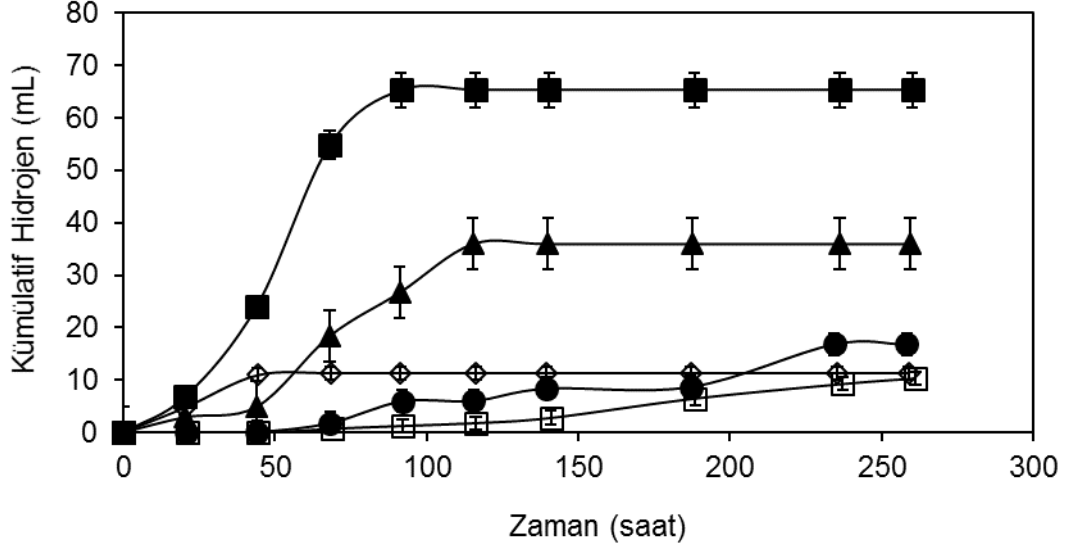
0.875 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunun gerçekleştiği deney ortamında en yüksek hidrojen üretim verimi 0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz olarak elde edilmiştir. Bu değer teorik 4 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz olan hidrojen oluşum veriminin yaklaşık dördte biri olup, teorikte ki değerin altında kalmıştır. Düşük hidrojen üretim veriminin elde edilmesinin nedenleri arasında, hidrolizat içerisinde nötralizasyon işleminin sonrasında oluşan aşırı tuz miktarının veya aşu çamuru içerisinde hidrojen tüketimine neden olan homo-asetojen türü mikroorganizmaların varlığı olabilir. Hidrolizat içerisinde 5-HMF miktarı 0 mg/L civarında olduğu için 5-HMF'nin toksik

etki yapma ihtimali bulunmamaktadır. Hidrojen veriminin düşük olmasının bir başka nedeni, organik asit birikimi ile ürün inhibisyon etkisini önlemek amacıyla başlangıç şeker konsantrasyonunun 7 g/L'de tutulması olabilir. Bu deneylerde şeker konsantrasyonunun düşük tutulmasındaki amaç mikroorganizmaların hızlı TUYA oluşumundan ve buna bağlı ani pH düşüşünden olumsuz etkilenmemelerini sağlamaktır. Literatürde optimum başlangıç şeker konsantrasyonu veya KOİ eşdeğeri koşullara göre değişiklik gösterse de genellikle 20 g/L seviyelerinde rapor edilmiştir (Wu ve diğ. 2007, Lin ve Chang 2004, Eker ve Sarp 2016). Bunların yanında deney esnasında UYA oluşumuna bağlı ani pH düşüşlerini engellemek için kullanılan fosfat tamponlarının ayrıca nötralizasyon esnasında oluşan tuzlar ile birlikte mikroorganizma hücre zarı üzerindeki ozmotik basıncı arttırmaları ile birlikte mikrobiyal etkinliklerini olumsuz yönde etkilemiş olabilirler. Literatürdeki bir çalışmaya göre atık buğday tozundan karanlık fermentasyon yöntemi ile hidrojen üretimi denemelerinde optimum başlangıç substrat ve biyokütle konsantrasyonu olarak sırasıyla 20 g/L ve 2.5 g/L belirlenmiştir. Bu durumda substrat/biyokütle oranının 0.125 olduğu rapor edilmiştir (Argun ve diğ. 2008<sup>b</sup>). Tez kapsamında yapılan bu çalışmada da başlangıç substrat konsantrasyonu olan 7 g/L ile biyokütle konsantrasyonu 0.875 g/L oranlandığında ortaya çıkan 0.125 sonucu ile çalışmanın literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir. 0.875 g/L biyokütle konsantrasyonunda en yüksek hidrojen veriminin olan 0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz olarak bulunmasına rağmen, karanlık fermentasyon aşamasının devamında 0.1 g/L kullanılması tavsiye edilmiştir. Çünkü 0.1 g/L' de elde edilen 0.905 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz veriminin 0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz verimine çok yakın olması, ÖHÜH en yüksek değerinin 0.1 g/L'de ve 188.81 mL H<sub>2</sub>/g.saat olması ve düşük seviyedeki biyokütle konsantrasyonunun kullanımının daha pratik olmasıdır.

#### **4.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Hidrojen Üretimine Olan Etkisi**

Farklı substrat konsantrasyonları için kümülatif hidrojen gazının (mL) zamana göre değişimi Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Deney 260 saatlik bir süre boyunca devam etmiştir ve kümülatif hidrojen gazı üretimi 10-65 mL arasında değişmiştir. Kümülatif hidrojen hacmi, substrat konsantrasyonunun 6 g/L'den 21 g/L'ye yükselmesiyle birlikte artış gösterdikten sonra daha yüksek glikoz konsantrasyonlarında düşmüştür. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi 6, 30 ve 41 g/L substrat konsantrasyonlarında kümülatif hidrojen hacimleri yaklaşık aynı düzeyde

seyretmiştir. Ancak 6 g/L konsantrasyonunda hidrojen oluşumu daha erken başlamıştır. Bunun sebebi 30 ve 40 g/L'de substrat inhibisyonu olabilir. 15 ve 21 g/L substrat (şeker) konsantrasyonundaki kümülatif hidrojen oluşumlarının diğer derişimlere göre daha verimli olduğu açıkça görülmektedir. Hidrojen yüzdesi ise 21 g/l substrat konsantrasyonunda %17'e çıkmıştır. 21 g/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarda ise hidrojen yüzdesi azalarak %3'e düşmüştür.



**Şekil 4.6:** Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için kümülatif hidrojen (mL) hacminin zamana göre değişimi. (◇) 6, (▲) 15, (■) 21, (●) 30, (□) 41.

Farklı substrat konsantrasyonlarına ait zaman ve kümülatif hidrojen hacim verilerinin Statistica programı yardımıyla regresyon analizi sonucu Gompertz eşitliği katsayıları belirlenmiş ve Tablo 4.3'de verilmiştir. Tablo 4.3'de görüldüğü gibi maksimum hidrojen üretim değerleri (P) ile adaptasyon süreleri ( $\lambda$ ) Şekil 4.6'da verilen grafikte uyumlu çıkmıştır. Adaptasyon sürelerinin şeker konsantrasyonu ile beraber artış gösterdiği görülmektedir. Bu süre 41 g/L için 102.67 saate ulaşmıştır. 21 g/L' den daha düşük şeker konsantrasyonunda ise bu süre daha az çıkmıştır. Adaptasyon süresine benzer bir durum hidrojen üretim hızında ( $R_m$ ) da görülmektedir.  $R_m$  değeri 6 g/L'den 21 g/L' ye kadar 0.25' ten 1.53 mL  $H_2$ /saat değerine doğru artış göstermiş, daha yüksek şeker konsantrasyonlarında azalarak 0.1 mL  $H_2$ /saat değerine düşmüştür.

**Tablo 4.3:** Farklı başlangıç substrat (glukoz) konsantrasyonları (g/L) için Gompertz katsayıları ( $X_0$ : 0.15 g/L,  $V_0$ : 45 mL).

Glikoz <sub>BAŞ</sub> (g/L)	P (mL)	$R_m$ (mLH <sub>2</sub> /saat)	$\lambda$ (saat)	$R^2$
6	11.40	0.25	11.93	1.00
15	35.95	0.59	37.07	0.99
21	65.26	1.53	27.05	0.99
30	16.04	0.08	52.00	0.95
41	10.23	0.10	102.67	0.98

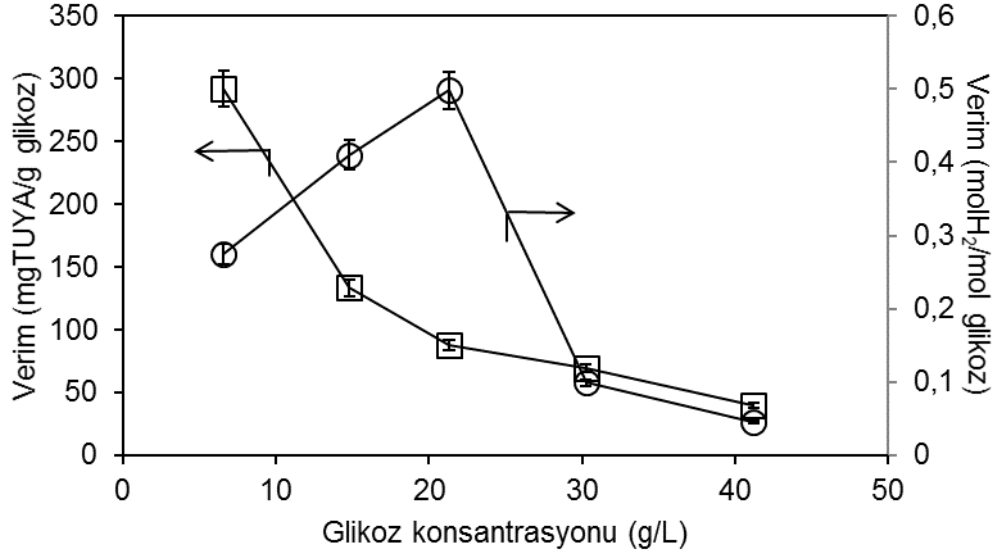
Deney başlangıcında ve sonucunda analizlenen glukoz ve TUYA konsantrasyonları Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Tablo 4.4'de görüldüğü gibi 21 g/L substrat konsantrasyonuna kadar glukozun yaklaşık tamamı kullanılmış ve 1 g/L'nin altına düşmüştür. Fakat başlangıç glukoz konsantrasyonu 21 g/L'den daha yüksek olan koşullarda son glukoz konsantrasyonlarının 1 g/L'nin üzerinde kaldığı görülmüştür. Bunun yanında tüm deney koşullarında TUYA konsantrasyonu artmıştır. TUYA'nın artışı glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak gerçekleşmiştir. Deney başlangıcında 1 g/L'nin üzerinde TUYA konsantrasyonunun olması hidrolizattan kaynaklanmaktadır. Bu durumun asit hidrolizi esnasında organik asit oluşumundan kaynaklanabileceği literatürde rapor edilmiştir (Yin ve Tan 2012).

**Tablo 4.4:** Deney başlangıcı ve sonundaki substrat (glukoz) ve toplam uçucu yağ asidi (TUYA) konsantrasyonları.

Glikoz <sub>BAŞ</sub> (mg/L)	Glikoz <sub>SON</sub> (mg/L)	TUYA <sub>BAŞ</sub> (mg/L)	TUYA <sub>SON</sub> (mg/L)
6600	90.43	560	2460
14819	909.40	920	2775
21330	670.87	2945	4755
30256	3411.38	1895	3755
41220	5468.24	2885	4310

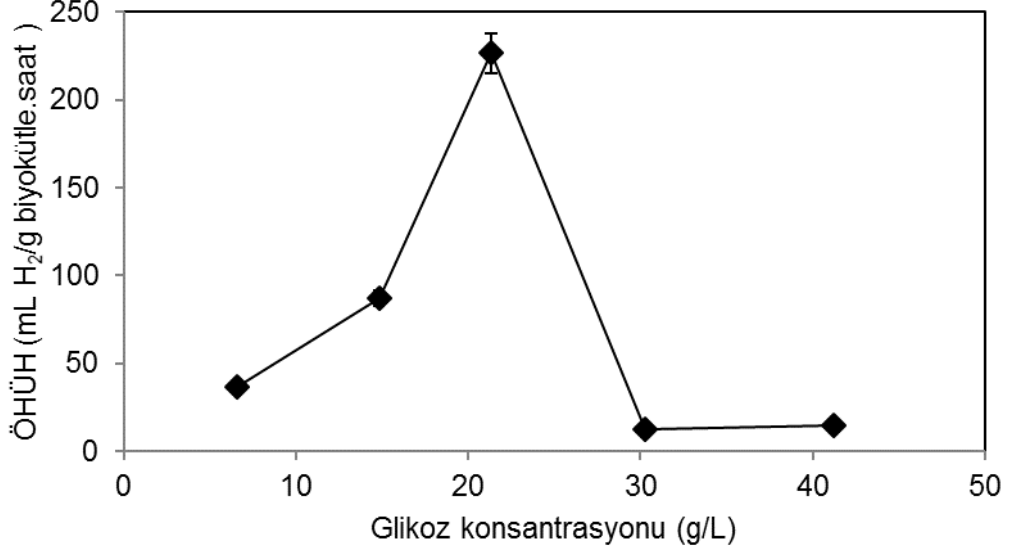
Farklı substrat derişimleri için hidrojen ve TUYA oluşum verimleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Burada da görüldüğü gibi hidrojen üretim verimi glukoz konsantrasyonunun 6 g/L'den 21 g/L'ye artmasıyla birlikte artış gösterdikten sonra daha yüksek şeker konsantrasyonlarında düşmüştür. En yüksek hidrojen verimi 21 g/L'de 0.498 mol H<sub>2</sub>/mol glukoz olarak elde edilmiştir. Bu verimin düşük olmasının birçok nedeni olabilir. Öncelikle asit hidroliz sırasında 5-HMF'den başka bilinmeyen toksik maddelerin oluşumu, nötralizasyon sonucu ortamda aşırı tuz birikiminin

bakteriler üzerinde inhibisyonu, iz elementler veya vitamin eksikliği ile enzimatik faaliyetlerin verimsiz kalışı gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Şekil 4.7 incelendiğinde birim glikoz tüketimi başına TUYA üretim verimleri ise başlangıç substrat konsantrasyonu artıkça azalmıştır. En yüksek TUYA oluşumu 6 g/L'de 291.88 mg TUYA/g glikoz, en düşük ise 41 g/L'de 39.85 mg TUYA/g glikoz olarak kayıt edilmiştir. En yüksek hidrojen üretiminin elde edildiği 21 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda düşük TUYA üretim veriminin olması, mikroorganizmalar üzerindeki TUYA inhibisyonunun daha az olmasını sağlamıştır.



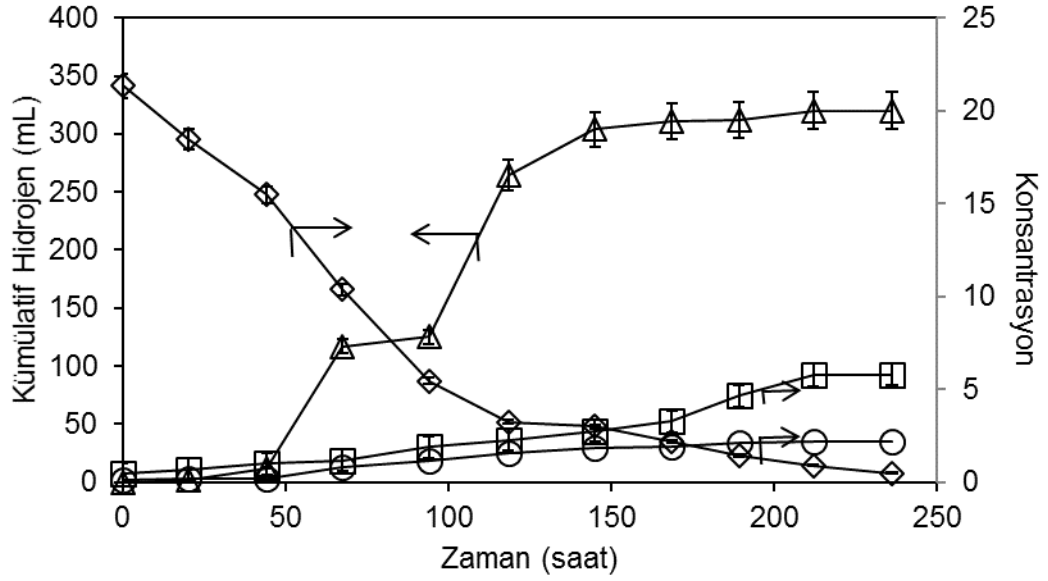
**Şekil 4.7:** Hidrojen (o) ve toplam uçucu yağ aside (TUYA) (□) üretim verimlerinin farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları için değişimi.

Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) başlangıç glikoz konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 4.8'de verilmiştir. ÖHÜH, glikoz konsantrasyonunun 6 g/L'den 21 g/L'ye yükselmesiyle orantılı olarak 36.88'den 226.66 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat değerine çıkmış daha sonra başlangıç glikoz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte düşerek 13 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat değerine kadar inmiştir.



**Şekil 4.8:** Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonlarına göre değişimi.

Yukarıda açıklanan sonuçlar doğrultusunda en uygun başlangıç substrat konsantrasyonunun 21 g/L olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Buna göre biyokütle konsantrasyonunun 0.1 g/L ve başlangıç substrat konsantrasyonunun 21 g/L olduğu en uygun koşullarda deney yapılmıştır. Burada bölüm 4.1.1 ve 4.1.2'deki deneylerden farklı olarak başlangıç sıvı hacmi hariç (300 mL) diğer tüm deney şartları aynı tutulmuş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir. Görüldüğü gibi glikoz konsantrasyonu düşüş gösterirken, kümülatif hidrojen hacmi ve TUYA konsantrasyonu artış göstermiştir. Parametrelerin değişimi kesikli büyüme ile uyumlu olup, deney başladıktan 150 saat sonra sabit hale gelmiştir. Burada maksimum üretilen hidrojen yüzdesi 36 olarak kaydedilmiştir. Bu doğrulama deneyine ait Gompertz eşitlik katsayıları Tablo 4.5'te verilmiştir.



**Şekil 4.9:** 21 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen karanlık fermentasyon deneyinde kümülatif hidrojen hacmi (Δ), glikoz (g/L) (◇), TU YA (g/L) (□) ve biyokütle (g/L) (o) konsantrasyonlarının zamana göre değişimi.

**Tablo 4.5:** Optimum başlangıç substrat (21 g/L) ve biyokütle (0.15 g/L) konsantrasyonlarında işletilen karanlık fermentasyon doğrulama deneyi Gompertz eşitliği katsayıları ve verimleri.

P (mLH <sub>2</sub> )	R <sub>m</sub> (mLH <sub>2</sub> /saat)	λ (saat)	Verim (mol H <sub>2</sub> /mol glikoz)	Verim (mg TU YA/g glikoz)	R <sup>2</sup>
326.54	3.79	47.14	0.36	257.00	0.97

Doğrulama deneyindeki sonuçların Bölüm 4.1.1 ve 4.1.2’de yapılan deneylerden farklı çıkmasının bir nedeni yüksek sıvı hacminde çalışılmış olması olabilir. Ayrıca farklı hidrolizatın kullanılmış olması da sonuçları etkilemiş olması muhtemeldir. Başlangıç biyokütle ile substrat konsantrasyonun optimize edildiği deneylerde kullanılan hidrolizat 50 g/L kağıt atığının 135°C’ de %5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0.05 katı/sıvı (w/w) oranında 2 saat işleme süresi ile muamele edilmesi sonucunda elde edilirken doğrulama deneyinde kullanılan hidrolizat 200 g/L kağıt atığının 105°C’ de %5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0.2 katı/sıvı (w/w) oranında 3.5 saat hidroliz edilmedi ile elde edilmiştir.

Hidrolizat eldesindeki bu değişimin sebebi asit hidrolizi esnasında oluşan toksik madde oluşumunu azaltmaktır. Yapılan bu işlem hidrolizat kompozisyonunda değişime yol açmıştır. Özellikle hidrolizat başlangıç TUYA konsantrasyonlarında farklılıklar gözlenmiştir. Başlangıç substrat konsantrasyonunun hidrojen üretimine olan etkisinin araştırıldığı deneylerde başlangıç TUYA konsantrasyonu 2945 mg/L civarında iken bu değer doğrulama deney hidrolizatında 440 mg/L'ye dūřmüřtür. Literatürde yapılan çalışmalarda selüloza uygulanan asit hidrolizi sonucunda glikozun yanında karboksil asitlerin ve 5-HMF'nin de oluşacağı rapor edilmiştir (Yin ve Tan 2012). Tablo 4.5'de görüldüğü gibi hidrojen üretiminin daha yüksek TUYA üretim verimi ve adaptasyon süresinde gerçekteşiği görülmektedir. Hidrojen üretim verimi ise (0.498 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz'dan 0.36 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz'a) daha yüksek TUYA (5800 mg/L) oluşumu nedeniyle dūřüř göstermiştir.

#### 4.1.3 C/N/P/Fe Oranının Hidrojen Üretimine Olan Etkisi

Hidrojen üretim verimi ve ÖHÜH'ları için Design-Expert ile adımsal model uyumluluğu testi yapıldığında her iki amaç fonksiyonu için en uygun modelin kuadratik model türü olduğu bulunmuştur (Lack-of-Fit test p-değeri >0.05).

Değişkenlere ait aralıkların Design-Expert programına girilerek elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

**Tablo 4.6:** Box-Behnken istatistiksel deney tasarım değerleri ve sonuçları tablosu.

Deney No	Değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri			Sonuçlar			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$ Verim (molH <sub>2</sub> /mol glikoz)		$Y_2$ ÖHÜH (mLH <sub>2</sub> /gbiyokütle.sa)	
	N/C oranı (w/w)	P/C oranı (w/w)	Fe/C oranı (w/w)	Deneysel Sonuç	Model Tahmini	Deneysel Sonuç	Model Tahmini
1	0.025 (0)	0.05 (0)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.628	0.630	162.38	171.27
2	0.025 (0)	0.1 (+1)	3.13x10 <sup>-3</sup> (+1)	0.492	0.460	231.43	215.63
3	0.025 (0)	0.05 (0)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.547	0.590	168.09	171.27
4	0 (-1)	0 (-1)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.491	0.460	63.81	54.57
5	0.05 (+1)	0.1 (+1)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.531	0.560	213.81	222.95
6	0.025 (0)	0 (-1)	0 (-1)	0.524	0.560	164.76	180.56
7	0.05 (+1)	0.05 (0)	3.13x10 <sup>-3</sup> (+1)	0.620	0.620	174.29	180.94
8	0.05 (+1)	0.05 (0)	0 (-1)	0.393	0.390	172.38	171.37
9	0 (-1)	0.1(+1)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.324	0.360	21.87	36.67
10	0.025 (0)	0.05 (0)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.586	0.590	183.33	171.27
11	0.025 (0)	0 (-1)	3.13x10 <sup>-3</sup> (+1)	0.327	0.360	89.05	97.18
12	0 (-1)	0.05 (0)	3.13x10 <sup>-3</sup> (+1)	0.183	0.180	37.14	38.15
13	0.025 (0)	0.1(+1)	0 (-1)	0.494	0.460	196.19	188.05
14	0.05 (+1)	0 (-1)	1.56x10 <sup>-3</sup> (0)	0.491	0.460	93.81	79.02
15	0 (-1)	0.05 (0)	0 (-1)	0.634	0.590	110.18	103.52

Tablo 4.6'da görüldüğü gibi hidrojen oluşum verimi 0.183-0.634 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz arasında değişirken, ÖHÜH değeri ise 37.14-231.43 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.sa arasında değişmiştir. Her bir değişkenin amaç fonksiyonlarına olan etkisi farklı olmuştur. Tablo 4.6 incelendiğinde deney sonuçları ile tahmin edilen değerlerin birbirine yakın çıktığı görülmektedir. Buna göre hidrojen üretim verimini temsil eden

Eşitlik (4.1) kuadratik model için korelasyon regresyon katsayısı olan R<sup>2</sup> değeri %85 iken ÖHÜH için Eşitlik (4.2)'de belirlenen R<sup>2</sup> %92 olmuştur.

Değişkenlerin bu etkileri Design-Expert yazılımı tarafından önerilen kuadratik model fonksiyonları ile Eşitlikler (4.1) ve (4.4)'de daha net görülmektedir. Eşt (4.1) ve (4.2)'de değişkenler ile hidrojen üretim verimi ve hızı arasındaki bağlantılar gerçek değişken katsayıları esas alınarak tanımlanırken, Eşt. (4.3) ve Eşt (4.4)'te verilen eşitlikler kodlanmış katsayılara göre verilmiştir. Eşt. (4.3)'te yer alan lineer katsayılar (b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> ve b<sub>3</sub>) incelendiğinde bağımsız değişkenlerin farklı oranlarda hidrojen üretim verimine katkı sağladıkları görülmektedir. Bu durumda N/C (b<sub>1</sub>: 0.050) ve P/C (b<sub>2</sub>: 1X10<sup>-3</sup>) oranları hidrojen veriminin artışına olumlu yönde katkı sağlarken Fe/C (b<sub>3</sub>: -0.053) olumsuz yönde etki etmiştir. Özgül hidrojen üretiminin kodlanmış değişkenlere göre ilişkisini gösteren (4.4) no'lu Eşitlik incelendiğinde N/C (b<sub>1</sub>: 52.66) oranı ÖHÜH artışına en yüksek katkı sağlarken, P/C (b<sub>2</sub>: 31.48) oranı ikinci ve Fe/C (b<sub>3</sub>: -13.95) oranının ise en az seviyede katkısının olduğu anlaşılmaktadır. Fakat ikili etkileşim ve kuadratik katsayılar irdelendiğinde bireysel olarak ÖHÜH'nin azalmasına katkı gösteren bir değişkenin tam tersini gösterebileceği anlaşılmaktadır.

Gerçek değişken katsayılarına göre düzenlenmiş model fonksiyonları:

$$Y_{VERİM}=0.6660-1.655X_1+0.53X_2-90.64X_3+41.40X_1X_2+4339.20X_1X_3+624.00X_2X_3-103.60X_1^2-25.20X_2^2-26521.60X_3^2 \quad (4. 1)$$

$$Y_{ÖHÜH}=127.2195+4529.7546X_1-213.0558X_2-54197.5237X_3+32386.7285X_1X_2+4.79635x10^{+5}X_1X_3+3.5505x10^{+5}X_2X_3-95842.58X_1^2-5216.8460X_2^2+4.9682x10^{+6}X_3^2 \quad (4. 2)$$

Kodlanmış değişken katsayılarına göre düzenlenmiş model fonksiyonları:

$$Y_{VERİM} =0.59+0.050X_1+1x10^{-3}X_2-0.053X_3+0.052X_1X_2+0.17X_1X_3+0.049X_2X_3- 0.065X_1^2 - 0.063X_2^2 - 0.065X_3^2 \quad (4. 3)$$

$$Y_{ÖHÜH}=171.27+52.66X_1+31.48X_2-13.95X_3+40.48X_1X_2+18.74X_1X_3+27.74X_2X_3-59.90X_1^2-13.04X_2^2+ 2.13X_3^2 \quad (4. 4)$$

Tablo 4.7 ve 4.8 de sırasıyla hidrojen üretim verimi ve ÖHÜH modelleri için Design-Expert yazılımında yapılan varyans analizleri (ANOVA) sonuçları verilmiştir. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi hidrojen üretim verimi modeli için hesaplanan p olasılık değerinin 0.05'ten düşük çıkması modelin önemli olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca

Lack of Fit analizine ait p değerinin 0.05'ten yüksek çıkması Lack of Fit' in önemsiz olduğunu ve model uyumluluğunun iyi olduğunu vurgulamaktadır.  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  parametrelerinin p değerlerinin 0.05' ten düşük çıkması bu değerlerin hidrojen üretimi üzerinde önemli etkisinin olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.7:** Hidrojen üretim verimine ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.

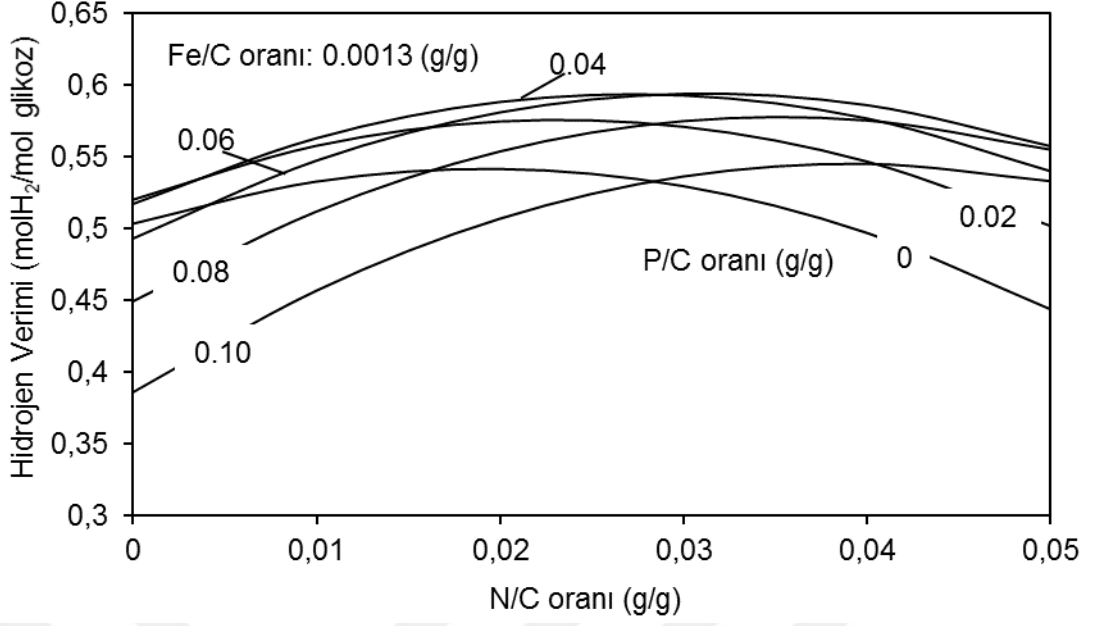
İstatistiksel parametreler	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P-değeri	
Model	0.22	9	0.024	10.10	0.0101	önemli
$X_1$ -N/C	0.020	1	0.020	8.49	0.0333	
$X_2$ -P/C	$8 \times 10^{-6}$	1	$8 \times 10^{-6}$	$3.346 \times 10^{-3}$	0.9561	
$X_3$ -Fe/C	0.022	1	0.022	9.35	0.0282	
$X_1X_2$	0.011	1	0.011	4.48	0.0879	
$X_1X_3$	0.11	1	0.11	48.06	0.0010	
$X_2X_3$	$9.506 \times 10^{-3}$	1	$9.506 \times 10^{-3}$	3.98	0.1027	
$X_1^2$	0.015	1	0.015	6.47	0.0516	
$X_2^2$	0.015	1	0.015	6.13	0.0561	
$X_3^2$	0.015	1	0.015	6.47	0.0516	
Kalan (Residual)	0.012	5	$2.391 \times 10^{-3}$			
Lack of Fit	$8.674 \times 10^{-3}$	3	$2.891 \times 10^{-3}$	1.76	0.3821	önemsiz
Pure Hata (Pure error)	$3.282 \times 10^{-3}$	2	$1.641 \times 10^{-3}$			
Cor Toplam (Total)	0.23	14				

ÖHÜH modeli için ANOVA tablosu sonuçları Tablo 4.8'de özetlenmiştir. Burada da model için önerilen p olasılık değerinin 0.05'ten düşük olması modelin önemli olduğunu ifade etmektedir.  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1^2$ ,  $X_2X_3$  parametreleri tek tek incelendiğinde değerlerin 0.05' ten düşük çıkması bu parametrelerin ÖHÜH üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu gösterir. Bu analizde de Lack of Fit testi için p değerinin 0.05' ten yüksek çıkması önemli bir uyumsuzluğun olmadığına ve modelin güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

**Tablo 4.8:** Hidrojen üretim hızına ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.

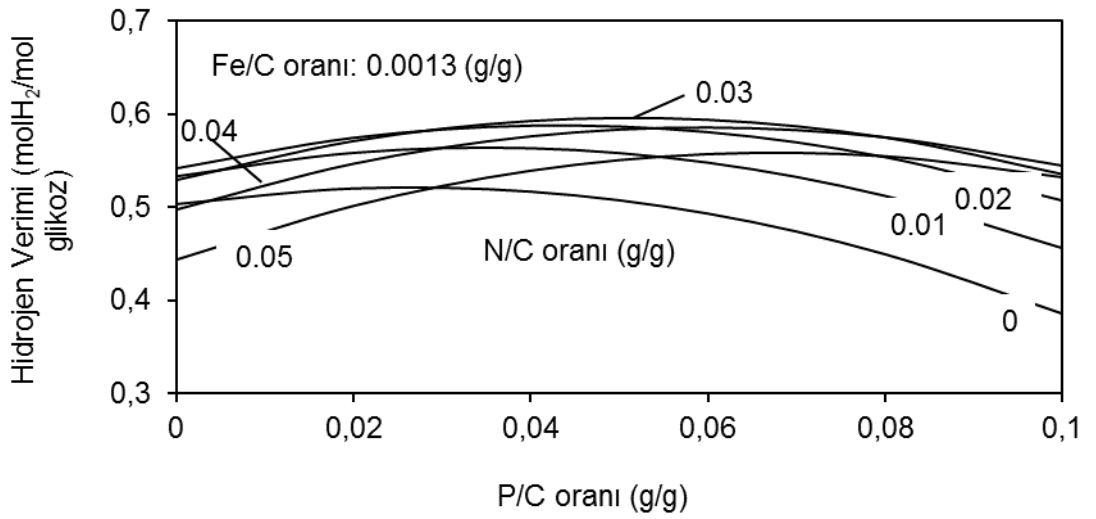
İstatistiksel parametreler	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P-değeri	
Model	57344.45	9	6371.61	20.40	0.0020	önemli
$X_1$ -N/C	22184.43	1	22184.43	71.03	0.0004	
$X_2$ -P/C	7930.18	1	7930.18	25.39	0.0040	
$X_3$ -Fe/C	1557.03	1	1557.03	4.99	0.0759	
$X_1X_2$	6555.63	1	6555.63	20.99	0.0059	
$X_1X_3$	1404.11	1	1404.11	4.50	0.0875	
$X_2X_3$	3077.61	1	3077.61	9.85	0.0257	
$X_1^2$	13248.75	1	13248.75	42.42	0.0013	
$X_2^2$	628.05	1	628.05	2.01	0.2154	
$X_3^2$	543.22	1	543.22	1.74	0.2444	
Kalan (Residual)	1561.71	5	312.34			
Lack of Fit	1327.10	3	442.37	3.77	0.2167	önemsiz
Pure Hata (Pure error)	234.62	2	117.31			
Cor Toplam (Total)	58906.16	14				

Hidrojen üretim verimine P/C ve N/C oranının etkileri Eşitlik 4.1 kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi P/C oranı sabit tutulduğunda hidrojen üretim verimi N/C oranının artmasıyla bir değere kadar artmış fakat daha sonra azalış göstermiştir. Hidrojen üretim verimi P/C oranı 0' dan 0.06 (g/g)'a çıkmasıyla maksimum 0.593 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz değerine ulaşmış ve daha yüksek P/C oranlarında düşüşe geçmiş, bunun yanında verimlerin değerleri 0.35-0.6 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz arasında değişim göstermiştir. Bunun nedeni 0.06 (g/g) P/C oranının altında kalan değerlerin mikrobiyal büyümeye fosfor limitlemesi yapması, daha yüksek P/C oranlarında ise mikroorganizmalar üzerinde fosforun inhibisyon etkisinden kaynaklanmıştır. Ortamda N/C ve P/C oranlarının sıfır olduğu durumda hidrojen üretim verimi 0.5 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz değerine ulaşmıştır. Çok az miktarda azot ilavesi 0.1 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz derecesinde verim artışına neden olmuştur. En ideal N/C ve P/C oranları Şekil 4.10'da gösterildiği gibi sırasıyla 0.03 ve 0.06 değerlerinde elde edilmiştir.



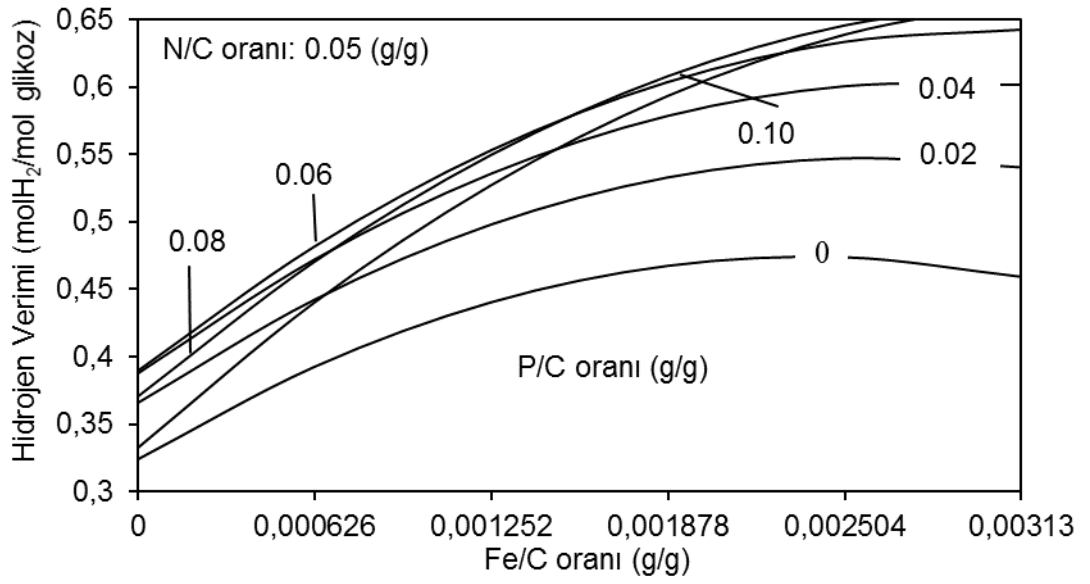
**Şekil 4.10:** Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.

Farklı N/C oranlarında hidrojen üretim veriminin P/C oranına göre değişimi Şekil 4.11’de verilmiştir. Burada görüldüğü gibi sabit N/C oranlarında P/C oranının artmasıyla bir dereceye kadar hidrojen verimi yükselmiş fakat daha yüksek değerlerde düşüşe geçmiştir. N/C oranının 0’dan 0.03’e artırılmasıyla en yüksek değer olan 0.593 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz’a ulaşılmıştır. N/C oranının daha çok artırılmasında ise hidrojen üretim verimi azalmıştır. 0.06 (g/g) P/C oranının altındaki değerler fosfor limitlemesine, yüksek değerler fosfor inhibisyonuna neden olmuştur.



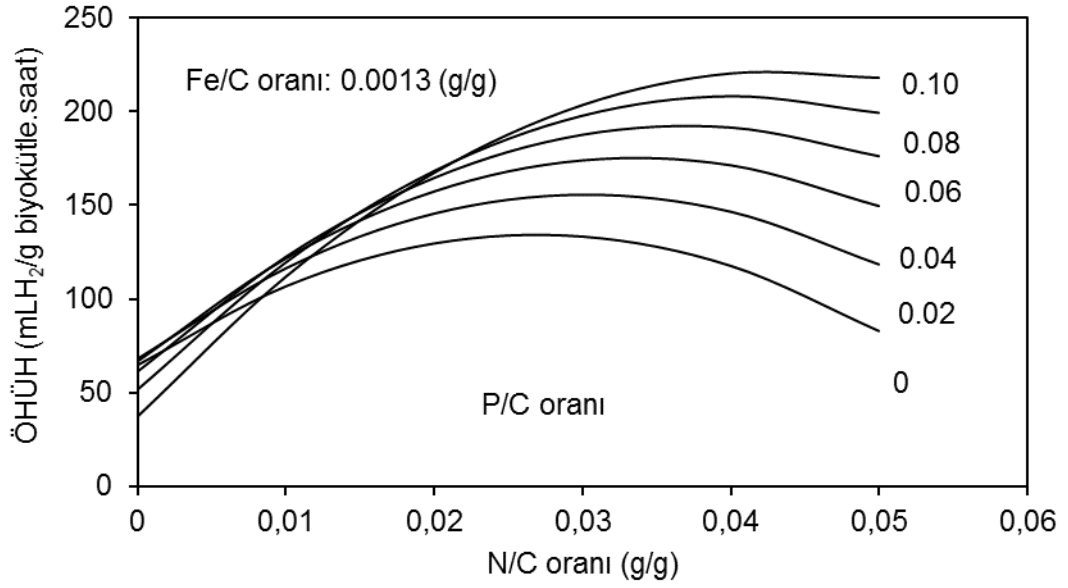
**Şekil 4.11:** Hidrojen üretim veriminin farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.

Şekil 4.12’de değişik P/C oranlarında hidrojen üretim veriminin Fe/C oranına göre değişimi gösterilmiştir. Sabit N/C ve Fe/C oranlarında, hidrojen üretim verimi P/C oranının artmasıyla birlikte belirli bir değere kadar arttıktan sonra daha yüksek P/C oranlarında azalmıştır. Diğer taraftan sabit P/C oranlarında hidrojen üretim verimi Fe/C oranının belirli bir değere artmasıyla birlikte Fe limitlemesi nedeniyle azalmış daha yüksek Fe/C oranlarında ise Fe inhibisyonu nedeniyle azalmıştır. En yüksek hidrojen üretim verimi (0.593 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz) P/C oranının 0.1, Fe/C oranının ise 0.002504 (g/g) olduğu durumda elde edilmiştir.



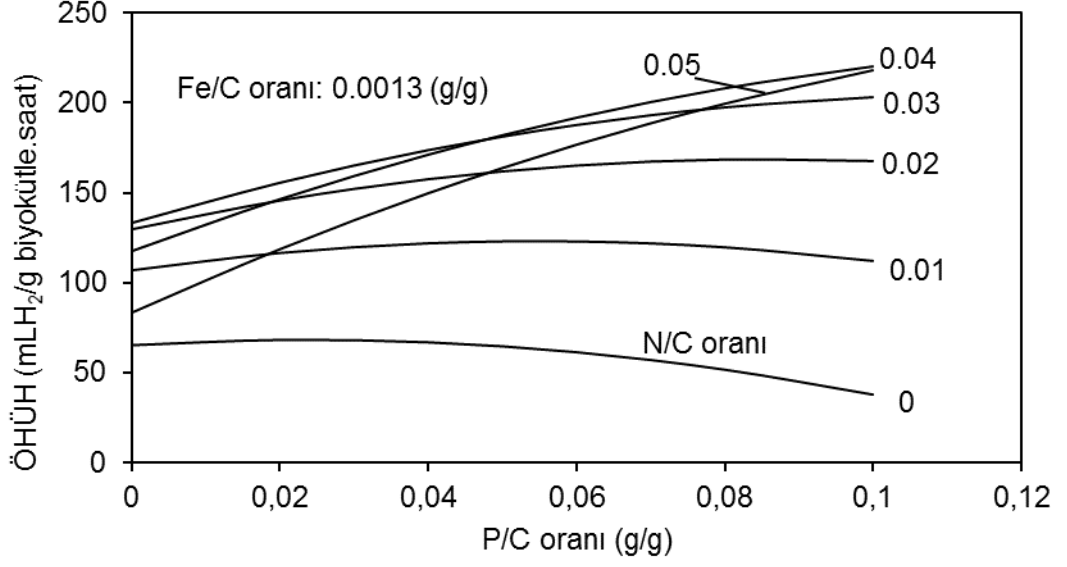
**Şekil 4.12:** Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında Fe/C oranına göre değişimi.

Özgül hidrojen üretim hızının farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi Şekil 4.13’de verilmiştir. Burada fark edildiği gibi ortama hiç azot ve fosfor katkısı yapılmamışken ÖHÜH değeri 65.15 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat olup, bu değer azot ve fosfor ilavesi sonucunda yaklaşık üç kat yükselme sağlamıştır. Sabit P/C oranlarında N/C oranının artırılması ile ÖHÜH değeri önce artmış, daha sonra azalmıştır. P/C oranı 0.1 (g/g) için azalma olmayıp, ÖHÜH değeri N/C 0.04 (g/g)’dan sonra sabit kalmıştır. Bu durum azot miktarının bir noktaya kadar limitlemeye bir noktadan sonra da inhibisyona neden olduğu ile açıklanabilir. P/C oranının artmasıyla ÖHÜH değeri sürekli artmıştır ve en yüksek değeri olan 220.17 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat’ e P/C oranı 0.1 (g/g)’de ulaşmıştır.



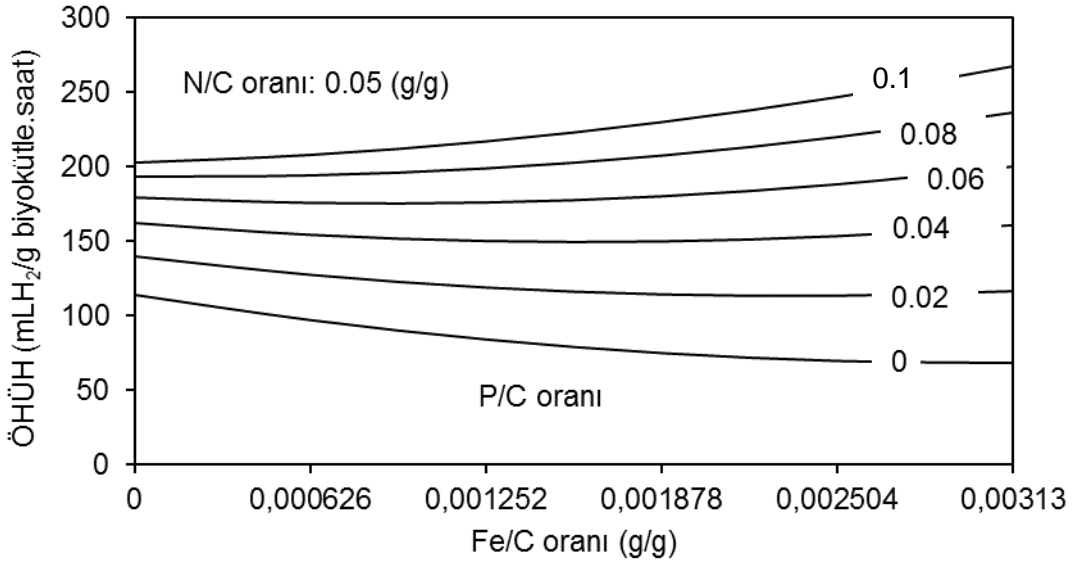
**Şekil 4.13:** Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.

Özgül hidrojen üretim hızının farklı N/C oranlarında P/C oranına göre gösterdiği değişim Şekil 4.14'te gösterilmiştir. N/C oranın sabit tutulup, P/C oranın artırılması ÖHÜH üzerinde 0, 0.01 ve 0.02 (g/g) N/C oranları için çok etkili olmasada 0.03, 0.04 ve 0.05 (g/g) N/C oranlarında etkili olmuştur. C/N oranının 0'dan 0.04'e artırılması ÖHÜH değerinin olumlu yönde artmasına sebep olmuştur. Fakat daha yüksek N/C oranlara çıkarılması ÖHÜH'ün düşmesi ile sonuçlanmıştır. Bu koşullarda en yüksek ÖHÜH değeri olan 220.17 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat'in 0.1 (g/g) N/C ve 0.04 (g/g) P/C oranında bulunabileceği belirlenmiştir.



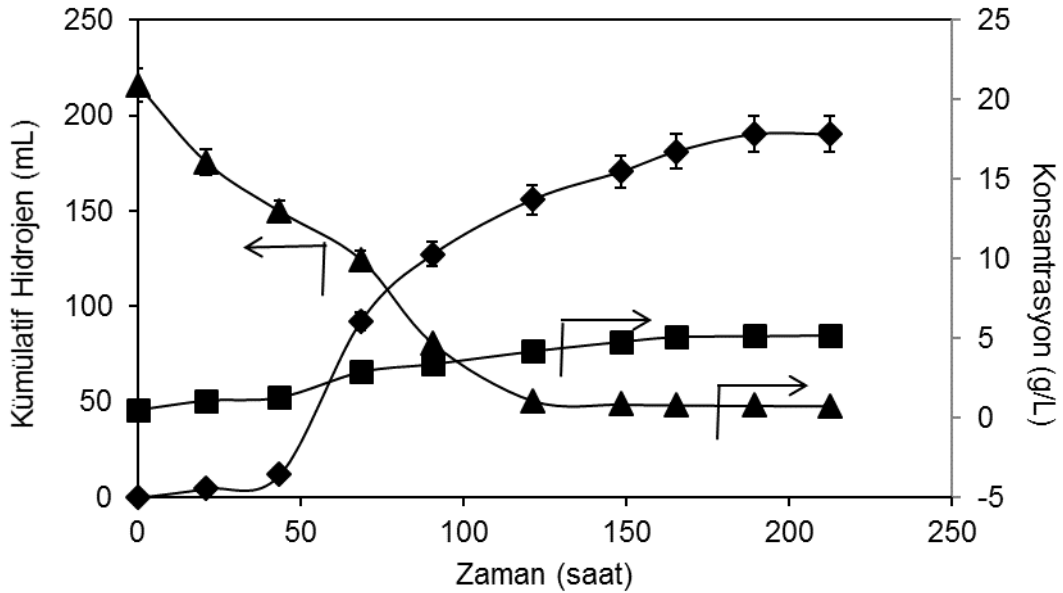
**Şekil 4.14:** Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.

Özgül hidrojen üretim hızının farklı P/C oranlarında Fe/C oranına göre değişimi Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Düşük P/C oranlarında (0-0,04) Fe/C oranının artırılması ÖHÜH'nin azalmasına, 0,04 (g/g) P/C oranından daha yüksek Fe/C oranları ÖHÜH'ün artmasına neden olmuştur. Maksimum ÖHÜH (220,17 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat) 0,00313 (g/g) Fe/C oranında P/C oranının 0,1 (g/g) olduğu koşulda elde edilmiştir.



**Şekil 4.15:** Özgül hidrojen üretim hızının (ÖHÜH) farklı P/C oranlarında Fe/C oranına göre değişimi.

Design-Expert yazılımı kullanılarak yapılan deneylerde ve hesaplamalarda en yüksek hidrojen verimi ve ÖHÜH değerini veren koşulların N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.00278 oranlarında elde edildiği belirlenmiştir. Bu optimum oranlarda deneysel olarak işletilen karanlık fermentasyon deneyine ait sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Şekil 4.16'ya göre TUYA (g/L), glikoz (g/L) ve kümülatif Hidrojen (mL) üretiminin kesikli işletim ile uyumlu olduğu görülmektedir. Burada glikoz tüketilirken, ürün olarak da hidrojen ve TUYA'nın oluştuğu görülmektedir. Hidrojen gazı yaklaşık 30 saat adaptasyon süresinden sonra oluşmaya başlamıştır. Deney sonucunda ulaşılan en yüksek kümülatif hidrojen hacmi 190 mL olmuştur. Deney başlangıcında 20 g/L olan substrat konsantrasyonu deney sonucunda 1 g/L'nin altına düşmüştür. TUYA üretimi ise deney sonunda 5 g/L seviyelerine ulaşmıştır. Deney boyunca üretilen veya tüketilen tüm parametreler 190 saat sonra sabit değere ulaşmıştır.. Yapılan bu deneye ait Gompertz sabitleri sırasıya P: 222.79 mL H<sub>2</sub>, Rm: 2.86 mL H<sub>2</sub>/saat ve λ: 29.72 saat olarak hesaplanmıştır. Bu değerler deney koşullarında elde edilen Şekil 4.16 ile uyumlu çıkmıştır.



**Şekil 4.16:** N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.003 optimum oranlarda işletilen karanlık fermentasyon deneyine ait TUYA (g/L) (■), glikoz (g/L) (▲) ve kümülatif hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.

Şekil 4.16'nın ait olduğu deneyde hidrojen üretim verimi ve ÖHÜH değerleri sırasıyla 0.525 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz ve 234.14 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat elde olarak edilmiştir. Design-Expert programı hidrojen üretim verimini ve ÖHÜH değerini sırasıyla 0.656 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz ve 241.64 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat olarak tahmin etmiştir. Sonuç olarak tahmin edilen değerler ile bulunan gerçek değerlerin birbirine yakın çıkması modelin güvenilirliğini teyit etmiştir. Ayrıca yapılan deneylerde H<sub>2</sub> yüzdesi 30 ile 44 arasında değişmiştir.

Yukarıda verilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek hidrojen üretim verimi ve ÖHÜH değerlerine ulaşmak için gerekli olan nutrient oranlarının N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C:0.003 olduğu bulunmuştur. Başka bir ifadeyle optimum C/N/P/Fe oranının 100/5/9/0.3 olduğu belirlenmiştir.

Literatürde karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde önerilen optimum C/N/P oranı, kullanılan substrat ve mikrobiyal aşı ile substrat içerisindeki azot, fosfor miktarlarına göre farklılık göstermektedir. Karışık mandıra atıksuyundan karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi üzerinde yapılan çalışmada KOİ/N ile KOİ/P sırasıyla 100.5 ile 120 olarak bulunmuştur (Gadhe ve diğ. 2013). Alkol kaynaklı atıksulardan hidrojen üretiminde ise KOİ/N/P oranı sırasıyla 100/6/0.5 olarak rapor edilmiştir (Intanoo ve diğ. 2012). Bu tez çalışmasında da elde edilen en uygun C/N/P/Fe oranları kullanılan hidrolizat ve aşuya göre özel olup tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Atık kağıt havludan karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde en uygun başlangıç biyokütle konsantrasyonunun 0.875 g/L olduğu bulunmuştur. Ancak 0.1 g/L ile 0.875 g/L değerleri için hidrojen üretim verimlerinin (0.875 g/L'nin HÜV değeri 0.927 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz, 0.1 g/L'nin HÜV değeri 0.905 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz) yakın çıkması, 0.1 g/L'nin hem küçük hem de büyük ölçek çalışmalarda kullanılabilirliğinin daha pratik olduğunu göstermiştir. Teorik hesaplamalardaki glikozdan elde edilen 4 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz verim değerine ulaşamamıştır. Bunun nedenleri; hidrolizat içerisinde nötralizasyon işlemi sonucunda oluşan aşırı tuz konsantrasyonu ve aşı çamurunun içerisinde hidrojen tüketimine neden olan homo-asetojen mikroorganizma türlerinin varlığı, iz element ve vitamin eksikliği nedeniyle enzimatik faaliyetlerin yeterli verime ulaşamamış olması şeklinde yorumlanabilir. Hidrolizat içerisinde bulunan 5-HMF konsantrasyonunun deney başlangıcında 0 mg/L' ye indirildiği için bu maddenin toksik etki yapma ihtimali bulunmamaktadır. Ancak iletkenlik değerlerinin 70 mS/cm seviyesinde olması ortamda halen mikrobiyal inhibisyona sebep olabilecek iyon varlığına işaret etmektedir. Bu çalışmada 0.875 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu ile 7 g/L olan başlangıç şeker konsantrasyonu arasında 0.125 biyokütle/substrat oranı bulunmaktadır. Bu da literatür ile uyumlu çıkmıştır.

Atık kağıt havludan karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde en uygun başlangıç substrat (şeker) konsantrasyonunun ise 21 g/L olduğu belirlenmiştir. Tezin bu aşamasında elde edilen en yüksek hidrojen üretim verimi ve özgül hidrojen verimi sırasıyla 0.498 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz ve 226.67 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat olarak tespit edilmiştir. 21 g/L substrat konsantrasyonunun altındaki değerler substrat limitlemesine üzerideki değerler ise substrat inhibisyonuna neden olmuştur. Burada da teorik verime ulaşamamasının sebebi biyokütle konsantrasyonu deneyinde belirtilen asit hidrolizi sonucunda substratta oluşan inhibitör maddelere veya aşı çamuru içerisinde bulunan hidrojen tüketimine neden olan bakterilere bağlanabilir.

Atık kağıt havludan karanlık fermentasyon yöntemi ile hidrojen üretiminde önemli parametrelerden olan optimum C/N/P/Fe oranının hidrojen üretimi verimi ve özgül hidrojen üretimine etkileri incelenmiş ve en uygun oranın C/N/P/Fe: 100/5/9/0.3 olduğu belirlenmiştir. Bu durumda ulaşılan en yüksek hidrojen üretim

verim ve özgül hidrojen üretim hızları sırasıyla 0.525 mol H<sub>2</sub>/mol glikoz ve 243.14 mL H<sub>2</sub>/g biyokütle.saat olmuştur.

Karanlık fermentasyon prosesi ile daha verimli hidrojen üretmek için ilerleyen çalışmalarda aşı kültürü olarak yüksek iletkenlik ve tuz konsantrasyonuna dayanıklı mikroorganizmalar kullanılabilir. Asit hidrolizinden kaynaklanan toksik maddeler tam olarak belirlendikten sonra bunların giderimi yapılabilir. Böylece toksik maddelerden arınan şeker çözeltisi daha sağlıklı olarak karanlık fermentasyonda kullanılabilir. Deneyler kesikli işletme modeli yerine yarı sürekli besleme modu kullanılarak veya immobilize sistem ile yapılabilir. Bu iki prosesin, mikroorganizmaların toksik madde etkilerinden daha az zarar görmelerine olanak sağlayacağı ve daha verimli hidrojen üretiminin elde edilebileceğini düşünülmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

Aam, S., (ed.) "Hydrogen as the energy carrier of future" Chapter 2, 9: Summary in English NOU:2004:11 (2004).

Adıgüzel, A. O., "Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri", *SAÜ Fen Bil Der*, 17(3), 381-397, (2013).

Argun, H., Kargi F., Kapdan K.I., Öztekin, R., "Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate", *Int J Hydrogen Energ*, 33, 1813-1819, (2008a).

Argun, H., Kargi, F., "Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview", *Int J Hydrogen Energ*, 36, 7443-7459, (2011).

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., Öztekin, R., "Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations", *Int. J. Hydrogen Energ*, 33, 6109–6115, (2008b).

Argun, H., Onaran, G., "Glucose and 5-hydroxymethylfurfural production from cellulosic waste by sequential alkaline and acid hydrolysis" *Renew Energ*, 96, 442-449, (2016).

Aslan, Ö., "Hidrojen ekonomisine doğru", *İstanbul Ticaret Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 11(2), 283-298, (2007).

Balat, H., Kırtay, E., "Hydrogen from biomass-present scenario and future prospects", *Int J Hydrogen Energ*, 35, 7416-7426, (2010).

Basak, N., Das, D., "The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art", *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 31-42, (2007).

Benemann, J.R., "Feasibility analysis of photobiological hydrogen production" *Int J Hydrogen Energ*, 22,979-987,(1997).

Beşergil, B., "Yakıtlar Yağlar" , Ankara: Gazi Kitabevi, 197-226 (2009).

Breuer, G., Jaeger, L. de, Artus, V. P. G., Martens, D. E., Springer, J., Draaisma, R. B., Eggink, G., Wijffels, R. H., Lamers, P. P. "Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (II) evaluation of TAG yield and productivity in controlled photobioreactors", *Biotechnol Biofuels*, 12, 7-70, (2014).

Butcher, G., "Mysteries of the sun book" Washington NASA Official:USA, NASA's heliophysics division of the science mission directorate, 3, (2014)

Carver, S.M., Nelson, M.C., Yu, Z., Tuovinen, O.H., "Fermentative metabolism of an anaerobic, thermophilic consortium on plant polymers and commercial paper samples", *Biomass Bioenerg*, 75, 11-22, (2015).

Çetiner, C., "Enerji ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları-Biyokütle Enerjisi Ders Notları", *Harran Üniversitesi*, (2009).

Chairattananokorn, P., Tapananont, S., Detjaroen, S., Sangkhatim, J., Anurakpongsatorn, P., Sirirote, P., "Additional paper waste in pulping sludge for biohydrogen production by heat-shocked sludge" *Appl Biochem Biotechnol*, 166, 389-401, (2012).

Chen, C., Chen, H., Wu, J., Lin, C., "Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration", *Int J Hydrogen Energ*, 33, 1573-1578, (2007).

Chin, H. L., Chen, Z. S., Chou C. P., "Fedbatch Operation Using Clostridium acetobutylicum Suspension Culture as Biocatalyst for Enhancing Hydrogen Production", *Biotechnol. Prog*, 19, 383-386, (2003).

Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Hassan, M. A., "Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation", *Int J Hydrogen Energ*, 34, 3277-3287, (2009).

Chu, C. Y., Wu, S. Y., Tsai, C. Y., Chiu-Yue Lin, "Kinetics of cotton cellulose hydrolysis using concentrated acid and fermentative hydrogen production from hydrolysate", *Int J Hydrogen Energ*, 36, 8743-8750, (2011).

Das, D., Veziroğlu, T. N., "Advances in biological hydrogen production processes", *Int J Hydrogen Energ*, 33,6046-6057,(2008).

Das, D., Veziroğlu, T. N., "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature", *Int J Hydrogen Energ*, 26, 13-28, (2001).

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Anal Chem*, 28, 350-356, (1956).

Eker, S., Sarp, M., "Hydrogen production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations", *Int J Hydrogen Energ*, doi:10.1016/j.ijhydene.2016.04.020 ,(2016).

E.N. BS "Characterization of waste – determination of total organic carbon (TOC) in waste, sludges and sediments" BS En, 1-22 13137 (2009) (2001).

Eugene W. R., (eds), Rodger B. B., (eds), Andrew D. E., (eds), Lenore, S. C., (eds), "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", Amerika: Amerikan Water Work Association 22. Published, (2012).

Fang, H. H. P., Liu, H., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture", *Bioresource Technol*, 82, 87-93, (2002).

Ferrer, A., Requejo, A., Rodríguez, A., Jiménez, L., " Influence of temperature, time, liquid/solid ratio and sulfuric acid concentration on the hydrolysis of palm empty fruit bunches", *Bioresour Technol*, 129, 506–11, (2013).

Gadhe, A., Sonawane, S. S., Varma, M. N., "Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach", *Int J Hydrogen Energ*, 38, 6607-6617, (2013).

Genç, N., "Atıkların biyohidrojen üretim potansiyellerinin değerlendirilmesi", *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg*, 17(2), 63-77, (2011).

Genç, N., "Biyolojik hidrojen üretim prosesleri", *BAÜ FBE Dergisi*, 11(2),17-36,(2009).

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi F., Trably, E., Escudie, R., Lens P. N. L., Esposito G., "A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products", *Appl Energ*, 144, 73-95, (2015).

Gromke, J. D., Rensberg, N., "Almanya ve avrupa'da biyoenerji ve biyogaz kullanımına genel bakış", Türk-Alman Biyogaz Projesi, 2. Biogas-Training, Ankara ,(2011).

Gülşen, H. E., Kumbur, H., Koyuncu, G., "Hidrojen enerjisi üretim mekanizmaları ve çevresel önemi", 2. International Symposium on Innovative Technologies in Engineering and Science 18-20 Haziran Karabük- Türkiye ,1333-1343, (2014).

Han, W., Ye, M., Zhu, A. J., Huang, J. G., Zhao, H. T., Li, Y. F., "A combined bioprocess based on solid-state fermentation for dark fermentative hydrogen production from food waste", *J Clean Prod*, 112, 3744-3749, (2015).

Holladay, J.D., Hu, J., King, D.L., "An overview of hydrogen production technologies", *Catal Today*, 139,244-260, (2008).

[http://hfcarchive.org/fuelcells/base.cgim?template=hydrogen\\_basics](http://hfcarchive.org/fuelcells/base.cgim?template=hydrogen_basics) Hydrogen Basics, (2016).

ISO "ISO11261:1995 determination of total nitrogen-modified Kjeldahl method" *Int Organ Stand*, 1–4, 90 (93) (1995).

Kapdan, I., Kargi, F., "Biohydrogen production from waste materials", *Enzyme Microb Tech*, 38, 569-582, (2006).

Kardaş, G., Solmaz, R., Yazıcı, B., Erbil, M., "Elektroliz Yöntemi ile Hidrojen Gazı eldesi", 3. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu,19-21 Ekim Mersin, (2005).

Lakshmidivi, R., Muthukumar, K., " Enzymatic saccharification and fermentation of paper and pulp industry effluent for biohydrogen production", *Int J Hydrogen Energ*, 35, 3389-3400, (2010).

Lee, J. M., Venditti, R. A., Jameel, H., Kenealy, W. R.," Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*", *Biomass Bioenerg*,35, 626-636, (2011).

Lee, K., Hsu, Y., Lo, Y., Lin, P., Lin, C., Chang, J. "Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora", *Int. J. Hydrogen Energ*, 33, 1565–1572, (2008).

Lee, Y. J., Miyahara, T., Noike, T., "Effect of pH on microbial hydrogen fermentation", *J Chem Technol Biot*, 77, 694-698, (2002).

Levin, D. B., Pitt, L., Love, M., "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application", *Int J Hydrogen Energy*, 29, 173-185, (2004).

Levin, D. B., Chahine, R., "Challenges for renewable hydrogen production from biomass", *Int. J. Hydrogen Energy*, 35,4962-4969, (2010).

Li, J., Zheng, G., He, J., Chang, S., Qin, Z., Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor, *Biotechnol Adv*, 27, 573-577, (2009).

Li, Y. C., Nissilä, M. E., Wu, S. Y., Lin, C.Y., Puhakka, J.A., "Silage as source of bacteria and electrons for dark fermentative hydrogen production", *Int J Hydrogen Energy*, 37, 15518-15524, (2012).

Li, Y. C., Wu, S. Y., Chu, C. Y., Huang, H. C., "Hydrogen production from mushroom farm waste with a two-step acid hydrolysis process", *Int J Hydrogen Energy*, 36, 14245-14251, (2011).

Lin, C. Y., Wu, C. C., Hung, C. H., "Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures", *Int J Hydrogen Energy*, 33, 43-50, (2008).

Lin, C., Chang, C., Hung, C., "Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures", *Int J Hydrogen Energy*, 33, 2445-2453, (2008).

Lin, C.Y., Chang, R.C., "Fermentative hydrogen production at ambient temperature", *Int J Hydrogen Energy*, 29, 715-720, (2004).

Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., Van Ginkel, S. "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers", *Environ Sci Technol*, 36, 2530–2535, (2002).

Magnusson, L., Islam, R., Sparling, R., Levin D., Cicek N., "Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process", *Int J Hydrogen Energy*, 33, 5398-5403, (2008).

Mallada, R., Méndez, M., *Inorganic membranes synthesis, characterization and applications Membrane Science and Technology Series, 13*, Zaragoza, Spain: Elsevier publication, (2008).

Manish, S., Banerjee, R., "Comparison biohydrogen production processes", *Int J Hydrogen Energy*, 33, 279-286, (2008).

Méndez-Vilas, A., (Eds), *Industrial, medical and environmental application of microorganism current status and trends*, Madrid, Spain: Wageningen Academic Publishers, 399, (2013).

Morales, J. E. R., Venegas, E. T., Alarcón, J. T., Filippi, G. R., "Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation", *Water Sci Technol*, 1271-1285, 71(9), (2015)

Moreau, A., Montplaisir, D., Sparling, R., Barnabé, S., "Hydrogen, ethanol and cellulase production from pulp and paper primary sludge by fermentation with *Clostridium thermocellum*", *Biomass Bioenergy*, 72, 256-262, (2014).

- Mu, Y., Zheng, X., Yu, H., Zhu, R., "Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures", *Int J Hydrogen Energy*, 31, 780-785, (2006).
- Nath, K., Das, D., "Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches", *Appl Microbiol Biot*, 65, 520-529,(2004).
- Nissilä, M. E., Li, Y. C., Wu, S.Y., Puhakka, J. A., "Dark Fermentative Hydrogen Production from Neutralized Acid Hydrolysates of Conifer Pulp", *Appl Biochem Biotechnol*, 168, 2160–2169, (2012).
- Onaran, G., Argun, H., "Atık maddelerden biyohidrojen üretimi", *Pamukkale Teknokent Bülteni*, 1(1), 32-33, (2014).
- Orta Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği(OAİB), "*Temizlik kağıdı sektör raporu*", Ankara, (2014).
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasungkha N., Dhamwichukorn, S., Birkeland, N. K., " Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge" , *Int J Hydrogen Energy*, 33, 1221-1231, (2008).
- Öztürk, N., Bilgiç, M., Arslan, C., "Hidrojen enerjisi ve Türkiye' deki hidrojen potansiyeli", 3. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu,19-21 Ekim Mersin, (2005).
- Pendyala, B., Chaganti, S. R., Lalman J. A., Heath, D. D., Shanmugam S. R., Veeravalli, S.S., "Using a food and paper-cardboard waste blend as a novel feedstock for hydrogen production: Influence of key process parameters on microbial diversity", *Int J Hydrogen Energy*, 38, 6357-6367, (2013).
- Penner, S. S., "Steps toward the hydrogen economy", *Energ*, 31, 33-43, (2006)
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., Liu, S., "Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system", *Int J Hydrogen Energy*, 31, 2147-2157, (2006).
- Salam, M. A., Pondith, P. C., Islam, A., Khan M. R., Uddin, M. R.,Islam, M. A., "Conversion of Cellulosic waste into fermentable sugar: Process optimization", *J Chem Eng*,1(28), 27-31, (2013).
- Saripan, A. F., Reungsang, A., "Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung", *Int J Hydrogen Energy*, 39, 9028-9035,(2014).
- Şentürk, İ., Büyükgüngör, H., "Anaerobik fermantasyonla biyohidrojen üretim verimine etki eden faktörler", *SAÜ Fen Bil Der*, 19(2), 171-186, (2015).
- Taherdanak, M., Zilouei, H., Karimi, K., "The effects of Fe<sub>0</sub> and Ni<sup>0</sup> nanoparticles versus Fe<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> ions on dark hydrogen fermentation", *Int J Hydrogen Energy*, 41, 167-173, (2016).
- Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., Zhou, Z., "High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose", *Int J Hydrogen Energy*, 38, 569-582, (2006).

Veziroğlu, T.N., "21<sup>st</sup> century's energy:hydrogen energy system, *I.Ege Enerji Sempozyumu ve Sergisi*, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Denizli Mayıs, (2003).

Wang, C. H., Lin, P. J., Chang, J. S., "Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge", *Process Biochem*, 41, 1353-1358, (2006).

Wang, J., Wan, W., "Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge", *Int J Hydrogen Energ*, 33, 2934-2941,(2008b).

Wang, J., Wan, W., "Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures", *Int J Hydrogen Energ*, 33, 5392-5397,(2008a).

Wang, J., Wan, W., "Factors influencing fermentative hydrogen production: A review", *Int J Hydrogen Energ*, 34,799-811, (2009).

Wu, S. Y., Hung, C. H., Lin, C. Y., Lin , P. J., Lee, K. S., Lin, , Chang F. Y., Chang, J. S., "HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate", *Int J Hydrogen Energ*, 33, 1542-1549, (2007).

Yang, H., Shi, B., Ma, H., Guo, L., "Enhanced biohydrogen production from cornstalk by dark-end-photo fermentation with diluted alkali-cellulase two-step hydrolysis", *Int J Hydrogen Energ*, 40, 12193-12200, (2015).

Yin, S., Tan, Z., "Hydrothermal liquefaction of cellulose to bio-oil under acidic, neutral and alkaline conditions", *Appl Energ*, 92, 234–239, (2012).

Zahedi, S., Sales, D., Romero, L. I., Solera, R., "Dark fermentation from real solid waste. Evolution of microbial community", *Bioresource Technol*, 151, 221-226, (2014).

Zhang, H., Bruns, M. A., Logan, B. E., "Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor", *Water Res*, 40, 728-734, (2006).

Zhang, J., Li, J., Tang, Y., Xue, G., "Rapid method for the determination of 5-hydroxymethylfurfural and levulinic acid using a double-wavelength UV spectroscopy", *Scientific World Journal*, 2013, 1-5, (2013).

Zhang, M. L., Fan, Y. T., Xing, Y., Pan, C. M., Zhang, G. S., Lay, J. J., "Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures", *Biomass Bioenerg*, 31, 250-254, (2007).

Zhang, Z. P., Show, K.Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D.J., Jiang, W. J., "Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation", *Biotechnol Bioenerg*, 96, 1040-1050, (2006).





# **EKLER**

## 7. EKLER

### EK A: Başlangıç biyokütle konsantrasyonun hidrojen üretimine olan etkisi

Tablo A. 1: Kontrol şişesi verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.0	348	7149.5
1	15.20	45	265	0	0	10	0	0			
2	36.50	45	265	0.1	0.1	10	0.275	0.0716			
3	63.10	45	265	0.4	0.4	40	1.23	0.04854			
4	85.45	45	265	0.7	0.7	0	2.025	0.07991			
5	110.2	45	265	0.7	0.7	0	2.025	0.07991	6.09	315	6173.15

Tablo A. 2: 0.1 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	328	7393.1
1	15.3	45	265	0.02	0.02	10	0.05	0.0021	5.8		
2	37	45	265	3	3	10	8.25	0.32	5.9		
3	63.54	45	265	10	10	40	30.80	1.21	5.1		
4	86.3	45	265	12.18	12.18	0	36.57	1.44	5.9		
5	111.06	45	265	12.85	12.85	0	38.35	1.51	5.9	2044	367.02

Tablo A. 3: 0.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	324	7474.3
1	15.35	45	265	0.1	0.1	10	0.27	0.01	6.1		
2	36.55	45	265	4	4	10	11.01	0.43	6.05		
3	63.2	45	265	11.3	11.3	60	37.13	1.46	5.5		
4	85.16	45	265	13.02	13.02	0	41.69	1.64	5.8		
5	109.52	45	265	13.02	13.02	0	41.69	1.64	5.8	2092	229.99

Tablo A. 4: 0.875 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	328	7271.3
1	15.4	45	265	0.2	0.2	40	0.61	0.02	6.1		
2	37	45	265	5.42	5.42	40	16.61	0.66	5.6		
3	63.19	45	265	12.0	12.0	40	38.84	1.53	5.4		
4	86.2	45	265	12.93	12.93	0	41.31	1.63	5.9		
5	110.53	45	265	12.93	12.93	0	41.31	1.63	5.9	2508	238.11

70

Tablo A. 5: 1 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	304	7543.9
1	15.47	45	265	0.2	0.2	40	0.61	0.02	6.1		
2	37.1	45	265	3.8	3.8	50	12.23	0.48	5.9		
3	63.28	45	265	11.48	11.48	20	34.72	1.37	5.6		
4	86.1	45	265	12.15	12.15	10	37.71	1.48	6.1		
5	110.4	45	265	12.15	12.15	0	37.71	1.48	6.1	2300	243.5

Tablo A. 6: 1.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	292	7589.8
1	15.55	45	265	0.1	0.1	50	0.31	0.01	6.1		
2	37.15	45	265	0.8	0.8	60	2.65	0.10	5.9		
3	63.33	45	265	11.58	11.58	10	32.37	1.30	5.3		
4	86.18	45	265	12.12	12.12	0	33.80	1.36	5.7		
5	110.5	45	265	12.13	12.13	0	33.83	1.36	5.8	2116	249.88

71

Tablo A. 7: 3 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	260	7799.1
1	16	45	265	0.2	0.2	50	0.63	0.024	6.1		
2	37.2	45	265	0.9	0.9	50	2.93	0.11	5.9		
3	63.39	45	265	9.87	9.87	0	26.70	1.05	5.8		
4	86.25	45	265	11.07	11.07	0	29.88	1.17	5.7		
5	111	45	265	11.07	11.07	0	29.88	1.17	5.8	2064	271.2

Tablo A.8: 6 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.15	348	8073.15
1	14.22	45	265	2.29	2.29	50	7.21	0.28	6		
2	38.47	45	265	3.6	3.6	0	10.68	0.42	5.9		
3	62	45	265	4.33	4.33	0	12.61	0.49	6		
4	86.35	45	265	5.42	5.42	0	15.50	0.61	6		
5	110.5	45	265	5.6	5.6	0	15.98	0.63	6	2796	259.43

## EK B: Başlangıç substrat (şeker) konsantrasyonun hidrojen üretimine olan etkisi

Tablo B.1: 6 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.0	560	6606.35
1	20.3	45	265	1.62	1.62	30	4.779	0.18	5.7		
2	44.3	45	265	3.7	3.7	20	11.03	0.43	5.9		
3	68.3	45	265	3.7	3.7	10	11.40	0.44	6.0		
4	91.45	45	265	3.7	3.7	0	11.40	0.44	6.0		
5	116.35	45	265	3.7	3.7	0	11.40	0.44	6.0		
6	139.55	45	265	3.7	3.7	0	11.40	0.44	6.0		
7	187.05	45	265	3.7	3.7	0	11.40	0.44	6.0		
8	235.3	45	265	3.7	3.7	0	11.40	0.44	6.0		
9	258.8	45	265	3.7	3.7	0	11.40	0.44	6.0	2460	90.43

Tablo B.2: 15 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.1	920	14819.2
1	20.45	45	265	1.02	1.02	20	2.90	0.11	6.5		
2	44	45	265	1.65	1.65	20	4.90	0.19	6.3		
3	68.05	45	265	6.38	6.38	15	18.39	0.72	5.9		
4	91.17	45	265	8.55	8.55	30	26.71	1.05	5.8		
5	115.25	45	265	11.6	11.6	10	35.95	1.41	5.8		
6	140.02	45	265	11.6	11.6	0	35.95	1.41	5.8		
7	187.5	45	265	11.6	11.6	0	35.95	1.41	5.8		
8	236.15	45	265	11.6	11.6	0	35.95	1.41	5.8		
9	259.3	45	265	11.6	11.6	0	35.95	1.41	5.8	2725	909.4

Tablo B.4: 21 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.1	2945	21330.2
1	20.5	45	265	2.41	2.41	20	6.86	0.27	5.4		
2	44.05	45	265	8.45	8.45	15	24.14	0.95	5.3		
3	68.1	45	265	17.4	17.4	40	54.81	2.16	5.4		
4	91.55	45	265	17.4	17.4	60	65.25	2.57	5.1		
5	116	45	265	17.4	17.4	0	65.25	2.57	5.7		
6	140.4	45	265	17.4	17.4	0	65.25	2.57	5.9		
7	188.25	45	265	17.4	17.4	0	65.25	2.57	5.8		
8	236.1	45	265	17.4	17.4	0	65.25	2.57	5.7		
9	260.05	45	265	17.4	17.4	0	65.25	2.57	5.8	4755	670.875

Tablo B.5: 30 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.0	1895	30256.3
1	20.55	45	265	0	0	20	0	0	5.9		
2	44.1	45	265	0.06	0.06	0	0.17	0.0067	5.9		
3	68.15	45	265	0.7	0.7	0	1.86	0.073	5.9		
4	92	45	265	2.27	2.27	0	6.02	0.237	5.9		
5	115.55	45	265	2.29	2.29	0	6.08	0.239	5.9		
6	139.55	45	265	3.18	3.18	0	8.43	0.333	5.9		
7	187.04	45	265	3.29	3.29	0	8.73	0.344	5.9		
8	234.25	45	265	5.91	5.91	20	16.85	0.665	5.9		
9	258.2	45	265	5.91	5.91	0	16.85	0.665	5.9	3775	3411.38

Tablo B.6: 41 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlu deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SİMİ</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)
0	0	45	265	0	0	0	0	0	6.0	2885	41220.6
1	21	45	265	0	0	20	0	0	6.0		
2	44.04	45	265	0	0	0	0	0	6.0		
3	68.08	45	265	0.3	0.3	0	0.79	0.031	6.0		
4	91.28	45	265	0.5	0.5	0	1.32	0.052	6.0		
5	115.28	45	265	0.7	0.7	0	1.85	0.073	6.0		
6	140.08	45	265	1.08	1.08	0	2.86	0.112	6.0		
7	163.18	45	265	2.46	2.46	0	6.51	0.257	6.0		
8	187.38	45	265	3.36	3.36	10	9.28	0.366	6.0		
9	211.38	45	265	3.76	3.76	0	10.34	0.408	6.0	4310	5468.24

Tablo B.7: 21 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlu doğrulama deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	TUYA (mg/L)	Glikoz (mg/L)	Biyokütle Derişimi (g/L)
0	0	300	310	0	0	0	0	0	6.9	440	21345.6	0.15
1	20.3	290	320	0.5	0.5	40	1.8	0.071	6.1	678	18467.8	0.17
2	44.3	280	330	3.35	3.35	30	12.26	0.48	5.3	986	15465.4	0.22
3	67.55	270	340	24.16	24.16	140	117.17	4.62	4.8	1166	10368.4	0.8
4	94.05	260	350	24.16	24.16	35	125.11	4.93	4.95	1890	5453.2	1.16
5	118.4	250	360	34.17	34.17	280	264.35	10.43	4.76	2280	3246.3	1.6
6	145	240	370	36.12	36.12	80	303.88	11.99	5.2	2760	2987.5	1.85
7	168.55	230	380	36.12	36.12	20	310.60	12.25	5.43	3270	2204.6	1.92
8	189.1	220	390	36.12	36.12	5	312.07	12.31	5.3	4648	1436.7	2.12
9	212	210	400	36.12	36.12	25	320.01	12.62	5.5	5780	900.4	2.2
10	236.1	200	410	36.12	36.12	0	320.01	12.62	6.1	5800	490.85	2.21

## EK C: C/N/P/Fe oranının hidrojen üretimine olan etkisi

Tablo C. 1: 1'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.9	70	20.9
1	16.00	139	171	0	0	20	0	0	6.89		
2	42.05	138	172	0.04	0.04	0	0.06	0.002	6.6		
3	60.00	137	173	1	1	0	1.73	0.068	6.4		
4	84.48	136	174	5.8	5.8	15	10.96	0.43	5.43	-150	
5	113.53	134	176	26.03	26.03	175	92.23	3.64	5.1		
6	136.17	132	178	34.52	34.52	160	163.1	6.43	5.1		
7	159.24	131.5	178.5	37.09	37.09	70	193.83	7.65	5.97		
8	182.22	131	179	37.09	37.09	0	194.02	7.65	6.3		
9	207.00	130.5	179.5	37.09	37.09	0	194.20	7.66	6.3		
10	231.00	130	180	37.09	37.09	0	194.39	7.67	6.3		
11	356.10	130	180	37.09	37.09	0	194.39	7.67	6.3	-362	0.872

Tablo C. 2: 2'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.9	67	20.1
1	20.55	139	171	0.06	0.06	20	0.11	0.004	6.45		
2	37.00	138	172	3.06	3.06	5	5.42	0.21	5.9		
3	60.47	136	174	12.88	12.88	20	25.15	0.99	5.38		
4	85.02	134	176	22.82	22.82	70	58.87	2.32	5.3	-97	
5	114.34	133	177	33.62	33.62	240	158.91	6.27	5.1		
6	136.39	132	178	38.49	38.49	60	191.00	7.53	5.2		
7	160.01	130	180	41.17	41.17	55	219.24	8.65	5.5		
8	183.08	129	181	42.80	42.80	40	239.72	9.46	5.4	-265	
9	207.40	128.5	181.5	42.80	42.80	0	239.94	9.46	6.3		
10	233.22	128	182	42.80	42.80	0	240.15	9.47	6.27		
11	355.30	128	182	42.80	42.80	0	240.15	9.47	6.27	-440	0.725

Tablo C.3: 3'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.5	76	20.7
1	20.30	139	171	0	0	20	0	0	6.3		
2	39.10	138	172	2.4	2.4	5	4.24	0.16	5.7		
3	62.57	137	173	8.9	8.9	20	17.27	0.68	5.6		
4	87.15	135	175	29.09	29.09	170	102.26	4.03	4.9	-196	
5	116.58	133	177	35.94	35.94	260	208.41	8.22	4.95		
6	139.05	132	178	35.94	35.94	20	215.71	8.51	5.4		
7	162.36	131	179	35.94	35.94	0	216.07	8.52	6.1		
8	185.32	130	180	35.94	35.94	0	216.42	8.54	6.05		
9	209.59	129.5	180.5	35.94	35.94	0	216.60	8.54	6.05		
10	236.11	129	181	35.94	35.94	0	216.78	8.55	6.05		
11	357.05	129	181	35.94	35.94	0	216.78	8.55	6.05	-453	0.622

Tablo C. 4: 4'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0		0	0	6.8	66	20.9
1	18.45	139	171	0	0	0	0	0	6.7		
2	37.25	138	172	0.9	0.9	20	1.54	0.06	5.9		
3	61.13	137	173	3.45	3.45	0	6.14	0.24	6.2		
4	85.26	135	175	5.28	5.28	5	9.41	0.37	6.12	-149	
5	115.04	134	176	13.24	13.24	0	25.46	1.00	5.8		
6	137.05	133	177	31.53	31.53	15	83.19	3.28	5.3		
7	160.27	132	178	35.02	35.02	80	100.22	3.95	5.4		
8	183.33	131	179	39.51	39.51	30	116.51	4.59	5.6		
9	208.10	130	180	39.51	39.51	20	126.26	4.98	5.4		
10	233.58	129	181	42.11	42.11	25	143.99	5.68	5.5		
11	254.21	128	182	42.17	42.17	30	148.74	5.87	6.2		
12	279.43	127	183	42.17	42.17	10	155.25	6.12	6.2		
13	305.25	126.5	183.5	42.17	42.17	15	155.46	6.13	6.2		
14	327.00	126	184	42.17	42.17	0	155.67	6.14	6.2		
15	355.49	126	184	42.17	42.17	0	155.67	6.14	6.2	-460	4.83

Tablo C. 5: 5'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.98	65	20.9
1	21.10	139	171	0	0	0	0	0	6.9		
2	39.00	138	172	0.1	0.1	20	0.17	0.006	6.4		
3	62.52	137	173	5.5	5.5	0	9.95	0.39	5.74		
4	87.09	135	175	13.79	13.79	8	26.36	1.04	5.5	-115	
5	116.50	134	176	35.04	35.04	13	158.51	6.25	5.1		
6	138.58	133	177	37.47	37.47	270	208.12	8.21	5.48		
7	162.58	132	178	38.14	38.14	120	209.69	8.27	5.7		
8	185.19	131	179	38.14	38.14	0	210.07	8.29	6.3		
9	209.52	130.5	179.5	38.14	38.14	0	210.26	8.29	6.3		
10	236.03	130	180	38.14	38.14	0	210.45	8.30	6.3		
11	357.00	130	180	38.14	38.14	0	210.45	8.30	6.3	-487	0.819

Tablo C. 1: 6'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.9	70	20.8
1	20.05	139	171	0	0	18	0	0	6.8		
2	37.40	138	172	0.1	0.1	0	0.17	0.006	6.7		
3	61.30	136	174	7.48	7.48	20	14.51	0.57	5.51		
4	85.36	134	176	27.89	27.89	170	97.99	3.86	4.7	-119	
5	115.17	133	177	38.74	38.74	210	198.83	7.84	5.1		
6	137.18	132	178	38.74	38.74	20	206.78	8.16	5.8		
7	160.39	131.5	178.5	38.74	38.74	0	206.97	8.16	6.1		
8	183.45	131	179	38.74	38.74	0	207.17	8.17	6.1		
9	208.22	130.5	179.5	38.74	38.74	0	207.36	8.18	6.1		
10	232.00	130	180	38.74	38.74	0	207.55	8.19	6.1		
11	356.00	130	180	38.74	38.74	0	207.55	8.19	6.3	-420	0.705

Tablo C. 2: 7'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.8	49	20.7
1	19.40	139	171	0	0	22	0	0	6.8		
2	38.55	138	172	0.03	0.03	0	0.05	0.002	6.65		
3	62.44	137	173	4.95	4.95	5	8.81	0.34	6.5		
4	87.00	136	174	8.04	8.04	5	14.63	0.57	6.1	-112	
5	116.44	134	176	28.79	28.79	190	106.02	4.18	5.1		
6	138.48	132	178	36.57	36.57	140	171.64	6.77	5.2		
7	162.21	131	179	37.76	37.76	90	208.12	8.21	5.3		
8	185.10	130	180	44.1	44.1	50	241.96	9.54	5.5		
9	209.47	129.5	180.5	44.1	44.1	0	242.18	9.55	6.3		
10	235.51	129	181	44.1	44.1	0	242.40	9.56	6.3		
11	356.55	129	181	44.1	44.1	0	242.40	9.56	6.3	-460	0.889

Tablo C. 3: 8'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.7	63	20.3
1	20.35	139	171	0.03	0.03	10	0.05	0.002	6.4		
2	39.25	138	172	0.4	0.4	8	0.72	0.028	6.3		
3	63.15	137	173	6.58	6.58	18	12.60	0.49	5.9		
4	87.25	135	175	26.03	26.03	127	79.83	3.15	4.9	-134	
5	117.08	134	176	34.61	34.61	140	143.64	5.66	5.1		
6	139.16	133	177	34.61	34.61	20	150.52	5.94	6.3		
7	162.45	132	178	34.61	34.61	0	150.86	5.95	6.24		
8	185.46	131	179	34.61	34.61	0	151.21	5.96	6.27		
9	210.15	130.5	179.5	34.61	34.61	10	153.47	6.05	6.27		
10	236.20	130	180	34.61	34.61	0	153.64	6.06	6.27		
11	357.15	130	180	34.61	34.61	0	153.64	6.06	6.27	-367	0.467

Tablo C. 4: 9'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif VH <sub>2</sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.9	78	20.6
1	20.50	139	171	0	0	20	0	0	6.1		
2	38.25	138	172	0.04	0.04	0	0.06	0.002	5.8		
3	62.14	137	173	10.91	10.91	13	20.29	0.80	5.3		
4	86.12	135	175	18.49	18.49	15	36.54	1.44	5.6	-120	
5	116.02	134	176	24.18	24.18	15	50.37	1.98	5.6		
6	138.13	132	178	26.89	26.89	15	59.71	2.35	5.1		
7	161.17	131.5	178.5	28.15	28.15	0	62.10	2.45	5.6		
8	185.31	131	179	28.15	28.15	10	64.78	2.55	6.1		
9	208.50	130.5	179.5	28.15	28.15	10	67.60	2.66	6.1		
10	235.03	130	180	28.15	28.15	10	70.51	2.78	6.1		
11	254.41	129	181	29.02	29.02	10	75.27	2.97	6.14		
12	280.09	128	182	29.22	29.22	0	75.92	2.99	6.09		
13	305.42	127	183	31.18	31.18	5	81.36	3.21	5.9		
14	327.21	126	184	31.18	31.18	0	81.67	3.22	5.9		
15	356.30	126	184	31.18	31.18	0	81.67	3.22	5.9	-481	7.84

Tablo C. 5: 10'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.7	86	20.3
1	20.30	139	171	0	0	20	0	0	6.5		
2	39.15	138	172	0.2	0.2	0	0.34	0.013	6.4		
3	63.05	137	173	6.8	6.8	10	12.44	0.49	6.1		
4	87.20	135	175	32.32	32.32	195	120.26	4.74	4.7	-156	
5	117.03	133	177	38.5	38.5	230	220.39	8.69	5.3		
6	139.10	132	178	39.1	39.1	10	225.76	8.91	5.9		
7	162.40	131	179	39.1	39.1	0	226.15	8.92	6.1		
8	185.41	130	180	39.1	39.1	0	226.54	8.94	6.15		
9	210.04	129.5	180.5	39.1	39.1	0	226.74	8.94	6.15		
10	236.15	129	181	39.1	39.1	0	226.93	8.95	6.15		
11	357.1	129	181	39.1	39.1	0	226.93	8.95	6.15	-451	0.678

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
-----	--------------	------------------------	---------------------	----------------------	------------------------	---------------------	---	----------------------------------	----	-----	--------------

Tablo C. 11: 11'nolu şişenin deney verileri.

0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.4	75	20.1
1	20.45	139	171	0.06	0.06	20	0.11	0.0045	6.65		
2	38.50	138	172	0.06	0.06	0	0.11	0.0045	6.15		
3	62.34	137	173	1.45	1.45	0	2.52	0.099	6.1		
4	86.52	136	174	2.23	2.23	0	3.89	0.15	5.9	-109	
5	116.35	135	175	3.45	3.45	0	6.04	0.23	5.9		
6	138.41	133	177	8.66	8.66	0	15.34	0.60	5.3		
7	162.15	132	178	8.66	8.66	0	15.42	0.60	5.7		
8	185.10	131	179	8.87	8.87	0	15.88	0.62	6.3		
9	209.12	129	181	11.44	11.44	10	21.86	0.86	5.6		
10	235.46	128	182	24.02	24.02	75	62.88	2.48	5.3		
11	254.59	127	183	29.61	29.61	80	97.04	3.83	5.4		
12	280.28	126	184	31.02	31.02	60	118.54	4.67	6.1		
13	306.00	125	185	31.02	31.02	15	122.98	4.85	6.1		
14	327.40	124	186	31.02	31.02	0	123.29	4.86	6.1		
15	356.50	124	186	31.02	31.02	0	123.29	4.86	6.1	-482	1.025

Tablo C. 12: 12'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.7	91	20.8
1	20.20	139	171	0	0	15	0.0003	1.2E-05	6.5		
2	39.30	138	172	1.89	1.89	5	3.27	0.12	5.7		
3	63.18	136	174	11.04	11.04	42	19.46	0.76	5.8		
4	87.30	135	175	19.72	19.72	50	35.07	1.38	5.3	-114	
5	117.15	133	177	28.93	28.93	40	52.08	2.05	5.1		
6	139.22	132	178	35.49	35.49	50	64.40	2.54	6.3		
7	162.50	131	179	35.49	35.49	10	65.12	2.57	6.24		
8	185.50	130	180	37.22	37.22	20	69.05	2.72	6.2		
9	210.15	129.5	180.5	37.22	37.22	40	69.69	2.75	6.2		
10	236.20	129	181	37.22	37.22	10	70.34	2.77	6.2		
11	357.1	129	181	37.22	37.22	0	70.80	2.79	6.2	-462	1.24

Tablo C. 13: 13'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif nH <sub>2</sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	6.8	69	20.8
1	18.55	139	171	0	0	21	0	0	6.4		
2	37.15	138	172	0.1	0.1	0	0.17	0.006	6.1		
3	61.01	136	174	15.26	15.26	40	32.65	1.28	5.3		
4	85.15	134	176	29.09	29.09	165	105.30	4.15	4.9	-89	
5	114.49	133	177	36.43	36.43	190	187.80	7.41	5.4		
6	136.53	132.5	177.5	37.63	37.63	20	197.63	7.80	6.2		
7	160.16	132	178	37.63	37.63	0	197.82	7.80	6.1		
8	183.22	131	179	37.63	37.63	0	198.20	7.82	6.14		
9	207.55	130.5	179.5	37.63	37.63	0	198.39	7.82	6.14		
10	233.40	130	180	37.63	37.63	0	198.58	7.83	6.14		
11	355.40	130	180	37.63	37.63	0	198.58	7.83	6.30	-440	0.432

Tablo C. 1: 14'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SİMİ</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	7.1	74	20.9
1	19.10	139	171	0	0	18	0	0	6.9		
2	38.35	138	172	0	0	0	0	0	6.83		
3	62.25	137	173	1.41	1.41	0	2.43	0.09	6.4		
4	86.41	135	175	4.99	4.99	0	8.73	0.34	6.1	-112	
5	116.16	134	176	24.75	24.75	80	63.36	2.50	5.3		
6	138.27	133	177	33.75	33.75	140	126.78	5.00	5.1		
7	161.55	131	179	35.27	35.27	60	151.34	5.97	5.4		
8	184.59	130.5	179.5	36.12	36.12	20	160.27	6.32	6.1		
9	209.01	130	180	36.12	36.12	20	167.22	6.59	5.7		
10	235.25	129	181	37.58	37.58	25	179.62	7.08	6.2		
11	254.53	128	182	37.58	37.58	30	190.81	7.53	6.2		
12	280.23	127	183	37.58	37.58	10	194.76	7.68	6.2		
13	305.54	126	184	37.58	37.58	0	195.13	7.70	6.2		
14	327.35	125	185	37.58	37.58	0	195.51	7.71	6.2		
15	356.40	125	185	37.58	37.58	0	195.51	7.71	6.2	-437	0.703

Tablo C. 2: 15'nolu şişenin deney verileri.

Gün	Zaman (saat)	V <sub>SIVI</sub> (mL)	V <sub>G</sub> (mL)	CH <sub>2</sub> (i%)	CH <sub>2</sub> (i-1%)	V <sub>w</sub> (mL)	Kümülatif V <sub>H<sub>2</sub></sub> (mL)	Kümülatif n <sub>H<sub>2</sub></sub> (mmol)	pH	ORP	Glikoz (g/L)
0	0.00	140	170	0	0	0	0	0	7.1	63	20.7
1	19.30	139	171	0.04	0.04	20	0.07	0.003	6.3		
2	37.30	138	172	4.13	4.13	5	7.31	0.28	5.7		
3	61.20	136	174	12.59	12.59	25	25.26	0.99	6.1		
4	85.30	135	175	14.83	14.83	15	31.53	1.24	5.5	-137	
5	115.10	133	177	25.34	25.34	40	60.57	2.39	5.1		
6	137.10	132	178	32.91	32.91	60	94.04	3.71	5.5		
7	160.33	131	179	40.78	40.78	95	147.20	5.80	5.3		
8	183.39	130	180	41.21	41.21	95	187.53	7.40	5.6		
9	208.18	129	181	44.27	44.27	80	228.90	9.03	5.90		
10	234.04	128.5	181.5	44.41	44.41	20	238.26	9.40	5.80		
11	254.30	128	182	44.41	44.41	10	242.63	9.57	6.20		
12	279.48	127.5	182.5	44.41	44.41	10	247.02	9.74	6.20		
13	305.31	127	183	44.41	44.41	0	247.24	9.75	6.20		
14	327.05	126.5	183.5	44.41	44.41	0	247.46	9.766	6.20		
15	355.55	126.5	183.5	44.41	44.41	0	247.46	9.76	6.20	-350	0.901

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülizar Onaran

Doğum Yeri ve Tarihi : 09.02.1990

Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : gulizaronaran@gmail.com

İletişim Adresi : Selçukbey Mah. 740 sokak No:11/1

Merkezefendi/DENİZLİ

05300137990

### Yayın Listesi

- Onaran G, Argun H. "Atık Maddelerden Biyohidrojen Üretimi" Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bülteni, 1(1) 32-33, (2014).
- Argun H, Onaran G. "Delignification of vineyard pruning residues by alkaline peroxide treatment" Industrial Crops and Products, 74 697-702 (2015).
- Argun H, Onaran G. "Hydrogen gas production from waste paper by sequential dark fermentation and electrohydrolysis" International Journal of Hydrogen Energy, 41 8057-8066 (2016).
- Argun H, Onaran G. "Glucose and 5-hydroxymethylfurfural production from cellulosic waste by sequential alkaline and acid hydrolysis" Renewable Energy, 96 442-449 (2016).

**Konferans listesi** :

• Argun H, Onaran G. "Hydrogen Gas Production From Waste Paper By Sequential Dark Fermentation And Elektrolisis" 6<sup>th</sup> International Conference on Hydrogen Production May 3-6 2015-University of Ontario Institute of Technology(UOIT) Oshawa,Ontario,Canada; Paper No:ICH2P-81.

• Argun H, Onaran G. "Alkaline Hydrolysis Of Different Waste Papers For Glucose Production" VI.Türk-Alman Katı Atık Günleri TAKAG2015&Young Reserachers' Forum,Posters 26-29 Mayıs2015,İzmir Paper No: 19-20.

• Argun H, Onaran G. "Atık Kağıttan Karanlık Fermentasyon ile Biyolojik Hidrojen Üretimi " 11. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi 11-17 Ekim 2015, Bursa Cilt 2, Sayfa No: 765.