

## Fermentatif Hidrojen Üretimini $\alpha$ -Selüloz İle Anaerobik Çamur Ve Sığır Gübresi Karışımlarını Kullanarak Değerlendirilmesi

Serpil ÖZMIHÇI\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 35390, Buca/İzmir

(Alınış / Received: 05.12.2016, Kabul / Accepted: 04.01.2017,  
Online Yayınlanma / Published Online: 02.05.2017)

**Anahtar Kelimeler**  
Biyo-hidrojen,  
birleşik kültür,  
sığır gübresi,  
Anaerobik çamur,  
 $\alpha$ -selüloz

**Özet:** Anaerobik karışık kültür ve sığır gübresi karışımları ile kesikli deneylerde  $\alpha$ -selülozun ( $2 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ ) biyo-hidrojen üretim performansı değerlendirilmiştir. Anaerobik çamur (AÇ) ve sığır gübresi (SG); 1/ 2- 1/ 15 arasında değişen giriş biyomas oranlarında karıştırılarak en iyi hidrojen üretim verimi ve miktarını veren optimum AÇ/ SG oranı saptanmıştır. Ayrıca AÇ ve SG karıştırılmadan hem  $\alpha$ -selüloz hem de glukoz üzerindeki hidrojen üretimleri, karışımların performansları ile karşılaştırılmıştır. En yüksek hidrojen oluşumu ( $\text{HF} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$  kültür), üretim verimi ( $13 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1}$  selüloz) AÇ/SG oranı 1/5 olduğunda elde edilmiştir. Kültürler ayrı ayrı, kayda değer hidrojen üretim verimleri vermesine rağmen, karışımlardan daha düşük değerlerde kalmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen en iyi AÇ/ SG oranı olan 1/5 ile yeni bir deney yapılmış ve zamana karşı hidrojen üretim performansını belirleyen değerlerden hidrojen üretimi, yüzde selüloz dönüşümü, 192. saatte sırasıyla  $10.88 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$  kültür ve %52 olarak bulunmuştur. Asetik asit en yüksek uçucu yağ asidi olarak tayin edilmiştir.

## Utilization of Fermentative Hydrogen Production From $\alpha$ -Cellulose by Combining Anaerobic Sludge and Cattle Manure

**Keywords**  
biohydrogen;  
co-culture,  
cattle manure,  
anaerobic sludge,  
 $\alpha$ -cellulose

**Abstract:** Batch fermentation experiments were performed for utilizing bio-hydrogen production from  $\alpha$ - cellulose solution ( $2 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ ) by combining anaerobic mixed culture and cattle manure. Mixed cultures of anaerobic sludge (AÇ) and cattle manure (SG) were used with different initial biomass ratios, changed between 1/ 2 and 1/ 15, in order to determine the optimum AÇ/ SG ratio yielding the highest hydrogen gas formation and yield. Hydrogen production by only AÇ and SG mixed cultures were also realized along with the combined fermentations by growing them on  $\alpha$ -cellulose and glucose. The highest hydrogen formation ( $\text{HF} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$  culture), hydrogen yield ( $13 \text{ mmol H}_2 \text{ gr}^{-1}$  cellulose) were obtained with AÇ/ SG ratio of 1/5. Hydrogen fermentations

done with strains alone also yielded considerable hydrogen gas amounts, however less than the mixed ones. The best AÇ/SG ratio of 1/5 were tested for its hydrogen gas formation yield, percent cellulose conversion with time and 10.88 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>culture, 52 %, were found respectively at 192 h. Acetic acid was the highest volatile fatty acid obtained in the experiments.

\*Serpil Özmihçi, serpil.ozmihci@deu.edu.tr

## 1. Giriş

Son dönemlerde hidrojen enerjisi sera gazı etkisini azaltması nedeniyle temiz enerji diye adlandırılmakta ve fosil yakıtların yerini alabilecek iyi bir alternatif enerji kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır. Yüksek enerji içeriğinden dolayı (122 kJ g<sup>-1</sup>) hidrojen gazı önemli bir enerji taşıyıcısıdır. Fermantasyon yoluyla özellikle de mezofilik koşullarda (30-35°C, 1atm) hidrojen gazı üretimi kimyasal metotlara göre ekonomik açıdan üstünlük sağlamaktadır. Ancak fermantasyon yönteminin de kendi içinde; düşük verim ve üretim hızı gibi, üstesinden gelinmesi gereken sorunları mevcuttur [1-5].

Selülozik ham maddeler biyo-hidrojen üretimi için ucuz kaynaklardır ve sürdürülebilir enerji hammaddesi olabilecek potansiyele sahiptir. Lignoselülozik maddeler selüloz, hemiselüloz ve lignin ihtiva eden yapılardır ve bu yapılar asit ya da enzimatik hidroliz ile şeker formları ortaya çıkarılarak fermantasyona tabii tutulabilirler. Selülozik maddelerin enzimatik hidrolizi çevre dostu ve asit hidrolizi ile karşılaştırıldığında daha verimli monosakkarit oluşumu sağlamasından dolayı avantajlıdır [6-7]. Selüloz, bitkilerde bulunan temel biyo-polimerik bileşenlerden olup lineer, paralel, ve yüksek oranda sıralanmış hidrojen bağlarıyla bağlı D-glukoz zincirli glukanolardan oluşmaktadır. Bünyesinde barındırdığı karmaşık ve farklı yapısıyla hidrolizi zorlu bir sürece dönüşmekte bu da selülozik maddelerden biyo-enerji

üretiminde, üretim hızını sınırlandıran bir basamağa dönüşmektedir [6-13].

Pek çok bakteri ve mantar türü, çoğu aerobik olmak üzere selülozik maddelerin indirgenmesinde kullanılmaktadır. Selülozik bakteri türleri *Trichonympha*, *Clostridium*, *Actinomyces*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* ve *Methanobrevibacter ruminantium* gibi türlerdir. *Clostridia* selülozik hammaddelerden yüksek hidrojen verimlerinin sağlanabildiği ve en çok çalışılmış bakteridir. *C.thermocellum*, *C. thermopalmarium*, *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. phytofermentans* ve *C. termitidis* hidrojen üretebilen türleri olarak literatürde karşımıza çıkmaktadır [6-8]. Literatürde *Clostridium* türleri ile yapılan selülozdan hidrojen üreten çalışmalarda 0.17-3.2 mmol/g selüloz arasında verimler görülmektedir [9-13].

Sığır gübresi karışık kültürleri içinde barındıran ve selülozik maddelerin parçalanmasına yardımcı organizmaları ihtiva eden bir biyomas kaynağıdır. Özellikle metan üretiminde çok sıkça başvurulan kaynaklardan biridir. Giriya v.d., 2013 yılında yaptıkları bir tanılama çalışmasında sığır gübresi kompozisyonunda *Bakteroid*(%38.3), *Firmikut* (%29.8), *Proteobakteri* (%21.3) ve *Verrucomikrobiyaller* (%2) içerdiğini saptamışlardır [14]. *Bacteroides*, *Alistipes* ve *Paludibacter* yanı sıra *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Anaerovorax*, *Bacillus* ve

yoğunluklu olarak *Firmicutes* türlerini barındırdığını söylemektedirler.  $\alpha$ - ve  $\gamma$ -proteobacterilerinden *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Stenotrophomonas* ve *Rhodobacter* türlerine rastlanmanın yanı sıra klon kütüphanesinde tanılanamayan %8'lik bir kültür oranının olduğunu belirtmektedirler. Literatürde sığır gübresi özellikle yüksek nütriye içeriği nedeniyle biyogaz üretiminde substrat olarak değerlendirilmektedir. Bu konuda yayınlar mevcuttur [14-17].

Anaerobik kültürler ile biyolojik olarak organik maddenin parçalanması metan gazı ile birlikte az miktarda hidrojen gazı (%2) açığa çıkarmaktadır. Bu süreçte anaerobik şartlarda asidojenik fazda (organik asit oluşumu) açığa çıkan hidrojen gazı metanojenik fazda tüketilmektedir. Bundan dolayı pek çok çalışmada, anaerobik hidrojen gazı üretiminde sistem asitleşme fazında tutularak yani metanojenik bakteriler karışık kültür içinde elimine edilerek hidrojen gazı verimi artırılmıştır [18-19].

Anaerobik çamur (AÇ) ve sığır gübresi (SG) birlikte selülozik hammaddeler ile değerlendirilerek biyoenerji üretim verimi ve hızını belirleyen çalışmalar bulunmaktadır. Ancak metan üretimi üzerinde yoğunlaşmış çokça çalışma olmasına rağmen hidrojen üretimine odaklanan çok çalışma bulunmamaktadır. Bu iki karışık kültürün biyo-hidrojen üretimi için birleştirilmesi  $\alpha$ -selülozdan biyo-hidrojen üretimi için bir avantaja dönüşüp tek başlarına kullanıldıkları durumlar ile karşılaştırıldığında fermentasyon süresini azaltabilir. Bunun yanı sıra hammaddenin etkin şekilde dönüşümünü ve hidrojen üretkenliğini artırır

-bilir. AÇ çok hızlı büyüeyebilen ve şekeri çok hızlı tüketebilen türler içermesine karşın lignoselülozik maddelerle kullanımında başarısı sınırlıdır. Ancak sığır gübresinin lignoselülozik hammaddeden biyogaz üretimindeki başarısı, içinde bulunan organizma kompozisyonundan kaynaklıdır ve lignoselülozik hammaddenin biyo-hidrojene dönüşümünde de başarı sağlayacaktır [14-17].

Birleşik fermantasyonda karışık kültürün nicel ve nitel kompozisyonu biyo-hidrojen üretim verimi ve hızı üzerinde son derece etkilidir [18-19]. Bu nedenle, bu çalışmada  $\alpha$ -selüloz üzerinde biyo-hidrojen üretim verimi ve hızını maksimize eden optimum AÇ / SG oranı (1/2-1/15) saptanacaktır. AÇ ve SG ayrıca  $\alpha$ -selüloz ve glukoz üzerinde büyütülerek biyo-hidrojen üretimine bakılacak ve karışımlar ile karşılaştırılacaktır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Deneysel Çalışmalar

Kesikli deneyler 310 mL serum şişelerinde 50 mL fermentasyon hacmi ile inkübatörde 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki deney optimum birleştirilmiş karışık kültürler ile aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ortamı anaerobik tutmak ve gaz kaçaklarını önlemek amacıyla şişeler bütill-kauçuk tıplar ve kapaklar ile sıkıca kapatılmıştır. Ortamı anaerobikleştirmek için %100 argon gazı şişelerden 15 dk geçirilmiştir. Başlangıç  $\alpha$ -selüloz konsantrasyonu 2 g L<sup>-1</sup>'de sabit tutulmuştur.  $\alpha$ -selüloz içindeki kullanılabilir şekerlerin açığa çıkartılabilmesi için 90°C 45 dk ısıtma işlemi tabii tutulmuştur. Örnekler aseptik koşullarda pH, hidrojen gazı ve sıvı ortamdaki son ürünlerin analizi için

şiringa yardımıyla alınmıştır. Karışık kültürler anaerobik çamur ve sığır gübresinden alınarak değişik oranlarda serum şişelerine eklenmiştir.

## 2.2. Organizma

Tüm deneylerde  $\alpha$ -selüloz (Sigma-Aldrich) konsantrasyonu 2 g L<sup>-1</sup>'de sabit tutulmuş ve sadece AÇ ve SG'nin tek başına denendiği deney şişesinde substrat olarak 2 g L<sup>-1</sup> glukoz kullanılmıştır. Anaerobik çamur (AÇ) PAKMAYA A.Ş, İzmir, Türkiye şirketinin arıtma tesisinin asideojenik fazından temin edilmiştir. Konsantre çamur 1 saat pH 5.9'da 100°C ısıya tabii tutularak ön arıtımı gerçekleştirilmiştir. Isı arıtımı spor oluşturan hidrojen üreten asideojenik bakterileri koruyarak hidrojen tüketen metanojenleri elimine edebilmek için gerçekleştirilmiştir. Sığır gübresi Kaynaklar Köyü, İzmir, Türkiye'den temin edilmiştir. Isıl-ışlemden geçirilen anaerobik çamur ve sığır gübresi sentetik ortamda, pH 7'ye ayarlanmış serum şişelerinde 37°C inkübatörde aktiveleştirilmiştir (5 g L<sup>-1</sup> glukoz, 2 g L<sup>-1</sup> nutriyent brot, 0.5 g L<sup>-1</sup> maya özütü, 0.25 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.8 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.9 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g L<sup>-1</sup> L-cysteine-HCl.H<sub>2</sub>O). İnkübasyon öncesi tüm şişelerden 15 dk argon gazı geçirilerek ortam anaerobik hale getirilmiştir. Sığır gübresi 1 ay üzerine yeni ortam eklenerek büyütülmüş, sonra tekrar yeni ortama alınmış ve anaerobik çamur ile benzer şekilde bir günlük inkübasyona tabii tutulmuştur. Ardından yüksek konsantrasyon elde etmek için santrifüjlenerek saf suda çözünerek deneylerde aşı kültürü olarak kullanılmışlardır.

Serum şişelerinde AÇ/SG oranları 1/ 2, 1/ 5, 1/ 10, 1/ 15 (w/w) tutulmuştur. Ayrıca SG ve AÇ kültürlerinin hidrojen gaz üretim potansiyelleri ayrı olarak da değerlendirilmiştir. AÇ ve SG ayrıca 2 g L<sup>-1</sup> glukoz üzerinde büyütülerek  $\alpha$ -selüloz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Deneysel

ortamda toplamda 0.25 g L<sup>-1</sup> biyomas olacak şekilde aşı kültürleri serum şişelerine eklenmiştir.

## 2.3. Analitik Yöntemler

Şeker, organik asit analizleri için deneysel ortamdan her gün 5 mL numune alınarak 8000 g'da santrifüjlenmiş ve üst sıvısı analizlerde kullanılmıştır. Şeker analizleri için fenol-asit yöntemi kullanılmıştır [20]. Uçucu yağ asitleri analizleri HPLC'de (Agilent 1100) 220 nm'de UV dedektör, 5  $\mu$ m x 150mm x 4.6 mm organik asit kolonu, pH 2.5'da 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızıyla verilen 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> taşıyıcı sıvı ile yapılmıştır.

Hidrojen ve metan gazı örnekleri, cam gaz sızdırmaz şiringalar ile serum şişelerinin gaz katmanından alınıp gaz kromatografisinde (Agilent 6890) hidrojen gazı konsantrasyonu tayin edilmiştir. Gaz kromatografisinde Alltech, Hayesep D 80/100 6009 1/800 9 08500 kolonunda 30 mL dk<sup>-1</sup> debili azot gazının taşıyıcı gaz olduğu, sırasıyla fırın, enjektör, dedektör sıcaklıklarının 35, 120 ve 140°C olduğu koşullarda gerçekleştirilmiştir. Toplam gaz miktarı sıvı yer değiştirme metodu (%2 sülfirik asit ve %10 NaCl) ile her gün tayin edilmiştir. Eklenik hidrojen gazı Özmihci, 2010b'da belirtildiği şekilde bulunmuştur [18-19].

Etil alkol gaz kromatografisinde ölçülmüştür (Varian CP-3800). FID Detektör ve WCOT fused silika kapiler kolon kullanılmış (15 m · 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film kalınlığı), kolon sıcaklığı 75°C ile başlatılıp 1 dk içinde 20°C dk<sup>-1</sup> ile 130°C'ye çıkartılmıştır. Toplam kalış süresinin 4.75 dk olduğu yöntemde enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 150 ve 200°C'de tutulmuştur. Azot gazı taşıyıcı gaz olarak tercih edilmiş ve lineer hızı 25mL dk<sup>-1</sup> ya ayarlanmıştır [21].

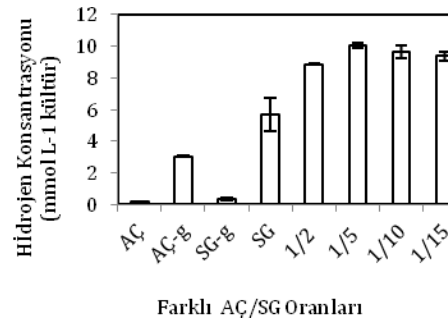
Nihai selüloz miktarı Standart Metodlara göre 105°C'de sabit tartıma gelinceye kadar tüm içerik kurutulmuş ve gerçekleştirilmiştir [22]. Kurutulmadan önce fermentasyon ortamı 8000g 'da 10 dakika santrifüjlenmiş, üst sıvıdan ayrılan pelet %0.9 NaCl çözeltisi ile birkaç defa yıkanarak girişim yapan bileşenlerden arındırılarak tekrar santri-füjlenmiştir.

### 3. Bulgular

$\alpha$ - selüloz üzerinde kesikli deneyler biyo-hidrojen fermentasyonu için dört farklı Anaerobik çamur / Sığır gübresi (AÇ/SG) kültür karışımlarında denenmiş ve SG, AÇ de ayrı ayrı hem  $\alpha$ - selüloz (AÇ, SG) hem de glukoz kullanılarak (AÇ-g, SG-g) teste tabii tutularak karışımlar ile karşılaştırılmıştır. Biyo-hidrojen üretim verimini, hızını ve miktarını en iyileyen koşullar tayin edilmiştir.

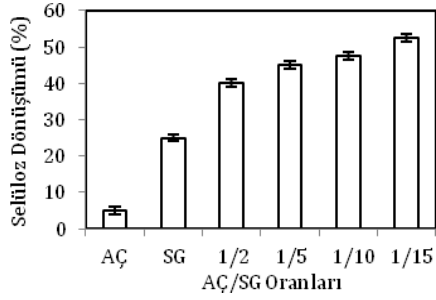
Şekil 1, farklı AÇ/SG oranlarında üretilen hidrojen miktarlarını göstermektedir. Deneyler 10 gün sürdürülmüştür. En yüksek hidrojen üretimi (10 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> kültür) AÇ/SG oranının 1/5 olduğu koşullarda tayin edilmiştir. AÇ ve SG kültürlerinin ayrı ayrı  $\alpha$ -selüloz üzerinde denendiği koşullarda en yüksek hidrojen gazı miktarı sırasıyla 0.2 ve 5.7 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> kültür gerçekleşmiştir. Görüldüğü üzere AÇ'deki hidrojen üretme performansı SG tek başına olduğundan daha az olmuştur. Bunun nedeni kültür karışımı içinde selülozu parçalayabilen organizma kültürlerinin az olmasından kaynaklanabilir. AÇ ve SG glukoz üzerinde büyütüldüğünde en yüksek hidrojen gazı konsantrasyonu sırasıyla 3 ve 0.35 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>kültür olarak saptanmıştır. Glukoz üzerinde büyüyen AÇ ve SG'nin sonuçlarının literature ile uyumlu olduğu görülmesine rağmen glukoz üzerinde SG'nin daha fazla büyümesi gerektiği açıktır [23-24].

SG'de elde edilen biyohidrojen miktarının AÇ'den düşük olmasının başlıca nedeni SG içinde varlığını koruyan metanojenlerin hidrojeni tüketmesinden kaynaklı olabilir. Deneylerin hepsinde metan üretiminin düşük düzeylerde ve yaklaşık olarak %10 civarında kaldığı gözlemlenmiştir (veriler verilmemiştir). Diğer AÇ/ SG oranları 1/15, 1/10, 1/2 AÇ/SG oranı 1/5'den daha düşük hidrojen gazı miktarları (9.4, 9.6, 8.8 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> kültür) vermiştir. Elde edilen birleşik fermentasyon sonuçları, kültürler tek başına denendiği durumdaki şişelerden daha yüksek hidrojen gaz hacmine sahiptirler.



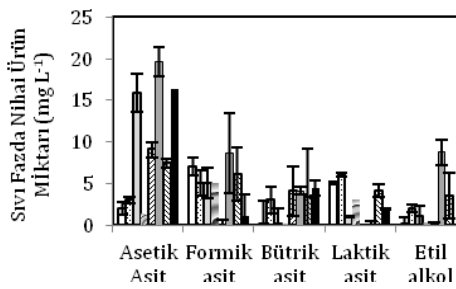
Şekil 1. Farklı AÇ/ SG oranlarındaki biyohidrojen gazı miktarları

Şekil 2 fermentasyon süreci sonunda farklı deney koşullarında elde edilen yüzde selüloz giderme verimliliklerini göstermektedir. AÇ'nin  $\alpha$ - selülozu iyi parçalayamadığı ve SG tek başına kullanıldığında  $\alpha$ -selülozun %25'lik bir kısmını parçalayarak fermentasyon süresinin sonunda 1.5 g L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -selüloz konsantrasyonu kaldığı gözlemlenmiştir. AÇ/ SG karışımlarının kullanıldığı 1/ 15, 1/ 10, 1/ 5, 1/ 2 oranına sahip şişelerde diğerlerine nazaran daha iyi bir selüloz giderme verimliliği elde edilmiştir. En yüksek alpha-selüloz giderimi AÇ/ SG'nin 1/15 olduğu koşullarda (%52) elde edilmiştir.



**Şekil 2.** Farklı AÇ/SG oranlarındaki yüzde selüloz dönüşümleri

Şekil 3 farklı deney ortamlarında elde edilen nihai ürünleri göstermektedir. En yüksek asetik asit konsantrasyonu (19.6 mM) AÇ/ SG oranı 1/5 iken elde edilmiş, bunu AÇ/SG oranı 1/15 ve SG'nin tek başına olduğu deney ortamı takip etmiştir. Ayrıca deney ortamlarında bütirik asit üretimi de kayda değer düzeydedir. Deney ortamlarında bütirik asit konsantrasyonları birbirine yakın çıkmış ve en yüksek bütirik asit üretimi AÇ/ SG oranının 1/15 olduğu deney ortamında (4.4 mM) oluşmuştur. Laktik asit üretimi fermentasyon süresinin sonlarına doğru ortaya çıkmıştır. Ayrıca üretilen etil alkol miktarına da bakılmış ve AÇ/SG oranı 1/5 olan şişede en yüksek etil alkol (8.8 mM) miktarı saptanmıştır.



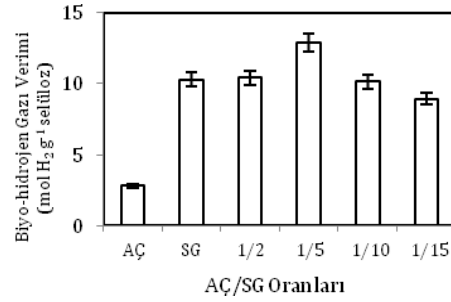
**Şekil 3.** Farklı AÇ/SG oranlarında sıvı ortamda elde edilen nihai ürünler:  
 □AÇ, ■AÇ-g, □SG, ■SG-g, □1/2, ■1/5, □1/10, ■1/15

Şekil 4 deney ortamlarında elde edilen hidrojen üretim verimlerini

göstermektedir. Hidrojen gazı üretimi verimi ( $Y_{P/S}$ ), karanlık fermentasyon sürecinin etkin bir şekilde gerçekleştirildiğini gösteren önemli parametrelerden biridir ve aşağıdaki denklem uyarınca değerler hesaplanmıştır:

$$Y\left(\frac{P}{S}\right) = \frac{HF}{(S_0 - S_e) * V} \quad (1)$$

HF (mmol H<sub>2</sub>) 240 saatte üretilen hidrojen gazı miktarını; V (L) başlangıçta konan fermentasyon ortamını (0.05L), S<sub>0</sub> and S<sub>e</sub> (g L<sup>-1</sup>) giriş ve nihai selüloz/ glukoz konsantrasyonunu göstermektedir [18].



**Şekil 4.** Farklı AÇ/SG oranlarında elde edilen biyohidrojen gazı üretim verimleri

Hidrojen gazı üretim verimlerine göre AÇ/ SG oranının 1/5 olduğu deney şişesi en yüksek biyo-hidrojen üretim verimini 13 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> selüloz (2.1 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glukoz) değeriyle göstermiştir. AÇ tek başına kullanıldığında yeterli selüloz dönüşümünü gösteremediği için grafikte yer alamamış ve glukozda büyütülen kültürler kalan toplam şeker miktarı baz alınarak hesaplanmıştır. SG'de elde edilen verim düşüktür; bunun sebebi uzun fermentasyon süresi nedeniyle hidrojenin tüketilmiş olması olabilir. Karıştırılmış kültürlerde elde edilen biyo-hidrojen gazı üretim verimi tek başına olan denemelere göre yüksek çıkmıştır. Deney sonucunda sonuçlar AÇ/ SG oranı

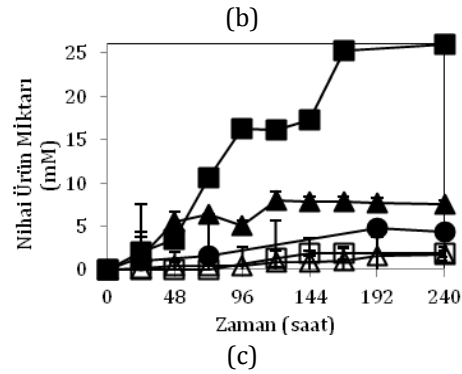
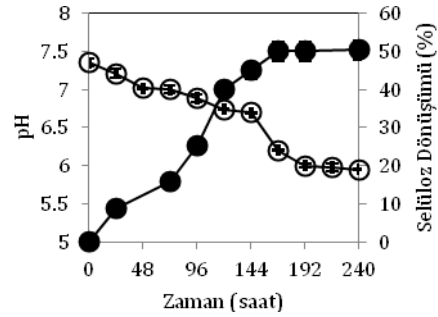
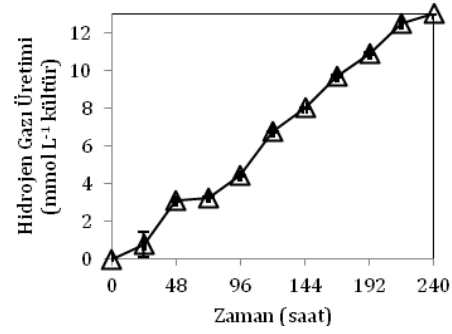
1/ 5 olan şişede en iyi hidrojen üretiminin olduğunu göstermektedir.

sırasıyla değerleri 2.89, 2.65, 9, 6.8 mM'dır.

Deney ortamlarında kullanılan biyomas konsantrasyonları yeterli etkinlikte olmayıp yeterli selüloz dönüşümü sağlamamış olabilirler. Ancak yine de selülozik ortamlarda anaerobik çamur ve sığır gübresinin birlikte biyohidrojen üretimi için kullanılması umut verici sonuçlar vermektedir.

Şekil 1, 2, 3 ve 4'deki sonuçlar değerlendirildikten sonra en iyi hidrojen gazı üretim miktarını ve verimini veren AÇ/ SG oranının 1/ 5 olduğu deneyler için zamana bağlı hidrojen miktarı (a), pH ve kalan selüloz (b), nihai ürünler (c) için yeni bir deney yapılmış ve Şekil 5'de gösterilmiştir.

Şekil 5 (a) zamana karşı hidrojen gazı miktarını vermektedir. Sonuçlara göre hidrojen gazı miktarı zamana bağlı olarak artmış önce 48 saatte 3 mmol  $H_2 L^{-1}$  kültüre ulaşmış ve 192. saatte nihai hidrojen miktarı olan 10.8 mmol  $H_2 L^{-1}$  kültüre erişmiştir. Şekil 5 b'de zamana bağlı pH değişimini ve selüloz dönüşüm miktarını göstermektedir. Fermentasyon ortamının başlangıç pH'sinin 7.35'e ayarlandığı şişede pH, 144 saatte 6.69'e düşmüş ve daha sonrasında fermentasyon süresinin sonunda tolare edilebilir seviyelerde (pH:6) kalmıştır. Yüzde selüloz dönüşüm verimliliği de zamana bağlı olarak artmış ve 192. saatte en yüksek dönüşüm değeri olan %50.5'ye ulaşılmıştır. Fermentasyon periyodu sonunda AÇ/SG oranının 1/5 olduğu koşullarda sıvı fazda elde edilen nihai ürünler Şekil 5 c verilmektedir. Tüm nihai ürünler zamana bağlı olarak artmış ve ortamda en fazla asetik asit (25 mM) oluşmuştur. Formik asit, laktik asit, bütirik asit ve etanol de aynı fermentasyon ortamında tespit edilebilen diğer nihai ürünlerdir ve



Şekil 5. AÇ /SG oranının 1/5 olduğu koşulda elde edilen (a) Hidrojen gazı miktarı, (b) pH(○)ve yüzde selüloz dönüşümü (●) (c) nihai ürün konsantrasyonları, □ formik asit, ■ asetik asit, △ Laktik asit, ▲ Bütirik asit, ● Etil alkol

Mezofilik koşullarda selülozik ortamlarda biyo-hidrojen üretimini hedefleyen ko-kültür (birleşik) ve karışık

kültürlerin kullanıldığı çalışmalar mevcut -tur [10, 13, 25-27] . Bu çalışmaların bazılarında elde edilen biyo-hidrojen üretim verimleri bu çalışma ile Tablo 1'de karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen hidrojen üretim verimlerinin karşılaştırılan çalışmalardan daha yüksek

olduğu görülmektedir. Bu çalışma; selülozik hammaddelerden biyo-hidrojen üretiminde anaerobik çamur ve sığır gübresinin birlikte kullanılabilceğini göstermektedir.

**Tablo 1.** Karışık kültürler ile mezofilik koşullarda selüloz bazlı kullanıldığında elde edilmiş biyo-hidrojen üretim verimlerinin karşılaştırması

Karışık Kültürler	Substrat	Substrat Miktarı	pH	T (°C)	Hidrojen Üretim Verimi (Y <sub>P/S</sub> )	Kaynak
<i>Clostridium acetobutylicum</i> , ATCC 824 ve <i>Ethanoigenens harbinense</i> B49	$\alpha$ - selüloz	10 g L <sup>-1</sup>	5	37	8.1mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> selüloz	[25]
Isıl işlemde geçirilmiş çürütücü çamuru	$\alpha$ - selüloz	40 g L <sup>-1</sup>		37	3.2 mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> selüloz	[10]
<i>Enterococcus gallinarum</i> G1 ve <i>Ethanoigenens harbinense</i> B49	Avicel	5 g L <sup>-1</sup>			2.97 mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> selüloz	[13]
İnek gübresi kompostu	selüloz	10 g L <sup>-1</sup>	6.8	37	2.09 mol H <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> heksoz	[26]
Panda gübresi	corn stalk	15 g L <sup>-1</sup>	5.5	36	176 ml H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> TS	[27]
Isıl işlemde geçirilmiş Anaerobik çamur ve sığır gübresi	$\alpha$ - selüloz	2 g L <sup>-1</sup>	6.4	37	13 mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> selüloz	Bu çalışma

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Anaerobik çamur, sığır gübresi ve bunların farklı karışımlarından oluşan deney ortamları  $\alpha$ - selüloz kullanılarak mezofilik koşullarda ve kesikli işletim sisteminde denenmiş ve biyo-hidrojen üretme performansları test edilmiştir. Kültürler 2 g L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -selüloz ve kültürler tek başına kullanıldığında glukoz kullanılarak, karışımlar ile karşılaştırılmıştır. En yüksek biyo-hidrojen gaz oluşumu (10 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> kültür), asetik asit konsantrasyonu (19.6 mM), biyo hidrojen gazı oluşum verimi (13 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> selüloz) AÇ/ SG oranı 1/5 olduğu koşullarda elde edilmiştir. En yüksek  $\alpha$ -selüloz dönüşüm verimliliği (%52) AÇ/ SG oranının 1/15 olduğu koşullarda elde edilmiştir. AÇ/ SG oranının 1/5 olduğu koşullar en iyi hidrojen gazı üretme performansını gösterdiğinden zamana bağlı nihai ürün oluşumları bu koşullar için verilmiştir. Biyo-hidrojen oluşumunun zamana bağlı olarak arttığının gözlemlendiği şişede 240. saatte maksimum biyo-hidrojen gazı miktarı olan 13 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> kültüre ulaşılmıştır.

Aynı zamanda en yüksek asetik asit konsantrasyonuna (24.3mM) ulaşılmıştır. Sonuçlar literatür ile karşılaştırılmış ve elde edilen biyo-hidrojen üretim veriminin bu çalışmada en yüksek olduğu saptanmıştır.

#### Teşekkür

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü Biyoproses Laboratuvarı olanakları ile tamamlanmıştır.

#### Kaynakça

- [1] Kapdan IK, Kargi F. 2006. Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* Cilt. 38, s. 569-582. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015
- [2] Kotay S.M., Das D. 2008. Biohydrogen as a renewable energy resource - Prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy.* Cilt. 33, s. 258-263. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.07.031
- [3] Manish S., Banerjee R. 2008. Comparison of biohydrogen



- production processes. *Int J Hydrogen Energy*. Cilt 33, s. 279-286. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.07.026
- [4] Ni M., Leung, D.Y.C., Leung M.K.H., Sumathy K. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Process. Technol.* Cilt 87, s. 461-472. DOI: 10.1016/j.fuproc.2005.11.003
- [5] V-Vazquez I, P-Valardo M. 2009. Hydrogen Production by fermentation consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Cilt 13:5, s. 1000-1013. DOI: 10.1016/j.rser.2008.03.003
- [6] Gupta P., Samant K. and Sahu A. 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *Int. of Microbiology. International Journal of Microbiology*. Cilt. 2012, s. 5 sayfa. DOI: 10.1155/2012/578925
- [7] Levin D. B., Carere C. R., Cicek N., Sparling R. 2009. Challenges for bio-hydrogen production via direct lignocellulose fermentation *Int. J. Hydrogen Energy*. Cilt 34, s. 7390-7403, DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.05.091
- [8] Geng A., He Y., Qian C., Yan X., Zhou Z. 2010. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium* *Bioresource Technology*. Cilt 101:11, s. 4029-4033. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.042
- [9] Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A. B., Kongjan P., Angelidaki I. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept . *Bioresource Technology*. Cilt 100:9, s. 2562-2568. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.011
- [10] Lay J.-J. 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotech. and Bioeng.* Cilt 74:4, s. 280-287. DOI: 10.1002/bit.1118
- [11] Ren Z, Ward T.E., Logan B.E., Regan J.M. 2007. Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. *J Appl Microbiol.* Cilt 103: 6, s. 2258-66. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03477.x
- [12] Saratale G.D., Chen S.-D., Lo Y.-C., Saratale R. G. and Chang J. S. 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation- a review. *J. Science and Industrial Research*. Cilt 67, s. 962-979. DOI: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/2424>
- [13] Wang A., Gao L., Ren N., Xu J. and Liu C. 2009. Bio-hydrogen production from cellulose by sequential co-culture of cellulolytic hydrogen bacteria of *Enterococcus gallinarum* G1 and *Ethanoigenens harbinense* B49. *Biotechnology Letters*. Cilt 31:9, s. 1321-1326. DOI: 10.1007/s10529-009-0028-z
- [14] Girija D, Deepa K, Xavier Francis, Antony Irin, Shidh P R. 2013. Analysis of cow dung microbiota— A metagenomic approach *Indian Journal of Biotechnology*. Cilt. 12, s. 372-378. DOI: <http://hdl.handle.net/123456789/21863>
- [15] Hagenkamp-Korth F., Ohl S., Hartung E. 2015. Effects on the biogas and methane production of cattle manure treated with urease inhibitor, *Biomass and Bioenergy*. Cilt. 75, s. 75-82. DOI: 10.1016/j.biombioe.2015.02.014
- [16] León E., Martín M. 2016. Optimal production of power in a combined

- cycle from manure based biogas, Energy Conversion and Management. Cilt. 14, s. 89-99. DOI: 10.1016/j.enconman.2016.02.002
- [17] Tsapekos P, Kougias P.G, Treu L., Campanaro S., Angelidaki I. 2017. Process performance and comparative metagenomic analysis during co-digestion of manure and lignocellulosic biomass for biogas production, Applied Energy. Cilt. 185:1, s. 126-135. DOI: 10.1016/j.apenergy.2016.10.081
- [18] Ozmihci S, Kargi F. 2010a. Comparison of different mixed cultures for bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and light fermentation. J.Ind.Microbiol Biotechnol. Cilt. 37, s. 341-347. DOI: 10.1007/s10295-009-0679-8
- [19] Ozmihci S, Kargi F. 2010b. Effects of starch loading rate on performance of combined fed batch fermentation of ground wheat for bio-hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energy. Cilt. 35, s. 1106-1111. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.11.048
- [20] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem Cilt. 8, s. 350-366. DOI: 10.1021/ac60111a017
- [21] Kargi F, Ozmihci S. 2006. Utilization of cheese whey powder for ethanol fermentations: effects of operating conditions. Enzyme Microb Technol Cilt. 38, s. 711-718. DOI: 10.1007/s00449-006-0101-0
- [22] Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., Eaton, A. D., 2005. Eds. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edn. American Public Health Association (APHA), Washington DC, USA
- [23] Datar R. Huang J. Maness P.C. Mohagheghi A., Czernik S., Chornet E. 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover pretreated with a steam explosion process. Int. J. Hydrogen Energy. Cilt. 32, s. 932-939. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2006.09.027
- [24] Cheong D.-Y. ve Hansen R. 2007. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. Bioresource Technology. Cilt. 98, s. 2229-2239. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.039
- [25] Wang A., Ren N., Shi Y., Lee D-J. 2008. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture—Clostridium acetobutylicum X9 and Ethanoigenens harbinense B49. Int. J. Hydrogen Energy. Cilt. 33, s. 912-917. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.10.017
- [26] Ren N.-Q., Xu J.-F., Gao L.- F., Xin L., Qiu J., Su D.-X. 2010., Fermentative bio-hydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures. Int. J. Hydrogen Energy. Cilt. 35:7, s. 2742-2746. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.04.057
- [27] Fan Y.-T., Xing Y., Ma H.-C., Pan C.-M., Hou H.-W. 2008. Enhanced cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. Int. J. Hydrogen Energy. Cilt. 33:21, s. 6058-6065. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.08.005