



## Determination of suitable operating conditions for biohydrogen production from potato production medium by dark fermentation and kinetic analysis

Baran Özyurt<sup>1</sup>, Zeynep Yılmaz Hitit<sup>1\*</sup>, Furkan Soysal<sup>2</sup>, Şule Camcıoğlu<sup>1</sup>, Bülent Akay<sup>1</sup>, Suna Ertunç<sup>1</sup>

Ankara University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Tandoğan, Ankara, 06100, Turkey

Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Etlik-Keçiören, Ankara, 06010, Turkey

### Highlights:

- Anaerobic biohydrogen production by dark fermentation
- Investigation of effects of operating conditions on hydrogen production
- Modelling of hydrogen production kinetics

### Keywords:

- Biohydrogen
- Anaerobic dark fermentation
- *Clostridium butyricum*
- Kinetic analysis

### Article Info:

Received: 28.03.2017

Accepted: 26.12.2017

### DOI:

10.17341/gazimmfd.416444

### Acknowledgement:

This work was supported by Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit under the project number 12A4343003.

### Correspondence:

Author: Zeynep Yılmaz Hitit  
e-mail: zyilmazer@ankara.edu.tr  
phone: +90 312 203 3433

### Graphical/Tabular Abstract

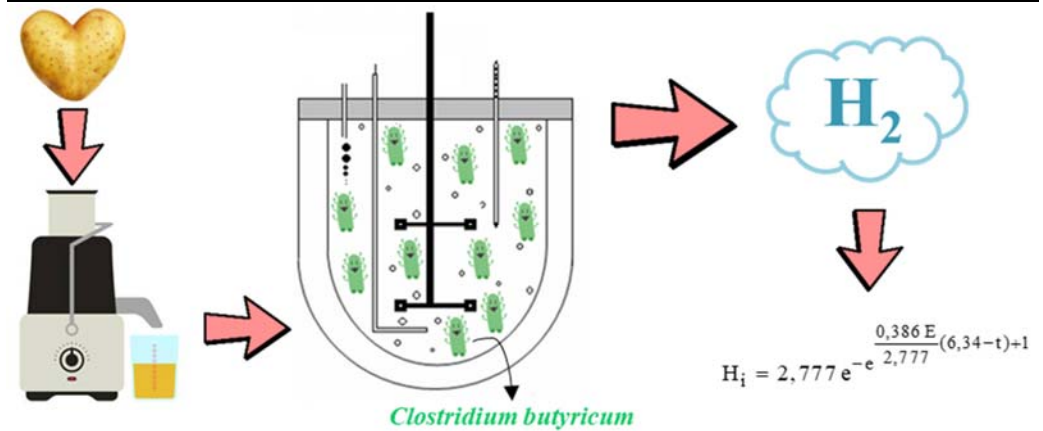


Figure A. Biohydrogen production from potato production medium by dark fermentation

**Purpose:** In this work, effects of agitation speed, inoculum ratio, initial substrate concentration and incubation temperature were investigated for anaerobic biohydrogen production using *Clostridium butyricum* microorganism in potato production medium were investigated. Using the data obtained, the relationship between substrate concentration and product production was evaluated by kinetic analysis.

**Theory and Methods:** Batch anaerobic biohydrogen production using *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 microorganism in potato production medium was investigated. The effect of inoculum ratio was examined at 1:10, 1:50, 1: 100 and 1: 200 (v / v) inoculum ratios. The effect of agitation speed on biohydrogen production was examined in a shaking incubator under 0 rpm / 100 rpm / 200 rpm conditions. In the studies which examined the effects of the substrate concentration and temperature, bioreactors containing production media of 10,8, 16,2, 21,6, 27 and 32,4 g COD / L concentrations were inoculated with a ratio of 1:10 (v / v). Fermentations were performed at 28° C and 37° C. The relationship between substrate concentration and product production was evaluated using elementary reaction rate model, Michaelis-Menten reaction rate model and modified Gompertz models.

**Results:** The most suitable parameters were determined as agitation speed 200 rpm, microorganism inoculum ratio 1:10 v/v, initial substrate concentration 32.4 g COD/L and temperature 37°C. Under these conditions, 1257 mL H<sub>2</sub> production, 17.06 mL H<sub>2</sub>/g COD yield and 6.441 mL H<sub>2</sub>/L maximum H<sub>2</sub> production rate was reached. For first order elementary reaction rate model, reaction rate constant was calculated as 7.92x10<sup>-5</sup> min<sup>-1</sup>. Arrhenius constant and activation energy were calculated as 9.74x10<sup>34</sup> min<sup>-1</sup> and 229.20 kJ/mol respectively. For Michaelis-Menten model, maximum H<sub>2</sub> production rate, Michaelis constant and R<sup>2</sup> value were calculated as, 74.66 mL H<sub>2</sub>/L.min, 447.7 g COD/L and 0.9505. Using modified Gompertz model, all R<sup>2</sup> values were obtained greater than 0.99, maximum H<sub>2</sub> production potential was found as 2.777 L H<sub>2</sub>/L. Maximum H<sub>2</sub> production rate was reached as 15.250 mL H<sub>2</sub>/L.min under 27 g COD/L initial substrate concentration condition.

**Conclusion:** The results showed that high H<sub>2</sub> production potential, highest H<sub>2</sub> production rate and low lag phase values were observed in comparison to the previously reported results in literature.



## Karanlık fermentasyon ile patates besi ortamından biyohidrojen üretimi için uygun işletim koşullarının belirlenmesi ve kinetik analizi

Baran Özyurt<sup>1</sup>, Zeynep Yılmazzer Hitit<sup>1\*</sup>, Furkan Soysal<sup>2</sup>, Şule Camcıoğlu<sup>1</sup>, Bülent Akay<sup>1</sup>, Suna Ertunç<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Tandoğan, Ankara, 06100, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Etlik-Keçiören, 06010, Türkiye

### Ö N E Ç İ K A N L A R

- Anaerobik karanlık fermentasyon ile hidrojen üretimi
- Hidrojen üretiminde işletme koşullarının etkisinin incelenmesi
- Hidrojen üretim kinetiğinin modellenmesi

#### Makale Bilgileri

Geliş: 28.03.2017

Kabul: 26.12.2017

#### DOI:

10.17341/gazimmfd.416444

#### Anahtar Kelimeler:

Biyohidrojen,  
anaerobik karanlık  
fermentasyon,  
Clostridium butyricum,  
kinetik analiz

#### ÖZET

Bu çalışmada çalkalama hızı, mikroorganizma aşısı oranı, başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığının karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. En uygun parametreler, çalkalama hızı 200 devir/min, mikroorganizma aşısı oranı 1:10 v/v, başlangıç substrat derişimi 32,4 g KOİ/L ve sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 1257 mL H<sub>2</sub> üretimi, 17,06 mL H<sub>2</sub>/g KOİ verimi ve 6,441 mL H<sub>2</sub>/L.min maksimum H<sub>2</sub> üretim hızı bulgularına ulaşılmıştır. Elemanter tepkime hız modeli için mertebeye 1, hız sabitleri ise 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla 6,5x10<sup>-5</sup> min<sup>-1</sup> ve 7,92x10<sup>-5</sup> min<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Arrhenius sabiti 9,74x10<sup>34</sup> min<sup>-1</sup> ve aktivasyon enerjisi 229,20 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Michaelis-Menten modeli ile maksimum H<sub>2</sub> üretim hızları 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla 11,47 mL H<sub>2</sub>/L.min ve 74,66 mL H<sub>2</sub>/L.min, bu sıcaklıklar için Michaelis sabitleri sırasıyla 181,9 g KOİ/L ve 447,7 g KOİ/L, R<sup>2</sup> değerleri ise 0,9458 ve 0,9505 olarak hesaplanmıştır. Modifiye Gompertz modeli ile R<sup>2</sup> değerleri tüm çalışmalar için 0,99'dan büyük olarak elde edilmiş, en yüksek H<sub>2</sub> üretimi potansiyelleri, 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde, 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla 2,126 L H<sub>2</sub>/L ve 2,777 L H<sub>2</sub>/L olarak bulunmuş, en yüksek H<sub>2</sub> üretim hızına 15,250 mL H<sub>2</sub>/L.min olarak 37°C sıcaklık ve 27 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde ulaşılmıştır.

## Determination of suitable operating conditions for biohydrogen production from potato production medium by dark fermentation and kinetic analysis

### H I G H L I G H T S

- Anaerobic biohydrogen production by dark fermentation
- Investigation of effects of operating conditions on hydrogen production
- Modelling of hydrogen production kinetics

#### Article Info

Received: 28.03.2017

Accepted: 26.12.2017

#### DOI:

10.17341/gazimmfd.416444

#### Keywords:

Biohydrogen,  
anaerobic dark fermentation,  
Clostridium butyricum,  
kinetic analysis

#### ABSTRACT

In this work, effects of agitation speed, inoculum ratio, initial substrate concentration and incubation temperature were investigated for anaerobic biohydrogen production. The most suitable parameters were determined as agitation speed 200 rpm, microorganism inoculum ratio 1:10 v/v, initial substrate concentration 32.4 g COD/L and temperature 37°C. Under these conditions, 1257 mL H<sub>2</sub> production, 17.06 mL H<sub>2</sub>/g COD yield and 6.441 mL H<sub>2</sub>/L.min maximum H<sub>2</sub> production rate was reached. For first order elementary reaction rate model, reaction rate constants were calculated as 6.5x10<sup>-5</sup> min<sup>-1</sup> and 7.92x10<sup>-5</sup> min<sup>-1</sup> for temperatures of 28°C and 37°C, respectively. Arrhenius constant and activation energy were calculated as 9.74x10<sup>34</sup> min<sup>-1</sup> and 229.20 kJ/mol respectively. For Michaelis-Menten model, maximum H<sub>2</sub> production rates, Michaelis constants and R<sup>2</sup> values were calculated as 11.47 mL H<sub>2</sub>/L.min, 74.66 mL H<sub>2</sub>/L.min, 181.9 g COD/L, 447.7 g COD/L and 0.9458, 0.9505 for 28°C and 37°C temperatures, respectively. Using modified Gompertz model, all R<sup>2</sup> values were obtained greater than 0.99, maximum H<sub>2</sub> production potentials were found as 2.126 L H<sub>2</sub>/L, 2.777 L H<sub>2</sub>/L at 28°C and 37°C with 32.4 g COD/L, respectively. Maximum H<sub>2</sub> production rate was reached as 15.250 mL H<sub>2</sub>/L.min at 37°C and 27 g COD/L initial substrate concentration.

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: zyilmazer@ankara.edu.tr / Tel: +90 312 203 3433

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Dünyanın enerji gereksiniminin büyük bölümünü karşılayan fosil yakıt rezervlerinin her geçen gün azalması nedeniyle 1990'lardan beri yenilenebilir bir enerji kaynağı olan hidrojene ilgi giderek artmıştır [1-3]. Bunun yanı sıra fosil yakıtlar çevre kirliliği yaratmakta ve yanması sonucu oluşan CO<sub>2</sub> küresel ısınmaya sebep olduğu için temiz enerji olan hidrojenin kullanımı giderek önem kazanmaktadır [4-6]. Hidrojen ideal bir enerji taşıyıcısıdır. Bilinen yakıtlara göre en yüksek enerji değerine sahiptir. Bir kg hidrojenin içerdiği enerji yaklaşık olarak 2,7 kg doğal gaz ve 3 kg benzine eşittir [7]. Ayrıca hidrojen temiz bir enerji kaynağıdır ve yandığında sadece H<sub>2</sub>O oluşur. Yakıldığında CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> ve SO<sub>x</sub> gibi atmosferi kirlletici yan ürünler oluşturmaz [8]. Elde edilen enerji hidrokarbon yakıtlarından elde edilen enerjiden yaklaşık 2,75 kat daha fazladır (122 kJ/mol) [1]. Dünyada CO<sub>2</sub> emisyonundaki artış, sera etkisi ve iklim değişiklikleri sonucu ulaşılmış son durum ve tahminler sonunda, geleceğin en önemli yakıtı olarak hidrojen, geleceğin yakıt teknolojisi olarak da yakıt pilleri görülmektedir. Hidrojen alışılagelmiş birincil yakıtların tümüne alternatif olarak doğrudan yakılarak veya yakıt pilleri ile elektrige dönüştürülerek kullanılabilir [3].

Hidrojenin en ekonomik üretimi fosil kaynakların kullanıldığı prosesler ile gerçekleştirilir. Doğalgazın buhar reformasyonu ve kömürün gazlaştırılması en çok kullanılan yöntemler arasındadır. Şu anda hidrojen üretiminin yaklaşık %80-85'i doğalgazın buhar reformasyonu ile gerçekleştirilmektedir [9]. En pahalı hidrojen üretimi ise suyun elektrolizi yöntemidir [7]. Elektrokimyasal ve termokimyasal hidrojen üretim proseslerinde gerekli enerji yüksektir ve çevreye zararlı etkileri mevcuttur [10]. Ancak biyolojik hidrojen üretimi proseslerinde, ılımlı sıcaklık ve basınçlarda çalışıldığı için enerji ihtiyacı düşüktür. Bu biyolojik üretim prosesleri sadece çevreye dost olmasıyla değil ayrıca yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımını sağlamasıyla da avantajlıdır. Biyolojik metot ile hidrojen üretimi fotosentetik ve fermentatif olmak üzere iki farklı yöntem ile yapılmaktadır [7]. Birçok araştırmacı fotosentetik prosesler üzerinde yoğunlaşmış olmalarına rağmen, bu prosesin ışık dönüşüm etkisi ve üretim hızı düşüktür [11]. Diğer taraftan fermentatif proseslerinin üretim hızlarının yüksek olması, ışığa ihtiyaç duymamaları ve reaktör tasarımlarının basit olması bu yöntemle olan ilgiyi arttırmıştır [1]. Fermentatif bir proses olan karanlık fermentasyon ile H<sub>2</sub> oluşum hızı yüksek olmasına rağmen, hidrojen verimi (mol H<sub>2</sub>/mol substrat) diğer yöntemlere göre daha düşüktür [10]. Ancak geliştirilen yeni teknolojiler ve atık maddelerin kullanılmasıyla fermentasyon sistemleri daha cazip hale gelmektedir [12]. Biyohidrojen üretim proseslerinde yüksek verimde ürün elde edebilmek için diğer tüm fermentasyon proseslerinde olduğu gibi pH, sıcaklık, substrat derişimi gibi parametrelerin en uygun değerlerinde işletilmesi gerekmektedir [13]. *Clostridium butyricum* karanlık fermentasyon ile hidrojen üreten bir bakteridir. Bu bakteri fermentasyon süresince yan ürün olarak asetik asit, bütirik

asit, propiyonik asit gibi organik asitler de üretir ve bunun sonucu olarak da pH değerinde düşme gözlenir [10]. Sert pH düşüşünün gerçekleşmesi durumunda hidrojen üretimi hidrojenaz enzimi aktivitesine bağlı olarak engellediğinden dolayı pH'ın en uygun değerinde çalışılması büyük önem taşımaktadır [14]. Patates besi ortamı kullanılarak biyohidrojen üretiminde en uygun pH değeri 6 olarak belirlenmiştir [10]. İnkübasyon sıcaklığı, tepkime hızını arttırdığından dolayı hidrojen üreten mikroorganizmanın aktivitesini artırır. Ancak çalışılan sıcaklığın mikroorganizmanın çoğalabileceği değeri aşmaması gerekmektedir [15]. Mikroorganizma aşı oranı gecikme fazı açısından önemlidir [16, 17]. Diğer taraftan biyohidrojen üretim prosesinde olduğu gibi uzun fermentasyon süreçleri için gecikme fazının kısa olması üretim prosesinin ekonomisi açısından da avantaj sağlayacaktır. Sıvı fazdaki çözülmüş hidrojen derişimi, biyohidrojen üretimine etki eden en önemli faktörlerden biridir [1]. Clostridia, piruvatı asetil CoA'ya dönüştürür, CO<sub>2</sub> ve indirgenmiş ferredoksin üretir. İndirgenmiş ferredoksin, elektron aktarımıyla hidrojen oluşumunu yönlendirerek tüketilen mol glikoz başına 2 mol hidrojen üretilmesini sağlar [14]. Ferredoksinin indirgenmesi ile NADH'nin reoksidasyonundan glikoz başına fazladan 2 mol hidrojen daha üretmek mümkündür [18]. Bu reaksiyonlar sıvı fazdaki hidrojen derişiminin artışından olumsuz etkilenirler. Sıvı faz hidrojen derişimi arttığı zaman metabolik yol izi ile laktat, etanol, aseton, bütanol veya alanin gibi substratlar üretilmektedir [18, 19]. Bu substratlar üretilen hidrojen miktarının azalmasına neden olurlar [20-22]. Bu nedenle fermentasyon süresince karıştırma yapılmalıdır [23]. Ancak karıştırma hızının düşük değerleri sıvı fazdaki hidrojenin gaz faza geçmesinde yetersiz kalmakta, yüksek değerlerinde ise mikroorganizmanın hücre duvarı yıkılarak biyohidrojen üretimini olumsuz etkileyecektir [24]. Bunun yanı sıra patates besi ortamında biyohidrojen üretimi katı-sıvı-gaz heterojen tepkime sisteminde gerçekleşmektedir [25]. Elde edilebilecek en yüksek tepkime hızı ile çalışabilmek için tepkime ortamındaki kütle aktarım direncinin azaltılması gerekmektedir. Çalkalama hızının artırılması kütle aktarım direncini azaltacaktır [26]. Şeker, nişasta ve selülozdan fermentatif hidrojen üretimi üzerine çok sayıda araştırmalar yapılmıştır [15, 19]. Substrat derişiminin artışı ile organik asit ve hidrojen üretim hızı ve miktarı belirli bir değere kadar artış göstermekle birlikte, birim substrat başına hidrojen üretim veriminin ve pH düşüşüne bağlı olarak çok yüksek substrat derişimlerinde hidrojen üretim hızı ve miktarının da düşüş gösterdiği bildirilmiştir [2, 27].

Literatürde yer alan mevcut çalışmaların büyük bir kısmı glikoz, nişasta ya da selüloz gibi saf substratların kullanımına odaklanmıştır. Ayrıca uygun bir biyohidrojen üretim teknolojisi için fazla bir ön işleme gerek olmaksızın steril olmayan fermente edilebilir organik hammaddeler kullanan sürekli proseslerin gerekliliği bildirilmiştir [28]. Patatesin başta nişasta olmak üzere karbohidratlar, proteinler, mikro ve makro elementler ve vitaminleri içeren kompleks bir ürün olmasından dolayı besi ortamına katkı

maddesi ilave edilmeden fermente edilmesi mümkündür [29]. Patates besi ortamınının, başta patates atıkları olmak üzere, gıda endüstrisi tarafından ortaya çıkartılan diğer besin atıklarının da biyohidrojen üretiminde değerlendirilmesi açısından uygun bir benzetim ortamı oluşturduğu bildirilmiştir [30]. Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2014 yılı verilerine göre ülkemizde 4,1 milyon ton patates üretiminden 2,1 milyon ton atık açığa çıkmış olup, bu atıklar gübre olarak kullanılmakta ya da yakılarak bertaraf edilmektedir [31]. Üretilen patatesin %50'sinin atık olması göz önünde bulundurulduğunda, patates atıklarının H<sub>2</sub> üretiminde değerlendirilmesi ile hem atık giderimi, hem de enerji üretimi sağlayacağı düşünülmektedir [31]. Clostridium türlerinin basit şekerlerin dışında çözünmemiş nişastayı da herhangi bir ön işleme gerek olmaksızın indirgeyebilmeleri bu türleri biyohidrojen üretimi açısından cazip kılmaktadır [32]. Bu çalışmada oksijensiz koşullarda patates besi ortamında *Clostridium butyricum* mikroorganizması kullanılarak biyohidrojen üretilen kesikli biyoreaktörlerde çalkalama hızı, mikroorganizma aşısı oranı, başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığı işletme parametrelerinin biyohidrojen üretimine etkisi incelenmiş, elde edilen veriler kullanılarak, substrat derişimi ile ürün üretimi arasındaki ilişki elemanter tepkime hız modeli, Michaelis-Menten tepkime hız modeli ve modifiye Gompertz modelleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Fermente edilebilen organik hammaddeler arasında, katkı maddesi ilave edilmesine ihtiyaç duyulmayan patatesin, besi ortamı olarak kullanılması, çalışmanın özgün yönlerinden biridir. Bu bağlamda, çalışmada kullanılan patates besi ortamı, gıda endüstrisi tarafından ortaya çıkartılan diğer besin atıklarının biyohidrojen üretiminde değerlendirilmesi açısından uygun bir benzetim sağlayacaktır. Ayrıca, mikroorganizma olarak basit şekerlerin dışında çözünmemiş nişastayı da herhangi bir ön işleme gerek olmaksızın indirgeyebilen *Clostridium butyricum*'un biyohidrojen üretiminde kullanılması ve üretim kinetiğine ilişkin modellerin elde edilmesi de çalışmanın diğer bir özgün yönüdür [33]. Bu kinetik modeller, endüstriyel biyohidrojen üretim reaktörü tasarımı amacıyla kullanılabilirler.

## 2. DENEYSEL METOT (EXPERIMENTAL METHOD)

### 2.1 Bakteri ve Besi Ortamı (Bacteria and Culture Media)

Yapılan çalışmada besi ortamında nişastaca zengin bir besin olan patates kullanılmış, *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 mikroorganizması ile hidrojen üretimi incelenmiştir. Mikroorganizma, hazırlanmış basamakları aşağıda verilen besi ortamında çoğaltılarak, hidrojen üretimi çalışmalarının gerçekleştirildiği biyoreaktörlere aktarılmıştır.

Besi ortamını hazırlamak için patatesler soyulmuş, katı meyve sıkacağı yardımı ile elde edilen katı parçacıklar da içeren patates suyu, çalışılacak substrat derişimine bağlı olarak hacimce %20, %30, %40, %50, %60 olacak şekilde bidistile su ile seyreltilmiştir. Nişastanın basit şekerlere hidrolizi amacıyla, hazırlanan bu besi ortamları manyetik karıştırıcıda 30 min süresince kaynatılmıştır. Kaynatılmış

besi ortamları, vidalı kapağının ortası kestirilmiş, tıpalı, otoklavlanabilir borosilikat cam biyoreaktörlere alınmış, köpük oluşumunu ve dolayısıyla besi ortamı kaybını engellemek amacıyla 1 damla köpük kırıcı eklenip, 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0,1 M NaOH kullanılarak pH'ı 6'ya ayarlanmıştır. Anaerobik ortamın sağlanması amacıyla biyoreaktör içerisine daldırılan çözünmüş oksijen probu (Hanna Instruments, HI9829) yardımıyla gösterge değeri sıfır olana kadar yaklaşık 10 min süresince besi ortamından azot gazı geçirilmiştir. Tıpası ve kapağı kapatılan biyoreaktörler, besi ortamında kontaminasyonu önlemek amacıyla 121°C sıcaklık ve 1,2 atm basınçta 20 min süresince otoklavlanmıştır (ALP, CL40). Hazırlanan besi ortamlarının kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ölçümleri SM 5220 D standart yöntemine göre gerçekleştirilmiştir [34].

### 2.2. Aşılama ve Biyohidrojen Üretimi (Inoculation and Biohydrogen Production)

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen deney setlerinin mikroorganizma kaynağını oluşturmak amacıyla ilk basamak olarak, 100 mL hacimce %20 besi ortamı içeren borosilikat cam biyoreaktörlere steril enjektör ile Class II laminer akışlı biyogüvenlik kabininde (Nuair, NU-427-600) 35 g/L derişiminde liver infüzyon (Difco™, Liver infüzyon broth) ortamında 4°C'de saklanan mikroorganizma kaynağından 30 mL aktarım yapılmış ve mikroorganizma çoğaltma işlemi 28°C sıcaklıkta 24 h süreyle hava çalkalamalı inkübatörde (Shellab, SSI5) gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma aşısı oranı etkisinin incelendiği çalışmalarda 500 mL'lik hacimce %20 besi ortamı içeren borosilikat cam biyoreaktörlere 130 mL'lik inkübe edilmiş kaynaktan 1:10, 1:50, 1:100 ve 1:200 (v/v) mikroorganizma aşısı oranları için nihai çalışma hacimleri 550, 510, 505, 502,5 mL olacak şekilde sırasıyla 50, 10, 5, 2,5 mL aşılama gerçekleştirilmiştir. Çalkalama hızının biyohidrojen üretimine etkisini incelemek için hazırlanan 130 mL kaynaktan 1:10 (v/v) mikroorganizma aşısı oranı ile 500 mL çalışma hacimli, hacimce %20'lik besi ortamı (10,8 g KOİ/L) içeren borosilikat cam biyoreaktörlere aktarımlar yapılmış ve hava çalkalamalı inkübatörde çalkalamasız, 100 devir/min, 200 devir/min çalkalama hızlarında 28°C'de fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Substrat derişimi ve sıcaklığın etkilerinin incelendiği çalışmalarda hazırlanan 130 mL kaynaktan, 200 mL çalışma hacimli ve 10,8, 16,2, 21,6, 27 ve 32,4 g KOİ/L derişiminde substrat içeren (sırasıyla hacimce %20, %30, %40, %50, %60 besi ortamı) borosilikat cam biyoreaktörlere 1:10 (v/v) mikroorganizma aşısı oranı ile aktarım yapılmış, 200 devir/min çalkalama hızında, 28°C ve 37°C sıcaklıklarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

### 2.3. Gaz Toplama ve Analizi (Gas Collection and Analyses)

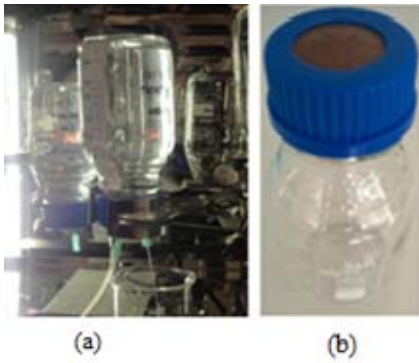
Mikroorganizmanın fermentasyonu süresince oluşan gaz karışımını toplamak amacıyla 500 mL'lik su ile dolu, vidalı kapağının ortası kestirilmiş, tıpalı borosilikat cam şişeler ters çevrilmiştir. Silikon hortum ile birbirine bağlanan iki steril enjektör iğnesi, biyoreaktörlerin tıplarına ve ters çevrilmiş

şişelerin tıplarına batırılmış ve çıkan gaz ile birlikte şişenin içindeki suyun boşalması için su dolu şişenin tıpasına ikinci bir iğne batırılmıştır. Boşalan su hacmi mezürde ölçülerek oluşan gaz hacmi hesaplanmıştır. *C. butyricum* mikroorganizması ile patates besi ortamından biyohidrojen üretimi süresince gaz karışımındaki H<sub>2</sub> içeriğinin fermentasyonun 10'uncu saatinden itibaren zamanla değişmediği bildirilmiştir [10]. Ölçülen H<sub>2</sub> yüzdesi üzerine etki etmesi olası tüm parametreler, Özyurt vd. [10] ile karşılaştırılarak, H<sub>2</sub> yüzdesinin zamanla değişmediği varsayımı yapılmıştır. Kümülatif H<sub>2</sub> hacmi ve H<sub>2</sub> üretim verimi hesapları sırasıyla Eş. 1 ve Eş. 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$H \text{ (mL)} = \text{GHI}(\%) \times \text{KGH} \text{ (mL)} \quad (1)$$

$$Y \text{ (mL H}_2 \text{ / g KOİ)} = H \text{ (mL)} / C_s \text{ (g KOİ / L)} \quad (2)$$

Gaz toplama sistemi ve fermentasyon gerçekleştirilen borosilikat cam biyoreaktör Şekil 1'de gösterilmektedir.



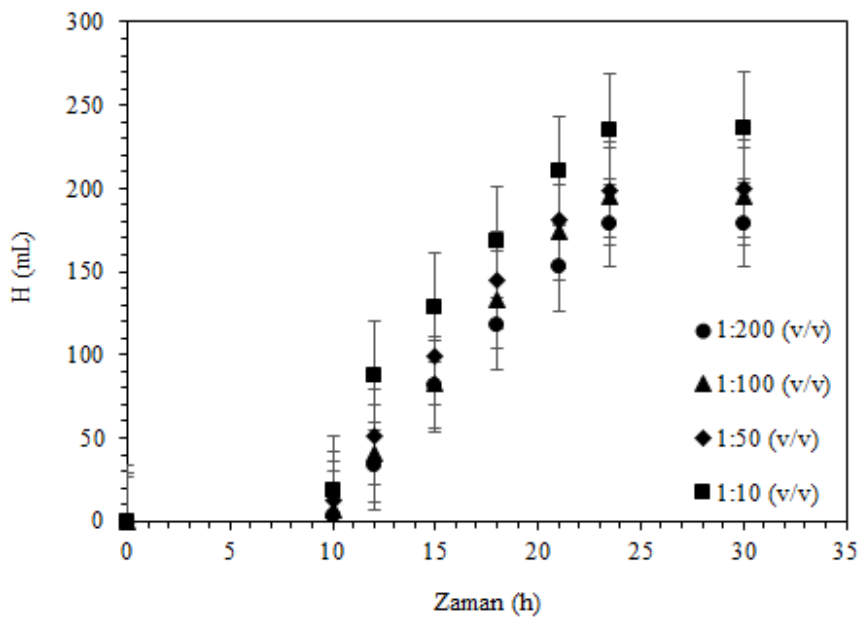
Şekil 1. a) Gaz toplama sistemi b) Borosilikat cam biyoreaktör (a) Gas collection system (b) pyrex bioreactor

Toplanan gaz karışımının bileşimi gaz kromatografi cihazı (Shimadzu, GC-2014) ile ısı iletkenlik dedektörü (TCD) kullanılarak belirlenmiştir. Taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmış, akış hızı 20 mL/min'e ayarlanmıştır. Örnekler sabit akış hızında 50 saniye boyunca cihaza gönderilmiştir. Moleküler elek kolon (Porapak-Q 80/100, 3,2 mm x 2,1 mm x 1 m) ve TCD1 dedektörü ile CO<sub>2</sub> ve CH<sub>4</sub> analizleri, diğer bir moleküler elek kolon (5A 80/100, 3,2 mm x 2,1 mm x 2 m) ve TCD2 dedektörü ile H<sub>2</sub> analizleri gerçekleştirilmiştir. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları 50°C'dir.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

#### 3.1. Mikroorganizma Aşısı Oranının Biyohidrojen Üretimine Etkisi (Effect of Inoculum Ratio on Biohydrogen Production)

Mikroorganizma aşısı oranını canlı mikroorganizma derişimini ve substrat/aşısı oranını etkilediği için biyoproseslerde üretim verimini doğrudan etkileyen bir parametredir [35]. Bu nedenle hem yüksek üretim verimi elde edebilmek hem de proses ekonomisi açısından gecikme fazının kısa olması için uygun bir mikroorganizma aşısı oranının belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu amaçla, yapılan çalışmada mikroorganizma aşısı oranının etkisini belirlemek için 130 mL kaynak hazırlanarak 500 mL çalışma hacimli, hacimce %20'lik besi ortamı (10,8 g KOİ/L) içeren borosilikat cam biyoreaktörlere 1:10, 1:50, 1:100 ve 1:200 (v/v) mikroorganizma aşısı oranlarında aktarımlar yapılmış ve 2 gün süre ile 28°C'de çalkalama yapılmaksızın inkübasyon gerçekleştirilmiştir. En yüksek ve en düşük aşısı hacimleriyle yapılan aktarımların biyoreaktörlerdeki besin derişimini %5'ten daha az değiştirdiği KOİ ölçümlerine dayalı olarak yapılan hesaplamayla bulunmuştur. Toplanan gazdaki kümülatif H<sub>2</sub> hacminin zamanla değişimi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Farklı mikroorganizma aşısı oranlarında H<sub>2</sub> üretiminin zamanla değişimi (H<sub>2</sub> production by time for various inoculum ratios)



Mikroorganizma aşısı oranının biyohidrojen üretimine etkisinin incelendiği deneyde en yüksek kümülatif H<sub>2</sub> hacmine 236,6 mL ile 1:10 (v/v) mikroorganizma aşısı oranında erişilmiştir. 1:10 (v/v) mikroorganizma aşısı oranı hariç diğer aşısı oranları için gecikme fazının 10 h olarak gözlemlendiği deneyde mikroorganizma aşısı oranının azalması ile (örn. 1:10'dan 1:200'e) kümülatif gaz hacminde de artış görülmüştür. Gaz karışımlarının gaz kromatografi analiziyle ölçülen hidrojen içerikleri ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Mikroorganizma aşısı oranının gaz karışımındaki H<sub>2</sub> derişimi ve miktarına etkisi (Effect of inoculation ratio on H<sub>2</sub> concentration and amount in gas mixture)

Mikroorganizma aşısı oranı (v/v)	GHI (%)	H (mL)
1:10	57,7	236,6
1:50	53,4	199,7
1:100	54,6	194,9
1:200	54,3	179,2

Gaz karışımının analizi sonucu H<sub>2</sub> içeriklerinin Tablo 1'de birbirine yakın bulunduğu görülmekle birlikte, 1:10 (v/v) mikroorganizma aşısı oranında en yüksek H<sub>2</sub> yüzdesine ulaşılmıştır (%57,7). Mikroorganizma aşısı oranının düşük değerlerinde (örn. 1:200 v/v), dolayısıyla substrat/mikroorganizma oranının yüksek değerlerinde, kümülatif H<sub>2</sub> hacminde düşüş gözlenmiştir. Bu durum, yüksek substrat/mikroorganizma oranında gerçekleştirilen fermentasyon sürecinde, başta hidroliz olmak üzere hız kısıtlayıcı basamaklar nedeniyle mikroorganizma tarafından substratın sadece çözünebilen kısmının hidrojene dönüştürülebilmesiyle açıklanabilmektedir [28]. Mikroorganizma aşısı oranının 1:10 (v/v) değerinde kümülatif H<sub>2</sub> hacminin de diğer aşısı oranlarında elde edilen değerlerden daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Böylece mikroorganizma aşısı oranının 1:200'den 1:10'a (v/v) artırılması ile 500 mL besi ortamında kümülatif

biyohidrojen hacminin 179,2 mL'den 236,6 mL'ye arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre mikroorganizma aşısı oranının, çalışma hacminin %10'undan daha yüksek bir değer olarak seçilmemesi gerektiği göz önünde bulundurularak [36] 1:10 mikroorganizma aşısı oranının toplanan gazda hem yüksek H<sub>2</sub> içeriği, hem de yüksek kümülatif H<sub>2</sub> hacmi elde edilmesi için uygun bir değer olduğu sonucuna varılmıştır.

### 3.2. Çalkalama Hızının Biyohidrojen Üretimine Etkisi (Effect of Agitating Speed on Biohydrogen Production)

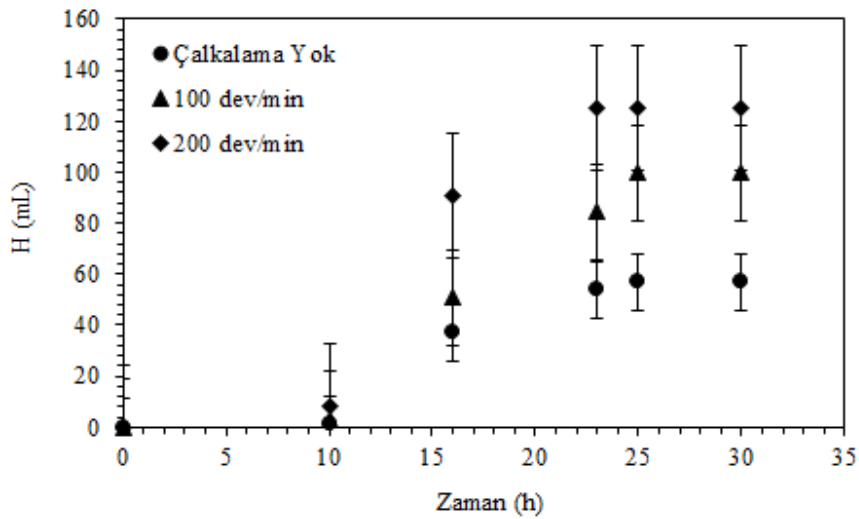
Çalkalama hızının biyohidrojen üretimine etkisi üç farklı çalkalama hızında incelenmiş olup, farklı çalkalama hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucu gaz toplama sisteminde ölçülen verilerden Eş. 1 kullanılarak hesaplanan kümülatif H<sub>2</sub> hacimlerinin fermentasyon boyunca değişimi Şekil 3'te verilmiştir.

Çalkalama hızı etkisinin incelendiği bu deneyde en yüksek H<sub>2</sub> gaz hacmine 125,4 mL ile 200 devir/min çalkalama hızında ulaşılmışken karıştırmanın yapılmadığı durumda 57,1 mL H<sub>2</sub> hacmi elde edilebilmiştir. Farklı çalkalama hızlarında elde edilen gaz karışımlarının analizi sonucunda bulunan H<sub>2</sub> içerikleri ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Çalkalama hızının gaz karışımındaki H<sub>2</sub> derişimi ve miktarına etkisi (Effect of agitation speed on H<sub>2</sub> concentration and amount in gas mixture)

Karıştırma Hızı (devir/min)	GHI (%)	H (mL)
0	55,4	57,1
100	54,2	99,7
200	55,5	125,4

Gaz karışımlarının analizi sonucu farklı çalkalama hızlarındaki deneylerde elde edilen H<sub>2</sub> içerikleri çok yakın

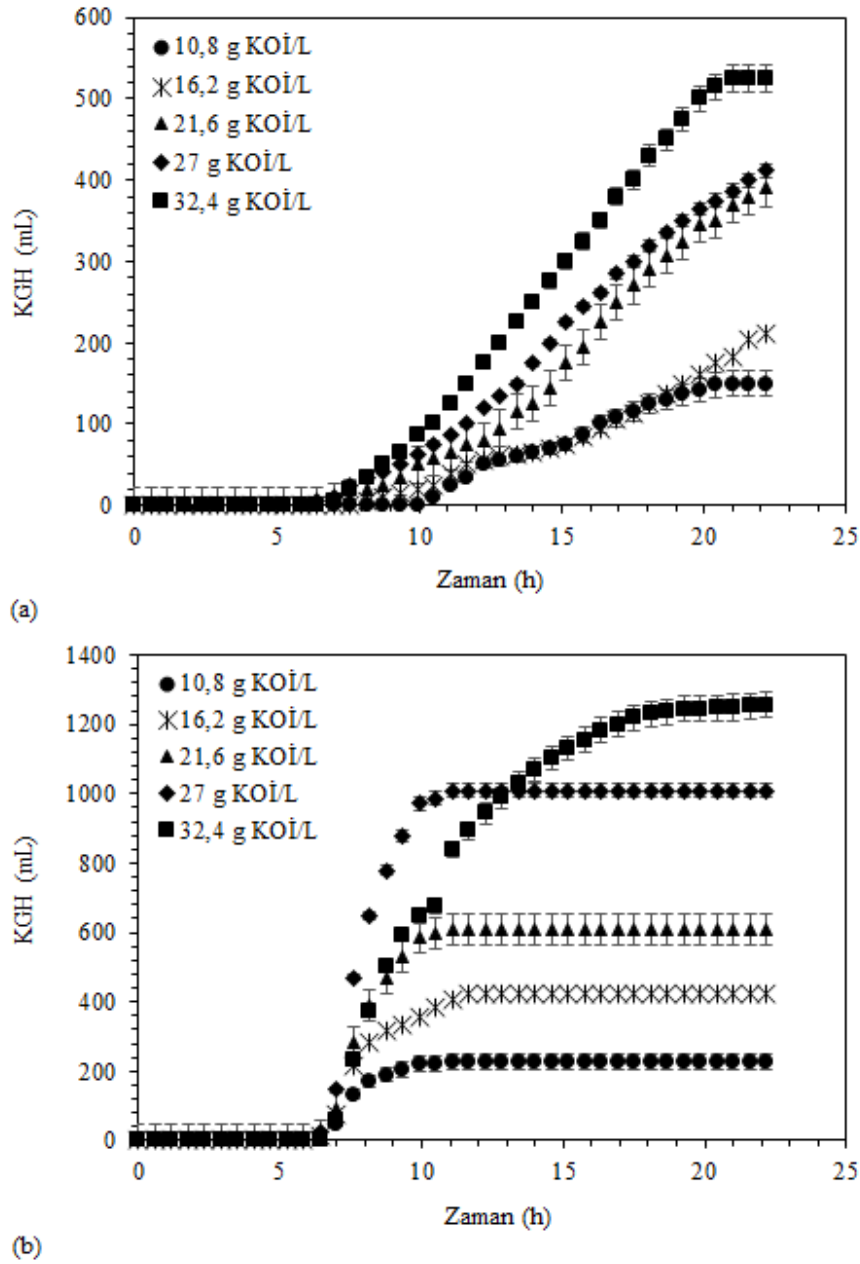


**Şekil 3.** Farklı çalkalama hızlarında H<sub>2</sub> üretiminin zamanla değişimi (H<sub>2</sub> production by time for various agitation speeds)

bulunmasına rağmen kümülatif gaz hacmi daha fazla olduğundan, 200 devir/min çalkama hızında en yüksek H<sub>2</sub> üretimi 125,4 mL olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak çalkalamanın sıvı fazdaki H<sub>2</sub> derişimini azaltıp biyotepkimenin devamını sağladığı, katı-sıvı-gaz heterojen tepkime sisteminde kütle aktarım direncini azalttığı ve verimi arttırdığı görülmüştür. Çalkamasız çalışma ile kıyaslandığında, 100 devir/min çalkalama hızındaki çalışma ile 200 devir/min çalkalama hızındaki çalışma arasındaki toplam üretilen H<sub>2</sub> miktarları arasındaki farkın daha az olduğu görülmüş, 200 devir/min çalkalama hızından daha yüksek hızlarda çalışmanın biyohidrojen üretim verimine anlamlı bir katkı yapmayacağı sonucuna varılmıştır.

### 3.3. Başlangıç Substrat Derişimi ve İnkübasyon Sıcaklığının Biyohidrojen Üretimine Etkisi (Effect of Initial Substrate Concentration and Incubation Temperature on Biohydrogen Production)

*C. butyricum* mikroorganizmasının çoğalması ve biyohidrojen üretiminin en yüksek değerde gerçekleştirilebilmesi amacıyla en uygun başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla 2 farklı inkübasyon sıcaklığında (28 ve 37°C), 5 farklı başlangıç besi ortamı derişiminde (10,8, 16,2, 21,6, 27 ve 32,4 g KOİ/L) fermentasyon süresince kümülatif gaz hacmindeki değişim incelenerek sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir.

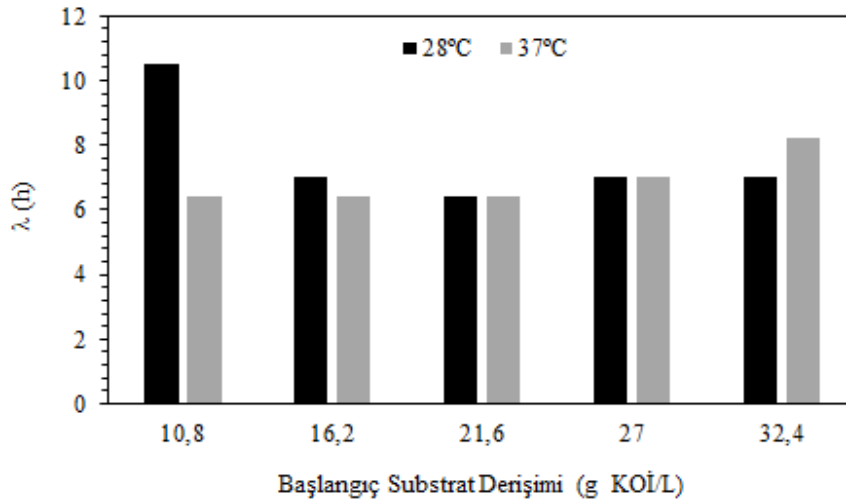


Şekil 4. Farklı başlangıç substrat derişimlerinde kümülatif gaz hacminin zamanla değişimi (a) 28°C (b) 37°C (Variation of cumulative gas production by the time for various initial substrate concentrations at (a) 28°C (b) 37°C)

Şekil 4'ten de görüleceği üzere başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığı arttıkça üretilen kümülatif gaz hacmi de artmıştır. 28°C'de 10,8 g KOİ/L ve 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde üretilen kümülatif gaz hacmi sırasıyla 150 mL ve 525 mL olarak elde edilmiştir. 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde inkübasyon sıcaklığının 28°C'den 37°C'ye değişimi, elde edilen kümülatif gaz hacminde 732 mL'lik artışa neden olmuştur. Bunun yanı sıra iki farklı inkübasyon sıcaklığı için prosesin gecikme fazının substrat derişimine de bağlı olarak 6-10 h arasında değiştii belirlenmiştir. Farklı başlangıç substrat derişimlerinde 28°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında gecikme fazı değerleri Şekil 5'te verilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 28°C olduğu durumda başlangıç substrat derişiminin 10,8 g KOİ/L'den daha yüksek olduğu çalışmalarda gözlenen gecikme fazı sürelerinin birbirine yakın ve daha kısa olduğu görülmüştür. İnkübasyon sıcaklığının 37°C olduğu durumda ise gecikme fazının başlangıç substrat derişiminden bağımsız olarak yaklaşık 6,5 h olduğu ve 28°C'deki inkübasyona göre 10,8 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde gözlenen gecikme fazının 4 h kısaldığı gözlenmiştir. 23 h'lik fermentasyon sonunda üretilen gaz karışımları gaz kromatografi cihazında analizlenerek H<sub>2</sub> içerikleri belirlenmiştir. Analiz sonuçları

Tablo 3'te verilmiştir. Başlangıç substrat derişiminin 10,8 g KOİ/L'den 32,4 g KOİ/L'ye arttırılmasıyla üretilen gaz karışımının H<sub>2</sub> içeriği 28°C'de %54,02'den %60,14'e, 37°C'de ise %37,12'den %44,16'ya artmış, bunun yanı sıra elde edilen gaz karışımının en yüksek H<sub>2</sub> içerikleri karşılaştırıldığında inkübasyon sıcaklığının 28°C'den 37°C'ye arttırılması ile gaz karışımının H<sub>2</sub> içeriğinde %15,98 düşüş gözlenmiştir.

Gaz karışımlarının analizi, 28°C'de ve 37°C'de ayrı ayrı değerlendirildiğinde her bir sıcaklık için H<sub>2</sub> içerikleri yakın bulunmasına rağmen 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişimi ve 37°C'de kümülatif gaz hacmi daha fazla olduğundan, 200 mL patates besi ortamında en çok H<sub>2</sub> üretimi 553 mL olarak elde edilmiştir. Bunun yanı sıra H<sub>2</sub> üretim verimi 37°C'de başlangıç substrat derişiminin 10,8 g KOİ/L'den 32,4 g KOİ/L'ye değişimiyle 2,17 kat, 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde inkübasyon sıcaklığının 28°C'den ve 37°C'ye değişimiyle 1,75 kat artmıştır. Bu durum, başlangıç substrat derişiminin artışı ile *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının besin değeri daha yüksek besi ortamlarında kümülatif hidrojen hacminin artışı sağlayarak daha yüksek hidrojen üretim veriminin elde edilmesini sağladığını, artan inkübasyon sıcaklığının ise



Şekil 5. 28°C'de farklı başlangıç substrat derişimlerinde gecikme fazı süreleri (Lag phase time for various initial substrate concentrations at 28°C)

Tablo 3. Farklı sıcaklıklarda başlangıç substrat derişiminin gaz karışımındaki H<sub>2</sub> derişimi, miktarı ve üretim verimine etkisi (Effect of initial substrate concentration on H<sub>2</sub> concentration, amount and production yield in gas mixture at various temperatures)

Başlangıç substrat derişimi (g KOİ/L)	T (°C)	GHI (%)	H (mL)	Y (mL H <sub>2</sub> /g KOİ)
10,8	28	54,02	81	7,50
	37	37,12	85	7,87
16,2	28	56,66	119	7,34
	37	39,19	164	10,12
21,6	28	57,04	222	10,27
	37	40,22	244	11,30
27	28	57,96	239	8,85
	37	41,28	414	15,33
32,4	28	60,14	316	9,75
	37	44,16	553	17,06



tepkime hızını ve dolaylı olarak üretim verimini arttırdığını göstermiştir. Tüm parametrelerin en uygun değerlerinde (mikroorganizma aşı oranı; 1:10 (v/v), çalkalama hızı; 200 devir/min, başlangıç substrat derişimi; 32,4 g KOİ/L ve inkübasyon sıcaklığı; 37°C) gerçekleştirilen çalışmanın sonunda besi ortamı KOİ değeri 30,8 g KOİ/L olarak gözlenmiş olup %5 KOİ giderimi elde edilmiştir.

### 3.4. Biyohidrojen Üretim Kinetiği Çalışmaları (Biohydrogen Production Kinetic Studies)

#### 3.4.1. Elemanter tepkime hız modeli (Elementary reaction rate model)

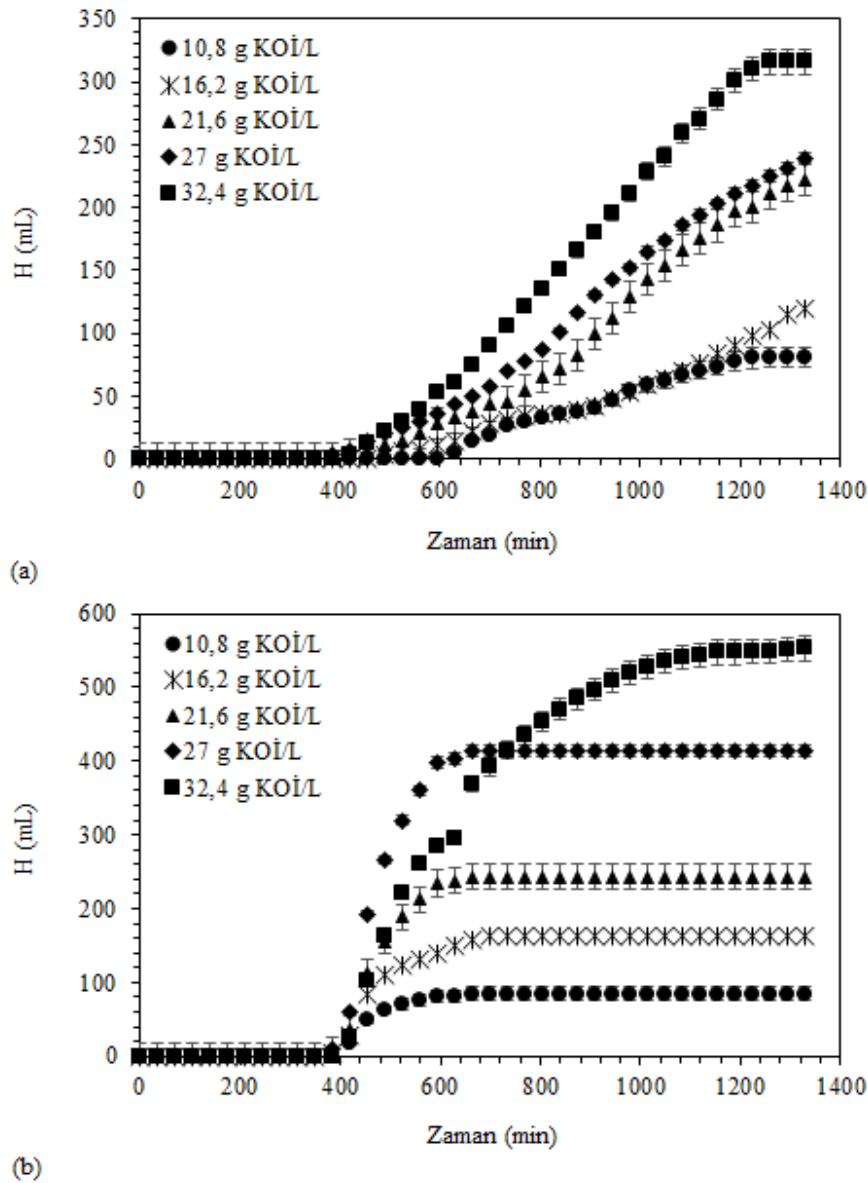
Biyohidrojen üretim hızının substrat derişimi ve sıcaklığa bağlılığını ifade edebilmek için elemanter tepkime hız

modeli yaklaşımı kullanılmıştır. 28°C’de ve 37°C’de farklı substrat derişimleri için zamana karşı elde edilen hidrojen hacmi değerleri Şekil 6’da verilmiştir.

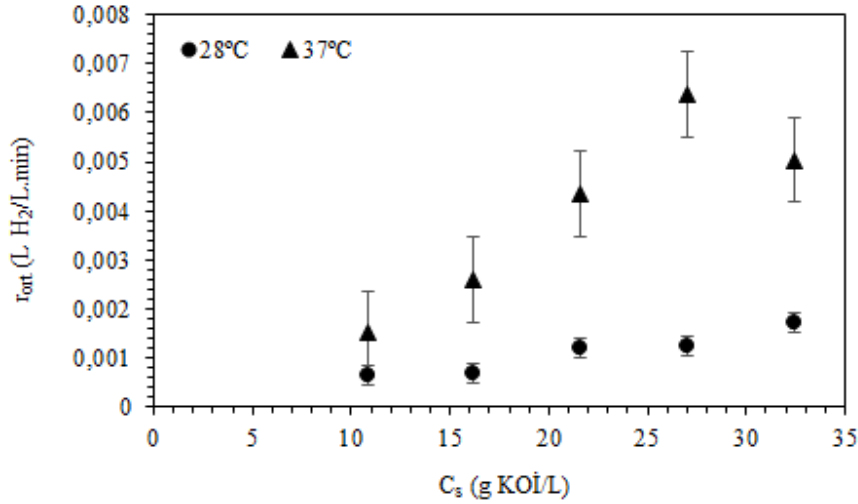
Üretilen H<sub>2</sub> hacminin zamanla değişimi verileri kullanılarak ortalama tepkime hızları Eş. 3 kullanılarak hesaplanmıştır [37].

$$r_{\text{ort}} = \frac{1}{V_r} \int_{t=0}^{t=1330} \frac{d(V_{H_2})}{dt} \quad (3)$$

Farklı başlangıç substrat derişimleri ve inkübasyon sıcaklıkları için hesaplanan ortalama hidrojen üretim hızları Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 6. Farklı başlangıç substrat derişimlerinde H<sub>2</sub> üretiminin zamanla değişimi (a) 28°C (b) 37°C  
(H<sub>2</sub> production for various initial substrate concentrations at (a) 28°C (b) 37°C)



**Şekil 7.** Farklı sıcaklıklarda başlangıç substrat derişiminin ortalama H<sub>2</sub> üretim hızına etkisi (Effect of initial substrate concentration on mean H<sub>2</sub> production rate at various temperatures)

Elde edilen sonuçlardan görüleceği üzere 28°C’de başlangıç substrat derişiminin 10,8 g KOİ/L’den 32,4 g KOİ/L’ye artırılmasıyla tepkime hızı 0,6 mL H<sub>2</sub>/L.min’den 1,7 mL H<sub>2</sub>/L.min’e, 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde ise inkübasyon sıcaklığının 28°C’den 37°C’ye artırılması ile 5 mL H<sub>2</sub>/L.min’e artmıştır.

28°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında farklı başlangıç substrat derişimlerinde ortalama H<sub>2</sub> üretim hızının zamanla değişimi Şekil 8’de gösterilmiştir. Sonuçlardan görüleceği üzere 37°C inkübasyon sıcaklığında çalışılan tüm başlangıç substrat derişimlerinde ortalama H<sub>2</sub> üretim hızları fermentasyonda 435 min sonunda pik değerini yapmış olup, en yüksek değer 27 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde 19 mL H<sub>2</sub>/L.min olarak elde edilmiştir. 28°C’de yapılan çalışmalarda pik değerinde elde edildiği süre yaklaşık 950 min olarak gözlenmiştir. 37°C inkübasyon sıcaklığında biyoteknikimin gecikme fazı dâhil toplam 750 min sonunda durduğu, 28°C’de ise tepkimenin gecikme fazı dâhil yaklaşık 1250 min süre ile devam ettiği gözlenmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığındaki artışın H<sub>2</sub> üretim tepkime hızını arttırdığı ve tepkime süresini kısalttığı sonucuna varılmıştır. Literatürde sıcaklığın hidrojen üretim hızı ve hidrojen üreten mikroorganizmaların çoğalma hızı üzerine etkileri Arrhenius modeli kullanılarak ele alınmış olup, substrat tüketim hızı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaların yapılması gerekmektedir [33]. Tek girdili bir tepkime için birinci mertebe tepkime kinetiği yaklaşımı radyoaktif bozunmadan, hücre çoğalmasına kadar pek çok uygulama alanında kullanılabilen basit bir analiz ve çözüm yöntemidir [38]. Literatürde sunulan kinetik model yaklaşımına uygun şekilde, hidrojen oluşumunun başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığına bağlı olduğu varsayımıyla elemanter bir tepkime hız modeli önerilmiştir. Önerilen model Eş. 4’de verilmiştir [39].

$$r_{ort} = k C_s^n \quad (4)$$

Eş. 4 doğrusallaştırılırsa Eş. 5 elde edilir.

$$\ln(r_{ort}) = \ln(k) + n \ln(C_s) \quad (5)$$

Eş. 5 kullanılarak düzenlenen verilerden tepkime hız ifadesi ve mertebesi hesaplanmış, elde edilen sonuçlar Şekil 9’da gösterilmiştir.

28°C ve 37°C inkübasyon sıcaklıklarında tepkime mertebeleri sırasıyla 0,92 ve 1,26 olarak bulunmuştur. Elemanter tepkimeler için sıcaklıkla mertebenin değişmediği bilinmektedir [37]. Elde edilen mertebe değerleri birbirine yakın olmakla beraber, ortalama tepkime mertebesinin 1 olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Tepkime hız sabitleri ise 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla  $6,5 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  ve  $7,92 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Sıcaklığın artışı ile tepkime hız sabitinin de üstel olarak artması beklendiğinden elde edilen bu sonuç uygun olarak değerlendirilmiştir.

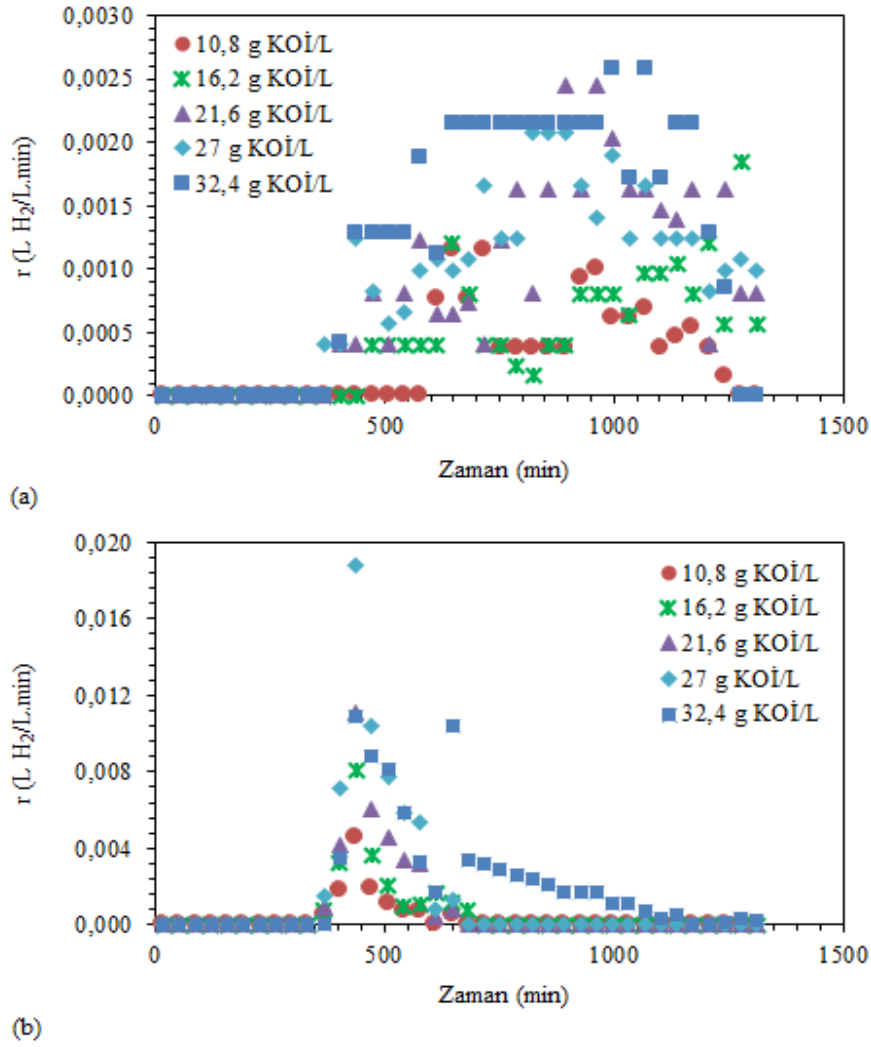
Hidrojen üretim tepkimesi hız sabitini sıcaklığa bağlayan Arrhenius eşitliği Eş. 6’da verilmiştir [40].

$$k = k_0 e^{-E_A / RT} \quad (6)$$

Bu eşitlik doğrusallaştırılırsa Eş. 7 elde edilir.

$$\ln(k) = \ln(k_0) + \frac{-E_A}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (7)$$

Eş. 7 kullanılarak farklı sıcaklıklar için elde edilen tepkime hız sabiti değerlerinden Arrhenius grafiği oluşturularak Arrhenius sabiti  $9,74 \times 10^{34} \text{ min}^{-1}$ , aktivasyon enerjisi 229,20 kJ/mol olarak hesaplanmış, elde edilen sonuçlar Şekil 10’da gösterilmiştir. Eş. 4 ve Eş. 6 birleştirilerek elde edilen bulgular yerine yazılarak ortalama tepkime hızını başlangıç substrat derişimi ve sıcaklığa bağlayan Eş. 8 elde edilmiştir.



**Şekil 8.** Farklı başlangıç substrat derişimlerinde ortalama H<sub>2</sub> üretim hızının zamanla değişimi (a) 28°C (b) 37°C  
(Variation of mean H<sub>2</sub> production rate with time for various initial substrate concentrations at (a) 28°C (b) 37°C)

$$r_{ort} = 7,94 \times 10^{34} e^{-27568/T} C_S \quad (8)$$

#### 3.4.2. Michaelis-Menten modeli (Michaelis-Menten model)

Biyohidrojen üretim hızının substrat derişimine bağlılığı Michaelis-Menten (M-M) modeli ile ifade edilebilmektedir [33, 41]. M-M modeli Eş. 9'da verilmiştir.

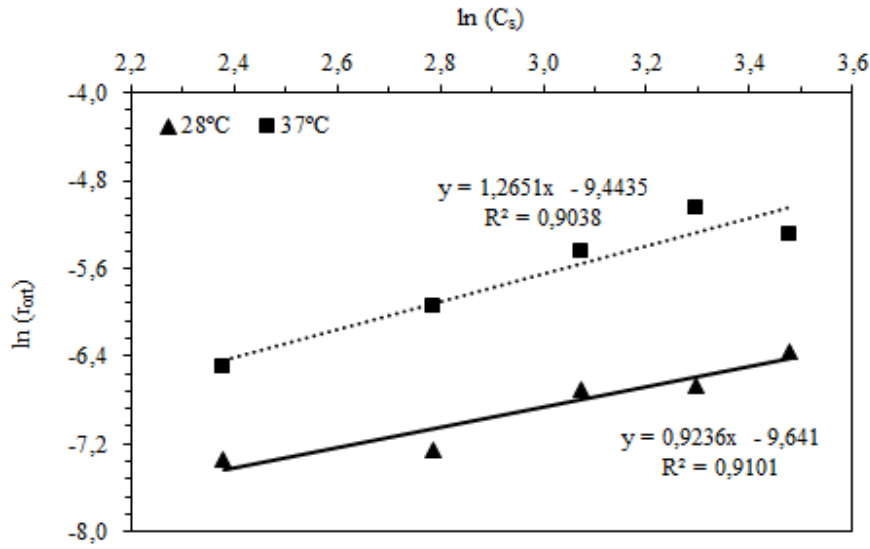
$$r_{ort} = \frac{r_m C_S}{K_S + C_S} \quad (9)$$

Eş. 9'dan, substrat derişimi ve ortalama tepkime hızı verileri kullanılarak 28°C ve 37°C'de maksimum H<sub>2</sub> üretim hızları ( $r_m$ ) ve Michaelis sabitleri ( $K_S$ ) hesaplanmış, elde edilen sonuçlar Şekil 11'de gösterilmiştir. Maksimum H<sub>2</sub> üretim hızları 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla 11,47 mL H<sub>2</sub>/L.min ve 74,66 mL H<sub>2</sub>/L.min, Michaelis sabitleri sırasıyla 181,9 g KOİ/L ve 447,7 g KOİ/L, R<sup>2</sup> değerleri ise sırasıyla 0,9458 ve 0,9505 olarak hesaplanmıştır.

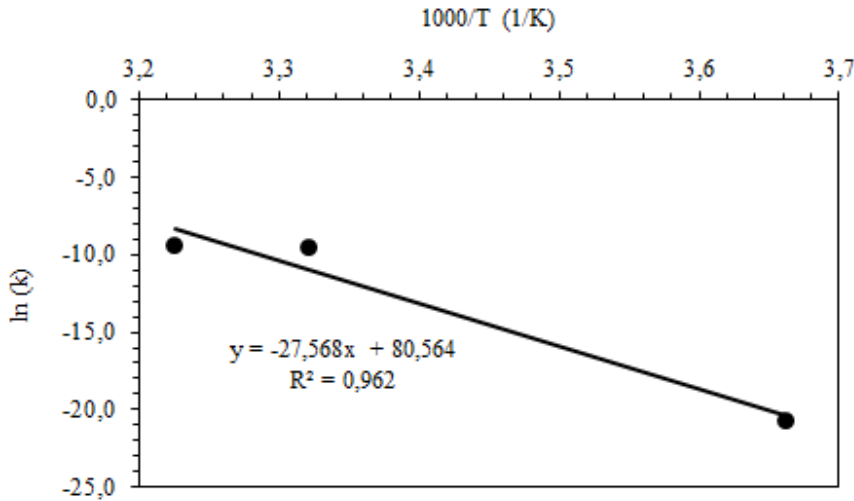
Sonuçlardan görüleceği üzere M-M modeli biyohidrojen üretim hızının substrat derişimine bağlılığını büyük ölçüde ifade edebilmektedir. Elde edilen yüksek R<sup>2</sup> değerleri fermentasyonların geręekleştirildięi substrat derişimleri için substrat inhibisyonunun olmadığını göstermektedir [33]. Tepkime sıcaklığının artmasıyla maksimum H<sub>2</sub> üretim hızının artması beklendiğinden elde edilen sonuçlar uygun olarak değerlendirilmiştir. Michaelis sabitinin değerinin büyüklüğü göz önüne alındığında çalışılan substrat derişimlerinin düşük olduğu, ortalama H<sub>2</sub> üretim hızının substrat derişimi ile doğrusal değiştiğini göstermekte, bu sonuç da Eş. 5 kullanılarak elde edilmiş olan 1. mertebe tepkime modeli varsayımını doğrulamaktadır [42].

#### 3.4.3. Modifiye gompertz modeli (Modified gompertz model)

Fermentatif hidrojen üretim sürecinde substrat derişimi [43], H<sub>2</sub> üreten bakteri sayısı [44,45], H<sub>2</sub> miktarı [46, 47], yan ürün miktarı gibi parametrelerin zamanla değişimlerini açıklayabilmek için önerilen modellerden biri modifiye



Şekil 9. Farklı sıcaklıklarda doğrusallaştırılmış başlangıç substrat derişimi ile ortalama H<sub>2</sub> üretim hızının değişimi (Linearized variation of mean H<sub>2</sub> production rate with initial substrate concentration at various temperatures)



Şekil 10. Patates besi ortamından biyohidrojen üretimi için Arrhenius grafiği (Arrhenius plot of biohydrogen production from potato medium)

Gompertz modelidir [33]. Modifiye Gompertz modeli Eş. 10'da verilmiştir.

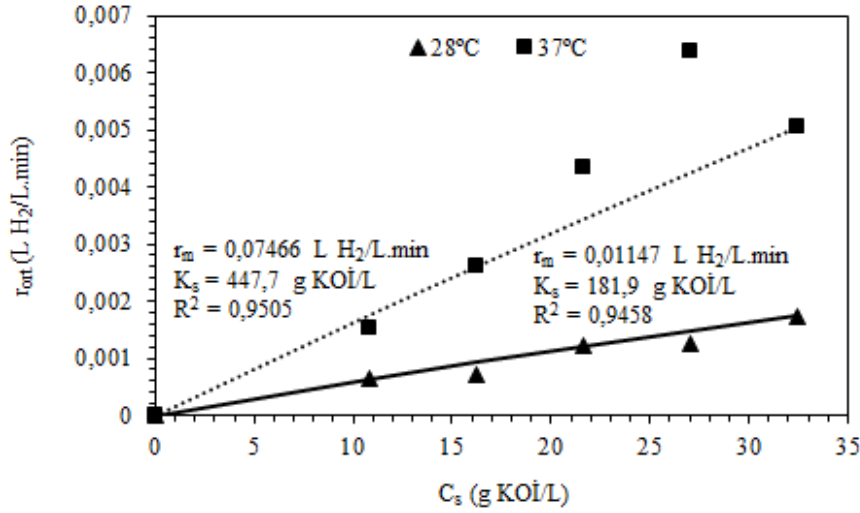
$$H_i = H_{max} \exp \left( - \exp \left( \frac{R_{max} E}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right) \right) \quad (10)$$

Farklı başlangıç substrat derişimlerinde, 28°C ve 37°C sıcaklıklar için zamanla biyoreaktör çalışma hacmi başına kümülatif H<sub>2</sub> üretimi (H<sub>i</sub>) verileri kullanılarak Eş. 10'dan maksimum H<sub>2</sub> üretim potansiyelleri (H<sub>max</sub>), maksimum H<sub>2</sub> üretim hızları (R<sub>max</sub>), gecikme fazları (λ) ve kararlılık katsayıları (E) hesaplanmış, elde edilen sonuçlar Tablo 4'te, model yanıtımı ile deney verileri arasındaki uyum ise Şekil 12'de gösterilmiştir. En yüksek H<sub>2</sub> üretim potansiyelleri 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde, 28°C ve 37°C

sıcaklıklar için sırasıyla 2,126 L H<sub>2</sub>/L ve 2,777 L H<sub>2</sub>/L olarak bulunmuştur. En yüksek H<sub>2</sub> üretim hızına 15,25 mL H<sub>2</sub>/L.min ile 37°C sıcaklık ve 27 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde ulaşılmıştır. 32,4 g KOİ/L derişiminde daha düşük H<sub>2</sub> üretim hızı elde edilmesinin sebebi olarak besi ortamındaki katı parçacıkların kütle aktarım direncini artırması düşünülmektedir. En düşük gecikme fazı süreleri 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde, 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla 516,7 min ve 380,8 min olarak bulunmuştur. Yüksek başlangıç substrat derişimi için gecikme fazındaki düşüşün, inhibisyona neden olmayacak kadar yüksek substrat/mikroorganizma oranında mikroorganizma aktivitesindeki artış nedeniyle olduğu değerlendirilmektedir. R<sup>2</sup> değerlerinin tüm çalışmalar için 0,99'dan büyük olarak elde edildiği göz önünde bulundurulduğunda modifiye Gompertz modelinin patates

besi ortamında karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretimini başarılı bir şekilde ifade edebildiği görülmektedir. Patates besisi ortamı kullanılarak biyohidrojen üretimi gerçekleştirilen literatür çalışmaları ile mevcut çalışmanın karşılaştırması Tablo 5'te gösterilmiştir. Sonuçlardan görülebileceği üzere mevcut çalışmada, literatürde bildirilen

patates besisi ortamı ile biyohidrojen üretimi çalışmalarına kıyasla daha yüksek substrat derişiminde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların literatürde daha önce bildirilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülebilmekle birlikte, yüksek H<sub>2</sub> üretim potansiyeli, en yüksek H<sub>2</sub> üretim hızı ve düşük gecikme fazı elde edildiği belirlenmiştir.



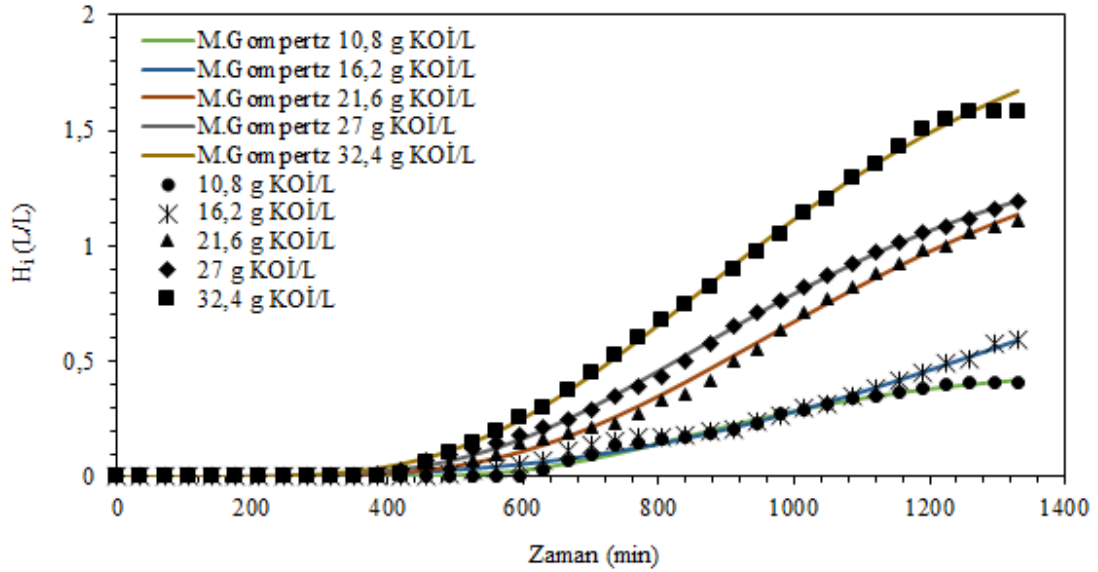
**Şekil 11.** Farklı sıcaklıklarda başlangıç substrat derişiminin ortalama H<sub>2</sub> üretim hızına etkisinin M-M çizimi (M-M plot of initial substrate concentration effect on mean H<sub>2</sub> production rate at various temperatures)

**Tablo 4.** Farklı başlangıç substrat derişimleri ve fermentasyon sıcaklıkları için Modifiye Gompertz model parametreleri (Modified Gompertz model parameters for various initial substrate concentrations and fermentation temperatures)

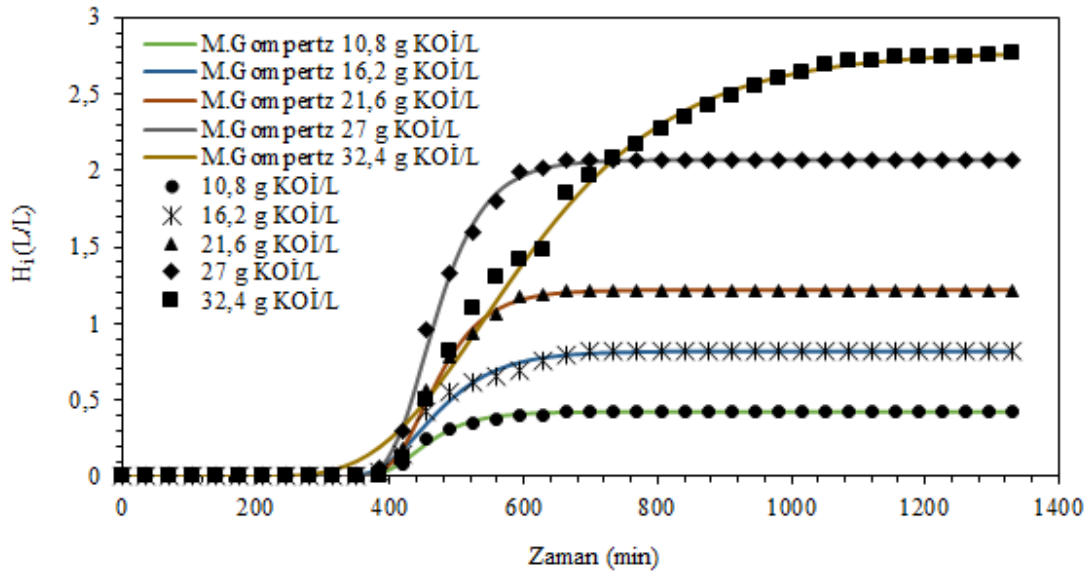
Başlangıç substrat derişimi (g KOİ/L)	T (°C)	H <sub>max</sub> (L/L)	R <sub>max</sub> (mL H <sub>2</sub> /L.min)	λ (min)	R <sup>2</sup>
10,8	28	0,4742	0,741	604,1	0,9990
	37	0,425	3,351	389,5	0,9998
16,2	28	1,73	1,012	744,6	0,9987
	37	0,8201	4,826	382,8	0,9994
21,6	28	1,61	1,651	592,3	0,9972
	37	1,22	9,043	400,4	0,9999
27	28	1,508	1,706	530,4	0,9999
	37	2,07	15,250	399,7	0,9999
32,4	28	2,126	2,330	516,7	0,9998
	37	2,777	6,441	380,8	0,9994

**Tablo 5.** Patates besisi ortamı kullanılarak gerçekleştirilen biyohidrojen üretim çalışmalarının karşılaştırması (Comparison of biohydrogen production studies from potatoes as substrate)

Kaynak	Mikroorganizma	T (°C)	Substrat Derişimi	H <sub>max</sub> (L/L)	R <sub>max</sub> (L H <sub>2</sub> /L.h)	λ (h)
[10]	<i>C. butyricum</i>	28	10,8 g KOİ/L	0,36	0,0339	5
[29]	Silo çukur sıvısı	37	100 g patates/ L	1,5	-	-
[43]	Isıl işlenmiş gübre	37	-	0,563	0,0123	110
[48]	Isıl işlenmiş gübre	23	21 g KOİ/L	2,8	0,21	27
[49]	Karışım kültür	37	%2 toplam katı	1,4	-	-
[50]	Olgunlaştırılmış lağım çamuru	37	12,6 g KOİ/L	-	0,1215	192
Mevcut çalışma	<i>C. butyricum</i>	37	32,4 g KOİ/L	2,777	0,386	6,34



(a)



(b)

Şekil 12. Farklı başlangıç substrat derişimlerinde H<sub>2</sub> üretim verilerinin modifiye Gompertz modeliyle uyumu a) 28°C b) 37°C (Modified Gompertz model fit to H<sub>2</sub> production data for various initial substrate concentrations at (a) 28°C (b) 37°C)

#### 4. SİMGELER (SYMBOLS)

$C_s$	: Başlangıç substrat derişimi
$E$	: Euler sayısı
$E_A$	: Aktivasyon enerjisi
GHI	: Gaz karışımı H <sub>2</sub> içeriği
$H$	: Kümülatif H <sub>2</sub> miktarı
$H_i$	: Biyoreaktör çalışma hacmi başına kümülatif H <sub>2</sub> üretimi
$H_{max}$	: Maksimum H <sub>2</sub> üretim potansiyeli
$k$	: Tepkime hız sabiti
$K_s$	: Michaelis sabiti
$k_0$	: Arrhenius sabiti
KGH	: Kümülatif gaz hacmi

KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
$n$	: Tepkime mertebesi
$R$	: İdeal gaz sabiti
$r$	: Yerel tepkime hızı
$R_{max}$	: Maksimum H <sub>2</sub> üretim hızı
$r_{ort}$	: Ortalama H <sub>2</sub> üretim hızı
$r_m$	: Maksimum spesifik H <sub>2</sub> üretim hızı
$t$	: Zaman
TCD	: Isıl iletkenlik dedektörü
$V_{H_2}$	: Üretilen H <sub>2</sub> hacmi
$V_r$	: Besi ortamı hacmi
$T$	: Sıcaklık
$Y$	: H <sub>2</sub> üretim verimi
$\lambda$	: Gecikme fazı



## 5. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Yapılan çalışmada oksijensiz koşullarda patates besi ortamından *Clostridium butyricum* mikroorganizması kullanılarak biyohidrojen üretilen kesikli biyoreaktörlerde çalkalama hızı, mikroorganizma aşırı oranı, başlangıç substrat derişimi ve inkübasyon sıcaklığı parametrelerinin biyohidrojen üretimine etkisi incelenmiştir. Biyohidrojen üretim prosesinin en uygun işletim koşulları; pH 6, 200 devir/min çalkalama hızı, 1:10 (v/v) mikroorganizma aşırı oranı, 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişimi (hacimce %60'lık besi ortamı) ve 37°C inkübasyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Substrat derişimi ile ürün üretimi arasındaki ilişki elemanter tepkime hız modeli, M-M tepkime hız modeli ve modifiye Gompertz modeli kullanılarak belirlenmiş, elemanter tepkime hız modeli ortalama tepkime mertebesinin 1 olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür. M-M modeli ile maksimum H<sub>2</sub> üretim hızları 28°C ve 37°C sıcaklıklar için sırasıyla 11,47 mL H<sub>2</sub>/L.min ve 74,66 mL H<sub>2</sub>/L.min, Michaelis sabitleri sırasıyla 181,9 g KOİ/L ve 447,7 g KOİ/L olarak hesaplanmıştır. Michaelis sabitinin değerinin büyüklüğü göz önüne alındığında ortalama H<sub>2</sub> üretim hızının substrat derişimi ile doğrusal değiştiği görülmekte, bu sonuç da elemanter tepkime hız modelleme çalışmasında elde edilen 1. mertebe tepkime modeli varsayımını doğrulamaktadır. Biyohidrojen üretiminin modifiye Gompertz modeli kullanılarak açıklandığı çalışmada en yüksek H<sub>2</sub> üretim potansiyeli 32,4 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde, 37°C'de 2,777 L H<sub>2</sub>/L olarak bulunmuş, en yüksek H<sub>2</sub> üretim hızına 15,25 mL H<sub>2</sub>/L.min ile 37°C sıcaklık ve 27 g KOİ/L başlangıç substrat derişiminde ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçların literatürde daha önce bildirilen sonuçlara kıyasla, yüksek H<sub>2</sub> üretim potansiyeli, en yüksek H<sub>2</sub> üretim hızı ve düşük gecikme fazı bulgularını işaret ettiği görülmüştür. Yapılan çalışma ile *Clostridium butyricum* mikroorganizmasının gıda endüstrisinde ortaya çıkan besin atıklarından karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretiminde kullanılması durumunda hem atık giderimi, hem de enerji üretimi amaçlarına eş anlamlı ulaşılabilirliği sonucu ortaya konulmuştur.

## TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışmayı 12A4343003 nolu proje kapsamında destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Kim D. ve Han S., Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production, Int. J. Hydrogen Energy, 31, 2158-2169, 2006.
- Liu G. ve Shen J., Effect of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria, J. Biosci. Bioeng., 98 (4), 251-256, 2004.
- Özkan G., Özkan G., Şahbudak B., The effect of water/ethanol mol ratio to H<sub>2</sub> yield and selectivity for hydrogen production from reforming of ethanol with the Pd-NiO, Ni-Cu-Pd/activated carbon catalysts, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 31 (2), 417-424, 2016.
- Melikoglu M. ve Albostan A., Bioethanol production and potential of Turkey, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 26 (1), 151-160, 2011.
- Gulum M., Bilgin A., Cakmak A., Comparison of optimum reaction parameters of corn oil biodiesels produced by using sodium hydroxide (NaOH) and potassium hydroxide (KOH), Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 30 (3), 503-511, 2015.
- Erdem F., Tosun A., Ergun M., Biosorption of Remazol Yellow (RR) by *Saccharomyces cerevisiae* in a batch system, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 31 (4), 971-978, 2016.
- Uyar B., Eroglu I., Yücel M., Gündüz U., Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents, Int. J. Hydrogen Energy, 34 (10), 4517-4523, 2009.
- Mizuno O., Dinsdale R., Hawkes F., Hawkes D., Noike T., Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, Bioresour. Technol., 73, 59-65, 2000.
- Alhamdani Y.A., Hassim M.H., Ng R.T.L., Hurme M., The estimation of fugitive gas emissions from hydrogen production by natural gas steam reforming, Int. J. Hydrogen Energy, 42 (14), 9342-9351, 2017.
- Ozyurt B., Hitit Z.Y., Ertunc S., Hapoglu H., Akay B., Demirtas G.F., Biological hydrogen production: effects of inoculation and production media, International Journal of Global Warming, 6 (2-3), 350-365, 2014.
- Nath K., Muthukumar M., Kumar A., Das D., Kinetics of two stage fermentation process for the production of hydrogen, Int. J. Hydrogen Energy, 33 (4), 1195-1203, 2008.
- Das D. ve Veziroglu T.N., Advances in biological hydrogen production processes, Int. J. Hydrogen Energy, 33 (21), 6046-6057, 2008.
- Hitit Z.Y., Boyacioglu H., Ozyurt B., Ertunc S., Hapoglu H., Akay B., Self-tuning GMV control of glucose concentration in fed-batch baker's yeast production, Appl. Biochem. Biotechnol., 172 (8), 3761-3775, 2014.
- Hallenbeck P.C., Abo-Hashesh M., Ghosh D., Strategies for improving biological hydrogen production, Bioresour. Technol., 110, 1-9, 2012.
- Genç N., Fermentatif biyohidrojen üretim proseslerinde hidrojen veriminin geliştirilmesindeki yaklaşımlar, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayınları, 26 (3), 225-239, 2010.
- Hitit Z.Y., Lazaro C.Z., Hallenbeck P.C., Hydrogen production by co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*: Optimization of yield using response surface methodology, Int. J. Hydrogen Energy, 42 (10), 6578-6589, 2017.
- Pirt J.S., Principles of Microbe and Cell Cultivation, John Wiley & Sons, New York, A.B.D., 1976.

18. Hallenbeck P.C., Ghosh D., Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering, *J. Environ. Manage.*, 95, 360-364, 2012.
19. Jackson A.T., *Process Engineering in Biotechnology*, Prentice Hall, New Jersey, A.B.D., 1991.
20. Jones D.T. ve Woods, D.R., Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiological Reviews*, 50 (4), 484-524, 1986.
21. Gorwa M.F., Croux C., Soucaille P., Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *J. Bacteriol.*, 178 (9), 2668-2675, 1996.
22. Nath K. ve Das D., Modeling and optimization of fermentative hydrogen production, *Bioresour. Technol.*, 102 (18), 8569-8581, 2011.
23. Abo-Hashesh M., Wang R., Hallenbeck P.C., Metabolic engineering in dark fermentative hydrogen production; theory and practice, *Bioresour. Technol.*, 102 (18), 8414-8422, 2011.
24. Chandrasekhar K., Lee Y.J., Lee D.W., Biohydrogen production: strategies to improve process efficiency through microbial routes, *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (4), 8266-8293, 2015.
25. Wang X., Ding J., Guo W.Q., Ren N.Q., A hydrodynamics–reaction kinetics coupled model for evaluating bioreactors derived from CFD simulation. *Bioresour. Technol.*, 101 (24), 9749-9757, 2010.
26. Acikel Y.S., Ersan M., Acikel U., Effects of stirring and aeration rates on lipase production and growth of *R. Delemar* in the media containing glucose or molasses sucrose and PFC, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 28 (4), 811-818, 2013.
27. Li Z., Wang H., Tang Z., Wang X, Bai J., Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose, *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 7413–7418, 2008.
28. Reddy K., Nasr M., Kumari S., Kumar S., Gupta S.K., Enitan A. M., Bux F., Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe<sup>2+</sup>, and magnetite nanoparticles, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24 (9), 8790-8804, 2017.
29. Laurinavichene T.V., Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Tekucheva D.N., Seibert M., Tsygankov A.A., Towards the integration of dark-and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light-driven H<sub>2</sub> production, *Int. J. Hydrogen Energy*, 35 (16), 8536-8543, 2010.
30. Xie B., Cheng J., Zhou J., Song W., Liu J., Cen K., Production of hydrogen and methane from potatoes by two-phase anaerobic fermentation, *Bioresour. Technol.*, 99 (13), 5942-5946, 2008.
31. Yılmaz Ö., Patates atığından termokimyasal gazlaştırma ile hidrojen üretimi ve modellenmesi, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2015.
32. Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I., Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization, *Int. J. Hydrogen Energy*, 27 (11), 1339-1347, 2002.
33. Wang J. ve Wan W., Kinetic models for fermentative hydrogen production: a review, *Int. J. Hydrogen Energy*, 34 (8), 3313-3323, 2009.
34. Eaton A.D., Clesceri L.S., Franson M.A.H., Greenberg A.E., Rice E.W., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Cilt 21, American Public Health Association, Washington, A.B.D., 2005.
35. Hitit Z.Y., Lazaro C.Z., Hallenbeck P.C., Increased hydrogen yield and COD removal from starch/glucose based medium by sequential dark and photo-fermentation using *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*, *Int. J. Hydrogen Energy*, 42 (30), 18832-18843, 2017.
36. Sood S., Singhal R., Bhat S., Kumar A., Inoculum Preparation, *Comprehensive Biotechnology*, Editör: Moo-Young M., Elsevier Science & Technology, New York, A.B.D., 2,151-164, 2011.
37. Levenspiel O., *Chemical Reaction Engineering*, Wiley, New York, A.B.D., 1999.
38. Niazi S.K. ve Brown J.L., *Fundamentals of Modern Bioprocessing*, CRC Press, Florida, A.B.D., 2015.
39. Güleç F., Şimşek E.H., Karaduman A., Disproportionation kinetics of 2-methylnaphthalene in the presence of Zr/ZSM5 zeolite catalysts, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 31 (3), 609-619, 2016.
40. Huang L., Hwang A., Phillips J., Effect of temperature on microbial growth rate–mathematical analysis: the Arrhenius and Eyring–Polanyi connections, *J. Food Sci.*, 76 (8), E553-E560, 2011.
41. Lo Y.C., Chen W.M., Hung C.H., Chen S.D., Chang J.S., Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies, *Water Res.*, 42 (4), 827-842, 2008.
42. Laidler K.J. ve Meiser J.H., *Physical Chemistry*, The Benjamin Cummings Publishing Company, California, A.B.D., 1982.
43. Mu Y., Yu H.Q., Wang G., A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process, *Water Res.*, 41 (5), 1152-1160, 2007.
44. Lin C.Y., Chang C.C., Hung C.H., Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures, *Int. J. Hydrogen Energy*, 33 (10), 2445-2453, 2008.
45. Lin C.Y., Wu C.C., Wu J.H., Chang F.Y., Effect of cultivation temperature on fermentative hydrogen production from xylose by a mixed culture, *Biomass Bioenergy*, 32 (12), 1109-1115, 2008.
46. Nath K. ve Das D., Modeling and optimization of fermentative hydrogen production, *Bioresour. Technol.*, 102 (18), 8569-8581, 2011.

47. Hitit Z.Y., Lazaro C.Z., Hallenbeck P.C., Single stage hydrogen production from cellulose through photo-fermentation by a co-culture of *Cellulomonas fimi* and *Rhodospseudomonas palustris*, Int. J. Hydrogen Energy, 42 (10), 6556-6566, 2017.
48. Van Ginkel S.W., Oh S.E., Logan B.E., Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters, Int. J. Hydrogen Energy, 30 (15), 1535-1542, 2005.
49. Patel S.K., Lee J.K., Kalia V.C., Dark-Fermentative Biological Hydrogen Production from Mixed Biowastes Using Defined Mixed Cultures, Indian J. Microbiol., 57 (2), 171-176, 2017.
50. Zhu H., Stadnyk A., Béland M., Seto P., Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process, Bioresour. Technol., 99 (11), 5078-5084, 2008.

