DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARDAN BİYOLOJİK HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

Oya Belce BARIŞIK

Aralık, 2015
İZMİR

LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARDAN BİYOLOJİK HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Oya Belce BARIŞIK

Aralık, 2015
İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

OYA BELCE BARIŞIK, tarafından **PROF. DR. İLGİ KARAPINAR KAPDAN** yönetiminde hazırlanan **"LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARDAN BİYOLOJİK HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN

Yönetici

Yrd. Doç. Dr. Serpil Özmihçı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Elif Şahin Işgın

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca çalışmalarıma yön veren, yaptığım araştırmaların her aşamasında bilgi, öneri ve her türlü yardımı esirgemeyen, fikirleriyle gelişmeme büyük katkısı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

2015.KB.FEN.021 nolu DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında yürütülen "İyonik Sıvıların Ön İşlemi İle Lignoselülozik Atıklardan Biyolojik Hidrojen Gazı Üretimi" başlıklı projemde bana kapılarını açtığı için Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü'ne ve Biyoproses Laboratuvarları'nda birlikte çalıştığım herkese teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca her an güler yüzleriyle, sabırlarıyla ve dostluklarıyla yanımda olan, her türlü yardımıma koşan yüksek lisans arkadaşlarım Seda ILGIN ve Firuze KARAOSMANOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında, her zaman kalbiyle yanımda olan hayat arkadaşım Berkay ÖZÖNÜR'e, en karamsar anlarımda yanımda olup beni güçlendiren kardeşim Cahide KÖKSAL'a ve maddi-manevi desteklerinin yanı sıra bütün sıkıntılarıma katlanan annem Fatma BARIŞIK ve babam İsmet BARIŞIK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Oya Belce BARIŞIK

LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARDAN BİYOLOJİK HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

ÖZ

Hidrojen, temiz bir enerji kaynağı olması sebebiyle geleceğin enerji kaynağı olarak görülmektedir. Lignoselülozik biyokütle gibi ikinci nesil selülozik atıklar, biyohidrojen üretiminin ihtiyacı olan yüksek karbon içeriğini sağlayacak nitelikte olup temiz, karbon-nötr ve yüksek verimli enerji üretimi için umut verici kaynaklardır.

Bu çalışmada lignoselülozik atık olan *Pinus brutia* (kızılçam) odun talaşından karanlık fermantasyonla hirojen gazı üretimi incelenmiştir. Bu amaçla odun talaşı asit ve alkali hidrolize tabi tutularak elde edilen toplam şekerden hidrojen üretim çalışmaları yapılmıştır. Hidroliz sonucu oluşacak toplam şeker derişimini etkileyen faktörlerin etkisi Box – Behnken istatistiksel deney tasarım metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler, asit/baz derişimi, odun talaşı derişimi, hidroliz sıcaklığı ve hidroliz süresidir. Stat – Ease Design Expert bilgisayar yazılımı kullanılarak ikinci dereceden cevap eşitliği geliştirilmiş ve maksimum şeker derişimine ulaşmak için optimum asit ve alkali hidroliz şartları belirlenmiştir. Odun talaşının asit ile hidrolizinden alkali hidrolize nazaran daha yüksek şeker derişimlerine ulaşılmıştır. Optimizasyon sonucunda, odun talaşı derişimi yüzde 8, asit derişimi yüzde 8, hidroliz sıcaklığı 121 santigrat derece ve hidroliz süresi 15 dakika olan asit hidrolizi şartlarında maksimum 40 g/L toplam şeker derişimine ulaşılmıştır. Asit hidrolizinden elde edilen hidrolizattan karanlık fermantasyonla hidrojen gazı üretiminde başlangıç şeker derişimine etkisi incelendiğinde, maksimum hidrojen üretim verimi 0,6 mol/mol ile 1 g/L başlangıç şeker derişiminden elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyohidrojen, hidroliz, karanlık fermantasyon, lignoselülozik atıklar, odun talaşı.

BIOLOGICAL HYDROGEN GAS PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC MATERIALS

ABSTRACT

The energy limitation in the world diverted the attentions to clean and renewable energy sources. Hydrogen is one of the clean and renewable energy sources with high energy value. Therefore, it is considered as source of energy in the future. Second generation cellulosic wastes as lignocellulosic biomasses from such as agricultural activities can be used as carbon source in order to achieve clean, carbon-neutral and efficient biohydrogen production.

In this study, hydrogen production from one of the lignocellulosic wastes, *Pinus brutia* (pinewood) chips by dark fermentation was investigated. Wood chip was subjected to acid and alkaline hydrolysis to obtain sugar solution to be used in hydrogen production by dark fermentation. Box-Behnken statistical experimental design method was used to determine the significant factors that affect total sugar formation after hydrolysis. The independent variables were acid or alkaline concentration, wood chip concentration, hydrolysis temperature and period. Stat-Ease Design Expert software was used to develop quadratic responses equation and to determine optimum hydrolysis conditions for the maximization of total sugar concentration. Acid hydrolysis resulted in higher sugar formation compared to alkaline hydrolysis. The optimal conditions for acid hydrolysis were determined as 8 percent substrate concentration, 8 percent acid concentration, 121 degrees Celsius and 15 minutes hydrolysis period with maximum sugar concentration of 40 g/L by using Stat – Ease Design expert software. The hydrolyzed wood chip was subjected to the dark fermentation for biohydrogen production. The effect of initial total sugar concentration on the yield of production was investigated. The maximum yield was obtained as 0.6 mol/mol at initial total sugar concentration of 1 g/L.

Keywords: Biohydrogen, hydrolysis, dark fermentation, lignocellulosic materials, wood chips.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ SINAV SONUÇ FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ iv
ABSTRACT v
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
TABLOLAR LİSTESİ xi

BÖLÜM BİR – GİRİŞ 1

1.1 Giriş 1
1.2 Hidrojenin Özellikleri 2
1.3 Hidrojen Gazının Kullanımı ve Avantajları 3
1.4 Hidrojen Üretim Yöntemleri 4
1.5 Biyolojik Hidrojen Üretimi 5
1.5.1 Suyun Biyofotolizi ile Hidrojen Üretimi 8
1.5.1.1 Doğrudan Biyofotoliz 9
1.5.1.2 Dolaylı Biyofotoliz 10
1.5.2 Su – Gaz Dönüşümü Reaksiyonu 11
1.5.3 Fotofermantasyon ile Hidrojen Üretimi 11
1.5.4 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretimi 13
1.5.4.1 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretim Metabolizması 14
1.5.4.2 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretimini Etkileyen Parametreler 16
1.6 Biyohidrojen Gazı Üretimi İçin Biyokütle 21
1.7 Ön İşlemler 23
1.7.1 Fiziksel Ön İşlemler 24
1.7.1.1 Mekanik Parçalama 24
1.7.1.2 Piroliz 25
1.7.2 Fiziko-kimyasal Ön İşlemler 25

1.7.2.1 Buhar Patlaması 25
1.7.2.2 Amonyak Lif Patlaması (AFEX) 26
1.7.2.3 İyonik Sıvılar (IL) 26
1.7.3 Kimyasal Ön İşlemler 28
1.7.3.1 Ozon Ön İşlemi 28
1.7.3.2 Asitle Ön İşlem 29
1.7.3.3 Alkali Ön İşlem 30
1.7.4 Biyolojik Ön İşlemler 30
1.8 Kaynak Araştırması 31
1.9 Amaç ve Kapsam 34

BÖLÜM İKİ – MATERYAL VE METODLAR 35

2.1 Lignoselülozik Biyokütle 35
2.2 Box-Behnken İstatistiksel Deney Tasarım Metodu 35
2.3 Asit Hidrolizi 36
2.4 Alkali Hidroliz 37
2.5 Biyohidrojen Üretimi 37
2.5.1 Mikroorganizma 37
2.5.2 Besi Ortamı 38
2.5.3 Karanlık Fermantasyon 38
2.6 Analitik Yöntemler 39
2.6.1 Toplam Şeker Analizi 39
2.6.2 Toplam Gaz Ölçümü 40
2.6.3 Hidrojen Gazı Ölçümü 40
2.7 Hesaplamalar 41

BÖLÜM ÜÇ – DENEYSEL SONUÇ VE DEĞERLENDİRMELER 43

3.1 Odun Talaşının Hidroliz Şartlarının Optimizasyonu 43
3.1.1 Asit Hidrolizi Şartlarının Optimizasyonu 43
3.2.2 Alkali Hidroliz Şartlarının Optimizasyonu 51

3.2 Hidrolize Odun Talaşından Hidrojen Gazı Üretimi 57

BÖLÜM DÖRT – SONUÇLAR VE ÖNERİLER 65

KAYNAKLAR.....67

EKLER.....85

Ek.1 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretimi Deney Sonuçları 85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Hidrojen üretim yöntemleri şeması 5
Şekil 1.2 Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri 6
Şekil 1.3 Doğrudan biyofotoliz sistemi şeması 9
Şekil 1.4 Dolaylı biyofotolizle hidrojen üretim şeması 10
Şekil 1.5 Fotofermantasyon prosesi ile hidrojen üretimi 11
Şekil 1.6 Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi şematik gösterimi 15
Şekil 1.7 Glukoz fermantasyonu ile hidrojen oluşumu yol izi 16
Şekil 1.8 Kesikli hidrojen fermantasyonu tipik gösterimi 18
Şekil 1.9 Lignoselülozik biyokütle üzerinde ön işlem etkisinin şematik gösterimi 22
Şekil 1.10 Lignoselülozik biyokütlenin üç temel bileşimi 23
Şekil 1.11 Selülozun polimer zincir yapısı 23
Şekil 2.1 Kesikli anaerobik karanlık fermantasyon ortamı 39
Şekil 2.2 Farklı odun talaşı derişimlerine sahip hidroliz örneklerinin Fenol – Asit spektrofotometrik yöntem ile toplam şeker analizi 39
Şekil 2.3 Toplam gaz ölçümü yapılan U boru sistemi 40
Şekil 2.4 Gaz – sızdırmaz cam şırınga (Agilent gas-thight syringe) 41
Şekil 3.1 Asit hidrolizi ile maksimum toplam şeker derişiminin elde edildiği optimizasyon şartları 47
Şekil 3.2 Toplam şeker derişiminin asit ve odun talaşı derişimi ile değişimi (T=121℃, t=15 dak) 48
Şekil 3.3 Toplam şeker derişiminin asit derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (S=%8, t=15 dak) 49
Şekil 3.4 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (A=%8, t=15 dak) 49
Şekil 3.5 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz süresi ile değişimi (A=8, T=121℃) 50
Şekil 3.6 Alkali hidroliz ile maksimum toplam şeker derişiminin elde edildiği optimizasyon şartları 53

Şekil 3.7 Toplam şeker derişiminin baz ve odun talaşı derişimi ile değişimi (T=90℃, t=15 dak) 54
Şekil 3.8 Toplam şeker derişiminin baz derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (S=%8, t=15 dak) 55
Şekil 3.9 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (B=%25, t=15 dak) 55
Şekil 3.10 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz süresi ile değişimi (B=%25, T=90℃) 56
Şekil 3.11 TS_0=1 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 58
Şekil 3.12 TS_0=2 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 58
Şekil 3.13 TS_0=3 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 59
Şekil 3.14 TS_0=4 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 59
Şekil 3.15 TS_0=5 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 60
Şekil 3.16 TS_0=6 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 60
Şekil 3.17 TS_0=7 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 61
Şekil 3.18 TS_0=9 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 61
Şekil 3.19 Kontrol deneyi eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi 62
Şekil 3.20 Hidrolize odun talaşı toplam şeker derişiminin hidrojen üretim verimi üzerine etkisi 64
Şekil 3.21 Başlangıç substrat derişiminin hidrojen üretim hızı üzerine etkisi 64

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 25℃'de ve 1 atm basınçta yakıt özellikleri 3
Tablo 1.2 Biyohidrojen üretim yöntemlerinin substrat ve ürünlerinin karşılaştırılması 6
Tablo 1.3 Hidrojen üreten mikroorganizmalar 7
Tablo 2.1 Box-Behnken deneysel tasarım metodunun dört faktör için kodlu hali 36
Tablo 3.1 Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenmiş deney noktaları, gözlenen ve hesaplanan şeker derişimleri (asit hidrolizi) 44
Tablo 3.2 Cevap eşitliği (Eşitlik 3.1) katsayıları 45
Tablo 3.3 Box-Behnken varyans analizi tablosu 45
Tablo 3.4 Box-Behnken deney tasarım metodu optimizasyon noktalarına göre yapılan validasyon çalışmaları ve sonuçları 46
Tablo 3.5 Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenmiş deney noktaları, gözlenen ve hesaplanan şeker derişimleri (alkali hidroliz) 52
Tablo 3.6 Cevap eşitliği (Eşitlik 3.2) katsayıları 53
Tablo 3.7 Farklı başlangıç toplam şeker derişimlerinde Gompertz denklemi sabitleri 63

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 Giriş

Dünyadaki kömür, petrol ve doğalgaz gibi fosil enerji kaynaklarının azalması sonucu küresel enerji krizi ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu oluşan küresel enerji krizi ve iklim değişikliği nedeniyle de, temiz alternatif enerji kaynaklarının geliştirilmesi oldukça ilgi görmektedir. Rüzgar enerjisi, güneş enerjisi, jeotermal enerji, hidroelektrik enerji, fotovoltaik enerji, biyoyakıtlar ve hidrojen enerjisi alternatif, temiz, yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynaklarından bazılarıdır. Bu alternatif enerji kaynaklarının yenilenebilir ve sürdürülebilir özellikte olmasına ek olarak atmosfere düşük ya da sıfır sera gazı emisyonu salmaları da enerji üretim çalışmalarını bu alana yoğunlaştırmıştır. Hidrojen gazı, temiz ve enerji verimi yüksek olduğu için en çok umut veren enerji kaynağı olarak ortaya çıkmıştır (Cheng ve ark., 2011).

Hidrojen gazı fosil enerji kaynakları gibi kolay ulaşılabilir değildir ya da doğal olarak bulunmamaktadır. Bu nedenle, hidrojen gazının ticarileştirilmesine ya da yaygın enerji kaynağı olarak kullanılmasına en büyük engel, yüksek üretim maliyetidir. Özellikle fiziko-kimyasal yöntemlerle hidrojen gazı üretiminde yüksek sıcaklık ihtiyacından dolayı üretim maliyetleri artmaktadır. Son yıllarda önem kazanan biyolojik hidrojen gazı üretiminde ise üretim şartlarının daha kabul edilebilir ve düşük maliyetli olmasından dolayı tercih edilmektedir (Cheng ve ark., 2011).

Hidrojen gazı; 1) algler tarafından suyun biyo-fotolizi, 2) karanlık fermantasyon ve 3) karbonhidratların foto-fermantasyonu yöntemleri ile biyolojik olarak üretilebilmektedir. Algler tarafından hidrojen üretimi oldukça yavaş ve ışık enerjisi gerektiren bir süreçtir. Ayrıca, serbest oksijen ve alglerin ürettiği oksijen hidrojen üretiminden sorumlu enzimleri inhibe etmektedir. Karanlık fermantasyon ile biyohidrojen daha hızlı ve daha verimli olarak *Clostridium sp.* gibi anaerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Foto-fermantasyon ile biyohidrojen

üretimi, zorlu çalışma koşulları ve ışık enerjisi ihtiyacından dolayı maliyetlidir (Kapdan ve Kargı, 2006).

Biyohidrojen gazı üretim maliyetini düşürmenin en önemli yolu ucuz ve yenilenebilir hammadde olan tarımsal atıklar, kağıt atıkları ve odun talaşları gibi sürdürülebilir lignoselülozik malzemelerin kullanılmasıdır.

1.2 Hidrojenin Özellikleri

Hidrojen, 1500'lü yıllarda keşfedilmiş ve 1700'lü yıllarda ise yanıcı olduğuna karar verilmiştir. Bu toksik olmayan, basit ve hafif element havadan 14,4 kat daha hafiftir. Aynı zamanda evrende en bol bulunan elementtir (Momirlan ve Veziroğlu, 2005).

Atmosfer ve yeryüzünün hidrojen içeriği sırasıyla %0,07 ve %0,14'dür. Havanın yoğunluğuna (1,2 g/L) kıyasla hidrojenin yoğunluğu (0,09 g/L) oldukça düşüktür (Argun, 2010). Doğada yalnız başına bulunmayan hidrojen, suyun yapısı ile çok sayıda organik ve kimyasal bileşiklerde bulunmaktadır. Renksiz ve kokusuzdur. Sıvı forma -252,77°C'de geçebilmektedir.

Hidrojenin ısıtma değeri (ürünü olduğu su göz önünde bulundurulduğunda) 3042 cal/m^3'tür. Yanma sırasında, suyun ana ürünü olarak hidrojen, temiz ve kirletici olmayan bir yakıt olarak kabul edilmektedir.

Farklı yakıtların özellikleri Tablo 1.1'de özetlenmiştir. Diğer gazlı yakıtlarla karşılaştırıldığında hidrojen, insan ve çevreye zararsızdır (Das ve Veziroğlu, 2001).

Tablo 1.1 25°C'de ve 1 atm basınçta yakıt özellikleri (White, Steeper ve Lutz, 2006)

Özellik	Hidrojen	Doğal Gaz	Benzin
Yoğunluk (kg/m^3)	0,0824	0,72	730[a]
Yanabilirlik sınırları (havadaki % hacmi)	4 – 78	4,3 – 15	1,4 – 7,6
Yanabilirlik sınırları (Φ)	0,1 – 7,1	0,4 – 1,6	≈ 0,7 – 4
Havada kendiliğinden tutuşma (K)	858	723	550
Minimum yanma enerjisi (mJ)[b]	0,02	0,28	0,24
Alev hızı ($m\ s^{-1}$)[b]	1,85	0,38	0,37 – 043
Söndürme mesafesi (mm)	0,64	2,1[c]	≈ 2
Stokiyometrik yakıt/hava kütle içeriği	0,029	0,069	0,068
Stokiyometrik hacim oranı (%)	29,53	9,48	≈ 2[d]
Alt ısıtma değeri (MJ/kg)	119,7	45,8	44,79
Yanma ısısı (MJ/kg_{air})[b]	3,37	2,9	2,83

[a] 0°C'de sıvı halde
[b] Stokiyometride
[c] Metan
[d] Buhar

1.3 Hidrojen Gazının Kullanımı ve Avantajları

Hidrojen enerjisi yeni, sürdürülebilir, temiz enerji sistemlerinin önemli bir faktörüdür. Bu yeni enerji taşıyıcısının sağladığı avantajlarla; yangın tehlikesi oluşturmayan ve taşınması güvenli bir gazdır, çeşitli yöntemlerle (örn. fosil yakıtlar, doğrudan güneş ışığı, suyun elektrolizi vb. gibi) üretimi mümkündür, hidrojenin yanması sırasında CO_2, CO, SO_2, VOC ve parçacıklar oluşmaz, ancak buhar ve NO_X emisyonu oluşmaktadır. NO_X oluşumu alev sıcaklığı ve süresinin bir fonksiyonudur. Hidrojen, geniş alev alma derecesine göre göz önüne alındığında, motor tasarımı ile

yanması etkilenebilir ve böylece NO_X emisyonu azaltılabilir (Momirlan ve Veziroğlu, 2002).

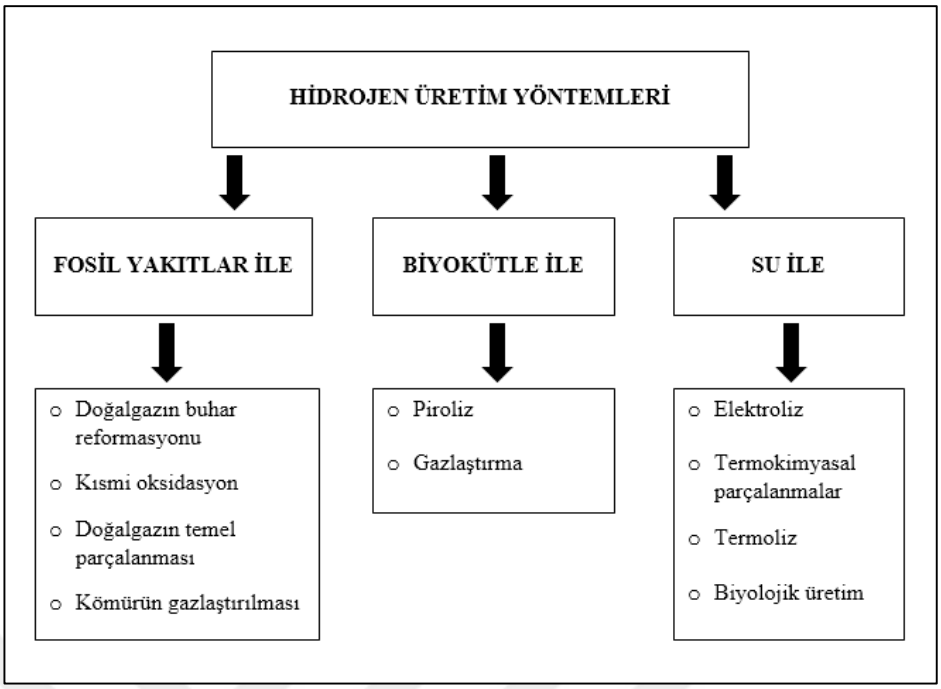
Hidrojen gazı endüstride çok çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Kullanım amacı ve endüstriler aşağıda özetlenmiştir:

- Hidrojenasyon proseslerinde reaktiftir.
- Metanol üretimi için kullanılmaktadır.
- Oksidasyon ve korozyona karşı korumada kimyasal reaktiftir.
- Metal sinterleme ve bağlanma işlemleri,
- Bir güç kaynağı olarak havacılık ve uçak endüstrisinde,
- Elektrik jeneratörü soğutucu,
- Alternatif yakıt olarak otomotiv ve ulaşım ekipmanları,
- Argon gazı karıştırılmasıyla paslanmaz çelik kaynağı olarak ve
- Aynı zamanda hidrojen gazı kimyasal, elektronik, gıda ve içecek, cam, metal üretimi, ilaç ve biyoteknoloji endüstrisinde kullanılmaktadır.

1.4 Hidrojen Üretim Yöntemleri

Hidrojen fosil yakıtlardan elde edilebildiği gibi suyun elektrolizi ile, biyokütleden ve biyolojik proseslerle üretimi mümkündür. Günümüzde hidrojen ağırlıklı olarak doğal gazın buhar reformasyonu ile elde edilmektedir. Suyun elektrolizi bilinen bir yöntem olmakla beraber ekonomik hale getirilmesi konusunda çalışmalar, yine benzer şekilde güneş enerjisinden biyoteknolojik yöntemlerle hidrojen üretimi konusunda araştırma ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Hidrojen; fosil yakıtlar, su ve biyokütle olmak üzere üç farklı kaynak ile üretilebilir (Şekil 1.1) (Das ve Veziroğlu, 2001).



Şekil 1.1 Hidrojen üretim yöntemleri şeması

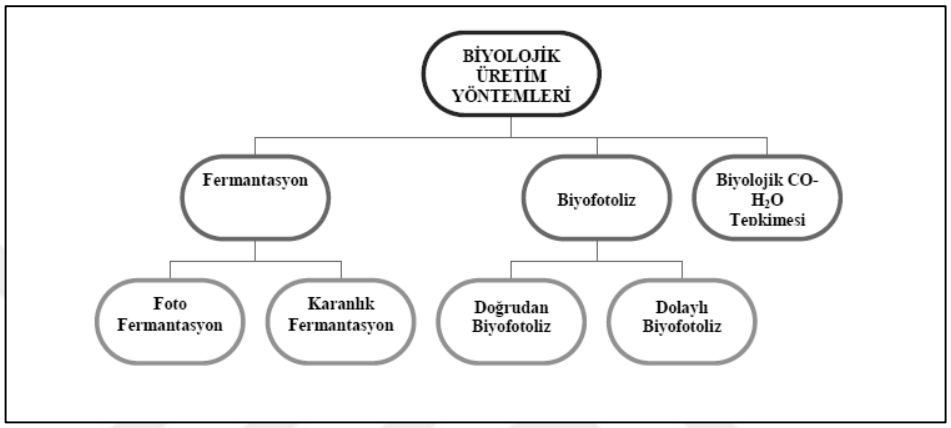
Hidrojenin yaklaşık %90'ı doğalgazın yüksek sıcaklıkta buhar reformasyonu sonucu üretilmektedir. Kömürün gazlaştırılması ve elektroliz ise diğer tercih edilen yöntemlerdir (Das ve Veziroğlu, 2001).

Doğalgazın buhar reformasyonu, kısmi oksidasyon, doğalgazın termal parçalanması, kömürün gazlaştırılması gibi endüstriyel metodlarda başlıca enerji kaynağı olarak fosil yakıtları kullanılmaktadır. Elektrokimyasal ve termokimyasal hidrojen üretim proseslerinde ise gerekli enerji yüksektir ve çevreye zararlı etkileri mevcuttur. Ancak biyolojik hidrojen üretimi proseslerinde normal sıcaklık ve basınçlarda çalışıldığı için enerji ihtiyacı düşüktür. Biyolojik üretim prosesleri sadece çevreye dost olmasıyla değil ayrıca yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımının sağlamasıyla da avantajlı hale gelmektedir (Das ve Veziroğlu 2001).

1.5 Biyolojik Hidrojen Üretimi

Biyohidrojen kavramı, yenilenebilir kaynaklardan (güneş, su, organik atıklar) hidrojenin biyolojik ya da fotobiyolojik yolla üretimi için kullanılmaktadır. Bu amaçla bazı bakteriler ve mikroalglerden yararlanılmakta, biyolojik yolla hidrojen

eldesi küçük ölçeklerde son 25 yıldan beri daha yoğun olarak çalışılmaktadır. 1970'lerde ortaya çıkan petrol krizi ile birlikte, özellikle hidrojen üretim prosesleri öne çıkmaya başlamıştır. Hidrojen üretiminde biyolojik yöntemlerin kullanılması henüz ucuz olmamakla birlikte, çevre dostu temiz teknolojinin tercih edildiği durumlar ve özellikle 21. yüzyıl için iyi bir alternatif enerji kaynağı olması kaçınılmazdır. Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri Şekil 1.2'de özetlenmiştir.



Şekil 1.2 Biyolojik hidrojen üretim yöntemleri

Biyolojik hidrojen üretimi sistemlerinde, algler, siyanobakteriler (mavi-yeşil algler), fotosentetik ve fermantatif bakteriler kullanılmaktadır (Das ve Veziroğlu, 2001).

Tablo 1.2 Biyohidrojen üretim yöntemlerinin substrat ve ürünlerinin karşılaştırılması (Eroğlu, 2008)

Biyoprosesler	**Mikroorganizma**	**Substratlar**	**Ürünler**	**Reaksiyon**
Biyofotoliz Doğrudan Dolaylı	Algler Siyanobakteriler	Işık H_2O, CO_2	H_2, O_2 Biyokütle	$H_2O \rightarrow H_2 + (½)\ O_2$
Biyolojik $CO - H_2O$ reaksiyonu	Fotosentetik bakteriler	CO H_2O	H_2, CO_2 Biyokütle	$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$
Foto fermantasyon	Fotosentetik bakteriler	Işık Organik atıklar	H_2, CO_2, Biyokütle, Organik asitler	Organik asitler + $6H_2O$ + ışık $\rightarrow 12H_2 + 6CO_2$
Karanlık fermantasyon	Fermantatif bakteriler	Organik atıklar	H_2, CO_2, Biyokütle, Yüksek organik asitler	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2 + 2CH_3COOH$

Biyolojik olarak hidrojen üretilen dört farklı proseste kullanılan temel substratlar, mikroorganizmalar ve oluşan yan ürünler farklılık göstermektedir. Tablo 1.2'de yöntemlerin substrat ve ürünler yönünden kıyaslaması, Tablo 1.3'de ise bu mikroorganizmaların sınıflandırılması ve farklı türleri verilmektedir.

Tablo 1.3 Hidrojen üreten mikroorganizmalar (Das ve Veziroğlu, 2001)

Türler	**Mikroorganizma Adları**
Yeşil algler	*Scenedesmus obliquus* *Chlamydomonas reinhardii* *C. moewusii*
Siyanobakteriler Heterocystous	*Anabaena azollae* *Anabaena CA* *A. variabilis* *A. cylindrica* *Nostoc muscorum* *N. spongiaeforme* *Westiellopsis prolica*
Fotosentetik bakteriler	*Rhodobacter sphaeroides* *R. capsulatus* *R. sulidophilus* *Rhodopseudomonas sphaeroides* *R. palustris* *R. capsulata* *Rhodospirillum rubnum* *Chromatium sp. Miami PSB 1071* *Chlorobium limicola* *Chloroexu aurantiacus* *Thiocapsa roseopersicina* *Halobacterium halobium*
Fermantatif bakteriler	*Enterobacter aerogenes* *E. cloacae* *Clostridium butyricum* *C. pasturianum* *Desulfovibrio vulgaris* *Magashaera elsdenii* *Citrobacter intermedius* *Escherichia coli*

1.5.1 Suyun Biyofotolizi ile Hidrojen Üretimi

Biyofotoliz, alglerden güneş enerjisi yardımıyla hidrojen ve oksijen elde etme işlemidir. Deniz suyu içindeki algler, bir tür güneş pili gibi çalışarak deniz suyunu fotosentetik olarak ayrıştırırlar (Das ve Veziroğlu, 2001). Fotokimyasal reaksiyonlar genelde, radyasyon (kızılötesi, görünür veya morötesi) şeklinde absorbe edilen enerji ile başlatılır. Fotokimyasal reaksiyonlar bazen ışık enerjisinin kimyasal enerjiye çevriminde oldukça yüksek verim gösterirler. Yeşil bitkilerdeki fotosentez olayında, sudaki hidrojen ve oksijen molekülleri arasındaki kararlı yapının ışık enerjisi yardımıyla kırılması şeklinde başlar. Ancak, bu reaksiyon sadece bitkilerde oluşur (Türe, 2007). Fotosentetik olarak aktif bazı organizmalar, içerdikleri pigmentler nedeniyle, suyun ayrıştırılması için daha düşük enerjili, yani görünür bölgede ışınıma gerek duyarlar. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalarda, çeşitli mikroorganizmalar ile deniz yosunları hidrojen üretimi için oldukça ümit verici bulunmuştur (Skulberg, 1991; Smith ve ark., 1992).

Biyofotoliz işlemi, bitki ve alglerdeki fotosentezin esasını oluşturur. Fotosentezde, ışığın absorbe edilmesiyle iki ayrı fotosentetik sistem serisi oluşur: 1) suyun ayrılması ve O_2'nin yayılması sistemi ("fotosistem II" veya "PS II") ve 2) fotosistem I (PSI), CO_2'in indirgenmesi (Ramachandran ve ark., 1998). Yeşil bitkiler karbon kaynağı alarak yalnızca CO_2 kullanırlar ve sadece enzimler hidrojen oluşumunu katalizleyebilirler. Ancak yeşil bitkilerde hidrogenaz enzimi yoktur ve bu nedenle hidrojen üretemezler (Das ve Veziroğlu, 2001). Mikroalgler çoğunlukla ökaryotik (yeşil algler gibi) veya prokaryotiktir (siyanobakteriler ve mavi-yeşil algler). Bunlar hidrogenaz enzimi içerirler ve özel koşullar sağlandığında hidrojen üretebilirler. Hidrogenaz enzimi ile ferrodoksin (Fd) taşıyıcılığıyla hidrojen oluşum denklemi, aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$H_2O \longrightarrow \text{PS II} \longrightarrow \text{PS I} \longrightarrow \text{Fd} \longrightarrow \text{Hidrogenaz} \longrightarrow H_2 \qquad (1.1)$$

$$\downarrow$$

$$O_2$$

Bu proses doğal olarak diğer proseslere göre cazip gibi gözükmektedir. Çünkü güneş enerjisini kullanarak suyu, oksijen ve hidrojene ayırmaktadır: ($H_2O \rightarrow H_2 + ½ O_2$). Ancak, ortamda bulunan düşük oksijen konsantrasyonlarında bile, hidrogenaz enziminin aktivitesini biyofotoliz boyunca inhibe ederek hidrojen oluşumunu azaltmaktadır (Das ve Veziroğlu, 2001; Benemann ve Hallenback, 2002).

Biyofotoliz iki şekilde gerçekleşir;

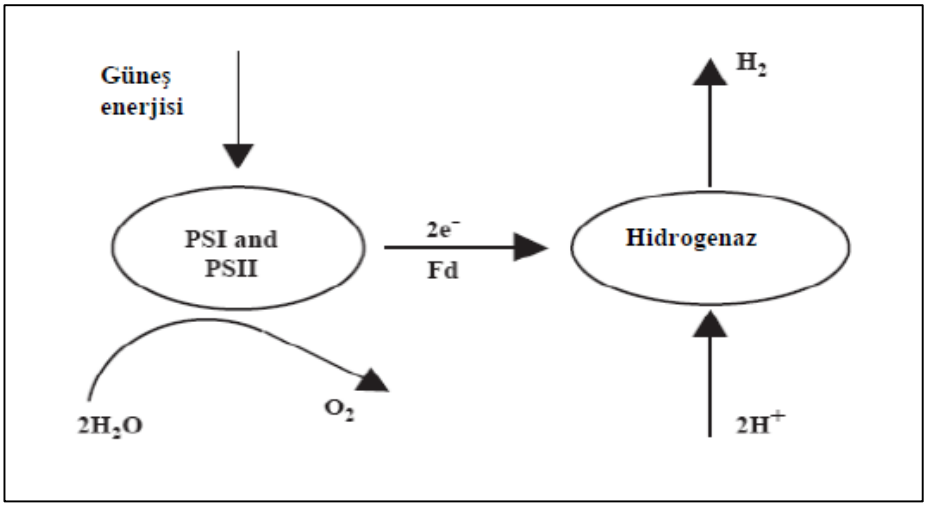
- Doğrudan biyofotoliz
- Dolaylı biyofotoliz

1.5.1.1 Doğrudan Biyofotoliz

Doğrudan biyofotoliz ile hidrojen üretiminde mikroalgler ışık enerjisini kullanarak hidrojen üretirler (Şekil 1.3) (Leung ve ark., 2006).

$$2H_2O \xrightarrow{\text{Işık Enerjisi}} 2H_2 + O_2 \qquad (1.2)$$

Bu proseste, PSII ışık enerjisini absorbladığında elektronlar oluşmakta, bu elektronlar, PSI ile absorblanan enerjiyi kullanarak ferrodoksin ile transfer edilmekte ve hidrogenaz enzimi Fd'den aldığı elektronları kullanarak hidrojen üretmektedir (Leung ve ark., 2006).



Şekil 1.3 Doğrudan biyofotoliz sistemi şeması (Leung ve ark., 2006)

Hidrogenaz oksijene karşı hassastır. Bu yüzden ortamda en yüksek % 0,1 değerinde oksijen bulunabilir.

1.5.1.2 Dolaylı Biyofotoliz

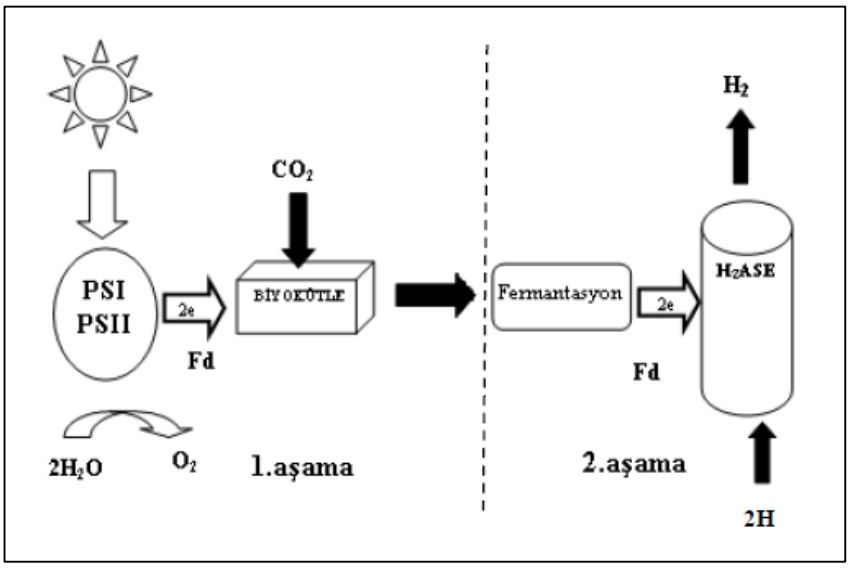
Dolaylı biyofotoliz dört adımdan oluşur:

- Fotosentez ile biyokütle üretimi
- Biyokütlenin derişimi
- Aerobik karanlık fermantasyon alg hücreleriyle verimi 4 mol H_2/mol glukoz ve 2 mol asetat oluşması
- 2 mol asetatın hidrojene dönüşümü

Dolaylı biyofotoliz ile hidrojen üretiminde siyanobakteriler kullanılmaktadır. Gerçekleşen reaksiyonlar 1.3 ve 1.4 eşitlikleriyle verilmektedir (Leung ve ark., 2006). Dolaylı biyofotoliz reaksiyonu Şekil 1.4'de verilmiştir (Benemann ve Hallenbeck, 2002).

$$12H_2O + 6CO_2 \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \quad (1.3)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2 \quad (1.4)$$



Şekil 1.4 Dolaylı biyofotolizle hidrojen üretim şeması (Benemann ve Hallenbeck, 2002)

1.5.2 Su – Gaz Dönüşümü Reaksiyonu

Bazı heterotrofik bakteriler (*Rhodospirillium rubrum* gibi) karanlıkta CO kullanarak ve ATP meydana getirerek, H^+'yı H_2'ye indirgerler (Leung ve ark., 2006).

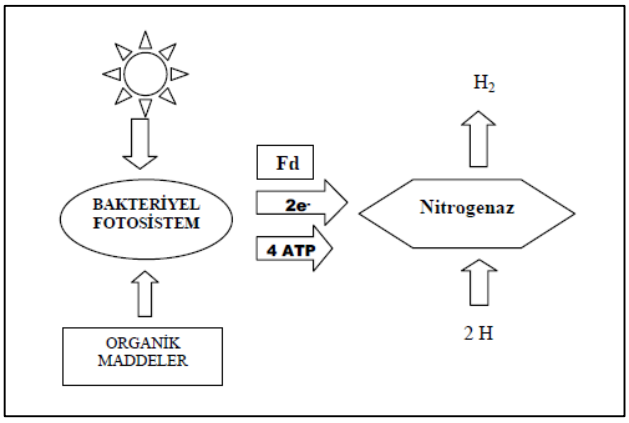
$$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2 \quad \Delta G^0 = -20.1 \text{ kJ/mol} \qquad (1.5)$$

Ana ürünler CO_2 ve H_2'dir. Su – gaz reaksiyonu hidrojen üretimine oldukça uygun bir prosestir. Bu proseste gram + (*Carboxydothermus hydrogenoformans*) ve gram - (*R. rubrum, Rubrivax gelatinosus*) bakteriler kullanılabilir. Anaerobik koşullar altında CO birçok proteinin sentezini meydana getirmektedir. Bunlar CO dehidrogenaz, Fe – S proteini ve CO hidrogenazdır (Leung ve ark., 2006).

Biyolojik su-gaz dönüşüm reaksiyonu ile hidrojen üretimi hala laboratuvar ölçeklidir ve bu konuda yapılan çalışmalar kısıtlıdır.

1.5.3 Fotofermantasyon ile Hidrojen Üretimi

Fotosentetik bakteriler, biyokütle ve organik asitlerden nitrogenaz enzimi ve güneş enerjisini kullanarak hidrojen üretme kapasitesine sahiptirler. Şekil 1.5'de fotofermantasyon yöntemi ile hidrojen üretimi şematik olarak gösterilmiştir. Son yıllarda bu konu ile ilgili çalışmalarda, girdi olarak endüstriyel ve tarımsal atıklar kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 1.5 Fotofermantasyon prosesi ile hidrojen üretimi (Benemann ve Hallenbeck, 2002)

Fotosentetik bakterileri çeşitli çevre şartlarına göre (aerobik, anaerobik, ışıklı ya da ışıksız) fonksiyonel hale gelebilirler, geniş aralıktaki ışık spektrumunda çalışılabilir ve yüksek ışık yoğunluğuna dayanabilirler (Uyar, 2008).

Fotosentetik bakteriler, uygun organik bileşiklerin varlığında, azot sınırlı şartlarda ve oksijensiz ortamda büyütüldüklerinde hidrojen üretebilmektedirler (Meyer ve ark., 1978; Nandi ve ark., 1998). Oksijen ve amonyum iyonları hidrojen üretimini baskılayan yani negatif yönde etkileyen iki önemli faktördür. Bu mikroorganizmalar oksijensiz fotosentez yaptıklarından dolayı nitrogenaz enziminin oksijene duyarlılığı bir problem olarak ortaya çıkmamaktadır.

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

i) Nitrogenaz

Uyar (2008), fotosentetik bakteriler ile hidrojen oluşumunun bu enzim ile gerçekleştiğini ve oksijeni uzaklaştırdığını açıklamıştır. Reaksiyon Eşitlik 1.6'da verilmiştir.

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16\ Pi \qquad (1.6)$$

ii) Hidrogenaz

Enzim katalizi reaksiyonu basitçe Eşitlik 1.7'de verilmiştir.

$$H_2 \leftrightarrow 2\ H^+ + 2e^- \qquad (1.7)$$

Hidrojen üretim hızını etkileyen faktörler enzim aktivitesi veya çevresel faktörlerdir (Benemann ve Hallenbeck, 2002; Melis, 2002). Işık önemli bir etken olarak ortaya çıkmakta, ışığın yoğunluğu, dağılımı hidrojen üretimini etkilemektedir. Ayrıca, azotlu bileşiklerin konsantrasyonu, indirgenmiş bileşiklerin konsantrasyonu, besi ortamının pH değeri, sıcaklık, tuz miktarı, ortamın oksijen içermesi ve ortamdaki farklı metaller de üretim hızını etkileyen diğer faktörler arasındadır.

1.5.4 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretimi

Birçok anaerobik mikroorganizma kullanılarak karanlık fermantasyon reaksiyonu ile şeker, aminoasit ve doymuş asit metabolizması sonucunda H_2, CO_2 ve diğer indirgenen maddeler üretilir (Turner ve ark., 2007).

Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi süresince, anaerobik bakteriler organik maddeleri kullanarak karanlık şartlarda hidrojen üretirler. Bu proses "karanlık hidrojen fermantasyonu" olarak adlandırılır. Çünkü kullanılan anaerobik bakteriler ışığa ihtiyaç duymazlar (Uyar, 2008). Geniş bir aralıkta, zorunlu anaeroblar ve fakültatif anaerobik kemohetotroflar, *Clostridia* ve enterik bakteri gibi mikroorganizma türleri karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde etkilidirler (Das ve Nath, 2004). Birçok anaerobik mikroorganizma karbonhidrat içeren substratları kullanarak hidrojen üretebilir. Hidrojen üretimi bakterilerde bulunan hidrogenaz aktivitesi ile gerçekleştirilmektedir (Chenlin ve Fang, 2007). Bu mikroorganizmalar arasında *Enterobacter, Bacillus* ve *Clostridium* türleri öne çıkmaktadır (Hawkes ve ark., 2002).

Hidrojen üreten mikroorganizmalardan *Clostridium* türleri *Clostridium butyricum, Clostridium termolactium, Closrtidium pasteurianum, Clostridium paraputrifium* M-21 ve *Clostridium bifermentants* zorunlu anaerob, gram pozitif, çubuk şeklinde ve spor oluşturan organizmalardır (Chenlin ve Fang, 2007). *Clostridia* türleri hidrojen üretimini üstel büyüme fazı evresinde gerçekleştirirler. Popülasyon durgunluk fazına ulaştığında, kesikli olarak *Closrtidia*'nın büyüme metabolizması hidrojen ve asit üretim fazından çözücü üretim fazına dönüşür. Farklı mezofilik kültürlerle yapılan

araştırmalarda hidrojen üretiminde %64 – 66 *Clostridia* türlerinin kullanıldığı gözlenmiştir (Kapdan ve Kargı, 2006). Hidrojen üretimi için kullanılan diğer türlerden olan fakültatif anaeroblar ise *Escherichia coli, Enterobacter, Citrobacter*'dir. *Enterobacter* gram negatif ve çubuk şekillidir. *Clostridium* ve *Enterobacter* türleri karışık kültür halinde çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Chenlin ve Fang, 2007).

1.5.4.1 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretim Metabolizması

Karanlık hidrojen fermantasyonu potansiyelini etkileyen iki önemli engel bulunmaktadır. Bunlar yüksek maliyetli glukoz kaynakları ve düşük hidrojen molar verimidir. Glukoz ideal bir substrattır, ancak çok masraflıdır. Birçok tarımsal kaynaklar ve yiyecek atıkları karbonhidratlarca zengindir ve glukoz kaynağı olarak kullanılabilmektedir (Turner ve ark., 2007).

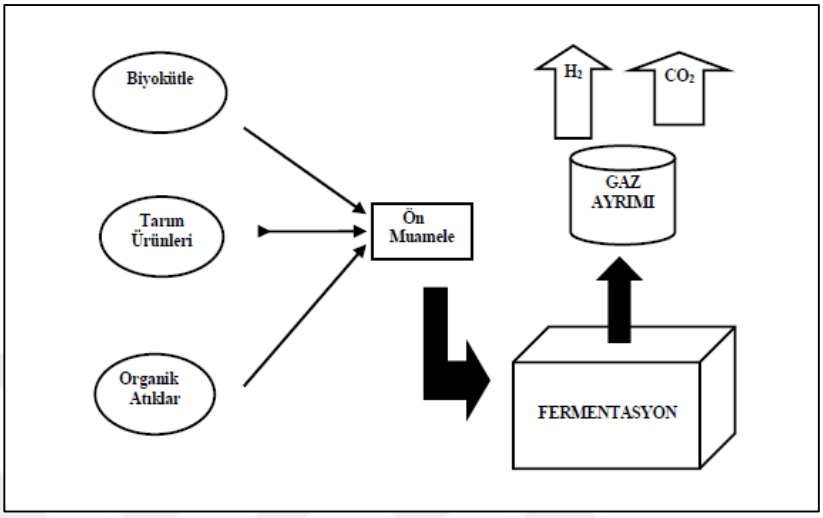
Anaerobik bakteriler fermantasyon ile karbonhidratlarca zengin substratlarla 30°C – 80°C'de karanlık ortamda hidrojen üretebilirler. Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi Şekil 1.6'da gösterilmiştir. Biyofotoliz prosesinde sadece H_2 üretilmektedir ancak karanlık fermantasyon prosesinde H_2'nin yanında CO_2 de çıkmaktadır. Fakat bu CO_2 değeri bitkilerin fotosentez yapması için gerekli olan miktar kadardır (Leung ve ark.,2006).

Thauer ve ark., (2007), *Clostridium sp.* mikroorganizmasıyla sadece son ürün olarak asetat oluşması durumunda hidrojen veriminin 4 mol H_2/mol glukoz olacağını belirtmiştir (Eşitlik 1.8). Eğer son ürün olarak bütirik asit meydana gelirse 2 mol hidrojen oluşmaktadır (Eşitlik 1.9) (Turner ve ark., 2007).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow \underset{\text{Asetik asit}}{2CH_3COOH} + 4H_2 + 2CO_2 \qquad \Delta G^0 = -182.4 \text{ kj} \quad (1.8)$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow \underset{\text{Bütirik asit}}{CH_2CH_2CH_2COOH} + 2H_2 + 2CO_2 \qquad \Delta G^0 = -257.1 \text{ kj} \quad (1.9)$$

Ancak pratikte 1 mol glukozdan 4 mol H_2'ye ulaşılamaz. Çünkü üretim sonunda ürünlerin çoğu asetik asit ve bütirik asit içerir. Ayrıca substratların bakterilerin büyümesi için harcanmasından dolayı teorik değer gerçekleşemez.



Şekil 1.6 Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi şematik gösterimi (Benemann ve Hallenbeck, 2002)

Hidrojen üretimi hidrogenaz enzimi ile aşağıdaki reaksiyon ile katalizlenir.

$$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2 \qquad (1.10)$$

Hidrogenaz çeşitli mikroorganizmaların fizikogeneteğinde var olmaktadır. Hidrojen verimi, çeşitli mikroorganizmaların kullanımıyla yol izini temel alarak değiştirir. Substrat olarak glukoz kullanılmasıyla glikoliz yol iziyle hidrojen üretiminde iki farklı bakteri yol göstermektedir (Şekil 1.7) (Turner ve ark., 2007).

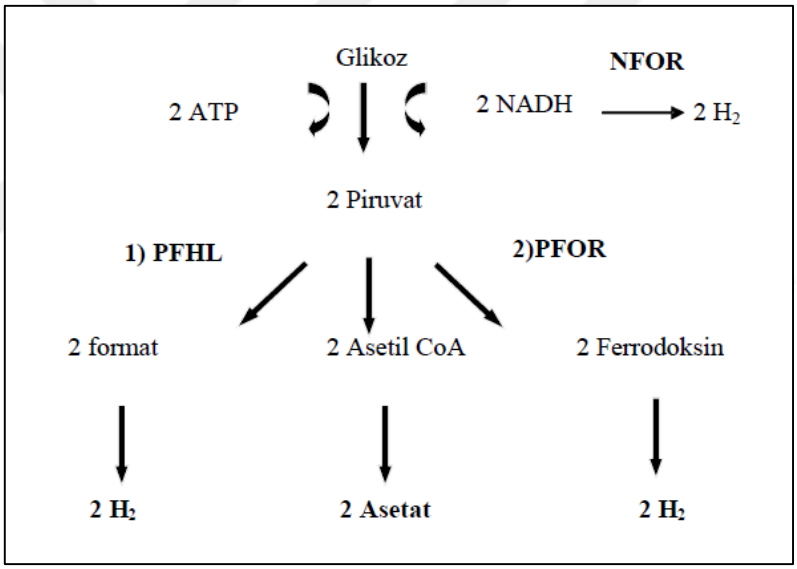
1) Enterik bakteri, *Esherichia coli* gibi, piruvat – format hidrojenliyaz (PFHL) enzim kompleksi (Benemann ve Hallenbeck, 2002).

$$\text{Piruvat} + \text{CoA} \xrightarrow[\text{Piruvat-format hydrojenliyaz}]{} \text{Asetil-CoA} + \text{format} \qquad (1.11)$$

2) Kuvvetli anaeroblar, *Clostridium sp.* türleri gibi, piruvat – ferrodoksin oksidoredüktaz (PFOR) (Benemann ve Hallenback., 2002).

$$\text{Piruvat} + \text{CoA} + 2\text{Fd(ox)} \xrightarrow[\text{Piruvat-ferrodoksin oksidoredüktaz}]{} \text{Asetil-CoA} + CO_2 + 2\text{Fd(red)} \qquad (1.12)$$

1 mol glukoz başına üretilen hidrojen verimi (molar hidrojen verimi) enterik bakteri ile 2 mol'dür (2 mol H_2/mol glukoz). NADH varlığında *Clostridium sp.* ile üretilen hidrojenin verimi ise en yüksektir. Ferrodoksin oksidoredüktaz (NFOR) aktivitesi ile ek olarak 2 mol hidrojen daha üretilebilir (Turner ve ark., 2007).



Şekil 1.7 Glukoz fermantasyonu ile hidrojen oluşumu yol izi (Turner ve ark., 2007)

1.5.4.2 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretimini Etkileyen Parametreler

Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretiminde önemli parametreler aşağıda verilmiştir.

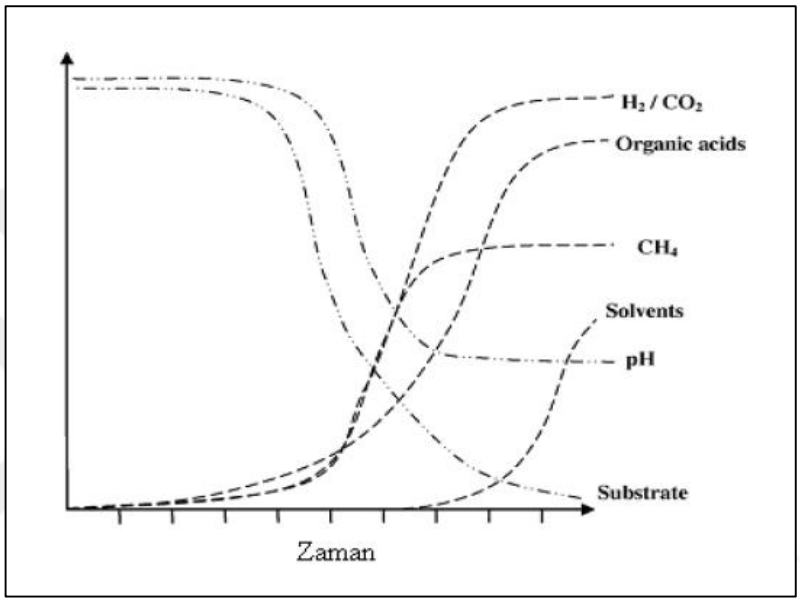
- Sıcaklık
- pH
- Oksitlenme – indirgenme potansiyeli (ORP)

- Kısmi gaz basıncı
- Üretilen asitlerin çeşitliliği
- Substrat ve biyokütle konsantrasyonu
- Besinler
- Mikroorganizma kültürü

Sıcaklık mikroorganizmaların büyümesini ve metabolik aktivitelerini büyük ölçüde etkilediği için önemli bir parametredir (Lee, Lin ve Chang, 2006). Karanlık fermantasyon prosesleri mezofilik (25 – 40℃), termofilik (40 - 65℃) ve ekstrem termofilik (65 - 80℃) koşullarda gerçekleşebilmektedir (Levin ve Chahine, 2010). Karışık kültür sistemleri ile hidrojen üretimi için optimum sıcaklık, bakteri popülasyon yoğunluğuna bağlıdır (Yu, Zhu, Hu ve Zhang, 2002; Zhang, Liu ve Fang, 2003). Artan sıcaklık ile hidrojen üretiminin artacağı gösterilmiştir. Ancak, özellikle mezofilik aralığın dışında, sıcaklık çok daha yüksek düzeylere çıktığı zaman üretim verimini azaltabilir (Wang ve Wan, 2008). Biyokütleden hidrojen üretiminde, termofilik anaerobik bakteriler, yüksek verimde hidrojen ürettiği için tercih edilebilir. Maksimum teorik değerleri 4 mol H_2/mol glukoz'dur. Zorunlu anaerob bakteri *Clostridium sp.* ile 2 mol H_2/mol glukoz ve fakültatif anaerob bakteri olan *Enterobacter sp.* ile 2 mol'den daha az verim elde edilmektedir. Ancak kullanılan mikroorganizmalarda optimum hidrojen verimi ve yüksek hidrojen üretim hızı istenmektedir. Ürün oluşumu hücre yoğunluğuna bağlıdır. *Clostridium sp.* ve *Enterobacter sp.* üretim hızı maksimum 23 ve 58 mmol/L.saat'e kadar ulaşabilmektedir (Veziroğlu ve Frano, 1998).

Karanlık fermantasyon süresince pH önemli bir faktördür ve fermentasyon pH değeri ile hidrojen, organik asit ve diğer ürün oluşumunun değişimi Şekil 1.8'de gösterilmiştir. Düşük pH değerlerinde metan oluşumu sona ermekte ve H_2/CO_2 üretilmektedir. Çoğu metanojenler sınırlı pH aralığında (6 – 8) çoğalmalarını gerçekleştirmektedirler. Birçok araştırmada metanojenlerin oluşumunu engellemek için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar arasında kimyasal bileşikler kullanılarak (asetilen, etanol, metil klorid, 2-brometansülfanat) metanojenlerin oluşmasını engellemenin yanı sıra biyokinetik kontrolde yoğun olarak

uygulanmaktadır. Biyokinetik kontrol yöntemleri, düşük pH ve ısı etkisi (~100 °C, 15 – 30 dakika) uygulanmaktır. Biyokinetik kontrol yönteminde, hem uygulamanın kolay hem de ekonomik olması açısından düşük pH uygulaması tercih edmektedir (Logan ve ark., 2003; Vazquez ve Varaldo, 2008). Karanlık fermantasyon için en uygun pH aralığının 5,0 – 6,0 arasında olduğu bildirilmiştir (Fang ve Liu, 2002; Chen, Lin ve Chang, 2001).



Şekil 1.8 Kesikli hidrojen fermantasyonu tipik gösterimi (Vazquez ve Varaldo, 2008)

Hidrojen üreten mikroorganizmalar zorunlu anaeroblardır. Oksitlenme indirgenme potansiyeli (ORP) anaerobik koşulları sağlamak için önemlidir. Hidrogenaz enzimi oksijen inhibisyonuna hassas olduğundan, ORP karanlık fermantasyon ile hidrojen üretim proseslerinde < -150 mV'de tutulmalıdır (Argun, 2010). Fermantasyon ortamı içerisinde oluşan oksijenin inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak ve ORP = -150 mV değerini elde etmek için, ortam içerisinden argon veya N_2 gazı geçirilerek oksijenin süpürülmesi sağlanır ya da sıvı faz içerisine sodyum tiyoglukolat veya L-cystein kimyasalları eklenerek anaerobik ortam sağlanır. Oksijeni ortamdan uzaklaştırmak için fakültatif mikroorganizmalar ile karışık kültür çalışmaları da mevcuttur. Örneğin *Enterobacter aerogenes* fakültatif bir anaerobik türdür ve *Clostridium sp.* ile karışık kültür oluşturarak hidrojen üretebilir. *Clostridium butyricum* ile hidrojen üretiminde

Enterobacter aerogenes kullanarak indirgeyici madde olmaksızın yüksek verimde hidrojen üretilebilmektedir (Yokoi ve ark., 1998; Kargı ve ark., 2006).

Substat ve biyokütle konsantrasyonu veya biyokütle/substrat oranı, hidrojen üretim hızını ve verimini etkileyen bir başka parametredir. Düşük substrat konsantrasyonları üretim verim ve hızının düşmesine neden olurken, yüksek substrat konsantrasyonları ise inhibisyona neden olmaktadır. Aynı şekilde düşük biyokütle konsantrasyonları uzun süren lag fazına ve yavaş fermantasyon oranlarına, yüksek biyokütle konsantrasyonları da oluşan son ürünlerin inhibisyon etkisi yaratmasına neden olmaktadır. Biyokütle konsantrasyonu ayrıca hidrojen üretim verimi ile toplam uçucu yağ asitlerinin oluşumunu etkilemektedir (Argun ve ark., 2008).

Hidrojen ürteiminde basit şekerler, nişasta içeren atıklar, selüloz içeren atıklar, gıda sanayi atıkları, atık su ve atık çamur susbtrat olarak kullanılmıştır (Kapdan ve Kargı, 2006). Bazı substratlar kompleks bir yapıya sahiptir ve çeşitli ön işlemler uygulanarak fermantasyona hazır hale getirilmektedir (Wongthanate, Chinnacotpong ve Khumpong, 2014). Biyokütle, biyohidrojen üretimi için doğada en bol bulunan ucuz, temiz, güvenilir yenilenebilir kaynaklardandır (Leung, ve ark., 2006; Kapdan ve Kargı, 2006). Birçok gelişmekte olan ülkede biyokütle enerjisi %40 – 50 oranında enerji ihtiyacına katkıda bulunurken, dünyada ise enerji arzının yaklaşık %12'sini karşılamaktadır (Demirbaş, 2001). Son yıllarda ise hidrojen gazı üretiminde basit karbon kaynaklarının yerine hammadde olarak atık biyokütle kullanılması ve özellikle birincil aday olarak lignoselülozik atıkların tercih edilmesi söz konusudur.

Karbon kaynağı haricinde mikroorganizmaların optimum yaşam koşullarının sağlanması için azot, fosfor ve diğer inorganik mineraller gerekmektedir. Besin; hidrojen üretimi, büyüme ve karanlık fermantasyon bakterilerinin hücresel faaliyetleri için hayati önem taşımaktadır. Azot; protein, nükleik asit ve enzimlerin önemli bir bileşenidir ve hidrojen üreten bakteriler için önemli bir besin kaynağıdır (Wang ve Wan, 2008). Amonyum klorür (NH_4Cl), üre (CH_4N_2O), amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3), maya ekstraktı ve polipepton hidrojen üretimi için mevcut azot kaynaklarıdır (Bisaillon, Turcot ve Hallenbeck, 2006; Salerno, Park, Zuo ve

Logan, 2006; Argun ve ark., 2008; Lay ve ark., 2005; Liu ve Shen, 2004; Morimoto ve ark., 2004; Yokoi, Ohkawara, Hirose, Hayashi ve Takasaki, 1995). Ayrıca, fosfat hidrojen üretimi için gerekli olan temel besleyici değeri yanı sıra tamponlama kapasitesi nedeniyle de besi ortamına eklenmektedir. Fosfat uygun konsantrasyonlarda karanlık fermantasyon bakterilerinin hidrojen üretimini arttırdığı gibi çok yüksek konsantrasyonlarında hidrojen üretiminin inhibisyonuna neden olmaktadır (Bisaillon, ve ark., 2006; Lay ve ark., 2005; Argun ve ark., 2008).

Metal iyonları yüksek konsantrasyonlarda toksik etki yaratabilir ancak eser miktardaki metal iyonları fermantatif hidrojen üretimi için gereklidir. Mg^{2+}, Na^{+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} iyonları, organizmaların kültivasyonu ve hidrojen üretimi için gerekli iyonlardır (Li ve Fang, 2007).

Hidrojen üretiminde kullanılan önemli bakteri kültürü *Clostridium* genusuna ait *C. Butyricum* (Yokoi ve ark., 2001), *C. thermolactium* (Collet ve ark., 2004), *C. pasteurianum* (Lin ve Lay, 2004; Liu ve Shen, 2004), *C. paraputrificum* M-21 (Evvyernie, 2001) ve *C.bifermentants* (Wang ve ark., 2003) türleridir. Bunlar, obligat anaerob ve spor oluşturan organizmalardır. Ayrıca *Clostridium sp.* türleri anaerobik çamurun ısı ile muamelesi sonucu elde edilirler (Kapdan ve Kargı, 2006). *Enterobacter aerogenes* ve *E. Clocae* ITT-BY08 benzer enterik fakültatif bakterilerdir. *T. Thermosaccharolyticum, Desulfotomaculum geothermicum, Thermococcus kodakaraensis* KOD1, *Klebsiella oxytoca* HP1 biyohidrojen üretiminde kullanılan benzer termofilik mikroorganizmalardır (Kapdan ve Kargı, 2006). *E. coli* ve *Hafnia alvei* bakterileri glukozdan biyohidrojen üretebilmektedir (Podesta ve ark., 1997). *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Vibrio* spp. hidrojen üretiminin aerobik kültürleridir. *Clostridium* spp., *Actinomyces* spp. ve *Porphyromonas* spp. anaerobik granüllü çamurda bulunmaktadır (Kapdan ve Kargı, 2006). *Thermotogales sp.* ve *Bacillus sp.* hidrojen üretiminde kullanılan mezofilik asidojenik kültürlerdir (Shin, Youn ve Kim, 2004). *Thermoanaerobacterium sp.* de benzer bir şekilde hidrojen üretme kapasitesi olan anaerobik termofilik organizmadır (Shin ve ark., 2004; Ueno, ve ark., 2001). *T. thermosaccharolyticum* ve *Desulfotomaculum geothermicum* hidrojen üreten termofilik asidojenik kültürdür

(Shin ve ark., 2004). Mezofilik ve termofilik mikroorganizmaların yanı sıra hipertermofilik türler de hidrojen üretme potansiyeline sahiptir. *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 türü hipertermofilik bakteriye örnektir (Kanai ve ark., 2005). *Klebsiella oxytoca* HP1 ve *Clostridium thermolactium* farklı sıcaklıklarda hidrojen üretmektedirler (sırasıyla 58℃ ve 35℃) (Collet ve ark., 2004; Minnan ve ark., 2005). Özet olarak, *Clostridium sp.* ve *Enterobacter sp.* karanlık fermantasyon ile hidrojen üretiminde aşı malzemesi olarak kullanılan en yaygın mikroorganizmalardır (Wang ve Wan, 2009). *Clostridium sp.* gram pozitif, çubuk şekilli anaeroblardır ve spor oluştururlar. *Enterobacter sp.* ise gram negatif, çubuk şekilli ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır (Li ve Fang, 2007).

1.6 Biyohidrojen Gazı Üretimi İçin Biyokütle

Biyokütle enerjisi için kullanılan karbon kaynağının ekilebilir arazi ile rekabeti önlemek için gıda kaynakları, gıda dışı ürünler veya tarımsal atıklar olmalıdır. Bu nedenle biyokütle enerjisi karbon kaynakları; birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyokütle olarak sınıflandırılmıştır. Birinci nesil karbon kaynağı olarak glukoz, maltoz, sukroz ve nişasta biyohidrojen üretiminde ayrıntılı olarak incelenmiştir (Kapdan ve Kargı, 2006).

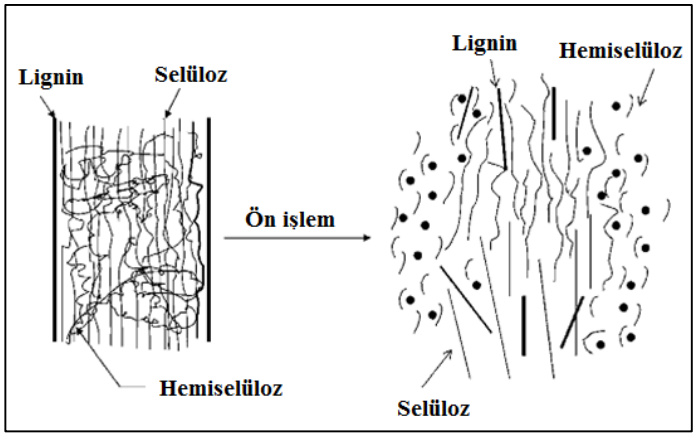
İkinci nesil biyokütle, tarımsal atıklar, kağıt atıkları, endüstriyel ve evsel organik katı atıklar olup lignoselülozik biyokütle olarak da isimlendirilmektedir. Basit şekerlerin substrat olarak kullanılması yerine lignoselülozik biyokütle içindeki selüloz ve hemiselülozun kullanılması hedeflenmektedir. Bu amaçla, mısır koçanı, buğday kepeği, buğday samanı, pirinç samanı, pirinç kepeği, tatlı sorgum, patates kabukları, şeker kamışı posası gibi ikinci nesil biyokütleler hidrojen üretiminde kullanılmıştır (Kim ve Dale, 2004).

Son yıllarda, biyohidrojen üretimi için üçüncü nesil hammadde kaynağı olarak alglerin kullanımı üzerine çalışmalar da önem kazanmıştır (Wijffels ve Barbosa, 2010). Yüksek karbonhidrat ve lipid içeriğine sahip olmaları, hızlı büyüme oranları, karbondioksit ve diğer sera gazlarını kullanarak büyümeleri ve tarımsal kaynaklara

nazaran daha kısa hasat döngüsüne (1-10 gün) sahip olmalarından dolayı biyohidrojen üretiminde sürdürülebilir ve yenilenebilir karbon kaynağı niteliği taşımaktadırlar (Harun ve ark., 2010).

Biyohidrojen üretiminde ağırlıklı olarak sukroz (şeker kamışı), nişasta bazlı (buğday, mısır, arpa, tatlı sorgum ve tatlı patates) biyokütleler tercih edilmekle birlikte atık niteliği taşıyan organik içerikli evsel, tarımsal ve endüstriyel lignoselülozik biyokütlenin kullanımının yaygınlaşması atık geri dönüşümünün enerji üretimine yönlendirilmesi gereklidir. Bu açıdan lignoselülozik biyokütleden biyohidrojen üretimi ön plana çıkmaktadır.

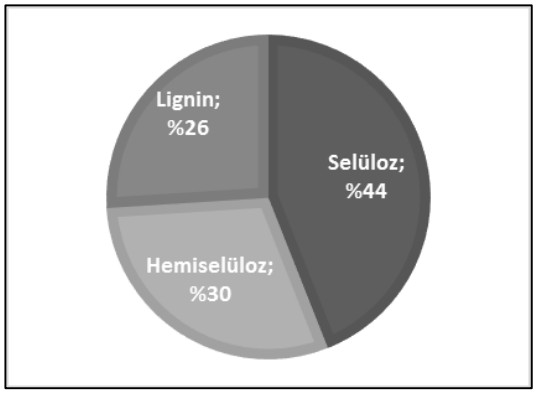
Lignoselülozik biyokütleden biyohidrojen üretimi; 1) ön işlem, 2) hidroliz ve 3) fermantasyon olmak üzere üç temel adım içermektedir. Uygulanan işlemlerde temel amaç parçacık çapını küçültmek, lignini ayırmak ve selülozun glukoza hidrolizi ile fermantasyon için gerekli substratı elde etmektir. Selüloz yüzey alanının arttırılması, karbonhidrat kaybının en aza indirilmesi, hidroliz ve fermantasyon işlemi sırasında mikroorganizmalara ya da enzimlere inhibisyon etkisi yaratan yan ürünlerin oluşumunun önlenmesi ve düşük maliyetli olması ön işlemlerde istenilen özelliklerdir.



Şekil 1.9 Lignoselülozik biyokütle üzerinde ön işlem etkisinin şematik gösterimi (Zheng ve ark., 2009)

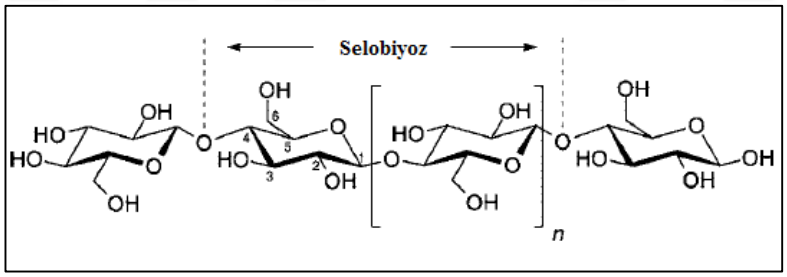
Selüloz, biyolojik yöntemlerle elde edilen ürünlerin artan talebini sağlamada neredeyse tükenmez bir substrat kaynağı olarak kabul edilir. Lignoselülozik atıkların

genel içeriği Şekil 1.10'da verilmiştir. %44 ile en yüksek içeriği selüloz oluşturmaktadır (McMillan, 1994).



Şekil 1.10 Lignoselülozik biyokütlenin üç temel bileşimi (McMillan, 1994)

Selüloz, selobiyozun C_1 ve C_4 pozisyonlardaki glukozidik bağları (C-O-C) ile bağlı olan iki glukoz şeker biriminden oluştuğu doğrusal bir polimerdir (Şekil 1.11). Hidroliz sırasında glukozidik bağların kırılması ile glukoz molekülleri elde edilmektedir (Pinkert ve ark., 2009).



Şekil 1.11 Selülozun polimer zincir yapısı (Pinkert ve ark., 2009)

1.7 Ön İşlemler

Lignoselülozik atıklardan biyolojik hidrojen gazı üretimi için ön işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ön işlemler; 1) fiziksel, 2) fiziko-kimyasal, 3) kimyasal ve 4) biyolojik olmak üzere dörde ayrılır. Fiziksel ön işlemler; lignoselülozik atıkların öğütülmesi, frezlenmesi veya talaş haline getirilmesi gibi mekanik olarak parçalanmasını kapsayan, kimyasal veya biyolojik ön işlemlere hazırlık niteliğindedir. Öğütme ön işlemi ile biyokütlenin yüzey alanı genişler,

fermantasyonda kısıtlayıcı faktör olan selüloz kristallik derecesinde azalma ve hemiselüloz gibi substrat değeri olan düşük molekül ağırlıklı bileşenlerin de kazanılması sağlanır (Lin ve ark., 2010). Ancak fiziksel ön işlemler, biyokütlenin fermantasyona uygun hale getirilmesi için tek başına yeterli değildir. Kimyasal ön işlemlerle selülozu daha kolay fermente edilebilir basit şekerlere dönüştürülmesi gereklidir. Oksidasyon, asit, alkali ön işlemleri ve solvent ekstraksiyonu en yaygın olarak kullanılan kimyasal ön işlemlerdir. Araştırmalar; öğütme, buhar patlaması, mikrodalga fırın ve oksitleyici ön işlemin de dahil olduğu diğer fiziksel ya da kimyasal ön işlemler ile kombine asit/alkali ön işlemlerin hidroliz verimliliğini arttırdığını ve aynı zamanda asit/alkali tüketiminin azaltılabileceğini göstermektedir (Lo ve ark., 2011). Biyolojik ön işlemlerde, kahverengi ve beyaz çürükçül mantar türleri ya da bu mikroorganizmaların saflaştırılmış enzimleri kullanılarak lignin ve hemiselülozun parçalanması sağlanabilir. Ancak, özellikle enzim saflaştırılma maliyetinin yüksek, reaksiyon hızının yavaş olması nedeniyle daha az tercih edilen bir yöntemdir.

1.7.1 Fiziksel Ön İşlemler

1.7.1.1 Mekanik Parçalama

Atık materyaller, selüloz kristalliğini azaltmak için yontma, öğütme, talaş haline getirme ve ezme (presleme) kombinasyonları ile parçalanabilirler. Materyallerin boyutu yontma işleminden sonra genellikle 10-30 mm, öğütme ve ezme işlemlerinden sonra ise 0,2-2 mm arasındadır. Titreşimli top öğütmesinin amacı; selüloz kristalliğini kırarak biyokütlenin organizmalar tarafından kullanılabilirliğini kolaylaştırmakta ve bu nedenle sıradan top öğütmesinden daha etkili olmaktadır (Millet, 1976). Tarımsal malzemelerin mekanik parçalanmasının zorluğu, son tanecik boyutu ve atık biyokütle karakteristiklerine bağlıdır (Cadoche ve Lopez, 1989).

1.7.1.2 Piroliz

Piroliz yönteminde, lignoselülozik materyaller 300ºC'den daha yüksek sıcaklıklarda işlem gördükleri zaman, selüloz hızlıca ayrışarak gaz ürünleri ve kömür kalıntısı oluşturur (Kilzer ve Broido, 1965; Shafizadeh ve Lai, 1975). Bu ayrışma çok yavaştır ve daha düşük sıcaklıklarda daha az uçucu ürünler oluşturulur. Süreç, oksijenin varlığıyla zenginleştirilebilir. Çinko klorür veya sodyum karbonat, bir katalizör olarak eklendiği zaman, saf selülozun ayrışması, daha düşük bir sıcaklıkta meydana gelebilir (Shafizadeh ve Lai, 1975).

1.7.2 Fiziko-kimyasal Ön İşlemler

1.7.2.1 Buhar Patlaması

Lignoselülozik materyallere uygulanan en yaygın ön işlemdir (McMillan, 1994). Küçük parçalara ayrılmış biyokütle yüksek basınçtaki doygun buhar ile muamele edilir. Daha sonra basınç süratle azaltılarak materyallerin patlayıcı dekompresyonu sağlanır. Buhar patlaması genellikle 160 - 260ºC'de ve 0,69 – 4,83 MPa basınçta başlatılır. Bu koşullarda birkaç dakika ya da daha az sürede tutulduktan sonra materyal atmosferik basınca maruz bırakılır. Bu işlem yüksek sıcaklıktan dolayı hemiselülozun parçalanmasına ve ligninin dönüşümüne sebep olur ve böylece selüloz hidrolizi artar.

Buhar patlaması ön işleminin etkinliği zamana, sıcaklığa, biyokütle parçacıklarının büyüklüğüne ve nem içeriğine bağlı olarak değişir. Optimum hemiselüloz çözünürlüğü ve hidrolizi ya yüksek sıcaklık – kısa zaman (270ºC, 1 dk) ya da düşük sıcaklık – uzun zaman (190ºC, 10 dk) uygulaması yapılarak sağlanabilir. Yapılan çalışmalar düşük sıcaklık – uzun zaman koşullarının daha etkili olduğunu göstermiştir. Buhar patlaması ön işleminin avantajları, mekanik parçalama ile karşılaştırıldığında %70 daha az enerji gerektirmesidir (Holtzapple ve ark., 1992). Bu yöntem, en ekonomik ön işlem olarak zirai atıklara ve sert odunsu lignoselülozik

maddelere başarıyla uygulanmış ancak yumuşak odunsu lignoselüloziklere daha az etkili olduğu tespit edilmişti (Clark ve Mackie, 1987).

1.7.2.2 Amonyak Lif Patlaması (AFEX)

AFEX, belli bir zaman periyodunda lignoselülozik materyallerin yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı amonyağa maruz bırakılıp ardından basıncın hızlıca azaltıldığı fiziko-kimyasal ön işlemlerin bir çeşididir. Tipik bir AFEX prosesi 1 – 2 kg amonyak/kg kuru biyokütle, 90ºC sıcaklık ve 30 dakika süre koşullarında yapılır.

AFEX ön işlemi çeşitli otsu bitkilerin sakkarifikasyon işlemini önemli derecede hızlandırmıştır. Yonca, arpa – buğday – pirinç samanı, tahıl kabuğu, mısır koçanı, şehirsel katı atıklar gibi çeşitli lignoselülozik materyaller bu yöntemle hidroliz edilebilmiştir (Vlasenko, 1997; Mes-Hartree, 1988). AFEX, asitli önişlemlere göre hemiselülozu daha az çözündürür.

Yapılan bir çalışmada, buğday samanı ve yonca yapraklarının enzimatik hidrolizi için buhar ve amonyak ön işlemleri karşılaştırılmış ve bu biyokütlelerdeki hemiselüloz fraksiyonlarının AFEX ile çözünmediği ancak buhar patlamasında çözündüğü görülmüştür (Mes-Hartree, 1988). Öte yandan %5 oranında lignin içeren Bermuda otuna AFEX uygulaması ile selüloz ve hemiselülozun %90'nı hidroliz edilmiştir (Holtzapple ve ark., 1991). AFEX prosesi lignin içeriği yüksek olan biyokütlelere uygulandığında düşük hidroliz verimi elde edilmektedir.

1.7.2.3 İyonik Sıvılar (IL)

İyonik sıvılar daha çok selülozdan biyoetanol üretimi için ön işlem olarak kullanılmıştır. İyonik sıvılar verimli ve "yeşil" selüloz çözücü olarak tanıtılmaktadır. Yüksek miktarlarda selülozun çözünmesini sağlayabilir, etkinliğini kaybetmeden çok kez aynı amaç için kullanılabilir, reaksiyon nispeten 90℃ ve 130℃ gibi kabul edilebilir sıcaklıklarda ve atmosferik basınçta gerçekleşir ve biyolojik süreci etkileyebilecek yan ürün oluşturmazlar (Heinze ve ark., 2005).

Diğer uçucu organik çözücüler ile karşılaştırıldığında, düşük toksisite, hidrofobisite, viskoziteli, termal stabilite, anyonunun geniş seçim avantajlarına sahip ve katyon kombinasyonları, elektrokimyasal kararlılık, yüksek reaksiyon hızı, potansiyel olarak en az çevresel etki ile düşük volatilite ve yanmaz özelliktedir (Zheng ve ark., 2009). İyonik sıvılarla ön işlemde, selüloz; hidroksil, oksijen ve hidrojen elektron alıcı ve elektron verici olarak davranarak iyonik sıvılarla reaksiyona girer, hidrojen bağları kırılır ve böylece glukoz molekülleri arsındaki bağlar bozulur. Sonuç olarak, selüloz yapısı glukoz kaybı olmadan bozulmuş olur. Çözünmüş selüloz, etanol, metanol, aseton ve su gibi anti solvent ilavesi ile çöktürülür. Elde edilen selülozun kristallik derecesinde önemli bir azalma, gözeneklilik yapısında ise artış sağlanır (Feng ve ark., 2008; Zhu, 2008).

Nguyen ve ark. (2009), pirinç samanını < 2 mm, 2 – 5 mm, > 10 mm olmak üzere farklı parçacık boyutlarına ayırarak iyonik sıvı – amonyak kombine ön işlemi uygulamışlardır. Pirinç samanının ana kompozisyonu; %4,6 nem, %36,8 selüloz, %25,8 hemiselüloz ve %15,8 lignindir. Pirinç samanı lignoselülozik bileşenlerinin üzerindeki iyonik sıvıların çeşitli fraksiyonlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla dört farklı iyonik sıvı ile muamele edilmiştir. Bunlar; 1-bütil-3-metilimidazolyum klorür ([Bmim]Cl), 1-etil-3-metilimidazolyum klorür ([Emim]Cl), 1-etil-3-metilimidazolyum asetat ([Emim]Ac) ve 1-etil-3-metilimidazolyum hidrojen sülfat ([Emim]Su)'dır. Bu iyonik sıvılar 60 – 70℃ sıcaklıkta pirinç samanını oldukça yapışkan koyu kahverengi bir jele dönüştürmüştür. Ön işleme tabi tutulmuş pirinç samanları ile işlenmemiş pirinç samanı karşılaştırıldığında, morfolojik değişimler görülmüştür. Kullanılan dört iyonik sıvı arasından ([Emim]Ac) iyonik sıvısının selülozu en yüksek verimle dönüşüme uğrattığı gözlenmiş ve lignoselülozik atıkların parçalanmasında en umut verici ön işlem olarak gösterilmiştir. < 2 mm, 2 – 5 mm ve > 10 mm olmak üzere üç farklı parçacık boyutundaki pirinç samanları sulu amonyak, ([Emim]Ac) ve NH_3-([Emim]Ac) kombine ön işlemlerine maruz bırakılmıştır. Araştırmacıların yaptığı bu çalışmada; < 2 mm boyutundaki parçacıklara kıyasla daha büyük parçacık boyutlu pirinç samanlarından elde edilen selüloz dönüşümünün daha yüksek olduğu görülmüştür. < 2 mm boyutlarına sahip pirinç samanlarının sıvı

amonyak ile ön işleminden elde edilen selüloz kazanımı %64, ([Emim]Ac) ile ön işleminden elde edilen selüloz kazanımı %62 ve NH_3-([Emim]Ac) kombine ön işleminden elde edilen selüloz kazanımı %58 olarak ölçülmüştür. 2 – 5 mm parçacık boyutlu pirinç samanına uygulanan üç test yöntemi karşılaştırıldığında, NH_3-([Emim]Ac) kombine ön işlemi sonucunda en yüksek selüloz kazanımı %82 ve glukoz dönüşüm oranı %97 ölçülerek en etkili yöntem olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar, iyonik sıvıların 5 ila 20 kez yeniden kullanılabilir olduklarını göstermiştir. Nguyen ve ark. (2009), bir çalışmalarında ([Emim]Ac) iyonik sıvısını 20 kez kullanmış ve selüloz kazanım oranının %74'den %83'e kadar arttığını gözlemlemişlerdir. ([Emim]Ac) iyonik sıvısı 5 kez tekrar kullanıldığında glukoz dönüşüm oranının %97 olduğu görülmüştür. 10 kez tekrar kullanıldığında ise bu glukoz dönüşüm oranı %94 olarak elde edilmiştir.

İyonik sıvıların en önemli avantajları; diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek glukoz dönüşüm verimi sağlamaları, hiçbir yan ürün oluşturmamaları, hidroliz verimini etkilemeden birkaç kez tekrar kullanılabilir olmaları ve ön işlemler arasında tüm bunlar baz alındığında maliyetinin uygun olmasıdır.

1.7.3 Kimyasal Ön İşlemler

1.7.3.1 Ozon Ön İşlemi

Ozon; buğday samanı (Ben-Ghedalia ve Shefet, 1981), küspe, yeşil ot, fıstık, çam (Neely, 1984), pamuk samanı (Ben-Ghedalia ve Shefet, 1983), kavak talaşı (Vidal ve Molinier, 1988) gibi birçok lignoselülozik biyokütleden lignin ve hemiselülozu ayrıştırmada kullanılmıştır. Bu ayrıştırma aslında lignin ve hemiselüloza karşı sınırlıdır, selülozu etkilemesi daha zordur. Ozonlama ön işleminin, bazı avantajları vardır; 1) etkili olarak lignin bozundurulur, 2) takiben uygulanacak biyolojik süreçler için zehirli artıklar üretmez, 3) tepkimeler oda sıcaklığı ve basıncında tamamlanır (Vidal ve Molinier, 1988). Ozon ön işlemi; ligninin etkili uzaklaştırılması, toksik atıkların oluşmaması ve reaksiyonun oda sıcaklığında ve atmosfer basıncında

gerçekleşmesi açısından avantajlıdır ancak yüksek miktarda ozon kullanımını gerektirmesi prosesi pahalı yapmaktadır.

1.7.3.2 Asitle Ön İşlem

Asitle ön işlem, konsantre asitle (% 30 - % 70) ve düşük sıcaklıkta (40 ℃) ya da seyreltilmiş asit (% 0,1) ve yüksek sıcaklıkta (230 ℃) yapılabilir. Sülfürik asit (H_2SO_4), hidroklorik asit (HCI), nitrik asit (HNO_3), fosforik asit (H_3PO_4), asetik asit, ve maleik asit gibi hem inorganik hem de organik asitler kullanılabilir. Ancak H_2SO_4 ile ön işlem en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Konsantre asit selüloz hidrolizine son derece etkili olmasına rağmen, toksik, korozif ve tehlikeli olması sebebi ile tercih edilmemektedir. Derişik asit kullanılması durumunda asit korozyonuna dayanıklı materyallerden üretilmiş olan reaktörlerin kullanılması gereklidir. Ancak düşük pH değerlerine dayanıklı reaktör materyali ya pahalı ya da yeteri kadar dayanıklı değildir. Buna ek olarak, asitle ön işlemin ekonomik olabilmesi için asidin geri kazanılması gereklidir. Bu nedenle, asitle ön işlemde seyreltik asit kullanılması daha çok tercih edilmektedir. Seyreltik asitle hidroliz yüksek reaksiyon hızlarında gerçekleşir ve selülozun hidrolizini kolaylaştırmaktadır (Esteghlalian ve ark., 1997). Ancak bu süreçte sıcaklık önemli bir faktördür. Düşük sıcaklıklarda şekerin yetersiz bozulmasından dolayı düşük biyogaz üretim verimleri gözlenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda ise selüloz hidrolizi daha kolay gerçekleşmektedir (McMillan, 1994). Lignoselülozik maddelerin seyreltik asit hidrolizi ile ksilanın ksiloza dönüşüm oranında artış sağlamak mümkündür (Hinman ve ark., 1992). Bu dönüşüm oranı lignoselülozik maddenin fermantasyonunda kullanılacak karbonhidrat miktarını arttırmak için çok önemlidir. Seyreltik asit ön işleminde iki yaklaşım vardır; 1) yüksek sıcaklıkta ($T \geq 160$ ℃), %5 - %10 katı içeriği ile sürekli akışlı süreçler (Brennan ve ark., 1986; Converse ve ark., 1989), 2) düşük sıcaklık (160 ℃ $\leq T$), kesikli süreçler ve yüksek substrat yükleme (%10 - %40) (Esteghlalian ve ark., 1997). Seyreltilmiş asit ön işlemi önemli ölçüde selüloz hidrolizini artırabilir, ancak maliyet olarak buhar patlama veya AFEX gibi fiziko-kimyasal ön işlemlerden genellikle daha yüksektir. pH nötralizasyonu, asitle ön işlemin ardından gelen enzimatik hidroliz ya da fermantasyon süreçleri için gereklidir.

Lignoselülozik maddelerin esas bileşenlerinden biri olan hemiselüloz, asit hidrolizi ile %100 oranında kendi bileşenleri olan ksiloz, arabinoz ve galaktoz şekerlerine dönüştürülebilir, ancak tamamen çözünmesi sağlanamaz. Bu yöntemin en önemli avantajı selülozun mikrobiyal ve enzimatik hidroliz için daha hazır hale getirilmesidir.

1.7.3.3 Alkali Ön İşlem

Alkali ön işlemde NaOH, $Ca(OH)_2$, KOH, NH_3, H_3O gibi bazlar kullanılarak lignoselülozik maddeden lignin, hemiselüloz ve selülozu ayırarak, mikroorganizmalar tarafından daha kolay kullanılabilir bir substrat haline dönüştürmek hedeflenmektedir. NaOH ile alkali ön işlem özellikle kağıt endüstrisinde lignin karbonhidrat bağlarının kırılmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tarkow ve ark., 1969). Bağların kırılması ile gözeneklilik ve iç yüzey alanında artma, polimerizasyon ve kristallik derecesinde de azalma sağlanmaktadır. Ayrıca lignin yapısının bozulması, lignin ve diğer polimerler arasındaki bağların kırılması sağlanmaktadır. Sonuç olarak lignoselülozik madde fermantasyonla ürün eldesinde daha kolay kullanılabilir bir substrat haline dönüşmektedir. Alkali ön işlemin etkinliği atık maddenin lignin içeriği ile doğrudan ilişkilidir (Fan ve ark., 1987).

1.7.4 Biyolojik Ön İşlemler

Biyolojik ön işlem yöntemlerinde atık materyallerdeki lignin ve hemiselülozu parçalamak için kahverengi, beyaz ve yumuşak küf mantarları kullanılır (Schurz, 1978). Kahverengi küf mantarları, esas olarak selülozu parçalarken, beyaz ve yumuşak küf mantarları selüloz ve lignini parçalamaktadırlar. Lignoselülozik materyallerin biyolojik ön işlemlerinde, beyaz çürükçül mantarlardan en etkilisi *Basidiomycetes* (küf mantarları/şapkalı mantarlar) türleridir (Fan ve ark., 1987). Biyolojik ön işlemler, diğer ön işlemlere göre maliyetli olduklarından çok fazla tercih edilmemektedir.

1.8 Kaynak Araştırması

Bilinen doğa dostu yeşil teknoloji gibi yenilenebilir kaynaktan biyolojik hidrojen üretimi, sürdürülebilir kalkınma ve atıkların en aza indirilmesini sağlar (Kapdan ve Kargı, 2006). Son yıllarda daha temiz bir çevre ve atık yönetimine katkıda bulunmak amacıyla, temiz enerji kaynakları olarak atık hammaddeler tercih edilmektedir. Biyohidrojen üretimi için kullanılan atıklar yani biyokütle, evsel ve tarımsal atıklar olabilir. Bu tip biyokütlelerin tercih edilmesinin sebebi toksik olmamaları, karbonca zengin, yenilenebilir, fermente edilebilir ve ucuz olmalarıdır. Biyohidrojen üretiminde arıtma çamuru, arpa, saman, mısır sapları, şeker pancarı posası, mısır, odun talaşı gibi çeşitli biyokütleler karbon kaynağı olarak kullanılmıştır (Guo ve ark., 2008; 2010; Wang ve ark., 2003b; Nicolau ve ark., 2008; Kotay ve Das, 2009; Argun, Kargı, Kapdan ve Öztekin, 2008a; 2008b; 2009a; 2009b; Cao ve ark., 2009; Fan ve ark., 2006; Lin ve ark., 2008). Hidrojen üretimi için en uygun hammade, selüloz ve nişasta içeren atıklardır (Sağnak, Kargı ve Kapdan, 2011). Tarımsal atıklar ucuz, yenilenebilir, bol ve biyolojik olarak parçalanabilir olmasından dolayı, bu atıklardan biyohidrojen üretimi gelecek vaat eden bir yaklaşımdır (Guo, Trably, Latrille, Carrere ve Steyer, 2010). Lignoselülozik maddelerin fermente edilmesi nişastaya veya basit şekerlere nazaran daha zordur. Lignin ayrılması için kompleks karbonhidratların ön işlemlerle fermente edilebilir hale getirilmesi gereklidir. Bu nedenle lignoselülozik atıklar için uygulanacak olan ön işlemin türü ve hidroliz sonucu elde edilecek fermente edilebilir şeker türü ve miktarı proses ekonomisi ve hidrojen üretimi açısından önemlidir.

Lignoselülozik atıklardan hidrojen üretim potansiyeli uygulanan ön işleme, biyokütle türüne ve mikrobiyal kültüre bağlıdır (Nissila ve ark., 2014). Lignoselülozik atıkların ön işlem ile; poroziteleri artar, lignin ayrılır ve selüloz kristalin yapısı azalır. Bunun bir sonucu olarak, selülozun fermantasyon sırasında enzimatik hidroliz yoluyla basit şekerlere dönüştürülmesi daha kolay olur (Nasirian ve ark., 2011). Bu ön işlem ya da hidroliz aşamasının uygulanması ile hidrojen üretiminin arttığı görülmektedir (Cui ve ark., 2009; 2010; Brynjarsdottir ve ark.,

2013; Han ve ark.,2012; Cao ve ark.,2012; Sekoai ve ark., 2013). Hidrojen üretim verimi 3 mol/mol olarak teorik verimin %75'ine kadar ulaşabilir (Nissila et al, 2014).

Hidrojen üretiminde kullanılan lignoselülozik atıklardan bazıları; şeker kamışı küspesi (Lo ve ark., 2011), mısır sapı (Cao ve ark.,2012; Sawatdeenarunat ve ark., 2015), pirinç samanı (Liu ve ark.,2013; 2014; He ve ark., 2014), buğday samanı (Nasirian ve ark., 2011), kenevir (*Cannabis sativa*), arpa samanı, çimen (*P.pratense*) (Brynjarsdottir ve ark., 2013), soya fasulyesi samanı (Han ve ark., 2012), palmiye gövdesi (Hniman ve ark., 2011), kavak yaprakları (Cui ve ark., 2010) ve hatta belediye atıklarının organik parçaları ile karışık tarımsal atıklardır (Sekoai ve ark., 2013). İkinci nesil lignoselülozik biyokütlelerin ana içeriği selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Lignin yerine yüksek selüloz ve hemiselüloz içeriği gereklidir çünkü bu karbonhidratlar kolayca hidroliz yoluyla glukoz ve ksiloz gibi fermente edilebilen şekerlere dönüştürülür. Lignin lignoselülozik atıkların fermente edilemeyen içeriği olduğundan, hidrojen gazı ligninden elde edilemez (Ho ve ark., 2012, Klimiuk ve ark., 2010; Thomsen ve ark., 2008; Cheng ve ark., 2010). Lignoselülozik atıkların hidrolizi, lignin ayrıldıktan sonra glukoz ve ksiloz karışımının oluşumuyla sonuçlanır. Glukoz, hidrojen üreten mikroorganizmalar tarafından en çok tercih edilen karbon kaynağı olarak bilinmektedir. Ancak, substrat başına daha yüksek elde edilecek hidrojen verimi nedeniyle ksiloz ve glukoz üzerindeki şekerin tercih edilebilir olduğu bildirilmiştir ve maksimum olarak hidrojen üretimi için en uygun oran glukoz/ksiloz=2/3 olarak belirlenmiştir (Prakasham ve ark.,2009; 2010). Hidrojen üretimi için yüksek ksiloz kullanımı metabolik olarak ve lignoselülozik atıkların sindiriminde mikrobiyal birliktelik içeren inoculumun (manda gübresi) biyokimyasal doğası ortaya konmuştur. Ksiloz kullanımı *C. beijerinckii* ve *Geobacter metallireducens* karışık kültürleri kullanılarak geliştirilmiştir. Hidrolizatların 1/10 gibi düşük glukoz/ksiloz oranına sahip olmasının sebebi yüksek ksiloz kullanımı, hidrojen üretimi ve asetat birikmemesidir (Zhang ve ark., 2013). Patel ve ark. (2015), ksilozun selüloz, nişasta ve sükroz gibi diğer karbon kaynakları arasında en yüksek hidrojen üretimi ve organik asit üretimine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka deyişle, ksiloz, glukoz ve ksiloz-glukoz karışımı termofilik fermantasyon koşulları altında substrat olarak kullanıldığında hidrojen üretiminde

önemli bir fark olduğu gözlenmiştir (Hniman ve ark., 2011). Ksilozdan teorik hidrojen oluşum verimi 3,33 mol H_2/mol ksiloz'dur. Oluşumu gözlenen verim, kullanılan bakteri kültürüne bağlı olarak değişmektedir. Bazı gözlenen ksiloz verimleri, *Bacillus firmus* ile 0,45 mol H_2/mol ksiloz (Sinha ve Pandey, 2014), *Caldoanaerobacter subterraneus* ve *Caloramator fervidus* karışık kültüründen 0,56 mol/mol olarak elde edilmiştir (Yokoyama ve ark., 2007). Ksilozdan en iyi hidrojen üretim verimi aşırı termofilik karışık kültür ile termofilik fermantasyon koşulları altında 1,62 mol/mol (Kongjan ve ark., 2009), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ile 2,09 mol/mol (Khamtib ve Reumgsang, 2012) ve *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ile 2,24 mol/mol olarak elde edilmiştir (Kádár ve ark., 2004).

Orozco ve ark. (2011), odun talaşından maksimum glukoz derişimi elde etmek için %5'lik H_3PO_4 konsantrasyonu ile, 200°C'de, 10 dakika otoklavda hidroliz gerçekleştirmiş ve bunun sonucunda %33'lük glukoz dönüşüm verimi elde etmişlerdir. Benzer şekilde %2,5 H_3PO_4 konsantrasyonunda, 150°C'de, 60 dakika hidroliz koşulunda ve %2,5 H_3PO_4 konsantrasyonu, 175°C hidroliz sıcaklığı, 10 dakika hidroliz süresi sonucunda %40 ile maksimum toplam şeker dönüşüm verimi elde etmişlerdir. Glukoz veriminin düşük olmasının nedeni, odun talaşı selüloz yapısının kristallik derecesinden kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde ksiloz, glukoz bozunması yüksek sıcaklık ve konsantrasyonda gözlemlenmiştir. Selülozun güçlü yapısında bulunan glukoz molekülleri arasındaki bağları kırmak için düşük asit konsantrasyonu uygulamalarının yetersiz olduğu görülmektedir. Benzer sonuçlar Jensen ve ark. (2010) tarafından rapor edilmiştir. Yaptıkları çalışmaya göre, sert odun olan kavak ağacı talaşından %42,3, yumuşak odun olan kınaçiçeği odun talaşından ise %2,8 glukoz dönüşüm verimi elde etmişlerdir. Ayrıca Yat ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmaya göre, %0,25 – 1,0 seyreltik H_2SO_4 asit derişiminde keresteden %11, çimden ise %13 verim elde etmişlerdir. Guo ve ark. (2008) ise *Mischantus sinensis* bitkisinden %10 değerinde dönüşüm verimi sağlamışlardır.

Salehian ve ark. (2013), çam ağacı odun talaşının alkali hidrolizi optimum koşullarını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, çam odun talaşını %8'lik NaOH çözeltisi ile 0 – 100℃ aralığında, 10, 30 ve 60 dakika olarak farklı sürelerde hidroliz gerçekleştirmişlerdir. 100℃'de 10 dakika hidroliz süresi sonucunda en iyi dönüşüm verimi olarak %46,8 ile glukan dönüşümü elde etmişlerdir. Aynı koşullarda %7,9 ksilan, %4,1 galaktan, %10,1 mannan ve %23,6 lignin dönüşümü elde etmişlerdir. 0℃'de 60 dakika hidroliz süresi sonucunda ise %42,1 glukan, %8,7 ksilan, %5 galaktan, %12,8 mannan ve %24,4 lignin dönüşüm verimine ulaşmışlardır.

1.9 Amaç ve Kapsam

Bu tez çalışmasının amacı, öncelikli olarak lignoselülozik bir atık olan *Pinus brutia* (kızılçam) odun talaşından karanlık fermantasyon yöntemi ile hidrojen gazı üretmektir.

Bu hedefe ulaşmak için yapılan çalışmanın kapsamı şu şekilde özetlenebilir;

- Asit ve alkali hidroliz yöntemlerinin odun talaşının hidrolizinde etkinliğini incelemek,
- Asit ve alkali hidroliz yöntemleri ile fermente edilebilir şeker eldesini etkileyen hidroliz şartlarını belirlemek,
- Maksimum fermente edilebilir şeker derişiminin elde edildiği hidroliz türü ve şartlarına karar vermek,
- Hidrolize odun talaşından hidrojen gazı üretiminde hidrolizat miktarının etkisini incelemek.

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE METODLAR

2.1 Lignoselülozik Biyokütle

Muğla Gökova yöresinde kerestecilik için yetiştirilen *Pinus brutia* (kızılçam) odun talaşı, kereste fabrikasından öğütülmüş atık olarak alınmıştır. Öğütülmüş odun talaşları kaba parçacıklardan ayrılmak üzere 18 mesh'lik elekte elenerek parçacık boyutu en büyük 1 mm olacak şekilde sabit tutularak hidroliz işlemi için hazır hale getirilmiştir.

2.2 Box-Behnken İstatistiksel Deney Tasarım Metodu

İkinci derece model parametrelerinin tahminlenmesinde kullanılan üç seviyeli tamamlanmamış (incomplete) çok etkenli tasarımlardan, dönersel tasarımların bir çeşidi olan Box-Behnken tasarımları 1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilmiştir. Box-Behnken tasarımlarında her bir etken üç düzeye sahiptir. Box-Behnken tasarımları 34 merkezsel bileşik tasarımlara kıyasla daha ekonomik bir tasarım sınıfıdır (Köksoy 2001). Box-Behnken tasarımlarının avantajlarından bir tanesi küresel bir tasarım olması ve sadece üç düzeyde verilere sahip olmasıdır. Box-Behnken tasarımları, tamamlanmamış bir blok tasarımın (incomplete block design) uygun bir şekilde iki düzeyli çok etkenli bir tasarımla birleştirilmesi sonucunda ortaya çıkarlar (Şehirlioğlu 1997).

Box-Behnken tasarımları için deneme noktasının sayısı $N=2k\ (k-1)+n_c$ denklemiyle belirlenmektedir. Bu denklemde k etken sayısını, n_c merkezi deneme sayısını belirtmektedir (Ferreira ve ark., 2007). Tasarımda tüm etkenler için alt ve üst sınırlar aynı anda hiçbir zaman kapsanmadığı için, uç değerlerin yaratacağı tatmin edici olmayan sonuçlar da engellenmiş olur. Özetle Box-Behnken tasarımları, ikinci dereceden modellerin tahminine, ardışık (sequential) tasarımların kurulumuna, modelin güven eksikliğinin analizine ve bloklara izin verdiği için kullanılan bir cevap yüzeyi tasarımıdır.

Box-Behnken deneysel tasarım metodunun 4 faktör için kodlu hali Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Box-Behnken deneysel tasarım metodunun dört faktör için kodlu hali

Deney No.	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**X_4**
1	-1,00	-1,00	0,00	0,00
2	1,00	-1,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4	1,00	0,00	-1,00	0,00
5	0,00	1,00	0,00	1,00
6	0,00	0,00	1,00	-1,00
7	0,00	-1,00	1,00	0,00
8	0,00	-1,00	-1,00	0,00
9	1,00	0,00	0,00	-1,00
10	0,00	1,00	-1,00	0,00
11	0,00	0,00	-1,00	1,00
12	1,00	0,00	0,00	1,00
13	0,00	-1,00	0,00	1,00
14	0,00	0,00	1,00	1,00
15	1,00	1,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	1,00	0,00	-1,00
18	-1,00	0,00	0,00	-1,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00
20	-1,00	0,00	1,00	0,00
21	0,00	0,00	-1,00	-1,00
22	0,00	-1,00	0,00	-1,00
23	0,00	1,00	1,00	0,00
24	-1,00	1,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00
27	-1,00	0,00	-1,00	0,00
28	-1,00	0,00	0,00	1,00
29	1,00	0,00	1,00	0,00

+1: faktörün maksimum değeri

-1 : faktörün minimum değeri

0 : merkez nokta = (max+min)/2

2.3 Asit Hidrolizi

Odun talaşının asit hidrolizi şartlarının optimizasyonu için yüzey tepki metodu olan Box-Behnken deneysel tasarım metodu kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler ve aralıkları; odun talaşı derişimi X_1=%1 - %8 (w/v), asit derişimi X_2=%5 - %25 (v/v), sıcaklık X_3=90 - 121℃ ve hidroliz süresi X_4=15 - 60 dakikadır. Hidroliz, belirlenmiş deney noktalarında otoklavda gerçekleştirilmiştir. Design expert yazılımı (Trial

Version 7.0.0 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) kullanılarak ikinci dereceden cevap eşitliği geliştirilmiş ve katsayıları belirlenmiştir. Katsayılar ve cevap eşitliği kullanılarak deneysel noktalarda bağımlı değişken değerleri hesaplanmıştır. Gözlenen (deneysel) ve hesaplanan değerler arasındaki ilişki regresyon katsayısı (R^2) hesaplanarak belirlenmiştir. Design expert yazılımının optimizasyon modülü ve cevap eşitliği kullanılarak, toplam şeker derişimini maksimize eden hidroliz şartları tespit edilmiştir. Bu şartlarda hidroliz yapılarak gözlenen ve hesaplanan toplam şeker derişimleri arasındaki fark belirlenmiştir.

2.4 Alkali Hidroliz

Odun talaşının alkali hidrolizi NaOH ile yapılmıştır. Hidroliz şartlarının optimizasyonunda asit hidrolizinde olduğu gibi yüzey tepki metodu olan Box-Behnken deneysel tasarım metodu kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler ve aralıkları asit hidrolizi çalışmasında olduğu gibidir. Odun talaşı derişimi X_1=%1 - %8 (w/v), baz derişimi X_2=%5 - %25 (v/v), sıcaklık X_3=90 - 121℃ ve hidroliz süresi X_4=15 - 60 dakikadır. Hidroliz, belirlenen deney noktalarında otoklavda gerçekleştirilmiştir. Design expert yazılımı (Trial Version 7.0.0 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) kullanılarak ikinci dereceden cevap eşitliği geliştirilmiş ve katsayıları belirlenmiştir. Katsayılar ve cevap eşitliği kullanılarak deneysel noktalarda bağımlı değişken değerleri hesaplanmıştır. Gözlenen (deneysel) ve hesaplanan değerler arasındaki ilişki regresyon katsayısı (R^2) hesaplanarak belirlenmiştir.

2.5 Biyohidrojen Üretimi

2.5.1 Mikroorganizma

PAKMAYA Maya Endüstrisi anaerobik arıtma tesisinden alınan arıtma çamuru 2 saat boyunca 100°C'de aktif olarak kaynatılarak spor oluşturan ve hidrojen gazı üretebilen asidojenik kültürlerin seçimi yapılmıştır (Karaosmanoğlu, 2015; Gökfiliz, 2014; Kırlı, 2014). Isıl işlem sonrası çamurdan alınan örnek mikroskop altında

incelenmiş ve hidrojen üreten bakteri kültürü olan *Clostridium sp.* varlığı tespit edilmiştir.

2.5.2 Besi Ortamı

18 mesh parçacık boyutuna sahip odun talaşının asit ile hidrolizinden elde edilen glukoz şurubu (sıvı faz), substrat olarak kullanılmıştır. Besi ortamına azot (N) ve fosfor (P), C/N/P=100/2,5/0,8 oranını sağlayacak şekilde, sırasıyla, üre ve KH_2PO_4, ilave edilmiştir. Demir ise C/N/P oranından bağımsız olarak besi ortamına $FeSO_4$.7H2O kullanılarak 10 mg/L ilave edilmiştir. Besi ortamının anaerobik ortam koşulunun sağlanması açısından 100 mg/L sodyum tiyoglukolat eklenmiştir.

2.5.3 Karanlık Fermantasyon

Deneysel çalışmalar, 300 mL serum şişelerinde, 37°C'de kesikli olarak, anaerobik şartlarda yapılmıştır. Odun talaşı hidrolizinden elde edilen toplam şeker, substrat olarak kullanılmıştır. Başlangıç toplam şeker derişimi TS_0=1 – 9 g/L arasında değiştirilmiştir. Kontrol deneyinde ise 5 g/L saf glukoz kullanılmıştır. Anaerobik şartların sağlanması için, deneylerin başlangıcında gaz fazından argon gazı Ar(g) geçirilmiştir. pH ve oksitlenme – indirgenme potansiyeli (ORP) günlük olarak kontrol edilmiştir. pH=7'ye seyreltik NaOH ile ayarlanmıştır. ORP değeri -180 mV ile -300 mV arasında değişmiştir. Hidrojen gazı yüzdesi ve hacmi, toplam şeker derişimi takip edilmiştir. Kümülatif H_2 hacminin sabit değere ulaşmasıyla deneyler sonlandırılmıştır.



Şekil 2.1 Kesikli anaerobik karanlık fermantasyon ortamı

2.6 Analitik Yöntemler

2.6.1 Toplam Şeker Analizi

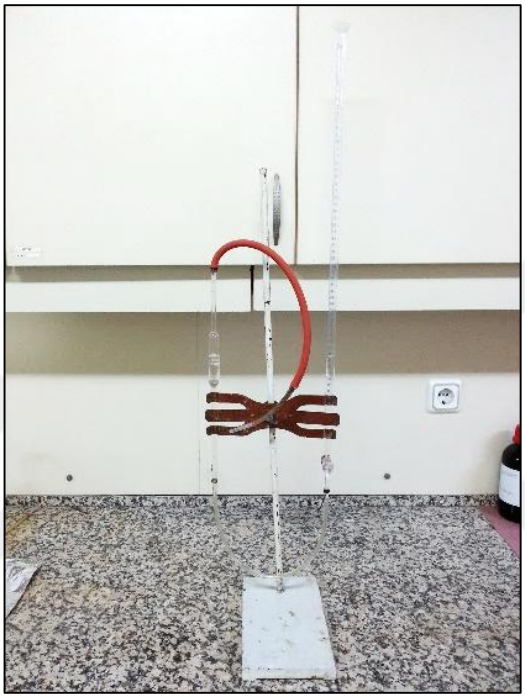
Odun talaşının hidrolizi aşamasında oluşan şeker miktarının belirlenmesi amacıyla Fenol-Asit spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır (Dubois ve ark., 1956). Toplam şeker analizi için örneklerin sıvı fazından alınan numuneler, 8000 rpm'de 20 dakika süre ile santrifüjlenerek, biyokütle ve katıların ayrılması sağlanmıştır.



Şekil 2.2 Farklı odun talaşı derişimlerine sahip hidroliz örneklerinin Fenol – Asit spektrofotometrik yöntem ile toplam şeker analizi

2.6.2 Toplam Gaz Ölçümü

Üretilen toplam gaz hacmi, bileşik kaplar prensibine dayalı olarak, gaz sıvı yer değiştirme sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Sıvı çözelti %2 H_2SO_4 ve %10 NaCl karışımından oluşmaktadır.



Şekil 2.3 Toplam gaz ölçümü yapılan U boru sistemi

2.6.3 Hidrojen Gazı Ölçümü

Hidrojen gazı ölçümleri; Agilent 6890 (Varian 3600) Gaz Kromotografında yapılmıştır. Kolon; Alltech, Hayesep D 80/100 6" x 1/8" x 0,085", taşıyıcı gaz; N_2 (30 mL/dak). Fırın sıcaklığı 35℃, enjeksiyon sıcaklığı 200℃ ve filament 140℃'dir. Gaz – sızdırmaz cam şırınga yardımıyla fermantasyon ortamından alınan toplam gazın hidrojen konsantrasyonu ölçülmüştür.



Şekil 2.4 Gaz – sızdırmaz cam şırınga (Agilent gas-thight syringe)

2.7 Hesaplamalar

i) Hidrojen gazı hacmi;

$$V_{H2} = C_{H2} * V_{gaz} \tag{2.1}$$

C_{H2}; Hidrojen gazı derişimi, (%H_2),

V_{gaz}; Üretilen toplam gaz (mL).

ii) mmol hidrojen gazı (37℃);

$$PV = nRT \tag{2.2}$$

n; mmol H_2 gazı,

P; 1 atm,

V_{H2}; üretilen hidrojen gazı hacmi (mL),

R; 0,082 (L atm / mol K),

T; sıcaklık (K).

iii) Eklenik hidrojen gazı hacmi (toplam gaz üretimi olduğunda);

$$V_{H2,\,i} = V_{H2,\,i-1} + V_W C_{H2,i} + V_{G,i} C_{H2,i} - V_{G,i-1} C_{H2,\,i-1} \quad (2.3)$$

iv) Gompertz Eşitliği;

$$H(t) = P \exp\left\{ -\exp\left[\frac{R_m e}{P}(\lambda - t) \right] + 1 \right\} \quad (2.4)$$

P; hidrojen üretim potansiyeli (mL),

R_m; Hidrojen üretim hızı (mL H_2/saat),

λ; gecikme (lag) periyodu (saat),

t; fermantasyon süresi (saat).

v) Hidrojen üretim verimi (Y);

$$Y = \frac{\Delta H_2}{\Delta S} \quad (2.5)$$

Y; mol H_2/mol substrat,

Δ_{H2}; H_2 üretimi (mol),

ΔS; tüketilen toplam şeker (mol).

BÖLÜM ÜÇ
DENEYSEL SONUÇ VE DEĞERLENDİRMELER

3.1 Odun Talaşı Hidroliz Şartlarının Optimizasyonu

3.1.1 Asit Hidrolizi Şartlarının Optimizasyonu

Odun talaşından hidrojen gazı üretimi için asit ile hidroliz optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Hidroliz koşullarını etkileyen en önemli dört faktör olarak; asit derişimi, substrat derişimi, sıcaklık ve hidroliz süresi bağımsız değişken olarak belirlenmiş ve bu faktörlerin toplam şeker derişimi (mg/L) üzerine etkileri incelenmiştir. Maksimum toplam şeker derişimi eldesi için hidroliz şartlarını belirlemek için Box – Behnken deneysel tasarım metodu kullanılmıştır. Asit derişimi (X_1), substrat derişimi (X_2), sıcaklık (X_3), zaman (X_4) sırasıyla, X_1=%5 – 25, X_2=%1 - 8, X_3=90 – 120 ℃, X_4=15 – 60 dakika aralığında değiştirilmiştir. Deneysel tasarım bir merkez noktadan oluşmakta olup, merkez noktada 5 tekrarlı çalışılarak sonuçların tekrar üretilebilirliği test edilmiştir. Tablo 3.1'de Box – Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenmiş deney noktaları, hidroliz sonucu elde edilen toplam şeker derişimleri ile cevap eşitliğinden belirlenen şeker derişimleri verilmiştir. Design Expert 7.0 programı kullanılarak Eşitlik 3.1'de verilen ikinci dereceden cevap eşitliği ve Tablo 3.2'de verilen eşitlik katsayıları belirlenmiştir. Gözlenen ve hesaplanan derişimler lineer bir ilişki göstermiştir (R^2= 0,946). Bu sonuç, geliştirilen cevap eşitliği ve belirlenen katsayılar çalışılan bağımsız değişken aralıklarında toplam şeker derişiminin tahmininde kullanılabileceğini göstermektedir.

$$Y_{TS} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 \quad (3.1)$$

Tablo 3.1 Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenmiş deney noktaları, gözlenen ve hesaplanan şeker derişimleri (asit hidrolizi)

Deney No.	**Asit Derişimi, (%)**	**Substrat Derişimi, (%)**	**Sıcaklık, (℃)**	**Hidroliz Süresi, (dakika)**	**Gözlenen Toplam Şeker Derişimi (mg/L)**	**Hesaplanan Toplam Şeker Derişimi (mg/L)**
	X_1	**X_2**	**X_3**	**X_4**	**X_5**	**X_6**
1	5	1	105,5	37,5	6700	8195
2	25	1	105,5	37,5	6300	7579
3	5	8	105,5	37,5	31100	29162
4	25	8	105,5	37,5	39300	37145
5	15	4,5	90	15	15400	16212
6	15	4,5	121	15	21800	25495
7	15	4,5	90	60	25900	21545
8	15	4,5	121	60	19400	17929
9	5	4,5	105,5	15	21800	20225
10	25	4,5	105,5	15	27200	24008
11	5	4,5	105,5	60	16000	19208
12	25	4,5	105,5	60	21200	22791
13	15	1	90	37,5	5900	5108
14	15	8	90	37,5	27800	30575
15	15	1	121	37,5	10900	8141
16	15	8	121	37,5	32400	33208
17	5	4,5	90	37,5	15100	14962
18	25	4,5	90	37,5	23500	25195
19	5	4,5	121	37,5	25400	24345
20	25	4,5	121	37,5	20700	21479
21	15	1	105,5	15	6700	6895
22	15	8	105,5	15	32800	32862
23	15	1	105,5	60	5900	6479
24	15	8	105,5	60	30600	31045
C_1*	15	4,5	105,5	37,5	17400	16640
C_2*	15	4,5	105,5	37,5	18300	16640
C_3*	15	4,5	105,5	37,5	13700	16640
C_4*	15	4,5	105,5	37,5	19700	16640
C_5*	15	4,5	105,5	37,5	14100	16640
				R^2	**0,946**	

* Merkez noktalar

Tablo 3.2 Cevap eşitliği (Eşitlik 3.1) katsayıları

Katsayı	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_{12}	β_{13}	β_{14}
Değeri	+16640,00	+1841,67	+12633,33	+1416,67	-558,33	+2150,00	-3275,00	-50,00
Katsayı	β_{23}	β_{24}	β_{34}	β_{11}	β_{22}	β_{33}	β_{44}	
Değeri	-100,00	-350,00	-3225,00	+3059,17	+821,67	+1796,67	+1859,17	

Tablo 3.3 Box-Behnken varyans analizi tablosu

Varyasyon kaynağı	**Kareler Toplamı**	**df**	**Kare Ortalama**	**F Değeri**	**p-değeri Prob > F**	**İstatistiksel değerlendirme**
Model	$2,166x10^9$	14	$1,547x10^8$	17,64	< 0,0001	Önemli
A-Asit Derişimi	*$4,070x10^7$*	*1*	*$4,070x10^7$*	*4,64*	*0,0491*	Önemli
B-Substrat Derişimi	*$1,915x10^9$*	*1*	*$1,915x10^9$*	*218,39*	*< 0,0001*	Önemli
C-Sıcaklık	*$2,408x10^7$*	*1*	*$2,408x10^7$*	*2,75*	*0,1197*	
D-Hidroliz Süresi	*$3,741x10^6$*	*1*	*$3,741x10^6$*	*0,43*	*0,5243*	
AB	*$1,849x10^7$*	*1*	*$1,849x10^7$*	*2,11*	*0,1685*	
AC	*$4,290x10^7$*	*1*	*$4,290x10^7$*	*4,89*	*0,0441*	Önemli
AD	*10000,00*	*1*	*10000,00*	*$1,140x10^{-3}$*	*0,9735*	
BC	*40000,00*	*1*	*40000,00*	*$4,561x10^{-3}$*	*0,9471*	
BD	*$4,900x10^5$*	*1*	*$4,900x10^5$*	*0,056*	*0,8166*	
CD	*$4,160x10^7$*	*1*	*$4,160x10^7$*	*4,74*	*0,0470*	Önemli
A^2	*$6,070x10^7$*	*1*	*$6,070x10^7$*	*6,92*	*0,0197*	Önemli
B^2	*$4,379x10^6$*	*1*	*$4,379x10^6$*	*0,50*	*0,4914*	
C^2	*$2,094x10^7$*	*1*	*$2,094x10^7$*	*2,39*	*0,1446*	
D^2	*$2,242x10^7$*	*1*	*$2,242x10^7$*	*2,56*	*0,1322*	
Kalan	$1,228x10^8$	14	$8,770x10^6$			
Uyum Eksikliği	*$9,498x10^7$*	*10*	*$9,498x10^6$*	*1,37*	*0,4092*	Önemsiz
Saf Hata	*$2,779x10^7$*	*4*	*$6,948x10^6$*			
Kor Toplamı	$2,289x10^9$	28				

Tablo 3.3'de Box-Behnken yüzey tepki metodunun toplam şeker derişimi optimizasyonu varyans analizi tablosu verilmiştir. "Prob > F" değerlerinin 0,0500'den az olması bağımlı değişkenin değerini etkiyen önemli bir faktör,

0,1000'den büyük değerler ise önemsiz bir faktör olduğunu göstermektedir. ANOVA sonuçlarına göre model katsayısının "önemli" olması "anlamlı" olduğunu göstermektedir. Asit ve substrat derişimi cevap eşitliğini ya da toplam şeker derişimini etkileyen önemli faktörlerdir. Ancak, asit derişimi ve sıcaklık, hidroliz sıcaklığı ve süresi hidroliz şartlarını etkileyen ikili etki olarak ortaya çıkmaktadır. Tek başına sıcaklığın ya da hidroliz süresinin bir etkisi olmazken, asit derişimi ile sıcaklık birlikte ele alındığında modele göre toplam şeker derişimi maksimize edilebilir. "Uyum Eksikliği" değerinin "önemsiz" olması modelin hidroliz sınır koşulları içinde toplam şeker derişiminin tahmin etmede kullanılabileceğini göstermektedir.

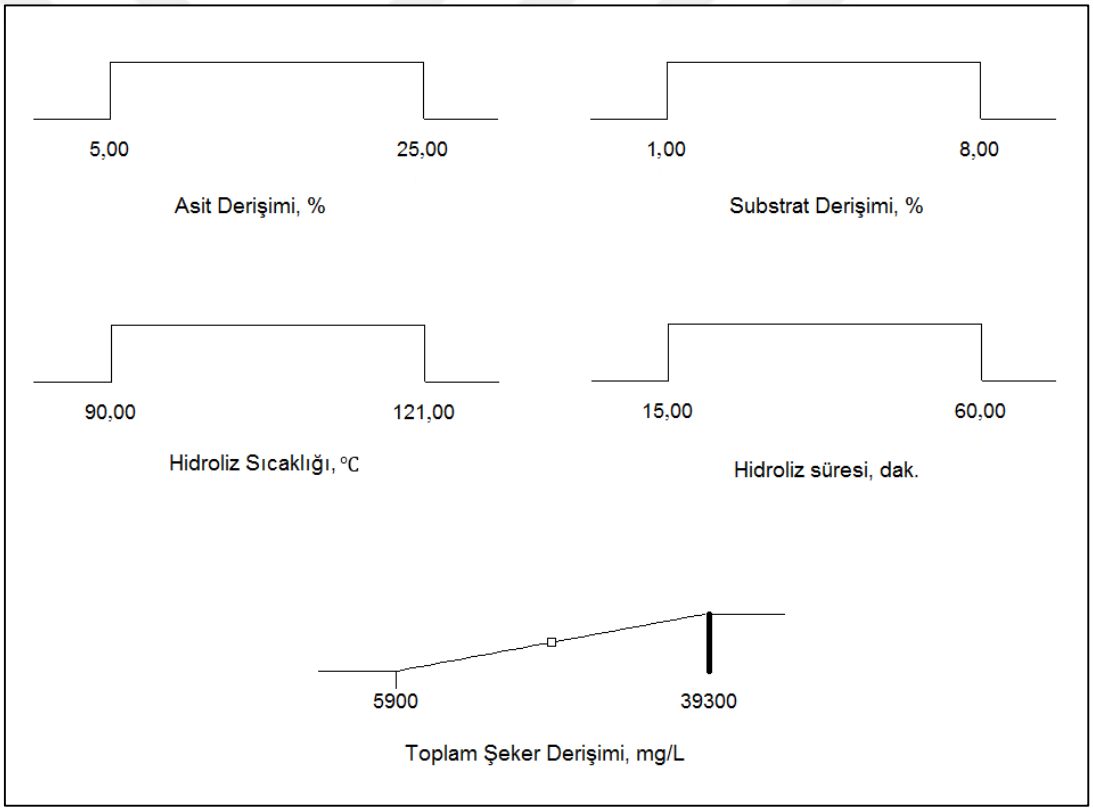
Cevap eşitliğinin hidroliz sınır koşulları içinde toplam şeker derişiminin tahmin etmede kullanılabileceğini göstermek için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Deneysel tasarımdaki koşulların farklı şartlarında hidroliz yapılarak deneysel toplam şeker derişimi ile modelden tahmin edilen şeker derişimleri karşılaştırılmıştır (Tablo 3.4). Gözlenen ve hesaplanan toplam şeker derişimlerinin yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 3.4 Box-Behnken deney tasarım metodu optimizasyon noktalarına göre yapılan validasyon çalışmaları ve sonuçları

Asit Derişimi, %	**Substrat Derişimi, %**	**Sıcaklık, ℃**	**Hidroliz Süresi, dak.**	**Hesaplanan Toplam Şeker Derişimi, mg/L**	**Gözlenen Toplam Şeker Derişimi, mg/L**
25	8	92	36	39836	42100
25	8	90	58	44175	41500
18	8	121	15	39200	40800
10	8	121	15	39500	40400
8	**8**	**121**	**15**	**39600**	**41100 42800 40000 42900 41300**
5	8	121	15	40500	33900

Design expert yazılımının optimizasyon modülü ve cevap eşitliği kullanılarak, toplam şeker derişimini maksimize eden hidroliz şartları tespit edilmiştir. Şekil

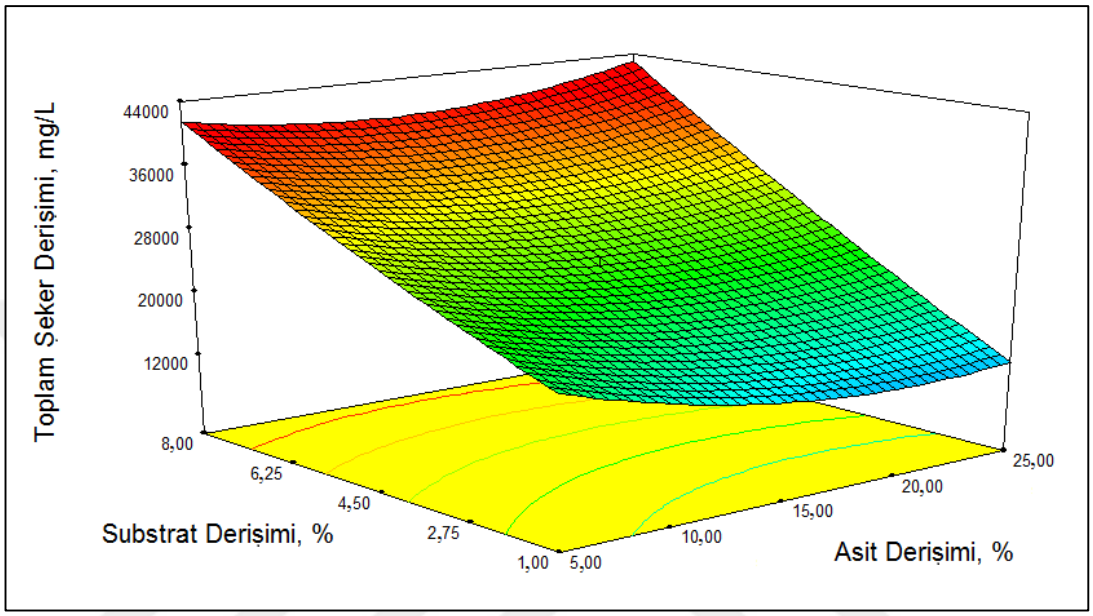
3.1'de asit hidrolizi sonucunda maksimum toplam şeker derişiminin elde edildiği optimizasyon şartları görülmektedir. Asit derişimi (%), substrat derişimi (%), hidroliz sıcaklığı ve hidroliz süresi seçilen aralıklarda tutulmuş, toplam şeker derişimi ise maksimize edilmiştir. Bu sonuçlara göre, A=%8,12, S=%7,88, T=120,61℃ ve t=15,31 dakika şartlarında maksimum toplam şeker derişimi TS=39321 mg/L elde edilmiştir. Bu şartlarda hidroliz yapılarak gözlenen toplam şeker derişimi (TS=41100 mg/L) ve hesaplanan derişim (TS=39321 mg/L) yaklaşık olarak aynıdır. Gözlenen ve hesaplanan derişimlerin yakın olması, geliştirilen cevap eşitliğinin çalışılan bağımsız değişken aralıklarında toplam şeker derişiminin tahmin edilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 3.1 Asit hidrolizi ile maksimum toplam şeker derişiminin elde edildiği optimizasyon şartları

Şekil 3.2'de toplam şeker derişiminin, asit (%) ve başlangıç odun talaşı derişimi (%) ile değişimi görülmektedir. Hidroliz bağımsız değişkenlerinden sıcaklık T=121℃ ve süre t=15 dakikada sabit tutulmuştur. Hidroliz sonucunda oluşan toplam şeker derişimini etkileyen faktör odun talaşı (substrat) derişimidir. Odun talaşının %1 olduğu şartlarda, asit derişimi %5'den %25'e arttırılmış olmasına rağmen toplam

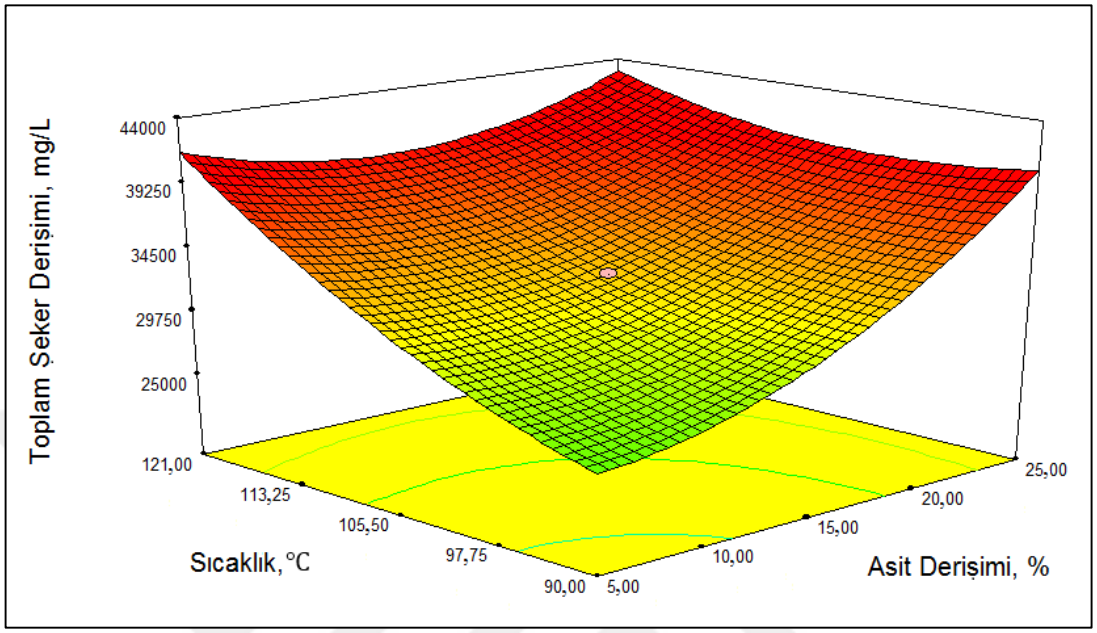
şeker derişiminde önemli bir değişiklik gözlenmemiş ve ortalama olarak TS=12400 mg/L elde edilmiştir. Ancak odun talaşının %1'den %8'e arttırılması ile uygulanan asit derişimi aralığında, %1 odun talaşına göre yaklaşık olarak 3,5 kat artış sağlanarak TS=43000 mg/L toplam şeker derişimine ulaşılmıştır.



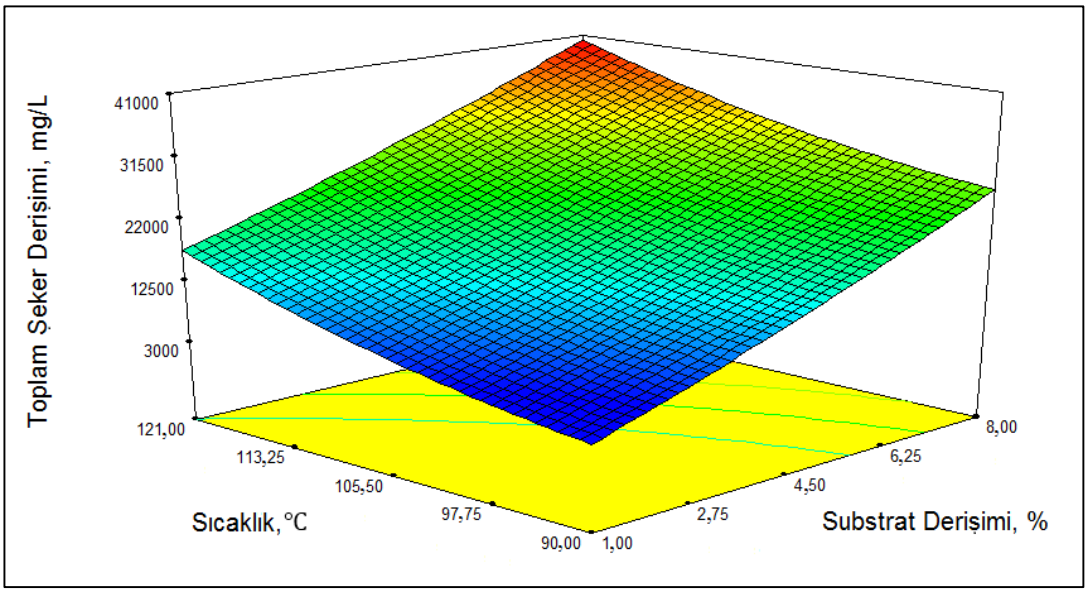
Şekil 3.2 Toplam şeker derişiminin asit ve odun talaşı derişimi ile değişimi (T=121°C, t=15 dak.)

Hidroliz sıcaklığı ve asit derişiminin toplam şeker derişimi üzerine etkisi Şekil 3.3'de verilmiştir. En yüksek hidroliz verimi S_o=%8 odun talaşı derişiminde elde edildiğinden, substrat derişimi %8'de, hidroliz süresi t=15 dakika'da sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar maksimum odun talaşı derişiminde, sıcaklığın ve asit derişiminin hidrolize önemli etkisinin olduğunu ve bu iki faktör arasında etkileşimin olduğunu göstermektedir. Düşük asit derişiminde (A=%5), sıcaklığın T=90°C'den T=121°C'ye yükseltilmesi ile toplam şeker derişimi, TS=25800 mg/L'den TS=41000 mg/L'ye yükselmiştir. Benzer olarak, T=90°C'de asit derişiminin A=%5'den A=%25'e çıkartılması ile de toplam şeker derişiminin TS=43000 mg/L'ye kadar yükseldiği görülmektedir. Ancak sıcaklığın T=121°C olduğu şartlarda, asit derişiminin toplam şekere olan etkisi ya da asit derişiminin yüksek olduğu şartlarda (A=%25), sıcaklığın toplam şeker derişimine olan etkisi ihmal edilebilir değerdedir. Sonuç olarak hidrolizle yüksek şeker derişimine ulaşmak

için derişik asit – düşük sıcaklık ya da yüksek sıcaklık – seyreltik asit şartlarının uygulanması gerektiği ortaya çıkmaktadır.

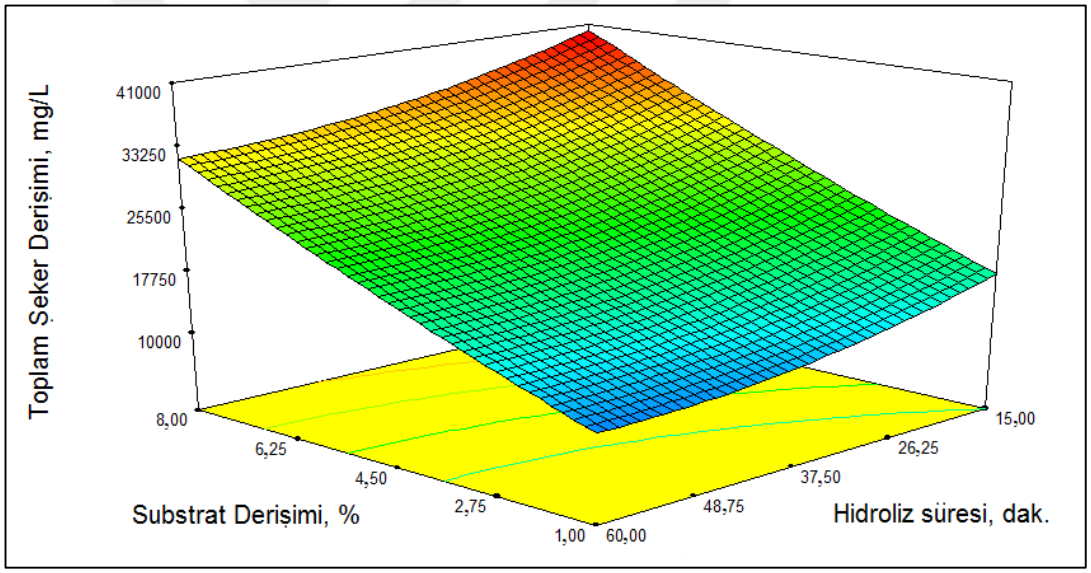


Şekil 3.3 Toplam şeker derişiminin asit derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (S=%8, t=15 dak)



Şekil 3.4 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (A=%8, t=15 dak)

Şekil 3.4'de hidroliz sıcaklığı ile odun talaşı derişiminin toplam şeker derişimi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek hidroliz verimi A=%8 asit derişiminde elde edildiğinden, asit derişimi %8'de, hidroliz süresi ise t=15 dakikada sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar optimum asit derişiminde, sıcaklığın ve substrat derişiminin hidrolize etkisi olduğunu, ancak bu etkinin Şekil 3.2'de gösterilen sıcaklık – asit derişimi etkisi kadar yüksek olmadığını göstermektedir. Düşük substrat derişiminde (%1) sıcaklığın 90°C'den 121°C'ye arttırılması ile toplam şeker derişimi TS=3300 mg/L'den TS=18000 mg/L'ye yükselmiştir. Aynı şekilde, substrat derişiminin %1'den %8'e çıkarılması ile toplam şeker derişiminin TS=41000 mg/L'ye yükseldiği görülmektedir. Düşük sıcaklık – düşük substrat derişimi ile toplam şeker derişimi düşmekte, sıcaklık ve substrat derişiminin artmasıyla birlikte toplam şeker derişimi de artmaktadır.



Şekil 3.5 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz süresi ile değişimi (A=%8, T=121°C)

Hidroliz süresi ve odun talaşı derişiminin (substrat), A=%8 ve T=121°C'de toplam şeker derişimi üzerine etkisi ise Şekil 3.5'de verilmiştir. Uzun hidroliz süresi – düşük substrat derişimi koşulları uygulandığında toplam şeker derişimi TS=9950 mg/L olarak elde edilmiş, substrat derişiminin %1'den %8'e çıkarılması ile toplam şeker derişimi TS=33000 mg/L'ye yükselmiştir. Aynı şekilde, hidroliz süresinin t=60

dakikadan t=15 dakikaya düşürülmesi ile toplam şeker derişimi TS=40000 mg/L olarak elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre odun talaşından asit hidrolizi ile maksimum toplam şeker derişimine ulaşmak için asit derişiminin A=%8, substrat derişiminin S=%8, hidroliz sıcaklığının T=121℃ ve hidroliz süresinin t=15 dakika olması gerekmektedir.

3.1.2 Alkali Hidroliz Şartlarının Optimizasyonu

Odun talaşından hidrojen gazı üretimi için baz (NaOH) ile hidroliz optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Hidroliz koşullarını etkileyen en önemli dört faktör olarak asit hidrolizinde de olduğu gibi; NaOH derişimi, substrat derişimi, sıcaklık ve zaman bağımsız değişken olarak belirlenmiş ve bu faktörlerin toplam şeker derişimi (mg/L) üzerine etkileri incelenmiştir. Maksimum toplam şeker derişimi eldesi için hidroliz şartlarını belirlemek için Box – Behnken deneysel tasarım metodu kullanılmıştır. Baz derişimi (X_1), substrat derişimi (X_2), sıcaklık (X_3), zaman (X_4) sırasıyla, X_1=%5 – 25, X_2=%1 - 8, X_3=90 – 120 ℃, X_4=15 – 60 dakika aralığında değiştirilmiştir. Deneysel tasarım bir merkez noktadan oluşmakta olup, merkez noktada 5 tekrarlı çalışılarak sonuçların tekrar üretilebilirliği test edilmiştir. Tablo 3.5'de Box – Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenmiş deney noktaları, hidroliz sonucu elde edilen toplam şeker derişimleri ile cevap eşitliğinden belirlenen şeker derişimleri verilmiştir. Design Expert 7.0 programı kullanılarak Eşitlik 3.2'de verilen ikinci dereceden cevap eşitliği ve Tablo 3.6'da verilen eşitlik katsayıları belirlenmiştir.

$$Y_{TS} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 \quad (3.2)$$

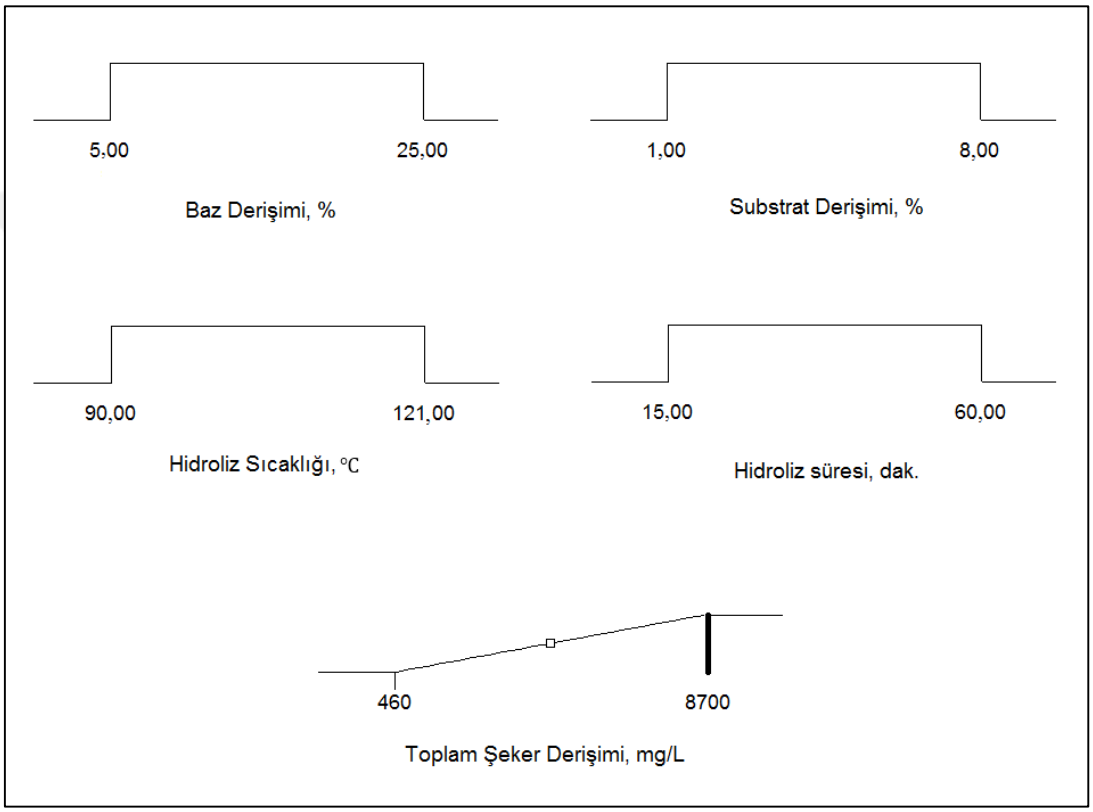
Tablo 3.5 Box-Behnken deneysel tasarım metoduna göre belirlenmiş deney noktaları, gözlenen ve hesaplanan şeker derişimleri (alkali hidroliz)

Deney No.	**Baz Derişimi, (%)**	**Substrat Derişimi, (%)**	**Sıcaklık, (℃)**	**Hidroliz Süresi, (dakika)**	**Gözlenen Toplam Şeker Derişimi (mg/L)**	**Hesaplanan Toplam Şeker Derişimi (mg/L)**
	X_1	**X_2**	**X_3**	**X_4**	**X_5**	**X_6**
1	5	1	105,5	37,5	460	1115
2	25	1	105,5	37,5	610	123
3	5	8	105,5	37,5	4800	3455
4	25	8	105,5	37,5	8700	6213
5	15	4,5	90	15	5600	3750
6	15	4,5	121	15	4600	3015
7	15	4,5	90	60	1620	1373
8	15	4,5	121	60	2200	2218
9	5	4,5	105,5	15	2200	2632
10	25	4,5	105,5	15	1900	3335
11	5	4,5	105,5	60	1450	865
12	25	4,5	105,5	60	1510	1929
13	15	1	90	37,5	700	1440
14	15	8	90	37,5	3700	4755
15	15	1	121	37,5	800	595
16	15	8	121	37,5	5600	5710
17	5	4,5	90	37,5	1900	1980
18	25	4,5	90	37,5	3400	3618
19	5	4,5	121	37,5	2030	2790
20	25	4,5	121	37,5	2020	2918
21	15	1	105,5	15	800	740
22	15	8	105,5	15	4200	5825
23	15	1	105,5	60	670	23
24	15	8	105,5	60	2330	3368
C_1*	15	4,5	105,5	37,5	1300	1698
C_2*	15	4,5	105,5	37,5	2200	1698
C_3*	15	4,5	105,5	37,5	1500	1698
C_4*	15	4,5	105,5	37,5	1890	1698
C_5*	15	4,5	105,5	37,5	1600	1698
				R^2	**0,749**	

* Merkez noktalar

Tablo 3.6 Cevap eşitliği (Eşitlik 3.2) katsayıları

Katsayı	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_{12}	β_{13}	β_{14}
Değeri	+1698,00	+441,67	+2107,50	+27,50	-793,33	+937,50	-377,50	+90,00
Katsayı	β_{23}	β_{24}	β_{34}	β_{11}	β_{22}	β_{33}	β_{44}	
Değeri	+450,00	-435,00	+395,00	+365,17	+663,92	+763,92	+127,67	

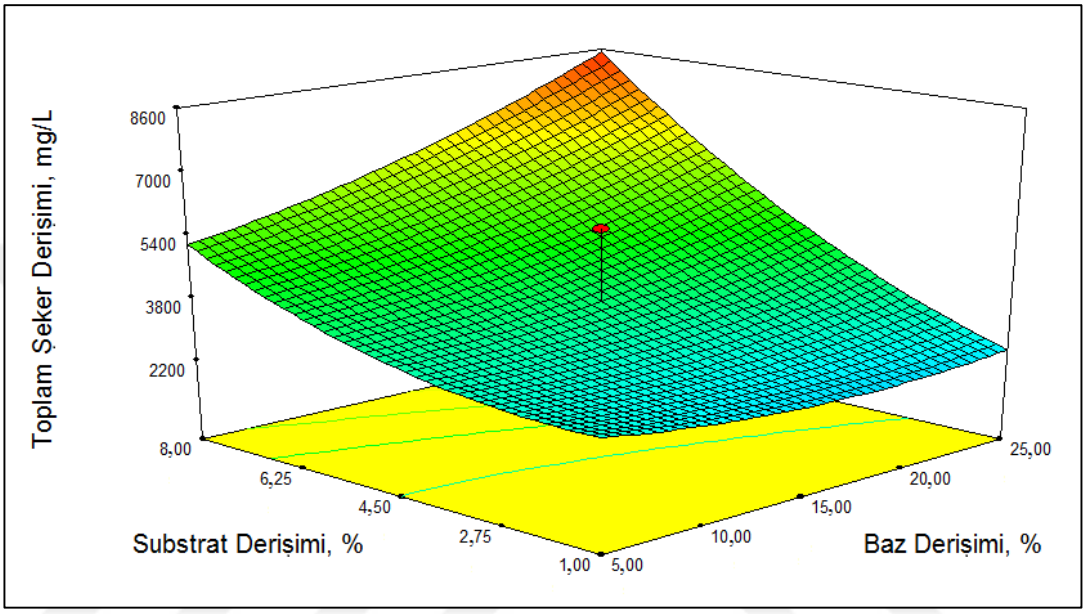


Şekil 3.6 Alkali hidroliz ile maksimum toplam şeker derişiminin elde edildiği optimizasyon şartları

Şekil 3.6'da baz ile hidroliz sonucunda maksimum toplam şeker derişiminin elde edildiği optimizasyon şartları görülmektedir. Baz derişimi (%), substrat derişimi (%), hidroliz sıcaklığı ve hidroliz süresi seçilen aralıklarda tutulmuş, toplam şeker derişimi ise maksimize edilmiştir.

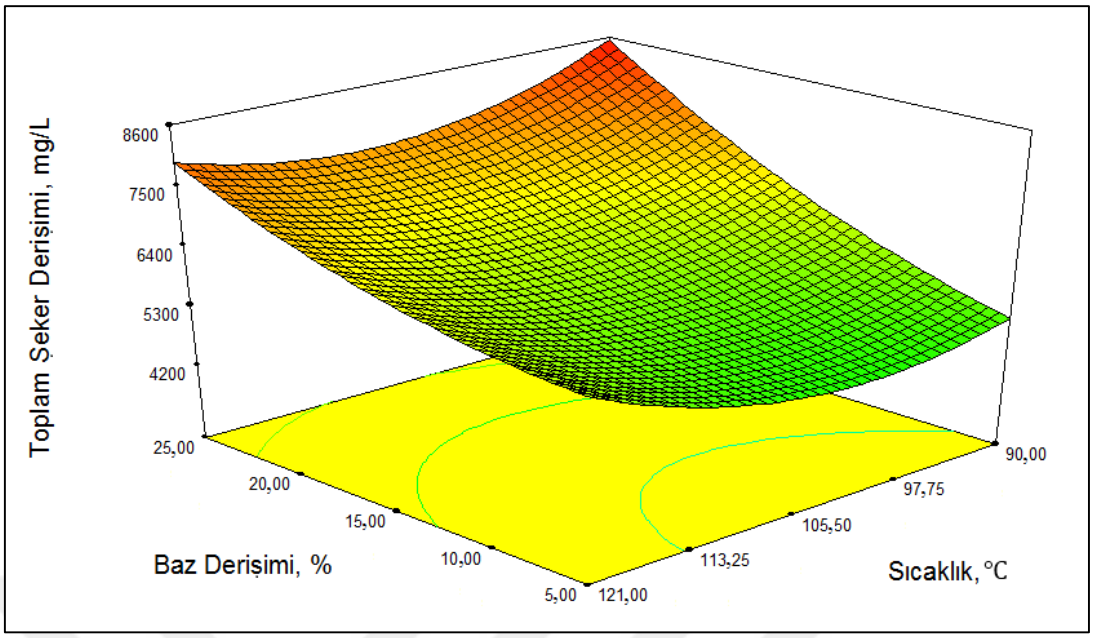
Şekil 3.7'de toplam şeker derişiminin baz (%) ve başlangıç odun talaşı derişimi (%) ile değişimi görülmektedir. Hidroliz bağımsız değişkenlerinden sıcaklık T=90°C ve süre t=15 dakikada sabit tutulmuştur. Hidroliz sonucunda oluşan toplam şeker derişimini etkileyen faktör odun talaşı (substrat) derişimidir. Odun talaşının %1

olduğu şartlarda, baz derişimi %5'den %25'e arttırılmış olmasına rağmen toplam şeker derişiminde önemli bir değişiklik gözlenmemiş ve ortalama olarak TS=2200 mg/L elde edilmiştir. Ancak odun talaşının %1'den %8'e arttırılması ile uygulanan baz derişimi aralığında, %1 odun talaşına göre yaklaşık olarak 4 kat artış sağlanarak TS=8600 mg/L toplam şeker derişimine ulaşılmıştır.

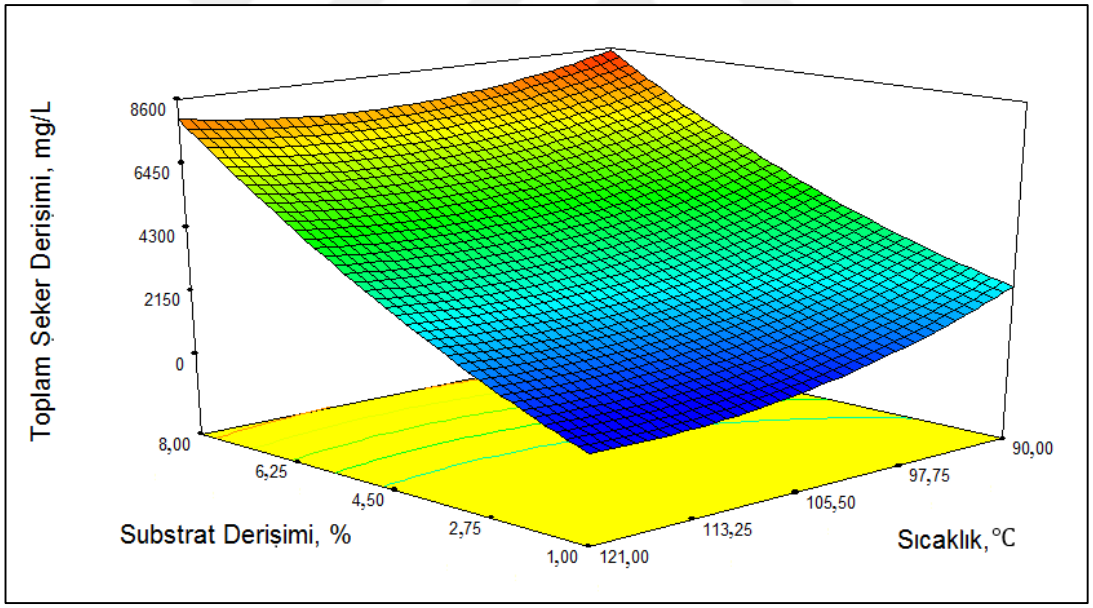


Şekil 3.7 Toplam şeker derişiminin baz ve odun talaşı derişimi ile değişimi (T=90°C, t=15 dak.)

Hidroliz sıcaklığı ve baz derişiminin toplam şeker derişimi üzerine etkisi Şekil 3.8'de verilmiştir. En yüksek hidroliz verimi S_o=%8 odun talaşı derişiminde elde edildiğinden, substrat derişimi %8'de, hidroliz süresi t=15 dakikada sabit tutulmuştur. Düşük baz derişiminde (NaOH=%5), sıcaklığın T=90°C'den T=121°C'ye yükseltilmesi ile toplam şeker derişimi, TS=5300 mg/L'den TS=6400 mg/L'ye yükselmiştir. Benzer olarak, T=90°C'de, NaOH'in %5'den %25'e çıkartılması ile de toplam şeker derişiminin TS=8600 mg/L'ye yükseldiği görülmektedir. NaOH derişimindeki artış sıcaklıktaki artışa nazaran daha etkin hidroliz sağlamıştır.



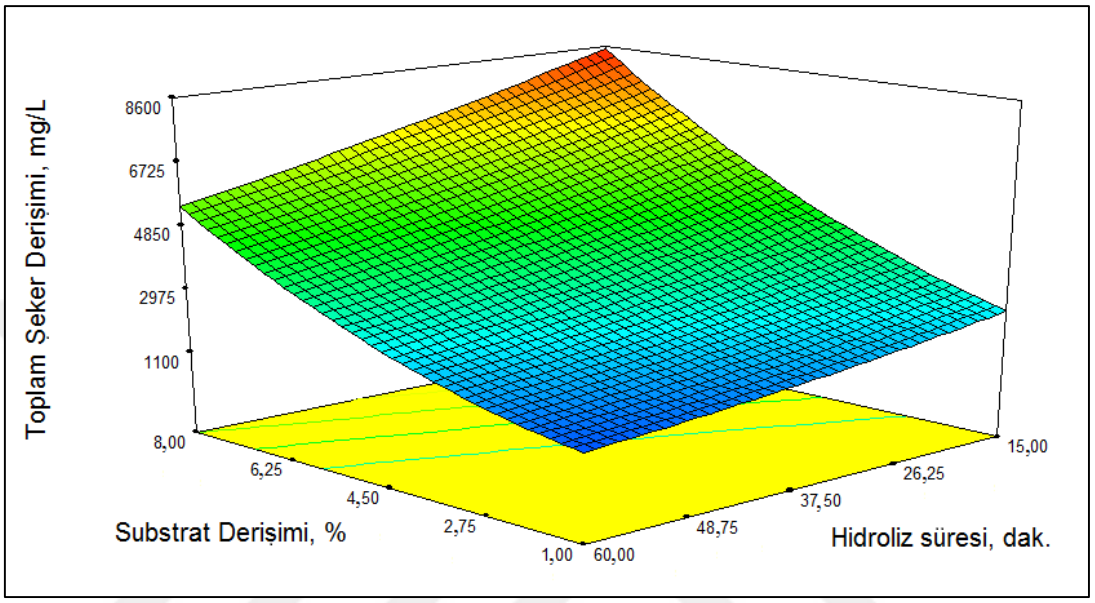
Şekil 3.8 Toplam şeker derişiminin baz derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (S=%8, t=15 dak)



Şekil 3.9 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz sıcaklığı ile değişimi (B=%25, t=15 dak)

Şekil 3.9'da hidroliz sıcaklığı ile odun talaşı derişiminin toplam şeker derişimi üzerine etkisi verilmiştir. En yüksek hidroliz verimi B=%25 baz derişiminde elde edildiğinden, baz derişimi %25'de, hidroliz süresi ise t=15 dakikada sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar maksimum baz derişiminde, sıcaklığın ve substrat

derişiminin hidrolize etkisi olduğunu göstermektedir. Substrat derişiminin %1'den %8'e arttırılması ile toplam şeker derişiminin yaklaşık olarak TS=8600 mg/L'ye yükseldiği görülmektedir. Düşük sıcaklık – yüksek substrat derişimi ile elde edilen toplam şeker derişimi artmaktadır.



Şekil 3.10 Toplam şeker derişiminin odun talaşı derişimi ve hidroliz süresi ile değişimi (B=%25, T=90°C)

Hidroliz süresi ve odun talaşı derişiminin (substrat), B=%25 ve T=90°C'de toplam şeker derişimi üzerine etkisi ise Şekil 3.10'da verilmiştir. Uzun hidroliz süresi – düşük substrat derişimi koşulları uygulandığında toplam şeker derişimi TS=1150 mg/L olarak elde edilmiş, substrat derişiminin %1'den %8'e çıkarılması ile toplam şeker derişimi TS=5000 mg/L'ye yükselmiştir. Aynı şekilde, hidroliz süresinin t=60 dakikadan t=15 dakikaya düşürülmesi ile toplam şeker derişimi TS=8600 mg/L olarak elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre odun talaşından alkali hidroliz ile maksimum toplam şeker derişimine ulaşmak için baz derişiminin B=%25, substrat derişiminin S=%8, hidroliz sıcaklığının T=90°C ve hidroliz süresinin t=15 dakika olması gerekmektedir.

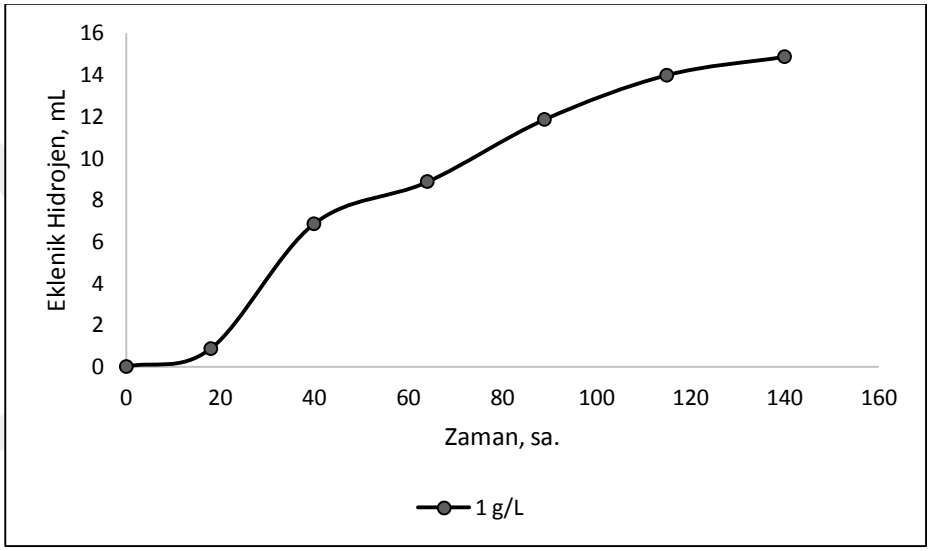
Design expert yazılımının optimizasyon modülü ve cevap eşitliği kullanılarak, toplam şeker derişimini maksimize eden hidroliz şartları tespit edilmiş ve B=%25,00, S=%8,00, T=90,06℃ ve t=15,00 dakika şartlarında maksimum şeker derişimi olarak TS=8531 mg/L elde edilmiştir. Bu şartlarda hidroliz yapılarak gözlenen toplam şeker derişimi (TS=8600 mg/L) ve hesaplanan derişim (TS=8531 mg/L) yaklaşık olarak aynıdır. Ancak toplam şeker derişimi eldesinin asit hidrolizi sonuçlarına göre çok düşük olması ve karamelizasyonun yüksek olmasından dolayı, hidrojen üretimi çalışmalarında ön işlem olarak asit hidrolizi tercih edilmiştir.

3.2 Hidrolize Odun Talaşından Hidrojen Gazı Üretimi

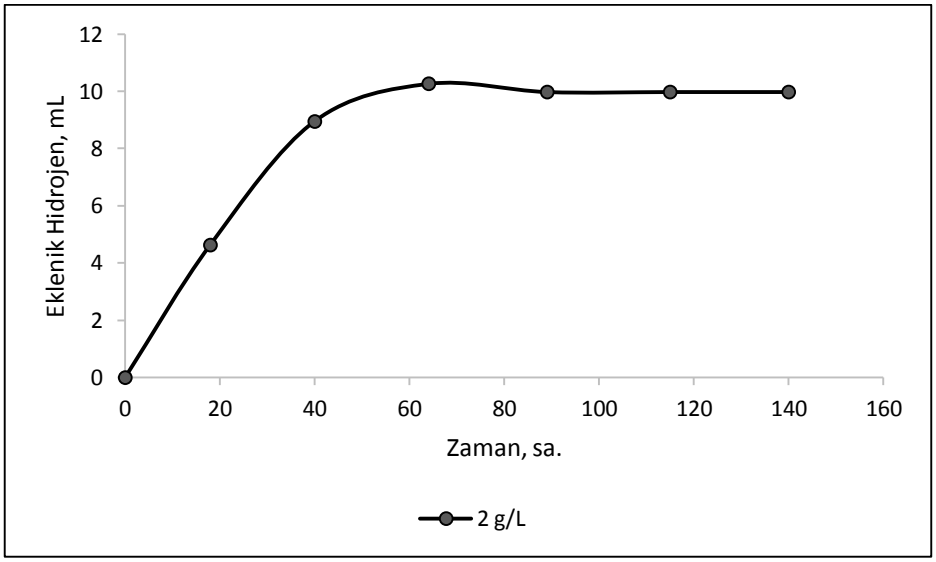
Asit ile optimum hidroliz şartlarında elde edilen şeker şurubu karbon kaynağı olarak kullanılarak karanlık fermantasyon ile hidrojen gazı üretimi çalışmaları yapılmıştır. Toplam şeker derişimi TS_0=1 – 9 g/L aralığında değiştirilmiştir. Başlangıç substrat derişiminin, eklenik hidrojen gazı hacmi, hidrojen üretim verimi ve hızı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 3.11'de eklenik hidrojen hacminin TS_0=1 g/L başlangıç şeker derişimine bağlı olarak zamanla değişimi görülmektedir. Burada lag fazının uzunluğu dikkat çekmektedir. 18 saat süren lag fazın ardından hidrojen gazı üretimi zamanla artarak 140. saat sonunda 14,8 mL'ye ulaşmıştır. Devam eden fermantasyon sürecinde hidrojen hacminde önemli bir artış gözlenmemiştir.

Şekil 3.12'de TS_0=2 g/L başlangıç şeker derişimine bağlı olarak eklenik hidrojen hacmi değişimi görülmektedir. TS_0=1 g/L'ye göre daha kısa lag fazına sahiptir. 64. saat sonunda hidrojen üretimi 10,2 mL'ye ulaşarak sabitlenmiştir. Şekil 3.13'de TS_0=3 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi verilmiştir. TS_0=2 g/L ile hemen hemen aynı lag fazına sahip olduğu görülmektedir. Yaklaşık 40 saat sonucunda 10,2 mL hidrojen üretimi gerçekleşmiş ve üretim bu değerde sabitlenmiştir. TS_0=4 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi Şekil 3.14'de verilmiştir. Yaklaşık 64 saat boyunca hidrojen üretim verimi artarak 9,9 mL'ye ulaşarak yavaşlamış ve 115. saate kadar artış kaydederek 13,1 mL'de sabit değere ulaşmıştır. Şekil 3.16'da, TS_0=6 g/L

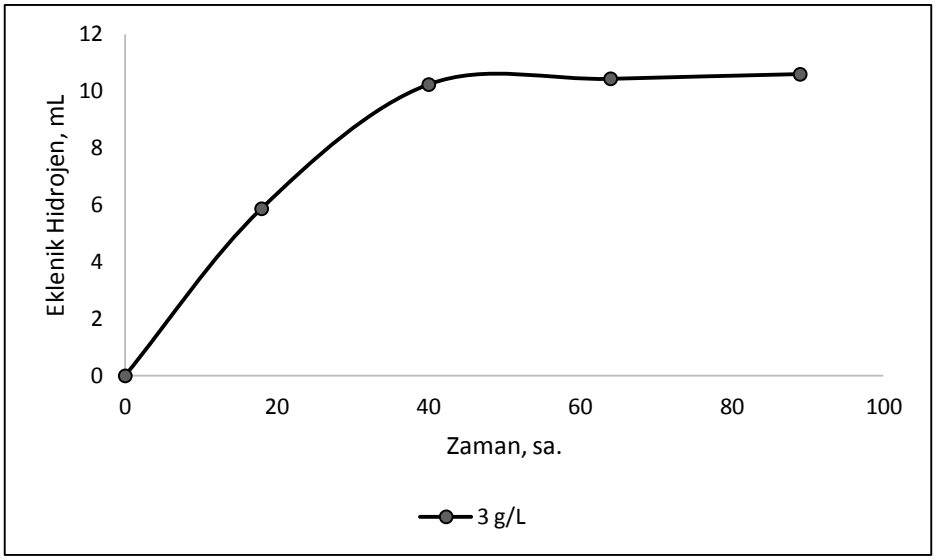
başlangıç şeker derişiminde, 64. saatte hidrojen üretim verimi yavaşlamaya başlamış ancak zamanla artış göstererek 115. saat sonucunda 8,6 mL olarak kaydedilmiştir. TS_0=7 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi Şekil 3.17'de görülmektedir. Başlangıç şeker derişimi daha düşük olan deney grupları ile kıyaslandığında hidrojen üretim verimi daha düşüktür ve 64. saatte 6,3 mL sabit değerine ulaşmıştır. TS_0=9 g/L başlangıç şeker derişiminde ise hidrojen üretim hacmi daha da düşerek 64 saat sonucunda 4,2 mL sabit değerine ulaşmıştır. Bu değer, en düşük hidrojen üretim hacminin elde edildiği toplam şeker derişimdir.



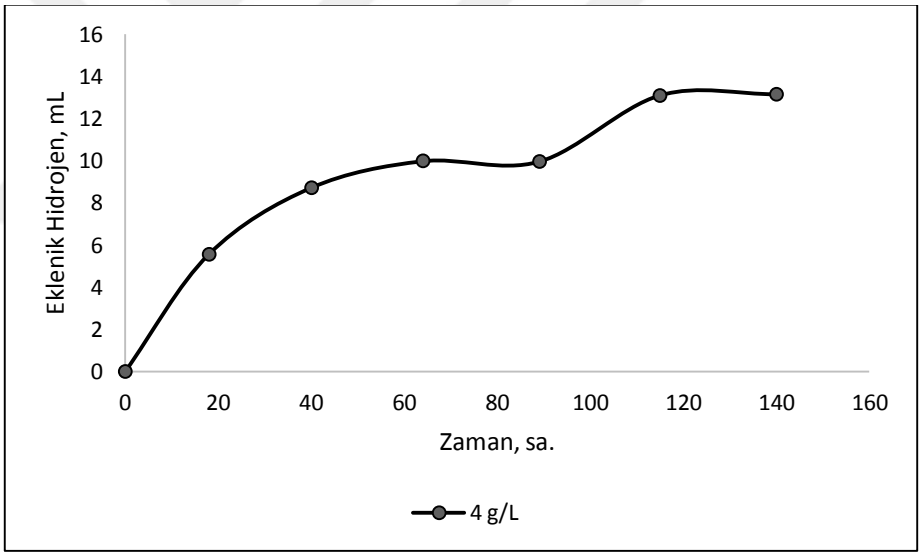
Şekil 3.11 TS_0=1 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



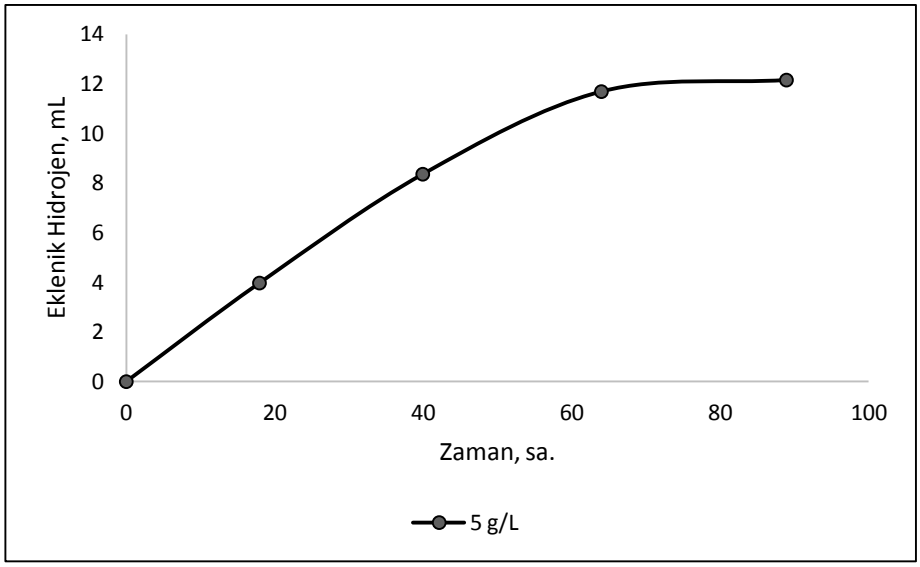
Şekil 3.12 TS_0=2 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



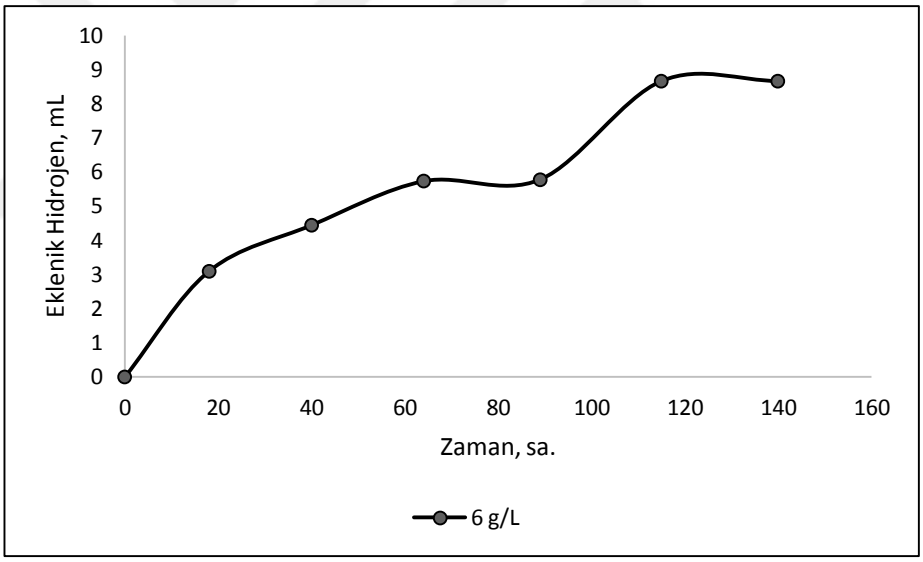
Şekil 3.13 TS_0=3 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



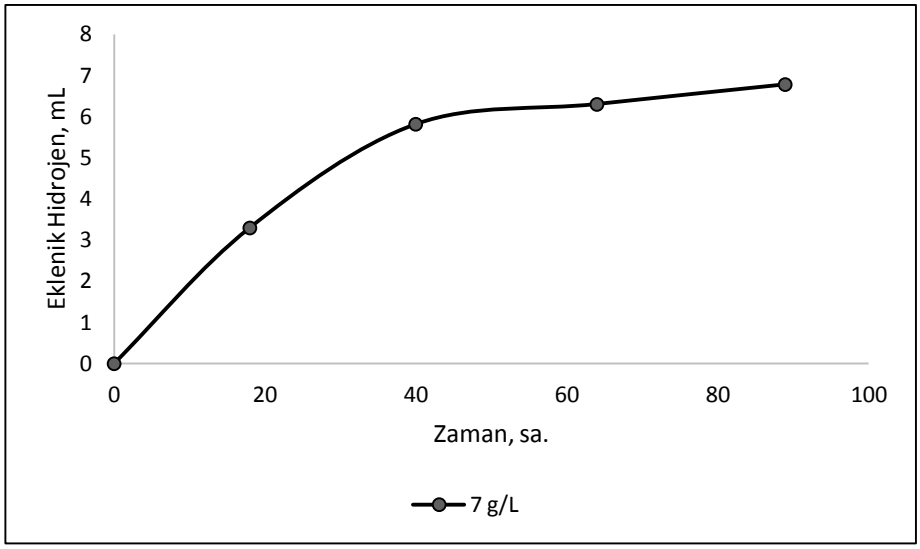
Şekil 3.14 TS_0=4 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



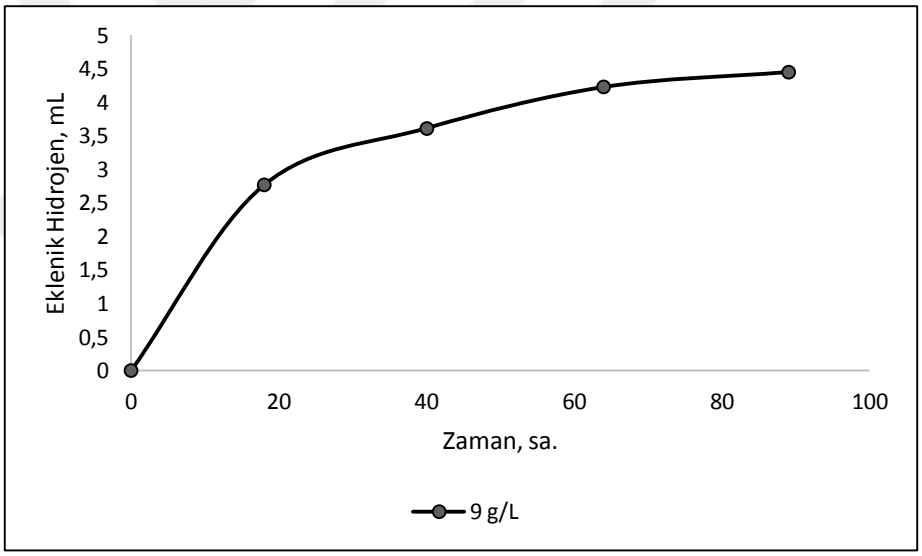
Şekil 3.15 TS_0=5 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



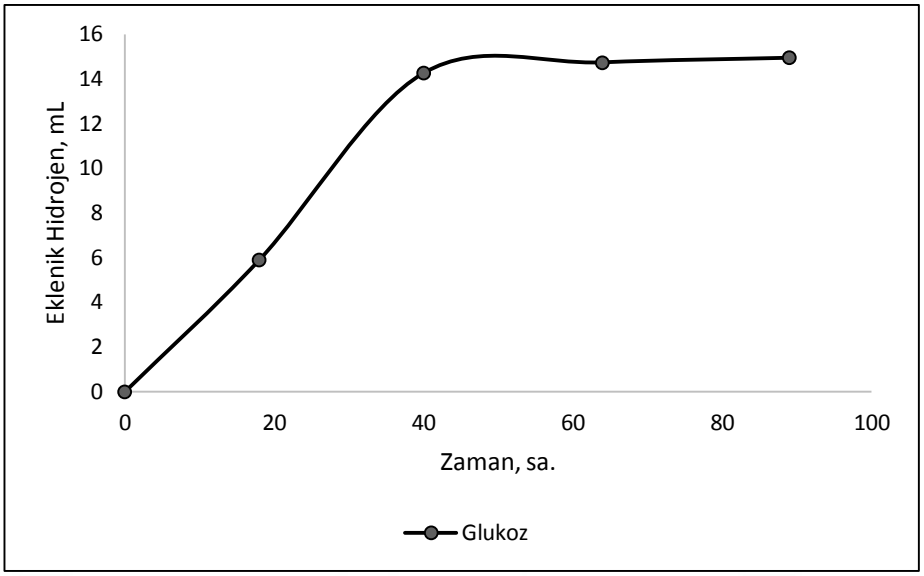
Şekil 3.16 TS_0=6 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



Şekil 3.17 TS_0=7 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



Şekil 3.18 TS_0=9 g/L başlangıç şeker derişiminde eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi



Şekil 3.19 Kontrol deneyi eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi

Şekil 3.19'da 5 g/L saf glukoz ile hazırlanan kontrol deneyinin eklenik hidrojen hacminin zamana göre değişimi verilmiştir. Lag fazının Şekil 3.11'de görülen TS_0=1 g/L'ye göre çok daha kısa olduğu görülmektedir. Üretim t=40 saatten sonra sabitlenerek maksimum üretim hacmi olan 14,9 mL elde edilmiştir. Şekil 3.15'de görülen TS_0= 5 g/L hidrolize odun talaşı şekerinde ise üretim yine 40 saat sonunda yavaşlayarak hacim 8 mL civarındadır. Hidrolize odun talaşından daha düşük hidrojen üretiminin gerçekleşmesinin temel sebebi, asit hidrolizi sırasında oluşan inhibitörlerin oluşmasıdır. Başlangıç toplam şeker derişimi arttıkça inhibitör derişiminin de artmasından dolayı hidrojen üretiminin azaldığı gözlenmektedir.

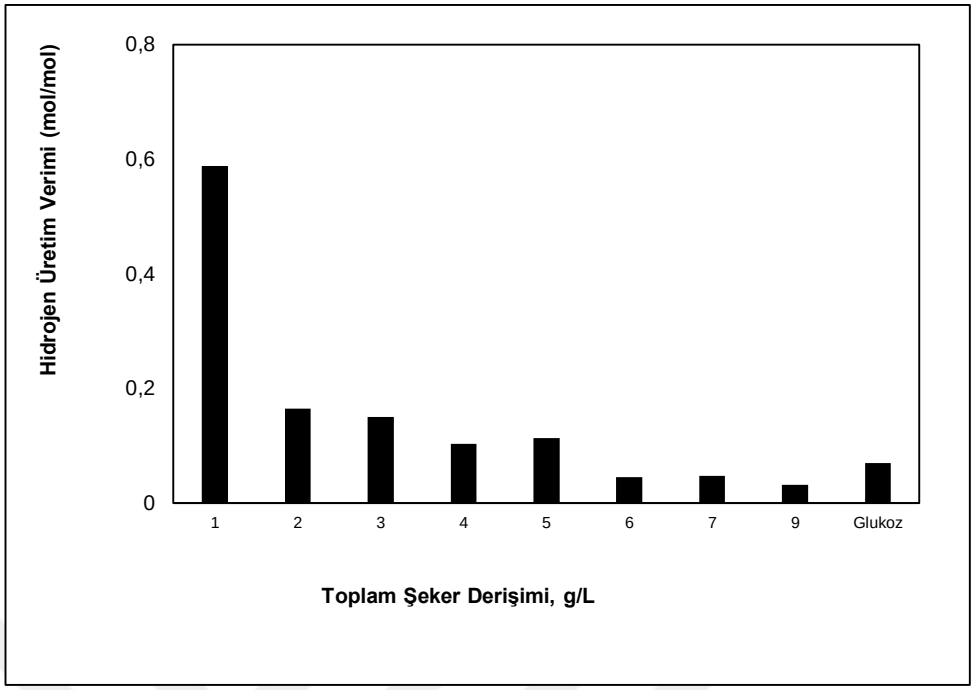
Substrat derişiminin hidrojen üretim verimi üzerine etkisi Şekil 3.20'de görülmektedir. Substrat derişimi arttıkça üretim veriminde azalma gözlenmiştir. Maksimum üretim verimi Y_{H2}= 0,6 mol/mol ile TS_0=1 g/L'de elde edilmiştir.

Gompertz eşitliği kullanılarak farklı başlangıç şeker derişimlerinde hidrojen üretim hızları (R_m) hesaplanmıştır (Tablo 3.7). Gompertz eşitliğindeki hidrojen üretim potansiyelleri ile deneysel çalışmalardan elde edilen hidrojen hacimleri benzerlik göstermektedir. Maksimum üretim hızı R_m=0,531 mL/saat ile TS_0=3 g/L başlangıç şeker derişiminde elde edilmiştir.

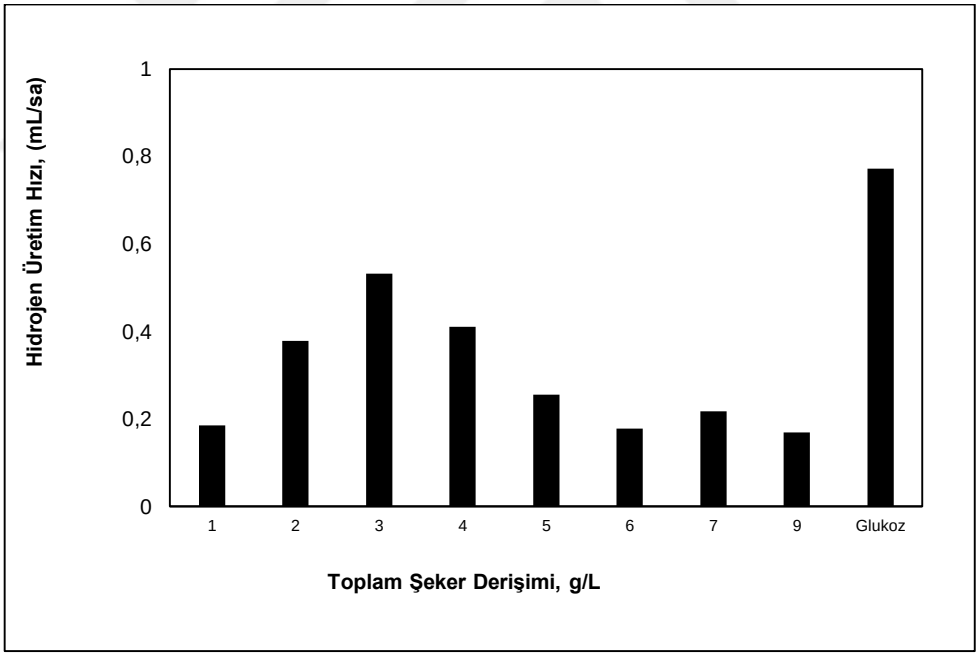
Tablo 3.7 Farklı başlangıç toplam şeker derişimlerinde Gompertz denklemi sabitleri

Başlangıç Taoplam Şeker Derişimleri, (mg/L)	**P, (mL)**	**R_m, (mL/sa)**	**L, (sa.)**	**R^2**
1 g/L	14,756	0,185	7,630	0,992
2 g/L	10,004	0,379	3,026	0,998
3 g/L	10,524	0,531	6,775	0,999
4 g/L	9,745	0,418	1,974	0,995
5 g/L	12,561	0,255	3,738	0,997
6 g/L	5,600	0,178	0	0,984
7 g/L	6,548	0,217	3,164	0,997
9 g/L	4,188	0,168	1,758	0,989
Glukoz	14,859	0,772	10,357	0,999

Şekil 3.21'de görüldüğü gibi toplam şeker derişiminin 1 g/L'den 3 g/L'ye arttırılması ile üretim hızı R_m=0,19 mL/saat'ten R_m=0,531 mL/saat'e yükselmiştir. Toplam şeker derişiminin daha yüksek olduğu şartlarda (TS_0 > 3 g/L) hız düşmektedir. Saf glukozun substrat olarak kullanıldığı çalışmada R_m=0,772 mL/saat ile maksimum üretim hızı elde edilmiştir. Yüksek substrat derişimlerinde hızın düşmesi ve hidrolize şeker ile saf glukoza nazaran daha düşük hızlarda üretimin gerçekleşmiş olması, hidroliz sırasında inhibisyon etkisi yapan maddelerin oluştuğunu ve bu maddelerin derişimlerinin substrat derişimine bağlı olarak artması olarak açıklanabilir.



Şekil 3.20 Hidrolize odun talaşı toplam şeker derişiminin hidrojen üretim verimi üzerine etkisi



Şekil 3.21 Başlangıç substrat derişiminin hidrojen üretim hızı üzerine etkisi

BÖLÜM DÖRT
SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Lignoselülozik atık olan odun talaşı çeşitli yollarla ya bertaraf edilmekte ya da mobilya endüstrisi tarafından parçacık boyutuna göre yeniden kullanılmaktadır. Ülkemizde kerestecilik ve mobilya endüstrisinin yaygın olması ve yüksek miktarda atık odun talaşı oluşması nedeniyle, biyolojik hidrojen gazı üretiminde bu lignoselülozik atıkların değerlendirilmesi mümkündür.

Biyoteknolojik, ekonomik, çevre dostu, yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynağı olan biyohidrojen gazı üretiminde odun talaşı, karanlık fermantasyonda karbon kaynağı olarak kullanılabilecek şekerin elde edilmesi açından potansiyel atık biyokütledir.

Bu çalışmada, odun talaşının alkali hidroliz şartlarının optimizasyon çalışması sonucunda düşük sıcaklık (T=90℃), kısa hidroliz süresi (t=15 dak.), maksimum baz derişimi (B=%25) ve %8 odun talaşı derişimi ile TS=8600 mg/L toplam şeker derişimi elde edilmiştir. Ancak elde edilen bu değerin asit hidrolizi sonuçlarına göre çok düşük olması ve ön işlem sonrası karamelizasyonun yüksek olmasından dolayı, hidrojen üretimi çalışmalarında ön işlem olarak asit hidrolizi tercih edilmiştir.

Odun talaşının asit hidrolizi şartlarının optimizasyonu ile %8 odun talaşı derişiminden TS=41100 mg/L gibi yüksek toplam şeker derişimi elde edilmiştir. Fermantasyon sonucunda ise maksimum üretim verimi Y_{H2}=0,6 mol/mol TS ve hızı R_m=0,531 mL/saat ile sırasıyla TS_0=1 g/L ve TS_0=3 g/L'de gözlenmiştir. Üretim verimi ve hızının saf glukozdan elde edilen değerlere göre düşük olması, asit hidrolizi sırasında toksik ve inhibisyon etkisi yapan maddelerin etkisi olarak açıklanabilir. Bu tür toksik maddeler oluşturmayan ve yüksek verimin elde edildiği hidroliz yöntemlerinin kullanılması ile odun talaşı, biyohidrojen üretiminde kullanılabilecek lignoselülozik biyokütle niteliği taşıyacaktır.

Odun talaşı gibi lignoselülozik atıkların ön işlemleri, biyohidrojen üretimi için önemli bir adımdır. Etkin ve düşük maliyetli yöntem, yüksek glukoz içeriği elde etmek için gereklidir. Fiziko-kimyasal yöntemler yaygın olmalarına rağmen; pahalıdır, nötürleştirilmeleri gerekir, hidroliz için kullanılan kimyasalın geri kazanımı mümkün değildir, furfurallar gibi toksik ve inhibisyon etkisi yaratan yan ürünler hidroliz sonrasında oluşabilir ve bu biyolojik hidrojen üretim verimini etkileyebilir. Son yıllardaki en büyük eğilim ön işlemlerde iyonik sıvıların kullanılmasıdır. Bu kimyasalların avantajları; diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek glukoz verimi sağlamaları, hiçbir yan ürün oluşturmamaları, hidroliz verimini etkilemeden birkaç kez tekrar kullanılabilir olmaları ve ön işlemler arasında tüm bunlar baz alındığında maliyetlerinin uygun olmasıdır.

Bu toksik ve inhibisyon etkisi yapan maddelerin oluşumunu engellemede iyonik sıvıların araştırılması, bu alanda çalışmaların arttırılması ve yeni metodların geliştirilmesi için araştırmaların önü açılmalı ve desteklenmelidir. Bu çalışmalarda, iyonik sıvı ve fiziko-kimyasal yöntemlerin performansları incelenebilir. Spesifik bir lignoselülozik atığın hidrolizi için reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı ve iyonik sıvı konsantrasyonu optimize edilebilir. Ülkemize ya da bölgemize özgü bir lignoselülozik atığın iyonik sıvılar ile ön işlemi araştırılabilir. Optimize iyonik sıvı hidroliz şartları kullanılarak hidrolize edilmiş lignoselülozik atıklardan biyolojik hidrojen gazı üretimi incelenebilir.

KAYNAKLAR

Argun, H., Kargi, F. ve Kapdan, I.K. (2009a). Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy, 34,* 2195–2200.

Argun, H., Kargi, F. ve Kapdan, I.K. (2009b). Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution. *International Journal of Hydrogen Energy, 34,* 4305-4311.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K. ve Öztekin, R. (2008a). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy, 33,* 1813–1819.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I.K. ve Öztekin, R. (2008b). Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: effects of the initial substrate and biomass concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy, 33,* 6109–6115.

Argun, H. (2010). *Hydrogen gas production from waste ground wheat by dark and light fermentations.* Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Argun, H. ve Kargı, F. (2009). Effects of sludge pre-treatment method on biohydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat. *International Journal of Hydrogen Energy, 34,* 8543-8548.

Argun, H. ve Kargı, F. (2010). Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 35,* 6170-6178.

Benemann, J.R. ve Hallenbeck, P.C. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy 27*, 1185–1193.

Ben-Ghedalia, D. ve Shefet, G. (1983). Chemical treatments for increasing the digestibility of cotton straw. *Journal of Agricultural Science and Technology, 100*, 393–400.

Bisaillon, A., Turcot, J. ve Hallenbeck, P.C. (2006). The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of Escherichia coli. *International Journal of Hydrogen Energy, 31*, 1504-1508.

Brennan, A.H., Hoagland, W. ve Schell, D.J. (1986). High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering-scale plug flow reactor: Result of low solids testing. *Biotechnology and Bioengineering Symposium 17*, 53–70.

Brynjarsdottir, H., Scully, S.M. ve Orlygsson, J. (2013). Production of biohydrogen from sugars and lignocellulosic biomass using *Thermoanaerobacter* GHL15. *Intrnational Journal of Hydrogen Energy, 38*, 14467-14475.

Cadoche, L. ve Lopez, G.D. (1989). Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes, 30*, 153–157.

Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D.J., Guo, W. ve Liu, B. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy, 34*, 7182–7188.

Cao, G.L., Guo, W.Q., Wang, A.J., Zhao, L., Xu, C. J., Zhao, Q. L. ve ark. (2012). Enhanced cellulosic hydrogen production from lime-treated cornstalk wastes

using thermophilic anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*, 13161–13166.

Chen, C.C., Lin, C.Y. ve Chang, J.S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 56–64.

Cheng, C.L., Lo, Y.C., Lee, K.S., Lee, D.J., Lin, C.Y. ve Chang, J.S. (2011). Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology, 102*, 8514-8523.

Cheng, J., Xie, B., Zhou, J., Song, W. ve Cen, K. (2010). Cogeneration of H2 and CH4 from water hyacinth by two-step anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*, 3029–3035.

Chenlin, L. ve Fang, H. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *37*, 1–39.

Clark, T.A. ve Mackie, K.L. (1987). Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. *I. Process Optimization. J. Wood Chemical Technology, 7,* 373–403.

Collet, C., Adler, N., Schwitzguebel J-P. ve Peringer, P. (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, *29,* 1479-1485.

Converse, A.O., Kwarteng, I.K., Grethlein, H.E. ve Ooshima, H. (1989). Kinetics of thermochemical pretreatment of lignocellulosic materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 20/21*, 63–78.

Cui, M., Yuan, Z., Zhi, X. ve Shen, J. (2009). Optimization of biohydrogen production from beer lees using anaerobic mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy 34*, 7971–7978.

Cui, M., Yuan, Z., Zhi, X., Wei, L. ve Shen, J. (2010). Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy, 35*, 4041 – 4047.

Das, D. ve Nath, K. (2004). Improvement of fermentaive hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 520–529.

Das, D. ve Veziroglu, T.N. (2001). Hydrogen production by biological processes: A survev of literature. *Internation Journal of Hydrogen Energy*, *26*, 13-28.

Demirbaş, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management*, *42*, 1357-1378.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *8*, 350-366.

Eroğlu, E. (2006). *Hydrogen productin from olive mill wastewater by Rhodobacter sphaeroides O.U. 001*. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.

Esteghlalian, A., Hashimoto, A.G., Fenske, J.J. ve Penner, M.H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchhgrass. *Bioresource Technology, 59*, 129–136.

Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. ve Ohmiya, K. (2001). Conversion of chitinous waste to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *Journal of Bioscience Bioengineering, 91*, 339-343.

Fan, L.T., Gharpuray, M.M. ve Lee, Y.H. (1987). *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs.* Berlin: Springer.

Fan, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Hou, H. ve Ren, B. (2006). Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology, 97,* 500-505.

Fang, H.H.P. ve Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture. *Bioresource Technology, 82*, 87–93.

Feng, L. ve Chen, Z.J. (2008). Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquid. *Journal of Molecular Liquids, 142*, 1-5.

Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandao, G.C. ve ark. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anaytica Chimica Acta, 597,* 179-186.

Gökfiliz, P. (2014). *Microbial support particle selection for hydrogen gas production in an immobilized reactor system by dark fermentation.* Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Guo, L., Li, X.M., Bo, X., Yang, Q., Zeng, G.M., Liao, .X. ve ark. (2008). Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretratment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource Technology, 99,* 3651–3658.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H. ve Steyer, J.P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy, 35,* 10660-10673.

Guo, Y.P., Fan, S.Q., Fan Y.T., Pan, C.M. ve Hou, H.W. (2010). The preparation and application of crude cellulase for cellulose-hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy, 35,* 459-468.

Han, H., Wei, L., Liu, B., Yang, H. ve Shen, J. (2012). Optimization of biohydrogen production from soybean straw using anaerobic mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*, 13200–13208.

Harun, R., Danquah, M.K. ve Forde, G.M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technolology and Biotechnology, 85*, 199–203.

Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. ve Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization, *International Journal of Hydrogen Energy*, *27*, 1339-1347.

He, L., Huang, H. ve Lei, Z. (2014). Enhanced hydrogen production from anaerobic fermentation of rice straw pretreated by hydrothermal technology. *Bioresource Technology*, *171*, 145–151.

Heinze, T., Schwikal, K. ve Barthel, S. (2005). Ionic liquids as reaction medium in cellulose functionalization. *Macromol Bioscience, 5*, 520-525.

Hinman, N.D., Schell, D.J., Riley, C.J., Bergeron, P.W. ve Walter, P.J. (1992). Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Appl. Biochem. Biotechnol. 34/35*, 639–649.

Hniman, A., O-Thong, S. ve Prasertsan, P. (2011). Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy, 36*, 8785-8793.

Ho, K.L., Lee, D.J., Su, A. ve Chang, J.S. (2012). Biohydrogen from lignocellulosic feedstock via one-step process. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*, 15569 -15574.

Holtzapple, M.T., Davison, R.R. ve Stuart, E.D. (1992). Biomass refining process, *US patent* 5, 171-592.

Holtzapple, M.T., Jun, J-H., Ashok, G., Patibandla, S.L. ve Dale, B.E. (1991). The ammonia freeze explosion (AFEX) process: A practical lignocellulose pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 28/29*, 59–74.

Jensen, J.R., Morinelly, J.E., Gossen, K.R., Brodeur-Campbell, M.J. ve Shonnard, D.R. (2010). Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam and switchgrass. *Bioresource Thechnology, 101*, 2317-2325.

Kádár, Z., De Vrıje, T., Noorden, G.E.V., Budde M.A.W., Szengyel Z., Reczey K. ve ark. (2004). Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 113–116,* 497-508.

Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Omori, Y., Toshiaki, F. ve ark. (2005). Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biotechnology, 116*, 271–282.

Kapdan, I.K. ve Kargı, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology, 38*, 569-582.

Karaosmanoğlu, F. (2015). *Biohydrogen production from hydrolized waste wheat by continuous dark fermentation process containing novel support material.* Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Khamtib, S. ve Reungsang, A. (2012). Biohydrogen production from xylose by Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum KKU19 isolated from hot spring sediment. *International Journal of Hydrogen Energy, 37*, 12219-12228.

Kilzer, F.J. ve Broido, A. (1965). Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrodynamics, 2*, 151–163.

Kim, S. ve Dale, B.E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residules. *Biomass Bioenergy, 26*, 361–375.

Kırlı, B. (2014). *Continuous hydrogen production from waste materials in an up-flow packed bed reactor.* Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Klimiuk, E., Pokoj, T., Budzynski, W. ve Dubis, B. (2010). Theoretical and observed biogas production from plant biomass of different fibre contents. *Bioresource Technology, 101*, 9527–9535.

Kongjan, P., Min, B. ve Angelidaki, I. (2009). Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 ℃) by mixed culture fermentation. *Water Research, 43*, 1414 – 1424.

Kotay, S.M. ve Das, D. (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy, 33*, 258-263.

Köksoy, O. (2001). *Taguchi ve Cevap Yüzeyi Felsefelerinin Birleştirilmesi: Problem ve Çözüm Teknikleri.* Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Lay, J.J., Fan, K.S., Hwang, J.I., Chang, J.I. ve Hsu, P.C. (2005) Factors affecting hydrogen production from food wastes by Clostridium-rich composts. *Journal of Environmental Engineering, 131*, 595–602.

Lee, K.S., Lin, P.J. ve Chang, J.S. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy, 31*, 465-472.

Leung, D., Leung, M., Sumathy, K. ve Ni, D. (2006). An owerview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology, 87*, 451–472.

Levin, D.B. ve Chahine, R. (2010). Challanges for renewable hydrogen production from biomass. *International Journal of Hydrogen Energy, 35*, 4962-4969.

Li, C. ve Fang, H.H.P. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes bu mixed cultures. *Environmental Science and Technology*, *37*, 1-39.

Li, M., Zhao, Y., Guo, Q., Qian, X. ve Niu, D. (2008). Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. *Renewable Energy*, *33*, 2573-2579.

Lin, C.Y., Chang, C.C. ve Hung, C.H. (2008). Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*, 2445–2453.

Lin, C.Y. ve Lay, C.H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, *29*, 41-45.

Lin, Z.X., Huang, H., Zhang, H.M., Zhang, L., Yan, L.S. ve Chen, J.W. (2010). Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 162*, 1872–1880.

Liu, C.M., Chu, C.Y., Lee, ve W.Y. (2013). Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pre-treatment in both batch and continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy, 38,*15823–15829.

Liu, C.M., Wu, S.Y., ve Chu, C.Y. (2014). Biohydrogen production from rice straw hydrolyzate in a continuously external circulating bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 39,* 19317-19322.

Liu, G. ve Shen, J. (2004). Effect Of Culture and Medium Conditions on Hydrogen Production From Starch Using Anaerobic Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 98(4),* 251-256.

Lo, Y.C., Su, Y.C., Cheng, C.L. ve Chang, J.S. (2011). Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy,* 36, 13955-13963.

Logan, B., Sang, O. ve Ginkel, S.V. (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science and Technology, 37,* 5186-5190.

McMillan, J.D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In:Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic conversion of biomass for fuels production.* Washington, American Chemical Society.

Melis, A. (2002). Green alga hydrogen production: Progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy, 27,* 1217–1228.

Mes-Hartree, M., Dale, B.E. ve Craig, W.K. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Applied Microbiology Biotechnology, 29,* 462-468.

Meyer, J., Kelley, B.C. ve Vignais, P.M. (1978). Effect of light on nitrogenase function and synthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology, 136(1),* 201–8.

Millet, M.A., Baker, A.J. ve Scatter, L.D. (1976). Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology Bioengineering Symposium, 6,* 125–153.

Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C., Chuannan, L., ve ark. (2005). Isolation and characterization of a high H_2-producing strain *Klebsiella oxytova* HP1 from a hot spring. *Research in Microbiology, 156,* 76-81.

Momirlan, M., ve Veziroğlu, T.N. (2002). Current status of hydrogen energy. Renewable and *Sustainable Energy Reviews*, *6,* 141-179.

Momirlan, M., ve Veziroğlu, T.N. (2005). The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. *International Journal of Hydrogen Energy*, *30,* 795-802.

Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A.A.Y., Ngan, M.A., Fakhru'l-Razi, A., Iyuke, S.E., ve ark. (2004). Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy, 29,* 709-713.

Nandi, R. ve Sengupta, S. (1998). Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Critical Reviews in Microbiology, 24(1),* 61–84.

Nasirian, N., Almassi, M., Minaei, S. ve Widmann, R. (2011). Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy, 36,* 411-420.

Nelly, W.C. (1984). Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. *Biotechnology Bioengineering*, *20,* 59-65.

Nguyen, T.A.D., Kim, K.R., Han, S.J., Cho, H.Y., Kim, J.W., Park, S.M. ve ark. (2009). Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for

lignocellulose conversion to fermentable sugars. *Bioresource Technology, 101*, 7432-7438.

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., ve Sumathy, K. (2006). An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology*, *87,* 461-472.

Nicolau, J.M., Dinsdale, R. ve Guwy, A. (2008). Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, *99/14*, 6325-6331.

Nissila, M.E., Lay, C.H. ve Puhakka, J.A. (2014). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates: A review. *Biomass and Bioenergy 67,* 145-159.

Orozco, A.M., Al-Muhtaseb, A.H., Albadarin, A.B., Rooney, D., Walker, G.M. ve Ahmad, M.N.M. (2011). Dilute phosphoric acid-catalysed hydrolysis of municipal bio-waste wood shavings using autoclave parr reactor system. *Bioresource Technology*, *102*, 9076-9082.

Öztekin, R., Kapdan, I.K., Kargı, F. ve Argun, H. (2008). Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*, 4083-4090.

Patel, A.K., Debroy, A., Sharma, S., Saini, R, Mathur, A., Gupta, R. ve ark. (2015). Biohydrogen production from a novel alkalophilic isolate *Clostridium sp.* IODB-O3. *Bioresource Technology*, *175*, 291–297.

Pinkert, A., Marsh, K.N., Pang, S. ve Staiger, M.P. (2009). Ionic liquid and their interaction with cellulose. *Chemical Reviews, 109*, 6712-6728.

Podest´a, J.J., Navarro, A.M.G., Estrella, C.N. ve Esteso, M.A. (1997). Electrochemical measurements of trace concentrations of biological hydrogen produced by *Enterobacteriaceae*. *Research in Microbiology, 148,* 87-93.

Prakasham, R.S., Brahmaiah, P. ve Sathish, T. (2009). Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *International Journal of Hydrogen Energy, 34,* 9354 – 9361.

Prakasham, R.S., Sathish, T. ve Brahmaiah, P. (2010). Biohydrogen production process optimization using anaerobic mixed consortia: A prelude study for use of agro-industrial material hydrolysate as substrate. *Bioresource Technology, 101,* 5708–5711.

Ramachandran, R. ve Menon, R.K. (1998). An owerview of industrial uses of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy, 23,* 593–598.

Sağnak, R. ve Kargi, F. (2011). Hydrogen gas production from acid hydrolyzed wheat starch by combined dark and photo-fermentation with periodic feeding. *International Journal of Hydrogen Energy, 36,* 10683-10689.

Sağnak, R., Kargı, F. ve Kapdan, I.K. (2011). Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy, 36,* 12803-12809.

Salehian, P., Karimi, K., Zilouei, H. ve Jeihanipour, A. (2013). Improvement of biogas production from pine wood by alkali pretreatment. *Fuel, 106,* 484-489.

Salerno, M.B., Park, W., Zuo, Y. ve Logan B.E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Research, 40,* 1167-1172.

Schurz, J., (1978). In: Ghose, T.K. (Ed.), *Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy*. Chemicals and Microbial Protein Symposium Proceedings, IIT, New Delhi.

Sekoai, P.T., Gueguim, E.B. ve Kana, A. (2013). Two-stage modelling and optimization of biohydrogen production from a mixture of agro-municipal waste. *International Journal of Hydrogen Energy, 38*, 8657-8663.

Shafizadeh, F. ve Lai, Y.Z. (1975). Thermal degradation of 2-deoxy-Darabinohexonic acid and 3-deoxy-D-ribo-hexono-1,4-lactone. *Carbohydrate Research, 42,* 39–53.

Shin, H.S., Youn, J.H. ve Kim, S.H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy, 29,* 1355–1363.

Sinha, P. ve Pandey, A. (2014). Biohydrogen production from various feedstocks by Bacillus firmus NMBL-03. *International Journal of Hydrogen Energy, 39,* 7518-7525.

Skulberg, O.M. (1991). Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology, IEA, Hydrogen Programme, Progress Report, 1997. Ltd. London.

Smith, G.D., Ewart, G.D. ve Tucker, W. (2002). Hydrogen production by *Cyanobacteria*. *International Journal of Hydrogen Energy, 17 (9),* 695-698.

Şehirlioğlu, A. K. ve Şen, A. (1997). *Ürün ve Süreç Kalitesini İyileştirmede Kullanılan İstatistiksel Modelleme Teknikleri Üzerine Bir Araştırma.* Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Tarkow, H. ve Feist, W.C. (1969). A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Advanced Chemistry Series, 95*, 197-218.

Thauer, R., Jungerman, K. ve Decker, K. (1977). Energy conversion in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews, 41*, 100–180.

Thomsen, M.H., Thygesen, A. ve Thomsen, A.B. (2008). Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology, 99,* 4221–4228.

Türe, E. (2007). Günes enerjisi ile hidrojen üretimi. 03 Nisan 2008, http://hidrojenenerji.blogspot.com/search?q=biyolojik

Turner, J., Sverdrup, G., Mann, M., Maness, P., Kroposki, B., Ghiardi, M. ve ark. (2007). Renewable hydrogen production. *International Journal of Energy Research, 32,* 379-407.

Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M. ve Igarashi, Y. (2001). Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 92,* 397–400.

Uyar, B., Eroglu, I., Yucel, M., Gunduz, U. ve Turker, L. (2008). Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy, 32,* 4670–4677.

Valdez-Vazquez, I. ve Poggi-Varaldo, H. M. (2008). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Rewiews*.

Vazquez, I.V. ve Varaldo, H.M.P. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13,* 1000-1013.

Veziroğlu, T.N. ve Frano, B. (1998). Hydrogen Energy Technologies, United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), Viena.

Vidal, P.F. ve Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass, 16,* 1–17.

Vlasenko, E.Y., Ding, H., Labavitch, J.M. ve Shoemaker, S.P. (1997). Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource Technology, 59,* 109-119.

Wakayama, T. ve Miyake, J. (2001). Hydrogen from biomass, In: Miyake, J., Matsunaga, T., San Pietro A., (Editors), *Biohyrogen II- An aproach to Environmentally Acceptable Tecnology*, Elsevier Science Ltd.,Uk, 41-51.

Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.V. ve Liao, C.S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology, 102*, 83-92.

Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.V., Liao, C.S., ve Tay, J.H. (2003b). Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation. *Water Research, 37*, 2789-2793.

Wang, J., ve Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy, 34,* 799-811.

Wang, J., ve Wan, W. (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy, 33,* 5392-5397.

White, C.M., Steeper, R.R. ve Lutz, A.E. (2006). The hydrogen-fueled internal combustion engine: a technical review. *Internation Journal of Hydrogen Energy, 31,* 1292-1305.

Wijffels, R.H. ve Barbosa, M.J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science 329 (5993),* 796–799.

Wongthanate, J., Chinnacotpong, K. ve Khumpong, M. (2014). Impacts of pH, temperature, and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, *5*, 76.

Yat, S.C., Berger, A. ve Shonnard, D.R. (2008). Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource Technology*, *99*, 3855-3863.

Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S. ve Takasaki, Y. (1995). Characteristic of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *80*, 571-574.

Yokoi, H., Saitsu, A., Uchida, H., Hirose, J., Hayashi, S. ve Takasaki, Y. (2001). Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *91*, 58-63.

Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S. ve Takasaki, Y. (1998). H_2 production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, *20*, 143–147.

Yokoyama, H., Moriya, N., Ohmori, H., Waki, M., Ogino, A. ve Tanaka, Y. (2007). Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 213–222.

Yu, H., Zhu, Z., Hu, W. ve 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*, 1359-1365.

Zhang, T., Liu, H. ve Fang, H.H.P. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management, 69,* 149-156.

Zhang, X., Ye, X., Guoa, B., Finneran, K.T. ve Zilles, J.L. (2013). Lignocellulosic hydrolysates and extracellular electron shuttles for H_2 production using co-culture fermentation with *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens*. *Bioresource Technology*, *147,* 89–95.

Zheng Y. (2009). Lignocellulosic biomass pretreatment for bioethanol production. In:Erbaum JB, editor. *Bioethanol: production, benefits and economics*. NewYork, Hauppauge: Nova Science Publishers.

Zheng, Y., Pan, Z. ve Zhan, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricaltural and Biology, 2,* 51-68.

Zhu, S.D. (2008). Perspective used of ionic liquids for the efficient utilization of lignocellulosic materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83,* 777-779.

EKLER

Ek.1 Karanlık Fermantasyon ile Hidrojen Üretimi Deney Sonuçları

Eşitlik E.1'de eklenik hidrojen gazı hacmi (mL) hesaplanması görülmektedir.

$$V_{H2,i} = V_{H2,i-1} + (V_w * C_{H2,i}) + (V_{Gi} * C_{H2,i}) - (V_{Gi-1} * C_{H2,i-1}) \quad (E.1)$$

V_w : Toplam gaz, (mL)

$C_{H2,i}$: H_2 konsantrasyonu, (%)

V_{Gi} : t zamanı boşluk hacmi, (mL)

$V_{G,i-1}$: t-1 zamanı boşluk hacmi, (mL)

$^1C_{H2,i-1}$: t-1 zamanında toplam gaz içerisindeki H_2 konsantrasyonu, (%)

$^2C_{H2,i-1}$: Argon gazı geçirildikten sonra boşlukta kalan H_2 konsantrasyonu, (%)

$V_{H2,i-1}$: t-1 zamanında üretilen H_2 miktarı, (mL)

V_{H2} : t zamanı üretilen H_2 miktarı, (mL)

TS_0 : Başlangıç toplam şeker derişimi, (mg/L)

TS_{son} : Son toplam şeker derişimi, (mg/L)

Tablo E.1 1g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	V_{Gi} (mL)	V_w (mL)	$^1C_{H2,i-1}$ (%)	$^2C_{H2,i-1}$ (%)	$V_{H2,i-1}$ (mL)	V_w*C_{H2}	$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$	V_{H2i} (mL)	pH	ORP	TS_0 (mg/L)	TS_{son} (mg/L)	Verim (mmol H_2/mmol)	Verim (mL H_2/g)
0	60	0	0	0	0			0	6,9	-199				
15	64	2,5	1,295	0,6475	0	0,8288	0	0,86117	6,5	-158				
37	66	2	9,422	4,711	0,861175	6,21852	0,4144	6,85373	6,5	-260				
61	68	3	7,196	7,196	6,853735	4,89328	3,10926	8,85363	6,6	-253				
85	70	0	11,275	11,275	8,853635	7,8925	4,89328	11,8528	6,6	-237				
136	70	1	3	3	11,85286	2,1	0	13,9828						
157	74	0,5	4	4	13,98286	2,96	2,1	14,8628	6,0	-231	1000	256	0,588615	79,90782

Tablo E.2 2g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	V_{Gi} (mL)	V_w (mL)	$^1C_{H2,i-1}$ (%)	$^2C_{H2,i-1}$ (%)	$V_{H2,i-1}$ (mL)	V_w*C_{H2}	$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$	V_{H2i} (mL)	pH	ORP	TS_0 (mg/L)	TS_{son} (mg/L)	Verim (mmol H_2/mmol)	Verim (mL H_2/g)
0	60	0	0	0	0			0	6,7	-220				
15	64	6	6,63	3,315	0	4,2432	0	4,641	6,7	-148				
37	66	13,5	8,095	40475	4,641	5,3427	2,1216	8,95492	6,5	-254				
61	68	2,5	5,638	5,638	8,954925	3,83384	2,67135	10,2583	6,4	-250				
85	70	0	5,06801	5,06801	10,25837	3,547607	3,83384	9,97213	6,6	-218				
136	70	0	0	0	9,972132	0	0	9,97213			2000	216	0,164701	22,35904

Tablo E.3 3g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	V_{Gi} (mL)	V_w (mL)	$^1C_{H2,i-1}$ (%)	$^2C_{H2,i-1}$ (%)	$V_{H2,i-1}$ (mL)	V_w*C_{H2}	$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$	V_{H2i} (mL)	pH	ORP	TS_0 (mg/L)	TS_{son} (mg/L)	Verim (mmol H_2/mmol)	Verim (mL H_2/g)
0	65	5	0	0	0			0	6,7	-390				
18	65	2	7,34997		0	1,102496	0	5,879976	6,2	-206				
40	67	7	4,78488	7,34997	5,879976	1,148371	0	10,23422	6,3	-190				
64	74	5	3,9559	4,78488	10,23422	0,197795	0	10,43201	6,4	-228				
89	79	4	5,57721	3,9559	10,43201	0,167316	0	10,59933	6,5	-245	2750	630	0,150321	19,99873

Tablo E.4 4g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	V_{Gi} (mL)	V_w (mL)	$^1C_{H2,i-1}$ (%)	$^2C_{H2,i-1}$ (%)	$V_{H2,i-1}$ (mL)	V_w*C_{H2}	$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$	V_{H2i} (mL)	pH	ORP	TS_0 (mg/L)	TS_{son} (mg/L)	Verim (mmol H_2/mmol)	Verim (mL H_2/g)
0	60	0	0		0			0	6,6	-408				
15	64	0,5	8,63	4,315	0	0,04315	0	5,56635	6,8	-91				
37	66	19,5	6,917	3,4585	5,56635	1,348815	2,7616	8,718785	6,2	-235				
61	68	7	4,726	4,726	8,718785	0,33082	2,28261	9,980675	6,2	-244				
85	70	1,2	4,48344	4,48344	9,980675	0,053801	3,21368	9,959204	6,5	-231				
136	70	0	0	0	9,959204	0	0	9,959204						
157	74	7	3,88134	3,88134	9,959204	0,271694	0	13,10309	6,0	-242				
181	78	1,5	3,68178	3,68178	13,10309	0,055227	2,872192	13,15791	6,5	-263	4000	271	0,103534	14,05534

Tablo E.5 5g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	**V_{Gi} (mL)**	**V_w (mL)**	**$^1C_{H2,i-1}$ (%)**	**$^2C_{H2,i-1}$ (%)**	**$V_{H2,i-1}$ (mL)**	**V_w*C_{H2}**	**$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$**	**V_{H2i} (mL)**	**pH**	**ORP**	**TS_0 (mg/L)**	**TS_{son} (mg/L)**	**Verim (mmol H_2/mmol)**	**Verim (mL H_2/g)**
0	65	0	0		0			0	6,5	-370				
18	65	7	5,53117	5,53117	0	0,387182	0	3,982442	6,2	-151				
40	67	40	4,10006	4,10006	3,982442	1,640024	0	8,369507	6,3	-194				
64	74	15	3,73293	3,73293	8,369507	0,55994	0	11,69181	6,5	-216				
89	79	9	5,16395	5,16395	11,69181	0,464756	0	12,15657	6,7	-248	4510	1270	0,112809	15,00811

Tablo E.6 6g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	**V_{Gi} (mL)**	**V_w (mL)**	**$^1C_{H2,i-1}$ (%)**	**$^2C_{H2,i-1}$ (%)**	**$V_{H2,i-1}$ (mL)**	**V_w*C_{H2}**	**$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$**	**V_{H2i} (mL)**	**pH**	**ORP**	**TS_0 (mg/L)**	**TS_{son} (mg/L)**	**Verim (mmol H_2/mmol)**	**Verim (mL H_2/g)**
0	60	0	0		0			0	6,4	-305				
15	64	0	4,828	2,414	0	0	0	3,08992	6,7	-60				
37	66	0,5	4,352	2,176	3,08992	0,02176	1,54496	4,43904	6,5	-221				
61	68	0	4,006	4,006	4,43904	0	1,43616	5,72696	6,0	-238				
85	70	1	3,9082	3,9082	5,72696	0,039082	2,72408	5,777702	6,3	-248				
136	70	0	0	0	5,777702	0	0	5,777702						
157	74	1	3,84533	3,84533	5,777702	0,038453	0	8,6617	6,0	-216	6000	416	0,045705	6,204656

Tablo E.7 7g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	**V_{Gi} (mL)**	**V_w (mL)**	**$^1C_{H2,i-1}$ (%)**	**$^2C_{H2,i-1}$ (%)**	**$V_{H2,i-1}$ (mL)**	**V_w*C_{H2}**	**$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$**	**V_{H2i} (mL)**	**pH**	**ORP**	**TS_0 (mg/L)**	**TS_{son} (mg/L)**	**Verim (mmol H_2/mmol)**	**Verim (mL H_2/g)**
0	65	0	0		0			0	6,9	-380				
18	65	0	5,07974	5,07974	0	0	0	3,301831	6,5	-161				
40	67	7	7,86169	7,86169	3,301831	0,550318	3,301831	5,817651	5,8	-175				
64	74	13	3,76099	3,76099	5,817651	0,488929	0	6,306579	6,0	-205				
89	79	12	3,98601	3,98601	6,306579	0,478321	0	6,784901	6,3	-233	5580	1300	0,047662	6,341029

Tablo E.8 9g/L başlangıç şeker derişimi hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	**V_{Gi} (mL)**	**V_w (mL)**	**$^1C_{H2,i-1}$ (%)**	**$^2C_{H2,i-1}$ (%)**	**$V_{H2,i-1}$ (mL)**	**V_w*C_{H2}**	**$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$**	**V_{H2i} (mL)**	**pH**	**ORP**	**TS_0 (mg/L)**	**TS_{son} (mg/L)**	**Verim (mmol H_2/mmol)**	**Verim (mL H_2/g)**
0	65	0	0		0			0	6,3	-320				
18	65	0	4,25695	4,25695	0	0	0	2,767018	6,5	-178				
40	67	0	5,39561	5,39561	2.767018	0	2,767018	3,615059	5,7	-158				
64	74	16	3,83908	3,83908	3.615059	0,614253	0	4,229312	5,6	-198				
89	79	6	3,72622	3,72622	4.229312	0,223573	0	4,452885	5,8	-202	6580	2430	0,03226	4,291937

Tablo E.9 Kontrol grubu (5 g/L saf glukoz) hidrojen üretim verileri

Süre (sa.)	**V_{Gi} (mL)**	**V_w (mL)**	**$^1C_{H2,i-1}$ (%)**	**$^2C_{H2,i-1}$ (%)**	**$V_{H2,i-1}$ (mL)**	**V_w*C_{H2}**	**$V_{Gi-1}*C_{H2,i-1}$**	**V_{H2i} (mL)**	**pH**	**ORP**	**TS_0 (mg/L)**	**TS_{son} (mg/L)**	**Verim (mmol H_2/mmol)**	**Verim (mL H_2/g)**
0	65	0	0		0			0	6,5	-225				
18	65	45	5,36534	5,36534	0	2,414403	0	5,901874	5,8	-176				
40	67	151	5,43644	5,43644	5,901874	8,209024	3,487471	14,26584	5,8	-182				
64	74	12	3,98085	3,98085	14,26584	0,477702	0	14,74354	6,3	-226				
89	79	4	5,11911	5,11911	14,74354	0,204764	0	14,94831	6,4	-217	7030	550	0,069357	9,227351