



Kağıt Atığından Karanlık Fermentasyon ve Elektroliz ile Hidrojen Gazı Üretimi

Program Kodu: 3501

Proje No: 113Y187

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Hidayet ARGUN

AĞUSTOS 2015
DENİZLİ



ÖNSÖZ

Günümüzde yenilenebilir kaynaklardan enerji üretimi büyük önem kazanmıştır. Zira hızla artan enerji ihtiyacı fosil yakıtların aşırı tüketimine ve ciddi çevresel problemlere neden olmaktadır. Bu nedenle geleceğin enerji taşıyıcısı olarak kabul edilen hidrojen gazının, yenilenebilir kaynaklardan üretimi fosil kaynaklı enerji üretimine önemli bir alternatif sunmaktadır. Özellikle karbonhidrat içeren atıkların hidrojen üretimi için değerlendirilmesi gelecek vaat eden bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. **TÜBİTAK Çevre, Atmosfer, Yer ve Deniz Bilimleri Araştırma Grubu** tarafından **113Y187** proje numarası ile desteklenen bu projede kağıt atığından karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz prosesleriyle hidrojen gazı üretimi çalışılmıştır. Projede öncelikle kağıt atığının asit hidrolizi ile elde edilen şeker çözeltilisinden hidrojen gazı üretilmiştir. Daha sonra karanlık fermentasyon çıkış suyundan elektrohizoliz ile hidrojen üretimi ve karanlık fermentasyon ile eş zamanlı elektrohizoliz denemeleri ile hidrojen üretimleri araştırılmıştır. Literatürde henüz karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz prosesinin birlikte kullanımıyla kağıt atığından hidrojen üretimi rapor eden başka çalışma bulunmadığı için bu çalışmadan elde edilen sonuçlar özgün katkılar sağlamış olup, aynı zamanda selüloz içeren atıklardan hidrojen üretimi için de model teşkil etmiştir.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	Vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	1
3. GEREÇ VE YÖNTEM	5
3.1 Mikroorganizma	5
3.2 Kağıt Atığı	5
3.3 Deneysel Çalışmalar	6
3.3.1 Kağıt Atığının Ön İşlenmesi	6
3.3.2 Karanlık Fermentasyon	7
3.3.3 Elektrohroliz	8
3.4 Analitik Yöntemler	10
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	12
4.1 Kağıt Atığının Ön İşlenmesi	12
4.2 Karanlık Fermentasyon	23
4.2.1 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Etkisi	23
4.2.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	29
4.2.3 C/N/P Oranının Etkisi	36
4.3 Elektrohroliz	46
4.3.1 Ardışık Karanlık Fermentasyon ve Elektrohroliz	46
4.3.1.1 Uygulanan Voltajın Etkisi	46
4.3.1.2 Başlangıç Organik Asit Konsantrasyonunun Etkisi	49
4.3.1.3 pH'nın Etkisi	51
4.3.2 Birleşik Karanlık Fermentasyon ve Elektrohroliz	53
4.3.2.1 Birleşik Karanlık Fermentasyon ve Elektrohroliz: pH Kontrolü için Dışarıdan Asit İlavesiz Deneyler	54
4.3.2.1.1 Uygulanan Voltajın Etkisi	54
4.3.2.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	57



4.3.2.1.3 Elektrot Aralığının Etkisi	59
4.3.2.2 Birleşik Karanlık Fermentasyon ve Elektroliz: pH Kontrolü için Dışarıdan Asit İlaveli Deneyler	61
4.3.2.1.1 Uygulanan Voltajın Etkisi	61
4.3.2.1.2 Uygulanan Voltaj Periyodunun Etkisi	63
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
6. KAYNAKLAR	73

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1. Box-Behnken istatistiksel deney tasarım değerleri ve sonuçları tablosu.
- Tablo 2. Box-Behnken istatistiksel deney tasarımına ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.
- Tablo 3. Farklı biyokütle konsantrasyonları için Gompertz eşitliği katsayıları.
- Tablo 4. Biyokütle deneyi başlangıç ve sondaki glikoz ve TVFA konsantrasyonları.
- Tablo 5. Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için Gompertz katsayıları (X_0 : 0.15 g/L, V_0 : 45 mL).
- Tablo 6. Deney başlangıcı ve sonundaki substrat (glikoz) ve toplam uçucu yağ asiti (TVFA) konsantrasyonları.
- Tablo 7. Optimum başlangıç substrat (21.34 g/L) ve biyokütle (0.15 g/L) konsantrasyonlarında işletilen karanlık fermentasyon doğrulama deneyi Gompertz eşitliği katsayıları ve verimleri.
- Tablo 8. Box-Behnken istatistiksel deney tasarım değerleri ve sonuçları tablosu.
- Tablo 9. Hidrojen üretim verimine ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.
- Tablo 10. Box-Behnken istatistiksel deney tasarımına ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.
- Tablo 11. Farklı gerilimler altında hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.
- Tablo 12. Farklı başlangıç TVFA konsantrasyonları için hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.
- Tablo 13. Farklı pH değerleri için hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.
- Tablo 14. Farklı gerilimler altında hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.
- Tablo 15. Farklı substrat konsantrasyonları için hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.
- Tablo 16. Farklı elektrot mesafeleri altında hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.
- Tablo 17. Farklı sıcaklık değerlerinde hidrojen üretimi için gerçekleştirilen KF deneyleri.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Şeker konsantrasyonunun farklı pH değerlerinde kağıt/sıvı oranlarına göre değişimi.
- Şekil 2. Şeker konsantrasyonunun farklı sürelerde kağıt/sıvı oranlarına göre değişimi.
- Şekil 3. Şeker konsantrasyonunun farklı pH değerlerinde sürelerle göre değişimi.
- Şekil 4. Şeker konsantrasyonunun farklı kağıt/sıvı oranlarında sürelerle göre değişimi.
- Şekil 5. Şeker konsantrasyonunun farklı sürelerde pH değerlerine göre değişimi.
- Şekil 6. Şeker konsantrasyonunun farklı kağıt/sıvı oranlarında pH değerlerine göre değişimi.
- Şekil 7. HMF konsantrasyonunun *Bacillus cereus* üzerindeki inhibisyonu.
- Şekil 8. Kümülatif hidrojen gazının farklı biyokütle konsantrasyonları (g/L) için zamana göre değişimi. ■ 0.1, ◆ 0.5, ○ 0.875, ◇ 1.0, △ 1.5, ▲ 3.0, x 6.0.
- Şekil 9. Maksimum kümülatif hidrojen hacminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.
- Şekil 10. (○) Spesifik hidrojen üretim hızı (SHÜH) ile (■) Hidrojen üretim veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.
- Şekil 11. Toplam uçucu yağ asidi oluşum veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.
- Şekil 12. 0.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu deneyi için TVFA (mg/L) (■), glikoz (mg/L) (▲) ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.
- Şekil 13. Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için kümülatif hidrojen (mL) üretiminin zamana göre değişimi. (◇) 6.60, (▲) 14.82, (■) 21.33, (●) 30.25, (□) 41.22.
- Şekil 14. Hidrojen (○) ve toplam uçucu yağ asidi-TVFA (□) üretim verimlerinin farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları için değişimi.
- Şekil 15. Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonlarına göre değişimi.
- Şekil 16. 21.34 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen karanlık fermentasyon deneyinde kümülatif hidrojen üretiminin (△), glikoz (◇), TVFA (□), biyokütle (○) konsantrasyonlarının zamana göre değişimi.
- Şekil 17. Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.
- Şekil 18. Hidrojen üretim veriminin farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.
- Şekil 19. Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.
- Şekil 20. Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.

Şekil 21. N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.00278 optimum oranlarda işletilen karanlık fermentasyon deneyine ait TVFA (g/L) (■), glikoz (g/L) (▲) ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.

Şekil 22. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı gerilimler altında zamana göre değişimi.

Şekil 23. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı substrat konsantrasyonlarında zamana göre değişimi.

Şekil 24. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı pH'larda zamana göre değişimi.

Şekil 25. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı gerilimler altında zamana göre değişimi.

Şekil 26. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı substrat konsantrasyonlarında zamana göre değişimi.

Şekil 27. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı elektrot mesafeleri altında zamana göre değişimi.

Şekil 28. Kümülatif hidrojen hacminin farklı gerilim değerleri için zamana göre değişimi. 0.25 V (▲), 0.5 V (□), 1.0 V (●), 1.5 V (◆).

Şekil 29. Hidrojen üretim verimi (molH_2/mol glikoz) (o) ve hızının (mLH_2/saat) (▲) uygulanan gerilime göre değişimi.

Şekil 30. 1 Volt gerilim altında farklı zaman periyotları için kümülatif hidrojen hacminin zamana göre değişimi. Uygulanan gerilim periyotları (Gerilimin açık olduğu süre (sa)/Gerilimin kapalı olduğu süre (sa)): (◆) 3/3, (□) 6/6, (▲) 12/12, (●) 24.

Şekil 31. 1 Volt gerilim altında Hidrojen veriminin farklı zaman periyotları için değişimi.

Şekil 32. 1 Volt gerilim altında Hidrojen üretim hızının farklı zaman periyotları için değişimi.

Şekil 33. (o) Kümülatif hidrojen hacminin (mL), (■) glikoz (g/L), (▲) KOİ (g/L), (◆) TVFA (g/L) konsantrasyonlarının zamana göre değişimi (Deney ortamına 1 Volt gerilim sürekli verilmiş olup, kontrol şişesinde üretilen kümülatif hidrojen hacminin (mL) zamana göre değişimi de (●) ile gösterilmiştir).

ÖZET

Bu projenin amacı kağıt havlu atığından temiz ve yüksek enerji değeri olan hidrojen gazı üretimi için verimli bir proses geliştirmek aynı zamanda hidrojen üretim hız ve verimini arttırmanın yollarını araştırmak olmuştur. Bu amaca ulaşabilmek için üç basamaklı bir proses yaklaşımı izlenmiştir. İlk basamakta kağıt atığı çözeltisinden asit hidroliz ön işlemiyle karanlık fermentasyon basamağı için şeker çözeltisi eldesi, ikinci basamakta şeker çözeltisinden anaerobik çamur kullanılarak karanlık fermentasyonla hidrojen gazı üretimi, üçüncü basamakta ise karanlık fermentasyon çıkış suyundan elektrohizoliz ile hidrojen üretimi yapılmıştır. Bunlara ilaveten karanlık fermentasyon ortamına doğrudan elektrik akımı verilerek oluşan organik asitlerin uzaklaştırılmasıyla hidrojen üretimi çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Deneylerin hidrojen üretim performans kıyaslamasında hidrojen üretim verimi ve hızı kullanılmıştır. Karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz basamaklarının performansının izlenebilmesi için deney seyri esnasında sıvı ve gaz numuneler alınarak çeşitli parametrelerin ölçümü yapılmıştır. Tüm deneylerde şeker konsantrasyonu fenol-asit metoduyla ölçülürken, toplam organik asit konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Toplam gaz, sıvı yer değiştirme yöntemine göre belirlenirken, hidrojen gazı konsantrasyonu GC'de tespit edilmiştir. Diğer tüm analizler standart metotlara göre yapılmıştır.

Birinci basamak çalışmalar kapsamında asit hidrolizi ile kağıt atığından şeker üretimini maksimize eden koşulların araştırılması yapılmıştır. Buna göre 100 g/L katı/sıvı oranı, 121 °C ve 180 dakika işlem süresinde en yüksek %29.24 verimde (32.17 g/L) şeker elde edilmiştir. Bu şeker şurubunun karanlık fermentasyonda substrat olarak kullanıldığı denemelerde hidrojen üretimi için en ideal koşulların 0.875 g biyokütle/L, 21.33 g glikoz/L ve C/N/P: 100/5/9'da olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen karanlık fermentasyon çıkış suyundan elektrohizoliz işlemi ile hidrojen üretimi deneyleri sonucunda en ideal şartların 7.5 V gerilim, 6.0 g TVFA/L ve pH: 2'de elde edildiği görülmüştür. Karanlık fermentasyon ortamına doğrudan elektrik akımı verilerek yapılan birleşik KF-EH deneylerinde ise en yüksek hidrojen üretimi 1.0 V sürekli gerilim uygulaması altında 20 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu ve 0.5 cm elektrot uzaklığında dışarıdan asit ilaveli pH kontrolüyle elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kağıt havlu atığı, hidrojen, atık bertarafı, karanlık fermentasyon, elektrohizoliz, ardışık karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz, birleşik karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz



ABSTRACT

The aim of this project was to investigate the development of an efficient process able to produce hydrogen, a clean and high energy fuel, and to explore conditions maximizing hydrogen formation yield and rates. In this context a three step process approach was followed. The aim of the first step was to produce sugar solution for dark fermentation by acid hydrolysis. The second step covered hydrogen gas production from the sugar solution by dark fermentation and the third step was on hydrogen gas production by electrohydrolysis of the dark fermentation effluent. Additionally, electrohydrolysis was coupled to dark fermentation for simultaneous organic acids removal during dark fermentation adversely affecting hydrogen gas production. Hydrogen production performance of experiments was evaluated by using the hydrogen formation yield and rate as comparison criteria. Gas and liquid samples were drawn for the analysis of several parameters to follow the performance of dark fermentation and electrohydrolysis. Sugar and total organic acid concentrations were determined by the phenol-acid method and spectrophotometric methods using analytical kits, respectively. Total gas was measured by water displacement method and hydrogen gas concentration was determined by using a gas chromatograph (GC). All other measurements were done according to the standard methods.

The first stage of the project covered investigations to determine conditions maximizing sugar formation per waste paper. Highest sugar conversion of %29.24 (32.17 g/L) was obtained at 100 g/L solid/liquid ratio, 121 °C and 180 min hydrolysis time. Most reasonable conditions resulting highest hydrogen formation from this hydrolysate in dark fermentation were obtained at 0.875 g/L initial biomass concentration, 21.33 g/L initial sugar concentration and C/N/P ratio of 100/5/9, respectively. Most convenient hydrogen production conditions for the electrohydrolysis of dark fermentation effluent were obtained at 7.5 V voltage, 6.0 g/L TVFA concentration and pH: 2. Most efficient hydrogen production for simultaneous dark fermentation and electrohydrolysis were obtained at 1.0 V voltage, 20 g/L initial sugar concentration and 0.5 cm electrode distance with acid controlled pH.

Keywords: Waste hand paper towel, hydrogen, waste disposal, dark fermentation, electrohydrolysis, sequential dark fermentation and electrohydrolysis, combined dark fermentation and electrohydrolysis



1. GİRİŞ

Türkiye'nin enerji ihtiyacı, hızla büyüyen ekonomisi ve nüfusu ile sürekli artmakta olup, bu ihtiyacının yaklaşık %70'i dış ülkelerin fosil yakıtlarından karşılanmaktadır. Bu nedenle Türkiye'nin öz kaynaklarının enerji üretimi için değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. Ülkemiz yenilenebilir enerji kaynaklarından hidrojen gazı üretimi bu ihtiyacın bir kısmının karşılanmasında önemli bir potansiyel sunmaktadır.

Hidrojen, yüksek enerji içeriği, sera gazı salınımlarına sebep olmaması ve oksidasyonu sonucunda sadece su buharı oluşturması nedeniyle geleceğin yakıtı olarak görülmektedir. Günümüzde hidrojen çoğunlukla, yüksek enerji ve karmaşık işletme koşulları gerektiren fiziko-kimyasal prosesler ile üretilmektedir. Hidrojeni ılımlı koşullarda biyolojik prosesler ile de üretmek mümkündür ancak bu yöntem henüz fiziko kimyasal proseslerle ekonomik ve uygulanabilirlik açısından rekabet edebilecek düzeyde değildir. Projede selülozca zengin kağıt atığından karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz ile yüksek verim ve saflıkta hidrojen gazı üretimi yapabilen bir prosesin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Literatürde karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminin geçmişi 1990'lı yıllara dayansa da, karanlık fermentasyon çıkış suyunda bulunan organik asitlerden elektrohizoliz yöntemiyle hidrojen üretimi son beş yıldan beri çalışılmaktadır. Elektrohizoliz yöntemi, zahmetli işletme koşulları gerektiren aydınlık fermentasyon basamağı için önemli bir alternatiftir. Literatürde karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz prosesinin birlikte kullanımıyla kağıt atığından hidrojen üretimi rapor eden başka bir çalışma bulunmadığı için bu çalışmanın sonuçları özgün katkılar sağlamış olup, aynı zamanda selüloz içeren atıklardan hidrojen üretimi için de model teşkil etmiştir.

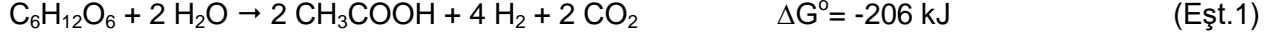
2. LİTERATÜR ÖZETİ

Hızla artan enerji ihtiyacı, fosil yakıt kaynaklarının azalması ve bu yakıtların yakılması sonucu oluşan sera gazlarının atmosferi olumsuz etkilemesi yenilenebilir ve temiz enerji kaynaklarının araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Bu anlamda hidrojen gazı geleceğin enerji taşıyıcısı olarak öngörülmektedir (Das ve Veziroğlu 2001). Zira hidrojen gazı diğer fosil yakıtlarla kıyaslandığında kütle başına yaklaşık üç buçuk kat daha fazla enerji içermekte (Seol vd. 2011), atık biyokütle gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilmekte ve yakılması sonucunda sera gazı etkisi bulunmayan su buharı oluşturmaktadır. Hidrojenin tek dezavantajı doğada serbest halde bulunmayışıdır (Guo vd. 2010).

Geleneksel olarak hidrojen gazı metan gazının buharla reformasyonu, biyokütlenin pirolizi sonrası gazlaştırılması ve suyun hidrolizi ile üretilmektedir. Bu proseslerin ortak özeliği yüksek enerji ve karmaşık işletme gereksinimleridir (Manish ve Banerjee 2008). Biyolojik yöntemlerle hidrojen gazı üretimi bu teknolojiler için önemli bir alternatif sunmaktadır (Das ve Veziroğlu 2001). Çünkü atık maddeler ham madde olarak kullanılabilen, hidrojen gazına dönüşüm ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı ve 1 atm basınç) gerçekleştirilmekte, sera gazları (NO_x , SO_x , CO vb.) salınmamaktadır (Kapdan ve Kargı 2006). Ancak bu yöntemin dezavantajı hidrojen gazı üretim hızı ve verimlerinin düşük olması bu nedenle büyük reaktör hacimlerine ihtiyaç duyulmasıdır (Levin ve Chahine 2010). Biyolojik olarak hidrojen gazı; suyun algler yardımıyla fotolizi, karbonhidratların karanlık fermentasyonu ve organik asitlerin ışıklı/aydınlık fermentasyonu ile üretilmektedir (Kotay ve Das 2008). Algler ile hidrojen üretimi diğer yöntemlere kıyasla çok yavaş olup, suyun fotolizi esnasında açığa çıkan oksijen gazı hidrojen üretiminde görev yapan hidrogenaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi oluşturmaktadır. Karanlık fermentasyon (KF) alglerle hidrojen üretimine göre daha hızlı olup, karbonhidrat içeren atık maddeler *Clostridium*, *Enterobacter* ve anaerobik çamur gibi mikrobiyal kültürler vasıtasıyla hidrojen, CO_2 ve organik asitlere dönüştürmektedir. Bu prosesin dezavantajı; sıvı ortamda biriken organik asitlerin önemli miktarda hidrojen içermesi ve mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisi oluşturmasıdır. Bu organik asitler ancak çok sıkı işletme koşulları altında *Rhodobacteraceae* familyasından bazı foto-heterotrofik bakteriler yardımıyla H_2 ve CO_2 'e dönüştürebilmektedir (Kapdan ve Kargı 2006).

Karanlık fermentasyonda teorik olarak en yüksek hidrojen üretim verimine asetat ve CO_2 'in sentezlenmesi sonucunda ulaşılabilmektedir. Halbuki pratikte proton ve organik ara ürünlerin elektron kazanmak için rekabeti asetattan daha çok indirgenmiş (propiyonat, bütirat, uzun alifatik asitler, laktat, format, alkoller ve ketonlar) karmaşık bileşiklerin oluşmasına ve dolayısıyla hidrojen üretim veriminin düşmesine neden olmaktadır (Hallenbeck 2005). Karanlık fermentasyonda en yüksek teorik verim 4 mol H_2 /mol glikoz olmasına rağmen elde edilen verimler 1 ila 3 mol H_2 /mol glikoz arasında değişmektedir. 3.5 mol H_2 /mol glikoz civarında verimler rapor edildiye de bunlar istisnai durumlar olup geneli temsil etmemektedir. Hidrojen üretim verimini 4 mol H_2 /mol glikoz üzerine çıkartmanın iki yolu vardır. Bunlardan birincisi karanlık fermentasyon çıkış suyunun ardışık ışıklı fermentasyona tabi tutulması ve mevcut organik asitlerin bu esnada parçalanmasıyla elde edilebilir. İkinci yol ise karanlık fermentasyon çıkış suyundan doğrusal elektrik akımı yardımıyla Elektroliz (EH) ile hidrojen üretilmesidir. Karanlık fermentasyonda sıvı fazda asetik asit oluşması durumunda glikozdan hidrojen üretim

basamağı eşitlik 1'de gösterilmiş olup (Valdez-Vazquez ve Poggi-Varaldo 2009), asetik asitten elektrohizoliz ile H₂ üretimi eşitlik 2'de yer almaktadır (Hawkes vd. 2007).



Karanlık fermentasyon çıkış suyu organik asit konsantrasyonunun seyreltilmesi ve amonyum iyonlarının uzaklaştırılması gereği, santrifüjleme ve sterilizasyon gibi ön işlem gerektirmesi, ışıklı fermentasyon prosesini ekonomik ve uygulanabilirlik yönlerinden olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle ışıklı fermentasyonun yerini alabilecek, organik asitlerden yüksek verim ve saflıkta hidrojen gazı üretebilen ve uygulaması avantajlar sunan elektrohizoliz yönteminin karanlık fermentasyon çıkış suyuna uygulanması veya doğrudan karanlık fermentasyona entegre edilmesi büyük önem kazanmıştır. Literatürde hidrojen üretimi için incelenen diğer elektroliz prosesleri; alkali elektroliz, proton değişim membran (PEM) kullanılan mikrobiyal elektroliz hücreleri ve katı oksit elektroliz hücreleridir (SOEC) (Kargi ve Uzunçar 2012).

Teorik olarak 1 mol glikozun ardışık karanlık ve ışıklı fermentasyona tabi tutulmasıyla 12 mol hidrojen molekülü elde etmek mümkündür (Ni vd. 2006). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bahsedilen fermentasyon ile teorik verimin ancak % 60 ına ulaşılmıştır (Yokoi vd. 2002). Sellülozun ham madde olarak kullanıldığı ardışık karanlık ve elektrohizogenesis prosesinde bu verim % 83'e çıkarılmıştır (Lalauette vd. 2009). Hidrojen üretiminin ekonomik sayılabilmesi için üretim veriminin 8 mol H₂ /mol glikoz üzerinde çıkartılması gerekmektedir (Chen vd. 2010) ancak bu değere sadece fermentasyon basamakları ile henüz ulaşamamıştır.

Yukarıda adı geçen elektrohizogenesis terimi, mikrobiyal elektroliz hücresi (MEC) olarak adlandırılan bir cihazda çözünebilir organik moleküllerden hidrojen (H₂) gazı üretimini ifade eder (Logan 2004). Mikrobiyal elektroliz hücresinde anotta bulunan organik maddelerin bakteriler tarafından okside edilmesiyle oluşan elektronlar akım vasıtasıyla katoda iletilir ve sıvıdaki protonlar yükseltgenerek H₂ gazı oluşur. H₂ üretim reaksiyonu endotermik olduğu için sisteme dışarıdan güç kaynağı vasıtasıyla elektron verilmesi gerekir. Ancak MEC'lerde PEM kullanımı, indirgenme ve yükseltgenme basamaklarının iki ayrı bölmede gerçekleşmesi bu prosesin başlıca dezavantajlarını oluşturmaktadır.

Literatürde karanlık fermentasyon çıkış suyundan elektrohizoliz prosesi ile hidrojen üretimi son beş yılda çalışılan bir konu olup, birkaç patent dışında yayın sayısı oldukça azdır. Elektrohizoliz prosesinde, çözeltiye doğrusal elektrik akımı verilmesiyle, anotta oluşan elektronlar sıvı ortamda organik asitlerin parçalanması ile oluşan protonlar ile katot üzerinde

birleşerek hidrojen gazı üretilmektedir (Kargi ve Arıkan 2013a). Bu proseste yüksek saflıkta hidrojen üretiminin tek bölmeli reaktörde düşük elektrik akımlarıyla, PEM (proton değişim membranı) ve saf kültür mikroorganizmaya ihtiyaç duyulmadan gerçekleşmesi MEC'lere kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Bugüne kadar elektrohizoliz prosesi ile karanlık fermentasyon çıkış suyundan (Tuna vd. 2009), deponi alanı sızıntı suyundan (Kargi ve Catalkaya 2011a), zeytinyağı karasuyundan (Kargi ve Catalkaya 2011b) ve peyniraltı suyundan (Kargi ve Uzunçar 2012b) hidrojen üretimi çalışılmıştır. Bunlar arasında en yüksek hidrojen üretim performansı peynir altı suyundan simultane karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz ile elde edilmiştir. 5 Volt doğrusal akım ve 158 saat işletme süresinde elde edilen hidrojen üretim potansiyeli, hidrojen üretim verimi ve hızı sırayla 5551 mLH₂, 1709 mLH₂ /gKOİ ve 913 mLH₂ /gün olmuştur. Elde edilen hidrojen %99 saflıkta doğrudan mikrobiyal yakıt hücresinde kullanıma hazır formda üretilmiştir (Kargi ve Uzunçar 2012b).

Selüloz içeren atık maddelerin fermentasyonla hidrojen gazı üretiminde ham madde olarak kullanımı büyük önem taşımaktadır. Çünkü dünyada selüloz en bol bulunan biyopolimer olup sürdürülebilir enerji üretimi için önemli bir potansiyel sunmaktadır (Levin vd. 2007). Bu anlamda kağıt atıkları lignoselülozik atıklar içerisinde selüloz yüzdesi en yüksek (%85-99) atık olması nedeniyle hidrojen üretimi için potansiyel bir ham madde durumundadır (Howard vd. 2003). Ülkemizde yaklaşık atık kağıt üretimi 3 milyon ton olup (MARKA Doğu Marmara Kalkınma Ajansı 2014), bu atığın hidrojen üretiminde yakıt olarak kullanımı büyük önem kazanmaktadır. Ancak selüloz yapısındaki kuvvetli β -(1-4) glikozidik bağları bu molekülün yapısındaki glikoz moleküllerinin doğrudan fermentasyonda kullanımı için bir bariyer teşkil etmektedir. Bu nedenle selülozun fermentasyon öncesinde hidroliz edilerek glikoz, sellobiyoz gibi basit şekerlere dönüştürüldükten sonra kullanılması gerekmektedir. Selüloz hidrolizi enzimatik, ya da kimyasal hidroliz işlemleri ile yapılabilmektedir. Enzimatik hidrolizin yavaş ve zahmetli olması nedeniyle kimyasal hidroliz işlemleri daha çok tercih edilmektedir. Lignoselülozik atıkların ön işleminde uygulanan proseslerin başlıcaları; kuvvetli ve seyreltik asit hidrolizi, amonyum lif patlatma, buhar patlama, sıvı sıcak su, ile muamele, kireç kullanımı, iyonik sıvı kullanımı ve organosolv prosesleridir (Agbor vd. 2011; Conde-Mejía vd. 2012).

Literatürde selülozik atıklardan hidrojen üretimi üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup, kağıt atıklarından karanlık fermentasyon ve elektrohizoliz yöntemleri kullanılarak rapor edilen çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle ele alındığında projenin yüksek saflıkta, yüksek hız ve verimde atık kağıttan hidrojen üretimine yönelik olması, zahmetli olan aydınlık fermentasyona alternatif sunması nedeniyle literatüre özgün katkılar sunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizma

Karanlık fermentasyon deneylerinde, kaynatma işlemine tabi tutulmuş anaerobik çamur kullanılmıştır. Bu çamur, İzmir'in Tire ilçesinde bulunan MONDİ Kağıt fabrikası anaerobik arıtma tesisinden temin edilmiştir. Çamurun kaynatılmasındaki amaç hidrojen tüketimine neden olan metanojen ve homo-asetojen bakterilerin inaktive edilmesi ve hidrojen üretme kabiliyetindeki spor oluşturan bakterilerin baskın hale getirilmesidir. Çamur kaynatma işlemi pH:5.9'da bir saat süreyle çeker ocak altında miknatıslı karıştırıcı üzerine yerleştirilen cam beher içerisinde yapılmıştır. Kaynatma işleminin ardından yeterli biyokütle konsantrasyonunun eldesi amacıyla çamur, iki gün süreyle 36 °C'de inkübe edilmiştir. Biyokütle konsantrasyonu, elde edilen bakteri çözeltilisinin standart metotlara göre askıda katı madde konsantrasyonunun tayin edilmesiyle belirlenmiştir. Besi ortamında karbon kaynağı olarak 10 g/L şeker içeren asit ön işleme tabi tutulmuş hidrolizat kullanılmış olup, C/N/P/Fe oranı 100/2/0.2/0.125 olacak şekilde NH₄Cl, KH₂PO₄ ve FeSO₄.7H₂O ilavesiyle ayarlanmıştır. Bunların dışında büyüme ortamına 0.2 g/L MgSO₄.7H₂O ve 0.1 g/L L.cysteine.HCl ilave edilmiştir. Besi sıvısı üstünde bulunan gaz faz argon ile süpürülerek ortamdaki oksijen uzaklaştırılmıştır. 10 g/L glikoz içeren şeker çözeltisi, 20 g/L kağıt peçetenin 135 °C, pH:1'de 15 dakika otoklavlanmasıyla elde edilmiştir.

3.2 Kağıt Atığı

Deneylerde kağıt atık türü olarak Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi (PAUMF) tuvaletlerinde el kurulama amacıyla kullanılan atık kağıt havlular seçilmiştir. %100 selülozdan oluşan bu atık fermentatif H₂ üretimi şeker ihtiyacını karşılamak için önemli bir ham madde kaynağı oluşturmaktadır. 2009 yılında sadece Avrupa'da yaklaşık 7 milyon ton (European Commission 2011) havlu cinsinden kağıtların tüketildiği düşünülürse bu atığın H₂ üretimi için ne kadar önemli, potansiyel bir ham madde olduğu anlaşılmaktadır. Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Akredite Atıksu Laboratuvarında yaptırılan kompozisyon analizlerine göre kullanılan atık kağıt içerisindeki toplam azot (TN), toplam fosfor (TP) ve toplam karbon (TC) içerikleri sırasıyla 470 mg/kg, < 1 mg/kg ve 574162 mg/kg olarak belirlenmiştir.

3.3 Deneysel Çalışmalar

3.3.1 Kağıt Atığının Ön İşlenmesi

Bu basamağın amacı kağıt atığından karanlık fermentasyonda kullanılacak olan substratın hazırlanması olup, başlıca basamaklar boyut küçültme, asit hidroliz ön işlemi, nötralizasyon ve nutrient ilavesinden oluşmaktadır. Bu kapsamda yapılan işlemler aşağıda özetlenmiştir:

- Boyut küçültme: Kağıt atığının yüzey alanını arttırmak ve asit hidrolizinin daha etkili olmasını sağlamak amacıyla temin edilen atık, makas ve blender yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Boyutu küçültülen atık kağıt, derin dondurucuda saklanarak ihtiyaç duyulduğunda istenilen atık çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- Asit-hidroliz ön işlemi: Bu basamakta kağıt atığı selüloz molekülleri arasındaki bağlar kırılarak glikoz moleküllerinden oluşan şeker çözeltisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Bunun için atıktan belirli pH (H_2SO_4) ve katı/sıvı oranında çözelti hazırlandıktan sonra, çözelti sürede otoklavda asit hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Deneyler 300 mL serum şişelerinde yapılmış olup, deney koşulları istatistiksel deney tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla Design Expert yazılımı kullanılmıştır. Asit hidroliz deneylerinde kağıt/sıvı oranı, işlem süresi ve pH'nın şeker oluşumu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Deneylerin amacı birim atıktan şeker oluşumunu maksimize eden koşulların tespit edilmesi olmuştur. Glikoz cinsinden toplam şeker konsantrasyonu fenol asit yöntemiyle tayin edilmiştir. Deneylerde katı (kağıt)/sıvı oranı (X_1), süre (X_2) ve pH (X_3) bağımsız değişkenler olarak seçilirken, hidrolizat içerisindeki şeker konsantrasyonu (g/L) (Y) amaç fonksiyon olarak esas alınmıştır. Optimizasyonda amaç fonksiyonunun (Y) bağımsız değişkenler (X_n) ile olan korelasyonu aşağıda verilen (Eş.3) kuadratik eşitlik ile yapılmıştır. Burada Y: amaç fonksiyonunu, X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişkenleri, b_0 : eşitlik sabitini; b_1 , b_2 , b_3 lineer; b_{12} , b_{13} , b_{23} interaksiyon ve b_{11} , b_{22} , b_{33} kuadratik sabitleri ifade etmektedir.

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

(Eş. 3)

Otoklav işlemi esnasında gözlemlenen buharlaşma olayı nedeniyle hidrolizatta ölçülen glikoz ve HMF konsantrasyonları buharlaşmadaki su kaybı dikkate alınarak eşitlik 4'e göre düzeltilmiştir Breuer vd. (2014).

$$C_D = C_s \times (V_s/V_D) \quad (\text{Eşit.4})$$

Burada; C_D : Buharlaşma dikkate alınarak düzeltilen glikoz veya 5-HMF konsantrasyonu (g/L), C_s : Asit hidrolizi sonrası hidrolizatta ölçülen glikoz veya 5-HMF konsantrasyonu (g/L), V_s : Asit hidrolizi sonrası hidrolizat toplam hacmi (L), V_D : Asit hidrolizi öncesi kağıt ve asit çözeltisi toplam hacmi (L).

- c. Nötralizasyon: Karanlık fermentasyon öncesi optimum asit hidroliz şartlarında elde edilen şeker çözeltisinin pH'sı 3M KOH çözeltisi kullanılarak nötralize edilmiştir.
- d. Nutrient ilavesi: Nötralize edilen şeker çözeltisinin C/N/P/Fe oranı bu projede karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi için belirlenen en ideal değer olan 100/5/9/0.278 olacak şekilde dışarıdan NH_4Cl , KH_2PO_4 ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilavesiyle sağlanmıştır.

3.3.2 Karanlık Fermentasyon

Deneyler 300 mL serum şişelerinde mezofilik şartlarda ($T = 36 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5.5- 6.0$) ve kesikli işletme koşullarında inkübatörde yapılmıştır. Şeker çözeltisinden hidrojen ve organik asit oluşumunun gerçekleştiği bu basamakta hidrojen oluşum verimi ve hızını maksimize eden şartlar belirlenmiştir. Bu kapsamda başlangıç biyokütle ve substrat konsantrasyonlarıyla ile C/N/P oranının hidrojen üretimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. C/N/P oranının hidrojen üretim verimi ve hızı üzerine olan etkilerinin araştırılması esnasında bölüm 3.3.1.a'da sunulan Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Anaerobik şartlar ortama eklenen indirgeyici L-Cystein.HCl ile sıvı üst fazından argon gazı geçirilerek sağlanmıştır. Deneyler esnasında sıvı ve gaz numuneler alınıp ölçülerek fermentasyon performansı takip edilmiştir. Sıvı faz numuneler, katı maddeler santrifüjlenip uzaklaştırıldıktan sonra şeker ve toplam uçucu organik asit ölçümlerine tabi tutulmuştur. Şeker konsantrasyonu ölçümleri fenol asit yöntemiyle, toplam uçucu organik asit (TVFA) konsantrasyonuysa fotometrik olarak analitik kitler yardımıyla yapılmıştır. Toplam gaz, sıvı yer değiştirme metoduyla belirlenirken bu gaz içerisindeki hidrojen yüzdesi GC'de analizlenmiştir. Sıvı yer değiştirme metodunda %2 H_2SO_4 ve %10 NaCl içeren çözelti kullanılmıştır. Deney seyri esnasında oluşan hidrojen gazı kümülatif olarak toplanarak hesaplanmıştır (Eşit.5) (Logan vd. 2002). Deney seyrine ait kümülatif hidrojen oluşumu verileri

Gompertz eşitliği (Lee vd. 2008) (Eş. 6) ile korele edilerek maksimum hidrojen üretimi potansiyeli, lag faz süresi ve hidrojen üretim hızı hesaplanmıştır.

$$V_{H_2,i} = V_{H_2,i-1} + V_W C_{H_2,i} + V_{G,i} C_{H_2,i} - V_{G,i-1} C_{H_2,i-1} \quad (\text{Eş.5})$$

burada $V_{H_2,i}$ = Kümülatif hidrojen hacmi (mL), V_W = Ölçülen toplam gaz (mL), $C_{H_2,i}$ = GC'de ölçülen hidrojen gazı konsantrasyonu, $V_{G,i}$ = Fermentör sıvısı üstü hava boşluk hacmi (mL).

$$H(t) = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) \right] + 1 \right\} \quad (\text{Eş.6})$$

burada, P = hidrojen üretim potansiyeli (mL), R_m = Hidrojen üretim hızı (mL H_2 /saat), λ = lag faz periyodu (saat), t = fermentasyon süresi (saat).

Karanlık fermentasyon deneylerinin performansının belirlenmesinde hidrojen üretim verimi (Eş.7) ve spesifik (özgül) hidrojen üretim hızı (Eş.8) esas alınmıştır.

$$Y = \frac{\Delta H_2}{\Delta S} \quad (\text{Eş.7})$$

burada, Y = mol H_2 /mol substrat veya mL H_2 /g KOİ, ΔH_2 : Deney süresince üretilen kümülatif H_2 (mol veya mL cinsinden) ve ΔS = tüketilen substrat (mol glikoz veya g KOİ cinsinden) dir.

Özgül Hidrojen Üretim Hızı (SHÜH):

$$SHÜH = \frac{R_m}{V_o X_o} \quad (\text{Eş.8})$$

burada, V_o = Başlangıç sıvı hacmi (L), X_o = başlangıç biyokütle konsantrasyonu (g X/L), R_m : Gompertz eşitliğinden elde edilen hidrojen üretim hızı (mL H_2 /saat).

Hidrojen gazı mol sayısı Eş.9'e göre hesaplanmıştır.

$$PV = nRT \quad (\text{Eş.9})$$

burada, n = mmol H_2 gazı, P = 1 atm, V_{H_2} = üretilen hidrojen gazı hacmi (ml), R = 0.082 (L atm / mol K), T = sıcaklık (K).

3.3.3 Elektrohizoliz

Elektrohizoliz deneyleri karanlık fermentasyon ile elektrohizoliz basamaklarının ardışık ve birleşik işletilmesi şeklinde iki ayrı basamakta incelenmiştir. Ardışık KF-EH deneylerinde amaç; karanlık fermentasyon çıkış suyunda bulunan organik asitlerden elektrohizoliz yöntemiyle hidrojen üretim hızı ve verimini arttıran koşulların araştırılması olurken, birleşik KF-EH deneylerinde karanlık fermentasyon deney ortamına doğrudan elektrik akımı verilmesi suretiyle organik asitlerin eş zamanlı olarak uzaklaştırılması ve hidrojen üretimini maksimize eden şartların belirlenmesi olmuştur.

Elektrohidroliz deneylerinde gaz ve sıvı faz ölçümlerinde yukarıda verilen yöntemlerin aynısı takip edilmiştir. Ardışık KF-EH deneylerinde farklı olarak eşitlik 10'da verilen enerji dönüşüm verimi (η) hesaplanmıştır (Kargi ve Arıkan 2013b). Elektrot olarak Alüminyum çubuklar kullanılmış olup, gerilim ve akım değerleri MY64 Multimetre ile okunarak kayıt edilmiştir. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) deneyleri Standart Metotlara (Eugene vd. 2012) göre yapılmıştır.

$$\eta = EH_2 / E_e \quad (\text{Eşit.10})$$

burada; EH_2 oluşan hidrojen gazının toplam enerjisi (Eşit. 11) iken E_e ortama verilen toplam elektrik enerjisidir (Eşit. 12).

$$EH_2 = mH_2 \cdot (122 \text{ kJ/g } H_2) \quad (\text{Eşit.11})$$

burada; mH_2 : Kümülatif Hidrojen gazının gram cinsinden kütlesi, 122 kJ ise 1 gr hidrojen gazının enerji içeriğidir.

$$E_e = V \int I dt = V \sum I_i \Delta t_i \quad (\text{Eşit.12})$$

burada, V = voltaj, I = akım şiddeti, t (saat) de zamanı temsil etmektedir. Bu eşitlikte doğrusal akım değeri zamanla değişim gösterdiği için denklemin $I \times t$ kısmı, akım zaman grafiğinin alanı hesaplanarak belirlenmiştir (Kargi ve Arıkan 2013a).

Tüm deneyler 300 mL serum şişelerinde kesikli işletme modunda gerçekleştirilirken ardışık KF-EH deneyleri oda sıcaklığında, birleşik KF-EH deneyleri ise 36 °C sıcaklıkta işletilen inkübatörde yapılmıştır.

Ardışık KF-EH deneylerinde; voltajın, başlangıç TVFA konsantrasyonunun ve pH'nın hidrojen üretimine olan etkileri araştırılırken, birleşik KF-EH deneylerinde uygulanan voltajın, substrat konsantrasyonunun ve elektrot aralığının hidrojen üretim verimi ve hızı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Birleşik KF-EH deneyleri iki set olarak yapılmıştır. Bunlardan bir tanesinde pH kontrolü dışarıdan kimyasal (asit) ilavesi ile sağlanırken diğer sette pH kontrolü ortama doğrudan elektrik akımı verilmesiyle sağlanmaya çalışılmıştır.

Ardışık ve birleşik KF-EH deneylerinin performansı hidrojen üretim verimi ve hızı ile ölçülmüştür. Ardışık KF-EH deneyleri için, hidrojen üretim verimleri her bir basamak için ayrı ayrı hesaplandıktan sonra toplanmıştır. Ardışık KF-EH deneylerinde toplam verimin molH_2/mol glikoz olarak hesaplanması durumunda şu yöntem esas alınmıştır:

Deney ölçümlerine göre öncelikle KF için verim: molH_2/mol glikoz, EH için verim ise: molH_2/mol asetik asit olarak hesaplanmıştır. Toplam verim, EH veriminin molH_2/mol glikoz'a dönüştürüldükten sonra KF verimi (molH_2/mol glikoz) ile toplanmasıyla bulunmuştur. EH veriminin molH_2/mol glikoz'a dönüştürülmesinde organik asit ölçümleri asetik asit cinsinden

belirlendiği için, asetik asitin ne kadar glikozdan üretildiği yukarıda belirtilen Eş.1 ve Eş.2 reaksiyonları gereği hesap edilebilmektedir. Bu sayede EH basamağında belirlenen molH₂/mol asetik asit verimi molH₂/mol glikoz verimine dönüştürülebilmiştir. Bunların dışında mLH₂/gKOİ cinsinden ifade edilen verim değerleri KF ve EH basamakları için ayrı ayrı hesaplanıp toplandıktan sonra bulunmuştur.

Birleşik KF-EH deneylerindeyse toplam verim oluşan kümülatif hidrojen gazı mol sayısının, tüketilen toplam glikoz mol sayısına doğrudan bölünmesiyle veya kümülatif hidrojen hacminin tüketilen KOİ miktarına bölünmesiyle elde edilmiştir. Birleşik KF-EH deneylerinde verimin molH₂/mol glikoz'a dönüştürülmesine gerek yoktur çünkü Eş.1 ve Eş.2 reaksiyonları aynı ortamda gerçekleşmiştir.

3.4 Analitik Yöntemler

Hidrojen Gazı Analizi: Hidrojen gazı derişimi Agilent 7820A Gaz Kromotografında (GC) ölçülmüştür. Kolon olarak; Supelco, Carboxen™ 1010 PLOT Fused Silica Capillary Column, 30m x 0.53 mm, U.S. Patents 5-549-445 ve 5-607-580 ve taşıyıcı gaz olarak N₂ (8 mL/dak) kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 110°C, giriş sıcaklığı 230°C, dedektör sıcaklığı 250°C çalıştırılmıştır. Standart kalibrasyon gazları ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak H₂ gaz derişimi belirlenmiştir. Ölçümlerden önce kalibrasyon eğrisi, kalibrasyon gazı ile kontrol edilmiştir. Aynı yöntem ile gaz numunelerde hidrojen ile birlikte metan ve CO₂ gazları da takip edilmiştir.

Toplam şeker analizi: Toplam şeker analizi glikoz cinsinden fenol-asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (DuBois vd. 1956). Bunun için glikoz şekerine ait 0-100 mgL⁻¹ konsantrasyon aralığında standartlar hazırlanarak, fenol-asit yöntemi bu çözeltilere uygulanmıştır. Glikoz için spektrum taraması yapılarak fenol-asit yönteminde spektrofotometre ile en yüksek dalga boyu (487 nm) belirlenmiştir. Standart çözeltilere fenol-asit uygulaması sonrası 487 nm absorbans değerinde spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda elde edilen kalibrasyon denklemi: $y = 95,341x + 2,7923$, $R^2 = 0,99$ olarak bulunmuştur. Bu denklem bilinmeyen glikoz konsantrasyonlarının tayininde kullanılarak şeker ölçümleri yapılmıştır.

Selüloz Analizi: Kağıt atığı içerisindeki selüloz miktarı fenol-asit yöntemi (DuBois vd. 1956) kullanılarak tayin edilmiştir. Bunun için atık kağıt, fenol-asit yöntemi öncesinde hidroliz edilerek içerisindeki tüm selüloz moleküllerinin glikoza dönüştürülmesi sağlanmıştır (Ferrer vd. 2013). Bu

işlem için kağıt atığı önce bir saat süreyle %72'lik konsantre sülfirik asit çözeltisi içerisinde bekletildikten sonra elde edilen çözelti $\frac{1}{4}$ oranında seyreltilerek 121 °C'de bir saat süreyle otoklavlanmıştır. Elde edilen çözeltiliye fenol-asit yöntemi uygulanarak glikoz konsantrasyonu bulunmuştur. Bu miktar selülozdan glikoza donusum oranı olan 1.1 ile bölünerek selüloz konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu işleme göre hidroliz edilen 10.00 g/L'lik kağıt atığının belirlenen selüloz konsantrasyonu 10.00 ± 0.2 g/L olarak ölçülmüştür. Bu sayede kağıt atığının %100 selülozdan oluştuğu teyit edilmiştir.

5-HMF Analizi: Hidrolizat içerisindeki 5-HMF ölçümleri 280 nm dalgaboyunda Hach Lange (DR 5000) UV-visible spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Bunun için 5-HMF standardı kullanılarak (Sigma-Aldrich W501808 Aldrich, 5-HMF, \geq %99 purity) farklı konsantrasyonlarda 5-HMF içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 280 nm'de karşılık gelen absorbans değeri okutularak kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Zhang vd. 2013). Bu denklem bilinmeyen 5-HMF konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılmıştır.

Toplam uçucu yağ asiti analizi: Sıvı numunelerde toplam uçucu yağ asiti fotometre (PhotoLab S12) kullanılarak Merck firmasından temin edilen kitler yardımıyla yapılmıştır (Spectroquant, 1.01763.0001).

Biyokütle konsantrasyonu tayini: Standart metodlara göre yapılmıştır (Eugene vd. 2012).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kağıt Atığının Ön İşlenmesi

Kağıt atığı çözeltisinden asit hidrolizi ile karanlık fermentasyon için şeker eldesi deneyleri bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi Design-Expert yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Deney noktaları Design-Expert içerisinde bulunan Box-Behnken İstatistiksel deney tasarımı (BBİDT) yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre katı/sıvı oranı (g/mL) (X_1), süre (X_2) ve pH (X_3) bağımsız değişkenler olarak seçilirken, hidrolizattaki şeker konsantrasyonu (g/L) (Y) amaç fonksiyon olarak seçilmiştir. Bu kurguya göre bağımsız değişken aralıkları katı/sıvı oranı için X_1 : 20-100 g/L, süre için X_2 : 30-180 dakika ve pH için X_3 : 0-2 seçilerek BBİDT yöntemine göre iki tekrarlı 15 deneyden oluşan bir set deney tasarlanmış ve her bir deney için hidrolizattaki şeker ve HMF konsantrasyonları ölçülmüştür.

Değişkenlere ait aralıkların Design-Expert programına girilmesiyle oluşturulan deney tasarım noktaları ile elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar Tablo 1’de özetlenmiştir. Deneylerin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi amacıyla orta nokta üç defa tekrar edilmiştir. Tüm deneyler 300 mL serum şişelerinde, 121 °C’de otoklavda iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1’de görüldüğü gibi asit hidroliz işlemi sonunda elde edilen hidrolizattaki şeker konsantrasyonu 0.88-24.17 g/L arasında değişmiştir. Dikkat edilirse kağıt/sıvı oranı ile sürenin artırılması şeker oluşumuna pozitif katkı yaparken pH’nın artırılması şeker oluşumunu azaltmıştır. Herbir değişkenin şeker oluşumu üzerine olan katkısı Design-Expert yazılımının önerdiği model eşitliğinde (Eş. 13) daha net görülmektedir. Yazılımın önerdiği kodlanmış formdaki model bağıntısı eşitlik 14’te verilmiştir. Buna göre her bir değişkenin lineer katsayılarına (b_1 , b_2 ve b_3) bakıldığında, şeker oluşumu üzerine en yüksek etki pH ile olurken (b_3 : 6.81) bunu katı/sıvı oranı (b_1 : 3.87) ve hidroliz süresi (b_2 : 3.57) izlemiştir.

$$Y = - 1.63259 + 0.147990 X_1 + 0.037137 X_2 + 3.01829 X_3 + 6.236E-004 X_1X_2 - 0.11654 X_1X_3 - 0.026974 X_2X_3 \quad (\text{Eş.13})$$

$$Y = 8.26 + 3.87 X_1 + 3.57 X_2 - 6.81 X_3 + 1.87 X_1X_2 - 4.66 X_1X_3 - 2.02 X_2X_3 \quad (\text{Eş.14})$$

Tablo 1. Box-Behnken istatistiksel deney tasarım değerleri ve sonuçları tablosu.

Deney No	Değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri			Sonuçlar		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y		
	Kağıt/sıvı oranı (g/L)	Zaman (dak)	pH	Deneysel Sonuç	Model Tahmini	HMF Konsantrasyonu (g/L)
1	60 (0)	105 (0)	1.00 (0)	4.28	8.26	0.039
2	100 (+1)	30 (-1)	1.00 (0)	5.89	6.70	0.058
3	20 (-1)	105 (0)	2.00 (+1)	3.37	2.24	0.004
4	60 (0)	180 (+1)	2.00 (+1)	2.37	3.00	0.004
5	60 (0)	30 (-1)	2.00 (+1)	0.88	0.00	0.004
6	60 (0)	180 (+1)	0.00 (-1)	20.72	20.66	0.523
7	60 (0)	105 (0)	1.00 (0)	7.83	8.26	0.067
8	60 (0)	105 (0)	1.00 (0)	6.99	8.26	0.060
9	20 (-1)	180 (+1)	1.00 (0)	7.02	6.09	0.034
10	20 (-1)	105 (0)	0.00 (-1)	6.96	6.53	0.034
11	100 (+1)	180 (+1)	1.00 (0)	18.37	17.58	0.578
12	100 (+1)	105 (0)	2.00 (+1)	1.93	0.67	0.003
13	60 (0)	30 (-1)	0.00 (-1)	11.14	9.48	0.030
14	100 (+1)	105 (0)	0.00 (-1)	24.17	23.90	0.685
15	20 (-1)	30 (-1)	1.00 (0)	2.02	2.69	0.004

Design-Expert ile adımsal model uyumluluğu testi yapıldığında atık kağıttan şeker eldesi için en uygun modelin 2FI (Two factor interaction) model türü olduğu bulunmuştur. Buna göre modelin düzeltilmiş R² değeri (0.98) ile model tahmini R² (0.91) değerlerinin birbirine yakın ve yüksek değerde çıkması (>0.90) modelin uygulanabilirliğinin göstergesi olmuştur.

Model uyumluluğunun yeterliliğinin test edilmesi amacıyla Design-Expert yazılımında yapılan varyans analizi (ANOVA) Tablo 2'te özetlenmiştir. Tablo 2'te görüldüğü gibi model için önerilen p olasılık değerinin 0.05'ten düşük çıkması ve F değerinin 34.11 bulunması önerilen modelin önemli olduğuna işaret etmektedir. Bu durum diğer parametreler ve etkileşimleri için de analiz edildiğinde p değerleri 0.05'ten küçük çıkan X₁, X₂, X₃, X₁X₃ terimlerinin kağıt atığından asit

hidrolizi ile şeker oluşumu üzerine önemli etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Lack-of-Fit p-değerinin 0.05'ten yüksek çıkması model uyumluluğunun önemli olduğuna işaret etmektedir.

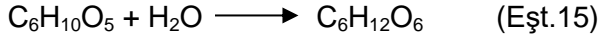
Tablo 2. Box-Behnken istatistiksel deney tasarımına ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.

Kaynak	Kareler	Serbestlik	Ortalama kare	F-değeri	P-değeri
	toplamı	derecesi			
Model	709.82	6	118.30	34.11	< 0.0001
X ₁ -Katı/sıvı oranı	120.03	1	120.03	34.61	0.0004
X ₂ -Süre	101.88	1	101.88	29.38	0.0006
X ₃ -pH	370.62	1	370.62	106.87	< 0.0001
X ₁ X ₂	14.00	1	14.00	4.04	0.0794
X ₁ X ₃	86.92	1	86.92	25.07	0.0010
X ₂ X ₃	16.37	1	16.37	4.72	0.0616
Kalan	27.74	8	3.47		
Lack of Fit	20.83	6	3.47	1.00	0.5766
Pure error	6.91	2	3.46		
Cor Toplam	737.56	14			

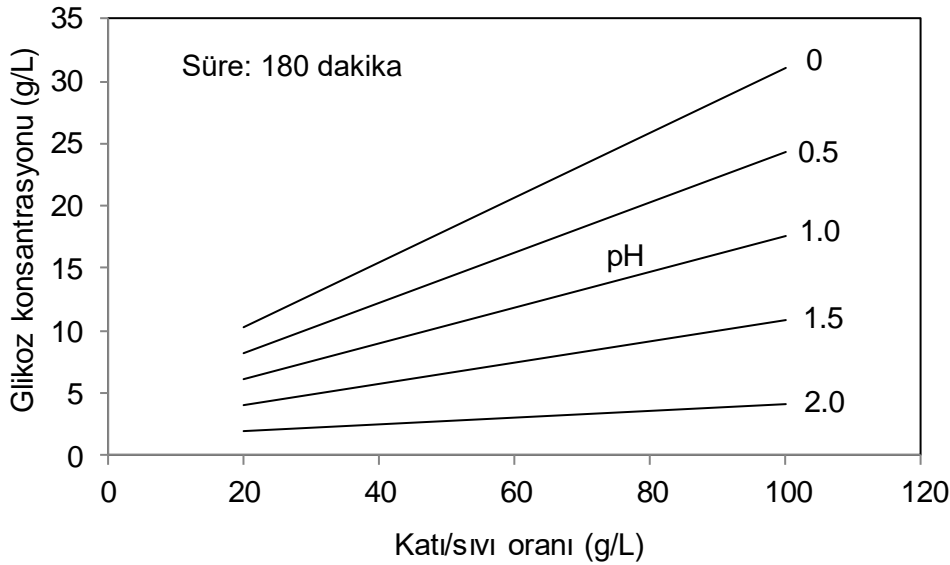
Elde edilen 2FI modele göre kağıt atığından asit hidrolizi ile en yüksek şeker eldesi sağlayan optimum koşulların; kağıt/sıvı oranı (g/L): 100, pH: 0, işlem süresi: 180 dakika olduğu ve bu koşullar altında 31.17 g/L şeker elde edilebileceği tahmin edilmiştir. Bu durumun teyit edilmesi amacıyla aynı koşullarda üç adet serum şişesinde asit hidrolizi gerçekleştirilmiş ve deney sonucunda elde edilen çözeltideki şeker konsantrasyonunun ortalama 32.17±0.37 g/L olduğu deneysel olarak bulunmuştur. Böylece modelin doğru sonuç verdiği deneysel olarak ta teyit edilmiştir.

Bu çalışmada seçilen bağımsız değişkenlerin, asit hidrolizi ile şeker oluşumu üzerine olan etkilerini daha rahat anlayabilmek için Eş. 13 kullanılarak farklı durumlar için şeker konsantrasyonları tahmin edilmiştir. Örneğin hidrolizattaki şeker konsantrasyonunun farklı pH değerleri için kağıt/sıvı oranlarına göre değişimi Şekil 1'de gösterilmiştir. Buna göre farklı pH değerleri için sabit hidroliz süresinde (180 dakika), kağıt/sıvı oranı 0.02'den 0.1'e yükseldiğinde hidrolizattaki şeker konsantrasyonu artış göstermiştir. Bu artış düşük pH (pH<1) değerlerinde daha etkiliyken yüksek pH (pH>1) seviyelerinde daha az olmuştur. Asit hidrolizi esnasında sıcaklık ve basınç etkisiyle selüloz molekülleri arasına su katılımı olup, β-glikozidik bağlar

kırılarak glikoz monomerleri oluşur. Bu durum Eş. 15'de şöyle özetlenebilir. Buna göre teorik olarak 1 gr selülozdan 1.1 glikoz elde edilebilir (Jeihanipour vd. 2010).



β -glikozidik bağların kırılabilmesi için selüloz molekülü arasında bulunan dördüncü karbona bağlı oksijen atomuna hidronyum iyonunun katılması gerekir (Guo vd. 2012). Böylece buradaki bağ kırılarak selüloz zincirinde kopmalar meydana gelir. Dolayısıyla ortamdaki hidronyum iyonlarının varlığı ile sıcaklık, süre, basınç gibi diğer çevresel etkiler bu bağların kırılması üzerinde etkili mekanizmaları oluşturur. Şekil 1'de görüldüğü gibi sabit pH değerlerinde kağıt/sıvı oranının arttırılması ile ortamdaki şeker konsantrasyonu artmıştır. Kağıt miktarının artması koparılan β -glikozidik bağların da sayısında artışa dolayısıyla şeker konsantrasyonunun yükselmesine neden olmuştur. Yüksek pH değerinde (pH: 2) ise kağıt/sıvı oranının arttırılması bağların kırılması için yeterli gelmemiştir.



Şekil 1. Şeker konsantrasyonunun farklı pH değerlerinde kağıt/sıvı oranlarına göre değişimi.

Şeker konsantrasyonunun farklı hidroliz süreleri için kağıt/sıvı oranına göre değişimi Şekil 2'de gösterilmiştir. Yukarıda açıklandığı üzere sabit deney süresinde kağıt/sıvı oranı arttırıldığında şeker konsantrasyonu artmıştır. Daha yüksek alıkonma süreleri şeker konsantrasyonunun da artışını sağlamıştır. Burada en yüksek şeker oluşumu (31.06 g/L) 180 dakikalık deney süresinde elde edilmiştir. Literatürde sıcaklık, deney süresi ve pH'nın asit hidroliz verimi üzerine olan

toplam etkisi hidroliz şiddeti (severity factor, R_o) parametresi ile açıklanmaktadır (Panagiotopoulos vd. 2011).

$$\text{Log}(R_o) = \text{Log} [t \cdot \exp [(T- 100)/14.75]] \quad (\text{Eş. 16}) \quad \text{burada};$$

R_o : Severity faktörü

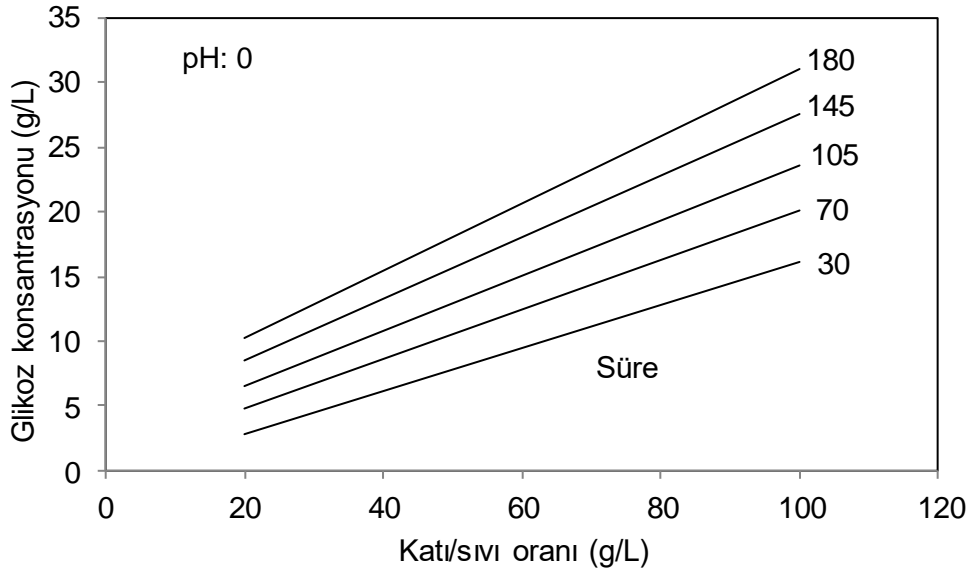
t : Hidroliz süresi (dakika)

T : Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)

pH değeri de hidroliz üzerinde etkili olup bu eşitliğe uyarlandığında toplam severity (CS) veya toplam hidroliz şiddeti şu eşitlik ile ifade edilir:

$$\text{CS} = \text{Log } R_o - \text{pH} \quad (\text{Eş. 17})$$

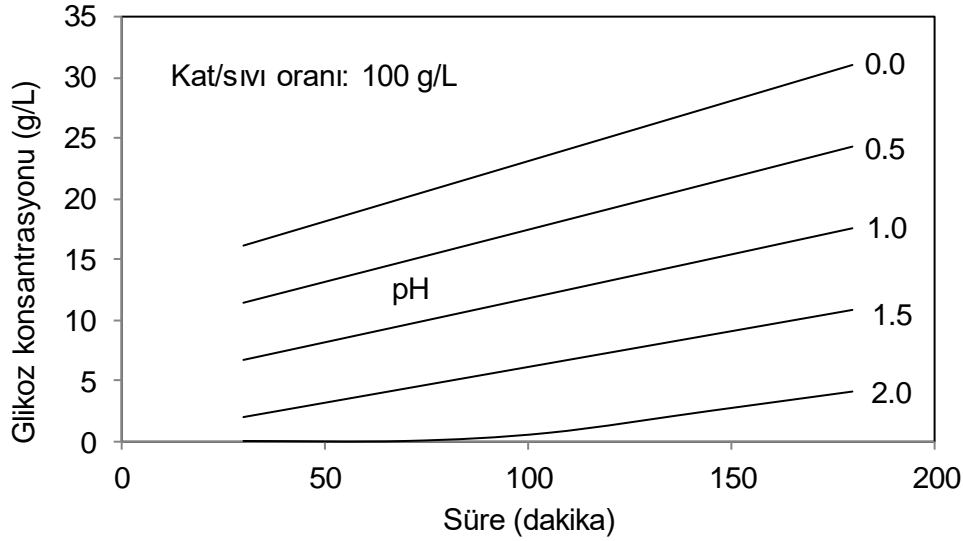
Buna göre sıcaklık ve deney süresinin artması ile pH'nın azalması daha şiddetli asit hidrolizinin elde edileceğine işaret etmekte olup bu durum bu çalışmada elde edilen deney sonuçları ile uyumlu çıkmıştır.



Şekil 2. Şeker konsantrasyonunun farklı sürelerde katı/sıvı oranlarına göre değişimi.

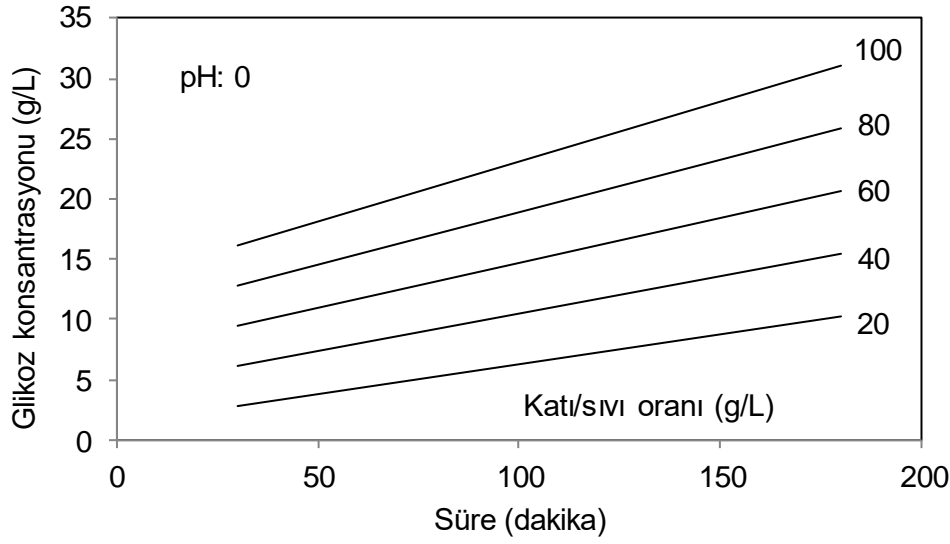
Şeker konsantrasyonunun farklı pH değerleri için süreye göre değişimi Şekil 3'te gösterilmiştir. Şekil 3'te tüm koşullar için katı/sıvı oranı 100 g/L'de sabit tutulmuştur. Görüleceği gibi sabit pH değerleri için deney süresi arttırıldıkça hidroliz şiddetindeki artış ile orantılı olarak çözeltiye

geçen şeker konsantrasyonu da artmıştır. En yüksek şeker oluşumu pH:0 değerinde elde edilmiştir. pH'nın 2'de tutulması etkili şeker oluşumuna katkı sağlayamamıştır. pH: 0 ve pH: 2 için aynı deney süresi (180 dakika) ve sıcaklıkta (121 °C) Eşit. 17'e göre toplam hidroliz şiddeti hesaplandığında sırayla 2.87 ve 0.87 değerleri elde edilmekte olup, tüm parametreler sabit tutulduğunda bile sadece pH değişimi ile hidroliz verimliliğinin ne kadar etkili olabileceği anlaşılmaktadır.



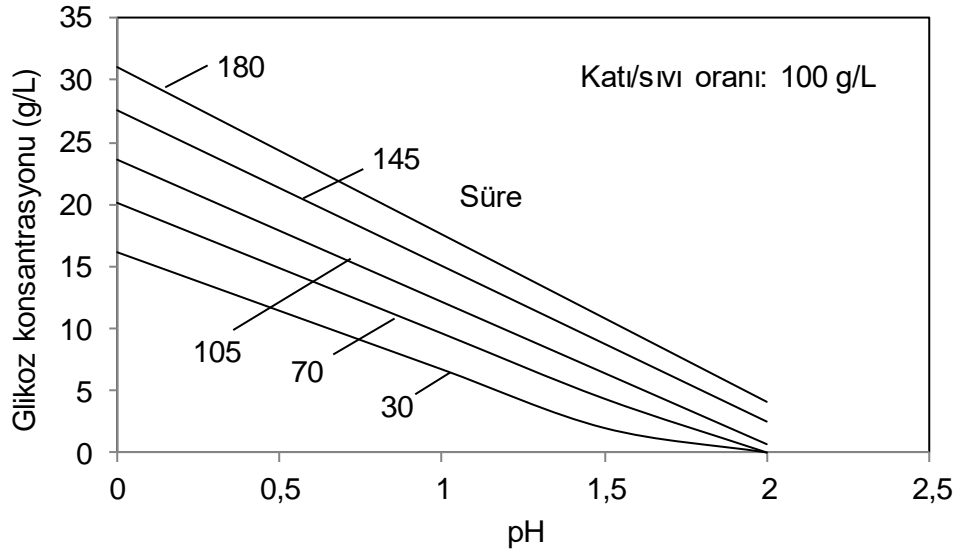
Şekil 3. Şeker konsantrasyonunun farklı pH değerlerinde sürelerle göre değişimi.

Şeker konsantrasyonunun farklı kağıt/sıvı oranlarında süreye göre değişimi Şekil 4'te verilmiştir. Görüldüğü gibi pH ve kağıt/sıvı oranı sabit tutulduğunda hidroliz süresinin arttırılması şeker konsantrasyonunun da artmasını sağlamıştır. Kağıt/sıvı oranı 20'de tutulduğunda hidrolizattaki şeker konsantrasyonu en fazla 10.25 g/L civarına çıkarken bu oran 100'e yükseltildiğinde şeker konsantrasyonu 31.06 g/L civarına yükselmiştir.

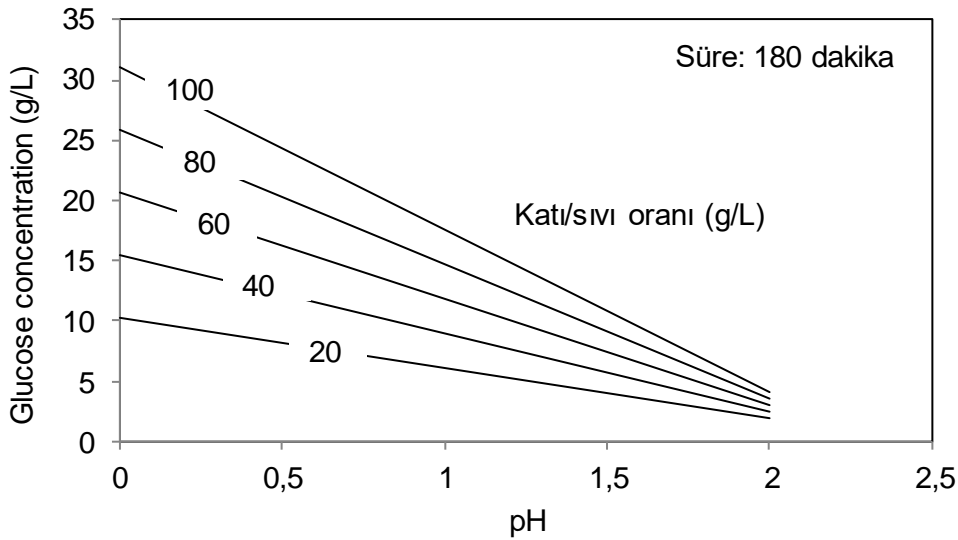


Şekil 4. Şeker konsantrasyonunun farklı kağıt/sıvı oranlarında sürelerle göre değişimi.

Katı/sıvı oranı 100 g/L'de sabit tutulup şeker konsantrasyonunun farklı sürelerde pH'ya göre değişimi Şekil 5'te gösterilmiştir. Burada da süre ve pH'nın asit hidrolizi üzerindeki etkisi açıkça görülmektedir. Aynı hidroliz süresi için pH değeri yükseldikçe elde edilen şeker konsantrasyonu düşmüştür. En yüksek şeker oluşumu pH:0 ve 180 dakika hidroliz süresinde elde edilmiştir. Hidroliz süresi 180 dakikada sabit tutulup farklı kağıt/sıvı oranlarının pH'a göre değişimi ise Şekil 6'da sunulmuştur. Buna göre katı/sıvı oranı sabit tutulsa dahi pH değeri yükseltilecek olursa şeker konsantrasyonunun düştüğü görülmektedir. Sonuç olarak yapılan çalışmada kağıt/sıvı oranının, pH ve sürenin kağıt atığından asit hidrolizi ile şeker eldesinde önemli etkileri olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar literatürdeki teorik bilgiler ile de uyum göstermiştir.



Şekil 5. Şeker konsantrasyonunun farklı sürelerde pH değerlerine göre değişimi.

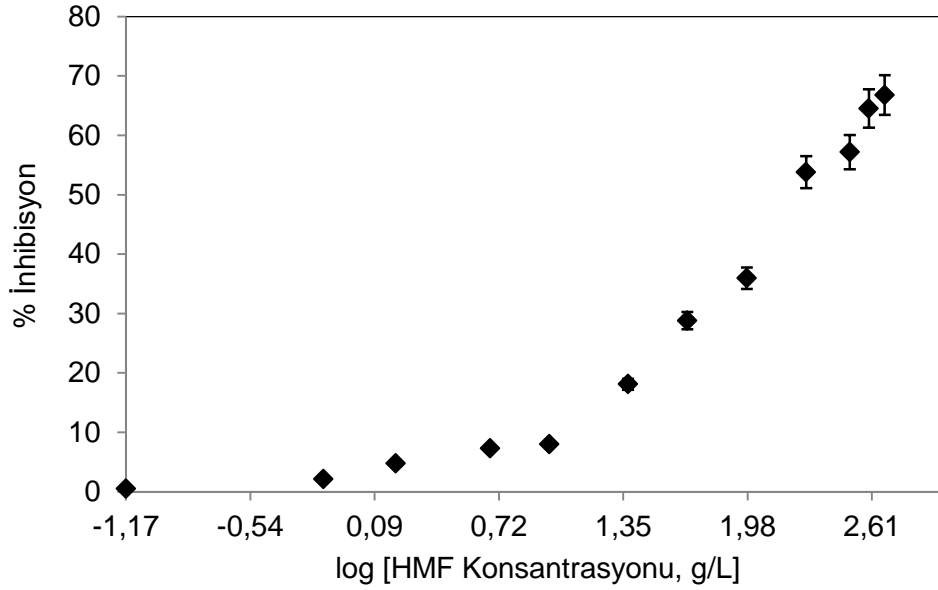


Şekil 6. Şeker konsantrasyonunun farklı kağıt/sıvı oranlarında pH değerlerine göre değişimi.

Yukarıda sunulan çalışmaya göre asit hidroliz şartları; 121°C sıcaklık, pH:0, 180 dakika süre ve 100 g/L kağıt/sıvı oranına ayarlandığında 31.06 g/L şeker elde edilebileceği bulunmuştur. Bu miktar, karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi için gerekli olan asgari 20 g/L şeker

konsantrasyonundan daha fazla olduğu için hidrolizat rahatlıkla H₂ üretimi deneylerinde kullanılabilir potansiyelindedir. Literatürde, selülozdan asit hidrolizi ile en fazla %70 civarında şeker dönüşümünün gerçekleştirilebileceği rapor edilmiştir (Jeihanipour et al., 2011). Bu çalışmanın sonuçlarına göre 100 g/L kağıt/sıvı oranında optimum şartlar altındaki şeker dönüşüm veriminin %29.24'tür.

Selülozun asit hidrolizinde, hidrolizatta oluşan önemli ürünlerden biriside 5-(hydroxymethyl)-furfural (5-HMF) bileşimidir. Bu çalışmada, hidroliz sonrası şeker ile birlikte oluşan HMF konsantrasyonları Tablo 1'de en sağ sütunda gösterilmiştir. 5-HMF endüstride birçok ürünün ham maddesi olarak kullanılabilirdiği gibi yakıt olarak ta değerlendirilebilmektedir. Ancak fermentasyon ortamında belirli bir miktarın üzerinde bulunması halinde mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye neden olur. Bu çalışmada elde edilen şeker şurubundan karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi hedeflendiği için hidrolizatta bulunan 5-HMF miktarının önemi artmaktadır. Bu nedenle şeker ile birlikte 5-HMF oluşumları da incelenmiş ve toksik seviyenin altına düşürülmesi için uygulanabilecek tedbirler üzerinde çalışılmıştır. 5-HMF, yüksek sıcaklıkta glikoz molekülünden su kopmasıyla oluşan organik bir bileşiktir. Tablo 1'de dikkat edilirse, şeker konsantrasyonunun artmasıyla HMF konsantrasyonu da artış göstermiştir. Şeker konsantrasyonunun < 3g/L olduğu koşullarda 5-HMF 10 mg/L'nin altındayken, 20 g/L'nin üzerindeki şeker konsantrasyonlarında 685 mg/L HMF seviyelerine ulaşılmıştır. Literatürde HMF'nin *Crustacea* ve *Daphnia magna* üzerindeki akut toksisitenin sırayla 54 ve 78 mg/L 5-HMF olduğu rapor edilmiştir (AVA Biochem 2012). Bu çalışmada gerçek hidrolizat kullanılarak *Bacillus cereus* bakterisi üzerinde resazurin toksisite deneyi yapılarak dehidrogenaz toksisitesi belirlenmiştir. Şekil 7'da görüleceği gibi 5-HMF konsantrasyonu arttıkça dehidrogenaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi de artış göstermiştir. Buna göre %50 dehidrogenaz inhibisyonuna neden olan 5-HMF konsantrasyonuna ait EC₅₀ değeri 197.24 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu durum karanlık fermentasyon öncesinde 5-HMF konsantrasyonunun 197.24 mg/L seviyesinin altına çekilmesi gerekliliğini doğurmuştur.



Şekil 7. HMF konsantrasyonunun *Bacillus cereus* üzerindeki inhibisyonu.

Literatürde 5-HMF giderimi ile ilgili birçok çalışma bulunmakta olup bunlardan en yaygın olarak kullanılanı aktif karbon uygulamasıdır. Bu bilgiye dayanarak Konfrut meyve suyu fabrikasından 5-HMF giderimi amacıyla kullanılan aktif karbon temin edilerek HMF giderimi sağlanmıştır. Buna göre 800 mg/L HMF içeren hidrolizattaki HMF konsantrasyonu ard arda 20 saatlik aktif karbon işleme tabi tutularak 10 mg/L'nin altına düşürülmektedir. Buna göre ilk 20 saatte, hidrolizat 5 g/L aktif karbon içeren 1 L'lik erlenlerde 40 °C'da 150 rpm de çalkalanmakta ve deney sonunda hidrolizat aktif karbondan süzülerek ayrılmaktadır. İkinci 20 saatte ise aktif karbonu uzaklaştırılan hidrolizata yine aynı şartlarda 3 g/L taze aktif karbon ilave edilmektedir.

Hidrolizattaki 5-HMF toksisitesi resazurin indirgenme yöntemine göre belirlenmiştir (Liu 1983). Bu test, bakteri bünyesindeki dehidrogenaz enzimi etkisiyle resazurin kimyasalının rezorufine indirgenmesi sonucunda ortam renginin maviden pembeye dönüşümünün ölçülmesi prensibine dayanır (Liu 1983). Bunun için *Bacillus cereus* (ATCC 11778) adlı bakteri kullanılmıştır. Söz konusu bakteri 15 saat süreyle 500 mL'lik erlende, pH: 6.8'de ve 36 ± 1 °C sıcaklıkta büyütülmüştür. Bakterinin büyütülmesi için kullanılan besi ortamı bileşimi: glikoz (60 g L^{-1}), peptone (10 g L^{-1}), yeast extract (0.6 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25 g L^{-1}), K_2HPO_4 (1 g L^{-1}) ve KH_2PO_4 (1 g L^{-1})'den oluşturulmuştur. Toksikite testi basamakları farklı zamanlarda iki tekrarlı olarak uygulanmıştır (Brouwer 1991). Test için oluşturulan çözeltiler şunlardır:

Kontrol çözelti (A): 3.75 mL büyütme ortamı + 0.25 mL distile su + 1 mL resazurin

Hücre kontrol çözeltisi (B): 2.75 mL büyütme ortamı + 0.25 mL distile su + 1 mL hücre + 1 mL resazurin

Test çözeltisi (C): 2.75 mL büyütme ortamı + 0.25 mL test çözeltisi + 1 mL hücre + 1 mL resazurin

Test esnasında Resazurin kimyasalı her seferinde en son bileşik olarak ortama eklenmiştir. 20 dakikalık inkübasyon sonunda mikrobiyal aktivite 50 µL HgCl₂ (10 mg mL⁻¹) ilavesiyle sonlandırılarak çözeltiler 5000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen berrak çözeltilerin 610 nm'deki absobans değerleri Hach Lange (DR 5000) UV-visible spektrofotometresi kullanılarak kaydedilmiş ve herbir çözelti için bulunan değerler aşağıdaki denkleme konularak inhibisyon yüzdesi hesap edilmiştir.

$$\text{Toksosite İnhibisyon yüzdesi} = \frac{(C-B)}{(A-B)} \times 100 \quad (\text{Eş. 18})$$

Literatürde farklı kağıt atıklarından asit hidrolizi ile ilgili sonuçlar rapor edilmiştir. Örneğin Dubey vd. (2012) 100 g/L atık kağıdı 0.5 N H₂SO₄ ile 120 °C'ta 2 saat otoklavlayarak %18.36'lık dönüşüm verimiyle 12.42 g/L glikoz şurubu elde etmişlerdir (R₀: 2.67) . Başka bir çalışmada atık gazete kağıtları Parr otoklavında 200 °C, %2.5 H₃PO₄ ile 30 dakika asit hidrolizine tabi tutularak (R₀: 4.42) 52.63 g/L atıktan %26 glikoz dönüşüm verimi elde edilmiştir (Orozco vd. 2013). Salam vd. (2013) 15 g/L atık kağıttan 20% H₂SO₄ ile pH:5 ve 25 °C'te 1.5 saatte %28 dönüşüm verimiyle 4 g/L glikoz elde etmişlerdir. Fagan vd. (1971) 230 °C'ta 20 saniye içerisinde 25 g/L atık kağıttan %1 H₂SO₄ ile %52 dönüşüm verimiyle 25 g/L glikoz üretimine ulaşmıştır. Bir başka çalışmada 100 g/L oluklu kartonun otoklavda 3% H₂SO₄ ile 130 °C, R₀: 3.14 ile 180 dakika hidrolizinden 9.2 g/L glikoz elde edilmiştir (Yáñez vd. 2004). Bu çalışmada elde edilen en yüksek glikoz dönüşüm verimi (%29.10) 100 g/L katı/sıvı oranındaki kağıdın pH:0'da ve 121 oC'de 180 dakikada elde edilmiştir. Görüldüğü gibi literatürde glikoz verimleri ve severity faktörleri sırasıyla %14-52 ve 2.67-4.42 arasında değişmiştir. Hemen hemen tüm çalışmalar otoklavda H₂SO₄ kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen glikoz verimi (%29.10) Fagan vd. (1971)'nin rapor ettiği %52'lik glikoz veriminden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Fakat bu karşılaştırmada kullanılan kağıt cinsinin, hidroliz şartlarının, severity faktörünün ve reaktörün farklı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle hidroliz verimlerindeki farklılıkların hidroliz koşullarına göre değiştiği söylenebilir.

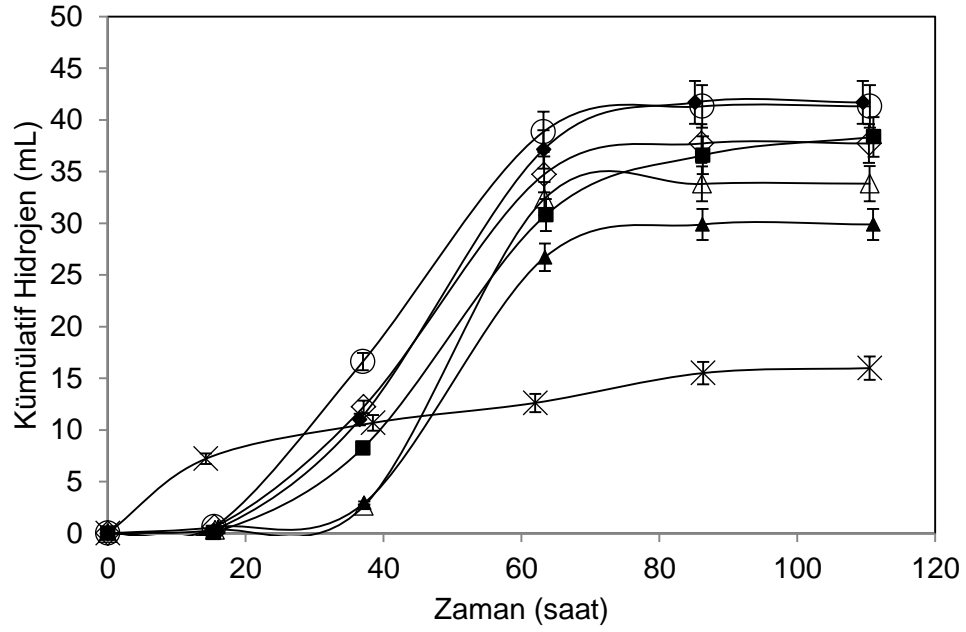
4.2 Karanlık Fermentasyon

4.2.1 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun Etkisi

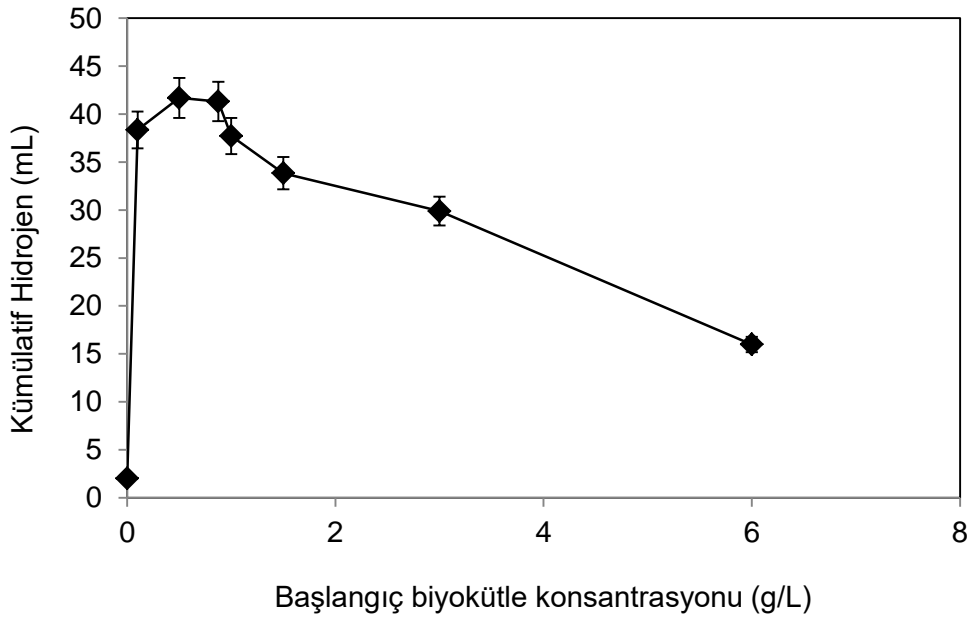
Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi deneyleri 300 mL'lik serum şişelerinde 45 mL çalışma hacminde, mezofilik şartlarda ($T= 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH: 5.5- 6.0), kesikli işletme koşullarında inkübatörde yapılmıştır.

Deney ortamında biyokütle konsantrasyonu dışındaki tüm şartlar aynı tutulmuştur. Deney başlangıcında şeker konsantrasyonu hidrolizat ile tüm şişelerde 7 g/L glikoz'a ayarlanmıştır. Bunların dışında ortama 2.8 g/L K_2HPO_4 , 3.9 g/L KH_2PO_4 , 15 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0.2 g/L L.cysteine.HCl ilave edilmiştir.

Kümülatif hidrojen gazı hacminin farklı biyokütle konsantrasyonları için zamana göre değişimi Şekil 8'de gösterilmiştir. Dikkat edilirse 6 g/L haricindeki tüm koşullarda hidrojen gazı üretimi yaklaşık 20 saatlik bir adaptasyon süresinden sonra üreilmeye başlanmıştır. Tüm koşullar için deney seyirleri esnasında üretilen en yüksek kümülatif hidrojen gazı hacimleri 15 ila 45 mL arasında değişim göstermiştir. Kümülatif hidrojen gazı üretimi biyokütle konsantrasyonunun artmasıyla birlikte 0.5 g/L ile en yüksek değer olan 41.69 mL'ye ulaştıktan sonra azalmıştır. Bu durum Şekil 9'da daha net bir şekilde görülmektedir. Hiç organizma ilavesi yapılmamış kontrol şişesinde herhangi bir gaz çıkışı olmayıp, 0.1 g/L çamur ilavesiyle hidrojen üretimi keskin bir şekilde artış göstermiş olup, organizma ilavesinin hidrojen üretimi üzerindeki etkisi görülmüştür. Biyokütle konsantrasyonunun 0.1'den 1 g/L'ye kadar arttırılması toplam hidrojen üretiminde çok yüksek salınımlar göstermemiştir. Ancak 1 g/L'nin üzerindeki biyokütle konsantrasyonlarında kümülatif hidrojen üretimi bariz bir şekilde azalarak en düşük (15.98 mL) 6 g/L biyokütle konsantrasyonunda elde edilmiştir.



Şekil 8. Kümülatif hidrojen gazının farklı biyokütle konsantrasyonları (g/L) için zamana göre değişimi. ■ 0.1, ◆ 0.5, ○ 0.875, ◇ 1.0, △ 1.5, ▲ 3.0, x 6.0.



Şekil 9. Maksimum kümülatif hidrojen hacminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.

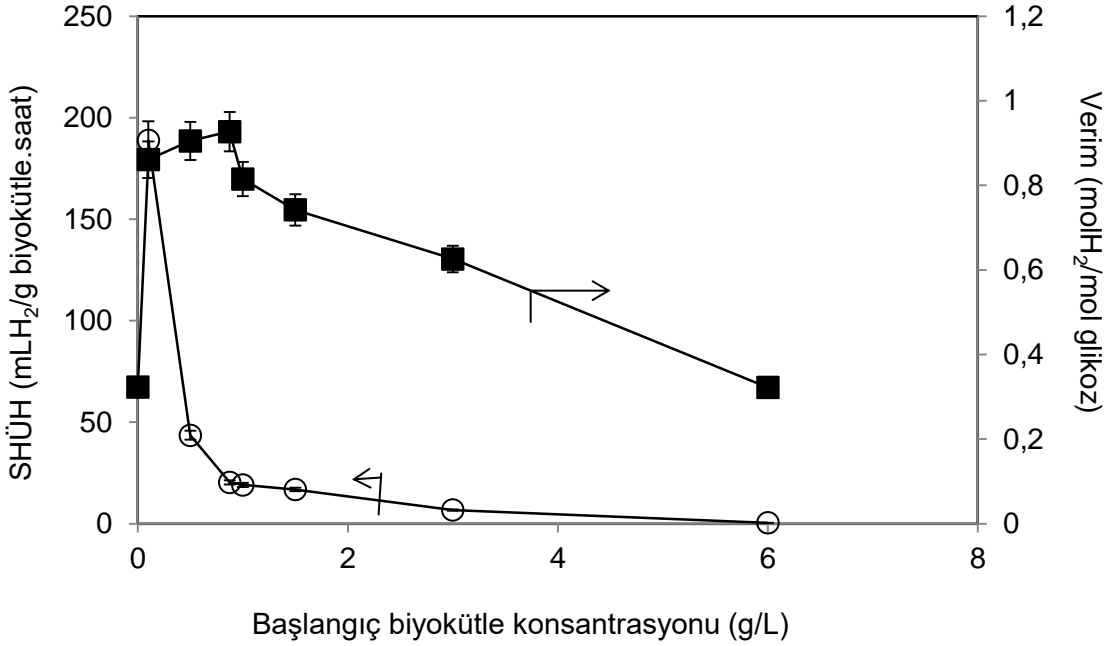
Herbir biyokütle konsantrasyonuna ait hidrojen üretim verileri Gompertz eşitliği ile Statistica bilgisayar programında regresyon analizi ile korele edildikten sonra elde edilen katsayılar Tablo 3'te özetlenmiştir. Dikkat edilirse Tablo 3'te gösterilen sonuçlar Şekil 8 ve 9'daki hidrojen üretimleriyle uyumlu çıkmıştır. Maksimum hidrojen üretim potansiyelleri (P) önce 0.1 g/L'den 0.5 g/L'ye kadar artış gösterdikten sonra daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında azalmıştır. Hidrojen üretim hızı değerleri 0.1 g/L'den 0.875 g/L'ye kadar artış gösterdikten sonra daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında azalmıştır. Şekil 8'e bakılacak olursa, adaptasyon süreleri yaklaşık 20 saate kadar sürerken, Gompertz eşitliğine göre 30-37 saat mertebelerinde çıkmıştır. Bunun nedeni regresyon analizi esnasında programın (Statistica) hız için eğim hesabını 30-37. saatlerde başlatması olmuştur. Tüm regresyon analizleri için elde edilen korelasyon katsayıları 0.98'in üzerinde çıkarak bulunan Gompertz katsayılarının uygun olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 3. Farklı biyokütle konsantrasyonları için Gompertz eşitliği katsayıları.

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

Spesifik hidrojen üretim hızlarıyla (SHÜH) Hidrojen üretim verimlerinin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 10'da gösterilmiştir. Buna göre hidrojen üretim verimi biyokütle konsantrasyonunun 0.1 g/L'ye çıkmasıyla yükselmiş ve 0.875 g/L'de 0.927 molH₂/mol glikoz ile maksimum değere ulaşmıştır. Daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında hidrojen üretim verimi azalarak en düşük verim 0.322 molH₂/mol glikoz ile 6 g/L biyokütle konsantrasyonunda elde edilmiştir. En yüksek SHÜH değeri 188.81 mLH₂/gbiyokütle.saat ile 0.1

g/L biyokütle konsantrasyonunda elde edilmiş olup, SHÜH değeri biyokütle konsantrasyonun artışıyla sürekli azalmıştır.

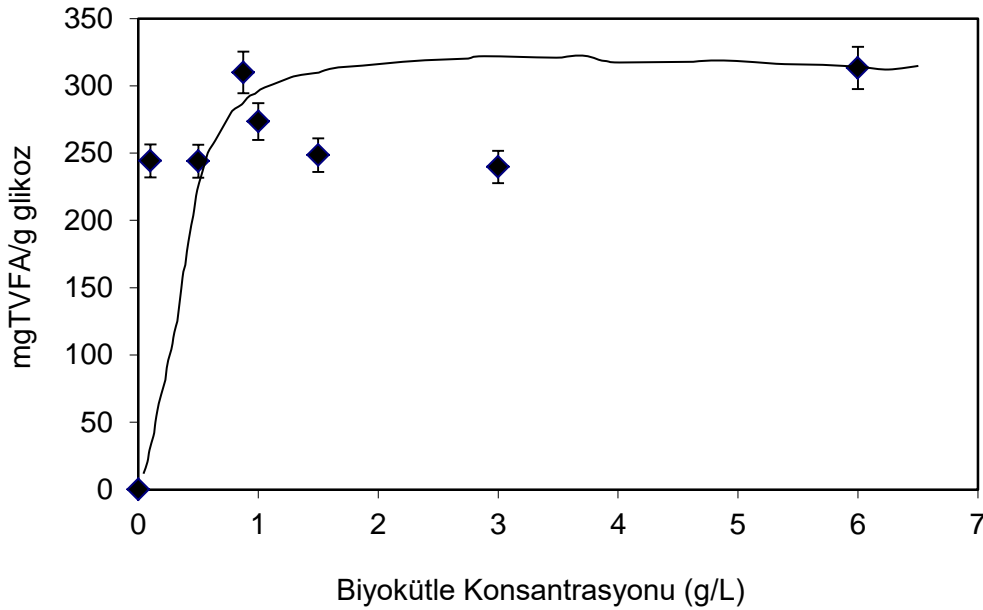


Şekil 10. (O) Spesifik hidrojen üretim hızı (SHÜH) ile (■) Hidrojen üretim veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.

Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi esnasında sıvı fazda oluşan ürünlerden bir tanesinde uçucu yağ asitleridir (TVFA). Toplam uçucu yağ asidi oluşum veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 11’de gösterilmiştir. Biyokütle konsantrasyonunun artmasıyla birlikte TVFA konsantrasyonunda artmıştır. Bu durum Tablo 4’te daha net görülmektedir. TVFA konsantrasyonları deney başlangıcında 300 mg/L seviyelerindeyken, hemen hemen tüm deney koşulları sonunda yaklaşık 2500 mg/L mertebelerine çıkmıştır. Birim glikoz tüketimi başına oluşan TVFA miktarlarıysa Şekil 11’den anlaşılacağı üzere tüm biyokütle konsantrasyonları için yaklaşık olarak 250-350 mgTVFA/g glikoz seviyelerinde seyretmiştir.

Tablo 4. Biyokütle deneyi başlangıç ve sondaki glikoz ve TVFA konsantrasyonları.

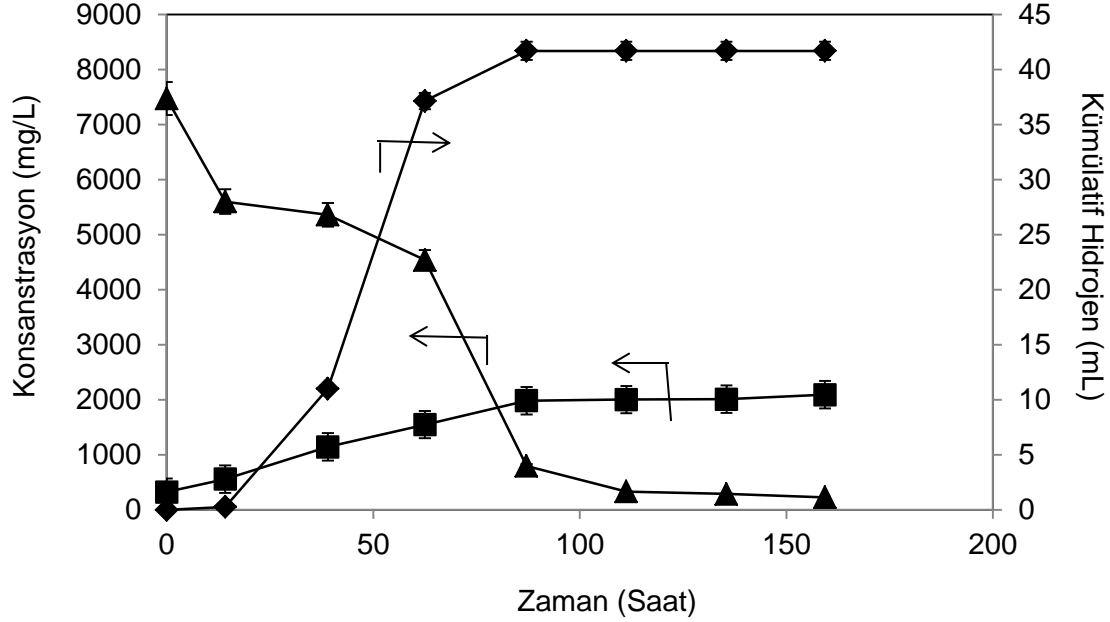
Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonu (g/L)	Glikoz _{baş.} (g/L)	Glikoz _{son} (g/L)	TVFA _{baş.} (g/L)	TVFA _{son} (g/L)
0.1	7.393	0.367	0.328	2.044
0.5	7.474	0.229	0.324	2.092
0.875	7.271	0.238	0.328	2.508
1.0	7.544	0.243	0.304	2.300
1.5	7.589	0.249	0.292	2.116
3.0	7.799	0.271	0.260	2.064
6.0	8.073	0.259	0.348	2.796



Şekil 11. Toplam uçucu yağ asidi oluşum veriminin biyokütle konsantrasyonuna göre değişimi.

0.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunun kullanıldığı hidrojen üretim deneyine ait ürün ve substratların zamana göre değişim profili Şekil 12'de gösterilmiştir. Değişkenlerin zamana göre değişimi kesikli işletim ile uyumludur. Buna göre substrat olan glikoz tüketilirken, Hidrojen ve TVFA'nın üretildiği görülmektedir. 110 saatten sonra tüm bileşenlere ait değerler yatışkın hale

gelmiştir. Deney sonunda kümülatif hidrojen hacmi 41.69 mL'de, TVFA 2092 mg/L'de sabitlenirken glikoz konsantrasyonunda 230 mg/L seviyesinde kalmıştır.



Şekil 12. 0.5 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonu deneyi için TVFA (mg/L) (■), glikoz (mg/L) (▲) ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.

Yukarıda hidrojen üretimiyle ilgili sunulan sonuçlar incelendiğinde <1.0 g/L'nin altındaki başlangıç biyokütle konsantrasyonları için kümülatif hidrojen ve hidrojen üretim verimlerinin hemen hemen aynı seviyelerde olduğu görülmektedir. En yüksek SHÜH'ı değeri ise 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonlu deney şişesinde 188.81 mL_{H₂}/g.saat olarak bulunmuştur. <1.0 g/L altındaki biyokütle konsantrasyonlarının hidrojen üretim performansları kendi aralarında kıyaslandığında 0.1 g/L'nin daha avantajlı olduğu söylenebilir. Zira, bir reaktörün daha az biyokütle ile beslenmesi daha yüksek organizma beslemesine göre hem daha ekonomik hemde daha az emek gerektirmektedir. Özellikle pilot tesis aşamasına geçiş için 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonunun kullanımı işletme açısından daha uygun olacaktır.

Bu çalışmada ulaşılan en yüksek hidrojen üretim verimi 0.927 mol H₂/mol glikoz ile 0.875 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonuna sahip olan şişeden elde edilmiştir. Bu değer teorik 4 mol H₂/mol glikoz değerinin yaklaşık dörtte birine denk gelmekte olup, henüz ulaşılmak istenilen seviyede değildir. Düşük hidrojen üretim veriminin elde edilmesinin nedenleri arasında, hidrolizat içerisinde nötralizasyon işlemi sonrasında oluşan aşırı tuz miktarının varlığı veya aşı çamuru içerisinde hidrojen tüketimine neden olan homo-asetojen türü mikroorganizmaların varlığı

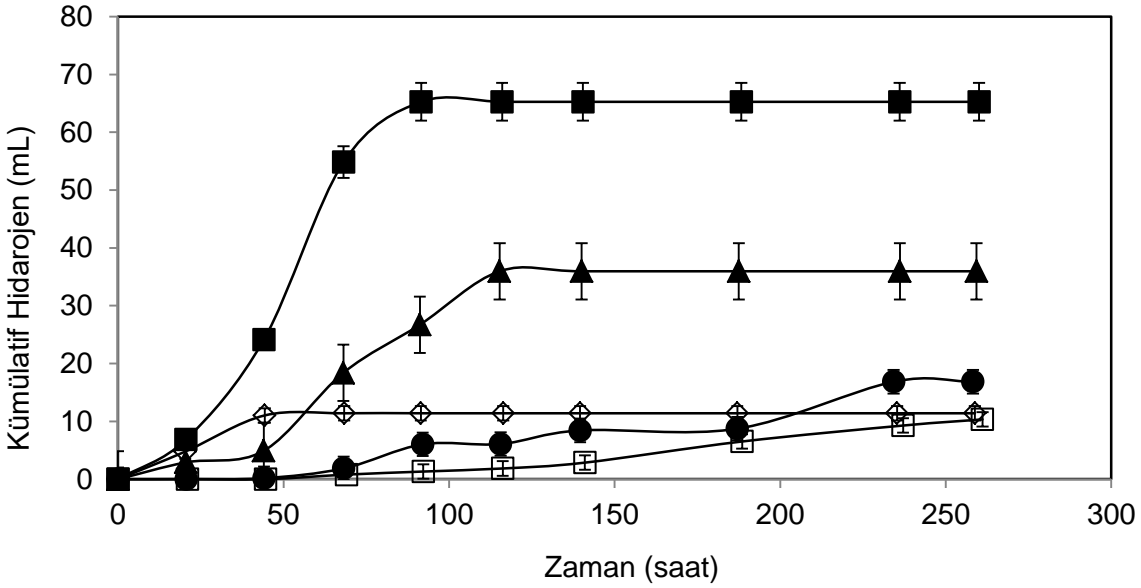
olabilir. Hidrolizat içerisindeki 5-HMF miktarı 0 mg/L civarında olduğu için 5-HMF'nin toksik etki yapma ihtimali bulunmamaktadır. Verim değerinin düşük çıkmasının bir diğer nedeni, aşırı organik asit birikimi ile ürün inhibisyon etkisini önlemek amacıyla başlangıç şeker konsantrasyonunun 7 g/L'de tutulması olabilir. Şeker konsantrasyonunun düşük tutulmasındaki amaç mikroorganizmaların aşırı TVFA oluşumu ve pH düşüşü nedeniyle negatif etkilenmesini minimize ederek başlangıç biyokütle konsantrasyonunun sağlıklı bir şekilde hidrojen üretimine olan etkisini test etmek olmuştur. Zira literatürde karanlık fermentasyon için optimum hidrojen üretiminin 20 g şeker/L civarında gerçekleştiği rapor edilmektedir. Ayrıca aşırı VFA birikimiyle oluşacak keskin pH düşüşlerinin önüne geçilmesi amacıyla ortama eklenen fosfat tamponlarının nötralizasyon esnasında oluşan tuzlar ile birlikte mikroorganizma hücre zarı üzerindeki ozmotik basıncı artırması mikrobiyal performansı negatif etkilemiş olabilir. Elde edilen sonuç literatürde rapor edilen çalışmalar ile uyum göstermiştir. Atık buğday tozundan karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde en uygun biyokütle konsantrasyonun belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada 20 g/L başlangıç substrat konsantrasyonu için optimum başlangıç biyokütle konsantrasyonunun 2.5 g/L olduğu ve bu durum için substrat/biyokütle oranının 0.125 olduğu rapor edilmiştir (Argun et al., 2008a). Bu çalışmada da 0.875 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunun 7 g/L olan şeker konsantrasyonuna oranının 0.125 çıkması elde edilen sonucun literatür ile olan uyumunu göstermektedir. En yüksek hidrojen verimi 0.875 g/L biyokütle konsantrasyonu için 0.927 mol H₂/mol glikoz olarak çıkmasına rağmen, karanlık fermentasyonda 0.1 g/L'nin biyokütle konsantrasyonu önerilmesinin nedenleri; 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonu için elde edilen 0.905 mol H₂/mol glikoz olan verim değerinin en yüksek 0.927 mol H₂/mol glikoz verim değerine çok yakın olması, SHÜH değerinin 0.1 g/L için en yüksek değerde olması (188.81 mLH₂/g. saat) ve düşük seviyedeki biyokütle kullanımının işlem açısından daha pratik olmasıdır.

4.2.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Başlangıç substrat konsantrasyonunun karanlık fermentasyonda hidrojen üretimi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı deneyler 300 mL'lik serum şişelerinde 45 mL çalışma hacminde, mezofilik şartlarda (T= 36 °C, pH: 5.5- 6.0), kesikli işletme koşullarında inkübatörde yapılmıştır. Burada substrat konsantrasyonu dışındaki tüm parametreler aynı şartlarda tutulmuştur. Buna göre ortama ilave edilen mikroorganizma konsantrasyonu: 0.15 g/L, MgSO₄.7H₂O: 0.1 g/L, FeSO₄.7H₂O (EDTA'lı): 10 mg/L ve L.cysteine.HCl: 0.1 g/L olmuştur.

Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için kümülatif hidrojen (mL) üretimlerinin zamana göre değişimi Şekil 13'te gösterilmiştir. Buna göre 260 saatlik deney süresince toplam hidrojen üretim değerleri 10 ile 65 mL arasında değişmiştir. Nihai kümülatif hidrojen üretimi şeker konsantrasyonunun 6.6 g/L'den 21.33 g/L'ye yükseltilmesiyle artmış olup, daha yüksek şeker konsantrasyonlarında ise düşmüştür. Şekil 13'te görüldüğü gibi 6.6, 30.25 ve 40.22 g/L şeker konsantrasyonlarında kümülatif hidrojen üretimi yaklaşık aynı seviyelerde seyretmiştir. Burada dikkati çeken husus 6.6 g/L şeker konsantrasyonunda hidrojen üretimi daha erken safhalarda başlarken 30.25 ve 40.22 g/L şeker konsantrasyonlarında daha geç olmuştur. Bunun nedeni muhtemelen yüksek şeker konsantrasyonlarında meydana gelen substrat inhibisyonudur. 14.82 ve 21.33 g/L şeker konsantrasyonlarında gözlemlenen hidrojen üretimi bariz bir şekilde diğerlerinden daha verimli gerçekleşmiştir.

Başlangıç substrat konsantrasyonlarına ait zaman ve kümülatif hidrojen üretim verileri Statistica programi yardımıyla regresyon analizine tabi tutularak Gompertz eşitliği katsayıları belirlenmiş ve Tablo 5'te gösterilmiştir. Tablo 5'te görüleceği gibi maksimum hidrojen üretim değerleri (P) ile adaptasyon süreleri (λ) Şekil 13'te elde edilen grafikler ile uyumlu çıkmıştır. Buna göre adaptasyon süreleri şeker konsantrasyonu ile birlikte artmış ve 41.22 g/L için 102.67 saate ulaşmıştır. 21.33 g/L şeker derişiminden daha düşük şeker derişimlerinde daha düşük adaptasyon sürelerine ihtiyaç duyulması substrat inhibisyonunun olmaması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Zira 21.33 g/L üzerindeki şeker derişimlerinde daha yüksek adaptasyon sürelerine ihtiyaç duyulmuştur. Benzer bir durum hidrojen üretim hızında (R_m , mLH₂/saat) da görülmüştür. R_m değerleri şeker konsantrasyonunun 6.6 g/L'den 21.33 g/L'ye artmasıyla 0.25'ten 1.53 mLH₂/saat değerine yükseldikten sonra, daha yüksek şeker konsantrasyonlarında düşerek 0.1 mLH₂/saat değerine düşmüştür.



Şekil 13. Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için kümülatif hidrojen (mL) üretiminin zamana göre değişimi. (◇) 6.60, (▲) 14.82, (■) 21.33, (●) 30.25, (□) 41.22.

Tablo 5. Farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları (g/L) için Gompertz katsayıları (X_0 : 0.15 g/L, V_0 : 45 mL).

Glikoz ₀ (g/L)	P (mL)	R_m (mLH ₂ /saat)	λ (saat)	r^2
6600	11.40	0.25	11.93	1.00
14819	35.95	0.59	37.07	0.99
21330	65.26	1.53	27.05	0.99
30256	16.04	0.08	52.00	0.95
41220	10.23	0.10	102.67	0.98

Deney başlangıcı ve sonundaki glikoz ile TVFA değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Tablo 6'da görüldüğü gibi 21.33 g/L substrat konsantrasyonuna kadar glikozun yaklaşık tamamı kullanılmış ve 1 g/L'nin altına düşmüştür. Ancak başlangıç glikoz konsantrasyonu 21.33 g/L'den daha yüksek olan deneylerin sonundaki glikoz konsantrasyonları 1 g/L'nin üzerinde kalarak ortamda birikmiştir. Tüm deney koşullarında TVFA konsantrasyonu artış göstermiştir. Substrat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte TVFA konsantrasyonu da artış göstermiştir. Deney başlangıcında 1 g/L'nin üzerinde TVFA olması, hidrolizattan kaynaklanmaktadır. Zira asit hidrolizi esnasında organik asit oluşumlarının mümkün olabileceği literatürde rapor edilmiştir (Yin ve Tan 2012).

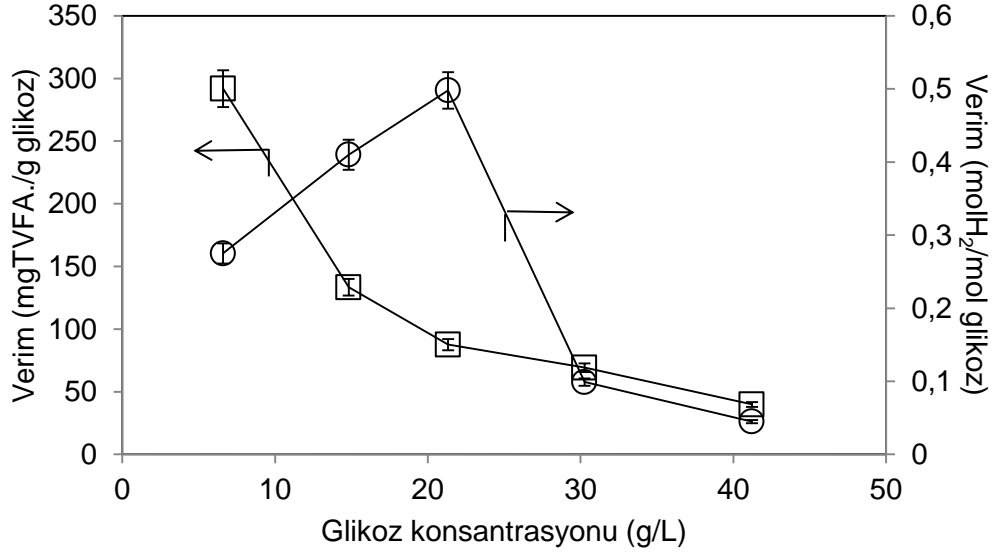
Tablo 6. Deney başlangıcı ve sonundaki substrat (glikoz) ve toplam uçucu yağ asiti (TVFA) konsantrasyonları.

Glikoz _o (mg/L)	Glikoz _s (mg/L)	TVFA _o (mg/L)	TVFA _s (mg/L)
6600	90.43	560	2460
14819	909.40	920	2775
21330	670.87	2945	4755
30256	3411.38	1895	3755
41220	5468.24	2885	4310

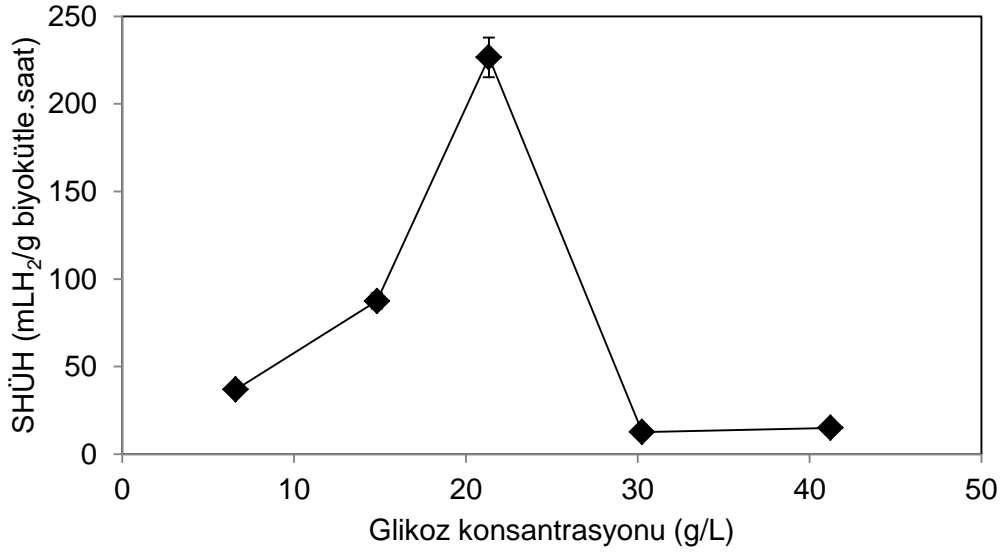
Hidrojen ve TVFA oluşum verimlerinin başlangıç substrat konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 14'te verilmiştir. Buna göre hidrojen üretim verimi glikoz konsantrasyonunun 6.6 g/L'den 21.33 g/L'ye artmasıyla birlikte artış gösterdikten sonra daha yüksek konsantrasyonlarda düşüş göstermiştir. En yüksek hidrojen üretim verimi 21.33 g/L başlangıç şeker derişiminin olduğu deneyde 0.498 molH₂/mol glikoz olarak bulunmuştur. Proje önerisinde 4 molH₂/mol glikoz'a yakın hidrojen verimlerine ulaşılması hedeflenmiş olmasına rağmen düşük verimlerin elde edilmesi birçok faktörden ileri gelmiş olabilir. Bunların başında asit hidrolizi esnasında 5-HMF dışında bilinmeyen toksik maddelerin oluşumu, nötralizasyon sonucu ortamda aşırı tuz birikiminin bakteriler üzerinde inhibisyonu, iz element ve vitamin eksikliği nedeniyle enzimatik faaliyetlerin verimsiz kalışı sayılabilir. Karanlık fermentasyonda hidrojen üretim verimlerinin istenilen seviyede olmaması nedeniyle ortamda biriken veya var olan organik asitlerin eş zamanlı olarak ortamdaki uzaklaştırılması için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma ile ilgili sonuçlar raporun ileriki bölümlerinde verilmiştir. Şekil 14 incelendiğinde birim glikoz tüketimi başına TVFA üretim verimleri ise başlangıç substrat konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır. En yüksek TVFA oluşum verimi 291.88 mgTVFA/g glikoz ile 6.6 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda, en düşük TVFA oluşum verimi ise 39.85 mgTVFA/g glikoz ile 41.22 g/L şeker derişiminde elde edilmiştir. En yüksek hidrojen üretim veriminin elde edildiği 21.33 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda düşük TVFA üretim veriminin olması, muhtemelen mikroorganizmalar üzerindeki TVFA inhibisyonunun daha az olmasını sağlamıştır.

Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) başlangıç glikoz konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 15'te gösterilmiştir. SHÜH, glikoz konsantrasyonunun 6.6 g/L'den 21.33 g/L'ye yükselmesiyle 36.88 değerinden 226.66 mLH₂/g biyokütle.saad değerine çıkmış daha yüksek glikoz konsantrasyonlarıdaysa düşerek 13 mLH₂/g biyokütle.saad mertebelerinde seyretmiştir.

Şekil 15'te açıkça görüldüğü gibi 21.33 g/L üzerindeki glikoz konsantrasyonlarında substrat inhibisyonu nedeniyle SHÜH düşmüştür.

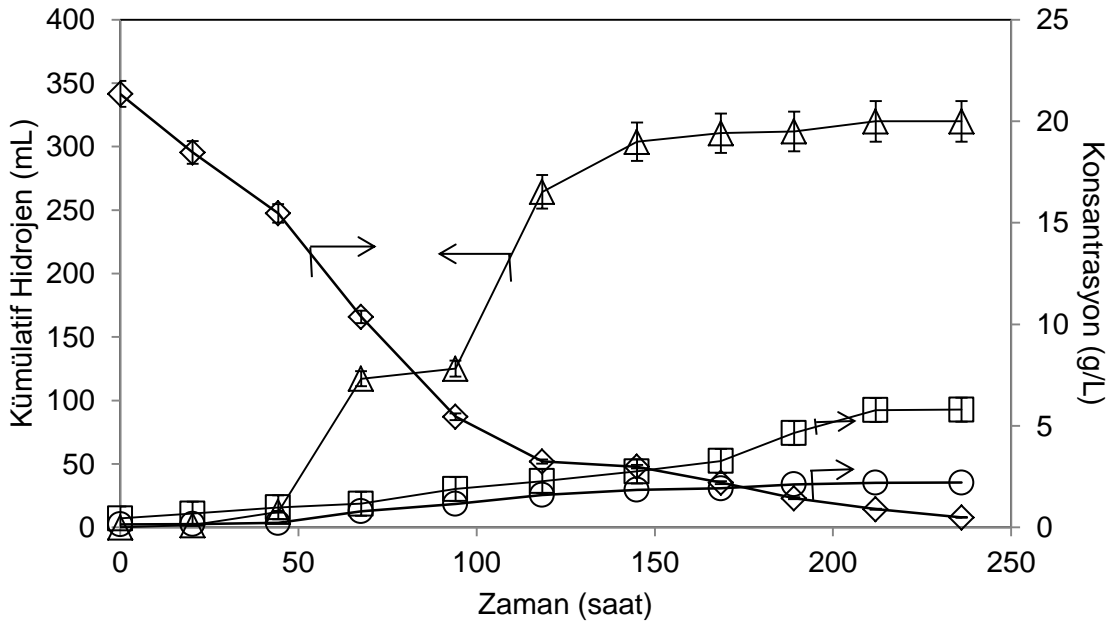


Şekil 14. Hidrojen (o) ve toplam uçucu yağ asidi-TVFA (□) üretim verimlerinin farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonları için değişimi.



Şekil 15. Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonlarına göre değişimi.

Yukarıda açıklanan bilgiler doğrultusunda en uygun başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonunun 21.33 g/L olduğu belirlenmiştir. Bundan önceki ara raporda is en uygun başlangıç biyokütle konsantrasyonunun 0.1 g/L olduğu bulunmuştu. Bu bilgiler göz önünde bulundurularak başlangıç substrat ve biyokütle konsantrasyonu sırayla 21.34 g/L ve 0.1 g/L olan bir doğrulama deneyi yapılmış ve sonuçları kaydedilmiştir. Deney başlangıç sıvı hacmi (300 mL) dışındaki tüm parametreler substrat ve biyokütle deneylerindeki koşullar ile aynı tutulmuştur. Bu deney esnasında ölçülen parametrelerin zamana göre değişimi Şekil 16'da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi substrat konsantrasyonu azalırken, kümülatif hidrojen hacmi ile TVFA ve biyokütle konsantrasyonları artmıştır. Parametrelerin değişimi kesikli büyüme kinetiği ile uyumlu olup, ölçülen parametrelerin tümü yaklaşık 150 saat sonra yatışkın hale gelmiştir. Bu doğrulama deneyinin sonucunda hesaplanan verim ve hız değerleri ile Gompertz eşitliği katsayıları (R^2 : 0.97) Tablo 7'da sunulmuştur.



Şekil 16. 21.34 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen karanlık fermentasyon deneyinde kümülatif hidrojen üretiminin (Δ), glikoz (\diamond), TVFA (\square), biyokütle (\circ) konsantrasyonlarının zamana göre değişimi.

Tablo 7'da görüldüğü gibi deneyin daha yüksek hacimde gerçekleştirilmesi bazı parametrelerin farklı sonuç vermesine neden olmuştur. Sonuçların farklı çıkmasının bir diğer

nedeniyse deneylerde, farklı hidrolizatların kullanılmış olmasıdır. Başlangıç substrat konsantrasyonunun optimize edildiği deneylerde kullanılan hidrolizat için 50 g/L kağıt atığı 135 °C'da %5 H₂SO₄ ile 0.05 katı/sıvı (w/w) oranında 2 saat süre işlem görürken, Şekil 16'da verilen deneyde kullanılan hidrolizat için 200 g/L kağıt atığı 105 °C'da %5 H₂SO₄ ile 0.2 katı/sıvı (w/w) oranında 3.5 saat işlem görmüştür. Bunun sebebi kağıt atığının asit hidrolizi esnasında oluşan toksik 5-HMF ve istenmeyen bazı organik asitlerin oluşumunun azaltılmasıdır. Bu da hidrolizat kompozisyonunun değişmesine neden olmuştur. Özellikle hidrolizatların başlangıç TVFA konsantrasyonları incelendiğinde farklı olduğu tespit edilmiştir. Başlangıç substrat konsantrasyonunun optimize edildiği deneylerde işin başındaki TVFA konsantrasyonu 2945 mg/L mertebesindeyken, Şekil 16'da sonuçları verilen deney için başlangıç TVFA konsantrasyonu 440 mg/L dir. Tablo 7 incelendiğinde, hidrojen üretiminin daha yüksek TVFA üretim verimi ve adaptasyon süresinde gerçekleştiği görülmektedir. Hidrojen üretim verimi ise (0.36 molH₂/mol glikoz) daha yüksek TVFA oluşumu nedeniyle (5800 mg/L) düşüş göstermiştir.

Tablo 7. Optimum başlangıç substrat (21.34 g/L) ve biyokütle (0.15 g/L) konsantrasyonlarında işletilen karanlık fermentasyon doğrulama deneyi Gompertz eşitliği katsayıları ve verimleri.

P(mLH ₂)	R _m (mLH ₂ /saat)	λ (saat)	Verim (molH ₂ /mol glikoz)	Verim (mg TVFA/g glikoz)
326.54	3.79	47.14	0.36	257.00

4.2.3 C/N/P Oranının Etkisi

Kağıt atığı hidrolizatından karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde C/N/P oranının optimizasyonu deneyleri Design-Expert yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Deney noktaları Design-Expert içerisinde bulunan Box-Behnken istatistiksel deney tasarım (BBİDT) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemin tasarımında en az üç parametrenin bulunması gerektiği için C/N ve C/P oranlarına ilave olarak C/Fe oranında etkisine bakılmıştır. Zira demir iyonu, hidrojen üretiminde görev alan hidrogenaz enziminin yapısına katıldığı için önemli bir kofaktör konumundadır. Sonuçlar sunulurken proje önerisinde vaat edildiği üzere C/N ve C/P oranlarının hidrojen üretimi ve hızına olan etkileri sunulmuştur. Design-expert programında tasarım noktaları N/C, P/C ve Fe/C halinde girilmiştir. Bunun nedeni hiç N, P ve Fe bulunmayan durumlarda başlangıç tasarım noktası olarak 0 rakamının girilebilmesidir.

Buna göre N/C (X_1), P/C (X_2) ve Fe/C (X_3) oranları bağımsız değişkenler olarak seçilirken, hidrojen oluşum verimi (Y_1) ($\text{molH}_2/\text{mol glikoz}$) ve spesifik hidrojen üretim verimi olan SHÜH (Y_2) ($\text{mLH}_2/\text{gbiyokütle.saat}$) amaç fonksiyonları olarak seçilmiştir. Bu kurguya göre bağımsız değişken aralıkları N/C oranı için X_1 : 0-0.05 (g/g), P/C oranı için X_2 : 0-0.1 (g/g) ve Fe/C oranı için X_3 : 0-3.13E-0.3 (g/g) seçilerek BBİDT yöntemine göre iki tekrarlı 15 deneyden oluşan bir set deney tasarlanmış ve her bir deney için hidrojen oluşum verimleri ve SHÜH'ları hesaplanmıştır.

Değişkenlere ait aralıkların Design-Expert programına girilmesiyle oluşturulan deney tasarım noktaları ile elde edilen deneysel ve tahmini sonuçlar Tablo 8'de özetlenmiştir. Deneylerin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi amacıyla orta nokta üç defa tekrar edilmiştir. Tüm deneyler 300 mL serum şişelerinde, 36 °C'de inkübatörde, ısıtılma tabii tutulmuş MONDİ kağıt fabrikası anaerobik arıtma tesisi aşu çamuru ile yapılmıştır.

Tablo 8'de görüldüğü gibi deney sonunda hidrojen oluşum verimi ve SHÜH değerleri sırasıyla 0.183-0.634 $\text{molH}_2/\text{mol glikoz}$ ve 37.14-231.43 $\text{mLH}_2/\text{g biyokütle.saat}$ aralıklarında elde edilmiştir. Her bir değişkenin hidrojen üretim verimi ve hızı üzerindeki etkisi farklı oranda olmuştur. Tablo 8 incelendiğinde dikkat çeken bir başka konu deneysel sonuçlar ile programın önerdiği model fonksiyonları kullanılarak tahmin edilen değerlerin birbirine yakın olması ve farkların (residual) düşük olmasıdır.

Tablo 8. Box-Behnken istatistiksel deney tasarım değerleri ve sonuçları tablosu.

Deney No	Değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri			Sonuçlar				
	X_1	X_2	X_3	Y_1		Y_2		
	N/C oranı (w/w)	P/C oranı (w/w)	Fe/C oranı (w/w)	Verim (molH ₂ /mol glikoz)		SHÜH (mLH ₂ /g biyokütle.sa)		
			Deneysel sonuç	Model Tahmini	Deneysel sonuç	Model Tahmini		
1	0.025 (0)	0.05 (0)	1.56E-03 (0)	0.628	0.630	162.38	171.27	
2	0.025 (0)	0.1 (+1)	3.13E-03 (+1)	0.492	0.460	231.43	215.63	
3	0.025 (0)	0.05 (0)	1.56E-03 (0)	0.547	0.590	168.09	171.27	
4	0 (-1)	0 (-1)	1.56E-03 (0)	0.491	0.460	63.81	54.57	
5	0.05 (+1)	0.1 (+1)	1.56E-03 (0)	0.531	0.560	213.81	222.95	
6	0.025 (0)	0 (-1)	0 (-1)	0.524	0.560	164.76	180.56	
7	0.05 (+1)	0.05 (0)	3.13E-03 (+1)	0.620	0.620	174.29	180.94	
8	0.05 (+1)	0.05 (0)	0 (-1)	0.393	0.390	172.38	171.37	
9	0 (-1)	0.1(+1)	1.56E-03 (0)	0.324	0.360	21.87	36.67	
10	0.025 (0)	0.05 (0)	1.56E-03 (0)	0.586	0.590	183.33	171.27	
11	0.025 (0)	0 (-1)	3.13E-03 (+1)	0.327	0.360	89.05	97.18	
12	0 (-1)	0.05 (0)	3.13E-03 (+1)	0.183	0.180	37.14	38.15	
13	0.025 (0)	0.1(+1)	0 (-1)	0.494	0.460	196.19	188.05	
14	0.05 (+1)	0 (-1)	1.56E-03 (0)	0.491	0.460	93.81	79.02	
15	0 (-1)	0.05 (0)	0 (-1)	0.634	0.590	110.18	103.52	

Değişkenlerin bu etkileri Design-Expert yazılımı tarafından önerilen kuadratik model fonksiyonları ile (Eş.19-22) daha net görülmektedir. Eş.19 ve Eş. 20'de incelenen değişkenler ile hidrojen üretim verimi ve hızı arasındaki bağıntılar gerçek değişken katsayıları esas alınarak tanımlarken, Eş. 21'te yer alan lineer katsayılar (b_1 , b_2 ve b_3) incelendiğinde bağımsız değişkenlerin farklı nispette hidrojen üretim verimine katkı sağladıkları görülmektedir. Buna göre N/C (b_1 : 0.050) ve P/C (b_2 : 1.000E-003) oranları hidrojen veriminin artışına yönelik katkı sağlarken Fe/C (b_3 : -0.053) azalması yönünde katkı sağlamıştır. Aynı şekilde faktörlerin ikili ve kuadratik etkileşimi ile ilgili olan katsayıları incelendiğinde (b_{11} , b_{12} , b_{13} , b_1^2 , b_2^2 , b_3^2) N/C, P/C ve Fe/C faktörlerinin farklı oranlarda hidrojen üretim veriminin artışına yönelik katkı sağladıkları

görülmektedir. Aynı inceleme SHÜH'nı temsil eden Eş.22 için yapıldığında N/C (b_1 : 52.66) oranı SHÜH artışı üzerinde en yüksek etkiyi gösterirken, P/C (b_2 : 31.48) etkisi ikinci ve Fe/C oranının (b_3 : -13.95) bireysel etkisi en az seviyede olmuştur. Ancak ikili etkileşim ve kuadratik etkileri temsil eden katsayılar incelendiğinde bireysel olarak SHÜH'nin azalmasına katkı gösteren bir değişkenin bunun aksini gösterebileceği anlaşılmaktadır.

Hidrojen üretim verimi ve SHÜH'ları için Design-Expert ile adimsal model uyumluluğu testi yapıldığında her iki amaç fonksiyonu için en uygun modelin kuadratik model türü olduğu bulunmuştur (Lack-of-Fit test p-değeri<0.05). Buna göre hidrojen üretim verimini temsil eden (Eş. 19) kuadratik model için korelasyon katsayısı olan R^2 değeri %85 iken SHÜH için (Eş. 20) belirlenen R^2 değeri %92 olmuştur.

Gerçek değişken katsayılarına göre düzenlenmiş model fonksiyonları:

$$Y_{\text{VERİM}} = 0.6660 - 1.655 X_1 + 0.53X_2 - 90.64X_3 + 41.40X_1X_2 + 4339.20X_1X_3 + 624.00 X_2X_3 - 103.60X_1^2 - 25.20 X_2^2 - 26521.60 X_3^2 \quad (\text{Eş. 19})$$

$$Y_{\text{SHÜH}} = 127.2195 + 4529.7546X_1 - 213.0558X_2 - 54197.5237X_3 + 32386.7285X_1X_2 + 4.79635E+005X_1X_3 + 3.5505E+005 X_2X_3 - 95842.5810X_1^2 - 5216.8460X_2^2 + 4.9682E+006X_3^2 \quad (\text{Eş. 20})$$

Kodlanmış değişken katsayılarına göre düzenlenmiş model fonksiyonları:

$$Y_{\text{VERİM}} = 0.59 + 0.050 X_1 + 1.000E-003 X_2 - 0.053 X_3 + 0.052 X_1X_2 + 0.17 X_1X_3 + 0.049 X_2X_3 - 0.065 X_1^2 - 0.063X_2^2 - 0.065 X_3^2 \quad (\text{Eş. 21})$$

$$Y_{\text{SHÜH}} = 171.27 + 52.66 X_1 + 31.48 X_2 - 13.95 X_3 + 40.48 X_1X_2 + 18.74 X_1X_3 + 27.74 X_2X_3 - 59.90 X_1^2 - 13.04 X_2^2 + 12.13 X_3^2 \quad (\text{Eş. 22})$$

Değişkenlerin hidrojen üretim verim ve hızı üzerine olan etkileri amaç fonksiyonları (Hidrojen verimi için: Eş.19, SHÜH için Eş. 20) kullanılarak çizdirilen ve aşağıda sunulan grafiklerden daha iyi anlaşılmaktadır.

Hidrojen üretim verimi ve SHÜH model uyumluluklarının yeterliliğinin test edilmesi amacıyla Design-Expert yazılımında yapılan varyans analizleri (ANOVA) sırasıyla Tablo 9 ve 10'da özetlenmiştir. Tablo 9'da görüldüğü gibi hidrojen üretim verim modeli için önerilen p olasılık değerinin 0.05'ten düşük çıkması modelin önemli olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan lack

of fit analizine ait P değerinin 0.05'ten yüksek çıkması lack of fit'in önemsiz olduğunu ve model uyumluluğunun iyi olduğuna işaret etmektedir. Değişkenler ve etkileşimleri için de analiz yapıldığında p değerleri 0.05'ten küçük çıkan X_1 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 terimlerinin hidrojen verimi üzerine önemli etkisi olduğu sonucu çıkmıştır.

Tablo 9. Hidrojen üretim verimine ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.

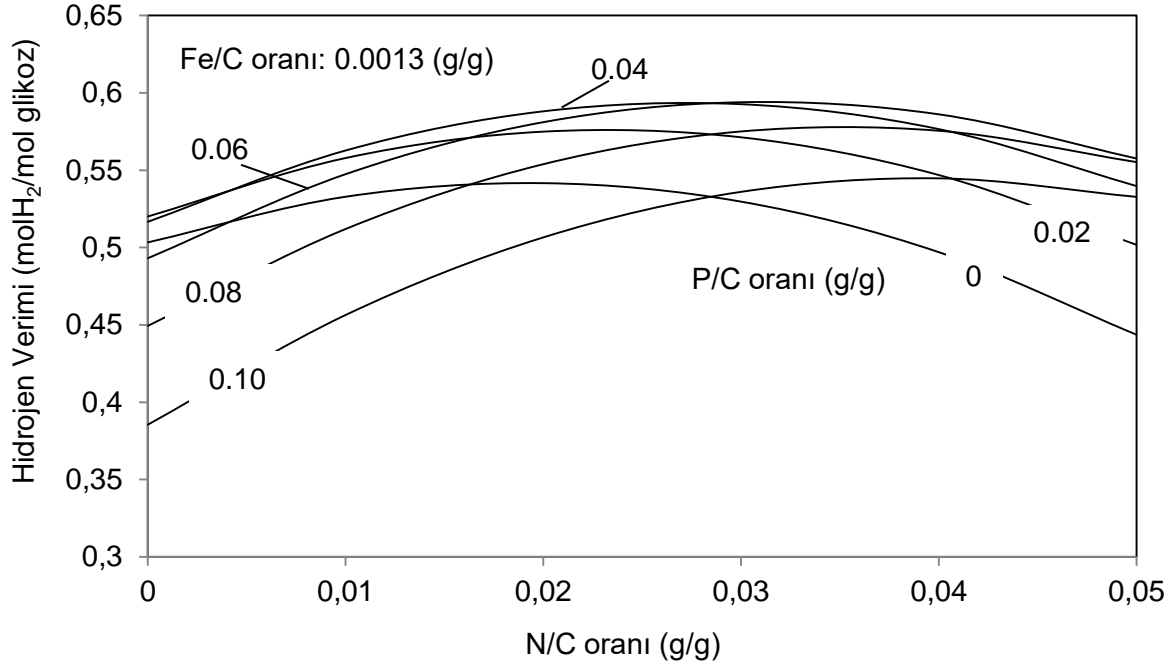
İstatistiksel parametreler	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P-değeri	
Model	0.22	9	0.024	10.10	0.0101	önemli
X_1 -N/C	0.020	1	0.020	8.49	0.0333	
X_2 -P/C	8.000E-006	1	8.000E-006	3.346E-003	0.9561	
X_3 -Fe/C	0.022	1	0.022	9.35	0.0282	
X_1X_2	0.011	1	0.011	4.48	0.0879	
X_1X_3	0.11	1	0.11	48.06	0.0010	
X_2X_3	9.506E-003	1	9.506E-003	3.98	0.1027	
X_1^2	0.015	1	0.015	6.47	0.0516	
X_2^2	0.015	1	0.015	6.13	0.0561	
X_3^2	0.015	1	0.015	6.47	0.0516	
Kalan (Residual)	0.012	5	2.391E-003			
Lack of Fit	8.674E-003	3	2.891E-003	1.76	0.3821	önemsiz
Pure Hata (Pure error)	3.282E-003	2	1.641E-003			
Cor Toplam (Total)	0.23	14				

Tablo 10 SHÜH modeline ait ANOVA tablosunu özetlemektedir. Buna göre model için önerilen p olasılık değerinin 0.05'ten düşük çıkması önerilen modelin önemli olduğuna işaret etmektedir. Bu durum diğer parametreler ve etkileşimleri için de analiz edildiğinde p değerleri 0.05'ten küçük çıkan X_1 , X_2 , X_1X_2 , X_1^2 terimlerinin SHÜH üzerine önemli etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan lack of fit testi için p değerinin 0.05'ten yüksek çıkması ve F değerinin 3.77 olması, önemli bir uyumsuzluğun olmadığına ve modelin güvenli bir şekilde kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Tablo 10. Box-Behnken istatistiksel deney tasarımına ait varyans analiz (ANOVA) tablosu.

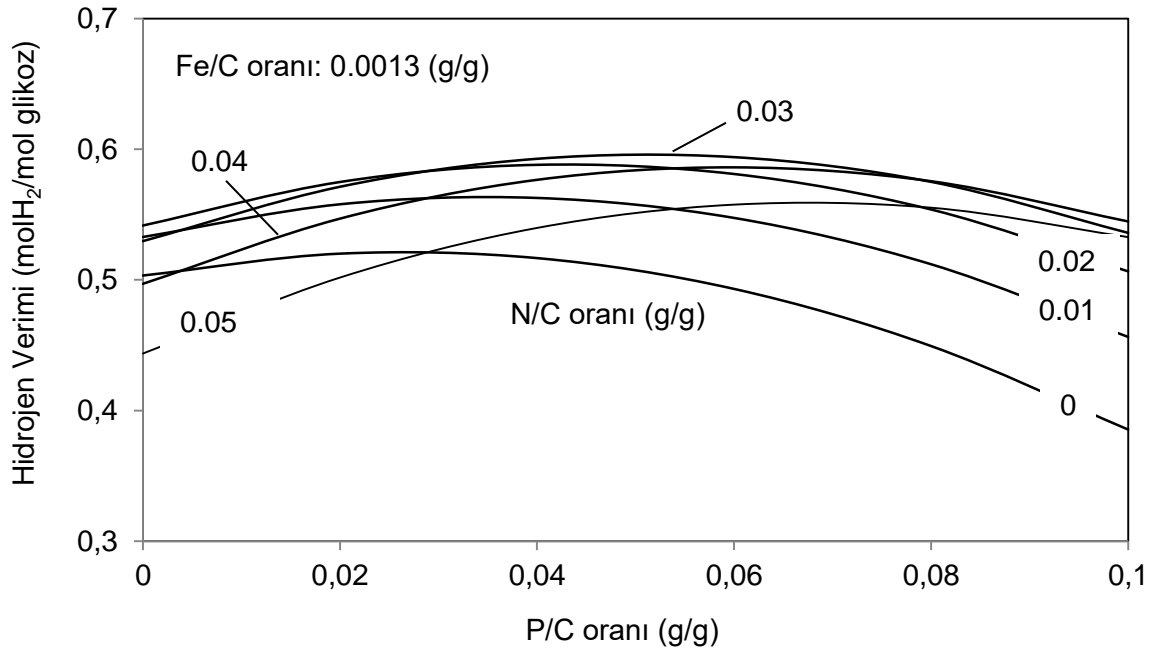
İstatistiksel parametreler	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P-değeri	
Model	57344.45	9	6371.61	20.40	0.0020	önemli
X ₁ -N/C	22184.43	1	22184.43	71.03	0.0004	
X ₂ -P/C	7930.18	1	7930.18	25.39	0.0040	
X ₃ -Fe/C	1557.03	1	1557.03	4.99	0.0759	
X ₁ X ₂	6555.63	1	6555.63	20.99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

Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi Eş.19 kullanılarak Şekil 17'de gösterilmiştir. Buna göre sabit P/C oranlarında hidrojen üretim verimi N/C oranının artmasıyla belirli bir değere kadar artmış, daha sonra azalma göstermiştir. Genel olarak hidrojen üretim verimi değerleri 0.35 - 0.6 molH₂/mol glikoz arasında değişim göstermiştir. Hidrojen verimi P/C oranının 0'dan 0.06 (g/g)'a çıkmasıyla maksimum 0.593 molH₂/mol glikoz değerine ulaşmış olup, daha yüksek P/C oranlarında verim değerleri düşmüştür. Bunun sebebi 0.06 (g/g) P/C oranından daha düşük oranlarda fosforun mikrobiyal büyüme üzerinde limitleme yapması, daha yüksek oranlardaysa fosfor miktarının inhibisyon etkisinden kaynaklanmış olabilir. N/C ve P/C oranlarının sıfır olduğu durumda hidrojen üretim verimi ilginç bir şekilde 0.5 molH₂/mol glikoz civarında olmuştur. Dikkat edilirse ortama çok az miktarda azot ilave edilmesi hidrojen veriminin 0.1 molH₂/mol glikoz mertebesinde artmasını sağlamıştır. Şekil 17'ye göre en ideal N/C ve P/C oranları sırasıyla 0.03 ve 0.06 değerlerinde elde edilmiştir. Şekil 17'deki çizim Fe/C oranının 0.0013 (g/g) değerinde sabit tutulmasıyla elde edilmiştir.



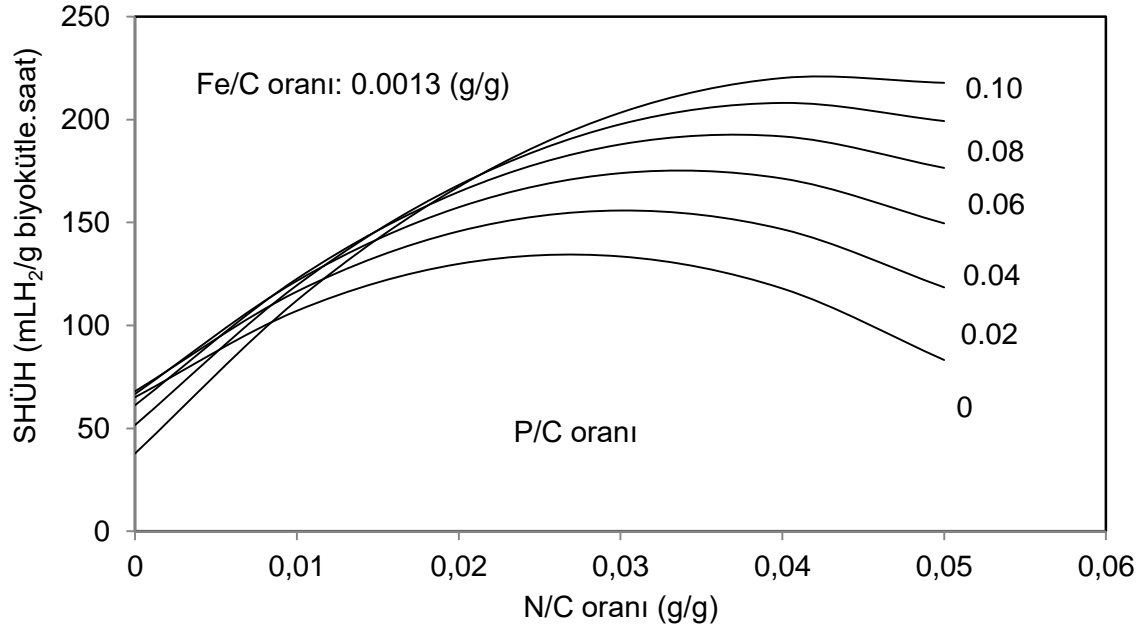
Şekil 17. Hidrojen üretim veriminin farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.

Şekil 18 Hidrojen üretim veriminin farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimini göstermektedir. Buna göre sabit N/C oranlarında P/C oranının artırılmasıyla Hidrojen verimi belli bir değere kadar yükseldikten sonra daha yüksek P/C oranlarında düşüş göstermiştir. Aynı durum N/C oranı içinde geçerli olmuştur. Hidrojen verimi N/C oranının 0'dan 0.03'e kadar artırılmasıyla en yüksek değeri olan 0.593 molH₂/mol glukoz'e ulaşıttan sonra daha yüksek N/C oranlarında düşüş göstermiştir. Şekil 18'den açıkça görüldüğü üzere, ortama ilave edilen fosfor miktarı 0.06 (g/g) P/C değerinden daha düşük değerlerde limitlemeye, daha yüksek oranlardaysa inhibisyona sebep olmuştur.



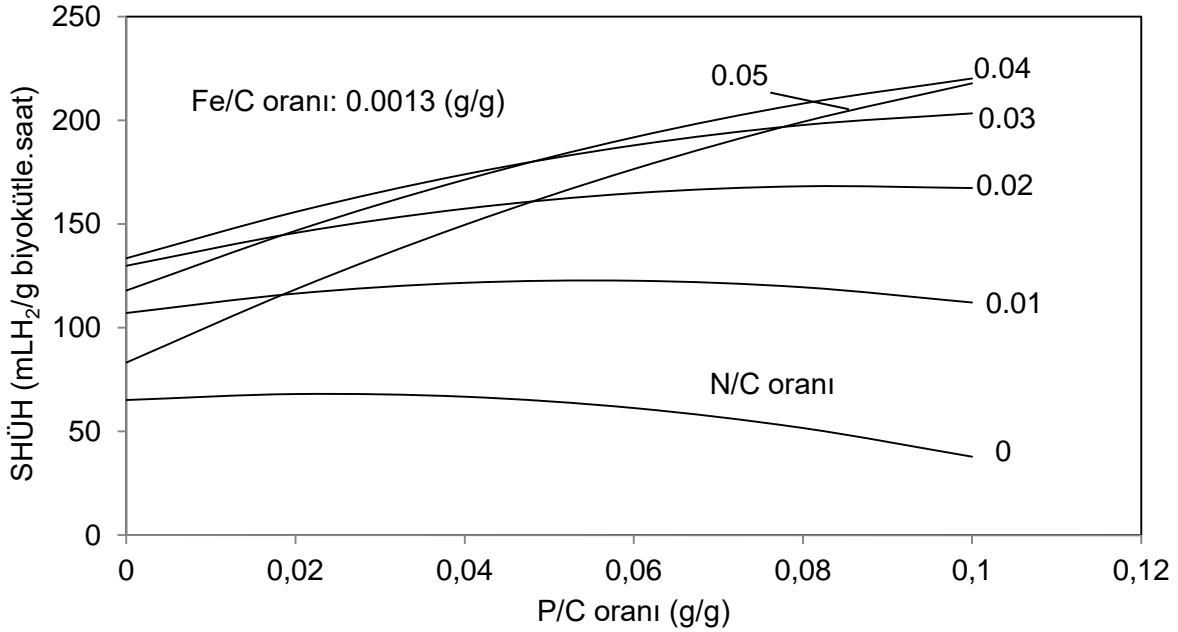
Şekil 18. Hidrojen üretim veriminin farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.

Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi Şekil 19'da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi ortama hiç azot ve fosfor ilave edilmediği durumda SHÜH değeri 65.15 mLH₂/g biyokütle.saate olup bu değer farklı azot ve fosfor ilavesiyle 3 katın üzerinde artışlar göstermiştir. Sabit P/C oranlarında N/C oranının arttırılmasıyla SHÜH değeri önce artmış sonra azalma göstermiştir. Ancak 0.1 (g/g) P/C oranı için azalma olmayıp SHÜH değeri 0.04 (g/g) N/C değerinden sonra sabit kalmıştır. Bu durum azot miktarının belli bir değere kadar limitlemeye daha yüksek değerlerdeyse inhibisyona neden olduğuyla açıklanabilir. P/C oranının arttırılmasıyla SHÜH değeri sürekli artarak en yüksek SHÜH değeri 220.17 mLH₂/g biyokütle.saate ile 0.1 (g/g) P/C oranında elde edilmiştir.



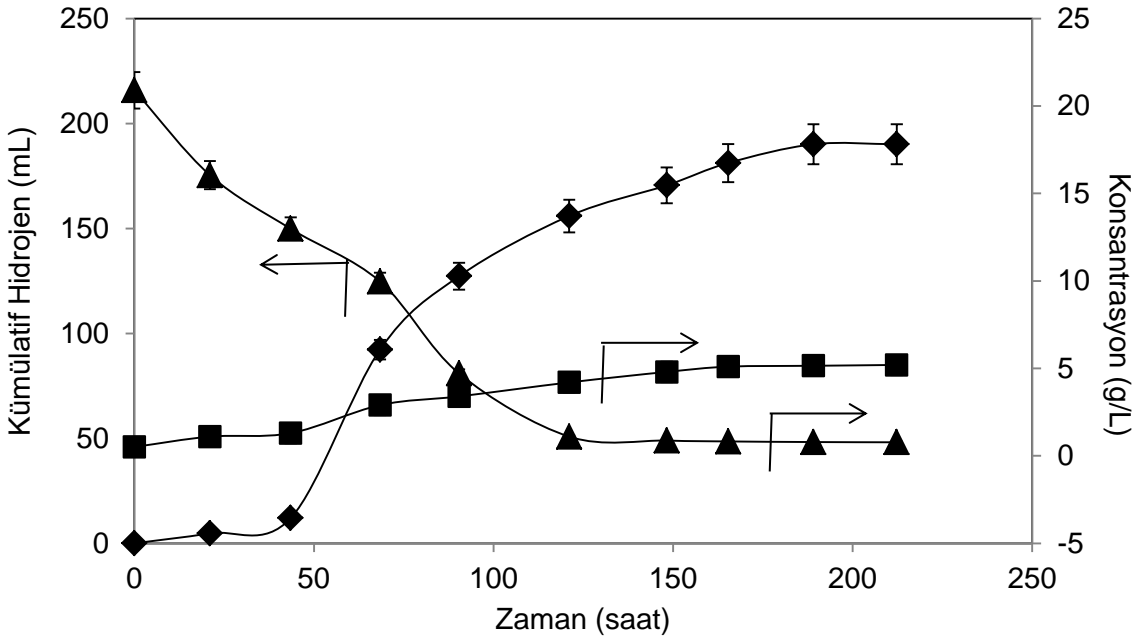
Şekil 19. Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı P/C oranlarında N/C oranına göre değişimi.

Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi şekil 20'de sunulmuştur. Buna göre sabit N/C oranlarında P/C oranının arttırılması SHÜH üzerinde 0, 0.01 ve 0.02 (g/g) N/C oranları için çok etkili olmasada 0.03, 0.04 ve 0.05 (g/g) N/C oranları için etkili olmuştur. Şekil 20'de görüldüğü gibi C/N oranının 0'dan 0.04'e kadar arttırılması SHÜH değerlerinin artmasına neden olmuştur. Ancak daha yüksek N/C oranı SHÜH'ün tekrar düşmesi ile neticelenmiştir. En yüksek SHÜH değerinin 220.17 mLH₂/g biyokütle.saat ile 0.1 (g/g) N/C ve 0.04 (g/g) P/C oranlarında bulunabileceği tespit edilmiştir.



Şekil 20. Spesifik hidrojen üretim hızının (SHÜH) farklı N/C oranlarında P/C oranına göre değişimi.

Design expert yazılımı ile en yüksek hidrojen üretim verimi ve SHÜH değerini veren şartların N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.00278 oranlarında elde edileceği belirlenmiştir. Bu optimum oranlarda işletilen karanlık fermentasyon deneyine ait TVFA (g/L) (■), glikoz (g/L) (▲) ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi Şekil 21’de gösterilmiştir. Buna göre değişkenlerin zamana göre değişiminin kesikli işletim ile uyumlu olduğu görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi substrat olan glikoz tüketilirken, Hidrojen ve TVFA’nın ürün olarak üretildiği anlaşılmaktadır. Hidrojen üretimi yaklaşık 30 saatlik bir adaptasyon süresinden sonra başlamış ve 190 mL’de sabitlenmiştir. Diğer taraftan glikoz 20 g/L başlangıç değerinden 1 g/L’nin altına kadar düşmüştür. TVFA üretimi ise deney sonunda 5 g/L civarında olmuştur. Deney parametreleri yaklaşık 190 saat sonra yatışkın hale gelmiştir. Bu deneye ait Gompertz sabitleri sırasıyla P: 222.79 mL H₂, Rm: 2.86 mLH₂/saat ve λ: 29.72 saat olarak hesaplanmış olup bu değerler Şekil 21 ile uyumlu çıkmıştır.



Şekil 21. N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.00278 optimum oranlarda işletilen karanlık fermentasyon deneyine ait TVFA (g/L) (■), glukoz (g/L) (▲)ve kümülatif Hidrojen (mL) (◆) üretiminin zamana göre değişimi.

Şekil 21’de verilen deneye ait hidrojen üretim verimi ve SHÜH değerleri $0.525 \text{ molH}_2/\text{mol}$ glukoz ve $243.14 \text{ mLH}_2/\text{g}$ biyokütle.saat çıkmıştır. Design-Expert programı verim ve SHÜH değerlerini $0.656 \text{ molH}_2/\text{molglukoz}$ ve $241.64 \text{ mLH}_2/\text{g}$ biyokütle.saat olarak tahmin etmiştir. Gerçek değerler ile tahmini beklenen değerlerin birbiriyle yakın çıkması önerilen modelin güvenilirliğini teyit etmiştir.

Yukarıdaki sonuçlar incelendiğinde en yüksek hidrojen üretim verimi ve spesifik hidrojen üretim değerlerini sağlayan oranların N/C: 0.05, P/C: 0.09 ve Fe/C: 0.00278 olduğu anlaşılmıştır. Bu oranlar aynı zamanda C/N: 20, C/P: 11.11 ve C/Fe: 359.7 oranlarına denk gelmekte olup, optimum C/N/P oranınının 100/5/9 olduğu sonucu çıkmaktadır.

4.3 Elektrohidroliz

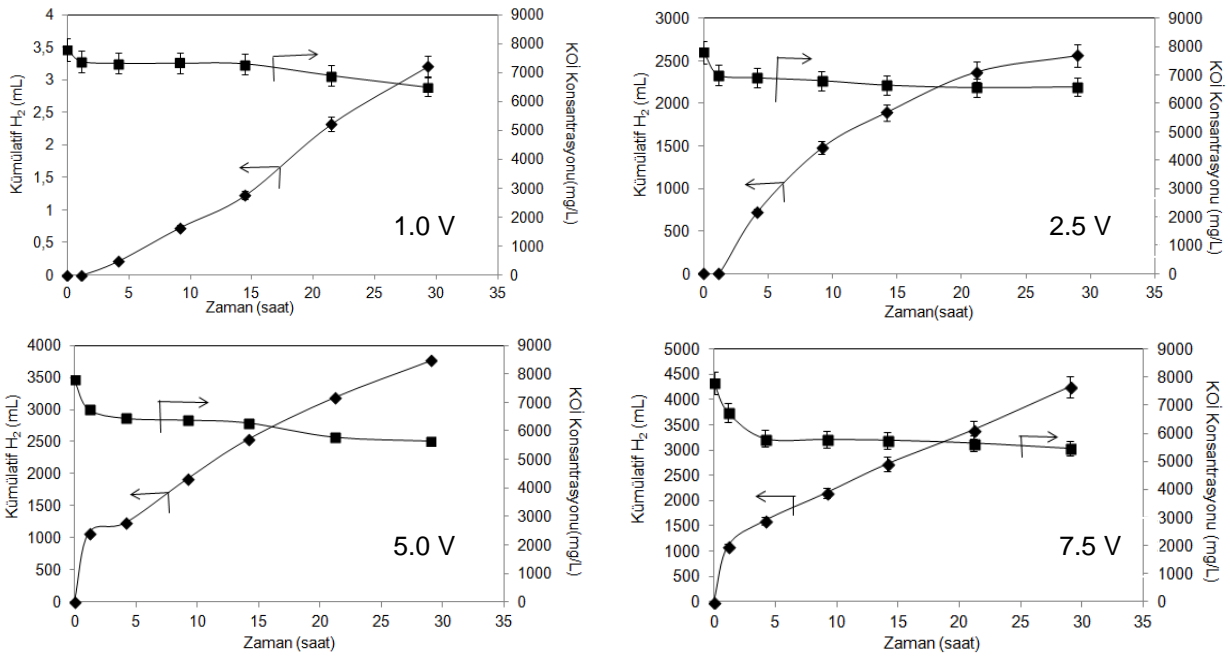
4.3.1 Ardışık Karanlık Fermentasyon ve Elektrohidroliz

Karanlık fermentasyon çıkış suyundaki organik asitler önemli miktarda hidrojen içermesine rağmen mikroorganizmalar tarafından hidrojen gazı olarak açığa çıkartılamamakta ve ortamda birikmektedir. Bu durum hidrojen kaybının yanında organik asit konsantrasyonu yüksek ve pH değeri düşük bir atıksu probleminin de oluşmasına neden olmaktadır. Literatürde söz konusu organik asitlerden hidrojen üretimi foto-heterotrofik bakterilerin kullanıldığı ışıklı fermentasyon basamağı ile yapılmaktadır. Ancak sterilizasyon, santrifüjleme, amonyum uzaklaştırılma, ışık gereksinimi gibi zahmetli işlemler gerektiren aydınlık fermentasyon basamağı beraberinde uygulama güçlükleri ve maliyetlerin de artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle projede, ışıklı fermentasyonun yerine geçebilecek olan elektrohidroliz prosesinin uygulanması üzerine araştırmalar yapılmıştır. Bu sayede karanlık fermentasyonda en yüksek %30-50 seviyelerinde elde edilen biyogaz hidrojen yüzdesinin, elektrohidroliz ile >%95'lere ulaşması ve hidrojen üretim veriminin karanlık fermentasyon ile birlikte 8 molH₂/mol glikoz değerine çıkartılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda EH ile hidrojen üretiminde uygulanan voltajın, substrat konsantrasyonunun ve pH'nın hidrojen üretimine olan etkileri araştırılmıştır.

4.3.1.1 Uygulanan Voltajın Etkisi

Deneyler 135 mL'lik serum şişelerinde 85 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Tüm şartların sabit tutulduğu deneylerde (TVFA_o: 4.4 g/L, KOİ_o: 7.8 g/L, iletkenlik: 67.4 ms/cm, pH: 6.08) sadece uygulanan voltaj değerler 1, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 15 V değiştirilerek voltajın hidrojen üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Bunlardan 10 ve 15 V'luk denemelerde yüksek elektrik akımının oluşması nedeniyle güç kaynaklarında kısa devre problemi meydana gelmiş ve bu nedenle incelenen voltaj aralığı 1-7.5 V arasında tutulabilmiştir. Tüm deneyler iki tekrarlı yapılmış olup, aynı voltajda suya da elektrik akımı uygulanarak sudan kaynaklanan hidrojen üretimi takip edilmiştir. KF çıkış suyuna doğrusal elektrik gerilimi uygulandığında, alüminyum anot çubuk yükseltgenerek ortama elektron vermekte ($Al^0 = Al(III) + 3e^-$) ve bu elektronlar organik bileşiklerin parçalanmasıyla (Organik bileşikler = nH^+ + parçalanmış organik bileşikler) açığa çıkan hidrojen iyonlarıyla birleşerek hidrojen gazını ($nH^+ + ne^- = n/2 H_{2(g)}$) oluşturmaktadır (Kargi ve Catalkaya 2011a). Şekil 22, Kümülatif Hidrojen hacmi ile KOİ konsantrasyonunun farklı gerilimler altında zamana göre değişimini özetlemektedir. Buna göre her bir voltajda elde edilen

hidrojen üretimi ve KOİ giderimleri farklı olmuştur. En düşük KOİ (16.67%) giderim verimiyle kümülatif hidrojen üretimi (3.2 mL) 1.0 V gerilim altında elde edilmiştir. Voltajın artmasıyla birlikte bu değerler de artmıştır. Gerilimin 1.0 V'tan 2.5 V'a yükseltilmesi kümülatif hidrojen hacminde (2562.78 mL) ciddi artışa neden olurken KOİ giderimi 1.0 V'a göre aynı seviyelerde gerçekleşmiştir. 5.0 V gerilim altında hem kümülatif hidrojen hacmi (3766.51 mL) hemde KOİ giderimi (26.28%) 2.5 V'a kıyasla iki kat artmıştır. En yüksek kümülatif hidrojen (4250 mL) ve KOİ giderimi (30 %) 7.5 V'ta elde edilmiştir. Voltaj artışıyla birlikte daha yüksek hidrojen oluşumu ve KOİ gideriminin nedeni gerilim artışıyla birlikte anottan salınan elektron miktarının artışı ve daha fazla organik maddenin parçalanması neticesinde ortama daha yüksek miktarda hidrojen iyonunun verilmesi olmuştur. Yüksek voltajla birlikte artan elektron ve hidrojen iyonları daha fazla hidrojen gazının oluşmasına olanak vermiştir.



Şekil 22. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı gerilimler altında zamana göre değişimi.

Farklı gerilimler altında hidrojen üretim verimi ve hızlarıyla enerji ve TVFA giderim verimleri Tablo 11'de verilmiştir. Buna göre birim reaktör hacmi başına elde edilen hidrojen üretim verimi voltajın 1.0 V'tan 7.5 V'a artmasıyla birlikte 0.037'den 50 mLH₂/mL değerine yükselmiştir. Diğer taraftan birim KOİ giderimi başına hidrojen üretim verimi, hidrojen üretim hızı ve enerji dönüşüm verimleri incelendiğinde bu parametrelerin gerilimin 1.0 V'tan 2.5 V'a yükseltilmesiyle sırasıyla

29'dan 25677.8 mLH₂/gKOİ'e, 0.156'dan 196.67 mLH₂/saat'e ve 5.2'den 98%'e yükseldiği ancak daha yüksek voltajlarda düştüğü görülmüştür. TVFA giderim verimi aynı eğilimi göstermeyip, voltajın 1.0'den 7.5 V'a yükseltilmesiyle birlikte 17.95%'ten 51.59%'a yükselerek en yüksek değerine ulaşmıştır. 1.0 ile 7.5 V arasındaki gerilimler aynı hacimdeki suya uygulandığında kümülatif hidrojen, voltajın yükselmesiyle artarak en yüksek değerine (40 mL) 7.5 V'ta ulaşmıştır. Bu sonuca göre suyun elektrolizinden kaynaklanan hidrojen üretiminin katkısı minimal seviyede olmuştur. Deney sonucunda elde edilen en yüksek hidrojen yüzdeleri de Tablo 11'de verilmiştir. Buna göre 1.0 V gerilim dışındaki tüm şartlarda 100% hidrojen yüzdesine ulaşılmıştır.

Tablo 11. Farklı gerilimler altında hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.

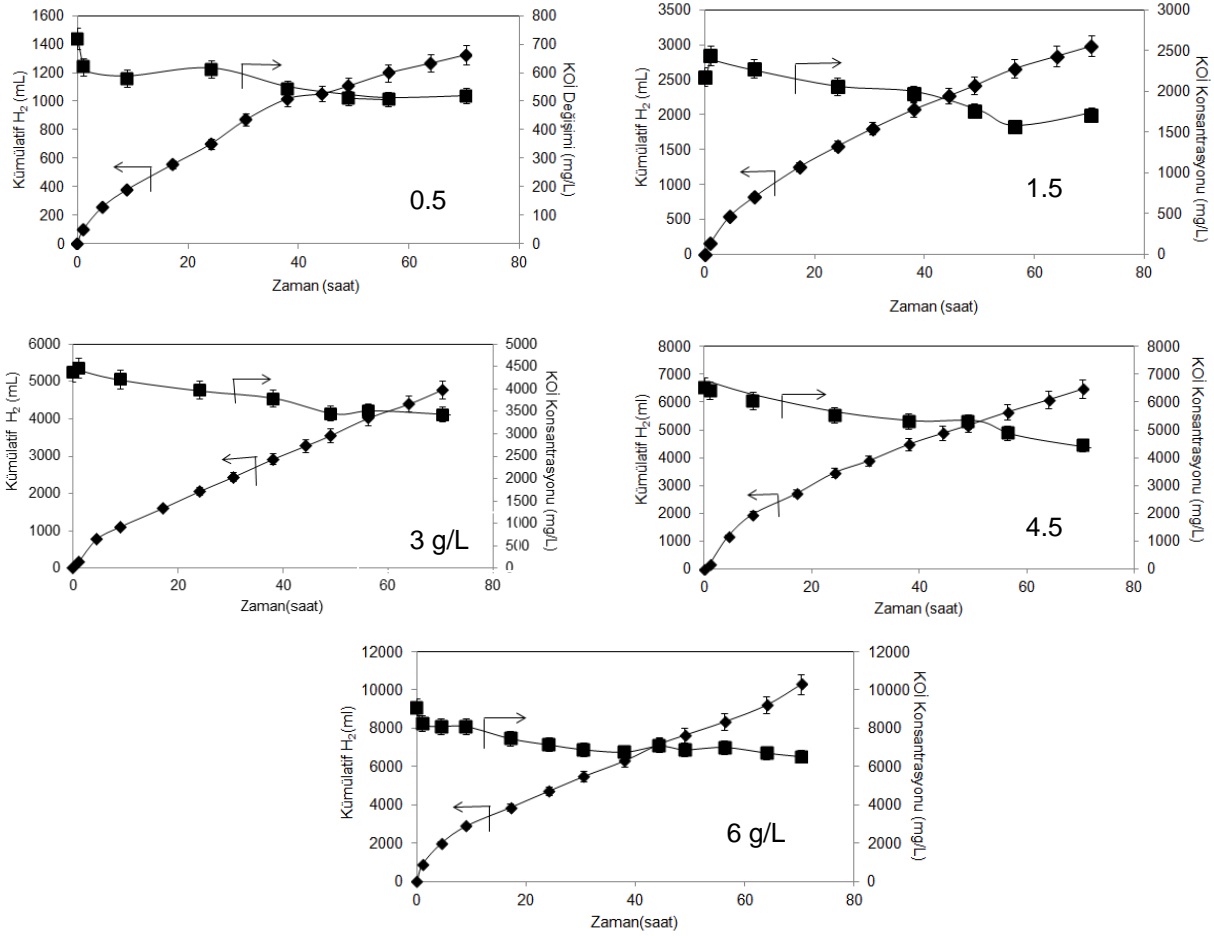
Gerilim (Volt)	Verim (mLH ₂ /mLReaktör Hacmi)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	HÜH (mLH ₂ /saat)	η (%)	TVFA giderim verimi (%)	Max. H ₂ (%)
1	0.037	29.00	0.156	5.2	17.95	21.9
2.5	30.15	25677.8	196.67	98	15.56	100
5	44.31	20610.2	136.23	84	47.95	100
7.5	50.00	21367.5	102.69	68	51.59	100

Birim KOİ giderimi başına hidrojen üretim verimi, hidrojen üretim hızı ve enerji dönüşümü incelendiğinde en iyi performansın 2.5 V gerilim altında elde edildiği görülmektedir. Ancak KOİ giderim verimleri, kümülatif hidrojen hacimleri ve birim reaktör hacmi başına hidrojen üretim verimleri dikkate alındığında 2.5 V gerilimde elde edilen değerlerin daha yüksek gerilimlere göre düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmada birim KOİ giderimi başına üretilen hidrojen hacmi ile hidrojen üretim hızları literatürde elde edilen benzer çalışmalara göre çok yüksek çıkmıştır. Diğer taraftan enerji dönüşüm ve organik madde giderim verimleri ile hidrojen yüzdeleri benzer seviyelerdedir. Organik asit içeren farklı atık suların hidrojen üretimi amacıyla elektrolize tabi tutulduğu denemelerde hidrojen üretim hızı: 25.8-53.2 mLH₂/saat, birim KOİ giderimi başına hidrojen üretim hacmi: 96-2500 mLH₂/gKOİ, KOİ giderim verimleri: 10.5-84%, enerji dönüşüm verimi: 37.8-95% ve reaktör hacmi başına üretilen hidrojen hacimleri: 5.5-11.1 mLH₂/mL reaktör arasında değişmiştir (Kargi ve Arıkan 2013c). Bu sonuçlar dikkate alındığında bu çalışmada elde edilen KOİ başına hidrojen üretim verimleriyle hidrojen üretim hızlarının oldukça yüksek çıkmasının temel nedeni muhtemelen çözeltilerin çok yüksek iletkenliğe (67.4 mS/cm) sahip olması nedeniyle suyun elektrolizinden dolayı ortaya çıkan ilave hidrojen gazı miktarından kaynaklanmıştır. Zira literatürde kullanılan atık suların iletkenlik değerleri en fazla 8 mS/cm olup, bu projede kullanılan suyun iletkenliğinden oldukça düşüktür. İletkenliğin bu kadar yüksek

olmasının temel nedeni sülfirik asit hidrolizi esnasında ortama verilen sülfat iyonlarının ortamda kalmasının olduğu düşünülmektedir. Kontrol deneylerinde kullanılan çeşme suyunun elektrolizinden düşük miktarda hidrojen çıkmasının nedeni iletkenlik değerinin 0.747 mS/cm seviyesinde olmasından kaynaklanmıştır. Yüksek iletkenliğe sahip atıksuda suyun da elektrolize uğradığı aşıkardır. Bu nedenle hidrojen üretim verimlerinin kıyaslamasında birim reaktör hacmi başına üretilen hidrojen hacminin esas alınması daha doğru olacaktır. Hidrojen üretim veriminin yanında organik madde giderimi de dikkate alınarak elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 7.5 V gerilim uygulamanın daha avantajlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle projenin bundan sonraki iki bölümünde 7.5 V gerilim uygulanmasına karar verilmiştir.

4.3.1.2 Başlangıç Organik Asit Konsantrasyonunun Etkisi

Deneyler 310 mL serum şişelerinde 85 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Tüm şartların sabit tutulduğu deneylerde (Gerilim: 7.5 V, pH: 6.8, V_0 : 85 mL) sadece başlangıç TVFA konsantrasyonu 0.5, 1.5, 3.0, 4.5 ve 6.0 g/L değerlerine ayarlanarak TVFA konsantrasyonunun hidrojen üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Tüm deneyler iki tekrarlı yapılmış olup, aynı voltajda suya da elektrik akımı uygulanarak sudan kaynaklanan hidrojen üretimi takip edilmiştir. Şekil 23, Kümülatif Hidrojen hacmi ile KOİ konsantrasyonunun farklı TVFA konsantrasyonları için zamana göre değişimini göstermektedir. Genel olarak bakıldığında tüm koşullar altında KOİ konsantrasyonu azalış gösterirken kümülatif hidrojen hacminde artış görülmüştür. KOİ giderim verimi tüm koşullar altında 20-32% arasında değişim göstermiş olup, TVFA konsantrasyonunun değişmesi KOİ giderim veriminde anlamlı bir artış veya azalış göstermemiştir. Kümülatif hidrojen hacimleri TVFA konsantrasyonun artmasıyla birlikte artış göstermiştir. 0.5 g/L TVFA konsantrasyonunda ulaşılan maksimum kümülatif hidrojen hacmi 1326.47 mL olurken daha yüksek TVFA konsantrasyonları için üretilen hidrojen hacimleri sırasıyla 1.5 g/L için 2983 mL, 3.0 g/L için 4769.52 mL, 4.5 g/L için 6479.52 mL ve 6.0 g/L için 10294.75 mL olmuştur. Yüksek TVFA konsantrasyonu ortama daha çok elektron verilmesine ve dolayısıyla daha çok hidrojen gazının oluşmasına neden olmuştur. 7.5 V gerilim altında aynı sürede çeşme suyuna gerilim uygulanması durumunda 40 mL hidrojen oluşumu gözlenmiş olup, numune şişelerinden elde edilen hidrojene kıyasla ihmal edilebilir seviyede düşük olmuştur.



Şekil 23. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı substrat konsantrasyonlarında zamana göre değişimi.

Farklı TVFA konsantrasyonlarında elde edilen hidrojen üretim verimi ve hızlarıyla enerji ve TVFA giderim verimleri Tablo 12’de özetlenmiştir. Buna göre birim reaktör hacmi başına üretilen kümülatif hidrojen hacmi TVFA konsantrasyonunun 0.5’ten 6.0 g/L’ye artmasıyla birlikte 15.6’dan 121.11 mL_{H₂}/mL değerine yükselmiştir. Aynı şekilde Hidrojen üretim hızı ve enerji dönüşüm verimi de TVFA konsantrasyonun artmasıyla birlikte artış göstermiştir. En düşük HÜH değeri 0.5 g TVFA/L’de 23.68 mL_{H₂}/saat iken en yüksek hız 109.93 mL_{H₂}/saat ile 6.0 g/L’de elde edilmiştir. Birim KOİ giderimi başına oluşan hidrojen üretimleri 35-77 LH₂/g KOİ gibi çok yüksek değerler arasında salınım göstermiş olup, TVFA konsantrasyonu ile uyumlu bir değişim sergilememiştir. Bölüm 4.3.1.1’de açıklandığı üzere çok yüksek Birim KOİ giderimi başına oluşan hidrojen üretim verimlerinin sebebi yüksek iletkenlik nedeniyle suyun elektrolizinden kaynaklanmıştır. Deney başlangıcındaki iletkenlik değerlerinin TVFA konsantrasyonunun 0.5’ten 6.0 g/L’ye yükselmesiyle 10.90’dan 73.04 mS/cm değerine kadar artmış olması iletkenliğin ne kadar

yüksek olduğunu göstermektedir. Tablo 12'de enerji dönüşüm verimleri incelendiğinde en düşük verim 17% ile 0.5 gTVFA/L'de görülürken; verim değerleri 1.5 g/L'de 24%, 3.0 g/L'de 30%, 4.5 g/L'de 36% ve 6.0 g/L'de 41% olarak elde edilmiştir. TVFA giderim verimiyle başlangıç TVFA konsantrasyonu arasında mantıklı bir değişim gözlenmemiştir. TVFA giderim verimi 22-62% arasında değişirken en yüksek TVFA giderim verimi 62% ile 1.5 g/L'de elde edilmiştir. Tüm deneylerde oluşan gaz içerisindeki hidrojen yüzdesi 100% değerine ulaşmıştır.

Tablo 12. Farklı başlangıç TVFA konsantrasyonları için hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.

Başlangıç TVFA konsantrasyonu (g/L)	Verim (mLH ₂ /mL Reaktör Hacmi)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	HÜH (mL H ₂ /saat)	η (%)	TVFA giderim verimi (%)	Max. H ₂ (%)
0.5	15.605	77641.20	23.68	17	22.6	98.5
1.5	35.094	74668.30	52.14	24	62.0	100
3	56.111	59693.61	62.91	30	35.0	100
4.5	76.229	36299.83	79.47	36	51.1	100
6	121.114	46943.90	109.93	41	36.5	100

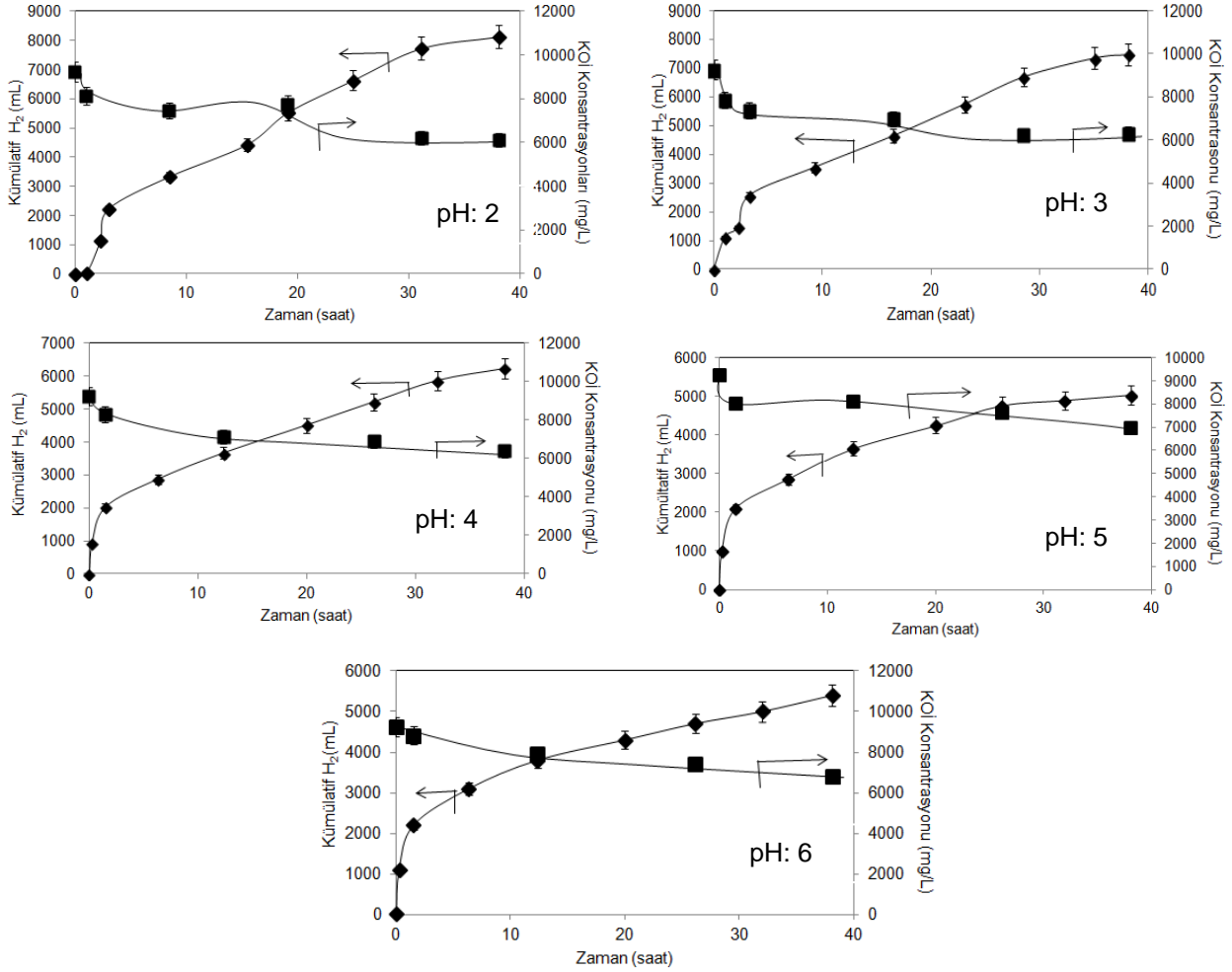
Yukarıda elde edilen sonuçlara incelendiğinde yüksek başlangıç TVFA konsantrasyonunda daha verimli hidrojen üretiminin gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1.3'te verilen literatür sonuçlarıyla kıyaslandığında birim sıvı hacmi başına hidrojen üretim verimiyle (121.11 mLH₂/mL) hidrojen üretim hızının (109.93 mLH₂/saat) oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Buradan 6 g/L başlangıç TVFA konsantrasyonunun elektroliz ile hidrojen üretimi için en uygun değer olduğu sonucu çıktığı için bundan sonraki bölümde 6 g/L TVFA konsantrasyonu seviyesinde çalışılmıştır.

4.3.1.3 pH'nın Etkisi

Deneyler 300 mL'lik serum şişelerinde 85 mL çalışma hacminde yapılmıştır. Tüm şartların sabit tutulduğu deneylerde (TVFA₀: 5.52 g/L, KOİ₀: 9.25 g/L, ortalama iletkenlik: 75 ms/cm) sadece pH başlangıç değerleri pH: 2, pH: 3, pH: 4, pH: 5 ve pH: 6 arasında değiştirilerek pH'nın hidrojen üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Tüm deneyler iki tekrarlı yapılmış olup, aynı pH değerlerinde suya da elektrik akımı uygulanarak sudan kaynaklanan hidrojen üretimi takip edilmiştir.

Şekil 24, Kümülatif Hidrojen hacmi ile KOİ konsantrasyonunun farklı pH değerleri için zamana göre değişimini göstermektedir. Tüm pH değerleri için 38 saatlik deney sonunda KOİ

konsantrasyonu azalış gösterirken kümülatif hidrojen hacminde artış görülmüştür. KOİ giderim verimleri 25.08-34.05% arasında değişim göstermiş olup, KOİ giderimi pH'nın 6'dan 2'ye düşmesiyle artış göstermiştir. Benzer eğilim pH ile kümülatif hidrojen hacimleri arasında da görülmüştür. Buna göre farklı pH değerleri için elde edilen kümülatif hidrojen değerleri sırasıyla şöyle olmuştur; pH:2 için 8133.62 mL, pH:3 için 7467.76 mL, pH: 4 için 6225.10 mL, pH: 5 için: 5027.49 mL ve pH: 6 için 5396.79 mL.



Şekil 24. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı pH'larda zamana göre değişimi.

Farklı pH değerlerinde elde edilen hidrojen üretim verimi ve hızlarıyla enerji ve TVFA giderim verimleri Tablo 13'te özetlenmiştir. Buna göre birim reaktör hacmi başına üretilen hidrojen hacimlerini ifade eden verimler incelendiğinde bu verimlerin pH:2 olan durumda en yüksek (95.68 mLH₂/mL) olduğu ve pH yükseldikçe 60 mLH₂/mL mertebelerine kadar düştüğü

görülmüştür. Bunun sebebi düşük pH'da ortamda daha fazla hidrojen iyonunun bulunması ve dolayısıyla daha çok hidrojen gazının açığa çıkmasından kaynaklanmıştır. Tablo13'te gösterilen birim KOİ giderimi başına üretilen hidrojen hacimlerini ifade eden verim değerleri; Bölüm 4.3.1.1 ve 4.3.1.2'de açıklandığı üzere çözeltilerin yüksek iletkenliği nedeniyle suyun elektrolizinden kaynaklanan fazla hidrojen gazı nedeniyle çok yüksek değerlerde çıkmıştır. 25-30 LH₂/g KOİ mertebesinde değişen bu verim değerleri pH değerinin düşmesiyle yükselme eğilimi göstermiştir. Tablo 13'te farklı pH değerleri için hidrojen üretim hızları incelendiğinde HÜH değerlerinin dalgalı bir seyir izlediği görülmektedir. HÜH değeri hidrojen verimleri ve kümülatif hidrojen hacimlerinin aksine düşük pH'da en düşük değerde olurken yüksek pH'larda daha yüksek değerler almıştır. En düşük HÜH değeri pH:2'de 176.7 mLH₂/saat olurken en yüksek HÜH değeri pH: 5'te 1096 mLH₂/saat olarak bulunmuştur. Herbir pH değeri için TVFA giderim verimleri incelendiğinde, bu verimin pH düştükçe yükseldiği görülmüştür. Genel olarak TVFA giderim verimleri 30-44% arasında değişim göstermiş olup, en yüksek TVFA giderimi pH: 2'de elde edilmiştir. Tüm şartlarda oluşan gaz içerisindeki hidrojen yüzdesi 100% değerine ulaşmıştır. Bunun dışında deney sonu pH değerleri elektrohidroliz esansında ortamdan hidrojen iyonunun uzaklaşması nedeniyle 13'ün üzerine çıkmıştır.

Tablo 13. Farklı pH değerleri için hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.

pH	Verim (mLH ₂ /mLReaktör hacmi)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	Hidrojen Üretim Hızı (mLH ₂ /saat)	η (%)	TVFA giderim verimi (%)	Max. H ₂ (%)	pH _{son}
2	95.68	30377.66	176.7	37	43.84	100	13.5
3	87.85	29781.69	671.5	35	42.03	100	13.6
4	73.23	25341.33	273.31	33	38.40	100	13.1
5	59.14	26055.92	1096.97	29	29.35	100	13.42
6	63.49	26236.21	920.7	36	31.16	100	14.10

Sonuç olarak pH parametresi elektrohidrolizde hidrojen üretimi ve TVFA giderimi açısından ele alındığında düşük pH değerlerinde daha verimli sonuçların elde edildiği görülmüştür. Bunun nedeni pH değerinin düşmesiyle beraber ortamda daha fazla hidrojen iyonunun bulunmasıdır. Bu nedenle pH'sı düşük olan karanlık fermentasyon çıkış suyuna elektrohidroliz uygulanması daha avantajlıdır.

4.3.2 Birleşik Karanlık Fermentasyon ve Elektrohidroliz

Birleşik KF-EH prosesinin amacı, KF ortamına doğrusal elektrik akımı verilerek organik asitlerin parçalanmasına yardımcı olmak ve bu sayede; organik asitlerin neden olduğu mikrobiyal ürün inhibisyonu etkisini azaltmak, organik asit oluşumu nedeniyle sert pH düşüşlerini önlemek ve

çıkan hidrojen iyonlarından hidrojen gazını tek reaktörde oluşturmaktır. Birleşik KF-EH prosesinde fermentasyon olayının devam etmesinden dolayı mikrobiyal ortam şartlarının uygun halde tutulması esastır. Bu nedenle organik asitlerin hızlı parçalanmasını sağlamak için ortama yüksek elektrik geriliminin verilmesi gibi uygulamaların yapılması mümkün değildir. Ayrıca ortamdaki hidrojen iyonlarının uzaklaştırılması neticesinde yükselen pH ($\text{pH} > 10$) değerlerinin kontrol edilerek nötral ($\text{pH}: 6-7$) seviyelerde tutulması gerekir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak iki set deney yapılmıştır. Birinci set deneyde KF esnasında düşen pH değeri dışarıdan asit ilavesi yapılmadan ortama elektrik akımı verilerek ayarlanırken ikinci set deneyde yükselen pH dışarıdan asit ilavesi yapılarak nötral seviyelerde kontrol edilmiştir. Mikrobiyal faaliyetlerin zarar görmemesi için tüm çalışmalar 0-3.0 V gerilim altında gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1 Birleşik Karanlık Fermentasyon ve Elektroliz: pH Kontrolü için Dışarıdan Asit İlavesiz Deneyler

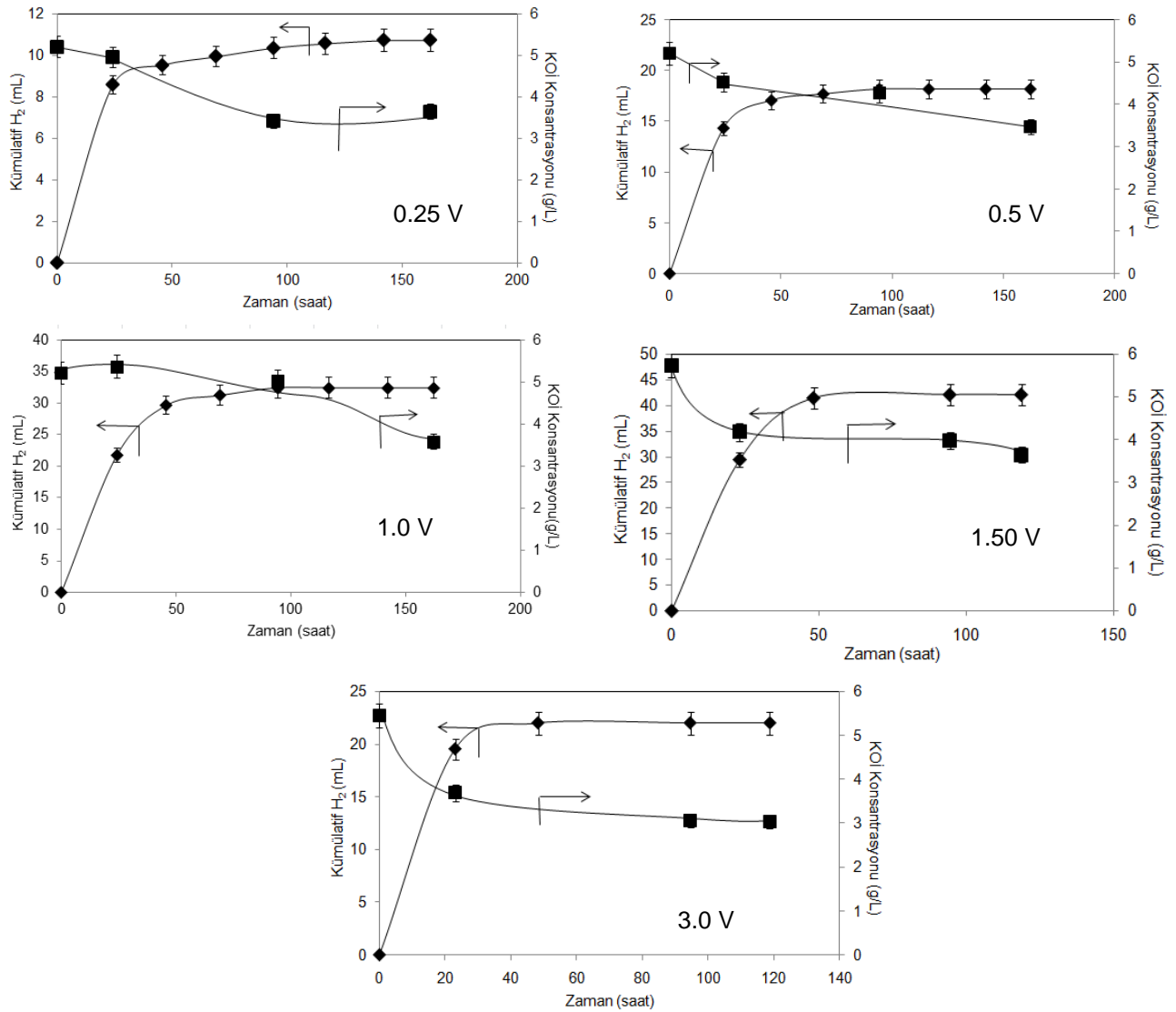
Bu bölümde sunulan çalışmalarda elektrik gerilimi sadece pH değerinin karanlık fermentasyonda nötral seviyenin altına düşmesi durumunda uygulanmıştır. Bu sayede karanlık fermentasyonda pH kontrolü gerilim ile sağlanarak organik asit inhibisyonu etkisinin azaltılması hedeflenmiştir.

4.3.2.1.1 Uygulanan Voltajın Etkisi

Deneyler 300 mL serum şişelerinde 140 mL çalışma hacminde 36 °C sıcaklıkta inkübatörde kesikli işletme modunda yapılmıştır. Substrat olarak kullanılan 50 g/L kağıt atığı çözeltisi 135 °C, pH:1'de 15 dakika otoklavlanarak elde edilmiştir. Tüm şartların sabit tutulduğu deneylerde (Glikoz: 5.1 g/L, KOH : 5.73 g/L, iletkenlik: 5 ms/cm, elektrotlar arası mesafe: 0.5 cm) sadece uygulanan gerilim değerleri 0.25, 0.5, 1.0, 1.50 ve 3.0 V arasında değiştirilerek gerilimin hidrojen üretimine olan etkileri iki tekrarlı deneyler ile araştırılmıştır.

Karanlık fermentasyonda aşı olarak Bölüm 3.1'de anlatılan besi ortamında büyütülen anaerobik çamur kültürü kullanılmış olup, büyütülen bu çamurdan 14 mL (çalışma hacminin %10'u) deney ortamına aşılanmıştır. Gerekli nütrientler Bölüm 4.2.3'te belirlenen optimum şartlar kullanılarak ayarlanmıştır (C/N/P/Fe: 100/5/9/0.28). İlaveten ortama 20 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg/L L-cysteinHCL ve Brom Cresol pH boya indikatörü konulmuştur. Ortama elektrik akımı pH değerinin 6.8'in altına düşmesiyle gözlemlenen renk değişimine göre yapılmıştır. Zira brom-krezol indikatörü pH değerinin 6.8'in altına düşmesi durumunda mordan yeşil-sarı renge dönmektedir. Genel olarak pH'nın yükselmesi yüksek gerilim değerlerinde ortamdaki daha fazla hidrojen iyonunun uzaklaştırılmasından dolayı daha hızlı olmuştur.

Şekil 25, Kümülatif Hidrojen hacmi ile KOİ konsantrasyonunun farklı gerilimler altında zamana göre değişimini göstermektedir. Buna göre her bir voltajda elde edilen hidrojen üretimi ve KOİ giderimi farklı olmuştur. KOİ giderim verimleri voltajın 0.25'ten 3.0 V'a yükseltilmesiyle birlikte 30.00'dan 44.22%'a küçük yükselmeler ile artmıştır. Bunun yanında kümülatif hidrojen hacimleri gerilimin 0.25 V'den 1.50 V'a yükseltilmesiyle 10.714 mL'den 32.43 mL'e çıkmış fakat 3.0 V'ta 21.967 mL değerine düşmüştür. Bunun nedeni 1.5 V üzerindeki gerilimin mikroorganizmalar üzerindeki olumsuz etkisi ile açıklanabilir. pH değeri tüm şişelerde 5-7 arasında kontrol edilerek uygun seviyelerde tutulmuştur.



Şekil 25. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı gerilimler altında zamana göre değişimi.

Birleşik KF-EH'da farklı gerilimler altında hidrojen üretim verimi ve hızlarıyla hidrojen yüzdeleri Tablo 14'te verilmiştir. Buna göre hidrojen üretim verimleri ve hidrojen üretim hızı gerilimin 0.25'ten 1.50 V'a yükseltilmesiyle artmış fakat 3 V gerilimde düşmüştür. En düşük hidrojen verimleri 0.25 V'ta 49.05 mLH₂/gKOİ ve 0.237 molH₂/mol glikoz olarak elde edilirken en yüksek verimler 1.5 V'ta 192.77 mLH₂/gKOİ ve 0.516 molH₂/mol glikoz olarak elde edilmiştir. Görüldüğü gibi bu değerler karanlık fermentasyon teorik hidrojen verimleri olan 4 molH₂/mol glikoz ve 550 mLH₂/g KOİ değerlerinden oldukça düşük çıkmıştır. Tek başına KF'dan daha yüksek verimlerin beklendiği birleşik KF-EH sisteminde düşük hidrojen verimlerinin elde edilmesinin sebebi asit hidrolizinden kaynaklanan yüksek sülfat konsantrasyonu ve yüksek iletkenlik değerlerinin mikrobiyal aktiviteyi limitlemesinden veya anaerobik çamur içerisinde hidrojen gazı tüketimine neden olabilen homoasetojen bakterileri üremesinden kaynaklanmış olabilir. Zira pH değerleri ve diğer koşullar (substrat konsantrasyonu, sıcaklık, nütrient dengesi vb.) karanlık fermentasyon için ideal durumda tutulmuştur. Hidrojen üretim hızı da gerilimin 0.25 V'tan 1.50 V'a arttırılmasıyla 0.354 mLH₂/saat'ten 1.270 mLH₂/saat değerine yükselmiş 3.0 V'ta ise azalarak 0.844 mLH₂/saat değerine düşmüştür. Birleşik KF-EH deneylerinde enerji dönüşüm verimi hesaplanamamıştır, bunun nedeni hidrojen üretimine hem KF hemde EH'in aynı ortama eş zamanlı katkı sağlamasıdır. KF çıkış suyuna gerilim uygulandığı ardışık KF-EH'de üretilen hidrojen sadece EH kaynaklı olduğu için enerji dönüşüm verimi hesap etmek mümkündür ancak birleşik sistemde bu ayırım yapılamamıştır. Reaktörlerde oluşan maximum hidrojen yüzdeleri incelendiğinde, hidrojen yüzdesinin 0.25 V'tan 1.00 V'a kadar artış gösterdiği daha yüksek gerilimlerdeyse düştüğü görülmüştür.

Tablo 14. Farklı gerilimler altında hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.

Gerilim (Voltaj)	Kümülatif H ₂ (mL)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	Verim (molH ₂ /mol glikoz)	HÜH (mLH ₂ /saat)	Max. H ₂ (%)
0.25	10.714	49.05	0.237	0.354	8.4
0.50	18.179	75.49	0.309	0.592	18.21
1.00	32.431	142.11	0.511	0.899	31.12
1.50	42.102	192.77	0.516	1.270	23.94
3.00	21.967	72.64	0.280	0.844	12.58

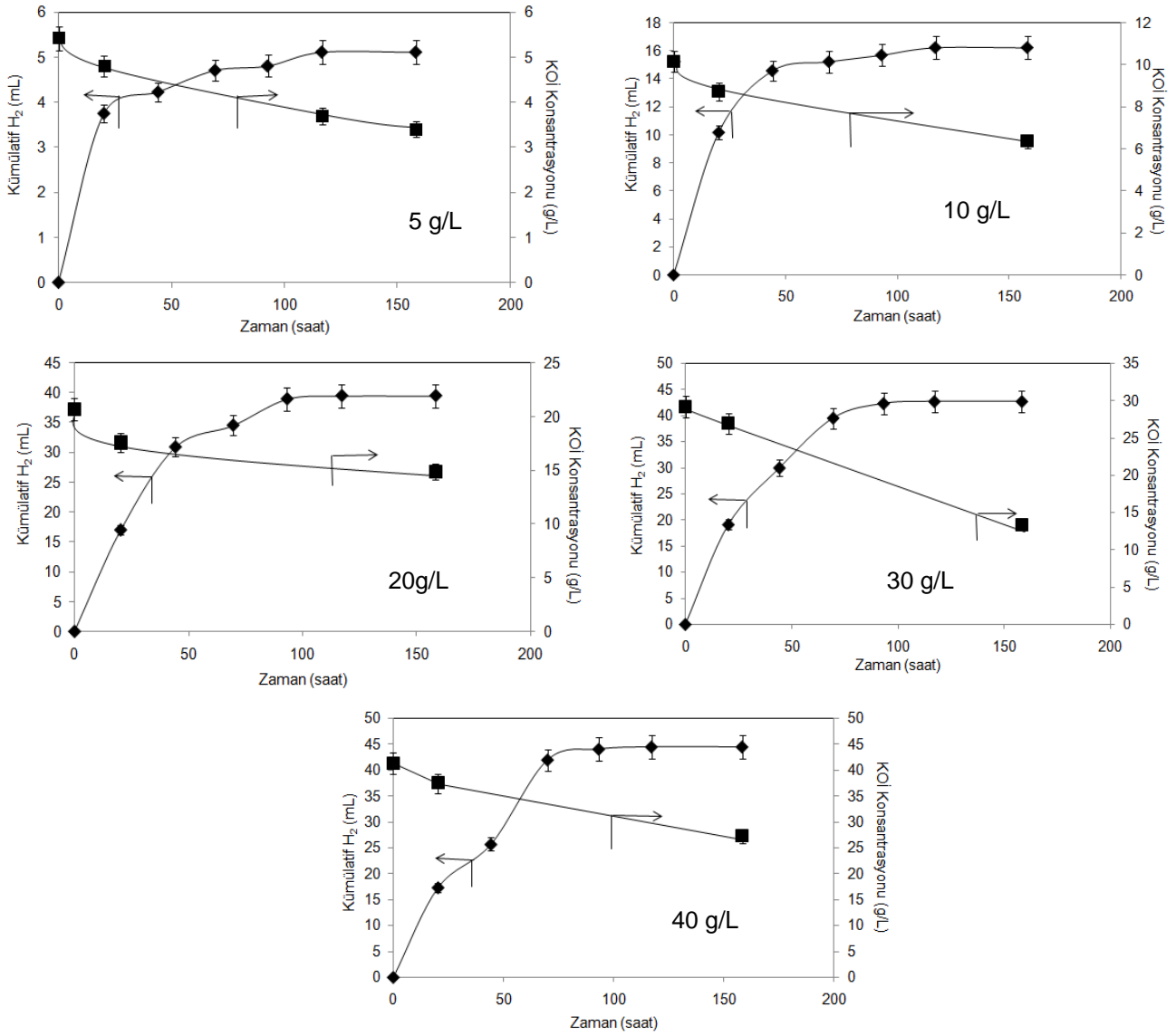
Literatürde KF ortamına doğrusal elektrik akımı uygulayarak pH kontrolüne yönelik çalışma yer almadığı için sonuçlar kıyaslanamamıştır. Ancak, buna rağmen verimlerin KF'den düşük çıkması, asit hidrolizinden kaynaklanan inhibitör maddelerin karanlık fermentasyon performansını olumsuz yönde etkilediğini düşündürmektedir. Uygulanan gerilimin hidrojen

üretimine olan etkilerinin araştırıldığı bu bölümde en uygun gerilimin 1.0 V olmasına karar verilmiştir. Bunun nedeni 1.0 V üzerindeki gerilim değerlerindeki hidrojen üretiminde KF dan ziyade EH ile hidrojen üretiminin olduğu sonucuna varılması olmuştur. 1.0 V gerilimde elde edilen sonuçlar 1.5 V'a yakın olup, gerilimin 1.5 V'a yükseltilmesi çok büyük bir fark yaratmamıştır. Bu nedenle bundan sonraki bölümlerde yapılan çalışmalarda 1.0 V gerilim kullanılmıştır.

4.3.2.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Deneyler 300 mL serum şişelerinde 100 mL çalışma hacminde 36 °C sıcaklıkta inkübatörde kesikli işletme modunda yapılmıştır. Bir önceki bölümden farklı olarak bu aşamada substrat hazırlığı için kullanılan 200 g/L kağıt atığı çözeltisi 105 °C'de %5'lik H₂SO₄ ile de 210 dakika otoklavlanarak elde edilmiştir. Bunun nedeni bu deney için 30-40 g/L gibi yüksek şeker içeren substrat çözeltilerine ihtiyaç duyulmasıdır. Otoklavlanan substrat, içerisindeki 5-HMF'nin giderilmesi için bölüm 4.1'de anlatıldığı gibi aktif karbon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra bu çözelti, sülfat iyonlarının giderimi için pH: 10.5, 50 °C, 150 rpm'de iki saat süreyle Ca(OH)₂ ile işleme tabi tutulmuştur. Aşı ve nütrient ilavesi ile pH kontrolü Bölüm 4.3.2.1.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Tüm şartların sabit tutulduğu deneylerde (Gerilim: 1.0 V, pH: 6.8, V₀: 100 mL, elektrotlar arası mesafe: 0.5 cm) sadece başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonu 5.0 g/L, 10.0 g/L, 20.0 g/L, 30.0 g/L ve 40.0 g/L arasında değiştirilerek substrat konsantrasyonunun hidrojen üretimine olan etkileri iki tekrarlı deneyler ile araştırılmıştır.

Kümülatif Hidrojen hacmi ile KOİ konsantrasyonunun farklı substrat konsantrasyonları için zamana göre değişimi Şekil 26'te gösterilmiştir. Genel olarak bakıldığında tüm koşullar altında KOİ konsantrasyonunun azalmasıyla birlikte kümülatif hidrojen hacminde artış görülmüştür. KOİ giderim verimi 27.40-54.55% arasında değişirken en yüksek KOİ giderimi 30 g/L'de elde edilmiştir. Kümülatif hidrojen hacimleri substrat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artış göstermiştir. Buna göre farklı substrat konsantrasyonlarında 5 g/L için 5.11 mL, 10.0 g/L için 16.21 mL, 20.0 g/L için 39.5 mL, 30 g/L için 42.66 mL ve 40.0 g/L için 44.45 mL H₂ oluşmuştur.



Şekil 26. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı substrat konsantrasyonlarında zamana göre değişimi.

Farklı substrat konsantrasyonlarında hidrojen üretim verimi ve hızlarıyla azami hidrojen yüzdeleri Tablo 15'te sunulmuştur. Buna göre birim KOİ veya glikoz tüketimi başına oluşan hidrojen üretimleri substrat konsantrasyonunun 5'ten 20 g/L'ye çıkmasıyla birlikte artmış ve daha yüksek substrat konsantrasyonlarında düşmüştür. En yüksek hidrojen verimleri 20 g/L'de sırasıyla 68.47 mLH₂/g KOİ ve 0.175 molH₂/mol glikoz olarak elde edilmiştir. Hidrojen üretim hızları incelendiğinde HÜH değerlerinin substrat konsantrasyonunun 5'ten 20 g/L'ye

yükseltilmesiyle 0.186 mLH₂/saat'ten 0.85 mLH₂/saat mertebesine çıktığı ve daha yüksek substrat konsantrasyonlarında fazla değişmediği görülmüştür. Oluşan biyogaz içerisindeki hidrojen yüzdesi substrat konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artmıştır ancak %50'nin üzerine çıkamamıştır.

Tablo 15. Farklı substrat konsantrasyonları için hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.

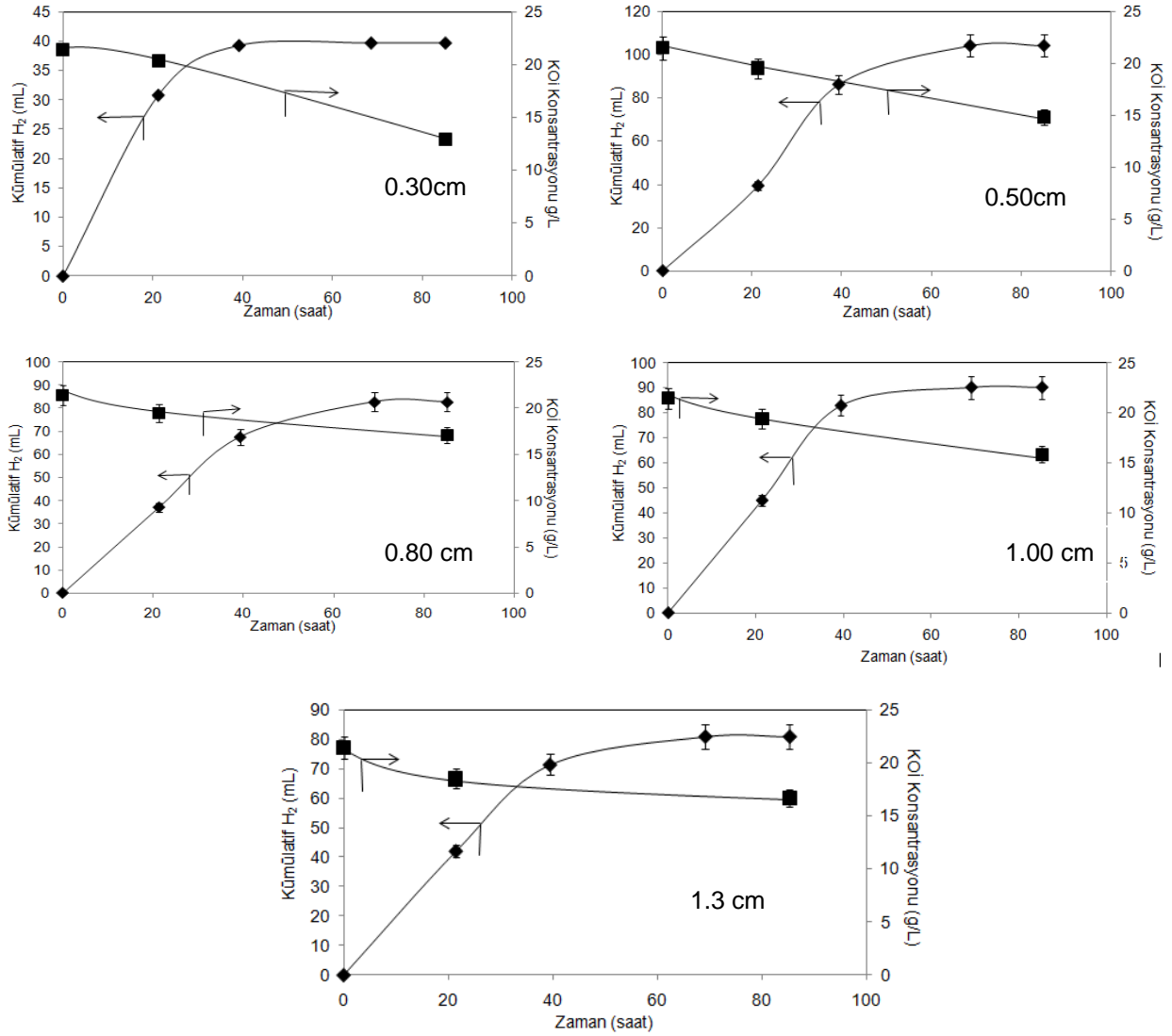
Substrat Konsantrasyonu (g/L)	Kümülatif H ₂ (mL)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	Verim (molH ₂ /mol glikoz)	HÜH (mLH ₂ /saat)	Max. H ₂ (%)
5	5.1145	25.31	0.091	0.186	9.62
10	16.213	42.66	0.160	0.504	12.90
20	39.508	68.47	0.175	0.842	27.82
30	42.656	26.84	0.133	0,943	27.27
40	44.4485	31.83	0.094	0.852	36.19

Yukarıda elde edilen sonuçlar irdelendiğinde birleşik KF-EH için 20.0 g/L'nin en uygun başlangıç substrat konsantrasyonu olduğu anlaşılmaktadır. Daha yüksek substrat konsantrasyonlarında ortama elektrik akımı verilmesi KF'da verim artışı yönünde bir iyileştirme sağlayamamıştır.

4.3.2.1.3 Elektrot Aralığının Etkisi

Deneyler 300 mL serum şişelerinde 70 mL çalışma hacminde 36 °C sıcaklıkta inkübatörde kesikli işletme modunda yapılmıştır. Tüm şartların sabit tutulduğu deneylerde (Gerilim: 1.0 V, pH: 6.5, Substrat₀: 21.44 g/L) sadece iki elektrot arasındaki mesafe 0.30 cm, 0.50 cm, 0.80 cm, 1.0 cm ve 1.30 cm arasında değiştirilerek bu mesafenin birleşik KF-EH'de hidrojen üretimine olan etkileri iki tekrarlı deneyler ile araştırılmıştır. Diğer deney koşulları (aşı, nütrient ilavesi vb.) Bölüm 4.3.2.1.3'te verilen şartların aynısı olarak tutulmuştur.

Kümülatif hidrojen hacmiyle KOİ konsantrasyonun zamana göre farklı elektrot mesafeleri için değişimi Şekil 27'te özetlenmiştir. Buna göre KOİ giderimleri ve hidrojen oluşumları farklı seviyelerde gerçekleşmiştir. Elektrot arası mesafenin 0.3'ten 0.5 cm'e yükseltilmesiyle birlikte kümülatif hidrojen 39.77'ten 104.48 mL'e yükseldikten sonra daha büyük mesafelerde azalarak 80 mL civarında sabitlenmiştir. Diğer taraftan KOİ giderim verimleri 26.12-39.74% arasında değişim göstermekle birlikte elektrot mesafesine göre mantıklı bir seyir izlememiştir.



Şekil 27. Kümülatif Hidrojen, mL (◆) ile KOİ konsantrasyonunun, g/L (■) farklı elektrot mesafeleri altında zamana göre değişimi.

Farklı elektrot mesafelerine göre hidrojen üretim performansına ait veriler Tablo 16'da sunulmuştur. Buna göre hidrojen üretim verimleri elektrot aralığının 0.3'ten 0.5 cm'ye artırılmasıyla yükseldikten sonra daha yüksek mesafelerde hemen hemen aynı değerleri almıştır. Hidrojen üretim hızıysa 1.45 ile 2.10 mLH₂/saat arasında dalgalı bir değişim göstermiştir. Reaktörlerde gözlemlenen en yüksek hidrojen yüzdeleri hidrojen üretim verimiyle aynı seyri izlemiştir. Buna göre elektrot arası mesafenin 0.3 cm'den 0.5 cm artmasıyla hidrojen yüzdesi 28.24'ten 52.10'a yükselmiş olup, daha uzak mesafelerde biraz düşüş göstererek 45% civarında sabitlenmiştir.

Tablo 16. Farklı elektrot mesafeleri altında hidrojen üretim performanslarının karşılaştırılması.

Elektrot aralığı (cm)	Kümülatif H ₂ (mL)	Verim (mLH ₂ /gKOİ)	Verim (molH ₂ /molglüköz)	HÜH (mLH ₂ /saat)	Max. H ₂ (%)
0.3	39.777 5	66.69	0.231	1.45	28.24
0.5	104.14 8	225.42	0.624	1.85	52.10
0.8	82.808	271.32	0.505	1.46	43.51
1	90.212	230.13	0.549	2.1	47.36
1.3	80.93	244.42	0.456	1.95	48.89

Buradan elektrotlar arası mesafenin 0.3'ten 0.5 cm'ye çıkartılmasının hidrojen üretimine katkısı olduğu fakat daha uzak mesafelerin çok etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Zira elektrotlar arası mesafenin uzaması anottan çıkan elektronların katoda ulaşma mesafesini uzattığından hidrojen üretim performansını olumsuz etkilemiş olma ihtimali yüksektir. Mevcut sonuçlar incelendiğinde 0.5 cm mesafenin en ideal uzaklık olduğu sonucuna varılmıştır.

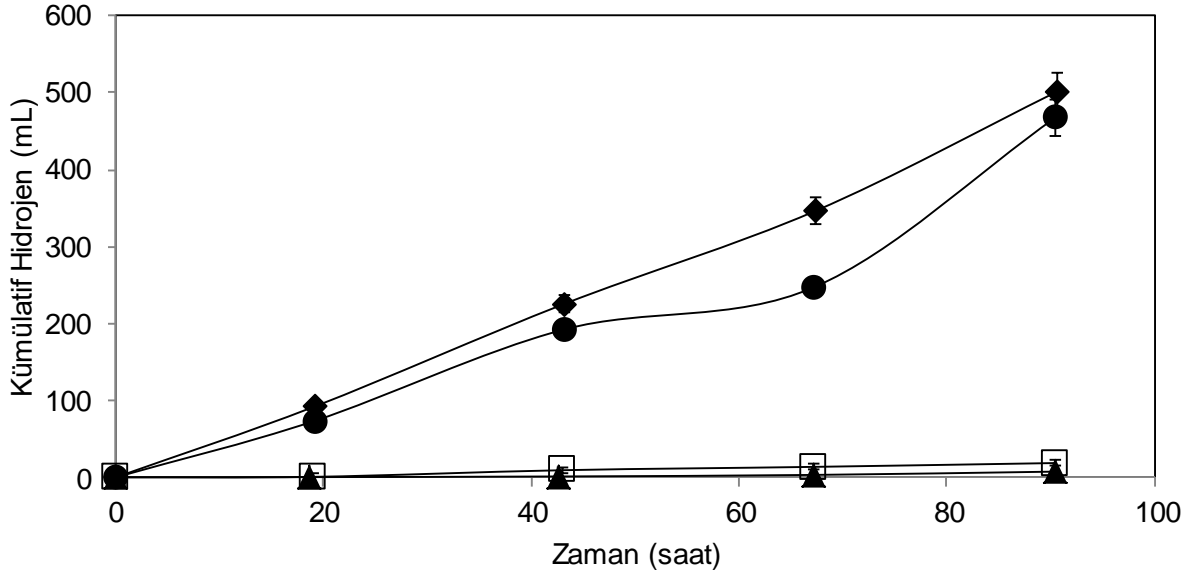
4.3.2.2 Birleşik Karanlık Fermentasyon ve Elektroliz: pH Kontrolü için Dışarıdan Asit İlaveli Deneyler

Bu bölümde sunulan çalışmalarda KF ortamına sürekli doğrusal elektrik akımı uygulanarak hidrojen üretimi araştırılmıştır. Ortamdan hidrojen iyonu uzaklaştırılmasıyla birlikte yükselen pH değerleri dışarıdan 5 M sülfürik asit ilavesiyle nötral seviyelerde kontrol edilmiştir.

4.3.2.1.1 Uygulanan Voltajın Etkisi

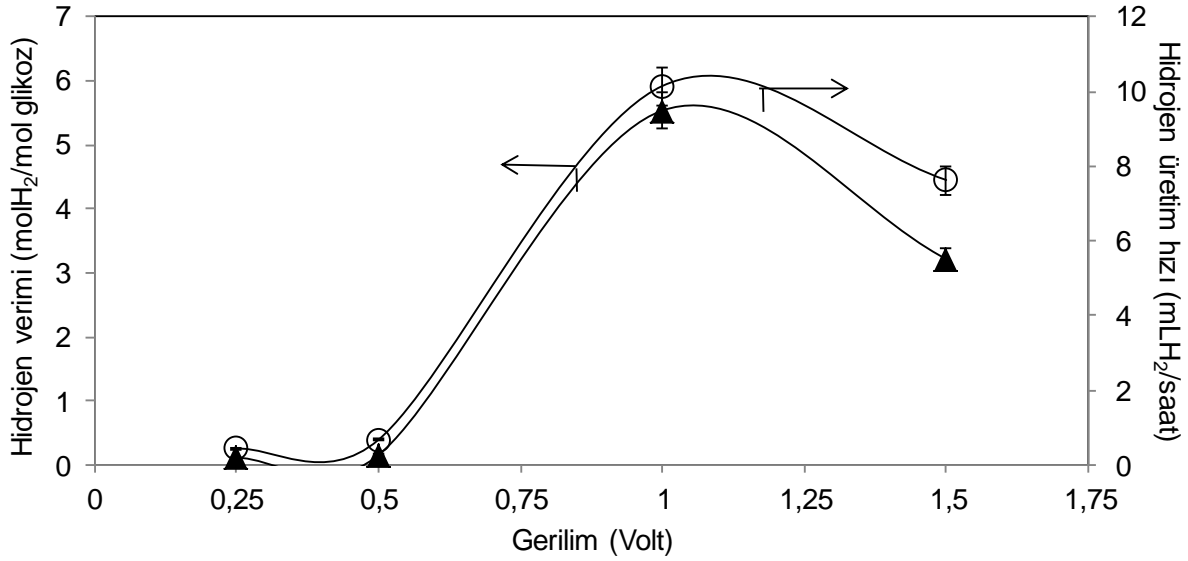
Deneyler 300 mL serum şişelerinde 60 mL çalışma hacminde kesikli işletim modunda yapılmıştır (Glikoz₀: 15.68 g/L, pH₀: 6.4). Kümülatif hidrojen hacminin farklı gerilim değerleri için zamana göre değişimi Şekil 28'de gösterilmiştir. Buna göre kümülatif hidrojen hacmi uygulanan gerilim değerinin 0.25'ten 1.5 V'a yükseltilmesiyle artmıştır. Gerilim değerinin 1.5 V'tan düşük tutulmasının nedeni suyun elektrolizi ile oluşabilecek ilave hidrojen üretimlerini minimize etmek olmuştur. Buradaki amaç, karanlık fermentasyon esnasında oluşan organik asitlerden elektroliz ile eşzamanlı hidrojen oluşumunu sağlamak, bu sayede mikroorganizmalar üzerinde organik asit birikimi sonucu oluşabilecek ürün inhibisyonu ve ani pH düşüşlerinin inhibisyon etkisini

azaltmaktır. Şekil 28'den de görüldüğü gibi 0.25 ve 0.50 V gerilim değerlerinin hidrojen üretimine olan katkısı düşük seviyede olurken 1.00 ve 1.50 Volt gerilimleri daha yüksek hidrojen oluşumunun elde edilmesini sağlamıştır. Burada en yüksek kümülatif hidrojen hacmi 501.35 mL ile 1.5 V'ta kaydedilmiştir. 1 V'luk gerilimde üretilen hidrojen hacmi 468 mL olup, 1.5 V ile hemen hemen yakın olmuştur.



Şekil 28. Kümülatif hidrojen hacminin farklı gerilim değerleri için zamana göre değişimi. 0.25 V (▲), 0.5 V (□), 1.0 V (●), 1.5 V (◆).

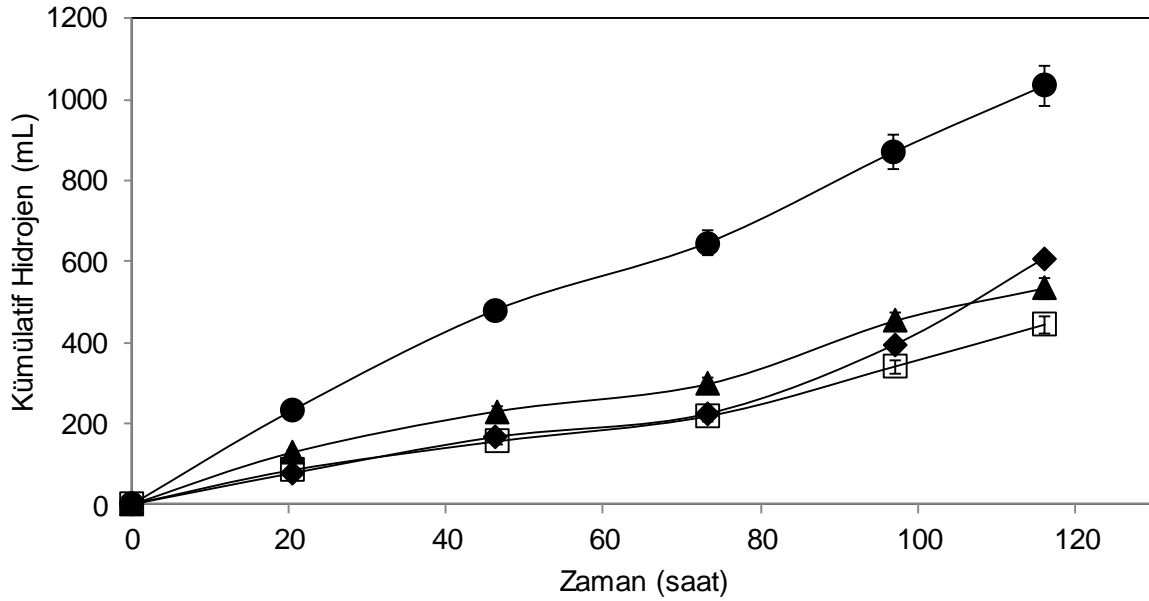
Hidrojen üretim verimi ve hızının uygulanan gerilime göre değişimi Şekil 29'da gösterilmiştir. Dikkat edilirse hidrojen verimi ve hızı uygulanan gerilimin 0.25'ten 1.0 V'a yükseltilmesiyle artış göstermiş daha yüksek gerilimlerde ise düşmüştür. En yüksek hidrojen verimi ve hız değerleri 1.0 V'ta sırasıyla 5.92 molH₂/mol glikoz ve 9.48 mLH₂/saat olarak elde edilmiştir. 1 Volt gerilim altında hiç mikroorganizma aşısı yapılmayan kontrol deneyinde elde edilen verim ve hız değerleri 3.97 molH₂/mol glikoz ve 6.35 mLH₂/saat olmuştur. Bu sonuçlardan görüldüğü gibi karanlık fermentasyon ortamına elektrik geriliminin uygulanması hidrojen verim ve hızında ciddi artışlar sağlamıştır. Ayrıca verim değerinin 4 molH₂/mol glikoz üzerine çıkmasıyla projede vaat edilen hedefe ulaşılmıştır. Daha yüksek gerilim değerlerinde verim ve hız değerlerinin düşmesi 1.0 V'tan yüksek gerilimin mikroorganizmalar üzerinde negatif etki yapmış olmasından kaynaklanmış olabilir.



Şekil 29. Hidrojen üretim verimi (molH₂/mol glikoz) (o) ve hızının (mLH₂/saat) (▲) uygulanan gerilime göre değişimi.

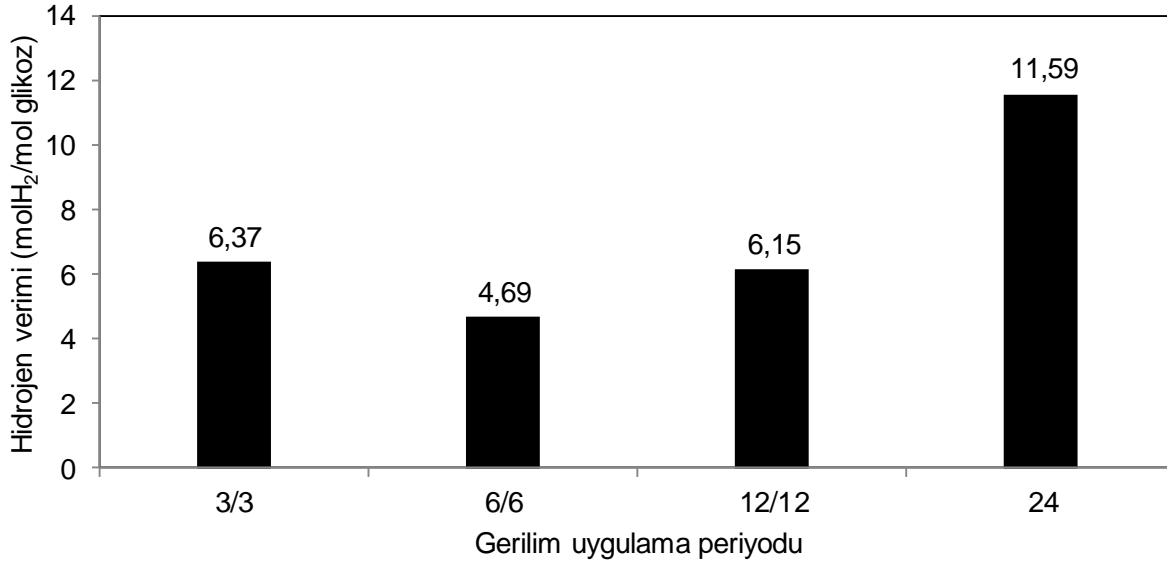
4.3.2.1.2 Uygulanan Voltaj Periyodunun Etkisi

Karanlık fermentasyon ortamına 1 V'luk gerilim uygulanması durumunda en yüksek hidrojen üretim verimi ve hızlarının tespit edilmesinin ardından aynı gerilim değerinin farklı zaman periyotlarında hidrojen üretimine olan etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda 1.0 V gerilim altında dört farklı periyodun etkileri araştırılmıştır. Deneyle 300 mL serum şişelerinde 60 mL çalışma hacminde kesikli işletim modunda yapılmıştır (Glikoz_o: 18.99 g/L, pH_o: 6.83). Buna göre farklı zaman periyotları için kümülatif hidrojen hacminin zamana göre değişimi Şekil 30'da gösterilmiştir. Burada belirtilen 3/3, 6/6, 12/12 ve 24 değerleri doğrusal güç kaynağının açık ve kapalı olduğu saatleri belirtmektedir. Örneğin 3/3 ifadesi, sisteme 3 saat süreyle 1.0 V gerilim uygulandıktan sonra 3 saat uygulanmadığını anlatmaktadır. 24 rakamı ise sistemin deney sonuna kadar 1.0 V'luk gerilime tabi tutulduğunu ifade etmektedir. Burada sunulan deneyin Şekil 28'de sonuçları sunulan deneylerden farkı başlangıç glikoz konsantrasyonunun 15 g/L olmasıdır. Şekil 30 incelendiğinde hidrojen üretiminin tüm şartlar için sürekli artış gösterdiği anlaşılmaktadır. 3/3, 6/6 ve 12/12'lik zaman periyotlarında üretilen kümülatif hidrojen hacimleri hemen hemen aynı değerde (450-500 mL) olurken, sürekli gerilim altında tutulan deneyde bunun yaklaşık iki katı gaz çıkışı (1035 mL) elde edilmiştir. Tüm koşullarda hidrojen üretimi elektrik akımıyla birlikte başlamış olup, herhangi bir adaptasyon süresi yaşanmamıştır.



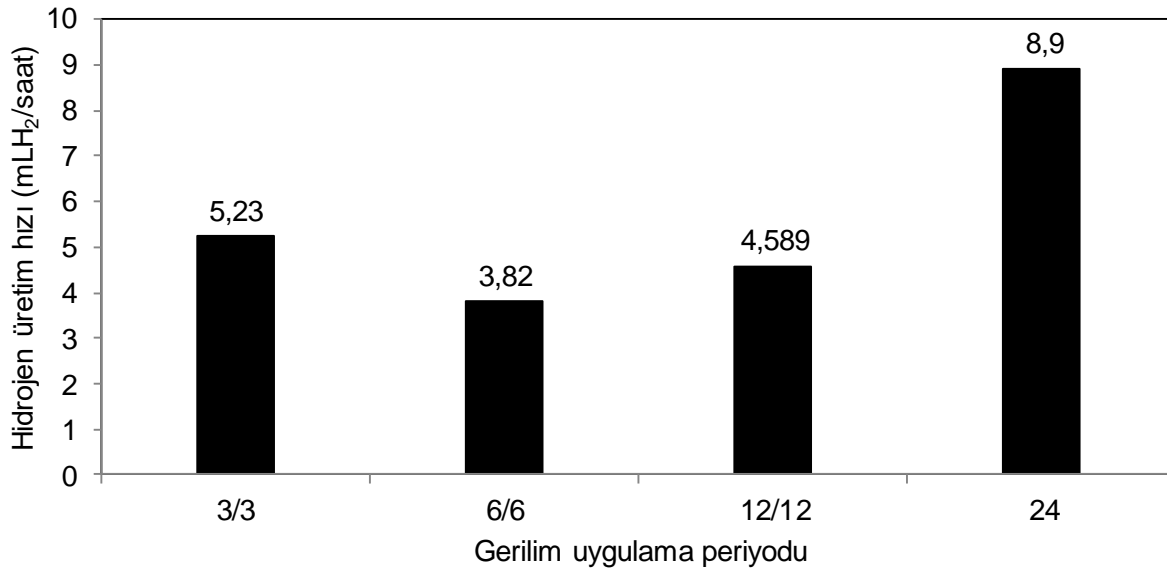
Şekil 30. 1 Volt gerilim altında farklı zaman periyotları için kümülatif hidrojen hacminin zamana göre değişimi. Uygulanan gerilim periyotları (Gerilimin açık olduğu süre (sa)/Gerilimin kapalı olduğu süre (sa)): (◆) 3/3, (□) 6/6, (▲) 12/12, (●) 24.

Farklı zaman periyotlarında uygulanan 1.0 V'luk gerilim için elde edilen hidrojen üretim verimi sonuçları Şekil 31'de gösterilmiştir. Buna göre hidrojen üretim verimi değerleri 4.69 ile 11.59 molH₂/mol glikoz arasında olmuştur. 3/3, 6/6 ve 12/12 saatlik periyotlar için elde edilen verimler 5 ile 6 molH₂/mol glikoz arasında değişirken, sürekli gerilim uygulanması durumundaki verim değeri 11.59 molH₂/mol glikoz olmuştur.



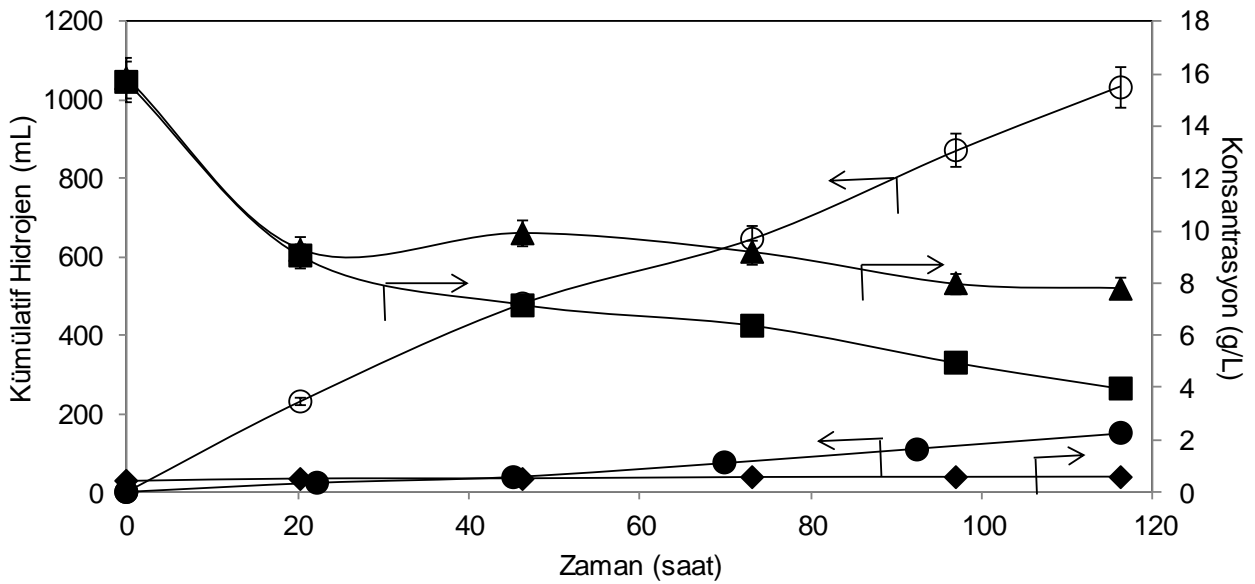
Şekil 31. 1 Volt gerilim altında Hidrojen veriminin farklı zaman periyotları için değişimi.

Farklı zaman periyotları için elde edilen hidrojen üretim hızı değerleri Şekil 32'de sunulmuştur. Buna göre hidrojen üretim hızları 3/3 periyotluk uygulamadan 6/6 periyoda geçince 5.23 mLH₂/saat değerinden 3.82 değerine düştükten sonra daha yüksek gerilim uygulama periyotlarında yükselerek 8.9 mLH₂/saat değerine ulaşmıştır. Bu sonuçlara göre en verimli hidrojen üretiminin 1.0 V'luk gerilimin sürekli uygulanması neticesinde elde edildiği söylenebilir.



Şekil 32. 1 Volt gerilim altında Hidrojen üretim hızının farklı zaman periyotları için değişimi.

Sürekli olarak 1.0 V'luk gerilim altında tutulan deney için kümülatif hidrojen hacmi ile glikoz, KOİ ve TVFA konsantrasyonlarının zamana göre değişimi Şekil 33'te gösterilmiştir. Buna göre KOİ ve glikoz konsantrasyon değerleri eş zamanlı olarak tüketilirken TVFA konsantrasyonu 1 g/L'nin altında sabit değerde seyretmiştir. Aynı koşullar altında çalıştırılan aşısız kontrol deneyine ait kümülatif hidrojen hacimlerinin zaman göre değişimi (●) işareti ile gösterilmiştir. Dikkat edilirse mikroorganizmanın bulunduğu deney ortamına 1.0 V'luk elektrik akımının uygulanması hidrojen üretiminde ciddi artış sağlamıştır.



Şekil 33. (o) Kümülatif hidrojen hacminin (mL), (■) glikoz (g/L), (▲) KOİ (g/L), (◆) TVFA (g/L) konsantrasyonlarının zamana göre değişimi (Deney ortamına 1 Volt gerilim sürekli verilmiş olup, kontrol şişesinde üretilen kümülatif hidrojen hacminin (mL) zamana göre değişimi de (●) ile gösterilmiştir).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi için literatürde belirtilen optimum şeker konsantrasyonu 20 g/L olup, bu şeker çözeltisinin atık kağıt havluların asit hidrolizi ile elde edilebileceği belirlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmaların sonucunda en yüksek 32.17 g/L şeker konsantrasyonuna 121 °C, pH: 0 ve 180 dakika otoklav işlemi ile ulaşılmıştır. 32.17 g/L'lik şeker şurubunun elde edilmesi pH'nın nötralizasyonu esnasında meydana gelecek seyreltmeyi

dengelemekte ve karanlık fermentasyon için gerekli olan minimum 20 g/L'lik şeker şurubunun sağlanmasını garanti etmektedir.

Asit hidrolizinde kullanılan kağıt/sıvı oranının, pH ve sürenin şeker oluşumu üzerinde önemli etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Kağıt miktarının artırılması, pH'nın düşürülmesi ve hidroliz süresinin uzatılması şeker şurubundan elde edilen glikoz ve 5-HMF konsantrasyonlarında artışa neden olmuştur. 200 mg/L ve üzeri 5-HMF konsantrasyonunun toksisiteye sebep olduğu ve bu nedenle fazla HMF'nin ortamdan uzaklaştırılması gerektiği anlaşılmıştır. Bunun için iki basamaklı aktif karbon uygulamasının etkili sonuç verdiği belirlenmiştir.

Kağıt atığından belirli konsantrasyonda çözelti hazırlamanın, kağıt atığının yüksek su emme özelliği nedeniyle yanlışlıklara sebep olduğu bu nedenle belirli miktar kağıt üzerine belirli miktar asit çözeltisinin ilave edilmesi prensibine dayanan kağıt/sıvı oranı parametresinin kullanımının deneylerde daha güvenilir olduğu anlaşılmıştır.

Asit hidrolizi ile kağıt atığından şeker eldesi mümkün olmasına rağmen, hidrolizatta yüksek seviyelerde sülfat ve 5-HMF konsantrasyonlarının oluşması bu çözeltinin KF öncesi ilave arıtmalara tabi tutulmasını gerektirmektedir. Ayrıca pH ayarlaması sonucu ortamda fazla miktarda tuz oluşumu meydana gelmekte, iletkenlik değerleri mikrobiyal faaliyetler için yüksek seviyelerde kalmaktadır. Tüm bu faktörler dikkate alındığında asit hidrolizinin KF için substrat hazırlamada tek başına kullanımının verimli sonuçlar vermediğini, olumsuzluk yaratan ürünlerin giderimi için ilave proseslerin beraberinde kullanılması gerektiğini gündeme getirmiştir. Bu nedenle yüksek selüloz içeren peçete atığından şeker eldesi için inhibitör madde oluşumuna sebep olmayan bir veya daha fazla ön işlem basamağının kullanılması avantajlar sağlayacaktır.

Kağıt atığından karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde en ideal biyokütle konsantrasyonunun 0.875 g/L olduğu ancak 0.1 g/L ile de yakın sonuçlar elde edildiği için 0.1 g/L'nin kullanılacağı sonucuna varılmıştır. Teorik 4 mol H₂/mol glikoz değerinin yaklaşık dörtte birine karşılık gelen verim değeri ile hedeflenen seviyeye ulaşamamıştır. Düşük hidrojen üretim veriminin elde edilmesinin nedenleri arasında, hidrolizat içerisinde nötralizasyon işlemi sonrasında oluşan aşırı tuz miktarı veya aşı çamuru içerisinde hidrojen tüketimine neden olan homo-asetojen türü mikroorganizmaların varlığı, iz element ve vitamin eksikliği nedeniyle enzimatik faaliyetlerin verimsiz kalışı sayılabilir. Hidrolizat içerisindeki 5-HMF miktarı 0 mg/L'ye indirildiği için 5-HMF'nin toksik etki yapma ihtimali bulunmamaktadır. Bu çalışmada 0.875 g/L başlangıç biyokütle ve 7 g/L olan şeker konsantrasyonunda biyokütle/substrat oranının 0.125 çıkması literatür ile uyum göstermiştir. En yüksek hidrojen verimi 0.875 g/L biyokütle

konsantrasyonu için 0.927 mol H₂/mol glikoz olarak çıkmasına rağmen, karanlık fermentasyonda 0.1 g/L'nin biyokütle konsantrasyonu önerilmesinin nedenleri; 0.1 g/L biyokütle konsantrasyonu için elde edilen 0.905 mol H₂/mol glikoz olan verim değerinin en yüksek 0.927 mol H₂/mol glikoz verim değerine çok yakın olması, SHÜH değerinin 0.1 g/L için en yüksek değerde olması (188.81 mLH₂/g. saat) ve düşük seviyedeki biyokütle kullanımının büyük reaktörlerin işletilmesinde sağlayacağı kolaylıktır.

Hidrojen üretim veriminin 0.875 g/L biyokütle konsantrasyonuna kadar artış gösterdikten sonra daha yüksek biyokütle konsantrasyonlarında düşüş göstermesi; aynı şekilde kümülatif hidrojen hacminin 0.5 g/L biyokütle konsantrasyonundan sonra düşmesi; X₀/S₀ oranı (X₀/S₀: başlangıç biyokütle/substrat konsantrasyonu oranı) ve kullanılan aşı çamurunun mikrobiyal içeriği ile açıklanabilir. Bu çalışmada X₀/S₀ oranı, başlangıç biyokütle konsantrasyonun 0.1'den to 6 g/L'ye çıkartılmasıyla birlikte 0.013'dan 0.743'ye lineer olarak artmıştır. Kümülatif hidrojen hacmi ve hidrojen üretim veriminin belirli bir biyokütle konsantrasyonundan sonra düşüş göstermesi, ortamda birim biyokütle miktarı başına çok fazla miktarda substrat olmasından kaynaklanmış olabilir. Zira bu durum metaboilk yollacın hidrojen üretiminden daha farklı bir ürün üretimine (alkol, organik asit vb.) geçmesine yol açmış olabilir. Ayrıca aşı çamurunda hidrojen tüketimine neden olabilecek homo-asetojen türü bakterilerin bulunması olasılığı, bu bakterilerin miktarının biyokütle konsantrasyonunun artmasıyla birlikte artmasına dolayısıyla yüksek başlangıç biyokütle konsantrasyonlarında daha düşük hidrojen gazının açığa çıkmasına neden olmuş olabilir. Bunların dışında bir diğer neden yüksek biyokütle konsantrasyonlarında TVFA üretiminin hızlı ve çok olması olması sert pH düşüşlerinin yaşanmasına ve mikrobiyal hidrojen üretiminin olumsuz yönde etkilenmiş olmasına sebep olabilir.

Kağıt atığından karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde en ideal başlangıç substrat (glikoz) konsantrasyonunun 21.33 g/L olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu aşamada elde edilen en yüksek hidrojen üretim verimi ve spesifik hidrojen üretim hızı sırasıyla 0.498 molH₂/mol glikoz ve 226.67 mLH₂/g biyokütle.saat olmuştur. 21.33 g/L'nin altındaki substrat konsantrasyonları mikrobiyal substrat limitlemesine neden olurken daha yüksek substrat konsantrasyonları substrat inhibisyonuna neden olmuştur. Elde edilen verim değerinin teorik verimin yaklaşık onda birine eşit çıkmasının temel nedenleri arasında yukarıda bahsedilen asit hidrolizi sonucunda substratta oluşan inhibitör maddelere veya aşı çamuru içerisinde hidrojen tüketimine neden olan mikroorganizmalara bağlanabilir.

Atık kağıt havlu hidrolizatından karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde optimum C/N/P oranının hidrojen üretimi verimi ve spesifik hızına olan etkileri incelenmiş ve en uygun

şartların C/N/P: 100/5/9 oranında elde edildiği sonucuna varılmıştır. C/N/P oranının 100/5/9 oranında tutulması halinde elde edilen en yüksek hidrojen üretim verimi ve SHÜH değerleri sırasıyla 0.525 molH₂/mol glikoz ve 243.14 mLH₂/g biyokütle.saat olmuştur. Literatürde karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi için önerilen optimum C/N/P oranları, kullanılan substrat ve mikrobiyal aşı ile azot ve fosfor kaynaklarına göre farklılıklar göstermektedir. Buna göre farklı substrat ve aşılar için KOİ/N oranları 10-73 arasında değişirken KOİ/P oranları 73-970 arasında değişim gösterebilmektedir (Hawkes vd. 2007). Atık buğday tozundan karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminin yapıldığı bir çalışmada optimum C/N ve C/P oranları sırasıyla 200 ve 1000 olarak rapor edilmiştir (Argun vd. 2008b). Bu çalışmada elde edilen en uygun C/N/P oranları da kullanılan hidrolizat ve aşıya göre spesifik olup tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.

KF basamağından hidrojen üretiminde daha verimli sonuçların elde edilebilmesi için gelecekte aşı kültürü olarak yüksek iletkenlik ve tuz konsantrasyonuna dayanıklı mikroorganizmalar ile denemeler yapılabilir. Asit hidrolizatında oluşan toksik ürünler belirlendikten sonra bunların giderimi yapılarak elde edilen artırılmış glikoz çözeltisi KF'da hidrojen üretimi için kullanılabilir. Deneyler kesikli işletme modu yerine kesikli beslemeli (fed-batch) işletme modunda veya immobilize sistem ile yapılabilir. Zira bu prosesler toksik madde inhibisyonlarına karşı mikroorganizmaların daha az zarar görmelerine imkan vermekte, yoğun mikroorganizma konsantrasyonu ile reaksiyon hızının artmasını sağlayabilmektedir.

Bu projenin karanlık fermentasyon basamağında elde edilen en yüksek hidrojen üretim verimi 0.927 mol H₂/mol glikoz olup, bu sonuç mezofilik işletme şartlarında elde edilmiştir (36 °C). Literatüre bakıldığında değişik sıcaklıklarda farklı substrat ve aşı kültürleri kullanılarak farklı hidrojen üretimlerinin olduğu görülmektedir. Psikrofilik (0-20 °C) (Debowski vd., 2014), mezofilik (30-40 °C)(Das ve Veziroğlu, 2001) ve termofilik (40-60 °C) (Zhang vd., 2015) şartlarda rapor edilen çalışmalar arasında en yüksek hidrojen verimi sağlayan sonuçların termofilik koşullarda (Zeidan ve Van Niel, 2009; Zeidan vd., 2010) elde edildiği rapor edilmektedir. Literatürde mezofilik fermentasyon ile hidrojen üretimi üzerine yapılan çalışmalar termofilik prosese göre daha yaygındır. Bunun sebebi mezofilik şartların daha az enerji gerektirmesi (Hniman vd., 2011) ve mezofilik şartlarda hidrojen üretebilen bakteri popülasyonunun daha çok olmasıdır. Termofilik şartlarda daha yüksek hidrojen verimlerinin elde edilmesinde hidrojen tüketimine neden olan bakterilerin inhibe olması ve bakteriyel aktivitenin daha hızlı gerçekleşmesinin etkili olduğu düşünülmektedir (Karadağ, 2011). Tablo 17 farklı sıcaklık değerlerinde hidrojen üretimi için literatürde gerçekleştirilen KF deneylerinden bazılarını özetlemektedir. Buna göre hidrojen üretim performansı, kullanılan substrat ile aşı kültürüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Tablo 17. Farklı sıcaklık değerlerinde hidrojen üretimi için gerçekleştirilen KF deneyleri.

Sıcaklık	Aşı kültürü	Substrat	Hidrojen verimi	Hidrojen üretim hızı (mLH ₂ /saat)	Referans
25 °C	<i>Polaromonas jejuensis</i> JS12-13 türü ile %98 benzer G024 türü	Glikoz (20 g/L)	1.57 mol H ₂ /mol glikoz	0.62	Alvarado-Cuevas vd. (2014)
20 °C	<i>Rahnella aquatilis</i> tür 7	Peyniraltı tozu (10 gKOİ/L)	-	0.15	Debowski vd. (2014)
25 °C	<i>Clostridium</i> sp. 6A-5	Glikoz (20 g/L)	0.48 mol H ₂ /mol glikoz	2.9	Cai vd. (2013)
37 °C	Anaerobik çamur	Şeker pancarı suyu (37.2 gTOC/L)	3.2 molH ₂ /mol hekzoz ilave edilen	84	Dhar vd. (2015)
35 °C	<i>C. beijerinckii</i> KCTC 1785	Süpürge bitkisi kabuğu hidrolizatı (5 g indirgen şeker/L)	1.051 mol H ₂ /mol indirgen şeker	1.86	Saratale vd. (2015)
35 °C	İnek dışkısı	Sükroz (15 g/L)	2.05 mol H ₂ /mol sükroz	4.41	Gou vd. (2015)
37 °C	Anaerobik çamur	Glikoz (7 g/L)	0.927 mol H ₂ /mol glikoz	1.54	Bu çalışma
55 °C	Fil dışkısı	Ksilan (3 g/L)	12.16 mmolH ₂ /g ksilan	0.17	Sarippan ve Reungsang (2014)
60 °C	Anaerobik çamur	Nişasta (14 gKOİ/L)	1.13 mol H ₂ /mol glikoz	5	Gupta vd. (2015)
70 °C	<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i> ve <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Ksiloz-glikoz karışımı (1:1) (10 g/L)	3.8 ± 0.2 mol H ₂ /mol glikoz	0.481	Zeidan ve Niel (2009)
70 °C	<i>Caldicellulosiruptor owensensis</i> OL ^T	Ksiloz-glikoz karışımı (1:1) (10 g/L)	3.8 ± 0.1 mol H ₂ /mol glikoz	0.42	Zeidan ve Niel (2010)
78.2 °C	<i>C. bescii</i> (DSM 6725)	Aritma çamuru (5 gVS/L)	4.4 mmolH ₂ /gVSilave edilen	-	Yılmaz vd. (2015)
80 °C	<i>Thermotoga maritima</i>	Gliserol (2.5 g/L)	2.75 molH ₂ / mol gliserol	-	Maru vd. (2012)

Tablo 17'ye göre psikrofilik şartlarda elde edilen hidrojen üretim verimi ve hızı değerlerinin mezofilik şartlarda elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu görülmektedir. Mezofilik koşullarda hidrojen üretim verimi ve hızı sırasıyla 1.051-3.2 mol H₂/mol glikoz ve 1.86-84 mLH₂/saat arasında değişmiştir. Termofilik koşullarda teorik karanlık fermentasyon veriminin

%95'ine ulaşıldığı fakat hidrojen üretim hızlarının psikrofilik ve mezofilik şartlardan çok farklı gelişmediği anlaşılmaktadır. Bu projede elde edilen hidrojen hızı ve verimi değerleri mezofilik çalışmalar ile kıyaslandığında daha düşük çıkmıştır. Bunda hidrolizat içerisinde bulunan inhibitör maddelerin varlığı ile çamur içerisindeki mikrobiyal kompozisyonun etkisinin olduğu tahmin edilmektedir. Bu projede elde edilen sonuçların literatürde yapılan çalışmalar ile bire bir kıyaslanması beraberinde bazı yanlışlıklarında getirebilmektedir. Zira yapılan çalışmalar aynı şartlarda gerçekleştirilmemiş olup, kullanılan aşı ve substrat tamamen farklıdır. Özellikle aşı çamurunda saf veya karışık kültür kullanılması hidrojen üretim performansını doğrudan etkileyebilmektedir. Literatürde karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde spor oluşturan *Clostridium* türlerinin (Kapdan ve Kargı, 2006; Levin vd., 2004) yanı sıra, fakültatif *Enterobacter* türleri (Vazquez ve Varaldo, 2009), *Bacillus* türleri (Ren vd., 2011), termofilik bakteriler (Karadağ, 2006; Hniman vd., 2011), genetik modifikasyona tabi tutulmuş mikroorganizmalar (Levin vd., 2011) ile farklı ön işlemlere tabi tutulmuş anaerobik çamurlar (Yin vd., 2014) kullanılmaktadır. Bunlar arasında saf kültürler ile yapılan çalışmalarda kısa süreli yüksek verimlerin elde edilmesi mümkün olurken, uzun vadede kontaminasyon riskinin olması ve saf kültür ile çalışmanın maliyetli olması saf kültür kullanımında güçlükler neden olmaktadır. Karışık kültür olarak isimlendirilen anaerobik asidojenik çamur kullanımı daha düşük maliyetli olmakla birlikte çamur içerisinde yok edilmesi güç homoasetojen gibi bazı hidrojen tüketici mikroorganizmaların varlığı hidrojen üretim performansını doğrudan etkileyebilmektedir (Saady, 2013). Ancak büyük ölçekli uygulamalarda karışık kültür kullanımının saf kültür kullanımına göre daha pratik imkânlar sunduğu aşikârdır. Bu çalışmada yapılan deneylerde metan gazına rastlanmamış olması hidrojen tüketimine neden olan metanojen bakterilerin çamur ön işlemi esnasında başarılı bir şekilde bertaraf edildiklerini göstermektedir. Diğer taraftan hidrojen üretimindeki düşüklük ve organik asit birikimi homoasetojen bakterilerin var olabileceğini düşündürmektedir. Ancak TVFA üretim verimlerinin 0.5 gTVFA/g glikoz'nin altında kalması homoasetojen bakterilerin varlığı hakkında kesin bir yargıya varılmasını güçleştirmektedir. Zira hidrojen üretimi açısından başarılı bir karanlık fermentasyonda birim glikoz başına üretilen TVFA miktarı 0.5 gTVFA/g glikoz mertebelerine çıkabilmektedir. Yüksek homoasetojen varlığı daha yüksek TVFA verimlerinin var olması gerektiğini düşündürmektedir. Bu çalışma kapsamında aşı çamurunun mikrobiyal kompozisyonu tayin edilmediği için çamur içeriği hakkında kesin bir bilgi verilememiş olup, sadece elde edilen sonuçlar üzerinden yorumlar yapılmıştır. Düşük hidrojen verimine karşı yüksek TVFA verimlerinin elde edilmesi ortamda propiyonik asit bakterilerinin varlığına da işaret edebilir. Çünkü propiyonik asit bakterileri propiyonik asit üretimi esnasında hidrojen tüketimine

de neden olmaktadır (Luo vd., 2010). Ancak TVFA profili çıkartılmadığı için propiyonik asit varlığı ve miktarı hakkında yorum yapılamamıştır. Laktik asit bakterilerinin de baskın hale gelmiş olma olasılığı ortama yüksek miktarda bakteriyosin geçip hidrojen üreten bakteriler üzerinde inhibisyona (Noike vd., 2002) neden olması muhtemeldir.

Karanlık fermentasyon çıkış suyuna doğrusal elektrik akımı verilmesiyle yapılan ardışık KF-EH deneylerinin sonucunda en uygun hidrojen üretimi koşullarının; 7.5 V gerilim, 6g/L başlangıç TVFA konsantrasyonu 6 g/L ve pH: 2 değerinde elde edildiği belirlenmiştir. Bu prosese ait hidrojen üretim verimlerinin hesabında molH₂/mol glikoz ve mLH₂/g KOİ yerine mLH₂/mL reaktör hesaplanmasının daha doğru olacağı anlaşılmıştır. Zira kağıt atığının sülfirik asit ile ön işlenmesi esnasında ortama verilen sülfat iyonları iletkenlik değerinin 70 mS/cm gibi yüksek değerlere çıkmasına bu da KF çıkış suyuna elektrik akımı uygulandığında suyun elektrolizi ile ilave hidrojen oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla suyun elektrolizinden kaynaklanan fazla hidrojen miktarı teorik verimlerin çok üzerinde rakamlar hesaplanmasına neden olmaktadır. Bu projede ardışık KF-EH prosesi ile elde edilen en yüksek hidrojen üretimi ve hızı, KOİ giderimi ve enerji dönüşümü sırasıyla; 121.11 mLH₂/mL reaktör ve 1096.97 mLH₂/saat, %34.05 ve %98 olmuştur. Tüm şartlar altında oluşan gaz içerisinde hidrojen yüzdesi %100 seviyelerine ulaşmıştır. Verim değerleri molH₂/mol glikoz hesaplanması durumunda projede hedeflenen 8 molH₂/mol glikoz'un üzerine çıkmıştır fakat bu verim içerisinde suyun elektrolizinden kaynaklanan hidrojen de dahil olup, bu hidrojen sadece organik maddenin parçalanmasından kaynaklanmamıştır.

Ardışık KF-EH prosesi ile daha verimli hidrojen gazının üretilebilmesi için daha uygun elektrotlar ile denemeler yapılabilir, hidrojen iyonlarıyla elektronların birleşmesini limitleyen koşullar daha detaylı araştırılabilir.

Karanlık fermentasyonda hidrojen üretim verimlerinin istenilen seviyede çıkmaması (1 molH₂/mol glikoz) nedeniyle KF ortamına EH uygulanarak ortamda biriken veya var olan inhibitör organik asitlerin eş zamanlı olarak ortamdaki uzaklaştırılması için çalışmalar yapılmıştır. Birleşik KF-EH olarak ifade edilen bu proseste en ideal hidrojen üretimi; 1.0 V gerilim, 20 g/L glikoz ve 0.5 cm elektrot aralığında tutulduğunda elde edilmiştir. Birleşik KF-EH prosesinde dışarıdan asit ilavesiyle pH kontrolü, sadece gerilim ile pH kontrolünden daha yüksek hidrojen üretimi sağlamıştır. Ancak dışarıdan pH ilavesi için ilave edilen asidin sağladığı hidrojen iyonları organik asit parçalanmasından kaynaklanan hidrojen üretiminden çok daha yüksek hidrojen gazının oluşmasına ve verim değerlerinin bazı durumlarda teorik verimin üzerine çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle dışarıdan asit ilaveli birleşik KF-EH prosesi için hidrojen üretim veriminin

hesaplanmasında birim reaktör hacmi başına oluşan hidrojen hacminin esas alınmasının daha doğru olacağı sonucu çıkmıştır. Sadece gerilim ile yapılan pH kontrollü birleşik KF-EH prosesinde elde edilen en yüksek hidrojen verimi ve hızı sırasıyla 1.49 mLH₂/mL reaktör ve 2.1 mLH₂/saat çıkmıştır. Dışarıdan asit ilavesiyle pH kontrolü yapılan birleşik KF-EH deneylerinde ise en yüksek hidrojen verimi ve hızı sırasıyla 19.15 mLH₂/mL reaktör ve 8.9 mLH₂/saat çıkmıştır. pH kontrolü için dışarıdan asit ilavesinin yapılması hidrojen verim ve hızlarının artışına neden olmuştur ancak bu durumun gerçekte uygulanabilirliği zayıftır. Sadece gerilim ile pH kontrolünün yapıldığı birleşik KF-EH deneylerine ait en yüksek hidrojen veriminin (0.624 molH₂/mol glikoz) tek başına KF ile elde edilen verim değerinden bile düşük çıkmasının sebebi muhtemelen asit hidrolizi ile substrat içerisinde oluşan inhibitör madde varlığının sebep olduğu etki ile açıklanabilir.

Birleşik KF-EH prosesi ile istenilen performansta hidrojen üretilmemesinin asıl nedeni karanlık fermentasyonun verimsiz gerçekleşmesine dayanmaktadır. Bu nedenle karanlık fermentasyon basamağı için yukarıda önerilen iyileştirme basamaklarının yerine getirilmesi durumunda birleşik KF-EH prosesinde daha verimli sonuçlar elde edilebilecektir. Burada pH kontrolü önemli bir basamak olduğu için pH'nın gerilim uygulamasıyla otomatik pH kontrollü fermentörde nötral seviyelerde tutulması birleşik KF-EH performansını ciddi derecede arttıracaktır.

6. KAYNAKLAR

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. "Biomass pretreatment: fundamentals toward application", *Biotechnol. Adv.*, 29, 675–85.

Alvarado-Cuevas, Z.D., López-Hidalgo, A.M., Ordoñez, L.G., Ocegüera-Contreras, E., Ornelas-Salas, J.T., De León-Rodríguez, A. 2015. "Biohydrogen production using psychrophilic bacteria isolated from Antarctica", *Int. J. Hydrogen Energy*, 40, 7586–7592.

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

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

AVA Biochem. "5-(Hydroxymethyl)-furfural AVA Biochem US Rev 1.00 121201-5-(Hydroxymethyl)-furfural_AVA_Biochem_US_Rev_1.00.121201.pdf". http://www.ava-biochem.com/media/downloads_EN/safety_data_sheet/5-%28Hydroxymethyl%29-furfural_AVA_Biochem_US_Rev_1.00_121201.pdf,

Son erişim tarihi: 15. 08.2015.

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

Brouwer, H. 1991. "Testing for chemical toxicity using bacteria: An undergraduate laboratory experiment", *J. Chem. Educ.*, 68, 695-7.

Cai, J., Wu, Q., Wang, G., Deng, C. 2013. "Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium* sp. 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill", *Renew. Energy*, 59, 202–209.

Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Lo, Y.-C., Wang, H.-M., Chang, J.-S. 2010. "Engineering strategies for the enhanced photo-H₂ production using effluents of dark fermentation processes as substrate", *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 13356–13364.

Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A., El-Halwagi, M. 2012. "A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials", *Process Saf. Environ. Prot.*, 90, 189–202.

Das, D., Veziroglu, T. 2001. "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature", *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 6046-6057.

Dębowski, M., Korzeniewska, E., Filipkowska, Z., Zieliński, M., Kwiatkowski, R. 2014. "Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria", *Int. J. Hydrogen Energy*, 39, 1972–1978.

Dhar, B.R., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Lee, H.-S. 2015. "Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell", *Bioresour. Technology*, 198, 223–230.

Dubey, A.K., Gupta, P.K., Garg, N., Naithani, S. 2012. "Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*", *Carbohydr. Polym.*, 88, 825–829.

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

European Commission. "untitled-Draft Technical Background Report on Tissue Paper.pdf." <http://ec.europa.eu/environment/gpp/pdf/Draft%20Technical%20Background%20Report%20on%20Tissue%20Paper.pdf>, Son erişim tarihi: 16.08.2015.

Eugene W. Rice, Rodger B. Baird, Andrew D. Eaton, L.S.C. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (22. Basım). Amerika: Amerikan Water Work Association.

Fagan, R.D., Grethlein, H.E., Converse, A.O., Porteous, A. 1971. "Kinetics of the acid hydrolysis of cellulose found in paper refuse", *Environ. Sci. Technol.*, 5, 545–547.

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

Gou, C., Guo, J., Lian, J., Guo, Y., Jiang, Z., Yue, L., Yang, J. 2015. "Characteristics and kinetics of biohydrogen production with Ni^{2+} using hydrogen-producing bacteria", *Int. J. Hydrogen Energy*, 40, 161–167.



Guo, F., Fang, Z., Xu, C.C., Smith, R.L. 2012. "Solid acid mediated hydrolysis of biomass for producing biofuels", *Prog. Energy Combust. Sci.*, 38, 672–690.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P. 2010. "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review", *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 10660–10673.

Gupta, M., Gomez-Flores, M., Nasr, N., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Hesham El Naggar, M., Nakhla, G. 2015. "Performance of mesophilic biohydrogen-producing cultures at thermophilic conditions", *Bioresour. Technol.*, 192, 741–7.

Hallenbeck, P.C. 2005. "Fundamentals of the fermentative production of hydrogen", *Water Sci. Technol.*, 52, 21–29.

Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. 2007. "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress", *Int. J. Hydrogen Energy*, 32, 172–184.

Hniman, A., O-Thong, S., 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", *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 8785–8793.

Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., Howard, S, 2003. "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production", *African J. Biotechnol.*, 2, 602–619.

Jeihanipour, A., Karimi, K., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J. 2010. "A novel process for ethanol or biogas production from cellulose in blended-fibers waste textiles", *Waste Manag.*, 30, 2504–2509.

Jeihanipour, A., Karimi, K., Taherzadeh, M.J. 2011. "Acid Hydrolysis of Cellulose-based Waste Textiles", *The 7th International Chemical Engineering Congress & Exhibition IChEC*. Kish, Iran, pp. 21–24.



Kapdan, I.K., Kargi, F. 2006. "Bio-hydrogen production from waste materials", *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 569-582.

Karadag, D.,2011. "Anaerobic H₂ production at elevated temperature (60 degrees C) by enriched mixed consortia from mesophilic sources", *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 458–465.

Kargi, F., Arıkan, S. 2013a. "Hydrogen gas production from vinegar fermentation wastewater by electro-hydrolysis: Effects of initial COD content", *Int. J. Hydrogen Energy*, 38, 2701–2708.

Kargi, F., Arıkan, S. 2013b. "Electrohydrolysis of Vinegar Fermentation Wastewater for Hydrogen Gas Production Using Different Types of Electrodes", *Journal of Environmental Engineering*, 139, 881–886.

Kargi, F., Arıkan, S. 2013c." Improved hydrogen gas production in electrohydrolysis of vinegar fermentation wastewater by scrap aluminum and salt addition", *Int. J. Hydrogen Energy*, 38, 4389–4396.

Kargi, F., Catalkaya, E.C. 2011a. "Electrohydrolysis of landfill leachate organics for hydrogen gas production and COD removal", *Int. J. Hydrogen Energy*, 36, 8252–8260.

Kargi, F., Catalkaya, E.C. 2011b. "Hydrogen gas production from olive mill wastewater by electrohydrolysis with simultaneous COD removal", *Int. J. Hydrogen Energy*, 36, 3457–3464.

Kargi, F., Uzunçar, S. 2012a. "Simultaneous hydrogen gas formation and COD removal from cheese whey wastewater by electrohydrolysis", *Int. J. Hydrogen Energy*, 37, 11656–11665.

Kargi, F., Uzunçar, S. 2012b. "Simultaneous hydrogen gas formation and COD removal from cheese whey wastewater by electrohydrolysis", *Int. J. Hydrogen Energy*, 37, 11656–11665.

Kotay, S., Das, D. 2008. "Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials", *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 258–263.



Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P.-C., Logan, B.E. 2009. "Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis", *Int. J. Hydrogen Energy*, 34, 6201–6210.

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

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

Levin, D.B., Zhu, H., Beland, M., Cicek, N., Holbein, B.E. 2007. "Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada", *Bioresour. Technol.*, 98, 654–60.

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

Liu, D. 1983. "Resazurin reduction method for activated sludge process control", *Environ. Sci. Technol.*, 17, 407–11.

Logan, B.E. 2004. "Biologically extracting energy from wastewater: biohydrogen production and microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, 160A–167A.

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

Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shim, H. 2010. "Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR)", *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 11733–11737.

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



MARKA Doğu Marmara Kalkınma Ajansı . "kagit_raporu.pdf,"
http://www.dogumarmarabolgeplani.gov.tr/pdfs/kagit_raporu.pdf (Son erişim tarihi: 15.08.2015).

Maru, B.T., Bielen, A.A.M., Kengen, S.W.M., Constantí, M., Medina, F. 2012. "Biohydrogen Production from Glycerol using *Thermotoga* spp.", *Energy Procedia*, 29, 300–307.

Nanqi, R., Wanqian, G., Bingfeng, L., Guangli, C., Jie, D. 2011. "Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22, 365–70.

Ni, M., Leung, D.Y.C., Leung, M.K.H., Sumathy, K. 2006. "An overview of hydrogen production from biomass", *Fuel Process. Technol.*, 87, 461–472.

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M. 2002. "Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria", *Int. J. Hydrogen Energy*, 27, 1367–1371.

Orozco, A.M., Al-Muhtaseb, A.H., Rooney, D., Walker, G.M., Aiouache, F., Ahmad, M. 2013. "Fermentable sugars recovery from lignocellulosic waste-newspaper by catalytic hydrolysis", *Environ. Technol.*, 34, 3005–3016.

Panagiotopoulos, I. a, Bakker, R.R., de Vrije, T., Koukios, E.G. 2011. "Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds", *Bioresour. Technol.*, 102, 11204–11.

Saady, N.M.C. 2013. "Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge", *Int. J. Hydrogen Energy*, 38, 13172–13191.

Salam, M.A., Pondith, P.C., Islam, A., Khan, M.R., Uddin, M.R., Islam, M.A. 2013. "Conversion of Cellulosic waste into fermentable sugar: Process optimization", *Journal of Chemical Engineering*, 28. 37-31.



Saratale, G.D., Kshirsagar, S.D., Saratale, R.G., Govindwar, S.P., Oh, M.-K. 2015. "Fermentative hydrogen production using sorghum husk as a biomass feedstock and process optimization", *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 20, 733–743.

Saripan, A. F., Reungsang, A. 2014. "Thermophilic Fermentative Biohydrogen Production from Xylan by Anaerobic Mixed Cultures in Elephant Dung", *Int. J. Green Energy*, 12, 900-907.

Seol, E., Manimaran, A., Jang, Y., Kim, S., Oh, Y.-K., Park, S. 2011. "Sustained hydrogen production from formate using immobilized recombinant *Escherichia coli* SH5", *Int. J. Hydrogen Energy*, 36, 8681–8686.

Tuna, E., Kargi, F., Argun, H. 2009. "Hydrogen gas production by electrohydrolysis of volatile fatty acid (VFA) containing dark fermentation effluent", *Int. J. Hydrogen Energy*, 34, 262–269.

Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M. 2009. "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13, 1000–1013.

Yáñez, R., Alonso, J., Parajó, J. 2004. "Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated cardboard", *Process Biochem.*, 39, 1543–1551.

Yilmazel, Y.D., Johnston, D., Duran, M. 2015. "Hyperthermophilic hydrogen production from wastewater biosolids by *Caldicellulosiruptor bescii*", *Int. J. Hydrogen Energy*, 40, 12177–12186.

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

Yin, Y., Hu, J., Wang, J. 2014. "Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods", *Int. J. Hydrogen Energy*, 39, 13550–13556.

Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., Hayashi, S. 2002. "Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes", *Biomass and Bioenergy*, 22, 389–395.



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

Zhang, F., Chen, Y., Dai, K., Shen, N., Zeng, R.J. 2015. "The glucose metabolic distribution in thermophilic (55 °C) mixed culture fermentation: A chemostat study", *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 919–926.

Zeidan, A. A., Van Niel, E.W.J. 2009. "Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars", *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 4524–4528.

Zeidan, A.A., Zeidan, A.A., van Niel, E.W.J. 2010. "A quantitative analysis of hydrogen production efficiency of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor owensensis* OLT", *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 1128–1137.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. HİDAYET ARGUN
Proje No:	113Y187
Proje Başlığı:	Kağıt Atığından Karanlık Fermentasyon ve Elektroliz ile Hidrojen Gazı Üretimi
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. MÜHENDİSLİK F. ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/09/2013 - 01/09/2015
Onaylanan Bütçe:	183439.0
Harcanan Bütçe:	157650.49
Öz:	<p>Bu projenin amacı kağıt havlu atığından temiz ve yüksek enerji değeri olan hidrojen gazı üretimi için verimli bir proses geliştirmek aynı zamanda hidrojen üretim hız ve verimini artırmanın yollarını araştırmak olmuştur. Bu amaca ulaşabilmek için üç basamaklı bir proses yaklaşımı izlenmiştir. İlk basamakta kağıt atığı çözeltisinden asit hidroliz ön işlemiyle karanlık fermentasyon basamağı için şeker çözeltisi eldesi, ikinci basamakta şeker çözeltisinden anaerobik çamur kullanılarak karanlık fermentasyonla hidrojen gazı üretimi, üçüncü basamakta ise karanlık fermentasyon çıkış suyundan elektroliz ile hidrojen üretimi yapılmıştır. Bunlara ilaveten karanlık fermentasyon ortamına doğrudan elektrik akımı verilerek oluşan organik asitlerin uzaklaştırılmasıyla hidrojen üretimi çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Deneilerin hidrojen üretim performans kıyaslamasında hidrojen üretim verimi ve hızı kullanılmıştır. Proje kapsamında üç adet uluslararası makale yazılmış ve SCI dergilere gönderilmiştir. Ayrıca iki adet konferansta poster sunumu kabul edilmiştir, bunlardan birisi sunulmuş olup diğeri Ekim 2015'te sunulacaktır. Birde proje verilerinden bir adet yüksek lisans tezi hazırlanmaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Atık kağıt havlu, hidrojen, karanlık fermentasyon, elektroliz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır