

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**KARANLIK VE FOTO-FERMANTASYON
YÖNTEMLERİ KULLANILARAK ARDIŞIK
İMMOBİLİZE BİYOREAKTÖRLERDE HİDROJEN
ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri AZBAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 02.09.2013

Bornova-İZMİR

2013

Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU tarafından doktora tezi olarak sunulan “Karanlık ve Foto-Fermantasyon Yöntemleri Kullanılarak Ardışık İmmobilize Biyoreaktörlerde Hidrojen Üretiminin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 02 Eylül 2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Nuri AZBAR

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Rengin ELTEM

.....

Üye : Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN

.....

Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

.....

Üye : Prof. Dr. Ayşe FİLİBELİ

.....

ÖZET

KARANLIK VE FOTO-FERMANTASYON YÖNTEMLERİ KULLANILARAK ARDIŞIK İMMOBİLİZE BİYOREAKTÖRLERDE HİDROJEN ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

KESKİN GÜNDOĞDU, Tuğba

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Nuri AZBAR

Eylül 2013, 251 sayfa

Alternatif enerji kaynakları arasında; biyolojik yollarla hidrojen üretimi en ekolojik ve ekonomik alternatiflerdendir. Biyolojik yollarla hidrojen üretiminde, tam kapasite hidrojen üretimi ancak karanlık ve foto-fermantasyon proseslerinin ardışık kullanımı ile mümkündür. Bu çalışmada karanlık fermentasyon ve foto-fermantasyon sistemlerinde askıda büyüme sistemlerinin pek çok dezavantajını elimine edebilecek immobilize biyoreaktörler esas alınmıştır.

Çalışmanın ilk ana bölümü olan karanlık fermentasyona hidrojen üretiminde öncelikle kullanılacak karışık konsorsiyumda hidrojen üreten mikroorganizmaların baskın hale geçmesi için kesikli reaktörlerde, çeşitli ön işlemler (ısıl işlem, asitleştirme, bazikleştirme, bromoetanosülfonat (BESA), tri-kloroasetik asit (TCI) ve kloroform ekleme) uygulanmış ve kullanılacak konsorsiyum için en uygun ön işlemin ısıl ön işlem olduğuna karar verilmiştir. Ardından sürekli immobilize reaktörlerde hidrojen üretim performansları incelenmiştir. İmmobilizasyon materyalleri olarak seramik top, seramik yüzük ve pomza taşı kullanılmıştır. HRT 24, 12, 6, 3 ve 1.5 saat koşullarında immobilize reaktörler ve bir adet sürekli karıştırılmalı tank reaktör (CSTR) işletilmiştir. Hidrojen üretim performansları açısından hacimce 8 kat küçük olan immobilize reaktörlerde CSTR reaktör konfigürasyonuna göre göre 6 kata kadar daha yüksek üretimler gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde dört yeni izolatla sürekli foto-fermantatif hidrojen üretimi immobilize reaktörlerde askıda sistemlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Öncelikle kullanılacak organik asitlerin optimizasyonu kesikli reaktör düzeneklerinde yapılmış, asetat, bütirat, süksinat ve laktatın izolatlar tarafından hidrojen üretimi için başarılı bir şekilde tüketilebildikleri görülmüştür. İzolatların hidrojen üretme potansiyelleri tutuklama (LentiKat®) ve tutundurma

(nano gözenekli manyetik parçacıklar) yöntemleri ile hazırlanmış immobilize reaktörlerde askıda reaktörlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Reaktörlerde karanlık fermantasyon çıkış suyunun ana bileşenleri olan asetat ve bütirattan hidrojen üretim performansları HRT 72, 36, 18 ve 9 saat koşullarında askıda reaktör ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Askıda reaktörde HRT 36 saatten itibaren sistemdeki biyokütle yıkanarak uzaklaşmasına rağmen tutuklama yöntemi kullanılan reaktörlerde hidrojen üretiminin HRT 9 saat koşulunda dahi devam ettiği gözlenmiştir.

Sükrozun substrat olarak kullanıldığı iki aşamalı bir hidrojen üretim sisteminde her iki aşamada literatürde ilk defa kullanılan immobilizasyon materyalleri ile, immobilizasyonun, düşük reaktör hacimlerinde çalışılabilmesi, biyokütle konsantrasyonunun yüksek olması, düşük alıkonma zamanlarında çalışabilme, sistem kararlılıklarının ve verimliliklerinin artması gibi önemli avantajlar sağladığı gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Biyohidrojen, İmmobilizasyon, Karanlık Fermantasyon, Foto--Fermantasyon, İki Aşamalı Reaktör Sistemleri.

ABSTRACT**ASSESSMENT OF HYDROGEN PRODUCTION IN SEQUENTIAL
IMMOBILIZED BIOREACTORS BY DARK AND PHOTO-
FERMENTATION**

KESKIN GUNDOGDU, Tugba

PhD in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Nuri AZBAR

September 2013, 251 pages

Among the alternative energy sources, biological hydrogen production is one of the most ecological and economical alternative. Full capacity hydrogen production through biological methods is only possible by combined / sequential use of dark and light dependent fermentation processes. In this study immobilized reactor systems that can eliminate the disadvantages of the suspended systems were studied for both dark and photo-fermentation systems.

In the first part of the study different pre-treatment methods (heat, acid, base, boromoethanosulfonate (BESA), tri-chloroacetic acid (TCl) and chloroform treatments) were applied to mixed consortium to dominate the hydrogen producing microorganisms in batch reactors. Heat treatment is decided to be the best method for the mixed consortium that will be used in this study. The hydrogen producing performances in continuous immobilized reactors were examined. Ceramic ball, ceramic ring and pumice stone were used as immobilizing materials. Three immobilized reactors and one continuous stirred tank reactor (CSTR) were operated at HRT's 24, 12, 6, 3 and 1.5 hours. In comparison to CSTR up to 6 fold better hydrogen productions were observed in 8 times smaller reactors.

In the second part of the study continuous photo-fermentative hydrogen production was observed by using four newly isolated strains in immobilized and suspended reactors. First of all in batch reactors the four isolates were observed to use acetate, butyrate, succinate and lactate successfully for hydrogen production. The continuous hydrogen production potentials of the isolates were examined in

immobilized reactors prepared by entrapment (LentiKat®) and attachment (nanopored magnetic materials) methods by comparing suspended upflow reactors. In these reactors the main organic acids of the effluent of a dark fermentation reactor, acetate and butyrate were used as carbon sources. The hydrogen production performances were examined at HRTs 72, 36, 18 and 9 h. The biomass was washed out starting from 36 h HRT but the hydrogen production was continued even at 9 h HRT at immobilized reactors by entrapped biomass.

By using sucrose as a carbon source in a two-stage biohydrogen production system immobilization by novel materials could provide many advantages such as; lower bioreactor sizes, higher biomass concentrations even at low HRT conditions, system stability and improvement in system productivities.

Key Words: Biohydrogen, Immobilization, Dark Fermentation, Photo-Fermentation, Two-Stage Bioreactor Systems

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca devam eden öğrenme sürecimde bana destek veren ve yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Nuri AZBAR'a; doktora sürecimde katkılarıyla bana yol gösteren hocalarım Prof. Dr. Rengin ELTEM ve Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN'a; laboratuvar çalışmalarımızı ortak gerçekleştirdiğim arkadaşlarım Tuba ÇETİNKAYA DOKGÖZ ve Elif AKSÖYEK'e, bana yardımcı olan Müjde Burcu AKBONCUK'a, Laboratuvar ortamını benim için eğlenceli hale getiren ve bana hep destek olan arkadaşlarım Mine GÜNGÖRMÜŞLER, Fatih TUTUK, Çağdaş GÖNEN, Duygu KARAALP, Gülizar ÇALIŞKAN, Fatma Gizem AVCI'ya, moral desteklerinden dolayı bölüm arkadaşlarıma ve maddi, manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan AİLEME, yurtdışı çalışmam da bana destek olan Patrick C. HALLENBECK'e ve son olarak maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK-BİDEB ve TÜBİTAK-ÇAYDAG'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
KISALTMALAR DİZİNİ	XXIX
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1. Hidrojen	5
2.2. Biyohidrojen	8
2.3. Karanlık Fermantasyonda Proses Verimlerinin Arttırılması için Uygulanabilecek Stratejiler	11
2.4. Karanlık Fermantasyonla Biyohidrojen Üretimi için Kullanılan Reaktör Konfigürasyonları	17
2.5. Foto-Fermantasyon Verimlerinin Artmasına Yönelik Stratejiler	18
2.6. Foto-Fermantasyonda Kullanılan Reaktör Konfigürasyonları	22
2.7. İmmobilizasyon	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1. Analitik Yöntemler	41
3.1.1. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) analizi	41
3.1.2. Toplam şeker analizi	42
3.1.3. Askıda katı madde (AKM) tayini	45
3.1.4. Gaz kromatografisi (GC) ile VFA (Uçucu Yağ Asidi) analizi	46
3.1.5. Toplam gaz ve gaz yüzdeleri analizi.....	47
3.1.6. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz metodu	48
3.2. Mikrobiyal Analizler.....	48

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1. Optik densite (OD).....	48
3.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri	49
3.2.4. BET analizleri	49
3.5. Karanlık Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri	50
3.3.1. Ön işlem görmemiş biyokütle i-ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	51
3.3.2. Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	53
3.3.3. Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	53
3.3.4. Ön işlem olarak bromoetanosülfonat (BESA) muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	54
3.3.5. Ön işlem olarak trikloroasetik asit (TCl) muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	55
3.3.6. Ön işlem olarak ısıl işlem görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	56
3.3.7. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	57
3.4. Karanlık Fermantasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri	58
3.4.1. Sürekli reaktör denemeleri için pompa kalibrasyonu.....	58
3.4.2. Bazal ortam	58
3.4.3. Mikroorganizmaların tutundurulması	59
3.4.4. İmmobilize reaktörler (karanlık fermantasyon)	59
3.4.5. İmmobilize biyokütlenin belirlenmesi	63
3.4.6. Tam karışımli reaktör çalışması	63
3.5. Foto-Fermantatif Bakterilerin İzole Edilmesi	64
3.5.1. Foto-Fermantatif Bakterilerin Balçık Ortamdan İzole Edilmesi.....	65
3.5.2. İzolatların Moleküler Analiz Yöntemleri İle Tanımlanması.....	66

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6. Foto-Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri (Karbon Kaynağı Konsantrasyonu Optimizasyonu)	67
3.7. İzolatların LentiKat® İçerisine Hapsedilmesi	68
3.8. İzolatların Katı Yüzeyler Üzerine Tutunma Denemeleri.....	70
3.9. Foto-Fermantasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri	70
3.9.1. Foto-fermantasyonla tutuklama yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi (LentiKat® Reaktörleri)	70
3.9.2. Foto-fermantasyonla tutundurma yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi (manyetik parçacıklar içeren reaktörler).....	71
4. BULGULAR.....	72
4.1. Karanlık Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri	72
4.1.1. Ön işlem görmemiş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	72
4.1.2. Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	77
4.1.3. Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	81
4.1.4. Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	86
4.1.5. Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	91
4.1.6. Ön işlem olarak ısıl işlem görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi	95
4.1.7. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi.....	101
4.2. Karanlık Fermantasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri	107
4.2.1. Seramik top dolgulu immobilize biyoreaktör	107
4.2.2. Seramik yüzük (halka) dolgulu immobilize biyoreaktör	112
4.2.3. Pomza taşı dolgulu immobilize biyoreaktör	117

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.4. Sükroz beslemeli tam karıştırmalı sürekli reaktör (CSTR)	122
4.2.6. Sürekli reaktörlerde istatistiksel karşılaştırmalar	127
4.3. Foto-Fermantatif Bakterilerin İzole Edilmesi	130
4.3.1. Foto-Fermentatif Bakterilerin Balçık Ortamından İzole Edilmesi.....	130
4.3.2. İzolatların moleküler analiz yöntemleri ile tanımlanması.....	135
4.4. Foto-Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri (Karbon Kaynağı Optimizasyonu)	137
4.4.1. Karbon kaynağı olarak asetat kullanılması	137
4.4.2. Karbon kaynağı olarak bütirat kullanılması	140
4.4.3. Karbon kaynağı olarak laktat kullanılması	143
4.4.4. Karbon kaynağı olarak süksinat kullanılması	145
4.4.5. Kesikli reaktör denemelerinde karşılaştırmalı kinetik analizler.....	149
4.4.6. Karbon kaynağı olarak glikoz, laktoz ve sükroz kullanılması	150
4.5. İzolatların Katı Yüzey Üzerine Tutunma Denemeleri	152
4.6. Foto-fermantasyonla sürekli reaktör denemeleri	153
4.6.1. Foto-fermantasyonla tutuklama yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi (LentiKat® reaktörleri)	153
4.6.2. Foto-fermantasyonla tutuklama yöntemi ile sürekli hidrojen üretiminde sistem performanslarının karşılaştırmaları.....	162
4.6.3. Foto-fermantasyonda tutundurma yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi...163	
5. TARTIŞMA	173
6. SONUÇ	187
7. ÖNERİLER	191
KAYNAKLAR DİZİNİ	193
ÖZGEÇMİŞ	211
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Biyohidrojen üretiminde kullanılan bazı reaktör tiplerinin şematik gösterimleri	18
Şekil 2.2. Hücre immobilizasyon yöntemleri	27
Şekil 3.1. Toplam gaz ölçümü	47
Şekil 3.2. Gaz kromatografisi ile gaz yüzdesi ölçümü	48
Şekil 3.3. SEM analizi için örneklerin hazırlanması ve Philips XL-30S FEG / FEI Quanta250 FEG marka SEM taramalı elektron mikroskobu.....	49
Şekil 3.4. Kesikli biyoreaktör örnekleri.....	51
Şekil 3.5. Kesikli biyoreaktör örnekleri (2)	51
Şekil 3.6. Kesikli biyoreaktör örnekleri (3)	51
Şekil 3.7. Seramik top dolgu malzemesi	60
Şekil 3.8. Üç çıkışlı reaktör	60
Şekil 3.9. Sirkülatörle yapılmış ısı ceketli	60
Şekil 3.10. Seramik dolgulu immobilize biyoreaktör düzeneği	61
Şekil 3.11. Pomza dolgu malzemesi ve deney düzeneği	61
Şekil 3.12. Seramik halka dolgu malzemesi ve deney düzeneği	62
Şekil 3.13. İmmobilize reaktörlerin çalışma düzeneği	62
Şekil 3.14. Pomza dolgu materyalinin reaktör içerisinden ayrılması	63
Şekil 3.15. Fermantör denemelerinde kullanılan CSTR reaktör	64
Şekil 3.16. İzolasyon seti için deneysel düzenek.....	65
Şekil 3.17. LentiKat® jel hazırlama sistemi.....	68
Şekil 3.18. LentiKat® solusyonu ve printer	68
Şekil 3.19. Laminar akışlı kabinde LentiKat® boncukları.....	69
Şekil 3.20. Sabitleyici solusyon ve hapsedilmiş suşlar.....	69
Şekil 3.21. LentiKat® diskleri.....	69
Şekil 3.22. Manyetik Parçacıklar	70
Şekil 3.23. Sürekli foto-fermantasyon reaktör düzenekleri	71
Şekil 3.24. Tutundurma deney düzeneği	72
Şekil 4.1. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem görmemiş biyokütle)	72

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.2. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H ₂ miktarları (Ön işlem görmemiş biyokütle).....	73
Şekil 4.3. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H ₂ ve CO ₂ yüzdelerinin değişimi (Ön işlem görmemiş biyokütle).....	74
Şekil 4.4. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem görmemiş biyokütle)	74
Şekil 4.5. Ön işlem görmemiş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H ₂ üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri....	75
Şekil 4.6. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle)	77
Şekil 4.7. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H ₂ miktarları (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle).....	78
Şekil 4.8. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H ₂ ve CO ₂ yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle).....	79
Şekil 4.9. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle)	79
Şekil 4.10. Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H ₂ üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri	80
Şekil 4.11. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle)	82
Şekil 4.12. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H ₂ miktarları (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle).....	83
Şekil 4.13. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H ₂ ve CO ₂ yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle).....	83
Şekil 4.14. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle)	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.15. Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H ₂ üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri	85
Şekil 4.16. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle).....	87
Şekil 4.17. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H ₂ miktarları (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)	87
Şekil 4.18. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H ₂ ve CO ₂ yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)....	88
Şekil 4.19. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)	88
Şekil 4.20. Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H ₂ üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri	89
Şekil 4.21. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle).....	91
Şekil 4.22. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H ₂ miktarları (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle)	92
Şekil 4.23. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H ₂ ve CO ₂ yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle).....	92
Şekil 4.24. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle)	93
Şekil 4.25. Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H ₂ üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri	93
Şekil 4.26. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak ısıtma işlemi görmüş biyokütle).....	95

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.27. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H_2 miktarları (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle)	96
Şekil 4.28. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H_2 ve CO_2 yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle)	96
Şekil 4.29. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle)	97
Şekil 4.30. Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H_2 üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri	98
Şekil 4.31. Sükroz konsantrasyonu ve sıcaklığın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)	100
Şekil 4.32. Sıcaklık ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)	100
Şekil 4.33. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)	100
Şekil 4.34. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)	102
Şekil 4.35. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H_2 miktarları (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)	102
Şekil 4.36. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde H_2 ve CO_2 yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)	103
Şekil 4.37. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)	104
Şekil 4.38. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H_2 üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri	104
Şekil 4.39. Seramik top dolgulu immobilize reaktörün OLR değerleri	108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.40. Seramik top dolgulu immobilize reaktöründe günlük H_2 (mL/gün) üretiminin HRT ile değişimi.....	108
Şekil 4.41. Seramik top dolgulu immobilize reaktörün % H_2 değerlerinin HRT ile değişimi.....	109
Şekil 4.42. Seramik top dolgulu reaktörün hidrojen verimi değerleri (mL H_2 /g süzkrozkullanılan)	110
Şekil 4.43. Seramik top dolgulu immobilize reaktörler (süzkroz beslemeli)- son görüntüleri.....	111
Şekil 4.44. Seramik top dolgulu immobilize reaktörde immobilize ve süspanse biyokütle oranları (%).....	111
Şekil 4.45. Seramik top üzerine immobilize olmuş mikroorganizmaların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çekilmiş görüntüleri (a) hidrojen üretiminden önce (b) hidrojen üretiminden sonra	112
Şekil 4.46. Seramik yüzük dolgulu reaktör OLR (Organik Yükleme Hızı) değerleri	113
Şekil 4.47. Seramik yüzük dolgulu reaktör’de H_2 üretim hızının HRT ile değişimii	113
Şekil 4.48. Seramik yüzük dolgulu reaktör % H_2 değerleri.....	114
Şekil 4.49. Seramik yüzük (halka) dolgulu reaktörün hidrojen verimi değerleri (mL H_2 /g süzkrozkullanılan)	115
Şekil 4.50. Seramik yüzük (halka) dolgulu immobilize reaktörler - son görüntüleri.....	116
Şekil 4.51. Seramik yüzük (halka) dolgulu immobilize reaktör son mikroorganizma konsantrasyonları (%)	116
Şekil 4.52. Seramik halka(yüzük) üzerine immobilize olmuş mikroorganizmaların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çekilmiş görüntüleri (a) hidrojen üretiminden önce (b) hidrojen üretiminden sonra	117
Şekil 4.53. Pomza dolgulu reaktör OLR (Organik Yükleme Hızı) değerleri	118
Şekil 4.54. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör hidrojen üretim değerleri	118
Şekil 4.55. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör hidrojen yüzdesi değerleri ..	119
Şekil 4.56. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör hidrojen verimi değerleri	119

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.57. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktörler-son görüntüleri	120
Şekil 4.58. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör son mikroorganizma konsantrasyonları (%)	121
Şekil 4.59. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör dolgu materyali SEM Görüntüleri	122
Şekil 4.60. Sükroz beslemeli CSTR OLR değerleri.....	123
Şekil 4.61. Sükroz beslemeli CSTR hidrojen üretim değerleri.....	123
Şekil 4.62. Sükroz beslemeli CSTR % H ₂ değerleri	124
Şekil 4.63. Karanlık fermentasyonla sürekli reaktörlerde immobilize ve askıda reaktörlerde OLR değerlerinin karşılaştırması.....	125
Şekil 4.64. Karanlık fermentasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde günlük hidrojen üretimi değerlerinin karşılaştırması	126
Şekil 4.65. Karanlık fermentasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde hacimsel hidrojen üretim değerlerinin karşılaştırması	127
Şekil 4.66. Cam parçacık dolgulu reaktörden alınan seyreltmeler	131
Şekil 4.67. Moleküler elek dolgulu reaktörden seyreltmeler	131
Şekil 4.68. İyonik reçine reaktöründen seyreltmeler	131
Şekil 4.69. Kömür reaktöründen seyreltme	131
Şekil 4.70. Cam dolgulu reaktörden alınan örnekler No:1	131
Şekil 4.71. Cam dolgulu reaktörden alınan örnekler No:2	132
Şekil 4.72. Cam dolgulu reaktörden alınan örnekler No:3	132
Şekil 4.73. Moleküler elek dolgulu reaktörden alınan örnekler No:1	132
Şekil 4.74. Moleküler elek dolgulu reaktörden alınan örnekler No:2.....	132
Şekil 4.75. İyonik reçine dolgulu reaktörden alınan örnekler No:1	133
Şekil 4.76. İyonik reçine dolgulu reaktörden alınan örnekler No:2.....	133
Şekil 4. 77. İyonik reçine dolgulu reaktörden alınan örnekler No:3	133
Şekil 4.78. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petrilere cam parçacık dolgulu reaktör No:2	133
Şekil 4.79. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petrilere cam parçacık dolgulu reaktör No:3	134

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.80. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:1 (kırmızı koloni).....	134
Şekil 4.81. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:1 (kahverengi koloni)	134
Şekil 4.82. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:2 (kırmızı koloni).....	134
Şekil 4.83. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:2 (kahverengi koloni)	135
Şekil 4.84. 3 ve 4 numaralı izolatların filogenetik haritaları	135
Şekil 4.85. 1 ve 2 numaralı izolatların filogenetik haritaları	136
Şekil 4. 86. İzolatlarla kurulan asetat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri	137
Şekil 4. 87. İzolatlarla kurulan asetat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD@600 nm değerleri	138
Şekil 4. 88. İzolatlarla kurulan asetat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneğinde kümülatif H ₂ üretimi ve asetat tüketimi	138
Şekil 4. 89. İzolatlarla kurulan deney düzeneğinde H ₂ üretimi, yüzdesi ve verim değerleri	139
Şekil 4.90. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri	140
Şekil 4.91. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD@600 nm değerleri.....	141
Şekil 4.92. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneğinde kümülatif H ₂ üretimi ve bütirat tüketimi	141

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.93. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde Toplam H ₂ Üretimi (mL), Verim (mol H ₂ /mol bütirat ve H ₂ üretim hızı (L H ₂ /L reaktör. gün değerleri).....	142
Şekil 4.94. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde AKM (mg/L) ve OD _{@600 nm} değerleri	143
Şekil 4.95. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD _{@600 nm} değerleri	143
Şekil 4.96. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneginde kümülatif H ₂ üretimi ve laktat tüketimi	144
Şekil 4.97. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde Toplam H ₂ Üretimi (mL), Verim (mol H ₂ /mol laktat) ve H ₂ üretim hızı (L H ₂ /L reaktör. Gün) değerleri	145
Şekil 4.98. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde AKM (mg/L) ve OD _{@600 nm} değerleri	146
Şekil 4.99. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD _{@600 nm} değerleri.....	146
Şekil 4.100. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneginde kümülatif H ₂ üretimi ve süksinat tüketimi	147
Şekil 4.101. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde Toplam H ₂ Üretimi (mL), Verim (mol H ₂ /mol süksinat) ve H ₂ üretim hızı (L H ₂ /L reaktör. gün değerleri).....	148
Şekil 4.102. İzolatlarla kurulan glikoz konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde AKM (mg/L) ve OD _{@600 nm} değerleri	151
Şekil 4.103. İzolatlarla kurulan laktoz konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde AKM (mg/L) ve OD _{@600 nm} değerleri	151
Şekil 4.104. İzolatlarla kurulan sukroz konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneginde AKM (mg/L) ve OD _{@600 nm} değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7) ...	151
Şekil 4.105. Cam boncuk yüzeyinde tutunma denemeleri.....	152

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 4.106. Değişik malzemeler üzerine tutundurma denemeleri	153
Şekil 4.107. <i>S.Malt.2</i> tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç ve son görüntüleri	156
Şekil 4.108. <i>R.Cap.</i> tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç ve son görüntüleri.	157
Şekil 4.109. <i>R.Cap.</i> tutuklanmış LentiKat® diski reaktör başlangıç ve son görüntüleri.....	158
Şekil 4. 110. <i>R.Gel.4</i> tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç ve son görüntüleri	160
Şekil 4.111. Foto- fermentasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde toplam hidrojen üretim değerlerinin karşılaştırması	162
Şekil 4.112. Foto- fermentasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde hacimsel hidrojen üretim değerlerinin karşılaştırması	163
Şekil 4. 113. <i>S.Malt.2</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretiminde manyetik parçacıklar içeren reaktörler	164
Şekil 4.114. V111308'in foto-fermantasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (<i>S.Malt.2</i>)	166
Şekil 4.115. V111616'nın foto-fermantasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (<i>S.Malt.2</i>)	166
Şekil 4.116. V111308'in foto-fermantasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (<i>R.Cap.</i>).....	169
Şekil 4.117. V111616'nın foto-fermantasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (<i>R.Cap.</i>).....	169
Şekil 4.118. <i>R.Gel.4</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretiminde manyetik parçacıklar içeren reaktörler	170
Şekil 4.119. V111308'in foto-fermantasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (<i>R.Gel.4</i>)	172
ŞEKİL 4.120. V111616'nın foto-fermantasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (<i>R.Gel.4</i>)	172

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. KOİ hazırlama prosedürü	42
Çizelge 3.2. Toplam şeker tayini yapılacak örneklerin miktarları.....	44
Çizelge 3.3. Toplam şeker tayininde standart eğrinin hazırlanması.....	45
Çizelge 3.4. Ön İşlemden geçmemiş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere belirlenen deney noktaları	52
Çizelge 3.5. Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları.....	54
Çizelge 3.6. Ön işlem olarak TCI muamelesi görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları.....	55
Çizelge 3.7. Ön işlem olarak ısıl işlem görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları.....	56
Çizelge 3.8. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları.....	58
Çizelge 4.1. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem görmemiş biyokütle ve substrat olarak sükroz).....	76
Çizelge 4.2. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz).....	81
Çizelge 4.3. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz).....	86
Çizelge 4.4. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz).....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Çizelge 4.5. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)	94
Çizelge 4.6. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak ısıtma işlemi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)	99
Çizelge 4.7. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)	105
Çizelge 4.8. Kesikli reaktörlerde ön işlem etkisinin “Toplam H ₂ Üretim Performansları (mL H ₂)” açısından karşılaştırması	106
Çizelge 4.9. Kesikli reaktörlerde ön işlem etkisinin “Toplam H ₂ Üretim Verimleri (mL H ₂ /g sükroz)” açısından karşılaştırması.....	107
Çizelge 4.10. Seramik yüzük dolgulu reaktör ANOVA testi sonuçları	128
Çizelge 4.11. Pomza taşı dolgulu reaktör ANOVA testi sonuçları.....	129
Çizelge 4.12. Seramik top dolgulu reaktör ANOVA testi sonuçları.....	129
Çizelge 4.13. Kesikli reaktör denemelerinde kinetik analiz sonuçları.....	149
Çizelge 4.14. Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış <i>S.Malt.2</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretimi	154
Çizelge 4.15. Yukarı akışlı reaktörde <i>S.Malt.2</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretimi	155
Çizelge 4.16. Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış <i>R.Cap.</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretimi.....	157
Çizelge 4.17. Yukarı akışlı reaktörde <i>R.Cap.</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretimi	159
Çizelge 4.18. Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış <i>R.Gel.4</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretimi.....	160
Çizelge 4.19.Yukarı akışlı reaktörde <i>R.Gel.4</i> ile foto-fermantatif hidrojen üretimi	161
Çizelge 4.20. Tutundurma yöntemi ile immobilize edilen izolatlarda foto-fermantatif hidrojen üretimi (<i>S.Malt 2</i>).....	165

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)Sayfa

Çizelge 4.21. Tutundurma yöntemi ile immobilize edilen izolatlarda foto-fermantatif hidrojen üretimi (<i>R.Cap</i>).....	168
Çizelge 4.22. Tutundurma yöntemi ile immobilize edilen izolatlarda foto-fermantatif hidrojen üretimi (<i>R.Gel.4</i>).....	171

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AC	Aktif Karbon
AFB	Anaerobik Dolgu Yatak
AKM	Askıda Katı Madde
ALSC	Akrilik-Lateks Silikon
BESA	Bromoetanosülfonat
BHP	Biyokimyasal Hidrojen Potansiyeli
CA	Kalsiyum Aljinat
CSTR	Sürekli Karıştırmalı Tank Reaktör
EC	Genişletilmiş Kil
EM	Zenginleştirme Ortamı
EVA	Etilen Vinil Asetat
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPR	Hidrojen Üretim Hızı
HRT	Hidrolik Alıkonma Süresi
KOI	Kimyasal Oksijen İhtiyacı

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
LS	Loofah Sünger
OD	Optik Dansite
OLR	Organik Yükleme Hızı
PBR	Foto-Biyoreaktör
PVA	Polivinil alkol
RID	Refraktif İndeks Dedektörü
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCD	Termal Konduktivite Dedektörü
TCI	Trikloroasetikasit
TŞ	Toplam Şeker
UAKM	Uçucu Askıda Katı Madde
UASB	Yukarı Akışlı Çamur Yatak
US	Ultrasound
UV	Ultraviyole
VFA	Uçucu Yağ Asidi
VSS	Uçucu Katı Madde
YPS	Maya Fosfat Sülfat

GİRİŞ

Son yıllarda enerji darboğazından dolayı biyoyakıtlara olan ilginin önemli miktarda artması nedeniyle biyoyakıt üretimine yönelimde önemli miktarda artış olmuştur. Artan küresel ısınma, petrol rezervlerinin azalması ve çevre kirliliğinin artması ile alternatif enerjilere olan eğilim tüm dünyada artmıştır. Alternatif enerji kaynakları arasında sera etkisinin olmaması, 122 MJ/kg'lık yüksek enerji içeriği, yakıt hücreleri ile elektrifiğe dönüştürülebilmesi ve yanma ürününün sadece su buharı olması gibi önemli avantajları nedeniyle hidrojen, geleceğin enerjisi olarak görülmektedir (Chen et al., 2006, Kapdan and Kargı, 2006). Hidrojen kimyasal, biyolojik ve termokimyasal proseslerle yapısında hidrojen olan her şeyden (suda, doğalgaz-kömür) üretilebilir. Ancak bu prosesler hidrojen üretim verimliliği açısından verimli prosesler olmalarına rağmen dışarıdan enerji ihtiyacı duymaları, prosesler sonucunda karbondioksit emisyonlarına katkıda bulunmaları gibi bazı dezavantajlarından dolayı çok ekolojik görülmemektedir. Bununla birlikte elde edilebilir, kolay bulunabilir, organik içeriği yüksek kaynakların biyolojik yollarla içlerindeki organik yükün azaltılması esnasında ekonomik bir yan ürün olarak hidrojen enerjisi elde edilebilmesi ekolojik bir çözümdür (Das and Veziroğlu, 2001). Hidrojen enerjisinin önemli bir dezavantajı ise üretim, depolama ve kullanımda henüz yeterli teknolojilerin gelişmemiş olmasıdır.

Biyolojik hidrojen üretim metotları karanlık ve foto-fermantasyon yöntemleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Fermantatif biyohidrojen üretim prosesi düşük sıcaklık ve atmosfer basıncı koşullarında çalışılabileceğinden termokimyasal ve elektrokimyasal proseslere göre daha avantajlıdır. Bunlara ek olarak karışık konsorsiyumla yapılan çalışmalar; kolay ulaşılabilmeleri, steril koşullara ihtiyaç duymamaları ve endüstriyel uygulamalara daha uygun olmaları gibi avantajlara sahiptir (Hallenbeck and Benemann, 2002).

Büyük ölçekli çalışmalarda hidrojen üreten bakterilerin baskın olduğu bir kültür kompozisyonu kullanmak çok önemlidir (Ren et al., 2007). Anaerobik bakterilerde organik substratların ışık kaynağı yokluğunda gerçekleşen karanlık fermantatif hidrojen üretim prosesi gelecek vaat etmektedir. Bu prosesin ham organik kaynaklardan olan atıkların değerlendirilmesini sağlaması gibi çevresel katkıları bulunmaktadır. Ancak karışık konsorsiyumda hidrojen üretiminin baskın hale geçmesi için ön işleme tabi tutulmaları gerekmektedir. Asidojenik bakteriler olarak da adlandırılan, hidrojen üreten bakteriler ve metanojenik bakteriler olarak bilinen hidrojen kullanan bakteriler arasındaki fizyolojik farklılıklar uygulanacak

zenginleştirme prosedüründe önemli anahtarlardır. Ön işlemler hız sınırlayıcı basamak olan hidroliz basamağının hızlandırılmasının yanı sıra metanojenesis basamağının baskılanması yoluyla hidrojen üretiminin iyileştirilmesini sağlar. Karışık konsorsiyuma uygulanabilecek çeşitli ön işlem yöntemleri mevcuttur. Bunlardan en çok kullanılanları; ısı ön işlem, asit muamelesi, baz muamelesi, ortama BESA, kloroform ve TCl eklenmesidir.

Karanlık fermantasyon sonucunda üretilen hidrojen yanında açığa çıkan organik asitlerin foto-fermentasyon bakterileri tarafından ışıklandırma altında tamamen hidrojen ve karbondioksit dönüştürülebildiği ve foto-fermantasyonun karanlık fermantasyonun en iyi tamamlayıcısı olduğu öne sürülmektedir (Tao et al., 2008). Ekonomik bir foto-fermantatif biyohidrojen üretimi, ışık enerjisinin uygun substrat konsantrasyonu ve hücre büyümesinde optimum koşulların sağlanmasıyla gerçekleşecektir. Bu proseslerde günümüzde aşılması gereken en büyük dezavantaj; düşük enerji verimlerini yenmek için kurulması gereken ve büyük alan kaplaması gereken reaktörlerdir (Özgür et al., 2010).

Günümüze dek yapılan çoğu biyolojik yollarla hidrojen üretimi çalışması sürekli karıştırılmalı tank biyoreaktörlerde askıda kültür sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynakları açısından ise en yüksek verimler karbonhidratlarla (glukoz, sükröz, nişasta) ile elde edilmiştir (Kapdan and Kargi, 2006). Ancak sürekli karıştırılmalı tank biyoreaktörlerde biyohidrojen üretimi çevresel koşullardan (pH, sıcaklık vs) çok fazla etkilenmektedir. Çevresel koşullara ek olarak yüksek seyreltme hızlarında yani düşük alıkonma zamanlarında biyokütlenin biyoreaktörden yıkanarak uzaklaştırılması işletim kararsızlığı ve verimsiz hidrojen üretimine neden olmaktadır. Bu nedenle yüksek hidrolik yüklerde hücre alıkonmasının artırılması ve bu şekilde hidrojen üreten organizma miktarının yüksek tutulması kararlı ve verimli bir hidrojen üretim hızının elde edilmesinde çok önemlidir. Bu çalışmada askıda büyüme sistemlerinin pek çok dezavantajını elimine edebilecek immobilize biyoreaktörler esas alınmıştır. Düşük alıkonma hızlarında hücre yıkanması gözlenmemesi, yüksek hücre konsantrasyonunun sağlanabilmesi, yüksek verimlilikler elde edilebilmesi ve mikro çevresel koşulların iyileştirilerek yüksek performans gözlenmesi gibi avantajlar immobilize sistemleri cazip kılmaktadır.

Literatürde hücrelerin immobilizasyon yöntemleri konusunda pek çok farklı teknik ortaya atılmıştır ve atılmaya devam etmektedir. Pek çok yöntemde enzim immobilizasyon yöntemlerinden esinlenilmiştir. Immobilizasyon yöntemleri hücrelerin fizyolojik gereksinimlerine göre değişmektedir. Fermantasyon proseslerinde hücreler canlı ve çok sayıda olmalıdır. Fermantasyon proseslerinde bir diğer önemli etmende hücrelerin tekrar kullanım olanaklarının sağlanması ya da ortamdan uzaklaştırılmalarını gerekliliğidir. Günümüze dek gerçekleştirilen teknikler belirli ana başlıklar altında; tutuklama, tutundurma, kümeleme, yüzeyler arasına alma şeklinde gruplandırılabilir.

Bu tez çalışmasını ana amaçları, geleceğin enerji kaynaklarından olarak görülen hidrojen üretimine yeni, ekonomik ve ekolojik bir yaklaşım getirmek; askıda sistemlerde görülen yıkanarak sistemden uzaklaşma, düşük alıkonma zamanlarında çalışamama ve yüksek yükleme hızlarına çıkılamama gibi sorunlara alternatif çözümler üretebilmek, biyohidrojen üretiminde maliyetler açısından en uygun ve en verimli yöntemi tespit edebilmek ve iki aşamalı sistemlerde her iki aşamanın da immobilize reaktörlerde gerçekleştirilmesi gibi yeni bir yaklaşım getirmektir.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmalar karanlık fermentasyon ve foto-fermentasyon olarak iki ana bölüme ayrılmıştır. Her iki bölümde kendi içinde kesikli reaktör denemeleri ve sürekli reaktör denemeleri olarak iki alt bölüme ayrılmıştır.

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretimi çalışmalarının ilk basamağı olan kesikli reaktör denemeleri ile kullanılacak karışık konsorsiyum için en uygun ön işlem, uygulanacak ön işlem koşulları, sükroz konsantrasyonu ve pH koşullarını belirlemek için istatistiksel deney tasarım yöntemlerinden faydalanılarak Biyokimyasal Hidrojen Potansiyeli (BHP) testleri ile karşılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Substrat olarak sükroz (10-50 g/L), ön işlemler olarak ise ısıl ön işlem (70-100°C 1 saat), asit (HCl ile pH 3), baz (NaOH ile pH 11), kloroform (%0.1-%10), BESA (10-200 mM), TCl (10-200 mM) karşılaştırmalı olarak pH 4.5-6.5 aralıklarında incelenmiştir. Daha sonra karanlık fermantasyonla sürekli hidrojen üretimi çalışmalarında tutundurma yöntemiyle hazırlanmış üç farklı immobilize biyoreaktörün performansları, CSTR ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Substrat olarak 10 g/L sükroz besi ortamına eklenmiştir. Dolgu materyalleri olarak; pomza taşı, seramik top, ve seramik yüzük (halka) kullanılmıştır. Tüm denemelerde biyoreaktörler HRT 24-12-6-3-1.5 saat koşullarında çalıştırılmış,

günlük ve saatlik alınan örneklerle biyoreaktörlerin volumetrik hidrojen üretimi, hidrojen verimi, substrat kullanımı (toplam şeker olarak) ve uçucu yağ asidi üretim performansları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci ana bölümü olan foto-fermantatif hidrojen üretim denemelerinin ilk basamağında dört yeni bakteri izole edilmiş ve moleküler analiz yöntemleri ile tanımlanmalarına başlanmıştır. Dört yeni izolat ile yapılan çalışmalarda öncelikle en uygun olan karbon kaynağının ve kullanılacak karbon kaynaklarının konsantrasyonunun belirlenmesi için ön kesikli reaktör denemeleri yapılmıştır. Bu ön denemelerde öncelikle tüplerde büyümeler gözlenmiş en uygun büyüme koşullarından sonra 50 mL hacimli kesikli reaktörlerde hidrojen üretim performansları incelenmiştir. Buna göre asetat ve laktat için başlangıç konsantrasyonu 5 g/L, bütirat ve süksinat için 3 g/L olarak belirlenmiştir.

Foto-fermantasyonda sürekli hidrojen üretiminde immobilizasyon yöntemleri öncelikle tutuklama ve yüzey tutundurma şeklinde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tutuklama malzemesi olarak ticari LentiKat® marka polimerik tutuklama malzemesi kullanılmıştır. İzolatlar LentiKat® jelleri içine hapsedildikten sonra 50 mL hacimli yukarı akışlı reaktörlere doldurulmuştur. Asetat/Bütirat/Glutamat ve zenginleştirme ortamı içeriği ile HRT etkisi (72-36-18-9 saat) serbest halde mikroorganizmaları içeren yukarı akışlı dolgulu reaktörle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yüzey tutundurma yöntemi olarak ise iki çeşit nano-gözenekli manyetik immobilizasyon malzemeleri reaktörlere karıştırılmış, tutuklama yönteminde kullanılan işletim koşulları ile immobilizasyon etkisi ve hidrojen üretim performansları hiçbir malzeme içermeyen reaktörle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Sükrozun substrat olarak kullanıldığı iki aşamalı bir hidrojen üretim sisteminde her iki aşamada literatürde ilk defa kullanılmış olan immobilizasyon materyalleri ile, immobilizasyonun, düşük reaktör hacimlerinde çalışılabilmesi, biyokütle konsantrasyonunun yüksek olması, düşük alıkonma zamanlarında çalışabilme, sistem kararlılıklarının ve verimliliklerinin artması gibi önemli avantajlar sağladığı gösterilmiştir.

1. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hidrojen

Hidrojen evrenin en basit ve en çok bulunan, renksiz, kokusuz ve havadan 14.4 kez daha hafif zehirsiz bir gazdır. İlk kez 1500'lü yıllarda keşfedilmiştir. 1700'lü yıllarda yanıcı özelliğinin farkına varılmıştır. Hidrojen evrenin temel enerji kaynağıdır. Güneş ve diğer yıldızların, termonükleer tepkimeye vermiş oldukları ısıнын yakıtıdır. -252.77°C ' de sıvı hale getirilebilir. Sıvı hidrojenin hacmi gaz halindeki hacminin sadece 1/700'ü kadardır. Hidrojen bilinen tüm yakıtlar içerisinde birim kütle başına en yüksek enerji içeriğine sahip enerji kaynağıdır (Üst ısı değeri 140.9 MJ/kg, alt ısı değeri 120.7 MJ/kg). 1 kg hidrojen 2.1 kg doğal gaz veya 2.8 kg petrolun sahip olduğu enerjiye sahiptir. Hidrojen doğada serbest halde bulunmaz, bileşikler halinde bulunur. En çok bilinen bileşiği ise sudur. Hidrojen hemen tüm maddelerin $\frac{3}{4}$ ' ünü oluşturan bollukta bir kaynaktır. Atmosferde %0.07, dünya yüzeyinde ise %0.14 oranında H_2 bulunur. Bilinen en hafif elementtir. 1 L hidrojen 0.09 g, 1 L hava ise 1.2 g 'dır. (Das and Veziroğlu, 2001). Hidrojen enerji çeşitliliği adına çok önemli bir yol izi sunmaktadır. Çeşitli kaynaklardan enerjiyi mobil uygulamalar ve daha fazlası için depolayabilir (ABD Enerji Raporu, 2012).

Hidrojenin ülke ekonomisine katkıları

- a. Enerji güvenliği: Hidrojen enerjisi ile çalışan araçlar yabancı ülkelerden alınacak petrol ithalatını düşürecektir.
- b. Sürdürülebilirlik: Hidrojen üretim teknolojileri; gelişmekte ve kullanılmakta olan (güneş, rüzgar, jeotermal...)yenilenebilir enerji kaynaklarına önemli bir katkı sağlayacaktır.
- c. İklim değişikliği: Yenilenebilir kaynaklardan, nükleer kaynaklardan veya fosil kaynaklardan elde edilecek hidrojenle çalışacak araçlardan sifıra yakın emisyonlar salınacaktır.
- d. Şehirsel hava kalitesi: Sıfıra yakın düzeylere indirgenmiş emisyonlar şehir hava kalitesinin de artmasını sağlayacaktır.,

- e. Ekonomik katkılar: Yüksek enerji içeriği ve petrol ithalatının azaltılacak olması ülke ekonomisine önemli katkıda bulunacaktır (ABD Enerji Raporu, 2012).

Hidrojenin konvansiyonel yakıtlardan farkı

- Hidrojen zehirli bir gaz değildir; solunması veya atmosfere salınması halinde hastalıklara yol açmaz.
- Renksiz, kokusuz ve tatsızdır; insanın beş duyusuyla fark edilemez.
- Yüksek derecede yanıcıdır.
- Yüzey sularının kontamine olmasına sebep olmaz. Normal atmosferik koşullarda suda çözünürlüğü oldukça düşüktür.
- Kirletici değildir. Atmosferik ortamda ya da su da kirleticilik etkisine dair henüz bir rapor yayınlanmamıştır (ABD Enerji Raporu, 2012).

Hidrojenin kullanım alanları

- Düşük molekül ağırlıklı doymuş bileşikler üretmek, parçalanmış hidrokarbonlar veya sülfür ve azot bileşiklerini ortamdan uzaklaştırmak için kısaca hidrojenasyon proseslerinde reaktant olarak kullanılır.
- Oksidasyon ve korozyondan koruma amacıyla kimyasal olarak iz miktardaki O_2 'nin uzaklaştırılmasında yani O_2 uzaklaştırıcı olarak kullanılır.
- Roket makinelerinde yakıt olarak kullanılır.
- Aynı fiziksel özellik avantajlarını sağlayabilmek için elektrik jeneratörlerinde soğutucu olarak kullanılır.
- Yakıt pillerinde kullanılır.

Bu sayılanlar dünya enerji tüketiminin % 3 ünü oluşturmaktadır ve ilerleyen yıllarda oranın artması beklenmektedir (Das and Vezioğlu, 2001). Bu nedenle hidrojenin enerji kaynağı olarak kullanımına olan ilgi giderek artmaktadır.

Enerji kaynağı olarak hidrojen

Global enerji gereksiniminin yaklaşık %80'i fosil esaslı yakıtlardan sağlanmaktadır (Das and Vezioğlu, 2001). Araştırmalara göre dünya fosil yakıt rezervi 2015 yılından itibaren düşüşe geçerken dünya enerji kullanımı ise ekspanansiyel artışına devam edecektir. Enerji Bakanlığı verilerine göre ülkemiz enerji talebinin %70'lik kadar çok önemli bir kısmını dışalım ile gerçekleştirmektedir (Azbar et al., 2009). Elektriğe 20. yüzyılın enerji taşıyıcısı, hidrojene 21. yüzyılın enerji taşıyıcısı diyen çevreler vardır. Hidrojen yerel olarak üretimi mümkün, kolayca ve güvenli olarak her yere taşınabilen, taşınması sırasında az enerji kaybı olan, ulaşım araçlarından ısınmaya, sanayiden mutfaklarımıza kadar her alanda yararlanacağımız bir enerji sistemidir (Azbar and Dokgöz, 2010).

Doğada bileşikler halinde bol miktarda bulunan hidrojen serbest olarak bulunmadığından doğal bir enerji kaynağı değildir. Bununla birlikte hidrojen birincil enerji kaynakları ile değişik hammaddelerden üretilebilir. Bu nedenle elektrikten neredeyse bir asır sonra teknolojisinin geliştirgi ve geleceğin alternatif kaynağı olarak yorumlanan bir enerji taşıyıcısıdır. Hidrojen karbon içermediği için fosil yakıtların neden olduğu çevresel sorunlar yaratmaz. Isınmadan elektrik üretimine kadar çeşitli alanların ihtiyacına cevap verebilecektir. Gaz ve sıvı halde olacağı için uzun mesafelere taşınabilecek ve iletimde kayıplar olmayacaktır. Hidrojen enerjisi önümüzdeki yüzyılın en önemli enerji kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Dünyanın enerji sorununu çözmek için kullanılacak hidrojen enerjisi ile milyarlarca yıl yetecek enerji devamlı olarak üretilebilecektir.

Hidrojen üretim metotları

Günümüzde H₂ genellikle fosil yakıtlar, biyokütle ve sudan üretilmektedir (Erdener et al., 2007). Hidrojen üretiminde kullanılan yöntemler; termal yöntemler (buharlı dönüşüm, termokimyasal su ayrımı, kömürün gazlaştırılması, ve piroliz); elektrokimyasal yöntemler (elektroliz, fotoliz ve direk termal bozunma) ve biyolojik yöntemlerdir (Alg ve siyanobakterlerle suyun biyofotolizi, fotosentetik bakterilerle organik bileşiklerin parçalanması, organik bileşiklerin

fermantasyonu ve hibrit sistemler). Bu yöntemlerin %90' ında hidrojen, doğal gaz veya hafif petrol fraksiyonlarından buhar ile veya yüksek sıcaklıklarda elde edilir. Kömür gazlaştırma ve suyun elektrolizi endüstriyel hidrojen üretim metotlarıdır. Bu endüstriyel metotlar fosil yakıtları veya hidroelektirliği enerji kaynağı olarak tüketirler. Termokimyasal ve elektrokimyasal hidrojen üretim prosesleri her zaman çevre dostu değildir. Buna karşılık biyolojik hidrojen üretim prosesleri uygun sıcaklık ve basınçlarda gerçekleştiğinden daha az enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bunlara ek olarak değişik atık maddelerin kullanılmasıyla geri dönüşüme katkıda bulunma avantajına sahiptirler (Erdener et al., 2007).

2.2. Biyohidrojen

Biyohidrojen mikroalgler ve bakteriler kullanılarak, ışık varlığında ya da yokluğunda ve inorganik veya organik maddelerden elde edilebilen önemli bir enerji kaynağıdır.

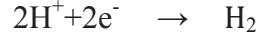
Biyohidrojen; uygun sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilebilmesi, yenilenebilir enerji kaynaklarını (güneş, rüzgar, su, biyokütle) kullanma olanağı sağlaması, çevre kirliliğine yol açmaması ve üretimi esnasında organik atıkların kullanılması nedeniyle ekonomik; önemli yan ürünlerin oluşması nedeniyle de avantajlı bir enerji kaynağıdır (Wünschiers and Linblad, 2002; Hawkes et al., 2007; Das and Veziroğlu, 2001; Azbar et al., 2008).

Biyolojik yollarla hidrojen üretim metotları

Dünya çapında H_2 üretiminin %96 'sı fosil enerji kaynaklarından sağlanmaktadır. Mikroorganizmalardan H_2 üretimi enzimler aracılığıyla olur. En sık kullanılan hidrojenaz enzimi, H_2 'yi okside eder, proton ve elektronlara dönüştürür ya da protonla indirgeyerek moleküler H_2 'nin açığa çıkmasına neden olur.

Biyosferde yer alan H_2 'nin çoğu biyolojik olarak mikrobiyal fermentasyon prosesleri sonucu üretilmiştir. Bu organizmalar organik maddeyi CO_2 ve H_2 ye parçalar. Protonların H_2 'ye indirgenmesi hücrede fazladan elektron açığa çıkmasına sebep olur. Bu durum da genel olarak metabolizmada ek enerji üretim basamaklarının oluşmasına neden olur. Üretilen H_2 gazı aynı ekosistem içinde yer alan tüketiciler tarafından kullanılır. Bu organizmalar hidrojenin indirgeyici etkisiyle metabolik prosesi yürütürler. H_2 bakterileri aynı zamanda otomatik

olarak büyüyebilir. H₂ gazı burada indirgeyici güç ve enerji substratıdır. Bu bakterilerde oksijen terminal elektron kabul edicidir. Bu biyolojik reaksiyon sonucunda su oluşur. Enzimlerin aktivite ve miktarları bütün prosesi sınırlandırıcı bir etkiye sahiptir. Ancak her enzimin katalitik aktivitesi farklı olacağından sayı veya miktar olarak belirli bir sınırlayıcı rakam söylenemez. H₂ üreten enzimler aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



En çok bilinen ve kullanılan enzimler; nitrojenaz, Fe-hidrojenaz, Ni-Fe hidrojenazdır. Biyolojik olarak H₂ üretimi iki kategoride incelenebilir; Fotosentetik biyohidrojen üretimi ve karanlık fermantasyonla biyohidrojen üretimi. Biyolojik yollarda hidrojen üretiminde Yeşil algler, *cyanobacteria heterocyteus*, *cyanobacteria non heterocyteus*, fotosentetik bakteriler ve fermantatif bakteriler kullanılmaktadır (Hallenbeck and Benemann, 2002).

Biyofotoliz

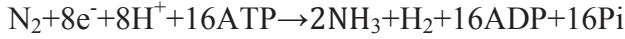
Direkt biyofotoliz

Oksijenik fotosentez organizmaları enerji açısından zayıf su moleküllerini yükseltgeyerek elektron ve protonları ekstrakte ederek ferrodoksin ve NADP 'nin indirgenmesinde kullanılmasını sağlar. Anaerobik koşullar altında fotosentezin primer ürünleri (indirgenmiş ferrodoksin, NADPH ve ATP) kullanılarak yeşil mikroalgler ve siyanobakterler tarafından hidrojen üretimi gerçekleştirilebilir. Direkt biyofotolizde PS2 ve PS1 tarafından absorblanan ışık enerjisi, elektronların lineer olarak sudan ferrodoksine aktarılmasını sağlar. İndirgenmiş ferrodoksin, hidrojenaz enzimine elektron donörü gibi davranır. Hidrojenaz enzimi tersinir olarak protonların (H⁺) moleküler hidrojene (H₂) indirgenmesini sağlar (Melis et al., 1999). Yeşil mikroalgler %12-14 arası güneş-H₂ dönüşümü sağlayan oldukça aktif [FeFe]-hidrojenaz enzimine sahiptir. Kloroplastlarında suyun yükseltgenmesi ve H₂ üretilmesini sağlayabilirler (Melis and Happe., 2001, Melis, 2009). Direkt biyofotolizde en önemli problem önemli bir PS2 yan ürünü olan O₂'nin aynı zamanda H₂ bağlantılı reaksiyonların baskılayıcısı olmasıdır. Bu reaksiyonlar; gen ekspresyonları, mRNA stabilitesi ve enzimatik katalizleme reaksiyonlarıdır. Direkt biyofotolizde oksijen birikimi gerçekleşene kadar hidrojen üretim reaksiyonu devam edecektir. Fotosentetik olarak üretilen oksijenin çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılması sağlanarak hidrojen üretiminin devamlılığı

sağlanabilir. Bu yöntemler inert bir gazla havalandırma yoluyla oksijenin sürekli olarak uzaklaştırılması ya da hücrenin mitokondriyal solunumunun oksijen tüketimine yönlendirilmesi şeklinde olabilir (GreenBahum, 1982, Ghirardi et al., 2000).

İndirekt biyofotoliz

Siyanobakterler genellikle sucul çevrelerde (deniz veya akarsular) bulunan, geniş çeşitliliğe sahip, fototrofik mikroorganizmalardır. Hidrojen üreten siyanobakterler genellikle filamentöz yapıdadır ve heterokist olarak bilinen özelleştirilmiş türlerinde azot fiksasyonu gerçekleştirebilirler (*Nostoc*, *Anabena*, *Calothrix*, *Oscillatoria*...). Azot fiske edemeyen türleri de bulunmaktadır; *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Gleobacter*...(Das and Veziroğlu, 2008). Oksijenik fotosentezin ve hipoksik azot fiksasyon reaksiyonlarının birbirinden belirgin biçimde ayrıldığı filamentöz siyanobakterlerde hidrojen üretimi indirekt biyofotoliz yöntemi ile gerçekleşmektedir. Filamentöz siyanobakterlerin heterokistleri azot fiksasyonu için gerekli anaerobik çevrenin sağlanması için farklılaşmış durumdadır. Nitrojenaz enzimi ile katalizlenen azot fiksasyonu reaksiyonunda hidrojen aşağıdaki reaksiyon doğrultusunda üretilmektedir.



Bu reaksiyonda en çok nitrojenaz/hidrojenaz katalizlenme reaksiyonu için gereken enerji ihtiyacı dikkati çekmektedir. 1 mol N_2 fiksasyonu için 16 mol ATP harcanmaktadır. Buradaki ATP ihtiyacı siyanobakterlerin heterokistlerindeki ışık tarafından sağlanan ve bu özel hücrelerin thylakoid membranlarında gerçekleşen siklik fotofosforilasyonla sağlanmaktadır. Azot fiske etmeyerek hidrojen üretebilen siyanobakter türleri de mevcuttur; *Synechocystis*, *Synechococcus* ve *Gleobacter*...(Das and Veziroğlu, 2008). Bu çeşit siyanobakterlerde iki değişik türde [NiFe] hidrojenaz bulunmaktadır. İki türünde farklı fonksiyon ve görevleri mevcuttur. İlk grup uptake [NiFe] hidrojenazdır, hup genlerine sahip oldukları söylenir. Bu enzimler öncelikle nitrojenaz tarafında sentezlenen hidrojeni tutar ve geri döndürür. Genellikle nitrojenazla birlikte çalışacak şekilde düzenlenmişlerdir. İki yönlü çok fonksiyonlu [NiFe] hidrojenazlar hoxFUYH genleri ile kodlanırlar ve hidrojen kullanma ve üretme yeteneğine sahiptirler (Tamagnini et al., 2002). Azot fiske etmeyen siyanobakterler hidrojeni [NiFe] iki yönlü (hoxEFUYH) hidrojenaz ile üretirler.

2.3. Karanlık Fermantasyonda Proses Verimlerinin Artırılması için Uygulanabilecek Stratejiler

Reaktör konfigürasyonları

Karanlık fermantasyonla biyohidrojen üretiminde çok farklı reaktör konfigürasyonları kullanılmıştır. Genel amaç kararlı uzun dönem çalışacak sistemler oluşturmaktır. Bunun yanı sıra en yüksek H_2 üretimini elde etmek için optimum koşullar saptanmaya çalışılmaktadır. Karanlık fermantasyonla biyohidrojen üretimi kesikli ve sürekli sistemlerde gerçekleştirilebilir. Kesikli sistemlerin başlangıç optimizasyon işlemlerinde daha etkili oldukları düşünülmektedir. Yarı sürekli ve sürekli sistemlerin ise sürdürülebilir hidrojen enerjisi koşullarını sağlamakta daha etkili oldukları düşünülmektedir. İlk çalışmalar sürekli sistemlerde saf kültürlerle yapılmıştır. CSTR reaktörleri işletimi kolay homojen etkili karıştırma sağlayan sistemlerdir. Ancak reaktörlerde mikrobiyal büyüme hızlarında HRT çok önemli bir faktördür. HRT değerleri organizmanın büyüme sürelerinden daha büyük olmalıdır ki mikroorganizmalar reaktörde yıkanarak uzaklaşması önlenir. CSTR tipi reaktörlerde gözlenen bu problem mikroorganizmaların fiziksel alıkonmasıyla bazı sistemlerle aşmaya çalışılmıştır. Granülleşme, flokleşme, hapsedme, tutundurma gibi yöntemler farklı reaktör tiplerinde kullanılmıştır. Günümüze dek yapılan çalışmalarda halen ortak bir reaktör tipi belirlenememiştir ancak fiziksel alıkonmanın yani immobilizasyonun hacimsel hidrojen üretimini artırdığı konusunda ortak bir kanıya varılmıştır.

Karışık mikrobiyal konsorsiyum kullanılması

Biyohidrojen çalışmalarının çoğu saf kültürlerle gerçekleştirilmiştir ancak endüstriyel koşullar düşünüldüğünde steril olmayan koşullarda çalışmak çok daha avantajlı olacaktır. Bu nedenle elde edilmesi ve işletilmesi kolay karışık kültürlerle çalışmak hidrojen enerjisinin sürdürülebilirliği açısından önemli bir faktördür.

Var olan yol izlerinin metabolik mühendislikle geliştirilmesi

Metabolik mühendislik yöntemleri son zamanlarda H_2 üreten mikroorganizma kapasitelerinin artırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygun genetik müdahalelerle enzim sentezleri ile sistemdeki

olumsuzlukları giderme yolları tespit edilmeye çalışılmaktadır. Bu konuda en çok çalışma *Escherichia Coli* ile yapılmıştır. Tüm genetik çalışmalarda bu organizma; genomunun kolaylıkla manipule edilebildiği, metabolizması anlaşılmış en iyi bakteri olduğu ve hali hazırda pek çok şekeri parçalayabildiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan genetik müdahalelerin amacı substratın tam olarak kullanıldığı bir H_2 üretim sistemi oluşturmaktır (Hallenbeck, 2009).

Sistematik müdahaleler

Hidrojen üretim hızını artırmak için uygulanabilecek sistematik müdahaleler ise; H_2 kısmi basıncını kontrol altında tutma, oluştuğu anda H_2 'yi uzaklaştırma, karıştırma hızını artırma, dışarıdan N_2/CO_2 ekleme, fosfat sınırlaması ile H_2/VFA (Uçucu Yağ Asidi) üretimini dengede tutma gerektiğinde sisteme fosfat ekleme ve mikroorganizmanın tipine en uygun sıcaklıklarda çalışma şeklindedir. (Hawkes et al., 2002).

Biyohidrojen üretiminde karışık konsorsiyuma ön işlem uygulamaları

Günümüzde ticari hidrojen üretiminin %95' i doğalgazın buharlaştırılması ve kömürün gazlaştırılması ile elde edilmektedir. Bu prosesler fosil yakıtların kullanılması ve çevre dostu değildirler.

Hidrojen üretiminin sürdürülebilirliği açısından ucuz ve faydalı bir prosesin bulunması çok önemlidir. Aşının hazırlanması, reaktörün başlangıç zaman dilimi ve hidrojen üretiminin ilerleyen basamakları sürekli hidrojen üretimi eldesi açısından çok önemlidir. Hızlı bir şekilde büyük ölçekli üretime geçerken hali hazırda hidrojen üreten bakterilerin elde bulunması çok önemlidir. Hidrojen üretiminde rol alan başlıca türler *Clostridium*, *Escherichia Coli* ve *Enterobakter*'lerdir. Bu türler doğada çamur toprak atık su çamuru, kompost ve hayvan atığı gibi kaynaklarda bolca bulunmaktadır.

Hidrojen üretim çamurunun elde edilme basamakları

- Kaynağın elde edilmesi (çamur, kompost vs gibi kaynaklardan)
- Aşının hidrojen üreten mikroorganizmalarca baskın hale gelmesi

- Aklimasyon (alıştırma süreci)

şeklindedir.

Hidrojen üreten bakteriler organik atık suların değerlendirilmesinin yanı sıra çok temiz bir enerji üretimi sağlarlar. Karışık kültürlerin saf kültürlerle nazaran; çalışma ortamının steril olmasına gerek olmamasından dolayı işletiminin ve kontrolünün kolay olması, atık suların sterilizasyon işleminden geçirilmeksizin doğrudan prosese verilebilmesi, elde edilme yöntemlerinin ucuz ve kolay olması gibi avantajları mevcuttur. Ancak; *Clostridium* ve *Enterobakter* gibi türlerin fonksiyonları yine karışık kültür içinde yer alan metanojen ve homoasetojen gibi hidrojen kullanan türler tarafından baskılanmış olabilir bu nedenle metanojenik türlerin baskılanması için ön işlemlerin uygulanması gerekmektedir (Wang and Wan, 2008).

Organik substratlardan fermantatif hidrojen üretiminde düşük hidrojen üretim verimlerine neden olan sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır. Büyük ölçekli çalışmalarda hidrojen üreten bakterilerin baskın olduğu bir kültür kompozisyonu kullanmak çok önemlidir (Ren et al., 2007). Anaerobik bakterilerde organik substratların ışık kaynağı yokluğunda gerçekleşen karanlık fermantatif hidrojen üretim prosesi gelecek vaat etmektedir. Bu prosesin ham organik kaynaklardan olan atıkların değerlendirilmesini sağlaması gibi çevresel katkıları bulunmaktadır. Asidojenik bakteriler olarak da adlandırılan hidrojen üreten bakteriler ve metanojenik bakteriler olarak bilinen hidrojen kullanan bakteriler arasındaki fizyolojik farklılıklar uygulanacak zenginleştirme prosedüründe önemli anahtarlardır. *Clostridium*'lar yüksek sıcaklık, asitlik, alkalinite gibi ekstrem koşullarda sporlanabilirken metanojenikler ekstrem koşullara karşı dayanıksızdır. Metanojenikler aynı zamanda zorunlu anaerobik *archeabakter*lerdir yani aerobik ortama maruz kaldıklarında oksijen adenilaz yüklerini indirgeyerek ölmelerine neden olur. Tam tersi olarak *Clostridium* ve *Enterobakter*'ler oksijen varlığında da büyüeyebilen fakültatif bakterilerdir (Zhu and Beland, 2006).

Termofilik karanlık fermantatif hidrojen üretimi yüksek reaksiyon hızı ve daha iyi proses performansı sağlayarak artırılmış enerji dönüşümü ve kontamine edici hidrojen tüketen mikroorganizma problemlerini indirger. Aynı zamanda çoğu yiyecek üretim prosesi atık sularının yüksek sıcaklıkta olmalarından dolayı endüstriyel açıdan çok avantajlı oldukları düşünülmektedir (O-Thong et al., 2009).

Ön işlemler hız sınırlayıcı basamak olan hidroliz basamağının hızlandırılmasını sağlayarak hidrojen üretiminin iyileştirilmesine katkıda bulunur. Karışık konsorsiyuma uygulanabilecek çeşitli ön işlem yöntemleri mevcuttur. Bunlardan bazıları; ısı ön işlem, asit muamelesi, baz muamelesi, BESA (2-Bromoetanosulfonat), kloroform muamelesi, TCl(Tri-kloroasetik asit)'tir.

Asit muamelesi

Asit muamelesi H₂ üreten bakteriler uzaklaştırılırken, metanojenik aktiviteyi baskılayarak spor oluşturan bakterilerin korunması açısından verimli bir ön işlemdir. Çoğu metanojenik bakteri pH 6.8-7.2 aralığında yaşamını sürdürebilirken hidrojen üreten bakteriler daha düşük pH koşullarına dayanabilirler. Yani metanojenik bakteriler kültüvasyon koşullarının düşük pH koşullarında kontrol edilmesiyle baskılanabilir. Asit ön işlemlerinde genellikle 1N Hidroklorik veya orto-fosforik asit aşı ortamına katılarak ortam pH sı 3-4 değerlerine indirgenerek sürekli karıştırma ile 24 saat beklenir. Wang et al., (2008) belirtilen proses sonucunda 0.8 mol H₂/mol glikoz ; Hu and Chen (2007) ; 0.72 mol H₂/mol glikoz; Mu et al., (2007); 2.6 mol H₂/mol süktroz, Ren et al. (2008) ; 50 mL hidrojen verim değerleri elde etmişlerdir. Zhu et al. (2006) ise karıştırma işlemini 30 dakikada keserek 3.1 mol H₂/mol süktroz verimlerine ulaşmışlardır.

Baz muamelesi

Alkalın muamelesi olarak da bilinen baz muamelesi ekstrem koşullar oluşturarak metanojenlerin büyümesini baskılayabilir. Baz muamelesinde genellikle 1 N NaOH çözeltisi karışık kültüre pH değeri 10-11 olana dek eklenir ve 24 saat karıştırılarak bekletilir.

Wang et al. (2008) kültür pH'ı sını 10 a 1 N NaOH ile getirdikten sonra 24 saat karıştırarak bekletmiştir. Kesikli reaktörde gerçekleşen çalışmanın ardından 1.09 mol H₂/mol glikoz; Chen et al. (2006) aynı koşullarda 0.58 mol H₂/mol glikoz, Mu et al. (2007), pH 12 değerinde muamale ederek 0.96 mol H₂/mol süktroz verim değerleri elde etmişlerdir.

Sodyum 2 bromoetanosülfonik asit (BESA) muamelesi

Sodyum 2 bromoetanosülfonik asit (BESA) kimyasal metanojen inhibitörüdür. BESA özellikle metanojenlerde bulunan ko-enzim M'in yapısal analogudur. BESA ile kimyasal muamele metanojenesis için şef komponent olan co enzim M redüktaz komponentini inhibe ederek H₂ üretimini etkilemeyen ancak metanojenik aktiviteyi inhibe edici bir yöntemdir. Bazı durumlarda BESA ya dayanıklı mutantlar oluşabilir ve asetat prosesini de inhibe edebilir. Zhu and Beland (2006) 10 mmol BESA ile 30 dakika muamele ederek yaptıkları çalışmada 5.28 mol H₂/mol süktroz verim değeri elde etmişlerdir.

Kloroform

Kloroform anestezi etkisi olan kimyevi bir maddedir. Kimyasal formülü CHCl₃ olup triklorometanda denilmektedir. Ağır ve renksiz bir kimyasaldır. 61°C'de kaynar ve kolaylıkla buharlaşır. 1831 de Justus Liebig tarafından keşfedilmiştir. Organik sentez proseslerinde de kullanım alanları mevcuttur. CH₄'ün H₂/CO₂ 'den üretimini önler. 100 mikrometre gibi çok düşük konsantrasyonlarda bile topraktaki mikrobiyal kontaminasyonun çok büyük kısmını öldürdüğü söylenmektedir. Kloroform metanojenler için güçlü bir inhibe edici ajandır. Kloroformun buharlaşmasıyla gram negatif bakteriler ölür ve mikrobiyal populasyon gram pozitif bakterilere doğru kayar. Ancak kloroform sülfat indirgeyicilerin asetat tüketimini de inhibe edebilir. Bu da ne yazık ki *Clostridium thermolacticum* 'larında inhibe edilebileceği anlamına gelmektedir. Wang et al. (2008) %2 lik kloroform muamelesi ile 0.69 mol H₂/mol glikoz; Hu and Chen (2007) %0.1'lik muamamele ile 1.17 mol H₂/mol glikoz; Liang et al. (2002) %2 lik kloroform muamelesi ile 0.005 mol H₂/mol glikoz; Argun and Kargı (2009) %0.05'lik kloroform muamelesi ile 0.29 mol H₂/mol glikoz verim değerleri elde etmişlerdir.

Trikloroasetik asit (TCl)

Tri kloroetanoik asit olarak da bilinen trikloroasetik 3 hidrojen atomu ve metil grubu yerine klor atomu içeren bir asetik asit analogudur. İlk kez 1840 yılında Jean-Baptiste Dumas tarafından keşfedilmiştir.

Uygun katalizör varlığında klor ve asetik asit reaksiyonu ile oluşur.



TCl metanojen inhibitörü olarak kullanılabilecek bir kimyasaldır (Speece ,1996).

Isıl muamele

Isıl işlem spor oluşturmayan bakterilerin elimine edilmesinde kullanılır. Karışık kültürde yer alan metanojenik arkealar termal olarak baskılanır ve kültür sporlu *Clostridiumlar*'la zenginleşmiş olur. Aynı zamanda uçucu yağ asidi oluşumunun ardındaki basamakta metanojenik aktiviteyi baskılayarak H₂ üretimine yönlendirir. Isıl işlem çalışmaları 80-104°C arasında 15-20 dakikalık zamanlarda gerçekleştirilmiştir. Isıl işlem spor oluşturmayan mikroorganizmalardan vejetatif hücreleri öldürür ancak bunun yanında *Enterobakter* türleri gibi H₂ üreten ve spor oluşturmayan bakterilerin de yok olmasına neden olabilir. Isıl işlemin bir diğer dezavantajı kısa süreli kararlılık göstermesi ve zaman zaman tekrar edilme gerekliliğidir. Aynı zamanda büyük ölçekli çalışmalarda büyük miktarlarda enerji kaybına da neden olmaktadır. Karışık konsorsiyumda hidrojen üreten bakterilerin baskın hale geçmesi için en sık kullanılan yöntem ısıtılma işlemidir. Wang et al. (2008), 100 °C de 15 dakika kaynatılmış aşığı kullanarak 1.78 mol H₂/mol glikoz; Oh et al. (2004), 104 °C de 2 saat kaynatılmış kültür ile 0.97 mol H₂/mol glikoz; Argun et al. (2009), 10 saat kaynatma işlemi ön işleme maruz bırakılmış aşı ile 1 mol H₂/mol glikoz; Hu and Chen (2007), 30 dakika sıcak su banyosunda kaynatarak yapılan ön işlem sonucu 1.1 mol H₂/mol glikoz; Mohan et al. (2008), 20 dakika kaynatma sonucu elde edilen aşı ile 3.18 mol H₂/mol sükröz; Mu et al. (2007), 100 °C de 1 saatlik kaynatma muamelesi sonucu 4 mol H₂/mol sükröz verim değerleri elde etmişlerdir.

Birleştirilmiş yöntemler ve karşılaştırma çalışmaları

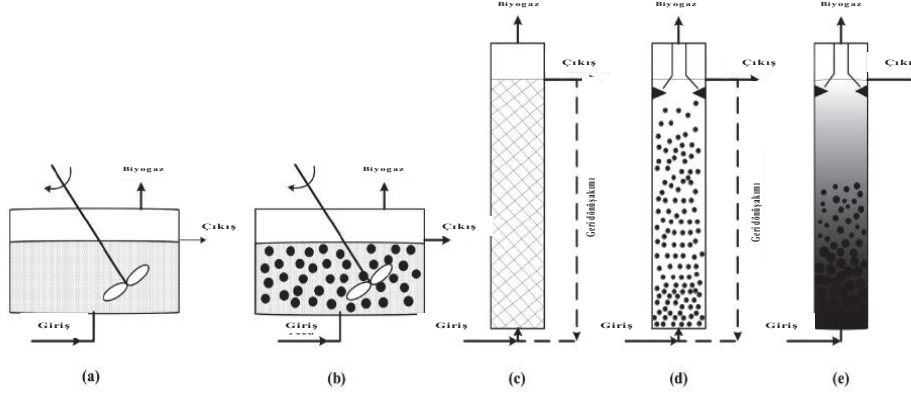
Bazı araştırmacılar tarafından ise yukarıda sayılan başlıca yöntemler ve bazı farklı yöntemler birleştirilerek çeşitli ön işlem denemeleri yapılmıştır. Cheong and Hansen (2006), beş değişik yöntem denemiş (asit, BESA, ısıtılma işlem, kuru ısıtılma işlem ve dondurma-çözdürme) ve en iyi yöntemin asit muamelesi olduğuna karar vermiştir. Hu and Chen (2007), üç değişik yöntem denemiş (asit-ısı-kloroform) ve en uygun yöntemin kloroform muamelesi olduğuna karar vermiştir. Zhu and Beland (2006), altı değişik yöntem denemiş (asit-baz-ısı-havalandırma-BESA-

iodopropan) ve ilk kesikli denemelerde iodopropan, ikinci kesikli denemelerde baz muamelesinin en iyi olduğunu belirtmişlerdir. Mu et al. (2007), üç yöntem denemiş (asit-baz-ısı) ve en iyi yöntemi ısıl işlem olarak belirtmişlerdir. Mohan et al. (2008), yedi yöntem denemiş (asit-ısıl işlem-BESA ve dört kombinasyon) ve BESA'nın en iyi yöntem olduğuna karar vermişlerdir. Argun and Kargı (2009), ısıl işlem ve kloroform ile değişik kombinasyonlarını denemiş ısıl işlemin en iyi olduğuna karar vermişlerdir. O-Thong et al. (2009), beş yöntem denemiş (baz-asit-BESA-yüklem şoku-ısıl işlem) ve en iyi yöntemin yüklem şoku olduğuna kanaat getirmişlerdir. Ren et al. (2008), dört değişik yöntem denemiş (ısıl işlem-asit-baz-sıralı havalandırma) ve sıralı havalandırmanın en iyi yöntem olduğuna karar vermişlerdir. Wang et al. (2008), beş değişik yöntem denemiş (asit-baz-ısı-havalandırma-kloroform) ve ısıl işlemin en iyi olduğunu bildirmişlerdir

Görüldüğü gibi karışık kültürlerle yapılacak ön işlem çalışmaları aşı kaynağı ve kullanılacak substrata göre farklı ön işlem koşullarına ihtiyaç duymaktadır. Hiçbir yöntemin bir diğerine üstünlüğü olmamakla beraber her araştırmacı tarafından farklı bir yöntem en iyi olarak ilan edilmiştir. Bu nedenle yapılacak çalışmalar öncesinde kullanılacak karışık kültür için en uygun ön işlemi belirlemek hidrojen üretim verimlerinin artırılması açısından önemli bir basamaktır.

2.4. Karanlık Fermantasyonla Biyohidrojen Üretimi İçin Kullanılan Reaktör Konfigürasyonları

Hidrojen üretiminde sürdürülebilir ve kirlilik oluşturmayan özellikleri dolayısıyla, biyolojik prosesler ve biyoreaktörler, üzerinde yoğun olarak çalışılan konulardır. Biyohidrojen üretiminde reaktör konfigürasyonları en basit haliyle tank ve kolon şekilli olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Şekil 2.1 'de ise bazı reaktörlerin şematik gösterimleri yer almaktadır (Çetinkaya Dokgöz, 2009).



Şekil 2.1. Biyohidrojen üretiminde kullanılan bazı reaktör tiplerinin şematik gösterimleri
(a) Sürekli tam karıştırılmalı reaktör (CSTR) (b) immobilize hücre içeren CSTR (c) sabit yataklı reaktör (d) akışkan yataklı reaktör (e) Yukarı akışlı çamur yatak reaktörü (Çetinkaya Dokgoz, 2009)

Biyohidrojen üretimi için üzerinde en çok çalışılmış olan reaktör konfigürasyonu sürekli karıştırılmalı tank reaktörler (CSTR)'dir. Bu tip geleneksel sistemlerde karışım ortamında hidrojen üreten bakteriler askıda dururlar ancak biyokütlenin reaktörde kalış süresini hidrolik alıkonma zamanı (HRT) çok etkiler. Düşük HRT'lerde biyokütle reaktörden yıkanarak uzaklaşabilir. Yani hidrojen üretim hızları CSTR da biyokütle alıkonma zamanı ve hidrolik yükleme hızlarıyla sınırlanır. İmmobilize hücre sistemleri askıda sistemlere göre önemli bir alternatiftir. Çünkü bu sistemlere daha yüksek seyrelme hızlarında yıkanarak uzaklaşma riski olmaksızın yüksek biyokütle konsantrasyonları sağlanabilir. Biyohidrojen fermantasyonu diğer pek çok fermantasyona benzer olarak, sürekli ya da kesikli modda sürdürülebilir. Kesikli fermantasyon denemeleri, başlangıç optimizasyon denemeleri için daha uygundur (Kapdan and Kargi, 2006; Davila-Vazquez et al., 2008), fakat endüstriyel olarak uygulanabilir bir üretim için proses sürekli ya da en azından yarı sürekli olarak gerçekleştirilmelidir.

2.5. Foto-Fermantasyon Verimlerinin Artmasına Yönelik Stratejiler

Metabolik yöntemler

Foto-fermantatif bakterilerle hidrojen üretiminde yüksek ışık duyarlılıkları fotosentetik antenlere sahip suşlarla artırılabilir. Kondo et al. (2002), tarafından yayınlanan bir makalede LHII içeriğindeki %50 düşme ile 205 lüks ışık yoğunluğunda hidrojen üretim hızında %50 artış gözlenmiştir. Kim et al. (2004),

tarafından yapılan bir çalışmada ise pigmentleri indirgenmiş mutant *R. Sph.* ile 6830 lüks ışık yoğunluğunda daha yüksek hidrojen verimleri elde edilmiştir.

Daha farklı metabolik değişiklikler de substrat dönüşüm verimlerini artırabilir. İndirgenmiş ferrodoksin havuzunda gerçekleşen reaksiyonlar da verimleri artırabilir. Foto-fermantasyonda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlardan elektron akışını nitrojenazdan uzaklaştıran metabolik reaksiyon indirgenebilirse hidrojen verimlerinde artış sağlanabilir. Bunun için çok değişik yollar hedef alınabilir. Örneğin, fazla karbon koşullarında yani nitrojenaz aktivitesi için önemli olan C/N oranının yüksek olması koşulunda indirgenmiş karbon depolama bileşiği olan polihidroksi bütiratın salgılanması aktive edilebilir. Buna göre teorik olarak phb mutantlarının verimi yükseltmesi beklenir. Ancak pratikte bunun gerçekleştirilmesi kolay bir işlem değildir. Bir phb mutanı olan *R. Sph.* 'in malat üzerinde büyütülmesi ile spesifik hidrojen üretiminde %34 artış sağlanmıştır ancak hacimsel hidrojen üretimindeki artış %21'de kalmıştır (Kim et al., 2006). Dahası en çok asetat üzerinde büyümesi beklenen mutant suş bu substrat üzerinde çok zayıf büyüme göstermiştir. Genel olarak hup⁻ suşlarla küçük ama kayda değer hidrojen birikimleri gözlenmiştir (11-40%) (Liu et al., 2010).

Foto-fermantatif olarak hidrojen yüksek enerji tüketimi ile nitrojenaz enzimi sayesinde üretilmektedir (4ATP/H₂). Buna göre nitrojenazın [FeFe] hidrojenazla yer değiştirmesi iki sonuç doğurabilir. Birincisi düşük döngülenme hızı olan bir enzim (6.4 s⁻¹) daha yüksek döngülenme hızında bir enzimle (2000-6000 s⁻¹) yer değiştirecektir. Bu durum hacimsel hidrojen üretimlerinde artış ve tutulmuş fotonlardan ATP üretimi gereksinimini düşürerek, daha yüksek ışık dönüşüm verimleri elde edilmesini sağlayacaktır. Ancak pratikte yapılan çalışmalarda bu teorik bilgi tam olarak desteklenmemiştir (Koku et al., 2002).

Görünüşe bakılırsa metabolik yollar ve metabolik mühendislik yöntemleri uygulanarak foto-fermantatif hidrojen üretimlerinde verimleri artırılabilecek pek çok olanak mevcuttur. Değişik yol izleri ve değişik mutasyonlar üzerine araştırmalar halen devam etmektedir.

Biyoreaktör koşullarının ve substrat kaynaklarının iyileştirilmesi

Reaktör tasarımı ve kültürleme

Işık doygunluğu fotosentetik proseslerde verimlilik ve verimi, özellikle biyokütleyi çok etkileyen bir faktördür. Bu şartı sağlarken dikkat edilmesi gereken önemli nokta güneş ışığının fazla absorpsiyonundan korunmaktır (Melis et al., 1999). Enerji dönüşüm verimleri ile güneş enerjisi yoğunluğu arasında ters bir ilişki bulunmaktadır (Polle et al., 2003).

Foto-biyoreaktörlerde ışık kullanımı, enerji ve verimliliği etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Hidrojen üretimi için kullanılacak bir foto-biyoreaktörde diğer önemli parametreler; pH, sıcaklık, ışığın penetrasyonu, karıştırma türü ve büyüme ortamının kompozisyonudur. Foto-biyoreaktörlerde yatay, dikey tübüler, düz tabaka gibi çok çeşitli reaktör geometrileri kullanılmıştır. (Eroglu and Melis, 2011).

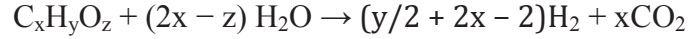
Reaktör tasarımında bir diğer önemli nokta karıştırmadır. Karıştırma reaktörde bir yandan üretilen hidrojenin uzaklaştırılmasını sağlarken bir yandan da mikroorganizmalar ve besin maddelerinin temasını artıracak ve ışıkla temas süresini uzatacaktır (Koku et al., 2003). Karıştırma ile aynı zamanda reaktör içinde sıcaklığında eşit olarak dağılması sağlanmaktadır. Genellikle büyük hacimli reaktörlerde inert bir gazla baloncuk püskürtme yöntemi kullanılmaktadır. Mekanik karıştırma büyük ölçekli sistemlerde ekonomik olarak kullanımı mantıklı olmamakla birlikte kayma gerilimleri oluşturması bakımından da fazla tercih edilmemektedir. Foto-biyoreaktörlerde hidrojen üretim hızlarının sabit tutulması için reaktöre substratın yavaş bir şekilde verilip üretilen gazın hızlı bir şekilde uzaklaştırılması önemli bir avantaj sağlayacaktır (Argun and Kargı, 2011).

Foto-biyoreaktörlerde hidrojen üretimi genellikle en yüksek seviyeye, kültürler durgun faza ulaştıklarında gerçekleşir. Bu nedenle reaktör içinde hidrojen üretimi açısından aktif biyokütlenin sürekli olarak aktif halde kalabilmesini sağlamak amacıyla eksponansiyel fazda kültürleme sürekli olarak yapılabilir.

Substrat kaynakları

Foto-fermantatif bakteriler çoğu karbon ve azot kaynağını kullanabilmelerine olanak sağlayan çok çeşitli metabolik yol izlerine sahiptir. Bu kabiliyetleri bakımından foto-fermantatif bakterilerin türleri arasında hatta aynı türün farklı suşları arasında dahi farklılıklar gözlenebilmektedir.

Spesifik bir substratın hidrojen üretim performansının belirlenmesinde iki kriter sık olarak kullanılmaktadır: Birincisi kültür miktarı ya da bakteri kuru ağırlığına dayanan gaz üretim hızıdır (miktar/zaman), ikincisi ise substrat kullanım verimidir. Substrat kullanım verimi, hidrojen üretimi için ne kadar substratın kullanıldığını ifade eder ve teorik olarak substrat başına üretilen hidrojenin gerçek mol değeridir.



Yüzde substrat kullanım verimi için ifade:

% Substrat Kullanım Verimi = $100 \times (\text{gerçek hidrojen üretim değeri} / \text{teorik hidrojen üretimi})$

Işık yoğunluğu

Foto-fermantasyonda maksimum hidrojen üretimi için gerekli en önemli şartlardan biri de optimum ışık kullanımıdır. Florasan, halojen, optik fiber, neon tüplerden seçilen yapay ışık kaynakları foto-fermantatif bakteriler ile hidrojen üretiminde kullanılabilir. Foto-biyoreaktör için yalnız güneş ışığı kullanılabileceği yapay ışık kaynakları tek, ikili ya da kombinasyonlar halinde de kullanılabilir.

Işık dönüşüm verimi mikroorganizma tipine göre değişmektedir. Laboratuvar koşullarında, *R. Sph.* ile % 6-8 maksimum enerji dönüşüm verimi (hidrojen gazı üretiminin yanma enerjisi/ perdeli ışık enerjisi olarak ifade edilir) elde edilmiştir (Miyake et al., 1982). Oksijensiz ortamda hücre büyümesi için 4000-6000 lüks ve hidrojen üretimi için 6000-10000 lüks ışık şiddeti tercih edilmektedir (Basak and Das, 2007). Genellikle foto-biyoreaktörler dışarıdan aydınlatılmaktadır ve aydınlatılan tarafın dış yüzeyine düşen ışık şiddeti göz önünde bulundurulmaktadır. Sasikala et al., (1991), *R. Sph.* O.U.001 için optimumun üzerindeki ışık şiddetinin biyokütlenin büyümesini olumlu etkilediği

ve foto-hidrojen üretimini inhibe etmediğini rapor etmiştir . Başka bir çalışmada ise, fotosentetik bakteri kültürünün sürekli aydınlatma ile karşılaştırıldığında karanlık ve ışık döngülerinin kullanılmasının hidrojen üretimini arttırdığı rapor edilmiştir (Koku et al., 2002).

Nath and Das (2009), *R. Sph.* O.U.001 suşu ile ışık yoğunluğunun hidrojen üretimi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada; ışık şiddetinin artırılmasının toplam gaz içerisindeki hidrojen içeriğinin ve hidrojen üretim hızının artmasına sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat, ışık yoğunluğunun artırılması ile birlikte, ışık dönüşüm verimi azalmıştır. Maksimum ışık dönüşüm verimi % 0.51 olarak, 2500 lüks gibi oldukça düşük ışık yoğunluğunda, gözlenmiştir. *R. Sph.* O.U. 001 suşu ile yapılan başka bir çalışmada, ışık yoğunluğunun artırılması ile birlikte hidrojen üretim hızının arttığı ve yaklaşık 18500 lüks doygunluğa ulaştığı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada, infrared ışığın yokluğunda hidrojen üretiminin % 39 oranında düştüğü, ve karanlık periyotlarda hidrojen üretilmediği gözlenmiştir (Uyar et al., 2007).

Sıcaklık

Foto-fermantatif bakterilerin metabolik yol izinin hidrojen üretimine doğru kaydırılmasında, optimum reaksiyon sıcaklığı önemli yer tutmaktadır. *Rhodobacter* türlerinden hidrojen üretimi için optimum ortam sıcaklığı 31-36° C arasında değişmektedir. Prosesin maliyetinin düşürülmesi için sıcaklık kontrol sistemi ekonomik önem arz etmektedir.

2.6. Foto-Fermentasyonda Kullanılan Reaktör Konfigürasyonları

Foto-fermantatif hidrojen üretiminde kesikli ve sürekli reaktörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Kesikli sistemlerde, kümülatif hidrojen üretimi hücrelerin durgun faza ulaşması ile sona ermektedir. Sürekli sistemlerin kullanılmasının avantajı, hücre popülasyonunun tercih edilebilir seyreltme hızında eksponansiyel büyüme fazında tutulabilmesidir. Sürekli hidrojen üretimi, *R. Sph.* (Eroğlu et al., 1998), *R. Rub.*, *Rp. Cap.* ve *R. Cap.* türleri için uygulanabilir bulunmuştur. Kesikli proses için, 6000 lüks ışık şiddetinde, 7.5 mM malik asit içeren 400 mL' lik foto-biyoreaktör için en yüksek hidrojen üretimi 2 mL H₂/L kültür/saat olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, gece boyunca büyütülen 30 mL bakteri kültürü ve 100 mL taze ortam ilavesi ile (sürekli fermentasyon) hidrojen üretim hızı 20 mL H₂/L kültür/saat'e çıkarılmıştır (Eroğlu et al., 1998). *R. Cap.*

için 0.04 saat seyreltme hızı/saat ve 6000 lüks ışık şiddeti altında 80 mL H₂/ L kültür/ saat hidrojen üretim verimi sürekli fermantasyon için rapor edilmiştir. Shi and Yu (2006), asetat (1.8 g/l), propiyonat (0.2 g/l) ve bütirat (1.0 g/l) karışımını kullanarak *R. Cap.* ile aşılınmış sürekli foto-fermantasyon denemeleri sonucunda maksimum hidrojen üretim hızını 37.8 mL H₂/g kuru hücre/saat, ışık dönüşüm verimini % 3.69 ve substrat dönüşüm verimini % 45 olarak rapor etmişlerdir.

Sabourin-Provost and Hallenbeck (2009), tarafından yapılan çalışmada biyodizel üretimi sonucunda açığa çıkan ham gliserolden foto-fermantasyonla hidrojen üretimi üzerine çalışılmıştır. 125 mL ortam içeren serum şişelerinde 30°C 'de 50 wattlık halojen lamba ışıklandırılmasında 6 mol H₂/mol gliserol verimlerine ulaşılmıştır.

Çalışmada aynı zamanda değişik azot kaynaklarının gliserolden hidrojen üretimine etkisi araştırılmıştır. Hidrojen üretim prosesi nitrojenazla katalizlenen bir proses olduğu için onun sentezine izin veren ortam kompozisyonlarını kullanmak önemlidir. Artan amonyum oranıyla (0 mM'dan 4 mM'a) mikroorganizmaların yoğunluğunun arttığı görülmüştür. Ancak artan biyokütle yoğunluğunun ışığın geçirgenliğini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca glutamatla da yapılan çalışmada 2 mM glutamat ile 6.2 mol H₂/gliserol verim değerlerine ulaşılmıştır. Çalışmada hem ham hem de saf gliserol kullanılmış arada çok fark olmadığı gözlenmiştir. Yapılan paralel çalışmalarda 4 mM glutamatın azot kaynağı olarak katıldığı ortamda 3.9 mol H₂/mol saf gliserol ve 4 mol H₂/mol ham gliserol; 6 mM glutamatın azot kaynağı olarak katıldığı ortamda 3.5 mol H₂/mol saf gliserol ve 3.1 mol H₂/mol ham gliserol sonuçları elde edilmiştir.

Mikrobiyal yakıt hücrelerinde elektrik üretebilen mikroorganizmalar son yıllarda yoğun ilgi çekmektedir. Ancak bu sistemlerde yüksek güç üretebilen çok az suş mevcuttur. Mikrobiyal bir yakıt hücresinden izole edilmiş *Rp. Pal.* DX-1 suşu 'nun (3600 lüks) aynı cihazda kullanılan karışık kültürden daha yüksek yoğunlukta güç ürettiği gözlenmiştir. Bu suşun çok değişik substratları (uçucu yağ asidi, yeast extract ve thiosülfat) kullanabildiği gözlenmiştir. Bu çalışma ile foto-fermantatif bakterilerin direk elektron transferi ile verimli bir şekilde elektrik üretebildiği gösterilmiştir (Xing et al., 2008).

Rp. Pal. WP3-5 suşu ile asetattan hidrojen üretilmesi üzerine Güneş Enerjisi ile Optik Fiber Reaktörü (SEEOF) ve Foto-Biyoreaktör (PBR) ile yapılan çalışmada güneş enerjisinden ışık alan optik fiberlerle ışıklandırmayı içeren

kombine bir ışıklandırma sistemi kullanılmıştır. PBR tungsten filament bir lamba ile ışıklandırılmıştır. 50 mL 'lik kesikli ve 1800 mL'lik sürekli reaktörlerde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda 2.45 mol H₂/mol asetat 1800 mL'lik sürekli sistem ile ise 48 saat hidrolik alıkonma zamanında 3.24 mol/L/saat verimlere ulaşılmıştır (Chen et al., 2008).

Üzerinde yaygın olarak çalışmalar yapılmış hibrit sistemlere örnek olan bir çalışmada karanlık fermantasyon ortamının çıkış suyu, değişik oranlarda seyreltilerek *Rp. Pal.* WP3-5 ortamına verilmiştir. En yüksek foto-H₂ üretim performansı en iyi 1:2 oranında 10.72 mL/L/h olarak ve 6.14 mol H₂/mol sükroz olarak elde edilmiştir. %88.1'lere varan H₂ üretimleri gözlenmiştir (Chen et al., 2010).

Yine Chen et al. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada iki aşamalı karanlık fermantasyon sisteminde *C. Pas.* ile 3.80 mol H₂/mol sükroz elde edilmiş karanlık fermantasyon sonucu açığa çıkan asetik ve bütirik asit bakımında yoğun olan ortam *R. Pal.* WP3-5 ortamına verilmiş ve iki aşamalı sistem sonucu hidrojen üretim verimi 10.02 mol H₂/mol sükroz olarak elde edilmiştir. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) giderim verimleri %72 olarak elde edilmiştir. Foto-biyoreaktör ortamına tutunma yüzeyi olarak %2' lik taşıyıcı kil eklenmesi ile hidrojen üretim verimlerinin 14.2 mol H₂/mol sükroza yükselmiş KOİ giderimi %90'lara ulaşmıştır.

Karanlık fermantasyon çıkış suyunda yoğun olarak bulunan beş değişik VFA çeşidinin (malat, asetat, propiyonat, bütirat, laktat) ve bu organik asitlerin karışımlarının *R. Sph.* O.U. 001 suşu içeren fotobiyoreaktörde hidrojen üretimi için kullanılması üzerine yapılan çalışmada en yüksek hidrojen üretimi malatla 24 mL H₂/L reaktör.saat olarak elde edilmiştir. En yüksek biyokütle konsantrasyonu 1.65 g/L olarak asetat içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. Substrat dönüşüm verimleri %14-50 arasında değişirken, malat tüketim hızı 0.026 mol/saat 'e ulaşılmıştır. Karışım beslenen ortamlarda önce asetat sonra propiyonat sonra da bütiratin kullanıldığı gözlenmiştir (Uyar et al., 2009).

Yeni izole edilmiş foto-fermantatif bakteri suşu ZX-5 ile atık sudan hidrojen üretimi üzerine yapılan bir çalışmada suşun büyüme aralıkları 5.5-9.5 olarak belirlenmiştir. ZX-5'in 22 çeşit karbon kaynağını kullanma potansiyeli incelenmiş, 15 tanesi ile hidrojen üretilbildiği gözlenmiştir. ZX-5 ile hidrojen dönüşüm verimleri, süksinat, laktat ve bütirattan %89.7, %81.5 ve %71.5 olarak

elde edilmiştir. En yüksek hidrojen üretim hızı 118 mL/L.saat olarak bütirattan elde edilmiştir (Tao et al., 2008).

Chen et al. (2006), asetatı karbon kaynağı olarak kullanarak *Rp. Pal.* ile H_2 üretimi üzerine yaptıkları çalışmada ışıklandırma yönteminin etkisini incelemişlerdir. Optik ışıklar, halojen lamba, tungsten filament lamba ve birleşimleri karşılaştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak asetat, azot kaynağı olarak glutamik asit kullanılmıştır. En yüksek hidrojen üretim hızı ve hidrojen verimleri tungsten lamba ile sırasıyla; 20.9 mL/saat.L olarak ve 2.47 mol H_2 /mol asetat olarak elde edilirken en yüksek hidrojen verimleri ve üretim hızı üç ışıklandırma kaynağının da birarada kullanıldığı sistemde 3.15 mol H_2 /mol asetat ve 38.2 mL/L.saat olarak elde edilmiştir.

Lo et al. (2010), yaptıkları çalışmada enzimatik hidroliz ve karanlık-foto fermentasyonun entegre sistemi ile nişastadan H_2 üretimini incelemişlerdir. Nişasta önce sıralı kesikli reaktörde *Cal. Tai.* ile parçalanarak 0.5 g indirgenmiş şeker/g nişasta verimi elde edilmiştir. Hidrolize olmuş nişasta'dan 0.22 L H_2 /L reaktör/saat H_2 üretimi *C. But.* ile pH 5.8-6 da 37°C de 12 saat HRT koşulunda elde edilmiştir. Karanlık fermentasyon çıkış suyu kullanılarak 35°C de 6830 lüks ışıklandırmada pH 7 de 48 saat HRT koşullarında *Rp. Pal.* WP3-5 ile 16.1 mmol H_2 /g KOİ ve 3.09 mol H_2 / mol glikoz verim değerleri elde edilmiştir.

Nişastanın hidrolizi sonucu elde edilen şeker çözeltisi substrat olarak kullanılarak foto-fermantasyonla hidrojen üretimi üzerine yapılan başka bir çalışmada üç değişik kaynaktan alınmış (RV, NRRL, DSMZ) suşlar kullanılmıştır. En iyi suş ile (DSMZ) 178 mL kümülatif H_2 üretimi, 1.23 mol H_2 /mol glikoz hidrojen verimi ve 46 mL H_2 /g biyokütle spesifik hidrojen üretim değerleri elde edilmiştir (Kapdan et al., 2009).

Ekonomik bir foto-fermantatif biyohidrojen üretimi; ışık enerjisinin uygun substrat konsantrasyonu ve hücre büyümesinde optimum koşulların sağlanmasıyla gerçekleşecektir. Bu proseslerde günümüzde aşılması gereken en büyük dezavantaj düşük enerji verimlerini yenmek için kurulması gereken ve büyük alan kaplaması gereken reaktörlerdir (Özgür et al., 2009). Bunun için henüz uygun tasarım tamamlanmamıştır ancak Gadhamsetty ve ark. (2008) foto-fermantasyonda biyohidrojen üretiminde proses dinamiklerinin tespiti için kinetik model geliştirmişlerdir. Hücre büyümesi, substrat tüketimi, hidrojen üretimi, biyokütles inhibisyonu, ışık etkisi ve substrat etkisi gibi 17 parametreyi

incelemişlerdir. Model biyokütles olarak *R. Sph.* seçmiş substrat olarak da malik aside karar vermişlerdir. Literatürde var olan datalardan yola çıkmış aralarında korelasyon katsayısı 0.9 olan 4 ayrı araştırmacının verilerinden faydalanmışlardır. Yapılan model simülasyonu ile hidrojen veriminin 4000-7000 lüks lere çıkabileceğini tespit etmişlerdir.

2.7. İmmobilizasyon

İmmobilizasyonun tarihçesi

İlk defa 1950’li yıllarda enzimler suya dayanıklı sistemler içinde tutuklanarak verimleri arttırılmış; geri dönüştürme ve saflaştırma işlemlerinde kolaylık sağlanmıştır. Bu teknik daha sonra geliştirilmeye devam edilmiş ve ilk defa 1969 yılında endüstriyel ölçekte enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sistemlerindeki geliştirme işlemleri 1970’li yıllarda çoklu immobilizasyon ve ko-faktör şeklinde geliştirilmeye devam edilmiştir. Aynı yıllarda Abbott, Jack, Zajic ve Vieth tarafından hücre immobilizasyonu denemeleri başlatılmıştır. Türlerin saf bir şekilde immobilizasyonu şeklinde başlayan çalışmalar daha sonra fermantasyon teknolojilerinde de uygulanmaya devam edilmiştir. O yıllarda immobilizasyon için: “Mikrobiyal hücrelerin belirli bir alana metabolik aktivitelerini devam ettirecek ve tekrar kullanılmalarını sağlayacak ortam koşulları sağlanarak hapsedilmesi” tanımı yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda biyofilm oluşumunun da bir immobilizasyon yöntemi olduğu kanaatine varılmıştır. Atkinson ve Davies ilk defa tam karıştırmalı mikrobiyal film fermantörü terimini ortaya atmıştır (Webb et al., 1996).

Fermantasyon prosesleri mikroorganizmaların hücre kültürü ve kültürlenmiş hücrelerin kompleks metabolik aktiviteleri sonucu ortaya çıkan fermantasyon ürünleri tanımlarını kapsamaktadır. Fermantasyon proseslerinde immobilizasyonda en önemli faktör hücrelerde fizyolojik bir baskı oluşturmada ürünün elde edilebilmesidir. Araştırmacılar için immobilizasyon çalışmaları hala günümüzde merak konusu olmaya devam etmektedir (Webb et al., 1996).

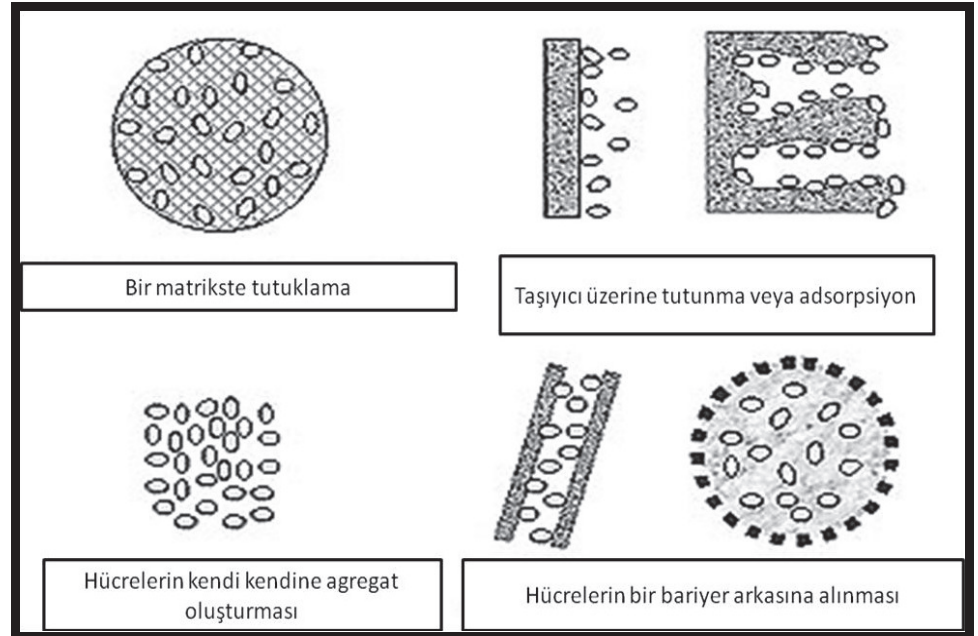
Hücre immobilizasyonu

Bir fermantasyon ortamının en önemli bileşenleri mikroorganizma gruplarıdır. Askıda sistemlerde fermantasyon ortamında mikroorganizmalar akışkan ortamın bir parçasıdır. Ortamdan sıvı uzaklaştırılması durumunda hücreler

de uzaklaştırılmaktadır. Sürekli ve tekrarlı kesikli sistemlerde hücrelerin geri dönüşünün sağlanamamasından dolayı bu oldukça olumsuz bir durumdur. Hücrelerin metabolik aktivitelerini kaybetmeden uygun ortama hapsedilmeleri ancak immobilizasyonla mümkün olabilmektedir. Bu durum hücrelerin ve ortamın hidrodinamik karakterlerini göz önünde bulundurarak, efektif hücre yoğunluğunun sağlanması ile mümkün olacaktır. Immobilizasyon bazı tekniklerle gerçekleştirilebileceği gibi kendiliğinden de oluşabilir. Atık su sistemlerinde biyofilm oluşumu bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Webb et al., 1996).

İmmobilizasyon yöntemleri

Günümüze dek yapılan çoğu hücre immobilizasyonu sisteminde enzim immobilizasyon yöntemlerinden esinlenilmiştir. Hücrelerin fizyolojisine en uygun immobilizasyon yönteminin seçilmesi çok önemlidir. Fermantasyon proseslerinde hücreler canlı, çok sayıda olmalıdır bunun yanı sıra büyüyen ya da büyümeyen hücreler şeklinde olabilirler. Fermantasyon proseslerinde bir diğer önemli etmen de hücrelerin tekrar kullanım olanakları ya da ortamdan uzaklaştırılmalarının gerekliliğidir. Günümüze dek gerçekleştirilen teknikleri belirli ana başlıklar altında; tutuklama, tutundurma, kümeleme, yüzeyler arasına alma şeklinde gruplandırabiliriz (Şekil 2.2)(Webb et al., 1996).



Şekil 2.2. Hücre immobilizasyon yöntemleri (Webb et al., 1996).

Tutundurma

İmmobilizasyon tekniklerinden hücrelerin katı bir yüzey sağlayıcıya belirli yöntemlerle bağlanması tutundurma yöntemi olarak adlandırılmaktadır. İçerdiği mekanizma tam olarak anlaşılamamakla beraber hücrelerin yüzeylere adezyonu yaygın kullanılan bir fenomen ve çoğu çalışmanın ana yöntemidir. En kolay yöntemlerden biri olarak adlandırılmakla birlikte şarap ve atık su teknolojileri gibi bilinen en eski teknolojilerden itibaren yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Geliştirilen sistemler bireysel parçacıklara tutundurma şeklindedir. Tutundurma için yaygın olarak kullanılan katı parçacıklar; kum, taş, ağaç parçacıkları ve camlar şeklindedir (Webb et al., 1996).

Tutundurulmuş hücreler dış çevre ile doğrudan bir ilişki içine girerek kayma kuvvetleri gibi olumsuz etkilere maruz kalarak kopmak zorunda kalabilirler. Bu dezavantajının yanı sıra bu immobilizasyon sistemlerinde besinle hücrenin direk teması sağlanması arada kütle aktarımından dolayı oluşabilecek kayıpların ortadan kaldırılması gibi avantajları da mevcuttur. Oluşacak biyofilmin kalınlığını kontrol altında tutmak oldukça zor bir işlemdir. Yine de tutundurma yöntemi oldukça ucuz, uygulanması kolay ve hücre yoğunluğunun sağlanması açısından faydalı bir yöntemdir (Webb et al., 1996).

Tutuklama

Tutuklama yöntemi gözenekli yapıların önceden veya hücreyle karşılaşma anında oluşturularak hücrelerin oluşturulan bölgeye hapsedilmesi ile gerçekleştirilir. Hücre büyümesi hücre ve destek materyali tipine bağlı olarak değişir. *İn situ* olarak oluşturulmuş poroz malzemelerle hemen her çeşit hücrenin immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Ancak bazı durumlar ve bazı hücre tipleri için toksik etki gösterebilir. Poroz malzemelerle tutuklama da seramik, gözeneklendirilmiş cam malzeme, gibi malzemelerle mikro-poroz yapılar oluşturulabilir. Makroskopik seviyede ise büyük gözenekli destek yapılar oluşturulabilir. Atkinson tarafından çelik tel ve köpüklü yapı olarak iki tip makroporoz malzeme geliştirilmiştir. Tutundurulmuş hücrelerin tersine tutuklanmış hücreler dış bölgelerde oluşan kayma etkisinden korunabilirler. Bu tip sistemlerde biyoreaktörlerde hiç askıda hücre gözlenmez (Webb et al., 1996).

Başka bir tip tutuklama yöntemi ise hücreleri çamursu bir yapı ya da jel içersinde malzeme ile birlikte karıştırmak koşuluyla tutuklanmasıdır. Bu

yöntemde hücre canlılığı malzemenin fiziksel yapısından hiçbir şekilde olumsuz etkilenmeyecektir. Bu işlem için K-carrageenan, agar, aljinat, kalsiyum aljinat jeli en çok kullanılan polisakkarit jellerdir. Hemen her mikroorganizma türü jelleşme yöntemiyle tutuklanabilir. Kalsiyum aljinat fosfat varlığı veya gaz oluşumu gözlenen proseslerde kararlılıklarını koruyamazlar. Jelle tutuklama yöntemleri ortamda bulunan bazı sıvılardan olumsuz etkilenme ya da hücrelerin hızlıca büyüyerek tutuklanma alanlarından taşması gibi dezavantajlara sahiptir (Webb et al., 1996).

Kümelenme

Sabit yatak ya da akışkan yatakta kullanılabilecek bir immobilizasyon yöntemidir. Hücreler floklaşma prosesi ile bir araya toplanırlar. Kule reaktörlerde doğal olarak floklaşmış maya hücreleri ile bira üretimi gerçekleştirilebilen proseslerdendir. Fungal misellerin küresel kümelenmeleri atık su arıtma tesislerinde aktif çamur için yol gösterici bir immobilizasyon yöntemi olmuştur. Normal ve doğal olarak floklaşmayan mikroorganizmalarda belli koşullar altında floklaştırıcı ajanlar kullanılabilir (Webb et al., 1996).

Bariyerler arasına alma

Hücreler bariyer arasına ya da arkasına alma yöntemiyle de immobilize edilebilirler. Bariyer ortamı iki tane birbiri içinde çözünmeyecek sıvı ile sağlanabilir. Daha çok hayvan hücre kültüründe kullanılan bu yöntem hassas hücrelerin bir membran ardından besin alımına devam etmesini sağlayan sistemlerdir. Mikro ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle hücreler geri kazanılır (Webb et al., 1996).

İmmobilize hücrelerde metabolik değişiklikler

İmmobilize hücrelerin üzerinde oluşabilecek metabolik etkiler:

- Büyüme karakteristikleri konusunda sıkıntılar gözlenebilir. Hücreler hızlı bir şekilde büyüyeceğinden ortama verilen besin miktarı yetmeyecektir ve hücreler yol-izlerini yeni koşullara göre değiştirecektir.
- Yüzey gerilimi/osmotik basınç etkisi oksijen alım hızının artması şeklinde olumlu bir etki oluşturabilir.

- İndirgenmiş su aktivitesi oksijen bağımlılığı fazla olan proseslerde olumsuz etki yapabilir.
- Hücre-hücre iletişimleri özellikle ökaryotik hücrelerde belirli biyosentetik aktivitelerde olumlu etki yapabilir.
- Hücre morfolojisinde değişimler olumlu yönde olabileceği gibi olumsuz olarak da prosesi etkileyebilir. Aşırı büyüyen hücreler tutuklanmışsa tutuklama materyalini parçalayabilecekleri gibi tutundurma yöntemiyle tutundurulularsa birbirlerinin besin ya da oksijen tutunmasını etkileyebilir, kayma gerilimden etkilenme oranları artabilir.
- Membran geçirgenliğinde iyileşmeler özellikle hayvan hücre kültürlerinde besine ulaşma ve ayırma saflaştırma basamaklarında kolaylık sağlayacaktır.
- Ortam temini konusunda, kullanılacak ortamın tutunma materyaline toksik etki etmeyecek kimyasallardan oluşması çok önemlidir.
- Difüzyon kısıtlamaları konusunda, jel içine hapsederek tutuklama işlemlerinde olumsuz etkiler gözlenebilir. Besine veya oksijene ulaşamayan hücreler yol izlerini değiştirebilir.

İmmobilize sistemlerin askıda sistemlere göre avantajları

- Geri dönüşüm ve saflaştırma maliyetlerinin azaltılması
- Yüksek alıkonma zamanlarında hücre yıkanmasının önlenmesi
- Mikro çevresel koşulların iyileştirilerek yüksek performans sağlanması
- Bazı durumlarda genetik kararlılığın artması
- Kayma geriliminden hücrelerin korunması
- İyileştirilmiş kütle transferi
- İyileştirilmiş ürün verimleri

- İyileştirilmiş reaktör seçenekleri
- İyileştirilmiş ürün kararlılığı
- İyileştirilmiş reaksiyon seçiciliği
- Yüksek hücre konsantrasyonları (Webb et al., 1996)

Karanlık fermantasyonla immobilize biyoreaktörlerle hidrojen üretimi

Günümüzde kullanılan enerji kaynakları küresel ısınma çevre kirliliği ve sağlık problemlerinin başlıca kaynağı durumuna gelmiştir. Biyoyakıt üretimi tarımsal ürün üretiminin fazlasının ya da atıklarının değerlendirilmesinin yanı sıra CO₂ emisyonlarının da düşürülmesine yardımcı olur. Anaerobik proseslerle etanol ve metan üretimi, tarımsal atık değerlendirmesinin en yaygın örneklerindendir (Gavala et al., 2006).

Hidrojen enerjisi fosil yakıtlara alternatif bir enerji kaynağı haline gelmiştir (Zhang et al., 2010). Hidrojen temiz geri dönüştürülebilir ve verimli olmasından dolayı geleceğin enerji kaynaklarından. Yakıt hücreleriyle elektriğe dönüştürülebilmesi cazibesini artırmaktadır (Wu et al., 2005).

Askıda hücre sistemleri karanlık fermantasyonla H₂ üretimi için en sık kullanılan sistemdir. Ancak askıda hücre sistemlerinin sürekli operasyonu yüksek seyreltme hızlarında yıkanarak uzaklaşma sorunu ve H₂ üretim aktivitesi için biyokütlenin geri döndürülmesi gibi gereklilikleri vardır (Wu et al., 2005).

Metan içermeyen hidrojen ağırlıklı biyogazın CSTR sistemlerinde kullanılabilmesi için ana prensip hidrojen üreten bakterilerin yüksek hızda üreme avantajını kullanmaktır. CSTR sistemlerinde HRT çamur alıkonma zamanına (SRT) eşit olduğunda optimum üretim gözlenir. HRT kısaltıldığında metanojenik arkealar büyüme hızları daha yavaş olduğundan sistemden yıkanarak uzaklaşırlar. CSTR, pH ve HRT gibi çevresel parametrelere çok duyarlıdır. Yukarı akışlı anaerobik sistemler ile immobilize biyokütle inert taşıyıcılar üzerine tutundurulularak hidrojen üretimi gerçekleştirilebilir. Immobilize sistemlerin diğer avantajları yüksek yükleme, toksisite ve şoka yüksek tolerans gösterebilmeleridir. Bu sistemler sabitlemiş biyokütle açısından da oldukça avantajlıdır. Sabitleme prosesi olarak granülleşme oluşumundan faydalanılmaktadır. Ancak bu sistem

yaklaşık 120 gün uzun reaktör başlatma ihtiyaç duyar. Buna karşılık katı tutunma yüzeylerine mikrobiyal tutundurma sistemleri iyi bir alternatif olarak sunulmaktadır (Zheng et al., 2005).

Günümüze dek yapılan çalışmalarda ortak bir kanıya varılamamasının nedenlerinden biri reaktör konfigürasyonu iken bir diğeri kullanılan karışık konsorsiyumun standart özelliklere sahip olmamasıdır. Aynı ortamdan alınan karışık konsorsiyum için bile hidrojen üretim performansları açısından farklılıklar gözlenebilir. Bazı immobilizasyon çalışmalarında katı parçacıklar üzerine biyofilm şeklinde tutundurma yönteminin jele hapsedmeye göre daha avantajlı olduğu kanısına varılmıştır. Jele hapsedme yönteminde kütle transferlerinin yanı sıra uzun dönemli kullanımlarda hapsedme materyalinin dayanıksızlık göstermesi gibi sorunlar ortaya çıkmıştır. Granül çamur sistemlerinin ise biyofilm sistemlerine göre daha avantajlı olduğu öne sürülmüştür. Bazı biyofilm tutundurma yöntemlerinde kullanılan destek materyalinin de reaktörden uzaklaştığı gözlenmiştir. Hidrojen üreten mikroorganizmaların spesifik büyüme hızları yüksek olduğunda biyofilmde oluşacak hızlı kalınlaşma yine kütle aktarımı sorunlarını beraberinde getireceği söylenmektedir (Zhang et al., 2008).

Granülleşme proseslerinde ise spontane granülleşme işlemi düşük HRT ile yukarı akışlı reaktörler veya CSTR tipi reaktörlerde sağlanabilir. Ancak granüllerin oluşması için uzun başlatma zamanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Granülleşme işlemlerinde kolon reaktörler silindirik aktif karbon, küresel aktif karbon, toprak veya süngerle %90-99 porozite koşullarında doldurulabilir. Yaklaşık 4.8 saat HRT koşullarında taşıyıcı tipine bağlı olarak granülleşme görülmeye başlanabilir. Granül çamur oluşumunda taşıyıcıların rolü hala tam olarak anlaşılamamakla beraber başlatıcı çekirdek rolü üstlendikleri düşünülmektedir. Granülleşme işlemi çeşitli anyonik ve katyonik polimerlerle de hızlandırılabilir (Zhang et al., 2008).

Zhang et al. (2008) sürekli sistemlerde askıda ve immobilize sistemleri karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada; pH' yı 5.5 te sabit tutarak mezofilik koşullarda askıda, biyofilm ve granül çamur sistemlerinin yanı sıra CSTR ve akışkan yatak ile hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. CSTR ile 0.32 L/L.saat; Granülleşmiş mikroorganizma içeren reaktörde 3.2 L/L.saat ve akışkan yatak ile 6.4 L/l.saat H₂ üretim verimleri değerlerine ulaşmışlardır.

Anaerobik konsorsiyumun immobilizasyonu için dayanıklı sentetik polimerlere hapsedme yöntemi de kullanılabilir. Wu et al. (2005), etilen vinil asetat (EVA) ko-polimer yeni bir sentetik polimer üreterek bunu anaerobik konsorsiyumun immobilize edilmesinde kullanmışlardır. Mikroorganizmalar polimer maddesi ve uygun oranlarda kolajen ve aktif karbonla karıştırılarak küresel immobilize parçacıklar elde etmişlerdir. 40°C koşullarında tekrarlı kesikli reaktör sistemleri ile sükrozu substrat olarak kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada askıda sistem denemelerine nazaran 3 kat iyileştirme gerçekleştirerek 1.74 mol H₂/mol sükroz verim değerine ulaşmışlardır.

Yine aynı grup 2007 yılında yayınladıkları çalışmada (Wu and Chang, 2007) anaerobik konsorsiyumu kompozit polimerik bir matrix olan polimetilmetakrilata hapsederek kesikli ve sürekli reaktör karşılaştırması yapmışlardır. Her iki reaktör konfigürasyonunda 35°C de ve 20 g/L sükroz ile çalışmışlardır. Kesikli reaktör ile 238 mL H₂/L. Saat, sürekli reaktör ile 4-8 saat alıkonma sürelerinde ortalama 1.8 L H₂/L.saat verimlilik değerleri elde etmişlerdir. Glikozdan H₂ üretimi askıda (CSTR) ve yukarı akışlı çamur yataklı (UASB) reaktörlerde mezofilik ve termofilik koşullarda karşılaştırılmıştır. CSTR denemelerinde termofilik koşullarda yüksek hidrojen üretim hızı ve düşük mikrobiyal kütle koşullarını bir araya getirmiştir. Bu koşullarda 6 saatlik alıkonma süresinde 104 mmol H₂/saat/L/g VSS (Uçucu Katı Madde); mezofilik koşullarda ise 12 mmol H₂/saat/L/g VSS hidrojen üretimi gözlenmiştir.

UASB reaktörü ile CSTR ile yapılan çalışmaya nazaran daha düşük alıkonma değerlerinde hidrojen üretimi pH ve glikoz tüketimi açısından daha kararlı bir üretim gözlenmiştir. 2 saatlik alıkonma süresinde UASB ile 19.05 mmol H₂/saat/L CSTR ile 8.42 mmol H₂/h/L hidrojen üretim değerleri elde edilmiştir. UASB ve CSTR reaktörler arasında teknik olarak ve ekonomik verimlilik arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Gavala et al., 2006).

Anaerobik akışkan yataklar (AFB) immobilize biyoreaktör konfigürasyonu olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. AFB reaktörde tutunma materyali olarak aktif karbon kullanılan bir çalışmada (Zhang et al., 2007) 37°C’de pH 4 koşullarında HRT kademeli olarak 4 ‘ten 0.5 saate düşürülmüş, sükroz konsantrasyonu ise 10 g/L’den 30 g/L’ye çıkarılmıştır. HRT değerleri düşürüldükçe H₂ kompozisyonunda %61 den %57’ ye düşme gözlenirken aynı zamanda hidrojen üretim verimlilik değerleri maksimum 2.36 L H₂/saat/L reaktör olarak elde edilmiştir.

Reaktörün başlatılma sisteminin etkisini incelemek üzere yapılan bir çalışmada (Zheng et al., 2008) iki ayrı sistemden birincisinde reaktör kesikli olarak aşılınıp zenginleştirilmiş plastik taşıyıcılarla diğeri sadece zenginleştirilmemiş plastik taşıyıcılarla doldurulmuştur. İkinci tipte inokulum 4 gün yavaşça elle eklenmiştir. Her iki sistemde sürekli besleme ilk günden başlatılmıştır. Her iki deneme de 70 °C’ de gerçekleştirilmiştir ve substrat olarak glikoz kullanılmıştır. Zenginleştirme kültürüyle önceden aşılınan plastik taşıyıcılı reaktörde bir ay başlangıç zamanına ihtiyaç duyulmuş ve 2.21 mol H₂/mol glikoz tüketim değerleri elde edilmiştir. Diğeri reaktörde ise 8 gün başlangıç zamanına ihtiyaç duyulmuş ancak 0.69 mol H₂/mol glikoz tüketim verimleri elde edilmiştir. Başarılı bir immobilizasyon işleminde hidrolik basınç uygulamasının, biyokütlenin yıkanarak uzaklaşması riski söz konusu olsa da olumlu etki yapabileceği belirtilmiştir.

Granülleşme prosesi üzerine yapılan üç yıllık bir çalışmada (Yu and Mu., 2006) karışık asidojenik populasyonun; atık su seçiciliği, reaktör konfigürasyonu, hidrolik alıkonma zamanı, giriş substrat konsantrasyonu ve organik yükleme hızlarından etkilendiği gösterilmiştir. Reaktör performansını etkileyen ana parametreler olan; pH, sıcaklık, besin ihtiyacı, yükseltgenme-indirgenme potansiyeli gibi parametreler arasında giriş substrat konsantrasyonu ve HRT’nin de diğeri koşullara göre daha etkili oldukları öne sürülmüştür. Wu and Chang (2007) tarafından UASB reaktörü ile hidrojen üretiminin fizikokimyasal incelemesi üzerine yapılan çalışmada hücre dışı ortamda granüllerdeki protein/karbonhidrat oranının düşük tutularak daha yüksek hidrojen üretim değerlerinin elde edilmesi, karbonhidratların proteinlerden daha önemli bir rol üstlendikleri göstermiştir.

Sabit yataklı (fixed-bed) reaktörlerde biyohidrojen üretimi üzerine yapılan başka bir çalışmada (Chang et al., 2002) çamur orijinli, hidrojen üreten bakteriler ile değişik dolgu malzemelerinin biyohidrojen üretimi üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. Sabit yataklı reaktör sistemlerinde üç değişik porozlu dolgu malzemesi; loofah sponge (LS) , genişletilmiş kil (EC) ve aktif karbon (AC) ile hidrojen üretim bakterilerinin alıkonması üzerine çalışılmıştır. Immobilizasyon malzemelerinin biyofilm oluşumu; kesikli ve sürekli sistemlerde hidrojen üretimi üzerine etkilerinin karşılaştırılması sonucunda LS ‘nin biyokütle immobilizasyonu için verimsiz bir malzeme olduğu, EC ve AC’ nin daha iyi biyokütle verimleri sergilediği gözlenmiştir. Daha sonra EC ve AC sürekli reaktörlerde kullanıldığında ise sükrözün karbon kaynağı olarak kullanılması ile 0.5-5 saat

alikonma sürelerinde EC reaktöründe (300 mL) 2 saat HRT süresinde 0.415 L H₂/saat/L reaktör üretimi gözlenmiştir. Öte yandan AC (300 mL) reaktöründe 1 saat alikonma süresinde 1.32 L H₂/saat/L reaktör üretimi gözlenmiştir. AC reaktöründe yapılan ölçek büyütme işleminde reaktör hacmi 3 L'ye çıkarıldığında 1-3 saat HRT sürelerinde 0.53-0.68 L H₂/saat/L üretimi gözlenmiştir. Bir süre sonra reaktör 75°C de termal muameleye tabi tutulduğunda hidrojen üretim hızı 1 saat HRT değerinde 1.21 L H₂/saat/L reaktör üretim değerine yükselmiştir.

Wu et al. (2002), evsel arıtma çamuru immobilize ederek anaerobik şartlarda hidrojen gazı üretimini incelemişlerdir. Hücre immobilizasyonu aktif karbon (AC), poliüretan (PU) ve akrilik lâteks ve silikon (ALSC) ile kimyasal ya da fiziksel olarak modifiye edilerek jelde tutuklama yaklaşımı ile gerçekleştirilmiştir. Değişik immobilizasyon materyallerinin kesikli reaktörlerde hidrojen üretimine etkisi araştırılmıştır. Sükrozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı sistemde asetik asit ve bütirik asit'in açığa çıkan metabolik yan ürünler oldukları gözlenmiştir. Aktif karbonun aljinat jeline eklenmesi ile yani CA/AC hücre sisteminin oluşturulması ile hidrojen üretim hızının arttığı gözlenmiştir. Poliüretan ve akrilik lâteks/silikonun immobilize hücrelerin mekanik gücünün ve işletim stabilitesini arttırırken hidrojen üretim hızında düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Michelis-Menten yaklaşımı ile yapılan kinetik analizler sonucunda CA/AC hücrelerinin hidrojen üretimi için daha yüksek aktiflikte biyokatalizler olduğu PU ve ALSC hücrelerinin ise substrata daha yüksek afinitesi olduğu sonucuna varılmıştır. ALSC hücrelerinin ise PU ve CA/AC hücrelerine nazaran daha yüksek dayanıklılığa sahip oldukları gözlenmiştir.

Endüstriyel selülozik bir atık olan damıtılmış üzüm posasından karışık kültür kullanılarak fermentatif hidrojen üretimi üzerine yapılan bir çalışma sonucunda 80 g/L substrat konsantrasyonu ile 50° C'de ve pH 6 da asit ve ısıl ön işlem karşılaştırması yapılmıştır. 7.9 mmol H₂/L.gün H₂ üretim hızı elde edilmiştir (Chuang et al.,2012).

Büyük baş hayvan atıklarının sükrozla karıştırılarak net enerji kazanımının katı organik atıklardan karanlık fermentasyonla iyileştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada en iyi sükroz oranı %4.5 olarak belirlenmiş ve 2.9-5.3 M H₂/M sükroz verim ve 2-3.7 kJ/gKOİ net enerji kazanımı elde edilmiştir (Perrera and Nirmalakhandan, 2012).

Gıda atıklarından anaerobik karışık kültürlerle sürekli karıştırılmalı tank reaktörde yapılan başka bir çalışmada 379 mL H₂/L. gün hidrojen üretim hızı, 261 mL H₂/g VSS hidrojen verimi değerleri 60 saatlik HRT koşullarında elde edilmiştir. Çıkış suyunda baskın olan organik asitler asetik ve bütirik asit olarak gözlenmiştir. PCR ile yoğunluklu olarak *Clostridium* türleri gözlenmiştir (Reungsang et al. 2013).

Melastan biyohidrojen üretimi için etanol tip fermantasyon ile HRT etkisinin araştırıldığı bir çalışmada CSTR'da 4-10 saat arası beş değişik HRT'de 5 saatlik HRT değeri ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir ve 12.27 L H₂/L.saat hidrojen üretim hızı gözlenmiştir (Wang et al., 2013). Sükroz içerikli olan melas oldukça avantajlı bir organik karbon kaynağıdır.

Fasülye atıkları (FA), mısır sapları (MS) ve kentsel atıkların organik fraksiyonlarının (KAOF) en yüksek hidrojen üretimi için en uygun oranda karıştırılması için yapılan çalışma sonucunda box-behnken tasarımı ile 40.45 g/L kentsel atıkların organik fraksiyon, 30° C sıcaklık, 7.9 pH ve 86.26 saat HRT koşullarında 57.73 mL H₂/gVSS elde edilmiştir. Öncesinde yapılan tarama testleri sonucunda optimum KAOF:FA:MS oranı ;15:15:0 olarak belirlenmiştir (Sekoai and Kana, 2013).

Süt ve süt ürünleri endüstrisi atıksularında biyohidrojen üretiminin optimizasyonu için yapılan çalışmada Box-Behnken tasarımı kullanılmış, substrat konsantrasyonu, pH, KOİ/N ve KOİ/P oranları sırasıyla; 15.3 g KOİ/L, 5.5, 100.5 120 olduğunda 13.54 mmol H₂/g KOİ hidrojen verimi elde edilmiştir (Gadhe et al., 2013).

İçecek atıksularının konsantrasyonu, inokulum konsantrasyonu ve pH değerinin keskli karanlık fermantasyon prosesine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada kentsel atık arıtma çamuru inokulum olarak kullanılmıştır. 1 L H₂/L ortam maksimum H₂ üretimi ve 0.12 LH₂/L reaktör.saat hidrojen üretim hızı elde edilirken çıkış suyunda en fazla asetat ve bütirat görülmüştür (Wicher et al., 2013).

Wu et al. (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada fermantatif hidrojen üretimi öncelikle 4-12 saat arasında değişen HRT koşullarında sürekli karıştırılmalı tank reaktörde askıda kültürlerde incelenmiştir. Hidrojen üretim hızının (HPR)

HRT deęerinin 12 saatten 6 saate dūřurūlūrken arttıęı ve 6 saatte optimum deęeri olan 0.6 L H₂/saat/L reaktōr deęerine ulařtıęı gōzlenmiřtir. Ancak HRT deęeri daha fazla dūřurūldūęūnde ōzellikle 4 saatte, biyokūtle miktarının azalmasına (1.63 g VSS/L) baęlı olarak hūcre yıkanmasından dolayı çok fazla dūřūř gōstermiřtir. Silikonla immobilize edilmiř anaerobik biyoreaktōr (ICSAB) veya toz halinde aktif karbonla immobilize edilmiř hūcrelerin (AGSB) anaerobik biyoreaktōrlerde hidrojen ūretimi gōzlenmiřtir. Her iki immobilize reaktōr sisteminde de biyokūtle alıkonmasında geliřme gōzlenmiřtir. AGBS siteminde biyokūtle konsantrasyonu 10.3 g VSS/L deęerine yūkselirken hidrojen ūretim performansında ise 0.97 L H₂/saat/L reaktōr deęerine yūkselme gōzlenmiřtir. DGGE ve 16 sRNA yōntemleri ile yapılan bakteriyel komūnite analizlerinde immobilize reaktōr sistemlerinde daha farklı tūrlerin baskın olduęu gōzlenmiřtir.

Lin et al. (2006) silikona immobilize edilmiř anaerobik çamur içeren draft-tube akıřkan yatak reaktōrle fermentatif hidrojen ūretimi ūzerine yaptıkları çalıřmada 8 L alıřma hacminde bir reaktōrū 2.2-8.9 saat hidroluk alıkonma zamanlarında 5-40 g/L arasında deęiřen giriř konsantrasyonlarında denemeler gerçekleřtirmiřlerdir. Yapılan alıřmalar sonucunda dūřen alıkonma zamanı ya da artan sūkroz konsantrasyonlarında volumetrik hidrojen ūretiminde artıř gōzlerken, hidrojen veriminde dūřūř gōzlemiřlerdir. En yūksək hidrojen ūretim hızı 2.27±0.13 L H₂/saat/L reaktōr olarak 40 g/L giriř konsantrasyonunda 2.2 saat hidroluk alıkonma zamanında elde edilmiřtir. En yūksək hidrojen verimi ise; 4.98 ±0.18 mol H₂/mol sūkroz olarak 40 g/l sūkroz konsantrasyonu ve 8.9 saat hidroluk alıkonma zamanında elde edilmiřtir.

İmmobilize sistemlerde saf kūltūrlerin kullanıldıęı pek çok çalıřma gerçekleřtirilmiřtir. Jo et al. (2008), yemek atıkları arıtma tesisinden izole edilmiř *C. Tyr.* JM1 suřunun immobilize edilmesiyle biyolojik hidrojen ūretimini incelemiřlerdir. *C. Try.* JM1 atıksu arıtma tesisinden 16 sRNA gen sekanslama ve amplifiye edilmiř ribozomal DNA restriksiyon analizi ile izole edilmiřtir. Poliūretan kōpūkte immobilize edilmiř mikroorganizmalarla doldurulmuř sabit yataklı reaktōrde 2 saat hidroluk alıkonma zamanında 7.2 L H₂/L. gūn maksimum hidrojen ūretim hızına ulařılmıřtır. Hidrojen yūzdesi %50 iken substrat dōnūřūm verimi % 97.4 olarak elde edilmiřtir.

Zhu et al. (2006), hidrojen ūretiminde azotun olumsuz etkisi nedeniyle azot içerięi dūřūk olan tofu atık suyunu karbon kaynaęı olarak kullanarak agar jelde immobilize edilmiř *R. Sph.* ile yaptıkları çalıřmalarında 2.1 L/saat/m² jel hidrojen

üretimi gözlemişlerdir. Bu miktar kontrol grubu olarak kullandıkları glikoza göre oldukça yüksek olmasının yanısıra immobilizasyon sayesinde de 50 saate kadar hidrojen üretimi rapor edilmiştir. Hidrojen verimi 1.9 mL/mL olarak glikozun substrat olarak kullanıldığı sistemlere nazaran %53-65 oranında daha yüksektir.

Katı matris olarak lignoselülozik materyallerin kullanılarak *Enterobacter Cloacae* ITT-BT 08 immobilize edilmesiyle sürekli hidrojen üretimi değişik reaktör konfigürasyonlarında incelenmiştir (Kumar ve Das, 2001). Maksimum hidrojen üretimi konik ve romboid tipli reaktörlerde elde edilirken bu reaktörlerde hidrojen üretiminde problem oluşturan gaz tutulma zamanının da kontrol altına alındığı gözlenmiştir. Maksimum hidrojen üretimi 75.6 mmol/L.saat olarak 0.93/saat seyreltme hızında ve 6.4 geri dönüşüm hızında elde edilmiştir. Sürekli sistemin kullanılmasıyla kesikli sisteme nazaran 2.1 kat daha yüksek hidrojen üretimi elde edilmiştir.

İmmobilize sistemlerle foto-fermantatif biyohidrojen üretimi

Askıda hücre sistemleri ile biyohidrojen üretimi günümüze dek yaygın olarak çalışılmıştır. Askıda hücre sistemlerinin mikroorganizmalar ve substrat arasında iyi kütle transferinin gerçekleşmesi gibi önemli bir avantajı vardır. Ancak düşük HRT koşullarında reaktör içinde oluşacak hücre yıkanmaları sonucunda yeterli hücre yoğunluğunun sağlanamaması gibi bir dezavantajı da bulunmaktadır. Bunlara ek olarak askıda sistemler düşük miktarda hidrojen üretim değerleri, düşük verimler ve düşük ışık dönüşüm verimleri ile tanımlanmaktadır.

Özellikle kimyasal madde üretimi ve eczacılık uygulamalarında mikroorganizma immobilizasyonu konusu yaygın bir uygulama alanına sahiptir. İmmobilizasyon teknikleri genel olarak adsorpsiyon (biyofilm oluşumu) , enkapsülasyon ve tutuklama şeklinde üçe ayrılmaktadır. İmmobilizasyon işleminde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta immobilizasyon için seçilen materyalin toksik olmaması, dayanıklı olması ve kütle aktarım performansının iyi olmasıdır (Keskin et al., 2011). Tüm immobilizasyon tekniklerinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır (Hallenbeck, 1983). Karanlık fermentasyonla yapılmış immobilizasyon yöntemlerinin hidrojen üretimi ve biyokütle konsantrasyonuna olumlu etkileri gösterilmiştir (Zhang et al., 2008). Yapılan değişik çalışmalarda 0.5 ve 4 saat arasında değişen hidrolik alıkonma zamanlarında değişik immobilizasyon yöntemleri ile 0.93-7.33 L/L/saat arasında hidrojen üretim hızları gözlenmiştir. Askıda sistemlerle elde edilen hidrojen

üretim hızları 0.15-0.58 L/L/saat değerleri arasında değişmektedir (Zhang et al., 2007; Hallenbeck, 2009). Foto-fermantasyon işlemlerinde yapılacak immobilizasyon işlemlerinde dikkate alınması gereken en önemli konular ışık penetrasyonu ve ışık kullanım verimleridir (Liao et al., 2010). Düşük maliyeti ve kolay elde edilebilirliği nedeniyle jel tutuklama yöntemi yüksek miktarda biyokütle konsantrasyonu sağlaması ve anaerobik ortamın oluşabilmesi nedeniyle oldukça yaygın bir immobilizasyon tekniğidir. Ancak bu yöntemlerde düşük mekanik dayanıklılık, uzun dönemlerde düşük stabilite gibi dezavantajlar gözlenmektedir. Agar, agaroz, aljinat, carrageenan ve kitosan en çok kullanılan immobilizasyon malzemeleridir. Agar, agaroz ve c-carragenan içinde tutuklanmış *Rp. Pal.* ile yapılan bir çalışmada boncuk çapının 3 mm den 0.05 mm ye düşürülmesi ile hidrojen üretim değerleri 145 ten 272 $\mu\text{mol H}_2/\text{g}$ kuru madde /saat değerine yükselme göstermiştir (Fissler et al., 1995). *Rp. Pal.*'in polivinil alkol-124 ve carragenan tozuna tutuklanması ile sürekli işletim üç ay sürmüş ve 2.61 mmol $\text{H}_2/\text{L/saat}$ hidrojen üretim hızı ve 3.59 mol H_2/mol glikoz verimleri elde edilmiştir (Wang et al., 2010). Bu immobilizasyon materyali daha yüksek mekanik dayanıklılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde Tian et al. (2009), yaptıkları çalışmada PVA-borik asit granüllerine *Rp. Pal.* CQK 01'i immobilize ederek şeffaf, porozlu yapı gibi özellikleri artırmışlardır. Hidrojen üretimi 20 gün boyunca sürmüş, jeller uzun süre dayanıklılık göstermiş ve 60 mM giriş glikoz konsantrasyonu ile 3.6 mmol /g kuru hücre/saat hız ve 0.23 mol H_2/mol substrat verimleri elde edilmiştir. İmmobilize kültürler için atık sular da substrat olarak kullanılabilir. Zhu et al. (1999) tofu atıksuyunu substrat olarak kullanarak *R. Sph.* ile %2' lik agar jelde 2.1 L/saat/ m^2 maksimum hidrojen üretim hızı ve 1.9 mL/mL atıksu verimler elde etmişlerdir. Bu çalışmada aynı zamanda bakterinin amonyumun inhibe edici etkisinden de korunduğu kararına varılmıştır. PVA içine hapsetmeye dayalı immobilizasyonda elde edilen başarılı çalışmalar sonucunda PVA yönteminde polimerin çağraz bağlanma kapasitesi artırılarak LentiKat® geliştirilmiştir. LentiKat® lens şekilli hidrojeller şeklinde kolay koşullarda oda sıcaklığında ve kısa sürede üretilebilir. Reaktörde uzun süre kalabilme ve difüzyon limitlerinin yüksek olması avantajlarına sahiptir. Yüksek mekanik stabiliteye sahiptir ve biyobozunması oldukça güçtür. Yüksek sıcaklıkları da tolere edebildiklerinden dolayı 55 °C'ye kadar termofilik sıcaklıklarda immobilizasyon malzemesi olarak kullanılabilirler (Schlieker and Varlop, 2006). Daha önce polimer üretiminde kullanılan bu malzemenin foto-fermantatif bakterilerin tutuklanmasında kullanılmasıyla hidrojen üretiminde iyileşmeler olduğu gözlenmiştir (Keskin et al., 2013)

Biyofilm oluşturma yöntemi de uzun dönem alıkonabilen biyokütle ve ürün inhibisyonundan korunma gibi avantajlara sahiptir. Buna rağmen bu sistemlerde düşük ışık dönüşüm verimi gibi dezavantajlar da mevcuttur (Zhang et al., 2010). Işık kullanım verimini ve hidrojen üretim verimlerini artırmak amacıyla cam boncukların kullanıldığı bir çalışmada pH ve substrat konsantrasyonun sistem performansına etkisi incelenmiştir. 0.12 M giriş glikoz konsantrasyonun ve bu değerden yüksek değelerin substrat inhibisyonuna neden olduğu kanısına varılmıştır. En iyi değerler ise %56' lık dönüşüm ile 5000 lüks değerinde elde edilmiştir (Tian et al., 2010). Başka bir çalışmada *Rp. Pal.* CQ 01 cam bir levha üzerine tutundurulmuş, biyofilm oluşumuna, yapıya ve hidrojen oluşumuna illuminasyon etkisi araştırılmıştır. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi ile en büyük parçacıkların 590 nm' de elde edildiğı ve ışık yoğunluğu ve dalga boyunun biyofilm oluşumunda etkili olduğu gözlenmiştir. Maksimum hidrojen üretim hızı 11.2 mmol /m²/ saat şeklinde 70 mL/saat hızında hidrojeni 60 mM glikoz giriş konsantrasyonunda 0.25 mol H₂/mol glikoz şeklinde %8.9 ışık dönüşüm hızıyla elde edilmiştir (Liao et al., 2010). Düz cam yüzeylerle karşılaştırıldığında cam boncukların, yüzey alanını artırabilmesinin yanısıra iyi bir kütle transferi ve iyi bir ışık penetrasyonu sağladığı bilinmektedir. Poroz cam malzemelerin en önemli avantajı toksik olmamalarıdır. Poliüretan köpükler, cam boncuklara alternatif olarak kullanılan tutundurma malzemeleridir. Poliüretan köpüklerin dayanıklılık, yüksek yüzey hacim oranı gibi avantajlı özellikleri vardır. Poliüretan köpük *R. Sph.* GL-1 poliüretan köpük yüzey (5 mm kalınlık 114 mL hacim ve 0.5-1 mm por çapı) içeren cam küvet şeklinde 210*150*8 mm reaktörde kullanılmıştır. En yüksek H₂ üretimi (0.21 mLH₂/saat/mL matrix) olarak 2040 lüks ışık yoğunluğunda elde edilmiştir. Laktatın hidrojene dönüşümü artan ışık yoğunluğuyla artmış ve 865 derecelere ulaşmıştır (Fedorev et al., 1998).

Karanlık fermentasyon çalışmalarında aktif karbon aktif kil, silika parçacıkları gibi malzemelerin sisteme eklenmesinin sistem performansını artırdığı gözlenmiştir (Lee et al., 2004a). Bu teknik foto-fermantatif bakterilerde de uygulanmıştır (Lee, 2004b). *Rp. Pal.* WP3-5 aktif karbon, silika jel, genleştirilmiş kil (hepsi %2 oranında) katılarak 2 g KOİ/L asetattan hidrojen üretimi incelenmiştir. Reaktör içine optik fiber; ve dış ışık kaynaklarının kullanıldığı reaktör sisteminde 3000 lüks ışık yoğunluğu elde edilmiştir. 26 mL/L/saat hidrojen üretim hızı ve 2.34 mol H₂/mol asetat verim elde edilmiştir. SEM ile yapılan analizlerde *Rhodobacter* hücrelerinin taşıyıcı yüzeye biyofilm şeklinde yapıştığı gözlenmiştir (Chen et al., 2006).

Sonuç olarak sürekli foto-fermantasyonun pek çok avantajı bulunmaktadır. Hücre immobilizasyonu sürekli hidrojen üretimi için askıda sistemlere nazaran daha verimli bir yöntemdir. Jel tutuklaması ve biyofilm teknikleri geniş uygulama alanı bulmuştur. Yukarıda tartışıldığı gibi her sistemin kendine has avantaj ve dezavantajları vardır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda immobilizasyonun yüksek biyokütle konsantrasyonunun daha düşük reaktör hacimlerinde ve yüksek verimlerde elde edilmiştir. Atık sularında kullanılabilme avantajı nedeniyle gelişmeye açık sistemlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Analitik Yöntemler

3.1.1. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) analizi

Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi “Standart Methods 5220.C Closed Reflux Method” a göre yapılmıştır.

Reaksiyon tüplerinin hazırlanması:

- Girişim yapabilecek kirlilikleri gidermek için tüpler öncelikle %20’lik H_2SO_4 çözeltisi ile yıkanır.
- Reaksiyon çözeltileri Çizelge 3.1’e göre tüplere eklenir.
- Tüpler dikkatlice kapatıldıktan sonra karıştırılır.
- 150 °C’de 2 saat ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına gelene kadar soğutulur.

Dikromat indirgenmesinin ölçülmesi:

- Absorbans ölçülmeden önce tüm katı parçacıklar çöktürülür.
- Tüpün etrafındaki parçacıkların da çözeltiye karışması sağlanır.
- 600 nm değerinde okumak üzere hazırlanmış spektrofotometreye tüpler kapakları açılmadan yerleştirilir.

- Absorbans okunur ve kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırılır.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

- Potasyum hidrojen fitalat çözeltisinden KOİ eşdeğeri 20-900 mg O₂/mg L arasında olacak şekilde beş değişik konsantrasyonda reaksiyon tüpleri hazırlanır.
- Standartların hacimleri de reaksiyon tüpleri gibi hazırlanır.

KOİ tayininde standart eğrinin oluşturulması

Tüm örnekler için spektrofotometrik yöntemle KOİ ölçümlerinin yapılabilmesi için öncelikle standartlarla kalibrasyon eğrisi hazırlanmalıdır. Her yeni çözelti sistemi için yeni kalibrasyon eğrisi hazırlanmalıdır. Kalibrasyon eğrisi için 0, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 mgO₂/mg L konsantrasyonlarında KHP çözeltileri hazırlanır (Çizelge 3.1). KOİ ölçümleri için lineer bir denklem elde edilir (APHA; AWWA, 2001) . KOİ için elde edilen kalibrasyon grafikleri Ek 1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. KOİ hazırlama prosedürü

Konsantrasyon (mgO₂/mg L)	0	20	50	100	250	500	750	1000
KHP hacmi (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
K₂Cr₂O₇ çöz. hacmi (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
H₂SO₄ çöz. (mL)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Örnekler iyice karıştırılır. 148 °C ‘lık ısıtma bloğuna yerleştirilir.								
148°C ısıtma bloğunda 2 saat bekletilir.								

Hesaplamalar:

$$KOİ = (\text{son hacimdeki mgO}_2 * 1000) / \text{mL örnek}$$

3.1.2. Toplam şeker analizi

Kolorimetrik fenol-sülfürik asit yöntemi, gıdalar içerisindeki karbonhidratların toplam konsantrasyonun bulunmasında kullanılan en yaygın

metottur (Masuko et al., 2005). Toplam Şeker Analizi Dubais metoduna göre yapılmıştır.

- Analizi yapılacak olan karbonhidratın renksiz ve temiz solüsyonu test tüplerine yerleştirir.
- Daha sonra fenol ve derişik sülfürik asit eklenir. Fenol ve karbonhidratların birbiri ile tepkimeye girmesinden dolayı solüsyon sarımsı-portakal renge döner. Rengin koyuluğu çözelti içerisindeki karbonhidrat miktarına bağıdır.
- Absorbans ölçümünde 490 nm dalga boyu kullanılır.
- Eklenen sülfürik asit, çözelti içerisinde bulunan bütün indirgenmeyen şekerlerin indirgen şekerlere dönüşmesini sağlar. Böylece, bir çözelti içerisindeki tüm karbonhidrat konsantrasyonu ölçülebilir.
- Bu metot sitokiyometrik olmadığından, kalibrasyon grafiği, konsantrasyonu bilinen bir karbonhidratın, farklı seyreltmeleri ile hazırlanır.

Reaksiyon çözeltilerinin hazırlanması

- 5 g fenol tartılarak 100 mL distile su içerisinde ısıtılarak çözünmesi sağlanır.
- Kolorimetrik bir ölçüm olduğu için, denemelerde renksiz ve yüksek saflıkta (%99) sülfürik asit (Merck, Co.) kullanılır.

Toplam şeker analizi deney prosedürü

- Toplam şeker analizi yapılacak olan örnekler, 10000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, standart eğrinin hazırlanmasında kullanılan uygun konsantrasyon oranına göre seyreltilir.
- Çizelge 3.2’de verilen hacimlerde deney tüpüne örnek, fenol çözeltisi ve sülfürik asit ilave edilir.
- Hazırlanan deney tüpleri vorteks yardımı ile karıştırılır.

- 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- Süre bitiminde tekrar vorteks ile karıştırılarak 25 - 30°C su banyosunda inkübasyona bırakılır.
- Süre bitiminde köre karşı 490 nm'de spektrofotometre ile örnekler okutulur.
- Konsantrasyon, standart eğrinin oluşturulmasından elde edilen lineer denklem kullanılarak hesaplanır (EK 2).
- Standart eğri konsantrasyon-absorbans grafiği çizilerek hazırlanır.

Çizelge 3.2. Toplam şeker tayini yapılacak örneklerin miktarları

TŞ* Tayini Kimyasalları	Kör	Örnek
dH ₂ O (mL)	1	1 (Seyreltilmiş örnek çözelti)
% 5 Fenol Çözeltisi (mL)	1	1
Derişik H ₂ SO ₄ (mL)	5	5

*TŞ: Toplam şeker

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

- 0.1 g glikoz tartılır ve 100 mL'lik balon jojede 100 mL içersinde çözülerek 1000 mg/L 'lik şeker çözeltisi hazırlanır.
- Bu çözeltiden 10 mL alınarak yeni bir balon jojede distile su ile 100 mL 'ye tamamlanır. % 0.01'lik (100 mg/L) glikoz çözelti elde edilir.
- Standart eğri için kullanılan glikoz konsantrasyonları Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.
- Hazırlanan standartlar üzerine deney prosedüründe verilen hacimlerde fenol ve sülfürik asit çözeltisi eklenir.
- Deney prosedürü uygulanır. Standartlar 490 nm'de spektrofotometrede okutulur.

- Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilir. Grafikten elde edilen denklemden toplam şeker konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin şeker konsantrasyonu hesaplatılır. Toplam şeker tayininde elde edilen kalibrasyon grafikleri Ek 2’de yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Toplam şeker tayininde standart eğrinin hazırlanması

Standartlar	% 0.01’lik Glikoz Çözeltisi (mL)	dH ₂ O	Glikoz Konsantrasyonu (mg/L)
Kör	0	1	0
Std 1	0.2	0.8	20
Std 2	0.4	0.6	40
Std 3	0.6	0.4	60
Std 4	0.8	0.2	80
Std 5	1.0	0	100

3.1.3. Askıda katı madde (AKM) tayini

Askıda katı madde (AKM), bir çözelti içerisindeki filtre edilemeyen katı maddeler olarak ifade edilir (APHA; AWWA, 2001). Askıda Katı Madde Tayini Standart Methods 2540.B’ye göre yapılmıştır.

- 0.45 µm cam fiber membran filtre 1 saat süreyle 103-105°C’a ayarlanmış etüvde tutularak sabit tartıma getirildikten sonra desikatörde soğutulur.
- Cam fiber membran filtre tartılarak darası alınır.
- Filtre vakum pompasına bağlı filtrasyon aparatı üzerine yerleştirildikten sonra, 10 mL distile su ile 3 kez yıkanır.
- AKM tayini yapılacak örnekler iyice karıştırıldıktan sonra, vakum pompası yardımıyla filtre edilir ve geçirilen örnek hacmi kaydedilir.
- Membran filtre porselen krozeeye yerleştirildikten sonra yeniden 103-105°C’da 1-2 saat sabit tartıma gelinceye kadar etüvde kurutulur.
- Kurutulan filtre kağıtları desikatörde soğutularak tartılır.
- Elde edilen tartım sonuçları ile aşağıda verilen formüle göre AKM miktarı mg/L cinsinden hesaplanır.

mg toplam askıda katı madde / L= (A-B) g x 10⁶ / örnek hacmi (mL)

A: filtre ağırlığı + bakiye ağırlığı

B. Filtre ağırlığı

3.1.4. Gaz kromatografisi (GC) ile VFA (Uçucu Yağ Asidi) analizi

• Uçucu yağ asitlerinden, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, izobütirik asit, izovalerik asit, valerik asit, kapriyonik asit, izokapriyonik asit, heptanoik asit ve alkol (etanol, butanol ve aseton) tayini Gaz Kromatografisi (GC) (6890N Agilent Technologies Network GC System) Flame Ionization Detektörü (FID) ve HP-FFAP 30 m x 0.25 mm kapiller kolon (J&W Scientific) ile yapılır.

• Kolon başlangıç sıcaklığı olan 40 °C’de 3 dakika bekledikten sonra 20 °C /dak. artışlarla, 60 °C ‘ye çıkarılır ve 3 dakika beklemeden sonra, 30 °C /dak artışlarla 120 °C’de 4 dakika bekletilerek son sıcaklık noktası olan 240 °C’ye 30 °C /dak artışlarla ulaşılır ve 240 °C’de 6 dakika bekletilir.

• İnlet (enjektör) ve detektör sıcaklıkları, 240 °C olarak ayarlanır.

• Helyum sabit 103 kPa’da taşıyıcı gaz olarak kullanılır.

Kalibrasyon için yüksek saflıkta GC standart çözeltileri (Dr. Ehrenstorfer GmbH) kullanılmıştır.

GC analizi için örnek hazırlama protokolü

- 1.5 mL hacminde örnek eppendorflara aktarılır.
- 10000 rpm’ de 15 dakika santrifüjlenir.
- Süpernatant şırınga yardımıyla çekilerek 0.22 µm ‘lik şırınga filtresinden süzülerek temiz viallere aktarılır.

GC analizlerinde elde edilen kalibrasyon grafikleri Ek 3’ te yer almaktadır.

3.1.5. Toplam gaz ve gaz yüzdeleri analizi

BHP (Biyokimyasal Hidrojen Potansiyeli) denemelerinde kesikli reaktör üzerinde toplanan gaz cam şırıngalar yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.1). Tepe gazının % gaz içeriklerine ise GC ile bakılmıştır (Şekil 3.2).

Sürekli reaktörde ise su taşırmalı gaz düzeneği kullanılmıştır. Kalibre edilmiş uzun ve silindirik borunun alt kısmı reaktörün tepe gazına bağlanmaktadır. Alt kısımda yer alan diğer çıkıştan gazın etkisiyle yer değiştiren su, geniş su haznesine akar.

Denemelerde üretilen toplam gazın, içeriğini oluşturan gazların tespiti için GC (6890N Agilent Technologies Network GC System) Termal Kondüktivite Detektörü (TCD) ile ve Hayesep D 80/ 100 dolgulu kolon (ALLTECH) kullanılmıştır. Gaz ölçümü için kullanılan GC metodunda, inlet (enjektör), detektör ve kolon sıcaklıkları sırası ile 120 °C , 140 °C, and 35 °C'dir ve argon 20 mL/dak akım debisi ile taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Yüksek saflıkta hidrojen, metan ve karbondioksit (% 30 H₂, % 30 CH₄ ve % 30 CO₂) içeren gaz karışımı GC'nin gaz kalibrasyonu için kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Toplam gaz ölçümü



Şekil 3.2. Gaz kromatografisi ile gaz yüzdesi ölçümü

3.1.6. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz metodu

Asetik asit, laktik asit, süksinik asit miktarları Refraktif İndeks Dedektörlü (RID) Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir. Analizler için Phenomenex Rezax RHM Monosaccharide (H+) 300 x 7.8 mm iyon değiştirici kolon kullanılmıştır. HPLC metodunda yürütücü solvent olarak 5mM H₂SO₄ çözeltisi kullanılmıştır. Organik asitlerin analizi akış hızı 0.8 mL /dak, kolon sıcaklığı 65°C, dedektör sıcaklığı 45°C, enjeksiyon hacmi ise 15 µL koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

HPLC analizlerinde örnek hazırlamak için GC’de örnek hazırlama protokolü kullanılmıştır (Bkz. Bölüm 3.1.4)

HPLC ile yapılan analizlerin kalibrasyon grafikleri ve grafiklerin korelasyon katsayı değerleri Ek’4 te yer almaktadır.

3.2. Mikrobiyal Analizler

3.2.1 Optik densite (OD)

Hücre kütlelerinin tayini için hücre süspansiyonlarının optik yoğunluğu ölçülmüştür. Foto-fermantatif bakterilerin optik yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. 2 mL örneğin spektrofotometre de besi ortamlarına karşı okumaları yapılmıştır.

3.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi (İYTE-MAM, İzmir)'nde bulunan, malzemelerin yapılarını mikro ve nano boyutlarda görüntüleyebilen Philips XL-30S FEG / FEI Quanta250 FEG marka SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanılmıştır (Şekil 3.3)

Örnekler karbon bant ile inert materyallerin üzerine yapıştırılarak (bir defada yedi örnek kapasiteli) görüntülenmiştir. (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. SEM analizi için örneklerin hazırlanması (sol kare) ve Philips XL-30S FEG / FEI Quanta250 FEG marka SEM taramalı elektron mikroskobu (sağ kare)

3.2.4. BET analizleri

Pomza taşı örnekleri yüzey alanlarının tespit edilmesi için Osmangazi Üniversitesi Malzeme Araştırma Laboratuvarına (Eskişehir) gönderilmiştir. BET analizleri Quantachrome Autosorb 1C cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analizler

3.3.1. Box-Behnken istatistiksel deney tasarımı

Box-Behnken istatistiksel deney tasarımı metodunda bağımsız değişkenlerin aksiyel ve faktöriyel noktalarına göre deney koşulları belirlenir. Örneğin bağımsız değişkenlerin sayısı 3 ise 15 farklı deney koşulu oluşturulur. Oluşturulan deney koşullarında elde edilen sonuçlarla (yanıtlar) birlikte uygun istatistik programı ile polinomik bir formül elde edilir. Elde edilen formüle ve R^2 değerine bağlı olarak yapılmamış denemeler hakkında da fikir sahibi olmamızı sağlar ve 3 boyutlu düzlemde her 3 değişkenin bağımlı değişkenlerimize etkisini

inceleme olanağı bulunur. Tez çalışması kapsamında Design Expert 7.0 istatistiksel analiz programı kullanılmıştır.

3.3.2. Varyans Analizi

Varyans Analizi (veya ANOVA, İngilizce “ANalysis Of VAriance” sözcüklerinin kısaltması) istatistik bilim dalında, grup ortalamaları ve (gruplar içi ve gruplar arası varyasyon gibi) bunlara bağlı olan işlemleri analiz etmek için kullanılan bir istatistiksel modeller koleksiyonudur. Bu yöntem ilk defa İngiliz istatistikçi ve genetikçi Ronald Fisher tarafından 1920'li ve 1930'lu yıllarda geliştirilmiştir. En basit şekliyle "Varyans Analizi" birkaç grubun ortalamalarının birbirine eşit mi eşit değil mi olduğunu sınamak için bir çıkartımsal istatistik sınaması olur ve bu sınama iki-grup için yapılan t-test sınamasını çoklu-gruplar için genelleştirir. ANOVA bir parametrik çıkarımsal metodu olup anakütle ortalamaları arasında farkın olup olmadığını sınamak için kullanılır. Tez çalışması kapsamında istatistiksel olarak ortalamaların karşılaştırılmasında PAWS Statistics. 18.0 programı kullanılmıştır.

3.4. Kinetik Analizler (Modifiye Gompertz Denklemi)

Kesikli reaktörlerde elde edilen hidrojen miktarının kinetik açıdan standardizasyonu için modifiye Gompertz denklemi kullanılmaktadır. R^2 değerinin 1.000'a yakınlığı hidrojen üretimi için gerekli kinetik parametrelerin doğruluğunun bir göstergesidir.

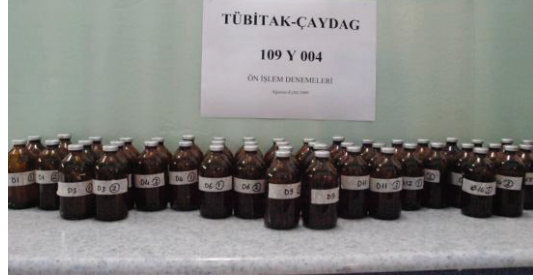
$$H = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

H (mL) t (saat) zamanından kümülatif hidrojen üretimi; P (mL) hidrojen üretim potansiyeli; R_m maksimum hidrojen üretim hızı (mL/saat) λ ise lag zamanıdır. Tez çalışmasında modifiye Gompertz denklemi ile katsayıların hesaplanmasında Statistica 5.0 programı kullanılmıştır.

3.5. Karanlık Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri

Kesikli biyoreaktör denemeleri diğer adıyla Biyokimyasal Hidrojen Potansiyeli (BHP) testlerinde 100 mL hacimli koyu renkli şişeler kullanılmıştır.

Şişelerde çalışma hacmi 70 mL olarak belirlenmiştir. Belirlenen oranlarda inokulum, substrat ve bazal ortam konulduktan sonra kalan hacim su ile tamamlanmıştır (Şekil 3.4). Geriye kalan tepe gazı azot gazı ile yıkanıp anaerobikleştirildikten sonra şişe ağzıları önce kauçuk tıpa ardından alüminyum yüzük ile sıkıca kapatıldıktan sonra ters bir şekilde kutulara yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Kesikli çalışmalar 70 rpm 55 °C 'lık inkübatörde yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.4. Kesikli biyoreaktör örnekleri



Şekil 3.5. Kesikli biyoreaktör örnekleri (2)



Şekil 3.6. Kesikli biyoreaktör örnekleri (3)

3.3.1. Ön işlem görmemiş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Biyolojik yollarla hidrojen üretiminde önemli iki parametre olan pH ve substrat konsantrasyonlarının karşılaştırmalı incelenmesi için 100' er mL'lik

kesikli reaktörlerde 70 ml çalışma hacimli düzenekler kurulmuştur. pH 4.5, pH 5.5 ve pH 6.5 koşullarında 10, 30 ve 50 g/L substrat (sükroz) içerecek şekilde kesikli reaktörler Çizelge 3.4'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Ön İşlemden geçmemiş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere belirlenen deney noktaları

pH	Substrat Konsantrasyonu
4.5	10 g/L
	30 g/L
	50 g/L
5.5	10 g/L
	30 g/L
	50 g/L
6.5	10 g/L
	30 g/L
	50 g/L

Kesikli reaktör denemelerinde hiçbir ön işleme tabi tutulmamış biyokütleden hacimce %10, 100 kat yoğun hazırlanmış bazal ortamdan hacimce 1/100 ve substrattan Çizelge 3.4'teki değerler elde edilecek şekilde koyulduktan sonra reaktör içi pH değerleri yine Çizelge 3.4'teki değerlere göre ayarlanmış ve reaktör tepe gazı azot ile yıkandıktan sonra kauçuk tıpa ve alüminyum kapak ile sıkıca kapatılmıştır. Reaktörler ikişer tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Günlük olarak toplam gaz değerleri cam şırınga ile ve gaz yüzdesi değerleri gaz

kromatografisinde ölçülmüştür. Gaz üretimi sonlandığında şişe içi pH değerleri, reaktör içi KOİ, toplam şeker ve VFA değerleri ölçülmüştür.

3.3.2. Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Karışık konsorsiyum bilindiği üzere çok çeşitli mikroorganizma gruplarını içeriğinde barındırmaktadır. Biyohidrojen üretimi için kullanılacak biyokütleyle çeşitli ön işlemler uygulanarak metanojenlerin baskılanması ve hidrojen üreten mikroorganizma gruplarının baskın hale geçmesi sağlanabilir.

Ön işlem olarak uygulanabilecek yöntemlerden ilki asit muamelesidir. Asit muamelesinde 1 M 'lık HCl çözeltisi ile biyokütle pH değeri 3'e getirilir. 24 saat 55 °C lik inkübatörde bekletilmesinin ardından kesikli reaktörlerde inokulum olarak kullanılır.

Kesikli reaktörler Çizelge 3.4'te yer alan deneme şablonu esas alınarak ikişer tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Bölüm 3.1.1 'de anlatılan ölçüm ve analizler yapılmıştır.

3.3.3. Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Biyokütle içerisindeki metanojen kültürlerin baskılanması ve hidrojen üreten mikroorganizma gruplarının baskın hale geçmesi için uygulanabilecek bir diğer yöntem ise baz muamelesidir.

Baz muamelesinde 1 N 'lık NaOH çözeltisi ile biyokütle pH değeri 11 'e getirilir. 24 saat 55°C' lik inkübatörde bekletilmesinin ardından kesikli reaktörlerde inokulum olarak kullanılır. Kesikli reaktörler Çizelge 3.4'te yer alan deneme şablonu esas alınarak ikişer tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Bölüm 3.1.1.'de anlatılan ölçüm ve analizler yapılmıştır.

3.3.4. Ön işlem olarak bromoetanosülfonat (BESA) muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

BESA (Bromoetanosülfonat) kimyasal metanojen inhibitörüdür. BESA özel olarak metanojenlerde bulunan koenzim M ile yapısal analog olmasından dolayı metanojen inhibitörü olarak kullanılabilir. 10 mM ile 100 mM arasında değişen konsantrasyonlarda hidrojen üretiminde iyileşme metanojen popülasyonunda azalma gözlemlenebilir. (Zhu et al., 1999; Wang and Wan, 2008).

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak; BESA (10-200 mM), substrat konsantrasyonu (10-50 g/L) ve pH (4.5-6.5) bağımsız değişkenlerinin biyohidrojen üretimi, hidrojen verimliliği, substrat verimi, KOİ ve şeker kullanımına etkileri incelenmiştir.

Kesikli reaktör içerikleri Çizelge 3.5'e göre hazırlanmıştır. Karışık konsorsiyuma çeşitli konsantrasyonlarda BESA eklenerek 30 dakika karıştırıldıktan sonra kesikli reaktörlerde inokulum olarak kullanılmışlardır. Her deneme seti ikili tekrarlar halinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları

Deneme No	BESA Kons. (mM)	Substrat Kons (g/L)	pH
I	10	30	4.5
II	10	50	5.5
III	10	10	5.5
IV	10	30	6.5
V	105	50	4.5
VI	105	10	4.5
VII	105	30	5.5
VIII	105	30	5.5
IX	105	30	5.5
X	105	50	6.5
XI	105	10	6.5
XII	200	30	4.5
XIII	200	50	5.5
XIV	200	10	5.5
XV	200	30	6.5

3.3.5. Ön işlem olarak Trikloroasetik asit (TCl) muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Çoklu parametrelili optimizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Box-Behnken metodolojisi uygulanarak TCl konsantrasyonu (10 mM-200 mM), substrat konsantrasyonu (10g/L-50 g/L) ve pH (4.5-6.5) bağımsız değişkenlerinin biyohidrojen üretimi, hidrojen verimliliği, substrat verimi, KOİ ve şeker kullanımı gibi parametrelere etkisi araştırılmıştır (Çizelge 3.6).

TCl metanojen inhibitörü olarak bilinen bir diğer kimyasal ajandır. Box-Behnken tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları Çizelge 3.6 'da verilmiştir. Çizelge 3.6 'daki değerler esas alınarak belirlenen aralıklarda anaerobik konsorsiyuma TCl eklenip 55°C de 30 dakika karışmaya bırakılmıştır. Ardından belirlenen 15 deney setindeki sükroz konsantrasyonu ve pH koşulları sağlandıktan sonra kesikli reaktörlerin tepe gazları azot ile yıkanıp anaerobik koşulların sağlanmasının ardından reaktörlerin ağzı kauçuk tıpa ve alüminyum yüzük ile sıkıca kapatılmıştır. Daha önceki bölümlerde açıklandığı gibi günlük gaz ölçümleri alınıp gaz yüzdeleri tespit edilmiştir. Gaz üretimi sonlandığında ise reaktörlerden örnekler alınarak gerekli analizler yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları

Deneme No	TCl Kons. (mM)	Substrat Kons. (mM)	pH
I	10	30	4.5
II	10	50	5.5
III	10	10	5.5
IV	10	30	6.5
V	105	50	5.5
VI	105	10	4.5
VII	105	30	4.5
VIII	105	30	5.5
IX	105	30	5.5
X	105	50	6.5
XI	105	10	6.5
XII	200	30	4.5
XIII	200	50	5.5
XIV	200	10	5.5
XV	200	30	6.5

3.3.6. Ön işlem olarak ısıtılmış biyokütle ile substrat olarak sükrözden kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Karışık konsorsiyumda hidrojen üreten bakterilerin baskın hale geçmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem ısıtılmış işlemidir. Şimdiye dek gerçekleştirilen pek çok çalışmada çeşitli sıcaklıkların kullanıldığı görülmektedir. Box-Behnken deneysel tasarım ile sıcaklık (70-100°C), sükröz konsantrasyonu (10-50 g/L) ve pH (4.5-6) bağımsız değişkenlerinin biyohidrojen üretimi, hidrojen verimliliği, substrat verimi, KOİ ve şeker kullanımı gibi parametrelere etkisi araştırılmıştır. Belirlenen 15 deney setindeki sükröz konsantrasyonu ve pH koşulları sağlandıktan sonra kesikli reaktörlerin tepe gazları azot ile yıkanıp anaerobik koşulların sağlanmasının ardından reaktörlerin ağzı kauçuk tıpa ve alüminyum yüzük ile sıkıca kapatılmıştır. Daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi günlük gaz ölçümleri alınıp gaz yüzdeleri tespit edilmiştir. Gaz üretimi sonlandığında ise reaktörlerden örnekler alınarak analizlere tabi tutulmuştur. Çizelge 3.7’ de yer alan koşullarda kurulan 15 kesikli reaktör setinde bölümde tanımlanan günlük ölçüm ve gazların bitmesiyle birlikte analizler gerçekleştirilmiştir. Her deneme seti ikili tekrarlar halinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. Ön işlem olarak ısıtılmış biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları

Deneme No	Sıcaklık (°C)	Substrat Kons. (g/L)	pH
I	70	30	4.5
II	70	50	5.5
III	70	10	5.5
IV	70	30	6.5
V	85	50	4.5
VI	85	10	4.5
VII	85	30	5.5
VIII	85	30	5.5
IX	85	30	5.5
X	85	50	6.5
XI	85	10	6.5
XII	100	30	4.5
XIII	100	10	5.5
XIV	100	50	5.5
XV	100	30	6.5

3.3.7. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Çalışmamızın bu bölümünde Bölüm 3.1.1 'deki yöntem ve ölçümler esas alınarak yeni bir optimizasyon denemesi yapılmıştır. Karışık konsorsiyumda bu kez metanojen inhibitörü olarak başka bir kimyasal ajan olan kloroform kullanılmıştır. Ardından belirlenen 15 deney setindeki sükroz konsantrasyonu ve pH koşulları sağlandıktan sonra kesikli reaktörlerin tepe gaz azot ile yıkanıp anaerobik koşulların sağlanmasının ardından reaktörlerin ağzı kauçuk tıpa ve alüminyum yüzük ile sıkıca kapatılmıştır. Daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi günlük gaz ölçümleri alınıp gaz yüzdeleri tespit edilmiştir. Gaz üretimi sonlandığında ise reaktörlerden örnekler alınarak Bölüm 3.1.1'de anlatılan analizlere tabi tutulmuştur.

Çoklu parametrelili optimizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Box-Behnken metodolojisi çalışmanın bu kısmında kloroform konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve pH bağımsız değişkenlerinin biyohidrojen üretimi, hidrojen verimliliği, substrat verimi, KOİ ve şeker kullanımı gibi parametrelere etkisi araştırılmıştır.

Bağımsız değişkenler; kloroform yüzdesi (%0.05 mM-10 mM); sükroz konsantrasyonu (10g/L-50 g/L) ve pH (4.5-6.5) 'ın hidrojen üretim performansına üzerine etkisi maksimum üretim için optimum değerler tespit edilmeye çalışılmıştır. Çizelge 3.8'de yer alan koşullarda kurulan 15 kesikli reaktörde günlük hidrojen üretim performansları incelenmiş günlük analizler gerçekleştirilmiştir. Karışık konsorsiyuma çeşitli konsantrasyonlarda kloroform eklenerek 30 dakika karıştırıldıktan sonra kesikli reaktörlerde inokulum olarak kullanılmışlardır ancak kloroform uçucu bir madde olduğundan tekrar denemelerinde uygun konsantrasyonlarda kloroform ilavesi günlük olarak yapılmıştır (Çizelge 3.8). Her deneme seti ikili tekrarlar halinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.8. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimini incelemek üzere Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenen deney noktaları

Deneme No	Kloroform (%)	Substrat Kons. (g/L)	pH
I	0.05	30	4.5
II	0.05	50	5.5
III	0.05	10	5.5
IV	0.05	30	6.5
V	5.025	50	4.5
VI	5.025	10	4.5
VII	5.025	30	5.5
VIII	5.025	30	5.5
IX	5.025	30	5.5
X	5.025	50	6.5
XI	5.025	10	6.5
XII	10	30	4.5
XIII	10	10	5.5
XIV	10	50	5.5
XV	10	30	6.5

3.4. Karanlık Fermantasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri

3.4.1. Sürekli reaktör denemeleri için pompa kalibrasyonu

Yapılan çalışmada; kullanılan hidrolik alıkonma zamanlarına göre (24 saat, 12 saat, 6 saat, 3 saat, 1.5 saat) beslemede kullanılacak akış hızı (mL/dak) ile pompa kalibrasyonu yapılmıştır. Belirlenen rpm'lerde çalıştırılan pompadan ne kadar zamanda kaç ml örnek alındığına bakılmıştır. Bu değerlere uygun bir kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır (Ek 5). Elde edilen grafiğe göre;

$$\text{rpm} = 3.293 (\text{akış hızı}) + 0.542 \text{ ve } R^2 = 0.9994 \text{ denklemi bulunmuştur}$$

3.4.2. Bazal ortam

Karanlık fermantasyon denemeleri için optimum anaerobik mikrobiyal büyüme ve aktivite için gerekli olan makro ve iz elementleri içeren bazal ortam kompozisyonu Bazal ortam içeriği (g/L); NaHCO_3 (1.25); NH_4Cl (2.5); KH_2PO_4 (0.25); CaCl_2 (0.25); NiSO_4 (0.032); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.32); FeCl_2 (0.02); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0144); ZnCl_2 (0.023); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.021); $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.03); maya özütü (0.05); L-sistein-HCl (0.5). (Çetinkaya-Dokgöz, 2010) Denemelerde kullanılan sükroz veya glikoz içeren besiyeri bu bazal ortam ile zenginleştirilmiştir.

3.4.3. Mikroorganizmaların tutundurulması

Sürekli reaktör denemeleri; reaktörlerin dolgu malzemeleriyle doldurulup hazırlanmasından sonra reaktörlere peristaltik pompa ile alttan bazal ortam içeren aşı beslemesi HRT=24 saat koşullarında yapılmıştır. Aşı, reaktörün içini tamamen doldurduktan sonra giriş ve çıkıştan belli aralıklara örnek alınıp AKM analizi yapılmıştır. Giriş ve çıkış AKM konsantrasyonları arasında farkın birbirine yakın çıkmaya başladığı noktada mikroorganizmaların tutunduğu anlaşılmıştır ve aşı sirkülasyonu kesilerek taze besleme verilmeye başlanmıştır.

3.4.4. İmmobilize reaktörler (karanlık fermentasyon)

Seramik top dolgu malzemeli sürekli reaktör denemesi

Sürekli reaktör denemelerinde 250 mL hacimli reaktörün içi seramik top dolgu malzemeleri (Şekil 3.7) (EHEIM Substrat biofilter medium; 450 m²/L) ile doldurulmuştur. Dolgu malzemelerinin doldurulmasının ardından reaktör çalışma hacmi 170 mL olmuştur. Reaktör; alttan besleme kanalları, değişik bölgelerden örnek alabilmek için yanlarda üç çıkışı ve bir adet gaz çıkışı bulunan silindirik bir düzeneştir (Şekil 3.8). Termofilik koşullar reaktör etrafına sarılmış silikon hortum ve sirkülatör aracılığıyla sağlanmıştır (Şekil 3.9). Taze besleme reaktöre alttan verilip en üstteki çıkış borusundan çıkış suyu alınmıştır. Reaktörde biyokütle olarak termofilik reaktörden alınan çamur kullanılmıştır. Reaktöre taze besleme peristaltik pompa ile verilmiştir. HRT 24 saat-12 saat-6 saat-3 saat ve 1.5 saat değerlerinde çalışılmıştır. Besleme sükroz ile 10 g/L olacak şekilde yapılmıştır. Taze beslemeler ve çıkış suları buz dolu kaplarda +4 C⁰ koşullarında tutulmuştur (Şekil 3.10). Günlük gaz ölçümleri su taşırmalı gaz ölçerle ölçüldükten sonra günde iki defa gaz kromatografisi ile gaz içeriklerine bakılmıştır. Ayrıca reaktör giriş ve çıkış sularından örnekler ayrılarak KOİ, Toplam Şeker, VFA, AKM ve UAKM (Uçucu Askıda Katı Madde) analizleri yapılmıştır. UAKM analizlerine çözünmüş örnek kullanıldığı için ve AKM değerleri ile çok benzer sonuçlar elde edildiği için son verilmiştir.



Şekil 3.7. Seramik top dolgu malzemesi



Şekil 3.8. Üç çıkışlı reaktör



Şekil 3.9. Sirkülatörle yapılmış ısı ceketi



Şekil 3.10. Seramik dolgulu immobilize biyoreaktör düzeneği

Pomza dolgu malzemeli sürekli reaktör denemesi

Sürekli reaktör denemelerinde 330 mL hacimli reaktör; alt kısmından 5 cm olacak şekilde kalın pomza taşı ($0.76 \text{ m}^2/\text{g}$), reaktörün orta kısmı (12 cm) kalın ve ince pomza taşı ve reaktörün üst kısmı (5 cm) ince pomza taşı dolgu malzemesi kullanılarak doldurulmuştur. Dolgu malzemelerinin doldurulmasının ardından reaktör çalışma hacmi 190 mL olmuştur. Reaktör seramik dolgulu reaktörle aynı konfigürayona sahiptir (Şekil 3.11). Besleme, ısıtma, gaz toplama ve işletim koşulları seramik dolgulu reaktör ile aynı şekildedir.



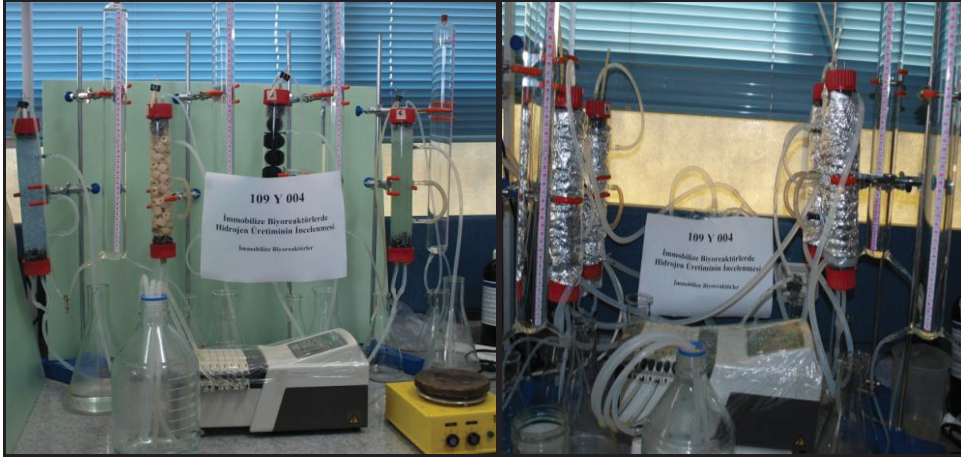
Şekil 3.11. Pomza dolgu malzemesi ve deney düzeneği

Seramik yüzük (halka) dolgu malzemeli sürekli reaktör denemesi

Sürekli reaktör denemelerinde 330 mL hacimli reaktör içi seramik halka (2.4*10⁻⁴ m²/g) dolgu malzemeleri ile doldurulmuştur. Dolgu malzemelerinin doldurulmasının ardından reaktör çalışma hacmi 160 mL olmuştur. Reaktör seramik dolgulu reaktörle aynı konfigürasyona sahiptir (Şekil 3.12). Besleme, ısıtma, gaz toplama ve işletim koşulları seramik dolgulu reaktör ile aynı şekildedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.12. Seramik halka dolgu malzemesi ve deney düzeneği



Şekil 3.13. İmmobilize reaktörlerin çalışma düzeneği

3.4.5. İmmobilize biyokütlenin belirlenmesi

Sürekli reaktör denemelerinin sonunda immobilize reaktörlerin içerisindeki dolgu materyalleri reaktörün içerisindeki yerlerine göre üst, orta ve alt kısımlarından ayrı ayrı alınmıştır. Her birinin üzerine 100'er ml saf su eklenmiş ve ultrasound (US) cihazında 15 dakika bekletilerek immobilize olmuş hücrelerin dolgu materyalleri üzerinden ayrılması ve saf suya geçmesi sağlanmıştır. Bu işlemlerin ardından dolgu malzemeleri sıvıdan ayrılıp AKM yapılmıştır (Şekil 3.14)



Şekil 3.14. Pomza dolgu materyalinin reaktör içerisinde ayrılması

3.4.6. Tam karışımli reaktör çalışması

Sartorius Biostat A markalı ve mikrobiyolojik üretimler için tasarlanmış CSTR reaktörüdür (Şekil 3.15). Sistemde pH, oksijen, sıcaklık ve karıştırıcı hızı kontrolü bilgisayar donanımında bulunan yazılım yardımı ile otomatik olarak kontrol edilmektedir. Toplam hacmi 3L olan reaktörde çalışma hacmi 2 ± 0.5 L' dir ve termofilik (55.0 ± 0.5), pH 5.5 işletme koşulları altında çalıştırılmıştır. Reaktörün sabit karıştırma hızı 150 rpm olarak seçilmiştir. pH kontrolü, reaktör asitleşme eğiliminde olduğu için 2M KOH ile otomatik olarak pH 5.5 ± 0.5 tutulmuştur. Reaktör içersine besleme, reaktör ile uyumlu ve bilgisayar yazılımı tarafından kontrol edilen ekstra tek yöllü peristaltik pompa yardımıyla yapılmıştır. Reaktörde üretim esnasında köpük problemi olmaması sebebiyle, besleme ile eşit hacimde sıvı uzaklaştırılması antifoam pompası ile sağlanmıştır. Üretilen biyogaz

reaktörün kondansörüne bağlanan ıslak tip sıvı ölçer yardımıyla ölçülmüştür. Günlük olarak, biyogaz içersindeki % gaz bileşimleri GC ile ölçülmüştür. Bu reaktörde sabit HRT (1 gün), organik yükleme hızlarının (OLR) sürekli hidrojen üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Reaktörün tepe gazı periyodik olarak saf azot gazı ile yıkanarak, anaerobik koşulların sürdürülmesi ve hidrojen kısmi basıncının düşürülmesi sağlanmıştır.

Fermantör denemelerinde, CSTR'a 1/10 oranında ısıl işlem uygulanmış aşı eklenmiştir. Ardından bazal ortam içere sükrözlu bazal ortam konulmuştur. CSTR, immobilize reaktör çalışmalarında olduğu gibi 24 -12 - 6 - 3 - 1.5 saatlik hidrolik alıkonma zamanında işletilmiştir.



Şekil 3.15. Fermantör denemelerinde kullanılan CSTR reaktör

3.5. Foto-Fermantatif Bakterilerin İzole Edilmesi

Foto-fermentatif hidrojen üretimi basamağında kullanılacak mikroorganizmalar doğadan izole edilmiştir. Bu çalışmalar Kanada'da yapılan çalışmalar sırasında gerçekleştirilmiştir. İzlatlar sıvı halde ve agara çizilmiş halde Türkiye'ye getirilmiştir.

3.5.1. Foto-Fermantatif bakterilerin balçık ortamdan izole edilmesi

Tez çalışmasının Kanada’da gerçekleştirilen kısmında Prof. Dr. Patrick Hallenbeck’in yönlendirmesi ile foto-fermentatif bakterilerin izolasyonu için, balçık örneği St. Lawrence Nehri, Velois Bay’ (Montreal, Kanada)’ den alınmıştır. Bakterilerin tutunması için yüzey oluşturma planlanan dört değişik (moleküler elek, kömür, iyonik reçine ve kontrollü nano gözenekli cam boncuk) malzeme yukarı akışlı reaktörlere doldurulmuştur. Zenginleştirme ortamı içeren stok solüsyona %20 oranında ırmaktan alınan balçık eklenmiştir. Bu ortamı içeren erlenler alüminyum folyo ile sarılarak tamamen karanlık bir ortam oluşturulmuştur. Sadece reaktörlerin yüzeyine 6000 lüks ışık yoğunluğu gelmesi sağlanmış reaktörler 30° C’ lik inkübatöre koyulmuştur (Şekil 3.16). Anaerobik koşullarda zenginleştirme ortamı peristaltik pompa ile sürekli kırmızı pigmentli bakterilerin dolgu malzemeleri üzerinde görülmesine dek döndürülmüştür. Kontrol grubu olarak da 100 mL kesikli reaktör aynı koşullardaki inkübatöre koyulmuştur.



Şekil 3.16. İzolasyon seti için deneysel düzenek

Kırmızı pigmentli oluşumların gözlenmesinin ardından steril koşullar altında her dolgulu reaktörden alınan 1 g dolgu malzemesi 99 mL %0.9 NaCl içeren erlenlere transfer edilmiş ve 20 dakika boyunca 30 °C de 200 rpm de çalkalanarak askıda kalmış bakterilerin uzaklaşması sağlanmıştır. 20 dakika çalkalamadan sonra katı parçacıklar 99 mL PBS (fosfat buffer solusyonu) içeren erlenlere alınmış ve biyofilmin uzaklaştırılması amacıyla tekrar 200 rpm de 20 dakika çalkalanmıştır. Bu ortamdan alınan süspanse kısımdan 10^{-2} - 10^{-7} arası transferler yine %0.9’luk NaCl çözeltisine yapılmıştır. Her tüpten alınan 100 µL örnek katı YPS petrilere yayma metodu ile transfer edilmiştir. Bu işlem her seyreltme için devam etmiş ve petrilere anaerobik jar içinde 30°C inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Görülen her farklı koloniden bir parça YPS petrilere çizilmiştir. Çizme işlemi bir petride saf kültür elde edene dek devam etmiştir.

Hücrelerin izolasyonunda maya-fosfat-sülfat (YPS) ve zenginleştirme ortamları kullanılmıştır. İzole edilen hücrelerin ve kullanılan diğer *Rhodobacter* türlerinin pasajlanmasında zenginleştirme ortamı kullanılmıştır (Sabourin-Provost and Hallenbeck, 2010).

YPS ortamı reçetesi

%7.5 CaCl ₂	4mL/L
%20 MgSO ₄	3 mL/L
Yeast extract	3 g/L
Nutrient broth	3 g/L

Zenginleştirme ortamı (EM) reçetesi

Sodyum Asetat	2 g /L
Yeast extract	0.1 g/L
NH ₄ Cl	0.5 g/L
MgCl ₂	0.2 g/L
CaCl ₂	0.05 g/L
Fe (EDTA)	0.1 mM
İz elementler	1 mL/L

pH 6.4'e ayarlanmıştır.

3.5.2. İzolatların moleküler analiz yöntemleri ile tanımlanması

İzole edilen ve öncelikle 1-2-3-4 şeklinde numaralar verilen izolatlar zenginleştirme ortamında 6000 lüks ışık şiddeti altında 28±2 °C sıcaklıkta haftalık olarak pasajlanmıştır. Hazırlanan sıvı kültürler Refgen Biyoteknoloji'ye (ODTÜ

Teknokent, Ankara) moleküler tanımlama için gönderilmiştir. Bu laboratuarda DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Tissue & Blood PCR ile 50 uL'de 1 X Taq Buffer, 1.5mM MgCl, 0.2mM dNTP, 0,4 pmol primerler, 1.25U Taq polimeraz kullanılarak (94° C'de 30s + 55°C'de 30s + 72°C'de 30 s)X30 tur şeklinde yapılmıştır. DNA dizi analizi Bigdye V.3.1 Cycle Sequencing kit kullanılarak ABI 3130 XL Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analiz Neighbour joining yöntemi ile yapılmıştır. Kullanılan primerler 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG ve 1492R GGTTACCTTGTTACGACTT'dir. Alignment: W-Clustal ile yapılmıştır. 16S tanımlama sonucunda ilk önce 3 ve 4 numaralı suşlar sıvı kültürden tanımlanmıştır. Diğer iki örnek agar ortamında büyütülmüş ve tanımlama işlemleri katı kültür üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.6. Foto-Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri (Karbon Kaynağı Konsantrasyonu Optimizasyonu)

İzolatların en yüksek hidrojen üretimi ve en uygun büyüme koşullarının tespiti amacıyla öncelikle her izolat zenginleştirme ortamında büyütülmüş, her izolat için 2 ve 5 g/L laktat içeren kesikli reaktörler hazırlanmış ve hidrojen üretimleri gözlenmiştir. Karanlık fermantasyon sonucunda açığa çıkan en önemli iki bileşiğin asetat ve bütirat olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle iki aşamalı bir reaktör sisteminin işlerliğini test etmek amacıyla izolatların asetat ve bütirat kullanımları da incelenmek istenmiştir. Bu amaçla zenginleştirme ortamında değişik konsantrasyonlarda asetat ve bütirat eklenmiştir. En uygun büyüme koşulunda ise izolatlar kullanılarak kesikli sistemde biyohidrojen üretim kapasiteleri incelenmiştir. Reaktörlerin sıcaklığı 25 cm uzaklıktan 6000 lüks ışık şiddeti sağlayan halojen lambaların yaydığı ısı ile 28±2°C'de tutulmuştur.

İzolatların büyüme ve hidrojen üretim potansiyellerinin incelenmesi için zenginleştirme ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda kullanılan asetat yerine diğer organik asitler ve karbonhidratlar eklenerek büyüme ve hidrojen üretme performansları incelenmiştir.

Öncelikle büyüme karakteristiklerinin incelenmesi adına her bir izolat için 2, 3, 4, 5, 7 ve 10 g/L substrat içeren ortamlar hazırlanmıştır. Bu ortamlarda büyümeler incelendikten sonra en iyi büyüme gözlenen konsantrasyon değerlerinde kesikli reaktörlerde hidrojen üretim potansiyelleri incelenmiştir.

Kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretim potansiyelleri incelenirken azot kaynağı olarak amonyum yerine 7 mM glutamat kullanılmıştır.

3.7. İzolatların LentiKat® içerisine hapsedilmesi

İzolatlar zenginleştirme ortamında büyütüldükten sonra üçüncü gün sonunda LentiKat® jeller içersine hapsedilmiştir. Bu yöntemde katı haldeki LentiKat® çözeltisi 105°C de 5 dakika otoklavlanmasının ardından 80°C'ye önceden ısıtılmış su banyosuna alınmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. LentiKat® jel hazırlama sistemi

Daha sonra oda sıcaklığında 10 mL izolat içeren ortam ile birleştirilerek manyetik balık aracılığıyla LentiKat® çözeltisi ve bakteri ortamı homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 15 cm çapında petriye dökülmüştür (Şekil 3.17).



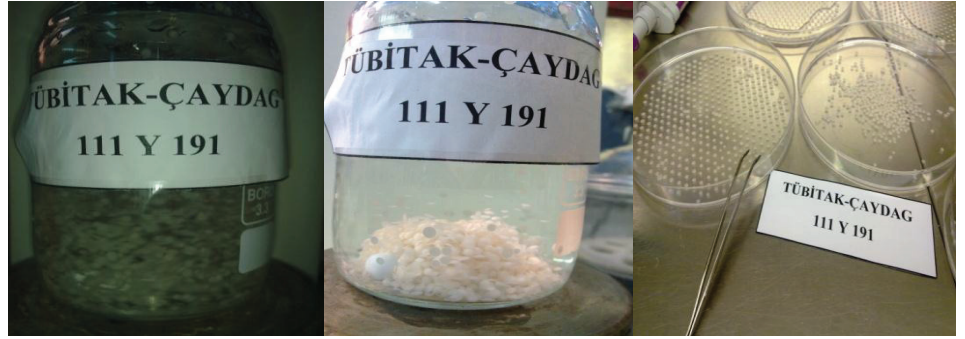
Şekil 3.18. LentiKat® solusyonu ve printer

Daha sonra printer aracılığıyla boş steril petrilere LentiKat® diskleri aktarılmıştır. Laminar flow kabin çalışır haldeyken 4 saat bekledikten sonra gece laminar flow kabinin kapağı kapatılarak bekletilmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.19. Laminar akışlı kabinde LentiKat® boncukları

Disk halinde hapsedilmiş hücreler ertesi gün sabitleyici solüsyon yardımıyla bir steril behere aktarılmış ve 2 saat bu solüsyonun içerisinde karıştırılmaya devam edilmiştir. LentiKat® diskleri bu aşamadan sonra sabitleyici solüsyonundan ayrılmış ve reaktöre aktarılmaya hazır hale gelmiştir (Şekil 3.19-3.2).



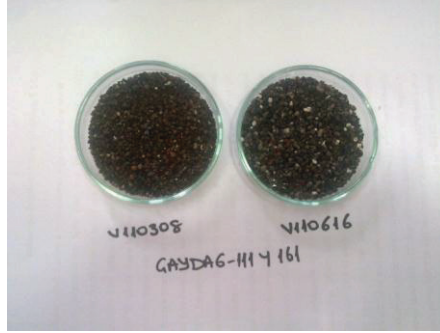
Şekil 3.20. Sabitleyici solusyon ve hapsedilmiş suşlar



Şekil 3.21. LentiKat® diskleri

3.8. İzolatların Katı Yüzeyler Üzerine Tutunma Denemeleri

İzolatların katı yüzey üzerine tutunma performanslarını incelemek amacıyla öncelikle plastik ve cam malzemelerden porozlu yüzeylere sahip malzemelerle anaerobik tüpler içerisinde tutunma denemeleri yapılmış ancak malzemelerin bu yüzeylere tutunmadığı gözlenmiştir. Daha sonra alternatif olarak nano yüzeyli manyeik parçacıklara izolatların tutunma kapasiteleri incelenmiştir. Almanya ATB enstitüsünden Dr. Jan Mumme tarafından patenti alınan ve Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Biyoteknolojisi ve Biyoenerji Laboratuvarına hediye edilen V110308 ve V110616 kodlu iki farklı manyetik özellikli tutunma malzemesi kullanılmıştır (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Manyetik Parçacıklar

3.9. Foto-Fermentasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri

3.9.1. Foto-fermentasyonla tutuklama yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi (LentiKat® reaktörleri)

Tutuklanan izolatları barındıran LentiKat® diskleri 50 mL hacimli yukarı akışlı reaktörlere doldurulmuştur. Reaktörün alt kısmına düzgün akışın sağlanması için cam boncuklar yerleştirilmiştir. En üste ise yine cam boncuklar konularak LentiKat® disklerin yüzerek sistemden çıkması engellenmiştir. Reaktörlere besleme alt kısımdan yapılmış çıkış suları ise üst kapağa yakın çıkıştan alınmıştır. Karbon kaynağı olarak 3 g/L bütirat ve 2 g/L asetat kullanılarak HRT 72-36-18-9 saat koşullarında hidrojen üretim performansları incelenmiştir. Aynı koşullarda askıda yukarı akışlı reaktör sistemi de işletilerek karşılaştırmalı olarak sonuçlar incelenmiştir (Şekil 3.23)



Şekil 3.23. Sürekli foto-fermantasyon reaktör düzenekleri

3.9.2. Foto-fermantasyonla tutundurma yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi (manyetik parçacıklar içeren reaktörler)

Hücre içine tutuklama yöntemiyle karşılaştırma yapabilmek amacıyla izolatların üzerine tutunacağı yüzey araştırmaları yapılmıştır. Almanya Potsdam ATB enstitüsü genç araştırmacılar başkanı Dr. Jan Mumme tarafından sentezlenen iki çeşit manyetik parçacıklar çalışmalarımızda kullanılmak üzere armağan edilmiştir. Bu manyetik parçacıklar çeşitli ön işlemler uygulanmış ve yüzey alanı artırılmış malzemelerdir. Zenginleştirme ortamı hazırlanıp reaktör düzenekleri kurulduktan sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Fosfat, Glutamat ve Asetat/Bütirat karışımı sterilizasyon sonrasında inokulasyonla birlikte yapılmıştır. İnokulasyonun yapılmasının ardından reaktörlerin içine 5’ er gram immobilizasyon materyallerinden eklenmiştir. Sistem gaz ölçere bağlandıktan sonra 100 rpm’de çalkalanmıştır. 6000 lüks ışık şiddeti halojen lambalarla sağlanmış ve reaktörler sıcaklık kontrollü odada 28°C’de tutulmuşlardır(Şekil 3.24). İmmobilizasyon materyali içermeyen başka bir reaktörde karşılaştırma amacıyla aynı şartlarda işletilmiştir.

R.Cap. ile yapılan çalışmalar 250 mL’lik reaktörlerde gerçekleştirilirken *S.Malt.2* ve *R.Gel.4* için kurulan reaktör düzeneklerinin hacmi 100 mL olarak tercih edilmiştir.



Şekil 3.24. Tutundurma deney düzeneği

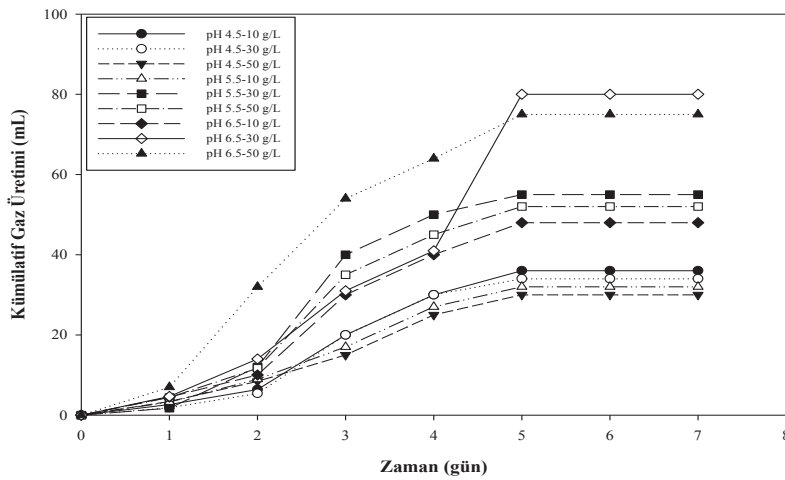
4. BULGULAR

4.1. Karanlık Fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri

Karanlık fermantasyonda metanojenlerin baskılanıp hidrojen üreten bakterilerin dominant hale getirilmesi amacıyla uygulanan ön işlemlerin sistem performansı ve hidrojen üretimine etkisini araştırmak amacıyla kesikli reaktörlerde BHP denemeleri gerçekleştirilmiştir.

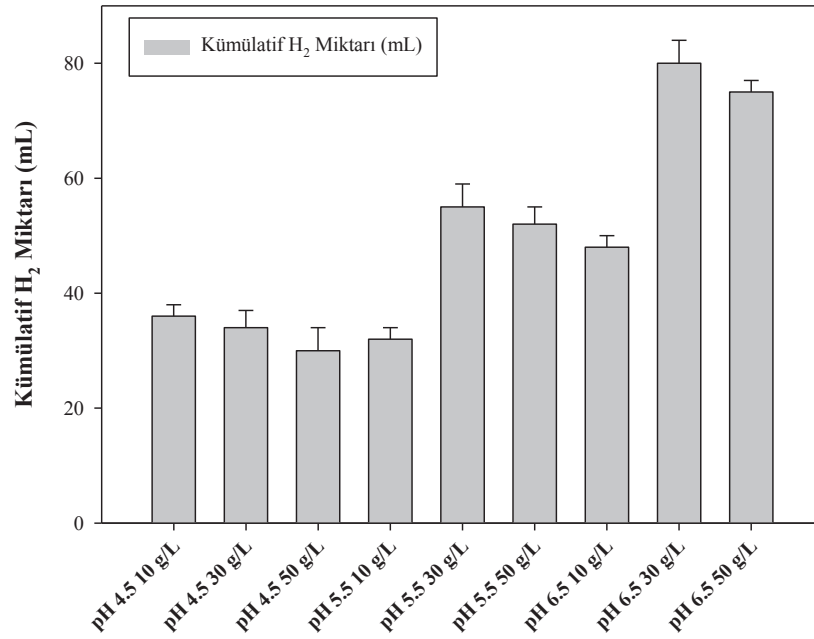
4.1.1. Ön işlem görmemiş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Karanlık fermantasyonda hiçbir ön işlem görmemiş karışık konsorsiyumla BHP denemeleri (Çizelge 3.4) yapılarak hidrojen üretim performansları incelenmiştir.



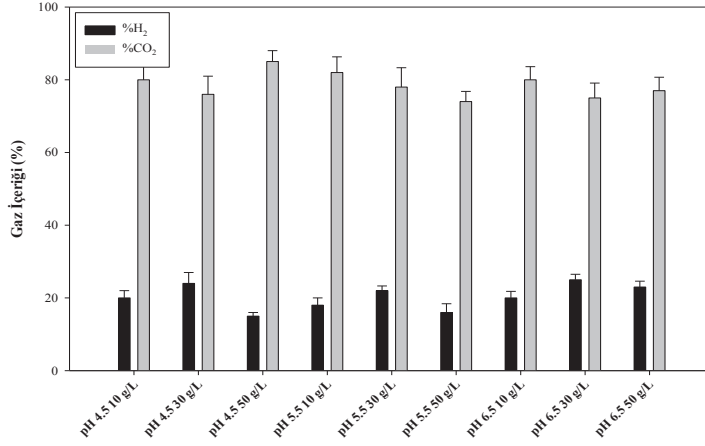
Şekil 4.1. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem görmemiş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

Substrat olarak süktroz ve inokulum olarak ön işlem görmemiş karışık konsorsiyum kullanıldığında kümülatif olarak en yüksek hidrojen gazı üretiminin pH 6.5 değeriinde ve 30 g/L süktroz konsantrasyonu ile yaklaşık 80 mL olarak elde edildiği görülmektedir. pH 6.5 değeriinde ve 50 g/L süktroz konsantrasyonunda yaklaşık 75 mL, pH 5.5 değeriinde ve 30 g/L süktroz konsantrasyonunda yaklaşık 55 mL gaz üretimi ile ikinci ve üçüncü sırada gelmektedir. Ön işleminden geçmemiş biyokütle ile en düşük gaz üretimleri pH 4.5 değeriinde ve 50 g/L süktroz konsantrasyonu için elde edilmiştir (Şekil 4.1).



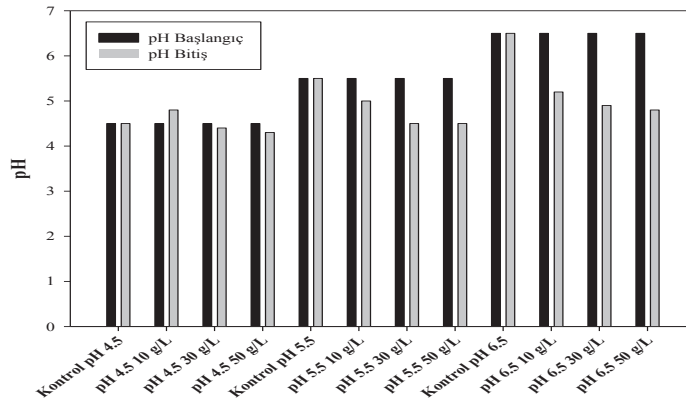
Şekil 4.2. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değeriinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem görmemiş biyokütle)

Toplam hidrojen miktarlarının karşılaştırmalı grafiğine bakıldığında en yüksek hidrojen üretiminin pH 6.5 değeriinde ve 30 g/L süktroz konsantrasyonunda yaklaşık 82 mL olduğu görülmektedir. Denemeler ikişer tekrarlı yapıldıkları için grafik değeri iki değeriin ortalaması ve standart sapma değeriinden oluşmaktadır. Standart sapma değerileri incelendiğinde ise tüm denemelerden istikrarlı sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.2).



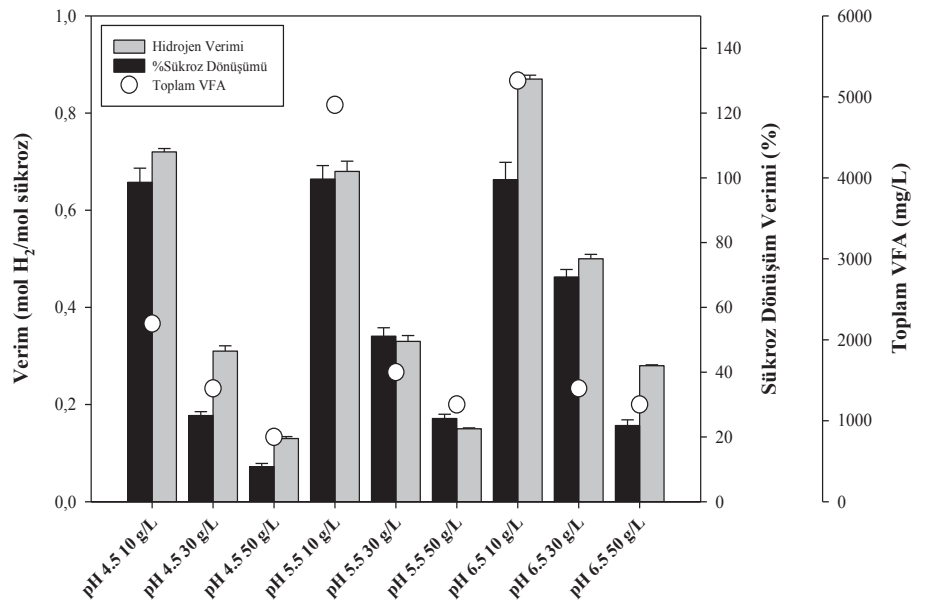
Şekil 4.3. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde H₂ ve CO₂ yüzdelерinin değişimi (Ön işlem görmemiş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak ön işlem görmemiş biyokütle kullanıldığında genel olarak pH 6.5 değerinde en yüksek H₂ yüzdesinin elde edildiği gözlenmiştir. (Şekil 4.3). Grafikteki değerler hidrojen üretimi boyunca ölçülen değerlerin ortalamasından oluşmaktadır. %0-3 arasında değişen düşük metan yüzdeleri metanojen bakterilerin faaliyetinin pek fazla olmadığına göstergesidir. En yüksek H₂ oranı pH 4.5 değerinde ve 30 g/L sükröz konsantrasyonunda %25 olarak elde edilmiştir. Bunun yanı sıra pH 6.5 değerinde ve 30 g/L sükröz konsantrasyonunda, %24 değerinde H₂ oranı ile onu takip etmektedir. pH 5.5 değerlerinin de hidrojen yüzdeleri pH 4.5 ve 6.5'a yakın olmasına rağmen nispeten düşüktür.



Şekil 4.4. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem görmemiş biyokütle)

Substrat olarak sükrozun ve inokulum olarak ön işleminden geçmemiş biyokütlenin kullanıldığı kesikli reaktör denemelerinde gaz üretimi sona erdiğinde pH değerlerinin genel olarak 4.5 'a yaklaştığı görülmektedir (Şekil 4.4). Her üç pH değeri için kontrol gruplarında pH değeri artarken içinde sükroz bulunan reaktörlerde pH değerleri başlangıçtan düşük çıkmıştır. Kesikli reaktörlerde pH değerinin asidik değerlere gelmesinin uçucu yağ asidi birikiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.5. Ön işlem görmemiş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan H₂ üretiminde hidrojen verimi, sükroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Hidrojen verimleri açısından elde edilen değerlerin 0.13-0.87 mol H₂/mol sükroz arasında değiştiği görülmektedir. En yüksek H₂ verimi pH 6.5 değerinde ve 10 g/L sükroz konsantrasyonunda elde edilirken en düşük verimlerin pH 4.5 ve pH 5.5 koşullarında 30 g/L sükroz konsantrasyonlarında elde edildiği görülmektedir.

Toplam VFA üretimlerine bakılacak olursa asetat ve bütiratın baskın olduğu üretimlerde 800-4900 mg/L arasında değişen asetat ve bütirat derişimleri göze çarpmaktadır. 10 g/L sükroz derişiminde pH'tan bağımsız olarak en yüksek VFA konsantrasyonu elde edilmiştir ve sükroz tüketimi %90'dır. 30 g/L sükroz

derişimlerinde ise süktroz tüketimi %30 seviyelerinde olup toplam VFA üretiminde düşüş gözlenmiştir. (Şekil 4.5).

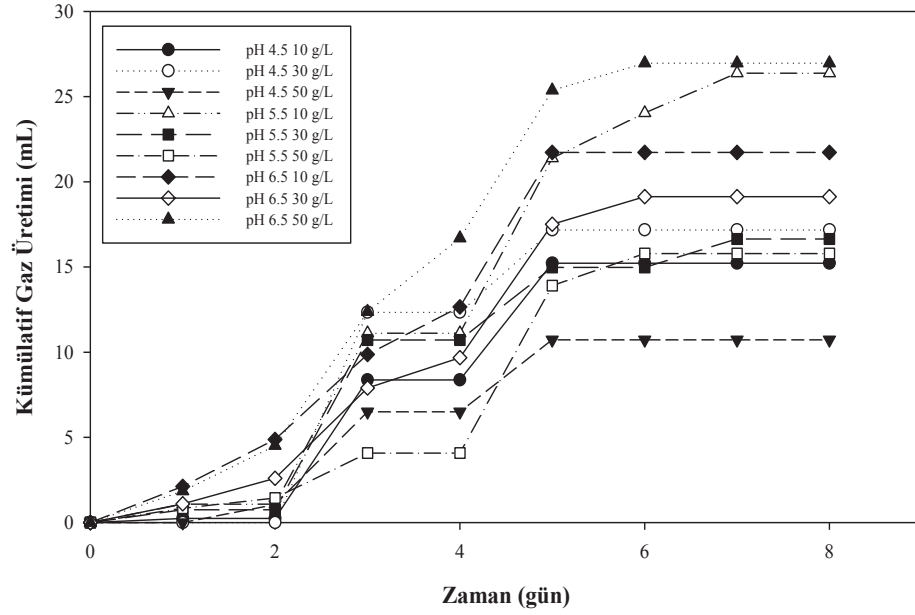
Çizelge 4.1. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem görmemiş biyokütle ve substrat olarak süktroz)

	Kons. (g/L)	P (mL)	Rm (mL/saat)	λ (saat)	R ²
pH 4.5	10	17.38	0.84	0.45	0.9888
	30	38.27	0.23	41.81	0.9999
	50	20.17	0.81	16.45	0.9777
pH 5.5	10	26.22	0.14	11.62	0.9888
	30	17.85	0.72	30.35	0.9777
	50	35.22	0.14	25.57	0.9888
pH 6.5	10	31.87	0.16	22.49	0.9888
	30	28.17	0.1	32.85	0.9999
	50	26.68	0.13	20.75	0.9999

Modifiye Gompertz denklemi ile katsayılar karşılaştırıldığında hidrojen üretim potansiyeli en yüksek olan kombinasyon, pH 4.5 değerinde ve 30 g/L süktroz konsantrasyonu için 38.27 mL olarak elde edilmiştir. Hidrojen üretim potansiyeli en düşük kombinasyon ise 17.38 mL ile pH 4.5 değerinde ve 10 g/L süktroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Maksimum hidrojen üretim hızı'nın en yüksek olduğu kesikli reaktör koşulları pH 4.5 ve 10 g/L süktroz; pH 4.5 ve 30 g/L süktroz ve pH 5.5 ve 30 g/L süktroz şeklinde sırasıyla 0.84, 0.81 ve 0.72 mL/saat'tir. Lag fazı en yüksek reaktör koşulu 41.81 saat ile pH 4.5 ve 30 g/L süktroz konsantrasyonu ile elde edilmişken en düşük lag fazı pH 4.5 ve 10 g/L süktroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Lag fazı açısından en hızlı olan bu kombinasyon olarak gözükse de hidrojen üretimi açısından diğer kombinasyonlara göre daha düşük kalmıştır (Çizelge 4.1).

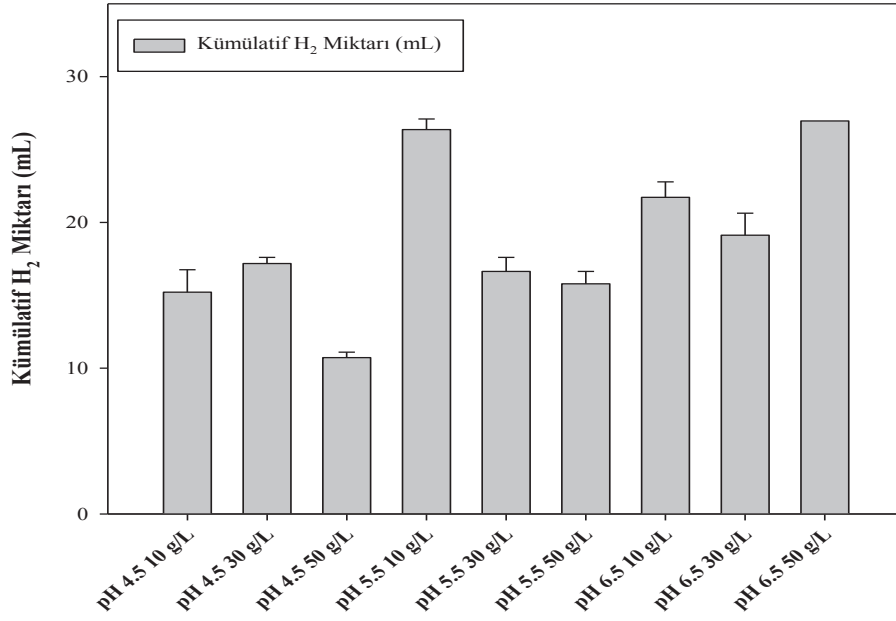
4.1.2. Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak süktrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Asit muamelesi karanlık fermantasyonda kullanılan karışık konsorsiyuma ön işlem olarak en yaygın biçimde uygulanmış olan bir yöntemdir. Bölüm 3.3.2’de ayrıntılı biçimde anlatılmış olan yöntemle biyokütleyle asit ön işlemi uygulanarak BHP testleri ile H₂ üretim potansiyelleri incelenmiştir.



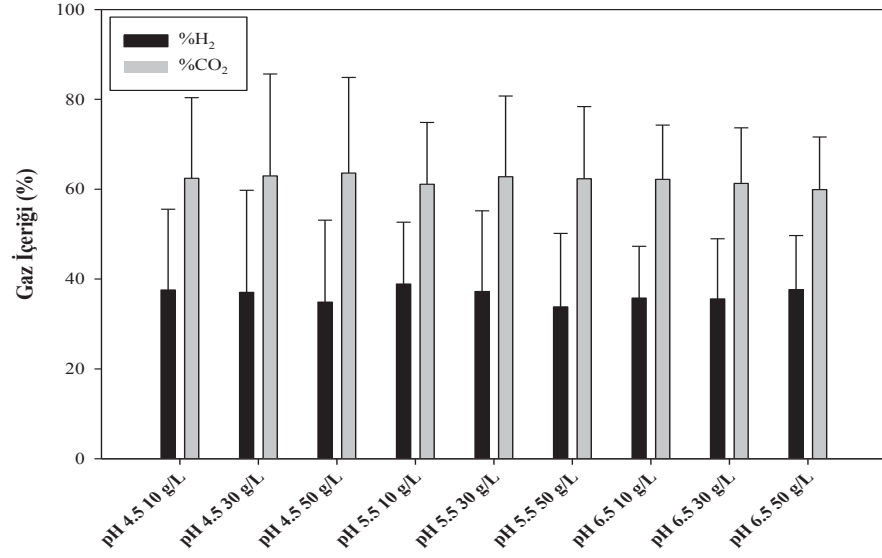
Şekil 4.6. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak süktrozun ve ön işlem olarak asitlendirilmiş biyokütlenin kullanıldığı kesikli biyoreaktör kombinasyonlarında farklı pH ve farklı süktroz konsantrasyonlarının karşılaştırmalı günlük kümülatif gaz üretim grafiklerine bakıldığında en yüksek gaz üretim değerinin pH 6.5 değerinde ve 50 g/L süktroz konsantrasyonu ile elde edildiği görülmektedir. En düşük gaz üretimi ise pH 4.5 değerinde ve 50 g/L süktroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Genel olarak kümülatif gaz üretim trendleri değişik pH ve süktroz konsantrasyonu değerleri için benzerlik göstermektedir (Şekil 4.6)



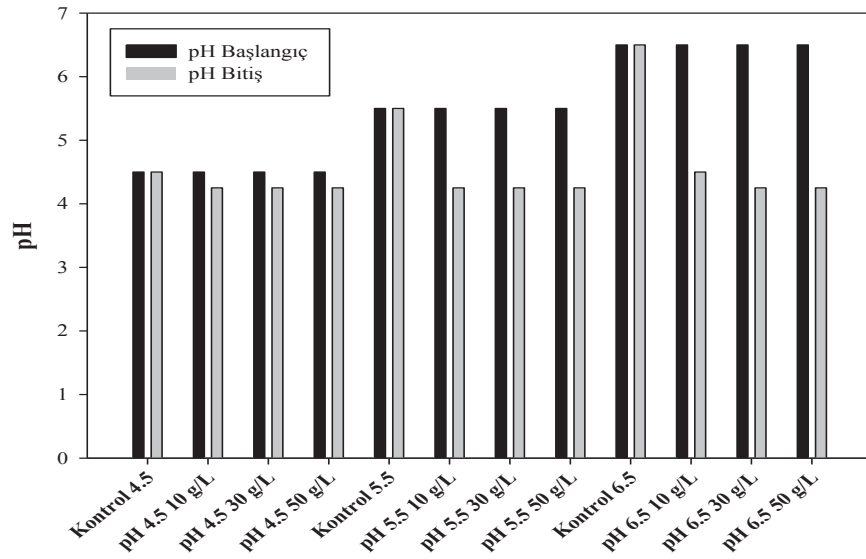
Şekil 4.7. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütlenin inokulum olarak kullanıldığı kesikli reaktörlerde pH 4.5'ta en yüksek gaz üretiminin 30 g/L sükröz konsantrasyonunda; pH 5.5 denemelerinde 10 g/L sükröz konsantrasyonunda ve pH 6.5 denemeleri için 50 g/L sükröz konsantrasyonunda elde edildiği görülmektedir. Genel bir değerlendirme yapıldığında ise, pH 4.5 ve 30 g/L sükröz konsantrasyonu ve pH 6.5 değerinde ve 50 g/L sükröz konsantrasyonu için en yüksek hidrojen gazı üretimleri gözlenmiştir. Standart sapma değerlerine bakıldığında en istikrarlı değer pH 4.5 değerinde ve 50 g/L sükröz konsantrasyonu için ve pH 6.5 değerinde ve 50 g/L sükröz konsantrasyonu için elde edildiği görülürken en farklı gaz üretim değerlerinin pH 4.5 değerinde ve 10 g/L sükröz konsantrasyonu için elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.7).



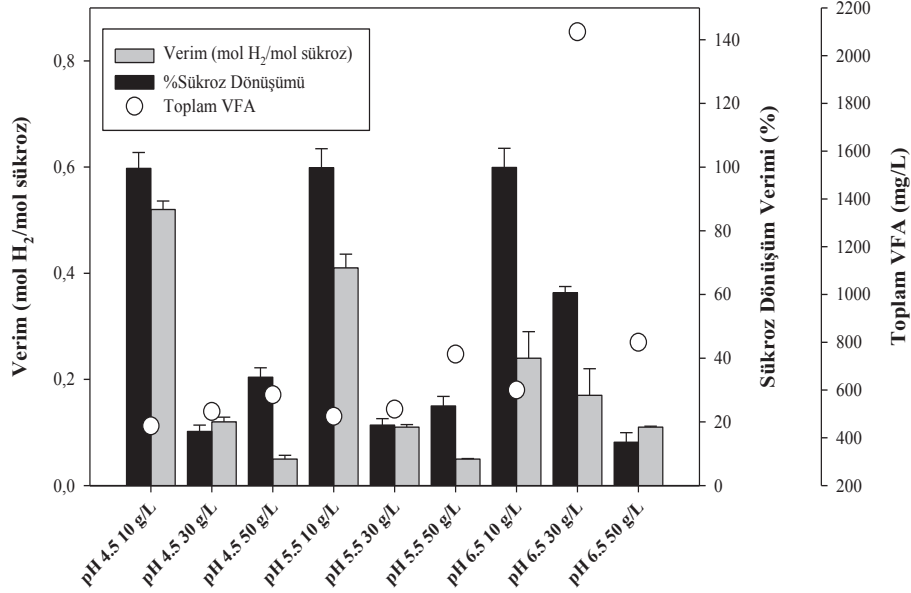
Şekil 4.8. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde H₂ ve CO₂ yüzdelерinin değişimi (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve ön işlem olarak asit muamelesi görmüş inokulum kullanılarak kurulan kesikli reaktörlerde gaz yüzdelерinin işlem görmemiş inokulumu göre yükseldiği görülmektedir. Bütün pH değerlerinde %30-40 arasında değişen hidrojen gaz yüzdesi görülürken metan oranlarının 0'a düştüğü görülmektedir. Metanojen bakterilerin tamamen indirgenmesi anlamına gelen bu durum hidrojen üretimi açısından olumlu bir gelişmedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütlenin inokulum olarak kullanıldığı kesikli reaktörlerde gaz üretimi sona erdiğinde pH değerlerinin genel olarak 4 ile 4.5 arasına yaklaştığı görülmektedir(Şekil 4.9).



Şekil 4.10. Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözden H₂ üretiminde hidrojen verimi, sükröz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözden hidrojen üretim potansiyelleri üzerine yapılan denemelerde verim açısından en iyi sonuçların her üç pH değerinde de 10 g/L sükröz konsantrasyonunda elde edildiği gözlenmektedir (Şekil 4.10). En yüksek verim 0.5 mol H₂/mol sükröz olarak pH 4.5 koşulunda elde edilmiştir.%98 sükröz dönüşümünün gözlendiği bu reaktörde verim değerlerinin teorik değerin çok altında kalmış olması sükröz dönüşümünün H₂ üretimine değil biyokütle çoğalmasına yönlendiğini göstermektedir. Asetat ve bütiratın baskın olduğu toplam uçucu yağ asidi üretimi genel olarak 400-800 mg/L arasında değişen değerler almış; yalnızca pH 6.5 değerinde ve 30 g/L konsantrasyonda 2100 mg/L toplam uçucu yağ asidi üretimi gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak asit muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

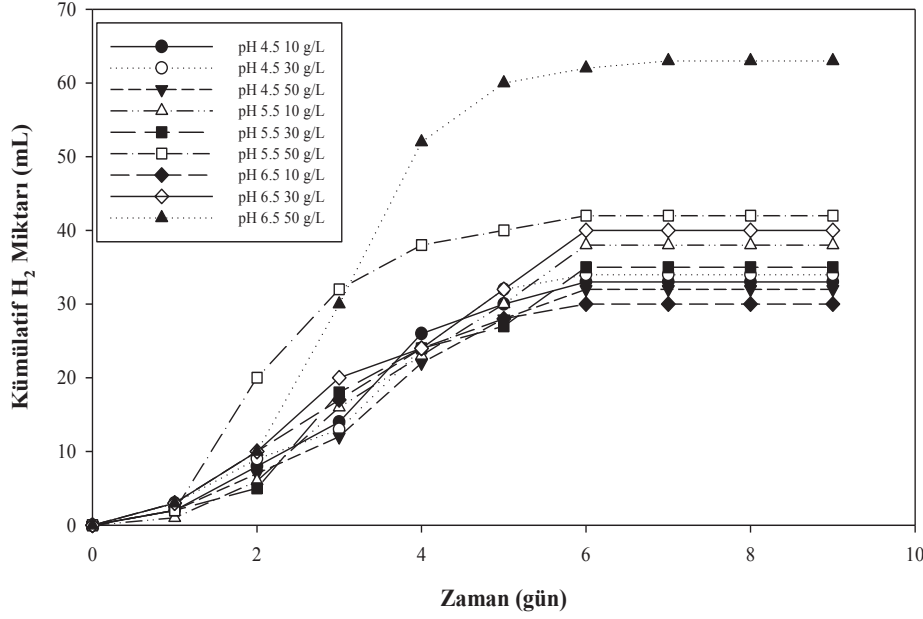
	Kons. (g/L)	P (mL)	Rm (mL/saat)	λ (saat)	R²
pH 4.5	10	28.68	0.70	20.69	0.9888
	30	19.51	0.74	21.97	0.9866
	50	14.62	0.60	14.97	0.9999
pH 5.5	10	22.28	0.86	25.92	0.9944
	30	18.33	0.64	25.75	0.9944
	50	14.63	0.42	28.08	0.9999
pH 6.5	10	12.64	0.69	26.79	0.9899
	30	27.25	0.91	24.97	0.9922
	50	30.79	1.23	26.56	0.9977

Modifiye Gompertz denklemi ile katsayılar karşılaştırıldığında hidrojen üretim potansiyeli en yüksek kombinasyon pH 6.5 için 30.79 mL olarak elde edilmiştir. Hidrojen üretim potansiyeli açısından en düşük kombinasyon ise 12.64 mL ile pH 6.5 koşulunda 10 g/L sükroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Saat başına hidrojen üretim hızı en yüksek kesikli reaktör koşulları pH 6.5 değerinde ve 50 g/L sükroz konsantrasyonunda 1.23 mL/saat olarak elde edilirken bu değere en yakın üreimin pH 6.5 değerinde ve 30 g/L sükroz konsantrasyonunda 0.91 mL/saat olduğu görülmüştür. Lag fazlarının birbirlerine yakın değerler olduğu görülmüştür. Lag fazı en yüksek reaktör koşulu 28.08 saat ile pH 5.5 değerinde ve 50 g/L sükroz konsantrasyonunda iken en düşük lag fazlı reaktör 14.97 saat ile pH 4.5 değerinde ve 50 g/L sükroz konsantrasyonu içeren reaktördür. Lag fazı açısından en hızlı olan bu kombinasyon olarak gözüktüğü de hidrojen üretimi açısından diğer kombinasyonlara göre daha düşük kalmıştır (Çizelge 4.2).

4.1.3. Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

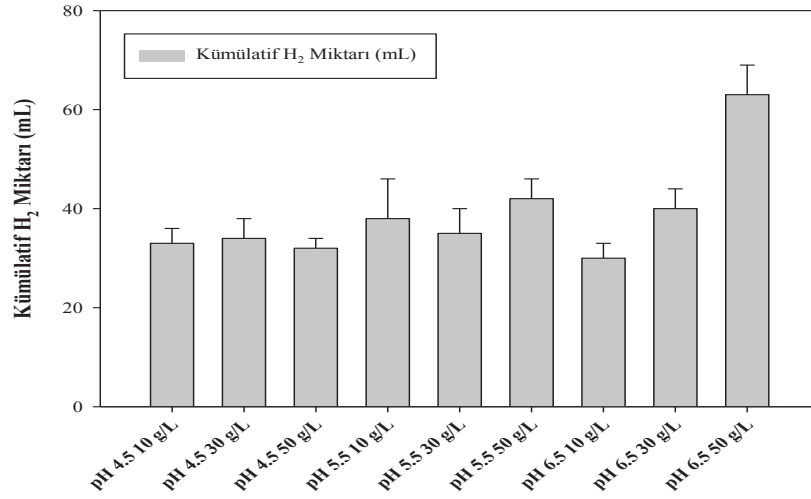
Baz muamelesi karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde kullanılan önemli yöntemlerden biridir. BHP denemeleri Bölüm 3.3.3'te ayrıntılı bir biçimde

anlatıldığı şekilde gerçekleştirilerek baz ön işleminin hidrojen üretim portansiyelleri üzerine etkisi incelenmiştir.



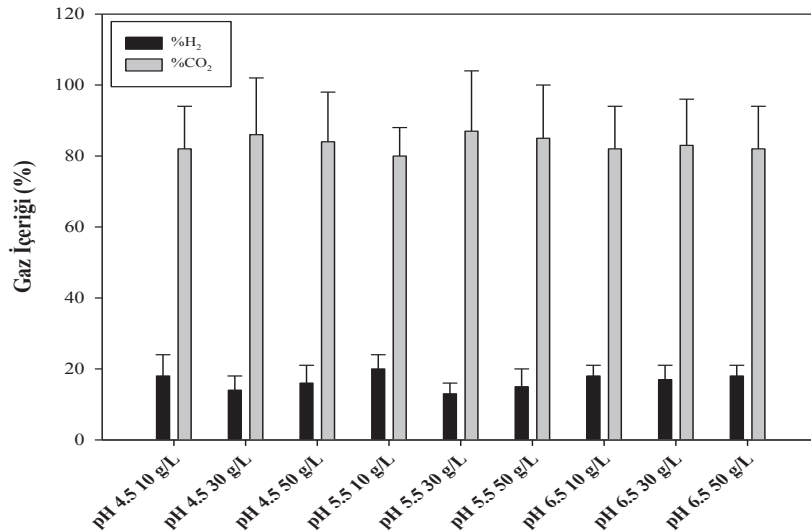
Şekil 4.11. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak süktrozun ve ön işlem olarak baz muamelesi yapılmış olan biyokütlenin kullanıldığı kesikli biyoreaktör kombinasyonlarında farklı pH ve farklı süktroz konsantrasyonlarının karşılaştırmalı, saatlik kümülatif gaz üretim grafiklerine bakıldığında en yüksek gaz üretim değeri pH 6.5'te 50 g/L süktroz konsantrasyonunda elde edildiği görülmektedir. En düşük gaz üretimi ise pH 6.5 değerinde ve 10 g/L süktroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Genel olarak kümülatif gaz üretim trendleri değişik pH ve süktroz konsantrasyonu değerleri için benzerlik göstermektedir (Şekil 4.11). Yaklaşık iki günlük lag fazının ardından iki ve beşinci günler arasında eksponansiyel bir gaz üretimi ve ardından dört günlük durgun faza geçiş, dolayısıyla gaz üretiminde durma gözlenmiştir.



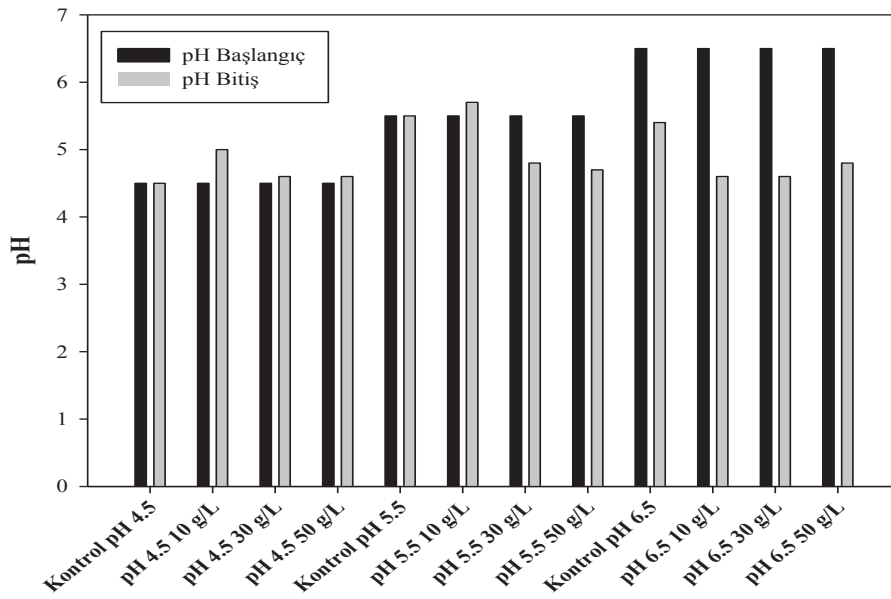
Şekil 4.12. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükrözün ve ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütlenin inokulum olarak kullanıldığı kesikli reaktörlerde pH 4.5 ve pH 5.5 da 10 ve 30 g/L sükröz konsantrasyonları için benzer hidrojen üretimleri gözlenmiştir. En yüksek hidrojen üretimi ise pH 6.5 değerinde 62 mL olarak gözlenmiştir. Standart sapma değerlerine bakıldığında genel olarak tüm denemelerde istikrarlı gaz üretim değerlerinin elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.12).



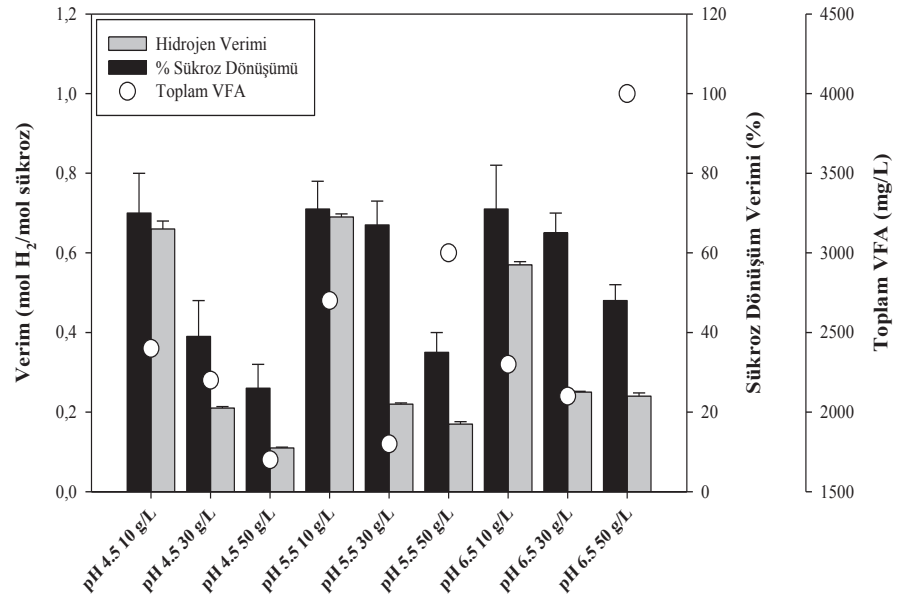
Şekil 4.13. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde H₂ ve CO₂ yüzdelерinin değişimi (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak baz muamelesi yapılmış biyokütle kullanıldığında genel olarak pH 5.5 değerinde en yüksek H_2 oranlarının elde edildiği görülmektedir. En yüksek H_2 yüzdesi pH 5.5 değerinde ve 10 g/L sükröz konsantrasyonu için %21 olarak elde edilmiştir. pH 4.5 değerinde ve 30 g/L sükröz konsantrasyonunda ve pH 6.5 değerinde ve 30 g/L sükröz konsantrasyonunda H_2 yüzdesi düşük kalmıştır. CO_2 yüzdesinin tüm pH'larda yüksek olduğu görülürken metan yüzdesinin hep sıfır olması ortamdaki metanojen bakterilerin elimine edildiğine işaret etmektedir. (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle)

Kesikli reaktör denemelerinin başlangıç ve sonlarında ölçülen pH değerlerine bakıldığında hidrojen üretimi sonrasında pH üretim değerlerinin genellikle 4.5'a düştüğü görülmektedir. Kontrol reaktörlerinde pH değerlerinde çok büyük değişimler gözlenmemiştir. Başlangıç pH değerinin 5.5 olduğu reaktörlerde 10 g/L sükröz konsantrasyonunda pH değeri başlangıç değerine göre yükselerek 5.7 olmuştur. Bu durum diğer reaktörler de gözlenmemiştir (Şekil 4.14)



Şekil 4.15. Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözdan H₂ üretiminde hidrojen verimi, sükröz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözdan hidrojen üretim potansiyellerini tespit etmek amacıyla kurulan kesikli reaktörlerde verim ve sükröz dönüşümü açısından en yüksek değerlerin 10 g/L konsantrasyonlarda elde edildiği görülmektedir. pH 4.5 ve 5.5 koşullarında verim değerleri yaklaşık 0.7 mol H₂/mol sükröz olarak elde edilmiştir. En düşük verim değerleri ise her pH koşulunda 50 g/L sükröz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sükröz dönüşümlerinin de oldukça düşük olduğu bu reaktörlerde yüksek substrat konsantrasyonlarının olumsuz etkisi göze çapmaktadır. Baskın olarak asetat ve bütiratın gözleendiği uçucu yağ asitlerinden en yüksek üretim 4000 mg/L olarak pH 6.5 değerinde ve 50 g/L sükröz konsantrasyonunda elde edilmiştir. En düşük uçucu yağ üretimi ise pH 4.5 değerinde ve 50 g/L konsantrasyonunda 1700 mg/L olarak gözlenmiştir (Şekil 4.15).

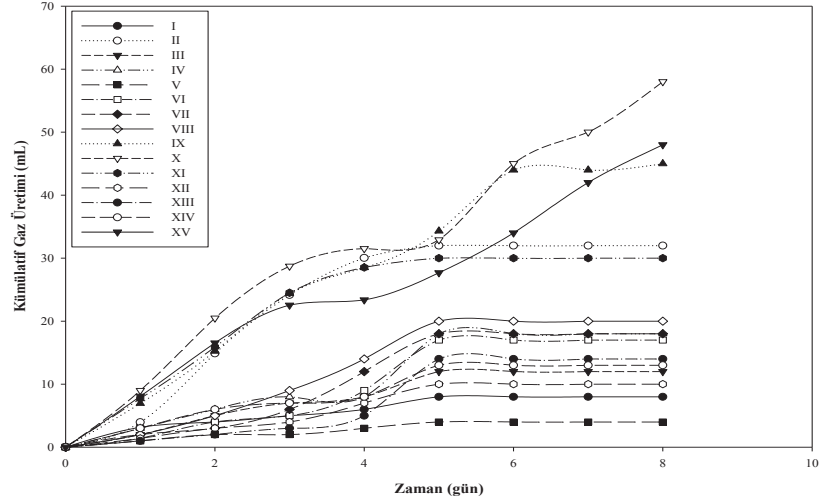
Çizelge 4.3. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak baz muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükröz)

	Kons. (g/L)	P (mL)	R _m (mL/saat)	λ (saat)	R ²
pH 4.5	10	36.16	0.67	30.97	0.9988
	30	35.50	0.78	41.74	0.9988
	50	30.91	0.55	37.90	0.9988
pH 5.5	10	38.47	0.64	21.98	0.9999
	30	38.01	0.50	25.21	0.9977
	50	46.10	1.04	24.52	0.9999
pH 6.5	10	31.13	0.69	20.28	0.9999
	30	43.84	0.54	26.10	0.9997
	50	65.29	1.33	41.52	0.9999

Modifiye Gompertz denklemi ile katsayılar karşılaştırıldığında hidrojen üretim potansiyeli en yüksek kombinasyon pH 6.5 değerinde ve 50 g/L sükröz konsantrasyonu için 65.29 mL olarak elde edilmiştir. Hidrojen üretim potansiyeli en düşük kombinasyon ise 30.91 mL ile pH 4.5 koşulunda elde edilmiştir. Saat başına hidrojen üretim hızı en yüksek kesikli reaktör koşulları hidrojen üretim potansiyelinde olduğu gibi pH 6.5 değerinde ve 50 g/L sükröz konsantrasyonu için 1.33 saattir. En yüksek hidrojen üretim hızını 1.04 saat ile pH 5.5 koşulunda 50 g/L sükröz konsantrasyonu izlemiştir. Lag fazı en yüksek reaktör koşulu 41.74 saat ile pH 4.5 değerinde ve 30 g/L sükröz konsantrasyonunda iken en düşük lag fazlı reaktör pH 6.5 değerinde ve 10 g/L sükröz içeren reaktördür (Çizelge 4.3).

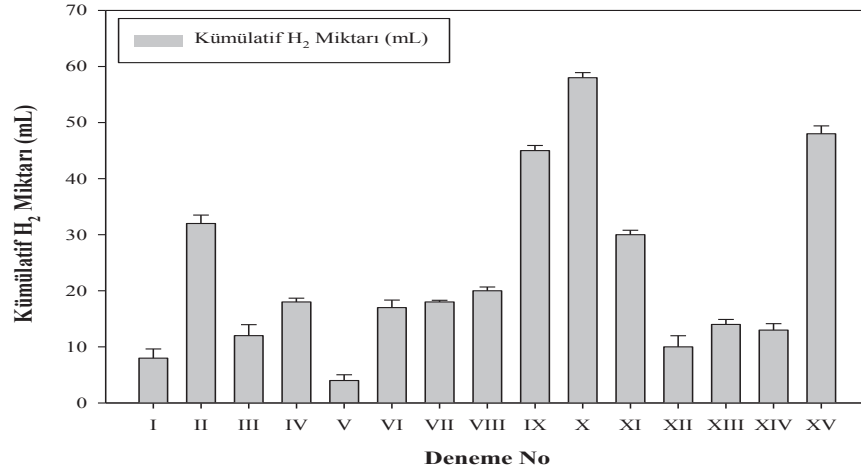
4.1.4. Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözden kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Bölüm 3.3.5'te ayrıntılı biçimde anlatılmış olan BHP denemeleri ile önemli bir metanojen inhibitörü olan BESA muamelesinden geçmiş karışık konsorsiyumun inokulum olarak kullanıldığı karanlık fermentasyonla hidrojen üretim potansiyelleri üzerine etkileri ayrıntılı biçimde incelenmiştir.



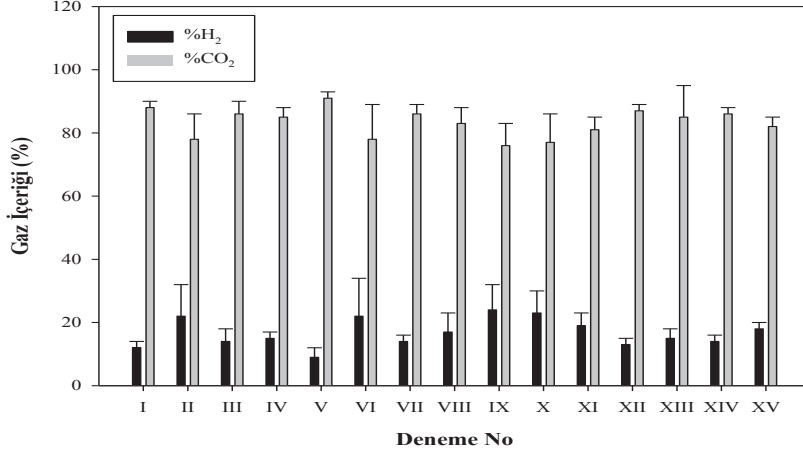
Şekil 4.16. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak BESA muamelesinden geçmiş kesikli biyoreaktörlerle günlük kümülatif gaz üretim grafiklerine bakıldığında maksimum 58 mL hidrojen gazının deneme X koşullarında (105 mM BESA; pH 6.5; 50 g/L sükröz) elde edildiği görülmektedir. En düşük değer de deneme V koşullarında (105 mM BESA; pH 4.5; 50 g/L sükröz) 5 mL olarak elde edilmiştir. Diğer deney koşullarında elde edilen hidrojen üretim miktarları 15-50 mL arasında değişmektedir (Şekil 4.16).



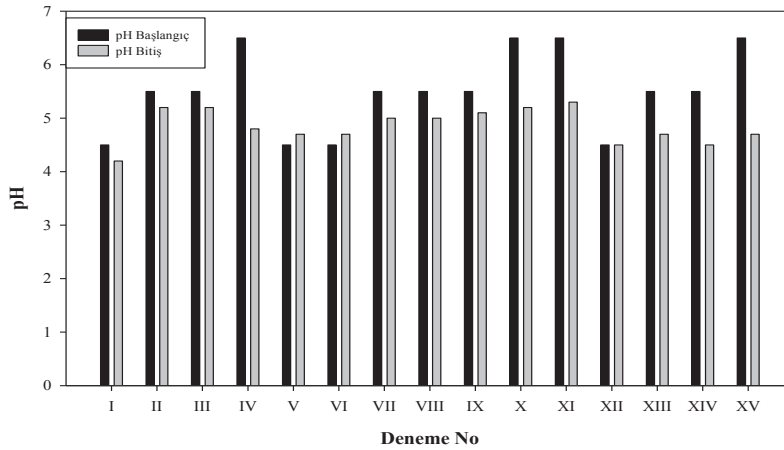
Şekil 4.17. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)

Toplam hidrojen miktarlarının karşılaştırmalı grafiğinde genel olarak 20 mL civarında hidrojen gazı üretimi görülse de; deneme X'da (105 mM BESA; pH 6.5; 50 g/L süktroz) 60 mL'ye yaklaşan değeri gözlenmiştir (Şekil 4.17).



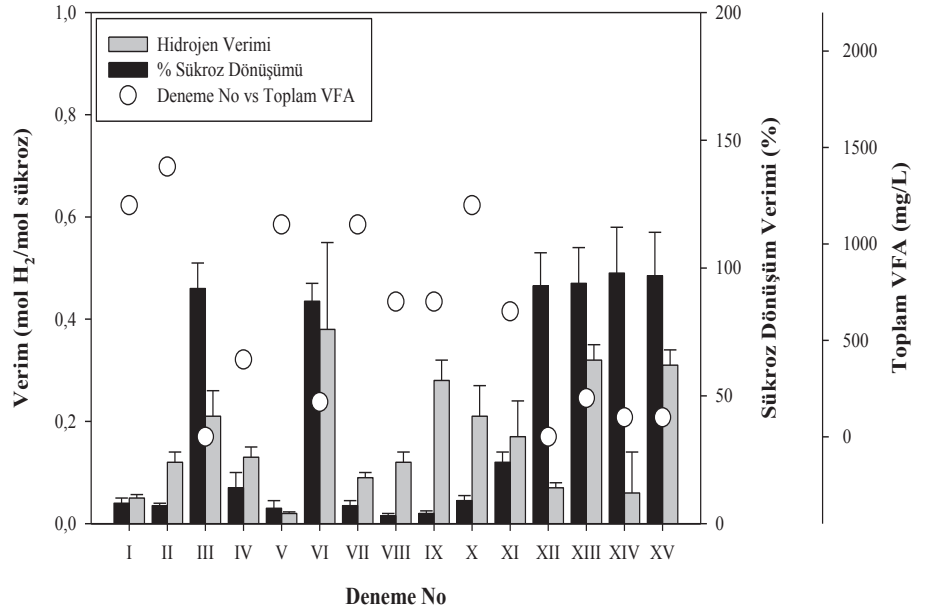
Şekil 4.18. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değeriinde H₂ ve CO₂ yüzdelerinin değışimi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)

Süktrozun substrat olarak ve BESA işlemi görmüş biyokütleinin inokulum olarak kullanıldığı deneme setinde genel olarak hidrojen gazı değeriilerinin %10-20 arasında değıştiğı görülmektedir. BESA kuvvetli bir metan inhibitörü olarak literatüre geçmiş olmasına rağmen %1 metan gazı oluşması kullanılan biyokütlede çok etkili olmadığı ya da konsantrasyonun düşük olduğu anlamına gelmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.19. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değeriinde başlangıç ve bitiş pH değeri (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle)

Başlangıç ve bitiş pH değerlerinin karşılaştırmalı grafiğine bakıldığında genel olarak çıkış pH değerlerinde düşme gözlenmektedir. Ancak deneme XII (200 mM BESA; pH 4.5; 30 g/L süktroz) koşullarında çıkış pH değerlerinde az da olsa yükselme gözlenmektedir. BESA kullanılan denemelerin büyük kısmında prosesin pH değerini 5'e çektiği gözlenmektedir. Hidrojen üretimi sırasında asitleşme olmaması yol izinin asitleşmeye kaymadığı dolayısıyla hidrojen üretiminde azalmalar olacağı anlamına gelmektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak süktrozdan H₂ üretiminde hidrojen verimi, süktroz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Substrat olarak süktroz ve inokulum olarak BESA muamelesinden geçmiş inokulum kullanılarak yapılan kesikli biyoreaktör denemelerinde genel olarak şeker kullanım verimlerinin iyi olduğu gözlenmektedir. Substrat olarak süktroz gibi bir şeker kullanıldığında şeker kullanım verimleri ile üretilen hidrojen miktarları karşılaştırıldığında gaz miktarlarının daha düşük olduğu gözlenmektedir. Bu olumsuzluğun biyokütle performansından kaynaklandığı düşünülmektedir. Süktroz dönüşüm verimleri bakımından en iyi sonuç deneme XII koşullarında (200 mM BESA; pH 4.5; 30 g/L süktroz) %15 olarak elde edilirken süktroz kullanımlarında deneme XIV ve XV koşullarında (200 mM BESA; pH 5.5; 50 g/L süktroz ve pH 6.5; 30 g/L süktroz) %99'lara varan süktroz giderimleri gözlenmiştir.

Verim değerlerine bakıldığında ise 0.3 mol H₂/mol süktroz verim değerinin deneme VI'da (105 mM BESA; pH 4.5; 10 g/L süktroz) elde edildiği görülmektedir. Süktroz konsantrasyonun yüksek olduğu denemelerde verim değerlerinin düşük oldukları gözlenmektedir.

VFA sonuçlarında ise asetik asit ve bütirik asidin baskın yağ asitleri oldukları gözlenmiştir. Toplamda en yüksek uçucu yağ asidi, 1430 mg/L konsantrasyonla deneme II (10 mM BESA; pH 5.5; 50 g/L)'de elde edilmiştir (Şekil 4.20). Box-Behnken istatistiksel analiz sonuçları; optimum üretim grafikleri ve denklemleri Ek 6'da yer almaktadır.

Çizelge 4.4. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak süktroz)

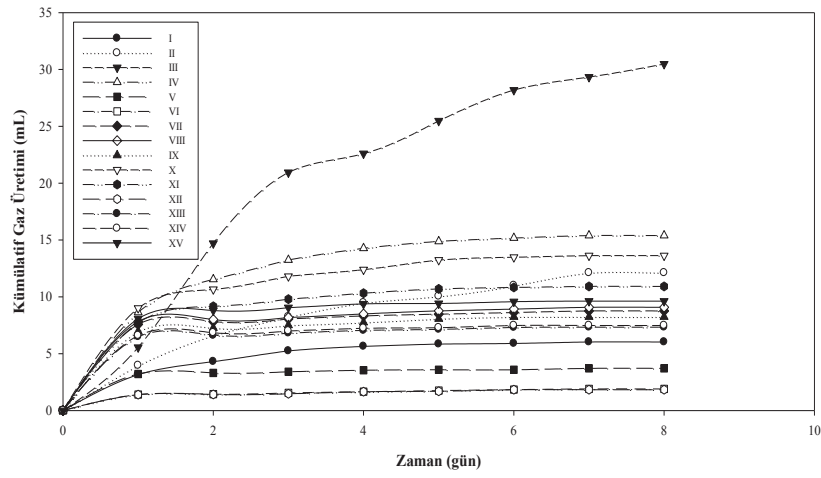
Deneme No	P (mL)	R _m	Λ (saat)	R ²
I	8.31	0.18	25.65	0.9933
II	36.64	0.23	27.79	0.9933
III	11.51	0.13	9.44	0.9988
IV	21.79	0.32	28.34	0.9966
V	5.08	0.13	35.24	0.9944
VI	18.69	0.27	26.83	0.9777
VII	16.30	0.18	19.78	0.9977
VIII	20.73	0.25	18.35	0.9966
IX	68.47	0.31	34.49	0.9899
X	109.20	0.45	56.23	0.9977
XI	32.36	0.38	25.49	0.9988
XII	10.91	0.23	26.83	0.9977
XIII	17.31	0.21	17.61	0.9990
XIV	18.02	0.29	31.55	0.9998
XV	54.26	0.41	35.45	0.9998

Modifiye Gompertz denklemi ile elde edilen kinetik katsayılar karşılaştırıldığında hidrojen üretim potansiyeli en yüksek deneme koşulu 109.02 mL hidrojen ile deneme X'da (105 mM BESA; pH 6.5; 50 g/L süktroz) elde edilmiştir. Hidrojen üretim potansiyeli en düşük olan koşullar ise 5.08 mL hidrojen ile deneme V'e (105 mM BESA; pH 4.5; 50 g/L süktroz) aittir. Hidrojen üretim hızlarında en yüksek değer 0.45 mL/saat olarak hidrojen üretim potansiyelinde olduğu gibi deneme X'da elde edilmiştir. En düşük değer ise 0.13 mL/saat olarak deneme V'te gözlenmiştir. Lag zamanı en kısa olan deneme III (

10 mM BESA; pH 5.5; 10 g/L sükröz) 9.44 saat en uzun olan ise 56.23 saat ile deneme X'dur (Çizelge 4.4).

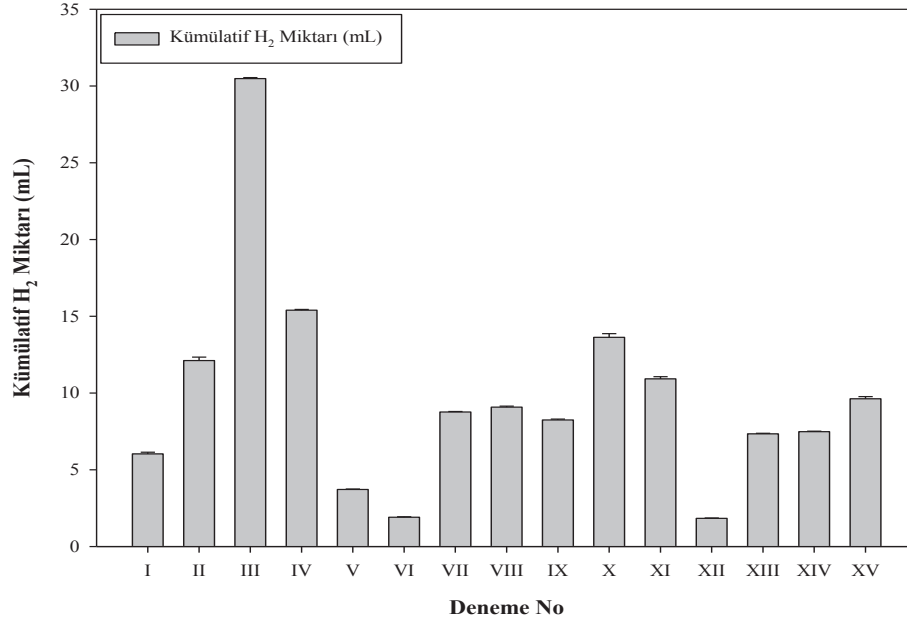
4.1.5. Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözden kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Ön işlem olarak TCl muamelesinin hidrojen üretim performansları üzerine etkisi Bölüm 3.3.6'da ayrıntılı biçimde anlatıldığı biçimde BHP denemeleri ile incelenmiştir.



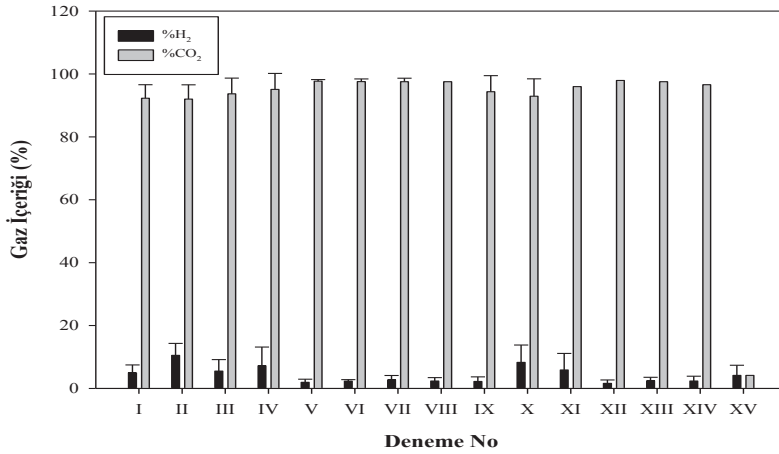
Şekil 4.21. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak TCl muamelesinden geçmiş biyokütle kullanılarak hazırlanan kesikli biyoreaktörlerde elde edilen kümülatif hidrojen üretim değerlerine bakılacak olursa deneme III koşullarında (10 mM TCl; pH 5.5; 50 g/L glikoz) en yüksek üretim performansının elde edildiği görülmektedir. Kümülatif hidrojen üretim eğilimleri açısından diğer tüm değerler birbirine yakın çıkmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.22. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle)

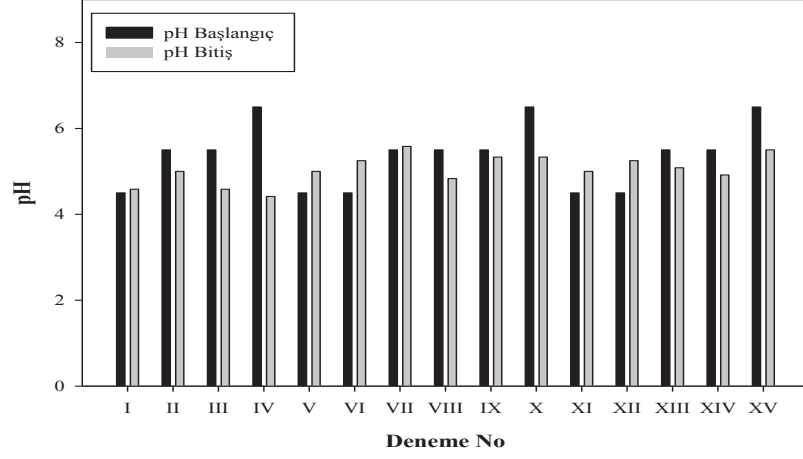
Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak TCl muamelesinden geçmiş biyokütlenin kullanıldığı kesikli biyoreaktörlerde toplam hidrojen miktarlarının genel olarak düşük seyir izledikleri görülmektedir. Standart sapmalara bakıldığında en istikrarlı sonuçlar ise bu ön işlem ile elde edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.23. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde H₂ ve CO₂ yüzdelерinin değişimi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle)

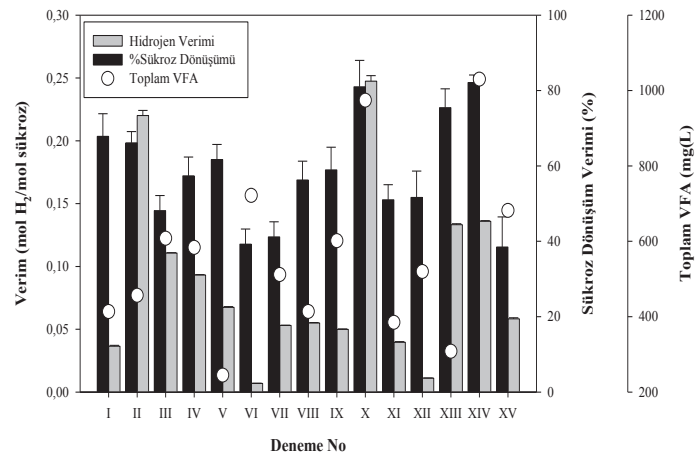
Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak TCl muamelesinden geçmiş biyokütle kullanıldığında tüm deneme modellerinde çok düşük hidrojen yüzdeleri

görülmektedir. TCl'in inhibe edici etkisinin metanojenlerin yanı sıra hidrojen üreten mikroorganizmalarda da etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle)

Başlangıç ve bitiş pH değerlerine bakıldığında çıkış pH değerlerinin 5 civarında olduğu görülmektedir. Hemen hemen tüm deneme modellerinde çıkış pH değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum görülen düşük hidrojen yüzdelerinin de açıklaması niteliğindedir. Asitleşmeye gitmesi gereken yol izi pH 7'ye doğru yaklaşım sergilemiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözden H₂ üretiminde hidrojen verimi, sükröz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak TCl muamelesinden geçmiş biyokütle kullanıldığında elde edilen substrat verimi ve hidrojen verimliliği

değerleri beklenenin oldukça altındadır. Substrat verimi açısından en yüksek değerler 19.46 mL H₂/ g sükroz ve 17.31 mL H₂/ g sükroz olarak deneme X ve deneme III 'te (105 mM TCl; pH 6.5; 10 g/L sükroz ve 10 mM TCl; pH 5.5; 50 g/L sükroz) elde edilmiştir. Hidrojen verimlilikleri ise yine deneme X ve II 'de (10 mM TCl; pH 5.5; 10 g/L sükroz) 0.247 mol H₂/mol sükroz ve 0.222 mol H₂/mol sükroz olarak elde edilmiştir (Şekil 4.25). Sükroz dönüşüm verimleri arasında en yüksek değer %84 olarak deneme XIV 'te (200 mM TCl; pH 5.5; 50 g/L sükroz) da elde edilirken diğer denemelerde %50-80 arasında değişen değerler elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.25). Substrat olarak sükroz ve inokulum olarak TCl muamelesi görmüş biyokütlenin kullanıldığı denemelerde incelenen VFA sonuçlarında; asetik asit ve heptanoik asit oluştuğu gözlenmiştir. Toplamda en yüksek uçucu yağ asidi 1030 mg/L konsantrasyonla deneme XIV (200 mM TCl; pH 5.5; 50 g/L)'de gözlenmiştir (Şekil 4.25). Box-Behnken istatistiksel analiz sonuçları; optimum üretim grafikleri ve denklemleri Ek 6'da yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

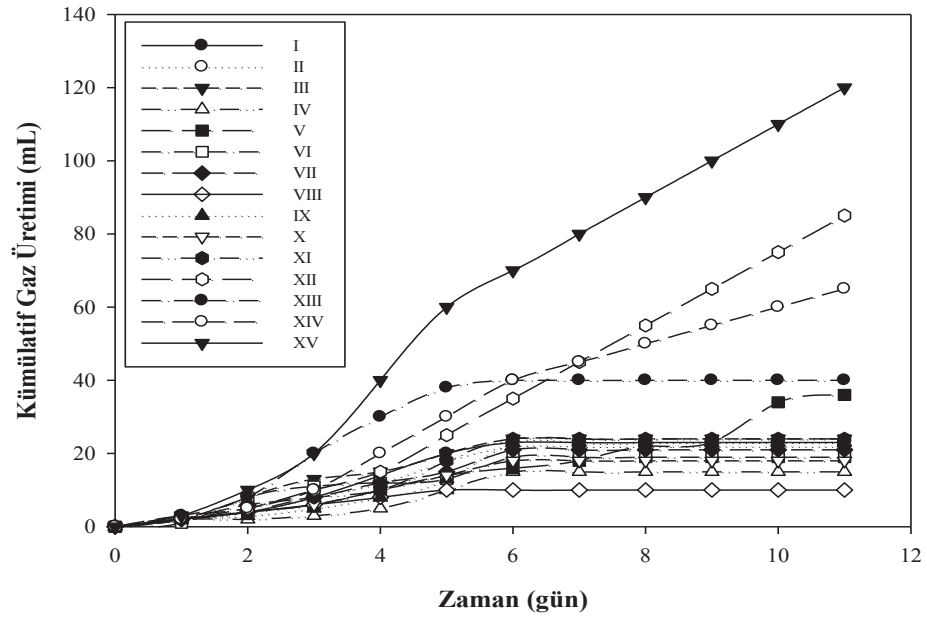
Deneme No	P	Rm	λ	R2
I	5.57	2.54	22.74	0.9992
II	11.86	0.12	5.02	0.9998
III	29.67	0.31	5.12	0.9999
IV	14.86	0.30	1.03	0.9898
V	3.55	2.42	22.21	0.9999
VI	1.68	1.37	2.69	0.8999
VII	8.41	0.50	4.03	0.9999
VIII	8.65	0.52	3.99	0.9999
IX	7.91	0.44	3.87	0.9999
X	12.91	0.37	0.86	0.9996
XI	10.47	0.37	2.53	0.9997
XII	1.64	0.60	1.49	0.9999
XIII	7.09	0.45	4.09	0.9999
XIV	7.26	0.45	4.15	0.9999
XV	9.36	0.49	4.08	0.9999

Modifiye Gompertz denklemi ile hesaplanan kinetik katsayılarla bakıldığında en yüksek hidrojen üretim potansiyeli 29.67 mL olarak deneme III 'te (10 mM TCl; pH 5.5; 50 g/L sükroz) elde edilmiştir. Hidrojen üretimi en hızlı olan deneme seti ise 2.54 mL/saat olarak deneme I (10 mM TCl; pH 4.5; 30 g/L

sükroz)'dir. Lag zamanı en kısa deneme seti 0. 86 saat ile deneme X (105 mM TCl; pH 6.5; 10 g/L sükroz) iken en uzun lag fazlı deneme seti ise 22.74 saat ile deneme I 'dir (Çizelge 4.5).

4.1.6. Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

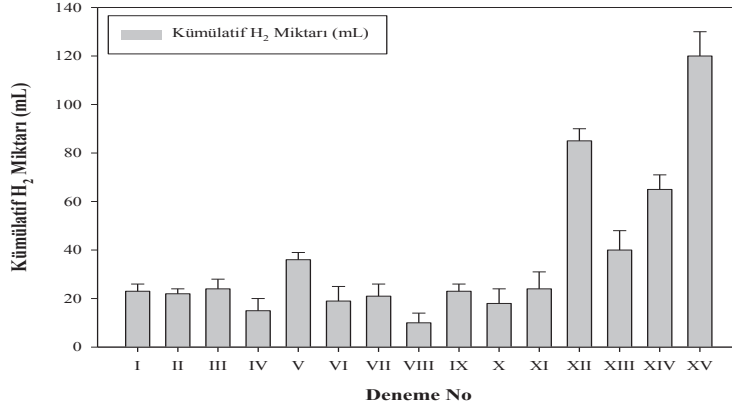
Isıl işlem karanlık fermentasyonla hidrojen üretiminde karışık konsorsiyum üzerinde en fazla uygulanmış olan yöntemdir. Bölüm 3.3.7'de ayrıntılı biçimde anlatılmış olan BHP yöntemi ile ısıtılmış işlemin hidrojen üretim performansı üzerine etkisi istatistiksel yaklaşımlarla ayrıntılı biçimde incelenmiştir.



Şekil 4.26. Farklı pH ve sükroz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle)

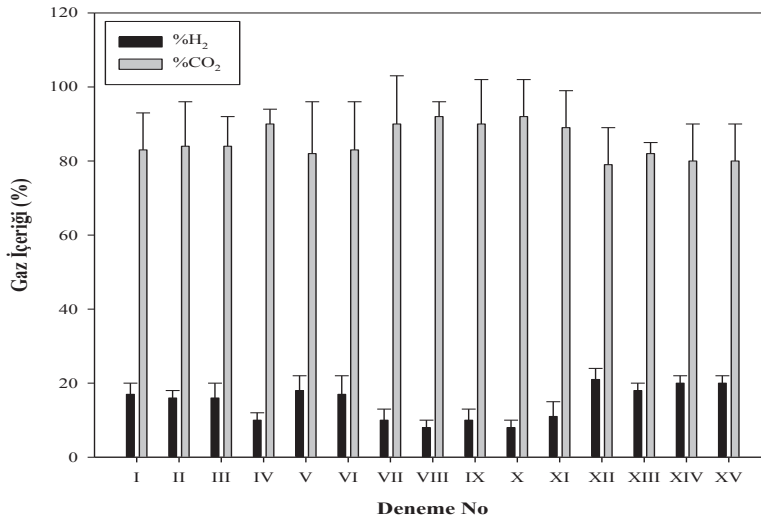
Substrat olarak sükroz ve inokulum olarak ısıtılmış işlem görmüş karışık konsorsiyum kullanıldığında kümülatif olarak en yüksek gaz hidrojen gazı üretiminin deneme XV (100 °C; pH 6.5; 30 g/L sükroz) koşulunda yaklaşık 120 ml olduğu görülmektedir. Deneme XII (100 °C; pH 4.5; 30 g/L sükroz) ve deneme XIV (100 °C ; pH 5.5; 50g/L sükroz) koşullarında ise en yüksek hidrojen üretimlerini sırasıyla 90.85 mL ve 72.69 ml ile takip ettiği gözlenmiştir. Ön işlem olarak ısıtılmış işlem yapılmış biyokütle ile en düşük gaz üretimleri deneme IV (70 °C ; pH 6.5; 30 g/L sükroz)'de 15.79 mL için elde edilmiştir. Grafığe göre lag

zamanları yapılan deneme koşullarında birbirine çok yakın olarak gözlenmiştir(Şekil 4.26).



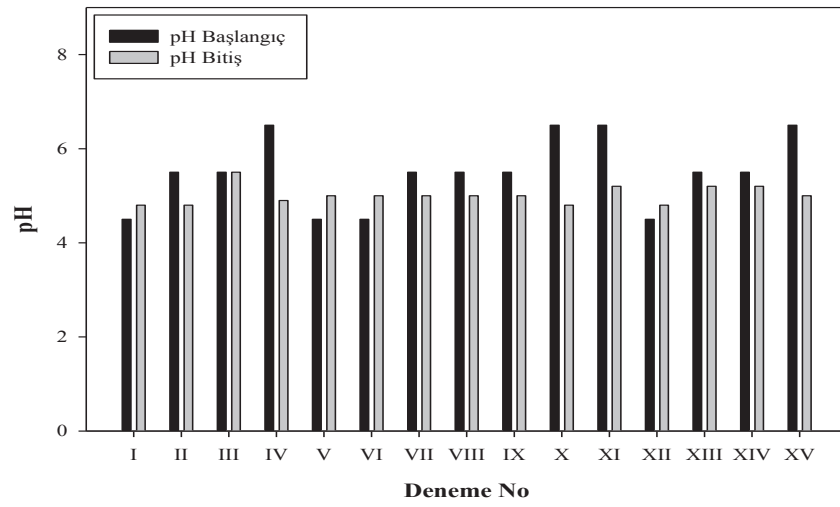
Şekil 4.27. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem olarak ısıtılmış biyokütle)

Toplam hidrojen miktarlarının karşılaştırmalı grafiğine bakıldığında en yüksek hidrojen üretiminin deneme XV (100°C; pH 6.5;30 g/L sükröz) değerinde yaklaşık 120 mL olduğu görülmektedir. Standart sapma değerlerine bakıldığında en istikrarlı denemeler Deneme I, III ve VIII (70°C; pH 4.5; 30 g/L sükröz- 70 °C; pH 5.5; 10g/L sükröz- 85°C, pH5.5; 30 g/L sükröz) koşullarında elde edildiği görülmektedir. Standart sapmalar açısından en çok salınım ise deneme VI (85°C; pH 4.5; 10 g/L sükröz)'da görülmüştür (Şekil 4.27).



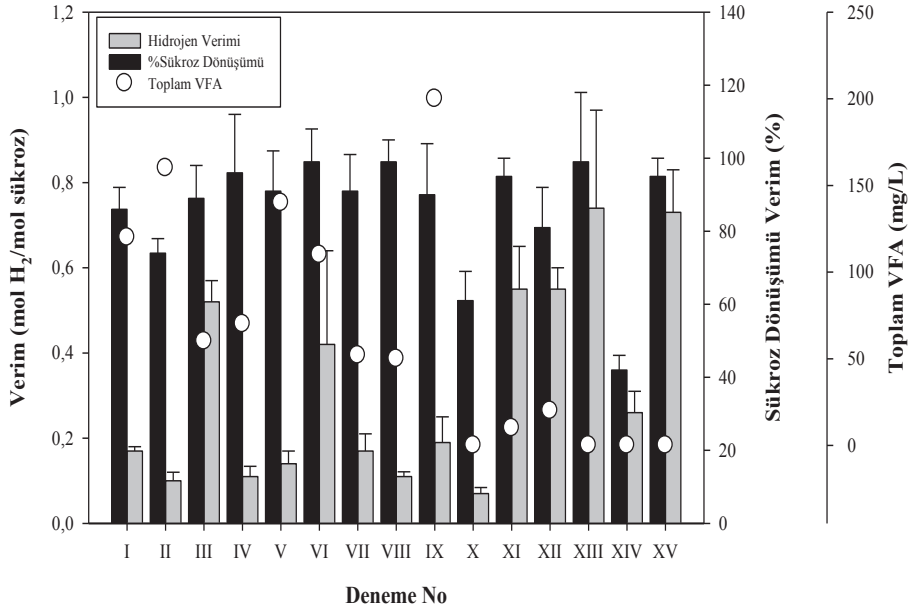
Şekil 4.28. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde H₂ ve CO₂ yüzdelерinin değişimi (Ön işlem olarak ısıtılmış biyokütle)

Substrat olarak süktroz ve inokulum olarak ısıl işlem görmüş biyokütile kullanıldığında genel olarak pH 6.5 ve 5.5 değerlerinde en yüksek H_2 oranlarının elde edildiği görülmektedir. Metan üretiminin görülmemesi metanojen bakterilerin faaliyetlerini sürdüremediğinin göstergesidir ve hidrojen üretimi açısından istenilen bir durumdur. En yüksek H_2 yüzdesi deneme XII (100°C; pH 4.5; 30 g/L süktroz) için %28 değerinde elde edilmiştir. En düşük H_2 yüzdesi deneme IV ve deneme VIII (70°C;pH 6.5; 30 g/L süktroz ve 85°C; pH 5.5; 30 g/L süktroz) koşullarında % 8 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.29. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak ısıl işlem görmüş biyokütile)

Substrat olarak süktrozun ve inokulum olarak ön işlem olarak ısıl işlem görmüş biyokütlenin kullanıldığı kesikli reaktör denemelerinde gaz üretimi sona erdiğinde pH değerlerinin genel olarak 4.5 ile 5 arasında olduğu görülmektedir. Denemeler I, V, VI ve XII (sırasıyla; 70°C; pH 4.5; 30 g/L süktroz- 85°C; pH 4.5; 50 g/L süktroz - 85°C; pH 4.5; 10 g/L süktroz ve 100°C; pH 4.5; 30 g/L süktroz) dışında yapılan denemelerde üretim sonundaki pH değeri başlangıç pH değerlerinden düşük çıkmıştır. Kesikli reaktörlerde pH değerinin asidik değerlere gelmesinin nedeni uçucu yağ asidi birikiminden kaynaklanmaktadır (Şekil 4.29).



Şekil 4.30. Ön işlem olarak ısıtılmış biyokütle ile substrat olarak sükrözden H₂ üretiminde hidrojen verimi, sükröz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Sükröz konsantrasyonu ve pH etkisi değişik parametreler açısından karşılaştırıldığında gram sükröz başına en yüksek hidrojen üretimi 58.30 mL olarak deneme XIII (100°C; pH 5.5; 10 g/L sükröz) değerinde elde edilmiştir. Her üç pH değeri için gram sükröz başına hacimce en iyi hidrojen üretimleri 10 g/L ve 30 g/L sükröz konsantrasyonları için elde edildiği görülmektedir (Deneme XIII (100°C; 10 g/L sükröz, pH 5.5), deneme XV (100°C; 30 g/L sükröz; pH 6.5), deneme XI (85°C; 10 g/L sükröz; pH 6.5) ve deneme XII (100 °C; 30 g/L sükröz; pH 4.5). Hidrojen verimliliği açısından en iyi sonuç en yüksek hidrojen üretiminde olduğu gibi deneme XIII (100°C; 10 g/L sükröz; pH 5.5) için 0.74 mol H₂/mol sükröz olarak elde edilmiştir (Şekil 4.30).

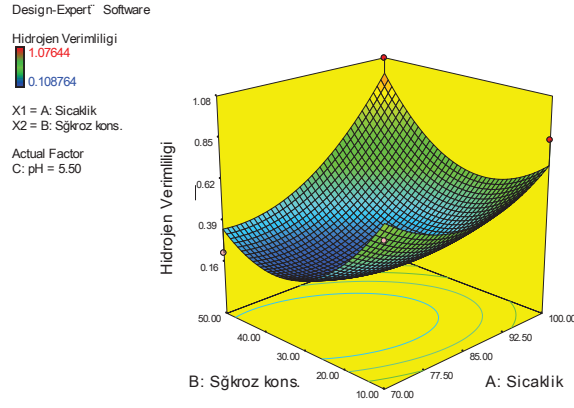
Şeker kullanım verimleri %60-100 arasında değişirken en düşük değer deneme XIV (100°C; pH 5.5; 50g/L sükröz) 'te %42 olarak elde edilmiştir. Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak ısıtılmış biyokütlenin kullanıldığı denemelerde incelenen VFA sonuçlarında; asetik asit ve heptanoik asit değerlerinin yüksek olmasına rağmen incelenen diğer uçucu yağ asitlerinin de oluştuğu gözlenmiştir. Toplamda en yüksek uçucu yağ asidinin 205 mg/L konsantrasyonla deneme IX (85°C; 30 g/L sükröz; pH 5.5)'da üretildiği görülmektedir (Şekil 4.30).

Çizelge 4.6. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükröz)

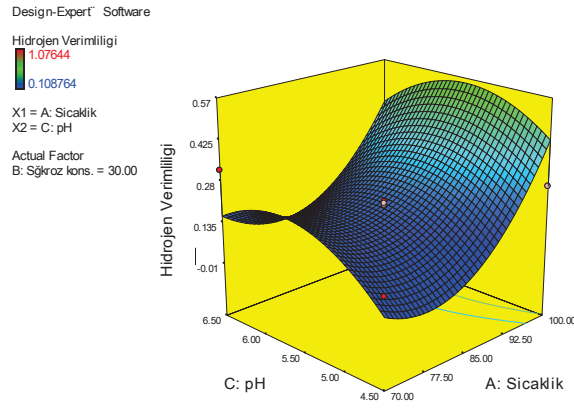
Deneme No	P(mL)	Rm(mL/saat)	λ (saat)	R ²
I	28.61	0.21	22.08	0.9995
II	26.66	0.19	8.75	0.9997
III	26.44	0.22	7.53	0.9866
IV	14.68	0.16	0	0.9696
V	96.01	0.25	74.53	0.9944
VI	48.98	0.11	20.68	0.9711
VII	22.54	0.34	0	0.9311
VIII	17.82	0.15	6.31	0.9898
IX	75.87	0.13	0	0.9333
X	18.19	0.17	9.21	0.9622
XI	32.56	0.27	26.03	0.9877
XII	201.44	0.64	91.10	0.9988
XIII	41.76	0.45	19.60	0.9988
XIV	94.61	0.45	46.76	0.9988
XV	159.56	0.87	76.23	0.9977

Modifiye Gompertz denklemi ile katsayılar karşılaştırıldığında hidrojen üretim potansiyeli en yüksek kombinasyon deneme XII (100°C; pH 4.5; 30 g/L sükröz) için 201.44 mL olarak elde edilmiştir. Hidrojen üretim potansiyeli en düşük kombinasyon ise deneme IV (70 °C; pH 6.5; 30 g/L sükröz) ile 14.68 mL olarak elde edilmiştir. Bunun dışındaki denemeler birbirlerine yakın hidrojen üretim potansiyeli göstermiştir. Saat başına hidrojen üretim hızı en yüksek kesikli reaktör koşulları deneme XV (100 °C; pH 6.5; 30 g/L sükröz) ile 0.87 mL/saat'tir. Lag fazı en yüksek reaktör koşulu 76.23 saat ile deneme XV (100°C; pH 6.5; 30 g/L sükröz) iken, en düşük lag fazlı reaktör 2 saat ile deneme IV, VII ve IX'da (70 °C; pH 6.5; 30 g/L sükröz - 85°C; pH 5.5; 30 g/L sükröz ve 85°C; pH 5.5; 30 g/L sükröz) gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

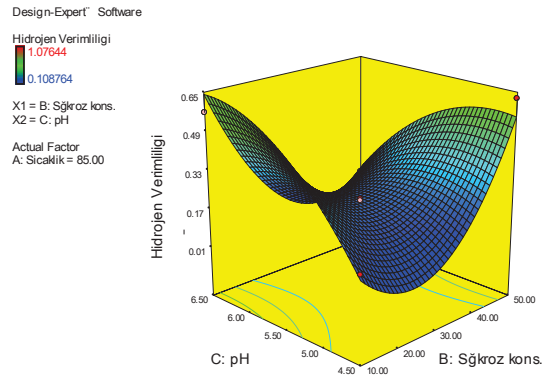
Isıl ön işlem uygulanan ön işlem yöntemleri arasında en yüksek hidrojen üretim değerlerinin ve verim değerlerinin elde edildiği yöntemdir. Isıl ön işlem için uygulanan Box-Behnken deney düzeneğine göre elde yanıtlar Design Expert 7.0 programında detaylı olarak incelenerek optimum işletim koşulları belirlenmiştir.



Şekil 4.31. Sükroz konsantrasyonu ve sıcaklığın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil 4.32. Sıcaklık ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil 4.33. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

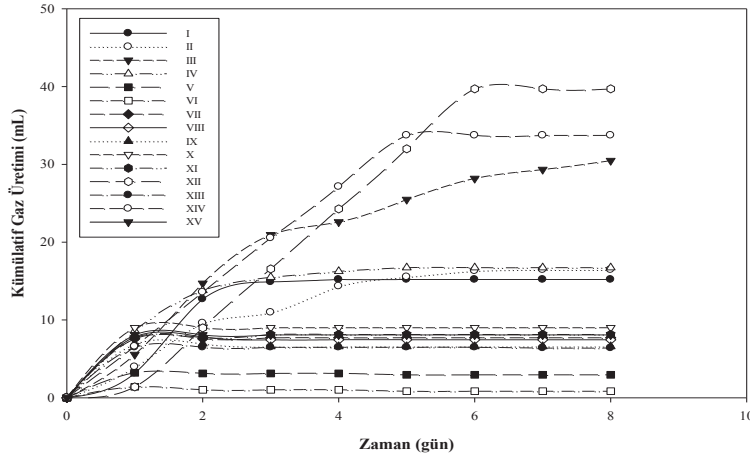
Şekil 4.31-4.33 'te Box-Behnken istatistiksel deney tasarımı etkisi araştırılan bağımsız değişkenlerin hidrojen üretimine etkileri yer almaktadır. Sükroz konsantrasyonlarındaki artışın hidrojen verimliliğini olumlu etkiledikleri, pH değerinin çok etkili olmasıydığı ama 5.5 değeri etrafında daha yüksek sonuçlar verdiği ve sıcaklığında arttıkça hidrojen verimlilik değerinin artmış olduğu gözlenmektedir. Isıl işlemde muamele süresinin uzunluğu hidrojen üreten mikroorganizmaların baskın hale geçmesini sağlayarak hidrojen verimliliği değerlerine olumlu katkılarda bulunmaktadır. Grafiklerin çizilmesinde kullanılan optimizasyon formülünde 0.8999 R² değeri ile elde edilen denklem aşağıdaki gibidir.

$$\text{Hidrojen Verimliliği} = 0.27676 - 0.13449 * \text{Sıcaklık} - 0.027606 * \text{Sükroz kons.} + 2.01869 * \text{pH} + 5.38124\text{E-}004 * \text{Sıcaklık} * \text{Sükroz kons.} - 2.22838\text{E-}003 * \text{Sıcaklık} * \text{pH} - 0.011465 * \text{Sükroz kons.} * \text{pH} + 8.30641\text{E-}004 * \text{Sıcaklık}^2 + 7.32879\text{E-}004 * \text{Sükroz kons.}^2 - 0.13267 * \text{pH}^2$$

Bu denkleme bağlı olarak maksimum hidrojen verimliliği için kullanılması gereken işletim koşulları programda yapılan analiz sonucunda 100°C sıcaklıkta 50 g/L sükroz konsantrasyonu ve pH 5 şeklinde önerilmektedir.

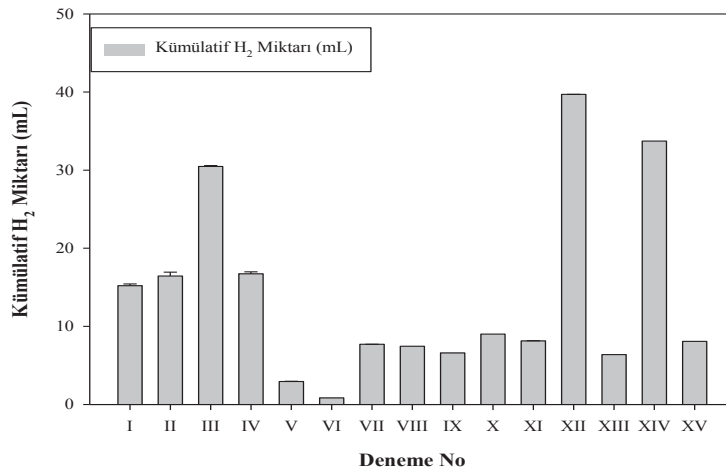
4.1.7. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrozdan kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretimi

Kloroform uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında önemli ve etkili bir metanojen inhibitörüdür. Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde karışık konsorsiyuma uygulanacak olan kloroform muamelesi için en uygun konsantrasyonun tespit edilmesi amacıyla Bölüm 3.3.8'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan BHP yöntemi kullanılmıştır.



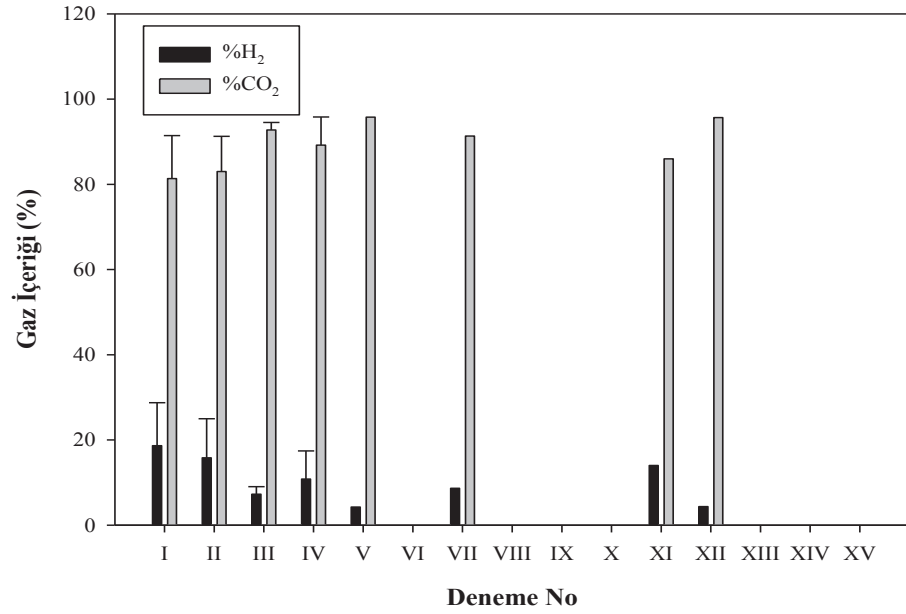
Şekil 4.34. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde kesikli reaktörlerde kümülatif hidrojen üretimleri (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükröz ve inokulum olarak kloroform muamelesi görmüş karışık konsorsiyum kullanıldığında kümülatif olarak en yüksek hidrojen gazı üretiminin deneme XII (%10 kloroform; pH 4.5; 30 g/L sükröz) ile yaklaşık 55 mL olduğu görülmektedir. Bu değere en yakın sonucu deneme XIV (%10 kloroform ; pH 5.5; 50 g/L sükröz) yaklaşık 53 mL gaz üretimi ile takip etmektedir. Kloroform muamelesinden sonra en düşük gaz üretimi deneme V ve deneme VI'da (%5.025 kloroform; pH 5.5; 50 g/L sükröz ve %5.025 kloroform; pH4.5; 10 g/L sükröz) 0-3 mL gaz olarak elde edilmiştir. Kloroform uygulaması yapılmış bu deneyler genel olarak kısa lag zamanı göstermiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.35. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde üretilen kümülatif H₂ miktarları (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)

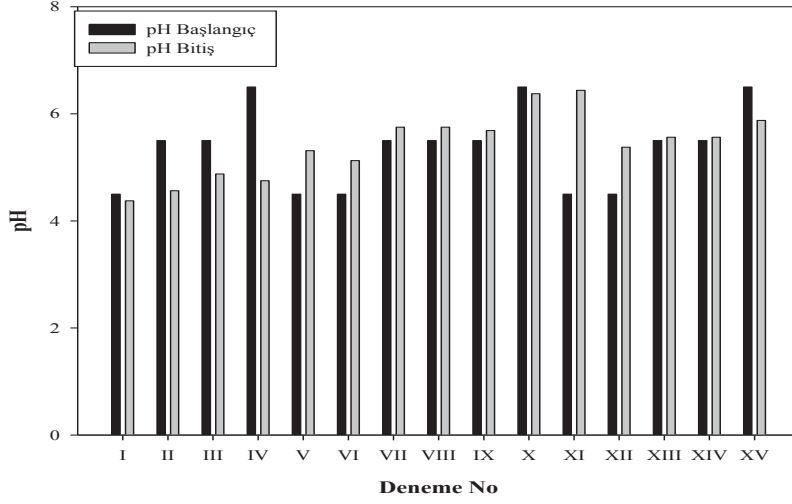
Toplam hidrojen miktarlarının karşılaştırmalı grafiğine bakıldığında hidrojen üretimlerinin yanı sıra standart sapma değerleri kararlılık göstermiş ve gaz üretimlerinin yine bu koşullarda elde edildiği gözlenmiştir. Deneme III, XII ve XIV (%0.05 kloroform; pH 5.5; 10g/L süktroz - %10 kloroform; pH 4.5, 30 g/L süktroz ve %10 kloroform; pH 5.5; 50 g/L süktroz) dışındaki diğer deneylerde ortalama 5-30 mL hidrojen üretimi gözlenmiştir. En yüksek hidrojen üretimi deneme XII’de (%10 kloroform; pH 4.5; 30 g/L) 55 mL olarak elde edilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.36. Farklı pH ve süktroz konsantrasyonu değerlerinde H₂ ve CO₂ yüzdelerinin değişimi (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)

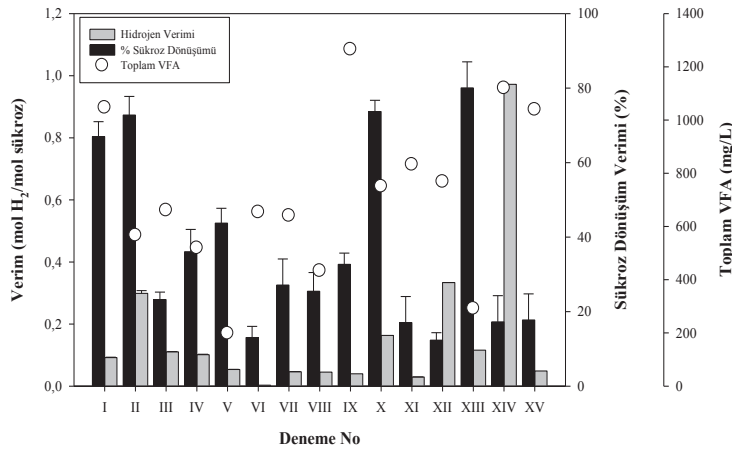
Substrat olarak süktroz ve kloroform muamelesi görmüş biyokütle kullanıldığında genel olarak hidrojen üretim yüzdesinin çok iyi olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde metan yüzdesinin tüm deneylerde sıfır olması metanojen bakterilerin kloroform uygulamasıyla faaliyetlerini sürdüremediğini göstermektedir ki bu hidrojen üretimi için istenilen bir durumdur. Deneme VIII, IX (%5.025 kloroform; pH 5.5; 30 g/L süktroz; %5.025 kloroform; pH 5.5; 30 g/L süktroz), deneme X (%5.025 kloroform; pH 6.5; 50 g/L süktroz), deneme XIII (%10 kloroform; pH 5.5; 10g/L süktroz), deneme XIV (%10 kloroform; pH 5.5; 50 g/L süktroz) ve deneme XV (%10 kloroform; pH 6.5; 30 g/L süktroz)’te hidrojen yüzdesi sıfır olarak en düşük değerleri oluşturmaktadır. Bu kloroform

uygulamasının hidrojen üreten bakterilerinde inhibe olmasına neden olarak hidrojen üretimini de olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir (Şekil 4.36).



Şekil 4.37. Farklı pH ve sükröz konsantrasyonu değerlerinde başlangıç ve bitiş pH değerleri (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle)

Substrat olarak sükrözün ve ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütlenin kullanıldığı kesikli reaktör denemelerinde gaz üretimi sona erdiğinde pH değerlerinin genel olarak 6'ya yaklaştığı gözlenmiştir. İlk dört denemede (I-IV) üretim sonunda pH değerleri 4.5'a düşüş göstermişken diğer denemelerde VI'ya yaklaşmıştır (Şekil 4.37).



Şekil 4.38. Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ile substrat olarak sükrözden H₂ üretiminde hidrojen verimi, sükröz dönüşüm verimi ve toplam VFA değerleri

Sükröz konsantrasyonu ve pH etkisi değişik parametreler açısından karşılaştırıldığında gram sükröz başına en yüksek hidrojen üretimi deneme XIV

(%10 kloroform; pH 5.5; 50g/L sükröz) koşullarında 76.45 olarak elde edilmiştir. Buna rağmen genel olarak hidrojen üretimi 1-30 mL olarak elde edilmiştir. Hidrojen verimliliği açısından en iyi sonuç hidrojen üretiminde olduğu gibi deneme XIV'te (%10 kloroform; pH 5.5; 50 g/L sükröz) 0.97 mol H₂/mol sükröz olarak elde edilmiştir. En yüksek toplam şeker kullanım verimi %80 ile deneme XIII (%10 kloroform; pH 5.5; 10 g/L sükröz) için elde edilmiştir. VFA sonuçlarında; asetik asit, izobütirik asit ve heptanoik asit oluşumu gözlenmiştir. İncelenen uçucu yağ asitleri arasında en yüksek asetik asit değerleri olmuştur. Toplamda en yüksek uçucu yağ asidi üretimi 1265 mg/L konsantrasyonla deneme IX (% 5.025 kloroform; pH 5.5, 30 g/L sükröz)'da elde edilmiştir (Şekil 4.38). Box-Behnken istatistiksel analiz sonuçları; optimum üretim grafikleri ve denklemleri Ek 6'da yer almaktadır.

Çizelge 4.7. Modifiye Gompertz denklemi ile kesikli reaktörlerde hidrojen üretiminin kinetik olarak incelenmesi (Ön işlem olarak kloroform muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükröz)

Deneme No	P	Rm	λ	R ²
I	49.66	0.39	34.54	0.9999
II	16.59	0.19	3.75	0.9998
III	29.66	0.31	5.12	0.9998
IV	16.54	0.39	2.67	0.9999
V	3.05	1.78	3.61	0.9998
VI	0.97	3.05	2.16	0.8777
VII	7.69	0.75	4.29	0.9999
VIII	7.55	3.96	1.46	0.9999
IX	6.69	3.32	1.37	0.9999
X	9.00	5.76	6.04	0.9999
XI	8.08	0.61	4.23	0.9999
XII	43.24	0.39	29.11	0.9999
XIII	6.47	3.27	1.82	0.9999
XIV	35.39	0.37	10.77	0.9999
XV	8.08	3.56	1.91	0.9999

Modifiye Gompertz denklemi ile katsayılar karşılaştırıldığında hidrojen üretim potansiyeli en yüksek kombinasyon deneme I (%0.05 kloroform; pH 4.5, 30g/L sükröz) için 49.66 mL olarak elde edilmiştir. Hidrojen üretim potansiyeli en düşük kombinasyon ise 0.97 mL ile deneme VI (%5.025 kloroform; pH 4.5, 10 g/L sükröz)'da elde edilmiştir. Saat başına hidrojen üretim hızı en yüksek kesikli reaktör koşullarının deneme X (%5.025 kloroform; pH 6.5, 50 g/L sükröz) için 5.76 mL/saat olduğu gözlenmiştir. Lag fazı en yüksek reaktör koşulu 34.54 saat

ile deneme I sađlarken en dűşűk lag fazlı reaktűr 1.37 saat ile deneme IX (%5.025 kloroform; pH 5.5; 30 g/L sűkroz)’dur (Çizelge 4.7).

4.1.8. Kesikli reaktűrlerde űn iřlem etkisinin karřılařtırmalı incelemesi

Karanlık fermentasyonda kullanılacak inokuluma uygulanacak űn iřlemlerin kűműlatif hidrojen űretimi űzerine etkisinin karřılařtırmalarına bakılacak olduđuunda en uygun űn iřlemin ısıl muamele olduđu gűrűlmektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Kesikli reaktűrlerde űn iřlem etkisinin “Toplam H₂ űretim Performansları (mL H₂)” aćısından karřılařtırması

Kimyasal Kons./Kloroform/Sıcaklık	pH	Sűkroz Kons.	İşlemsiz	Asit	Baz	BESA	TCI	Sıcaklık	Kloroform
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	4.5	30	35	20	35	8	6	28	13
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	5.5	10	37	23	38	12	12	28	10
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	5.5	50	42	15	46	32	30	25	30
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	6.5	30	81	28	42	21	15	16	15
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	4.5	10	40	29	36	21	4	23	3
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	4.5	50	35	15	31	5	2	39	1
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	5.5	30	54	19	37	16	9	28	7
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	5.5	30	54	19	37	20	9	18	7
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	5.5	30	54	19	37	46	8	31	7
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	6.5	10	48	13	38	31	14	30	9
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	6.5	50	78	31	65	59	11	20	8
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	4.5	30	50	20	35	11	2	91	1
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	5.5	10	37	23	38	18	7	41	6
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	5.5	50	42	15	46	18	7	73	7
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	5.5	30	81	28	42	49	10	121	8

Ortama kloroform ve TCI eklenmesi ile metanojenlerin yanı sıra hidrojen űreten mikroorganizmalarında baskılandığı dűřűk hidrojen űretim verimlerinden anlaşılmaktadır. Karıřık konsorsiyumun asitlendirilmiř ve bazikleřtirilmiř olması da hidrojen űretim verimlerine olumlu etkiler yapmıř olmasına karřın proses maliyetleri aćısından dűřűnűldűđűnde ısıl muamelenin uygulama aćısından en uygun yűntem olduđu gűrűlmektedir.

Çizelge 4.9. Kesikli reaktörlerde ön işlem etkisinin “Toplam H₂ Üretim Verimleri (mL H₂/g sükröz)” açısından karşılaştırması

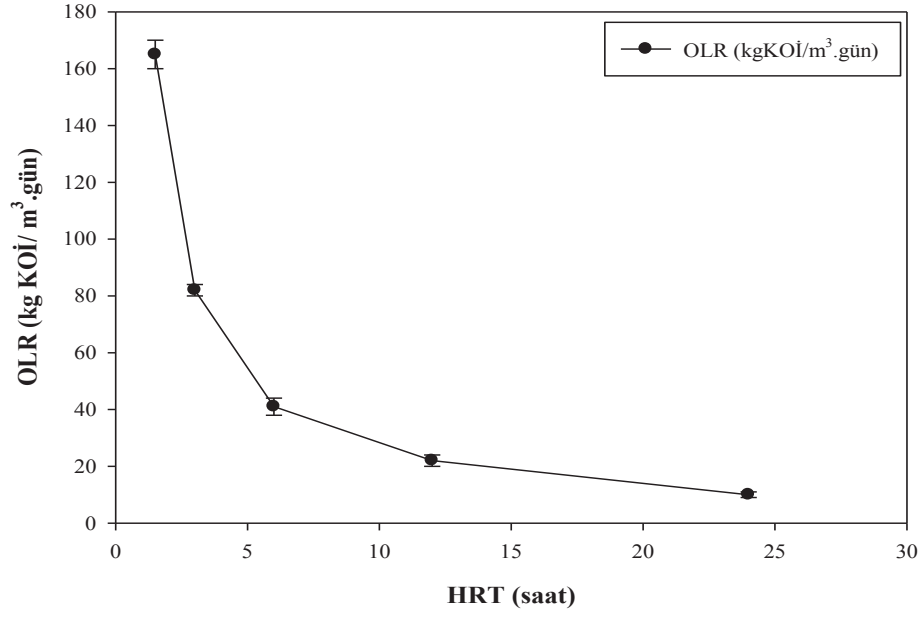
Kimyasal Kons./Kloroform/Sıcaklık	pH	Sükröz Kons.	İşlemsiz	Asit	Baz	BESA	TCI	Isıl işlem	Kloroform
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	4.5	30	24	10	17	4	3	13	7
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	5.5	10	12	4	13	16	17	41	23
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	5.5	50	53	32	55	9	9	9	9
10mM (mg/L) / %0.05 / 70°C	6.5	30	38	13	20	10	7	8	8
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	4.5	10	10	4	9	30	5	33	4
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	4.5	50	5	41	52	1	1	11	0
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	5.5	30	26	9	17	7	4	13	4
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	5.5	30	26	9	17	10	4	8	4
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	5.5	30	26	9	17	22	4	15	3
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	6.5	10	22	9	19	45	19	43	13
105mM (mg/L) / %5.025 / 85°C	6.5	50	68	19	45	17	3	6	2
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	4.5	30	24	10	17	5	1	43	2
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	5.5	10	53	32	55	25	10	58	1
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	5.5	50	12	4	13	5	11	21	6
200mM (mg/L) / %10 / 100°C	5.5	30	39	13	20	23	5	57	4

Karanlık fermantasyonda kesikli reaktörlerle hidrojen üretiminde kümülatif hidrojen üretiminin yanı sıra bir diğer önemli parametre tüketilen substrat başına üretilen hidrojen miktarıdır. Çizelge 4.9’da karışık konsorsyuma uygulanan ön işlemlerin hidrojen üretim verimleri açısından karşılaştırması yer almaktadır. Buna göre verimleri açısından da en olumlu etkinin ısıl ön işlem ile sağlandığı görülmektedir. Asit ve baz muamelesi de metanojenlerin baskılanıp hidrojen üreten mikroorganizmaların dominant hale geçmesinde etkin yöntemler olmasına rağmen uygulama kolaylığı ve maliyetler açısından en olumlu sonuçların ısıl işlem ile sağlandığı görülmektedir. TCI ve kloroform muamelelerinin ise oldukça düşük hidrojen verim değerleri ile sonuçlandığı görülmektedir.

4.2. Karanlık Fermantasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri

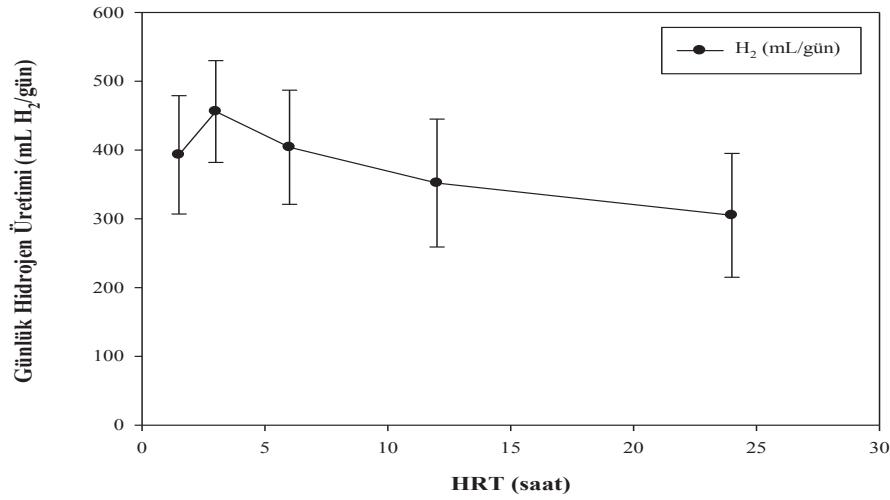
4.2.1. Seramik top dolgulu immobilize biyoreaktör

Seramik top dolgulu reaktörde giriş suyu olarak 10 g/L sükröz içeren besleme çözeltisi kullanılmış ve HRT 24, 12, 6, 3 ve 1.5 saat koşullarında reaktör çıkış değerleri dengeye gelene dek çalıştırılmıştır. Çıkış sularından düzenli örnekler alınmış, reaktörde günlük analizler yapılmıştır.



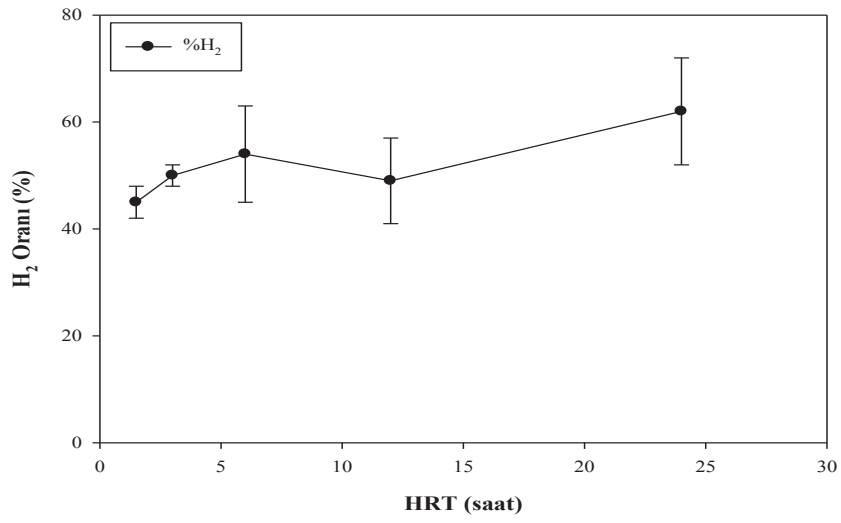
Şekil 4.39. Seramik top dolgulu immobilize reaktörün OLR değerleri

Şekil 4.39’da seramik top dolgulu immobilize reaktörün OLR (Organik Yükleme Hızı) değerleri yer almaktadır. Giriş konsantrasyonu 10 g/L sükroz olarak sabit tutulmuştur. OLR değerlerinde azalan HRT değerleriyle birlikte beklenen ve sınırlar arasında düzenli bir artış gözlenmektedir.



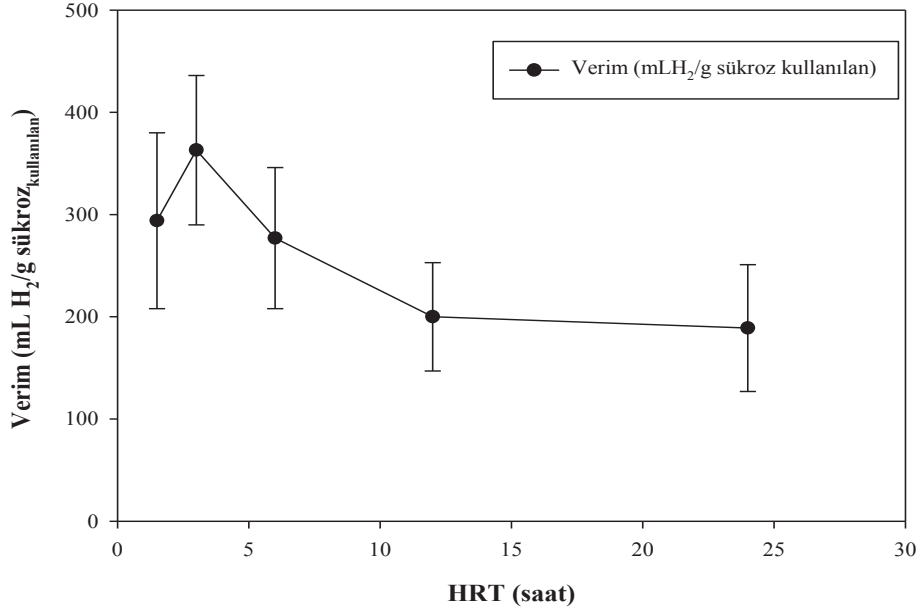
Şekil 4.40. Seramik top dolgulu immobilize reaktöründe günlük H₂ (mL/gün) üretiminin HRT ile değişimi

Seramik top dolgulu immobilize reaktörde her HRT değerinde birbirine yakın ve 400 mL civarında değerler elde edilmiştir. Bu değerler seramik top dolgulu immobilize reaktörlerle istenen her HRT değerinde yüksek performans ile çalışılabileceğini göstermektedir. Düşük HRT ile yüksek HRT değerleri arasında önemli bir fark gözlenmemektedir. Ancak seramik top dolgulu reaktörün HRT=1.55 saat ile çalıştırılabilmesi ekonomik olarak avantajlıdır. Değerler arasında en yüksek hidrojen gazı üretimi HRT 3 saat koşulunda yaklaşık 450 mL olarak gözlenmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.41. Seramik top dolgulu immobilize reaktörün %H₂ değerlerinin HRT ile değişimi

Hidrojen yüzdeleri seramik top dolgulu immobilize reaktör içerisindeki mikroorganizmaların performansı ile ilgili bir parametredir. Şekil 4.41’de yer alan sonuçlara bakılacak olursa yatışkın durum hidrojen yüzdelerinin 45-60 arasında değiştiğinin ancak hidrojen yüzdesi bakımından en iyi performansın HRT 24 saat koşullarında (%60) elde edildiği görülmektedir. En düşük hidrojen yüzdesi ise HRT 12 saat (%45) ve 1.5 saat (%42) koşullarında gözlenmiştir.



Şekil 4.42. Seramik top dolgulu reaktörün hidrojen verimi değerleri (ml H₂/g sükröz kullanılan)

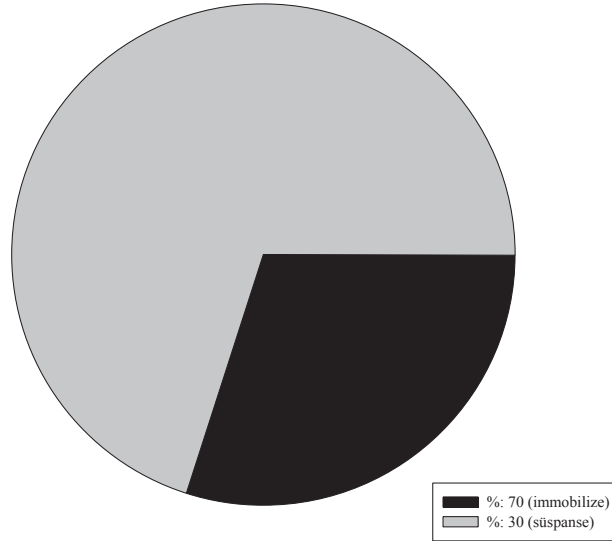
Şekil 4.42’de seramik top dolgulu immobilize reaktörün hidrojen verimi değerleri yer almaktadır. En yüksek verim değerleri HRT 1.5 ve 3 saat koşullarında 294 ve 363 mL H₂/ g sükröz kullanılan (2.46 mol H₂/mol sükröz ve 3.03 mol H₂/mol sükröz) olarak elde edilmiştir. Substrat olarak sükröz kullanıldığında termofilik koşullarda son ürün asetat olduğunda 616 mL H₂/g sükröz, bütirat olduğunda 280 mL H₂/ g sükröz, asetat ve bütirat olduğunda ise 140 mL H₂/ g sükröz verim değerleri elde edilmektedir. Teorik değerlerle karşılaştırma yapıldığında HRT 1.5 ve 3 koşullarında son ürün bütirat ve asetat veya sadece bütirata olduğu düşünülürse reaktörün %60-70 performansla çalıştığı söylenebilir. HRT 24 ve 12 saat koşullarında hidrojen verim değerlerinin oldukça düşük oldukları gözlenmektedir. Bu durum reaktörün yüksek HRT değerlerinde başlatıldığından dolayı akklimasyon sürecinde olduğu anlamına gelir. Daha düşük HRT zamanlarına inildikçe reaktördeki mikroorganizma sayısı ve tutunmuş mikroorganizma konsantrasyonları artış göstermiştir.

Reaktörler planlanan HRT koşullarında çalıştırıldıktan sonra dolgu malzemelerinin üzerine tutunan mikroorganizma miktarlarının tespit edilmesi için reaktörler boşaltılmıştır. Şekil 4.43 ‘te görüldüğü gibi mikroorganizmaların

çoğunluğu reaktörün alt kısmında toplanmıştır. Reaktörün alt, orta ve üst bölgelerinde yapılan analizlerle mikroorganizma miktarları tespit edilmiştir.



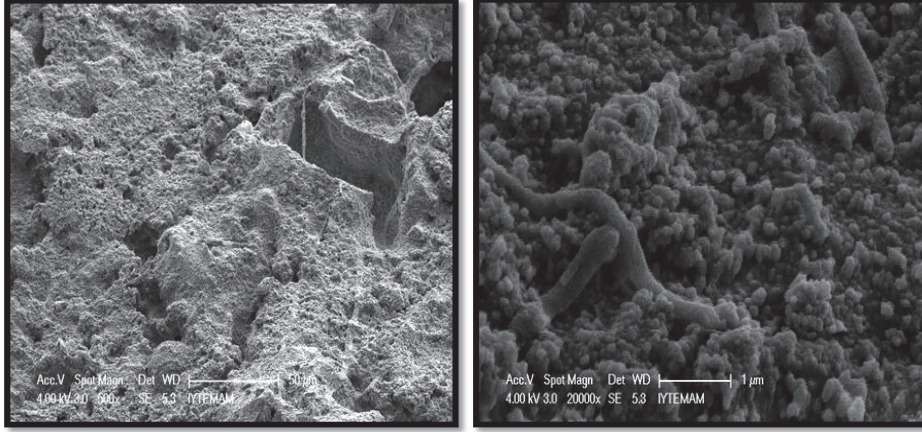
Şekil 4.43. Seramik top dolgulu immobilize reaktörler (sükroz beslemeli)- son görüntüleri



Şekil 4.44. Seramik top dolgulu immobilize reaktörde immobilize ve süspanse biyokütle oranları (%)

Reaktörde yapılan son analizlerde AKM (mg VSS/L) dağılımları Şekil 4.44'te yer almaktadır. Toplam biyokütlenin % 70'ini immobilize %30'unu süspanse biyokütle oluşturmaktadır. Yapılan analizlerde mikroorganizma miktarlarının en büyük çoğunluğunun alt bölgede toplandığı görülmüştür. İç kısımlarda da alt bölgedekine yakın değerler elde edildiğinden reaktörde hem tutunmuş hem askıda

mikroorganizmaların bulunduğu söylenebilir. Bu durum reaktör performansını artıracak bir etki oluşturacaktır. Taze beslemenin sürekli alttan veriliyor olması yukarı akışlı sistemlerde mikroorganizmaların çoğunlukla giriş bölgesinde büyümelerini sağlar. Üst bölgedeki yoğun mikroorganizma konsantrasyonu ise daha çok ölerik ya da parçalanarak dolgu materyallerinden kopmuş reaktörden uzaklaşmakta olan mikroorganizmaları temsil etmektedir.



(a)

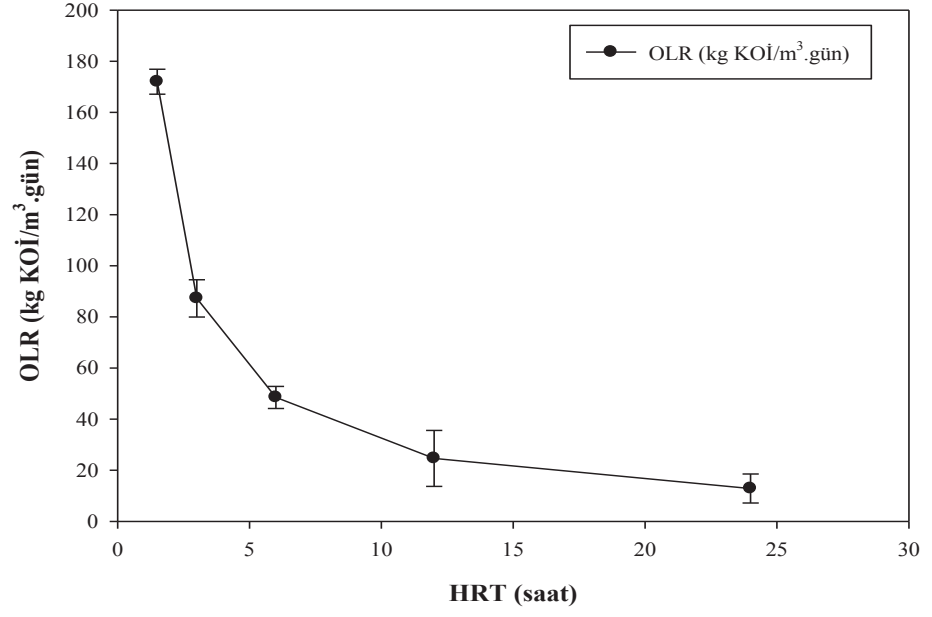
(b)

Şekil 4.45. Seramik top üzerine immobilize olmuş mikroorganizmaların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çekilmiş görüntüleri (a) hidrojen üretiminden önce (b) hidrojen üretiminden sonra

Şekil 4.45’ teki SEM fotoğraflarına bakılacak olursa seramik top reaktöründen alınan parçaçıklar üzerinde morfolojik olarak *Clostridium* benzeri yapılar gözlenmektedir.

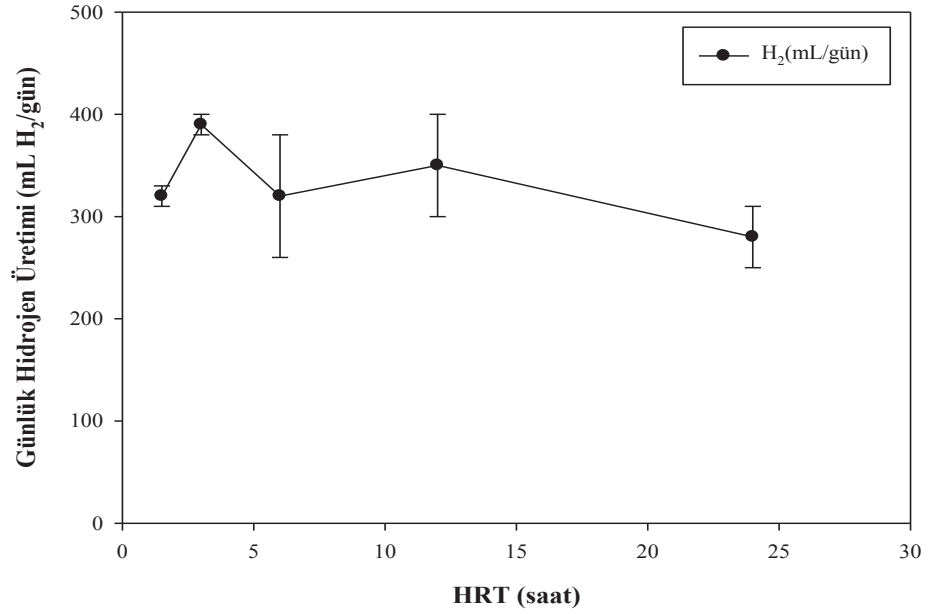
4.2.2. Seramik yüzük (halka) dolgulu immobilize biyoreaktör

Seramik yüzük dolgulu reaktör 10 g/L süktroz içeren besi ortamı ile beslenmiştir. Sistem HRT 24, 12, 6, 3 ve 1.5 saat koşullarında reaktör çıkış değerleri dengeye gelene kadar çalıştırılmıştır. Çıkış sularından düzenli örnekler alınmıştır. Çıkış suyu değerleri izleyen bölümlerde sunulmuştur.



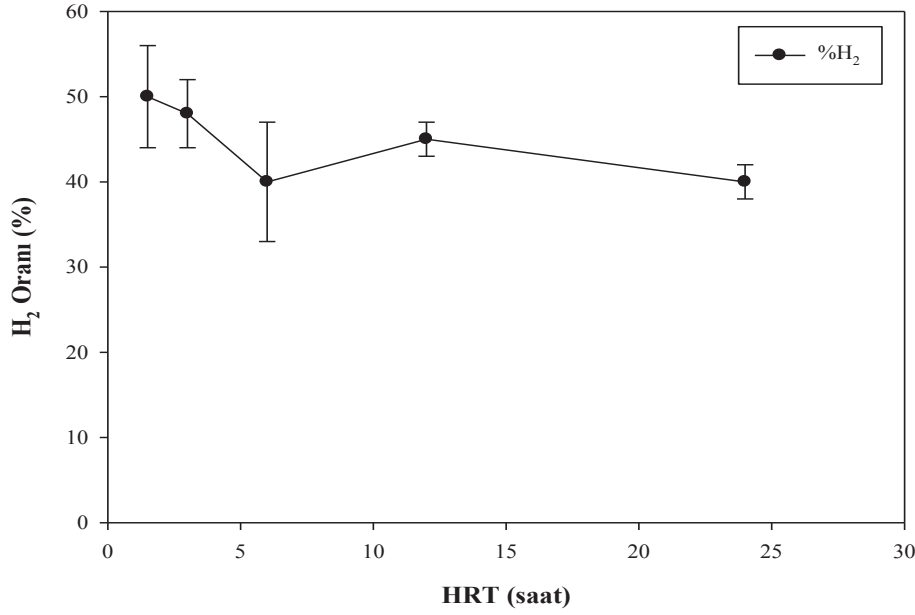
Şekil 4.46. Seramik yüzük dolgulu reaktör OLR (Organik Yükleme Hızı) değerleri

Şekil 4.46’da seramik yüzük dolgulu immobilize reaktörün OLR değerleri yer almaktadır. Giriş konsantrasyonu 10 g/L süktroz olarak sabit tutulmuştur. OLR değerlerinde azalan HRT değerleriyle birlikte beklenen ve sınırlar arasında düzenli bir artış gözlenmektedir.



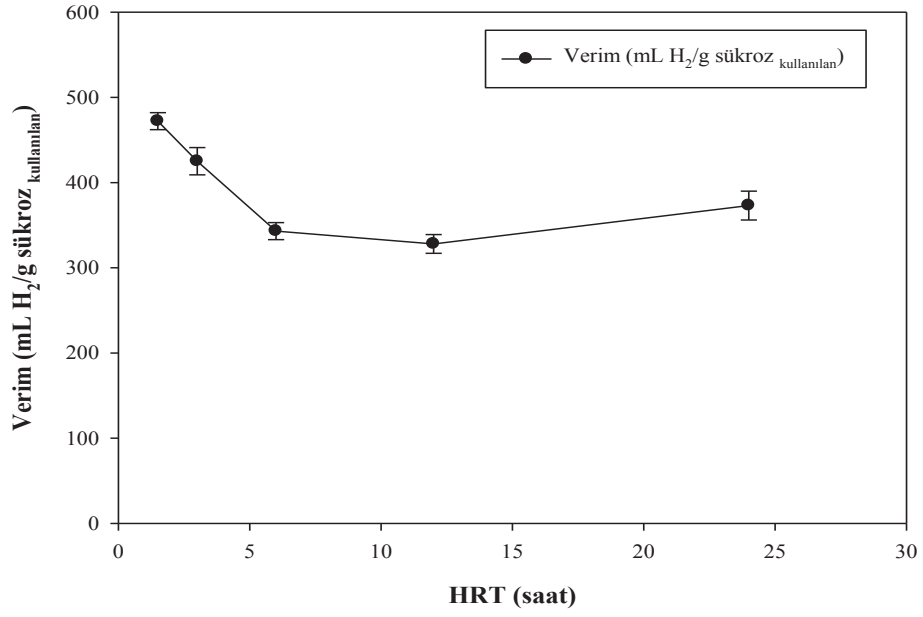
Şekil 4.47. Seramik yüzük dolgulu reaktör’de H₂ üretim hızının HRT ile değişimi

Seramik yüzük dolgulu immobilize reaktörde her azalan HRT değeriyle birlikte artan hidrojen gazı miktarları gözlenmektedir. Bu eğilim seramik yüzük dolgulu immobilize reaktörler ile istenen her HRT değerinde rahatlıkla çalışılabileceğini ancak daha düşük HRT 'lerde daha iyi performans alınabileceğini göstermektedir. Değerler arasında en yüksek hidrojen gazı üretimi HRT 3 saat koşulunda yaklaşık 450 mL olarak gözlenmiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.48. Seramik yüzük dolgulu reaktör %H₂ değerleri

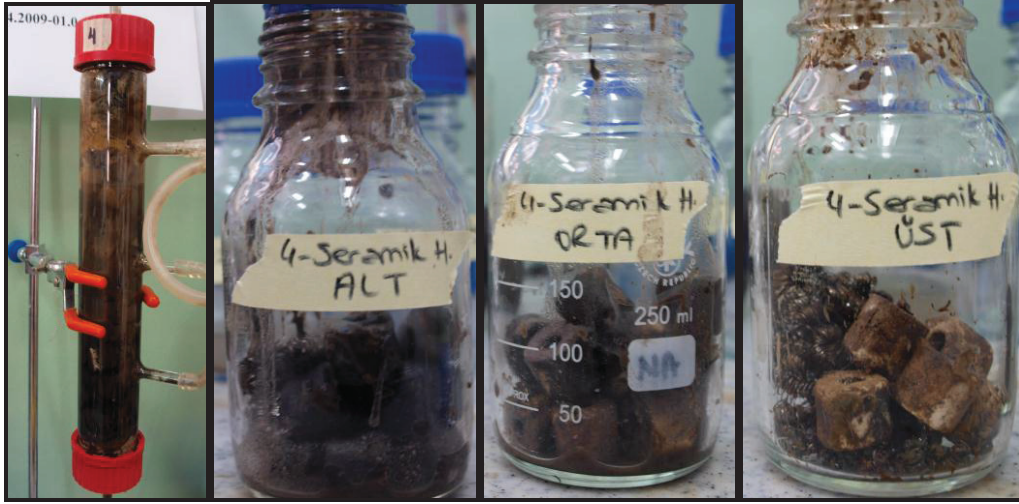
Hidrojen yüzdeleri seramik yüzük dolgulu immobilize reaktör içersindeki mikroorganizmaların performansı ile ilgili bir parametredir. Şekil 4.48’de yer alan sonuçlara bakılacak olursa hidrojen yüzdelerinin hemen hepsinin %45-50 arasında olduğu anlaşılmaktadır. Hidrojen yüzdelerinin birbirine yakın olması içerdeki mikroorganizma miktarının da sabit olduğu artan organik yükleme hızlarıyla reaktörden uzaklaşmadıklarını göstermektedir.



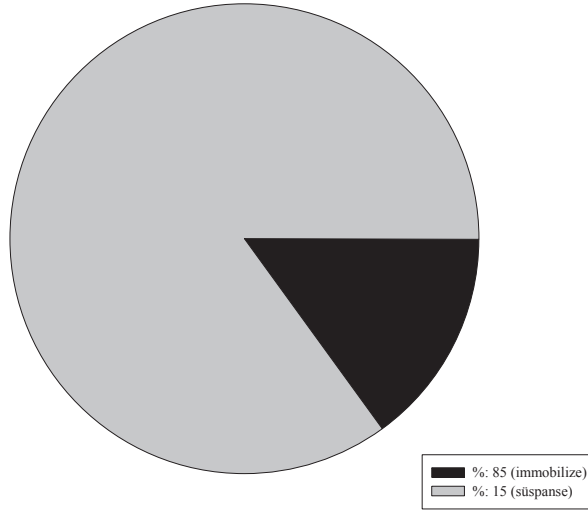
Şekil 4.49. Seramik yüzük (halka) dolgu reaktörün hidrojen verimi değerleri (mL H₂/g sükröz kullanılan)

Şekil 4.49’da seramik yüzük dolgu immobilize reaktörün hidrojen verimi değerleri yer almaktadır. En yüksek verim değerleri HRT 1.5 ve 3 saat koşullarında 472-425 mL H₂/ g sükröz kullanılan (2.91 mol H₂/mol sükröz ve 2.62 mol H₂/mol sükröz) olarak elde edilmiştir. Teorik değerlerle karşılaştırma yapıldığında HRT 1.5 ve 3 koşullarında son ürün bütirat ve asetat veya sadece bütirata olduğu düşünülürse reaktörün yaklaşık %50 performansla çalıştığı söylenebilir. HRT 24 ve 12 saat koşullarında hidrojen verim değerlerinin oldukça düşük oldukları gözlenmektedir. Bu durum reaktörün yüksek HRT değerlerinde başlatıldığından dolayı aklimasyon sürecinde olduğu anlamına gelir. Daha düşük HRT zamanlarına inildikçe reaktördeki mikroorganizma sayısı ve tutunmuş mikroorganizma konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir.

Reaktörler planlanan HRT koşullarında çalıştırıldıktan sonra dolgu malzemelerinin üzerine tutunan mikroorganizma miktarlarının tespit edilmesi için reaktörler boşaltılmıştır. Şekil 4.50’ de görüldüğü gibi mikroorganizmaların çoğunluğu reaktörün alt kısmında toplanmıştır. Reaktörün alt, orta ve üst bölgelerinde yapılan analizlerle mikroorganizma miktarları tespit edilmiştir.



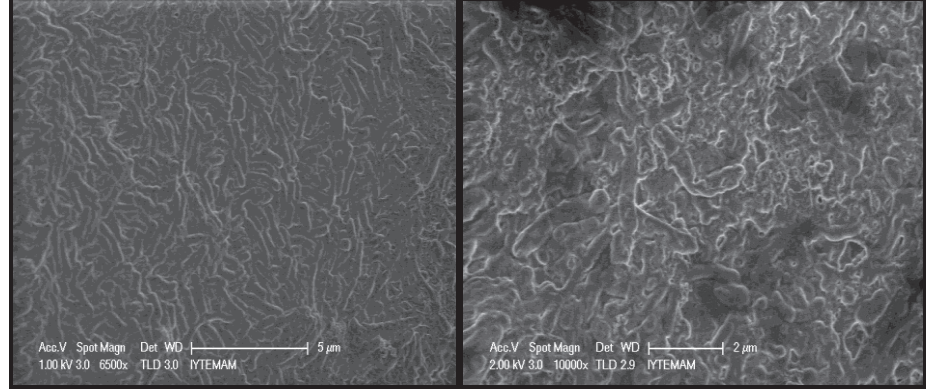
Şekil 4.50. Seramik yüzük (halka) dolgulu immobilize reaktörler - son görüntüleri



Şekil 4.51. Seramik yüzük (halka) dolgulu immobilize reaktör son mikroorganizma konsantrasyonları (%)

Reaktörde yapılan son analizlerde AKM (mg VSS/L) dağılımları Şekil 4.51’de yer almaktadır. Reaktör içindeki biyokütlenin % 85’ini immobilize biyokütle, 15’ini süspanse biyokütle oluşturmaktadır. Yapılan analizlerde mikroorganizma miktarının çok büyük çoğunluğu alt bölgede toplandığı görülmüştür. İç kısımlarda da alt bölgedekinden çok daha düşük değerler elde edildiğinden reaktörde özellikle alt bölgede tutunmuş mikroorganizma miktarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum reaktör performansını artıracak bir etki oluşturacaktır. Taze beslemenin sürekli alttan veriliyor olması yukarı akışlı sistemlerde mikroorganizmaların çoğunlukla giriş bölgesinde büyümelerini

sağlar üst bölgedeki yoğun mikroorganizma konsantrasyonu ise daha çok ölerek ya da parçalanarak dolgu materyallerinden kopmuş reaktörden uzaklaşmakta olan mikroorganizmaları temsil etmektedir.



(a)

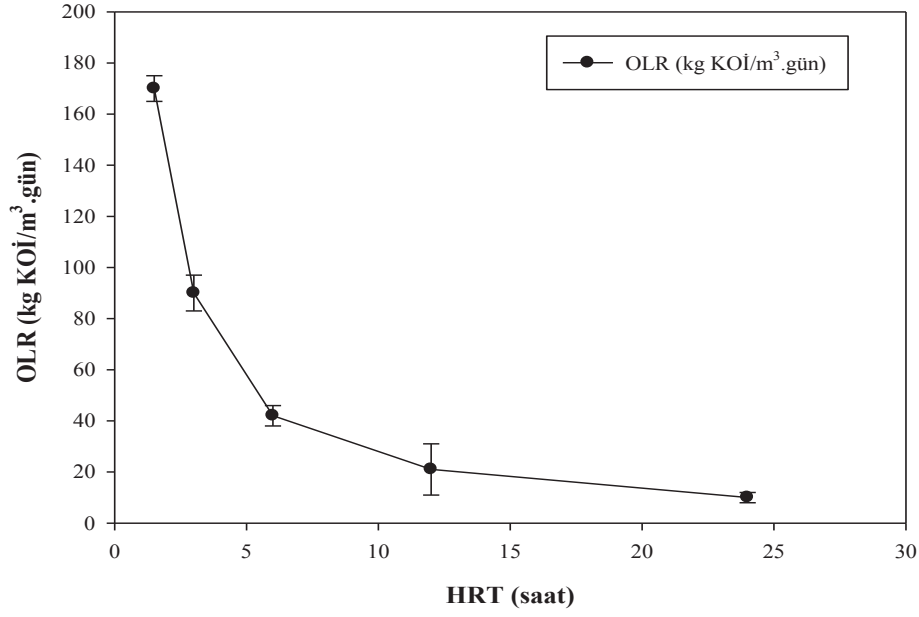
(b)

Şekil 4.52. Seramik halka(yüzük) üzerine immobilize olmuş mikroorganizmaların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çekilmiş görüntüleri (a) hidrojen üretiminden önce (b) hidrojen üretiminden sonra

Reaktörden çıkan dolgu malzemelerden alt bölgeden bir adet örnek SEM görüntüleme merkezinde üzerindeki mikroorganizmalar görüntülenmiştir. Şekil 4.52’de yer alan fotoğraflarda görüldüğü gibi dolgu materyali üzerine iyi bir tutunma sağlanmıştır. Mikroorganizmaların çoğunun yapıları itibariyle *Clostridium* türleri oldukları gözlenmektedir.

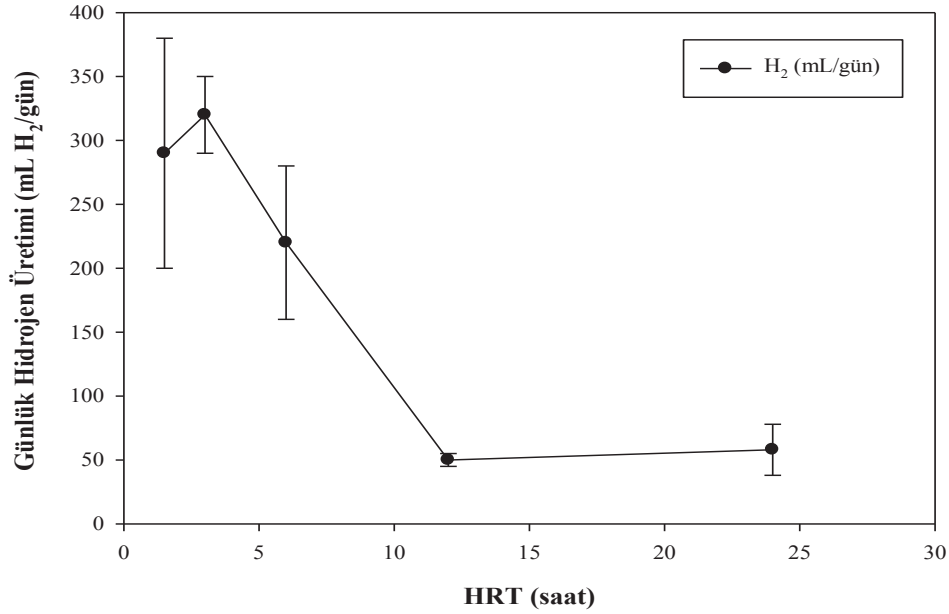
4.2.3. Pomza taşı dolgulu immobilize biyoreaktör

Bölüm 3.4.4 ’te ayrıntılı biçimde özellikleri ve ayrıntıları açıklanan pomza taşı dolgulu immobilize reaktör 10 g/L sükröz içeren besleme çözeltisi ile beslenmiş, HRT 24, 12, 6, 3 ve 1.5 saat koşullarında reaktör çıkış değerleri dengeye gelene dek çalıştırılmıştır. Çıkış sularından düzenli örnekler alınmış çıkış suyu değerleri izleyen bölümlerde sunulmuştur.



Şekil 4.53. Pomza dolgulu reaktör OLR (Organik Yükleme Hızı) değerleri

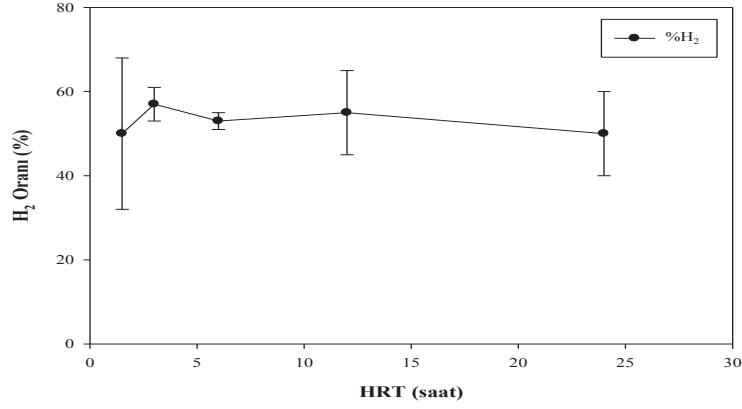
Şekil 4.53'te pomza taşı dolgulu immobilize reaktörün OLR değerleri yer almaktadır. Giriş konsantrasyonu 10 g/L süktroz olarak sabit tutulmuştur. OLR değerlerinde azalan HRT değerleriyle birlikte beklenen şekilde ve sınırlar arasında düzenli bir artış gözlenmektedir.



Şekil 4.54. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör hidrojen üretim değerleri

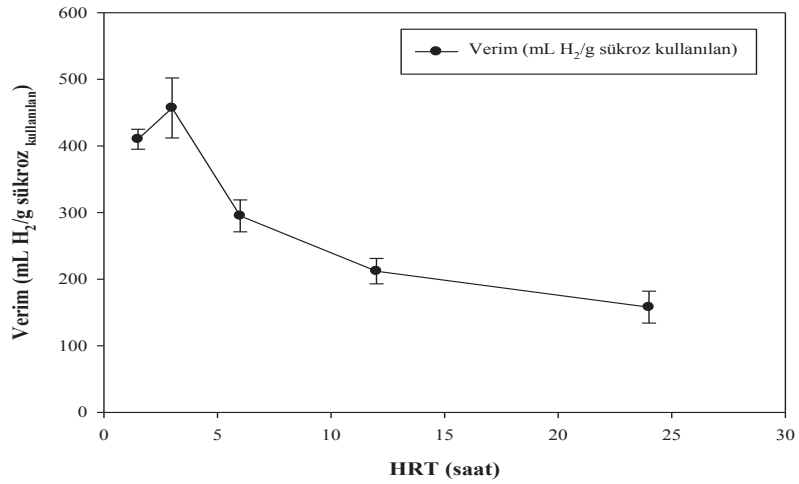
Pomza taşı dolgulu immobilize reaktörde her azalan HRT değeriyle birlikte artan hidrojen gazı miktarları gözlenmektedir. En yüksek değerler HRT 3 saatte

320 mL olarak, en düşük değer ise HRT 24 saatte yaklaşık 100 mL olarak elde edilmiştir. Bu eğilim pomza taşı dolgulu immobilize reaktörler ile istenen her HRT değerinde rahatlıkla çalışılabileceğini ancak daha düşük HRT 'lerde daha iyi performans alınabileceğini göstermektedir. Değerler arasında en yüksek hidrojen gazı üretimi HRT 3 saat koşulunda 320 mL olarak gözlenmiştir(Şekil 4.54).



Şekil 4.55. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör hidrojen yüzdesi değerleri

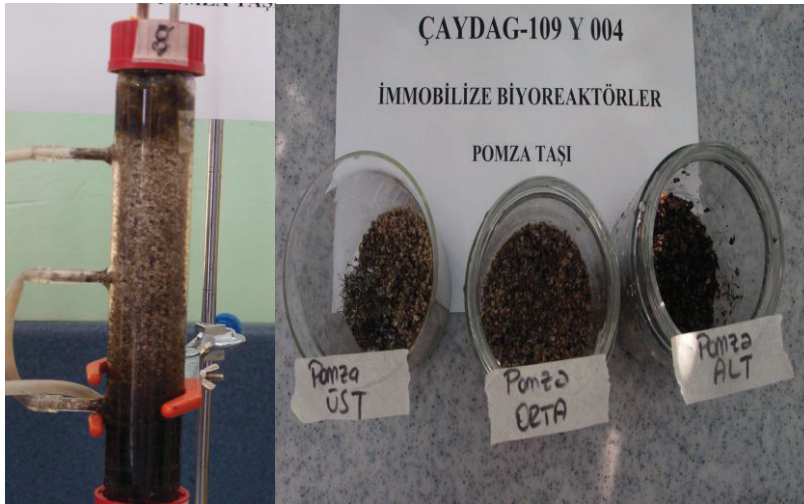
Hidrojen yüzdeleri pomza taşı dolgulu immobilize reaktör içersindeki mikroorganizmaların performansı ile ilgili bir parametredir. Şekil 4.55' te yer alan sonuçlara bakılacak olursa hidrojen yüzdelерinin hemen hepsinin %50'nin üzerinde elde edildiği anlaşılmaktadır. Hidrojen yüzdelерinin sabit olması içerdeki mikroorganizma miktarının da sabit olduğunu; artan organik yükleme hızlarıyla reaktörden uzaklaşmadıklarını göstermektedir.



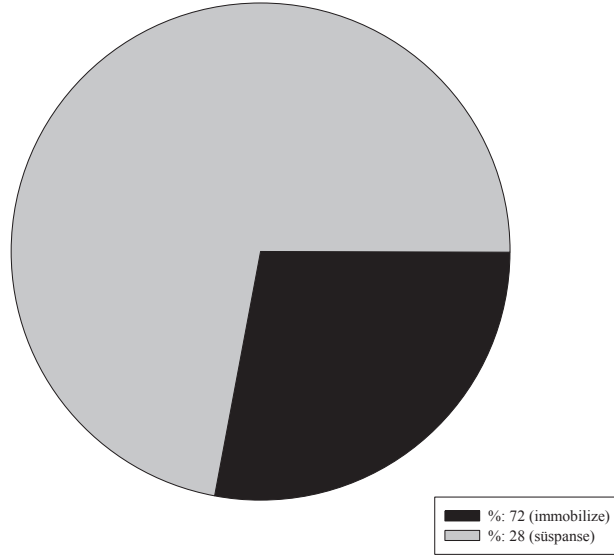
Şekil 4.56. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör hidrojen verimi değerleri

Şekil 4.56'da pomza taşı dolgulu immobilize reaktörün hidrojen verimi değerleri yer almaktadır. En yüksek verim değerleri HRT 1.5 ve 3 saat koşullarında 400 mL H₂/g sükroz kullanılan (~1,36 mol H₂/mol sükroz) civarında değerler olarak elde edilmiştir. Teorik değerlerle karşılaştırma yapıldığında HRT 1.5 ve 3 koşullarında son ürün bütirat ve asetat olduğu düşünülürse reaktörün yaklaşık %70 performansla çalıştığı söylenebilir. HRT 24 ve 12 saat koşullarında hidrojen verim değerlerinin oldukça düşük oldukları gözlenmektedir. Bu durum reaktörün yüksek HRT değerlerinde başlatıldığından dolayı akklimasyon sürecinde olduğu anlamına gelir. Daha düşük HRT zamanlarına inildikçe reaktördeki mikroorganizma sayısı ve tutunmuş mikroorganizma konsantrasyonları artmıştır.

Reaktörler planlanan HRT koşullarında çalıştırıldıktan sonra dolgu malzemelerinin üzerine tutunan mikroorganizma miktarlarının tespit edilmesi için reaktörler boşaltılmıştır. Şekil 4.57'de görüldüğü gibi mikroorganizmaların çoğunluğu reaktörün alt kısmında toplanmıştır. Reaktörün alt, orta ve üst bölgelerinde yapılan analizlerle mikroorganizma miktarları tespit edilmiştir.

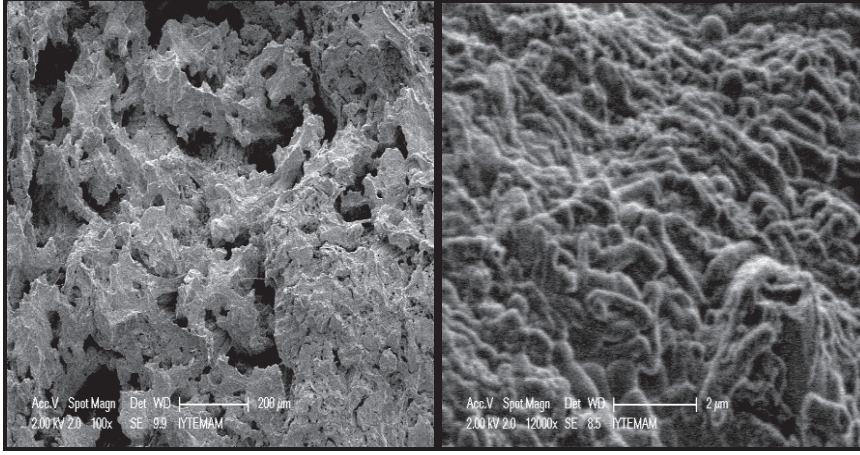


Şekil 4.57. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktörler-son görüntüleri



Şekil 4.58. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör son mikroorganizma konsantrasyonları (%)

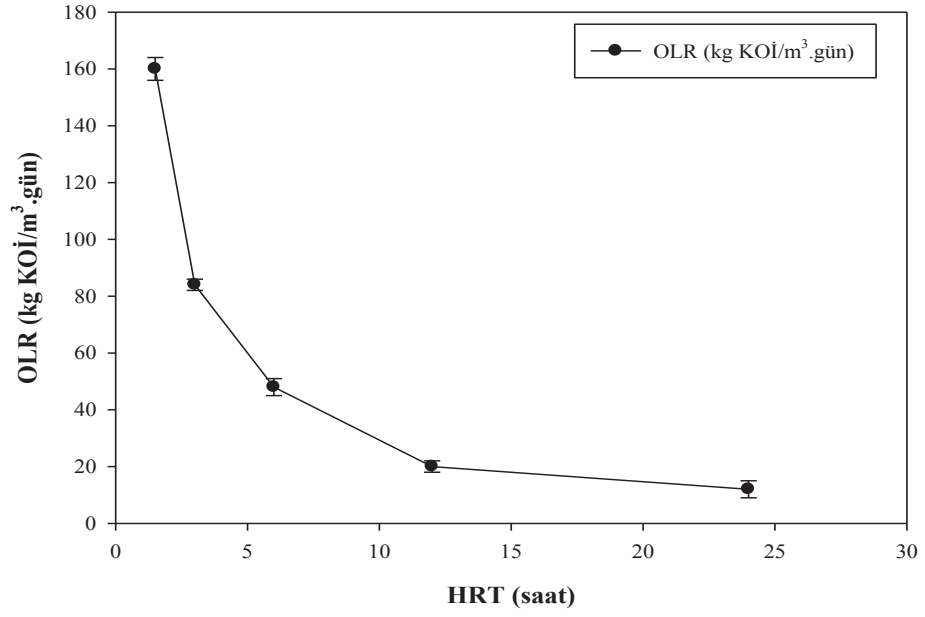
Reaktörde yapılan son analizlerde AKM (mg VSS/L) dağılımları Şekil 4.58’de yer almaktadır. Reaktör içi biyokütlenin %72’sinin immobilize, %28’inin süspanse halde olduğu görülmüştür. Yapılan analizlerde mikroorganizma miktarının çok büyük çoğunluğu alt bölgede toplandığı görülmektedir. İç kısımlarda da alt bölgedekinden çok daha düşük değerler elde edildiğinden reaktörde özellikle alt bölgede tutunmuş mikroorganizma miktarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum reaktör performansını artıracak bir etki oluşturacaktır. Taze beslemenin sürekli alttan veriliyor olması yukarı akışlı sistemlerde mikroorganizmaların çoğunlukla giriş bölgesinde büyümelerini sağlar üst bölgedeki yoğun mikroorganizma konsantrasyonu ise daha çok ölerik yada parçalanarak dolgu materyallerinden kopmuş reaktörden uzaklaşmakta olan mikroorganizmaları temsil etmektedir. Reaktörden çıkan dolgu malzemelerden alt bölgeden bir adet örnek SEM görüntüleme merkezinde üzerindeki mikroorganizmalar görüntülenmiştir. Şekil 4.59’da yer alan fotoğraflarda görüldüğü gibi dolgu materyali üzerine iyi bir tutunma sağlanmıştır. Mikroorganizmaların çoğunun yapıları itibariyle *Clostridium* türleri oldukları gözlenmektedir.



Şekil 4.59. Pomza taşı dolgulu immobilize reaktör dolgu materyali boş (sol kare) ve hidrojen üretimi sonrası (sağ kare) SEM Görüntüleri

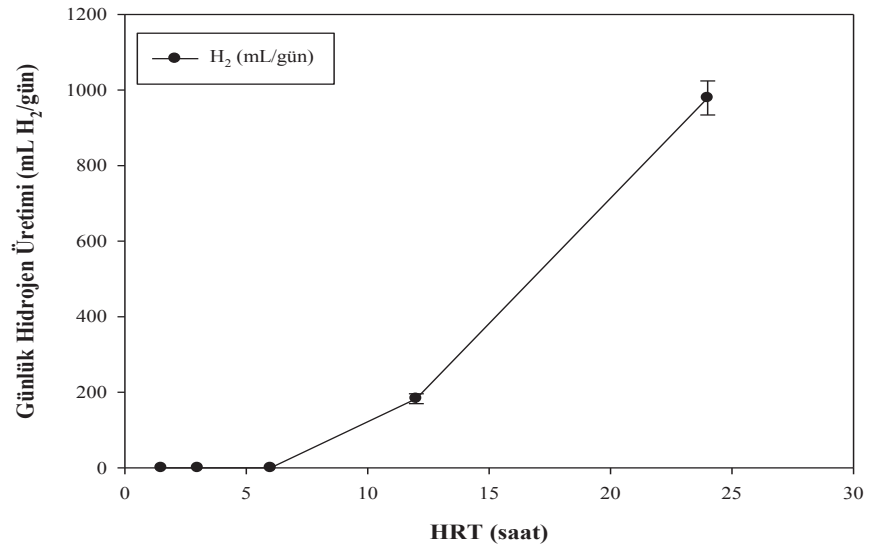
4.2.4. Sükroz beslemeli tam karıştırmalı sürekli reaktör (CSTR)

Biyohidrojen üretiminde karışık kültürle çalışıldığında literatürde var olan datalarla karşılaştırma yapmak kültürlerin kaynaklarına veya uygulanan ön işlemlere bağlı oldukları için yeterli olmayacaktır. Bu nedenle yapılan immobilizasyon denemelerin de aynı karışık kültürle askıda sistem kurmak çok daha sağlıklı olacaktır. Bu çalışmada immobilize reaktörlerle karşılaştırma yapabilmek için aynı koşullarda tam kontrollü CSTR çalıştırılmıştır. 10 g/L sükroz beslenerek pH kontrollü fermantörde 24-12-6-3-1.5 saat HRT koşullarında işletilmiş ve günlük analizler yapılmıştır. Sonuçlar ilerleyen bölümlerde yer almaktadır.



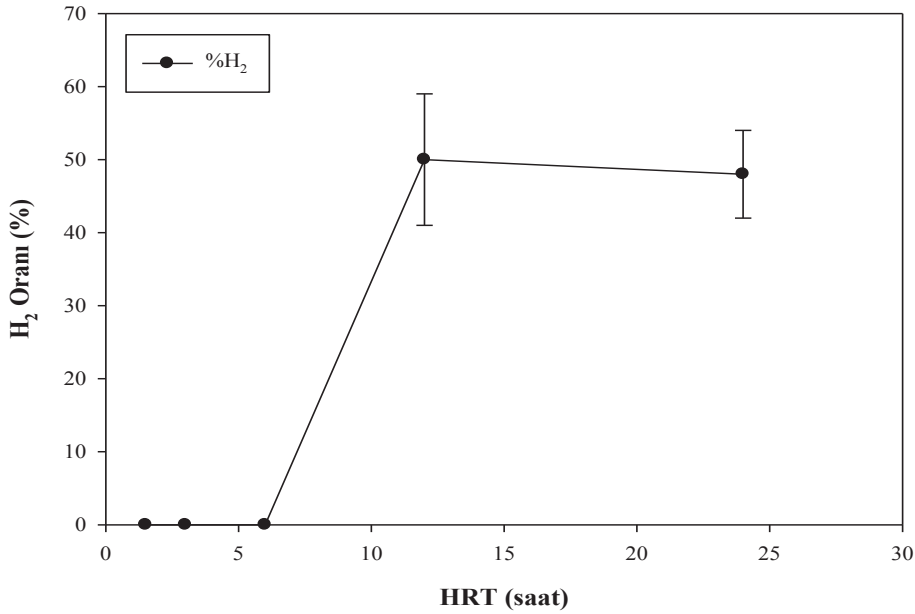
Şekil 4.60. Sükroz beslemeli CSTR OLR değerleri

Şekil 4.60' ta sükroz beslemeli CSTR, OLR değerleri yer almaktadır. Giriş konsantrasyonu 10 g/L sükroz olacak şekilde sabit tutulmuştur. OLR değerinin düşen HRT değeri ile arttığı HRT=1.5 saat koşulunda 160 kg KOİ/m³.gün değerine ulaştığı gözlenmektedir.



Şekil 4.61. Sükroz beslemeli CSTR hidrojen üretim değerleri

Şekil 4.61’de ise CSTR reaktöründe elde edilen H_2 değerleri yer almaktadır. Bu değerler incelendiğinde en yüksek hidrojen üretim değerlerinin HRT 24 saat koşullarında elde edildikleri gözlenmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda HRT 24 saatlik koşulların CSTR ile hidrojen üretiminde optimum oldukları, daha düşük HRT değerlerinde mikroorganizmaların yıkanarak uzaklaştıkları gözlenmiştir (Azbar, 2010). Çalışmanın bu basamağı daha önce belirlenen bu sonuçları destekler nitelikte olup immobilize reaktörlerin kullanılmasının avantajını ortaya koymuştur. Özellikle HRT 6, 3 ve 1.5 saatlik koşullarda hidrojen üretim değerlerinin oldukça düşük oldukları göze çarpmaktadır. Mikroorganizmaların reaktörden yıkanıp uzaklaştıkları anlamına gelen bu durum CSTR reaktörlerinde düşük HRT koşullarda çalışmanın güçlüğünü ortaya koymaktadır.



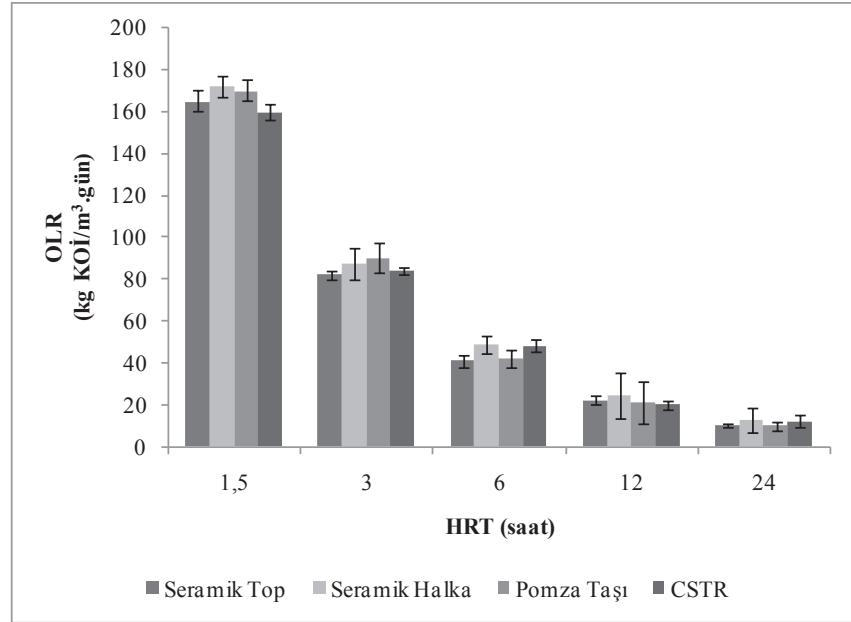
Şekil 4.62. Sükroz beslemeli CSTR % H_2 değerleri

Hidrojen yüzdesi biyohidrojen üretiminde başka bir önemli parametredir. CSTR’da HRT 6, 12 ve 24 saatlik koşullarda hidrojen yüzdelerinin % 50’den daha yüksek oldukları daha düşük HRT koşullarında %40 ların altına düştüğü gözlenmektedir (Şekil 4.62). Reaktörde azalan mikroorganizma sayısında bir sonucu olan bu durum üretilen hidrojen miktarlarına yansımaktadır. HRT 1.5 ve 3

saat koşullarında zaten oldukça azalan hatta sıfır olan hidrojen miktarlarına da bakılacak olursa reaktör üzerinde zenginleşme olabileceğinin ancak mikroorganizma sayısının yetersizliğinden dolayı hidrojen üretimi gözlenemediğinin göstergesidir.

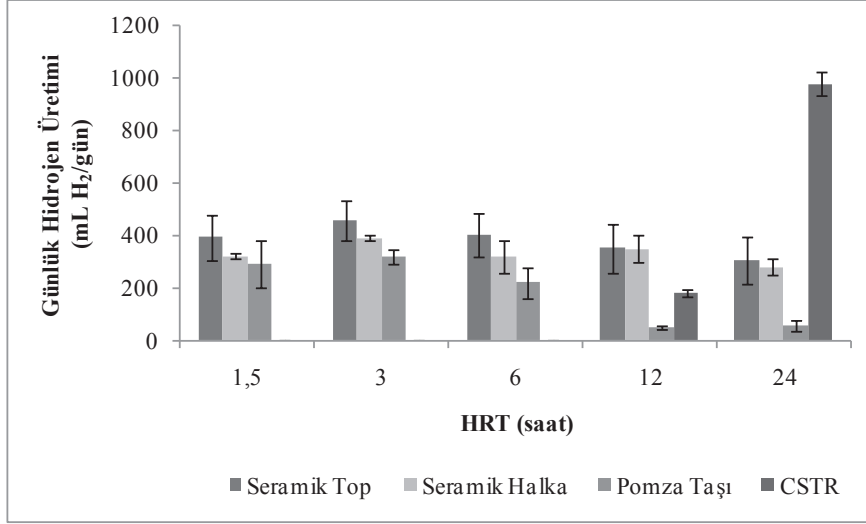
4.2.5. Karanlık fermentasyonla hidrojen üretiminde kullanılan sürekli reaktörlerde performans karşılaştırmaları

Karanlık fermentasyonla hidrojen üretiminde sürekli reaktörlerde immobilizasyonun etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların bir arada karşılaştırmaları yapılmıştır. İmmobilize reaktörlerin kendi aralarında ve askıda reaktörle karşılaştırmalı grafiklerine bakıldığında immobilizasyonun etkisi daha net bir şekilde görülmektedir.



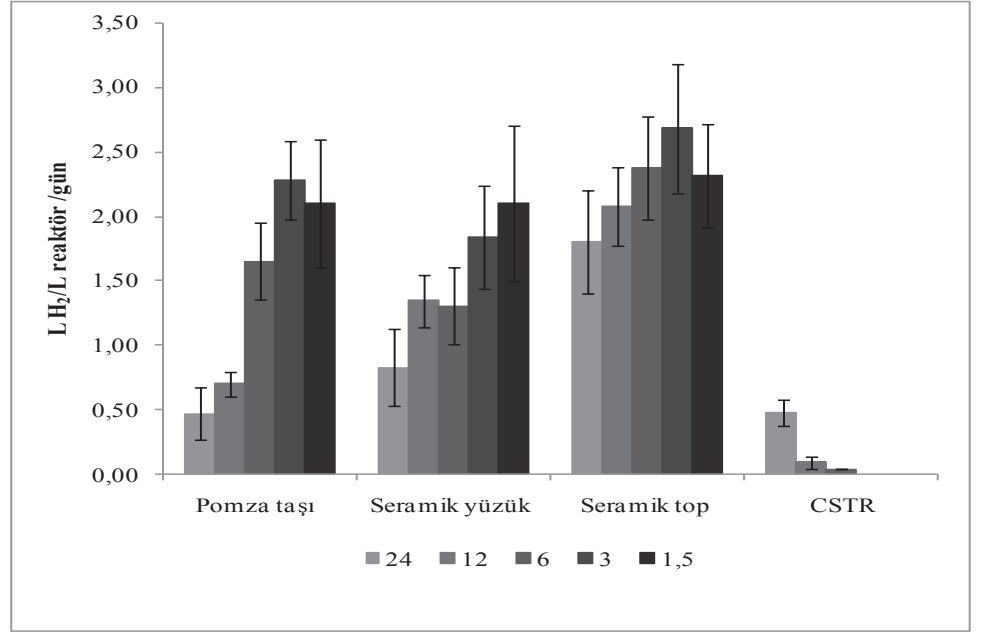
Şekil 4.63. Karanlık fermentasyonla sürekli reaktörlerde immobilize ve askıda reaktörlerde OLR değerlerinin karşılaştırması

Karanlık fermentasyonla sürekli reaktörlerde hidrojen üretimine immobilizasyonun etkisini incelemek amacıyla hazırlanan karşılaştırma grafiğine bakılacak olursa HRT=24 saatte 10 g/L olan OLR değerinin düşen HRT değeri ile artışı bütün reaktörlerde OLR değerinin hesaplanan değerlere yakın olduğu görülmektedir. OLR değerlerindeki bu kararlı durum reaktörlerde beslemelerin uygun koşullarda yapıldığını göstermektedir.



Şekil 4.64. Karanlık fermantasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde günlük hidrojen üretimi değerlerinin karşılaştırması

Karanlık fermantasyonla sürekli reaktörlerde günlük hidrojen üretimi üzerine immobilizasyonun etkisinin karşılaştırmalı olarak yer aldığı Şekil 4.64'e bakılacak olursa HRT=24 saatte en yüksek hidrojen üretimi CSTR'da görülmektedir ancak aradaki fark CSTR'ın hacminin 2 L olmasından kaynaklanmaktadır. HRT=12 saat'ten itibaren CSTR'da hidrojen üretimi yüksek miktarda azalmış ve HRT=6 saatten itibaren CSTR'da biyokütle sistemden yıkanarak uzaklaştığından dolayı hidrojen üretimi durmuştur. Bu koşullarda immobilize reaktörlerde hidrojen üretiminin kararlı bir şekilde devam ettiği görülmektedir. HRT=1.5 saat koşulunda dahi üç immobilize reaktörde de günlük hidrojen üretimi devam etmiştir. Bu durum sistemde sabit bir şekilde kalan biyokütlenin aktif bir şekilde hidrojen üretmeye devam ettiğini göstermektedir.



Şekil 4.65. Karanlık fermantasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde hacimsel hidrojen üretim değerlerinin karşılaştırması

Karanlık fermantasyonla sürekli reaktörlerde hidrojen üretim hızına immobilizasyonun etkisinin karşılaştırıldığı Şekil 4.65'te değişen HRT değerlerine karşılık reaktörlerin kendi aralarındaki ve askıda sistemden farkları görülmektedir. İmmobilize reaktörlerde reaktörün litresi başına hidrojen üretimine bakıldığında da askıda sisteme göre oldukça yüksek oldukları görülmektedir. Hacimce 8 kat düşük reaktörlerde performans açısından 5-6 kat yüksek değerler göze çarpmaktadır. HRT= 6 saatten itibaren immobilizasyonun reaktör performansına katkısının oldukça yüksek olduğu reaktör içinde kalan kararlı biyokütle ile düşük alıkonma zamanlarında dahi hidrojen üretimlerinin devam etmesi hidrojen üretimine immobilizasyonun olumlu katkısını net bir şekilde ortaya koymaktadır.

4.2.6. Sürekli reaktörlerde istatistiksel karşılaştırmalar

İstatistiksel analizler öncelikle reaktörlerin kendi içlerinde HRT değerleri arasında fark olup olmadığına bakmak için yapılmıştır. Seramik yüzük dolgulu reaktörde reaktörün en önemli işletme parametresi olan HRT' ler arasında %H₂, % Şeker kullanım verimi ve hidrojen verimi açısından %5'lik düzeyde ANOVA testi sonucu p değerleri sırasıyla 0.841; 0.379 ve 0.314 >0.05 olduğundan, fark olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.10). Değişen HRT değerlerinin, H₂ üretimi (p

0.001<0.05) ve H₂ üretim hızı üzerinde etkili olduğu (p 0.011<0.05) ANOVA testi ile görülmüştür.

Çizelge 4.10. Seramik yüzük dolgulu reaktör ANOVA testi sonuçları

ANOVA		F	Sig.
Toplam Gaz (ml)	Between Groups Within Groups Total	6,320	,001
%H ₂	Between Groups Within Groups Total	,351	,841
H ₂ (ml)	Between Groups Within Groups Total	3,829	,011
% KOİ Kullanım Verimi	Between Groups Within Groups Total	3,196	,025
% Şeker Kullanım Verimi	Between Groups Within Groups Total	1,086	,379
I H ₂ /l/gün	Between Groups Within Groups Total	3,829	,011
mol H ₂ /mol sucrosekullanılan	Between Groups Within Groups Total	1,237	,314

Pomza taşı dolgulu reaktörde H₂ üretimi (0.000<0.05); H₂ üretim hızı (p=0.000<0.05) ve H₂ verimi (p=0.003<0.05) değerleri açısından HRT parametresinin etkili olduğu ANOVA testi ile de gösterilmiştir. Seramik yüzük reaktörüne benzer şekilde %H₂ ve % Şeker kullanım verimleri değerleri açısından HRT etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Pomza taşı dolgulu reaktör ANOVA testi sonuçları

ANOVA		F	Sig.
Toplam Gaz (ml)	Between Groups Within Groups Total	26,278	,000
%H ₂	Between Groups Within Groups Total	1,055	,393
H ₂ (ml)	Between Groups Within Groups Total	16,671	,000
% KOİ Kullanım Verimi	Between Groups Within Groups Total	,680	,612
% Şeker Kullanım Verimi	Between Groups Within Groups Total	2,148	,101
I H ₂ /I/gün	Between Groups Within Groups Total	12,135	,000
mol H ₂ /mol sucrosekullanılan	Between Groups Within Groups Total	5,221	,003

Seramik top reaktöründe ise tüm parametreler açısından HRT parametresi etkisi anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Seramik top dolgulu reaktör ANOVA testi sonuçları

ANOVA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Toplam Gaz (ml)	Between Groups Within Groups Total	1022877,764 752028,236 1774906,000	4 45 49	255719,441 16711,739	15,302	,000
%H ₂	Between Groups Within Groups Total	1738,496 3411,685 5150,181	4 45 49	434,624 75,815	5,733	,001
H ₂ (ml)	Between Groups Within Groups Total	125191,990 348637,317 473829,306	4 45 49	31297,997 7747,496	4,040	,007
% KOİ Kullanım Verimi	Between Groups Within Groups Total	10055,292 9905,967 19961,259	4 45 49	2513,823 220,133	11,420	,000
% Şeker Kullanım Verimi	Between Groups Within Groups Total	26272,223 6245,716 32517,939	4 45 49	6568,056 138,794	47,322	,000
I H ₂ /I/gün	Between Groups Within Groups Total	4,332 12,064 16,395	4 45 49	1,083 ,268	4,040	,007
mol H ₂ /mol sucrosekullanılan	Between Groups Within Groups Total	47,172 23,730 70,901	4 45 49	11,793 ,527	22,364	,000

Aynı HRT değerlerinde immobilize reaktörlerin hem kendi aralarında hem de askıda sistem (CSTR) ile karşılaştırmalarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığına bakıldığında ANOVA testi sonucuna göre ($p=0.002<0.05$) tüm HRT koşullarında günlük hidrojen üretim miktarları arasındaki fark anlamlı

bulunmuştur. İleri analiz yöntemi olarak uygulanan Tukey testinde ise seramik top ve seramik halka reaktörlerinin performanslarının istatistiksel olarak birbirine benzer olup ($p=0.574>0.05$) tüm immobilize reaktörlerin performanslarının askıda sistemden farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Ek 6).

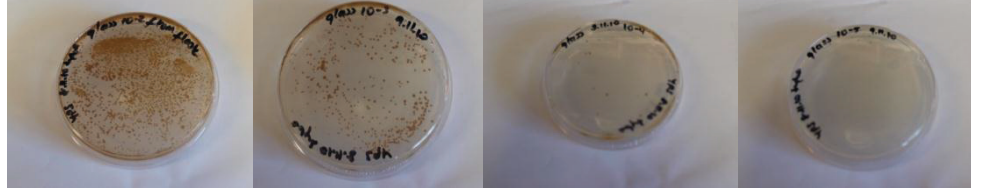
H₂ yüzdeleri açısından HRT 24 saatte gruplar arası farklar $p=0.114>0.05$ olduğundan anlamlı bulunmamıştır. Aynı biyokütlenin kullanılmasından kaynaklanan bu durum biyokütlenin üzerinde immobilize olduğu materyale veya askıda olmasına bağlı olmaksızın aynı miktarda H₂ üretebildiğini göstermektedir. HRT 12, 6, 3 ve 1.5 saat değerlerinde CSTR içerisinde biyokütle miktarının azalması ve hatta tamamen yıkanarak reaktörden uzaklaşması sonucunda performans arasında çıkan fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p=0.00<0.05$). Tukey testleri sonucunda immobilize reaktörlerdeki %H₂ oranlarının da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Ek 6).

Verimlilik değerlerine bakıldığında tüm HRT koşullarında ANOVA testi sonucunda reaktörler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Tukey testleri ile grup içi analizlere bakıldığında ise performans açısından immobilize reaktörlerin birbirine benzer oldukları görülmektedir ($p>0.05$). Gruplar arasındaki farkın çıkmasının en önemli sebebi CSTR ve immobilize reaktörler arası performans farkıdır. Verim değerlerinin istatistiksel olarak incelenmesi sonucunda tüm HRT koşullarında gruplar arasındaki farklar anlamlı bulunmuştur. İstatistiksel analizlerin ayrıntılı sonuç çizelgeleri Ek 6'da yer almaktadır.

4.3. Foto-fermantatif Bakterilerin İzole Edilmesi

4.3.1. Foto-fermantatif bakterilerin balçık ortamından izole edilmesi

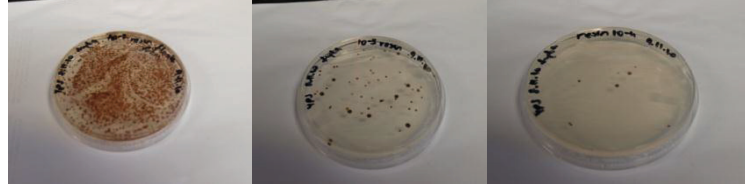
Balçık ve zenginleştirme ortamı Bölüm 3.5'te anlatıldığı gibi değişik malzemelerle doldurulmuş reaktörlerden sürekli sirküle edilmişlerdir. Üç hafta sonunda kolonlarda kırmızı pigmentli oluşumlar gözlenmeye başlamıştır. Her reaktörden ayrılan örnekler öncelikle YPS petrilere yayma metodu ile aktarılmıştır. Petriler anaerobik jar içinde inkübatörde gerekli koşullarda tutulmasının ardından ilk oluşumlar Şekil 4.66-4.69'daki gibi olmuştur.



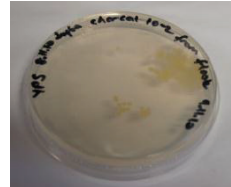
Şekil 4.66. Cam parçacık dolgulu reaktörden alınan seyreltmeler



Şekil 4.67. Moleküler elek dolgulu reaktörden seyreltmeler

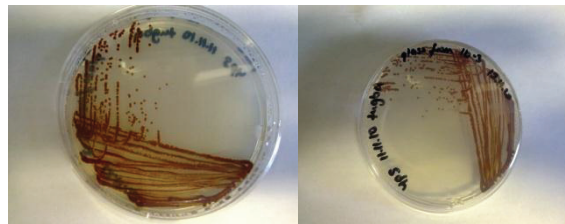


Şekil 4.68. İyonik reçine reaktöründen seyreltmeler



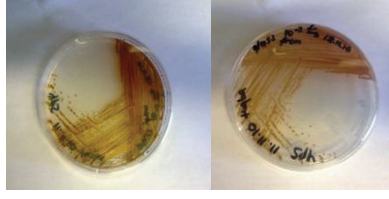
Şekil 4.69. Kömür reaktöründen seyreltme

Kömür reaktörü hariç bütün reaktörlerden 10^{-4} seyreltmelerinde görülen koloniler üç tekrarlı şekilde YPS petrilere çizme yöntemi ile aktarılmıştır. Bir hafta büyümeye bırakılmıştır. Bir hafta sonunda görülen farklı koloniler gruplandırılmıştır. Gözlenen koloniler aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.70. Cam dolgulu reaktörden alınan örnekler No:1

Koyu kırmızı ve kahverengi; tek tip, yuvarlak, yaygın koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.70).



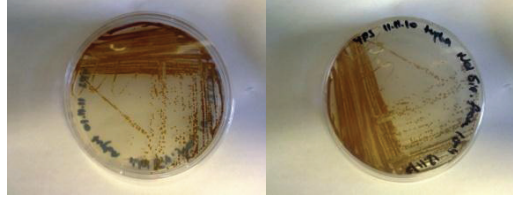
Şekil 4.71. Cam dolgulu reaktörden alınan örnekler No:2

Açık kahverengi, tek tip, yaygın koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.71).



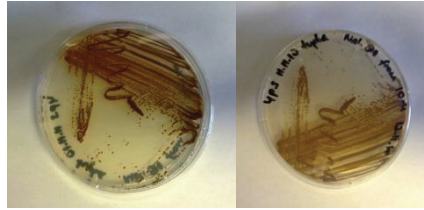
Şekil 4.72. Cam dolgulu reaktörden alınan örnekler No:3

Kahverengi birbirinden ayırık olmayan açık kahverengi koloniler (Şekil 4.72).



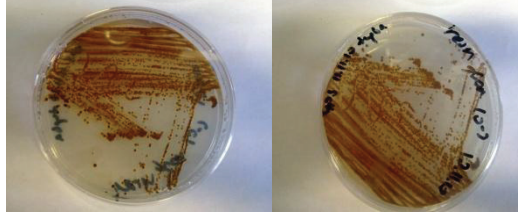
Şekil 4.73. Moleküler elek dolgulu reaktörden alınan örnekler No:1

Koyu kahverengi, yuvarlak, yaygın koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.73).



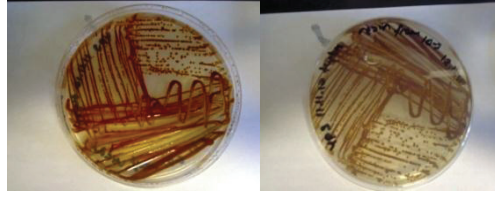
Şekil 4.74. Moleküler elek dolgulu reaktörden alınan örnekler No:2

Koyu kahverengi kırmızı, yuvarlak ve yaygın koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.74).



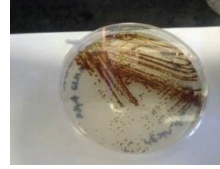
Şekil 4.75. İyonik reçine dolgulu reaktörden alınan örnekler No:1

Kırmızı ve açık kahverengi ayrık olmayan yaygın koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.75).



Şekil 4.76. İyonik reçine dolgulu reaktörden alınan örnekler No:2

Kırmızı ve açık kahverengi ayrık olmayan, yuvarlak yaygın koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.76).



Şekil 4. 77. İyonik reçine dolgulu reaktörden alınan örnekler No:3

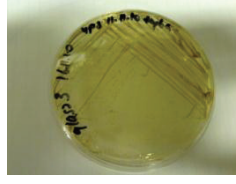
Koyu kırmızı, yaygın ve yuvarlak koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.77).

Cam parçacıklardan 2 ve 3 numaralı; reçineden 1 ve 2 numaralı petrilere alınan örnekler çizme yöntemiyle yine ekilmiştir. Bir hafta sonra gözlenen saflaştırılmış koloniler aşağıdaki gibidir.



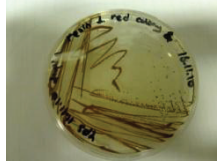
Şekil 4.78. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petrilere cam parçacık dolgulu reaktör No:2

Kırmızı-kahverengi büyük yarıçaplı koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.78).



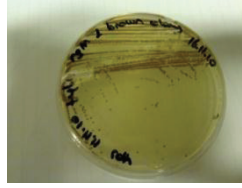
Şekil 4.79. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler cam parçacık dolgulu reaktör No:3

Açık kahverengi küçük yarıçaplı koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.79).



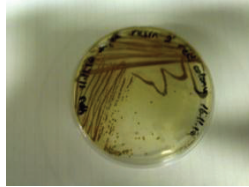
Şekil 4.80. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:1 (kırmızı koloni)

Küçük kırmızı, yuvarlak düzgün dağılımlı koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.80).



Şekil 4.81. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:1 (kahverengi koloni)

Açık kahverengi küçük yarıçaplı düzgün dağılımlı koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.81).



Şekil 4.82. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:2 (kırmızı koloni)

İyi dağılımlı kahverengi ayırık koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.82).

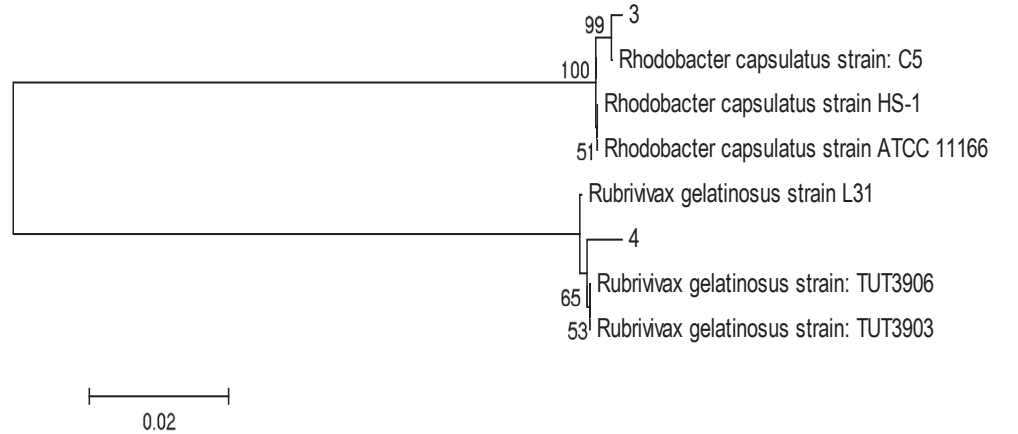


Şekil 4.83. İleri saflaştırma için transfer yapılmış petriler iyonik reçine dolgulu reaktör No:2 (kahverengi koloni)

Ayrık kahverengi koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.83).

4.3.2. İzolatların moleküler analiz yöntemleri ile tanımlanması

İzole edilen suşlar Refgen Biyoteknoloji şirketinde öncelikle Kanada'daki izolasyon çalışmasının ardından Türkiye'ye getirilen izolatların sıvı kültürlerinden alınarak incelenmiştir bu inceleme sonucunda 3 ve 4 numaralı izolatların tanımlamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.84).

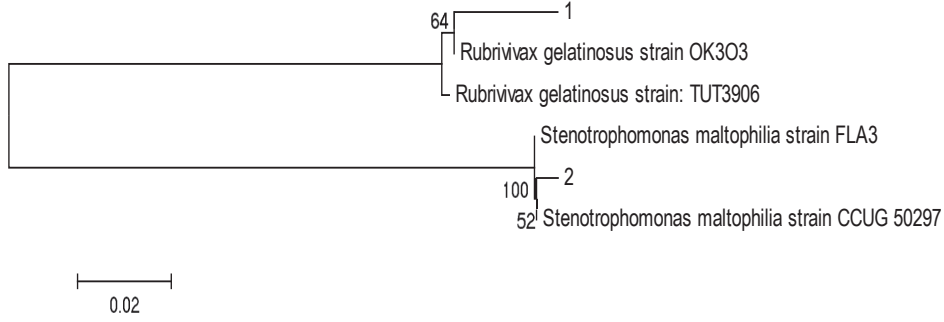


Şekil 4.84. 3 ve 4 numaralı izolatların filogenetik haritaları

Şekil 4.84'te yer alan filogenetik ağaca bakılacak olursa 3 olarak tanımlanmış izolat %99 ihtimalle *Rhodobacter capsulatus* suşudur. Kullanılan ortamlarda da en iyi *Rhodobacter capsulatus* ortamında büyüyen bu suş %100 olarak tanımlanmadığı için diğer suşlardan farklı özelliklere sahip olma olasılığı araştırılacaktır.

Filogenetik ağaca bakılacak olursa 4 olarak tanımlanan izolatın bir *Rubrivivax gelatinus* suşu olduğu görüşmektedir. Çalışmamızda bu izolat

Rubrivivax gelatinosus R.Gel 4 olarak adlandırılmıştır. *Rubrivivax gelatinosus* daha çok CO kullanarak hidrojen ürettiği bilinen bir suştur. *Rubrivivax gelatinosa* L31 suşunun sükroz, glikoz, nişasta laktat ve malattan hidrojen üretebildiği literatürde yer almıştır. Aynı zamanda asetat, bütirat ve süksinatı da karbon kaynağı olarak kullanabildiğini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Li and Fang, 2008).



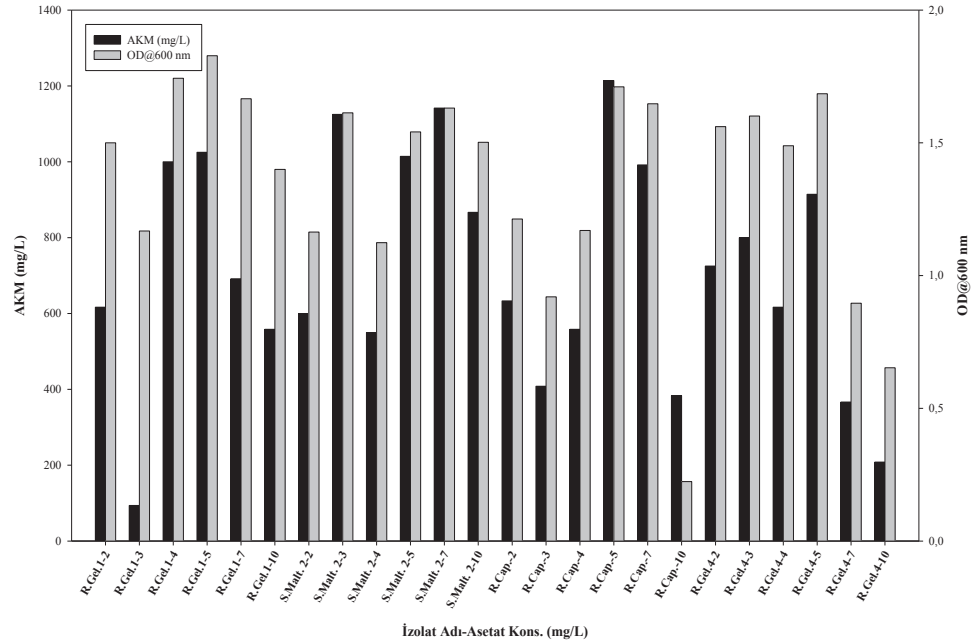
Şekil 4.85. 1 ve 2 numaralı izolatların filogenetik haritaları

1 ve 2 olarak adlandırılan izolatlar agarda büyütülerek moleküler analize gönderilmiştir. Bu sonuçlara bakılacak olursa 1 numaralı izolatın %64 ihtimalle yine bir *Rubrivivax gelatinosus* olduğu; 2 numaralı izolatın ise %52 *Stenotrophomonas maltophilia* suşu olduğu bildirilmiştir (Şekil 4.85). 1 numaralı izolat çalışmanın ilerleyen kısımlarında *R. Gel. 1*; *Stenotrophomonas maltophilia* ise *S. Malt 2* olarak adlandırılmıştır.

4.4. Foto-fermantasyonla Kesikli Reaktör Denemeleri (Karbon Kaynağı Optimizasyonu)

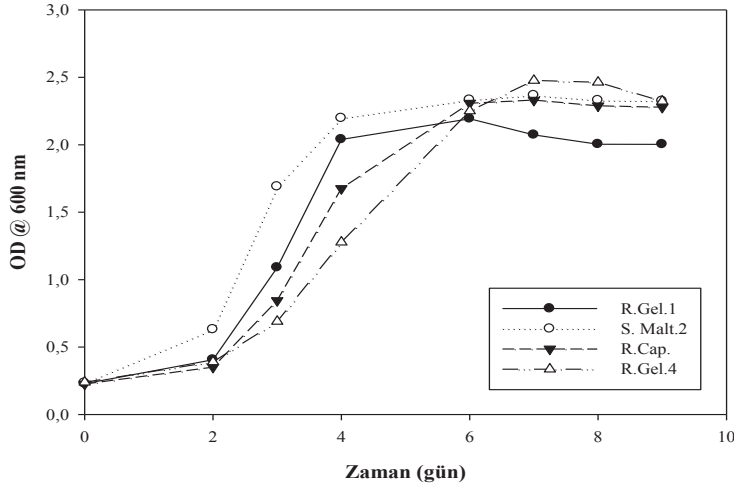
4.4.1. Karbon kaynağı olarak asetat kullanılması

Karanlık fermentasyonla immobilize reaktörlerde sükrozdan hidrojen üretimi denemelerinde çıkış suyunda baskın olan iki uçucu yağ asidinin asetat ve bütirat oldukları gözlenmiştir. Karanlık fermentasyon çıkış suyunun foto-fermantasyon basamağında substrat kaynağı olarak kullanılması durumunda izolatların kullanabileceği en uygun asetat konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla kesikli reaktörlerde hidrojen üretimi denemeleri gerçekleştirilmiştir.



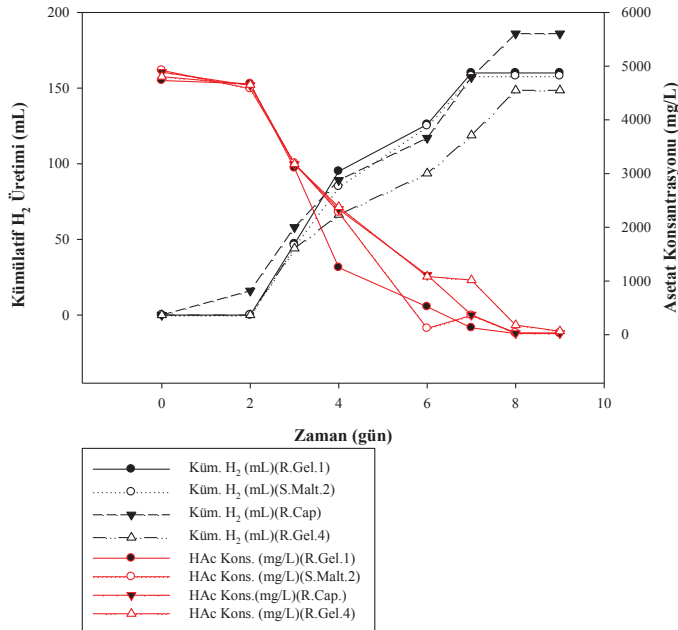
Şekil 4. 86. İzolatlarla kurulan asetat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

Büyüme karakteristiklerinin incelenmesi amacıyla azot kaynağı olarak amonyum kullanılmıştır. Karbon kaynağı konsantrasyonu 2-10 g/L arasında değişecek şekilde zenginleştirme ortamına asetat eklenerek izolatların büyümeleri gözlenmiştir. OD@600nm ve AKM değerlerine bakılacak olursa her izolatta büyümenin en iyi 5 g/L konsantrasyonlarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.86). Düşük konsantrasyonlarda daha iyi büyümeler gözlenirken konsantrasyonlar arttıkça büyümelerin olumsuz etkilendiği ortam renginde açılmalar olduğu gözlenmiştir.



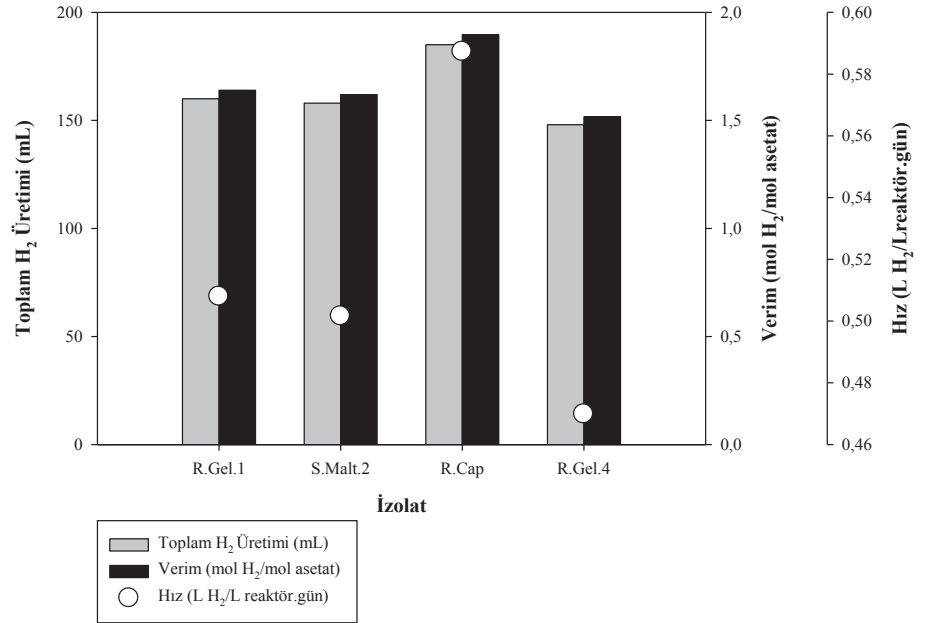
Şekil 4. 87. İzolatlarla kurulan asetat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD@600 nm değerleri (6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

İzolatların ortak olarak en iyi büyüme gösterdikleri 5 g/L asetat konsantrasyonunda hidrojen üretim performansları da incelenmiştir. Azot kaynağı hidrojen üretim denemelerinde glutamat ile değiştirilmiştir. Bütün izolatlarda yüksek OD@600nm değerleri yani iyi büyüme performansı gözlenmiştir (Şekil 4.87). Bütün izolatların öncelikle iki günlük lag fazına ihtiyaç duydukları gözlenmiştir. Ortalama dört günlük eksponansiyel faz süresinin ardından tüm izolatlarda altıncı günden itibaren durgun faz gözlenmeye başlamıştır.



Şekil 4. 88. İzolatlarla kurulan asetat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneğinde kümülatif H₂ üretimi ve asetat tüketimi (6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

Substrat olarak asetatın kullanıldığı foto-fermantasyon düzeneklerinde dört izolatın da asetatı tamamen kullanabildiği gözlenmiştir. Asetat tüketimiyle hidrojen üretiminin ters orantılı olması asetatın dört izolat için de hidrojen üretiminde kullanabilecekleri iyi birer kaynak olduğunu göstermektedir. Asetat kullanımının kümülatif hidrojen üretimi ile paralellik gösterdiği görülmektedir. En yüksek 180 mL toplam H_2 üretimi *R. Cap.* izolatı ile elde edilmiştir. *S. Malt. 2* ve *R. Gel. 1* ile yaklaşık 160 mL hidrojen üretimi gözlenirken *R. Gel. 4* ile en düşük hidrojen üretimi 150 mL olarak gözlenmiştir. Teorik olarak 5 g/L asetatın tamamen tüketilmesi durumunda 400 mL kümülatif gaz üretimi beklendiğinden %45-48 arasında proses verim değerlerinin elde edildikleri görülmektedir (Şekil 4.88).

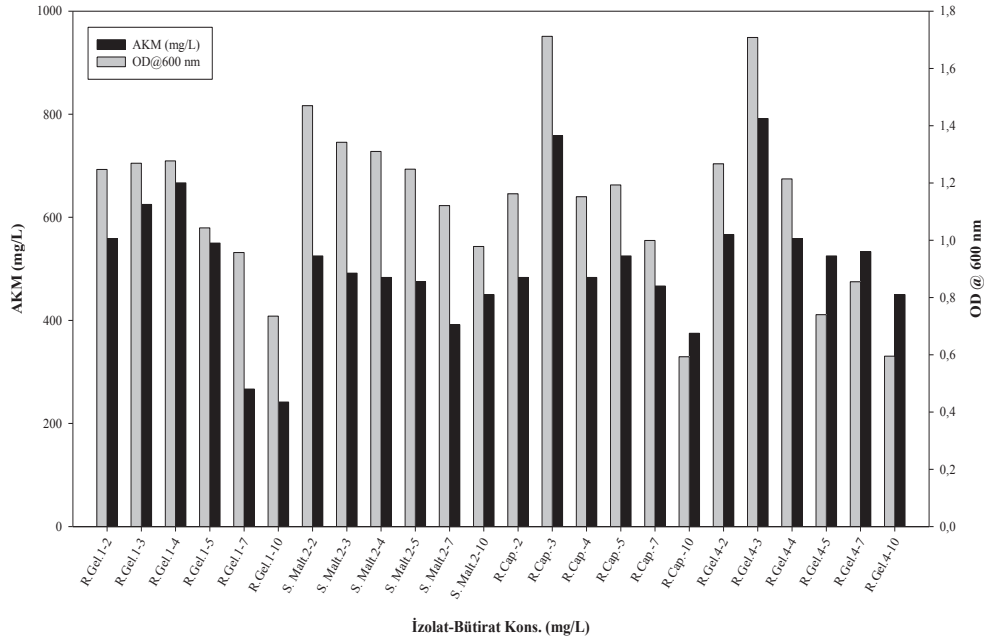


Şekil 4. 89. İzolatlarla kurulan deney düzeneğinde H_2 üretimi, yüzdesi ve verim değerleri(1-2 (*R. Gel. 1*, 2 g/l), 1-5 (*R. Gel. 1*, 5g/l) ; 2-2 (*S. Malt. 2*, 2 g/l), 2-5 (*S. Malt. 2*, 5g/l); 3-5 (*R. Cap.* 5 g/l); 4-2 (*R. Gel. 4*, 2 g/l), 4-5 (*R. Gel. 4*, 5g/l); 6000 lüx; $28 \pm 2^\circ C$; pH 7)

Asetatın karbon kaynağı olarak kullanıldığı izolatlarla kurulan foto-fermantasyon düzeneklerinde 5 g/L asetatın tamamıyla kullanıldığı durumda teorik olarak 4 mol H_2 /mol asetat verim ve 400 mL hidrojen üretimleri beklenmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda 1.5-1.7 mol H_2 /mol asetat arasında değişen verim değerleri. H_2 üretim hızlarına bakılacak olursa günde reaktörün litresi başına 0.46-0.60 L hidrojen üretim hızları gözlenmiştir (Şekil 4.89).

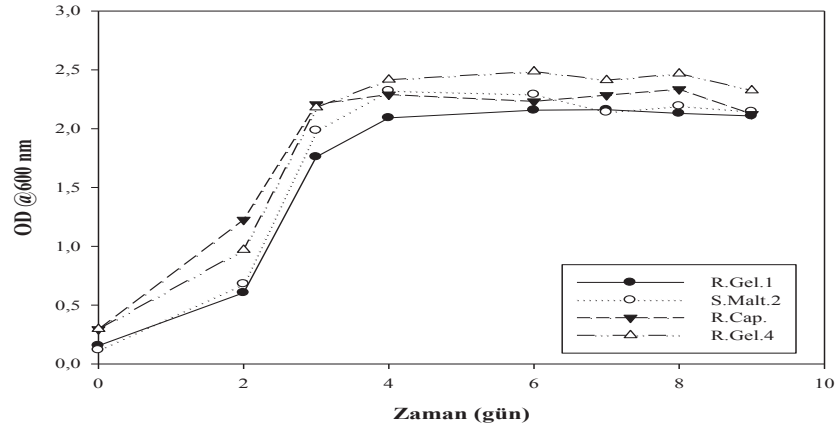
4.4.2. Karbon kaynağı olarak bütirat kullanılması

Kesikli reaktör denemeleri ile izolatların hidrojen üretimi için bütiratı kullanma performansları incelenmiştir. Karanlık fermantasyon denemelerinin önemli ana çıktılarından diğeri olan bütirat zenginleştirme ortamına karbon kaynağı olarak eklenmiştir.



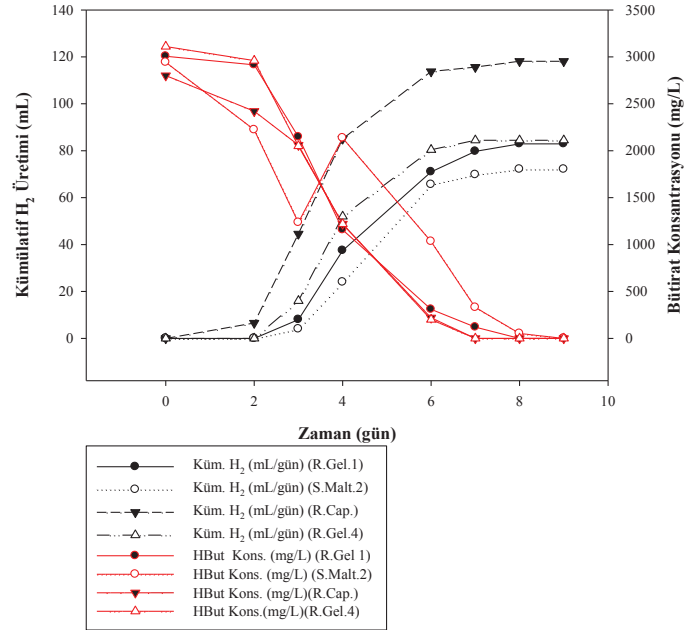
Şekil 4.90. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD_{@600 nm} değerleri ; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

İzolatların bütiratı karbon kaynağı olarak kullanılmasını test etmek amacıyla zenginleştirme ortamına azot kaynağı olarak amonyum ve 2-10 g/L konsantrasyonları arasında bütirat eklenmiştir. Tüm izolatlar da ortak olarak 3 g/L bütirat ortamında en iyi büyüme gözlenmiştir. Tüm izolatların düşük konsantrasyonlarda bütirat kullanılmasıyla iyi bir büyüme gösterdikleri ancak artan bütirat konsantrasyonunun büyümeyi olumsuz etkilediği gözlenmiştir. İki numaralı izolatta en iyi büyüme 2 g/L konsantrasyonda elde edilmiş olmasına rağmen en ortak konsantrasyonda karşılaştırma yapabilmek amacıyla hidrojen üretim çalışmaları için 3 g/L tercih edilmiştir (Şekil 4.90).



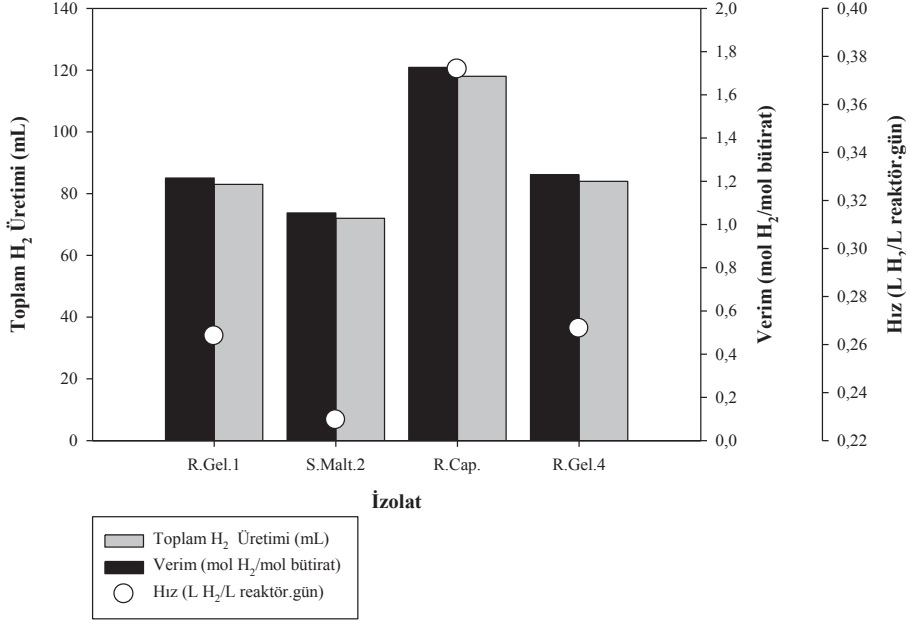
Şekil 4.91. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD_{@600 nm} değerleri (6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

İzolatların hidrojen üretimi için bütiratı kullanma kapasitelerini incelemek için yapılan kesikli reaktör denemeleri sonucunda dört izolatta da iki günlük lag fazını dördüncü güne kadar devam eden eksponansiyel faz takip etmiştir. Dördüncü günden itibaren ise durgun faz gözlenmeye başlamıştır. OD_{@600} değerleri foto-fermantatif bakterilerde genel olarak Şekil 4.91’de görülen değerlerde gözlenmiştir. En iyi büyüme *R.Gel. 4* ile en yavaş büyüme ise *R.Gel 1* izolatında gözlenmiştir (Şekil 4.91).



Şekil 4.92. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeniğinde kümülatif H₂ üretimi ve bütirat tüketimi (6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

İzolatlar için karbon kaynağı olarak bütiratın uygun olduğu Şekil 4.92’de görülmektedir. Bütiratın dört izolat tarafından tamamen tüketilebildiği durumda *R. Gel.1*, *S.Malt.2* ve *R.Gel.4* tarafından 80 mL’ye kadar kümülatif hidrojen üretimi gözlenirken en yüksek üretim *R. Cap* tarafından 120 mL olarak gözlenmiştir. Düşen bütirat konsantrasyonlarıyla birlikte hidrojen üretim değerlerin de de artış gözlenmiştir (Şekil 4.92).

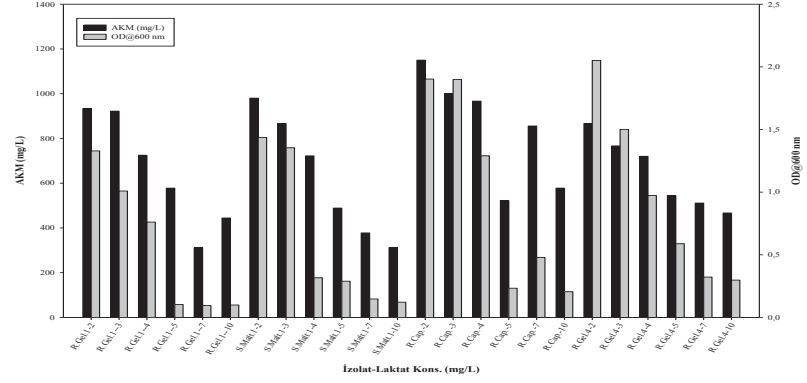


Şekil 4.93. İzolatlarla kurulan bütirat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde Toplam H₂ Üretimi (mL), Verim (mol H₂/mol bütirat ve H₂ üretim hızı (L H₂/L reaktör. gün değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

Toplam H₂ üretimi, verim ve hız değerleri bir arada incelendiğinde bütiratın karbon kaynağı olarak kullanılması durumunda, verim değerlerinin ve toplam H₂ değerlerinin teorik değerlere göre daha düşük olarak gözlemlendiği görülmektedir. En düşük hidrojen üretim verimi *S. Malt. 2* ile 0.85 mol H₂/mol bütirat olarak elde edilirken en yüksek verim *R.Cap* ile 1.65 mol H₂/mol bütirat olarak elde edilmiştir. Karbon kaynağı olarak asetatın kullanıldığı reaktörlerle karşılaştırıldığında hidrojen üretim değerleri yarı yarıya düşüş göstermiştir. Bu durum izolatların asetatı daha rahat bir şekilde kullanabildiklerini göstermektedir. H₂ üretim hızları 0.22-0.38 L H₂/L reaktör. gün arasında değerler almış en yüksek değerler *R.Cap* ile elde edilmiştir (Şekil 4.93).

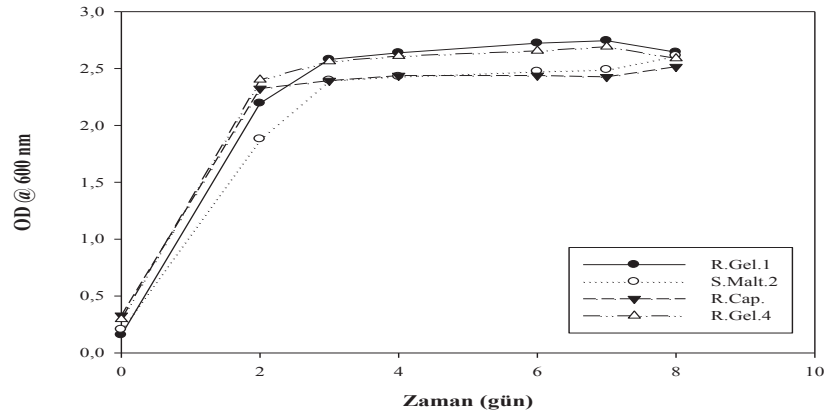
4.4.3. Karbon kaynağı olarak laktat kullanılması

Foto-fermantatif bakterilerin metabolik yollarında önemli yeri olan laktatın yeni izolatlar tarafından hidrojen üretimi için kullanılabilme kapasiteleri kesikli reaktörlerde incelenmiştir.



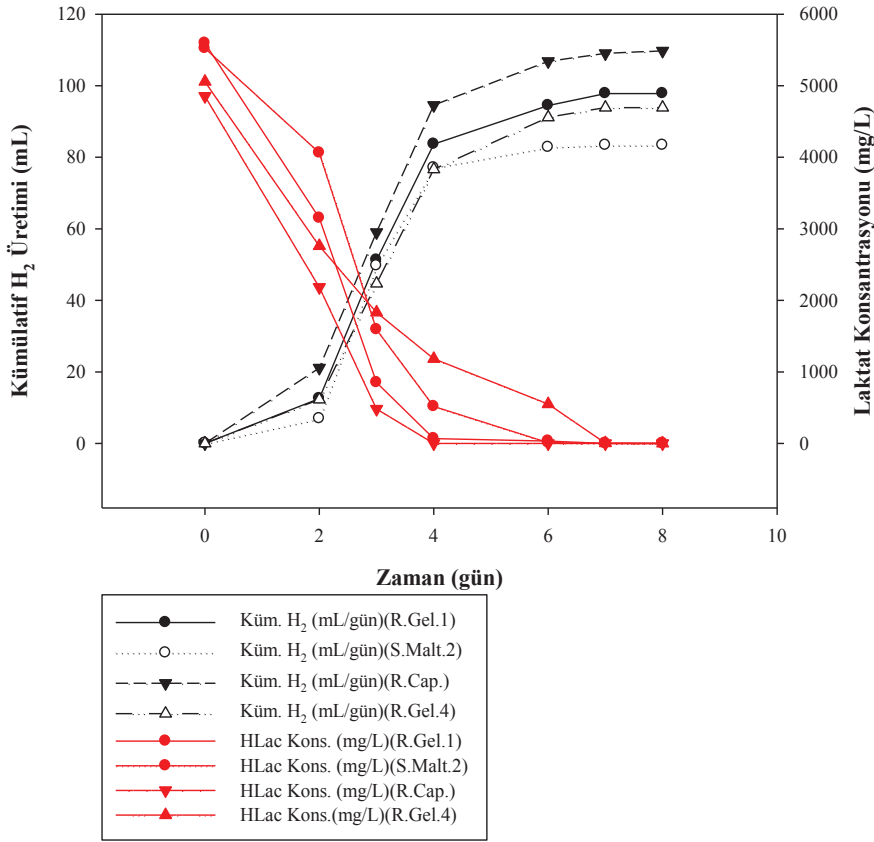
Şekil 4.94. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri; 6000 lüks; 28±2°C; pH 7)

İzolatların hidrojen üretiminde karbon kaynağı olarak laktatı kullanabilme kapasitelerini incelemek amacıyla yapılan kesikli reaktör denemelerinde ilk olarak ağızları sıkıca kapatılmış anaerobik tüplerde azot kaynağı olarak amonyum kullanılarak büyümeleri incelenmiştir. Tüm izolatlarda en iyi büyüme 2 g/L konsantrasyonda gözlenmiştir. Literatürle karşılaştırma yapabilmek amacıyla yine iyi büyümenin gözlemlendiği 5 g/L konsantrasyonda kesikli reaktörlerde hidrojen üretimi çalışmaları yapılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.94).



Şekil 4.95. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD@600 nm değerleri (6000 lüks; 28±2°C; pH 7)

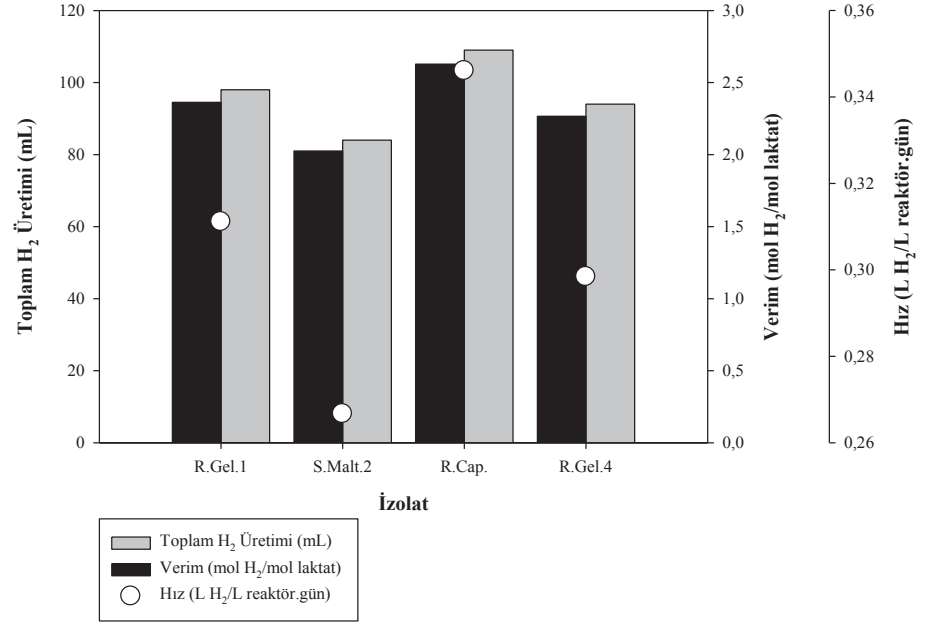
Laktatın çok düşük konsantrasyonlar da dahi iyi bir karbon kaynağı olduğu tüplerde yapılan büyüme denemelerinde de gözlenmiştir. 5 g/L laktat ve azot kaynağı olarak glutamat kullanılarak kesikli reaktörlerde izolatların hidrojen üretim potansiyelleri incelendiğinde lag fazına ihtiyaç duyulmaksızın iki günlük hızlı bir eksponansiyel faz gözlenmiştir. İkinci günün hemen ardından izolatlar durgun faza geçiş yapmışlardır. En hızlı büyüme *R.Gel. 4* ile gözlenirken onu sırasıyla; *R.Cap.*, *R.Gel.1* ve *S.Malt.2* takip etmiştir (Şekil 4.95).



Şekil 4.96. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneğinde kümülatif H₂ üretimi ve laktat tüketimi (6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

Şekil 4.96' da her dört izolat için de laktatın tüketimiyle ters orantılı olarak hidrojen üretimi gözlenmektedir. Laktat izolatların dördü tarafından tamamıyla tüketilmiştir. En yüksek kümülatif hidrojen üretimi 110 mL olarak *R.Cap* ile elde edilmiştir. En düşük üretim ise *S. Malt.2* tarafından 82 mL olarak gözlenmiştir. Laktat tüketimi dört gün içinde tamamlanmış ve reaktörlerde dördüncü günden itibaren durgun faz gözlenmeye başlamıştır. Laktat tüketiminin diğerlerinden

farklı olarak yedinci güne kadar uzamasıyla birlikte en yüksek hidrojen üretimi *R.Cap* tarafından gerçekleştirilmiştir.

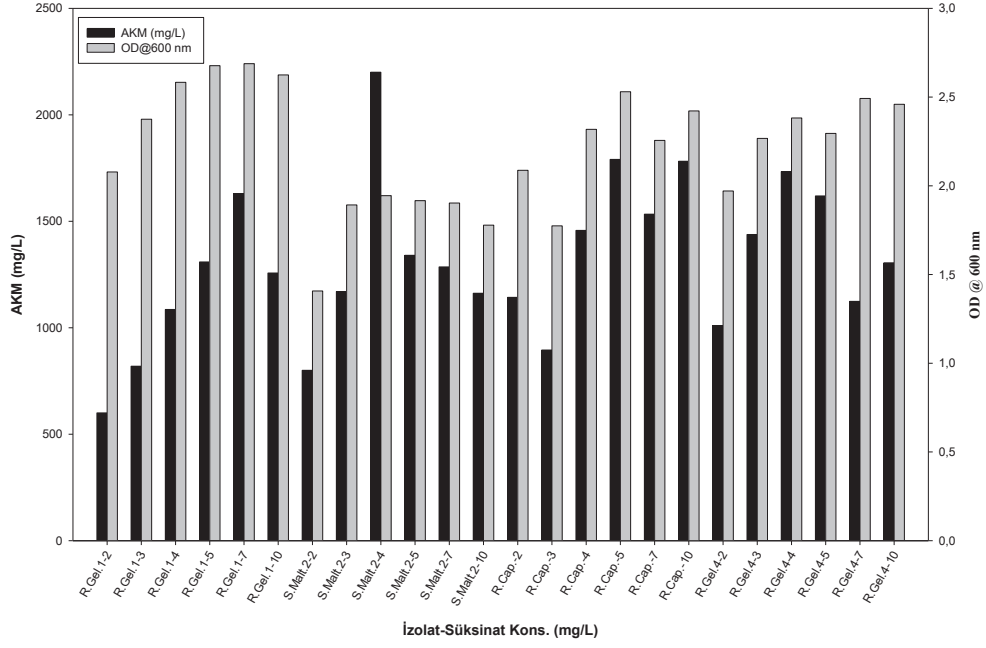


Şekil 4.97. İzolatlarla kurulan laktat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde Toplam H₂ Üretimi (mL), Verim (mol H₂/mol laktat ve H₂ üretim hızı (L H₂/L reaktör. gün değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

İzolatların karbon kaynağı olarak laktatı kullanarak kesikli reaktörlerde hidrojen üretim potansiyellerinin değerlendirmelerine bakılacak olursa toplam hidrojen üretimi ve verimler açısından en iyi sonuçların *R.Cap* tarafından elde edildiği görülmektedir. Diğer izolatlar için elde edilen sonuçlar verim değerleri *R.Cap* ile elde edilen verim değerine oldukça yakın olarak 2.1-2.5 mol H₂/mol laktat arasında değişmektedir. Hidrojen üretim hızları açısından ise 0.26-0.34 L H₂/L reaktör.gün arasında değişen değerlerden en yüksek olanı yine *R.Cap* ile en düşük olan değer ise *S.Malt.2* izolatıyla elde edilmiştir (Şekil 4.97).

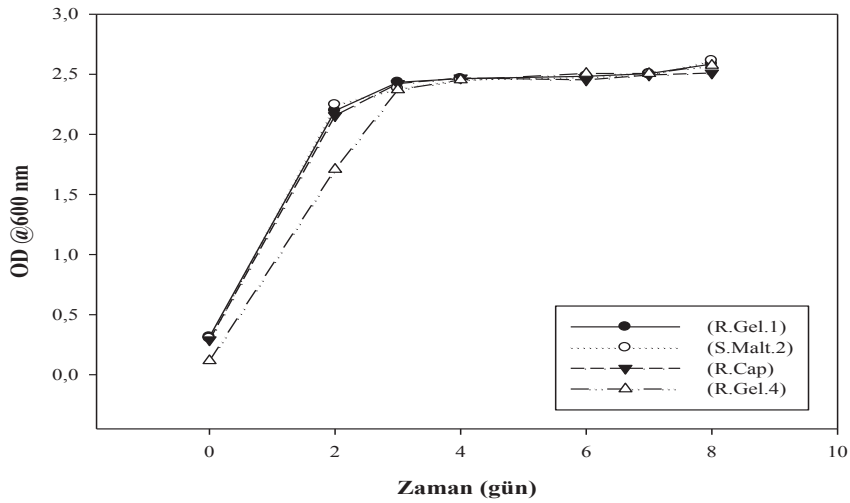
4.4.4. Karbon kaynağı olarak süksinat kullanılması

Süksinat foto-fermantatif bakteriler tarafından rahatlıkla kullanılan bir karbon kaynağıdır. İzolatların süksinat ortamında büyüme potansiyellerini incelemek amacıyla öncelikle ağzı sıkıca kapalı anaerobik tüplerde azot kaynağı olarak amonyum kullanılarak büyümeleri gözlenmiştir.



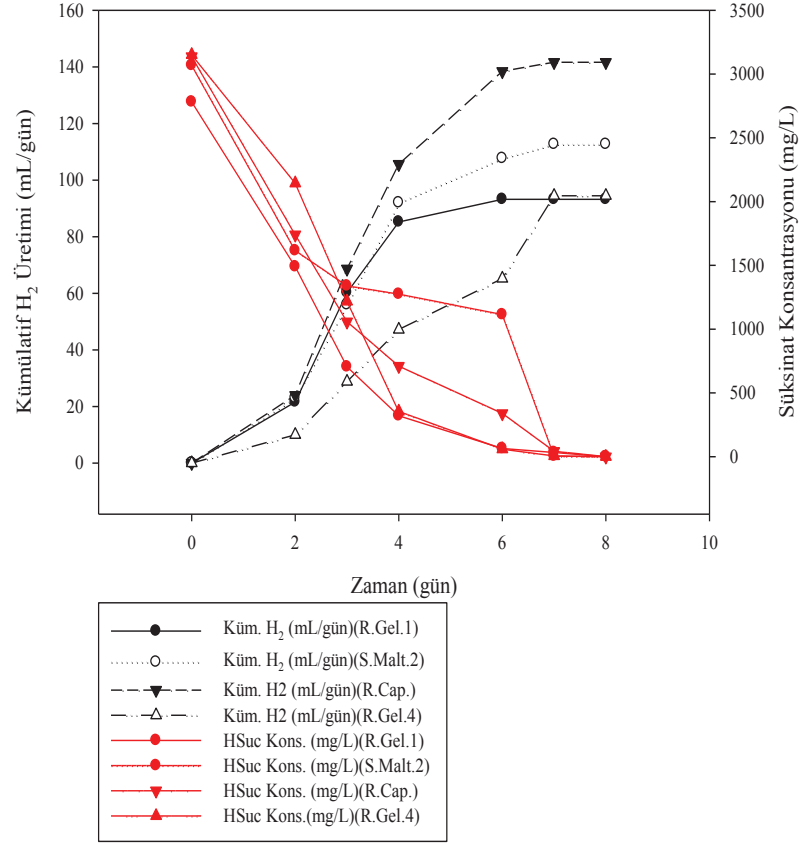
Şekil 4.98. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD_{@600 nm} değerleri; 6000 lüks; 28±2°C; pH 7)

Yapılan gözlemler sonucunda süksinatın kullanılan her konsantrasyonda yüksek olanlarda dahi iyi bir büyüme gösterdikleri görülmüştür. En iyi büyüme konsantrasyonları *R.Gel. 1* ve *R. Gel. 4* için 7 g/L, *S.Malt. 2* ve *R.Cap* için 4 g/L şeklinde gözlenmiştir. Karbon kaynağı olarak süksinatın kullanıldığı tüplerde yapılan denemelerde yüksek miktarlardaki süksinatın dahi büyümeye olumlu etkileri gözlenmiştir (Şekil 4.98).



Şekil 4.99. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonunun optimizasyonu denemesinde zamana karşı değişen OD_{@600 nm} değerleri (6000 lüks; 28±2°C; pH 7)

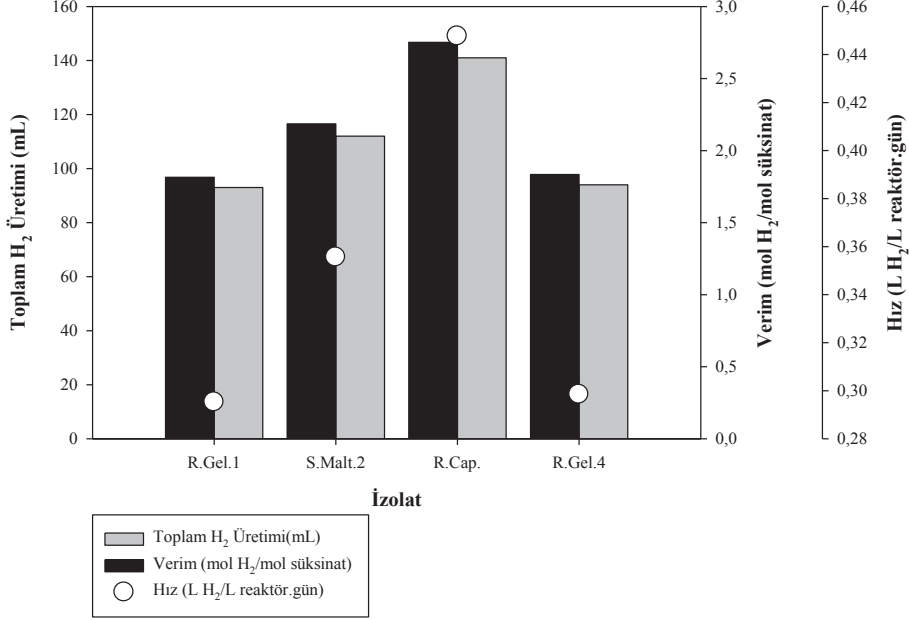
Literatürle ve diğer karbon kaynakları ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla seçilen 3 g/L süksinat konsantrasyonunda azot kaynağının glutamat olarak değiştirilmesi ile kesikli biyoreaktörlerde hidrojen üretim performansları incelenmiştir. Süksinatı kullanılması ile lag fazı gözlenmeden direk reaktörde ekspanansiyel faza geçildiği görülmektedir (Şekil 4.99). Dört izolat içinde üçüncü günde ekspanansiyel faz sona ermiş ve durgun faza geçilmiştir.



Şekil 4.100. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonu optimizasyonu deney düzeneğinde kümülatif H₂ üretimi ve süksinat tüketimi (6000 lüks; 28±2°C; pH 7)

Başlangıç konsantrasyonu olarak 3 g/L süksinat kullanılan fotofermantasyon denemelerinde izolatlarda azalan süksinat konsantrasyonu ile artan kümülatif H₂ üretimleri gözlenmiştir. En yüksek üretim değerleri *R.Cap.* ile yaklaşık 140 mL olarak elde edilmiştir. İkinci yüksek hidrojen üretimi 110 mL olarak *S.Malt.2* tarafından üretilmiştir. *R.Gel.4* tarafından üretim miktarı ve süksinat tüketimi diğer izolatlarla göre altıncı güne kadar daha düşük kalmış ancak sekizinci gün itibarıyla *R.Gel.1* ve *R.Gel.4* ile 85 mL H₂ üretim değeri elde

edilmiştir. Süksinat en yavaş biçimde *S. Malt.2* tarafından olmak üzere tüm izolatlar tarafından tamamen tüketilmiştir (Şekil 4.100).



Şekil 4.101. İzolatlarla kurulan süksinat konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde Toplam H₂ Üretimi (mL), Verim (mol H₂/mol süksinat ve H₂ üretim hızı (L H₂/L reaktör. Gün değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

Karbon kaynağı olarak süksinatın oldukça iyi olduğu hem büyüme değerlerinden hem de H₂ üretim performanslarından görülmektedir. Tüm izolatlar için toplam H₂ üretim değerleri ve verim değerleri teorik değerın yaklaşık %40-50' si arasındadır. H₂ üretim hızları ilse 0.28-0.44 L H₂/L reaktör olarak değişmektedir. En yüksek değerler *R.Cap.* ile elde edilmiştir. En düşük performanslar ise *R.Gel. 1* ve *R.Gel.4* izolatları ile elde edilmişlerdir (Şekil 4.101).

4.4.5. Kesikli reaktör denemelerinde karşılaştırmalı kinetik analizler

Kesikli reaktör denemelerinde kinetik analizler için modifiye Gompertz denklemi kullanılmıştır.

Çizelge 4.13. Kesikli reaktör denemelerinde kinetik analiz sonuçları

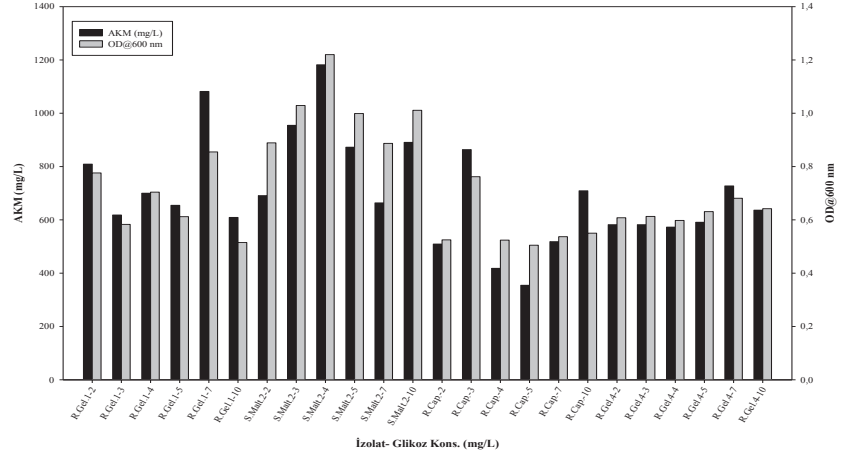
Substrat	İzolat	P (mL)	Rm (mL/saat)	Lag Zamanı (saat)	R ²
Asetat	<i>R.Gel.1</i>	160	1.96	49	0.9991
	<i>S.Malt.2</i>	162	1.78	49	0.9954
	<i>R. Cap.</i>	229	1.21	31	0.9909
	<i>R.Gel.4</i>	178	1.03	40	0.9865
Bütirat	<i>R.Gel.1</i>	83	1.20	66	0.9994
	<i>S.Malt.2</i>	72	1.23	76	0.9998
	<i>R. Cap.</i>	118	1.96	49	0.9999
	<i>R.Gel.4</i>	85	1.58	62	0.9999
Laktat	<i>R.Gel.1</i>	98	1.85	43	0.9995
	<i>S.Malt.2</i>	84	2.08	47	0.9998
	<i>R. Cap.</i>	110	1.86	38	0.9989
	<i>R.Gel.4</i>	94	1.60	43	0.9995
Süksinat	<i>R.Gel.1</i>	94	1.82	37	0.9996
	<i>S.Malt.2</i>	114	1.65	36	0.9987
	<i>R. Cap.</i>	144	1.95	37	0.9998
	<i>R.Gel.4</i>	119	0.70	35	0.9894

Modifiye Gompertz denklemi ile yapılan kinetik incelemeler sonucunda hesaplanan kinetik değerlerle deney sonucunda elde edilen değerlerin birbiri ile örtüştüğü ve yüksek R² değerleri ile gözlenmektedir. Yüksek R² değerleri kesikli reaktörlerde üretimin genel karakterine uygun olarak elildiğini göstermektedir. Substrat olarak asetat kullanıldığında H₂ üretim hızının en yüksek *R.Gel. 1* en düşük üretim hızının ise *R.Gel. 4* ile elde edildiği gözlenmektedir. Ancak maksimum H₂ üretim potansiyeli *R.Cap.* izolatu ile elde edilmiştir. *R.Cap* ile aynı

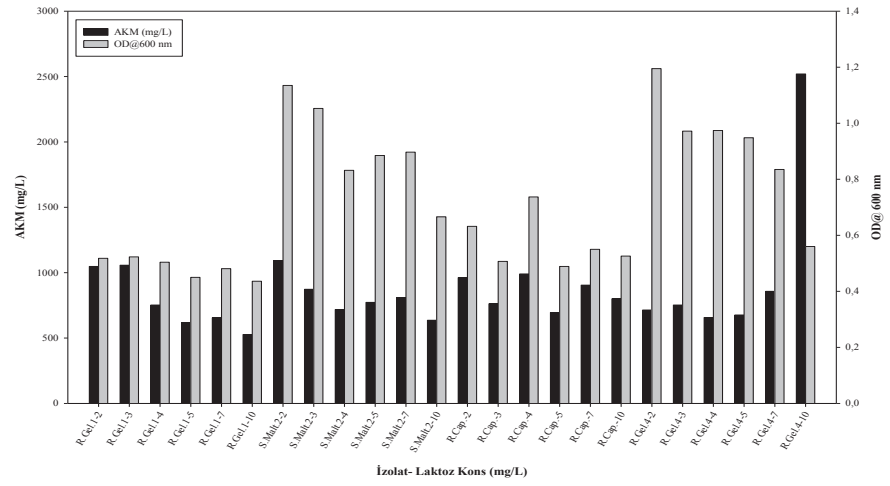
zamanda en kısa lag zamanı da gözlenmiştir. Substrat olarak bitürat kullanıldığında hidrojen üretim hızlarının substrat olarak asetatın kullanıldığı denemelerdeki değerlere yakın olduğu ancak hidrojen üretim potansiyellerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Hidrojen üretim hızı ve hidrojen üretim potansiyelleri bakımından en yüksek değerler *R.Cap.* ile sırasıyla 1.96 mL/saat ve 118 mL olarak gözlenmiştir. Bütiratın substrat olarak kullanılması ile *R.Gel. 1* , *S.Malt.2* ve *R.Gel.4* ile sırasıyla 66, 76 ve 62 saatlik lag zamanları hesaplanmıştır. Gerçek değerlerde lag zamanları 72 saat olarak gözlenmiştir. Substrat olarak laktatın kullanılmasıyla oldukça yüksek hidrojen üretim hızları ve potansiyelleri gözlenmiştir. En yüksek hidrojen üretimi hızı 2.08 mL/saat olarak *S.Malt.2* ile elde edilmesine karşın en yüksek hidrojen üretim potansiyeli 110 mL olarak *R.Cap.* ile elde edilmiştir. Substrat olarak süksinatın kullanıldığı kesikli denemelerde dört izolat için de en düşük lag zamanları gözlenmiştir. Diğer substratlarla 48-72 saat civarında olan lag zamanları süksinat ile ortalama 35 saat şeklinde gözlenmiştir. Hidrojen üretim potansiyelleri bakımından en yüksek değerler *S.Malt.2* ve *R.Cap.* ile 112 ve 141 mL olarak hesaplanmıştır. Gerçek uygulamalarda kümülatif hidrojen üretimleri bu izolatlar için sırasıyla 113 ve 144 mL şeklinde gözlenmiştir. Hidrojen üretim hızları açısından en düşük değer *R.Gel. 4* ile 0.7 mL/saat olarak diğer izolatlarla 1.65-1.95 mL/saat arasında elde edilmiş olmasına karşın hidrojen üretim potansiyellerinde bu büyük fark gözlenmemiştir. Hidrojen üretim potansiyelleri açısından *R.Gel.4* için 94 mL olarak elde edilen değer *R.Cap.* için 1.95 mL olarak gözlenmiştir. R^2 değerleri bütün izolatlar için 0.9900'da yüksek olarak elde edildiğinden yüm izolatlar daki kesikli üretimin genel kriterlere uyduğu söylenebilir (Çizelge 4.13).

4.4.6. Karbon kaynağı olarak glikoz, laktoz ve sükroz kullanılması

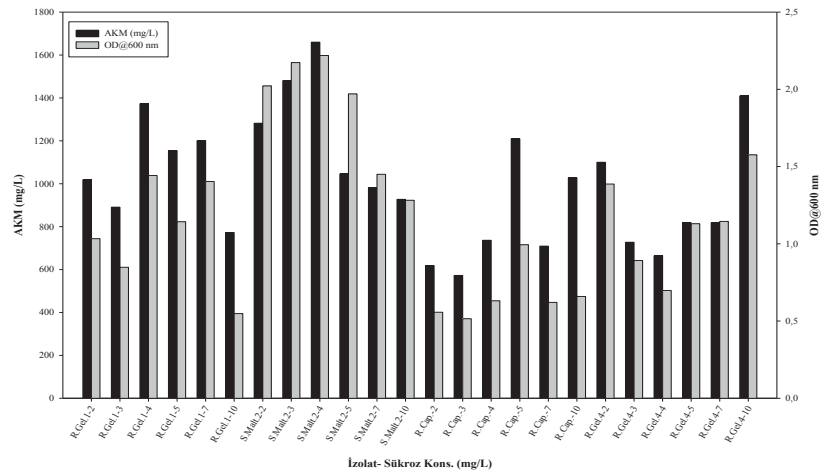
Foto-fermantatif bakterilerin organik asitleri oldukça verimli bir şekilde kullanarak hidrojen üretimini gerçekleştirebildikleri bilinmektedir. İzolatların da organik asitleri verimli bir şekilde kullanabildikleri görülmüştür. Bu aşamada izolatların daha kompleks yapıdaki karbonhidratları kullanabilme kapasitelerini incelemek amacıyla kesikli reaktörlerde incelemeler yapılmıştır.



Şekil 4.102. İzolatlarla kurulan glikoz konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)



Şekil 4.103. İzolatlarla kurulan laktoz konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

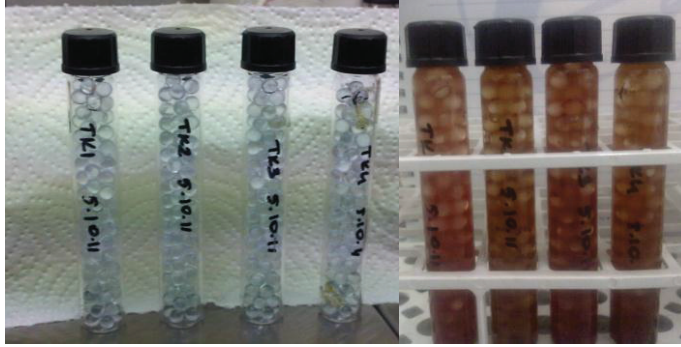


Şekil 4.104. İzolatlarla kurulan sükröz konsantrasyonunun optimizasyonu düzeneğinde AKM (mg/L) ve OD@600 nm değerleri; 6000 lüx; 28±2°C; pH 7)

Karbon kaynağı olarak karbonhidratların incelenmesi adına glikoz, laktoz ve sükroz kullanılarak öncelikle 2-10 g/L arasında değişen konsantrasyonlarda kapalı tüplerde üretimleri gözlenmiştir. Bu üretimlerde yapılan $OD_{600\text{ nm}}$ ve AKM analizlerinde glikoz ve laktozun ve sükrozun iyi birer kaynak olmadıkları anlaşılmıştır. İzolatların kompleks karbonhidratları kullanabilme potansiyelleri oldukça düşük olduğundan indirgenmesi planlanan kompleks karbonhidratların öncelikle karanlık fermantasyon operasyonu ile uçucu yağ asitlerine parçalanması daha uygundur (Şekil 4.102-4.104).

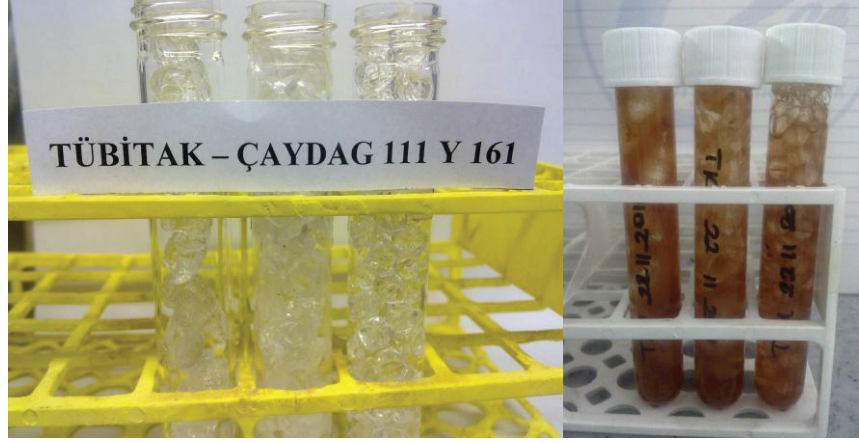
4.5. İzolatların Katı Yüzey Üzerine Tutunma Denemeleri

İzolatların askıda büyüme halindeyken kendi kendilerine floklar oluşturdukları gözlemlendiği için ortama aktarılan katı bir yüzey üzerine sarmalanacağı ihtimaliyle ilk önce her izolatın ortamına steril cam boncuk doldurulmuştur. Ancak hiçbir izolatın düz cam yüzey üzerine tutunmadıkları gözlenmiştir (Şekil 4.105).



Şekil 4.105. Cam boncuk yüzeyinde tutunma denemeleri

Daha sonra quartz taş parçaları, plastik porozlu yüzey ve köşeli cam yüzeyler üzerine sadece 1 numaralı izolatın tutundurulması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda ise yine bu izolatın hiçbir yüzeye tutunmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.106).



Şekil 4.106. Değişik malzemeler üzerine tutundurma denemeleri

4.6. Foto-Fermentasyonla Sürekli Reaktör Denemeleri

Foto-fermentasyonla sürekli reaktör denemeleri tutuklama ve tutundurma yöntemlerinin askında yöntemle karşılaştırmalı olarak incelenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Foto-fermentasyonla tutuklama yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi (LentiKat® reaktörleri)

İzolatların immobilize edilmesinin H_2 üretimine etkisini incelemek amacıyla daha önce yapılan kesikli çalışmalarda iyi performanslar göstermiş olan *S.Malt.2*, *R.Cap.* ve *R.Gel.4* ile çalışılmıştır.

Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış S.Malt.2 ile biyohidrojen üretimi

S.Malt.2 Bölüm 3.5.2’de detaylı bir şekilde anlatılan yöntem ile LentiKat® polimeri içerisine tutuklanmıştır. Hazırlanan LentiKat® diskleri yukarı akışlı reaktöre tam olarak doldurulmuş ve reaktörün alt kısmından besleme yapılarak ve üst çıkış noktasından çıkış suları alınarak HRT 72 saat-36 saat-18 saat ve 9 saat koşullarında biyohidrojen üretim performansları incelenmiştir. HRT 9 saat koşullarında toplam gaz üretimi durduğundan daha düşük HRT koşullarında denemeler gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 4.14. Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış *S.Malt.2* ile foto-fermantatif hidrojen üretimi

Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)
1	72	7	0,312	12			
2	72	8	0,278	13			
3	72	7	0,289	8	0,07	106	0,22
4	72	7	0,856	22			
7	72	7	0,912	17	0,27	347	0,26
8	72	8	1,014	21			
9	72	8,5	0,986	15	0,17	170	0,24
10	36	7	0,756	19	0,27	176	0,25
11	36	8	0,752	22	0,26	182	0,29
12	36	7,5	0,345	15	0,30	186	0,20
14	18	7,5	0,232	14	0,33	306	0,37
16	18	7	0,134	14	0,31	197	0,37
16	18	7	0,245	5	0,35	184	0,13
17	9	7	0,189	4	0,37	320	0,21
17	9	7	0,124	3	0,34	77	0,16
17	9	7	0,093	0	0,30	0	0

S.Malt.2'ın LentiKat® içerisinde tutuklandığı disklerle hazırlanan reaktörde 72 saat HRT koşullarında üçüncü günden itibaren yaklaşık 20 mL H₂ üretimi gözlenmeye başlamıştır. Substrat tüketiminin hücre büyümesine yönlendirmesinden dolayı ilk üç günde hidrojen üretimi daha düşük değerlerde kalmıştır. İmmobilize reaktörde düşük HRT koşullarında, reaktörün litresi başına yaklaşık 157 mL H₂ üretimi gerçekleşmiştir. LentiKat® içerisinde tutuklanmış halde bulunan bu izolatların düşük HRT koşullarında dahi H₂ üretim faaliyetlerine devam ettiği anlamına gelen bu sonuç immobilizasyonun H₂ üretimine olumlu etkisini göstermektedir. İlk üç günden sonra LentiKat® diskler içerisindeki kırmızı oluşumlar artış göstermeye başlamıştır. Bu artışla beraber hidrojen üretimlerinde de artış gözlenmeye başlamıştır. Askıda halde bulunan reaktör sıvısında yapılan OD_{600nm} analizlerinde görülen sabit değerlerden de izolatların tutuklandıkları bölgeden dışarıya kaçmadıklarını anlaşılmaktadır. HRT değerlerinin düşmesiyle birlikte H₂ gazı üretimleri azalmış ve çıkış sularındaki substrat konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. Kütle transfer hızının düşük olduğu bu koşullarda substrat gereken hızla mikroorganizmalarla buluşamamış dolayısıyla hidrojen üretim mekanizması aktif olamamıştır. LentiKat® disklerin içinden izolatlar kaçış göstermedikleri için olumlu etkisi olduğu düşünülen bu immobilizasyon yönteminde yaklaşık 3 günlük HRT koşullarında çalışılması reaktör performansı açısından en olumlu sonuçları vermektedir. Düşük kalan H₂

üretim verimleri izolattan H_2 üretiminde gerekli olan ortam koşullarının iyileştirilmesi gerektiğini göstermektedir (Çizelge 4.14).

Yukarı akışlı reaktörde *S.Malt.2* ile biyohidrojen üretimi

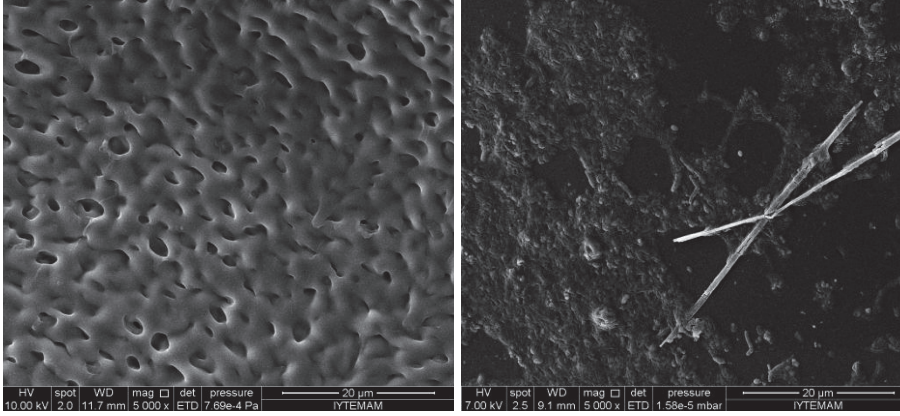
LentiKat® diskleri içine hapsedilmiş iki numaralı izolat ile sistem performansları arasında karşılaştırma yapabilmek amacıyla hiçbir dolgu malzemesi kullanmadan yukarı akışlı reaktör hazırlanmıştır. Reaktör besleme çıkış koşulları ve reaktörün ışık ve sıcaklık koşulları immobilize reaktör ile aynı tutulmuştur.

Çizelge 4.15. Yukarı akışlı reaktörde *S.Malt.2* ile foto-fermantatif hidrojen üretimi

Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H_2 (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mL H_2 /gKOİ)	H_2 Üretim Hızı (L H_2 /Lreaktör.gün)
1	72	7	1,268	6			
2	72	7	1,734	11			
3	72	7	1,423	4	0,10	74,44	0,14
4	72	8	1,475	35			
7	72	8	1,802	42	0,27	684,13	0,51
8	72	8	1,345	15			
9	72	7	1,144	12	0,17	127,18	0,18
10	36	8	1,566	2	0,27	18,52	0,03
11	36	8	0,76	3	0,26	24,76	0,04
12	36	8	0,794	2	0,30	24,73	0,03
14	18	8	0,198	0	0,33	0,00	0
16	18	8	0,334	0	0,31	0,00	0
16	18	7	0,422	0	0,35	0,00	0
17	9	7	0,412	0	0,37	0,00	0
17	9	8	0,392	0	0,34	0,00	0
17	9	7	0,234	0	0,30	0,00	0

S.Malt.2 kullanılarak 2 g/L asetat ve 3 g/L bütirat içeren zenginleştirme ortamında hidrojen üretimi denemelerinde immobilizasyonun etkisinin araştırılması amacıyla işletilen reaktörde serbest halde bulunan *S.Malt.2*'nin 3 günlük HRT koşullarında, büyüme koşulları OD_{@600nm} değerlerinden takip edilmiştir. Kinetik olarak incelendiğinde 3 günlük HRT koşullarında en hızlı büyümelerin gözlemlendiği bu izolatta HRT değerlerinin düşmesiyle birlikte OD_{@600nm} değerlerinde düşüş göze çarpmaktadır. Reaktörden bakterilerin yıkanarak uzaklaştığı anlamına gelen bu durum aynı HRT koşullarında immobilize reaktörde gözlenmemiştir. 3 günlük HRT koşullarında serbest halde bulunan izolat ile 500 mL H_2 / L reaktör değerlerine kadar yükselen bir üretim hızı gözlenmiştir. İmmobilize reaktörde daha düşük olarak gözlenen bu değerler

polimerik madde kütlesini yavaşlattığından dolayı gaz aktarım verimlerini düşürmüştür. Düşük HRT koşullarında bakteriler reaktörden yıkanarak uzaklaştıkları için substrat tüketimi oldukça azalmıştır bu nedenle hidrojen üretimi gözlenmemiştir. Verim değeri sekizinci günde yükselmiş olmasına rağmen teorik olarak beklenen değerlerin oldukça altında kalmıştır. Foto-fermantatif hidrojen üretiminde sıklıkla gözlenen bu durum ileri optimizasyon hatta metabolik yollarına genetik müdahale yöntemleri ile iyileştirilebilir (Çizelge 4.15).



Şekil 4.107. *S. Malt.2* tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç ve son görüntüleri

S. Malt.2'nin tutuklandığı LentiKat® disklerinin başlangıç ve son görüntüleri SEM tekniği ile elde edilmiştir. SEM görüntüleme tekniği ile disklerin dış bölgesinde bir bakteriyel büyüme olup olmadığı gözlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda disklerin etrafında bakteri oluşumları gözlenmemiştir. Disklerin bazı bölgelerinde yırtılmaların yani deformasyonların başladığı ancak bakterilerin hala disklerin içinde gömülü olarak bulundukları görülmektedir. Yırtılma olan bölgelerden çıkan bazı bakteriler Şekil 4.107'de görülmektedir.

Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış R.Cap. ile biyohidrojen üretimi

R.Cap. Bölüm 3.5.2'de ayrıntılı biçimde anlatıldığı şekilde eksponansiyel fazında iken LentiKat® diskler içersine tutuklanmış ve LentiKat® diskleri oluşturulmuştur.



Şekil 4.108. *R. Cap.* tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç ve son görüntüleri

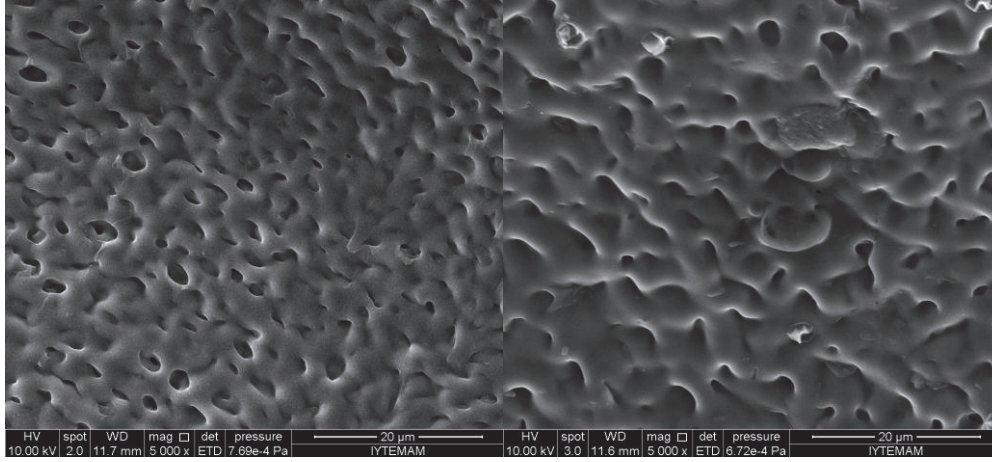
Yukarı akışlı reaktörde HRT 72-36-18 ve 9 saat koşullarında çalışılmıştır. Zenginleştirme ortamında 2 g/L asetat ve 3 g/L bütirat substrat olarak kullanılarak organik yükleme hızının hidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. 9 saatlik HRT koşulundan itibaren besleme akış hızındaki artış nedeniyle kütle aktarımı için gereken zaman kısalmıştır bu nedenle hidrojen üretimi gözlenememiştir. Ama son günlerde dahi reaktör içerisinde mikroorganizmaların yoğun bir biçimde kaldıkları gözlenmiştir (Şekil 4.108).

Çizelge 4.16. Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış *R. Cap.* ile foto-fermantatif hidrojen üretimi

Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)
1	72	7	0,281	22			
2	72	7	0,293	12			
3	72	8	1,292	10	0,04	130,79	0,29
4	72	8,5	1,195	36			
7	72	8	1,443	16	0,08	172,55	0,35
8	72	7	0,802	0			
9	72	7	0,528	4	0,25	31,16	0,03
10	36	8	0,589	0	0,16	0,00	0,00
11	36	8	0,495	0	0,21	0,00	0,00
12	36	8	0,676	5	0,28	49,48	0,07
14	18	8	1,409	7	0,34	165,14	0,19
16	18	8	0,501	0	0,32	0	0
16	18	7	0,273	0	0,31	0	0
17	9	8	0,398	0	0,29	0	0
17	9	8	0,14	0	0,34	0	0
17	9	7	0,348	0	0,32	0	0

17 gün süren hidrojen üretimi boyunca HRT etkisinin incelendiği çalışmada en yüksek toplam hidrojen üretim değerlerinin 72 saatlik HRT koşullarında elde

edildiği görülmektedir. 36 saat ve 18 saat HRT koşullarında hemen hemen hiç hidrojen üretimi gözlenmemiştir. Bu noktalarda verim ve H_2 üretim hızı değerleri de oldukça düşük seviyelerde kalmıştır. *R.Cap.* ile tutuklama işlemi başarılı bir şekilde sonuçlanmış olmasına rağmen asetat ve bütirattan hidrojene dönüşüm verimleri teorik değerlere kıyasla oldukça düşük olarak gözlenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında da *R. Cap.* için en yüksek verimlerin laktat ile elde edilmesi sonucu en uygun substrat olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle karanlık fermantasyon sonucu laktatın açığa çıktığı bir sistemde foto-fermantasyon basamağında *R.Cap.* izolatının kullanılması oldukça faydalı olacaktır. Ancak bu çalışma kapsamında karanlık fermantasyon sonucunda en çok gözlenen organik asitler asetat ve bütirat olduklarından bu iki organik asitten hidrojen üretimleri incelenmiştir (Çizelge 4.16).



Şekil 4.109. *R.Cap.* tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç (sol kare) ve son (sağ kare) görüntüleri

R.Cap.'ın tutuklandığı LentiKat® disklerinin başlangıç ve son görünümüne bakıldığında yüzeyde yerel parçalanmalar olduğu ve bakterilerin yüzeyin altında oldukları göze çarpmaktadır. Artan HRT koşullarının LentiKat® disklerini parçalama ve bakterilerin jel içerisinden çıkmasına neden olma riskleri vardır. Bu nedenle daha düşük HRT koşulları stabil üretimler için daha faydalı bir tercih olacaktır (Şekil 4.109).

Yukarı akışlı reaktörde R.Cap. ile biyohidrojen üretimi

LentiKat® diskleri içine hapsedilmiş *R.Cap.* ile karşılaştırmalı olarak immobilizasyon etkisinin incelenmesi amacıyla aynı koşullarda bir de yukarı akışlı askıda reaktör işletilmiştir.

Çizelge 4.17. Yukarı akışlı reaktörde *R.Cap.* ile foto-fermantatif hidrojen üretimi

Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)
1	72	7	1,298	50			
2	72	7	1,628	0			
3	72	8	1,406	12	0,08	207,25	0,41
4	72	8	1,232	16			
7	72	8	1,434	36	0,08	174,63	0,35
8	72	7	0,52	0			
9	72	7	0,541	4	0,31	57,65	0,03
10	36	8	0,363	0	0,27	0,00	0,00
11	36	7	0,443	0	0,28	0,00	0,00
12	36	7	0,79	2	0,29	22,94	0,03
14	18	8	0,387	0	0,33	0	0
16	18	8	0,345	0	0,36	0	0
16	18	7	0,317	0	0,35	0	0
17	9	7	0,302	0	0,38	0	0
17	9	8	0,175	0	0,30	0	0
17	9	7	0,987	0	0,26	0	0

Substrat olarak asetat ve bütiratın *R. Cap.* tarafından hidrojen üretim için kullanılma performansının incelendiği çalışma sonuçları Çizelge 4.17’de yer almaktadır. Bu sonuçlara bakılarak reaktörde 72 saat HRT’ten daha düşük HRT koşullarında çalışmanın askıda reaktörde çok iyi sonuçlar vermediği OD_{600 nm} değerlerinden de anlaşılabileceği gibi bakterilerin reaktörden yıkanarak uzaklaştıkları dolayısıyla hidrojen üretiminde ve substrat tüketimlerinde düşüşler olduğu görülmektedir. 72 saat HRT koşullarında en yüksek H₂ üretim hızı 413 mL H₂/L reaktör.gün şeklinde elde edilmiştir. Düşen HRT değerleriyle birlikte hidrojen üretimi de düşüş göstermiştir (Çizelge 4.17).

Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış R.Gel.4 ile biyohidrojen üretimi

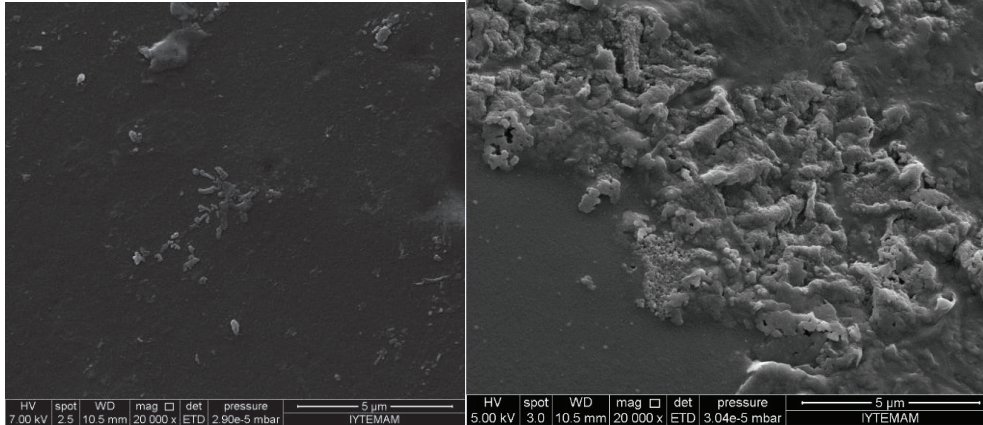
R.Gel.4 Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde polimerik LentiKat® diskleri içersine hapsedilmişlerdir. Hazırlanan LentiKat® diskleri yukarı akışlı reaktöre doldurulmuştur. Diğer iki izolat için olduğu gibi substrat olarak karanlık fermentasyon çalışmalarında en yüksek oranda çıkış suyunda bulunan asetat ve bütirat substrat olarak kullanılarak hidrojen üretim performansları incelenmiştir.

Reaktörün LentiKat® diskleri ile doldurulmasının ardından önceki çalışmalarda olduğu gibi 72-36-18-9 saat HRT koşullarında beslemeler yapılmış ve organik yükleme hızlarının hidrojen üretim performanslarına etkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.18. Yukarı akışlı reaktörde tutuklanmış *R.Gel.4* ile foto-fermantatif hidrojen üretimi

Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)
1	72	7	0,281	14			
2	72	7	0,293	10			
3	72	7	0,283	8	0,05	98,23	0,21
4	72	8	0,739	32			
7	72	9	0,784	27	0,27	522,37	0,39
8	72	7	0,128	22			
9	72	7	0,268	17	0,14	164,46	0,26
10	36	8	0,336	19	0,18	93,24	0,25
11	36	8	0,318	22	0,26	181,08	0,29
12	36	7	0,364	13	0,17	62,81	0,17
14	18	8	0,357	14	0,32	218,34	0,37
16	18	7	0,292	12	0,27	111,81	0,32
16	18	7	0,251	8	0,23	53,11	0,21
17	9	8	0,331	2	0,36	101,40	0,11
17	9	7	0,163	2	0,36	83,62	0,11
17	9	7	0,167	2	0,37	285,92	0,11

R.Gel.4'ün tutuklandığı LentiKat® diskleri ile doldurulmuş reaktörde yapılan çalışmada 72 saat HRT koşullarında ilk günlerde düşük gaz üretimleri ve yükselen OD_{600nm} değerleri gözlenmektedir. Asetat ve bütirat tüketiminin de yoğun olduğu bu dönemde substratların büyüme için kullanıldığı görülmektedir. Yeterli derecede büyümenin tamamlanmasının ardından hidrojen üretimi başlamıştır. En yüksek H₂ üretimleri 72 saat HRT koşullarında gözlenmiştir ancak 36-18 ve 9 saat HRT koşullarında da daha düşük değerlerde olmasına rağmen daha stabil H₂ üretim değerleri gözlenmiştir. H₂ üretim hızları 393 mL H₂/L reaktör.gün değerlerinden 100 mL H₂/L reaktör.gün değerlerine doğru düşüş göstermiştir. Artan akış hızı nedeniyle kütle aktarım performansındaki düşüşten kaynaklanan bu durum 72 saat HRT koşullarında daha uzun süreli üretimler yapılabileceğinin göstergesidir. Verim değerleri beklenen teorik değerlerin altında kalmıştır ancak geliştirilebilecek düzeyde oldukları görülmektedir (Çizelge 4.18).



Şekil 4. 110. *R.Gel.4* tutuklanmış LentiKat® diski başlangıç (sol kare) ve son (sağ kare) görüntüleri

LentiKat® disklerinin başlangıç ve son görünüşleri Şekil 4.110'da yer almaktadır. İlk görünümde yüzeyde bazı bakterilerin kaldığı görülmektedir. Bu yüzeyde kalan bakterilerin yıkanıp uzaklaştırılması amacıyla ortamla hızlı bir besleme işlemi uygulanmıştır. Son SEM görüntülerine bakılacak olursa fotoğrafın alındığı bölgede bir parçalanma olduğu ve bakterilerin yüzeye doğru geldikleri görülmektedir. Ancak diğer bakteriler yüzeyin altında yığılı halde bulunduğu gözlenmektedir (Şekil 4.110).

Yukarı akışlı reaktörde R.Gel.4 ile biyohidrojen üretimi

R.Gel.4 ile immobilizasyon etkisinin araştırılması amacı bir LentiKat® disk reaktörlerinin yanı sıra aynı koşullarda yukarı akışlı askıda reaktör kurulmuştur. Aynı substrat ile aynı HRT koşullarında yapılan çalışma ile immobilizasyonun sisteme ve hidrojen üretimine olumlu bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

Diğer reaktörlerde olduğu gibi 72-36-18 ve 9 saat HRT koşullarında reaktörler işletilerek asetat bütirat içerikli zenginleştirme ortamından hidrojen üretimleri incelenmiştir.

Çizelge 4.19.Yukarı akışlı reaktörde *R.Gel.4* ile foto-fermantatif hidrojen üretimi

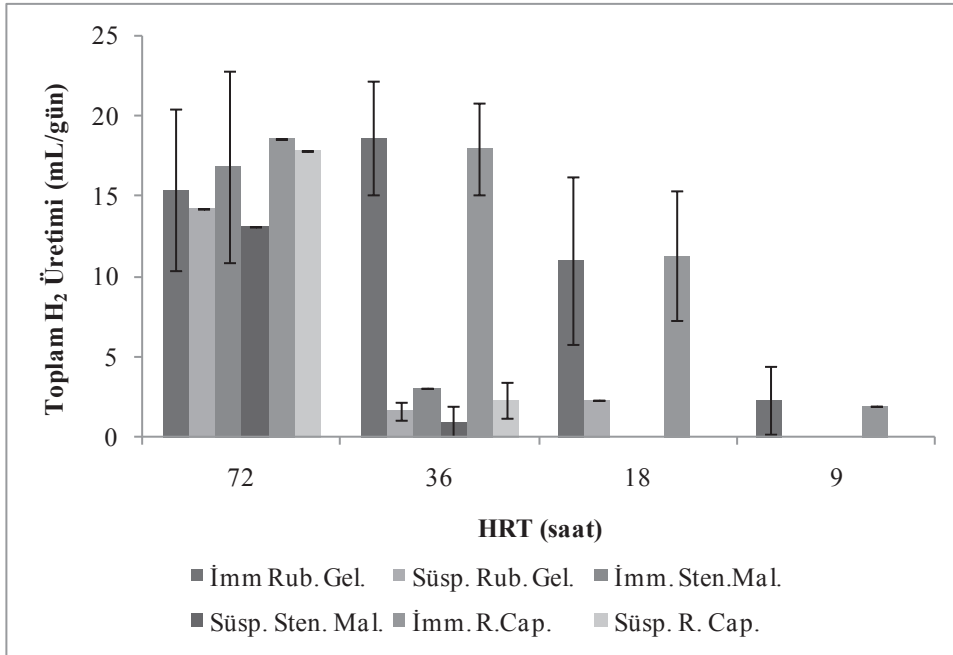
Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)
1	72	7,3	1,298	5			
2	72	7	1,628	10			
3	72	7,5	1,385	3	0,11	67,68	0,12
4	72	8	1,357	25			
7	72	8	1,705	29	0,29	632,99	0,36
8	72	8	1,275	11			
9	72	7,5	0,381	9	0,18	98,42	0,13
10	36	8	2,11	4	0,25	30,96	0,05
11	36	8	0,61	3	0,26	24,26	0,04
12	36	8	0,867	2	0,28	20,36	0,03
14	18	8	0,292	0	0,33	0,00	0,00
16	18	8,5	0,567	0	0,22	0,00	0,00
16	18	7	0,444	0	0,35	0,00	0,00
17	9	7	0,421	0	0,38	0,00	0,00
17	9	8	0,4	0	0,24	0,00	0,00
17	9	7,5	0,323	0	0,37	0,00	0,00

R.Gel.4 ile yukarı akışlı reaktörde hidrojen üretim performansına bakılacak olursa HRT 72 saat koşullarında toplam H₂ üretim değerlerinin ilk üç günden sonra yükseldiği ancak daha düşük HRT koşullarına geçildiğinde OD_{600nm} değerlerinden de anlaşılabileceği gibi aktif izolatların reaktörden yıkanarak

uzaklaştığı, bundan dolayı substrat tüketimi, dolayısıyla hidrojen üretiminin durduğu gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında hidrojen üretim verimleri ve hızları teorik değerlerden oldukça düşük olmasına rağmen immobilizasyonun olumlu etkisi gözlenmiştir. Bu durum bu sistemlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir (Çizelge 4.19).

4.6.2. Foto-fermantasyonla tutuklama yöntemi ile sürekli hidrojen üretiminde sistem performanslarının karşılaştırmaları

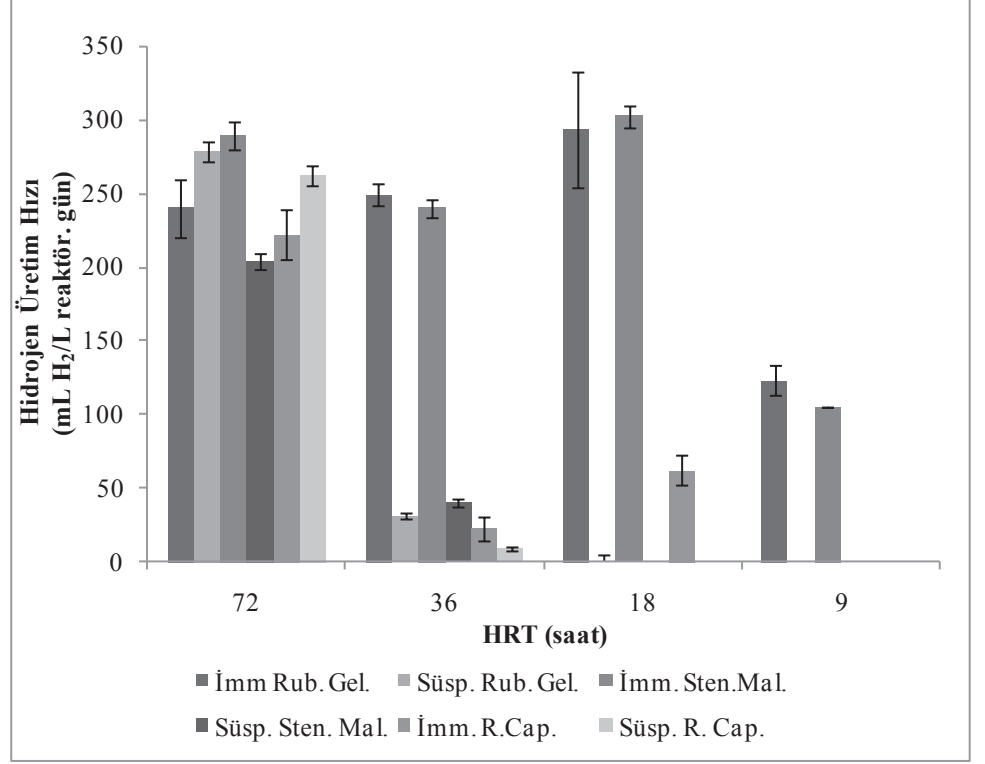
Yöntemi ile immobilize edilen izolatların sürekli reaktörlerde foto-fermentatif hidrojen üretiminin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların bir arada incelenmesi amacıyla karşılaştırmalı grafikler hazırlanmıştır.



Şekil 4.111. Foto-fermantasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde toplam hidrojen üretim değerlerinin karşılaştırması

Tutuklanmış izolatların kullanıldığı immobilize reaktörlerde foto-fermentatif hidrojen üretiminde elde edilen sonuçlara bakıldığında toplam hidrojen üretimi bakımından 72 saatlik alıkonma zamanında askıda ve immobilize sistemlerin performansları birbirine benzerken, HRT=36 saatten itibaren sürekli reaktörlerde biyokütlenin yıkanarak sistemden uzaklaşması ile birlikte toplam

hidrojen üretim miktarlarında düşüşler olmuş HRT=18 saatten itibaren askıda reaktörlerde hidrojen üretimi sona ermiştir (Şekil 4.111).



Şekil 4.112. Foto-fermantasyonla sürekli hidrojen üretiminde immobilize ve askıda reaktörlerde hacimsel hidrojen üretim değerlerinin karşılaştırması

Foto-fermantasyonla sürekli hidrojen üretiminde volumetrik hidrojen üretimi açısından askıda ve immobilize reaktörler karşılaştırıldığında immobilizasyonun olumlu etkisi HRT=36 saatten itibaren görülmektedir. HRT=18 ve 9 saatlik alıkonma zamanlarında askıda reaktörlerde sistemdeki biyokütle yıkanarak uzaklaşmış ve buna bağlı olarak hidrojen üretimi sonlanmıştır. Düşük alıkonma zamanlarında immobilize reaktörlerdeki devam eden yüksek mikroorganizma yoğunluğu ile hidrojen üretimleri devam etmiştir (Şekil 4.112).

4.6.3. Foto-fermantasyonda tutundurma yöntemi ile sürekli hidrojen üretimi

Katı yüzey üzerine tutunma çalışmaları geçmişten günümüze dek pek çok hücre ve bakteri immobilizasyonu çalışmalarında uygulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatlar için daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi çeşitli yüzeylere

sahip cam malzeme üzerine tutunma denemeleri yapılmış ancak başarılı olmamıştır. Ardından nano yüzeyli manyetik parçacıklar üzerine tutundurma işleminin hidrojen üretimine katkıları askıda reaktörlerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

S.Malt.2 ile gerçekleştirilen yüzey tutundurma denemeleri

S.Malt.2 ile de LentiKat® reaktörlerinde olduğu gibi 72-36-18-ve 9 saat HRT koşullarında sürekli beslemeli denemeler yapılmıştır. Asetat ve bütiratın hidrojene dönüşüm verimleri incelenmiştir (Şekil 4.113).

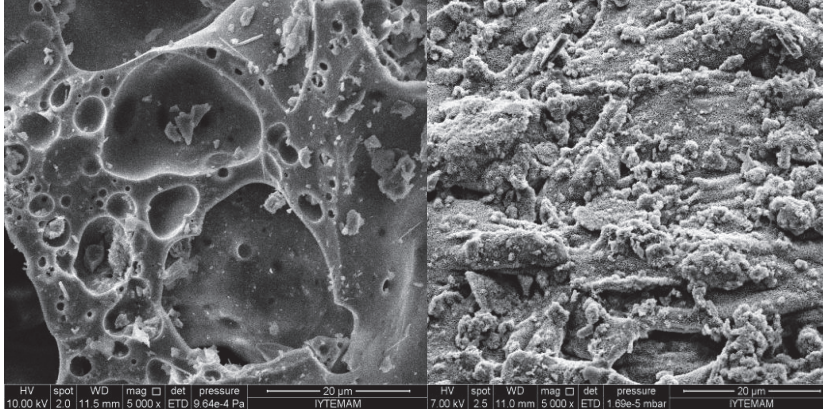


Şekil 4. 113. *S.Malt.2* ile foto-fermantatif hidrojen üretiminde manyetik parçacıklar içeren reaktörler

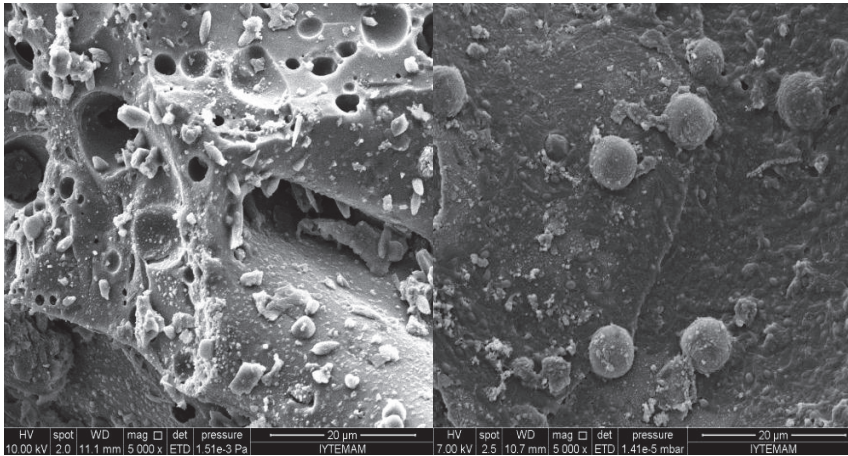
Çizelge 4. 20. Tutundurma yöntemi ile immobilize edilen izolatlarda foto-fermantatif hidrojen üretimi (*S.Malt 2*)

MANYETİK PARÇACIKSIZ REAKTÖR										VIII1308 KODLU MANYETİK PARÇACIK ÇİREN REAKTÖR						VIII1616 KODLU MANYETİK PARÇACIK ÇİREN REAKTÖR					
Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkarış KOİ (g/L)	Verim (mL H ₂ /g KOİ)	H ₂ Üretim Hızı (L H ₂ /L reaktör.gün)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkarış KOİ (g/L)	Verim (mL H ₂ /g KOİ)	H ₂ Üretim Hızı (L H ₂ /L reaktör.gün)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkarış KOİ (g/L)	Verim (mL H ₂ /g KOİ)	H ₂ Üretim Hızı (L H ₂ /L reaktör.gün)		
1	72	7	2,134	24				7	1,291	26				7	1,678	45					
2	72	7,5	2,018	16				7	1,312	24				7	1,564	6					
3	72	6,5	1,966	14	0,37	138,76	0,18	7	1,428	25	0,56	373,76	0,25	7,5	1,278	25	0,14	121,96	0,25		
4	72	7	1,987	34				8	1,987	21				7	1,345	35					
7	72	7,5	2,205	39	0,25	142,33	0,24	7,5	1,893	18	0,53	170,02	0,13	7	1,689	12	0,18	80,55	0,16		
8	72	8	2,129	21				7,5	1,869	16				7,5	2,123	56					
9	72	7	2,453	26	0,32	107,89	0,16	7	1,627	14	0,30	65,86	0,10	7	2,189	36	0,19	160,88	0,31		
10	36	7	1,998	10	0,32	22,87	0,07	7	1,453	13	0,45	41,89	0,09	8	1,956	28	0,47	97,60	0,19		
11	36	7	1,456	11	0,32	25,16	0,07	7	1,467	15	0,33	34,60	0,10	8	1,568	16	0,56	79,01	0,11		
12	36	7	1,342	12	0,33	27,70	0,08	7	1,643	13	0,51	52,96	0,09	7	1,487	12	0,52	49,85	0,08		
14	18	7	1,342	18	0,29	38,16	0,24	)	1,453	12	0,68	144,08	0,16	7	0,995	4	0,69	57,83	0,05		
16	18	7,5	1,267	6	0,34	14,20	0,08	7	1,432	5	0,64	41,15	0,07	7	1,211	5	0,65	47,52	0,07		
16	18	7,5	1,347	0	0,66	0	0	7	1,389	0	0,64	0	0	7	1,245	0	0,73	0	0		
17	9	7	1,532	0	0,68	0	0	7	1,389	0	0,64	0	0	7	1,456	0	0,50	0	0		
17	9	7	0,655	0	0,63	0	0	7	1,123	0	0,67	0	0	7	0,894	0	0,55	0	0		
17	9	7	0,234	0	0,73	0	0	7	1,093	0	0,64	0	0	7	0,234	0	0	0	0		

S.Malt.2' nin katı yüzey üzerine tutunmasını incelemek amacıyla karşılaştırmalı olarak kurulan reaktörlerde genel tabloya bakılacak olursa reaktörler içerisine eklenen manyetik parçacıkların çok olumlu etkileri olmadığı gözlenmiştir ancak $OD_{@600nm}$ değerlerine bakıldığında boş yani içinde manyetik parçacık bulunmayan reaktörde reaktör çıkışında $OD_{@600nm}$ değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu durum düşük HRT koşullarında manyetik parçacıklar üzerinde tutunmuş bakteriler olduğu anlamına gelmektedir. H_2 üretim hızları açısından performans farkı gözlenmemiştir. Her üç reaktörde de 72 saatte en iyi üretim hızları gözlenmiştir. LentiKat® reaktörlerinde de gözlenen bu durum izolatların exponansiyel fazlarının da bu zamanda eşdeğer olmasıyla ilişkilidir. HRT 72 saat koşullarında en iyi H_2 üretim hızları her üç reaktörde 130mL-250 mL H_2 /L reaktör.gün şeklinde elde edilmiştir (Çizelge 4.20).



Şekil 4.114. V111308'in foto-fermantasyon öncesi (sol kare) ve sonrası (sağ kare) SEM görüntüleri (*S.Malt.2*)



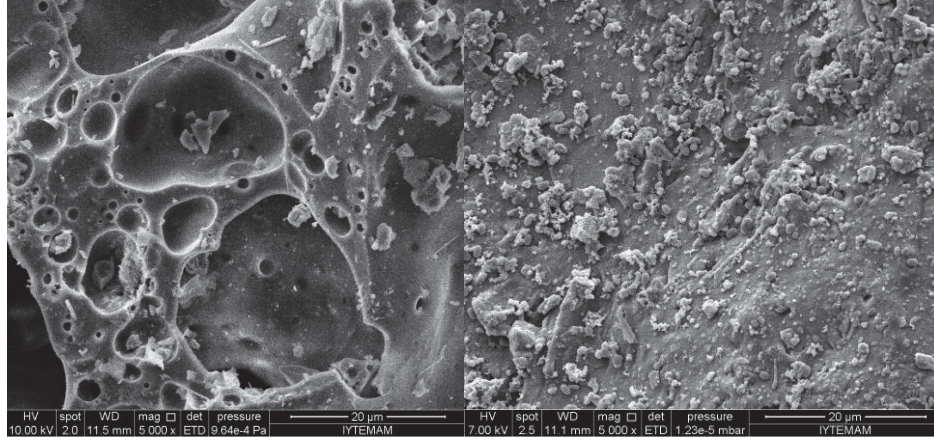
Şekil 4.115. V111616'nın foto-fermantasyon öncesi (sol kare) ve sonrası (sağ kare) SEM görüntüleri (*S.Malt.2*)

Manyetik parçacıkların SEM görüntülerine bakılacak olursa öncelikle hem V111308 hem de V111616 kodlu boş manyetik parçacıklar üzerindeki gözenekli yapıların çok dikkat çektikleri söylenebilir. V111308 kodlu yapı üzerinde beklendiği gibi rod yapılar gözlenmektedir ancak V111616 kodlu manyetik yapılarda beklenmeyen küresel görünümeler vardır reaktör içinde bazı beklenmedik türlerinde olabileceği anlamına gelen bu durum düşük gaz üretimlerinin sebebi olabilir (Şekil 4.114-4.115).

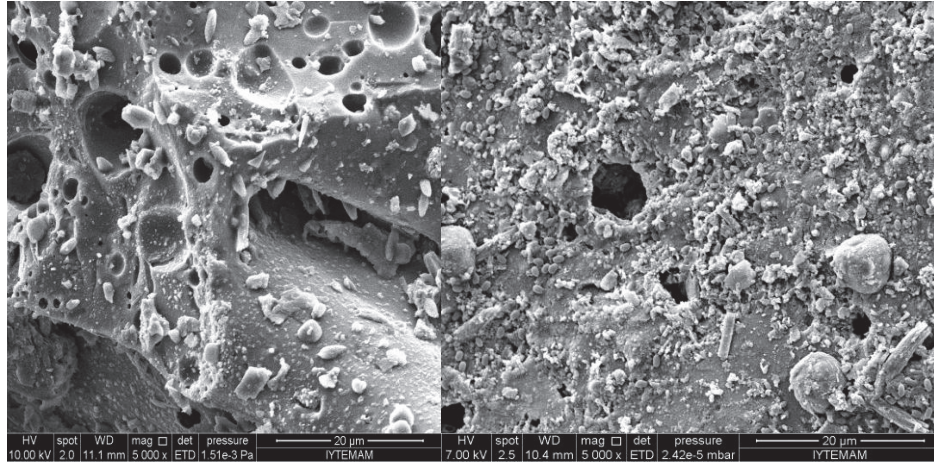
R.Cap ile gerçekleştirilen yüzey tutundurma denemeleri

3 numaralı izolatla gerçekleştirilen yüzey tutundurma denemelerinde 2 numaralı da olduğu gibi tutunma denemesi yapılacak reaktörlere, 5' er gram V111308 ve V111616 kodlu manyetik parçacıklardan eklenmiştir ve sistemde yavaş bir karıştırma uygulanmıştır. Bu denemeler 250 mL'lik reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağı olarak 2 g/L asetat ve 3 g/L bütirat içeren zenginleştirme ortamı ile beslemeler yapılmıştır.

72-36-18-9 saat HRT koşullarında reaktörlerde beslemeler gerçekleştirilmiştir. Toplam gazlar sıvı yer değiştirme yöntemi ile toplanmış gaz içerikleri gaz kromatografisi cihazı ile tespit edilmiştir. Oldukça düşük verim ve H_2 üretim değerleri elde edilen bu denemeler asetat ve bütiratın 3 numaralı izolat için uygun karbon kaynakları olmadıklarını göstermektedir. %99 ihtimalle *Rhodobacter capsulatus* suşu olan bu izolat için laktat daha iyi bir karbon kaynağıdır. Dolayısıyla iki aşamalı çalışmalarda ikinci aşamada kullanılmak için çok uygun bir izolat değildir (Çizelge 4.21).



Şekil 4.116. V111308'in foto-fermantasyon öncesi (sol kare) ve sonrası (sağ kare) SEM görüntüleri (*R.Cap*)



Şekil 4.117. V111616'nın foto-fermantasyon öncesi (sol kare) ve sonrası (sağ kare) SEM görüntüleri (*R.Cap*)

SEM görüntülerine bakılacak olursa rod yapılı oluşumların yüzeye tutundukları görülmektedir. Boş reaktörle yapılan karşılaştırmalı inceleme sonucunda da $OD_{@600nm}$ değerlerine bakıldığında bakterilerin bir kısmının manyetik parçacıklar üzerine tutunduğu görülmektedir. Bu durumda *R.Cap.* için en uygun koşulların 72 saat HRT olduğu ve asetat ve bütiratın uygun substratlar olmadığı anlaşılmaktadır. Bu izolat için laktat veya süksinat daha uygun bir karbon kaynağı olabilir (Şekil 4.116-4.117).

R.Gel.4 ile gerçekleştirilen yüzey tutundurma denemeleri

Yüzey tutundurma denemelerinde son olarak *R.Gel.4*; *S.Malt.2* ve *R.Cap.*'un besleme koşullarında 100 mL'lik reaktörlerde kullanılmıştır. *R.Gel.4*'ün büyütüldüğü ortama V111308 ve V111616 kodlu manyetik

malzemeler 5'er gram olacak şekilde eklenmiş ve hafif şiddetli karıştırma işlemi ile bakterilerin yüzeylere tutunmaları gözlenmiştir. Bakterilerin yüzeye tutunduklarının en önemli göstergesi hiçbir taşıyıcı madde içermeyen ama *R.Gel.4* ve aynı ortamı içeren boş reaktörde gözlenmiştir (Şekil 4.118).

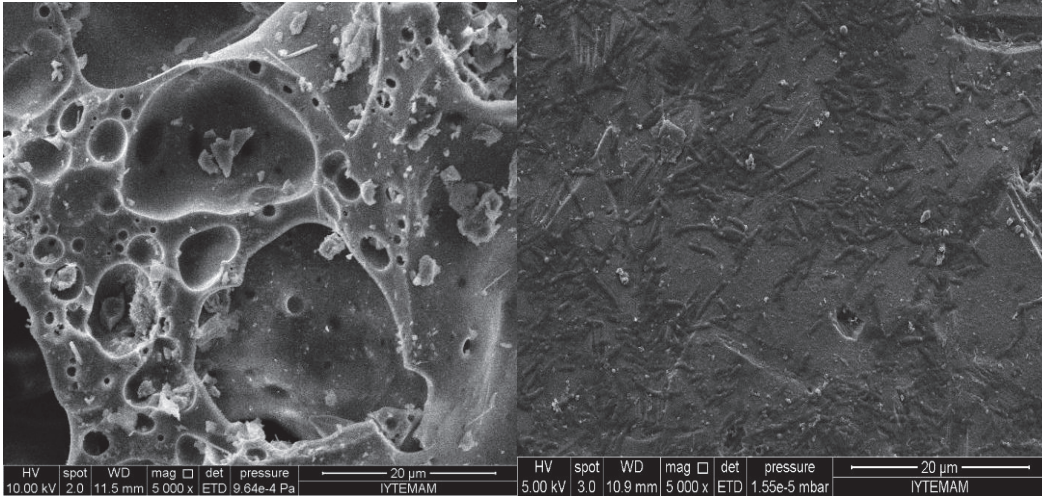


Şekil 4.118. *R. Gel.4* ile foto-fermantatif hidrojen üretiminde manyetik parçacıklar içeren reaktörler

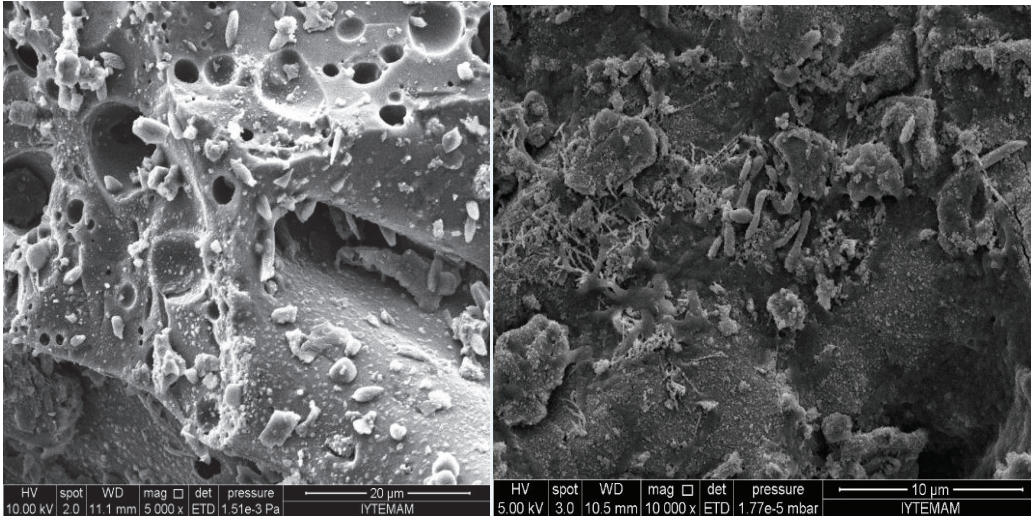
$OD_{@600nm}$ değerleri karşılaştırıldığında V111308 ve V111616 içeren reaktörlerde çıkış sularında $OD_{@600nm}$ değerlerinin daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. Hidrojen üretim değerlerinin de birbirlerine oldukça yakın oldukları içerdeki aktif bakteri konsantrasyonlarının birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir. Taşıyıcı madde konsantrasyonunun artırılması daha düşük HRT değerlerinde daha yüksek tutunmuş bakteri konsantrasyonunu sağlayacaktır. Hidrojen üretim hızları reaktörün litresi başına günlük 130-250 mL arasında değişmektedir. Verim değerleri de teorik olarak beklenen değerlerin oldukça altında gözlenmiştir. Bu değerler manyetik parçacıklar için uygulanacak daha etkili konfigürasyonlarla artırılabilir (Çizelge 4.22). Çünkü SEM görüntülerinde de görüldüğü üzere bakteriler yüzeye tutunmuştur ve bu kapasite arttırılabilir.

Çizelge 4.22. Tutundurma yöntemi ile immobilize edilen izolatlarda foto-fermantatif hidrojen üretimi (*R. Gel.4*)

MANİYETİK PARÇACIKSIZ REAKTÖR										V111308 KODLU MANİYETİK PARÇACIK İÇEREN REAKTÖR						V111616 KODLU MANİYETİK PARÇACIK İÇEREN REAKTÖR					
Zaman (gün)	HRT (saat)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)	pH	OD ₆₀₀	Toplam H ₂ (mL/gün)	Çıkış KOİ (g/L)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	H ₂ Üretim Hızı (LH ₂ /Lreaktör.gün)		
1	72	7	2,372	34				7,5	2,333	28				7	1,85	44					
2	72	7,25	2,18	15				7,5	2,2	24				9	1,235	4					
3	72	7,5	2,096	24	0,75	97,55	0,24	7,5	2,122	23	0,04	104,14	0,25	10	1,378	5	0,20	95,45		0,18	
4	72	8	2,089	2				8	1,977	10				7	1,387	6					
7	72	7,5	2,273	47	0,65	75,40	0,16	7,5	2,216	50	0,13	95,54	0,20	9,5	2,153	32	0,44	119,99		0,13	
8	72	7,5	2,409	11				7	2,009	0				7	2,013	0					
9	72	8	2,389	16	0,15	176,64	0,09	8	2,469	13	0,58	72,72	0,04	9	2,281	0	0,71	0,00		0,00	
10	36	8	2,039	0	0,31	0,00	0,00	8	2,124	0	0,45	0,00	0,00	9	1,981	8	0,38	21,28		0,05	
11	36	8	1,608	4	0,17	23,78	0,03	8	1,685	10	0,54	44,47	0,07	8	1,67	6	0,42	17,88		0,04	
12	36	7	1,546	11	0,18	60,02	0,07	8	1,728	0	0,58	0,00	0,00	7	1,592	11	0,57	58,51		0,07	
14	18	7	1,046	28	0,27	103,40	0,37	7	0,762	29	0,54	129,67	0,39	7	1,034	3	0,62	21,53		0,04	
16	18	8	1,352	7	0,03	209,71	0,09	7,5	1,281	0	0,63	0,00	0,00	8	1,393	2	0,69	27,03		0,03	
16	18	7	1,34	0	0,15	0	0	7	1,291	0	0,61	0	0	7	1,399	0	0,70	0		0	
17	9	7	1,443	0	0,03	0	0	7	1,331	0	0,75	0	0	8	1,541	0	0,70	0		0	
17	9	7	0,755	0	0,01	0	0	7	0,967	0	0,68	0	0	7	0,688	0	0,64	0		0	
17	9	7	0,348	0	0,16	0	0	7	0,428	0	0,65	0	0	7	0,287	0	0,70	0		0	



Şekil 4.119. V111308'in foto-fermantasyon öncesi (sol kare) ve sonrası (sağ kare) SEM görüntüleri (*R. Gel.4*)



Şekil 4.120. V111616'nın foto-fermantasyon öncesi (sol kare) ve sonrası (sağ kare) SEM görüntüleri (*R. Gel.4*)

SEM görüntülerine bakılacak olursa iki tutundurma malzemesinde yüzeyinde rod yapılı bakteri oluşumları görülmektedir. Foto-fermantasyon öncesinde görülen gözenekli yapıların arasında görülen bakteri oluşumları bu malzemelerin tutundurma için uygun olduğunu göstermektedir ancak tutunma kapasiteleri ilave polimerik malzeme eklenmesi veya bakteriler üzerinde yapılacak modifikasyonlarla arttırılabilir (Şekil 4.119-4.120).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında immobilize mikroorganizma kullanım esasına dayalı yeni ve özgün biyoreaktör konfigürasyonun denenmesi, atık kaynaklarının değerlendirilebilmesi, düşük sıcaklık ve basınç koşullarında çalışılabilmesi ve maliyetler açısından uygunluğu gibi avantajları göz önüne alınarak biyohidrojen üretimi üzerine çalışılmıştır. Biyohidrojen üretim yöntemlerinden ise sterillik, özel büyüme koşulları gerektirmemesi, ticari olarak kolay ve ucuz olarak bulunabilmesi gibi avantajları nedeniyle karışık konsorsiyum ile çalışılması uygun bulunmuştur. Ancak karışık konsorsiyumda var olan metanojen bakterilerin baskılanıp hidrojen üreten bakterilerin baskın hale geçmesi için bazı ön işlemlere gereksinim bulunmaktadır.

Karanlık fermantasyonda kullanılan karışık kültürün pek çok avantajı vardır. Pratik ve teknik olarak kullanımının kolay olmasının yanı sıra atıksulardan enerji üretiminde sterilizasyona ihtiyaç duyulmaması çok önemli bir avantajdır. İçeriğindeki çeşitli mikroorganizma grupları toplam proses verimliliği açısından önemli katkılar sağlamaktadır. Ancak karışık kültürlerle hidrojen üretiminde bu karışık konsorsiyum içeriğindeki homoasetojen ve sülfat indirgeyici bakterileri içeren metanojenler grubu gibi hidrojenotrofillerin, üretilen H_2 'yi hemen kullanmaları proses verimini düşürücü etki yapmaktadır. Bu nedenle biyokatalizörlerin doğası ve fonksiyonları hidrojen üretimi için çok önemli bir faktördür (Goud and Mohan, 2012).

Yapılan çalışmaların sonuçlarına genel olarak bakılacak olursa sükrozun substrat olarak kullanıldığı deneme setlerinde toplam hidrojen gazları üretimi açısından en olumlu etki ısıtma işleminde görülmüştür. Ön işlemsiz denemeler, BESA ve baz muamelesi yapılmış denemelere göre daha yüksek sonuç verirken, TCl, asit ve kloroform muamelesi gaz üretim değerlerini düşürmüştür.

Kloroformun ön işlem olarak kullanılması çalışmamızda olumsuz etki oluşturmuş elde edilen gaz değerleri ve hidrojen gazı yüzdeleri düşüş göstermiştir. Hu and Chen, (2007) metanojenik granüllere ön işlem uygulanması üzerine yaptıkları çalışmada ısı ve asit muamelesinin iyi birer yöntem olmalarına rağmen granül haldeki biyokütlelerde kloroformdan daha az etkili olduklarını savunmuşlardır. Yaptıkları çalışmada %0.05 lik kloroform ile metanojenlerin tamamen inhibe edildiğini daha yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etki

oluşturduğunu savunmuşlardır. Bu tez çalışması kapsamında kloroformun %0.05 ‘ten daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı çalışmalarda hemen hemen hiç gaz üretimi olmadığı gözlenmiştir. Wang and Wan (2008) ise ısı işleminin daha iyi olduğunu savunmasına rağmen kloroform ön işlemi ile 100 mL H₂/ g glikoz bir substrat verimi bildirmişlerdir.

Ren et al. (2008) ise yaptıkları çalışmada asit, baz ve havalandırma muamelesini DGGE yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelemiş ve asit ve havalandırma koşullarında metanojenlerin tamamen indirgenirken baz muamelesinin mikroorganizmaların inhibisyonu konusunda etkili olmadıklarını belirtmişlerdir.

BESA muamelesi etkili olabilecek başka bir kimyasal metanojen inhibisyonu yöntemi iken çalışmalarımızda sıcaklık daha iyi sonuç vermiştir. Substrat olarak sükroz kullanımında elde edilen hidrojen verimlerine bakıldığında ısı işlem daha yüksek değerler vermiştir.

Isıl işlem literatürde en çok tercih edilen yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Isıl işlem ile Zhu and Beland (2006) yaptıkları çalışmalarda 2.59 mol H₂/ mol sükroz elde etmişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında aynı sükroz konsantrasyonunda (10 g/L) fakat farklı pH değerlerinde (7-5.5) ve farklı sıcaklık koşullarında 0.74 mol H₂/mol sükroz elde edilmiştir. Wang and Wan (2008) sıcaklık ön işlemiyle 221.5 mL H₂/g glikoz elde ederken bu tez çalışması kapsamında en yüksek 74 mL H₂/g sükroz verime elde edilmiştir.

Baz muamelesi çoğu çalışmada etkisiz olarak belirtilmesine rağmen bu tez çalışması kapsamında oldukça olumlu sonuçlar vermiştir. Zhu and Beland (2006) tarafından yapılan çalışmada baz muamelesi sonucu 1.44 mol H₂/mol sükroz elde edilirken bizim yaptığımız çalışmada 0.69 mol H₂/mol sükroz değeri elde edilmiştir.

Sürekli modda karanlık fermentasyon işlemleri, sterilizasyona ihtiyaç duyulmaması ve yüksek hidrojen dönüşümleri sağlaması gibi avantajlarından dolayı organik atıkların substrat olarak kullanılabildiği proseslerdir. Çeşitli atıksular veya katı atıklarla yapılmış çalışmalar literatürde mevcuttur.

Bu tez çalışması kapsamında çoğu atıksuyu temsilen sükroz substrat olarak kullanılarak sürekli hidrojen üretimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sürekli

çalışmalara uygun ön işlemin seçilmesinin ardından geçilmiştir. Sürekli biyoreaktör çalışmalarında literatürde belirtilen düşük alıkonma zamanlarında hücre yıkanması olmaksızın çalışılabilmesi, daha küçük biyoreaktör hacimleriyle daha yüksek hidrojen verimleri elde edilebilmesi, stabil bir üretim sağlaması gibi avantajlarından dolayı immobilize biyoreaktörler; kütle aktarımı sınırlamaları olmaması gibi avantajlarından dolayı da tutundurma yöntemi seçilmiştir.

Askıda sistemi temsilen işletilen tam kontrollü CSTR, 24 saat HRT koşullarında biyoreaktör performansı en iyi iken 12 saatten itibaren performansta bütün parametreler açısından düşüşler görülmüştür. Düşük alıkonma zamanları askıda sistemler için uygun koşullar olmadığı kanaatine varılmıştır. 24 saatlik alıkonma zamanında her parametre açısından CSTR' da daha yüksek performanslar gözlenmiştir. Ancak daha düşük alıkonma zamanlarında bu durumun tersi gözlenmiştir. Bu durum düşük alıkonma zamanlarında askıda sistemlerde görülen hücrelerin yıkanması probleminden kaynaklanmaktadır.

Yapılan sürekli biyoreaktör denemelerinde üç farklı immobilizasyon malzemesi kullanılmıştır. Kullanılan biyoreaktör tipleri askıda sistem karşılaştırması için aynı koşullarda işletilen tam kontrollü CSTR ile karşılaştırılmıştır. Seramik top, seramik halka ve pomza taşı ile doldurulmuş immobilize biyoreaktörler sükröz ortamından hidrojen üretmek üzere işletilmiştir. Hidrolik alokonma zamanının etkisinin belirlenmesi için tüm reaktörler azalan HRT koşullarında (HRT 24 saat-12 saat-6 saat-3 saat-1.5 saat) işletilmiştir. Bir askıda sistem aynı koşullarda işletilerek karşılaştırma yapılmıştır. Literatürde immobilize reaktörlerin askıda sistemlere göre daha avantajlı olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Hücre immobilizasyonunun sadece hücre yıkanmasına karşı koruma sağlamadığı aynı zamanda biyohidrojen üretiminde artış sağladığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. Immobilize reaktörlerin kullanılmasındaki itici güç daha düşük reaktör hacimlerinde askıda sistemlere göre avantajlar elde edilmesidir. Bir biyoreaktördeki hidrolik koşullar metan üreten bakterilerin sistemden uzaklaştırılarak biyohidrojen üretiminde önemli olan bakterilerin sistemde kalmasını sağlamak açısından çok önemlidir. Bu nedenle reaktör içindeki biyokütle konsantrasyonun yüksek tutulması gereklidir.

Seramik top, seramik halka ve pomza taşı dolgulu reaktörlerde askıda katı madde miktarları giriş ve çıkışta sürekli kontrol edilerek reaktördeki biyokütlenin

içeriği kontrol edilebilmiştir. Buna ek olarak malzemelerin yüzeylerindeki bakteri tutunmaları da SEM tekniği ile görüntülenmiştir. SEM görüntülerinde morfolojik yapısı açısından baskın olan türlerin *Clostridium* türleri oldukları görülmüştür. Bu durum ön işlem olarak uygulanmış olan ısıtılma işlemin etkili olduğunu göstermiştir. Sükroz ve bazal ortamın çözünmüş formda olmasından dolayı çıkış suyundaki katı partiküllerin (ortalama 100 mg/L) biyokütle oldukları kararına varılmıştır. Sürekli askıda reaktör çıkış suyundaki yüksek askıda katı madde miktarı ve buna paralel olarak hacimsel hidrojen üretiminde de düşüşler gözlenmiştir. İmmobilize reaktörlerde ise çıkış sularında düşük biyokütle konsantrasyonları ile birlikte yüksek hidrojen üretim oranları gözlenmiştir.

Karanlık fermantasyonda pH, metabolik yolizi ve hidrojenaz aktivitelerini etkileyen en önemli işletim parametrelerinden biridir (Sinha and Pandey, 2011). pH kontrolü de çok önemli konulardan biri olduğundan askıda sistemlerde pH değerini kontrol altında tutmak amacıyla tam kontrollü fermantörler kullanılmaktadır. Mu et al. (2007), pH 3.4-6.3 arasında değişen değerlerle yaptıkları denemeler sonucunda pH 4.2'nin optimum değer olarak 1.61 mol H₂/mol sükroz verim ile sonuçlandığını belirtmiştir. Başka bir çalışmada optimum pH değeri 1.1 mol H₂/mol glikoz verim ile 5 olarak raporlanmıştır (Khanal et al., 2004). Khanal et al. (2004) aynı zamanda düşük pH değerlerin inhibe edici etkisini de göstererek pH'ın belli seviyede kalması gerektiğini belirtmiştir. Karanlık fermantasyon için genel olarak pH değerlerinin kullanılan inokulumda da bağlı olarak pH 4-6 arasında olması gerektiği bilinmektedir (Sinha and Pandey, 2011). Azbar ve Dokgoz (2010) tarafından kullanılan inokulumda optimum pH değerleri 5-6.5 arasında olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında aynı kaynaktan gelen inokulum kullanılmıştır.

İmmobilize reaktörlerle yapılan çalışmalarda dolgu reaktörlerin pH açısından kararlı bir karakter sergiledikleri görülmüştür. İmmobilize reaktörlerde kendiliğinden oluşan tamponlama yeteneği ile 7 olan giriş pH değerleri çıkışta 4.5-5 arasında değişmiştir. Endüstriyel uygulamalar açısından immobilize reaktörlerde maliyetler ve işletim avantajları açısından dolgu reaktörlerin büyük avantaj sağladıkları görülmüştür.

Oh et al. (2004), yaptıkları çalışmada immobilize biyoreaktör kullanımının %H₂ değerini %57-60'lara çıkarabildiğini öne sürmüşlerdir. Yaptığımız bu

çalışmada hidrojenin hacimsel yüzdeleri hemen her biyoreaktör tipinde stabil olarak %45-65 arasında değişen değerler almıştır. En yüksek hidrojen yüzdesi HRT 24 koşulunda seramik top dolgulu biyoreaktörde % 62 olarak elde edilmiştir. CSTR 'da daha değişken hidrojen yüzdeleri görülmektedir. İmmobilizasyon ile biyoreaktör içindeki hidrojen üreten mikroorganizmaların sayıca sabit kalması çıkış suyuyla uzaklaşmaması gibi avantajlarından dolayı hidrojen yüzdeleri de daha stabil bir seyir göstermiştir.

Çıkış suyunda VFA konsantrasyonları günlük olarak ölçülmüş ve asetat ve bütiratın dominant VFA'lar oldukları tespit edilmiştir. Karanlık fermantasyonda son ürün asetik asit olduğundan teorik olarak 616 mL H₂, son ürün bütirat olduğunda ise 280 mL H₂ beklenmektedir. İmmobilize reaktörlerin çıkış sularında asetik asit konsantrasyonları 115.2-6256 mg/L arasında değişen değerler almıştır. Metabolit kompozisyonları dolgulu reaktörlerde, askıda reaktörde benzerlik göstermiştir. Reaktörlerin işletilmesi süresince propiyonik asit oluşumu gözlenmemiştir. Chang et al. (2002) tarafından yapılan çalışmaya göre propiyonik asit oluşumu hidrojen üretimini düşürücü etki yapmaktadır. İmmobilize reaktörlerde bu oluşumların gözlenmemiş olması hidrojen üretim verimleri açısından olumlu bir sonuçtur.

Literatürde immobilize reaktörler ile biyohidrojen üretimi çalışmaları oldukça sınırlıdır. Wu and Chang (2007) PMMA (polimetilmetakrilat) kullanarak anaerobik çamuru tutuklamış ve mezofilik koşullarda 6 saat HRT'de 2.25 mol H₂/mol süktroz verim elde edildiğini belirtmiştir. Zhang et al. (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada kendiliğinden granülleşen anaerobik çamur reaktörü ve biyofilm reaktörleri kullanılarak CSTR'da 10 ve 20 kat daha yüksek sistem performansı elde etmişlerdir. Gavala ve ark. (2006) tarafından UASB'de 2 saat HRT'de 0.7 mol H₂/mol glikoz verim elde edilmiştir. Katı materyallere adsorbsiyon başka bir yaygın immobilizasyon tekniğidir. Gavala et al. (2006) tarafından kullanılan biyokütle dört farklı malzeme üzerine (aktif karbon, küresel aktif karbon, toprak, sünger) immobilize edilip 4 saat HRT'de en iyi tutunma küresel aktif karbonda gözlenmiştir. Lee et al. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada Gavala et al. (2006)'nın çalışmasında kullanılan dolgu materyalleri ile sırasıyla 2.74 mol H₂/mol süktroz; 3.03 mol H₂/mol süktroz; 2.35 mol H₂/mol süktroz ve 1.84 mol H₂/mol süktroz verim değerleri elde edilmiştir. Başka bir

immobilizasyon malzemesi olan etilen vinil asetat ile 4 saat HRT’de 1.74 mol H_2 /mol süktroz verim elde edilmiştir (Wu et al. 2005). Lin et al. (2006), 8 saat HRT koşullarında 4.98 mol H_2 /mol süktroz verimi granüllü biyokütle ile elde etmişlerdir. Peixoto et al. (2011), 3.3 mL H_2 /mol süktroz verimi polietilen dolgulu UASB reaktörde raporlamıştır. Çoğu immobilizasyon çalışması mezofilik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Zhang et al. (2007), tarafından yapılan çalışmada ise karışık kültürlerin plastik taşıyıcılara immobilizasyonu ile 2.21 mol H_2 /mol süktroz verimleri termofilik koşullarda bildirilmiştir.

Dolgu malzemesi olarak seramik top kullanıldığında 3.03 mol H_2 /mol süktroz HRT 3 saat koşullarında elde edilmiştir. Teorik olarak beklenen 8 mol H_2 /mol süktroz verimin %38’ine tekabül eden bu değerler literatürle uyumlu olup daha düşük HRT koşullardan sağlandığı için oldukça avantajlıdır. Askıda sistemdeki 0.5 mol H_2 /mol süktroz verimine göre ise oldukça pozitif olan bu sonuçlar immobilize sistemlerin askıda sistemlere nazaran daha verimli olduklarının bir göstergesidir.

Biyohidrojen üretiminde karışık kültür kullanılması genel bir ortak noktaya varmayı güçleştiren bir faktördür. Karışık kültürler uygulanan ön işlemlere veya alındıkları kaynaklara göre büyük farklılıklar gösterirler. Literatürde yer alan sonuçların birbiriyle karşılaştırılması sağlıklı bir değerlendirme olacaktır. Bu nedenle yapılacak immobilizasyon çalışmalarında aynı koşullarda aynı karışık kültürle işletilen bir askıda sistemle karşılaştırma yapılması çok önemlidir. Bu çalışmada CSTR ile karşılaştırma yapıldığında bütün biyoreaktörlerde 12 saatlik HRT ve daha düşük değerlerde CSTR a nazaran 7-11 kat arası iyileşmeler gözlenmiştir.

İmmobilize biyoreaktörlerin hepsinde pH kontrol sistemi olmamasına rağmen pH değerleri stabil kalmıştır. İmmobilizasyonun hidrojen üretimine önemli bir katkısı olan bu durum ölçek büyütme sistemlerinde çok avantaj sağlayacaktır. İmmobilize biyoreaktörlerde mikroorganizmaların metabolik yol izlerinde dolayısıyla hidrojen ve yan ürün oluşturma performanslarında önemli bir parametre olan pH için dışarıdan bir kontrol sistemi gerekmemektedir.

İmmobilize biyoreaktörlerde mikroorganizma kaçışları rutin AKM analizleri ile kontrol edilmiştir. Tüm biyoreaktörlerde giriş ve çıkış AKM değerleri hep birbirine yakın çıkmıştır. Çalışılan pH değerlerinin hiçbirinde kayda değer mikroorganizma kaçışları olmadığı gözlenmiştir.

Ölçek büyütme sistemlerinde başka bir önemli nokta biyoreaktörün kaplayacağı hacimdir. Yaptığımız çalışmada kullanılan CSTR hacmi immobilize biyoreaktörlerin hacminin yaklaşık 10 katı büyüklüğünde olmasına rağmen düşük HRT koşullarında hemen hemen aynı ya da daha yüksek hidrojen verim değerleri elde edilmiştir. Biyoreaktör hacminde immobilizasyonla sağlanacak bu avantaj özellikle sanayi uygulamaları ve ölçek büyütme sistemlerinde çok fayda sağlayacaktır. Düşük hacimli biyoreaktörün başka bir avantajı da daha düşük miktarlarda besleme yapılabilmesidir. Bazal ortam hazırlanmasında kullanılacak kimyasalların maliyeti açısından bu durum da olumlu bir etki oluşturmaktadır.

Dolgu malzemelerinin bir kısmında yapılan SEM analizlerinde ise *Clostridium* türlerinin yaygın ve oldukça fazla sayıda olduğu gözlenmiştir. Uygulanan ön işlemlerde sporlu olan bu türlerin baskın hale geçtiğini gösteren bu durum hidrojen üretiminde olumlu bir sonuçtur. Örnekler biyoreaktörlerin işletilmesinin bitiminden sonra alındığından dolayı son zamanlarda uygulanan düşük HRT koşullarına rağmen bu türlerin dolgu malzemesi üzerinde stabil bir halde kaldıklarının gözlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan bütün dolgu malzemeleri ticari olarak kolayca ulaşılabilir, daha önce kullanılmamış ve ucuz materyallerden seçilmiştir. Hemen her biyoreaktörde mikroorganizmalara biyoreaktörün alt kısmındaki dolgu materyallerinde daha yoğun orta da daha az yoğun ve en üstte oldukça seyrek olarak gözlenmiştir. Taze beslemenin sürekli alttan verilmesi dolayısıyla oradaki mikroorganizmaların daha hızlı ve kolay büyüebildiği ve bu nedenle biyoreaktörün üst kısımlarına çıkıldıkça mikroorganizma yoğunluğunun azaldığı gözlenmektedir. Tutundurma ile hazırlanan immobilize biyoreaktörlerde malzemeler arası boşluklarda kalmış askıda mikroorganizmalar da hidrojen üretimine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle hem askıda hem de tutunmuş olarak mikroorganizmaları daha yoğun olan seramik halka ve seramik top dolgulu immobilize biyoreaktörlerde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yüzey alanı en az olan büyük boy rasching halkası dolgulu biyoreaktörde düşük üretimler

gözlenmiştir. Poliüretan köpük biyoreaktöründe iyi bir tutunma sağlanmış ve yüksek hidrojen üretimleri gözlenmiştir ancak denemeler sonunda poliüretan köpük malzemelerin mikroorganizmalar tarafından tamamen parçalandığı gözlenmiştir. Bu nedenle karışık kültürlerin immobilizasyonu için kullanımı uygun olmayan bir materyal olduğu kanısına varılmıştır. Kullandığımız dolgu malzemelerinin her biri immobilizasyon için uygun ve ucuz malzemelerdir bu nedenle ölçek büyütme ve sanayi uygulamalarında kullanılmaları açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

İki aşamalı reaktör sistemleri biyohidrojen üretiminde oldukça büyük öneme sahiptir. Karanlık fermentasyonla kompleks organik maddelerden hidrojen üretimi gerçekleşirken son ürün olarak organik asitler de çıkmaktadır. Karanlık fermentasyon çıkış suyunun foto-fermantatif bakteriler tarafından kullanılmasıyla substrat içersindeki hidrojenin tamamen açığa çıkması sağlanabilir. Bu nedenle karanlık fermentasyon ve foto-fermantasyonun birleştirilmesi ile oluşturulan hibrit sistemler oldukça avantajlıdır. Bu tez çalışmasının ikinci kısmında karanlık fermentasyon çıkış suyunda baskın halde bulunan asetat ve bütiratın sürekli immobilize foto-fermantasyon reaktörlerinde kullanılmıştır.

Günümüze dek askıda hücre kültürü sistemleri ile foto-fermantatif biyohidrojen üretimi üzerine pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Askıda hücre sistemlerinin en büyük avantajı hücrelerle substrat arasındaki iyi kütle aktarımı karakteristikleridir. Bunun yanı sıra düşük hidrolik alıkonma zamanlarında reaktörden hücrelerin yıkanarak uzaklaşması gibi çok önemli dezavantajlar da mevcuttur.

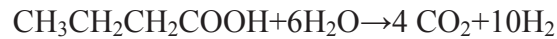
Bu tez çalışması kapsamında öncelikle Montreal’de yapılan çalışmada izole edilen dört izolat üzerinde tanımlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu izolatlardan üç tanesinin yeni birer suş olma ihtimalinin moleküler çalışmalarla belirlenmesi üzerine en uygun ortam koşullarının belirlenmesi amacıyla değişik büyüme ortamları kullanılmıştır. Zenginleştirme ortamının RCV ortamından daha verimli sonuçlar verdiğinin belirlenmesinin üzerine en uygun organik asit ve karbonhidrat kaynaklarının belirlenmesi üzerine kesikli reaktör denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerin sonucunda organik asitlerin karbonhidratlarda daha iyi birer karbon kaynağı oldukları sonucuna varılmıştır. Asetattan H₂ üretiminde;



4 mol H₂/mol asetat verim beklenmektedir. Başlangıç konsantrasyonu 5 g/L olarak belirlendiğinden teorik olarak beklenen toplam H₂ üretimi 400 mL'dir. Çalışmamızda teorik değerlerle karşılaştırıldığında verimler açısından %37-40 üretim hızları açısından %40-47 'lik değerlere ulaşılmıştır. En iyi sonuçlar *R.Cap.* ile elde edilmiştir. Lo et al. tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 suşu kullanılmıştır. 3 g/L asetat başlangıç konsantrasyonunda %67 verim değerlerine ulaşılmıştır. Barbosa et al. (2001) tarafından yapılan başka bir çalışmada üç ayrın foto-fermantatif suş ile asetattan H₂ üretimi incelenmiştir. *Rp. HCC 2037* ile toplamda 269 mL; *Rp. Pal. R1* ile 56 mL ve tanımlanmamış izolat ile 134 mL H₂ üretim değerleri çok benzer bir ortam formülasyonu ile elde edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında başlangıç konsantrasyonunun 1.36 g/L olduğuna bakılarak çalışmamızda kullanılan izolatlar ile daha yüksek başlangıç koşullarında yakın verim değerleri elde edildiği söylenebilir.

Özgür et al. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise değişik asetat konsantrasyonlarının hidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. Çalışmada asetat tüketim değerlerinin yüksek başlangıç koşullarında daha düşük olduğu gözlenmiştir. 6 g/L başlangıç konsantrasyonu ile %38 asetat kullanımı gözlenirken bu değer 2.3 g/L değerinde %79'a yükselmiştir. Molar hidrojen verimleri %2-34 arasında değişmektedir. Bu çalışmada daha yüksek başlangıç konsantrasyonları ile daha yüksek hidrojen verim değerleri elde edilmiştir (%37-40).

Bütiratın hidrojene dönüşümü şu şekildedir:



3 g/L başlangıç bütirat konsantrasyonunda teorik olarak 680 mL H₂ üretimi beklenmektedir. Ancak çalışmamızda maksimum 118 mL H₂ üretimi gözlenmiştir. Sonuçlar teorik değerlerin altında kalmış olmasına rağmen yapılan diğer çalışmalara bakıldığında da buna benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Lo et al. (2010) yaptıkları çalışmada 12 mL H₂/L reaktör. saat'lik maksimum üretim hızı değerine ulaşmışlardır. Bu çalışmada H₂ üretim hızı değerleri 9.58-15.4 mL H₂/L reaktör.saat olarak değişmektedir. Fang ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada değişen bütirat konsantrasyonlarında hidrojen üretimleri karşılaştırıldığında 3 g/L için 90 mL toplam H₂ üretim değerine ulaşılmıştır. Bu

çalışmada aynı konsantrasyonda 72-118 mL H₂ arasında değişen değerler elde edilmiştir.

Laktatın karbon kaynağı olarak kullanıldığı diğer çalışmalarla karşılaştırılacak olduğunda diğer çalışmalarda (He et al. ,2006, Li and Fang, 2009, Kondo et al. 2002 ve Ren et al., 2008) 1.5-3.75 mol H₂/mol laktat verim değerleri elde edilirken bu çalışmada zenginleştirme ortamı kullanıldığında 2-2.5 mol H₂/mol laktat verim değerleri elde edilmiştir.

İmmobilizasyonun sistem performansını artırdığını gösteren pek çok çalışma yayınlanmıştır. Ancak immobilizasyon işlemi yapılmadan önce en önemli nokta dayanıklı, hücreler için toksik olmayan ve maliyetler açısından da çok pahalı olmayan immobilizasyon malzemesinin seçilmesidir. Her immobilizasyon tekniğinin ve her malzemenin kendisine has avantaj ve dezavantajları vardır (Hallenbeck, 1983).

Karanlık fermantasyon üzerine yapılan bazı çalışmalarda immobilizasyonun sistem performansını artırdığı görülmüştür (Zhang et al. , 2007, Keskin et al. , 2011, Keskin et al. , 2012). Foto-fermantasyonun endüstriyel uygulamalarında karşılaşılan en büyük problemler düşük hücre büyüme hızları ve ışık kullanım verimleridir (Chen et al., 2006, Zhu et al., 1999). Foto-fermantasyonla hidrojen üretimi üzerine yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. Kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olduğundan en çok tercih edilen yöntem hücre tutuklama olmuştur. Tutuklama yönteminin başka bir avantajı da bölgesel anaerobik çevrelerin oluşması ve yüksek biyokütle konsantrasyonlarının sağlanmasıdır. Hücre yıkanması olmadan düşük HRT koşullarına dayanması da en önemli avantajlarından biridir. En önemli dezavantajları ise düşük hidrojen üretimleri, düşük mekanik dayanıklılık ve uzun dönem işletimlerinde erken bozulmalardır. Agar, agaroz, carrgenan ve aljinat yaygın olarak kullanılmış olan tutuklama malzemeleridir. LentiKat® yani patentli PVA (polivinil alkol)-borik asit bileşimi bu dezavantajları elimine etmek için geliştirilmiş ticari bir tutuklama malzemesidir. LentiKat® polimerinin kullanıldığı sistemlerde uzun süreli mekanik dayanım, iyi kütle transferi ve büyük ölçekli işletimleri için pratik avantajlar bulunmaktadır. Çalışmamızda LentiKat® yazıcısı kullanılarak bir defada 400 eşit çaplı LentiKat® diskleri oluşturulmuştur. Boyutların ayarlanması

ve uniform olması biyokütle konsantrasyonu açısından oldukça pratik katkılar sağlamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında LentiKat® içersine *S. Malt.2*, *R.Cap.*, *R. Gel.4* hapsedilerek H₂ üretim performanslarına bakıldığında her izolatta askıda sistemden daha uzun süre reaktörde kalma avantajı gözlenmiştir. HRT 72 saat koşullarında ise en yüksek H₂ üretim değerleri elde edilmiştir. Özellikle 2 ve 4 numaralı izolatlar LentiKat® içersine hapsedilmiş halde düşük HRT koşullarında askıda sistemden daha iyi performans göstermişlerdir. En yüksek H₂ üretim değerleri HRT 72 saat koşulunda 390 mL H₂/L reaktör.gün olarak *R.Gel.4* ile elde edilmiştir. Askıda sistemlerde H₂ üretiminin durduğu ve biyokütlenin reaktörden yıkanarak uzaklaştığı bir nokta olan HRT 18 saat koşullarında ise hem *S.Malt.2* hem de *R.Gel.4* ile 390 mL H₂/L reaktör.gün değerlerine varan hidrojen üretim hızları gözlenmiştir. Daha düşük HRT koşullarında substrat tüketimi sona erdiğinden H₂ üretimi tamamen durmuştur. Bu HRT koşulunda askıda sistemde biyokütle konsantrasyonu çok fazla azalıp bitme noktasına geldiğinden dolayı H₂ üretimleri gözlenmemiştir. LentiKat® reaktörlerinde ise düşük HRT koşullarında dahi içersine izolatların tutuklandığı LentiKat® diskleri reaktörde kalmaya devam etmiştir. Ancak besleme çözeltisinin düşük HRT koşulunu sağlamak amacıyla hızlı bir şekilde reaktörden geçirilmesi sırasında iyi kütle aktarımı sağlanamamış biyokütleyle substrat ulaşamamıştır. LentiKat® disklerinin boyutunun ayarlanabilmesi bu çalışmadaki en büyük avantaj olmuştur. Fissler et al. (1995) jel boncukların boyutunun 3 mm den 0.5 mm'ye düşürülmesi ile benzoattan hidrojen üretim verim değerlerinde 9.3 mol H₂/mol benzoattan 13.2 mol H₂/mol benzoata artış olduğunu rapor etmişlerdir.

PVA(polivinil alkol) ve carregen tozu ile yapılmış bir matrix *R. Palustrisin* tutuklanması için kullanılmıştır. 3 ay boyunca üretim sürmüş ve 2.61 mmol H₂/L/saat hız değerleri hesaplanmıştır (Wang et al., 2010). Başka bir çalışmada PVA-Borik asit jeli kullanılarak *R. Cap.* CQ 01 tutuklanmış ve iyi kütle aktarımı ile 20 günlük üretim gerçekleştirilmiştir. 0.23 mol H₂/mol substrat verim ve 3.6 mmol H₂/ g kuru hücre ağırlığı/saat hızında hidrojen üretimi rapor edilmiştir (Tian et al., 2009). Bu iki örnek çalışmamızda olduğu gibi LentiKat® iyi mekanik dayanımlı ve tutuklamayı cazip bir metod olarak gösteren immobilizasyon yöntemleridir. Reaktör maliyetleri tutuklama yönteminde bir

miktar pahalı olsa da bu yöntemin atıksulardan H_2 üretiminde kullanılmasıyla durum avantajlı hale gelebilir. Zhu et al. (1999) %2 'lik agar jeline hapsedilmiş *R. Sphaeorides* ile 1.9 mL H_2 /mL atıksu verim değerlerine ulaşmışlardır.

Pratik foto-fermantatif H_2 üretimi sistemlerinde önemli olan sürekli modda uzun süreli üretimi gerçekleştirebilmektir. Biyofilm oluşturma yani yüzey tutundurma metodları da bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak yüzey tutunma yönteminin kullanılma sebepleri yüksek substrat-ürün dönüşümleri, biyokütlenin uzun süreli alıkonması ve ürün inhibisyonunun önlenbilmesidir. Tutuklama yöntemlerindeki zayıf kütle transferi ve düşük ışık dönüşüm verimleri gibi dezavantajlar bu sistemlerde ortadan kalkmaktadır (Zhang et al. , 2010).

Tian et al. (2010) ışık kullanım verimlerinin ve hidrojen üretim değerlerinin artırılması amacıyla foto-fermantatif bakteriler cam boncuklar üzerinde tutundurulmuşlardır. Bu reaktörlerde iyi sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen en büyük dezavantaj uzun başlangıç dönemleri olarak rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada *Rb. Pal.* CQK 01 cam bir yüzey üzerine immobilize edilerek bu işlemin biyofilm oluşumuna, foto-biyohidrojen üretim performansına etkisi incelenmiştir. Çalışma sonunda 590 nm nin en etkili dalga boyu olduğuna karar verilmiştir ve 11.2 mmol H_2 /mL reaktör.saat hızında glikozdan H_2 üretimi raporlanmıştır (Liao et al. , 2010).

Düz yüzeye biyokütle inhibisyonunda biyofilm kalınlığı artıkça ışığın penetrasyonu zorlaşacağından ışık dönüşüm verimlerinin azalması gibi durumlarla karşılaşılabilir. Bakterilerin tutundurulacağı yüzeyin porozlu olması tutunacak biyokütle konsantrasyonunun artması gibi avantajları da beraberinde getirecektir. Yapılan bir çalışmada 15.6 mL hacimli bir foto-biyoreaktörde modifiye edilmiş porozlu bir kağıt kullanılarak 40 gün H_2 üretimi gerçekleştirilmiştir. 1.3 mL H_2 /L. reaktör.saatlik üretim hızı değerleri rapor edilmiştir (Tsygankov et al., 1994).

Poroz cam malzemelerde şeffaf yapılarından dolayı foto-fermantatif hidrojen üretiminde kullanılabilecek malzemeler arasında gösterilmektedirler (Keskin et al. , 2011). Ancak yapılan bu çalışmada cam bazlı tutundurma materyallerinin kullanılmasından olumlu sonuçlar alınamamıştır. Plastik yada porozlu camlardan hiçbirine izolatlar tutunmamışlardır. Bu nedenle cam boncuklar porozlanmamış halleriyle yukarı akışlı reaktörlerde akışın homojen bir

şekilde reaktöre dağılmasını sağlamak amacıyla reaktörün alt kısmına ve LentiKat®'ların reaktörden kaçmasını önlemek amacıyla reaktörün üst kısmına doldurulmuşlardır.

Yüzey özellikleri immobilize sistemlerde çok önemli bir faktördür. Bu tez çalışması kapsamında cam boncuklar üzerinde tutunma çalışmaları başarısız olduğunda dolayı alternatif ve özgün malzeme arayışına girilmiştir. Bu konuda Potsdam, Berlin; Almanyada bulunan ATB enstitüsü öğretim görevlisi Dr. Jan Mumme tarafından yardım alınmıştır. Kendisi patenti için başvuruda bulunduğu iki çeşit (V111308 ve V111616) manyetik malzemeyi bize armağan etmiştir. Çalışmalarımızda bu manyetik parçacıklardan 5'er gramın biyoreaktörlere eklenmesi şeklinde bir yol izlenmiştir. Malzemeler siyah renkli olduğundan reaktörü tam olarak doldurma metodu tercih edilmemiştir. SEM görüntüleme fotoğrafları ve OD değerleri karşılaştırıldığında manyetik parçacıklar üzerinde tutunmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Toplam H₂ verimleri teorik değerlerin altında kalmıştır. Ancak immobilizasyon işlemi başarılı olmuş ve biyokütlenin reaktör içinde kalması sağlanmıştır.

Sonuç olarak; dört izolatla denemeler yapılmıştır. Bu dört izolattan üç tanesinin moleküler tanımlama işlemleri sonucunda yeni izolatlar olabileceği ve bir tanesinin *R. Cap.* suşu olduğu anlaşılmıştır. Bu izolatlar ile yapılan optimizasyon çalışmalarında zenginleştirme ortamı ile yüksek verimlerin elde edildiği görülmüştür. Organik asitlerden asetat, bütirat, laktat ve süksinatın oldukça iyi birer karbon kaynağı oldukları kesikli denemeler sonucunda görülmüştür. Özgün immobilizasyon yöntemi olarak tutuklama yöntemi için LentiKat® jeller, tutundurma ortamı sağlamak amacıyla da manyetik parçacıklar kullanılmıştır. Immobilize reaktörlerin aynı koşullarda çalışan askıda reaktörlerle karşılaştırılmaları sonucunda immobilize reaktörlerin biyokütle konsantrasyonlarının yüksek olması gibi olumlu etkiler sağladığı gözlenmiştir. Özellikle düşük HRT (18 saat) koşullarında askıda sistemlerde H₂ üretimi dururken immobilize reaktörlerde az da olsa devam ettiği gözlenmiştir. Yine de kütle transferi karakteristikleri göz önüne alındığında en uygun HRT 72 saat olarak gözlenmiştir.

İki aşamalı reaktör sistemlerinde yeni bir yaklaşım kullanılarak immobilizasyonun her iki basamağa uygulanması ile sistemdeki biyokütle

konsantrasyonlarının arttırılabildiği görülmektedir. Doğadan izole edilmiş izolatların hiçbir genetik müdahale olmaksızın literatüre yakın verim değerleri ile hidrojen üretimini gerçekleştirilmiş olması bu izolatların tanımlanması ve ileri tekniklerle hidrojen üretim kapasitelerinin arttırılabileceğini göstermiştir. Bu tez çalışması ile organik maddeler olan atıkların iki aşamalı sistemlerde hidrojen üretimi için verimli bir şekilde, küçük reaktör hacimlerinde yüksek biyokütle konsantrasyonları ile gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir.

6. SONUÇ

Yenilenebilir enerji kaynakları arasında yüksek enerji içeriği, temiz bir enerji kaynağı olması, yandığında son ürünün yalnızca su olması gibi avantajlarından dolayı hidrojen üretimi çok önemli bir yer tutmaktadır. Hidrojen üretim teknolojileri arasında düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmesi ve organik substratlardan hidrojen üretilmesi gibi iki önemli avantajından dolayı biyohidrojen üretimi oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Biyohidrojen üretiminin bir diğer önemli avantajı organik substrat olarak atıksu ve atıkların kullanılabilmesidir. Organik atıkların hidrojene dönüşümü sırasında hem atıkların çevreye salınmadan bertaraf edilmesi hem de karbon ve hidrojen içeriklerinin enerjiye dönüşümleri gibi çok önemli bir avantaj söz konusudur. Karanlık fermantasyon en çok uygulanmış hidrojen üretim tekniklerinden biridir. Karanlık fermantasyonun sterilizasyona ihtiyaç duyulmadığından atık kaynaklarının direk kullanılabilmesi, yüksek enerji dönüşüm verimleri gibi avantajları söz konusudur. Karanlık fermantasyonda en önemli nokta karışık konsorsiyumda varolan metanojenik bakterilerin inhibe edilebilmesidir. Karışık konsorsiyumun alındığı kaynağa göre içeriği değişebilmektedir. Bu nedenle hidrojen üreten bakterilerin baskın hale geçebilmesi için karışık konsorsiyuma özgü en uygun metodun bulunması oldukça önemlidir. Uygulanacak ön işlem sonucunda karışık konsorsiyum içindeki metanojen bakterilerin baskılanması ve hidrojen üreten bakterilerin baskın hale geçmesi proses verimleri açısından çok kritiktir. Ortamda metan üreten bakterilerin baskın hale geçmesi durumunda üretilen hidrojenin de kullanılacak olması hidrojen üretim verimlerini düşürecektir. Bu tez çalışmasının ilk aşamasında çeşitli ön işlem metodları (BESA, TCl, Asit, Baz, Kloroform, Isıl İşlem) arasında kullanılacak olan karışık konsorsiyuma uygulanmış en uygun, en verimli yöntemin ısıl işlem olduğu görülmüştür.

Kesikli reaktörlerle en uygun ön işlemin belirlenmesinin ardından sürekli hidrojen üretimi için en uygun reaktör tasarımının tespit edilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Karanlık fermantasyonla sürekli hidrojen üretiminde en önemli sorun reaktördeki biyokütle konsantrasyonlarının yüksek alıkonma zamanlarında düşmesi sonucu proses verimlerindeki azalmadır. Yüksek biyokütle konsantrasyonlarının sağlanması, biyokütle ve sistem kararlılığının artırılması ve düşük alıkonma zamanlarında dahi hidrojen üretiminin

sürekliliğinin sağlanması gibi avantajları dolayısıyla immobilizasyon sürekli hidrojen üretimi açısından çok önemli bir uygulamadır. Çeşitli immobilizasyon yöntemleri arasında mikroorganizma ve substrat arasındaki temasın direk sağlanabilmesi avantajı açısından tutundurma tekniği oldukça verimlidir. Bu tez çalışması kapsamında seramik top, seramik halka ve pomza taşı mikroorganizmalar için tutunma yüzeyi olarak kullanılmıştır. Bu üç malzeme de piyasada kolayca ulaşılabilen, mikroorganizmalar için yoğun tutunma yüzeyleri sağlayan, dayanıklı ve ucuz immobilizasyon materyalleridir. Mikroorganizmalar üç malzeme üzerinde de çok iyi tutunmuş, düşük alıkonma zamanlarında reaktör içi yüksek biyokütle konsantrasyonları sağlanarak yüksek hidrojen üretim hızları gözlenmiştir. Askıda sistemlerle yapılan karşılaştırmalar sonucunda CSTR tipi reaktörde 12 saat alıkonma zamanından sonra biyokütle konsantrasyonunun oldukça azaldığı ve reaktörde yıkanarak uzaklaştığı görülmüştür. İmmobilize reaktörlerle hacimsel olarak 8 kat küçük reaktörlerde performans olarak 5-6 kat yüksek performanslar gözlenmiştir. Bu endüstriyel uygulamalar açısından çok önemli bir avantajdır. Endüstriyel uygulamalar açısından bir diğer önemli avantaj ise immobilize reaktörlerde ilave pH kontrol sistemi olmamasına rağmen reaktör içinde biyokütlenin kararlılığında dolayı bir kendi kendine pH kontrolü sağlanmış olmasıdır.

Karanlık fermantasyonla sükrözdan hidrojen üretiminde immobilize reaktörlerin kullanılması askıda sistemlerle karşılaştırıldığında aynı koşullar altında 12 saat alıkonma zamanından itibaren performans açısından oldukça yüksek avantajlar sağlamış ve 1.5 saatlik alıkonma zamanlarında dahi sistem içeriğindeki yüksek biyokütle konsantrasyonu ile hidrojen üretimine devam edilmiştir. Bu işlemler sonucunda reaktör çıkış sularında yoğun olarak asetat ve bütirat gözlenmiştir. Karanlık fermantasyonda hidrojen üretimi yanı sıra açığa çıkan organik asitler karanlık fermantasyonda verim sınırlayıcı etkenlerdendir. Karanlık fermantasyon sonucunda açığa çıkan organik asitlerin değerlendirilmesi kompleks karbonhidratların içeriğindeki tüm hidrojen potansiyelinin açığa çıkarılması için foto-fermantasyonla karanlık fermantasyonun birleştirildiği hibrit sistemler önerilmektedir.

Foto-fermantasyon bir diğer önemli hidrojen üretim metodlarından biridir. Fotofermantasyonla hidrojen üretiminde ışık enerjisinin kullanılarak

organik asitlerin hidrojene indirgenmesi atıkların enerji üretim kaynağı olarak kullanılabilmesi, ışık enerjisi olarak güneş ışığından faydalanılabilmesi gibi avantajları açısından çok önemlidir.

Bu tez çalışması kapsamında foto-fermantasyon basamağında kullanılmak üzere dört çeşit bakteri St. Lawrence nehri'nden izole edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda bu izolatların bir tanesi *Rhodobacter capsulatus* olarak tanımlanmış diğerleri *Rubrivax gelatinosus* ve *Stenotrophomonas maltophilia* ile benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Öncelikle bu yeni izolaların hidrojen üretim kapasitelerini incelemek amacıyla kesikli reaktörlerde yapılan çalışmalarda bu izolatların asetat, bütirat, laktat ve süksinatı başarılı bir şekilde kullanarak hidrojen üretebildikleri saptanmıştır. Üzerlerinde işlem yapılmamış vahşi suşlarla teorik olarak beklenen değerlerin %37-48'i arasında değişen hidrojen üretimleri gözlenirken, bu değerlerin literatürde kullanılan suşlarla elde edilen hidrojen üretim değerleri ile benzerlik göstermektedir. Karanlık fermentasyonda açığa çıkan asetat ve bütiratın bu yeni izolatlarca kullanılabilmesi ile sürekli hidrojen üretiminde hibrit sistemlere geçiş yapılmıştır.

Karanlık fermentasyonla foto-fermantasyonun birleşiminden oluşan hibrit sistemlerde karanlık fermentasyon aşamasında immobilizasyonun avantajının görülmesinin ardından foto-fermantasyon basamağında da immobilizasyonun etkileri incelenmiştir. Immobilizasyon yöntemlerinden tutundurma ve tutuklamanın karşılaştırmalı olarak incelenmesi için tutuklama yönteminde ticari ve özgün bir polimer malzeme olan LentiKat®, tutundurma yönteminde ise ATB Enstitüsü öğretim üyelerinden Dr. Jan Mumme tarafından sentezlenen iki değişik nanogözenekli malzeme kullanılmıştır. Immobilizasyon denemelerinde karşılaştırma yapmak amacıyla bir adet askıda reaktör aynı koşullarda işletilmiştir.

Foto-fermantasyon aşamasında sürekli olarak hidrojen üretimi sırasında LentiKat® polimeri içerisine tutuklanmış izolatlarla yapılan denemelerden elde edilen hidrojen üretim değerleri teorik değerlerin altındadır. Ancak aynı koşullarda işletilmiş olan sürekli reaktörlerle yapılan karşılaştırmaya göre 36 saat alıkonma zamanından itibaren askıda reaktörde hidrojen üretimi azalıp biyokütle reaktörden yıkanarak uzaklaştığında immobilize reaktörde hidrojen üretimi devam etmiştir. LentiKat® malzemeler içersinde biyokütlenin büyümeye devam ettikleri

ve malzemelerden dışarı çıkmadığı görülmüştür. Manyetik parçacıklarla yapılan denemelerde immobilize reaktörlerle askıda reaktörler arasında performans açısından bir fark görülmemiştir. Ancak SEM fotoğraflarında parçacıklar üzerinde tutunmalar olduğu görülmüştür.

Hidrojen üretiminde, immobilizasyonun hem karanlık fermantasyonda hem de foto-fermantasyonda sürekli hidrojen üretim performanslarına olumlu katkıları gösterilmiştir. Immobilizasyon biyokütlenin sistemden yıkanarak uzaklaşmasının yanı sıra düşük alıkonma zamanlarında dahi hidrojen üretiminin devam etmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda askıda sistemlere nazaran daha küçük reaktör hacimlerinde daha yüksek hidrojen üretim performansları gözlenmiştir. Bu endüstriyel uygulamalar açısından çok önemlidir. Aynı zamanda hidrojen üretiminde kullanılabilecek üç yeni izolatın literatüre kazandırılması için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında çoğu endüstriyel atıkların ana bileşeni olan sükrozdan iki aşamalı bir hidrojen üretim sisteminde her iki aşamada literatürde ilk defa kullanılmış olan immobilizasyon materyalleri ile başarılı immobilizasyonun gerçekleştirilmesi, düşük reaktör hacimlerinde yüksek organik yüklemelrr ile çalışılabilmesi, biyokütle konsantrasyonunun en yüksek seviyede tutulabilmesi, düşük alıkonma zamanlarında çalışabilme, sistem kararlılıklarının ve verimliliklerinin artması gibi önemli avantajlar sağladığı gösterilmiştir.

7. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında immobilizasyonun sürekli hidrojen üretimine olan önemli katkıları gösterilmiştir. Aynı zamanda üç yeni izolatın literatüre kazandırılması için ön çalışmalara başlanmıştır.

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde immobilizasyonun sistemdeki biyokütle konsantrasyonlarının yüksek ve kararlı tutulduğunda dahi düşük alıkonma zamanlarında dahi mikroorganizmaların sistemden yıkanarak uzaklaşmadıkları ve sistemde kalarak hidrojen üretimine devam ettikleri görülmüştür. Aynı zamanda bu reaktörlerde ilave bir pH kontrol sistemi olmaksızın pH değerlerinin sabit kalması gibi bir avantaj sözkonusudur. Bu avantajlar göz önüne alınarak bir sonraki aşamada yapılabilecek önemli çalışmalardan biri karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde reaktör hacimlerini büyütmek ve pilot ölçekli reaktörlerde sistem performanslarını incelemektir.

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde immobilize reaktörlerin askıda sistemlere göre yüksek biyokütle konsantrasyonlarının sağlanmasının yanısıra düşük reaktör hacimleri ve kendi kendine pH kontrolü gibi endüstriyel uygulamalar açısından çok önemli avantajları tespit edilmiştir. Çalışmalar çoğu endüstriyel atıksuyu temsil etmesi amacıyla saf sükrozla gerçekleştirilmiştir. Aynı reaktör sistemlerinde şeker ve şeker ürünleri endüstrisi, süt ve süt endüstrisi, meyve suyu endüstrisi, gıda atıkları gibi çeşitli organik ve endüstriyel atıklar substrat olarak kullanılarak sistem performansları açısından incelenmeli, immobilize reaktörlerin endüstriyel sistemlere uygulanabilirliği gözlenmelidir.

Doğadan izole edilen muhtemelen yeni üç izolatın ileri moleküler analizlerle tanımlanmaları tamamlanmalıdır. Bu yeni izolatların saf olarak hidrojen üretimi konusunda literatürdeki çalışmalara benzer sonuçlar verdiğinden genetik müdahalelerle hidrojen üretim performansları artırılabilir. Metabolik yöntemlerle bu izolatların hidrojen üretim yollarının çok iyi bir şekilde anlaşılmasının ardından hidrojen üretim performanslarının arttırılması amacıyla bu yollara müdahale edilerek yan ürün üretim noktalarının baskılanması ile hidrojen üretim performansları arttırılabilir.

LentiKat® içerisinde tutuklanmaları sonucu izolatların reaktör içi konsantrasyonlarının düşük alıkonma zamanlarında bile yüksek kaldığı ve reaktörde hidrojen üretimine devam edildiği görülmektedir. Bu dayanıklı polimerik malzemenin biyopolimer üretiminde pilot tesis uygulamalarının olduğu bilinmektedir. Bu pilot tesis uygulamasının hidrojen üretimi için de denenmesi immobilize foto-fermantasyonda sağlayacağı avantajlar gözlenebilir.

Son olarak bu dayanıklı polimerik malzemenin ko-fermantasyonla hidrojen üretimine etkisi araştırılabilir. Tutuklama yönteminin anaerobik sistemlerde bölgesel anaerobik çevreler oluşturması gibi avantajları olduğu bilinmektedir. Saf karanlık fermentasyon suşları ile (*Clostridium* türleri gibi), foto-fermantatif suşların LentiKat® içerisine hapsedilerek hidrojen üretiminde immobilizasyon ve ko fermentasyonun ortak olarak incelenmesi gerçekleştirilebilir.

Biyohidrojen üretimi ve immobilizasyon etkisi daha pek çok araştırmalara ihtiyaç duyulan çok önemli konulardır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- ABD Enerji Raporu**, 2012. <http://www.eia.gov/forecasts/aeo/er/index.cfm> (Erişim tarihi 29.06.2013)
- Antonopoulou, A., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K. and Lyberatos, G.**, 2008, Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass, *Bioresource Technology*, 99:110–119 pp.
- APHA, AWWA, WPCF.**, 2001, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21st Ed. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Argun, H. and Kargi, F.**, 2009, Effects of sludge pre-treatment method on bio-hydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (20) : 8543-8548pp.
- Argun, H. and Kargi, F.**, 2011, Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 7443-7459pp.
- Azbar, N. and Dokgoz, F.T.**, 2010, The effect of dilution and L-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 5028-5033 pp.
- Azbar, N., Dokgoz, F.T.C., Keskin, T., Korkmaz, K. S. and Syed, H.M.**, 2009, Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7441-7447 pp.
- Azbar, N., Dokgöz, F.T.Ç., Keskin, T., Tutuk, F. and Gönen, Ç.**, 2008, Geleceğin kömürü-hidrojen, ICCI Konferans Kitabı, İstanbul, 232-236pp.
- Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M. and Ohnishi, A.**, 2013, A microbiological study of biohydrogen production from beer lees, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 2709-2718pp.
- Barbosa, M.J., Rocha, J.M.S., Tramper, J. and Wijffels, R.H.**, 2001, Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria, *Journal of Biotechnology*, 85: 25–33 pp.
- Basak, N. and Das, D.**, 2007, The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:31–42 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bru, K., Blazy, V., Joulain, C., Trably, E., Latrille, E., Quemeneur, M., Dictor and M.,C.,** 2012, Innovative CO₂ pretreatment for enhancing biohydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 14067-14071pp.
- Chang, J, Lee, K. and Lin, P.,** 2002, Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1167 – 1174pp.
- Chen, C.Y. and Chang, J.S.,** 2006, Enhancing phototropic hydrogen production by solid- carrier assisted fermentation and internal optical-fiber illumination, *Process Biochemistry*, 41: 2041-2049 pp.
- Chen, K.C. and Lin Y.F.,** 1994, Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel, *Enzyme Microbiology and Technology*, 16: 79–83 pp.
- Chen, X., Sun ,Y.Q., Xiu, Z.L., Li, X.H. and Zhang, D.J.,** 2006, Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:539–549 pp.
- Chen, C.Y. , Saratale G. D. , Lee C. M. , Chen P.C. and Chang J. S.,** 2008, Phototrophic hydrogen production in photobioreactors coupled with solar-energy-excited optical fibers, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 6886-6895pp.
- Chen, C.Y.,Yeh K. L., Lo Y. C., Wang H. M. and Chang J. S.,** 2010, Engineering strategies for the enhanced photo-H₂ production using effluents of dark fermentation processes as substrate, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:3467-3489pp.
- Cheong, D.Y. and Hansen, C.L.,** 2006, Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen, *Process Biochemistry*, 41(8):1736–1745 pp.
- Cheong, D.Y., Hansen, C.L. and Stevens, D.K.,** 2007, Production of biohydrogen by mesophilic anaerobic fermentation in an acid-phase sequencing batch reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 96: 421-432 pp.
- Chuang, Y. S., Huang, C. Y., Lay, C. H., Chen, C. C., Sen, B. and Lin, C. Y.,** 2012, Fermentative bioenergy production from distillers grains using mixed microflora, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 15547-15555pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chung, K. T.**, 1976, Inhibitory effects of H₂ on growth of *Clostridium cellobioparum*. Applied Environmental Microbiology, 31(3): 342–348 pp.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguebel, J.P. and Peringer, P.**, 2004, Hydrogen production by *Clostridium thermolactum* during continuous fermentation of lactose, International Journal of Hydrogen Energy, 29:1479–1485 pp.
- Çetinkaya Dokgöz, F.T.**, 2010, Organik Atıklardan İki Aşamalı Sitemlerle Biyolojik Hidrojen Üretimi, (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi.
- Das, D. and Veziroglu, T.N.**, 2001, Hydrogen production by biological processes: A Survey of literature, International Journal of Hydrogen Energy, 26:13–28 pp.
- Das, D. and Veziroglu, T.N.**, 2008, Advances in biological hydrogen production processes, International Journal of Hydrogen Energy, 33: 6046-6057 pp.
- Davila-Vazquez, G., Alatrliste-Mondragon, F., de Leon-Rodriguez, A. and Razo-Flores, E.**, 2008, Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH, International Journal of Hydrogen Energy, 33:4989–4997 pp.
- De Vrije, T., Mars, A.E., Budde, M.A.W., Lai, M.H., Dijkema, C. and de Waard, P.**, 2007, Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Applied Microbiology and Biotechnology 74(6):1358–1367 pp.
- Dien, B. S., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J. and Bothast, R. J.**, 2000, Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass, Applied Biochemistry and Biotechnology, 84–(86):181–196 pp.
- Erdener, H., Erkan, S., Eroglu, E., Gur, N., Sengul, E. and Baç, N.**, 2007, Sürdürülebilir enerji ve hidrojen, ODTU Geliştirme Vakfı Yayınları, Ankara, 12-18 pp.
- Eroglu, I., Aslan, K., Gunduz, U., Yucel, M. and Turker, L.**, 1998, Continuous hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. in: Zaborsky OR (ed) Biohydrogen, Plenum pres, held in London, 143-151 pp.
- Eroglu, E., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L. and Eroglu, I.**, 2004, Photobiological hydrogen production from olive mill wastewater as sole substrate sources, International Journal of Hydrogen Energy, 29:163-171 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eroglu, E. and Melis, A.,** 2011, Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art, *Bioresource Technology*, 102: 8403–8413pp.
- Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. and Ohmiya, K.,** 2001, Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(4):339–343 pp.
- Fang, H.H.P., Liu, H. and Zhang, T.,** 2005, Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater, *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 785-793pp.
- Fedorov, A. S., Tsygankov, A. A., Rao, K.K. and Hall, D.O.,** 1998, hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* immobilised on polyurethane foam, *Biotechnology Letters*, 11:1007-1009pp.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Hintz, W., Gil, G.H. and Almadidy, A.,** 2005, Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6– 7):855–862 pp.
- Fissler, J., Kohring, G.W. and Giffhorn, F.,** 1995, Enhanced hydrogen production from aromatic acids by immobilized cells of *Rhodopseudomonas palustris*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 43-46 pp.
- Fritsch, M., Hartmeier, W. and Chang, J.S.,** 2008, Enhancing hydrogen production of *Clostridium butyricum* using a column reactor with square-structured ceramic fittings, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:6549–6557 pp.
- Gadhamshetty, V. , Sukumaran A. , Nirmalakhandan N. and Myint M. T.,** 2008, Photofermentation of malate for biohydrogen production— A Modeling approach, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:2138-2146 pp.
- Gadhe, A., Sonawane, S.S., Varma, M.N.,** 2013, Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 6607-6617pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gavala H.N., Skiadas I.V. and Ahring B.K.**, 2006, Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1164-1175pp.
- Ghirardi,M.L., Zhang, L., Lee, J.W., Flynn, T., Seibert,M., Greenbaum, E. and Melis, A.**, 2000, Microalgae: A green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18: 506–511 pp.
- Greenbaum, E.**, 1982, Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science* , 196: 879–880 pp.
- Gogotov, I.N.**, 1986, Hydrogenases of phototrophic microorganisms. *Biochimie* 68: 181-187 pp.
- Goud, R.,K. and Mohan,V.**, 2012, Regulating biohydrogen production from wastewater by applying organic load-shock: Change in the microbial community structure and bio-electrochemical behavior over long-term operation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 17763-17777 pp.
- Guo, W.Q., Ren, N.Q., Wang, X.J., Xiang, W.S., Meng, Z.H. and Ding, J.**, 2008, Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed reactor, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:4981–4988 pp.
- Hallenbeck, P.C.**, 1983, Immobilized microorganisms for hydrogen and ammonia production, *Enzyme and Microbial Technology*, 5:171-180pp.
- Hallenbeck, P.C. and Benemann, J.R.**, 2002, Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1185–1193 pp.
- Hallenbeck, P.C.**, 2009, Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 7379-7389 pp.
- Hashimoto, S. and Furukawa, K.**, 1986, Immobilization of activated sludge by PVA-Boric acid method, *Biotechnology and Bioengineering* , 30: 52–59 pp.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. and Hussy, I.**, 2002, Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimization, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1339– 1347 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R. and Hawkes, D.L.,** 2007, Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress, *International Journal of Hydrogen Energy* 32 (2): 172-184pp.
- He, D.L., Bultel, Y., Magnin, J.P. and Willison, J.C.,** 2006, Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter capsulatus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 253–259.
- Hillmer, P. and Gest, H.,** 1977, H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures, *Journal of Bacteriology*, 129: 724–731pp.
- Hu, B. and Chen, S.,** 2007, Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15): 3266-3273.
- Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R. and Hawkes, D.L.,** 2003, Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co- product by mixed microflora, *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6): 619–626 pp.
- Imai, K., Shiomi, T., Uchida, K. and Miya, M. ,** 1998, Immobilization of enzyme into poly(vinyl alcohol) membrane, *Biotechnology and Bioengineering*, 28:1721–1726 pp.
- Jahn, A., Keuntje, B., Dorffler, M., Klipp, W. and Oelze, J.,** 1994, Optimizing photoheterotrophic H₂ production by *Rhodobacter Capsulatus* upon interposon mtagenesis in hupL gene, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(5) 687-690 pp.
- Jo, J.H., Lee, D.S., Park, D. and Park, J.M.,** 2006, Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process, *Bioresource Technology*, 99(14):6666-6672pp.
- Jones, B.L. and Monty, K.J.,** 1979, Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodospseudomonas sphaeroides* nitrogenase system, *Journal of Bacteriology*, 139 (3): 1007-1013 pp.
- Kapdan I.K. and Kargi F.,** 2006, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme Microbial Technology*, 38(5):569–582 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kapdan, I., Kargi, F., Oztekin, R. and Argun, H.,** 2009, Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter sp.*, International Journal of Hydrogen Energy , 34(5):2201-2207 pp.
- Kern, M., Klipp, W. and Klemme, J.H.,** 1994, Increased nitrogenase dependent H₂ photoproduction by hup mutants of *Rhodospirillum rubrum*, Applied Environmental Microbiology, 60(6): 1786-1774 pp.
- Keskin, T, Abo-Hashes M. and Hallenbeck, P.C.,** 2011, Photofermentative hydrogen production from wastes, Bioresource Technology, 102: 8552-8568 pp.
- Keskin, T., Guisti, L., and Azbar, N.,** 2012, Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture system, International Journal of Hydrogen Energy, 37(2): 1418-1424pp .
- Keskin, T., Aksöyek, E., and Azbar, N.,** 2011, Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed materials of ceramic ring and pumice stone, International Journal of Hydrogen Energy, 36:15160-15167pp.
- Keskin, T., Akboncuk, M.B. and Azbar, N.,** 2013, A novel immobilization method for photo-fermentative hydrogen production, Biofuels, *In press*
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li,L. and Sung, S.,** 2004, Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, International Journal of Hydrogen Energy, 29,1123-1131.
- Kim, M.S., Ahn, J.H. and Yoon, Y.S.,** 2004, Photo-biological hydrogen production by the uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*, In Miyake, J., Igarashi, Y and Rogner M (eds.). Biohydrogen III. Oxford, UK, Elsevier Ltd., pp. 45–55 pp.
- Koku, H., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L.,** 2002, Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*, International Journal of Hydrogen Energy , 27:1315–1329 pp.
- Koku, H., Gunduz, U., Yucel, M. and Turker, L.,** 2003. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter Sphaeroides* O.U.001., International Journal of Hydrogen Energy, 28: 381–388pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kondo, T., Arakawa, M., Wakayama, T. and Miyake, J.,** 2002, Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1303–1308 pp.
- Kondo, T., Wakayama, T. and Miyake, J.,** 2006, Efficient hydrogen production using a multi-layered photobioreactor and a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 1522–1526 pp.
- Kraemer, J.T. and Bagley, D.M.,** 2005, Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle, *Environmental Science and Technology*, 39(10):3819–3825 pp.
- Kumar, N. and Das, D.,** 2000, Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process Biochemistry*, 35:589–593 pp.
- Kumar, N. and Das, D.,** 2001, Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices, *Enzyme Microbiology and Technology*, 29:280–287 pp.
- Kyazze, G., Martinez-Perez, N., Dinsdale, R., Premier, G.C., Hawkes, F.R., Guwy, A.J. and Hawkes, D.L.,** 2006, Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production, *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5):971–979 pp.
- Lay, J.J., Fan, K.S., Chang, I.J. and Ku, C.H.,** 2003, Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, 28: 1361–1367pp.
- Lee, K.S., Wu, J.F., Lo, Y.S., Lo, Y.C., Lin, P.J. and Chang, J.S.,** 2004, Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*. 87:648–657pp.
- Leitea, J.A.C., Fernandes, B.S., Pozzi, E., Barboza, M. and Zaiat, M.,** 2008, Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 579-586 pp.
- Li, R.Y. and Fang, H.H.P.,** 2009, Heterotrophic photo fermentative hydrogen production, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 39(12): 1081-1108 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liang, T.M., Cheng, S.S. and Wu K.L.,** 2002, Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1157–1165pp.
- Liao, Q., Wang, Y.J. , Wang, Y. Z., Zhu, X., Tian, X. and Li, J.,** 2010, Formation and hydrogen production of photosynthetic bacterial biofilm under various illumination conditions, *Bioresource Technology*, 101: 5313-5324pp.
- Lin, C.Y., Chang, C.C. and Hung, C.H.,** 2008, Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:2445–2453 pp.
- Lin, C.Y., Chang, C.C. and Hung, C.H.,** 2008. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:2445–2453 pp.
- Lin, C.Y. and Chen, H.P.,** 2006, Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(7):953–960 pp.
- Lin, C.Y., Lee, C.Y., Tseng, I.C. and Shiao, I.Z.,** 2006, Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora, *Process Biochemistry*, 41(4):915–919pp.
- Liu, B.F., Ren, N.Q., Xie, G.J., Ding, J., Guo, W.Q. and Xing, D.F.,** 2010, Enhanced bio-hydrogen production by the combination of dark and photo-fermentation in batch culture. *Bioresource Technology*, 101: 5325–5329pp.
- Liu, C., Shi, W., Kim, M., Yang, Y., Lei, Z. and Zhang, Z.,** 2013, Photocatalytic pretreatment for the redox conversion of waste activated sludge to enhance biohydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 7246-7252pp.
- Lo, Y.C., Chen, C.Y., Lee, C.M. and Chang, J.S.,** 2010, Sequential dark-photo fermentation and autotrophic microalgal growth for high yield and CO₂ free biohydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10944-10953 pp.
- Logan, B.E., Oh, S.E., Kim, I.S. and Van Ginkel, S.,** 2002, Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers, *Environmental Science and Technology*, 36(11):2530–2535 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lozinsky, V.I. and Plieva, F.M.**, 1998, Polyvinylalcohol cryogels employed as matrices for cell immobilization, overview of recent research and developments, *Enzyme Microbial Technology*, 23:227–242 pp.
- Mahyudin, A.R., Furutani, Y., Nakashimada, Y., Kakizono, T. and Nishio, A.**, 1997 Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4):358–363 pp.
- Manish, S. and Banerje, R.**, 2008, Comparison of biohydrogen production processes *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 279-286 pp.
- Manish, S., Venkatesh, K.V. and Banerjee, R.**, 2007, Metabolic flux analysis of biological hydrogen production by *Escherichia coli*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:3820–3830 pp.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I. and Lee, Y.C.**, 2005, Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format, *Analytic Biochemistry*, 339 (1):69–72pp.
- Melis, A. and Happe, T.**, 2001, Hydrogen production green algae as a source of energy, *Plant Physiology*, 127: 740–748pp.
- Melis, A., Neidhardt, J. and Benemann, J.R.**, 1999, *Dunaliella salina* (chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Physiology*, 10: 515–25pp.
- Melis, A.**, 2009, Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 177: 272–280pp.
- Melis, A. and Melnicki, M.R.**, 2006, Integrated biological hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 1563-1573 pp.
- Miyake, J., Tomizuka, N. and Kamibayashi, A.**, 1982, Prolonged photo-hydrogen production by *Rhodospirillum rubrum*, *Journal of Fermentation Technology*, 60: 199–203pp.
- Mohan, S.V., Babu, V.L. and Sarma, P.N.**, 2008, Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate, *Bioresource Technology*, 99 : 59-67pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mu, Y., Wang, G. and Yu, H.Q.,** 2006, Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures, *Bioresource Technology*, 97(11):1302–1307pp.
- Mu, Y., Wang, G. and Yu, H.Q.,** 2006, Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7):905–913 pp.
- Mu Y., Yu H. And Wang G.,** 2007, Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40: 947-953 pp.
- Nakada, E., Asada, Y., Arai, T., and Miyake, J.,** 1995, Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80:53–57pp.
- Nandi, R. and Sengupta, S.,** 1998, Microbial production of hydrogen: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1):61–84 pp.
- Nath, K, Muthukumar, M., Kumar, A. and Das, D.,** 2008, Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:1195–1203 pp.
- Nath, K. and Das, D.,** 2009, Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17): 7497-7501 pp.
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G. and Lyberatos, G.,** 2010, Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review, *Waste Biomass Valorisation*, 1:21-39 pp.
- Oh, Y.K., Seol, E.H., Kim, M.S. and Park, S.,** 2004, Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4, *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 1115–1121 pp.
- Ooshima, H., Takakuwa, S., Katsuda, T., Okuda, M., Shirasawa, T., Azuma, M. and Kato, J.,** 1998, Production of hydrogen by a hydrogenase deficient mutant of *Rhodobacter Capsulatus*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(5): 470-475 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D. and Angelidaki, I.,** 2008, High-rate continuous hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 immobilized on heat-pretreated methanogenic granules, International Journal of Hydrogen Energy, 33:6498–6508 pp.
- O-Thong S., Prasertsan P. and Birkeland N.,** 2009, Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis, Bioresource Technology, 100: 909-918pp.
- Özgür, E., Uyar, B., Öztürk, Y., Yücel, M., Gündüz, U. and Eroglu, I.,** 2010, Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures, Resource Conservation and Recycling, 54:310-314 pp.
- Özgür, E., Afsar, N., Vrije, T., Yücel, M., Gündüz, U., Claassen, P. and Eroglu, I.,** 2010, Potential use of thermophilic dark fermentation effluents in photofermentative hydrogen production by *Rhodobacter Capsulatus*, Journal of Cleaner Production, 18, 23-28 pp.
- Pan, C.M., Fan, Y.T., Zhao, P. and Hou, H.W.,** 2008, Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii*, International Journal of Hydrogen Energy, 33:5383–5391 pp.
- Parascandola, P., Branduardi, P. and Alteriis, E.,** 2006, PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production, Enzyme and Microbial Technology, 38: 184–189 pp.
- Park, W., Hyun, S.H., Oh, S.E., Logan, B.E. and Kim, I.S.,** 2005, Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. Environmental Science and Technology, 39(12):4416–4420 pp.
- Perrera, K.R.J. and Nirmalakhandan, N.,** 2012, Net energy gain from solid organic wastes by dark fermentation and its end products, International Journal of Hydrogen Energy, 37: 16460-16465pp.
- Polle, J.E.W., Kanakagiri, S., Melis, A. and Tlal, L.,** 2003, A DNA Insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size, Planta, 217: 49–59pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D.J., Guo, W. and Zhu, Y.,** 2008, Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, International Journal of Hydrogen Energy, 33:6124–6132 pp.
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B.E., Zhao, L., Xie, T. and Zhao, X.,** 2007, Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production, Environmental Microbiology, 9: 1112-1125 pp.
- Sabourin-Provost, G. and Hallenbeck, P.C.,** 2009, High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation, Bioresource Technology, 100(14):3513-3517 pp.
- Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. and Soucaille, P.,** 2001. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose–glycerol mixtures, Journal of Bacteriology, 183(5):1748–1754 pp.
- Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y. and Logan, B.E.,** 2006, Inhibition of biohydrogen production by ammonia, Water Research, 40(6):1167–1172 pp.
- Sasikala, K., Ramana, C.H.V. and Subrahmanyam, M.,** 1991, photoproduction of hydrogen from wastewater of a lactic acid fermentation plant by a purple non-sulphur bacterium. *Rhodobacter Sphaeroides* O.U. 001, Indian Journal of Experimental Biology, 129: 74-75.
- Sawayama, S., Rao, K. K. and Hall, D.O.,** 1998, Immobilization of *Rhodobacter capsulatus* on cellulose beads and water treatment using a photobioreactor, Journal of Fermentation and Bioengineering, 86(5) :517-521 pp.
- Schlieker M. and Vorlop K.D.,** 2006, A novel immobilization method for Entrapment in LentiKats, In: Immobilization of enzyme and cells, 2nd edition, Editor: Jose M Guisan, Humana Press, Totowo, New Jersey.
- Seifert, K., Waligorska, M. and Laniecki, M.,** 2010, Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater, International Journal of Hydrogen Energy, 35: 9624-9629pp.
- Sekoai, P.T. and Kana E.B.G.,** 2013, A two-stage modelling and optimization of biohydrogen production from a mixture of agro-municipal waste, International Journal of Hydrogen Energy, 39: 1-7pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shi, X.Y. and Yu, Q.H.**, 2006, Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodopseudomonas capsulata*, International Journal of Hydrogen Energy, 31:1641–1647 pp.
- Shin, H.S., Youn, J.H. and Kim, S.H.**, 2004, Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. International Journal of Hydrogen Energy, 29:1355–1363 pp.
- Sinha, P. and Pandey, A.**, 2011 An evaluative report and challenges for fermentative hydrogen production, International Journal of Hydrogen Energy, 36:7460-7478pp.
- Speece, R.E.**, 1996, Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters, Archae Press ,
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. and Cen, K.**, 2009, Combination of dark and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency, International Journal of Hydrogen Energy, 34: 8846-8853 pp.
- Tabita, F.R.**, 1995, The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer, Dordrecht, pp 885-914 pp.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunchiers, R. and Lindblad, P** , 2002, Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Research, 66, 1–20pp.
- Tanisho, S.**, 2000, A strategy for improving the yield of hydrogen by fermentation. In: Mao ZQ, Veziroglu TN (eds) Hydrogen Energy Progress XIII, vol 1, Beijing, China, 370–374 pp.
- Tanisho, S., Kuromoto, M. and Kadokura, N.**, 1998, Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation, International Journal of Hydrogen Energy, 23:559–563 pp.
- Tao, Y. , He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W. and Zhou, Z.**, 2008, Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment, International Journal of Hydrogen Energy, 33:963-973 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tian, X., Liao, Q., Liu, W., Wang, Y.Z., Zhu, X., Li, J. and Wang, H.,** 2009, Photo-hydrogen production rate of a PVA-Boric acid gel granule containing immobilized photosynthetic bacteria cells, *International Journal of Hydrogen Energy*. 34: 4708–4717pp.
- Tian, X., Liao, Q., Zhu, X., Wang, Y. Z., Zhang P., Li, J. and Wang, H.,** 2010, Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production, *Bioresource Technology*. 101: 977–983pp.
- Tsygankov, A.A., Hirata, Y., Miyake, M., Asada, Y. and Miyake, J.,** 1994, Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77:575–578pp.
- Ueno, Y., Otsuka, S. and Morimoto, M.,** 1996, Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82:194–197 pp.
- Uyar, B., Eroglu I., Yücel, M., Gündüz, U. and Türker L.,** 2007, Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 4670 – 4677pp.
- Uyar, B., Eroglu, I., Yucel, M. and Gunduz, U.,** 2009, Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:1417–1423pp.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Carmona-Martinez, A., Munoz- Paez, K.M. and Poggi-Varaldo, H.M.,** 2006, Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace, *Environmental Science and Technology*, 40(10):3409–3415 pp.
- Van Andel, J.G., Zoutberg, G.R., Crabbendam, P.M. and Breure, A.M.,** 1985, Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23:21–26 pp.
- Van Ginkel, S.W., Oh, S.E. and Logan, B.E.,** 2005, Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters, *International Journal of Hydrogen Energy* 30(15):1535–1542 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, B., Li, Y., Ren, N.,** 2013, Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38:4361-4367pp.
- Wang, J. and Wan, W.,** 2008, Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12):2934-2941pp.
- Wang, Y. Z., Liao, Q., Zhu, X. Tian, X. and Zhang, C.,** 2010, Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodopseudomonas Palustris* CQK in an immobilized cell photobioreactor, *Bioresource Technology*, 101:4034-4041 pp.
- Webb, C. and Dervakos, G.A.,** 1996, *Studies in Viable Cell Immobilization*, ed: R. G. Landes Company, United Kingdom, 1-24pp.
- Wicher, E., Seifert, K., Zagrodnik, R., Pietrzyk, B. and Laniecki. M.,** 2013, Hydrogen gas production from distillery wastewater by dark fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 7767-7773pp.
- Wu, S., Lin, C, Chang, J., Lee, K., Lin, P.,** 2002, Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge, *Biotechnology Progress*, 18 (5): 921-926pp.
- Wu S., Lin C, Chang J. and Chang J.,** 2005, Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer, *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1375-1381pp.
- Wu, K. and Chang, J.,** 2007, Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix, *Process Biochemistry*, 42: 279-284pp.
- Wunschiers, R. and Linblad, P.,** 2002 Hydrogen in education-a biological approach, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27 (11) :1131-1140pp.
- Xing, D. , Shaoancheng Y., Regan J., and Logan B.,** 2008, Electricity generation by *Rhodopseudomonas palustris* DX-1, *Environmental Science and Technology*, 42:4146–4151 pp.
- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W. and Zhang, H.,** 2002, Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12) :1359–1365 pp.
- Yu, H. and Mu, Y.,** 2006, Biological hydrogen production in a UASB Reactor With granules. II: Reactor performance in 3-year operation, *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (5): 988-995pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang, C., Zhu, X. Liao, Q., Wang, Y. , Li, J. Ding, Y. and Wang, H.,** 2010, Performance of a groove-type photobioreactor for hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 5284-92 pp.
- Zhang, J.J., Li, X.Y., Oh, S.E. and Logan, B.E.,** 2004, Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production, *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7):854–860 pp.
- Zhang, Z., Tay, J., Show, K., Yan, R., Liang, D., Lee, D. and Jiang, W.,** 2007, Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor, *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:185-191pp.
- Zhang Z., Show K, Tay J., Liang D. and Lee D.,** 2008, Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors—A comparison of biofilm-based and granule-based systems *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:1559-1564 pp.
- Zheng, X.J. and Yu, H.Q.,** 2005, Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures, *Journal of Environmental Management*, 74(1):65–70 pp.
- Zheng, H., Zeng, R. and Angelidaki, I.,** 2008, Biohydrogen production from glucose in upflow biofilm reactors with plastic carriers under extreme thermophilic conditions (700 °C), *Biotechnology and Bioengineering*, 100:1034-1038pp.
- Zhu, H., Suzuki, T., Tsygankov, A.A., Asada, Y. and Miyake, J.,** 1999, Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized agar gels. *International Journal of Hydrogen Energy*, 24: 305–310pp.
- Zhu, D., Wang, G., Qiao, H. and Cai, J.,** 2008, Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 6116–6123 pp.
- Zhu, H.G., Wakayama, T., Asada, Y. and Miyake, J.,** 2001, Hydrogen production by four cultures with participation by anoxygenic phototrophic bacterium and anaerobic bacterium in the presence of NH_4^+ , *International Journal of Hydrogen Energy*, 26:1149–1154 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhu, H. and Beland, M.,** 2006, Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge, International Journal of Hydrogen Energy, 31(14): 1980-1988pp.
- Zorin, N.A.,** 1986, Redox properties and active center of phototrophic bacteria hydrogenases. 68: 97-101 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU 1982 yılında Eskişehir’de doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Eskişehir’de tamamlamıştır. 2000 yılında Eskişehir Fatih Fen Lisesi’nden, 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünden mezun olmuştur. 2007 yılında ikinci üniversite programı kapsamında Anadolu Üniversite’si İşletme bölümünü bitirmiştir. 2004-2007 yılları arasında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nde Prof. Dr. Nuri Azbar danışmanlığında “Karasuyun Biyolojik Parçalanabilirliğinin Ortak Besi Maddesi Etkisi ile İyileştirilmesi” başlıklı yüksek lisans tezini tamamlamıştır. 2007 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü doktora programına kabul edilmiştir ve 2010 yılında aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamıştır.

SCI Yayınları

- Keskin Tuğba, Akboncuk Müjde Burcu, Azbar Nuri (2013).”Anovel immobilization method for photo-fermantative hydrogen production” Biofules, *In press*
- Keskin Tuğba, Tutuk Fatih, Azbar Nuri (2012).”Effect of Pretreatment on the enhancement of biodegradation of olive mill effluent for treatment in an anaerobic cross-flow filter reactor” Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 26 (1):23-29.
- Keskin Tuğba, Hallenbeck Patrick (2012). “Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermantation” Bioresource Technology, 112: 131-136.
- Keskin Tuğba, Laura Giusti, Azbar Nuri (2012). “Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture”- International Journal of Hydrogen Energy.37(2):1418-1424
- Keskin Tuğba, Aksöyek Elif, Azbar Nuri (2011). “Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed materials of ceramic ring and pumice stone”- International Journal of Hydrogen Energy, 36(23): 15160-15167.
- Keskin Tuğba, Abo-Hashesh Mona, Hallenbeck Patrick C. (2011). Photofermantative Hydrogen Production from Wastes”- Bioresource Technology. 102 (18): 8557-8568. (review paper)
- Keskin Tuğba, Azbar Nuri (2010). “A Screening Methodology for AOP Selection as Pre-Treatment in The Anaerobic Degradation of Olive Mill Effluent”-Fresenius Environmental Bulletin. 19 (12): 3209-3216.

- Azbar Nuri, Tutuk Fatih, Keskin Tuğba (2009). 'Effect of Organic Loading Rate on the Performance of an Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor Treating Olive Mill Effluent' - Biotech. Bioprocess. Eng. Journal, 14:99-104.
- Azbar Nuri, Dokgoz Fatos Tuba, Keskin Tuğba, Eltem Rengin, Korkmaz Kemal Sami, Gezgin Yüksel, Akbal Zeynep, Oncel Suphi, Dalay Conk Meltem (2009). 'Comparative Evaluation of Bio-Hydrogen Production From Cheese Whey Wastewater Under Thermophilic and Mesophilic Anaerobic Conditions' - International Journal of Green Energy, 6: 192-200.
- Azbar Nuri, Cetinkaya Dokgoz Fatos Tuba, Keskin Tuğba, Korkmaz Kemal Sami, Syed Hamid (2009). 'Continuous Fermentative Hydrogen Production From Cheese - Whey Wastewater Under Thermophilic Anaerobic Conditions'- International Journal of Hydrogen Energy , 34:7441-7447.
- Azbar Nuri, Tutuk Fatih, Keskin Tuğba (2009): 'Biodegradation Performance of an Anaerobic Hybrid Reactor Treating Olive - Mill Effluent Under Various Organic Loading Rates'- International Biodeterioration & Biodegradation, 63:690-698.
- Azbar Nuri, Keskin Tuğba, Cokay Catalkaya Ebru (2008). 'Improvement in Anaerobic Degradation of Olive Mill Effluent (OME) by Chemical Pretreatment Using Batch Systems'- Biochemical Engineering Journal, 38:379-383.
- Azbar Nuri, Keskin Tuğba, Çatalkaya Ebru (2008). 'Improvement in Anaerobic Degradation of Olive Mill Effluent (OME) by Pre-Treatment Using H₂O₂, UV-H₂O₂ And Fenton's Process'- Int. J. of Green Energy, Vol.5: 189-198.
- Azbar Nuri, Keskin Tuğba, Yuruyen Aysegul (2008). 'Enhancement of Biogas Production from Olive Mill Effluent (OME) by Co-Digestion, Biomass & Bioenergy, 32:1195-1201.

KİTAP BÖLÜMÜ

-Keskin Tugba, Hallenbeck Patrick C. (2012) "Enhancement of Biohydrogen Production by Two-Stage Systems: Dark and Photofermentation" In: Biomass Conversion -The Interface of Biotechnology, Chemistry and Materials Science- Editors: Chinnappan Baskar, Shikha Baskar and Ranjit S. Springer.

EKLER

Ek 1 KOİ Kalibrasyon Grafiği

Ek 2 Toplam Şeker Kalibrasyon Grafiği

Ek 3 Pompa Akış Hızı Kalibrasyon Grafiği

Ek 4 VFA Kalibrasyon Grafikleri

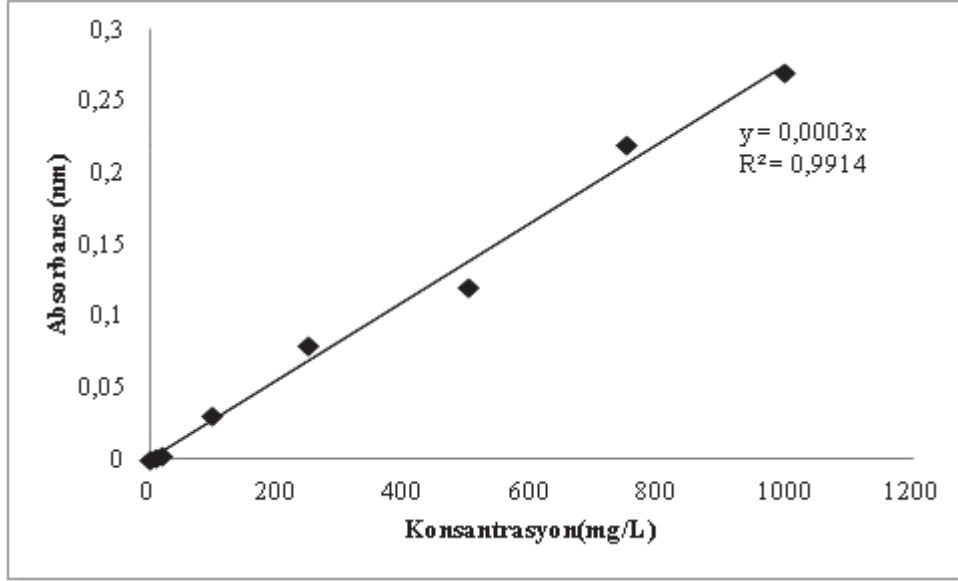
Ek 5 GC Kalibrasyon Grafikleri

Ek 6 Karanlık Fermantasyon Kesikli Reaktörler İstatistiksel Analizler
(Program Çıktıları)

Ek 7 Karanlık Fermantasyon Sürekli Reaktörler İstatistiksel Analizler
(Program Çıktıları)

Ek 8 Hesaplamalar

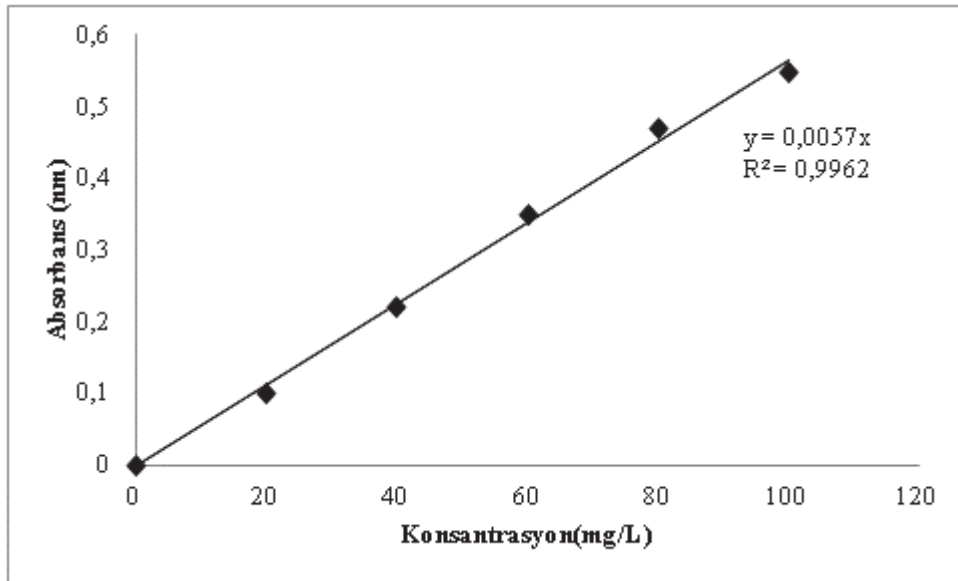
Ek 1 KOİ Kalibrasyon Grafiği



Şekil Ek 1. Örnek KOİ kalibrasyon grafiği

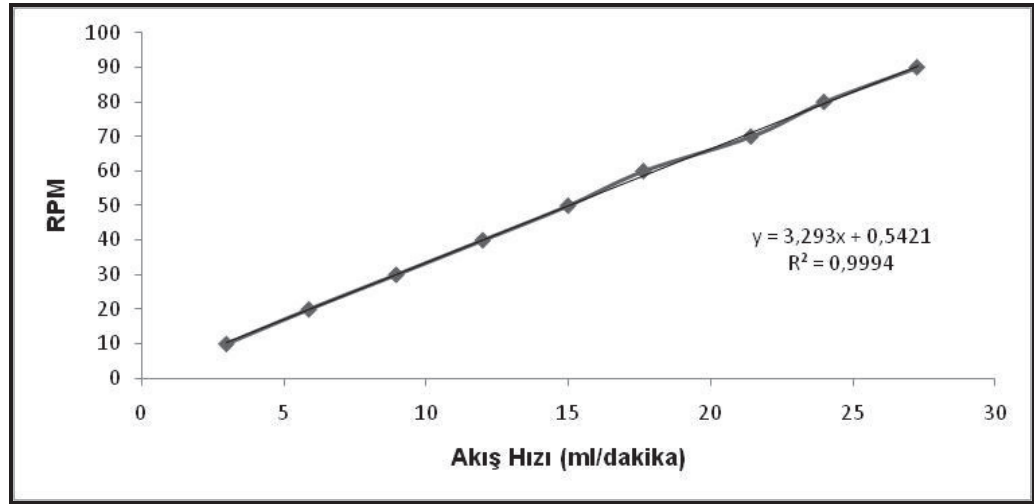
Ek 2 Toplam Şeker Kalibrasyon Grafiği

Örnek Toplam Şeker Standart Eğrileri



Şekil Ek 2. Toplam şeker standart grafiği

Ek 3 Pompa Akış Hızı Kalibrasyon Grafiği

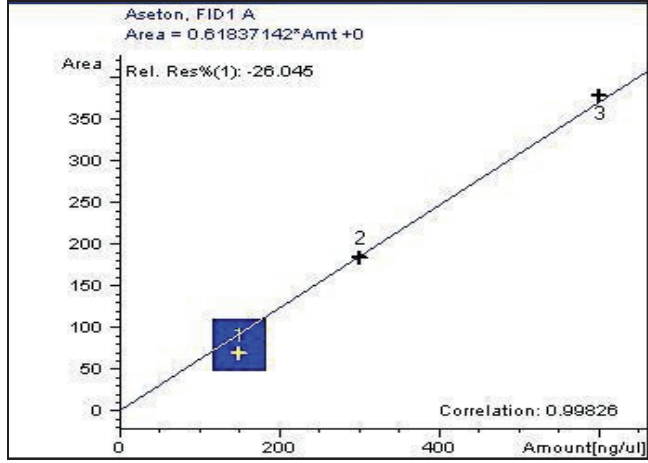


Şekil Ek 3. Pompa akış hızının standart grafiği

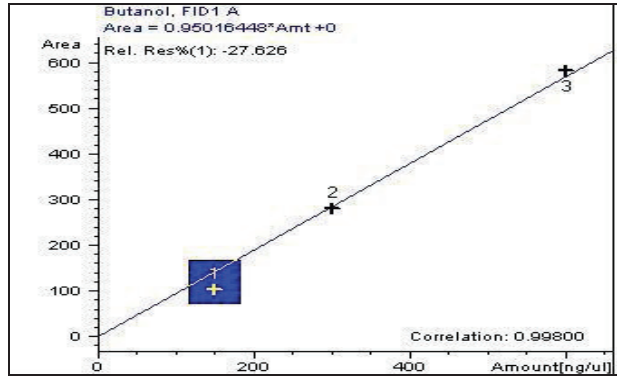
Ek 4 VFA Kalibrasyon Grafikleri

Çizelge Ek 1. VFA kalibrasyon dataları

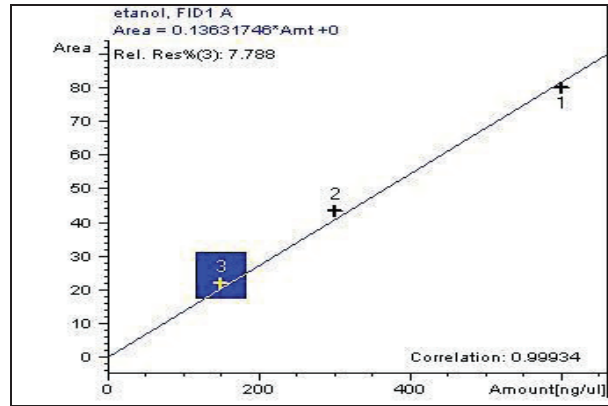
#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ng/ul]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD	#
1	1.519	FID1 A	Aseton	1	150.000	68.598	2.187	No	No	
				2	300.000	184.020	1.630			
				3	600.000	377.810	1.588			
2	1.942	FID1 A	etanol	3	150.000	22.040	6.806	No	No	
				2	300.000	43.400	6.912			
				1	600.000	80.140	7.487			
3	5.856	FID1 A	Butanol	1	150.000	103.150	1.454	No	No	
				2	300.000	281.000	1.068			
				3	600.000	581.970	1.031			
4	10.928	FID1 A	Hac	1	150.000	7.461	20.104	No	No	
				2	300.000	13.333	22.500			
				3	600.000	24.278	24.714			
5	12.061	FID1 A	Hpr	1	185.000	10.258	18.035	No	No	
				2	370.000	22.343	16.560			
				3	740.000	42.745	17.312			
6	12.486	FID1 A	HBut	1	220.000	14.598	15.071	No	No	
				2	440.000	34.284	12.834			
				3	880.000	66.569	13.219			
7	13.632	FID1 A	IsoBut	1	220.000	15.168	14.504	No	No	
				2	440.000	34.110	12.900			
				3	880.000	66.383	13.256			
8	14.445	FID1 A	IsoVal	1	25.500	18.718	1.362	No	No	
				2	51.000	44.571	1.144			
				3	102.000	87.418	1.167			
9	15.361	FID1 A	HVal	1	25.500	19.152	1.331	No	No	
				2	51.000	44.024	1.158			
				3	102.000	86.243	1.183			
10	15.990	FID1 A	IsoCap	1	29.000	23.005	1.261	No	No	
				2	58.000	53.702	1.080			
				3	116.000	105.300	1.102			
11	16.339	FID1 A	HCap	1	29.000	23.642	1.227	No	No	
				2	58.000	55.236	1.050			
				3	116.000	107.750	1.077			
12	17.066	FID1 A	Hepta	1	32.500	26.607	1.222	No	No	
				2	65.000	63.249	1.028			
				3	130.000	122.750	1.059			



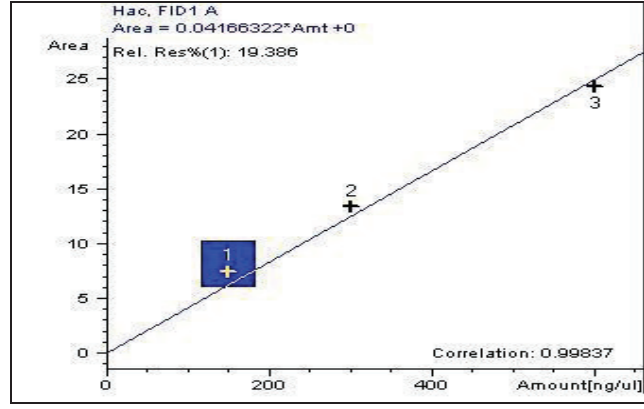
Şekil Ek 4. Aseton kalibrasyon grafiği



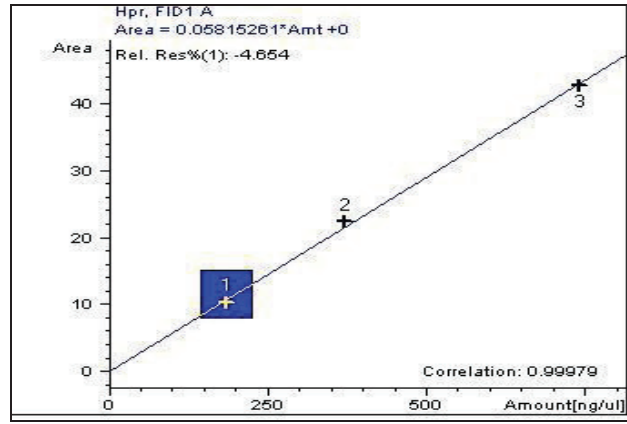
Şekil Ek 5. Bütanol kalibrasyon grafiği



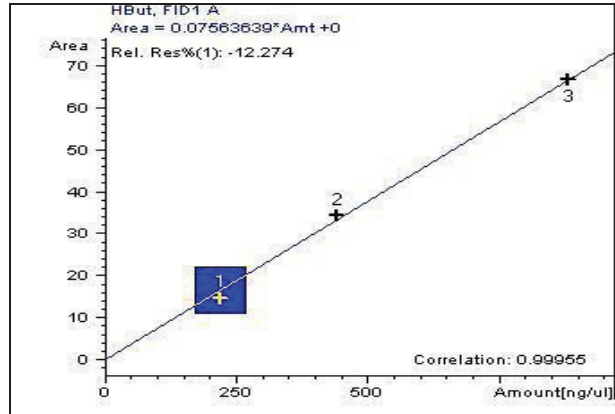
Şekil Ek 6. Etanol kalibrasyon grafiği



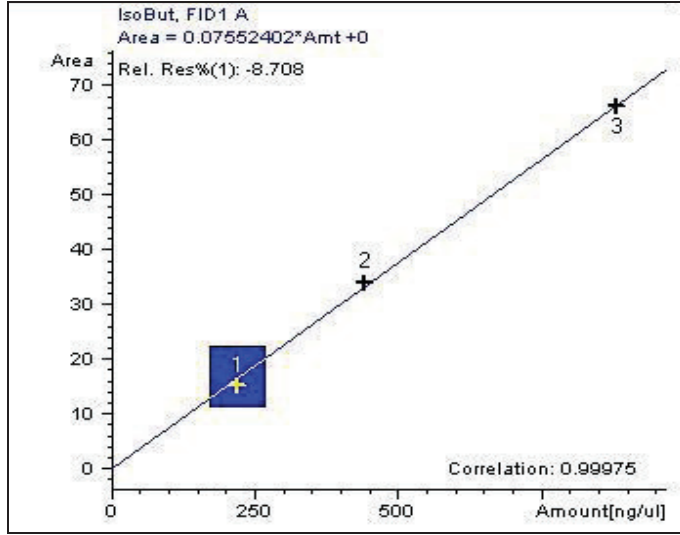
Şekil Ek 7. Asetik asit (HAc) kalibrasyon grafiği



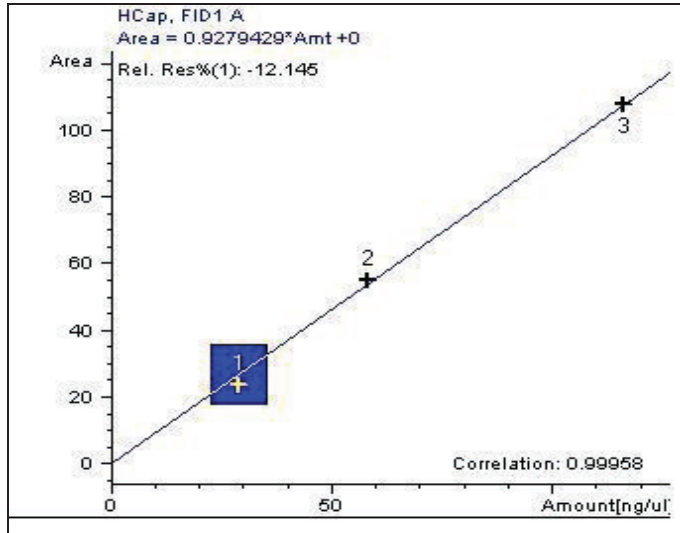
Şekil Ek 8. Propiyonik asit (HPr) kalibrasyon grafiği



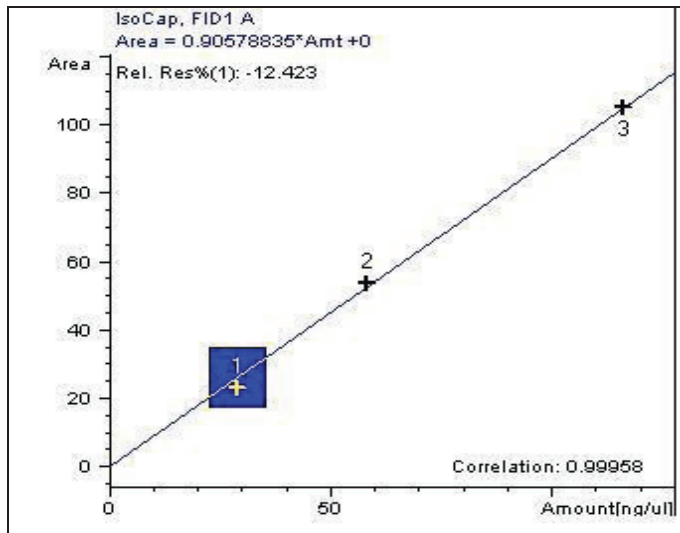
Şekil Ek 9. Bütirik asit (HBut) kalibrasyon grafiği



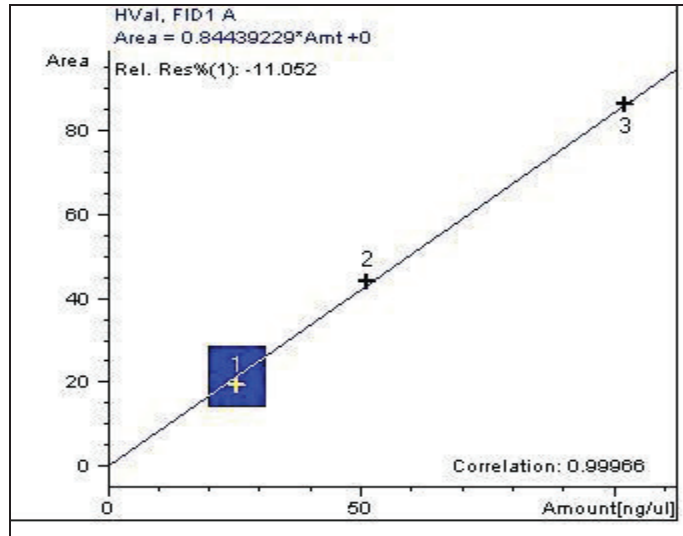
Şekil Ek 10. İzobütirik asit (IsoBut) kalibrasyon grafiği



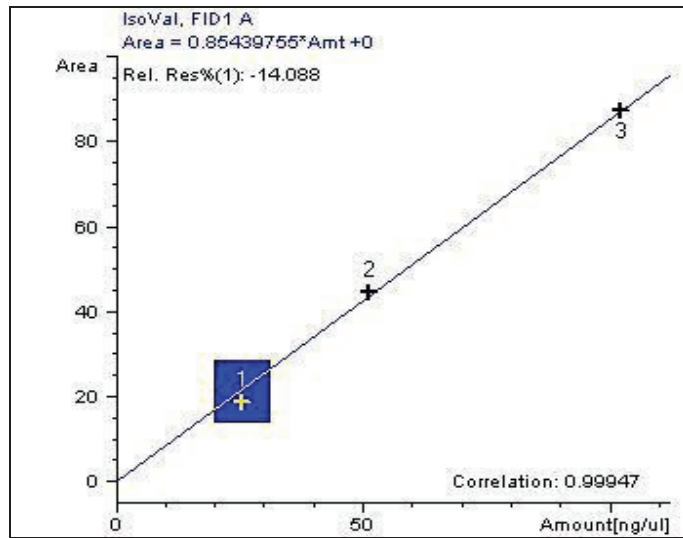
Şekil Ek 11. Kapriyoik asit (HCap) kalibrasyon grafiği



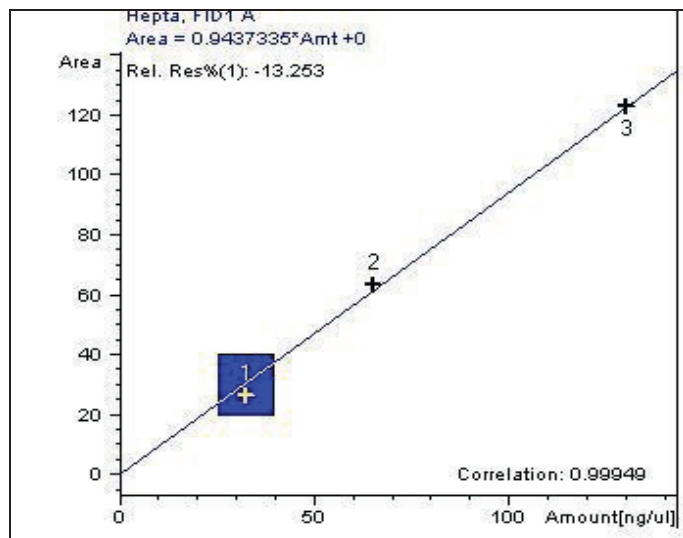
Şekil Ek 12. İzokaproik asit (IsoCap) kalibrasyon grafiği



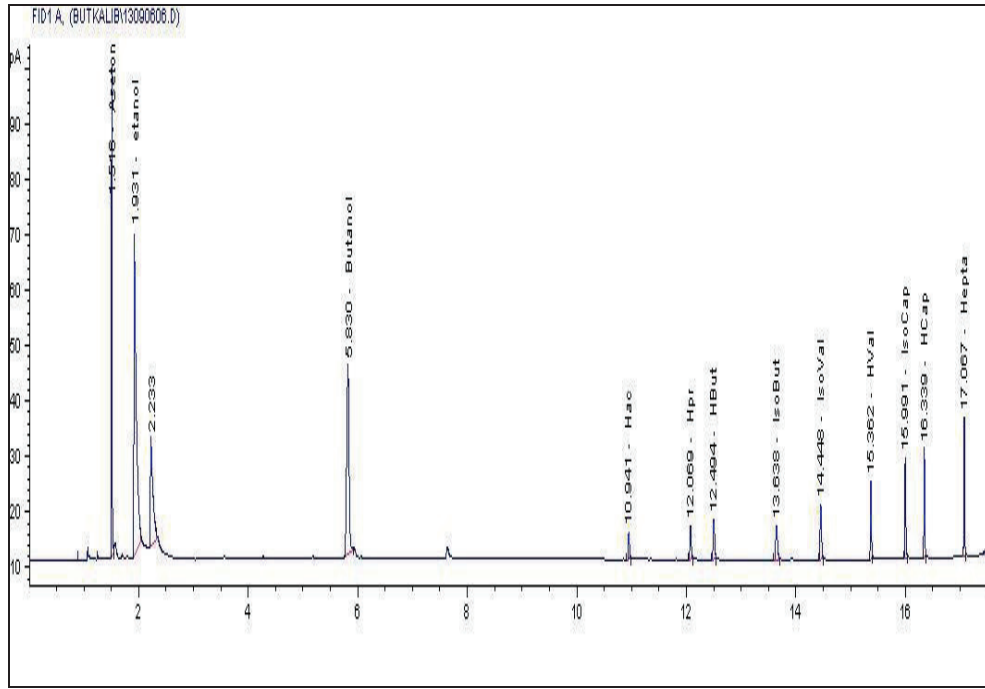
Şekil Ek 13. Valerik asit (HVal) kalibrasyon grafiği



Şekil Ek 14. İzovalerik asit (IsoVal) kalibrasyon grafiği



Şekil Ek 15. Heptanoik asit (Hepta) kalibrasyon grafiği

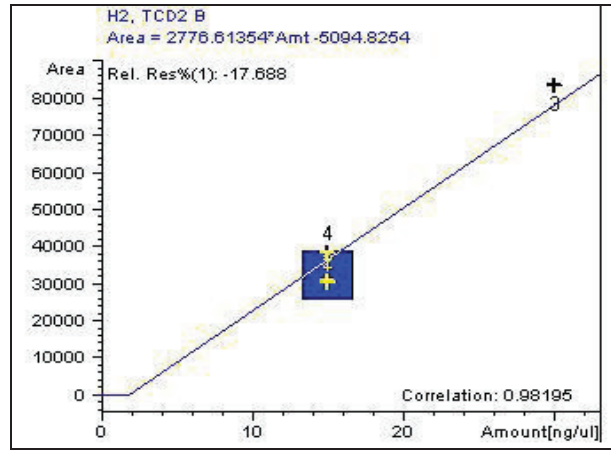


Şekil Ek 16. Uçucu yağ asitleri kalibrasyon pikleri

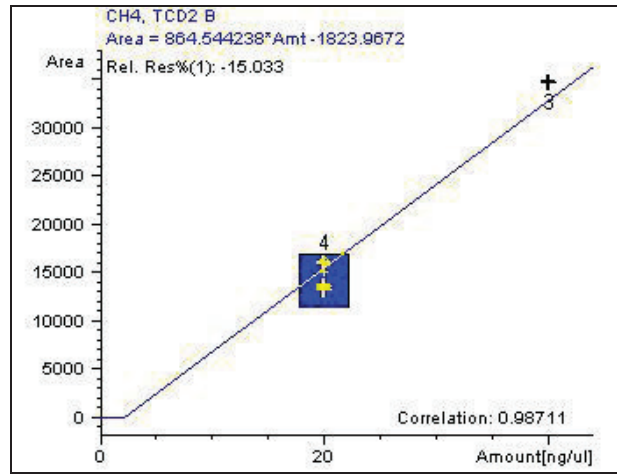
Ek 5 GC Kalibrasyon Grafikleri

Çizelge Ek 2. Gaz kalibrasyonu tablosu

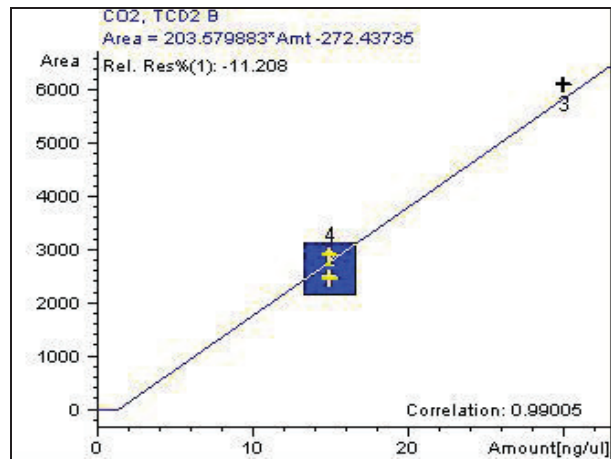
#	RT	Signal	Compound	Rsp.Factor	Ref	RsRf	#	Ref.Amount
1	0.410	TCD2 B	H2	4.9853e-4	No	No	0	15.000
				4.8471e-4				15.000
				3.9024e-4				15.000
				3.6015e-4				30.000
2	0.860	TCD2 B	CH4	1.5219e-3	No	No	0	20.000
				1.4678e-3				20.000
				1.2512e-3				20.000
				1.1567e-3				40.000
3	1.974	TCD2 B	CO2	6.0740e-3	No	No	0	15.000
				6.1562e-3				15.000
				5.1853e-3				15.000
				4.9121e-3				30.000



Şekil Ek 17. H₂ kalibrasyon grafiği



Şekil Ek 18. CH₄ kalibrasyon grafiği



Şekil Ek 19. CO₂ kalibrasyon grafiği

Ek 6 Karanlık Fermantasyon Kesikli Reaktörler İstatistiksel Analiz Değerlendirmeleri

Box-behnken deneme sonuçları regresyon yöntemi ile Design Expert 7.0 Trial Version programında değerlendirilmiştir.

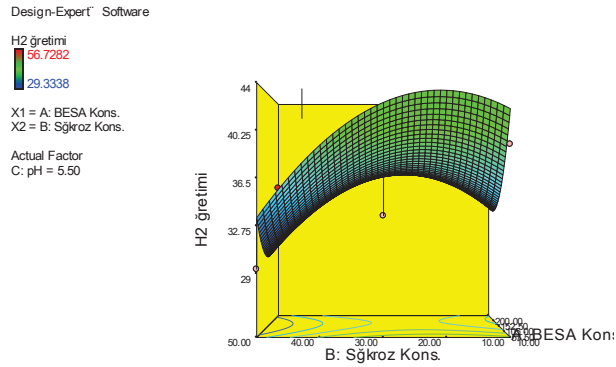
BESA Ön İşlemlili Biyokütle ile Substrat Olarak Sükrozdan Kesikli Biyoreaktörlerde Hidrojen Üretiminin Box-Behnken Analiz Sonuçları

Hidrojen Üretimi Bakımından Sonuçlar

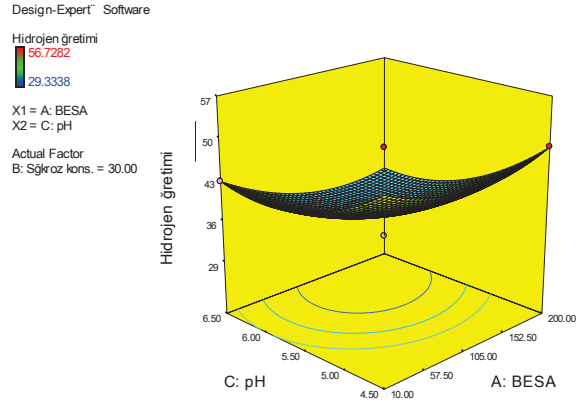
Optimizasyon Formülü:

$$R^2=0.70$$

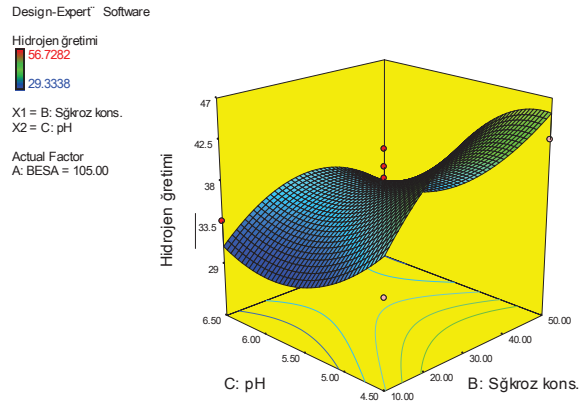
$$\begin{aligned} H_2 \text{ üretimi} = & +201.59234 - 0.051192 * \text{BESA Kons.} - 0.37805 * \text{Sükroz Kons.} - \\ & 50.92306 * \text{pH} + 9.47234E-004 * \text{BESA Kons.} * \text{Sükroz Kons.} - 0.013664 * \\ & \text{BESA Kons.} * \text{pH} + 0.15846 * \text{Sükroz Kons.} * \text{pH} + 3.72140E-004 * \text{BESA} \\ & \text{Kons.}^2 - 0.011951 * \text{Sükroz Kons.}^2 + 3.89538 * \text{pH}^2 \end{aligned}$$



Şekil Ek 20. Sükroz ve BESA konsantrasyonlarının H_2 üretimine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 21. pH ve BESA konsantrasyonlarının H_2 üretimine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 22. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın ve BESA konsantrasyonlarının H_2 üretimine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

Optimizasyon Sonuçları:

BESA Kons.	Sükroz Kons.	pH	H_2 üretimi	Desirability
<u>10.0</u>	<u>14.40</u>	<u>4.50</u>	<u>52.713</u>	<u>0.853</u>

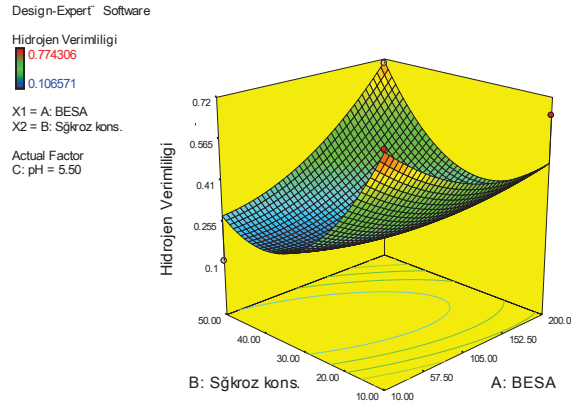
Hidrojen Verimliliği Bakımından Sonuçlar

Hidrojen verimliliği ($\text{mol } H_2/\text{mol sükroz}$) bakımından sonuçlar değerlendirildiğinde $0.85 R^2$ değeri ile elde edilen optimizasyon formülü aşağıdaki gibidir. Optimizasyon formülünde maksimum ve minimum değerler arasında kalması koşuluyla uygun değerler yerine koyularak tahmini bir hidrojen verimliliği değeri hesaplanabilir.

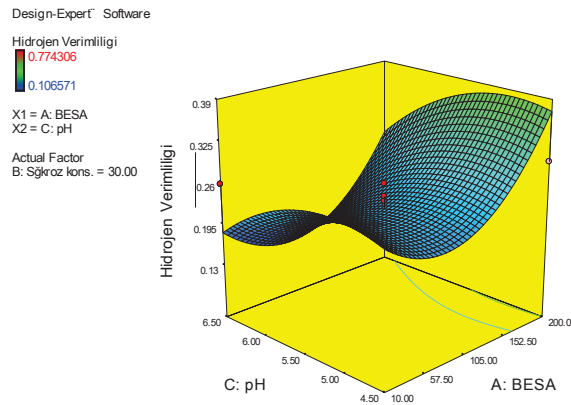
Optimizasyon Formülü

$$R^2=0.85$$

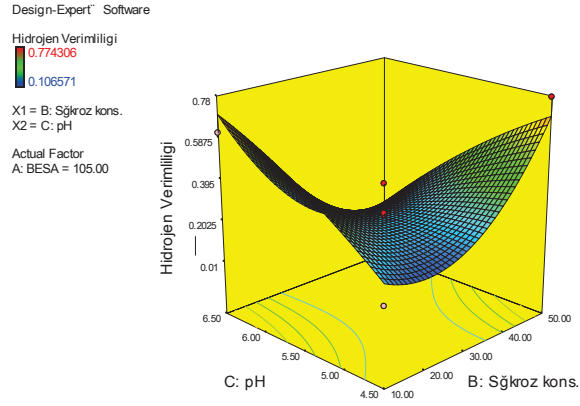
$$\begin{aligned} \text{Hidrojen Verimliliği} = & -2.38443 - 3.65244\text{E-}003 * \text{BESA} + 0.032369 * \text{Sükroz} \\ & \text{kons.} + 0.88827 * \text{pH} + 8.58351\text{E-}005 * \text{BESA} * \text{Sükroz kons.} - 8.27350\text{E-}005 * \\ & \text{BESA} * \text{pH} - 0.014211 * \text{Sükroz kons.} * \text{pH} + 9.86947\text{E-}006 * \text{BESA}^2 + 5.73170\text{E-} \\ & 004 * \text{Sükroz kons.}^2 - 0.045149 * \text{pH}^2 \end{aligned}$$



Şekil Ek 23. Sükroz ve BESA konsantrasyonlarının hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 24. BESA konsantrasyonu ve pH 'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 25. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

Optimizasyon Önerileri

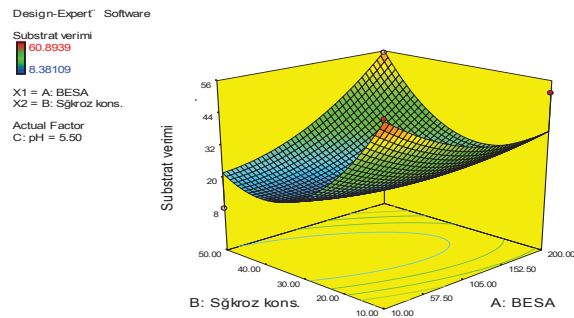
BESA	Sükroz kons.	pH	Hidrojen Verimliliği	Desirability
<u>196.01</u>	<u>49.90</u>	<u>5.02</u>	<u>0.841598</u>	<u>1.000</u>

Substrat Verimi Bakımından Sonuçlar

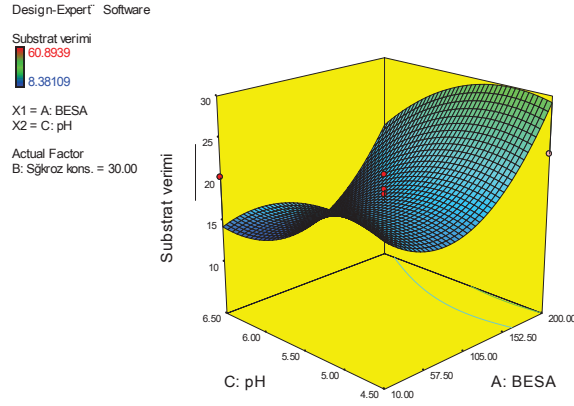
Optimizasyon Formülü

R=0.85

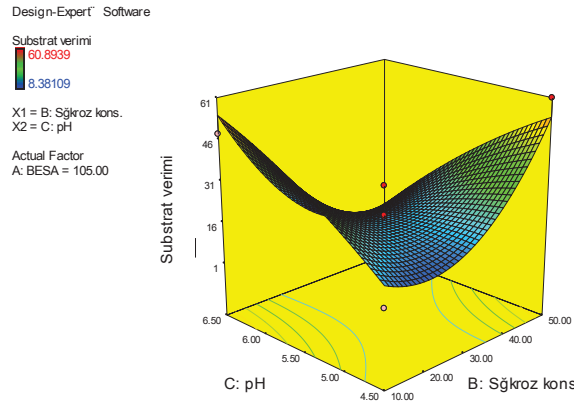
Substrat verimi = $-187.51930 - 0.28724 * \text{BESA} + 2.54560 * \text{Sükroz kons.} + 69.85682 * \text{pH} + 6.75035\text{E-}003 * \text{BESA} * \text{Sükroz kons.} - 6.50655\text{E-}003 * \text{BESA} * \text{pH} - 1.11759 * \text{Sükroz kons.} * \text{pH} + 7.76168\text{E-}004 * \text{BESA}^2 + 0.045076 * \text{Sükroz kons.}^2 - 3.55065 * \text{pH}^2$



Şekil Ek 26. Sükroz ve BESA konsantrasyonlarının substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 27. BESA konsantrasyonu ve pH'nın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 28. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

Optimizasyon Önerileri

BESA	Sükroz kons.	pH	Substrat verimi	Desirability
<u>196.07</u>	<u>49.93</u>	<u>4.83</u>	<u>70.4802</u>	<u>1.000</u>

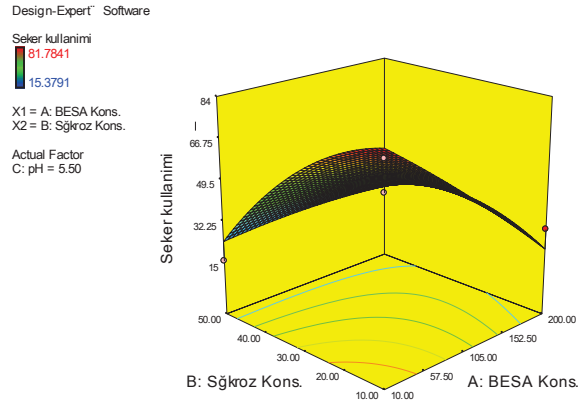
Şeker Kullanımı Bakımından Sonuçlar

Optimizasyon Formülü

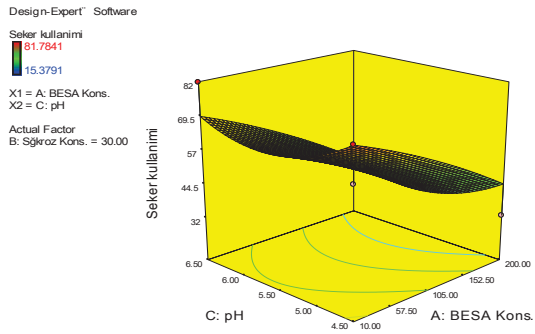
$$R^2=0.88$$

$$\text{Şeker kullanımı} = +389.24496 - 0.35224 * \text{BESA Kons.} - 0.98409 * \text{Sükroz Kons.} - 101.42390 * \text{pH} + 8.40860E-003 * \text{BESA Kons.} * \text{Sükroz Kons.} - 2.99854E-003 *$$

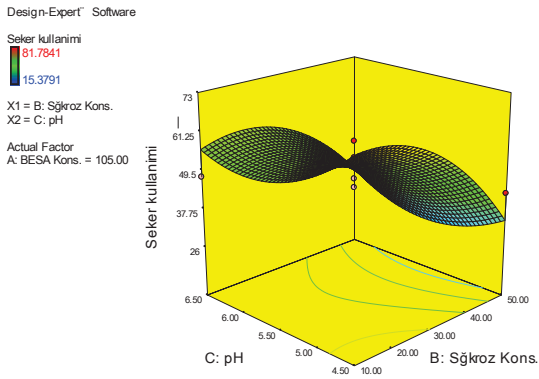
$$\text{BESA Kons.} * \text{pH} + 0.17181 * \text{Sükroz Kons.} * \text{pH} - 2.14848\text{E-}004 * \text{BESA Kons.}^2 - 0.025521 * \text{Sükroz Kons.}^2 + 8.51877 * \text{pH}^2$$



Şekil Ek 29. Sükroz ve BESA konsantrasyonlarının şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 30. BESA konsantrasyonu ve pH'nın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 31. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak BESA muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

Optimizasyon Önerileri

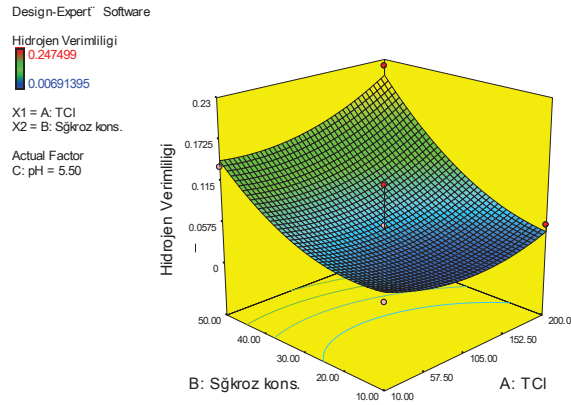
BESA Kons.	Sükroz Kons.	pH	Seker kullanimi	Desirability
<u>17.30</u>	<u>19.74</u>	<u>4.54</u>	<u>86.9389</u>	<u>1.000</u>

TCl Ön İşlemlili Biyokütle ile Substrat Olarak Sükrozdan Kesikli Biyoreaktörlerde Hidrojen Verimliliği Bakımından

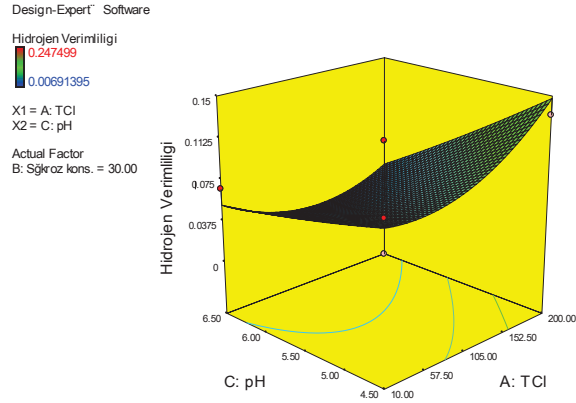
Optimizasyon Formülü

$$R^2=0.91$$

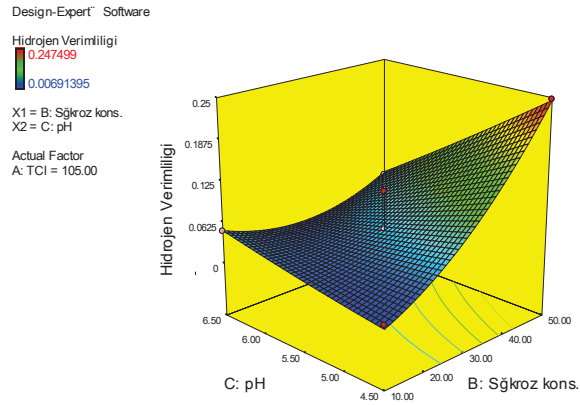
$$\begin{aligned} \text{Hidrojen Verimliliği} = & -0.24188 + 3.54845\text{E-}004 * \text{TCl} + 0.013024 * \text{Sükroz} \\ & \text{kons.} + 0.044963 * \text{pH} + 9.05993\text{E-}006 * \text{TCl} * \text{Sükroz kons.} + 1.86669\text{E-}004 * \text{TCl} * \\ & \text{pH} - 2.85051\text{E-}003 * \text{Sükroz kons.} * \text{pH} + 2.58545\text{E-}006 * \text{TCl}^2 + 1.0899\text{E-}005 * \\ & \text{Sükroz kons.}^2 + 2.36702\text{E-}003 * \text{pH}^2 \end{aligned}$$



Şekil Ek 32. Sükroz ve TCl konsantrasyonlarının hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 33. TCI konsantrasyonu ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak TCI muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 34. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak TCI muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

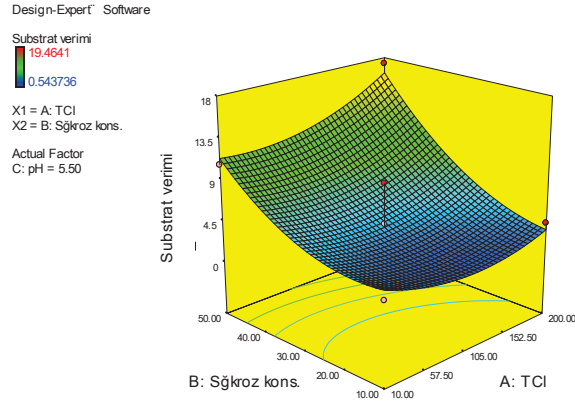
TCI	Sükroz kons.	pH	Hidrojen Verimliliği	Desirability
<u>186.56</u>	<u>49.04</u>	<u>4.80</u>	<u>0.263394</u>	<u>1.000</u>

Substrat Verimi

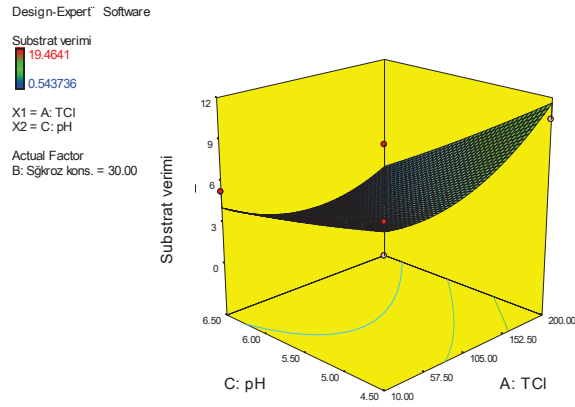
Optimizasyon Formülü

$$R^2=0.91$$

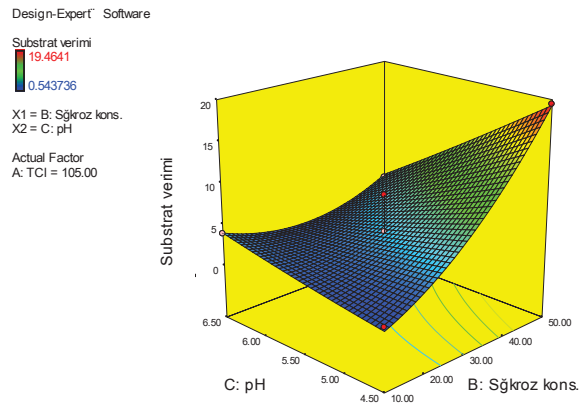
$$\text{Substrat verimi} = -19.02222 + 0.027906 * \text{TCI} + 1.02427 * \text{Sükroz kons.} + 3.53606 * \text{pH} + 7.12503\text{E-}004 * \text{TCI} * \text{Sükroz kons.} - 0.014680 * \text{TCI} * \text{pH} - 0.22417 * \text{Sükroz kons.} * \text{pH} + 2.03328\text{E-}004 * \text{TCI}^2 + 6.37717\text{E-}003 * \text{Sükroz kons.}^2 + 0.18615 * \text{pH}^2$$



Şekil Ek 35. TCl ve Sükroz konsantrasyonlarının substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 36. TCl konsantrasyonu ve pH'nın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



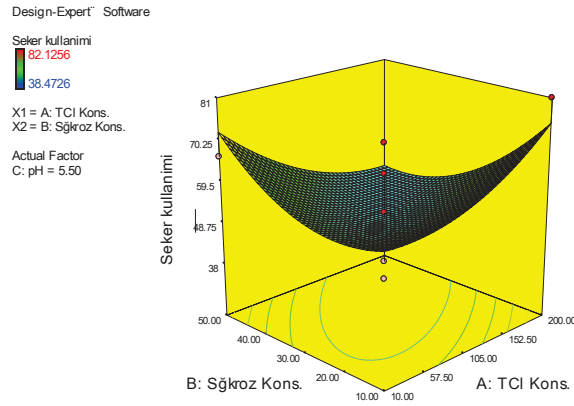
Şekil Ek 37. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak TCl muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

TCI	Sükroz kons.	pH	Substrat verimi	Desirability
<u>198.58</u>	<u>46.75</u>	<u>4.81</u>	<u>19.8425</u>	<u>1.000</u>

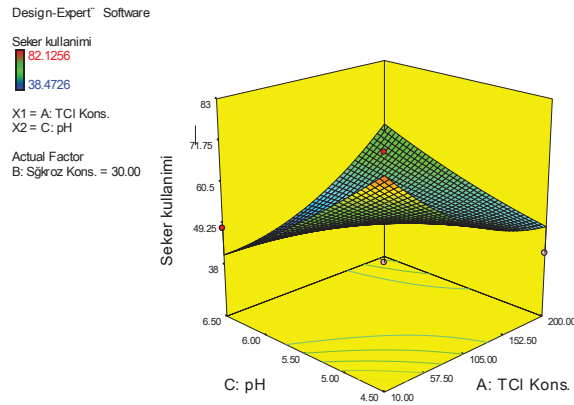
Seker Kullanımı

$$R^2=0.72$$

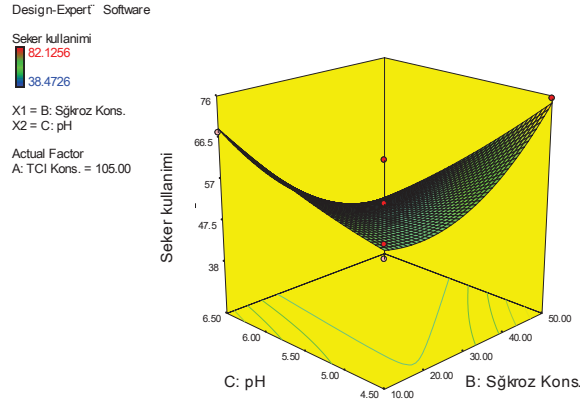
Şeker kullanımı = +114.41248 - 0.73819 * TCI Kons. + 2.55330 * Sükroz Kons. - 17.09894 * pH - 5.09054E-003 * TCI Kons. * Sükroz Kons. + 0.13623 * TCI Kons. * pH - 0.59716 * Sükroz Kons. * pH + 6.18723E-004 * TCI Kons.² + 0.019225 * Sükroz Kons.² + 1.41856 * pH²



Şekil Ek 38. Sükroz ve TCI konsantrasyonlarının şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak TCI muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 39. TCI konsantrasyonu ve pH'nın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak TCI muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 40. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak TCI muamelesi görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

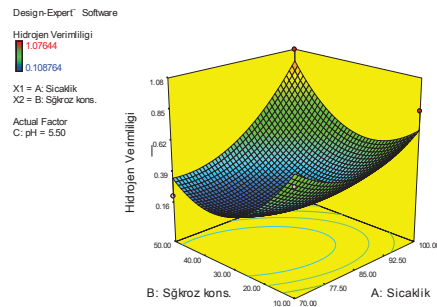
TCI Kons.	Sükroz Kons.	pH	Seker Kullanımı	Desirability
<u>10.00</u>	<u>50.00</u>	<u>5.17</u>	<u>82.5509</u>	<u>0.632</u>

Isıl Ön İşlemlili Biyokütle ile Substrat Olarak Sükrozdan Kesikli Biyoreaktörlerde Hidrojen Üretiminin Box-Behnken Analiz Sonuçları

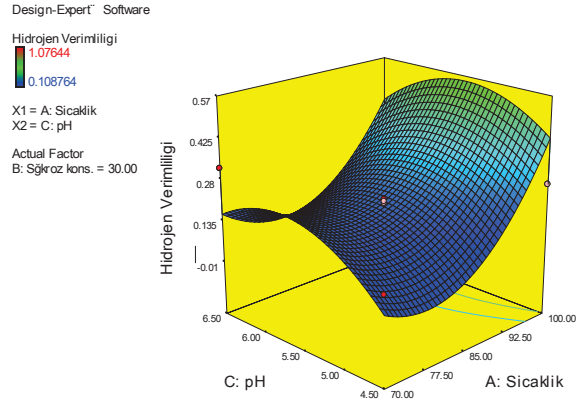
Hidrojen Verimliliği

$$R^2=0.89$$

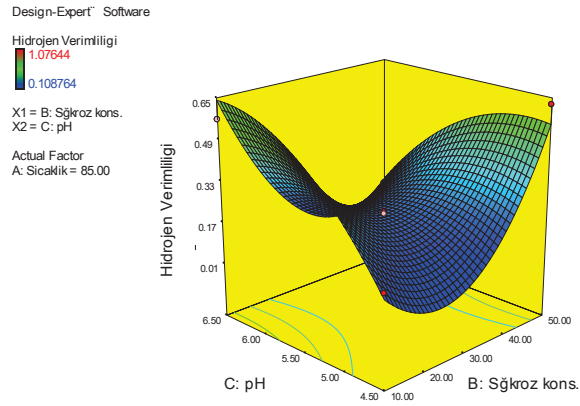
$$\begin{aligned} \text{Hidrojen Verimliliği} = & +0.27676 - 0.13449 * \text{Sicaklık} - 0.027606 * \text{Sükroz} \\ & \text{kons.} + 2.01869 * \text{pH} + 5.38124\text{E-}004 * \text{Sicaklık} * \text{Sükroz kons.} - 2.22838\text{E-}003 * \\ & \text{Sicaklık} * \text{pH} - 0.011465 * \text{Sükroz kons.} * \text{pH} + 8.30641\text{E-}004 * \\ & \text{Sicaklık}^2 + 7.32879\text{E-}004 * \text{Sükroz kons.}^2 - 0.13267 * \text{pH}^2 \end{aligned}$$



Şekil Ek 41. Sükroz konsantrasyonu ve sıcaklığın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıl işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 42. Sıcaklık ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 43. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın hidrojen verimliliğine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

Optimizasyon Önerileri

Sıcaklık	Sükroz kons	pH	Hidrojen Verimliliği	Desirability
<u>100.00</u>	<u>49.92</u>	<u>4.83</u>	<u>1.08402</u>	<u>1.000</u>

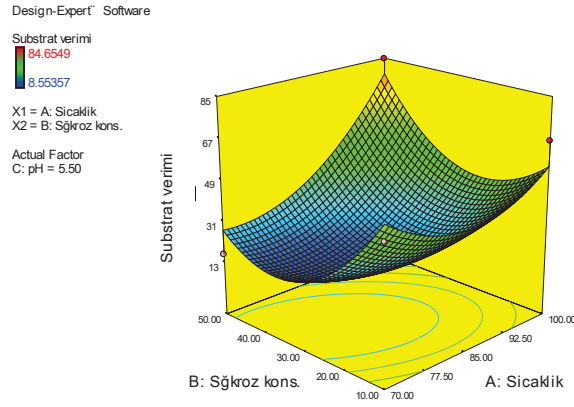
Substrat Verimi

Optimizasyon Formülü

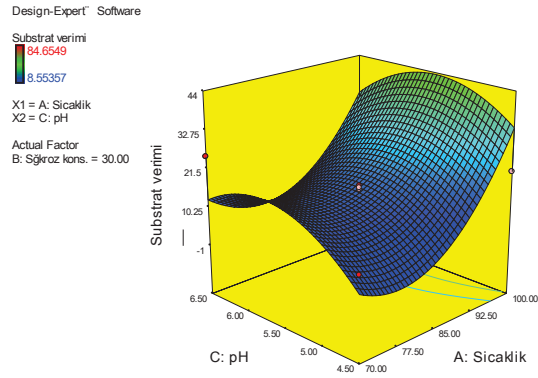
$$R^2=0.89$$

$$\text{Substrat verimi} = +21.76522 - 10.57640 \cdot \text{Sıcaklık} - 2.17103 \cdot \text{Sükroz kons.} + 158.75610 \cdot \text{pH} + 0.042320 \cdot \text{Sıcaklık} \cdot \text{Sükroz kons.} - 0.17525 \cdot \text{Sıcaklık}$$

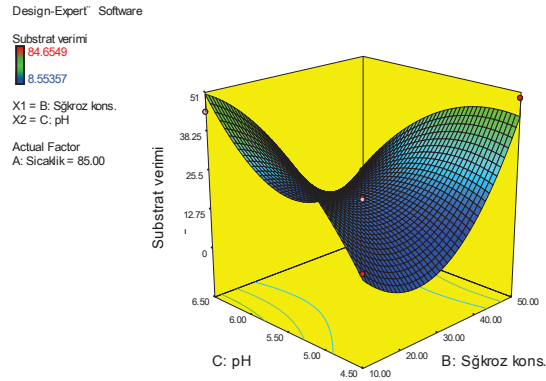
$$* \text{pH} - 0.90161 * \text{Sükroz kons.} * + 0.065324 * \text{Sıcaklık}^2 + 0.057636 * \text{Sükroz kons.}^2 - 10.43322 * \text{pH}^2$$



Şekil Ek 44. Sükroz konsantrasyonu ve sıcaklığın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 45. Sıcaklık ve pH'nın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

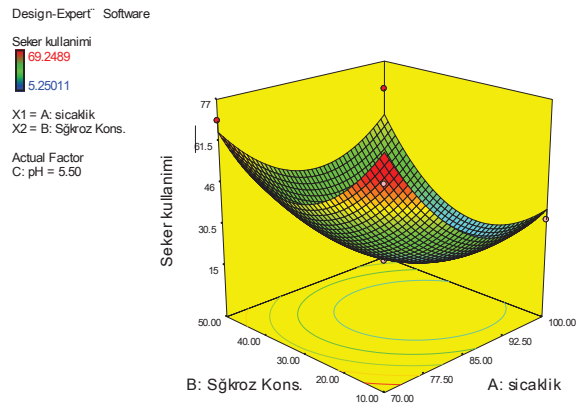


Şekil Ek 46. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın substrat verimine etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

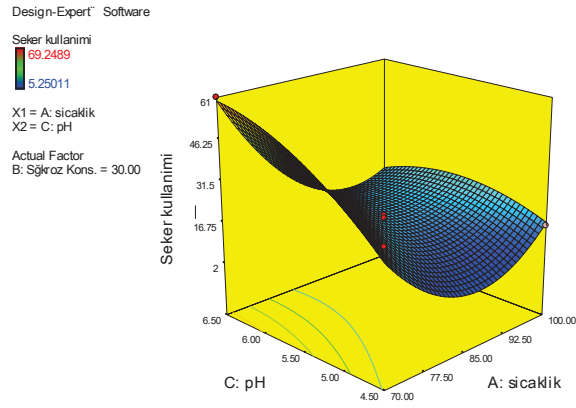
Şeker Kullanımı

$$R^2=0.92$$

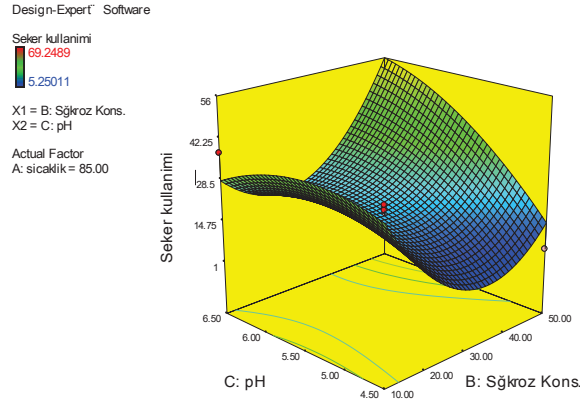
$$\begin{aligned} \text{Seker kullanimi} = & +380.50075 - 12.53945 * \text{sicaklik} - 8.47415 * \text{Sükroz} \\ & \text{Kons.} + 111.29217 * \text{pH} + 0.024811 * \text{sicaklik} * \text{Sükroz Kons.} - 0.55278 * \text{sicaklik} \\ & * \text{pH} + 0.58604 * \text{Sükroz Kons.} * \text{pH} + 0.082439 * \text{sicaklik}^2 + 0.054056 * \text{Sükroz} \\ & \text{Kons.}^2 - 6.61860 * \text{pH}^2 \end{aligned}$$



Şekil Ek 47. Sükroz konsantrasyonu ve sıcaklığın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 48. Sıcaklık ve pH'nın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)



Şekil Ek 49. Sükroz konsantrasyonu ve pH'nın şeker kullanımına etkisi (Ön işlem olarak ısıtılmış işlem görmüş biyokütle ve substrat olarak sükroz)

sicaklik	Sükroz Kons.	pH	Seker kullanimi	Desirability
70	<u>49.57</u>	<u>5.78</u>	<u>70.8349</u>	<u>1.000</u>

Ek 7 Karanlık Fermantasyon Sürekli Reaktörler İstatistiksel Analiz Program Çıktıları

HRT 24 SAAT

ANOVA

H2 (mL/gün)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3923615,902	3	1307871,967	46,428	,000
Within Groups	1126805,022	40	28170,126		
Total	5050420,924	43			

Multiple Comparisons

H₂ (mL/gün)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	28,1050000	66,6252871	,974	-150,478707	206,688707
	pomza taşı	242,1109700*	68,5202228	,006	58,448040	425,773900
	cstr	...	73,4797528	,000	-856,094750	-462,181650
seramik halka	seramik top	-28,1050000	66,6252871	,974	-206,688707	150,478707
	pomza taşı	214,0059700*	73,3343921	,028	17,439048	410,572892
	cstr	...	77,9883722	,000	-896,284740	-478,201660
pomza taşı	seramik top	...	68,5202228	,006	-425,773900	-58,448040
	seramik halka	...	73,3343921	,028	-410,572892	-17,439048
	cstr	...	79,6133045	,000	-1114,646210	-687,852130
cstr	seramik top	659,1382000*	73,4797528	,000	462,181650	856,094750
	seramik halka	687,2432000*	77,9883722	,000	478,201660	896,284740
	pomza taşı	901,2491700*	79,6133045	,000	687,852130	1114,646210

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT= 6 saat

ANOVA

H₂ (mL/gün)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	346430,136	3	115476,712	24,957	,000
Within Groups	92542,080	20	4627,104		
Total	438972,216	23			

Multiple Comparisons

H₂ (mL/gün)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	77,7857818	39,7167700	,237	-33,378924	188,950488
	pomza taşı	181,5555418*	36,6887806	,000	78,865985	284,245099
	cstr	324,5957818*	39,7167700	,000	213,431076	435,760488
seramik halka	seramik top	-77,7857818	39,7167700	,237	-188,950488	33,378924
	pomza taşı	103,7697600	45,6310947	,138	-23,948764	231,488284
	cstr	246,8100000*	48,0993971	,000	112,182855	381,437145
pomza taşı	seramik top	...	36,6887806	,000	-284,245099	-78,865985
	seramik halka	-103,7697600	45,6310947	,138	-231,488284	23,948764
	cstr	143,0402400*	45,6310947	,025	15,321716	270,758764
cstr	seramik top	...	39,7167700	,000	-435,760488	-213,431076
	seramik halka	...	48,0993971	,000	-381,437145	-112,182855
	pomza taşı	...	45,6310947	,025	-270,758764	-15,321716

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=3 SAAT

ANOVA

H2 (mL/gün)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	476686,461	3	158895,487	4,619	,013
Within Groups	688038,307	20	34401,915		
Total	1164724,769	23			

Multiple Comparisons

H2 (mL/gün)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	-3,0454067	95,7801864	1,000	-271,128039	265,037226
	pomza taşı	147,7306833	119,7252330	,613	-187,372608	482,833974
	cstr	376,5930333*	119,7252330	,024	41,489742	711,696324
seramik halka	seramik top	3,0454067	95,7801864	1,000	-265,037226	271,128039
	pomza taşı	150,7760900	109,7299885	,529	-156,351149	457,903329
	cstr	379,6384400*	109,7299885	,012	72,511201	686,765679
pomza taşı	seramik top	-147,7306833	119,7252330	,613	-482,833974	187,372608
	seramik halka	-150,7760900	109,7299885	,529	-457,903329	156,351149
	cstr	228,8623500	131,1524216	,328	-138,224913	595,949613
cstr	seramik top	...	119,7252330	,024	-711,696324	-41,489742
	seramik halka	...	109,7299885	,012	-686,765679	-72,511201
	pomza taşı	-228,8623500	131,1524216	,328	-595,949613	138,224913

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=1.5 SAAT

ANOVA

H2 (mL/gün)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	693624,338	3	231208,113	14,049	,000
Within Groups	263320,998	16	16457,562		
Total	956945,336	19			

Multiple Comparisons

H₂ (mL/gün)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	-130,5375467	77,6816552	,365	-352,786303	91,711210
	pomza taşı	110,5858400	81,1358426	,539	-121,545416	342,717096
	cstr	393,9387200*	86,0575568	,002	147,726343	640,151097
seramik halka	seramik top	130,5375467	77,6816552	,365	-91,711210	352,786303
	pomza taşı	241,1233867*	77,6816552	,031	18,874630	463,372143
	cstr	524,4762667*	82,8089226	,000	287,558296	761,394237
pomza taşı	seramik top	-110,5858400	81,1358426	,539	-342,717096	121,545416
	seramik halka	...	77,6816552	,031	-463,372143	-18,874630
	cstr	283,3528800*	86,0575568	,021	37,140503	529,565257
cstr	seramik top	...	86,0575568	,002	-640,151097	-147,726343
	seramik halka	...	82,8089226	,000	-761,394237	-287,558296
	pomza taşı	...	86,0575568	,021	-529,565257	-37,140503

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

H₂ ORANLARI

HRT=24 SAAT

ANOVA

H₂ (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1785,819	3	595,273	2,107	,114
Within Groups	11585,149	41	282,565		
Total	13370,968	44			

Multiple Comparisons

H2 (%)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	14,4513939	6,6727306	,150	-3,415641	32,318429
	pomza taşı	9,8271667	6,8625143	,487	-8,548037	28,202370
	cstr	14,2253333	7,0875743	,202	-4,752495	33,203162
seramik halka	seramik top	-14,4513939	6,6727306	,150	-32,318429	3,415641
	pomza taşı	-4,6242273	7,3446684	,922	-24,290456	15,042001
	cstr	-,2260606	7,5553796	1,000	-20,456494	20,004372
pomza taşı	seramik top	-9,8271667	6,8625143	,487	-28,202370	8,548037
	seramik halka	4,6242273	7,3446684	,922	-15,042001	24,290456
	cstr	4,3981667	7,7235051	,941	-16,282442	25,078776
cstr	seramik top	-14,2253333	7,0875743	,202	-33,203162	4,752495
	seramik halka	,2260606	7,5553796	1,000	-20,004372	20,456494
	pomza taşı	-4,3981667	7,7235051	,941	-25,078776	16,282442

HRT=12 SAAT

ANOVA

H2 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1374,179	3	458,060	9,326	,000
Within Groups	2112,076	43	49,118		
Total	3486,255	46			

Multiple Comparisons

H2 (%)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	2,7178974	2,6557201	,737	-4,379308	9,815103
	pomza taşı	-7,6042692	2,9479005	,062	-15,482304	,273766
	cstr	-10,8607692*	3,0390580	,005	-18,982415	-2,739123
seramik halka	seramik top	-2,7178974	2,6557201	,737	-9,815103	4,379308
	pomza taşı	-10,3221667*	2,8611786	,004	-17,968444	-2,675890
	cstr	-13,5786667*	2,9550125	,000	-21,475708	-5,681626
pomza taşı	seramik top	7,6042692	2,9479005	,062	-,273766	15,482304
	seramik halka	10,3221667*	2,8611786	,004	2,675890	17,968444
	cstr	-3,2565000	3,2201502	,744	-11,862101	5,349101
cstr	seramik top	10,8607692*	3,0390580	,005	2,739123	18,982415
	seramik halka	13,5786667*	2,9550125	,000	5,681626	21,475708
	pomza taşı	3,2565000	3,2201502	,744	-5,349101	11,862101

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=6 SAAT

ANOVA

H2 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1504,409	3	501,470	6,927	,002
Within Groups	1375,476	19	72,393		
Total	2879,885	22			

Multiple Comparisons

H2 (%)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	16,6806818*	4,9678553	,016	2,711837	30,649526
	pomza taşı	-,3458182	4,5891082	1,000	-13,249684	12,558048
	cstr	-11,9418182	5,5418746	,172	-27,524716	3,641080
seramik halka	seramik top	-16,6806818*	4,9678553	,016	-30,649526	-2,711837
	pomza taşı	-17,0265000*	5,7076312	,035	-33,075480	-,977520
	cstr	-28,6225000*	6,4984240	,002	-46,895068	-10,349932
pomza taşı	seramik top	,3458182	4,5891082	1,000	-12,558048	13,249684
	seramik halka	17,0265000*	5,7076312	,035	,977520	33,075480
	cstr	-11,5960000	6,2136818	,275	-29,067917	5,875917
cstr	seramik top	11,9418182	5,5418746	,172	-3,641080	27,524716
	seramik halka	28,6225000*	6,4984240	,002	10,349932	46,895068
	pomza taşı	11,5960000	6,2136818	,275	-5,875917	29,067917

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=3 SAAT

ANOVA

H2 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6866,329	3	2288,776	64,013	,000
Within Groups	679,345	19	35,755		
Total	7545,674	22			

Multiple Comparisons

H2 (%)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	3,7266667	3,0878265	,630	-4,955826	12,409159
	pomza taşı	-6,0895833	3,8597831	,414	-16,942699	4,763533
	cstr	50,8966667*	4,2281805	,000	39,007674	62,785659
seramik halka	seramik top	-3,7266667	3,0878265	,630	-12,409159	4,955826
	pomza taşı	-9,8162500	3,5375496	,054	-19,763295	,130795
	cstr	47,1700000*	3,9362219	,000	36,101950	58,238050
pomza taşı	seramik top	6,0895833	3,8597831	,414	-4,763533	16,942699
	seramik halka	9,8162500	3,5375496	,054	-,130795	19,763295
	cstr	56,9862500*	4,5669569	,000	44,144670	69,827830
cstr	seramik top	-50,8966667*	4,2281805	,000	-62,785659	-39,007674
	seramik halka	-47,1700000*	3,9362219	,000	-58,238050	-36,101950
	pomza taşı	-56,9862500*	4,5669569	,000	-69,827830	-44,144670

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=1.5 SAAT

ANOVA

H2 (%)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5662,158	3	1887,386	18,983	,000
Within Groups	1491,337	15	99,422		
Total	7153,495	18			

Multiple Comparisons

H2 (%)
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	,6176667	6,0377899	1,000	-16,784142	18,019475
	pomza taşı	-4,6750000	6,3062659	,879	-22,850596	13,500596
	cstr	45,7460000*	7,2818487	,000	24,758630	66,733370
seramik halka	seramik top	-,6176667	6,0377899	1,000	-18,019475	16,784142
	pomza taşı	-5,2926667	6,0377899	,817	-22,694475	12,109142
	cstr	45,1283333*	7,0506196	,000	24,807399	65,449267
pomza taşı	seramik top	4,6750000	6,3062659	,879	-13,500596	22,850596
	seramik halka	5,2926667	6,0377899	,817	-12,109142	22,694475
	cstr	50,4210000*	7,2818487	,000	29,433630	71,408370
cstr	seramik top	-45,7460000*	7,2818487	,000	-66,733370	-24,758630
	seramik halka	-45,1283333*	7,0506196	,000	-65,449267	-24,807399
	pomza taşı	-50,4210000*	7,2818487	,000	-71,408370	-29,433630

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

VERİMLİLİK

HRT=24 SAAT

ANOVA

L H2/L reaktör.gün

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15,453	3	5,151	14,595	,000
Within Groups	14,470	41	,353		
Total	29,923	44			

Multiple Comparisons

L H2/L reaktör.gün
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	,4162677	,2358226	,304	-,215175	1,047711
	pomza taşı	1,3277420*	,2425298	,000	,678340	1,977144
	cstr	1,3103560*	,2504837	,000	,639656	1,981056
seramik halka	seramik top	-,4162677	,2358226	,304	-1,047711	,215175
	pomza taşı	,9114743*	,2595697	,006	,216445	1,606503
	cstr	,8940883*	,2670165	,009	,179120	1,609057
pomza taşı	seramik top	-1,3277420*	,2425298	,000	-1,977144	-,678340
	seramik halka	-,9114743*	,2595697	,006	-1,606503	-,216445
	cstr	-,0173860	,2729582	1,000	-,748264	,713492
cstr	seramik top	-1,3103560*	,2504837	,000	-1,981056	-,639656
	seramik halka	-,8940883*	,2670165	,009	-1,609057	-,179120
	pomza taşı	,0173860	,2729582	1,000	-,713492	,748264

*, The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=12 SAAT

ANOVA

L H2/L reaktör.gün

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31,582	3	10,527	38,821	,000
Within Groups	11,661	43	,271		
Total	43,243	46			

Multiple Comparisons

L H2/L reaktör.gün
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	,1501911	,1973269	,871	-,377150	,677532
	pomza taşı	1,4716454*	,2190367	,000	,886287	2,057004
	cstr	1,9824034*	,2258099	,000	1,378944	2,585863
seramik halka	seramik top	-,1501911	,1973269	,871	-,677532	,377150
	pomza taşı	1,3214542*	,2125930	,000	,753316	1,889593
	cstr	1,8322122*	,2195651	,000	1,245442	2,418983
pomza taşı	seramik top	-1,4716454*	,2190367	,000	-2,057004	-,886287
	seramik halka	-1,3214542*	,2125930	,000	-1,889593	-,753316
	cstr	,5107580	,2392655	,159	-,128661	1,150177
cstr	seramik top	-1,9824034*	,2258099	,000	-2,585863	-1,378944
	seramik halka	-1,8322122*	,2195651	,000	-2,418983	-1,245442
	pomza taşı	-,5107580	,2392655	,159	-1,150177	,128661

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=6 SAAT

ANOVA

L H2/L reaktör.gün

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13,672	3	4,557	27,707	,000
Within Groups	3,125	19	,164		
Total	16,797	22			

Multiple Comparisons

L H2/L reaktör.gün
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	,3373852	,2367967	,500	-,328451	1,003221
	pomza taşı	,7282932*	,2187434	,017	,113220	1,343366
	cstr	2,3772727*	,2641578	,000	1,634502	3,120044
seramik halka	seramik top	-,3373852	,2367967	,500	-1,003221	,328451
	pomza taşı	,3909079	,2720587	,493	-,374079	1,155895
	cstr	2,0398875*	,3097525	,000	1,168911	2,910864
pomza taşı	seramik top	-,7282932*	,2187434	,017	-1,343366	-,113220
	seramik halka	-,3909079	,2720587	,493	-1,155895	,374079
	cstr	1,6489796*	,2961800	,000	,816167	2,481792
cstr	seramik top	-2,3772727*	,2641578	,000	-3,120044	-1,634502
	seramik halka	-2,0398875*	,3097525	,000	-2,910864	-1,168911
	pomza taşı	-1,6489796*	,2961800	,000	-2,481792	-,816167

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=3 SAAT

ANOVA

L H2/L reaktör.gün

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25,235	3	8,412	6,279	,004
Within Groups	26,794	20	1,340		
Total	52,029	23			

Multiple Comparisons

L H2/L reaktör.gün
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	-,1850653	,5977095	,989	-1,858016	1,487886
	pomza taşı	,4003011	,7471369	,949	-1,690887	2,491490
	cstr	2,6850000*	,7471369	,009	,593812	4,776188
seramik halka	seramik top	,1850653	,5977095	,989	-1,487886	1,858016
	pomza taşı	,5853664	,6847623	,828	-1,331240	2,501972
	cstr	2,8700653*	,6847623	,002	,953459	4,786671
pomza taşı	seramik top	-,4003011	,7471369	,949	-2,491490	1,690887
	seramik halka	-,5853664	,6847623	,828	-2,501972	1,331240
	cstr	2,2846989	,8184474	,051	-,006083	4,575481
cstr	seramik top	-2,6850000*	,7471369	,009	-4,776188	-,593812
	seramik halka	-2,8700653*	,6847623	,002	-4,786671	-,953459
	pomza taşı	-2,2846989	,8184474	,051	-4,575481	,006083

*, The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=1.5 SAAT

ANOVA

L H2/L reaktör.gün

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21,613	3	7,204	10,090	,001
Within Groups	10,710	15	,714		
Total	32,323	18			

Multiple Comparisons

L H2/L reaktör.gün
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	-,9599767	,5116666	,279	-2,434676	,514723
	pomza taşı	,2190898	,5344183	,976	-1,321183	1,759363
	cstr	2,3180000*	,6170931	,009	,539446	4,096554
seramik halka	seramik top	,9599767	,5116666	,279	-,514723	2,434676
	pomza taşı	1,1790664	,5116666	,141	-,295633	2,653766
	cstr	3,2779767*	,5974979	,000	1,555899	5,000054
pomza taşı	seramik top	-,2190898	,5344183	,976	-1,759363	1,321183
	seramik halka	-1,1790664	,5116666	,141	-2,653766	,295633
	cstr	2,0989102*	,6170931	,018	,320356	3,877464
cstr	seramik top	-2,3180000*	,6170931	,009	-4,096554	-,539446
	seramik halka	-3,2779767*	,5974979	,000	-5,000054	-1,555899
	pomza taşı	-2,0989102*	,6170931	,018	-3,877464	-,320356

*, The mean difference is significant at the 0.05 level.

VERİM DEĞERLERİ

HRT=24 SAAT

ANOVA

mLH2/g sükröz kullanılan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	195301,873	3	65100,624	27,659	,000
Within Groups	96502,888	41	2353,729		
Total	291804,762	44			

Multiple Comparisons

mLH2/g sükröz kullanılan
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	136,8423694*	19,2585209	,000	85,275375	188,409363
	pomza taşı	159,3785136*	19,8062658	,000	106,344867	212,412160
	cstr	103,0964243*	20,4558233	,000	48,323510	157,869339
seramik halka	seramik top	...	19,2585209	,000	-188,409363	-85,275375
	pomza taşı	22,5361442	21,1978362	,714	-34,223599	79,295887
	cstr	-33,7459452	21,8059809	,419	-92,134068	24,642178
pomza taşı	seramik top	...	19,8062658	,000	-212,412160	-106,344867
	seramik halka	-22,5361442	21,1978362	,714	-79,295887	34,223599
	cstr	-56,2820894	22,2912167	,071	-115,969489	3,405310
cstr	seramik top	...	20,4558233	,000	-157,869339	-48,323510
	seramik halka	33,7459452	21,8059809	,419	-24,642178	92,134068
	pomza taşı	56,2820894	22,2912167	,071	-3,405310	115,969489

*, The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=12 SAAT

ANOVA

mLH2/g süktroz kullanılan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	261184,830	3	87061,610	62,034	,000
Within Groups	60348,249	43	1403,448		
Total	321533,079	46			

Multiple Comparisons

mLH2/g süktroz kullanılan
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	136,9082332*	14,1957983	,000	98,971067	174,845400
	pomza taşı	177,6810178*	15,7576102	,000	135,570030	219,792005
	cstr	184,0522330*	16,2448804	,000	140,639054	227,465412
seramik halka	seramik top	...	14,1957983	,000	-174,845400	-98,971067
	pomza taşı	40,7727846	15,2940493	,051	-,099372	81,644941
	cstr	47,1439998*	15,7956262	,023	4,931418	89,356582
pomza taşı	seramik top	...	15,7576102	,000	-219,792005	-135,570030
	seramik halka	-40,7727846	15,2940493	,051	-81,644941	,099372
	cstr	6,3712153	17,2128845	,982	-39,628880	52,371310
cstr	seramik top	...	16,2448804	,000	-227,465412	-140,639054
	seramik halka	-47,1439998*	15,7956262	,023	-89,356582	-4,931418
	pomza taşı	-6,3712153	17,2128845	,982	-52,371310	39,628880

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=6 SAAT

ANOVA

mLH2/g süktroz kullanılan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	339530,009	3	113176,670	42,871	,000
Within Groups	52798,928	20	2639,946		
Total	392328,937	23			

Multiple Comparisons

mLH2/g süzkroz kullanılan
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	192,5269296*	29,9996953	,000	108,559696	276,494163
	pomza taşı	231,4647994*	27,7125315	,000	153,899191	309,030407
	cstr	277,3136364*	29,9996953	,000	193,346403	361,280870
seramik halka	seramik top	...	29,9996953	,000	-276,494163	-108,559696
	pomza taşı	38,9378697	34,4670258	,676	-57,533137	135,408877
	cstr	84,7867067	36,3314353	,124	-16,902663	186,476077
pomza taşı	seramik top	...	27,7125315	,000	-309,030407	-153,899191
	seramik halka	-38,9378697	34,4670258	,676	-135,408877	57,533137
	cstr	45,8488370	34,4670258	,555	-50,622170	142,319844
cstr	seramik top	...	29,9996953	,000	-361,280870	-193,346403
	seramik halka	-84,7867067	36,3314353	,124	-186,476077	16,902663
	pomza taşı	-45,8488370	34,4670258	,555	-142,319844	50,622170

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=3 SAAT

ANOVA

mLH2/g süzkroz kullanılan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	372488,936	3	124162,979	20,346	,000
Within Groups	122052,240	20	6102,612		
Total	494541,175	23			

Multiple Comparisons

mLH2/g süzkroz kullanılan
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	233,4300640*	40,3405899	,000	120,519326	346,340802
	pomza taşı	259,5294608*	50,4257374	,000	118,391038	400,667884
	cstr	363,6833333*	50,4257374	,000	222,544910	504,821756
seramik halka	seramik top	...	40,3405899	,000	-346,340802	-120,519326
	pomza taşı	26,0993968	46,2159517	,941	-103,256104	155,454898
	cstr	130,2532693*	46,2159517	,048	,897768	259,608771
pomza taşı	seramik top	...	50,4257374	,000	-400,667884	-118,391038
	seramik halka	-26,0993968	46,2159517	,941	-155,454898	103,256104
	cstr	104,1538725	55,2386277	,265	-50,455523	258,763268
cstr	seramik top	...	50,4257374	,000	-504,821756	-222,544910
	seramik halka	...	46,2159517	,048	-259,608771	-,897768
	pomza taşı	-104,1538725	55,2386277	,265	-258,763268	50,455523

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HRT=1.5 SAAT

ANOVA

mLH2/g süzkroz kullanılan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	214946,157	3	71648,719	23,029	,000
Within Groups	49780,163	16	3111,260		
Total	264726,321	19			

Multiple Comparisons

mLH2/g süzkroz kullanılan
Tukey HSD

(I) Reaktör	(J) Reaktör	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
seramik top	seramik halka	178,6494270*	33,7756630	,000	82,016585	275,282269
	pomza taşı	211,0408518*	35,2775294	,000	110,111140	311,970563
	cstr	294,5240000*	37,4174704	,000	187,471875	401,576125
seramik halka	seramik top	...	33,7756630	,000	-275,282269	-82,016585
	pomza taşı	32,3914248	33,7756630	,774	-64,241417	129,024267
	cstr	115,8745730*	36,0049777	,025	12,863617	218,885529
pomza taşı	seramik top	...	35,2775294	,000	-311,970563	-110,111140
	seramik halka	-32,3914248	33,7756630	,774	-129,024267	64,241417
	cstr	83,4831482	37,4174704	,157	-23,568977	190,535273
cstr	seramik top	...	37,4174704	,000	-401,576125	-187,471875
	seramik halka	...	36,0049777	,025	-218,885529	-12,863617
	pomza taşı	-83,4831482	37,4174704	,157	-190,535273	23,568977

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

EK 8 Tezde Kullanılan Hesaplamalar

Karanlık fermentasyonda kesikli reaktör denemeleri

Kümülatif gaz üretimi

$V_n = n$. Günde üretilen toplam biyogaz miktarı (mL)

Kümülatif gaz üretimi (mL) = $V_0 + V_1 + \dots + V_n$

Kümülatif H_2 Üretimi

$V_n \times \% H_2 = V_{H_2(n)}$

$V_{H_2n} = V_{2(0)} + V_{2(1)} + \dots + V_{2(n)}$

Hidrojen Üretim Verimi

Verim(mol H₂ / mol süktroz)= Üretilen H₂ miktarı (mol) / Tüketilen süktroz miktarı (mol)

Üretilen H₂ miktarı (mol)=(V_{H2} X 1 atm) / (0.082 L atm / mol K) X (55+273)K

Tüketilen süktroz miktarı (mol) = [(Kullanılan süktroz kons. (mg/L) X Reaktör hacmi (L)] / [(346 g/mol) X 1000]

Süktroz Dönüşüm Verimi

Ci: Başlangıç süktroz konsantrasyonu (mg/L)

Cf: Son süktroz konsantrasyonu (mg/L)

Süktroz dönüşüm verimi= [(Ci-Cf) / Ci] X 100

Karanlık fermentasyonda sürekli reaktör denemeleri

Hidrojen Üretim Verimi

Verim(mol H₂ / mol süktroz)= Üretilen H₂ miktarı (mol) / Tüketilen süktroz miktarı (mol)

Üretilen H₂ miktarı (mol) = (V_{H2} X 1 atm) / (0.082 L atm / mol K) X (55+273)K

Tüketilen süktroz miktarı (mol) = [(Kullanılan süktroz kons. (mg/L) X Reaktör hacmi (L)] / [(346 g/mol) X 1000]

Hidrojen Üretim Hızı

Hidrojen üretim hızı= V_{H2}(ort) / V_{reaktör.gün}

Foto-fermentasyonda kesikli reaktör denemeleri

Kümülatif gaz üretimi

V_n=n. Günde üretilen toplam biyogaz miktarı (mL)

Kümülatif gaz üretimi (mL)= V₀+V₁+.....+V_n

Kümülatif H₂ Üretimi

V_n X %H₂= V_{H2(n)}

V_{H2n}=V_{2 (0)} +V₂₍₁₎+.....+V_{2(n)}

Hidrojen Üretim Verimi

Verim(mol H₂/mol substrat)= Üretilen H₂ miktarı (mol)/Tüketilen substrat miktarı (mol)

Üretilen H₂ miktarı (mol)=(V_{H2}X1 atm) / (0.082 L atm/mol K) X (55+273)K

Tüketilen substrat miktarı (mol) = [(Kullanılan substrat kons. (mg/L) X Reaktör hacmi (L)) / [(Substratın molekül ağırlığı (g/mol)) X 1000]

Foto-fermentasyonda sürekli reaktör denemeleri

Besleme çözeltisi konsantrasyonu

2 g/L asetat ve 3 g/L bütirat

Asetat: $\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{O}_2 \Rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mol asetat 64 g KOİ)

Bütirat: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH} + 5 \text{O}_2 \Rightarrow 4\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ (1 mol bütirat 160 g KOİ)

Hidrojen Üretim Verimi

$\text{mL H}_2 / \text{g KOİ} = \text{Toplam üretilen hidrojenin hacmi} / \text{kullanılan KOİ miktarı}$

Hidrojen Üretim Hızı

Hidrojen üretim hızı = $V_{\text{H}_2(\text{ort})} / V_{\text{reaktör.gün}}$