

Mikrodalga ön işlemeden geçirilmiş atık kuru incirin biyohidrojen üretimi için değerlendirilmesi

Evaluation of microwave pretreated waste dry fig for Biohydrogen production

Serpil OZMIHCI^{1*} , İlknur HACIOĞLU² 

¹Çevre Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

serpil.ozmhci@deu.edu.tr

²Fen Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

ilknurhcg17@gmail.com

Geiş Tarihi/Received: 02.10.2022

Düzelme Tarihi/Revision: 08.01.2023

doi: 10.5505/pajes.2023.23238

Kabul Tarihi/Accepted: 23.01.2023

Araştırma Makalesi/Research Article

Öz

Çalışmada; atık kuru incirde mikrodalga ön işlemleri (250-800W) uygulanarak aflotoksin giderimi ve en yüksek çözünmüş şeker eldesi için en iyi koşulları saptanmıştır. Aflotoksini giderilmiş atık kuru incirlerin biyohidrojen üretim performansları farklı substrat (11.8-118 g/L) ve farklı organizma konsantrasyonları (0.5-2.5 g/L) denenerek test edilmiştir. Mikrodalga işlemleri sonucunda 100 g/L atık kuru incirden en yüksek çözünmüş şeker konsantrasyonunu (89.7 g/L) veren dalga boyu 400 W ve muamele süresi 10 dk. olarak bulunmuştur. Bu koşullarda %46.2 şeker hidrolizlenmesi ve %77.8 aflotoksin giderimi sağlanmıştır. En yüksek kümülatif hidrojen gazı hacmi, hidrojen gazı üretim verimi, hidrojen gazı üretim hızı; 59 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda sırasıyla, 161.9 mL, 207.5 mL H₂/g toplam şeker, 1.75 mL/sa. olarak bulunmuştur. Farklı substrat konsantrasyonlarının kullanıldığı deneylerde üretilen organik asitlerden, laktik asidin yüksek miktarlarda üretiliyor olmasına rağmen, bazı deneylerde bütirik aside dönüşümü gözlemlenmiştir. Bu da biyohidrojen gazı üretimlerinde artış sağlamıştır. Organizma miktarı değişim deneylerinde şekerin tüm deney ortamlarında tüketildiği gözlenmiş ve başarılı bir şekilde hidrojen gazı üretimi gerçekleşmiştir. Yoğunluklu olarak bütirik asit üretilen deney ortamlarında en yüksek hidrojen gazı üretim verimi 1 g/L organizma içeren deney ortamında 124.28 mL H₂/g toplam şeker olarak elde edilmiştir. Organizma konsantrasyonu arttıkça spesifik hidrojen üretim hızında (SHÜH) düşüş gözlenmiştir. En yüksek SHÜH, 0.5 g/L organizma içeren fermentasyon ortamında 3.83 mL H₂/g biyokütle saat olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Aflotoksin, Atık kuru incir, Biyohidrojen üretimi, Substrat konsantrasyonu, Organizma konsantrasyonu.

Abstract

In the study, the best conditions for aflatoxin removal and the highest dissolved sugar were determined by applying microwave pretreatment (250-800W) to waste dried figs. Biohydrogen production performances of aflatoxin-free dried figs were evaluated by testing different substrate (11.8-118 g/L) and different organism concentrations (0.5-2.5 g/L). The optimum microwave of the microwave pretreatment process, giving the highest dissolved sugar concentration (89.7 g/L) from 100 g/L waste dried figs was 400 W and the treatment time was 10 minutes. Under these conditions, 46.2% hydrolysis of sugars and 77.8% aflatoxin removal were achieved. At the initial substrate concentration of 59 g/L, the highest cumulative volume of hydrogen gas, hydrogen gas production yield, hydrogen gas production rate were found as 161.9 mL, 207.5 mL H₂/g total sugar, 1.75 mL/hour, respectively. Although lactic acid was produced in high amounts from organic acids produced in experiments using different substrate concentrations, it has been observed that it is converted into butyric acid in some experiments. This resulted as an increase in biohydrogen gas production. In different organism amount experiments, it was observed that sugar was consumed in all experiments and hydrogen gas was produced successfully. Butyric acid was the main organic acid in the experimental media where the highest hydrogen gas production yield was produced in 1 g/L as 124.28 mL H₂/g total sugar. The specific hydrogen gas production rate (SHPR) decreased with increasing organism concentrations. The highest SHPR was obtained with 0.5 g/L organism concentration as 3.83 mL H₂/g biomass hour.

Keywords: Aflatoxin, Waste dry fig, Biohydrogen production, Substrate concentration, Organism concentration.

1 Giriş

Biyokütleden karanlık fermentasyon yoluyla biyohidrojen üretimi, biyofotoliz ve fotofermentasyon gibi biyolojik metotlara kıyasla daha düşük maliyet, yüksek enerji verimi ve yüksek substrat dönüşüm etkinliğine sahiptir [1]-[6]. Üretim ışığa bağımlı olmaması, atıksu da dahil olmak üzere çok farklı karbon kaynaklarının substrat olarak kullanılabilir olması ve büyük ölçekte üretim göz önüne alındığında mikroorganizma konsorsiyumu olarak karışık kültürlerin kullanımına elverişli olması karanlık fermentasyonu biyohidrojen üretiminde tercih edilen bir üretim teknolojisi haline getirmektedir [7]. Örneğin, buğdaydan fotofermentasyon ve karanlık fermentasyon yoluyla biyohidrojen üretimi, üretim potansiyelleri bakımından

karşılaştırılmış ve sırasıyla 1 mol glikoz başına 1.23 mol H₂ ile 1.9 mol H₂ verimlerine ulaşılmıştır [4].

Karanlık fermentasyonla biyohidrojen üretiminde tarımsal atıklar, lignoselülozik atıklar, evsel katı atıklar, mutfak atıkları, sebze ve meyve atıkları gibi karbonhidratça zengin ve özellikle ülkemizde atık olma potansiyeli yüksek olan substratlar kullanılabilir [8],[9]. Bu substratlar içinde meyve atıkları, hem nem içerikleri hem de yüksek oranda uçucu katı, nütriyent içermeleri ve yüksek şeker konsantrasyonları ile biyoparçalanabilir olmaları gibi özellikleri sayesinde biyohidrojen üretiminde ideal bir substrat olarak dikkat çekmektedir [10]-[12]. Ancak kompleks şeker yapılarının kolayca fermente edilebilen basit şeker formlarına dönüşebilmesi için fermentasyon öncesi alkali, asidik, termal

*Yazışılan yazar/Corresponding author

veya mikrodalga ışınları ile uygulanabilen bir ön işlem basamağı gerekmektedir [7]. Bir çalışmada, meyve atıklarının karanlık fermentasyonla biyohidrojen üretimine tabi tutulmuş ve mikrodalga ve buharlı ısı işleme maruz bırakılan meyve atıklarından 24 saatin sonunda 2526 mL/L hidrojen üretilerek 2.43-2.51 mol hidrojen/mol heksoz verimine ulaşılmıştır [10]. Silva ve diğ.(2018) Cashew elma küspesini, fermentasyon öncesinde hidrojen peroksitle ön muamele etmiş ardından asidik ve enzimatik hidrolize maruz bırakmıştır. Asidik hidroliz herhangi bir ön muamele olmaksızın en yüksek hidrojen verimini (15 mmol H₂/Lhidrolizat) verirken hidrojen peroksitle ön muameleli Cashew elma küspesinin verimi %67 oranında düşmüştür [13]. Amekan (2018) ve diğ., kavun atıklarından, meyve atığı çürütücü tankından izole edilerek zenginleştirilen mikroorganizma kültürünü kullanmış ve 743 mL kümülatif hidrojen (207.56 mL/g uçucu katı) üretebilmiştir [14]. Portakal, elma, kavun, üzüm ve muz atıklarının biyohidrojen üretiminde ise ayrı ayrı ve farklı kombinasyonlar halinde atıklar denenmiş; elma atığının tek başına kullanıldığı ve portakal atığının meyve karışımında %20 oranında kullanıldığı iki farklı durumda sırasıyla 504 mL/g ve 513 mL/g uçucu katı bulunmuştur [15].

Dünya üzerinde üretilen toplam meyve miktarının ciddi bir kısmı (640 milyon tondan fazlası) uygun olmayan üretim, taşıma ve depolama koşulları, düşük kalite ve özellikle uygunsuz saklama koşullarının tetiklediği mikotoksin kontaminasyonu sebebiyle atık durumuna gelmektedir [10],[11],[16]. Türkiye'nin ihracatında ve üretiminde dünyada ilk sıralarda yer aldığı meyvelerden olan kuru incirin mikotoksinle kontaminasyonunun gıda tüketimi açısından yarattığı endişeler, bu kuru meyveleri biyohidrojen üretimi için potansiyel bir hammadde haline getirmiştir. Çoğunlukla uygunsuz depolama koşulları altında *Aspergillus* sp. gibi filamentöz mantarlar tarafından kontamine olan gıdalarda yayılım gösteren mikotoksinlerin şimdiki dek tanımlanmış 400'e yakın türü bulursa da literatürde birçok çalışma aflatoksin ve okratoksin-A (OTA) üzerine odaklanmıştır [17]. Kuru meyvelerde özellikle kurutma prosesinden sonra nemli çevresel şartların ortaya çıkması, kuru incirde aflatoksin birikmesine neden olmaktadır [18],[19]. Aflatoksinle kontamine olmuş kuru incirler endüstride alkol fermentasyonunda kullanılabilir. Çelikleş (2015), mikotoksinli kuru incirleri kullanarak 25 g/L indirgen şekerden 5.9 g/L etanol üretebilmiştir [19]. Bir başka çalışmada, aflatoksinli mısır, biyogaz (metan ve CO₂) üretiminde değerlendirilmiş ve anaerobik çürüme prosesi ile eş zamanlı olarak %95'e varan oranlarda aflatoksin degradasyonu gerçekleştirilmiştir [20]. Literatürde mikotoksin içeren meyvelerden biyogaz üretimine odaklanan pek çok çalışma bulunmasına karşın biyohidrojen üretiminde AFA ve OTA etkisine dair çalışma bulunmamaktadır.

Mikotoksinle kontamine hammaddelerin biyogaz üretiminde kullanılması, mikotoksinlerin sahip olduğu kompleks ve stabil yapıları sebebiyle anaerobik çürümenin gidişatını ve kalitesini dolayısıyla biyogaz verimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Özellikle yüksek mikotoksin konsantrasyonlarının mikrobiyal konsorsiyumu değiştirdiğini ifade eden çalışmalar mevcuttur. AFB1 ile kontamine mısır yarı sürekli modda biyogaz üretiminde değerlendirilmiştir. Çalışmada, 25 µg/kg düzeyinde AFB1 konsantrasyonunun biyometan verimi üzerinde bir etkisi olmadığı gözlemlenirken; 100 µg/kg AFB1 kontaminasyonunun organik asit birikimi

üzerinden prosesin inhibisyonuna sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır [21],[22].

Aflatoksin degradasyonunda kızartma, kuru sıcaklık uygulaması, radyasyon, ozon, amonyak, hidrojen bisülfid, hidrojen peroksit, sitrik asit veya laktik asit vb. kimyasal muamelesi, enzimatik veya mikrobiyolojik prosesleri kapsayan yöntemler kullanılıyor olsa da son yıllarda dikkat çeken su destekli mikrodalga uygulaması, mikotoksinin dekompozisyon sıcaklığını düşürerek parçalanma yüzdesini arttırması gibi bir avantaja sahiptir. Ayrıca bu uygulamalarda kullanılan su, mikrodalga enerjisini emerek ısıyı üretmek için mükemmel bir aracı görevini görmektedir. Mikrodalğanın uygulama süresi ve gücü arttırıldıkça degradasyonun arttığına işaret eden çalışmalar mevcuttur [23]-[26].

Bu çalışmada, farklı muamele süreleri ve mikrodalga gücünde su destekli mikrodalga yöntemi uygulaması ile en verimli mikotoksin giderim metodu uygulanarak aflatoksin giderimi yapılmış kuru incirde biyohidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın son aşamasında farklı başlangıç substrat konsantrasyonu ve mikroorganizma konsantrasyonlarında biyohidrojen üretim prosesinin çıktuları değerlendirilerek mikotoksin giderimi yapılmış meyvelerde optimum substrat ve organizma konsantrasyonları belirlenmiştir.

2 Materyal ve metod

2.1 Substrat hazırlığı

Mikotoksinle kontamine olmuş kuru incir Ege İhracatçı Birliklerinden temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan kuru incir %43-55.8 aralığında toplam şeker içeriğine sahiptir (Analiz metodu: Dubois metot) Toplam şeker miktarını 1:1 oranda glikoz ve fruktoz oluşturmaktadır. Kuru incirin nem içeriği %16.5 olarak bulunmuştur. Kuru incir, 69±9.12 µg/kg aflatoksin B1, 5.99±0.64 µg/kg aflatoksin B2, 84.86±11 µg/kg aflatoksin G1, 5.79±0.9 µg/kg aflatoksin G2 (analiz metodu; R-Biopharm (analiz metodu; VICAM) içermektedir.

Deneylerde 18.5 g/L konsantrasyonda mikotoksin içeren kuru incir küçük parçalar (□1 mm çaplı) haline getirilerek ön işleme tabii tutulmuş ve fermentasyon ortamına aktarılmıştır.

Mikotoksin içeren kuru incirler, mikrodalga ön muamelesinin aflatoksin giderimine olan etkisini gözlemlemek ve fermentasyon öncesinde maksimum şeker konsantrasyonunun elde edildiği koşulları belirleyebilmek için 100 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda, farklı mikrodalga gücü (250 W-800 W) ve farklı muamele sürelerinde (0-60 dk.) mikrodalgada ön muameleye maruz bırakılmıştır. Kullanılan mikrodalga güçleri 250, 350, 400, 600, 700 ve 800 Wattır. Her 5 dk.'da bir numuneler alınarak mikrodalga işleminden elde edilen toplam şeker miktarlarına bakılmıştır.

2.2 Deneysel tasarım

Kesikli karanlık fermentasyon denemeleri, 250 mL'lik serum şişelerinde (Isolab-Germany Boro 3.3) farklı substrat konsantrasyonlarında (11.8- 29.5- 59- 88.5- 118 g/L) ve farklı organizma konsantrasyonlarında (0.5-1-1.5-2-2.5 g/L)100 mL çalışma hacminde yürütülen çalışmalarda deney ortamları, fermentasyon öncesinde yaklaşık 50-60 mL su ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol fermentasyon ortamı organizma içermemektedir. Seçilen optimum mikrodalga gücü ve uygulama süresinde ön muameleye tabii tutulan atık meyveler kullanılmıştır. Fermentasyon ortamı, 2.8 g/L K₂HPO₄, 3.9 g/L KH₂PO₄, 0.25 g/L MgSO₄, 10 g/L pepton, 0.6 g/L maya özütü ve 0.1 g/L L-sisteinden oluşmaktadır [27].

Fermentasyon, mezofilik (37 °C) koşullarda 14 gün boyunca yürütülmüştür. Fermentasyon öncesinde deney ortamlarının pH'ı, 10M NaOH kullanılarak 7.2'ye ayarlanmış ve şişeler 121 °C'de 15 dk. boyunca otoklavlanmıştır. Anaerobik koşulların sağlanması amacıyla şişelerin üst kısmından azot gazı geçirilmiş ve gaz sızdırmazlığının sağlanması için şişeler tıparlarla kapatılarak kapaklarının çevreleri silikonlanmıştır. Negatif kontrol hariç tüm deney şişelerine %10 (v/v) oranında inokulasyon yapılmıştır.

Deneylerde, maksimum biyohidrojen üretim verimi ile kümülatif hidrojen hacmini veren başlangıç substrat konsantrasyonunu içeren fermentasyon ortamlarına farklı miktarlarda organizmanın (0.5-1-1.5-2-2.5 g/L) ilave edilmesiyle biyohidrojen üretimi gerçekleştirilmiş ve en iyi hidrojen üretim potansiyelini gösteren organizma konsantrasyonu belirlenmiştir.

2.3 Organizma hazırlığı

Deneylerde organizma olarak kullanılan anaerobik çamur, İzmir'de faaliyet gösteren Pakmaya fabrikasındaki anaerobik atık su arıtma tesisinin asidojenik fazından temin edilmiştir. Çamur, spor formundaki hidrojen üreten bakterileri karışık bakteri kültüründen ayırabilmek için pH:5'te 1 sa. boyunca kaynatılmıştır. Ön işlem görmüş aktif çamur, 10 g/L glukoz, 2.8 g/L K₂HPO₄, 3.9 g/L KH₂PO₄, 0.25 g/L MgSO₄, 10 g/L pepton, 0.6 g/L maya özütü ve 0.1 g/L L-sistein içeren ortama aşılansmıştır [27]. Şişenin üst kısmından azot gazı geçirilerek anaerobik koşullar sağlanmış ve 37°C'de, 7.2 başlangıç pH'ında 2 gün boyunca inkübe edilen organizmalar, 2. gün sonunda deney şişelerine aşılansmaya hazır hale gelmiştir.

2.4 Analitik metotlar

Fermentasyon ortamlarının sıvı kısım analizleri için her gün deney şişelerinden 5 mL örnek alınmış, 8000 rpm'de 15 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen berrak üst sıvıda pH, toplam şeker konsantrasyonu, basit şeker kompozisyonu ve toplam uçucu yağ asidi (TUYA) konsantrasyonu analizleri yapılmıştır. Toplam şeker konsantrasyonu için asit-fenol spektrometrisi metodu kullanılmıştır. Basit şeker ve TUYA konsantrasyonunun analizi için yüksek saflıkta sıvı kromatografisi (HPLC, Agilent 1100; Aminex HPX-84H kolonu) kullanılmıştır. Mobil faz 0.6 mL/dk. akış hızında 5 mM H₂SO₄'tür. Glukoz ve fruktoz konsantrasyonları 37 °C sıcaklıkta RID ile; TUYA konsantrasyonları ise 220nm'de UV dedektörü ile tespit edilmiştir.

Gaz fazındaki analizler için fermentasyon şişelerinden her gün gaz sızdırmaz cam şırınga ile örnek alınmıştır. Hidrojen gazı konsantrasyonu, gaz kromatografisi (Agilent 6890 N-GC) ile ölçülmüştür. Kolon olarak Alltech, Hayesep D 80/100 (6 in. x 1/8 in. x 0.85 in.) ; taşıyıcı gaz olarak ise 30 mL/dk. akış hızında azot kullanılmıştır. Fırın, enjeksiyon, dedektör ve filament sıcaklığı sırasıyla 35 °C, 120 °C, 120 °C, 140 °C'dir. Üretilen toplam gaz hacmi %2 H₂SO₄ ve %10 NaCl içeren solüsyon kullanılarak su yer değiştirme metodu üzerinden hesaplanmıştır [27].

Kümülatif hidrojen gazı hacmi, hidrojen gazı üretim verimi ve hidrojen gazı üretim hızı hesaplamaları Özmihci ve diğ. (2022)'den alınmıştır [27].

3 Bulgular ve yorumlar

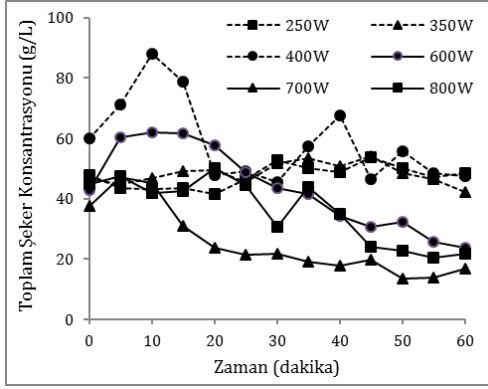
Bu çalışmada, mikrodalga ön işlemi uygulanan kuru incirdeki aflatoksin giderilmeye çalışılmıştır. Mikotoksini giderilen substratlarda substrat ve organizma konsantrasyonları

değiştirilerek en iyi hidrojen gazı üretim potansiyeli olan koşullar saptanmıştır.

Mikotoksinin biyohidrojen üretimi üzerine etkisi daha önce yayınladığımız makalede atık kuru incir ve kuru üzüm için incelenmiştir [27]. Bu makaleye göre, atık substratlardaki mikotoksin varlığı, biyohidrojen üretiminde mikotoksinsiz kuru meyvelere kıyasla kuru üzümde 3.27 kat; kuru incirde ise 3.29 kat azalmaya sebep olmuştur. En yüksek Kümülatif Hidrojen Hacmi (KHH) ve hidrojen üretim verimi, mikotoksinsiz kuru incirde sırasıyla 267 mL ve 78.8 mL H₂/g toplam şeker olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, substratlara uygulanan asidik ön muamele, KHH üzerinde artışa sebep olmadığı gibi, mikotoksinsiz meyvelerde biyohidrojen üretimini negatif yönde etkilemiştir. Asitle ön muamele, yenilebilir kuru üzümün kullanıldığı deney ortamlarında KHH'nin %34 oranında azalmasına neden olmuştur. Bu durum, özellikle asitle ön işlem sırasında biyohidrojen üretimini baskılayabilecek 5-HMF ve furfural gibi inhibitörlerin oluşumuyla açıklanabilir [28]. Hem pozitif kontrol fermentasyon ortamlarıyla hem de mikotoksin içermeyen substratlarla kıyaslandığında mikotoksinli substratların kullanıldığı deney ortamlarında kümülatif hidrojen hacmindeki belirgin düşüş, mikotoksinin biyohidrojen üretimi üzerinde negatif etkisi olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada, toplam uçucu yağ asitlerinin (TUYA) deney sonundaki konsantrasyonları asetik asit (AA) ve bütrik asit (BA) üretimi gerçekleşmekte olup mikotoksin içeren substratlarda AA: BA oranı 8 ile 12 aralığında değişmektedir. Buna karşın mikotoksin içermeyen ortamlarda AA: BA oranı 1.4 ile 2 aralığındadır. Bu durum, fermentasyon ortamlarında AA: BA oranlarının max. KHH üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Deney ortamlarındaki yüksek TUYA birikimi, ürün inhibisyonu yaratmakta ve özellikle mikotoksin içeren ortamlarda ürün inhibisyonu üzerinden hidrojen üretim hacminde düşüş meydana getirmektedir [29]-[31].

3.1 Mikrodalga uygulaması ile mikotoksin giderimi

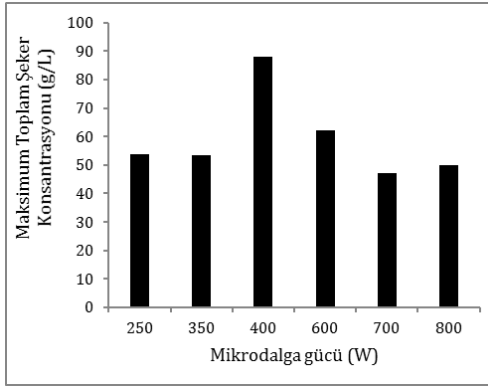
Su destekli mikrodalga uygulaması ile maksimum toplam şeker konsantrasyonunu (hidroliz oranı) veren ve mikotoksin giderim yüzdesi en yüksek olan dalga boyu aralığı tayin edilmiştir. Bu amaçla 250 W-800 W aralığında mikrodalga gücü kullanılmıştır. 100 g/L başlangıç substrat konsantrasyonundaki mikotoksinli kuru incir deney ortamlarına 60 dk. süre boyunca uygulanarak her 5 dk.'da bir toplam şeker konsantrasyonu analizi yapılmıştır. Farklı mikrodalga gücü uygulamalarında toplam şeker konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 1'de ifade edilmektedir. Açıkça görüldüğü üzere özellikle 400W ve 800W aralığındaki uygulamalarda 10 ila 20. dk.'dan sonra toplam şeker konsantrasyonu azalma eğilimi göstermektedir. Bu durum yüksek uygulama gücünde oluşan aşırı ısınmanın, şeker formunun kaynama noktasının üzerine çıkıp, şeker karamelizasyonuna yol açmasıyla açıklanabilir [32]. 250 W ve 350W mikrodalga gücünde ise toplam şeker konsantrasyonundaki düşüş, sıcaklık artışının daha ılımlı gerçekleşmesinden dolayı 45. dk.'dan sonra gözlenmiştir. Ancak düşük mikrodalga gücünde ulaşılabilen maksimum toplam şeker konsantrasyonu 54 g/L ile sınırlı kalmıştır. En yüksek toplam şeker miktarı ise 400 W mikrodalga gücünde 10 dk. uygulama sonrasında 89.7 g/L olarak elde edilmiştir. 400 W'dan daha yüksek mikrodalga gücündeki uygulamalarda toplam şeker konsantrasyonunun azalma trendine girdiği görülmektedir.



Şekil 1. Farklı mikrodalga gücünde (250W-350W-400W-600W-700W-800W) 60 dk. uygulama süresi boyunca toplam şeker konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi.

Figure 1. Time-dependent variation of total sugar concentrations during 60 min application period at different microwave power (250 W-350 W-400 W-600 W-700 W-800 W).

Benzer sonuçlar mikrodalga uygulaması ile maksimum fermente edilebilir şeker ortaya çıkarmaya çalışan bir çalışmada da görülmüştür [33]. Elde edilebilen en yüksek şeker konsantrasyonları Şekil 2'de verilmektedir.



Şekil 2. Farklı mikrodalga gücündeki uygulamalarda elde edilen maksimum şeker konsantrasyonları (g/L).

Figure 2. Maximum sugar concentrations (g/L) obtained in different microwave power applications.

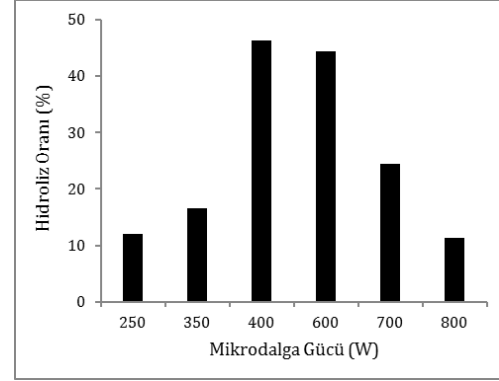
Daha önce de açıklandığı üzere 250 ve 350 W'ta ve 700-800W'ta elde edilen toplam şeker miktarları yaklaşık olarak 50 g/L civarlarında seyretmektedir. 600W ta şeker konsantrasyonu 60 g/L civarlarında olsa da en yüksek şeker konsantrasyonu ortalama dalga boyu olan 400W'ta elde edilmiştir. Hidroliz oranları (%) Şekil 3'te gösterilmiş ve aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır:

$$\frac{(C_s - C_o)}{C_o} * 100 \quad (1)$$

Denklemden, C_s : Mikrodalga sonrasında suya geçen toplam şeker konsantrasyonu ve C_o : Başlangıçta suya geçen toplam şeker konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Buna göre 400 W ve 600 W mikrodalga güçlerinde, sırasıyla %46.2 ve %44.3 ile en yüksek hidroliz verimlerine ulaşılmıştır. 600W'dan sonra hidroliz yüzdesinde ciddi bir düşüş meydana gelmiştir. Üstelik 800W'daki ani ısınma, şeker miktarındaki artışı çok düşük oranda etkileyerek hidroliz veriminin en düşük uygulama gücünün (250 W) yarattığı verimden bile düşük

kalmasına neden olmuştur. Ancak düşük mikrodalga gücünde yine de dikkate değer bir hidroliz gerçekleşmemiştir.



Şekil 3. Farklı mikrodalga gücündeki uygulamalarda elde edilen hidroliz oranları (%).

Figure 3. Hydrolysis rates (%) obtained in different microwave power applications.

400 W mikrodalga gücünde 10 dk. uygulama süresi en yüksek hidroliz oranı ile maksimum şeker miktarını verse de mikotoksin giderim yüzdesi ve uygulama sonucunda ölçülecek toplam aflatoksin konsantrasyonu, mikotoksinin kuru meyvelerde biyohidrojen üretim verimi ile KHH'ı negatif etkilediği sonucuna varıldığından, mikrodalga uygulama gücü ve süresinin seçimi için diğer bir önemli faktördür. 250 W, 400W ve 600W mikrodalga güçlerinde uygulama süreleri sonunda elde edilen aflatoksin konsantrasyonları sonuçları Tablo 1'de ifade edilmiştir.

Tablo 1. Farklı mikrodalga uygulamaları sonucunda elde edilen AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 ve toplam aflatoksin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Table 1. AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 and total aflatoxin concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$) obtained as a result of different microwave applications.

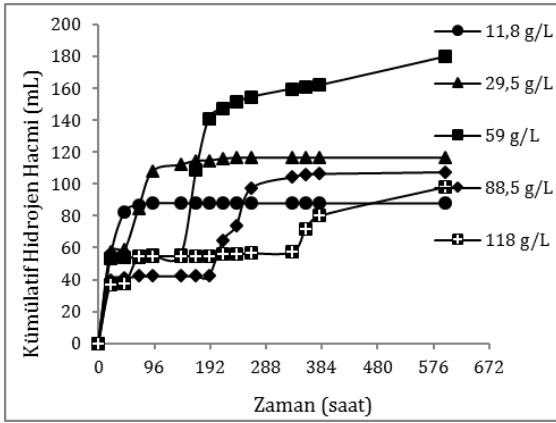
Mikrodalga uygulaması sonrası aflatoksin miktarları ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	250W	400W	600W
AFB ₁	26.97±0.42	25.48±1.35	21.04±0.8
AFB ₂	11.93±0.38	11.44±1.46	4.95±0.78
AFG ₁	0	0	11.92±0.82
AFG ₂	0	0	2.58±0.8
Toplam Aflatoksin	38.9±0.4	36.92±1.4	40.49±0.8

Toplam aflatoksin giderim yüzdesi 250 W, 400W ve 600W mikrodalga gücü uygulaması sonucunda sırasıyla 76.6, 77.8 ve 75.1 olarak bulunmuştur (başlangıç toplam aflatoksin konsantrasyonu 166 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Daha düşük mikrodalga gücünde AFG1 ve AFG2 giderimi %100 iken 600 W'da sırasıyla %86 ve %57 ile sınırlı kalmıştır. Toplam aflatoksin giderimi bakımından her üç mikrodalga gücü arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu nedenle hem elde edilen maksimum toplam şeker konsantrasyonu hem de mikrodalga giderim yüzdesi bir arada değerlendirildiğinde fermentasyon öncesi substrata uygulanacak en uygun ön muamele yöntemi olarak 10 dk. boyunca 400 W'ta mikrodalga muamelesi seçilmiştir.

3.2 Substrat konsantrasyonunun biyohidrojen üretimi üzerine etkisi

Substrat olarak kullanılacak mikotoksin içeren kuru incirler, fermentasyon öncesinde 10 dk. boyunca 400 W gücünde

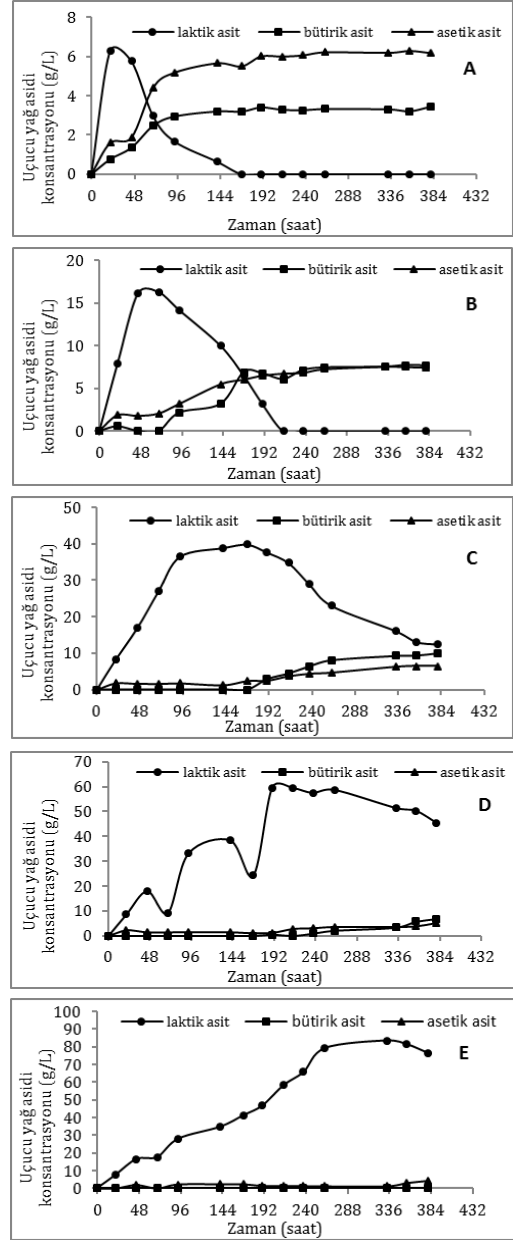
mikrodalga işlemine maruz bırakılarak 11.8 g/L, 29.5 g/L, 59 g/L, 88.5 g/L ve 118 g/L olmak üzere 5 farklı substrat konsantrasyonunda biyohidrojen üretim potansiyelleri değerlendirilmiştir. Şekil 4'te farklı substrat konsantrasyonlarında KHH'nin zamana bağlı değişimi gösterilmektedir. En yüksek KHH, 59 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunun kullanıldığı deney ortamında 380 sa. sonunda 161.9 mL olarak elde edilmiştir. 59 g/L'ye kadar artan substrat konsantrasyonlarına paralel olarak hidrojen üretiminde de artış gözlenmiştir. Ancak, daha yüksek konsantrasyonlarda substrat inhibisyonu sebebiyle hidrojen üretiminde düşüş meydana gelmiştir. En düşük KHH, 118 g/L'de 80 mL olarak bulunmuştur. Düşük substrat konsantrasyonlarında (11.8 ve 29.5 g/L) toplam şeker, 72 ile 96. saatler arasında tamamen tükenerek pH yaklaşık 6.5 civarlarında sabit kalmakta (veri gösterilmemiştir) fermentasyon ilk birkaç gün içerisinde sonlanarak KHH sabit duruma gelmektedir.



Şekil 4. Farklı substrat konsantrasyonlarında kümülatif hidrojen hacminin zamana bağlı değişimi.

Figure 4. Time-dependent variation of cumulative hydrogen volume at different substrate concentrations.

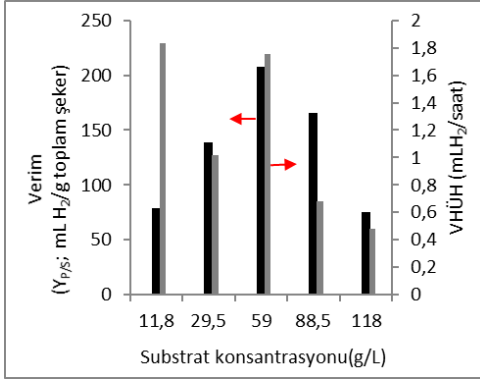
Şekil 5 (A-E), farklı substrat konsantrasyonlarındaki fermentasyon sırasında üretilen uçucu yağ asitlerinin kompozisyonlarını ve konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimini göstermektedir. Propiyonik asit, tüm fermentasyon ortamlarında ihmal edilebilir düzeydedir. Tüm deney ortamlarında laktik asit birikimi gözlenirse de düşük substrat konsantrasyonlarında laktik asit tüketimine eş zamanlı olarak bütirik asit oluşumu gözlenmekte ve buna paralel olarak hidrojen üretimi gerçekleşmektedir. Literatürdeki kesikli karanlık fermentasyon çalışmalarından, hidrojen üreten mikrobiyal konsorsiyumların veya *Clostridium butyricum* saf kültürlerinin laktat ve asetatı bütirik asite çevirme yeteneğinde oldukları bilinmektedir [34],[35]. Yüksek substrat konsantrasyonlarında ise deney ortamlarındaki laktik asit tüketilemeyerek hidrojen üretimi üzerinde inhibe edici bir etki göstermiştir. 118 g/L substrat konsantrasyonuna sahip deney ortamında laktik asit miktarı 384 saat sonunda 76.5 g/L iken bütirik asit oluşumu gözlenmemiş ve asetik asit konsantrasyonu ise yalnızca 4.18 g/L olarak bulunmuştur. Buna karşın en yüksek KHH'ın elde edildiği 59 g/L başlangıç substrat miktarında toplam asetik asit ve bütirik asit konsantrasyonu toplamı 16.45 g/L; laktik asit konsantrasyonu ise 12.47 g/L olarak elde edilmiştir. Fermentasyonun ilk günlerinde üretilen laktik asidin neredeyse %70'i tüketilmiş ve 59 g/L'den daha yüksek substrat konsantrasyonlarında laktik asit birikiminin yarattığı inhibisyon bu deney ortamında gözlenmemiştir.



Şekil 5. Farklı substrat konsantrasyonlarında toplam uçucu yağ asidi (TUYA) konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi (A=11.8 g/L; B=29.5 g/L; C=59 g/L; D=88.5 g/L; E=118 g/L).

Figure 5. Time-dependent variation of total volatile fatty acid (TVFA) concentrations at different substrate concentrations (A=11.8 g/L; B=29.5 g/L; C=59 g/L; D=88.5 g/L; E=118 g/L).

Şekil 4'deki kümülatif hidrojen hacmi verileri de ele alındığında artan asetik asit ve bütirik asit konsantrasyonlarının biyohidrojen üretiminde artışı sağladığı ancak yüksek miktarda laktik asit üretiminin hidrojen üretimini oldukça kısıtladığı sonucuna ulaşılmaktadır. Asetik asit (AA) ve Bütirik Asit (BA) oranlarına bakıldığında ise oranların artıka verimlerin düştüğü gözlenmiştir. Substrat konsantrasyonlarının 11.8 g/L; 29.5 g/L; 59 g/L; 88.5 g/L; 118 g/L olduğu koşullarda AA: BA oranları sırasıyla 1.89, 1, 0.64, 0.87, 20.9 olmuştur. Kümülatif hidrojen üretimine paralel olarak harcanan şeker başına maksimum hidrojen üretimi en yüksek 59 g/L substrat içeren deney ortamında 207.5 mL H₂/g toplam şeker olarak bulunmuştur (Şekil 6).



Şekil 6. Farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen hidrojen gazı üretim verimleri ve volumetrik hidrojen gazı üretim hızları (VHÜH); ■ Verim, ■ VHÜH.

Figure 6. Hydrogen gas production efficiencies and volumetric hydrogen gas production rates (VHPR) obtained at different substrate concentrations, ■ Yield, ■ VHPR.

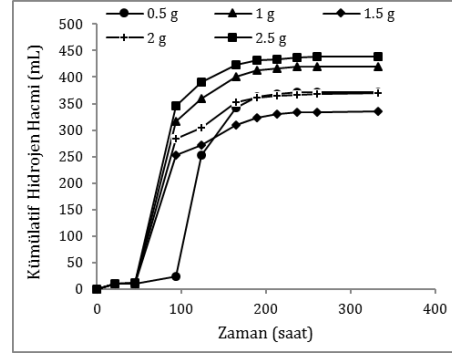
Daha yüksek konsantrasyonlarda verim azalma eğilimi göstermektedir. Şekil 6B'da deney ortamlarına ilişkin hidrojen üretim hızları gösterilmektedir. En yüksek hidrojen üretim hızına en düşük substrat konsantrasyonunu içeren deney ortamında ulaşılmıştır. Bunun sebebi, düşük substrat konsantrasyonlarında organizmanın metabolizması gereği şekeri hızlı bir şekilde tüketerek asetik ve bütirik asit yolağı üzerinden hidrojen dönüşümünü etkin bir şekilde gerçekleştirebilmesidir. Yüksek şeker konsantrasyonlarında organizmanın ortama adaptasyonu uzun sürmekte bununla birlikte şeker hidrolizi de eş zamanlı olarak devam ettiğinden fermentasyon süresi uzamaktadır. 59 g/L şeker konsantrasyonunda 1.75 mL/saat hidrojen gazı elde edilerek 11.8 g/L substrat konsantrasyonuna yakın bir hız elde edilmiştir.

Elde edilen KHH, hidrojen üretim verimi ve hidrojen üretim hızı verileri bir arada ele alındığında optimum substrat konsantrasyonu olarak 59 g/L seçilmiştir ve deneylerin bir sonraki aşamasında en uygun mikroorganizma konsantrasyonunun seçiminde tüm deney ortamlarında 10 dk. süre boyunca 400W mikrodalgı uygulama gücünde ön muamele edilmiş 59 g/L başlangıç konsantrasyonunda atık kuru incirler kullanılmıştır.

3.3 Mikroorganizma miktarının biyohidrojen üretimi üzerine etkisi

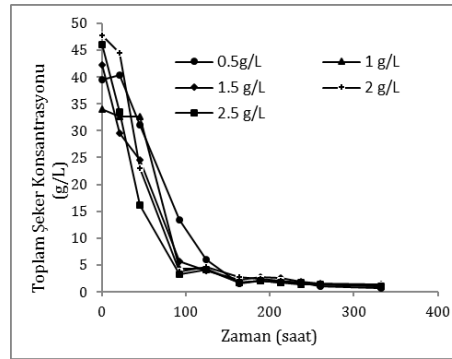
Anaerobik çamurdan mikotoksin giderimi yapılmış kuru incirlerin kesikli karanlık fermentasyon ile biyohidrojen üretimlerinde en uygun başlangıç substrat konsantrasyonunda (59 g/L) yürütülen deneylerde 5 farklı organizma miktarı (0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L, 2 g/L ve 2.5 g/L) kullanılarak organizma konsantrasyonunun biyohidrojen üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Şekil 7'de deney ortamlarına ait kümülatif hidrojen gazı hacminin zamana bağlı değişimi gösterilmektedir. En yüksek KHH, 2.5 g/L organizma içeren fermentasyon ortamında 438 mL olarak elde edilmiştir. Bunu, 421 mL ile 1 g/L organizma içeren deney ortamı takip etmektedir.

En düşük mikroorganizma miktarında, fermentasyon başladıktan sonraki ilk 93 sa. içerisinde toplam şeker konsantrasyonu 39.5 g/L'den 13,4 g/L'ye düşmesine rağmen (Şekil 8) hidrojen üretimindeki logaritmik artış ancak 93. saatten sonra gerçekleşmiştir.



Şekil 7. Farklı mikroorganizma miktarlarında kümülatif hidrojen gazı hacminin zamana bağlı değişimi.

Figure 7. Time-dependent variation of cumulative hydrogen gas volume in different microorganism amounts.



Şekil 8. Farklı mikroorganizma miktarlarında toplam şeker konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.

Figure 8. Time-dependent variation of total sugar concentration in different microorganism amounts.

Bu durum, düşük organizma konsantrasyonunda bakterilerin ortamdaki şekeri, hidrojen üretiminden ziyade öncelikli olarak büyümek ve hücre sayılarına göre ortamda yüksek konsantrasyonda bulunan şekere adapte olmak amacıyla kullandıklarını göstermektedir. Kalan tüm organizma miktarlarında hidrojen üretimi, fermentasyonun 2.günüden itibaren doğrusal olarak artış göstermekte ve üretim yaklaşık 164 ile 189. saatler aralığında sonlanmaktadır (Şekil 7).

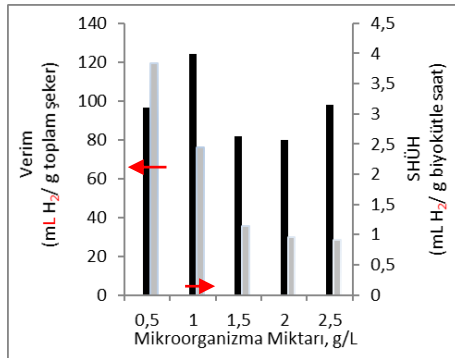
Kümülatif hidrojen üretiminin maksimum olduğu noktada deney ortamlarındaki TUYA konsantrasyonları Tablo 2'de ifade edilmiştir. Toplam AA ve BA konsantrasyonları tüm fermentasyon şişeleri için 18.35 ile 20.9 g/L aralığındadır ve hidrojen üretiminin asetik asitten ziyade bütirik asit yolağı üzerinden gerçekleştiği görülmektedir. Laktik asit, bütün şişelerde fermentasyonun ilk 164 sa. içerisinde birikim göstererek fermentasyonun son evrelerinde (hidrojen üretim hızında azalmaya paralel olarak) tüketilmeye/dönüşmeye başlamış ve hidrojen üretiminin maksimum olduğu zamanda tamamen tükenmiştir (veri gösterilmemiştir). Laktik asit tüketimine paralel olarak bütirik asit miktarında artış görülmesi laktik asidin bütirik aside dönüşmüş olabileceğini ortaya koymaktadır. En yüksek laktik asit konsantrasyonu üretimin 93. sa'te 2 g/L organizma içeren fermentasyon ortamında 22.65 g/L olarak elde edilirken en düşük laktik asit konsantrasyonu 1 g/L organizma içeren deney ortamında 15 g/L olarak elde edilmiştir. AA: BA oranına bakıldığında ise denenen fermentasyon ortamlarında benzer organik asitler üretildiğinden 0.24- 0.47 aralığında değiştiği görülmektedir.

Tablo 2. Farklı organizma miktarlarında nihai elde edilen toplam uçucu yağ asidi (TUVA) konsantrasyonları.

Table 2. Final total volatile fatty acid (TVFA) concentrations of different organism concentrations.

Mikroorganizma Miktarı (g/L)	Asetik Asit (g/L)	Bütrik Asit (g/L)	Laktik Asit (g/L)
0.5	3.67	15	0
1	3.95	14.9	0
1.5	4.9	14.5	0
2	5.96	14.9	0
2.5	5.85	12.5	0

Farklı mikroorganizma miktarlarındaki biyohidrojen gazı üretim verimleri ve hızları Şekil 9'da ifade edilmiştir. Kümülatif hidrojen üretimindeki durumun verim için de geçerli olduğu görülmektedir. Buna göre en yüksek verim 1 g/L organizma içeren deney ortamında 124.28 mL H₂/g toplam şeker (0.83 mol H₂/mol toplam şeker) olarak elde edilmiştir. En düşük verim ise, laktik asidin en yüksek konsantrasyonda birikim gösterdiği 2 g/L organizma içeren deney ortamında 79 mL H₂/g toplam şeker olarak bulunmuştur. Bu fermentasyon şişesinde organizma, ortamdaki şekeri büyük oranda laktik asit üretimi için kullandığından ve laktik asit yolağının hidrojen üretimi üzerinde net veriminin sıfır olduğu bilindiğinden, üretim veriminde diğer ortamlara nazaran daha fazla düşüş yaşandığı söylenebilir. Organizma konsantrasyonu arttıkça spesifik hidrojen üretim hızında düşüş gözlenmiştir. En yüksek Spesifik Hidrojen Üretim Hızı (SHÜH), 0.5 g/L organizma içeren fermentasyon ortamında 3.83 mL H₂/g biyokütle saat olarak bulunmuştur.



Şekil 9. Farklı mikroorganizma hidrojen üretim verimleri ve spesifik hidrojen gazı üretim hızları; ■ Verim, ■ SHÜH.

Figure 9. Hydrogen production efficiencies and specific hydrogen gas production rates in different microorganism concentrations; ■ Yield, ■ VHPR.

4 Sonuçlar

Çalışmada; önce mikrodalga ön işlemleri denenmiş ve aflotoksin gideriminin yanı sıra en yüksek çözünmüş şeker konsantrasyonunu veren dalga boyu 400 W olarak bulunmuştur. 100 g/L başlangıç incir konsantrasyonunda 10 dk. elde edilen çözünmüş şeker miktarı 89.7g/L olmuştur. Bu koşullarda %46.2 hidrolizlenme ve %77.8 aflotoksin giderimi sağlanmıştır. Mikrodalga ön işleminde dalga boyunun daha fazla arttığı koşullarda fermente edilebilir şeker miktarının düştüğü tespit edilmiş ve bunun nedeninin şekerin karamelize olarak yapısının bozulduğu kanaatine varılmıştır. Aflotoksinin giderilen kuru incir farklı substrat (11.8-118 g/L) ve organizma (0.5-2.5 g/L) konsantrasyonlarında fermentasyon ortamına eklenerek en iyi biyohidrojen gazı üreten koşullar tayin edilmiştir. En yüksek KHH, hidrojen gazı üretim verimi,

hidrojen gazı üretim hızına; 59 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda sırasıyla, 161.9 mL, 207.5 mL H₂/g toplam şeker, 1.75 mL/saattir. Substrat konsantrasyonu değişimlerinde üretilen organik asitlerden laktik asidin yüksek miktarlarda üretiliyor olmasına rağmen bazı koşullarda bütrik aside dönüştüğü gözlemlenmiştir. Bu da biyohidrojen gazı üretimlerinde artış sağlamıştır. 59 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu kullanılan organizma miktarı değişiminin hidrojen üretimi üzerine olan etkilerine bakıldığında ise tüm deneylerde şekerin tüketildiği gözlenmiştir. Hidrojen üretimi öncesi bakterilerin şekere adaptasyonu ve büyüme için kullanması sonrasında başlamış ve düşük organizma konsantrasyonlarında bu adaptasyon süresi uzun sürmüştür. Ancak tüm organizma konsantrasyonlarında KHH başarılı bir şekilde üretilmiş ve 340-440 mL arasında hidrojen gazı üretimi gerçekleşmiştir. Yoğunluklu olarak bütrik asit üretilen deney ortamlarında en yüksek hidrojen gazı üretim verimi 1 g/L organizma içeren deney ortamında 124.28 mL H₂/g toplam şeker olarak elde edilmiştir. Organizma konsantrasyonu arttıkça spesifik hidrojen üretim hızında düşüş gözlenmiştir. En yüksek SHÜH, 0.5 g/L organizma içeren fermentasyon ortamında 3.83 mL H₂/g biyokütle saat olarak bulunmuştur.

5 Conclusion

In the study; first, microwave pretreatment was conducted and the wavelength that gave the highest dissolved sugar concentration, as well as aflatoxin removal, was found to be 400 W. At the initial fig concentration of 100 g/L, the amount of dissolved sugar obtained in 10 minutes was 89.7 g/L. Under these conditions, 46.2% hydrolysis and 77.8% aflatoxin removal were achieved. In the microwave pretreatment, it was determined that the amount of fermentable sugar decreased under conditions where the wavelength increased more, and it was concluded that the reason for this was that the sugar caramelized and deteriorated its structure. The best biohydrogen gas producing conditions were determined by adding pretreated dried figs, which the aflatoxins were removed, to the fermentation medium at different substrate (11.8-118 g/L) and organism (0.5-2.5 g/L) concentrations. The highest Cumulative Hydrogen Volume (CHV), hydrogen gas production efficiency, hydrogen gas production rate; at an initial substrate concentration of 59 g/L, was 161.9 mL, 207.5 mL H₂/g total sugar and 1.75 mL/hr respectively. Although lactic acid is produced in high amounts from organic acids produced in different substrate concentrations, it has been observed that it turns into butyric acid under some conditions. This resulted in an increase in biohydrogen gas production. The effects of organism amounts were examined at an initial sugar concentration of 59 g/L. It was observed that sugar was consumed in all experiments. Hydrogen production began after the bacteria's adaptation to sugar and it is used for growth. This adaptation period took a long time at low organism concentrations. However, CGV was produced

successfully at all organism concentrations and hydrogen gas was produced between 340-440 mL. The highest hydrogen gas production efficiency was obtained as 124.28 mL H₂/g total sugar in the experimental bottle containing 1 g/L organism where butyric acid was densely produced. As the organism concentration increased, a decrease in the specific hydrogen production rate was observed. The highest Specific Hydrogen Production Rate (SHPR) was found as 3.83 mL H₂/g biomass hour in fermentation medium containing 0.5 g/L organism.

6 Teşekkür

Bu çalışma; Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2021.KB.FEN. 044 No.lu Proje ile desteklenmiştir.

7 Yazar katkı beyanı

Serpil OZMIHCI, fikrin oluşturulması, tasarımın yapılması, kaynak ve malzemelerin temini, literatür taraması, yazım ve eleştirel inceleme, makalenin hazırlanmasında katkı vermiştir.

İlknur HACIOĞLU, veri toplama, analizlerin gerçekleştirilmesi, literatür taraması, makalenin hazırlanmasında katkılar koymuştur.

8 Etik kurul onayı ve çıkar çatışması beyanı

Hazırlanan makalede etik kurul izni alınmasına gerek yoktur.

Hazırlanan makalede herhangi bir kişi/kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

9 Kaynaklar

- [1] Cheng D, Ngo HH, Guo W, Chang SW, Nguyen DD, Deng L, Chen Z, Ye Y, Bui XT, Hoang NB "Advanced strategies for enhancing dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment". *Bioresource Technology*, 351, 1-11, 2022.
- [2] Shao W, Wang Q, Rupani PF, Krishnan S, Ahmad F, Rezaia S, Rashid MA, Sha C, Din MFM. "Biohydrogen production via thermophilic fermentation: A prospective application of *Thermotoga* species". *Energy*, 197, 3-9, 2020.
- [3] Dursun N, Gülşen H. "Biyohidrojen üretim yöntemleri ve biyohidrojen üretiminde biyoreaktörlerin kullanımı". *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1), 66-75, 2019.
- [4] Kapdan İK, Kargı F "Bio-hydrogen production from waste materials". *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569-82, 2006
- [5] Ghosh S, Roy S. "Novel integration of biohydrogen production with fungal biodiesel production process". *Bioresource Technology*, 288, 2-7, 2019.
- [6] Azwar MY, Hussain MA, Abdul-Wahab AK "Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158-173, 2014.
- [7] Soares JF, Confortin TC, Todero I, Mayer FD, Mazutti MA. "Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 1-10, 2020.
- [8] Panin S, Setthapun W, Sinsuw AAE, Sintuya H, Chu CY. "Biohydrogen and biogas production from mashed and powdered vegetable residues by an enriched microflora in dark fermentation". *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(27), 14073-14082, 2020.
- [9] Srivastava N, Srivastav, M, Abd_Allah EF, Singh R, Hashem A, Gupta VK. "Biohydrogen production using kitchen waste as the potential substrate: A sustainable approach". *Chemosphere*, 271, 3-7, 2021.
- [10] Mahato RK, Kumar D, Rajagopalan G. "Biohydrogen production from fruit waste by *Clostridium* strain BOH3". *Renewable Energy*, 153, 1368-1377, 2020.
- [11] Wloch WC, Borowski S, Otlewska A. "Biohydrogen production from fruit and vegetable waste, sugar beet pulp and corn silage via dark fermentation". *Renewable Energy*, 153, 1226-1237, 2020.
- [12] Saravanan A, Kumar PS, Khoo KS, Show PL, Carolin C F, Jackulin CF, Jeevanantham S, Karishma S, Show KY, Lee DJ, Chang JS. "Biohydrogen from organic wastes as a clean and environment-friendly energy source: production pathways, feedstock types, and future prospects". *Bioresource Technology*, 342, 5-13, 2021.
- [13] Silva JS, Mendes JS, Correia JAC, Rocha MVP, Micoli L. "Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process". *Journal of Biotechnology*, 286, 71-78, 2018.
- [14] Amekan Y, Wangi DSAP, Cahyanto MN, Sarto-Widada J. "Effect of different inoculum combination on biohydrogen production from melon fruit waste". *International Journal of Renewable Energy Development*, 7(2), 101-109, 2018.
- [15] Akinbomi J, Taherzadeh MJ. "Evaluation of fermentative hydrogen production from single and mixed fruit wastes". *Energies*, 8(5), 4253-4272, 2015.
- [16] Yasin NHM, Mumtaz T, Hassan M. "Food waste and food processing waste for biohydrogen production: a review". *Journal of Environmental Management*, 130, 375-385, 2013.
- [17] Bakirci GT. "Investigation of aflatoxins levels in commercial dried figs from western Turkey". *International Food Reserach Journal*, 27(2), 245-251, 2020.
- [18] Unusan N. "Systematic review of mycotoxins in food and feeds in Turkey". *Food Control*, 97(12), 1-14, 2019.
- [19] Celiktas MS. "Sequential techniques for aflatoxin contaminated *Ficus carica* L. to produce bioethanol". *Journal of Biobased Mater Bioenergy*, 9(4), 410-416, 2015.
- [20] Giorni P, Pietri A, Bertuzzi T, Soldano M, Piccinini S, Rossi L, Battilani P. "Fate of mycotoxins and related fungi in the anaerobic digestion process". *Bioresource Technology*, 265, 554-557, 2018.
- [21] Ferrara M, Haidukowski M, D'Imperio M, Parente A, De Angelis E, Monaci L, F.Logrieco A, Mule G. "New insight into microbial degradation of mycotoxin during anaerobic digestion". *Waste Management*, 119, 215-225, 2021.
- [22] Tacconi C, Cucina M, Pezzolla D, Zadra C, Gigliotti G "Effect of the mycotoxin aflatoxin B1 on a semi-continuous anaerobic digestion process". *Waste Management*, 78, 467-473, 2018.
- [23] Zhang Y, Li M, Liu Y, Guan E, Bian K. "Degradation of aflatoxin B1 by water-assisted microwave irradiation: Kinetics, products and pathways". *LWT-Food Science and Technology*, 152, 5-8 2021.
- [24] Zhang Y, Li M, Liu Y, Guan E, Bian K. "Reduction of aflatoxin B1 in Corn by water-assisted microwaves treatment and its effects on corn quality". *Toxins*, 12(9), 1-10, 2020.
- [25] Ployer HR, Ahmed EM, Wei CI. "Destruction of aflatoxin on peanuts by oven and microwave roasting". *Journal of Food Protection*, 50, 504-508, 1987.

- [26] Farag RS, Rashed MM, Hgger AAA. "Aflatoxin destruction by microwave heating". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, 197-208, 1996.
- [27] Özmihci S, Hacıoğlu İ, Altındağ EE. "Impacts of mycotoxin on biohydrogen production from waste dry fruits". *Journal Mater Cycles Waste Managment* 24, 1736-1746, 2022.
- [28] Eckert Carrie A, Cong T. *Trinh*, 1st ed. Biotechnology for biofuel production and optimization. USA, Elsevier, 2016.
- [29] Eker S, Sarp M. "Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations". *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2562-2568, 2017.
- [30] Argun H, Kargı F, Kapdan İK, Öztekin R. "Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations". *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6109-6115, 2008.
- [31] Liu, Dawei, et al. Bio-Hydrogen Production By Dark Fermentation From Organic Wastes and Residues. Ph.D Thesis, DTU, Department of Environmental Engineering, KGS. Lyngby, Denmark, 2008.
- [32] El-Wany Mahmoud. Hydrolysis of Rice Straw for Production of Soluble Sugars. MSc Thesis, The American University in Cairo, School of Science and Engineering, Cairo, Egypt 2021.
- [33] Abibu WA, Karapınar İ. "Optimization of pretreatment conditions of fig (*Ficus carica*) using autoclave and microwave treatments". *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007.s13399-022-02688-7>, 2022.
- [34] Detman, Anna, et al. "Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: Clostridium butyricum and microbial communities from dark fermentation bioreactors". *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-12, 2019.
- [35] Tao Y, Hu X, Zhu X, Jin H, Xu Z, Tang Q, Li X. "Production of Butyrate from Lactate by a Newly Isolated *Clostridium* sp. BPY5". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179, 361-374, 2016.