



T.C.

Ardahan Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Çevre Sağlığı Ana Bilim Dalı

Çevre Sağlığı Bilim Dalı

**ANAEROBİK BİYOREAKTÖRDE ATIK ÇÖREK OTUNUN (*Nigella
Sativa*) BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Betül ÇELİK

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN

Yüksek Lisans Tezi

Ardahan, 2025

ANAEROBİK BİYOREAKTÖRDE ATIK ÇÖREK OTUNUN (*Nigella Sativa*)
BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Betül ÇELİK

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN

Ardahan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Çevre Sağlığı Ana Bilim Dalı
Çevre Sağlığı Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Ardahan, 2025

KABUL VE ONAY

Betül ÇELİK tarafından hazırlanan “Anaerobik Biyoreaktörde Atık Çörek Otunun (*Nigella Sativa*) Biyoetanol Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, 16/07/2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayla BİLGİN (Başkan)

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN (Danışman)

Doç. Dr. Burcu AKÇA

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa ŞENEL
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Ardahan Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinleri yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / Ardahan Üniversitesi Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

16/07/2025

Betül ÇELİK

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince **enstitü** veya **fakülte** tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, **Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN** danışmanlığında tarafımdan retilildiğini ve Ardahan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Betül ÇELİK

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimi, deneyimi ve destekleriyle akademik gelişimime büyük katkı sağlayan danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN'a değerli önerileri, teşvikleri ve sabrı için içtenlikle teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde her zaman yanımda olan, fedakârlıktan kaçınmayarak eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her daim beni destekleyen kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışması sürecinde bana her türlü yardımı sağlayan tüm arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmasını maddi olarak destekleyen Ardahan Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne [Proje No: 2024-2)ÖNP-Lisa-003] ve etanol analizi için hizmet alımı yapılan Ardahan Üniversitesi ARÜLAB'a teşekkür ederim.

Betül ÇELİK
Ardahan, 2025

ÖZET

ÇELİK, Betül. *Anaerobik Biyoreaktörde Atık Çörek Otu (Nigella Sativa) Biyoetanol Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ardahan, 2025.

Dünyada enerji ihtiyacının artması, alternatif enerji kaynakları arayışını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle biyometan, biyohidrojen, biyokömür, biyodizel ve biyoetanol gibi yenilenebilir enerji kaynaklarına ilgi artmıştır. Biyoyakıt üretiminde, hammadde yerine çeşitli organik kökenli atık tipleri kullanımı tercihi, maliyet ve atık yönetimi göz önüne alındığında son yıllarda daha cazip hale gelmiştir. Organik atıklar, sera gazı salınımı başta olmak üzere su ve toprak kirliliği gibi çevre sorunlarına neden olmaktadır. Bu sorunları, minimize etmek için organik atıkların yönetimine ilişkin stratejiler geliştirilmelidir. Bu kapsamda, organik atık biyokütle tiplerinin çevre dostu biyoetanol üretiminde değerlendirilmesi son yıllarda araştırmacıların odak noktası olmuştur. Bu kapsamda, Türkiye’de soğuk pres çörek otu yağı üretimi sonrası üreticiler tarafından elde edilen atık posa da biyoetanol üretimi için değerlendirilebilir. Bu atık, genel olarak çöpe atılmaktadır. Bazen de, hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Tez çalışmasının özgün yanı, organik kökenli çörek otu posası atığı kullanılarak biyoetanol üretim potansiyelini belirlemek olup, bu kapsamda literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmada, yağ üretimi sonrası üreticiler tarafından elde edilmiş atık temin edilmiştir. Bu atıklar, karışık bakteriler ile biyoetanol üretimi amacıyla ham madde olarak incelenmiştir. Tez çalışmasında, çörek otu posası atığının (i) doğrudan (5 gr çörek otu/L ve 10 gr çörek otu/L) ve (ii) dekoksasyon ön işlemi sonrası ekstrakt sıvısı (5 gr çörek otu ekstraktı/L ve 10 gr çörek otu ekstraktı/L) olarak iki şekilde kullanımı ile, farklı organik yükleme oranları ve 5.0 başlangıç pH değerinde işletilecek anaerobik kesikli reaktörlerde (ABRs), biyoetanol üretim performansının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada, 5 gr çörek otu/L ve 10 gr çörek otu/L olarak doğrudan kullanımda sırasıyla maksimum 5.53 mL ve 8.07 mL biyoetanol üretimi saptanmıştır. Ayrıca, 5 gr çörek otu ekstraktı/L kullanılan biyoreaktörlerde 2.89 mL ve 10 gr çörek otu ekstraktı/L kullanılan biyoreaktörlerde 2.79 mL biyoetanol üretimi

belirlenmiştir. Sonuç olarak, biyoetanol üretimi amacıyla çörek otu posasının ham madde olarak kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın, dünyada biyoetanol üretimi ve atık yönetimine ilişkin stratejilere, literatüre önemli katkı sağlaması öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler:

Atık çörek otu, Anaerobik biyoreaktör, Karışık bakteri, Biyoetanol üretimi



ABSTRACT

ÇELİK, Betül. *Investigation of the Potential for Use of Waste Black Cumin (Nigella Sativa) in Bioethanol Production in Anaerobic Bioreactor*, Master's Thesis, Ardahan, 2025.

The increasing worldwide energy demand has forced the pursuit of alternative energy sources. This has led to growing interest in renewable energy sources, including biomethane, biohydrogen, biochar, biodiesel, and bioethanol. In biofuel production, the preference for using various types of organic wastes instead of raw materials has become more appealing in recent years, considering cost and waste management. Organic wastes cause environmental problems, including greenhouse gas emissions and water and soil pollution. To minimize these issues, it is necessary to develop strategies for organic waste management. In this regard, the utilization of organic waste biomass types for environmentally friendly bioethanol production has been the focus of researchers in recent years. In this respect, in Turkey, the waste pulp generated from cold-pressed black cumin oil production can also be utilized for bioethanol production. This waste is mostly disposed of in the garbage. Occasionally, it is also used as animal feed. The unique aspect of the thesis is to determine the potential of bioethanol production using organic black cumin pulp waste, and no study has been found in the literature in this context. Therefore, in this study, waste obtained by producers after oil production was acquired. These wastes were examined as raw material for bioethanol production with mixed bacteria. The thesis aims to determine the bioethanol production performance in anaerobic batch reactors (ABRs) operated at different organic loading rates and initial pH value of 5.0 by using black cumin pulp waste (i) directly (5 gr black cumin/L ve 10 gr black cumin/L) and (ii) as extracted liquid after decoction pretreatment (5 gr black cumin extract/L ve 10 gr black cumin extract/L). In the study, a maximum bioethanol production of 5.53 mL and 8.07 mL was determined in the direct use of 5 g black cumin/L and 10 g black cumin/L, respectively. In addition, 2.89 mL bioethanol production was determined in bioreactors using 5 g black cumin extract/L, and 2.79 mL bioethanol production was determined in bioreactors using 10 g black cumin extract/L. As a result, it was determined that black cumin pulp can be used as a

raw material for bioethanol production. This study is envisioned to make a significant contribution to the strategies and literature on global bioethanol production and waste management.

Keywords:

Waste Black Cumin, Anaerobic bioreactor, Mixed bacteria, Bioethanol production



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	ii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖN SÖZ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
GİRİŞ	1
1. BÖLÜM.....	5
GENEL BİLGİLER.....	5
1.1. BİYOKÜTLE KAYNAKLARI	5
1.2. ÇÖREK OTU KARAKTERİSTİĞİ VE KULLANIM ALANLARI.....	6
1.3. KATI MADDELERE UYGULANAN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ	7
1.4. BİYOETANOL ÜRETİMİNDE AŞAMALAR.....	9
1.4.1. Önişlemler.....	9
1.4.2. Enzimatik Hidroliz.....	13
1.4.3. Fermantasyon.....	13
1.4.3.1. Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon (SHF).....	13
1.4.3.2. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-fermantasyon (SSCF)	13
1.4.3.3. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon (SSF)	14
1.5. ETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR.....	14
1.6. ETANOL ÜRETİMİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	15
2. BÖLÜM.....	18
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	18

2.1. SPESİFİK BAKTERİ VE MAYA KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ	18
2.1.1. Atıksular Kullanılarak Biyoetanol Üretimi.....	18
2.1.2. Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi	22
2.1.2.1. Tek Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi	22
2.1.2.2. İki ve Üzeri Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi.....	25
2.2. KARIŞIK BAKTERİLER KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ	28
2.2.1. Atıksular Kullanılarak Biyoetanol Üretimi.....	28
2.2.2. Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi	29
2.2.2.1. Tek Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi	29
2.2.2.2. İki ve Üzeri Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi.....	30
3. BÖLÜM.....	35
MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1. MATERYAL.....	35
3.1.1. Çörek Otu Atığı, Aşı ve İz Elementler.....	35
3.1.2. Su	36
3.1.3. Biyoreaktörler	36
3.2. YÖNTEM	36
3.2.1. Ham maddenin Öğütülmesi ve Karakterizasyonu	36
3.2.2. Ön İşlem Uygulamaları.....	37
3.2.2.1. Çörek Otu Atığına Uygulanan Ön İşlem.....	37
3.2.2.2. Aşıya Uygulanan Ön İşlem	38
3.2.3. Biyoreaktörlerin Kurulumu.....	38
3.2.4. Analitik Yöntemler	39
4. BÖLÜM.....	40
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	40

4.1. HAM ÇÖREK OTU ATIĞI KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ	40
4.2. ÇÖREK OTU ATIĞI EKSTRAKT SIVISI KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ	45
SONUÇ.....	49
KAYNAKÇA	51
EKLER.....	65
EK 1. ETANOL KALİBRASYON EĞRİSİ.....	65
EK 2. ORJİNALLİK RAPORU FORMU	66
EK 3. ETİK KURUL MUAFİYET FORMU	67
ÖZ GEÇMİŞ.....	68

KISALTMALAR DİZİNİ

g	Gram
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
L	Litre
mL	Mili litre
mm	Mili metre
mPa	Mili paskal
SHF	Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon
SSCF	Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Kofermantasyon
SSF	Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çörek otunun genel kimyasal bileşimi.....	7
Tablo 2. Kesikli biyoreaktörde işletim koşullarına göre biyoetanol üretimine yönelik araştırmalar.....	32
Tablo 3. Kampüs musluk suyu analiz sonuçları.....	36
Tablo 4. Çörek otu atığı karakterizasyonu	37



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyoetanol üretiminde kullanılan biyokütle tipleri	6
Şekil 2. Soğuk pres çörek otu yağı üretimi sonrası atık olarak oluşan çörek otu posası	35
Şekil 3. Aynı koşullarda işletilen biyoreaktörler	36
Şekil 4. Mekanik öğütücü	37
Şekil 5. Çörek otu atığı biyokütlesinin 5 gr çörek otu/L olarak doğrudan kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi	41
Şekil 6. Çörek otu atığı biyokütlesinin 10 gr çörek otu/L olarak doğrudan kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi	42
Şekil 7. Çörek otu atığı ekstrakt sıvısının 5 gr çörek otu ekstraktı/L olarak kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi	46
Şekil 8. Çörek otu atığı ekstrakt sıvısının 10 gr çörek otu ekstraktı/L olarak kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi	47

GİRİŞ

Biyokütle genel olarak çayır, bitki sapları ve ağaçlar gibi çeşitli organik materyalleri kapsamaktadır. Tarım alanlarından elde edilen enerji için kullanılan biyokütle şeker kamışı posası, mısır koçanı, patates sapı, palmiye atıkları, buğday sapı, ayçiçeği artıkları ve kolza yağı presleme kalıntıları olarak bildirilmiştir. Biyokütleden enerji eldesi kapsamında, gıda ürünlerinin tüketilmeyen kısımlarından da faydalanılmaktadır. Bunlar meyve kabukları, tohumlar, çekirdekler ve endüstriyel üretim sonrası artıklar olarak belirtilebilir. Yenilenebilir ve sürdürülebilir biyokütle; geniş ölçekli enerji üretimi açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Ayrıca, biyolojik olarak parçalanabilir, düşük maliyetli ve bol miktarda bulunabilirliği ile çevresel ve ekonomik açıdan avantajlı bir alternatiftir (Ab Rasid ve diğerleri, 2021).

Biyo-etanol (C_2H_5OH), çeşitli biyokütle atık veya kalıntılardan üretilebilen sıvı biyoyakıtlardan biri olup, yenilenebilir ve biyo bazlı olması nedeniyle cazip alternatif yakıtlardan biridir (Nair ve diğerleri, 2017). Biyoetanol buğday, şeker kamışı, mısır gibi nişastalı temel şeker içerikli ürünlerden üretilmektedir. Ancak, şeker ve nişasta içeren bu ham maddeler ağırlıklı olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır. Bu durum, bu ürünlerin gıda üretimi rekabetini arttırarak, sürekli tedarikini etkilemektedir (Tan ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, etanol üretiminde, gıda çatışmasını önleyen lignoselülozik biyokütle, son yıllarda araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir (Sveinsdottir ve diğerleri, 2011). Odun talaşı ve mahsul artıkları (pirinç samanı, buğday samanı, mısır samanı, şeker kamışı küspesi vb.) gibi tarımsal atık malzemeler, etanol üretimi için yenilenebilir, düşük maliyetli ve bol miktarda bulunan ham maddelerdir (Nair ve diğerleri, 2017). Bu avantajlarına ilaveten, tarımsal atık veya kalıntıların etanol üretiminde kullanımının hava, su ve toprak kirliliği riskini azaltma avantajı olduğu bildirilmiştir (Champagne, 2007). Bu avantajları nedeniyle, lignoselülozik atık veya kalıntılar önemli ham madde kaynağı olarak biyoetanol üretiminde değerlendirilebilir. Lignoselülozik malzemeler, karmaşık biyopolimerlerden (lignin, selüloz ve hemiselüloz) oluşmaktadır. Bu polimerik malzemelerden, selüloz ve hemiselüloz etanol üretimi için kullanılabilir. Ancak, fermantasyon öncesinde polimerlerin fizyolojik, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle ayrıştırılması gerekmektedir. Bu kapsamda, asit ve alkali kimyasal ön işlem yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlere

ilaveten, enzimatik ön işlem de uygulanmaktadır. Lignoselülozik malzemelerin hemiselülozik fraksiyonunda iki ana bileşen olan arabinoz ve ksilozun kullanılamaması, daha geniş substrat spektrumuna sahip diğer bakterilerin kullanımına olan ilginin artmasına neden olmuştur. Bakterilerin; pentozlar, heksozlar, disakkaritler ve hatta bazı durumlarda selüloz, pektin ve ksilanlar gibi polimerleri parçalayabilme yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Lee ve diğerleri, 1993; Rainey ve diğerleri, 1994). Bakterilerin genelinin düşük substrat konsantrasyonlarını tolere ettiği bilinse de beslemeli kesikli veya sürekli kültür kullanımı bu sorunu azaltabilir. Termofilik mikroorganizmaların kullanımı özellikle son zamanlarda artmıştır. Bunun nedeni, yüksek büyüme oranları ve daha az kontaminasyon riski olarak bildirilmiştir. Ayrıca, etanol üretimi için lignoselülozik biyokütleyi hidrolize etme ve elde edilen şekerleri etanole fermente etme kapasitesine sahip bakterileri eş zamanlı olarak kullanma imkânı umut verici yöntem olarak rapor edilmiştir (Sveinsdottir ve diğerleri, 2011).

Termofil anaerobların çeşitli substratlardan etanol üretebilmeleri ve bazı türlerin selüloz, nişasta ve ksilan dahil hemiselülozlar gibi biyopolimerleri parçalayabilmeleri nedeniyle termofil anaeroblara ilgi artmıştır. Bu mikroorganizmalar, büyüme sıcaklıklarına göre kategorize edilmektedir. Orta dereceli termofillerin 50-64 °C, aşırı termofillerin 65-79 °C, hipertermofillerin ise 80 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda optimum olarak büyüdüğü bildirilmiştir (Scully ve Orlygsson, 2015). Etanol üreten termofil üyeler *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* ve *Caloramator* cinsleri olmasına rağmen, yüksek etanol üretme kapasitesine sahip termofil anaerob türlerin *Clostridium*, *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacter* veya *Thermoanaerobacterium* cinsi üyeler olduğu rapor edilmiştir. Çoğu cins içindeki türlerin fizyolojisi ve etanol üretim potansiyeli kapsamlı araştırılmamıştır; yapılmış çalışmalarda tipik olarak her cins içindeki bir veya iki üyeye odaklanılmıştır (Sveinsdottir ve diğerleri, 2011; Scully ve Orlygsson, 2015). *Clostridium* cinsi bakteriler spor oluşturmakta ve genellikle bitki çürümesi bakımından zengin ortamlarda bulunmaktadır. Bu nedenle, birçok tür polimerik malzemeleri hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Canganella ve Wiegel, 1993; Carreira ve Ljungdahl, 1993).

Organik atıklardan karışık kültür kullanılarak biyoetanol üretimi umut verici bir yol olmasına rağmen, tanımlanmamış karışık kültürlerde istikrarlı etanol üretimini aktive etme zorluk olmaya devam etmektedir. Bu kapsamda Carrillo-Barragán ve

diğerleri (2021) tarafından yapılan çalışmada, başlangıçta aerobik koşullar ve başlangıç pH'sı ≤ 5.5 olarak düşük proses kontrolü altında, koyun işkembesi ve anaerobik çamur karışımlarından zenginleştirilmiş mikrobiyal topluluklar kullanılarak katı atıklardan etanol üretilmesi amaçlanmıştır. Stabil bir çalışma için 3 ila 14 gün arasında değişen sıralı aşısı transfer aralıkları incelenmiştir. 3 günlük transfer aralığında, ana çözünür fermantasyon ürünü olarak sürekli etanol üreten kararlı bir topluluk olduğu saptanmıştır. Singla ve diğerleri (2014) tarafından yapılan çalışmada da sentez gazı fermantasyonundan etanol üretebilen anaerobik karışık bakteri kültürü zenginleştirilmiştir. Çalışmada, gelişmiş etanol üretimi için işletimsel parametrelerin optimize değerleri; başlangıç ortam pH'sı 6.0 ± 0.1 , inkübasyon sıcaklığı $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve çalkalama hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada da karışık bakteriler kullanılarak, 5.0 başlangıç pH'sında ve $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ işletim koşullarında biyoetanol üretimi incelenmiştir.

Organik kökenli atıkların biyoyakıt üretiminde kullanımı, atık yönetimine katkı sağlama ve ham madde olarak kullanılabilirliği avantajları nedeniyle ilgi çekicidir. Bu kapsamda, soğuk pres çörek otu yağı üretimi sonrası elde edilen organik kökenli atık posası, genel olarak çöpe atılmaktadır. Bazen de hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Tez çalışmasının özgün yanı, organik kökenli çörek otu posası atığının azaltılmasına katkı sağlanarak, ham madde olarak biyoetanol üretimi için ilk defa kullanılacak olmasıdır.

Bu tez çalışması ile, soğuk pres çörek otu yağı üretimi yapan üreticiler tarafından, genel olarak çöpe atılan çörek otu posasının farklı organik yükleme oranlarında ham madde olarak doğrudan kullanım veya ön işleme tabi tutularak kullanıma göre biyoetanol üretimi için kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile, dünyada biyoetanol üretim ve uygulama alanlarına yönelik stratejilere, literatüre önemli katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Çörek otu posası atığının biyoetanol üretimi için değerlendirilmesi ile hem atık bertarafı hem de katma değerli ürün anlamında çevreci olacağı, dolayısıyla ülke ekonomisine katkı sağlama da dikkat çekici olacağı öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında, çörek otu posasının farklı organik yükleme oranları ve ham madde olarak doğrudan kullanım veya ön işleme tabi tutularak kullanımı ile biyoetanol üretim potansiyeli belirlenmiştir. Çalışmanın birinci bölümünde genel bilgiler, ikinci

bölümünde önceki çalışmalar, üçüncü bölümünde materyal ve yöntem, dördüncü bölümünde araştırma bulguları ve tartışmaya yer verilmiştir. Son olarak da sonuçlar ve öneriler sunulmuştur.



1. BÖLÜM

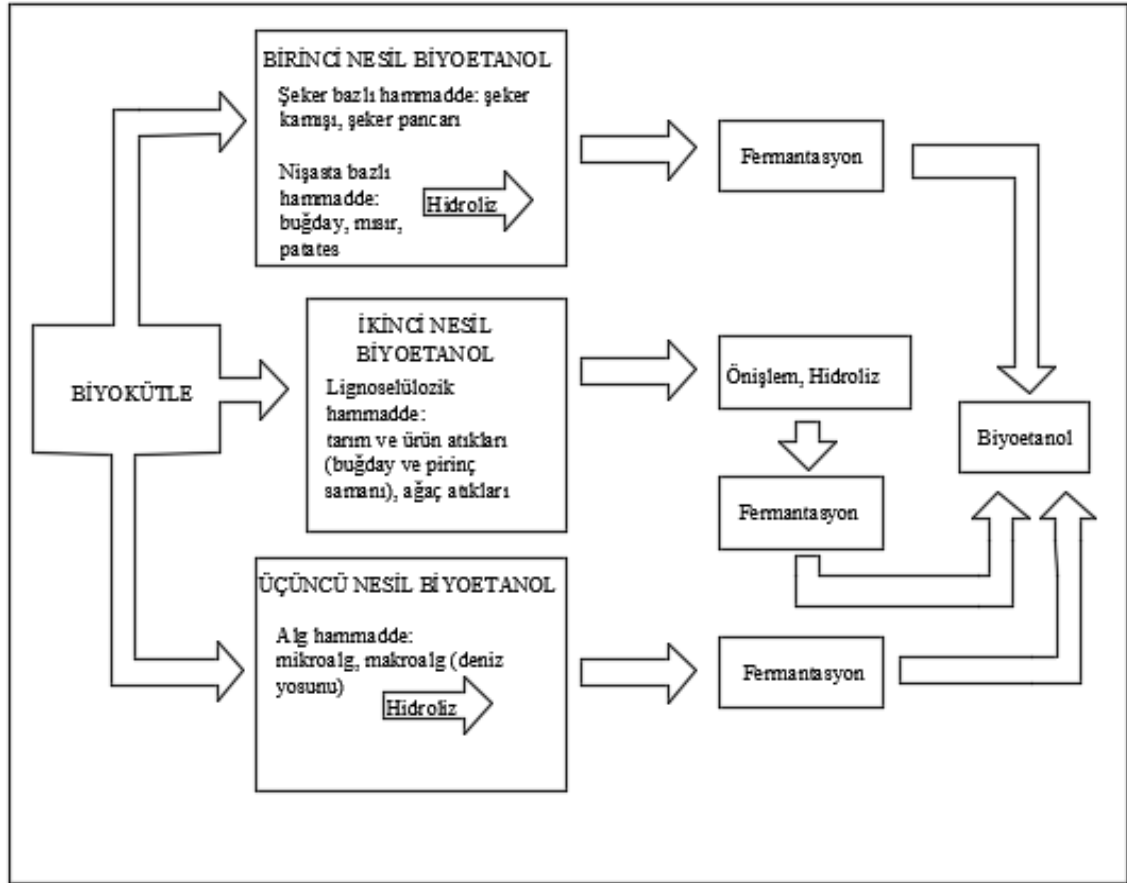
GENEL BİLGİLER

1.1. BİYOKÜTLE KAYNAKLARI

Biyokütle, sürdürülebilir enerji üretimi potansiyeli ve geniş kullanılabilirliği nedeniyle artan öneme sahip olan yenilenebilir bir enerji kaynağıdır. Biyokütle, birçok endüstriyel ve tarımsal sürecin yan ürünü olarak elde edilmektedir, bu da biyokütleyi enerji üretimi için kolay erişilebilir bir kaynak yapmaktadır. Biyokütle, doğal süreçlerle yenilenebilen organik malzemelerden türetildiği için sürdürülebilir bir enerji kaynağıdır. Bitki ve hayvanlardan elde edilen organik maddeye dayanmaktadır. Biyokütle tarımsal artıklar, ormancılık kalıntıları ve enerji mahsulleri gibi biyosferde bulunan tüm organik maddelere dayanmaktadır (Perea-Moreno ve diğerleri, 2019). Biyokütle, farklı dönüşüm süreçleriyle ısı, elektrik ve biyoyakıtlar gibi çeşitli enerji formlarına dönüştürülebilir (David ve diğerleri, 2019). Biyokütle dönüşüm teknolojilerindeki ilerlemeler, biyokütle enerji üretiminin verimliliğini ve etkinliğini önemli ölçüde artırmıştır (Wang ve diğerleri, 2023). Biyokütleden termokimyasal ve biyokimyasal dönüşümle elde edilen biyoyakıt, önemli yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olup katı, sıvı (biyoetanol ve biyodizel) ve gaz (biyometan, biyohidrojen ve sentez gazı) olarak üç şekilde elde edilmektedir (Zhao ve diğerleri, 2022).

Biyoyakıtlar ham madde kaynaklarına göre birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Dördüncü nesil biyoyakıt üretimi için araştırmalar yeni olsa da genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar kullanılarak elde edildiği bildirilmiştir. Birinci nesil biyoyakıt üretiminde, tarımsal faaliyet alanlarının gıda üretimi yerine biyoyakıt üretimi için ayrılması gerekmektedir. Böyle durumda, gıda fiyatları artarak gıda arz güvenliğini tehlikeli duruma getirebilir. Birinci nesil biyoyakıtlar, düşük üretim maliyeti ve daha düşük sera gazı emisyonu avantajıyla mısır, şeker kamışı ve soya fasulyesi gibi ürünlerden üretilmektedir. İkinci nesil biyoyakıtlar için ana ham madde, (i) tatlı sorgum, şeker kamışı posası ve saman gibi tarımsal artıklar, (ii) enerji mahsulleri ve odunsu bitkiler gibi orman artıkları olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Gelişmiş biyoyakıt olarak adlandırılan ikinci nesil biyoyakıtlar,

organik atık kaynaklardan üretilmektedir. İkinci nesil biyoyakıtların üretimi, ucuz ham madde kullanımı nedeniyle ekonomik olup, ticari biyoyakıt üretimi bu nesil biyoyakıtlardan karşılanmaktadır. İkinci nesil biyoyakıtlar tarımsal atıklar, orman kalıntıları gibi gıda dışı kaynaklardan ve dallı darı gibi enerji bitkilerinden üretilmektedir. Alglar kullanılarak da üçüncü nesil biyoyakıtlar üretilmekte olup, bu nesil biyoyakıtların üretiminin maliyetli olduğu rapor edilmiştir (Çakmak ve Özcan, 2021; Mahapatra ve diğerleri, 2023; Rezania ve diğerleri, 2020a; Abdullah ve diğerleri, 2019). Birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoetanol üretiminde kullanılan biyokütle tipleri Şekil 1’de sunulmuştur (Melendez ve diğerleri, 2022).



Şekil 1. Biyoetanol üretiminde kullanılan biyokütle tipleri

1.2. ÇÖREK OTU KARAKTERİSTİĞİ VE KULLANIM ALANLARI

Çörek otu (*Nigella sativa*), düğünçiçeğigiller (*Ranunculaceae*) familyasına ait bir bitki türüdür. Çörek otu, genellikle sıcak iklimlerde yetişen bir yıllık otsu bitkidir ve 30-50 cm yüksekliğe ulaşabilmektedir. Bitkinin gövdesi dik, tüylü ve yeşil renkte olup,

yaprakları ince, parçalı ve keskin kenarlara sahiptir. Çörek otu bitkisi, genellikle bahar aylarında çiçek açmaktadır. Çiçekleri mavi, beyaz veya mor tonlarında olup, beş taç yaprağına sahiptir. Bu çiçeklerin ortasında, çok sayıda erkek organ bulunur, bu da bitkinin polinatörler tarafından kolayca tozlaşmasını sağlamaktadır. Çiçekler, daha sonra kapsül şeklindeki meyvelere dönüşmektedir. Çörek otu tohumları, bitkinin en önemli kısmıdır ve genellikle baharat olarak kullanılmaktadır. Tohumlar 3-4 köşeli bir yapıya sahip olup, 1.5-2 mm genişliğinde ve 2.5-4 mm uzunluğundadır. Siyah renkte ve oval şekillidir. Tohumlar; keskin, karakteristik bir aroma ve hafif acı bir tat taşımaktadır (Baydar, 2013; İş ve Beyatlı, 2023). Çörek otunun genel kimyasal bileşimi Tablo 1’de sunulmuştur (Al-Jassir, 1992).

Tablo 1. Çörek otunun genel kimyasal bileşimi

Bileşen	Ağırlığa göre % oran
Protein	20.9 ± 1.35
Karbonhidrat	31.9 ± 2.56
Yağ	38.2 ± 2.20
Diğer (kül, lif vb.)	~ 9.0

Nigella sativa tohumları ve bu tohumlardan elde edilen yağ, Hindistan ve Arap uygarlıklarında yüzyıllardır hem gıda hem de tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Yarnell ve Abascal, 2011). Geleneksel olarak çörek otu tohumları; astım, bronşit, romatizma ve diğer enflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *N. sativa*; diüretik, antihipertansif, antidiyabetik, antikanser, immünomodülatör, antimikrobiyal, anthelmintik, analjezik ve antiinflamatuvar, spazmolitik, bronkodilatör, mide koruyucu, karaciğer koruyucu ve böbrek koruyucu gibi geniş bir farmakolojik etki yelpazesine sahiptir. Geleneksel kullanım alanları arasında; astım, diyabet, hipertansiyon, ateş, iltihaplanma, bronşit, baş dönmesi, romatizma, cilt hastalıkları ve gastrointestinal bozukluklar yer almaktadır. Ayrıca sindirimi destekleyici, antiparaziter ve bağışıklık sistemini güçlendirici olarak da kullanılmaktadır (Goreja, 2003; Srinivasan, 2018).

1.3. KATI MADDELERE UYGULANAN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Maserasyon, en az üç gün boyunca oda koşullarında bir çözücüde kaba veya toz formunda hazırlanmış ham maddenin, aralıklı çalkalama ile ıslatılmasını içeren basit bir ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntemde, bitkisel materyal çözücü içerisinde bekletilirken

hücre duvarları yumuşayarak parçalanmaktadır, böylece fitokimyasalların serbest kalması sağlanmaktadır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra, karışım ya eleklerden ya da küçük delikli bir ağdan süzülmeştir. Bunu takiben, katı kısmı preslenmekte ve sıvı özüt bekletildikten sonra filtrasyon veya dekantasyon kullanılarak temizlenmektedir. Maserasyon, buharlaşma yoluyla çözücü kaybını en aza indirmek için tercihen tıpalı bir kapta gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon işlemi sırasında çözücünün buharlaştırılması yoluyla konsantre bir özüt elde edilmesi hedeflenmemektedir. Ürün, vakumlu buharlaştırma kullanılarak sıklıkla konsantre edilmektedir (Bitwell ve diğerleri, 2023; Zhang ve diğerleri, 2018).

Dijestiyon, maserasyona benzer bir ekstraksiyon yöntemidir ve ekstraksiyon sürecinde düşük ısıtma kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sıcaklığın belirli bitki materyalinin biyoaktif fitokimyasallarını değıştirmesinden kaçınmak için dikkatli olunmalıdır. Bu nedenle, ısıtma nedeniyle ekstraksiyon çözücüsünün kullanılmasında artan bir verimlilik vardır. Sıcaklık, çoğunlukla 35 ila 40 °C aralığında tutulmaktadır, ancak kabuklar ve iyi çözünmeyen fitokimyasalları içeren materyaller daha sert bitki materyalleri için maksimum 50 °C'ye kadar artırılabilir. Ekstraksiyon sırasında, istenen bitki parçaları belirtilen sıcaklıklara önceden ısıtılmış uygun çözücü ile bir kaba konulmaktadır. Optimum sıcaklık, kabın düzenli aralıklarla çalkalanmasıyla yarım saatten 24 saate kadar değışebilen bir süre boyunca korunmaktadır (Bitwell ve diğerleri, 2023).

İnfüzyon, maserasyonla aynı ekstraksiyon prensibine dayanmakta olup, öğütülmüş bitkisel materyale belirli bir miktar soğuk veya kaynar su eklenerek kısa süre bekletilmesini içeren bir yöntemdir. Bu teknik, özellikle kolay çözünür bileşiklerin elde edilmesinde kullanılır ve genellikle bitkisel ilaçlar ile çeşitli çayların hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilmektedir (Azwanida, 2015). İnfüzyon, çözünürlüğü yüksek olan fito-besinlerin bitkisel ham maddelerden basit bir kimyasal işlemle seyreltilmiş çözeltiler halinde elde edilmesini sağlamaktadır (Hussain ve diğerleri, 2019).

Perkolasyon, çözücünün toz halindeki bitkisel materyal üzerine kontrollü bir hızda yavaşça eklenerek, çözünen maddelerin çözücü tarafından absorbe edilip kabın alt kısmından süzülmesi esasına dayanan etkili bir ekstraksiyon yöntemidir (Azwanida, 2015; Rathi ve diğerleri, 2006). Bu işlemde, ekstraksiyon tamamlanana kadar genellikle dakikada yaklaşık altı damla olacak şekilde kontrollü hızda devam edilmekte ve elde

edilen ekstraktlar evaporasyon yöntemiyle yoğunlaştırılmaktadır (Azwanida, 2015). Perkolasyon yöntemi ıslatma, bekletme (şişirme) ve perkolasyon olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, bitkisel materyal genellikle 4–5 saat boyunca çözücü ile ıslatılmaktadır; ardından 24–48 saat süren bekletme aşamasıyla hücre yapısının şişmesi sağlanarak çözücünün penetrasyonu kolaylaştırılmaktadır. Son aşamada ise, belirli bir hızda (örneğin perkolatör hacminin 1/48'i kadar saatte) çözücü bitkisel materyal üzerinden geçirilmektedir (Tabaraşu ve diğerleri, 2022).

Dekoksiyon sırasında bitki materyali 15 ila 60 dakika boyunca suda kaynatılmaktadır. Bu yöntem kök, kabuk gibi daha sert bitkisel materyallerde bulunan bileşenlerin elde edilmesinde tercih edilmektedir. Genellikle yapraklar, kökler, çiçekler gibi hassas bitki parçaları 15 dakika kaynatılmaktadır. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra, karışım sıvı özütü elde etmek için süzülmemektedir (Azwanida, 2015; Bitwell ve diğerleri, 2023).

1.4. BİYOETANOL ÜRETİMİNDE AŞAMALAR

1.4.1. Ön işlemler

Mekanik Parçalama (Öğütme): Ön işlemin ilk adımı olarak öğütme kabul edilmektedir. Biyoetanol üretim süreçlerinde kullanılan öğütme türlerinden bazıları bilyalı öğütme, çekiçli öğütme, iki silindirli öğütme, kolloid öğütme ve disk öğütme olarak sıralanabilir. Öğütme sonrası elde edilen boyut, fiziksel ön işlemin türüne bağlıdır (Mood ve diğerleri, 2013). Biyokütle, yüzey alanı artması sayesinde, hidroliz aşamasındaki enzimatik reaksiyonları daha verimli hale getirmektedir (Chaturvedi ve Verma, 2013).

Mikrodalga: Mikrodalga ön işlemin parametreleri; güç aralığı 100–1100 W, frekans 1 kHz ile 300 GHz arasında, sıcaklık 27 °C–700 °C ve işlem süresi 4–30 dakika aralıklarında değişmektedir. Bu yöntem, lignoselülozik materyallerin ön işlemin için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ön işlemin tercih edilmesinde; (i) basit işletim, (ii) düşük enerji tüketimi, (iii) hızlı yüksek sıcaklığa ulaşabilme, (iv) inhibitör oluşumunun azlığı ve (v) selüloz yapısında gerçekleşen parçalanma faktörleri etkilidir (Kumar ve Sharma, 2017). Mikrodalga uygulamasının kimyasal proseslerle kombine edilerek daha yüksek verimlilik elde edildiği de rapor edilmiştir.

Alkali ön işlem: Alkali ön işlem, en yaygın uygulamalardan biri olarak kabul edilir (Yang ve diğerleri, 2021). Bu işlem, ligninin bazik ortamda çözünmesi sayesinde enzimlerin hemiselüloz ve selüloza erişimini artırarak sakkarifikasyon verimini yükseltmektedir (Kumar ve Prakash, 2023).

Asit ön işlemi: Asit ön işlemi, konsantre asit (%30-70) ve 40 °C gibi düşük sıcaklık veya seyreltik asit (%0.1) ve yüksek sıcaklık (örneğin 230 °C) koşullarında gerçekleştirilebilir. Asit ön işlemde inorganik asitler (sülfürik, hidroklorik, nitrik ve fosforik asitler) ve organik asitler (asetik, formik ve propiyonik asitler) kullanılmaktadır (Rezania ve diğerleri, 2020b; Zheng ve diğerleri, 2014; Chen ve diğerleri, 2017). Bunlardan en yaygın sülfürik asit (H₂SO₄), seyreltik asit ön işlemi için kullanılmıştır. Konsantre asit selüloz hidrolizi üzerinde oldukça etkili olmasına rağmen, son derece toksik, aşındırıcı ve tehlikelidir ve reaktör inşası için özel metal olmayan malzemeler veya alaşımlar gibi pahalı malzemeler gerektirmektedir. Ayrıca, enerji ve maliyet açısından yoğun bir işlem olduğundan, ekonomik nedenlerle asidin biyokütle işleminden sonra geri kazanılması gerekmektedir. Bu nedenle, lignoselülozik biyokütle ön işlemi için konsantre asit yerine seyreltik asit tercih edilmektedir. Seyreltik asit ön işlemi, ön işlem koşullarına bağlı olarak, öncelikle hemiselülozu %100 orana kadar bileşen şekerlerine (ksiloz, arabinoz ve galaktoz) hidrolize etmektedir. Ayrıca, lignini yüksek oranda parçalayabilir, ancak çoğu durumda lignini çözmede etkili olmamaktadır. Seyreltik asit ön işleminin temel amacı, selülozun mikrobiyal bozunmaya ve enzimatik hidrolize duyarlılığını önemli ölçüde arttırmasıdır (Zheng ve diğerleri, 2014).

Organik çözücü ön işlemi: Organik çözücü ön işlemi, lignoselülozik biyokütlenin özellikle de odun ve tarımsal atıkların, biyoetanol üretimi için uygun hale getirilmesinde önemli bir adımdır. Bu işlemde, selüloz katı olarak geri kazanılırken, lignin ve hemiselülozun çoğu organik çözücü içinde çözülür. Organik çözücü ön işlem parametreleri; organik çözücü konsantrasyonu %30–70, işlem süresi 20–50 dakika, sıcaklık 140–200 °C ve çözücü-katalizör oranı 10:1 şeklindedir. Organik çözücü yöntemi, biyokütle ile belirlenen sıcaklık ve basınç koşullarında asidik, bazik veya tuz bazlı katalizörlerin varlığında etanol, metanol, etilen glikol, aseton ve tetrahidrofurfuril alkol gibi sulu organik çözücülerin reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır. Bu işlem öncelikli olarak lignin ve hemiselülozun çözünürlüğünü arttırmak amacıyla uygulanmaktadır. Ligninin uzaklaştırılması, selülozun enzimatik hidroliz için

erişilebilirliğini artırmaktadır. Sonuç olarak, lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılması, lignin direncinin azalmasına ve selülozun yüzey alanının artmasına neden olarak hidroliz ve fermentasyonun biyoetanol verimini arttırmaktadır (Zhao ve diğerleri, 2009a; Koo ve diğerleri, 2011).

Ozon ön işlemi: Bu ön işlem, lignin ve hemiselülozu parçalamak ve selülozun biyolojik olarak parçalanabilirliğini artırmak için anoksidan olarak ozon gazı kullanmayı içermektedir. Güçlü bir oksidan olması, suda çözünmesi ve bulunabilmesi ozon gazının başlıca avantajlarıdır. Ayrıca, lignini parçalayarak, asetik ve formik asit gibi daha az moleküler ağırlığa sahip çözünür bileşikler serbest bırakabilmektedir. Bu yöntemin en önemli avantajı, sonraki hidroliz adımlarında daha az komplikasyona yol açan bozunma yan ürünlerinin olmamasıdır. Ayrıca, bu işlem ortam koşullarında gerçekleştirilmektedir. Ozon kullanım maliyetinin yüksek olması başlıca dezavantaj olup, lignoselülozik malzemelerin işlenmesinde büyük miktarda ozon kullanılmaktadır (Ab Rasid ve diğerleri, 2021; Mood ve diğerleri, 2013).

Buhar patlaması ön işlemi: Buhar patlaması, otohizoliz olarak da adlandırılmaktadır. Katalize edilmiş buhar patlamasından farklı olup, işlemde kimyasal eklemesi yapılmamaktadır. Bu yöntemde, biyokütle parçacıkları kısa bir süre için yüksek basınçlı doymuş buharla ısıtılmakta ve reaksiyonları sonlandırmak için basınç hızla düşürülmektedir. Bu durum, biyokütlenin patlayıcı bir dekompresyona girmesine neden olmaktadır. Tipik ön işlem sıcaklığı, basıncı ve süresi sırasıyla 160-260 °C, 0.69-4.83 MPa ve birkaç saniye ile birkaç dakika aralığındadır. Bu koşullar altında, hemiselüloz bileşen şekerlerine hidrolize edilmekte ve lignin belirli bir dereceye kadar dönüştürülmektedir. Böylece, önceden işlenmiş biyokütle daha parçalanabilir hale gelmektedir (Vivek ve diğerleri, 2019; Zheng ve diğerleri, 2014).

Sıcak su ön işlemi: Sıcak su ön işlemi, lignoselülozik biyokütlenin (örneğin pirinç samanı, buğday samanı, şeker kamışı ve ayçiçeği sapları) dönüştürülmesi sürecinde önemli bir adımdır. Bu işlem, herhangi bir kimyasal veya katalizör eklenmeden genellikle 100-230 °C sıcaklık, 2-5 MPa basınç aralığında birkaç dakikadan birkaç saate kadar ve yüksek basınçta gerçekleştirilmektedir. Ön işlem sırasında su biyokütle hücre yapısına nüfuz edebilir, selülozu nemlendirebilir, hemiselülozu çözebilir ve lignini hafifçe giderebilir. Sıcak su ön işlemi, selülozun erişilebilir ve duyarlı yüzey alanını genişletmek ve enzimlerle parçalanabilirliğini iyileştirmek için oldukça etkilidir (Kumar

ve diğerleri, 2020; Zheng ve diğerleri, 2014). Sıcak su ön işlemi, buhar patlamasından farklı olarak genleşme gerektirmez, basıncın kullanımı yalnızca suyu muhafaza etmek ve buharlaşmayı önlemek için yapılmaktadır (Mood ve diğerleri, 2013).

Ultrasonik ön işlem: Sonikasyon, ham maddeye ultrasonik ses dalgaları uygulanmasıdır. Ultrasonik ön işlemin ultrasonik radyasyon frekansı 20 kHz ile 500 MHz arasında değişmekte olup, uygulama süresi 1 saate kadar olabilmekte ve genellikle 2 saniye açık, 4 saniye kapalı döngü şeklinde uygulanmaktadır. İşlem sıcaklığı ise, 25 ile 90 °C arasında değişmektedir. Ultrasonik ön işlem, enerjinin lignoselülozik maddelere değişen frekans ve yoğunlukta, ses dalgaları şeklinde uygulandığı etkili bir yöntemdir. Biyoetanol üretimi için lignoselülozik ham maddenin sonikasyonu ultrasonik yoğunluk, sonikasyon süresi, ortam pH'sı, sıcaklık, ultrasonik frekans gibi faktörlere bağlıdır (Yusaf ve Al-Juboori, 2014; Ofori-Boateng ve Lee, 2014). Ultrasonik ön işlem, sıvı ortamda 25 kHz – 170 kHz aralığında yüksek frekansta ses dalgaları üreterek uygulanan bir tekniktir. Bu işlem sırasında sıvı içinde meydana gelen kabarcık oluşumu, “kavitasyon” olarak adlandırılmaktadır. Milyonlarca hava kabarcığının lignoselülozik ham maddelerin yüzeyine çarparak patlamasıyla kimyasal bağlar üzerine etki etmesi esasına dayandırılmaktadır (Erkurt, 2011; Sint Jan ve diğerleri, 2008).

Islak hava oksidasyonu: Bu yöntem, hem etanol hem de biyogaz üretimi için yaygın kullanılmaktadır. Bu yöntemde, biyokütlenin 125-315 °C'de, 0.5-5 MPa'ya artırılmasıyla oksijen sağlanan asit, nötr ve alkali gibi koşullara sahip sulu çözeltilerin varlığında oksidasyona uğramasına izin verilmektedir. Bu işlem ekzotermik olup, bu nedenle reaksiyon başladıktan sonra ısı açısından kendi kendini desteklemektedir. Ön işlem süreci, hidrolitik bir işlemde ve oksidatif reaksiyondan asitlerin oluşumunu içermektedir. Bu nedenle, hemiselüloz ve lignin parçalanmaktadır. Hemiselülozlar monomerik şekerlere parçalanırken; ligninler oksidasyona uğramakta ve selüloz şekerlere parçalanmaktadır. Ön işlem uygulanan süspansiyon, selüloz ve hemiselüloz substratını ayırmak için filtrelanmaktadır. Katı bileşen, enzimatik hidrolizden geçmeden önce deiyonize su ile yıkanmaktadır. Hemiselüloz kısmı karboksilik asitler gibi ara maddelere oksitlenmektedir. Bu adım sonrası da fenolik bileşiklere, asetaldehitlere ve alkole ayrılmakta ve daha sonra da CO₂ ve H₂O'ya parçalanmaktadır. Bu ön işlemin temel sorunu, hızlı reaksiyon hızı nedeniyle çok hızlı ve yüksek olan ısı üretimiyle ilgili

olup, bu nedenle reaktör sıcaklığının kontrol edilmesi zordur (Singh ve Satapathy, 2018).

1.4.2. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz, lignoselülozik biyokütleden bioetanol üretiminde karbonhidratların monomerik şekerlere dönüştürülmesi açısından kritik bir aşamadır. Bu süreçte, selüloz ve hemiselüloz polimerlerin parçalanması sağlanmaktadır. Sonuç olarak, selülozun başlıca hidroliz ürünü glukoz iken, hemiselülozdan çeşitli pentoz ve heksozlar elde edilmektedir (Kumar ve diğerleri, 2020).

1.4.3. Fermantasyon

1.4.3.1. Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon (SHF)

Ayrı hidroliz ve fermantasyon yönteminin etanol üretiminde etkili bir yöntem olduğu sıkça vurgulanmıştır. SHF yöntemi, enzim üretimi, hidroliz ve fermantasyon süreçlerinin birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilmesini temel almaktadır (Aggarwal ve diğerleri, 2022). SHF prosesinin konsepti, reaksiyonları ayrı reaktörlerde çalıştırarak hidroliz ve fermantasyon prosesinin ayrılmasını içermektedir. Birinci reaktörde, önceden işlenmiş lignoselülozik malzeme, selülazlar tarafından monomerik şekerlere parçalanır ve başka bir reaktörde etanole fermente edilmektedir. Bu yöntemin temel avantajı, iki prosesin (hidroliz ve fermantasyon) kendi ayrı ayrı optimum koşullarında, örneğin sıcaklık faktörü açısından gerçekleştirilebilmesidir. Selülazların 45-50 °C arasındaki bir sıcaklıkta en etkili olduğu kanıtlanmıştır, buna karşın yaygın olarak kullanılan fermente edici organizmaların optimum sıcaklığı 30-37 °C arasındadır. Glukoz konsantrasyonunun, fermantasyon sürecinde kritik olduğu bilinmektedir (Sudiyani ve diğerleri, 2019; Aggarwal ve diğerleri, 2022).

1.4.3.2. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-fermantasyon (SSCF)

Eşzamanlı sakkarifikasyon ve eşfermantasyon yöntemi, enzim üretiminin ayrı bir aşamada gerçekleştirilmesine karşın, heksoz ve pentoz şekerlerinin hidrolizi ve fermantasyonunun aynı reaktörde eşzamanlı olarak yürütülmesini temel almaktadır (Yasuda ve diğerleri, 2014). Hidroliz aşamasında enzim aktivitesinin inhibisyonunu

önlemek amacıyla şeker kombinasyonları genellikle düşük konsantrasyonlarda tutulmaktadır (Panahi ve diğerleri, 2020). SSCF için en büyük zorluk, selüloz enzimleri (~50 °C) ile mikrobiyal hücreleri (30-37 °C) arasındaki optimum sıcaklıkların uyumsuzluğudur. Bu nedenle, SSCF'yi selüloz enzimlerinin daha yüksek sıcaklığında ön hidroliz ve mikroorganizmaların daha düşük sıcaklığında buna bağlı SSCF olmak üzere iki adıma bölerek önemli bir uzlaşmaya varılması gerekmektedir (Zhang ve diğerleri, 2022). SSCF prosesinde, heksoz ve pentoz şekerlerini aynı anda fermente edebilen tekli ya da karışık mikrobiyal kültürler kullanılmaktadır. Burada en kritik faktör, uygun mikroorganizma seçimi olup, genetik modifikasyonla geliştirilmiş suşlar, heksoz ve pentoz şekerlerini etkin şekilde fermente edebilmektedir (Taherzadeh ve Karimi, 2007).

1.4.3.3. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon (SSF)

Eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon yönteminin temel prensibi, enzim üretiminin ayrı bir aşamada gerçekleştirilmesine rağmen, hidroliz ve fermantasyon süreçlerinin aynı reaktörde eşzamanlı olarak yürütülmesidir. Bu yöntem, hidroliz sırasında açığa çıkan şekerlerin (özellikle selobiyoz ve glukoz) selüloz enzimi üzerinde oluşturduğu inhibitör etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır. Çünkü, oluşan şekerler maya tarafından anında etanole dönüştürülmekte, böylece ortamda şeker birikimi minimumda tutulmakta ve enzim aktivitesinde baskılanma engellenmektedir. Ayrıca, SSF prosesinin yalnızca iki reaktörde gerçekleştirilmesi, kontaminasyon riskini önemli ölçüde azaltmaktadır (Valles ve diğerleri, 2020).

1.5. ETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR

Biyoetanol, ham petrol kullanımı ve çevre kirliliği azaltılmasına önemli ölçüde katkıda bulunduğu için dünya çapında en çok kullanılan biyoyakıt olarak tanımlanmıştır. Sakkaroz, nişasta, lignoselülozik ve alg biyokütlesi gibi çeşitli ham madde türleri kullanılarak mikroorganizmalar tarafından fermantasyon süreciyle biyoetanol üretilir. Diğer mikroorganizma türleriyle karşılaştırıldığında, özellikle *Saccharomyces cerevisiae* olmak üzere mayalar, yüksek etanol verimliliği, yüksek etanol toleransı ve çeşitli şekerleri fermente etme yeteneği nedeniyle etanol üretiminde kullanılan yaygın mikroorganizmalardır. Ancak, maya fermantasyonunda yüksek

sıcaklık, yüksek etanol konsantrasyonu ve pentoz şekerlerini fermente etme yeteneği gibi etanol üretimini engelleyen bazı zorluklar vardır. Hibrit ve rekombinant tip mayalar dahil olmak üzere çeşitli maya suşları, etanol üretimi için fermantasyonda kullanılmıştır. Mayalar, basit şekerleri doğrudan etanole fermente edebilir (Azhar ve diğerleri, 2017). *Pichia stipitis* iyi şekilde pentoz fermente eden mayadır. Diğer mikroorganizmalar olan *Candida shehatae* ve *Spathaspora passalidarum* ile karşılaştırıldığında, *P. stipitis* mayasından daha yüksek etanol verimi ve üretkenlik elde edilmektedir. Bu da *P. stipitis*'in fermantasyonunda daha etkili olduğunu göstermektedir. *Pichia stipitis* mayası kullanımı, ksiloz fermente edilerek yüksek etanol verimi ve üretkenlik sağlayabilen, ancak oksijen seviyelerine dikkat edilmesi gereken etkili bir mikroorganizmadır (Nosrati-Ghods ve diğerleri, 2020).

Kluyveromyces marxianus mantarının çoğunluğu aerobik özelliğine sahiptir. *K. marxianus* benzersiz fizyolojik özellikleri ve aktif bir konakçı olarak farklı türlere ait protein üretme kabiliyeti nedeniyle peynir altı suyu veya diğer süt atıkları dahil olmak üzere çeşitli düşük maliyetli substratları metabolize edebilmektedir. Bu yeteneğiyle ilaç, gıda ve yem endüstrilerinde ticari uygulamalar için vazgeçilmez bir adaydır (Karim ve diğerleri, 2020).

Yüksek etanolojenik termofilik anaerob türler genel olarak *Clostridium*, *Caldanaerobacter*, *Thermoanaerobacter* ve *Thermoanaerobacterium* cinsleridir (Taylor ve diğerleri, 2009; Sveinsdottir ve diğerleri, 2009; Tomás, 2013). Bununla birlikte *Bacillus*, *Geobacillus*, *Paenibacillus* ve *Caloramator* gibi termofilik üyeler de etanol üretebilmektedir (Fong ve diğerleri, 2006; Sveinsdottir ve diğerleri, 2009; Crespo ve diğerleri, 2012).

1.6. ETANOL ÜRETİMİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Etanol üretiminde yaygın olarak kullanılan prosesler ön işlem, hidroliz ve fermantasyondur. Fermantasyon sırasında biyoetanol üretimi pH, sıcaklık, ham madde konsantrasyonu, fermantasyon süresi ve aşı tipi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Azhar ve diğerleri, 2017). Etanol üretiminde temel olan faktörlerden bazıları aşağıda sunulmuştur.

Ham madde tipi: Biyoyakıtlardan etanol ve hidrojen üretimi için karbonhidrat içeriği yüksek atıksular ve atıklar kullanılmaktadır. Bu kapsamda, kullanılabilen ham

maddelerden bazıları yiyecek ve içecek endüstrisi başta olmak üzere gıda atıkları, tarımsal atıklar ve meyve işleme atıkları olarak sıralanabilir (Kothari ve diğerleri, 2012).

Organik yükleme oranı: Etanol üretiminde organik yükleme oranı, mikroorganizmaların substratı verimli şekilde kullanabilme kapasiteleri açısından kritik parametre olarak değerlendirilmektedir. Özellikle termofilik bakteriler, maya türleri *Saccharomyces cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* gibi diğer fermantatif mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında, nispeten düşük substrat (şeker) konsantrasyonlarında inhibisyona uğrama eğilimindedir (Taylor ve diğerleri, 2009; Almarsdottir ve diğerleri, 2012).

Sıcaklık: Biyoyakıt üretimi amacıyla kullanılan mikroorganizmaların, atıksu ya da atık biyokütle tipine göre termofilik ve mezofilik sıcaklık gibi farklı sıcaklıklarda aktivitesini değerlendirmek önemlidir. Yüksek sıcaklıkların bazı bakterilerin hedef biyoyakıt üretim performansını arttırdığı görülürken, bazı bakterilerde de mikroorganizma aktivitesinde sınırlandırma yaptığı rapor edilmiştir (Dursun, 2024a; Sivagurunathan ve diğerleri, 2016). Bu durum, yüksek sıcaklıklarda çalışacak mikroorganizmaların seçiminde inhibitör toleransının dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. İnhibitörlerin etkileri, toleranslı mikroorganizmaların kullanımı ya da fermantasyon öncesi arıtma işlemleri ile azaltılabilir. Ayrıca, endüstriyel ölçekte prosesin sürdürülebilirliği açısından, mikroorganizmaların yüksek sıcaklık koşullarında maya özü gibi karmaşık ve maliyetli katkı maddelerine olan ihtiyaçlarının en aza indirilmesi de büyük önem taşımaktadır. Literatürde, düşük maya özü konsantrasyonlarında da etkili etanol üretimi gerçekleştirebilen bazı termofilik suşların tanımlandığı bildirilmektedir (Zhao ve diğerleri, 2009b).

pH: Etanol üretimi sırasında termofilik bakterilerin pH toleransı, metabolik aktiviteleri ve ürün verimi açısından belirleyici bir faktördür. Bu mikroorganizmaların, büyüme ve fermantasyon proseslerinde belirli bir pH aralığında optimum performans sergiledikleri bilinmektedir. pH seviyesindeki sapmalar, özellikle inhibitör bileşiklerin etkilerini artırabileceği gibi hücresel enzim sistemlerinin bozulmasına da yol açabilir. Özellikle furfuraldehit ve ligninden türeyen aromatik bileşikler gibi inhibitörler, belirli pH koşullarında daha aktif hale gelebilmekte ve termofilik bakteriler üzerinde daha yoğun baskı oluşturmaktadır (Tomás ve diğerleri, 2013; Ahring ve diğerleri, 1996; Ahring ve diğerleri, 1999). Bu nedenle, fermantasyon sürecinde uygun pH koşullarında

bu bileşiklerin zararlı etkilerinin azaltılması mümkün olabilir. Ayrıca, pH değerinin inhibitör toleransının yanı sıra besin elementlerinin biyoyararlılığı üzerinde de etkili olduğu ve bu durumun etanol verimi üzerinde dolaylı bir rol oynayabileceği değerlendirilmektedir. Termofilik bakteriler genellikle tanımlı ortamda, fosfat tamponları ve eser element solüsyonları gibi katkılarla büyütülmektedir. Ancak, maya özü gibi kompleks katkıları, pH stabilitesinin sağlanmasında ve metabolik denge açısından önemli bir rol oynayabilir (Zhao ve diğerleri, 2009b). Bu tür suşların izole edilmesi, gelecekte daha düşük maliyetli ve daha çevre dostu biyoyakıt üretim süreçlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Mikroorganizma tipi: Etanol ve hidrojene fermantatif dönüşüm genel olarak karmaşık bir dizi biyokimyasal reaksiyonlarla ve *Clostridium sp.*, *Enterobacter* gibi çeşitli spesifik mikroorganizma grubu tarafından gerçekleştirilmektedir. Saf kültürlerin kullanımı dışında çeşitli karışık mikro-flora da etanol ve hidrojen üretimi için kullanılmıştır (Kothari ve diğerleri, 2012).

2. BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. SPESİFİK BAKTERİ VE MAYA KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ

Biyoetanol üretimi için spesifik bakteri ve maya kullanılan çalışmalar atıksular ve atıklar şeklinde aşağıda sunulmuştur.

2.1.1. Atıksular Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

Ren ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışmada, melas atık suyundan hidrojen üretimi için başlangıç pH değeri 6.0-6.5 (reaktör A), 5.5-6.0 (reaktör B) ve 4.0-4.5 (reaktör C) olan üç sürekli karıştırmalı tank reaktör (CSTR) kullanılmıştır. Reaktörler, 28 gün çalıştırdıktan sonra mikrobiyal topluluk etanol tipi (C), propiyonat tipi (A) ve etanol-bütirat karışımı tip (B) fermantasyon oluşturmuştur. Hidrojen üretim oranı etanol tipi fermantasyon için en yüksek olup, $0.40 \text{ L (g VSS)}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ veya $0.45 \text{ L H}_2 \text{ (g KOI giderimi)}^{-1}$ olarak saptanmıştır. Mikrobiyal topluluk dinamikleri ve çeşitliliği çiftgradyanlı denatüre edici gradyan jel elektroforezi (DG-DGGE) kullanılarak analiz edilmiştir. Denatüre edici gradyan jel elektroforezi profilleri, mikrobiyal topluluk yapılarının ilk 14 günde hızla değiştiğini göstermiştir. Etanol bazlı hidrojen üreten bakteri olan *Ethanoligenens harbinense* CGMCC1152, reaktör C'den izole edilmiştir. Ayrıca, alkol dehidrojenaz (ADH) için izoenzim aktivitesi boyaması, etanol üreten bakterilerin çoğunun mikrobiyal topluluktaki *Ethanoligenens* ile ilişkili olduğunu desteklemiştir.

Reyimu ve Özçimen (2017) tarafından İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi'nden (İSKİ) temin edilen deniz suyu ve atık su, aynı büyüme koşulları altında *Nannochloropsis oculata* ve *Tetraselmis suecica* mikroalg suşu için büyüme ortamı olarak kullanılmak üzere farklı oranlarda birleştirilerek kullanılmış, hücre çoğalması ve büyüme kinetiği üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hem *Nannochloropsis oculata* hem de *Tetraselmis suecica* suşunun atık suyu tolere edebildiği ve kullanabildiği, kültürlerin özgül büyüme hızının *Nannochloropsis oculata* için $0.5430 \text{ gün L}^{-1}$ 'ye (atık suyun

%75'i) ve *Tetraselmis suecica* için 0.4778 gün L'ye (atık suyun %25'i) kadar çıkabildiği bulunmuştur. Bu çalışma, *Nannochloropsis oculata* ve *Tetraselmis suecica* gibi mikroalg türlerinin etkili bir şekilde yetiştirilmesi için belediye atık suyunun belirli bir konsantrasyonda besiyeri olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Belirli büyüme hızına göre, 14 günlük yetiştirme sonunda, *Nannochloropsis oculata* besiyeri için %75'lik atık su konsantrasyonunun ideal olabileceği, *Tetraselmis suecica* için ise %25'lik atık su konsantrasyonunun optimum olduğu bulunmuştur. *Nannochloropsis oculata* ve *Tetraselmis suecica* karşılaştırıldığında, büyüme hızı profillerine göre, *Nannochloropsis oculata* suşunun atık su ortamına adaptasyonu, *Tetraselmis suecica* suşundan daha iyi sonuç vermiştir. 14 günlük yetiştirme sonunda, iki türün biyoetanol üretkenlikleri de incelenmiştir. *Nannochloropsis oculata* suşunun en yüksek biyoetanol verimi, %75'lik atık su ortamında yetiştirilen mikroalglerden %3.68 olarak elde edilmiştir. Sonuçlar, %75'lik atık suda yetiştirilen *Nannochloropsis oculata* suşunun en yüksek karbonhidrat içeriğini temsil ettiğini; dolayısıyla etanol konsantrasyonunun kontrol grubundan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Suşlar karşılaştırıldığında *Tetraselmis suecica* suşunun en yüksek karbonhidrat içeriği kontrol grubunda saptanmıştır. *Tetraselmis suecica* örneklerinin ikinci en yüksek karbonhidrat içeriği, %100 konsantrasyonda atıksu ortamında yetiştirilen kültürlerden elde edilmiştir. En yüksek biyoetanol verimi ise, %7.26 ile *Tetraselmis suecica* suşu kontrol grubundan tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda, *Tetraselmis suecica* suşunun *Nannochloropsis oculata* suşundan daha yüksek karbonhidrat içeriğine sahip olması nedeniyle, kültür ortamı olarak atıksu kullanılarak etanol üretimi için daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Onay (2018) tarafından, Yüzüncü Yıl Üniversitesi mikroalg koleksiyonundan mikroalg kültürü elde edilerek, *Nannochloropsis gaditana* DEE003 kültürlenmiştir. Bu çalışmada, çeşitli belediye atıksularında, *Nannochloropsis gaditana* DEE003 kullanılarak, biyoetanol üretilmesi amaçlanmıştır. *Nannochloropsis gaditana* DEE003'nın büyüme oranları, farklı atık su konsantrasyonlarında değişkendir. 24 °C'de, belediye atık suyunun %0, %30, %60 ve %100'ünde, *Nannochloropsis gaditana* DEE003 mikroalgi incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki belediye atıksularında (%0, 30, 60 ve 100), *Nannochloropsis gaditana* DEE003'nın biyoetanol verimleri 70.3 mg g biyokütle⁻¹'den 94.3 mg g biyokütle⁻¹'e kadar değişmektedir. Biyokütle hasadı günü olan 14. günde, %30'luk atıksuyun en yüksek biyoetanol verimiyle 94,3 mg g

biyokütle⁻¹ olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, farklı belediye atıksularında, *Nannochloropsis gaditana* DEE003'nin biyoetanol üretimi için kullanılabileceğini göstermektedir.

Acebu ve diğerleri (2022) tarafından, mikroalglerin domuz atık suyundan besin maddelerini uzaklaştırma ve karbonhidrat biriktirme potansiyelini araştırmıştır. *Chlorella sorokiniana* AK-1 ve *Chlorella vulgaris* ESP-31, %10 sterilize edilmemiş domuz atık suyunda yetiştirilmiş ve %42.5 ve 189 mg L⁻¹ gün⁻¹ olarak sırasıyla maksimum karbonhidrat içeriği ve verimlilik elde edilmiştir. %25 atık su ve %25 BG-11 konsantrasyonunda, *Chlorella vulgaris* ESP-31'in maksimum karbonhidrat verimliliği ve toplam azot giderme verimliliği sırasıyla 266 mg L⁻¹ gün⁻¹ ve %54.2 olarak saptanmıştır. Ayrıca, bazı parametrelerde yapılan değişikliklere göre aşının 0.2 g L⁻¹'ye, ışık yoğunluğunun 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 'ye ve hasat süresinin 7 güne ayarlanması, mikroalg performansını daha da artırmıştır. Buna göre, 0.49 g L⁻¹ gün⁻¹ biyokütle verimliliği, %49.3 karbonhidrat içeriği ve 1.8 g L⁻¹ karbonhidrat konsantrasyonu tespit edilmiştir. Biyokütlenin etanol fermantasyonu %84.2 biyoetanol verimi ve 4.2 g L⁻¹ konsantrasyon ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, %92.2 oranında toplam azot giderimi ile *Chlorella vulgaris*'in domuz atık suyundaki besin yükünü etkin bir şekilde kullanma yeteneği kanıtlanmıştır.

Ayadi ve diğerleri (2022) tarafından, zeytin değirmeni atık suyundan izole edilen maya suşlarının fermantasyonda kullanım potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kuzey Cezayir'de yerel bir zeytin değirmeni atık suyunun fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri değerlendirilmiştir. Zeytin değirmeni atıksu numuneleri %0.65 hafif asitlik, pH 4.88 ve 34 mS cm⁻¹ elektriksel iletkenlik değerlerine sahip bulunmuştur. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) 183 g L⁻¹ ve biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ₅) 7 g L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Çalışma, kesikli fermantasyonla, puzolan ve sığır kemikleri üzerinde hareketsizleştirilmiş hücrelerle dolu, gıda sınıfı polipropilenden yapılmış bir kolondan oluşan ev yapımı bir deneysel düzende gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, daha önce zeytin değirmeni atık suyundan izole edilen *Saccharomyces cerevisiae* maya suşlarının zeytin değirmeni atık suyundan biyoetanol üretmede mümkün olduğunu göstermiştir. En iyi performans anaerobik fermantasyonla, %1.4 (v/v) oranında etanol üretimiyle sonuçlanmıştır.

Kumar ve diğ erleri (2022) tarafından, sentetik glikoz ve ksiloz karışımı şekerlerin biyoetanole dönüştürülmesi için iki aşamalı ardışık fermantasyon süreci ele alınmıştır. Yerli türlerin bireysel olarak şekerleri fermente etme yetenekleri sınırlıdır; bu nedenle *Zymomonas mobilis* ve *Pichia stipitis* kullanılarak şekerlerin etkin bir şekilde dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Karışık şeker fermantasyonu için toplam 160 g/L'nin (100 g/L glikoz ve 60 g/L ksiloz) optimum olduğu bulunmuştur. İlk aşamada, glikoz olmadan 0.50 g/g verimle 50.25 g/L'lik bir etanol titresi elde edilmiştir. İkinci aşamada ise, ksilozun fermente edilmesi hedeflenmiştir. Ancak *Z.mobilis* hücrelerinin varlığı, ksilozda önemli bir dönüşüm sağlamamıştır. Bununla birlikte, *Z.mobilis* hücreleri kaldırıldığında, etanol üretkenliği yeniden başlamış ve toplam etanol titresi 56.77 g/L, verimi ise 0.36 g/g olarak bulunmuştur. *Z. mobilis* hücrelerinin tamamen uzaklaştırılması, ikinci aşamada kalan etanol miktarını önemli ölçüde azaltmış ve etanol titresi ile üretkenliği artırmıştır. Kalan etanolün %80'inin uzaklaştırılması durumunda, toplam etanol titresi 79.03 g/L, verim 0.50 g/g ve hacimsel üretkenlik 1.09 g/L/saat olarak ölçülmüştür. Kalan etanol tamamen uzaklaştırıldığında ise etanol titresi 79.93 g/L, verim 0.50 g/g ve hacimsel üretkenlik 1.82 g/L/saat olarak bulunmuştur. Bu  alışma karışık şekerlerin sıralı fermantasyon yoluyla biyoetanole dönüştürülmesinin etkinliğini göstermekte ve elde edilen etanol titresi ile verimin, ayrı glikoz ve ksiloz parti fermantasyonları ile karşılaştırılabilir olduğunu belirtmektedir.

Guo ve diğ erleri (2024) tarafından, tavşan dışkısından zenginleştirilen karışık bakteriler kullanılmıştır. Karışık bakteriyel sentez gazı fermantasyonuyla asetik asit ve etanol üretimi araştırılmıştır. Karışık bakteriler, 0.8 L bazal ortam (PBM) içeren silindirik anaerobik fermantasyon şişelerine %10 oranında aşılanmış, anaerobik ortam için azot gazı uygulaması yapılmıştır. Buna ilaveten, şişeler pH değerini kontrol etmek için çok kanallı bir pH  evrimi i ölçümü ve geri bildirim ayarlamalı otomatik kontrol cihazına bağlanmıştır. pH değeri değişimi, NaOH ve HCl   zeltisiyle, cihaz aracılığıyla otomatik olarak sabit bir değerde düzenlenmiştir. pH değerinin sürekli gaz temini altında sentez gazı fermantasyon performansı ve mikrobiyal topluluk bileşimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada, bakteri topluluğu aktivitesinin büyük ölçüde kültürün pH değerine bağlı olduğu rapor edilmiştir. Araştırmada, karışık bakterilerin pH 7'de en hızlı şekilde geliştiği saptanmıştır. Buna rağmen çalışma, pH sabit 6 değerinde, pH 7'deki değerden %160 daha yüksek olan 5.15 g L⁻¹'lik yüksek etanol

konsantrasyonuyla sonuçlanmıştır. Bu pH değişimiyle, maksimum etanol konsantrasyonu 5.85 g L⁻¹'ye ulaşmıştır. Bu sonuca dayanarak, etanol üretimini iyileştirmek için iki aşamalı bir pH düzenleme yöntemi önerilmiştir. Farklı sabit pH değerlerinde, bakteri popülasyonlarının yapısal analizi yapılmış ve *Clostridia*'nın etanol üretimine daha fazla katkısı olduğu tespit edilmiştir.

2.1.2. Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

2.1.2.1. Tek Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

Choi ve diğerleri (2015) soya endüstrisi atıklarından biri olan okara'nın, biyoetanol üretimi için kullanım potansiyelini araştırmıştır. Bu atığın, *Saccharomyces cerevisiae* tarafından fermente edilebilen glikoz ve galaktoz gibi fermente edilebilir içeriği incelenmiştir. Ayrıca, mantar türlerinden üretilen hidrolitik enzimlerin, okara biyokütlesi üzerindeki aktiviteleri incelenmiştir. Okara biyokütlesi, çığ olarak kullanılmıştır. Bu atığa, 20 dakika boyunca, 121 °C'de, otoklavda (nemli ısıtma) ön işlem uygulanmıştır. Ham ve otoklavlanmış biyokütlenin kimyasal bileşiminin çok az farklılık gösterdiği saptanmıştır. Ancak, enzimatik dönüşüm oranının ham okara için %21.9'dan, ön işlem görmüş okara için %82.9'a önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. *S. cerevisiae* fermantasyonu sonrası, enzimatik hidrolizden şeker içeriğine göre 1 kg okara atığının etanol konsantrasyonunun 59.1 g, fermantasyon veriminin ise %96.2 olduğu tespit edilmiştir.

Gonçalves ve diğerleri (2015) tarafından, Brezilya'da bol miktarda bulunan lignoselülozik olgun hindistan cevizi lifi, yeşil hindistan cevizi kabuğu, olgun hindistan cevizi kabuğu ve kaktüs materyalleri kullanılarak biyoetanol üretim potansiyeli incelenmiştir. Çalışmada, lignoselülozik materyallere uygulanan hidroliz ön işlemi ve işlenmiş materyallerin enzimatik hidrolize duyarlılığını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar temel alınarak, *Zymomonas mobilis* bakterisi, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* mayaları ve ham madde olarak yeşil hindistan cevizi kabuğu seçilip kullanılarak yarı eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSSF) ve eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) uygulaması yapılmıştır. Yeşil hindistan cevizi kabuğundan etanolün 0.21 g/L saat üzerinde olan en iyi sonuçlarının yarı eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSSF) kullanılarak *Saccharomyces cerevisiae* aracılığıyla elde edildiği saptanmıştır.

Yu ve diğerkleri (2016) tarafından, katı substrat yıkama işlemi yapılmadan sodyum hidroksit (NaOH) ön işlemi uygulanmış tatlı sorgum posasının, biyoetanol üretimi incelenmiştir. Sonuçlar, NaOH ön işlem görmüş katı substratın, yıkama işlemi yapılmadan doğrudan enzimatik sakkarifikasyonunun ve etanol fermantasyonunun fermente edilebilir şeker dönüşümünü ve etanol verimini sırasıyla %44,06 ve %44,85'ten %65,14 ve %61,81'e önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. NaOH ön işlemi görmüş likörün (SL) iyi yıkanmış NaOH ön işlem görmüş katı substrata eklendiği deneyler, fermente edilebilir şeker dönüşüm veriminin önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Ayrıca, enzimatik sakkarifikasyon sırasında enzim aktivitelerinin analizi, SL'nin selüloz aktivitesini, özellikle ksilanaz aktivitesi için, önemli ölçüde koruduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, NaOH ile önceden işlenmiş lignoselülozik katının, yıkama olmaksızın doğrudan enzimatik sakkarifikasyon ve sonraki etanol fermantasyonu için kullanılabileceğini önermektedir.

Tsunatu ve diğerkleri (2017) tarafından, pirinç samanının (*Oryza sativa*) biyoetanol üretim potansiyeli araştırılmıştır. Ham madde olarak pirinç samanı ve %0.2 (w/v), %0.4 (w/v), %0.6 (w/v), %0.8 (w/v), %1 (w/v) konsantrasyonlarda maya ekstraktları pepton dekstrozu (YEPD) ve %0.5 (w/v), %1 (w/v), %1.5 (w/v), %2 (w/v), %2.5 (w/v) konsantrasyonlarda *Saccharomyces cerevisiae* (maya) kullanılarak fermantasyonla çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, ön işlem yöntemlerinden en uygun ön işlem yöntemi incelenmiştir. 1M NaOH ve ısıtma araştırılmıştır. 1M NaOH ön işlemi en yüksek selüloz ve en düşük lignin içeriğini vermiştir. Optimum fermantasyon koşullarını elde etmek için 300 µm partikül boyutuna sahip 1g/L, 2g/L, 4g/L, 6g/L ve 8g/L substrat konsantrasyon değerlerinin ve hücre yükleme kombinasyonu olan %0.2 (w/v), %0.4 (w/v), %0.6 (w/v), %0.8 (w/v) ve %1 (w/v) konsantrasyonlarındaki maya ekstraktları pepton dekstrozu ve %0.5 (w/v), %1 (w/v), %1.5 (w/v), %2 (w/v) ve %2.5 (w/v) konsantrasyonlarındaki *Saccharomyces cerevisiae*'nin (maya) fermantasyon süreci üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Fermantasyonun optimum koşulları, 72 saatlik fermantasyon süresinde 33 °C sıcaklık, 4.0 pH değeri, 4g/L substrat konsantrasyonu, 300 µm partikül boyutu ve 0.8/1.5 YEPD/maya oranında elde edilmiştir. Ayrıca 4g/L substrat konsantrasyonu, %49.50'lik en yüksek biyoetanol verimiyle sonuçlanmıştır.

Palacios ve diğerkleri (2017) tarafından, *Kluyveromyces marxianus* mantarı kullanılan bir çalışmada da, farklı sülfürik asit konsantrasyonlarında (%0, %0.5 ve %1

v/v) ve sıcaklıklarda (otoklavda 28 °C ve 121 °C) yapılan ön işlemler, mekanik öğütme ve bir karıştırıcı aracılığıyla öğütmeye muz kabuklarına (BP) uygulanmıştır. Çalışmada selüloz, hemiselüloz, lignin, kül, toplam ve indirgen şeker içerikleri değerlendirilmiştir. En yüksek selüloz enzimatik hidroliz verimleri (%99), 48 saatlik hidrolizden sonra %0.5 ve %1 asitle işlenmiş sıvılaştırılmış otoklavlanmış muz kabukları ile elde edilmiştir. *Kluyveromyces marxianus* fermantasyonu ile etanol üretimi, %10, %15 ve %20 (w/w) hidrolize muz kabukları kullanılarak denenmiştir. En yüksek etanol seviyesine (21 g/L), %20 (w/w) muz kabukları ile 24 saatlik fermantasyondan sonra ulaşılmıştır. Araştırmada, muz kabuklarının etanol üretimi için iyi bir kaynak olduğu sonucuna varılmıştır.

Tesfaw ve diğerleri (2021) gıda dışı substratlardan biri olan peynir altı suyundan *Kluyveromyces marxianus* ETP87 suşu kullanılarak etanol üretimini araştırmıştır. Bu çalışmanın amacı, geleneksel yoğurttan izole edilen *Kluyveromyces marxianus* ETP87 suşunu kullanarak farklı ham (deproteinize edilmemiş, pH ayarlanmamış ve seyreltilmemiş) peynir altı suyundan etanolü optimize etmektir. Sterilize edilmiş ve sterilize edilmemiş peynir altı suyu, peynir altı suyundaki laktik asit ve diğer mikroflora ile maya rekabet potansiyelini değerlendirmek için *Kluyveromyces marxianus* ETP87 suşu için kullanılmıştır. Peynir altı suyundan elde edilen etanol verimliliğine pH ve sıcaklığın etkisi de araştırılmıştır. Etanol optimizasyonu için ek besin gereksinimini araştırmak amacıyla pepton, maya özütü, amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ve üre peynir altı suyuna eklenmiştir. Sterilize edilmemiş peynir altı suyundan elde edilen etanol, sterilize edilmiş peynir altı suyundan istatistiksel olarak biraz daha düşük olmuştur. Peynir altı suyunun 4 °C’de depolanması, daha uzun koruma sürelerinde sabit laktoz varlığını garantilememiştir. pH ayarlaması yapılmadan peynir altı suyundan (3.9) pH kontrollü (5.0) peynir altı suyundan daha düşük olsa bile önemli ölçüde yüksek miktarda etanol elde edilmiştir. Termofilik maya *Kluyveromyces marxianus* ETP87 suşu, 30 ila 35 °C arasında yüksek etanol vermiş ve maya 45 °C’ye kadar yüksek etanol üretebilmiştir. 50 °C’de de önemli ölçüde daha düşük etanol kaydedilmiştir. Amonyum sülfat ve pepton etanol verimliliğini artırırken, maya özütü ve üre mayanın etanol fermantasyon kapasitesini baskılamıştır. Geleneksel yoğurttan izole edilen maya olan *Kluyveromyces marxianus* ETP87 suşu, sterilize edilmemiş ve deproteinize edilmemiş substratlardan etanol üretebilmektedir.

Danso ve diğerleri (2022) tarafından odunla beslenen termit *Microcerotermes* sp.'den izole edilmiş yeni bir bakteri türü olan *Streptomyces* sp. MSS2 suşu kullanılarak, buğday samanının eş zamanlı bozunması ve sakkarifikasyonu ile indirgeyici şekerlerin serbest bırakılması ve daha sonra biyoetanole dönüştürülebilme potansiyeli incelenmiştir. *Streptomyces* sp. MS-S2 suşunun ksilanaz ve selüloz enzimlerinin salgılanması için karbon kaynağı olarak ham madde buğday samanını verimli bir şekilde kullanma potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Bakteri %1.5 maya özütü ve 15 g/L buğday samanı ile pH 8.0, 30 °C'de kültüre alındığında en yüksek ksilanaz ve selüloz üretimleri on gün boyunca gözlenmiştir. Optimum koşullarda, ksilanaz ve selüloz aktivitelerinin sırasıyla 6.560 ± 0.160 ve 0.866 ± 0.067 mililitre başına birim (U/mL) olduğu tahmin edilmiştir. Enzimatik sakkarifikasyonun 96 saat sonrasında 10.8 g/L konsantrasyonda maksimum etanol üretimi saptanmıştır. Bu çalışmanın bulguları, odunla beslenen termitlerin bağırsağında yaşayan, yeni keşfedilen bir bakteri türünün biyoyakıt araştırmaları için yeni bir yol olduğunu göstermiştir.

Abduljabbar ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada amaçlanan maya ekstraktı kullanılarak, iki aşamalı *Saccharomyces* ve fermantasyon aşamasıyla karton atıklarından glikoz sentezini iyileştirmek için fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemler yoluyla karton atığını biyoetanol sentezi için ham madde olarak kullanmaktadır. Tüm topraklarda bulunan ve en yaygın olarak yetiştirilen mantar cinsi olan *Trichoderma*, selülozu fermente şekere parçalayan selüloz enziminin üreticisidir ve bir karbon kaynağıdır. Karboksimetil selüloz agar besiyeri enzim çözücü mantarların büyümesi için seçilmiş ve daha sonra optimum pH (5.5-6) ve sıcaklık 28 °C koşullarında yüksek oranda şeker (12 mg/L) içeren enzimatik süzüntü alınmıştır. Araştırmada, kartonda selülozun değerlendirilmesi ve 5-8 günlük bir süre boyunca fermantasyon işlemiyle etanol üretiminden tatmin edici sonuçlar elde edilmiş olup, 5 g karton atığının tüketimi %1, yani 20 mL etanol verimine eşdeğer olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar, potansiyel bir kaynak olarak karton atıklarından biyoetanol üretiminin mümkün olduğunu göstermektedir.

2.1.2.2. İki ve Üzeri Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

Antonopoulou ve diğerleri (2016) tarafından, ayçiçeği samanına uygulanmış asit (H_2SO_4 , H_3PO_4 ve HCl), alkali (NaOH) ve termal ön işlem yöntemleri sonrası elde

edilmiş tüm bulamaç, biyohidrojen ve biyoetanol üretimi için kullanılmıştır. Ön işlem görmüş ayçiçeği samanından elde edilen biyohidrojen, eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon yoluyla karışık anaerobik çamur kullanılarak kesikli deneylerde incelenirken, etanolün eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyonu ksilozu fermente eden maya *Pichia stipitis* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, deneysel sonuçlar, biyohidrojen için 20 g NaOH/100 g toplam katı ile alkali ön işlemin optimum olduğunu ve 155.3 L/kg toplam katı'lık en yüksek hidrojen verimi göstermiştir. Aynı kimyasal HCl veya H₂SO₄ ön işleminde, inhibitör bileşikler oluşumunun en düşük biyohidrojen verimleriyle sonuçlandığı saptanmıştır. 20 g H₂SO₄/100 g toplam katı ile ön işlemde, *P. stipitis* inhibisyonuna neden olarak en düşük biyoetanol verimi sağlamasına rağmen, 20 g HCl/100 g toplam katı ile ön işlemde 104.78 mg etanol/g toplam katı ile en yüksek biyoetanol verimi tespit edilmiştir. Araştırmada, ön işlem sırasında üretilen inhibitör bileşiklere karşı farklı mikrobiyal türlerin farklı duyarlılık gösterdiği kanısına varılmıştır.

Danmaliki ve diğerleri (2016) tarafından, lignoselülozik tarımsal atık muz kabuklarının biyoetanol üretim potansiyeli araştırılmıştır. Lignoselülozik biyokütleyle uygulanan ön işlemler biyoetanol üretiminde önemli adımdır. Çalışmada su, alkali ve asidik ön işlem olmak üzere üç ön işlem tekniğinin biyoetanol üretimi üzerindeki etkinliği belirlenmiştir. Tüm ön işlem tekniklerine H₂SO₄ kullanılarak aynı hidroliz tekniği uygulanmıştır. Sonuçlar, muz kabuklarının asit ile ön işleme tabi tutulduğunda en yüksek indirgen şeker konsantrasyonları oluşturduğu ve sadece su kullanılarak yapılan ön işlemin en düşük indirgen şeker konsantrasyonları oluşturduğunu göstermiştir. İndirgen şekerleri üç günlük bir fermantasyon süreciyle biyoetanolle dönüştürmek için, aktifleştirilmiş bir *S. cerevisiae* türü kullanılmıştır. Su, asidik ve alkali ön işlemlerden GC-FID ile tespit edilen biyoetanol konsantrasyonlarının sırasıyla 40 ppm, 60 ppm ve 80 ppm olduğu saptanmıştır. Çalışma sonuçları, nihai etanol üretiminin ön işleme bağlı olduğunu göstermiştir.

Sathendra ve diğerleri (2019) tarafından palmiye odununa, lignin giderimi için kimyasal (sülfürik, nitrik, fosforik) yöntem uygulanmış ve sonra karışıma 121 °C'de bir saat termal ön işlem uygulanmıştır. Ön işlem uygulaması sonrası palmiye odunu, *Trichoderma reesei* MTCC 4876 mantarı kullanılarak hidrolize tabi tutulmuştur. Bu işlem sonrasında, *Kluveromyces marxianus* MTCC 1389 mayası ile palmiye odunu

hidrolizati kullanılarak biyoetanol üretilmiştir. 45 °C sıcaklık, 156 rpm çalkalama hızı, 5 pH, %8 (v/v) substrat konsantrasyonunda; 22.90 g/L'lik biyoetanol saptanmıştır.

Sudhakar ve diğerleri (2021) *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen kullanılmış mantar ham maddesinden biyoetanol üretim potansiyelini incelemiştir. Hidroliz yoluyla şeker eldesi için kullanılmış mantar substratına sülfürik asit ön işlemi uygulanmıştır. Kullanılmış mantar ham maddesinden elde edilen şekerler, fırın mayası kullanılarak fermente edilmiş ve 30 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Çalışmanın dördüncü gününde, 1.57 g L⁻¹ etanol üretilmiştir. Çalışmada, *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen kullanılmış mantar ham maddesinin biyoetanol üretiminde önemli bir alternatif olduğu sonucuna varılmıştır.

Budiyono ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, kapok ağacı meyvesi atığına uygulanan hidrojen peroksit ve asetik asit ön işleminin; elde edilen hemiselüloz, selüloz ve lignin içeriği üzerindeki etkisi, fermantasyon pH değerinin biyoetanol üretim seviyeleri üzerindeki etkisi ve fermantasyon süresinin biyoetanol üretim seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada ham madde ön işlemi, fermantasyon pH değeri (4, 4.5 ve 5), fermantasyon süresi (3, 5 ve 7 gün) araştırılmıştır. Sonuçlar, hidrojen peroksit ve asetik asit ön işleminin kapok meyve kabuğu atıklarındaki lignin içeriğinin %90'ını giderebildiğini, optimum pH ve fermantasyon süresinin 4.5 pH değerinde ve %8.26 biyoetanol içeriğiyle 5. günde elde edildiğini ve en yüksek biyoetanol veriminin %8.78 olduğunu göstermiştir.

Saini ve diğerleri (2022) tarafından, ananas yapraklarının kademeli sakkarifikasyon ve fermantasyon yoluyla sürdürülebilir biyoetanol üretimindeki potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla, ananas yaprağı atığı herhangi bir katalizör olmadan 150 °C'de 20 dakika boyunca yüksek basınçlı bir reaktörde hidrotermal ön işleme tabi tutulmuş ve ön işlem görmüş hidrolizatın katı-sıvı ayrımından sonra sıvı fraksiyonda maksimum 38.1 g/L indirgeyici şeker verimiyle sonuçlandığı görülmüştür. Hem ön işlem görmüş biyokütle bulamacının hem de selüloz açısından zengin katı fraksiyonun enzimatik hidrolizi (EH), %5 ağırlıkta katı yüklemede (kuru bazda) tutulmuştur. 10 FPU/gds enzim dozunda ticari selülaz kullanılarak, 50 °C ve 150 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz, ön işlem görmüş bulamaç ve katı fraksiyonlar sırasıyla 13.7 ve 18.4 g/L'lik bir glikoz verimiyle sonuçlanmıştır. Ön işlem görmüş bulamaç ve katı fraksiyonun enzimatik hidroliziyle elde edilen şeker şurubunun

fermantasyonu, *Saccharomyces cerevisiae* WLP300 kullanılarak, 30 °C’de 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. %91’den fazla fermentasyon verimliliğiyle önemli oranda etanol üretimiyle sonuçlanmıştır.

2.2. KARIŞIK BAKTERİLER KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ

Biyometanol üretimi için karışık bakteriler kullanılan çalışmalar atıksular ve atıklar şeklinde aşağıda sunulmuştur.

2.2.1. Atıksular Kullanılarak Biyometanol Üretimi

Lay ve diğerleri (2012) tarafından, çalışma hacmi 60 mL olan 125 mL toplam hacme sahip kesikli anaerobik biyoreaktörlerde, 37 ± 1 °C’de hidrojen ve etanol üretimi araştırılmıştır. Bakteri kültürleri olarak kanalizasyon çamuru ve inek gübresi temin edilerek, metanojenik aktiviteyi engellemek için 100 °C’de 45 dakika boyunca, gübre ve çamur, ısı ön işleme tabi tutulmuştur. Biyoreaktörlerin çalışma hacmi içeriğinin; bakteri kültürleri olarak kanalizasyon çamuru veya inek gübresi, tatlı patates substrat çözeltisi ve besin çözeltisinden oluştuğu rapor edilmiştir. Reaktör içeriğinin pH değeri, NaOH veya HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Anaerobik ortamı oluşturmak için biyoreaktör içerikleri, 5 dakika boyunca argon gazı kullanılarak, oksijen uzaklaştırılmıştır. Çeşitli deneysel koşullarda enerji üretimi incelenmiştir. Buna göre; hidrojen üretimi için optimum koşulların tatlı patates 50 g KOI/L, kanalizasyon çamuru, sıcaklık 37 °C ve pH 7.0 ve etanol üretimi için optimum koşulların tatlı patates 50 g KOI/L, kanalizasyon çamuru, sıcaklık 37 °C ve pH 8.5 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, tatlı patates konsantrasyonu ve parçacık boyutunun hidrojen ve etanol üretimini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir. Bakteri topluluğu analizleri; *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium fimetarium*, *Grimontella senegalensis* ve *Enterobacter asburiae* (veya *Escherichia coli*) bakteri türlerinin çalışmadaki en yüksek etanol üretiminde mevcut olduğunu ve iki türün de (*Ruminococcus schinkii* ve *Lactovum miscens*) çalışmadaki en yüksek hidrojen üretiminde mevcut olduğunu göstermiştir.

Tsolcha ve diğerleri (2021) kimyasal bir ortamda ve tarımsal-endüstriyel atık sularda (yani süt ürünleri atık suyu, şarap imalathanesi atık suyu ve karışık şarap imalathanesi-kuru üzüm atığı) siyanobakteri bazlı bir mikrobiyal konsorsiyumun büyümesinden elde edilen farklı biyokütleler kullanılarak, biyometanol formunda enerji

üretim potansiyelini incelemiş ve kuru üzüm kalıntısı özütü ile desteklemiştir. Filamentli siyanobakteri *Leptolyngbya* sp. tarafından domine edilen bir mikrobiyal biyokütleden fermente edilebilir şekerlerin geri kazanılma olasılığı gösterilmiştir. Test edilen farklı asit hidroliz koşullarından en iyi sonuçlar, süt ürünleri atık suyundan ve karışık şarap imalathanesi-kuru üzüm atık sularından elde edilen kurutulmuş biyokütle kullanılarak 120 dakika boyunca 2.5 N sülfürik asit ile elde edilmiştir. Mikrobiyal biyokütleden asit hidrolizi uygulanarak şeker salınımı optimize edildikten sonra, *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm deneylerde, etanol üretimini artırmak için işlenmiş biyokütle suyuna kuru üzüm kalıntısı özütü eklenmiştir. Sonuçlar, biyoetanol üretimi için ham madde olarak kuru üzüm kalıntısı özütüyle birlikte siyanobakteri bazlı biyokütlenin potansiyel kullanımının uygun olduğunu göstermiştir.

2.2.2. Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

2.2.2.1. Tek Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

Du ve diğerleri (2015) tarafından yapılan çalışmada, Çin'deki farklı habitatlardan 16 doğal bakteriyel konsorsiyum kullanılmış ve lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi incelenmiştir. Özellikle, HP isimli konsorsiyumun, 55 °C'de 6 gün boyunca 7 g/L α -selülozdan 2.06 g/L nispeten yüksek etanol üretim performansı gösterdiği saptanmıştır. Daha detaylı araştırmalar, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* suşunun, HP konsorsiyumunun yüksek etanol verimliliğinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Bu suşun, diğer doğal bakteri konsorsiyumlarının etanol üretimini önemli ölçüde artırma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın bir diğer önemli bulgusu da HP konsorsiyumundaki *P. taiwanensis* oranının optimize edilerek yeni bir konsorsiyum olan HPP adının verildiği bir konsorsiyum geliştirilmesidir. Etanol'ün dönüşüm oranı %78'e ulaşmıştır. Bu sonuçlar, doğal bakteri konsorsiyumlarının biyoyakıt üretimindeki potansiyelini ve optimizasyon stratejilerinin önemini ortaya koymaktadır.

Gil ve Maupoey (2018) tarafından, tarımsal-endüstriyel kalıntı ananas atığı kullanılarak, biyoetanol ve proteini parçalayan proteolitik enzim eldesi potansiyeli araştırılmıştır. Ayrıca, gıda ve ilaç endüstrileri, kozmetik, tekstil, deri ve deterjan endüstrilerinde kullanımı olan bromelain (ananasdan elde edilen) potansiyeli incelenmiştir. Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon, doğrudan fermantasyon

(%4.7) ve katı atık sakkarifikasyonu ve fermantasyonu (%4.9 v/v) işlemlerine kıyasla etanol üretimini (%5.4 v/v) artırmıştır. Çalışmada, bromelain ayırımının mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon membran ayırma teknikleriyle yapılmıştır. Fermantasyon deneyleri (DF ve SSF), 72 saat boyunca, 100 mL'lik şişelerde, 28 °C'de pH 4, 5 ve 6'da gerçekleştirilmiştir. Üç farklı proste etanol'ün: *Saccharomyces bayanus* 1926 kullanımında doğrudan fermantasyonda (DF), 0.36 g_{ethanol}/g_{glucose}, ardışık sakkarifikasyon ve fermantasyonda (CSF) 0.35 g_{ethanol}/g_{glucose}, eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyonda (SSF) 0.418 g_{ethanol}/g_{glucose}; *Saccharomyces cerevisiae* 11020 kullanımında doğrudan fermantasyonda (DF), 0.38 g_{ethanol}/g_{glucose}, ardışık sakkarifikasyon ve fermantasyonda (CSF) 0.370 g_{ethanol}/g_{glucose}, eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyonda (SSF) 0.430 g_{ethanol}/g_{glucose}; *Saccharomyces cerevisiae* 1319 kullanımında doğrudan fermantasyonda (DF), 0.384 g_{ethanol}/g_{glucose}, ardışık sakkarifikasyon ve fermantasyonda (CSF) 0.39 g_{ethanol}/g_{glucose}, eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyonda (SSF) 0.428 g_{ethanol}/g_{glucose} olarak sonuçlandığı belirlenmiştir. Biyoetanol ve proteolitik enzimler, endüstriyel ananas atıklarından başarıyla elde edilmiştir.

2.2.2.2. İki ve Üzeri Ön İşlem Uygulanmış Atıklar Kullanılarak Biyoetanol Üretimi

Chenxi ve diğerleri (2013) aşırı termofiller tarafından, glikoz ve ksilozu kullanarak eş zamanlı hidrojen ve etanol üretimini, yukarı akışlı anaerobik reaktör kullanarak araştırmıştır. Ham madde konsantrasyonu 1 g/L'den 7 g/L'ye çıkarıldığında, glikoz ve ksiloz için hidrojenin 0.74 mol/mol'den 0.15 mol/mol'e ve 0.67 mol/mol'den 0.07 mol/mol'e düştüğü tespit edilmiştir. 5 g/L glikoz ve 6 g/L ksiloz konsantrasyonlarında etanolün en yüksek 1.19 mol/(mol glikoz) olduğu saptanmıştır. Glikoz ve ksilozun eş zamanlı fermantasyonu için 2.5 g/L glikoz ile 2.5 g/L ksiloz (1:1) oranında, en yüksek etanol 1.54 mol/(mol heksoz) olarak elde edilmiştir. Ancak, glikoz/ksiloz oranından hidrojenin önemli ölçüde etkilenmediği belirtilmiştir. Çalışmada hidrojen gazı üretimi, etanol konsantrasyonu ve ham madde bozunma verimliliğinin pH ile birlikte arttığı ve optimum pH'nın 5.8 – 6.6 aralığında olduğu sonucuna varılmıştır.

Byadgi ve Kalburgi (2016) kentsel katı atıklardaki gazete yükünü azaltmak amacıyla atık gazeteden biyoetanol üretim potansiyeli araştırmıştır. Ön işlem, hidroliz ve fermantasyon biyoetanol üretiminde yer alan adımlardır. Ham madde için ön işlem

optimizasyonu, %0 ila %6 arasında değişen farklı seyreltik sülfürik asit kombinasyonları ve 121 °C ve 15 lb basınçta 30, 45 ve 60 dakikalık ısıtma süreleri kullanılarak yapılmıştır. Fermantasyon, 36 °C’de gerçekleştirilmiştir. Ön işlem için optimize edilmiş koşulun 121 °C ve 45 dakikada %1.5 H₂SO₄ konsantrasyonu olduğu bulunmuştur. Selülozun şekere dönüştürülmesine yardımcı olan ve dinitrosalisilik asit kullanılarak analiz edilen *Cytophaga huchnosonni* bakterisi hidroliz işlemi için kullanılmıştır. İndirgeyici şekerler, *Saccharomyces Cerevisae* mayası kullanılarak biyoetanol üretmek için fermente edilmiştir. Saf kültür *Cytophaga huchnosonni*, Pune şehrinde Ulusal Endüstriyel Mikroorganizmalar Koleksiyonu’ndan temin edilmiş ve izole edilmiş organizma, Bagalkot (Hindistan) da Biyoteknoloji Bölümü’nden alınmıştır. Saf kültür ve izole edilmiş tür kıyaslanmış, saf kültürden daha yüksek etanol saptanmıştır. Etanol’ün *Cytophaga huchnosonni* bakterisi kullanılan çalışmada, veriminin %6.91 olduğu saptanmıştır. Buna göre, *Cytophaga huchnosonni* bakterisinin etanol üretimi için önemli olduğu belirlenmiştir.

Dutta ve diğerleri (2024) tarafından, inek gübresi-çim kompostundan zenginleştirme tekniği kullanılarak, on iki termofilik etanolojenik bakteri izole edilmiş ve en yüksek biyoetanolü üreten izolat CSD6 incelenmiştir. Çalışmada CSD6; etanol, laktik asit ve asetik asit üreten hem pentoz hem de heksoz şekerlerini kullanarak başlıca çözümler ürünler olarak kullanılmış ve 16S rRNA gen dizilimi yoluyla *Geobacillus stearothermophilus* suşu olarak tanımlanmıştır. En yüksek etanol üretiminin 5 g/L glikozdan 25.05 mM olduğu, 55 °C’de ve başlangıç pH değerinin 7.5’de olduğu bulunmuştur. İzolatın etanol, asetik asit konsantrasyonuna ve başlangıç substrat yüklemesine karşı ortalama tolerans gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, CSD6’nın biyoetanol potansiyeli, otoklavda işlenmiş karışık çiçek atığı (FW) kullanılarak maliyetsiz bir substrat olarak incelenmiştir. CSD6, herhangi bir enzimatik ön işlem olmaksızın substrat olarak 20 g/L karışık çiçek atığı kullanılarak, %75.47 oranında indirgen şeker azalmasıyla maksimum 8.9 mM biyoetanol üretmiş ve bu da CSD6’nın kolayca elde edilebilen substratlardan biyoetanol üretme yeteneği olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, lignoselülozik kaynaklardan biyoetanol üretiminde termofilik bakterilerin potansiyelini vurgulamaktadır.

Kesikli biyoreaktörde, işletim koşullarına göre biyoetanol üretimine yönelik araştırmalardan bazıları da Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Kesikli biyoreaktörde işletim koşullarına göre biyoetanol üretimine yönelik araştırmalar

Ham madde tipi ve Kullanılan mikroorganizma (Aşı)	Ön işlem uygulaması	Biyoreaktör işletim şartları	Etanol üretimi	Kaynak
Atık gliserol Anaerobik tortudan izole edilen <i>Enterobacter aerogenes</i> KKU-S1 bakterisi	Şeker fabrikasının anaerobik bölmesinden anaerobik tortu alınarak 105 °C'de 60 dakika ön işlem uygulaması	Eş zamanlı hidrojen ve etanol üretimi yapılmıştır. Bunun için reaktörlerde kurulum sonrası NaOH ve HCl ile pH 6.5'e ayarlanmış, reaktör işletimi öncesi reaktör kapağı kapatıldıktan sonra anaerobik koşulu sağlamak için 5 dakika süresince düşük saflıkta (%80) N ₂ gazı reaktörlere uygulanmıştır. Çalışmada, maya ekstrakt konsantrasyonu 1.00 gr/L, gliserol konsantrasyonu 37 gr/L, başlangıç pH değeri 8.14, sıcaklık 37 °C'dir.	En yüksek etanol üretimi 120 mmol/L	Reungsang ve diğerleri (2013)
Mısır koçanı, atık ofis kağıdı ve <i>Thaumatococcus daniellii</i> yaprakları <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası	Ham maddelerin hidrolizi 6 M, 9 M ve 13 M H ₂ SO ₄ konsantrasyonu nda, 100 °C'de 60 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.	Ham maddelerin hidrolizatı <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kullanılarak 30 °C'de 72 saat boyunca fermente edilmiştir.	48 saatlik fermantasyon süresinde, en yüksek etanol verimleri 20.2, 16.8 ve 15.9 g/L olarak sırasıyla atık ofis kağıdı, mısır koçanı ve <i>Thaumatococcus daniellii</i> yapraklarından elde edilmiştir.	Melekwe ve diğerleri (2016)
Hurma meyvesi atıkları <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası	-	30 °C'de 72 saat, 4.3-4.7 pH koşullarında çalışılmıştır. Ayrıca, 78 °C'de damıtma işlemi yapılmıştır.	%33 oranda	Boulal ve diğerleri (2016)
Cogongrass (<i>Imperata cylindrical</i>) çayır otu <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (PTCC 5052) mayası	Çekiçle parçalanmış çayır otu, 85 °C'de 90 dakika, %2 (w/v) sodyum hidroksit çözeltisi ile ön işlem	Ön işlem sonrası, sakkarifikasyon ve fermantasyon yapılmıştır. 5 g/L maya biyokütlesi, 32 °C'de, 30 saat, 120 rpm çalkalayıcı inkübatör koşullarında gerçekleştirilmiştir.	Maksimum %76 etanol	Goshadrou (2019)

Tablo 2. Kesikli biyoreaktörde işletim koşullarına göre biyoetanol üretimine yönelik araştırmalar (Devam)

Ham madde tipi ve Kullanılan mikroorganizma (Aşı)	Ön işlem uygulaması	Biyoreaktör işletim şartları	Etanol üretimi	Kaynak
Ananas atıkları			Maksimum biyoetanol konsantrasyonunun bir kombinasyonda (toprakta elde edilen <i>A. niger</i> + <i>S. cerevisiae</i>) %11.3 (v/v) ve ikinci kombinasyonda (katı atık depolama sahasından elde edilen <i>A. niger</i> + <i>S. cerevisiae</i>) %7.0 (v/v)	Efunwoye ve Oluwole, (2019)
Toprak ve ticari satılan palmye şarabından izole edilmiş <i>Aspergillus niger</i> mantarı, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mayası ham madde üzerinde kültürlenmiş aşı	Atıklar, 5 gün 60 °C’de sıcak hava fırınında kurutulmuştur. Ev tipi blender ile öğütülmüştür.	Çalışmada pH değeri 4.1’den 3.3’e düşmüştür. Aşı, 30 °C’de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir.		
Bezelye kabuğu bulamacı, kabukların (kabuk-su oranı 1:1) bir karıştırıcıda öğütülmesiyle hazırlanmıştır. Öğütme sonrası, bulamaç 5 dakika 65 °C’de ısıtılmış berrak bir süspansiyon elde edilerek 121 °C’de 20 dakika sterilize edilmiştir. Maya, 28 ± 2°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.		Aşı konsantrasyonu (%3-7), fermentasyon süresi (24-71 saat) ve pH (4.4, 4.8 ve 5.2) koşullarında çalışılmıştır. En yüksek biyoetanol, %6.8 aşı konsantrasyonunda; başlangıç pH değeri 5.2 olan ortamda 71 saatlik fermentasyon süresinde meydana gelmiştir.	Maksimum biyoetanol %1.65	Saxena ve diğerleri (2019)
Bezelye kabuğu sulu özütü				
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası (aşı)				
Endüstriyel <i>Euchema Spinosum</i> makroalg atığı	Makroalg atığına H ₂ SO ₄ asidi ön işlemi	Alg hidrolizatı, 0.5 g <i>S. Cerevisiae</i> ile 30 °C’de, 24 saat, pH 1.0-4.5 aralığına ayarlanarak fermentasyon yapılmıştır.	11.6 g/g verim ve %75 verimlilikle biyoetanol	Alfonsín ve diğerleri (2019)
<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası				

Tablo 2. Kesikli biyoreaktörde işletim koşullarına göre biyoetanol üretimine yönelik araştırmalar (Devam)

Ham madde tipi ve Kullanılan mikroorganizma (Aşı)	Ön işlem uygulaması	Biyoreaktör işletim şartları	Etanol üretimi	Kaynak
Organik mutfak atıkları (sebze kabukları, meyve posası ve kabukları, atık gıda malzemesi gibi) <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası	Atığa doğrama, toz haline getirme ve karıştırma uygulanmıştır. Maya ekstraktı, 30 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir.	30 °C’de 48 saat, 6.0 pH değerinde, 150 rpm çalkalayıcı inkübatör koşullarında optimum sonuca ulaşılmıştır.	42 gms/L	Kashyap (2022)
Patates kabuğu atıkları ve zarar görmüş patates Üzüm örneklerinin NaCl tuzlu su çözeltisinde yıkanması sürecinde izole edilen <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası	Ham maddelere öğütme işlemi. Patates kabuğu atıkları ve zarar görmüş patates atıklarına HCl (%0.5) ön işlemi	NaOH ve HCl ile pH ayarlanmıştır. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) kültürü için 30 °C’de, pH 6’da 84 saat inkübasyon yapılmıştır. Fermantasyon, 30 °C’de 5 gün boyunca, 150 rpm çalkalayıcı inkübatör koşullarında gerçekleştirilmiştir.	Patates kabuğu atıkları 5.89 gr/L (%1.05) ve zarar görmüş patates 7.22 gr/L (%5.90)	Ahmed ve diğerleri (2023)
Atık kağıt <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> mayası ve <i>E.coli</i> bakterisi (aşı)	Atık kağıt 48 saat boyunca 60 °C’de kurutulmuştur. Atık kağıda H ₂ SO ₄ asit ön işlemi uygulanmıştır.	<i>E. coli</i> kullanılarak 120 saat, 36 °C, 5.0 pH ve 36 saat, 36 °C, 5.0 pH’da; <i>S. centriase</i> kullanılarak, 47 °C’de 36 saat, pH 6.5’de otoklavda fermente edilerek en yüksek sonuca ulaşılmıştır.	%80.9 oranda	Awol ve Abate (2024)

3. BÖLÜM

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde, atık çörek otu kullanılarak, farklı işletim koşullarında biyoetanol üretimi için deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler ve yöntemler hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. MATERYAL

Çalışmada kullanılan çörek otu atığı, aşısı (inokülüm), iz elementler, musluk suyu ve biyoreaktörlere ilişkin detaylı bilgi aşağıda sunulmuştur.

3.1.1. Çörek Otu Atığı, Aşısı ve İz Elementler

Çörek otu atığı, Şanlıurfa ilinde faaliyet gösteren, soğuk sıkım çörek otu yağı üreticisinden Şekil 2’de verildiği şekilde temin edilmiştir.



Şekil 2. Soğuk pres çörek otu yağı üretimi sonrası atık olarak oluşan çörek otu posası

Karışık bakteri, Malatya ilinde şeker üretim faaliyeti gösteren bir fabrikanın biyolojik atık su arıtma tesisi anaerobik reaktöründen temin edilerek kullanılmıştır. Fang ve diğerleri (2006) ve Dursun (2024b) tarafından yapılmış çalışmada kullanılan miktarlar temel alınarak, NH_4Cl 2500 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 500 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 320

mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 23 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 21 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L ve $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L iz elementleri, besleme çözeltisi olarak hazırlanmıştır.

3.1.2. Su

Musluk suyunun kullanıldığı çalışmalar (Ng ve diğerleri, 2021; Dursun ve Gülşen, 2024) ve karışık bakterilerin atıksu arıtma tesisleri bünyesinde biyoyakıt üretiminde kullanımları temel alınarak, çalışmada musluk suyu kullanılmıştır. Musluk suyu, Ardahan Üniversitesi Yenisey Kampüsü musluk suyu olup, su analizine ilişkin sonuçlar Tablo 3’de sunulmuştur.

Tablo 3. Kampüs musluk suyu analiz sonuçları

pH	Sıcaklık (°C)	Cl^- (mg/L)	SO_4^{2-} (mg/L)
7.33	16.9	2.62	1.39

3.1.3. Biyoreaktörler

Atık çörek otundan biyoetanol üretimi amacıyla, toplam hacmi 500 mL ve boş yatak hacmi 100 mL olan laboratuvar ölçekli, cam anaerobik kesikli biyoreaktörler kullanılmıştır. Anaerobik kesikli reaktörlerin çevresi, fototrofik mikroorganizmaların gelişimini önlemek için alüminyum folyo bant ile kapatılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Aynı koşullarda işletilen biyoreaktörler

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Ham maddenin Öğütülmesi ve Karakterizasyonu

Biyokütlenin etkin hidrolizi ve erişilebilirliği için 3 mm’den küçük partikül boyutuna sahip olması tavsiye edilmiştir (Barakat ve diğerleri, 2014). Bu boyut

önerisine göre, homojen hale getirmek için çörek otu atıkları Şekil 4’de verildiği üzere, mekanik öğütücü aracılığıyla “ ≤ 1 mm” boyutu haline getirilerek ve elekten boyutu kontrol edilerek çalışma için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 4. Mekanik öğütücü

Çalışmada kullanılan atık çörek otunun karakterizasyonu Tablo 4’de sunulmuştur.

Tablo 4. Çörek otu atığı karakterizasyonu

	Bileşim (%)
Karbonhidrat	44.3
Protein	35.1
Yağ	14.6
Kül	6

3.2.2. Ön İşlem Uygulamaları

3.2.2.1. Çörek Otu Atığına Uygulanan Ön İşlem

Çörek otu atığı ekstrakt sıvının kullanıldığı biyoreaktörler için atığa dekoksiyon (kaynatma) ön işlemi uygulanmıştır. Bu işlem, küçük boyutlarda katı malzeme üzerine soğuk su takviyesi ile 30 dakika 100 °C’de ısıtılarak yapılan ekstraksiyon uygulamasıdır. İşlem yapılırken katı maddenin su içinde homojen dağılması gerekmektedir. Bu uygulamayı takiben, katı sıvı karışımının 40 °C’ye düştüğünde soğutularak süzme işleminin yapılması tavsiye edilmiştir (Özden ve diğerleri, 2004). Bu çalışmada, katı+sıvı karışımının soğutma işleminde küçük modifikasyon yapılarak, karışım oda sıcaklığına ulaştığı zaman filtre kâğıdı ile süzme işlemi yapılmış ve elde edilen ekstrakt sıvısı kullanılmıştır.

3.2.2.2. Aşıya Uygulanan Ön İşlem

Spesifik bakterilerin, etanol ve hidrojen üretimini eş zamanlı olarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Lopez-Hidalgo ve diğerleri, 2017). Karışık bakterilerin etanol ve hidrojen üretimini eş zamanlı olarak gerçekleştirdiği araştırmalarda ise, karışık bakterilere ısıl ön işlem uygulanarak etanol ve hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir (Chuang ve diğerleri, 2012). Bu kapsamdaki araştırmalarda, genel olarak karışık bakterilerin, biyoreaktöre eklenmeden önce, karışık mikroorganizma içeriğindeki hidrojen üretimini gerçekleştiren mikroorganizma aktivitesini arttırabilmek, metanojen mikroorganizmaların aktivitesini inhibe edebilmek veya tamamen yok edebilmek için aşıya ısıl ön işlem uygulanmaktadır. Bu uygulamalar temel alınarak, bu tez çalışmasında, farklı işletim koşullarında çörek otu atığı veya çörek otu atığı ekstrakt sıvısı kullanılarak, karışık bakteriler aracılığıyla biyoetanol üretimi amaçlanmıştır. Bu nedenle, aşıya 50 dakika 97 ± 1 °C’de ısıl ön işlem uygulanmıştır. Bu işlem sonrası aşı, reaktör içerisine ilave edilmeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. Biyoreaktörlerin Kurulumu

Araştırmada, ham maddeye ön işlem uygulanmış veya uygulanmamış olmasına göre farklı organik yükleme oranları, pH (5.0) ve sıcaklık (50 ± 1 °C) işletim koşullarının biyoetanol üretimine etkisini incelemek üzere, biyoreaktörlerin beşte dördü doldurularak, tekrarlı olacak şekilde kurulum planlanmıştır. Anaerobik kesikli reaktörlerin çevresi, fototrofik mikroorganizmaların gelişimini önlemek için alüminyum folyo bant ile kapatılmıştır. Biyoreaktörlerin içeriği; çörek otu posası (doğrudan atık veya ekstrakt sıvısı), ısıl ön işlem uygulanmış anaerobik karışık mikroorganizma ve mikrobiyolojik büyüme için gerekli iz elementlerden (NH_4Cl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oluşmaktadır. Çörek otu atığının doğrudan kullanılacağı, biyoetanol üretim performansının araştırıldığı anaerobik kesikli biyoreaktörlerin içeriği, belirlenmiş olan organik yükleme oranı, ısıl ön işlem uygulanmış anaerobik karışık mikroorganizma ve musluk suyuna takviye edilmiş iz elementlerden oluşmaktadır. Çörek otu atığına deoksijen ön işlemi uygulanarak, ekstrakt sıvısının kullanıldığı, biyoetanol üretim performansının araştırıldığı anaerobik kesikli biyoreaktörlerin içeriği, ısıl ön işlem uygulanmış anaerobik karışık mikroorganizma, musluk suyuna belirlenmiş miktarda

organik atık eklenerek dekoksiyon ön işlemleri uygulamasından elde edilmiş ekstrakt sıvısı ve bu sıvıya takviye edilmiş iz elementlerden oluşmaktadır. Biyoreaktörlerin işletimi sürecinde, gaz üretimi olacağı öngörüldüğünden, biyoreaktör kurulumları yapılırken, biyoreaktörde gaz toplama bölgesi olacak şekilde planlama yapılmıştır. Bu kapsamda, çalışmada 100 mL gaz toplama bölgesi, 400 mL çalışma (doğrudan atık kullanımı veya dekoksiyon ekstraksiyon ön işlemleri uygulamasını takiben elde edilecek ekstrakt sıvısı+ön işlem uygulanmış karışık bakteri+iz elementler) hacmi olacak şekilde planlama yapılmıştır. Anaerobik kesikli biyoreaktörlerin içeriği tamamlandıktan sonra kapakları kapatılarak, biyoreaktör kurulumları tamamlanmıştır. Bu biyoreaktörlerin içeriğinde, oksijeni uzaklaştırmak için 4-5 dakika süresince biyoreaktör içerisine azot gazı verilmiştir. Bu işlem sonrası biyoreaktörler, ilgili çalışma sıcaklıklarında etüvde karanlık koşullarda işletilmiştir. Biyoetanol örnekleme enjektörle yapılarak, numune kaplarına numune şırınga filtreden geçirilerek eklenmiştir.

3.2.4. Analitik Yöntemler

Numunelerde biyoetanol miktarı, hizmet alımı ile belirlenmiştir. Etanol analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi Shimadzu marka LC20AD model (HPLC), kolon fırını CTO-10AS ve refraktif indeks dedektörü RID 10A model (RID) cihazda yapılmıştır. Kullanılan kolon intersustain NH₂ 250 x 4.6 mm'dir. Taşıyıcı faz olarak 0.45 µm partikül çapında filtreden süzölmüş ultra saf su ve merk marka asetonitril (40:60 H₂O:ACN) kullanılmıştır. Etanol kalibrasyonu için Sigma-Aldrich absolute kullanılmış olup, etanol kalibrasyon eğrisi Ek 1'de sunulmuştur.

4. BÖLÜM

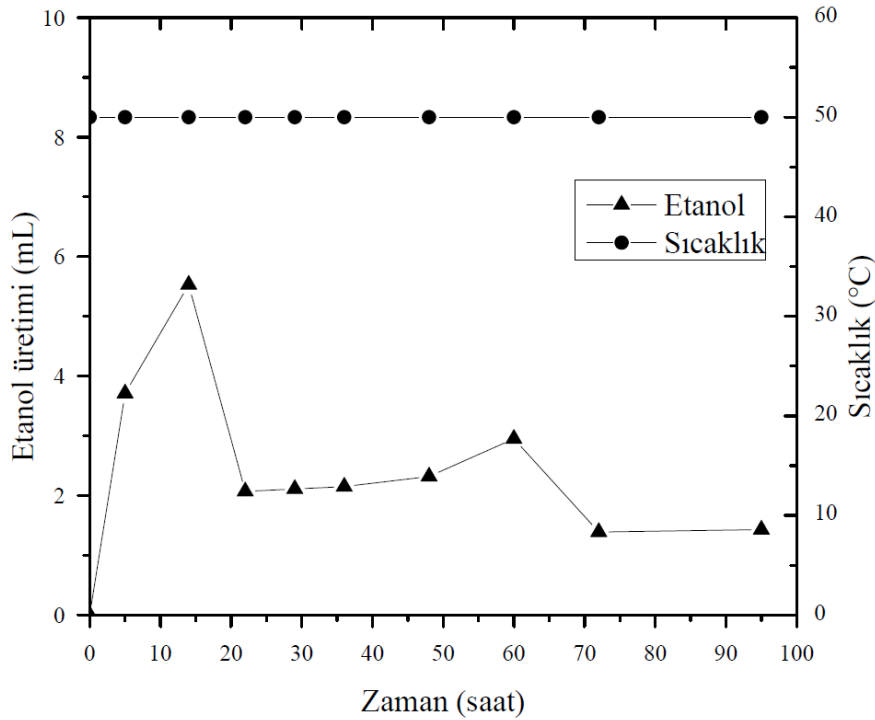
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. HAM ÇÖREK OTU ATIĞI KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ

Karanlık fermantasyonda etanol, asetat ve bütirat gibi başlıca sıvı metabolitlerin hidrojen üretimine eşlik ettiği rapor edilmiştir. Ham madde tipine ve ön işlem yöntemine göre oluşan bu metabolitlere, bütanol ve laktat gibi diğer metabolitler de eşlik edebilir (Lin ve Hung, 2008). Isıl ön işleme tabi tutulan karışık bakteri kullanılmış çalışmaların, yüksek hidrojen üretim performansı ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Kumari ve Das, 2017). Karışık bakteriler ve atıklar kullanılarak, pH ve besin maddelerinin termofilik biyoetanol üretimi üzerindeki etkisine ilişkin literatür araştırmalarına göre çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, bu kapsamda literatür araştırmaları incelendiğinde, spesifik bakterilerle ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu, karışık kültür fermantasyonu mikrobiyal topluluk yapısı bilgisinin etanol üretimini geliştirme de önemli olmasına rağmen araştırma boşluğu olduğu görülmektedir. Hidrojen ve etanolün eş zamanlı elde edilmesi temel alınarak, çalışmada kullanılan anaerobik çamur, ısıl ön işleme tabi tutulmuştur. Ham çörek otu biyokütlesi, ısıl işleme tabi tutulmuş anaerobik çamur ve iz element solüsyonu biyoreaktörlere eklenerek, biyoreaktörlerin kurulumu yapılmıştır. Bu amaçla, kurulumu yapılmış olan biyoreaktörler, etüvde ve 50 ± 1 °C sıcaklık koşullarında işletilmiştir. Ön işleme tabi tutulmamış çörek otu atığı biyokütlesinin 5 ve 10 gr çörekotu/L organik yükleme oranlarında kullanımı ile, 5.0 başlangıç pH değerinde, biyoetanol üretim potansiyeli araştırılmıştır (Şekil 5 ve Şekil 6).

Ön işleme tabi tutulmayan ham biyokütlenin doğrudan kullanıldığı biyoreaktörlerde, pH 5.0'de, işletimin ilk beş saatine kadar etanol üretimi gerçekleşmemiştir (Şekil 5). 5 gr çörekotu/L biyoreaktöründe, etanol üretiminin beş saatte 3.71 mL olduğu saptanmıştır. Biyoetanol üretimi, yakın zamanda aşılınmış kültürün bir özelliği olan bakterilerin lag fazı nedeniyle, fermantasyonun ilk saatlerinde daha yavaş olup, bu çalışmada da bu faz süre olarak 5 saate kadar sürmüştür. Lag faz ve hemen sonrasında bunun kısa sürede (< 5 saat) gerçekleştiğini gözlemlemek önemlidir. Hızlı adaptasyon ve ürün oluşumunun başlangıcı eğilimi vardır. Bakteriler temel

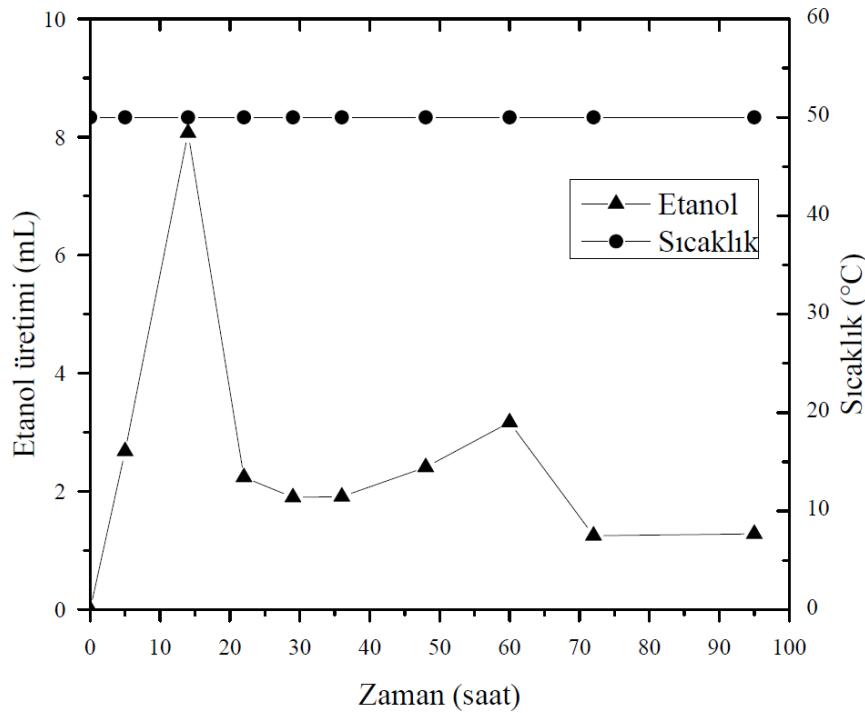
alınarak bu durum, Shuler ve Kargi (2002) tarafından yapılmış çalışmadaki gibi, mayaya kolayca asimile olan, şeker konsantrasyonları ve düşük inhibitör konsantrasyonları olan bir fermantasyon ortamından kaynaklanmaktadır. Bu da hücrelerin gelişimi için uygundur. Şekil 5’de verildiği üzere, maksimum etanol üretimine 5.53 mL olarak on dört saatte ulaşılmış ve bu saat sonrasında etanol üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Bunu takiben, etanol üretiminin yirmi ikinci saatte 2.07 mL olarak azalmış olduğu görülmüştür. Bu saat sonrası örneklemede, yirmi dokuz saatte 2.11 mL, otuz altı saatte 2.15 mL ve kırk sekiz saatte 2.32 mL etanol tespit edilmiştir. Kırk sekiz saat örnekleme sonrası, bu stabil eğilimin değişerek altmış saat örneklemesinde 2.95 mL olarak arttığı saptanmıştır. Bu örnekleme saati sonrası, yetmiş iki saatte yapılan örneklemede ise, etanolün 1.39 mL olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5. Çörek otu atığı biyokütlesinin 5 gr çörek otu/L olarak doğrudan kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi

Ön işleme tabi tutulmayan ham biyokütlenin doğrudan kullanıldığı, 10 gr çörekotu/L organik yüklemede işletilen biyoreaktörde, aynı başlangıç pH değerinde, işletimin ilk beş saatine kadar, etanol üretiminin olmadığı saptanmıştır (Şekil 6). Biyoetanol üretimi, yakın zamanda aşılınmış kültürün bir özelliği olan bakterilerin lag fazı nedeniyle, diğer biyoreaktörlerde olduğu gibi bu biyoreaktörde de fermantasyonun

ilk saatlerinde daha yavaş olup, bu faz süre olarak 5 saate kadar sürmüştür. Dolayısıyla, biyoreaktör ortamına hızlı adaptasyon ve ürün oluşumunun başlangıcı eğilimi vardır. Etanol üretimi, Şekil 6'da verildiği üzere, beş saatte 2.68 mL olarak tespit edilmiştir. Maksimum etanol üretimine 8.07 mL olarak on dört saatte ulaşılmıştır. Bu saat sonrası, etanol üretiminde azalma olduğu görülmüştür. Bunu takiben, yirmi ikinci saatte 2.24 mL olarak etanol üretiminin azaldığı belirlenmiştir. Bu saat sonrası örneklemede, yirmi dokuz saatte 1.90 mL, otuz altı saatte 1.91 mL ve kırk sekiz saatte 2.41 mL etanol belirlenmiştir. Kırk sekiz saat örneklemesini takiben stabil eğilimin değişerek altmış saat örneklemesinde 3.17 mL olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu örnekleme saati sonrası, yetmiş iki saatte yapılan örneklemede ise, etanol 1.25 mL olarak saptanmıştır.



Şekil 6. Çörek otu atığı biyokütlesinin 10 gr çörek otu/L olarak doğrudan kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi

Atıklar temel alınarak, biyoetanol üretimine ilişkin yapılmış çalışmalar sınırlı olup, bu çalışmalarda genel olarak mayalar kullanılmıştır. Maya kullanılan çalışmaların büyük çoğunluğunda da *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılmıştır. Bu kapsamda, atıklar temel alınarak bakteri ve mantar kullanımına yönelik çalışmalarda literatürde mevcut olup, bu çalışmaların biyoetanol üretimine yönelik sayısı sınırlıdır. Biyoetanol üretimi amacıyla, atık ve maya kullanılarak, Salehi ve diğerleri (2018) tarafından

yapılmış çalışmada, tarımsal atık üretiminin fazla olduğu İran'da kavun atıkları kullanımı biyoetanol üretimi için incelenmiştir. Çalışmada, 15 kg kapasiteye sahip fermantasyon tankına, kavun şekeri şurubu:su, 4:1 oranında, her bir kilogram substrat için 5 g *Saccharomyces cerevisiae* mayası ve 30 °C'de işletilecek şekilde eklenmiştir. 35 saat gerçekleştirilen çalışmada, her beş saatte bir örnekleme yapılmıştır. Sonuçlar, her bir kilogram kavundan yaklaşık 60.5 g biyoetanol elde edildiğini göstermiştir. Ayrıca, fermantasyon tankında karıştırıcı dönüş hızının artırılmasının üretilen alkol oranını azaltabileceği belirtilmiştir. Fermantasyon tankındaki farklı karıştırıcı dönüş hızlarında üretilen alkol oranında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, karıştırma yapıldığında, enerji israfını önlemek için fermantasyon tankında 120 rpm'den daha yüksek dönüş hızlarının kullanılmaması önerilmiştir. Başka bir araştırmada da Chatanta ve diğerleri (2007) tarafından, meyvenin (elma) suyu çıkarıldıktan sonra kalan posa meyve işleme ünitesinden elde edilmiş ve biyoetanol üretimi için ham madde olarak kullanılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 mayası, *Aspergillus foetidus* MTCC 151 mantarı ve *Fusarium oxysporum* MTCC 1755 mantarı gibi farklı mikrobiyal (*S. cerevisiae*, *A. foetidus* + *F. Oxysporum*, *S. cerevisiae* + *A. foetidus* + *F. oxysporum*) suşlar, fermantasyon sistemlerinde elma posasından etanol üretimi için hem ayrı ayrı hem de konsorsiyumlar halinde kullanılmıştır. 30 °C'de 96 saate kadar fermente edilmiştir. *S. cerevisiae* MTCC 173 (%1 aşı)'de %8.44 (v/w) ile etanol, 30 °C'de 72 saatlik inkübasyonun ardından kazanılmıştır; diğer yandan, *S. cerevisiae* MTCC 173, *A. Foetidus* MTCC 151, *F. oxysporum* MTCC 1755 kokültürlerinde etanol %16.09 (v/w) olarak elde edilmiş, 30 °C'de 72 saatlik inkübasyonun ardından %0.15'e kadar azalmıştır. Zanivan ve diğerleri (2022) tarafından da geleneksel olmayan bir maya olan *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 kullanılarak, evsel tüketimden elde edilen meyve (kavun, ananas, muz, elma ve mango) artıklarını, malzemenin işlem öncesi hidroliz komplekslerini gerektirmemesi nedeniyle daha sürdürülebilir bir yakıt arayışında biyoetanol üretimi amacıyla incelenmiştir. Araştırmada, dokuzuncu saatte maksimum etanol $2.50 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Meyve artıklarının düşük maliyetli ve ulaşılabilir olması, biyorafineri bağlamında benzersiz olması nedeniyle biyoetanol işlemi için bir alternatif olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, biyoetanol üretimi amacıyla ilk defa bu çalışmada kullanılan geleneksel olmayan *Wickerhamomyces* sp.

UFFS-CE-3.1.2 mayanın, gelecek yıllardaki araştırmalarda, biyoetanol üretimi amacıyla kullanılabilir olduğu saptanmıştır.

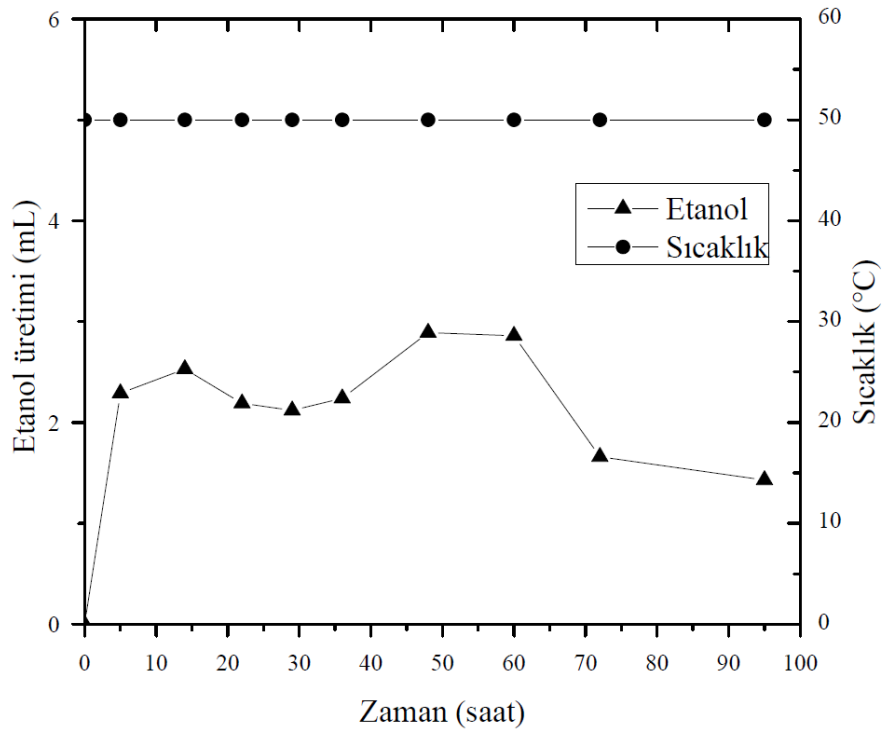
Bu çalışmada, hem 5 gr çörek otu/L hem de 10 gr çörek otu/L yükleme oranındaki biyoreaktörlerde, maksimum etanol üretim saati sonrasında, pH değişimine bağlı olarak etanol üretimi azalma eğilimi göstermiştir. Başlangıç 5.0 pH değerinin, çalışma sonunda 4.80-4.83 pH değeri aralığında olduğu belirlenmiştir. Hidrojen veya etanol üretiminde mikroorganizmaların koşullardaki (pH ve ortam bileşimi) değişiklikten etkilendiği rapor edilmiştir. Bu nedenle, pH ve besin formülasyonuna bağlı olarak eş zamanlı hidrojen ve etanol üretiminin esnek bir yetenek gösterdiği düşünülmektedir. Bu kapsamda yapılmış araştırmalarda, çalışmada kullanılan mikroorganizmaların, eş zamanlı hidrojen/etanol üreticileri olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2009b). Başlangıç pH değerlerinin 5.5 ve 9.0 arasında değiştiği farklı bir araştırmada; son pH değerleri 4.8 ve 8.9 olduğu durumda, bu pH değerleri yüksek indirgeyici şeker konsantrasyonu ile sonuçlanmıştır, ancak etanol üretimi olmadığı belirtilmiştir. Araştırmada, hem düşük (4.8 ve 8.9) hem de yüksek başlangıç (5.5 ve 9.0) pH değerlerinde etanol üretimi gözlenmediği rapor edilmiştir (Lin ve Hung, 2008). Lin ve Hung (2008) tarafından yapılmış aynı çalışmada, zenginleştirilmiş kültür, ön işlem uygulanmamış ve ısıtma işlemi uygulanmasına tabi tutulmuş mikroorganizmalar, substrat tipine göre etanol üretim performansı bakımından kıyaslanmıştır. Buna göre, selülozun ham madde olarak kullanıldığı çalışmada ısıtma işlemi görmüş kültür kullanımının etanol üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Ksilozun ham madde olarak kullanıldığı çalışmada da zenginleştirilmiş kültür kullanımının ısıtma ön işlem uygulanmış kültür kullanımına göre etanol üretiminde daha iyi performans gösterdiği rapor edilmiştir. Atıkların kullanımına ilişkin başka bir çalışmada da katı formda ham madde, etanol üretimi için kullanıldığında ön işlem uygulanmasına ihtiyaç olabileceği rapor edilmiştir. Bu ön işlem uygulamasının gerekli olup olmadığı da katı materyale göre farklılık gösterebilir şeklinde bildirilmiştir (Hahn-Hagerdal ve diğerleri, 2006; Ashour ve diğerleri, 2023). Literatür araştırmaları, biyoetanol üretimi kapsamında yapılan çalışmalarda, mikroorganizma (bakteri, maya, mantar) tipi, pH, sıcaklık ve ham madde (atık, atıksu) tipi gibi parametrelerin biyoetanol üretimi için önemli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, tüm işletim koşulları aynı olup, sadece organik yükleme (5 gr çörek otu/L ve 10 gr çörek otu/L)

farklılığı olan biyoreaktörlerin işletim sonuçları (5.53 mL ve 8.07 mL), organik yükleme parametresinin önemli bir işletim parametresi olduğunu göstermektedir.

4.2. ÇÖREK OTU ATIĞI EKSTRAKT SIVISI KULLANILARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ

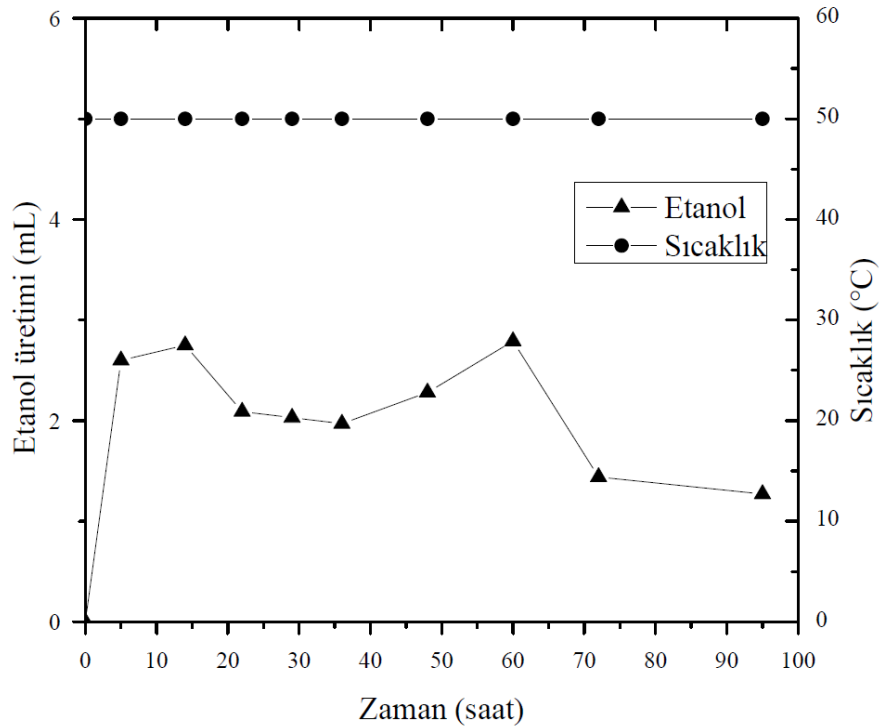
Etanol üretimi amacıyla karışık meyve atığında bulunan serbest şekerler, mekanik çalkalama ve ekstraksiyon yoluyla elde edilerek kullanılmıştır (Bonatto ve diğerleri, 2021). Bu çalışmada da çörek otu atığına dekoksasyon ön işlemi uygulanarak, elde edilen ekstrakt sıvısı biyoetanol üretimi için kullanılmıştır. Ön işleme tabi tutulmuş çörek otu atığı biyokütlesinden elde edilen ekstrakt sıvısı, ısıl işleme tabi tutulmuş anaerobik çamur ve iz element solüsyonu biyoreaktörlere eklenerek, biyoreaktörlerin kurulumu yapılmıştır. Bu amaçla, kurulumu yapılmış olan biyoreaktörler, etüvde 50 ± 1 °C sıcaklık koşullarında işletilmiştir. Ön işleme tabi tutulmuş çörek otu atığı biyokütlesinin 5 ve 10 gr çörek otu ekstraktı/L organik yükleme oranlarında kullanımı ve 5.0 başlangıç pH değerinde, biyoetanol üretim potansiyeli araştırılmıştır (Şekil 7 ve Şekil 8).

Ön işleme tabi tutulmuş çörek otu atığı biyokütlesinden elde edilen ekstrakt sıvısının kullanıldığı biyoreaktörlerde, pH 5.0'de, işletimin ilk beş saatine kadar etanol üretimi gerçekleşmemiştir (Şekil 7). 5 gr çörek otu ekstraktı/L biyoreaktöründe, etanol üretiminin beş saatte 2.29 mL olduğu saptanmıştır. Biyoetanol üretimi, yakın zamanda aşılınmış kültürün bir özelliği olan bakterilerin lag fazı nedeniyle, fermantasyonun ilk saatlerinde daha yavaş olup, bu çalışmada da bu faz süresinin 5 saate kadar bir sürede olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, hızlı adaptasyon ve ürün oluşumunun başlangıcı eğilimi vardır. Şekil 7'de verildiği üzere, etanol üretiminin on dört saatte 2.53 mL, yirmi iki saatte 2.19 mL, yirmi dokuz saatte 2.12 mL ve otuz altı saatte 2.24 mL olduğu saptanmıştır. Maksimum etanol üretimine 2.89 mL olarak kırk sekiz saatte ulaşılmıştır. Bunu takiben, altmış saat örneklemede 2.86 mL etanol üretimine ulaşılarak, bu örnekleme saati sonrası, yetmiş iki saatte yapılan örneklemede ise, etanolün 1.66 mL olduğu belirlenmiştir.



Şekil 7. Çörek otu atığı ekstrakt sıvısının 5 gr çörek otu ekstraktı/L olarak kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi

Ön işleme tabi tutulmuş çörek otu atığı biyokütlesinden elde edilen ekstrakt sıvısının kullanıldığı, 10 gr çörek otu ekstraktı/L organik yüklemde işletilen biyoreaktörde, aynı başlangıç pH değerinde, işletimin ilk beş saatine kadar, etanol üretiminin olmadığı saptanmıştır (Şekil 8). Biyoetanol üretimi, yakın zamanda aşılınmış kültürün bir özelliği olan bakterilerin lag fazı nedeniyle, diğer biyoreaktörlerde olduğu gibi bu biyoreaktörde de fermantasyonun ilk saatlerinde daha yavaş olup, bu faz süresinin 5 saate kadar bir sürede olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, biyoreaktör ortamına hızlı adaptasyon ve ürün oluşumunun başlangıcı eğilimi vardır. Etanol üretimi, beş saatte 2.60 mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 8). Şekil 8’de verildiği üzere, etanol üretimi on dört saatte 2.75 mL olarak saptanmış, bu saat itibarıyla azalmaya başlayarak yirmi iki saatte 2.09 mL, yirmi dokuz saatte 2.03 mL ve otuz altı saatte 1.97 mL’ye kadar azalma eğilimi göstermiştir. Kırk sekiz saat örneklemede 2.28 mL olarak elde edilen etanol, altmış saat örneklemede maksimum 2.79 mL olarak belirlenmiştir. Bu örnekleme saati sonrası, yetmiş iki saatte yapılan örneklemede ise, etanol 1.44 mL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 8. Çörek otu atığı ekstrakt sıvısının 10 gr çörek otu ekstraktı/L olarak kullanıldığı biyoreaktörlerde pH 5.0 çalışma koşullarında etanol üretimi

Biyoyakıt üretimi kapsamında, atıklara dekoksiyon ön işlemi uygulanarak elde edilmiş ekstrakt sıvısının kullanıldığı biyohidrojen üretimine yönelik araştırmalar literatürde bulunmaktadır (Dursun ve Gülşen, 2024; Dursun, 2024b). Ancak, atıklara dekoksiyon ön işlemi uygulanarak elde edilmiş ekstrakt sıvısının kullanıldığı biyoetanol üretimine yönelik araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Biyoetanol üretimi amacıyla karışık bakterilerin kullanıldığı sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalardan biri Vikromvarasiri ve diğerleri (2014) tarafından yapılmıştır. Çalışmada, ham gliserol'den etanole fermentatif dönüşümde karışık bir mikrobiyal konsorsiyumun potansiyel uygulaması incelenmiştir. 30 °C'de ve pH 7'de anaerobik koşullar altında 45 g L⁻¹'lik ilk saf gliserol konsantrasyonundan 72 saatlik fermentasyondan sonra maksimum 11.1 g L⁻¹ ve en düşük 6.5 g L⁻¹ etanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Saf gliserol'ün optimum fermentasyon koşulunda, 16S rRNA gen dizilerine dayalı mikrobiyal konsorsiyumunun filogenetik analizi, *Gammaproteobacteria*'nın konsorsiyumdaki mikrobiyal çeşitliliğin %95'ini temsil ettiği, geri kalan oranı ise *Betaproteobacteria*'nın oluştuğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, hem 5 gr çörek otu ekstraktı/L hem de 10 gr çörek otu ekstraktı/L yükleme oranındaki biyoreaktörlerde, maksimum etanol üretim saati sonrasında, pH değişimine bağlı olarak etanol üretimi genel olarak azalma eğilimi göstermiştir. Biyoreaktör işletim parametrelerinden çalışma ortamının pH değeri, bakteriyel kontaminasyon kontrolündeki önemi nedeniyle fermentasyonu önemli ölçüde etkileyen bir faktördür (Menezes ve diğerleri, 2013). Çalışmada, başlangıç 5.0 pH değerinin, çalışma sonunda 4.81-4.85 pH değeri aralığında olduğu saptanmıştır. Zheng ve diğerleri (2012), genel olarak tüm substratlar için, 36 saatlik fermentasyondan sonra kalan şeker miktarının göz ardı edilebileceğini bildirmiştir. Dziugan ve diğerleri (2013), yoğun meyve suyu şıralarından biyoetanol üretimini ve bunların konsantrasyonlarının, mineral takviyesinin tipinin ve maya aşısının dozunun fermentasyon dinamikleri ve etanol verimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda, yüksek yoğunluklu meyve suyu şıralarının etkili etanol fermentasyonunu sağlamak için yüksek etanol toleransına sahip bir maya suşu ve çok miktarda aşı kullanılması gerektiğini göstermiştir.

Literatür araştırmaları, biyoetanol üretimi kapsamında yapılan çalışmalarda, mikroorganizma (bakteri, maya ve mantar) tipi, pH, sıcaklık ve ham madde (atık ve atıksu) tipi gibi parametrelerin biyoetanol üretimi için önemli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, tüm işletim koşulları aynı olup, sadece organik yükleme (5 gr çörek otu ekstraktı/L ve 10 gr çörek otu ekstraktı/L) farklılığı olan biyoreaktörlerin Şekil 7 ve Şekil 8'da verilmiş sonuçları (2.89 mL ve 2.79 mL), önemli farklılık göstermese de organik yüklemenin hassas derecede önemli bir işletim parametresi olduğunu göstermektedir.

Çalışma genel olarak değerlendirildiğinde, ön işleme tabi tutulmayarak ham biyokütlenin doğrudan kullanılmış olduğu biyoreaktörlerin, ön işlem uygulanarak elde edilmiş ekstrakt sıvısının kullanılmış olduğu biyoreaktörlere göre daha iyi biyoetanol üretimiyle sonuçlandığı belirlenmiştir.

SONUÇ

Çalışmada, Türkiye’de soğuk pres çörek otu yağı üretimi sonrası üreticiler tarafından elde edilen ve genel olarak çöpe atılan ya da hayvan yemi olarak kullanım alanı olan atık posa, çalışmada kullanılmak üzere temin edilmiş, biyoetanol üretimi kapsamında araştırılmıştır. Çalışmada, ham maddeye ön işlem uygulanmış veya uygulanmamış olmasına göre farklı organik yükleme oranları, 5.0 pH değerinde ve 50 ± 1 °C sıcaklık işletim koşullarında biyoetanol üretim potansiyeli irdelenmiştir. Yapılan araştırmada, aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

1. Atık çörek otu, biyoetanol üretimi amacıyla başarılı bir şekilde kullanılabilir.
2. Biyoreaktörlerde üretilen biyoetanol, saatlere göre artma ve azalma yönünden genel olarak değerlendirildiğinde benzer eğilimler göstermiştir.
3. Çörek otu posasının ön işleme tabi tutulmadan doğrudan kullanıldığı biyoreaktörlerde gerçekleştirilen fermentasyonda, çörek otu ekstrakt sıvısının kullanıldığı biyoreaktörlere göre daha yüksek biyoetanol üretimi tespit edilmiştir.
4. Çalışmada, doğrudan 5 gr çörek otu/L ve 10 gr çörek otu/L olarak çörek otu posası kullanılan biyoreaktörlerde, sırasıyla maksimum 5.53 mL ve 8.07 mL biyoetanol üretimi saptanmıştır.
5. Çalışmada, 5 gr çörek otu ekstraktı/L kullanılan biyoreaktörlerde 2.89 mL ve 10 gr çörek otu ekstraktı/L kullanılan biyoreaktörlerde 2.79 mL biyoetanol üretimi belirlenmiştir.
6. Biyoreaktörler kıyaslandığında, 10 gr çörek otu/L olarak çörek otu posası kullanılan çalışma sonuçlarının daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında, atık çörek otunun biyoetanol üretimi için başarı ile kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, bazı öneriler aşağıda sunulmuştur;

1. Pilot ölçekli saha çalışmaları yapılabilir.

2. Farklı işletim (pH, sıcaklık, ham madde tipi ve mikroorganizma tipi) parametresi koşullarında hem doğrudan ham madde kullanımı hem de ham maddeye yönelik çeşitli ön işlem uygulamalarıyla elde edilen sıvı kullanımının optimizasyonuna yönelik kapsamlı çalışmalar yapılması önerilmektedir.



KAYNAKÇA

- Ab Rasid, N. S., Shamjuddin, A., Rahman, A. Z. A. ve Amin, N. A. S. (2021). Recent advances in green pre-treatment methods of lignocellulosic biomass for enhanced biofuel production. *Journal of Cleaner Production*, 321, 129038.
- Abduljabbar, A. T., Younes, R. W. ve Ibrahim, A. J. (2022). Converting of cardboard waste for bioethanol production using anaerobic fermentation. *Iraqi Journal of Industrial Research*, 9(2), 141-147.
- Abdullah, B., Muhammad, S. A. F. S., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N. ve Aziz, M. A. (2019). Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 37-50.
- Acebu, P. I. G., Luna, M. D. G. D., Chen, C-Y., Abarca, R. R. M., Chen, J-H. ve Chang, J-S. (2022). Bioethanol production from *Chlorella vulgaris* ESP-31 grown in unsterilized swine wastewater. *Bioresource Technology*, 352, 127086.
- Aggarwal, N. K., Kumar, N. ve Mittal, M. (2022). Green Chemistry and Sustainable Technology. Bioethanol Production Past and Present. Springer, Switzerland.
- Ahmed, I., Hossain, J., Khan, N. M. ve Hasan, C. M. (2023). A sustainable approach of turning potato peel waste towards bioethanol production using *Saccharomyces Cerevisiae*. *The Chittagong University Journal of Science*, 11(1-2), 85-91.
- Ahring, B. K., Jensen, K., Nielsen, P., Bjerre, A. B. ve Schmidt, A. S. (1996). Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 58(2), 107–113.
- Ahring, B. K., Licht, D., Schmidt, A. S., Sommer, P. ve Thomsen, A. B. (1999). Production of ethanol from wet oxidised wheat straw by *Thermoanaerobacter mathranii*. *Bioresource Technology*, 68(1), 3–9.
- Alfonsín, V., Maceiras, R. ve Gutiérrez, C. (2019). Bioethanol production from industrial algae waste. *Waste Management*, 87, 791-797.
- Al-Jassir, M. S. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 45, 239-242.
- Almarsdottir, A. R., Sigurbjornsdottir, M. A. ve Orlygsson, J. (2012). Effects of various factors on ethanol yields from lignocellulosic biomass by

- Thermoanaerobacterium* AK17. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(3), 686–694.
- Antonopoulou, G., Vayenas, D. ve Lyberatos, G. (2016). Ethanol and hydrogen production from sunflower straw: The effect of pretreatment on the whole slurry fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 65-74.
- Ashour, M., Al-Souti, A. S., Hassan, S. M., Ammar, G. A. G., Goda, A. M. A.-S., El-Shenody, R., Abomohra, A. E.-F., El-Haroun, E. ve Elshobary, M. E. (2023). Commercial seaweed liquid extract as strawberry biostimulants and bioethanol production. *Life*, 13, 85.
- Awol, Z. S. ve Abate, R. T. (2024). Comparative study for bioethanol production from waste paper using *E. coli* and *S. cerevisiae* specie. *Asian Journal of Research in Biosciences*, 6(1), 38-48.
- Ayadi, K., Meziane, M., Rouam, D., Bouziane, M. N. ve El-Miloudi, K. (2022). Olive mill wastewater for bioethanol production using immobilised cells. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 71 (1-2), 21-28.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M. ve Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 1000196.
- Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon, R.A.D., de Vriesa, H. ve Luque, R. (2014). Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *RSC Advances*, 4, 48109-48127.
- Baydar, H. (2013). *Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi* (Genişletilmiş 4. baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi, Yayın No: 51. Isparta.
- Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C. ve Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585.
- Bonatto, C., Scapini, T., Zanivan, J., Dalastra, C., Bazoti, S. F., Alves, S., Fongaro, G., deOliveira, D. ve Treichel, H. (2021). Utilization of seawater and wastewater

- from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol. *Bioresource Technology*, 321, 124501.
- Boulal, A., Kihal, M., Khelifi, C. ve Benali, B. (2016). Bioethanol production from date palm fruit waste fermentation using solar energy. *African Journal of Biotechnology*, 15(30), 1621-1627.
- Budiyono., Agustiani, V., Khoiriyah, L., Matin, H. H. A. ve Rachmawati, S. (2022). Effect of hydrogen peroxide acetic acid pretreatment on kapok (*ceiba pentandra*) fruit peel waste for bioethanol production using separated hydrolysis and fermentation methods. *Materials Today: Proceedings*, 63, S73-S77.
- Byadgi, S. A. ve Kalburgi, P. B. (2016). Production of bioethanol from waste newspaper. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 555-562.
- Canganella, F. ve Wiegel, J. (1993). The potential of thermophilic Clostridia in biotechnology. In: The Clostridia and Biotechnology, D. R. Woods, (Ed.), Butterworths Publishers, ISBN 0750690046, USA. 391-429.
- Carreira, L. H. ve Ljungdahl, L. G. (1993). Production of ethanol from biomass using anaerobic thermophilic bacteria, In: Liquid fuel developments, D. L. Wise, (Ed.), CRC Press, ISBN 0849360943, USA. 1-28.
- Carrillo-Barragán, P., Dolfing, J., Sallis, P. ve Gray, N. (2021). The stability of ethanol production from organic waste by a mixed culture depends on inoculum transfer time. *Biochemical Engineering Journal*, 166, 107875.
- Champagne, P. (2007). Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: a Canadian perspective: Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(3), 211-230.
- Chatanta, D., Attri, C., Gopal, K., Devi, M, Gupta, G. ve Bhalla, T. (2007). Bioethanol production from apple pomace left after juice extraction. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(2), 1-5.
- Chaturvedi, V. ve Verma, P. (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *3 Biotech*, 3, 415–431.
- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H. ve Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160, 196-206.

- Chenxi, Z., Wenjing, L., Hongtao, W. ve Xiangliang, P. (2013). Simultaneous hydrogen and ethanol production from a mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles I: Effect of substrate and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(23), 9701-9706.
- Choi, I. S., Kim, Y. G., Jung, J. K. ve Bae, H-J. (2015). Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy*, 93, 1742-1747.
- Chuang, Y-S., Huang, C-Y., Lay, C-H., Chen, C-C., Sen, B. ve Lin, C-Y. (2012). Fermentative bioenergy production from distillers grains using mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15547-15555.
- Crespo, C., Pozzo, T., Karlsson, E. N., Alvarez, M. T. ve Mattiasson, B. (2012). *Caloramator boliviensis* sp. nov., a thermophilic, ethanol-producing bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1679–1686.
- Çakmak, A. ve Özcan, H. (2021). Gliserin eterlerinin ikinci nesil biyoyakıt olarak dizel motorda kullanımının araştırılması. *Isı Bilimi ve Tekniği Dergisi*, 41(2), 191-204.
- Danmaliki, G., Muhammad, A., Shamsuddeen, A. ve Usman, B. (2016). Bioethanol production from banana peels. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 10(6), 56-62.
- Danso, B., Ali, S. S., Xie, R. ve Sun, J. (2022). Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase-and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite, *Microcerotermes* species. *Fuel*, 310, 122333.
- David, E., Kopac, J., Armeanu, A., Niculescu, V., Sandru, C. ve Badescu, V. (2019). Biomass - alternative renewable energy source and its conversion for hydrogen rich gas production. *E3S Web of Conferences*, 122, 01001.
- Du, R., Yan, J., Li, S., Zhang, L., Zhang, S., Li, J., Zhao, G. ve Qi, P. (2015). Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(10), 1-10.
- Dursun, N. (2024a). Production of biological hydrogen from Quinoa residue using dark fermentation and estimation of its microbial diversity. *Heliyon*, 10, e25018.
- Dursun, N. (2024b). Biohydrogen production from Buckwheat residue using anaerobic mixed bacteria. *Fermentation*, 10(1), 15.

- Dursun, N. ve Gülşen, H. (2024). Biohydrogen production from waste black cumin (*Nigella Sativa*) extract liquid. *Bioengineering*, 11(3), 282.
- Dutta, S., Yesankar, P. J. ve Kumar, M. S. (2024). Potential of thermophilic bacteria isolated from cow dung-grass compost for bioethanol production using floral waste. *Biofuels*, 15(6), 635-643.
- Dziugan, P., Balcerek, M., Pielech-Przybylska, K. ve Patelski, P. (2013). Evaluation of the fermentation of high gravity thick sugar beet juice worts for efficient bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 158.
- Efunwoye, O. O. ve Oluwole, O. R. (2019). Bioethanol production from pineapple waste by solid state fermentation method. *Nigerian Journal of Microbiology*, 33(2), 4811-4820.
- Erkurt, E. A. (2011). Doğu Akdeniz Bölgesinde yetiştirilen mısır ve buğday atıklarından biyoetanol üretim verimi üzerine ön işlem etkisinin araştırılması. Mersin Üniversitesi, Doktora Tezi, Mersin, Türkiye.
- Fang, H. H. P., Li, C. ve Zhang, T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 683–692.
- Fong, J. C. N., Svenson, C. J., Nakasugi, K., Leong, C. T. C., Bowman, J. P., Chen, B., Glenn, D. R., Neilan, B. A. ve Rogers, P. L. (2006). Isolation and characterization of two novel ethanol-tolerant facultative-anaerobic thermophilic bacteria strains from waste compost. *Extremophiles*, 10(4), 363–372.
- Gil, L. S. ve Maupoey, P. F. (2018). An integrated approach for pineapple waste valorisation. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues. *Journal of Cleaner Production*, 172, 1224-1231.
- Gonçalves, F. A., Ruiz, H. A., Santos, E. S. D., Teixeira, J. A. ve Macedo, G. R. D. (2015). Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 77, 1-12.
- Goreja, W. G. (2003). *Black seed: Nature's miracle remedy*. Amazing Herbs Press.
- Goshadrou, A. (2019). Bioethanol production from Cogongrass by sequential recycling of black liquor and wastewater in a mild-alkali pretreatment. *Fuel*, 258, 116141.
- Guo, X., Huang, Y., Tang, Y., Xia, A., Zhu, X., Zhu, X. ve Liao, Q. (2024). Two-step pH regulating ethanol production through continuous CO/CO₂ gas fermentation by mixed bacteria from rabbit faeces. *Renewable Energy*, 228, 120564.

- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Liden, G. ve Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol the fuel of tomorrow from residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549–556.
- Hussain, M. K., Saquib, M. ve Khan, M. F. (2019). Techniques for Extraction, Isolation, and Standardization of Bio-active Compounds from Medicinal Plants. Swamy, M. K., Akhtar, M. S. (Eds) Natural Bio-active Compounds. Springer, Singapore.
- İş, Ş. ve Beyatlı, A. (2023). Çörek otu'nun (*Nigella sativa*) biyolojik ve farmakolojik özellikleri. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 13(3), 543-552.
- Karim, A., Gerliani, N. ve Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.
- Kashyap, A. (2022). Bioethanol production from organic kitchen waste using *Saccharomyces cerevisiae*. *Helix*, 12(2), 28-33.
- Koo, B-W., Kim, H-Y., Park, N., Lee, S-M., Yeo, H. ve Choi, I-G. (2011). Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1833-1840.
- Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V. ve Tyagi, S. K. (2012). Fermentative hydrogen production-An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2337-2346.
- Kumar, A. K. ve Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: A review. *Bioresource and Bioprocessing*, 4, 7.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V. ve Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*, 199, 106244.
- Kumar, R. S., Singh, P. ve Ghosh, S. (2022). Sequential fermentation for enhanced volumetric productivity of bioethanol from mixed sugars. *Fuel*, 308, 121984.
- Kumar, R. ve Prakash, O. (2023). Experimental investigation on effect of season on the production of bioethanol from wheat-stalk (WS) using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method. *Fuel*, 351, 128958.

- Kumari, S. ve Das, D. (2017). Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(7), 4083-4094.
- Lay, C-H., Lin, H-C., Sen, B., Chu, C-Y. ve Lin, C-Y. (2012). Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 27, 155-164.
- Lee, Y. E., Jain, M. K., Lee, C. Y., Lowe, S. E. ve Zeikus, J. G. (1993). Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes - description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen-nov, sp-nov, and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen-nov, sp-nov - reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb-nov, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb-nov, and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb-nov, respectively - and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 41-51.
- Lin, C-Y. ve Hung, W-C. (2008). Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 3660-3667.
- Lopez-Hidalgo, A. M., Sánchez, A. ve León-Rodríguez, A. D. (2017). Simultaneous production of bioethanol and biohydrogen by *Escherichia coli* WDHL using wheat straw hydrolysate as substrate. *Fuel*, 188, 19-27.
- Mahapatra, S., Kumar, D., Singh, B. ve Sachan, P. K. (2023). Biofuels and their sources of production: A review on cleaner sustainable alternative against conventional fuel, in the framework of the food and energy nexus. *Energy Nexus*, 4, 100036.
- Melekwe, E. I., Lateef, S. A. ve Ana, G. R. E. E. (2016). Bioethanol production potentials of corn cob waste office paper and leaf of *Thaumatococcus daniellii*. *British Journal of Applied Science & Technology*, 17(4), 1-10.
- Melendez, J. R., Mátyás, B., Hena, S., Lowy, D. A. ve Salous, A. E. (2022). Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160, 112260.

- Menezes, E. G. T., Carmo, J. R. D., Menezes, A. G. T., Alves, J. G. L. F., Pimenta, C. J. ve Queiroz, F. (2013). Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 673–687.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M. ve Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.
- Nair, R. B., Lennartsson, P. R. ve Taherzadeh, M. J. (2017). Bioethanol production from agricultural and municipal wastes. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Solid Waste Management*, 157-190.
- Ng, W. J., Tan, C. T. ve Bae, S. (2021). Effects of monochloramine on culturability, viability and persistence of *Pseudomonas putida* and tap water mixed bacterial community. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 3799–3810.
- Nosrati-Ghods, N., Harrison, S. T. L., Isafiade, A. J. ve Tai, S. L. (2020). Analysis of ethanol production from xylose using *Pichia stipitis* in microaerobic conditions through experimental observations and kinetic modelling. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107754.
- Ofori-Boateng, C. ve Lee, K. T. (2014). Ultrasonic-assisted simultaneous saccharification and fermentation of pretreated oil palm fronds for sustainable bioethanol production. *Fuel*, 119, 285-291.
- Onay, M. (2018). Bioethanol production from *Nannochloropsis gaditana* in municipal wastewater. *Energy Procedia*, 153, 253-257.
- Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., Nebioğlu, D., Büyükbingöl, E., Göker, H., Yıldız, İ., Altuntaş-Dinlenç, T.G., Tunçbilek, M., Ayhan-Kılıcıgil, G., Ölgün, S., Süzen, S., Temiz-Arpacı, Ö., Kuş, C., Bozdağ-Dündar, O., Tekinergülbaş, B. ve Ateş-Alagöz, Z. (2004). *Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, 21-22.
- Palacios, S., Ruiz, H. A., Ramos-Gonzalez, R., Martínez, J., Segura, E., Aguilar, M., Aguilera, A., Michelena, G., Aguilar, C. ve Ilyina, A. (2017). Comparison of physicochemical pretreatments of banana peels for bioethanol production. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 993-1001.

- Panahi, H. K. S., Dehghani, M., Aghbashlo, M., Karimi, K. ve Tabatabaei, M. (2020). Conversion of residues from agro-food industry into bioethanol in Iran: An under-valued biofuel additive to phase out MTBE in gasoline. *Renewable Energy*, 145, 699–710.
- Perea-Moreno, M-A., Salmerón-Manzano, E. ve Perea-Moreno, A-J. (2019). Biomass as renewable energy: Worldwide research trends. *Sustainability*, 11(3), 863.
- Rainey, F. A., Donnison, A. M., Janssen, P. H., Saul, D., Rodrigo, A., Bergquist, P. L., Daniel, R. M., Stackebrandt, E. ve Morgan, H. W. (1994). Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen.-nov., sp.-nov - an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 120, 263-266.
- Rathi, B. S., Bodhankar, S. L. ve Baheti, A. M. (2006). Evaluation of aqueous leaves extract of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 898–901.
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B. E., Zhao, L., Xie, T. ve Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9(5) 1112-1125.
- Reungsang, A., Sittijunda, S. ve Angelidaki, I. (2013). Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KCU-S1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 1813-1825.
- Reyimu, Z. ve Özçimen, D. (2017). Batch cultivation of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica* in treated municipal wastewater toward bioethanol production. *Journal of Cleaner Production*, 150, 40-46.
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Sabbagh, F., Rupani, P.F., Talaiekhosani, A., Rahimi, N. ve Ghahroudi, M. L. (2020a). Technical aspects of biofuel production from different sources in Malaysia - A review. *Processes*, 8(8), 993.
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F. ve Mohammadi, A. A. (2020b). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 117457.

- Saini, R., Chen, C.-W., Patel, A. K., Saini, J. K., Dong, C.-D. ve Singhanian, R. R. (2022). Valorization of pineapple leaves waste for the production of bioethanol. *Bioengineering*, 9(10), 557.
- Salehi, R., Taghizadeh-Alisaraei, A., Jahanbakhshi, A. ve Shahidi, F. (2018). Evaluation and measurement of bioethanol extraction from melon waste (*Qassari cultivar*). *AgricEngInt: CIGR Journal*, 20(3), 127-131.
- Sathendra, E. R., Baskar, G., Praveenkumar, R. ve Gnansounou, E. (2019). Bioethanol production from palm wood using *Trichoderma reesei* and *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 271, 345-352.
- Saxena, D., Singh, A. ve Sirohi, R. (2019). Bioethanol production from pea hull aqueous extract as a novel substrate using *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Biotechnology*, 18, 253-259.
- Scully, S. M. ve Orlygsson, J. (2015). Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies*, 8, 1-30.
- Shuler, M. L. ve Kargi, F. (2002). How Cells Grow. In: Shuler, M. L., Kargi, F. (Eds) *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, 2nd ed. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, 155–207.
- Singh, Y. D. ve Satapathy, K. B. (2018). Conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol: An overview with a focus on pretreatment. *International Journal of Engineering and Technologies*, 15, 17-43.
- Singla, A., Verma, D., Lal, B. ve Sarma, P. M. (2014). Enrichment and optimization of anaerobic bacterial mixed culture for conversion of syngas to ethanol. *Bioresource Technology*, 172, 41-49.
- Sint Jan, M. V., Guarini, M., Guesalaga, A., Pérez-Correa, J. R. ve Vargas, Y. (2008). Ultrasound based measurements of sugar and ethanol concentrations in hydroalcoholic solutions. *Food Control*, 19(1), 31–35.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S-H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., Lakner, G., Toth, G., Nemestothy, N. ve Belafi-Bako, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 3820–3836.

- Srinivasan, K. (2018). Cumin (*Cuminum cyminum*) and black cumin (*Nigella sativa*) seeds: Traditional uses, chemical constituents, and nutraceutical effects. *Food Quality and Safety*, 2(1), 1–16.
- Sudhakar, M. P., Ravel, M. ve Perumal, K. (2021). Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*. *Fuel*, 306, 121680.
- Sudiyani, Y., Dahnum, D., Burhani, D. ve Putri, A. M. H. (2019). Evaluation and comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separated hydrolysis and fermentation process. Second and Third Generation of Feedstocks, 273-290.
- Sveinsdottir, M., Baldursson, S. R. B. ve Orlygsson, J. (2009). Ethanol production from monosugars and lignocellulosic biomass by thermophilic bacteria isolated from Icelandic hot springs. *Icelandic Agricultural Sciences*, 22, 45–58.
- Sveinsdottir, M., Sigurbjornsdottir, M. A. ve Orlygsson, J. (2011). Progress in Biomass and Bioenergy Production. Chapter 19 Ethanol and Hydrogen Production with Thermophilic Bacteria from Sugars and Complex Biomass. 359-394.
- Tabaraşu, A-M., Biriş, S. Ş., Gageanu, I., Anghelache, D., Bălăţatu, C. ve Persu, C. (2022). Methods of extracting the active principles from medicinal and aromatic plants – A review. *Acta Technica Corviniensis – Bulletin of Engineering*, 15, 23–26.
- Taherzadeh, M. J. ve Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2, 707–738.
- Tan, J. S., Phapugrangkul, P., Lee, C. K., Lai, Z-W., Bakar, M. H. A. ve Murugan, P. (2019). Banana frond juice as novel fermentation substrate for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101293.
- Taylor, M. P., Eley, K. L., Martin, S., Tuffin, M. I., Burton, S. G. ve Cowan, D. A. (2009). Thermophilic ethanologenes: Future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in Biotechnology*, 27(7), 398–405.
- Tesfaw, A., Oner, E. T. ve Assefa, F. (2021). Evaluating crude whey for bioethanol production using non-*Saccharomyces* yeast, *Kluyveromyces marxianus*. *SN Applied Sciences*, 3(42), 1-8.

- Tomás, A. F. (2013). *Optimization of bioethanol production from carbohydrate-rich wastes by extreme thermophilic microorganisms*. Doctoral Dissertation, Technical University of Denmark.
- Tomás, A. F., Karagöz, P., Karakashev, D. ve Angelidaki, I. (2013). Extreme thermophilic ethanol production from rapeseed straw: Using the newly isolated *Thermoanaerobacter pentosaceus* and combining it with *Saccharomyces cerevisiae* in a two-step process. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6), 1574–1582.
- Tsolcha, O. N., Patrino, V., Economou, C. N., Dourou, M., Aggelis, G. ve Tekerlekopoulou, A. G. (2021). Utilization of biomass derived from Cyanobacteria-based agro-industrial wastewater treatment and raisin residue extract for bioethanol production. *Water*, 13(4), 486.
- Tsunatu, D. Y., Atiku, K. G., Samuel, T. T., Hamidu, B. I. ve Dahutu, D. I. (2017). Production of bioethanol from rice straw using yeast extracts peptone dextrose. *Nigerian Journal of Technology*, 36(1), 296-301.
- Valles, A., Alvarez-Hornos, F. J., Martinez-Soria, V., Marzal, P. ve Gabaldon, C. (2020). Comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation processes for butanol production from rice straw. *Fuel*, 282, 118831.
- Vikromvarasiri, N., Laothanachareon, T., Champreda, V. ve Pisutpaisal, N. (2014). Bioethanol production from glycerol by mixed culture system. *Energy Procedia*, 61, 1213-1218.
- Vivek, N., Nair, L. M., Mohan, B., Nair, S. C., Sindhu, R., Pandey, A., Shurpali, N. ve Binod, P. (2019). Bio-butanol production from rice straw – Recent trends, possibilities, and challenges. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100224.
- Wang, R., He, X., Lin, L., Flores-Betancourt, A., Lee, K., Dunning, T. ve Qu, J. (2023). Investigation of biomass fouling on screw feeder in preconversion of pyrolysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(13), 4934-4942.
- Yang, M., Lan, M., Gao, X., Dou, Y. ve Zhang, X. (2021). Sequential dilute acid/alkali pretreatment of corncobs for ethanol production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 43(14), 1769-1778.

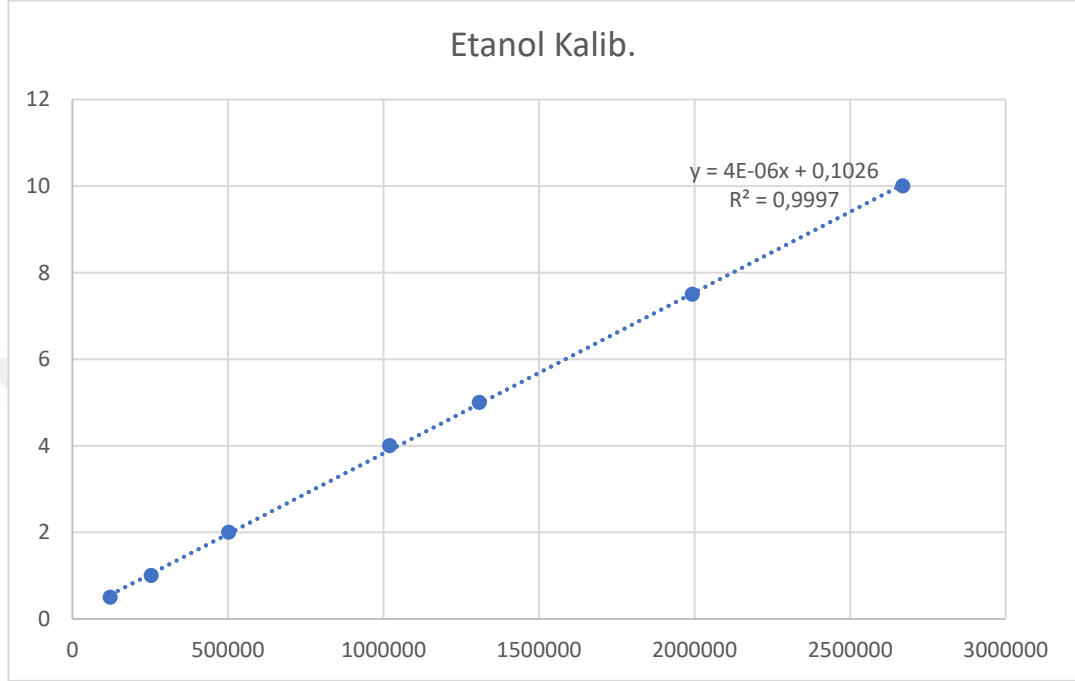
- Yarnell, E. ve Abascal, K. (2011). *Nigella sativa*: Holy herb of the Middle East. *Alternative and Complementary Therapies*, 17(2), 99–105.
- Yasuda, M., Nagai, H., Takeo, K., Ishii, Y. ve Ohta, K. (2014). Bio-ethanol production through simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiegrass (*Pennisetum purpureum Schumach*). *SpringerPlus*, 3, 333.
- Yu, M., Li, J., Chang, S., Zhang, L., Mao, Y., Cui, T., Yan, Z., Luo, C. ve Li, S. (2016). Bioethanol production using the sodium hydroxide pretreated sweet sorghum bagasse without washing. *Fuel*, 175, 20-25.
- Yusaf, T. ve Al-Juboori, R. A. (2014). Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications. *Applied Energy*, 114, 909–923.
- Zanivan, J., Bonatto, C., Scapini, T., Dalastra, C., Bazoti, S. F., Júnior, S. L. A., Fongaro, G. ve Treichel, H. (2022). Evaluation of bioethanol production from a mixed fruit waste by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. *BioEnergy Research*, 15, 175–182.
- Zhang, Q-W., Lin, L-G. ve Ye, W-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 20.
- Zhang, B., Li, J., Liu, X. ve Bao, J. (2022). Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. *Industrial Crops & Products*, 187, 115527.
- Zhao, X., Cheng, K. ve Liu, D. (2009a). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 815–827.
- Zhao, C., O-Thong, S., Karakashev, D., Angelidaki, I., Lu, W. ve Wang, H. (2009b). High yield simultaneous hydrogen and ethanol production under extreme-thermophilic (70 °C) mixed culture environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5657–5665.
- Zhao, C., Ma, Z., Huang, C., Wen, J. ve Hassan, M. (2022). From biomass to bio-energy and bio-chemicals: Pretreatment, thermochemical conversion, biochemical conversion and its bio-based applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 975171.

- Zheng, Y., Yu, C., Cheng, Y-S., Lee, C., Simmons, C. W., Dooley, T. M., Zhang, R., Jenkins, B. M. ve Vander Gheynst, J. S. (2012). Integrating sugar beet pulp storage, hydrolysis and fermentation for fuel ethanol production. *Applied Energy*, 93, 168–175.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F. ve Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35-53.



EKLER

EK 1. ETANOL KALİBRASYON EĞRİSİ



EK 2. ORJİNALLİK RAPORU FORMU

 ARDAHAN ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
ARDAHAN ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ ÇEVRE SAĞLIĞI ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA
Tarih: 16/07/2025
Tez Başlığı : Anaerobik Biyoreaktörde Atık Çörek Otunun (<i>Nigella Sativa</i>) Biyoetanol Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 19/06/2025 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda işaretlenmiş filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'tir. Uygulanan filtrelemeler: 1- ☒ Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç 2- ☒ Kaynakça hariç 3- ☒ Alıntılar dâhil 4- ☒ 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç Ardahan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nde belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini saygılarımla arz ederim.
16/07/2025
Adı Soyadı: Betül ÇELİK Öğrenci No: 22408400002 Anabilim Dalı: Çevre Sağlığı Programı: Çevre Sağlığı Statüsü: ☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
<u>DANIŞMAN ONAYI</u> UYGUNDUR. _____ Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN

EK 3. ETİK KURUL MUAFİYET FORMU

 ARDAHAN ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ TEZ ÇALIŞMASI ETİK KOMİSYON MUAFİYETİ FORMU
ARDAHAN ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ ÇEVRE SAĞLIĞI ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞINA Tarih: 16/07/2025 Tez Başlığı: Anaerobik Biyoreaktörde Atık Çörek Otunun (<i>Nigella Sativa</i>) Biyoetanol Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmam: 1. İnsan ve hayvan üzerinde deney niteliği taşımamaktadır, 2. Biyolojik materyal (kan, idrar vb. biyolojik sıvılar ve numuneler) kullanılmasını gerektirmemektedir. 3. Beden bütünlüğüne müdahale içermemektedir. 4. Gözlemsel ve betimsel araştırma (anket, mülakat, ölçek/skala çalışmaları, dosya taramaları, veri kaynakları taraması, sistem-model geliştirme çalışmaları) niteliğinde değildir. Tez çalışmamın yürütülebilmesi için herhangi bir Etik Kurul/Komisyon'dan izin alınmasına gerek olmadığını; aksi durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini saygılarımla arz ederim. 16/07/2025 Adı Soyadı: Betül ÇELİK Öğrenci No: 22408400002 Anabilim Dalı: Çevre Sağlığı Programı: Çevre Sağlığı Statüsü: ☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
<u>DANIŞMAN GÖRÜŞÜ VE ONAYI</u> _____ Dr. Öğr. Üyesi Nesrin DURSUN Detaylı Bilgi: https://www.ardahan.edu.tr Telefon: 0-4782117522 Faks: 0-4782117523 E-posta: lisansustuegitim@ardahan.edu.tr

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Betül ÇELİK

Doğum Yeri ve Tarihi :

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Ahi Evran Üniversitesi, Biyoloji

Yüksek Lisans : Ardahan Üniversitesi, LEE Çevre Sağlığı ABD
Öğrenimi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Bilimsel Faaliyetleri : ARÜ Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı.

İş Deneyimi

Stajlar :

Projeler :

Çalıştığı Kurumlar : Ardahan MEB

İletişim

E-Posta Adresi

Tarih : 16/07/2025