

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

***Lemna minor*'den FERMENTASYON
İLE
HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İKBAL ÖREN

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

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



Lemna minor'den FERMENTASYON
İLE
HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İKBAL ÖREN

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından 2022 FEBE006 nolu proje ile desteklenmiştir.

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

İKBAL ÖREN

ÖZET

***Lemna minor*'den FERMENTASYON İLE HİDROJEN GAZI ÜRETİMİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
İKBAL ÖREN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. HİDAYET ARGUN)

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Bu tez kapsamında *Lemna minor*'den karanlık fermentasyon (KF) ile hidrojen gazı üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. Bu araştırma sırasında iki set deney tasarlanmıştır, birinci deney setinde *Lemna minor* (LM) ve glikozun (GLİ) ikinci deney setinde ise LM ve cennet hurması kabuğu (CH) karışımının hidrojen üretim verimi ve hızı üzerine olan etkileri incelenmiştir. En uygun H₂ üretimini sağlayan koşulları bulabilmek için, Box-Wilson istatistiksel deney tasarımı kullanılmıştır. LM-GLİ deney seti için bağımsız değişkenler ve aralıkları: GLİ konsantrasyonu (X₁: 0-60 g/L) ve LM konsantrasyonu (X₂: 0-40 g/L) olmuştur. LM-CH deney setinde LM bağımsız değişkeni ve aralığı aynı tutulurken (X₂: 0-40 g/L) GLİ yerine CH (X₁¹: 0-60 g/L) değişken olarak kullanılmıştır. Birinci deney setinin sonunda en yüksek hidrojen verimi ve hızı sırasıyla 76,01 mLH₂/10 mL ve 13,51 mLH₂/saat olarak tespit edilmiştir. Birinci set deney sonuçları ikinci set deneylerin değerlendirilmesinde yol gösterici olmuştur. LM-CH deney setinin sonunda en yüksek hidrojen verimi ve hız değerleri sırasıyla 103,25 mLH₂/10 mL ve 21,42 mLH₂/saat olarak bulunmuştur. Bu tez kapsamında yapılan çalışma sonunda 123 g/L cennet hurması kabuğunun 40 g/L *Lemna minor* ile harmanlanması sonucunda literatüre uygun H₂ üretiminin gerçekleştirilebildiği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: Hidrojen, Karanlık Fermentasyon, *Lemna Minor*, Box-Wilson, Cennet hurması kabuğu

ABSTRACT

HYDROGEN GAS PRODUCTION FROM LEMNA MINOR BY FERMENTATION

MSc THESIS

İKBAL ÖREN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
ENVIRONMENTAL ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. HİDAYET ARGUN)

DENİZLİ, 2022

Within the scope of this thesis, research was carried out on the production of hydrogen gas from *Lemna minor* by dark fermentation (DF). In this context, two sets of Box-Wilson statistical experiment designs were established to determine the most convenient hydrogen production conditions. During the first set, effects of *Lemna minor* (LM) and glucose concentration (GLU) on hydrogen formation yield and rate were assessed, and then during the second set of experiments effects of LM and persimmon peel (PP) concentration on hydrogen formation yield and rate were surveyed. The independent variables and ranges for the LM-GLU set were GLU (X_1 : 0-60 g/L) and LM (X_2 : 0-40 g/L). For the LM-PP experimental set, where PP was replaced with GLU, PP and LM variable ranges were X_1^1 : 0-60 g/L and X_2 : 0-40 g/L, respectively. The highest hydrogen yield and rate for the LM-GLU set were 76,01 mLH₂/10 mL and 13,51 mLH₂/h, respectively. The results of the first set of experiments were a guide in the evaluation of the second set of experiments. The highest H₂ yield and rate values for the LM-PP experiments were 103,25 mLH₂/10 mL and 21,42 mLH₂/h, respectively. Within the context of this thesis, it was found that blending 123 g/L PP with 40 g/L LM resulted in comparable H₂ production with the literature.

KEYWORDS: Biohydrogen, Dark Fermentation, *Lemna Minor*, Box-Wilson, Persimmon shell

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Hidrojen.....	2
2.1.1 Literatürde Karanlık Fermentasyon ile Yapılmış Çalışmalar	10
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1 Substrat	16
3.2 Aşı	16
3.3 Fermentasyon Deneyleri.....	17
3.4 Analitik Metotlar	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	19
4.1 H ₂ Üretimi İçin Uygun Substrat Kompozisyonun Belirlenmesi	20
4.1.1 LM-GLİ karışımında hidrojen gazı ürteiminin BWİDT metodu ile optimizasyonu	20
4.1.2 LM-CH karışımında hidrojen gazı ürteiminin BWİDT metodu ile optimizasyonu	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
6. KAYNAKLAR.....	40
7. ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Biyohidrojen Üretim Yolları (Ghimire ve diğ., 2015).....	3
Şekil 2.2: Lignoselülozik bir yapıya ön işlemin etkilerini gösteren şematik görünüm (Sheng ve diğ., 2021).....	7
Şekil 2.3: Lignoselülozik biyokütlenin ön işlem şeması (D. Muley ve Boldor, 2017)	7
Şekil 4.1: Sabit glikoz konsantrasyonunda H ₂ veriminin <i>Lemna minor</i> konsantrasyonuyla değişimi.....	24
Şekil 4.2: Sabit <i>Lemna minor</i> konsantrasyonunda H ₂ veriminin glikoz konsantrasyonuyla değişimi	25
Şekil 4.3: Sabit glikoz konsantrasyonunda H ₂ üretim hızının <i>Lemna minor</i> konsantrasyonuyla değişimi	26
Şekil 4.4: Sabit <i>Lemna minor</i> konsantrasyonunda H ₂ üretim hızının glikoz konsantrasyonuyla değişimi	27
Şekil 4.5: Sabit cennet hurması kabuğu konsantrasyonunda H ₂ veriminin <i>Lemna minor</i> konsantrasyonuyla değişimi.....	31
Şekil 4.6: Sabit <i>Lemna minor</i> konsantrasyonunda H ₂ veriminin cennet hurması kabuğu konsantrasyonuyla değişimi	32
Şekil 4.7: Sabit cennet hurması kabuğu konsantrasyonunda H ₂ üretim hızının <i>Lemna minor</i> konsantrasyonuyla değişimi.....	33
Şekil 4.8: Sabit <i>Lemna minor</i> konsantrasyonunda H ₂ üretim hızının cennet hurması kabuğu konsantrasyonuyla değişimi.....	34

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Biyohidrojen Üretim Proseslerinin Karşılaştırılması.....	5
Tablo 2.2: Literatürde farklı substrat ve deney koşulları altında KF ile ilgili yapılan çalışmalar.....	14
Tablo 4.1: <i>Lemna minor</i> ve cennet hurması içeriği.....	20
Tablo 4.2: Box-Wilson deney tasarımı ve sonuçları (Glikoz- <i>Lemna minor</i>)....	22
Tablo 4.3: Box-Wilson amaç fonksiyonu sabitleri (Glikoz- <i>Lemna minor</i>).....	23
Tablo 4.4: Glikoz ve <i>Lemna minor</i> karışımı verifikasyon deney sonuçları.....	28
Tablo 4.5: Box-Wilson deney tasarımı ve sonuçları (Cennet hurması kabuğu- <i>Lemna minor</i>).....	29
Tablo 4.6: Box-Wilson amaç fonksiyonu sabitleri (Cennet hurması kabuğu- <i>Lemna minor</i>).....	30
Tablo 4.7: Glikoz ve <i>Lemna minor</i> karışımı verifikasyon deney sonuçları.....	35

SEMBOL LİSTESİ

DBR	: Doğal gazın buharla reformasyonu
HÜV	: Hidrojen Üretim Verimi
HÜH	: Hidrojen Üretim Hızı
BF	: Biyofotoliz
AF	: Aydınlık Fermentasyon
KF	: Karanlık Fermentasyon
BWİDT	: Box-Wilson İstatistiksel Deney Tasarımı
KH	: Kümülatif Hidrojen
LM	: <i>Lemna minor</i>
GLİ	: Glikoz
CH	: Cennet Hurması
SE	: Suyun Elektrolizi
ORP	: Oksidasyon Redüksiyon Potansiyeli

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren, kendimi geliştirebilmem için her türlü imkânı sunan, desteklerini hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen, pozitif tavırlarıyla ve güveniyle hep destekleyen, öğrencisi ve meslektaşı olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Hidayet ARGUN' a sonsuz teşekkür ederim.

Başta Pamukkale Üniversitesi Çevre Mühendisliği bölüm hocalarımdan Prof. Dr. Osman Nuri AĞDAĞ olmak üzere, lisans ve yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi, birikim ve desteklerini esirgemeyen tüm bölüm hocalarıma ve laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarından dolayı Arş. Gör. Ebru ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bir ekip arkadaşlığından çok daha fazlasını hissettiren, değerli Kimya Mühendisliği Bölümü Arş. Gör. Alime ŞENOCAK'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım sürecimde, pozitif ve negatif her olayda, her zaman beni destekleyen, aynı yolda yürümekten mutluluk duyduğum arkadaşlarım başta Dilara KAPLAN olmak üzere, Neriman BAYLAN ve Tugay GEÇGEL' e destekleri için çok teşekkür ederim.

Son olarak başaracağıma inanan ve beni hep destekleyen, kararlarıma saygı duyan, her zaman arkamda olduklarını hissettiren annem Selma ÖREN'e, babam Feyzullah ÖREN'e ve ablam Emel ÖREN'e sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Ülkemizin enerjide büyük oranda dışa bağımlı olması, yenilenebilir kaynaklarımızın enerji üretimi için değerlendirilmesini gündeme getirmiştir. Özellikle sera gazı emisyonlarına neden olmayan alternatiflerin bu amaç için değerlendirilmesi enerjide dışa bağımlılığın azaltılmasının yanı sıra çevre dostu yakıt üretimine de olanak sunmaktadır. Bu kapsamda bitkisel biyokütleden mikrobiyal hidrojen gazı (H₂) üretimi bu ihtiyaçların karşılanması yönünde potansiyel araştırma konusu olmaktadır. Yakıldığında su buharı dışında herhangi bir kirlenici emisyonu neden olmayan Hidrojen gazı (H₂) yüksek enerji içeriği nedeniyle geleceğin enerji taşıyıcısı olarak kabul edilmektedir. Hidrojen üretim ve kullanımı teknolojileri üzerine yoğun araştırmalar yapılmakta, bu gazın yakıt olarak kullanımının önümüzdeki yıllarda ciddi oranda artacağı düşünülmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Bu tezin amacı sucul ortamda yaygın olarak yetişebilen *Lemna minor* su mercimeğinin karanlık fermentasyon ile hidrojen gazı (H₂) üretimi araştırılmasıdır. Deniz ve tatlı su kaynaklarımızda doğal olarak dört mevsim yetişebilen su mercimeğinin hidrojen üretimi için değerlendirilmesi yenilenebilir temiz enerji üretimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca literatürde *Lemna minor* den fermentasyon ile hidrojen üretimi üzerine yapılan çalışma sayısı oldukça az sayıda olduğu için proje çıktılarıyla literatüre de önemli katkıların yapılması hedeflenmektedir.

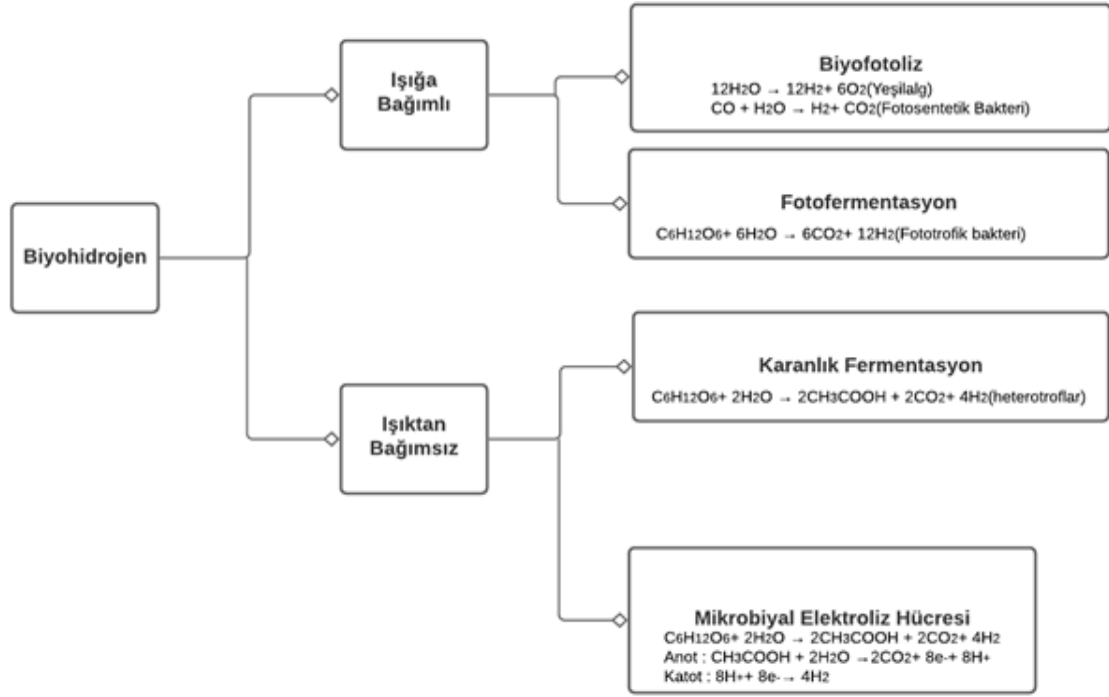
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hidrojen

Günümüzde iklim değişikliği ile mücadele sadece Türkiye'nin değil, tüm dünyanın en önemli gündem maddelerinin birisi haline gelmiştir. İklim değişikliği dünyada kuraklık ve yağış dengesizliği, buzulların erimesi, deniz su seviyesinde yükselme, tarımda verimsizlik, kıtlık, göç, biyoçeşitlilikte azalma, endemik türlerin yok olması ve salgın hastalıklarda artış gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır (Diaz 2006). İklim değişikliğinin en önemli nedeniyse, enerji üretiminde yoğun fosil yakıt kullanımı sonrası atmosferde biriken kirletici gaz emisyonlarının sera gazı etkisi ile küresel ısınma yapmasıdır (Jun Wang ve diğ., 2020). Bu nedenle fosil yakıtlara alternatif yerli temiz enerji yakıtlarının araştırılması önem kazanmıştır (Löffler ve diğ., 2022).

Hidrojen gazı (H_2) birim kütle başına yüksek enerji içeriği ve oksidasyonu sonrası su buharı haricinde kirletici oluşturmaması nedeniyle tüm dünyada geleceğin favori yakıtı olarak kabul edilmektedir (Xia ve diğ., 2015). Hidrojen doğada en yaygın element olmakla birlikte Hidrojenin gaz formu oldukça düşük seviyelerde atmosferde bulunmaktadır (Bardone ve diğ., 2014). Bu nedenle Hidrojen gazının uygun bir teknoloji ile üretilmesi gerekmektedir. Endüstriyel anlamda en yaygın üretim metodu doğal gazın buharla reformasyonu (DBR) olup, suyun elektrolizi (SE) ile de H_2 üretimi yapılmaktadır (Manish ve Banerjee 2008). DBR'de doğal gaz ve yüksek enerji gereksinimi, SE'de yüksek elektrik sarfiyatı ve elektrot korozyonu bu teknolojilerin en önemli problemlerini oluşturmaktadır (Holladay ve diğ., 2009). Alternatif olarak H_2 'in karbonhidrat, organik asitler gibi bileşikler ile sudan mikrobiyolojik olarak da üretilmesi mümkündür (Sharma ve Arya 2017). Ancak mikrobiyal yöntemlerin mevcut endüstriyel üretilere göre üretim kapasitesi henüz düşük seviyelerdedir (Singh ve Wahid 2015). Biyobozunur madde içerikli atık ve atıksuların mikrobiyal yöntemlerle H_2 üretimi için ham madde olarak kullanılabilirliği ve ılımlı işletme koşulları bu yöntemi cazip hale getirmektedir (Das ve Veziroğlu 2001).

Fermentasyon ile H₂'nin oluşturulmasında mikroorganizmalar bu işlemi hidrogenaz ve nitrogenaz enzimleri yardımıyla gerçekleştirir (Kapdan ve Kargi 2006). Literatür incelendiğinde biyohidrojen üretimi karanlık (KF) ve aydınlık fermentasyon (AF) ile suyun fotolizi ile yapılabilmektedir (Prabakar ve diğ., 2018). Biyohidrojen üretim yolları Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1: Biyohidrojen Üretim Yolları (Ghimire ve diğ., 2015)

Aslında hücrenin H₂ oluşturması, ona zarar veren fazla protonlardan kurtulabilmek için geliştirdiği bir stratejidir (Valdez-Vazquez ve Poggi-Varaldo 2009). KF ile H₂ üretebilen mikroorganizmaların çoğu *Clostridium* türlerine mensup zorunlu anaerobiktir (Jianlong Wang ve Yin, 2019). Bunların çoğu karbonhidratları H₂, CO₂ ve uçucu yağ asitlerine çevirirler (Kothari ve diğ., 2017). KF ile H₂ oluşumundaysa hidrogenaz enzimleri rol oynar. Mezofilik ve termofilik şartlarda H₂ üretimi mümkündür (Gupta ve diğ., 2015). Özellikle karbonhidrat içeren atıkların KF ile H₂ üretimi için değerlendirilebilmesi bu yöntemi avantajlı kılmaktadır.

KF ürünü olan uçucu yağ asitlerinden H₂ üretimi ışık enerjisi varlığında fotoheterotrofik bakteriler yardımıyla gerçekleştirilebilmektedir (Jianlong Wang ve Yin, 2019). Özellikle *Rhodobacter* türü mor-kükürtsüz bakteriler anoksik şartlarda nitrojenaz enzimleri yardımıyla bu dönüşümü yapabilmektedir (Basak ve diğ., 2014). Glikozun substrat olarak kullanıldığını KF'da sıvı ortamda son ürünün asetik asit olması durumunda teorik olarak mol glikoz başına 4 mol H₂ üretilebilir. Diğer taraftan bu asetik asitin AF'a substrat olarak beslenmesiyle 8 mol daha H₂ elde edilebilir. Toplamda 1 mol glikozdan 12 mol H₂ elde edilebilme kapasitesi mevcuttur (Argun ve Kargi, 2011). Ancak mikrobiyal kısıtlamalar nedeniyle pratikte bu verimlerin çok altında rakamlar elde edilmektedir. Suyun doğrudan ışık varlığında gerçekleştirebilen fotosentetik organizmalar mevcuttur ancak H₂ ile açığa çıkan O₂ gazı hidrogenaz enzimlerini baskılamakta ve prosesin yavaşlamasına neden olmaktadır (Márquez-Reyes ve diğ., 2015).

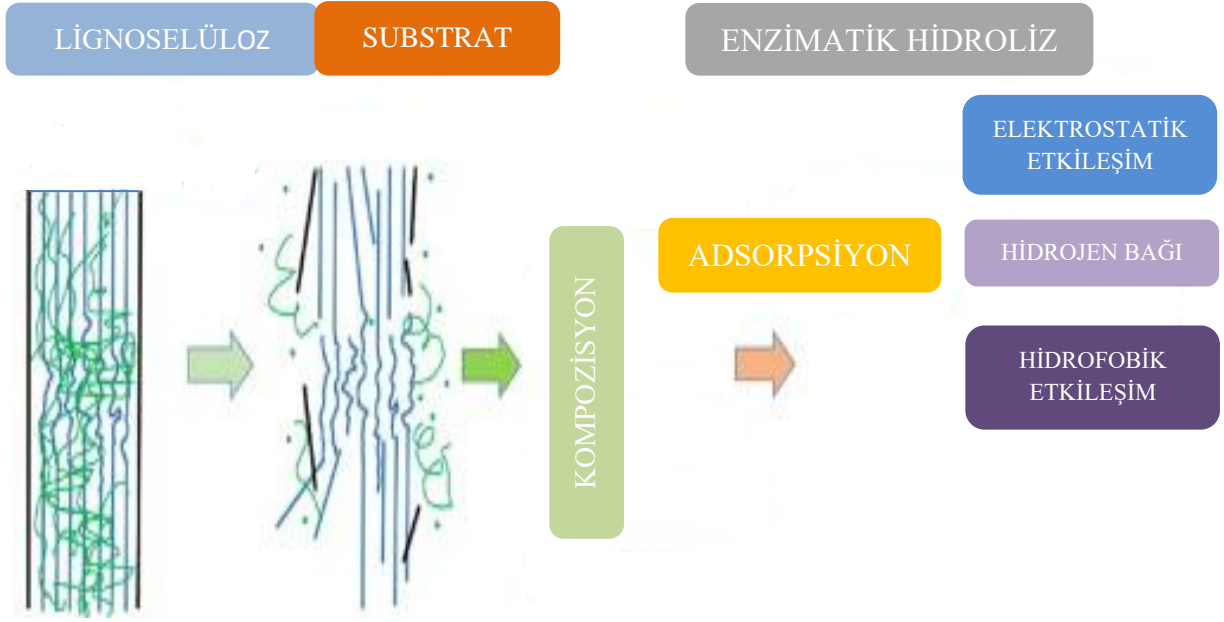
Tablo 2.1: Biyohidrojen Üretim Proseslerinin Karşılaştırılması (Genç, 2009; Kothari ve diğ., 2012' den geliştirilmiştir).

Biyo-Hidrojen Üretim Yöntemleri ve Proses Reaksiyonları	Mikroorganizma	Avantajları	Dezavantajları	Hidrojen üretim hızı (mmol H₂/Lsaat)
Doğrudan Biyofotoliz $2 \text{H}_2\text{O} + \text{ışık} \rightarrow 2 \text{H}_2 + \text{O}_2$	Yeşil alg	Su ve güneş ışığını kullanarak direkt H ₂ üretebilir.	Oldukça yoğun ışık kaynağı gerektirir. O ₂ sistem için zararlıdır. Yavaş ve fotokimyasal verim düşüktür.	0,07
Dolaylı Biyofotoliz $6 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{CO}_2 + \text{ışık} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{CO}_2$ $2 \text{CH}_3\text{COOH} + 4 \text{H}_2\text{O} + \text{ışık} \rightarrow 8 \text{H}_2 + 4 \text{CO}_2$ Toplam reaksiyon: $12 \text{H}_2\text{O} + \text{ışık} \rightarrow 12 \text{H}_2 + 6 \text{O}_2$	Siyanobakteriler	Cyanobacter H ₂ 'ni sudan üretebilir ve N ₂ miktarını düzenleyebilir.	Hidrojenaz enzimi H ₂ 'nin bozunmasını engellediği için giderimi sağlanmalıdır. Gaz karışımı %30 O ₂ içerir.	0,355
Fotofermentasyon $\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{ışık} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2$	Fotoheteretrofik Bakteriler	Geniş spektrumdaki ışık enerjisi kullanılabilir. Kullanılabilir organik madde çeşitliliği oldukça fazladır.	Oksijen bulunduğu ortamda nitrojena ihibisyon etki yapar. Işık dönüşüm verimliliği oldukça düşüktür (%1-5).	0,16
Karanlık Fermentasyon $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2$	Fermentatif Bakteriler	Işık kaynağı olmadan tüm gün H ₂ üretebilir. Karbon kaynağı olarak kullanılacak olan substrat çok çeşitli olabilir.	Fermentör çıkışının iletir arıtmaya ihtiyacı vardır. O ₂ hidrojenaz için kuvvetli bir inhibitördür. Fermentasyon sonucunda üretilen CO ₂ 'nin gaz karışımından uzaklaştırılması gerekmektedir.	8,2-121

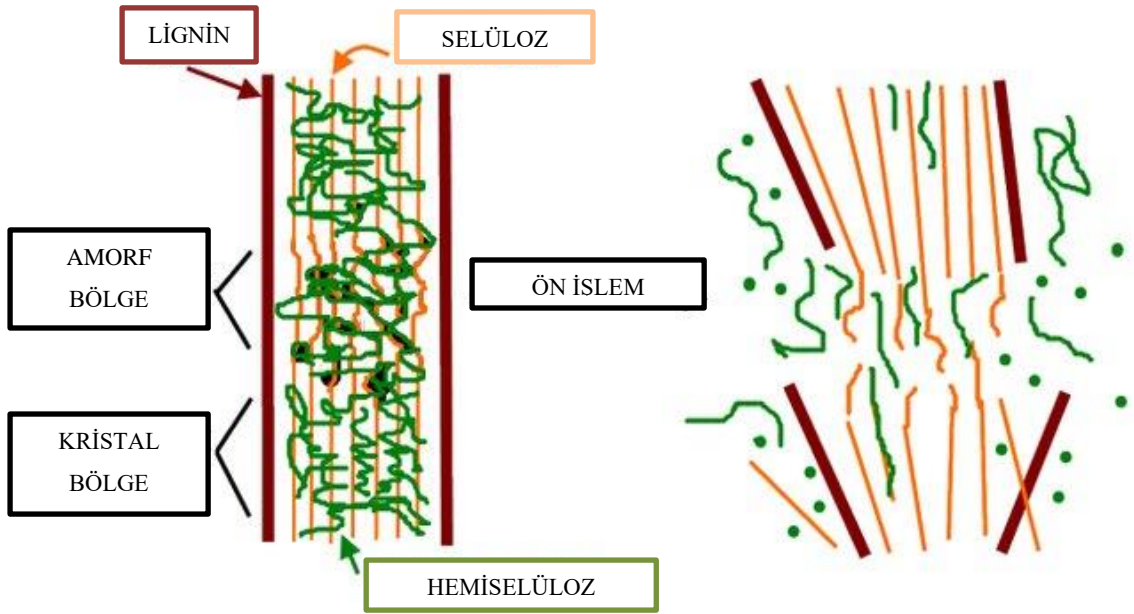
Biyo-H₂ üretimi için kullanılacak olan substratın kolay temin edilebilir, ekonomik ve yeterli miktarda bulunması gerekir (Sekoai ve diğ., 2017). Bitkisel biyokütlenin bu amaçla değerlendirilmesi büyük bir potansiyel sunmaktadır (Holladay ve diğ., 2009). Literatürde fermentasyon için substrat olarak değerlendirilecek bitkisel biyokütleler birinci, ikinci ve üçüncü nesil bitki biyokütlesi ana grupları altında sınıflandırılmaktadır (Argun ve diğ., 2016). Birinci nesil biyokütle nişasta gibi gıda potansiyeli olan tarımsal ürünleri kapsamaktadır. Buğday, arpa, mısır, şeker pancarı vb. biyokütleler bu gruptaki ürünlere örnek olarak verilebilir.

Birinci nesil biyokütleden verimli bir şekilde biyo-H₂ üretim potansiyeli olmakla birlikte, bu ürünlerin insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yeri olması nedeniyle fermentasyonda H₂ üretimi için kullanılması veya ekilebilir tarımsal alanların gıda üretimi yerine bu amaçla değerlendirilmesini uygun görülmemektedir. Bununun yerine fermentasyonda ikinci nesil olarak adlandırılan lignoselüloz içerikli tarımsal ve bitkisel atıkların, karbonhidrat içeren evsel ve endüstriyel atık ve atıksuların substrat olarak değerlendirilmesi daha uygun görülmektedir (Urbaniec ve Bakker 2015).

Lignoselülozik bitkisel biyokütle yapısı temel olarak lignin, selüloz ve hemiselülozdan oluşur (Pérez ve diğ., 2002). Bunların oransal dağılımı bitkiden bitkiye değişkenlik gösterir. İkinci nesil biyokütlenin fermentasyonda değerlendirilmek istenmesi durumunda lignin ve hemiselüloz bileşenlerinin uzaklaştırılması ve geriye kalan selülozun uygun bir hidroliz işlemiyle monomerlerine dönüştürülmesi gerekir (Bakker 2010). Lignin koni feril alkol ve farklı fonksiyonel gruplar taşıyan kompleks bir polimer olup (Abejón ve diğ., 2018) fermentasyonda H₂ üretimi için kullanılamaz. Lignin gideriminden daha ziyade biyokütle, alkali ön işleme tabi tutulur (Argun ve Onaran 2015).



Şekil 2.2: Lignoselülozik bir yapıya ön işlemin etkilerini gösteren şematik görünüm (Sheng ve diğ., 2021)



Şekil 2.3: Lignoselülozik biyokütlenin ön işlem şeması (D. Muley ve Boldor 2017)

Yüksek pH seviyelerinde biyokütleden lignin ve hemiselülozun belli dönüşüm verimi altında uzaklaştırılması mümkündür. Diğer taraftan hemiselüloz, ksiloz şekerinden oluşan bir polisakkarit olup, fermentasyonda glikoz gibi verimli metabolize edilemez bu nedenle fermentasyon öncesinde uzaklaştırılması tercih edilir (Balan 2014).

Lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılması sonrası geriye kalan selüloz, glikoz moleküllerinden oluşan düz zincir polimerdir ve genellikle doğrudan mikrobiyal olarak ayrıştırılması güçtür (Carere ve diğ., 2008). Selülozun glikoza dönüştürülmesi için asit ve enzimatik hidroliz kullanılabilir (Taherzadeh ve Karimi 2007). Asit hidrolizinde genellikle biyokütle, kuvvetli asit çözeltisiyle yüksek sıcaklıkta muamele edilir ve elde edilen glikoz şurubu nötralize edildikten ve nütrient açısından zenginleştirildikten sonra fermantöre beslenebilir. Selülozun enzimatik hidrolizi de mümkündür ancak bu işlem yavaş gerçekleşmekte ve asit hidrolizine göre daha pahalı olmaktadır. Ön işlemler fermentasyon öncesinde proses sayısını arttırmakta, daha yoğun proses kontrol, bakım ve enerji gereksinimlerine neden olmaktadır (Argun ve diğ., 2016).

Üçüncü nesil biyokütle grubundaysa alg ve yosunlar gibi sucul canlılar yer alır (Ortigueira ve diğ., 2015). Algler, fotosentez ile bünyelerinde karbonhidrat depolamaları nedeniyle fermentasyon için potansiyel bir substrat olma özelliği göstermektedir (Sharma ve Arya 2017). Algler ökaryotik hücreler olmakla birlikte siyanobakteri olarak isimlendirilen prokaryotik mavi-yeşil algler de mevcuttur (Sharma ve Arya 2017). Bu canlıların tatlı ve tuzlu su kütleleriyle birçok atıksuda üreyebilmeleri yetiştirilmeleri için toprak gereksinimini ortadan kaldırmaktadır. Diğer taraftan yapılarında ikinci nesil biyokütlerdeki gibi lignoselülozik moleküller olmadığı için fermentasyon öncesinde ön arıtım gereksinimi bulunmamaktadır (Yin ve diğ., 2021). Dolayısıyla ön arıtma ile ortaya çıkabilecek fazladan proses basamağı, enerji gereksinimi, toksik madde giderimi ve nötralizasyon ihtiyacı ortadan kalkmaktadır.

Lemna minor; ördek otu veya su mercimeği olarak bilinen bu sucul bitki fermentasyon ile hidrojen üretiminde kullanılacak potansiyel üçüncü nesil bir biyokütledir (Mu ve diğ., 2020). *Lemna minor* hızlı büyümesi ve hasat işleminin kolay olmasının yanı sıra yüksek nişasta depolama kapasitesi ve düşük lignin içeriğine sahiptir, bu sayede biyohidrojen üretimi öncesinde yoğun bir ön arıtım gerektirmez (Yu ve diğ., 2014).

Lemna minor içerisinde bulunan doku olarak adlandırılan Turion, *Lemna minor* için uygun olmayan hava şartlarında suyun derinliklerinde kalarak ortam sıcaklıkları düzeline kadar bekler ve daha sonra su yüzeyine çıkar ve yeni su mercimekleri oluşur (Xu ve diğ., 2018). Toprak gereksinimi olmadan atık sular dahil birçok su kütlelerinde

büyüme yeteneği, nişasta depolayabilmesi ve kolay bulunabilirliği su mercimeğinin substrat olarak tercih edilmesini ön plana çıkartmaktadır (Kaur ve diğ., 2019).

J. Xu ve Deshusses (2015) yaptıkları çalışmada su mercimeğinden biyohidrojen üretim sürecinde farklı ön işlem ve fermentasyon koşullarını incelemiştir. Asidik (%1 H₂SO₄-85°C -60 dk), alkali (%1 NaOH- 85°C -60 dk) ve termal (120°C - 60 dk) hidroliz uygulanmıştır. Asit hidrolizi, alkali ve termal hidrolizlere göre daha verimli hidrojen üretimiyle sonuçlanmıştır. Asit ön işleminden sonra pH ayarlaması sırasında ortamın yüksek miktarda sodyuma maruz kalması sebebiyle hidrojen üretimine limitleyici etki yaratmıştır. 35°C sıcaklık ve pH 5,5 'da yapılan kesikli deneyler sonucunda hidrojen üretimi verimi 75,3 mL/g kuru biyokütle elde edilmiştir (J. Xu ve Deshusses 2015).

Zhang ve diğ., (2021) su mercimeği ve mısır samanını harmanlayarak AF ile hidrojen üretimi gerçekleştirmiştir. Fermentasyon deneyleri beş farklı C/N (11-13,2-19,9-36,5-59) oranları denenerek, 30°C 'de pH:7 de kesikli olarak gerçekleşmiştir. Çalışma sonunda C/N oranı 13,2 olan karışım ile en yüksek hidrojen verimi 78,27 mL/g TS elde edilmiştir. Çalışma sonucunda sadece mısır samanı kullanarak yapılan deneylerle kıyaslama yapıldığında su mercimeği ile harmanlayarak yapılan çalışmadaki verim %66,7 daha yüksek çıkmıştır (Zhang ve diğ., 2021).

Cennet hurması (*Diospyros kaki*) *Ebenaceae* familyasına ait olup Çin, Japonya, İspanya ve Brezilya gibi ülkelerde yaygın olarak yetişmekte olan bir meyvedir. Nişasta içeriği zengin olup azot ve fosfor içeriği ise fakirdir (Salomón ve diğ, 2022). Cennet hurmasının yapısı ve içeriğinde bulunan yüksek vitamin, mineraller ve şekerler açısından zengin olup biyohidrojen üretiminde kullanımı potansiyel bir biyokütledir.

Bu çalışmada, su mercimeğinden KF ile H₂ üretiminin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada su mercimeği azot içeriğinin yüksek olması nedeniyle glikoz ve cennet hurması kabukları ile harmanlanarak H₂ üretim şartlarının arttırılmasına yönelik deneyler yapılmıştır. Bu amaçla, en uygun glikoz/su mercimeği ve cennet hurması/su mercimeği harmanlama oranları Box-Wilson istatistiksel deney tasarımı metodu kullanılarak iki farklı set deneysel çalışma yapılmıştır.

2.1.1 Literatürde Karanlık Fermentasyon ile Yapılmış Çalışmalar

Literatürde yer alan karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretimi için yapılan çalışmalarından bazıları özetlenmiştir. Çeşitli substratlar, farklı işletme koşulları altında değerlendirilmiş olup, hidrojen üretim hızları ve verimleri yapılan deneysel çalışmalara göre farklılık göstermektedir.

G. Yang ve Wang (2019) yaptıkları çalışmada arıtma çamuru ve ot atıkları ile ko-fermentasyon yöntemi kullanarak, H₂ üretimi için optimum substrat konsantrasyonunu belirlemeyi hedeflemiştir. Substrat olarak kullanılan arıtma çamuru, H₂ üretimini engelleyen organizmaların ortamdaki uzaklaştırılması için 15 dk 100°C ısıyla işleme tabi tutulmuştur. Ot atıkları ise 60°C’de kurutulup 1 mm boyutunda olacak şekilde öğütülmüştür, substrat olarak arıtma çamuru ve ot atıkları karışımı kullanılmıştır. Arıtma çamuru ve ot atıkları konsantrasyonları 5-80 g/L, aşı oranları ise 0,8:1-12,8:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. En yüksek hidrojen verimi, 10 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda (46,5 mL/gVS) elde edilmiş olup, 5-10g/L ya da 10-80g/L başlangıç konsantrasyonlarında hidrojen üretim veriminin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Başlangıç substrat konsantrasyonunun azalmasıyla yetersiz karbon kaynağının organizmaların aktivitelerini olumsuz etkilediğini, artmasıyla ise ortamda organik asitlerin birikmesinden dolayı, H₂ üretiminde sınırlayıcı etkiye sebep olduğu belirlenmiştir (G. Yang ve Wang, 2019)

Argun ve Dao (2016) yaptıkları çalışmada, şeftali posasından hidrojen üretiminde C/N, C/P, C/Fe ve C/Ni oranlarının hidrojen üretim verimi ve hızına olan etkilerini incelemek üzere Box-Behken istatistiksel deney tasarımı kullanmıştır. Deneysel çalışmada ortama aşı ilavesi yapılmadan şeftali posası içerisindeki mikroorganizmalar kullanılmıştır. Hidrojen üretim verimini arttırmak için fermentasyon çıkış suyunda elektroliz denemesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda optimum C/N/P/Fe/Ni oranı 100/2,09/3,89/0,047/0,043 olarak bulunmuştur, hidrojen üretim verimi ve hızı sırasıyla 460,93 mLH₂/gKOİ ve 2,44 mL-H₂/saat olarak belirlenmiştir. Elektroliz ile 310 saatlik sürede 30,09 mLH₂/mL reaktör hidrojen değerine ulaşılmıştır(Argun ve Dao, 2016).

Argun ve Onaran (2016) atık kağıt havludan KF ile biyohidrojen üretimini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada, hidrojen üretimi esnasında ortaya çıkan

uçucu yağ asitleri nedeniyle oluşan, ani pH düşüşlerinin önüne geçebilmek için, fermentasyon ortamına doğru akım sağlamışlardır. Deneyler kesikli olarak işletildi ve fermentasyon ortamının asidik değerinin nötr seviyede kalması sağlanmıştır. Farklı akım değerlerinin (0,25-3 V) farklı substrat konsantrasyonlarının (4,8- 41,2 g/L) ve farklı elektrot uzaklıkları (0,3-3 cm) hidrojen üretim verimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. En yüksek hidrojen verimi, 1V gerilim, 20 g glikoz/L ve 0,5 cm elektrot uzaklığında elde edilmiştir (Argun ve Onaran, 2016).

Silva ve diğ., (2017) yemek atıkları ve gliserolün (%1-5 v/v) karanlık ko-fermentasyonu ile biyohidrojen üretimini gerçekleştirmiştir. Farklı gliserol (%1, %3 ve %5) konsantrasyonlarının hidrojen üretim verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Karanlık fermentasyon işlemi 250 mL'lik şişelerde 120 mL çalışma hacminde, %1 (v/v) oranında aşı (arıtma çamuru) ve substrat ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 36 saat boyunca, 150 rpm karıştırma ve pH:5,5 işletme koşullarında gerçekleştirilmiştir. En yüksek H₂ verimleri, %3 (175 mL/gVS) ve %5 (180 mL/gVS) gliserolde elde edilmiştir. Deney sonucunda %1 (140 mL/gVS) ve %3 (175 mL/gVS) gliserol konsantrasyonları arasında önemli bir artış gözlemlenirken, %5 (180 mL/gVS) gliserol ilavesinde H₂ veriminde gözle görünür bir artış gözlemlenmemiştir. Ortamda bulunan gliserol mikroorganizmaların lag fazı sürelerini azaltırken, miktarının artmasıyla VFA oluşumunda da artış gözlemlenmiştir (Silva ve diğ., 2017).

Mıynat ve Argun (2020) yaptıkları çalışmada karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretimi sırasında uçucu yağ asitlerinin hızlı oluşmasından dolayı ani pH düşüşlerini önlemek için, seyreltme metodunu araştırmışlardır. Çalışmada, hidrojen üretim verimi üzerine, seyrelme hızının, seyrelme yüzdesinin ve başlangıç KOİ derişiminin etkisini incelemişlerdir. Başlangıç konsantrasyonu 85 gKOİ/L olup fermentasyon ortamının %130 oranda seyrelmesi sonucunda, en yüksek hidrojen üretim verimi, 7,7 mLH₂/mL reaktör; en yüksek hidrojen üretim hızı ise 9,38 mmol/Lreaktör.sa olarak belirlenmiştir (Mıynat ve Argun, 2020).

Eker ve Sarp (2017) atık kağıtları kullandıkları çalışmada çeşitli substrat ve hücre konsantrasyonlarının hidrojen üretim verimi üzerine etkilerini araştırmıştır. Deneysel çalışmadan önce atık kağıt sülfürik asit kullanılarak 121°C'de 90 dakika boyunca bir otoklav kullanılarak asit hidrolizine tabi tutulmuştur. Glikoz konsantrasyonunun hidrojen üretim verimi üzerine etkilerini araştırabilmek için 6 farklı

(3,84-45,5 g/L) başlangıç konsantrasyonu ile deneyler gerçekleştirmiştir. En yüksek kümülatif hidrojen üretim verimi, 18,9 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda elde edilmiş, bu değer üzerinde glikoz konsantrasyonlarında ise ürün inhibisyonuna neden olduğu için düşüş gözlenmiştir. İkinci aşamada ise glikoz konsantrasyonu sabit tutularak (18,9 g/L) biyokütle konsantrasyonu 0,25- 2 g/L arasında değiştirilmiştir. En yüksek kümülatif hidrojen üretim verimi; 0,5 g/L biyokütle değerinde elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda biyohidrojen üretiminin, başlangıç glikoz konsantrasyonun artmasıyla, uçucu yağ asitlerinin inhibisyonu nedeniyle ve HMF oluşumu nedeniyle düştüğü belirlenmiştir (Eker ve Sarp, 2017).

Argun ve Dao (2017) yaptıkları çalışmada atık şeftali posasından hidrojen üretimi esnasında aşı ilavesinin etkisini araştırmıştır. Deneysel çalışmada 200 g/L sabit atık şeftali posası başlangıç konsantrasyonunda, aşı ilavesi %0 ile %10 (v/v) arasında değiştirilmiştir. En yüksek hidrojen üretim verimi 123,27 mL.H₂/gTOC, %5 aşı ilavesinde elde edilmiştir. Hidrojen üretiminin aşı eklenmesiyle önemli oranda arttığını ancak %5 değerinden fazla aşı eklenmesiyle azaldığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda düşük biyokütle miktarı, hidrojen oluşumunu sınırlarken, yüksek biyokütle miktarı ise uçucu yağ asitlerinin hızlar artmasına ve bu durumun pH değerinin ani şekilde düşüşüne yol açmasıyla hidrojen üretiminin azalmasına neden olmuştur (Argun ve Dao 2017).

Tablo 2.2’de çeşitli substratlar, farklı işletme koşulları altında değerlendirilmiş olup, hidrojen üretim hızları ve verimleri özetlenmiştir.

Tabloda görüldüğü gibi organik içeriği yüksek substrat kullanılmasına rağmen, eklenen kültür türü, uygulanan ön işlemin (ısı, asit, alkali, enzim) türü, başlangıç konsantrasyonu, sıcaklık, pH, işletme koşullarına göre hidrojen üretim verimi ve hızı değişkenlik göstermektedir. Hidrojen üretim verimleri 0,8-5,5 mol H₂/molglikoz arasında, hidrojen üretim verimleri ise 3,75-117,45 mL H₂/L.saat aralıklarında değişmiştir. Bunlara ek olarak C/N/P gibi nutrient oranları, substrat içerisindeki vitamin ve mineraller de hidrojen üretimini etkileyen faktörlerdendir.

Tablo 2.2: Literatürde farklı substrat ve deney koşulları altında KF ile ilgili yapılan çalışmalar.

Aşı Kültürü	Substrat ve Başlangıç Konsantrasyonu	Ön Arıtma	İşletme Modu	KF Deney Koşulları	Hidrojen Üretim Verimi	Hidrojen Üretim Hızı	Referanslar
Anaerobik Çamur	Galaktoz 15 g/L	-	Sürekli	pH:5,5 Sıcaklık:37 °C HRT:2 gün	2,60 mol/mol hexose	65,5 L/L/gün	(Sivagurunathan ve diğ., 2017)
<i>Enterobacter sp.</i>	Bira fabrikası atık suyu 2 KOİ g/L	Isıl (15 dk 90 °C)	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:37 °C	0,8 mol H ₂ /mol glikoz	1,37 mmol H ₂ / L. saat	(Maintinguer ve diğ., 2017)
<i>Karışık Kültür</i>	Pirinç Samanı 40 RS g/L	Asit (Seyreltik HCl 121 °C) Enzim (%1 h/h Selülaz)	Kesikli	pH:5,5 Sıcaklık:37 °C	761 mL/L	1,35 mL/saat	(Sen ve diğ., 2016)
Anaerobik Çamur	Palmiye Meyvesi 10 g glikoz /L	Asit (Seyreltik HCl 121 °C 30-60-90 dk)	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:37 °C	1,11 mol H ₂ /mol Toplam	2090 mL H ₂ /L.gün	(Gonzales ve diğ., 2016)

Tablo 2.2: Literatürde farklı substrat ve deney koşulları altında KF ile ilgili yapılan çalışmalar (devam)

Aşı Kültürü	Substrat ve Başlangıç Konsantrasyonu	Ön Arıtma	İşletme Modu	KF Deney Koşulları	Hidrojen Üretim Verimi	Hidrojen Üretim Hızı	Referanslar
Anaerobik Çamur	Çam Ağacı Ahşabı 10 g glikoz /L	Asit (Seyreltik HCl 121 °C 30-60-90 dk)	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:37 °C	1,36 mol H ₂ /mol Toplam Şeker	2533 mL H ₂ /L.gün	(Gonzales ve diğ., 2016)
<i>Clostridium Beijerincki</i> B21	Algsel biyokütle 15 g galaktoz/L	Isıl (80 °C 30 dk) Asit (pH:3 12 saat)	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:35 °C	2,02 mol H ₂ /mol galaktoz	117,45 mL H ₂ /L.saatt	(Fonseca ve diğ., 2016)
Anaerobik Çamur	Alg Kültürü 12 g /55 mL	-	Kesikli	pH:5,5 Sıcaklık:37 °C	9 mL H ₂	90 mL/L gün	(Kumar ve diğ., 2016)
Anaerobik Çamur	Yulaf 4,7 g RŞ/L	Asit (Seyreltik HCl 121 °C) Enzim (Celluclast 1,5 L) Alkali (NaOH/H ₂ O ₂)	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:35 °C	2,39 mol H ₂ /mol indirgenmiş şeker	110 mL H ₂ /L.saatt	(Arreola-Vargas ve diğ., 2015)

Tablo 2.2: Literatürde farklı substrat ve deney koşulları altında KF ile ilgili yapılan çalışmalar (devam)

Aşı Kültürü	Substrat ve Başlangıç Konsantrasyonu	Ön Arıtma	İşletme Modu	KF Deney Koşulları	Hidrojen Üretim Verimi	Hidrojen Üretim Hızı	Referanslar
Anaerobik Çamur	Mısır Sapı Hidrolizati 5 g Şeker /L	-	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:55 °C	7,74 mmol- H ₂ /g Şeker	43,3 mL /saat	(J. nissi ve diğ., 2015)
Karışık Kültür	Kozalak ağaç hamuru 4,5 g TŞ/L	-	Kesikli	pH:7 Sıcaklık:37 °C	2,26 mol H ₂ /mol TŞ	-	(Nissilä ve diğ., 2012)
Anaerobik Çamur	Öğütülmüş Buğday Atığı (hidrolizat) 16,7 g TŞ /L	Isıl (1,5 saat)	Sürekli	pH:7 Sıcaklık:55 °C HRT:6 saat	2,7 mol H ₂ /mol toplam şeker	652 mL H ₂ /L. gün	(Ozmihci and Kargi, 2011)
<i>Clostridium butyricum</i>	Şeker Kamışı 20 g KOİ/L	Asit (H ₂ SO ₄ , %0,25-7 h/h)	Sürekli	pH:5,5 Sıcaklık:37 °C	1,73 mol H ₂ /mol TŞ	1611 mL H ₂ /L. gün	(Pattra ve diğ., 2008)

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Substrat

Bu çalışmada kullanılan *Lemna minor* (LM) Didim evsel atık su arıtma tesisinden temin edilmiştir. Atık su üzerinde kendiliğinden gelişen su mercimeği kevgir ile dikkatlice toplandıktan sonra laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen su mercimekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan su mercimekleri değirmenden geçirilerek boyutu 1 mm'nin altına düşürülmüştür. Bu şekilde elde edilen toz su mercimeği cam kavanozlarda 4°C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Cennet hurması (CH) kabuklarının eldesi için ilgili meyveler Denizli semt pazarından alınmıştır. Laboratuvarında soyulan cennet hurması kabukları 30°C' de iki gün kurutulduktan sonra bıçaklı öğütücüden geçirilmiş ve hazırlanan kabuklar -18°C 'de buzlukta saklanmıştır.

3.2 Aşı

Deneylerde kullanılan aşı Pamukkale Üniversitesi yakınında bulunan doğal bir kompost yığınının alınmıştır. Metanojen aktivitenin durması için alınan kompost 90°C'de 30 dakika süreyle ısıtılarak tabii tutulmuştur. Daha sonra kompost 20 g TŞ/L içeren melaz çözeltisinde 37°C' de, nötral pH'ta 16 saat süre ile büyütülmüştür. Besi ortamına ayrıca 100 mg/L L-cysteine.HCl ve 20 mM FeSO₄.7 H₂O ilave edilmiştir. Ayrıca KOİ/P oranı KH₂PO₄ ilavesiyle 200 (w/w)'ye ayarlanmıştır. Sıvı üst boşluğundan 3 dakika süreyle argon gazı geçirilerek oksijen uzaklaştırılmıştır. Büyütme sonrasında boşluk hacminde %41 oranında H₂ ölçülmüştür. Büyütülen bu aşı deney ortamına %5 (v/v) oranında ilave edilmiştir.

3.3 Fermentasyon Deneyleri

LM-GLİ ve LM-CH deneylerinin koşulları Box-Wilson istatistiksel deney tasarımı (Box-Wilson) kullanılarak belirlenmiştir. LM-GLİ deney seti için bağımsız değişkenler ve aralıkları: Glikoz konsantrasyonu (X_1 : 0-60 g/L) ve LM konsantrasyonu (X_2 : 0-40 g/L). LM-CH deney setinde LM bağımsız değişkeni ve aralığı aynı tutulurken (X_2 : 0-40 g/L) glikoz yerine cennet hurması kabuğu (X_1 : 0-60 g/L) değişken olarak kullanılmıştır.

Bütün deneyler 310 mL'lik serum şişelerinde 37 °C'te inkübatörde 100 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Deney ortamında pH gözlemi yapabilmek için dışarıdan iki damla bromtimol mavisi indikatörü damlatılırken olası herhangi bir metanojen aktivitenin önlenmesi adına 10 mg/L kloroform ilave edilmiştir. Anaerobik ortam şartlarının sağlanabilmesi adına tüm şişelere 100 mg/L L.cysteine-HCl ilavesi yapıp, sıvı üstündeki hava boşluğu aşılama sonrasında argon gazı ile süpürülmüştür. Bir set Box-Wilson deneyi dört aksiyal, dört faktöryel ve bir orta nokta olmak üzere en az dokuz deney noktasından oluşur. Deneylerin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla orta nokta üç defa tekrar edilmiştir. Box-Wilson deney tasarımında bağımsız değişkenler ve amaç fonksiyonu ilişkisinin irdelendiği fonksiyon eşitlik 1'de verilmiştir.

Bu eşitlikte Y amaç fonksiyonunu (Y_1 : H_2 üretim verimi (mL H_2 /10 mL) Y_2 : H_2 üretim hızı (mL H_2 /saat)) X bağımsız değişkenlerini ifade etmektedir. b harfleri de sabitleri tanımlamaktadır (b_0 : offset, b_1 ve b_2 : lineer, b_{12} : etkileşim ve b_{11} ile b_{22} : kuadratik sabitler).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (3.1)$$

Eşit.1'de ait sabitler SPSS (deneme sürümü) yazılımında hesaplatılmıştır.

3.4 Analitik Metotlar

Fermentasyon performansının takip edilmesi amacıyla şişelerden düzenli aralıklarda örnekler alınmıştır. Lignin, selüloz ve hemiselüloz analizleri van Soest ve Lewis (1991) metoduna göre Ege Üniversitesi Zootekni Bölümü Laboratuvarına yaptırılmıştır (Van Soest ve diğ., 1991). TOC analizi (SS-EN 13137, 2001) Terralab TOC analizöründe, toplam Kjeldahl azotu (TKN) ISO 11261 standardına (“ISO 11261,1995 , toplam fosfor analizi ise ISO 14672 standardına göre (ISO 14672, 2005) yapılmıştır. Toplam şeker konsantrasyonu fenol-sülfirik asit metoduna göre yapılmıştır (Dubois ve diğ., 1956).Gaz içerik analizleri Agilent marka gaz kromatografi cihazında gerçekleştirilmiştir (Argun ve Onaran, 2017). Toplam gaz ölçümü sıvı yer değiştirme metoduna göre yapılmıştır (Logan ve diğ., 2002).

Bu çalışmadaki H₂ verimi 10 mL sıvı fermentasyon hacmi başına üretilen H₂ hacmini (mL H₂/10 mL) ifade etmektedir. Diğer taraftan H₂ üretim hızı, birim zamanda üretilen H₂ hacmini (mL H₂/saat) tanımlamaktadır ve Gompertz eşitliği (Lee ve diğ., 2008) (Eş. 2) kullanılarak belirlenmiştir.

$$H(t) = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) \right] + 1 \right\} \quad (3.2)$$

Gompertz eşitliğinde H(t)= H₂ hacmini (mL) P= Hidrojen üretim potansiyelini (mL) R_m= Hidrojen üretim hızını (mL H₂/saat) λ=lag faz periyodunu (saat) t= Fermentasyon süresini (saat) ifade etmektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

Tablo 4.1’ de *Lemna minor* ve cennet hurması kabuğu içeriği hakkında bilgi vermektedir. Tabloda görüldüğü üzere *Lemna minor* C/N/P oranı 100/12,45/6,22 iken cennet hurması kabuğunda bu oran 100/1,3/0,04 elde edilmiştir. *Lemna minor* azot ve fosfor açısından zengin iken cennet hurması kabuğu karbon açısından zengin ancak azot ve fosfor açısından sınırlıdır. Bu nedenle uygun oranda harmanlandıktan sonra H₂ üretimi için kullanılma potansiyeli yüksektir. Literatürde H₂ üretimi için en uygun C/N ve C/P oranları değişkenlik göstermekle birlikte, C/N oranı için 20-200 ve C/P oranı için 50-1000 aralıkları tavsiye edilmektedir (Argun ve Dao, 2016). *Lemna minor*’ün C/N oranı 8,03, C/P oranı ise 16,08 olması yapısındaki azot ve fosforun yüksekliğinden ileri gelmektedir.

Tablo 4.1: *Lemna minor* ve cennet hurması içeriği

Parametre	<i>Lemna minor</i>	Cennet hurması kabuğu
TOC (Toplam organik karbon) %	25,37	37,89
TKN (Toplam Kjeldahl Azotu) %	3,16	0,50
TP (Toplam fosfor) %	1,58	0,016

Lemna minor C/N ve C/P oranlarının yükseltilebilmesi için iki strateji mümkündür. Bunlardan ilki fermentasyon öncesi yapısındaki azot ve fosforun uzaklaştırılması ikincisi karbonca zengin fakat azot ve fosfor açısından fakir bir substrat ile harmanlanmasıdır. Bu çalışmada ikinci yöntem seçilerek en uygun H₂ üretim koşullarını sağlayan harmanlama miktarını belirlemek hedeflenmiştir. Bu amaçla iki set deney tasarlanmıştır. Öncelikle *Lemna minor* için, kimyasal yapısı bilinen azot ve fosfor içermeyen ve karbon açısından zengin olan glikoz ile en uygun harmanlama çalışması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra glikoz yerine aynı fonksiyonu görebilecek cennet hurması kabuğu kullanılarak ikinci bir set deney yapılmıştır. Her iki deneyden elde edilen sonuçlar ışığında en yüksek H₂ gazı üretimini sağlayan harmanlama koşulları kurulan modeller yardımıyla belirlenmiştir.

4.1 H₂ Üretimi İçin Uygun Substrat Kompozisyonun Belirlenmesi

4.1.1 LM-GLİ karışımında hidrojen gazı üretiminin BWİDT metodu ile optimizasyonu

Tablo 4.2’de Glikoz ile LM konsantrasyonlarının bağımsız değişken olarak kullanıldığı Box-Wilson deney seti tasarımına ait deneysel sonuçlar ve modelin tahmin ettiği değerleri özetlemektedir. Tablo 4.2 H₂ verimi 5,82-82,70 mLH₂/10 mL ve H₂ üretim hızı 0,64-14,43 mLH₂/saat aralığında değişmiştir.

Deney sonucu elde edilen değerler ile modelin tahmin ettiği değerlerin çoğu uyum içerisinde çıkmıştır. Deney setine noktasal olarak bakıldığında A₄ noktasındaki koşullarda en yüksek H₂ üretim verimi ve hızının elde edildiği görülmektedir, zira bu noktada C/N ve C/P oranları sırasıyla 17 ve 35’tir.

Tablo 4.2: Box-Wilson deney tasarımı ve sonuçları (Glikoz-*Lemna minor*)

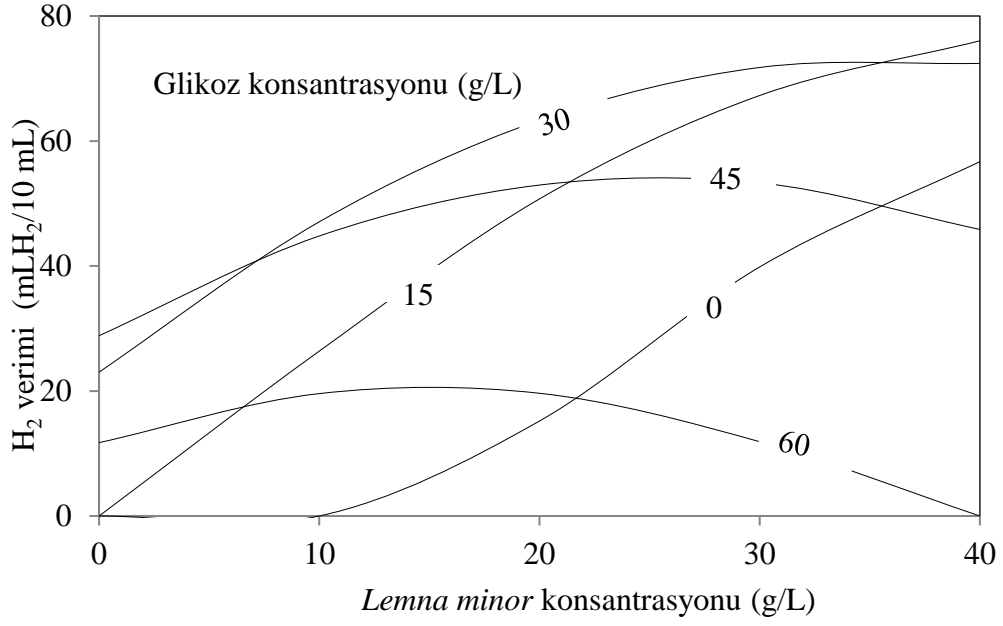
	Değişkenler ve konsantrasyonları		Amaç fonksiyonlar			
	X ₁	X ₂	Y ₁		Y ₂	
	Glikoz (g/L)	<i>Lemna minor</i> (g/L)	Hidrojen verimi (mLH ₂ /10 mL)		R _m (mLH ₂ /saat)	
			Deney	Model	Deney	Model
Axial noktalar						
<i>A</i> ₁	0,00	20,00	5,82	15,19	2,40	2,84
<i>A</i> ₂	60,00	20,00	19,90	19,64	9,15	8,96
<i>A</i> ₃	30,00	0,00	3,80	23,02	0,64	2,70
<i>A</i> ₄	30,00	40,00	82,70	72,42	14,43	12,50
Faktöryel noktalar						
<i>F</i> ₁	51,21	34,14	23,56	35,41	10,91	12,98
<i>F</i> ₂	51,21	5,86	43,16	32,87	5,77	4,85
<i>F</i> ₃	8,79	34,14	61,43	64,66	6,29	7,45
<i>F</i> ₄	8,79	5,86	15,74	-2,65	3,46	1,73
Orta nokta	30,00	20,00	62,85	63,32	10,30	10,40

Tablo 4.3 'de, H₂ üretim verimi (Y₁) ve H₂ üretim hızı (Y₂) fonksiyonları için SPSS yazılımı ile hesaplatılan katsayılar ve R² değerleri gösterilmektedir. Her iki durum için de R² değerlerinin %80 üzerinde çıkması modelin güvenilirliğinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.3: Box-Wilson amaç fonksiyonu sabitleri (*Glikoz-Lemna minor*)

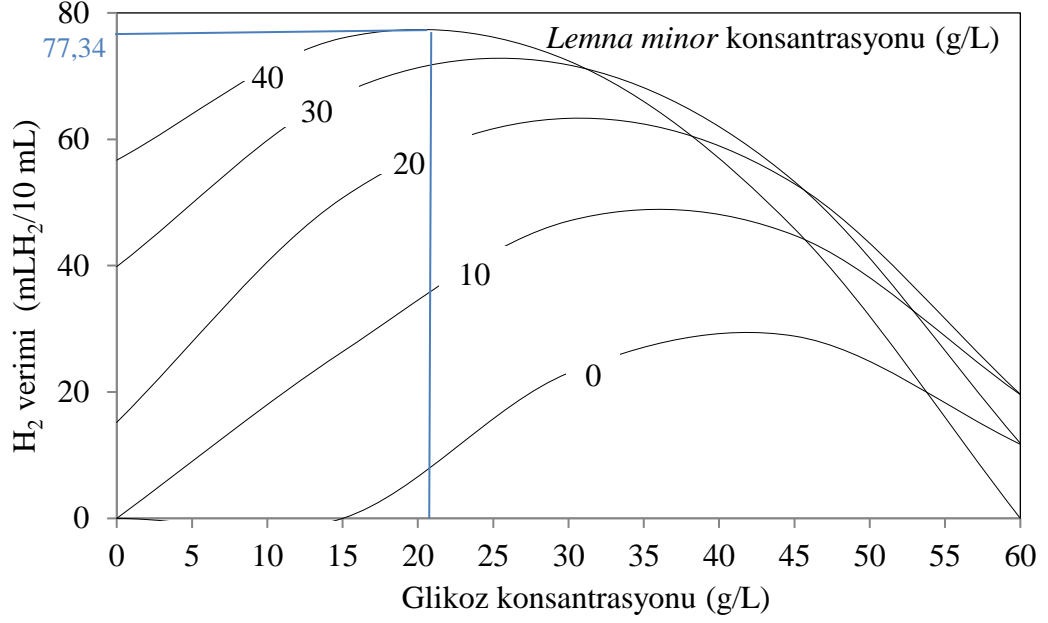
	b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₂	b ₁₁	b ₂₂	R ²
Y ₁	-57,04	4,214	4,415	-0,054	-0,051	-0,039	0,82
Y ₂	-3,657	0,362	0,465	0,002	-0,005	-0,007	0,89

Şekil 4.1'de, sabit glikoz konsantrasyonunda H₂ veriminin *Lemna minor* konsantrasyonuyla değişimini göstermektedir. Dikkat edilirse 0-30 g/L sabit glikoz konsantrasyonlarında H₂ verimi, LM konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artış göstermiştir. Ancak 45 ve 60 g/L sabit glikoz konsantrasyonları ele alındığında H₂ verimi, glikoz konsantrasyonun belli bir değere çıkartılmasına kadar artış gösterdikten sonra daha yüksek LM konsantrasyonlarında düşüş göstermiştir. Bu da 15 g/L'ye kadar olan glikoz konsantrasyonlarında LM artışının herhangi bir inhibisyona neden olmadığını ancak 45 g/L ve üzerindeki glikoz konsantrasyonlarında LM'nin belli bir değere kadar limitleme yaptıktan sonra belli bir değerden sonra substrat inhibisyonu yaptığını düşündürmektedir. Bu grafiğe göre en yüksek H₂ verimi olan 76,01 mLH₂/10 mL değeri 15 g/L glikoz ve 40 g/L LM kullanıldığında elde edilmiştir. Glikoz ve LM konsantrasyonlarının H₂ verimi üzerindeki etkilerini daha detaylı inceleyebilmek için Şekil 4.2 çizdirilmiştir.



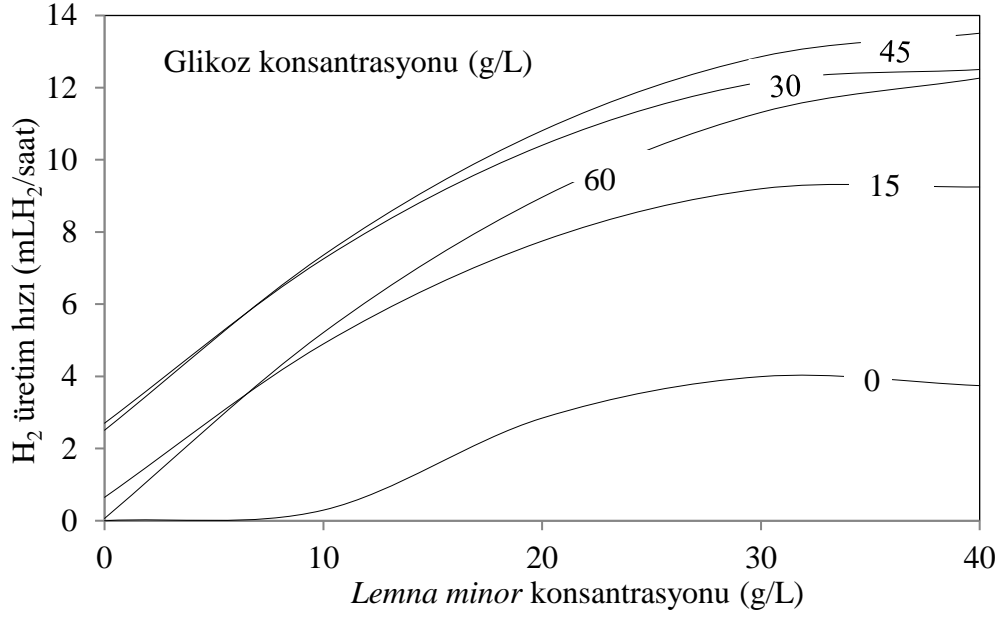
Şekil 4.1: Sabit glikoz konsantrasyonunda H₂ veriminin *Lemna minor* konsantrasyonu ile değişimi

Şekil 4.2’de, sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ veriminin glikoz konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Burada tüm sabit LM konsantrasyonlarında glikoz konsantrasyonunun belirli bir değere kadar sınırlayıcı faktöre sebep olduğunu ancak belli bir değerden sonra substrat inhibisyonuna neden olduğu daha iyi bir şekilde görülmektedir. Grafığe göre en yüksek H₂ verimi 40 g/L glikoz ve 15 g/L LM’de elde edilmiştir. Ancak model optimizasyonu ile elde edilen sonuca göre en yüksek H₂ verimi olan 77,34 mLH₂/10 mL değerinin, 40 g/L LM ve 21 g/L glikoz konsantrasyonlarında elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.2: Farklı *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ veriminin glikoz konsantrasyonu ile değişimi

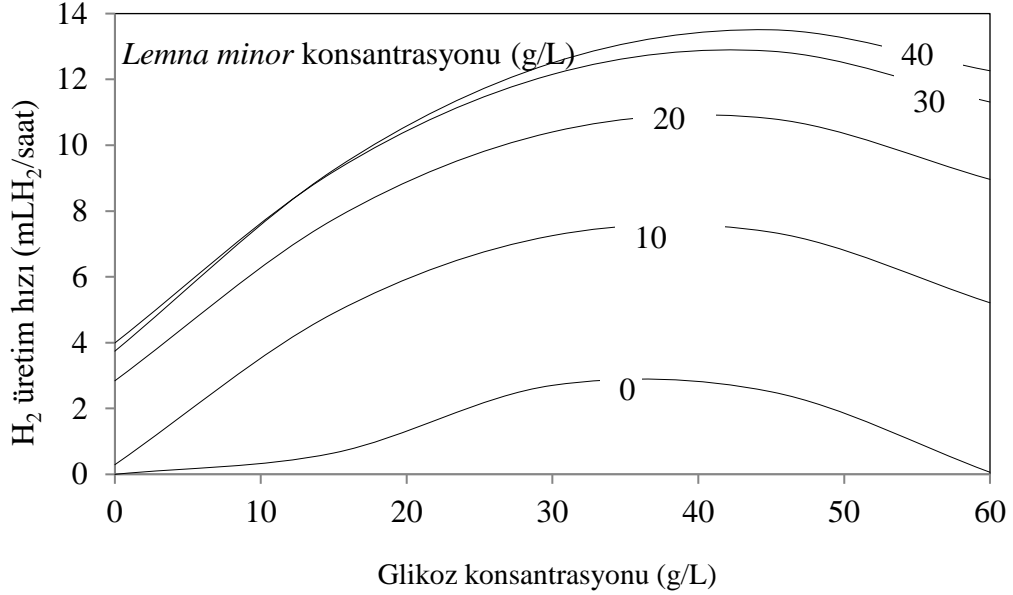
Şekil 4.3'te, sabit glikoz konsantrasyonunda H₂ üretim hızının *Lemna minor* konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Buna göre tüm sabit glikoz konsantrasyonlarında LM konsantrasyonunun artırılmasıyla H₂ üretim hızının arttığı ve belli bir seviyeden sonra sabitlendiği görülmektedir. En yüksek H₂ üretim hızı olan 13,51 mL.H₂/saat değeri ortamda 45 g/L glikoz ve 40 g/L LM olduğunda elde edilmiştir. Ortamda sadece LM'nin olup glikoz konsantrasyonunun 0 g/L olduğu durumda da LM'nin artışıyla birlikte H₂ üretim hızında artış olduğu görülmektedir. Ancak glikoz ilaveli durumlarda elde edilen H₂ üretim hızları daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu da LM ve glikozun uygun bir oranda harmanlandıktan sonra fermentasyona başlanmasının daha verimli sonuçlar vereceğini göstermektedir. Burada önemli olan mikroorganizmaların H₂ üretimi ve büyüme için ihtiyaç duydukları nütrient kompozisyonunun uygun seviyede olması olduğu söylenebilir.



Şekil 4.3: Farklı glikoz konsantrasyonunda H₂ üretim hızının *Lemna minor* konsantrasyonu ile değişimi

Farklı glikoz ve LM konsantrasyonlarının H₂ üretim hızına olan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için Şekil 4.4 incelenmelidir. Burada sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ üretim hızının glikoz konsantrasyonu ile değişimi görülmektedir. LM konsantrasyonunun 0'dan 40 g/L'ye artırılmasıyla birlikte H₂ üretim hızı da artış göstermiştir. Tüm sabit LM konsantrasyonlarında glikoz konsantrasyonunun belli bir değere kadar karbon sınırlaması yaptığı, ancak belli bir değerden sonra substrat inhibisyonuna neden olduğu söylenebilir. Burada da en yüksek H₂ üretim hızının 40 g/L LM ve 45 g/L glikoz'da elde edildiği görülmektedir. Şekil 4.1, 4.2 ile bu grafik birlikte yorumlandığında 40 g/L LM konsantrasyonunun en yüksek H₂ verimi ve hızını sağladığı söylenebilir. Ancak aynı glikoz konsantrasyonu hem verim ve hem de hız değerlerini aynı anda maksimize edememiştir. Maksimum verim değeri 21 g/L glikozda elde edilirken maksimum hız değeri de 45 g/L glikozda elde edilmiştir. Burada her iki amaç fonksiyonu maksimize eden glikoz konsantrasyonuna karar verilmesi gerekir. 45 g/L glikoz konsantrasyonu maksimum hız değerine ulaşılmasını sağlamasına rağmen 20 g/L üzerinde olduğu için substrat inhibisyonuna neden olma ihtimali çok yüksektir. LM konsantrasyonunun 40 g/L ve glikoz konsantrasyonunun 21 g/L olması durumundaki H₂ üretim hızı değeri 10,82 mLH₂/saat'tir. Bu değer glikoz konsantrasyonunun 45 g/L olduğu durumdaki hız

değerinden (13,51 mLH₂/saat) çok düşük olmayıp yakın bir değerdir. Bu nedenle hem H₂ verimi hem de H₂ üretim hızının en ideal olduğu durumun 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM konsantrasyonlarında elde edildiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.4: Sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ üretim hızının glikoz konsantrasyonuyla değişimi

Yukarıdaki analiz dikkate alınarak 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM konsantrasyonlarında farklı bir zamanda üç tekrarlı doğrulama deneyi yapılmış ve sonuçları Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Tablo 4.3 incelendiğinde Y₁ ve Y₂ amaç fonksiyonları için önerilen model fonksiyonlarının R² değerlerinin %80'nin üzerinde çıktığı görülmektedir. Ancak Tablo 4.4'e göre deneysel ve tahmini değerler Y₁ için %69 ve Y₂ için %54 elde edilmiştir. Mikrobiyal sistemlerde bu tarz sapmaların olması normaldir. Ancak deneysel sonuçların modelin tahmin ettiği değerlerden çok daha yüksek çıkması olumlu bir sonuç olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.4: Glikoz ve *Lemma minor* karışımı verifikasyon deney sonuçları

$X_1: 21 \text{ g/L}$ $X_2: 40 \text{ g/L}$	<i>Amaç fonksiyonu</i>	<i>Deneysel sonuç</i>	<i>Model tahmini</i>
	Y_1	111,99	77,34
	Y_2	20,01	10,82

4.1.2 LM-CH karışımında hidrojen gazı ürteiminin BWİDT metodu ile optimizasyonu

LM-GLİ deneylerinde kullanılan Box-Wilson deney tasarımının aynısı glikoz yerine cennet hurması kabuğu kullanılarak yapılmıştır. Bağımsız değişken aralıkları ve amaç fonksiyonlar aynı olup, sadece glikoz cennet hurması kabuğu ile değiştirilmiştir. Zira bitkisel atıkların LM ile harmanlanarak H₂ üretimi için değerlendirilmesi amaç edinilmiştir. Buna göre Box-Wilson tasarımının önerdiği noktalarda yapılan deneylerin sonuçları ile model sonuçları Tablo 4.5 'te özetlenmiştir. Deneysel tasarıma göre C/N oranı 8-76 arasında C/P oranıysa 16-2368 arasında değişmiştir. Bu çalışmada esas amaç C/N/P oranının optimizasyonu değildir. Ancak, deneysel tasarımda iki organik atığın farklı orنالarda karıştırılması sonucunda C/N ve C/P oranlarının geniş bir aralıkta gözlemlenmeside sağlanmıştır. Fermentasyon sonucunda gözlemlenen H₂ üretim verimi 4,76-103,25 mLH₂/10 mL arasında değişirken H₂ üretim hızı 0,99-21,42 mL.H₂/saat arasında değişmiştir. Bu değerler LM-GLİ deneylerinde elde edilen değerlerden oldukça yüksektir. Bunun temel sebebinin cennet hurması kabuğunun içerdiği mineraller ve vitaminler olduğu söylenebilir. Tablo 4.5 'deki deneysel sonuçlar incelendiğinde en yüksek H₂ verimi (103,25 mLH₂/10 mL) ve hızı (21,42 mL.H₂/saat) A₄ noktasında 30 g/L CH ve 40 g/L LM konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Bu noktadaki C/N oranı 15,21 ve C/P oranı 33,73' tür. Deneysel ve model tahmin değerleri büyük oranda benzer çıkmıştır.

Tablo 4.5: Box-Wilson deney tasarımı ve sonuçları (Cennet hurması kabuğu-*Lemma minor*)

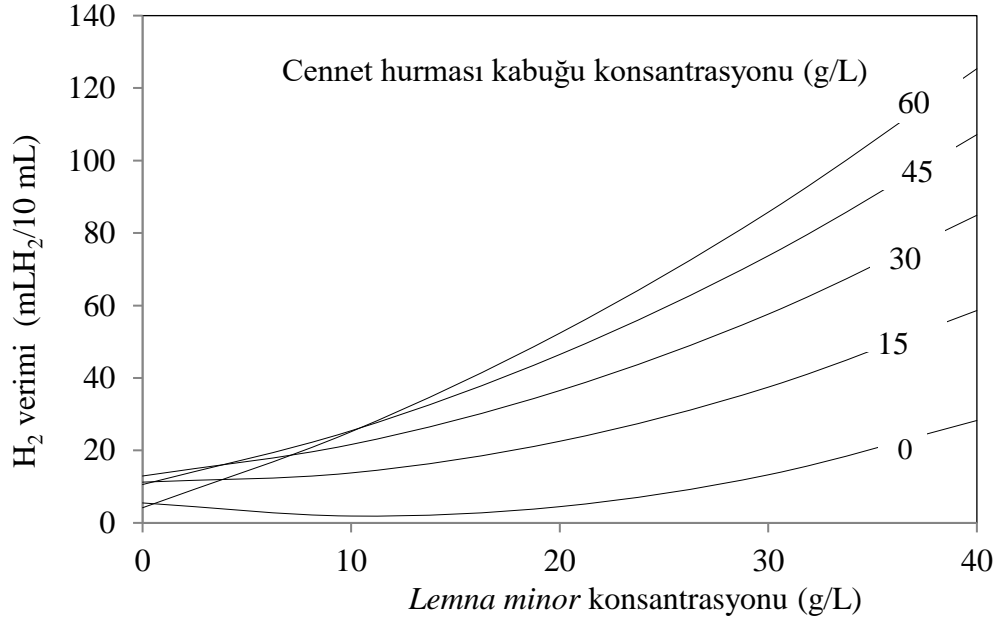
	Değişkenler ve konsantrasyonları		Amaç fonksiyonlar			
	X_1^1	X_2	Y_1		Y_2	
	Cennet hurması kabuğu (g/L)	<i>Lemna minor</i> (g/L)	Hidrojen verimi (mLH ₂ /10 mL)		R_m (mLH ₂ /saat)	
			Deney	Model	Deney	Model
Axial noktalar						
A_1	0,00	20,00	4,76	4,48	7,76	7,65
A_2	60,00	20,00	63,45	52,36	14,68	12,63
A_3	30,00	0,00	5,75	12,95	0,99	1,32
A_4	30,00	40,00	103,25	84,91	21,42	19,96
Faktöryel noktalar						
F_1	51,21	34,14	77,00	93,34	19,09	19,64
F_2	51,21	5,86	18,75	17,87	6,00	4,66
F_3	8,79	34,14	24,73	34,89	12,87	14,32
F_4	8,79	5,86	15,85	8,61	3,46	2,94
<u>Orta nokta</u>	30,00	20,00	36,91	36,53	7,72	7,44

Tablo 4.6’da LM-CH deneyleri sonunda SPSS programı ile hesaplanan amaç fonksiyonu katsayılarını göstermektedir. H₂ üretim verimi için R² değeri %90 ile H₂ üretim hızı için bu değer %98 elde edildi. Gözlenen ve hesaplanan değerler lineer ilişki göstermektedir.

Tablo 4.6: Box-Wilson amaç fonksiyonu sabitleri (Cennet hurması kabuğu-*Lemna minor*)

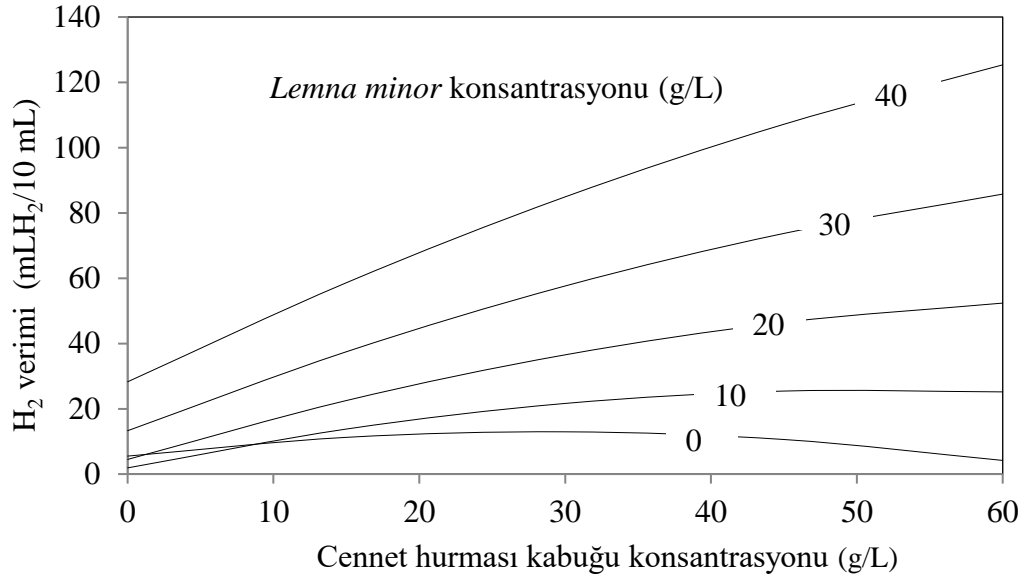
	b ₀	b ₁	b ₂	b ₁₂	b ₁₁	b ₂₂	R ²
Y ₁	5,508	0,518	-0,671	0,041	-0,009	0,031	0,90
Y ₂	3,332	-0,157	0,056	0,003	0,003	0,008	0,98

Şekil 4.5'te, sabit cennet hurması kabuğu konsantrasyonunda H₂ veriminin *Lemna minor* konsantrasyonuyla değişimini görülmektedir. Sabit CH konsantrasyonlarında LM konsantrasyonunun arttırılmasıyla birlikte H₂ üretim verimi de artmıştır. CH kabuğu ilavesiz deneysel şartlarda H₂ verimi CH ilaveli şartlara nazaran düşük elde edilmiştir. Bu sonuç CH ile LM karışımının H₂ verimi üzerinde olumlu etkisini göstermektedir. En yüksek H₂ verimi 125,35 mL.H₂/10 mL ile 60 g/L CH ve 40 g/L LM ile elde edilmiştir.



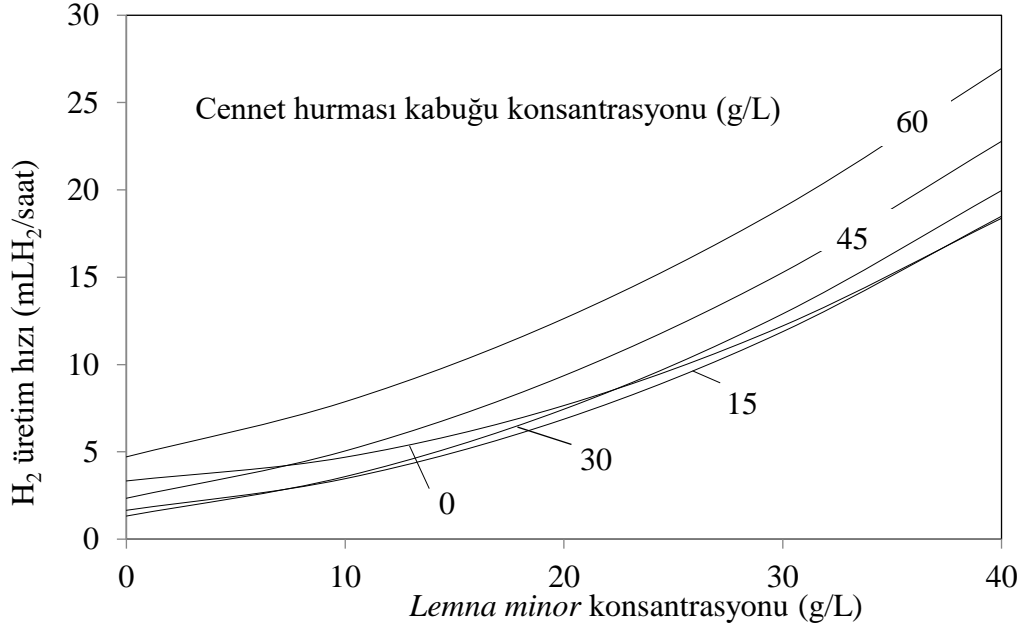
Şekil 4.5: Sabit cennet hurması kabuğu konsantrasyonunda H₂ veriminin *Lemna minor* konsantrasyonu ile değişimi

Şekil 4.6'da sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ veriminin cennet hurması kabuğu konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Burada da 0 g/L LM üzerindeki konsantrasyonlarda CH konsantrasyonunun artırılmasının H₂ üretim verimini de arttırdığı söylenebilir. Sadece 10 g/L LM'de 40 g/L üzerindeki CH konsantrasyonunu H₂ verimi artışı üzerinde fazladan bir etki yapmadığı görülmektedir. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 birlikte incelendiğinde LM veya CH'nin tek başına incelenen aralıklarda artırılmasının H₂ verimi üzerinde sanki lineer artışlar yaptığı, maksimum bir noktaya ulaşmadığı ve dolayısıyla optimum değere karar verilemediği görülmüştür. Normalde glikoz derişimi 20 g/L'de optimum değere ulaşmakta ve daha yüksek glikoz konsantrasyonları substrat inhibisyonuna neden olmaktadır. Ancak bu deney setinde CH ve LM'den gelen glikoz cinsinde başlangıç toplam şeker konsantrasyonunun hiçbir zaman 13,56 g/L'yi geçememiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



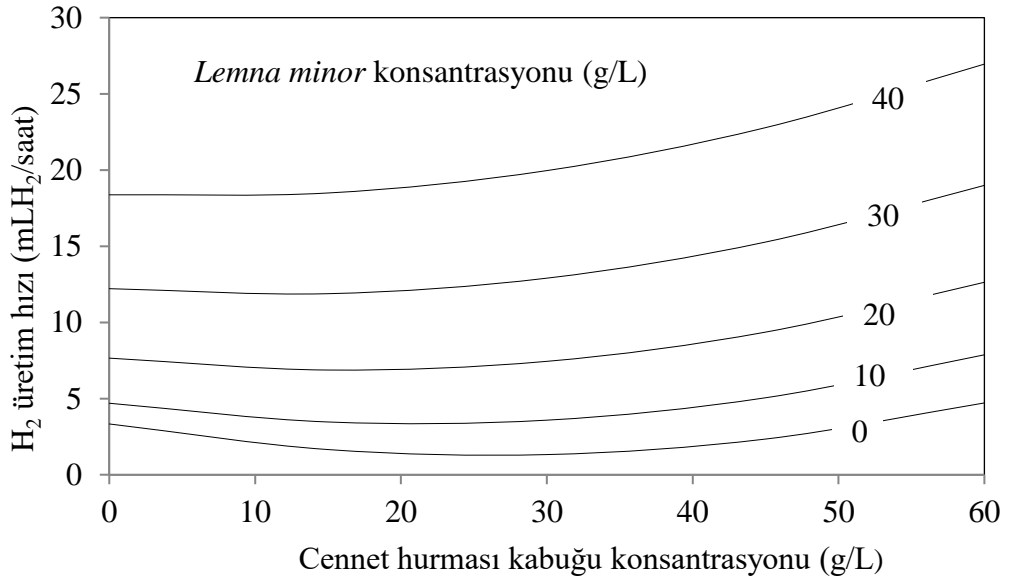
Şekil 4.6: Sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ veriminin cennet hurması kabuğu konsantrasyonuyla değişimi

Şekil 4.7 'de, sabit cennet hurması kabuğu konsantrasyonunda H₂ üretim hızınının *Lemna minor* konsantrasyonuyla değişimini göstermektedir. Buna göre tüm sabit CH konsantrasyonlarında LM konsantrasyonunun artırılması H₂ üretim hızında sürekli bir artış etkisi göstermiştir. Yukarıda anlatılan glikoz konsantrasyonunun inhibisyon seviyesine ulaşamaması nedeniyle eğrilerde optimum nokta görülememiştir. En yüksek H₂ üretim hızı 40 g/L LM ve 60 g/L CH kullanıldığında 26,95 mL.H₂/saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7: Sabit cennet hurması kabuğu konsantrasyonunda H₂ üretim hızının *Lemna minor* konsantrasyonuyla değişimi

Şekil 4.8’de, sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ üretim hızının cennet hurması kabuğu konsantrasyonuyla değişimini vermektedir. Dikkat edilirse tüm sabit LM konsantrasyonlarında CH konsantrasyonunun arttırılması H₂ üretim hızında artışlara neden olmuştur. LM’nin hiç bulunmadığı fermentasyon deneyinde CH konsantrasyonu 0-60 g/L arasında değiştirildiğinde H₂ üretim hızının 5 mLH₂/saat altında değerlerde kaldığı görülmüştür. Bu da CH’nın da kendi başına substrat olarak kullanılmasının yüksek H₂ üretim hızları vermeyeceğini göstermiştir. 40 g/L LM ve 60 g/L CH karışımı kullanıldığında C/N ve C/P oranları sırasıyla 21,01 ve 51,18 olmuştur. C/N oranının bu değerde bulunması literatür ile de uyumlu çıkmıştır.



Şekil 4.8: Sabit *Lemna minor* konsantrasyonunda H₂ üretim hızının cennet hurması kabuğu konsantrasyonuyla değişimi

LM-GLİ deney seti sonucuna göre en yüksek H₂ üretim verimi ve hızını sağlayan koşullar 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM kullanıldığında elde edilmiştir. LM-CH deney seti sonuçlarına göre de en yüksek H₂ üretimi 60 g/L CH ve 40 g/L LM kullanıldığında elde edilmiştir ancak bu karışım içerisinde glikoz cinsinden toplam şeker konsantrasyonu 13,65 g/L'yi hiç geçemediği için LM-GLİ deney setinde maksimum H₂ üretim sonuçlarını veren 21 g/L glikoz konsantrasyonunun etkisi CH deneyinde gözlemlenememiştir. Bu şeker konsantrasyonunu veren CH konsantrasyonu 123 g/L'dir. Bu nedenle CH konsantrasyonunun 123 g/L ve LM konsantrasyonunun 40 g/L olduğu durum, 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM'nin LM-GLİ deney setinde elde edilen verimli H₂ üretimine ulaşılabilir düşüncesiyle bu değerlerde üç tekrarlı doğrulama deneyleri yapılmış ve sonuçları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Glikoz ve *Lemna minor* karışımı verifikasyon deney sonuçları

X ₁ : 123 g/L X ₂ : 40 g/L	Amaç fonksiyonu	Deneysel sonuç	Model tahmini
	Y ₁	142,24	157,54
	Y ₂	21,34	59,21

Tablo 4.7 incelendiğinde model fonksiyonun 123 g/L CH ve 40 g/L LM'de önerdiği H₂ üretim verimi 157,54 mLH₂/10 mL iken deneysel olarak %90 oranla 142,24 mLH₂/10 mL değeri elde edilmiştir. Diğer taraftan H₂ üretim hızı değerinin modele göre 59,21 mLH₂/saat olması bekleniyorken deneysel olarak 21,34 mLH₂/saat hız değerine ulaşılmıştır. Mikrobiyal sistem ile çalışıldığı için bu seviyede sapmaların olması normal bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada LM-GLİ deney seti LM-CH deney seti için bir ön model oluşturmuş olup, en uygun H₂ üretimini sağlayan CH ve LM kompozisyonunun belirlenmesine ışık tutmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında *Lemna minor*'den karanlık fermentasyon ile hidrojen gazı üretimi üzerine araştırma yapılmıştır. Laboratuvarında gerçekleştirilen analizler sonucunda, *Lemna minor*'ün C/N/P oranı 100/12,45/6,22 iken cennet hurması kabuğunda bu oran 100/1,3/0,04 çıkmıştır. *Lemna minor* azot ve fosfor açısından zengin iken cennet hurması kabuğu karbon açısından zengin ancak azot ve fosfor açısından fakirdir. Bu sebeple uygun oranda harmanladıktan sonra, H₂ üretimi için kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.

Öncelikle *Lemna minor*'ün, kimyasal yapısı bilinen azot ve fosfor içermeyen ve karbon açısından zengin olan glikoz en uygun harmanlama çalışması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra glikoz yerine aynı fonksiyonu görebilecek cennet hurması kabuğu kullanılarak ikinci bir set deney yapılmıştır. En yüksek H₂ üretimini sağlayan koşulları bulabilmek için, Box-Wilson deneysel tasarım modeli kullanılmış ve hesaplamalar SPSS ile gerçekleştirilmiştir.

LM-GLİ deney seti için bağımsız değişkenler ve aralıkları: Glikoz konsantrasyonu (X₁: 0-60 g/L) ve LM konsantrasyonu (X₂: 0-40 g/L). LM-CH deney setinde LM bağımsız değişkeni ve aralığı aynı tutulurken (X₂: 0-40 g/L) glikoz yerine cennet hurması kabuğu (X₁¹: 0-60 g/L) değişken olarak kullanılmıştır.

LM-GLİ deney seti için elde edilen değerler ile modelin tahmin ettiği değerlerin çoğu uyum içerisinde çıkmıştır. Deney setine noktasal olarak bakıldığında A₄ noktasındaki koşullarda en yüksek H₂ üretim verimi ve hızının elde edildiği görülmektedir, zira bu noktada C/N ve C/P oranları sırasıyla 17 ve 35'tir. En yüksek hidrojen verimi (76,01 mLH₂/10 mL) ve hızı (13,51 mLH₂/saat) tespit edilmiştir. Maksimum verim değeri 21 g/L glikozda elde edilirken maksimum hız değeri de 45 g/L glikozda elde edilmiştir. 45 g/L glikoz konsantrasyonu maksimum hız değerine ulaşılmasını sağlamasına rağmen 20 g/L üzerinde olduğu için substrat inhibisyonuna neden olma ihtimali çok yüksektir. LM konsantrasyonunun 40 g/L ve glikoz konsantrasyonunun 21 g/L olması durumundaki H₂ üretim hızı değeri 10,82 mLH₂/saattir. Bu değer glikoz konsantrasyonunun 45 g/L olduğu durumdaki hız değerinden (13,51 mLH₂/saat) çok düşük olmayıp yakın bir değerdir.

Bu nedenle hem H₂ verimi hem de H₂ üretim hızının en ideal olduğu durumun 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM konsantrasyonlarında elde edildiği sonucuna varılmıştır. Doğrulama deneyi sonucunda modelin önerdiği H₂ üretim verimi 77,34 mLH₂/10 mL iken, deneysel olarak %69 oranla 111,99 mLH₂/10 mL değeri elde edilmiştir. Diğer taraftan H₂ üretim hızı değerinin modele göre 10,82 mLH₂/saat olması bekleniyorken deneysel olarak %54 oranla 20,01 mLH₂/saat hız değerine ulaşılmıştır.

LM-CH deney seti için elde edilen değerler ile modelin tahmin ettiği değerlerin çoğu uyum içerisinde çıkmıştır. Deney setine noktasal olarak bakıldığında A4 noktasındaki koşullarda en yüksek H₂ üretim verimi ve hızının elde edildiği görülmektedir, zira bu noktada C/N ve C/P oranları sırasıyla 15,21 ve 33,73'tir. LM'nin hiç bulunmadığı fermentasyon deneyinde CH konsantrasyonu 0-60 g/L arasında değiştirildiğinde H₂ üretim hızının 5 mLH₂/saat altında değerlerde kaldığı görülmüştür. Bu da CH'nin da kendi başına substrat olarak kullanılmasının yüksek H₂ üretim hızları vermeyeceğini göstermiştir. H₂ üretim verimi 4.76-103.25 mLH₂/10 mL arasında değişirken H₂ üretim hızı 0,99-21,42 mLH₂/saat arasında değişmiştir. Bu değerler LM-GLİ deneylerinde elde edilen değerlerden oldukça yüksektir. Bunun temel sebebi cennet hurması kabuğunun içerdiği mineraller ve vitaminler olabilir. Deneysel sonuçlar incelendiğinde en yüksek H₂ verimi (103,25 mLH₂/10 mL) ve hızı (21,42 mL.H₂/saat) A4 noktasında 30 g/L CH ve 40 g/L LM konsantrasyonlarında elde edilmiştir.

LM-GLİ deney seti sonucuna göre en yüksek H₂ üretim verimi ve hızını sağlayan koşullar 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM kullanıldığında elde edilmiştir. LM-CH deney seti sonuçlarına göre de en yüksek H₂ üretimi 60 g/L CH ve 40 g/L LM kullanıldığında elde edilmiştir ancak bu karışım içerisinde glikoz cinsinden toplam şeker konsantrasyonu 13,65 g/L'yi hiç geçemediği için LM-GLİ deney setinde maksimum H₂ üretim sonuçlarını veren 21 g/L glikoz konsantrasyonunun etkisi CH deneyinde gözlemlenememiştir. Bu şeker konsantrasyonunu veren CH konsantrasyonu 123 g/L dir. Bu nedenle CH konsantrasyonunun 123 g/L ve LM konsantrasyonunun 40 g/L olduğu durum, 21 g/L glikoz ve 40 g/L LM'nin LM-GLİ deney setinde elde edilen verimli H₂ üretimine ulaşılabilir düşüncesiyle bu değerlerde üç tekrarlı doğrulama deneyleri yapılmıştır.

Doğrulama deneyi sonucunda modelin önerdiği H₂ üretim verimi 157,54 mLH₂/10 mL iken deneysel olarak %90 oranla 142,24 mLH₂/10 mL, H₂ üretim hızı değerinin modele göre 59,21 mLH₂/saat olması bekleniyorken deneysel olarak 21,34 mLH₂/saat hız değerine ulaşılmıştır. Deneysel sonuçların modelin tahmin ettiği değerlerden çok daha yüksek çıkması olumlu bir sonuç olarak kabul edilmiştir.

Karanlık fermentasyon prosesi ile daha verimli hidrojen üretmek için ilerleyen çalışmalarda farklı aşu kültürü ve ön işlem denemeleri yapılabilir. Deneyler kesikli işletme modeli yerine yarı sürekli besleme modu kullanılarak veya immobilize sistem ile yapılabilir. Bu sayede daha verimli hidrojen üretiminin elde edilebileceğini düşündürmektedir. Bu tür atıkların yararlı ürünlere dönüştürülmesi karbon salınımı, atık yönetimi ve enerji ihtiyacını karşılamak açısından önemlidir.

6. KAYNAKLAR

Abejón, R., Pérez-Acebo, H. ve Clavijo, L. "Alternatives for Chemical and Biochemical Lignin Valorization: Hot Topics from a Bibliometric Analysis of the Research Published During the 2000–2016 Period", *Processes* 2018,6(8), 98, (2018).

Argun, H., Dao, S. "Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition", *Int. J. Hydrogen Energy*, 42(4), 2569–2574, (2017).

Argun, H. ve Dao, S., "Hydrogen gas production from waste peach pulp by dark fermentation and electrohydrolysis", *Int. J. Hydrogen Energy*, 41(27), 11568–11576, (2016).

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

Argun, H., Liz, P. G. ve Karapinar, I. "Biohydrogen production potential of different biomass sources", *Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective*, 11–48, (2016).

Argun, H. ve Onaran, G. "Delignification of vineyard pruning residues by alkaline peroxide treatment", *Industrial Crops and Products*, 74, 697–702, (2015).

Argun, H. ve Onaran, G. "Effects of N/C, P/C and Fe/C ratios on dark fermentative hydrogen gas production from waste paper towel hydrolysate", *Int J Hydrogen Energ*, 42(22), 14990–15001, (2017).

Argun, H. ve Onaran, G. G. G. G., "Hydrogen gas production from waste paper by sequential dark fermentation and electrohydrolysis", *Int. J. Hydrogen Energy*, 41(19), 8057–8066, (2016).

Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., Celis, L. B. ve Alatríste-Mondragón, F. "Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: Role of hydrolysates constituents", *Int. J. Hydrogen Energy*, 40(34), 10756–10765, (2015).

Bakker, R. R. "Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass", *Retrieved from*, (2010).

Balan, V."Current Challenges in Commercially Producing Biofuels from Lignocellulosic Biomass", *ISRN Biotechnology*, 2014, 1–31, (2014).

Bardone, E., Bravi, M., Keshavarz, T., Cardoso, V., Romão, B. B., Silva, F. T. M. ve Ferreira, J. S. "Hydrogen Production by Dark Fermentation", 38, (2014).

Basak, N., Jana, A. K., Das, D. ve Saikia, D."Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective", *Int. J. Hydrogen Energy*, 39(13), 6853–6871, (2014).

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

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

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

Fonseca, B. C., Guazzaroni, M. E. ve Reginatto, V., "Fermentative production of H₂ from different concentrations of galactose by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br21", *Int. J. Hydrogen Energy*, 41(46), 21109–21120, (2016).

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

Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P. ve Kim, S.-H., "Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation", *Int. J. Hydrogen Energy*, 41(46), 21678–21684, (2016).

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

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

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

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

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

Manish, S. ve Banerjee, R., “Comparison biohydrogen production processes”, *Int J Hydrogen Energ*,33,279-286,(2008).

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

Carere, C. R., Sparling, R., Cicek, N. ve Levin, D. B. "Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation", *International Journal of Molecular Sciences*, 1342–1360, (2008).

D. Muley, P. ve Boldor, D."Advances in Biomass Pretreatment and Cellulosic Bioethanol Production Using Microwave Heating", 173–180, (2017).

Diaz, J. H. "Global Climate Changes, Natural Disasters, and Travel Health Risks", *Journal of Travel Medicine*, 13(6), 361–372. (2006).

Ghosh, D., Sobro, I. F. ve Hallenbeck, P. C. "Optimization of the hydrogen yield from single-stage photofermentation of glucose by *Rhodobacter capsulatus* JP91 using response surface methodology", *Bioresource Technology*, 199–206, (2012).

Gupta, M., Gomez-Flores, M., Nasr, N., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Hesham El Naggar, M. ve Nakhla, G. "Performance of mesophilic biohydrogen-producing cultures at thermophilic conditions". *Bioresource Technology*, 192, 741–747, (2015)

ISO - ISO 11261:1995 "Toprak kalitesi - Toplam azot tayini - Modifiye edilmiş Kjeldahl yöntemi. n.d." *Retrieved July 4, (2022).*

ISO 14672. n.d. "EN 14672:2005 - Çamurların karakterizasyonu - Toplam fosfor tayini", *Retrieved July 4, (2022).*

Kaur, M., Srikanth, S., Kumar, M., Sachdeva, S. ve Puri, S. K. "An integrated approach for efficient conversion of *Lemna minor* to biogas", *Energy Conversion and Management*, 180, 25–35, (2019).

Kothari, R., Kumar, V., Pathak, V. v., Ahmad, S., Aoyi, O. ve Tyagi, V. v. "A critical review on factors influencing fermentative hydrogen production". *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 22(8), 1195–1220, (2017).

Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. v. ve Tyagi, S. K. "Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2337–2346, (2012).

Kumar, G., Zhen, G., Kobayashi, T., Sivagurunathan, P., Kim, S. H., Xu, K. Q. "Impact of pH control and heat pre-treatment of seed inoculum in dark H₂ fermentation: A feasibility report using mixed microalgae biomass as feedstock", *Int J Hydrogen Energ*, 41(7), 4382–4392, (2016).

Löffler, K., Burandt, T., Hainsch, K., Oei, P. Y., Seehaus, F., Wejda, F. "Chances and barriers for Germany's low carbon transition - Quantifying uncertainties in key influential factors", *Energy* 239, 121901, (2022).

Maintinguer, S. I., Lazaro, C. Z., Pachiega, R., Varesche, M. B. A., Sequinel, R. ve de Oliveira, J. E. "Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater", *Int J Hydrogen Energ*, 42(1), 152–160, (2017).

Manish, S.ve Banerjee, R. "Comparison of biohydrogen production processes", *Int J Hydrogen Energ*, 33(1), 279–286, (2008).

Márquez-Reyes, L. A., Sánchez-Saavedra, M. D. P. ve Valdez-Vazquez, I. "Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*", *Int J Hydrogen Energ*, 40(23), 7291–7300, (2015).

Mıynat, M. E. ve Argun, H. "Prevention of substrate and product inhibitions by using a dilution strategy during dark fermentative hydrogen production from molasses", *Int J Hydrogen Energ*, 45(60), 34695–34706, (2020).

Mu, D., Liu, H., Lin, W., Shukla, P. ve Luo, J. "Simultaneous biohydrogen production from dark fermentation of duckweed and waste utilization for microalgal lipid production", *Bioresource Technology*, 302, 122879, (2020).

Nissilä, M. E., Li, Y. C., Wu, S. Y., Lin, C. Y. ve Puhakka, J. A. "Hydrogenic and methanogenic fermentation of birch and conifer pulps" *Applied Energy*, 100, 58–65, (2012)

Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L. ve Moura, P. "Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass", *Fuel*, 153, 128–134, (2015).

Ozmihci, S. ve Kargi, F. "Dark fermentative bio-hydrogen production from waste wheat starch using co-culture with periodic feeding: Effects of substrate loading rate", *Int J Hydrogen Energ*, 36(12), 7089–7093, (2011).

Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M. ve Reungsang, A. "Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*", *Int J Hydrogen Energ*, 33(19), 5256–5265, (2008).

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de La Rubia, T. ve Martínez, J. "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview". *International Microbiology* 5:2, 5(2), 53–63, (2002).

Prabakar, D., Manimudi, V. T., Suvetha K, S., Sampath, S., Mahapatra, D. M., Rajendran, K. ve Pugazhendhi, A. "Advanced biohydrogen production using pretreated industrial waste: Outlook and prospects", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 96, 306–324, (2018).

Rice, E. W. ve Baird, R. B. "Methods for the Examination of Water and Wastewater", *American Public Health Association, American Water Works*, 23, (2017).

Salomón, Y. L., Georgin, J., Franco, D. S. P., Netto, M. S., Piccilli, D. G. A., Foletto, E. L. ve Dotto, G. L. "Adsorption of atrazine herbicide from water by diospyros kaki fruit waste activated carbon", *Journal of Molecular Liquids*, 347, 117990, (2022).

Sekoai, P. T., Daramola, M. O., Sekoai, P. T. ve Daramola, M. O. "The potential of dark fermentative bio-hydrogen production from biowaste effluents in South Africa Carbon nanotube production and functionalization protocols View project Thermochemical conversion of waste tyres: A sustainable approach to used tyres management and beneficiation View project The Potential of Dark Fermentative Bio-hydrogen Production from Biowaste Effluents in South Africa", *INTERNATIONAL JOURNAL of RENEWABLE ENERGY RESEARCH* , (2017).

Sen, B., Chou, Y. P., Wu, S. Y. ve Liu, C. M. "Pretreatment conditions of rice straw for simultaneous hydrogen and ethanol fermentation by mixed culture", *Int J Hydrogen Energ*, 41(7), 4421–4428, (2016).

Sharma, A. ve Arya, S. K. "Hydrogen from algal biomass: A review of production process", *Biotechnology Reports*, 15, 63–69, (2017).

Sheng, Y., Lam, S. S., Wu, Y., Ge, S., Wu, J., Cai, L. ve Xia, C. "Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin", *Bioresource Technology*, 324, 124631, (2021).

Silva, F. M. S., Oliveira, L. B., Mahler, C. F. ve Bassin, J. P. "Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions", *Int J Hydrogen Energ*, 42(36), 22720–22729, (2017).

Singh, L. ve Wahid, Z. A. "Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70–80, (2015).

Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., Park, J. H. ve Kim, S. H. "Recovering hydrogen production performance of upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASBR) fed with galactose via repeated heat treatment strategy", *Bioresource Technology*, 240, 207–213, (2017).

Taherzadeh, M. J. ve Karimi, K. "Enzyme-based ethanol", *BioResources*, 2(4), 707–738, (2007).

Urbaniec, K. ve Bakker, R. R. "Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation – A review", *Int J Hydrogen Energ*, 40(9), 3648–3658, (2015).

Valdez-Vazquez, I. ve Poggi-Varaldo, H. M. "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), 1000–1013, (2009).

Van Soest, P. J., Robertson, J. B. ve Lewis, B. A. "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition", *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597, (1991).

Wang, Jianlong ve Yin, Y. "Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes", 49(10), 825–865, (2019).

Wang, Jun, Chen, Y., Tett, S. F. B., Yan, Z., Zhai, P., Feng, J. ve Xia, J. "Anthropogenically-driven increases in the risks of summertime compound hot extremes", *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–11, (2020).

Xia, A., Cheng, J., Song, W., Su, H., Ding, L., Lin, R. ve Cen, K. "Fermentative hydrogen production using algal biomass as feedstock", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 209–230, (2015).

Xu, J. ve Deshusses, M. A. "Fermentation of swine wastewater-derived duckweed for biohydrogen production", *Int J Hydrogen Energ*, 40(22), 7028–7036, (2015).

Xu, Y. L., Fang, Y., Li, Q., Yang, G. L., Guo, L., Chen, G. K., ve Zhao, H. "Turion, an innovative duckweed-based starch production system for economical biofuel manufacture". *Industrial Crops and Products*, 124, 108–114, (2018).

Yang, G. ve Wang, J. "Biohydrogen production by co-fermentation of sewage sludge and grass residue: Effect of various substrate concentrations" *Fuel*, 237, 1203–1208, (2019).

Yang, H., Shi, B., Ma, H. ve Guo, L. "Enhanced hydrogen production from cornstalk by dark- and photo-fermentation with diluted alkali-cellulase two-step hydrolysis", *Int J Hydrogen Energ*, 40(36), 12193–12200, (2015).

Yin, Y., Chen, Y. ve Wang, J. "Co-fermentation of sewage sludge and algae and Fe²⁺ addition for enhancing hydrogen production". *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(13), 8950–8960, (2021).

Yu, C., Sun, C., Yu, L., Zhu, M., Xu, H., Zhao, J. ve Zhou, G. "Comparative Analysis of Duckweed Cultivation with Sewage Water and SH Media for Production of Fuel Ethanol", *PLOS ONE*, 9(12), e115023, (2014).

Zhang, J., Zhang, J. ve Zang, L. "Thermophilic bio-hydrogen production from corn-bran residue pretreated by calcined-lime mud from papermaking process", *Bioresource Technology*, 198, 564–570, (2015).

Zhang, X., Jiang, D., Zhang, H., Wang, Y., Zhang, Z., Lu, C. ve Zhang, Q. "Enhancement of the biohydrogen production performance from mixed substrate by photo-fermentation: Effects of initial pH and inoculation volume ratio". *Bioresource Technology*, 319, 124153, (2021).