

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



FARKLI İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ İLE ETANOL ÜRETİMİ

Seyedeh Heliya HASSANI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



FARKLI İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ İLE ETANOL ÜRETİMİ

Seyedeh Heliya HASSANI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ İLE ETANOL ÜRETİMİ

Seydeh Helıya HASSANI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ İLE ETANOL ÜRETİMİ

Seyedeh Helıya HASSANI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 31/07/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliğı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Doç. Dr. Mehmet TORUN

Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN

ÖZET

FARKLI İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ İLE ETANOL ÜRETİMİ

Seyede Heliya HASSANI

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İrfan Turhan

Temmuz 2024; 106 sayfa

Dünya enerji tüketiminin %80' den fazlası fosil yakıtlardan karşılanmakta, bu da çevresel sorunlara ve iklim değişikliğine yol açmaktadır. Fosil yakıtların azalması, küresel ısınmaya, iklim değişikliklerine ve diğer sorunlara yol açması gelişmiş ülkeleri biyoyakıtlar gibi yenilenebilir enerji kaynaklarına yönlendirmiştir. Biyoyakıtlar, biyokütleden elde edilen ve çevresel etkisi az olan enerji kaynaklarıdır. Biyoetanol, özellikle ulaştırma sektöründe yaygın olarak kullanılan ve yüksek verimliliği ile öne çıkan bir biyoyakıttır.

Bu tez çalışmasında etanol üretimi amacıyla immobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) mayalarından yararlanılmıştır. Biyoetanol verimliliğinin artırılması zaman, maliyet ve enerji açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla bu tez kapsamında farklı immobilizasyon işlemleri ve besiyeri optimizasyonu üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Öncelikle immobilizasyon için 4 farklı PKD (Plastik Kompozit Destek) materyali ve 4 farklı 3D materyali (Hex, grid, X, W) arasında etanol üretimi açısından en iyi materyal olarak PKD2 (%5 soya fasulyesi unu, %5 maya ekstraktı, 5% sığır albümin içeren destek malzemesi) ve Hex materyalleri seçilmiştir. Karbon kaynağı olarak beyaz dut kurusu kullanılmıştır ve verimin artması için optimum koşullarda ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon için en iyi materyal seçimi ve besiyeri optimizasyonu aşamaları beyaz dut kurusu hidrolizatının modifiye ortamda (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz) yapılmış. Modifiye ortama farklı miktarlarda yedi çeşit besiyeri bileşeni eklenmiş ve 10 çeşit besiyerinin PBD (Plackett-Burman Designs) yöntemiyle formülasyonu hem PKD materyalleri ile hem de 3D materyalleri ile uygulanmış, fermentasyonları yapılmış ve PKD materyallerinde maksimum etanol üretimi için 20 g/L pepton ve 0.5 g/L KH_2PO_4 eklenmesi optimum besiyeri bileşeni olarak belirlenmiş. Hex materyalleri için ise 20 g/L pepton, 3g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi olduğu saptanmış. Doğrulama fermentasyonu ise hem beyaz dut kurusu hidrolizatı ile hem de modifiye besiyer ile yapılmıştır. Son aşamada doğrulama fermentasyonu sonuçlarına göre beyaz dut kurusu hidrolizatı ile sürekli etanol fermentasyonu gerçekleştirilmiş. Ayrıca her fermentasyonun sonunda şeker tüketimi, etanol üretimi, etanol verimi, spesifik gelişim hızı, ikiye katlanma süresi ve sürekli sisteme ait kinetik parametreler hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Besiyeri optimizasyonu, Biyoetanol, Fermentasyon, İmmobilizasyon, *Saccharomyces cerevisiae*

JÜRİ: Prof. Dr. İrfan TURHAN

Doç. Dr. Mehmet TORUN

Doç. Dr. Mert KARAOĞLAN



ABSTRACT

ETHANOL PRODUCTION WITH DIFFERENT IMMOBILIZATION METHODS

Seyede Heliya HASSANI

MSc in Food engineering

Supervisor: Prof. Dr. İrfan. TURHAN

July 2024; 106 pages

More than 80% of the world's energy consumption comes from fossil fuels, which leads to environmental problems and climate change. The decline in fossil fuel resources, leading to global warming, climate change and other problems, has led developed countries towards renewable energy sources such as biofuels. Biofuels are energy sources derived from biomass and have low environmental impact. Bioethanol is a biofuel that is widely used especially in the transportation sector and stands out with its high efficiency.

In this thesis study, immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) yeast cells were utilized for ethanol production. Increasing bioethanol productivity is very important in terms of time, cost and energy. For this purpose, immobilization, medium optimization were performed in this thesis. First of all, PCS2 (support material containing 5% soybean meal, 5% yeast extract, 5% bovine albumin) and Hex materials were selected as the best materials for ethanol production among 4 different PCS (Plastic Composite Support) and 4 different 3D materials (Hex, grid, X, W) for immobilization. Dried white mulberry was used as carbon source and its extraction was carried out under optimum conditions to increase the yield. The best material selection for immobilization and medium optimization steps were performed in synthetic medium (45 g/L glucose, 45 g/L fructose, 1 g/L sucrose) of dried white mulberry hydrolysate. Different amounts of 7 different nutrient components were added to a synthetic medium, and the Plackett-Burman designs was used to formulate 10 different nutrient combinations. These formulations were applied using both PCS materials and 3D materials, fermentations were conducted and for maximum ethanol production in PCS materials, the optimum nutrient composition was determined to be 20 g/L peptone and 0.5 g/L KH_2PO_4 and 20 g/L peptone, 3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for Hex materials. Validation fermentation was performed with both white mulberry dried hydrolysate and synthetic medium. In the last step, continuous ethanol fermentation was carried out with dried white mulberry hydrolysate according to the results of validation fermentation. Additionally, at the end of each fermentation, sugar consumption, ethanol production, ethanol yield, specific growth rate, doubling time and kinetic parameters of the continuous system were calculated.

KEYWORDS: Bioethanol, Fermentation, Immobilization, Media optimization, *Saccharomyces cerevisiae*

COMMITTEE: Prof. Dr. İrfan TURHAN

Assoc. Dr. Mehmet TORUN

Assoc. Dr. Mert KARAOĞLAN



ÖNSÖZ

Günümüzde, enerjinin büyük bir kısmı fosil kaynaklı yakıtlardan sağlanmaktadır. Ancak petrol ve diğer fosil kaynaklı yakıtlar yakın bir zamanda tükenmekte, küresel ısınmaya yol açmakta ve su ve hava kirliliğine sebep olmaktadır. Bu sorunların çözümü ve enerji talebinin karşılanması amacıyla araştırmacılar ve özel sektör firmaları çok sayıda proje gerçekleştirmektedir. Dünyanın enerji ihtiyacını karşılayıp petrol kullanımını azaltmak için alternatif enerji kaynağı olarak yenilenebilir ve çevresel olumsuz etkisi az olan kaynakları kullanmak oldukça önem arz etmektedir.

Yenilenebilir enerji kaynaklarından birisi olan biyokütle enerjisi; biyoetanol, biyodizel ve biyogaz olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyoetanolin dikkate değer avantajları arasında; biyodegradasyona uğrayabilme yeteneği, sürdürülebilirliğe katkıda bulunması, fosil kaynaklı yakıtlara kıyasla daha düşük sera gazı emisyonları üretmesi ve tarımcılar için yeni iş fırsatları oluşturabilme kabiliyeti yer almaktadır. Tüm bu avantajlar göz önüne alındığında, fosil yakıtlara olan bağımlılığı aşamalı olarak azaltmaktadır. Etanol, başta gıda ve kimya endüstrileri olmak üzere çeşitli sektörlerde yaygın bir kullanıma sahiptir. Ayrıca, araç yakıtlarında belirli oranlarda fuel-oil ile karıştırılarak kullanılabilir. Bu yanı sıra, etanolün dünya genelinde içecek üretimi, gıda katkı maddesi ve diğer alanlarda da yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir.

Dünyada biyoetanol üretimi için karbon kaynağı olarak tatlı sorgum, şeker pancarı, şeker kamışı, mısır, buğday ve diğer selüloz içeren ürünler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında, karbonhidrat kaynağı olarak şeker içeriği yüksek, fermentasyon öncesindeki ön işlemleri (up-stream) lignoselülozik materyallere göre daha az ve gıda endüstrisi dışında yeterince değerlendirilemeyen beyaz dut kurusu hidrolizatı kullanılmıştır. Beyaz dut kurusunun optimum şartlarda ekstraksiyonu yapıldıktan sonra immobilizasyon için 3D küreler ve PKD malzemesi arasında en iyisi seçilerek fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonda verimin artması için besiyeri optimizasyonu yapılmıştır. Son olarak her iki biyoreaktör türünde *S.cerevisiae* mayası kullanılarak sürekli fermentasyon yapılmıştır.

Yüksek lisans tezimde eğitimim boyunca bana güvenen, hep beni dinleyen ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden saygılı hocam Prof. Dr. İrfan TURHAN'a çok teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım boyunca aynı laboratuvar ortamını paylaştığım kıymetli çalışma arkadaşlarım Selime Benemir ERKAN, Hatice Gözde HOSTA YAVUZ, Ali ÖZCAN, Hilal Nur GÜRLER, Selin BAŞMAK, Gökçe KÜÇÜK, Ercan YATMAZ, Müge CANATAR, Gülsüm ÇANKIRAN ve diğer lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak hep benim yanımda duran ve beni maddi ve manevi açıdan hep destekleyen ve benim gelişmem için elinden geleni yapan kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca hayatımı aydınlatan sevgili nişanlım Nawaf AL-MURİSH'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Fosil Yakıtlar.....	3
2.2. Biyoyakıtlar.....	3
2.2.1. Biyoyakıtların sınıflandırılması	4
2.2.2. Biyoyakıtların yararları	5
2.3. Etanol.....	6
2.3.1. Tarihçe.....	7
2.4. Biyodizel	8
2.5. Ulaşım için Biyoetanol Kullanımı.....	9
2.6. Etanol Üretimi için Güncel Teknolojiler	9
2.6.1. Hammaddeler ve prosesler	9
2.7. Türkiye’de Biyoetanol Üretimi	12
2.8. Etanol Üretici Mikroorganizmalar	13
2.9. Fermentasyonda Kullanılan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mayası.....	13
2.10. Etanol Fermantasyonu için substrat olarak kullanılan Dut Kurusu.....	14

2.10.1. Türkiye’de dut meyvelerinin yetiştirilmesi	14
2.10.2. Dutun kullanım alanları.....	15
2.10.3. Beyaz dutun polisakkarit içeriği	15
2.11. Fermentasyon	15
2.11.1. Kesikli fermentasyon.....	16
2.11.2. Kesikli beslemeli fermentasyon	16
2.11.3. Sürekli fermentasyon.....	17
2.12. İmmobilizasyon	18
2.12.1. İmmobilizasyon işleminin avantajları	19
2.12.2. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar.....	20
2.12.3. İmmobilizasyon teknikleri.....	20
2.12.4. İmmobilizasyonun hücrelerde neden olduğu değişiklikler.....	24
2.13. Destek Materyallerinin Üstünlükleri	24
2.14. Biyofilmler	25
2.14.1. Biyofilm oluşumu.....	25
2.15. PKD Materyalinin İçeriği.....	26
2.16. 3D Materyaller Kullanılarak Hücre İmmobilizasyonu	26
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Materyal	28
2. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizma	28
3.3. Plastik Kompozit Destek Malzemeleri	29
3.4. 3D Materyaller	30
3.5. Etanol Üretimi için Uygulanan Deneme Deseni	30
3.6. PKD Materyalinin Seçimi için Falkon Tüplerinde Fermentasyon.....	31
3.7. 3D Materyalin Seçimi için Erlenmayerlerde Fermentasyon.....	32

3.8. Beyaz Dut Kurusuna Uygulanan Ön İşlem.....	33
3.9. Beyaz Dut Kurusunun Ekstraksiyonu.....	34
3.10. Besiyeri Bileşiminin Optimizasyonu.....	34
3.11. Toplam Şeker Analizi	37
3.12. Biyokütle Analizi.....	37
3.13. Etanol Analizi.....	38
3.14. PKD Materyalleri Kullanılarak Sürekli Etanol Fermentasyonu	39
3.15. 3D Materyalleri Kullanılarak Sürekli Etanol Fermentasyonu	39
3.16. Kinetik Parametreler	41
3.17. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Modifiye Ortamda Kontrol Fermentasyonun Yapılması	42
4.2. Biyofilm ve 3D Materyalinin Seçimi	43
4.3. Modifiye Ortam Bileşiminin Optimizasyonu	44
4.4. PBD ile Hex Materyalli Besiyeri Bileşiminin Optimizasyonu	44
4.5. PBD ile Etkili Parametrelerin Belirlenmesi (3D materyalleri için)	60
4.6. PBD Besiyeri Optimizasyonunun Validasyonu (Hex materyalleri için).....	63
4.7. Doğrulama Fermentasyonu (Hex materyalleri için).....	63
4.8. PBD ile PKD2 Materyalli Besiyeri Bileşiminin Optimizasyonu	65
4.9. PBD ile Etkili Parametrelerin Belirlenmesi (PKD2 materyali için).....	79
4.10. PBD Besiyeri Optimizasyonunun Validasyonu (PKD2 materyalleri için).....	81
4.11. Doğrulama Fermentasyonu	82
4.12. Kontrol Fermentasyonu	83
4.13. Hex Materyalleri ile Zenginleştirilmemiş Dut Hidrolizatında Fermentasyon ..	84

4.14. PKD 2 Materyalleri ile Zenginleştirilmemiş Dut Hidrolizatında Fermentasyon	85
4.15. Hex Materyalleri ile Dut Hidrolizatında Doğrulama Fermentasyonu	87
4.16. PKD2 Materyalleri ile Dut Hidrolizatında Doğrulama Fermentasyonu	88
4.17. PKD2 Materyalleri Kullanılarak Sürekli Fermentasyon	90
4.18. Hex Materyalleri Kullanılarak Sürekli Fermentasyon.....	91
5. SONUÇLAR.....	94
6. KAYNAKLAR.....	97

ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farklı İmmobilizasyon Yöntemleri ile Etanol Üretimi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

31.07.2024

Seyedeh Heliya HASSANI



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
ΔP	: Etanol üretimi (g/L)
ΔS	: Şeker tüketimi (g/L)
ΔX	: Biyokütle gelişimi (g/L)
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
dp/dt	: Üretim oranı
ds/dt	: Tüketim oranı
dx/dt	: Gelişme oranı
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
N	: Normal
P	: Ürün
pH	: Hidrojen iyonlarının eksi logaritması
QP	: Spesifik üretim hızı (g/L/h)
QS	: Spesifik tüketim hızı (g/L/h)
QX	: Spesifik gelişim hızı (g/L/h)
Rpm	: Devir/dakika
S	: Şeker
t	: Zaman (saat)
td	: İkiye katlanma süresi (saat)

v/v : Hacim/hacim

w/v : Ağırlık/hacim

YP/S : Etanol verimi (%)

YX/S : Biyokütle verimi (%)

Bu tez kapsamında ondalıklı sayıların ayrımı için “,” kullanılmıştır.

Kısaltmalar

ATCC : Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

Batch : Kesikli

Continuous : sürekli

D. KO : Düzeltilmiş kareler ortalaması

D. KT : Düzeltilmiş kareler toplamı

DNSA : 3,5-dinitrosalisilik asit

Down stream : Fermentasyon sonrası işlemler

Down time : Bekleme süresi

EPS : Hücre dışı polimerik maddeler

Fed-batch : Kesikli beslemeli

GRAS : Genel Olarak Güvenli Kabul Edilir

HCl : Hidroklorik asit

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

M. alba L : Beyaz dut

M. nigra L. : Karadut

M. rubra L. : Kırmızı dut

M. : Morus

NaOH : Sodyum hidroksit

P : Olasılık

PBD : Plackett Burman Designs

PKD	: Plastik Kompozit Destek
PPS	: Polipropilen destekli
ProAlcool	: Ulusal Alkol Programı
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	: Serbestlik derecesi
SH	: Standart hata
TARKİM	: Tarımsal Kimya Teknolojileri Sanayi ve Ticaret A.Ş.
TEZKİM	: Tarımsal Kimya İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Up stream	: Fermentasyon öncesi işlemler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyokütle kullanım alanları	4
Şekil 2.2. Dut kurusu gibi karbonhidrat kaynaklarından biyoetanol üretiminin karbon döngüsü	5
Şekil 2.3. Dünyadaki biyoetanol üretimi (1975-2010), (Anonim 3; Bengisu 2014).	6
Şekil 2.4. Dünyadaki ülkelerin biyoetanol üretme oranları (Bengisu 2014).	7
Şekil 2.5. Dünyadaki ülkelerin biyoetanol üretme oranları (Bengisu 2014).	12
Şekil 2.6. Hücre immobilizasyonunun temel yöntemleri (Kourkoutas vd. 2004).	21
Şekil 2.7. PKD materyalleri	25
Şekil 2.8. 3D materyaller (Hex)	27
Şekil 3.1. Materyal olarak kullanılan beyaz dut kurusu.	28
Şekil 3.2. Fermentasyonda kullanılan <i>S. cerevisiae</i> mayasının geliştirilmesi	29
Şekil 3.3. İmmobilizasyonda kullanılan 3 D materyalleri; a) Hex; b) Grid; c) X; d) W	30
Şekil 3.4. Fermentasyonda kullanılan PKD diskleri; a) inokülasyon öncesi; b) inokülasyon sonrası.	32
Şekil 3.5. Fermentasyonda kullanılan PKD diskleri üzerinde gelişen <i>S. cerevisiae</i> mayası	32
Şekil 3.6. 3D materyaller kullanılarak çalkalamalı inkübatörde fermentasyonun yapılması	33
Şekil 3.7. Beyaz dut kurusuna uygulanan ön işlem ve ekstraksiyon.	33
Şekil 3.8. Toplam şeker analizi	37
Şekil 3.9. Biyokütle analizi	38
Şekil 3.10. HPLC cihazı.	38
Şekil 3.11. Biyoreaktör cihazı	41
Şekil 4.1. Etanol fermentasyonu; a) fermentasyon öncesi; b) fermentasyon sonrası.	42
Şekil 4.2. Kontrol fermentasyonunun etanol üretimi, şeker tüketimi ve biyokütle gelişimi grafikleri.	42
Şekil 4.3. PB 1 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	45
Şekil 4.4. PB 2 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	46
Şekil 4.5. PB 3 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	48
Şekil 4.6. PB 4 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	49
Şekil 4.7. PB 5 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	50
Şekil 4.8. PB 6 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	52
Şekil 4.9. PB 7 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).	53

Şekil 4.10. PB 8 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).....	54
Şekil 4.11. PB 9 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).....	56
Şekil 4.12. PB 10 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için).....	57
Şekil 4.13. Etkilerin normal grafiği (PBD).....	61
Şekil 4.14. Pareto grafiği	62
Şekil 4.15. Modifiye ortamda Hex materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu.....	64
Şekil 4.16. PB 1 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği.....	65
Şekil 4.17. PB 2 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği.....	67
Şekil 4.18. PB 3 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	68
Şekil 4.19. PB 4 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	69
Şekil 4.20. PB 5 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	70
Şekil 4.21. PB 6 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	72
Şekil 4.22. PB 7 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	73
Şekil 4.23. PB 8 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	74
Şekil 4.24. PB 9 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	75
Şekil 4.25. PB 10 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği	77
Şekil 4.26. Etkilerin normal grafiği (PBD).....	80
Şekil 4.27. Etkilerin Pareto Grafiği (PBD).....	81
Şekil 4.28. Modifiye ortamda PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu	82
Şekil 4.29. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu.....	84
Şekil 4.30. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak fermentasyon	85
Şekil 4.31. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak fermentasyon	86
Şekil 4.32. Beyaz dut kurusu ekstraksiyonunun doğrulama denemeleri sonucunda elde edilen şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği.....	87

Şekil 4.33. Beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonuna ait şeker, etanol ve biyokütle grafikleri.....	89
Şekil 4.34. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyonuna ait şeker, etanol ve biyokütle grafikleri.....	90
Şekil 4.35. Zenginleştirilmiş beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyonuna ait şeker, etanol ve biyokütle grafikleri	92



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı hammaddelerin biyoetanol potansiyelleri	10
Çizelge 2.2. Çeşitli fermentasyon sistemlerinde <i>S.cerevisiae</i> ile etanol üretimi (Waites vd. 2018).....	18
Çizelge 3.1. PKD materyallerinin bileşimi (Germec vd. 2015).....	29
Çizelge 3.2. PBD yönteminde kullanılan minimum ve maksimum seviyedeki parametrelerin konsantrasyon aralıkları.....	35
Çizelge 3.3. PB yönteminde kullanılan parametreler	36
Çizelge 3.4. Sürekli sistemin koşulları	40
Çizelge 4.1. Kontrol fermentasyonunun kinetik parametreleri.....	43
Çizelge 4.2. PKD materyallerinin etanol üretimi açısından karşılaştırılması	43
Çizelge 4.3. 3D materyallerinin etanol üretimi açısından karşılaştırılması	44
Çizelge 4.4. PB 1 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	45
Çizelge 4.5. PB 1 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler	45
Çizelge 4.6. PB 2 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	46
Çizelge 4.7. PB 2 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	46
Çizelge 4.8. PB 3 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	47
Çizelge 4.9. PB 3 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	48
Çizelge 4.10. PB 4 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	49
Çizelge 4.11. PB 4 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	49
Çizelge 4.12. PB 5 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	50
Çizelge 4.13. PB 5 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	51
Çizelge 4.14. PB 6 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	51
Çizelge 4.15. PB 6 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	52
Çizelge 4.16. PB 7 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	53
Çizelge 4.17. PB 7 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	53
Çizelge 4.18. PB 8 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	54
Çizelge 4.19. PB 8 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	55
Çizelge 4.20. PB 9 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)	55
Çizelge 4.21. PB 9 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	56
Çizelge 4.22. PB 10 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için).....	57
Çizelge 4.23. PB 10 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için).....	57

Çizelge 4.24. PBD fermentasyon denemeleri kinetik parametreleri (3D materyalleri için)	59
Çizelge 4.25. Etanol üretimi için tahmini etkiler ve katsayılar	60
Çizelge 4.26. Etanol üretiminin varyans analizi.....	61
Çizelge 4.27. PBD yöntemi ile optimum etanol üretimi koşulları	63
Çizelge 4.28. Modifiye ortamda Hex materyalleri kullanılması ile doğrulama fermentasyonu	64
Çizelge 4.29. PB 1 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	65
Çizelge 4.30. PB 1 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	66
Çizelge 4.31. PB 2 numaralı PKD2’li besiyeri bileşimi	66
Çizelge 4.32. PB 2 numaralı PKD2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	67
Çizelge 4.33. PB 3 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	68
Çizelge 4.34. PB 3 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	68
Çizelge 4.35. PB 4 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	69
Çizelge 4.36. PB 4 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	69
Çizelge 4.37. PB 5 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	70
Çizelge 4.38. PB 5 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	71
Çizelge 4.39. PB 6 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	71
Çizelge 4.40. PB 6 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	72
Çizelge 4.41. PB 7 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	73
Çizelge 4.42. PB 7 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	73
Çizelge 4.43. PB 8 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	74
Çizelge 4.44. PB 8 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	74
Çizelge 4.45. PB 9 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	75
Çizelge 4.46. PB 9 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler.....	76
Çizelge 4.47. PB 10 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi	76
Çizelge 4.48. PB 10 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler....	77
Çizelge 4.49. PBD fermentasyon denemeleri kinetik parametreleri (PKD materyalleri için)	78
Çizelge 4.50. Etanol üretimi için tahmin edilen etkiler ve katsayılar.....	79
Çizelge 4.51. Etanol üretiminin varyans analizi.....	80
Çizelge 4.52. PBD yöntemi ile optimum etanol üretimi koşulları	81
Çizelge 4.53. Modifiye ortamda PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu	82
Çizelge 4.54. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu.....	83
Çizelge 4.55. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak fermentasyon	85
Çizelge 4.56. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak fermentasyon	86
Çizelge 4.57. Beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonunun gerçekleştirilmesi	88

Çizelge 4.58. Beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler	89
Çizelge 4.59. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyon	90
Çizelge 4.60. Zenginleştirilmiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyon	91



1. GİRİŞ

Dünyada tüketilen enerjinin %80'inden fazlası kömür, petrol ve doğal gaz gibi fosil kaynaklardan sağlanmaktadır. Ancak bu artan fosil yakıt kullanımı, sera gazı emisyonlarını arttırarak, asit yağmurları gibi çevresel sorunlara ve küresel ısınmaya yol açmaktadır (Güneş vd. 2020). Ayrıca dünya nüfusunun ve enerji talebinin artışıyla orantılı olarak fosil yakıtların miktarı giderek azalmaktadır. Bu durum gelişmiş ülkeleri alternatif çözümler aramaya teşvik etmiştir. Fosil yakıtların yerine alternatif olarak çevresel olumsuz etkisi az olan ve yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyoyakıtlar karşımıza çıkmaktadır. Biyoyakıtlar; biyokütle kaynağından elde edilen ve çeşitli termokimyasal işlemler sonucu üretilen enerji kaynaklarıdır (Güneş vd. 2020). Biyoyakıtlar arasında biyodizel, biyogaz ve biyoetanol, öne çıkan yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Özellikle ulaştırma sektöründe, biyoetanol en yaygın kullanılan biyoyakıttır (Bhadana ve Chauhan 2016). Ayrıca etanol, yüksek verimliliği ve çevresel etkileri göz önüne alındığında, yenilenebilir enerji kaynakları arasında önemli bir konumda bulunmaktadır (Turhan vd. 2010).

Biyoyakıt üretimi, fosil yakıtlara kıyasla daha maliyetli olduğu için, uygun maliyetli teknolojilerin geliştirilmesi günümüzde büyük bir öneme sahiptir (Güneş vd. 2020). Bu doğrultuda fermentasyon yoluyla üretilen önemli bir biyoyakıt türü olan biyoetanolün verimliliğinin arttırılması için çeşitli ön işlemler ve fermentasyon yöntemleri (immobilizasyon, suş geliştirilmesi, farklı suşların bir arada kullanılması, optimizasyon vb.) kullanılmaktadır.

Biyoetanolün dikkate değer avantajları arasında; biyodegradasyona uğrayabilme yeteneği, sürdürülebilirliğe katkıda bulunması, fosil yakıtlara göre daha düşük sera gazı emisyonları üretmesi, zararlı yakıtların alternatifi olması ve tarımcılar için yeni iş fırsatları oluşturabilme kabiliyeti yer almaktadır (Güneş vd. 2020). Tüm bu avantajlar göz önüne alındığında, fosil yakıtlara olan bağımlılığı aşamalı olarak azaltılmaktadır.

Etanol, başta gıda ve kimya endüstrileri olmak üzere çeşitli sektörlerde yaygın bir kullanıma sahiptir. Ayrıca, araç yakıtlarında belirli oranlarda fuel-oil ile karıştırılarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra, etanolün dünya genelinde içecek üretimi, gıda katkı maddesi ve diğer alanlarda yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir (Adıgüzel 2013; Erkan 2020).

Dünyada biyoetanol üretimi için karbon kaynağı olarak tatlı sorgum, şeker pancarı, mısır, buğday ve diğer selüloz içerikli hammaddeler kullanılmaktadır. Bu çeşitli hammaddeler genel olarak (a) sakkaroz içeren hammaddeler (şeker pancarı, şeker kamışı, meyveler, tatlı sorgum, peynir altı suyu vb.), (b) nişasta içeren hammaddeler (mısır, buğday, patates), (c) lignoselülozik hammaddeler (tarımsal atık, odun, çimen, saman) olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Bengisu 2014). Günümüzde, üretilen biyoetanolün önemli bir bölümü şeker içerikli ve nişasta içerikli hammaddelerden elde edilmektedir (Balat vd. 2008; Bengisu 2014). Dünya genelinde biyoetanolün en önemli kaynakları arasında, şeker pancarı, mısır ve şeker kamışı bulunmaktadır (Güneş vd. 2020).

Şeker pancarı, şeker kamışı, tatlı sorgum ve meyve gibi sakkaroz içerikli hammaddeler etanol üretimi için daha uygun ve işlemesi kolaydır. Nişasta içeren hammaddeler için fermentasyondan önce sakkarifikasyon işlemi yapılmaktadır.

Günümüzde, lignoselüloz içeren hammaddeler, biyoetanol üretiminde kullanılmakta ve ekonomik ve verimli kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Ancak bu hammaddelerin yüksek miktarda lignin içerdiği için çeşitli ön işlemlere ihtiyaç duymaktadır (Güneş vd. 2020). Endüstriyel düzeyde lignoselülozik hammaddeler kullanılarak etanol üretimi hala zor bir iş olarak sayılmaktadır ve ayrıca düşük etanol titreli fermantasyon sıvısının damıtılması için yüksek buhar enerjisi tüketilmektedir (Bhadana ve Chauhan 2016).

Bu tez kapsamında, karbonhidrat kaynağı olarak dut kurusu ekstraktı (sakkaroz içerikli) kullanılarak 3D materyallerle ve PKD (Plastik Kompozit Destek) malzemelerle immobilizasyon ve biyofilm reaktörü dizayn edilerek kesikli ve sürekli fermantasyon işlemleri ile etanol üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte her fermentasyonun sonunda şeker tüketimi, etanol üretimi, etanol verimi, maksimum tüketim hızı, spesifik gelişim hızı, ikiye katlanma süresi ve sürekli sisteme ait kinetik parametreler hesaplanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Fosil Yakıtlar

Fosil kaynaklı yakıtlar, organik maddelerin milyonlarca yıl boyunca yüksek sıcaklık ve basınç altında oluşur. Bu fosil yakıtlar, yakıldığı zaman yüksek miktarda karbon dioksit (CO₂) ve metan gazı (CH₄) üretirler. Fosil kaynaklı yakıtlar, dünyadaki çoğu enerji ihtiyacını karşılamak için kullanılan, yenilenebilir olmayan kaynaklardır (Güneş vd. 2020). Mevcut petrol ve gaz yeterli görünse bile fosil kaynaklı yakıtların hepsi 100-200 yıl içinde sona erdiği öngörülmektedir (Anonymous 1; Güneş vd. 2020).

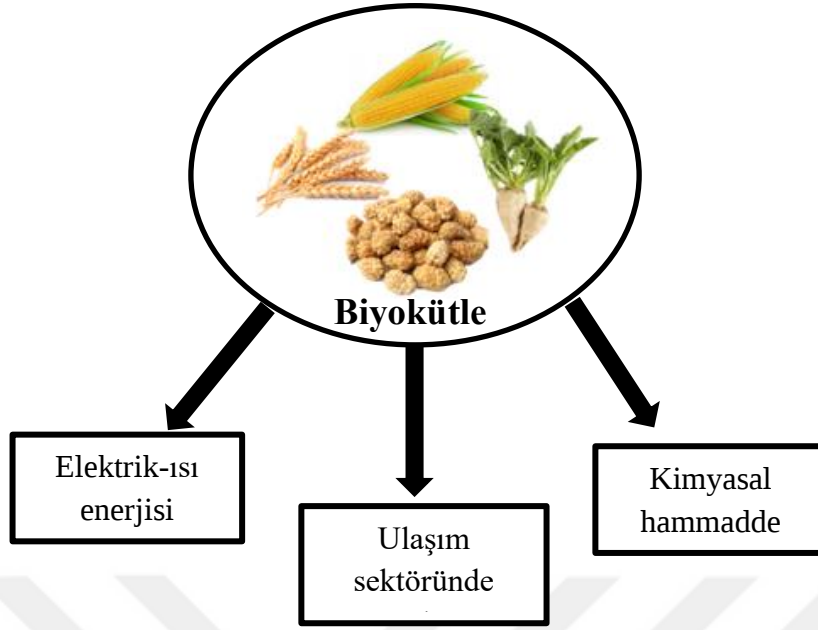
Hemen hemen tüm yakıtlar ve karbon içerikli kimyasallar, önemli ölçüde fosil kaynaklardan elde edilmektedir (Rass-Hansen vd. 2007; Güneş vd. 2020). Fosil yakıtların kullanılması ve endüstriyel faaliyetlerin sonucunda sera gazı emisyonlarının yaklaşık %76'sı oluşmaktadır (Moustafa 2017; Güneş vd. 2020). Tüm bu olumsuz faktörler göz önüne alındığında, yakıt üretimi için geleneksel olarak kullanılan petrol ve doğal gaz yerine, yenilenebilir gıda ve gıda olmayan biyokütle kaynaklarından enerji elde etmek önem kazanmaktadır (Lee vd. 2019; Güneş vd. 2020). Biyoyakıt grubunda yer alan biyoetanol veya biyodizel sürdürülebilir ve güvenilir olan yenilenebilir enerji kaynaklarıdır.

2.2. Biyoyakıtlar

Biyokütle; bir organizma topluluğunun belirli bir zamandaki toplam kütlesi olarak tanımlanırken, ek olarak organik karbon şeklinde de tanımlanabilmektedir (Anonim 4; Güneş vd. 2020).

Günümüzde, dünya genelindeki enerji ihtiyacının yalnızca %7'si, yenilenebilir enerji kaynaklarından (hidroelektrik ve biyokütle enerjisi) sağlanmaktadır. Ancak gelecekteki 20 yıl içinde bu oranın %60'ın üzerinde bir artış göstermesi öngörülmektedir (Singh ve Dwevedi 2019; Güneş vd. 2020).

Biyokütle, elektrik ve ısı enerjisi üretiminin yanı sıra, ulaşım sektöründe yakıt ve kimyasal hammadde olarak da kullanılabilen bir kaynaktır. Bu çok yönlü kaynaktan elde edilen enerji, taşımacılık sektöründe kullanılan biyoyakıt olarak adlandırılır. Günümüzde biyoyakıtlar 2 ana formda (biyoetanol ve biyodizel) üretilmektedir. Şeker ve nişasta bakımından zengin mahsuller, günümüzde üretilen biyoetanolün neredeyse tamamının kaynağını oluşturur. Ayrıca şeker ve mısırın ötesinde, buğday, şeker pancarı, arpa, patates kabuğu ve lignoselüloz içeren bitkiler gibi diğer önemli ürünler de kullanılmaktadır (Bayraç vd. 2020).



Şekil 2.1. Biyokütle kullanım alanları

Biyoyakıtların benzin ve motorinle rekabet etmesinde, devlet tarafından sağlanan destek ve teşvikler gerekmektedir. Bu destek politikaları, üretim ve tüketim teşvikleri, araştırma geliştirme faaliyetlerini destekleme, dağıtım ve ulaştırma konularında yapılan desteklemeleri içerir (Hatunoğlu 2010; Bayraç vd. 2020).

Biyoyakıt üretimi için sağlanan üretime yönelik başlıca destekler, üretim maliyetini azaltmayı ve ürün arzını artırmayı hedefler. Bu desteklemeler arasında, üretimde hammadde olarak kullanılmış olan tarım ürünlerine verilen sübvansiyonlar, maliyetin düşürülmesi açısından kritik bir rol oynar. Ayrıca, hükümet tarafından belirlenen taban fiyat uygulaması gibi diğer maliyet azaltma önlemleri de bulunmaktadır (Hatunoğlu 2010; Bayraç vd. 2020).

2.2.1. Biyoyakıtların sınıflandırılması

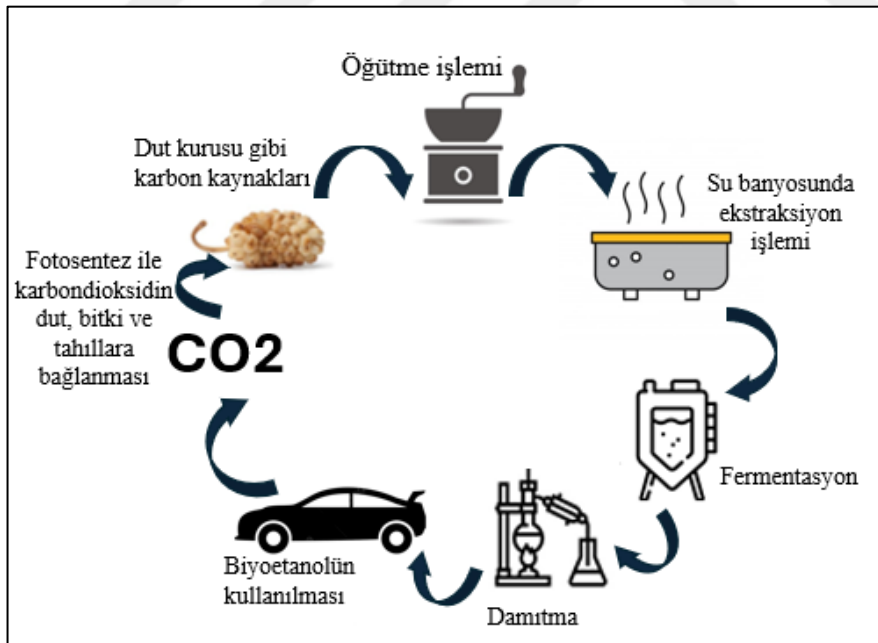
Biyoyakıtlar üretim kaynağına göre, birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Bitkilerden, şekerlerden, nişastadan, bitkisel ve hayvansal yağlardan üretilmiş olan biyoyakıtlar birinci nesil biyoyakıt olarak bilinmektedir (Güneş vd. 2020). Başka bir deyişle birinci nesil biyoyakıtların hammaddesi, gıda olarak da kullanılabilen bitkilerdir (Bayraç vd. 2020). İkinci nesil biyoyakıtlar; lignoselülozik materyallerden, tarım ürünlerinin artıkları gibi gıda olmayan biyokütleden ve endüstriyel atıklardan elde edilmektedir. Üçüncü nesil biyoyakıtlar, gıda dışı kaynaklardan elde edilen ve entegre biyorafineri teknolojisi ile üretilmiş olan yakıtları temsil eder. Bu biyoyakıtların üretiminde genetiği değiştirilmiş olan tohumlar, bitkiler ve mikro algler kullanılabilir (Bayraç ve ark. 2020).

2.2.2. Biyoyakıtların yararları

Biyoyakıtlar, CO₂ ve CH₄ gibi sera gazı emisyonlarının ve küresel ısınmanın azaltılması, sosyoekonomik yapının ve tarımın korunması gibi bir dizi konuda öncelikler sunmaktadır. Bununla birlikte; biyokütle kaynaklarının kolaylıkla temin edilebilir olmaları hem çevre ve ekonomi için hem de tüketiciler için avantajlıdır. Ayrıca biyoyakıtlar biyolojik olarak parçalanabildiği için sürdürülebilirliğe katkıda bulunurlar (Demirbaş 2008; Güneş vd. 2020).

Biyokütle enerjisi, diğer yenilenebilir enerji kaynaklarına göre daha avantajlıdır, çünkü kolayca depolanabilir. Bunun yanı sıra, yerli kaynaklardan elde edilebilir (Bayraç vd. 2020). Ayrıca biyoyakıt üretimi, yeni istihdam alanları yaratmasında ve atıl durumda olan tarım alanlarının yeniden üretime alınmasında katkıda bulunmaktadır (Bayraç vd. 2020).

Fosil kaynaklarından etanol üretildiğinde, sera gazı olan karbon dioksit atmosfere yayılmaktadır. Ancak biyoetanol üretimi karbon nötr olarak bilinmektedir. Bunun nedeni biyoetanolün üretimi sırasında karbon dioksitin bitkiler tarafından kullanılması ve bu bitkilerin tekrar biyoetanol üretimi için kullanılmasıdır. Bu döngü sayesinde karbon ayak izi en aza inmektedir (Güneş vd. 2020). Ayrıca etanolün, petrol yakıtlarına kıyasla enerji eşdeğeri %68 daha düşük olmasına rağmen, yanma süreci daha temizdir, çünkü oksijen içermektedir. Bu nedenle, emisyonlardaki toksik maddelerin seviyeleri daha düşüktür (Krylova vd. 2008; Mussatto vd. 2010).

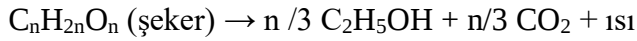


Şekil 2.2. Dut kuruğu gibi karbonhidrat kaynaklarından biyoetanol üretiminin karbon döngüsü

2.3. Etanol

Etanol, C_2H_5OH kimyasal formülüne sahip bir bileşik olup, moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 46,47 g/mol ve kaynama noktasının $78,3^{\circ}C$ olduğu bilinmektedir (Erkan 2020).

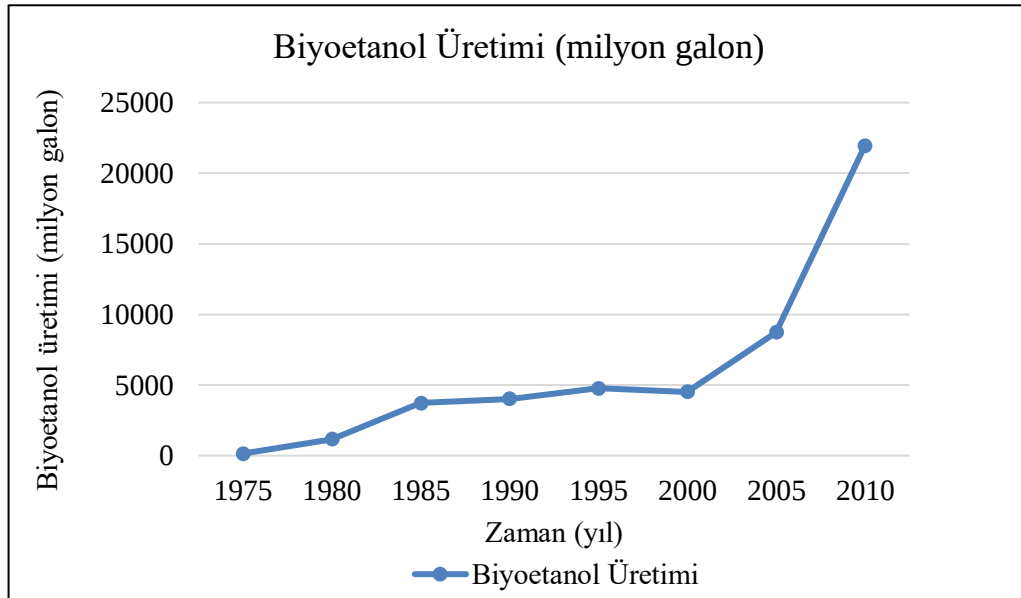
Biyoetanol üretilmesi için hammaddelerin kaynağı esas olarak biyokütledir. Biyoetanol, biyokütledeki kullanılabilir karbonhidratların fermantasyonu ile üretilir. Biyokütle içindeki basit şekerler aşağıda verilen tepkime yolu ile biyoetanol ve karbondioksit dönüştürülür (Adıgüzel 2011; Bengisu 2014).



Teorik olarak, 1 kg glukozdan 0,51 kg etanol ve 0,49 kg karbondioksit üretilebilir. Ancak pratikte kullanılan mikroorganizmalar, glukozun tamamını tüketemezler (Demirbaş 2005; Bengisu 2014). Bu sebeple mikroorganizmalar kullanılarak elde edilen verim teorik verimin altında olmaktadır.

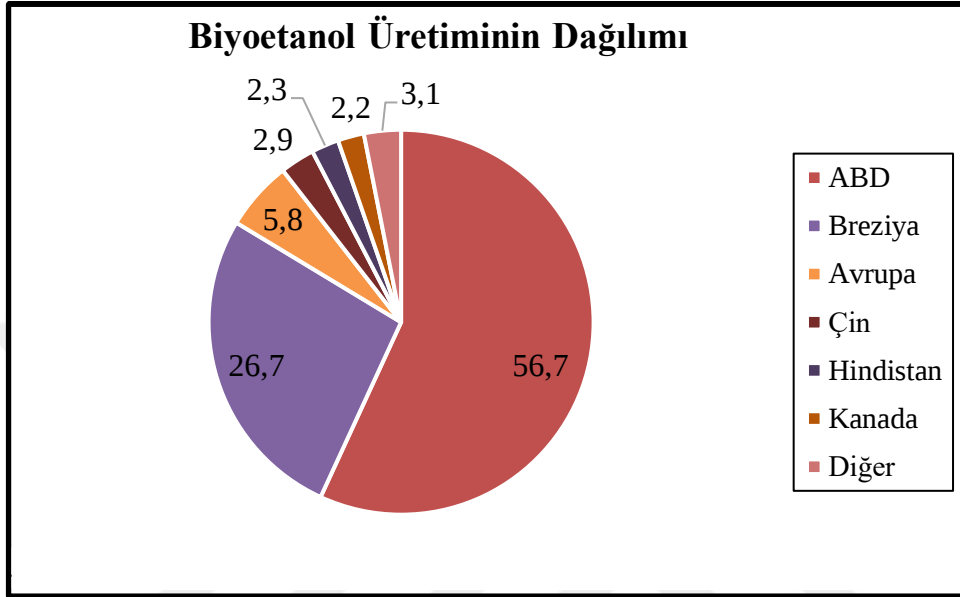
Fermentasyonla üretilen biyoetanolün en çok kullanım alanı (%92 civarında) yakıt ve taşımacılık olarak bilinmektedir (Bader 2017). Etanol, benzin gibi fosil yakıtlara karıştırılarak kullanılabilir. Biyoetanolün başka yakıt türleriyle karıştırılması, ileride daha kaliteli ve temiz enerjiye erişimi arttıracaktır (Güneş vd. 2020).

Dünyadaki etanol üretimi (Şekil 2.3) 1975'ten günümüze kadar bir artış halindedir (Bengisu 2014). Şekil 2.3'e göre dünyada etanol üretimi yaklaşık 22 milyon galona ulaşmıştır (Anonim 3; Bengisu 2014).



Şekil 2.3. Dünyadaki biyoetanol üretimi (1975-2010), (Anonim 3; Bengisu 2014).

Dünyadaki en büyük biyoetanol üretici ülkeler Şekil 2.4'te gösterilmektedir. ABD dünya biyoetanol üretiminde % 56,7 pay ile lider konumunda yer almakta ve biyoetanol üretimi için hammadde olarak mısırı kullanmaktadır. ABD'den sonra Brezilya 2. sırada yer almakta ve biyoetanol üretimi için hammadde olarak şeker kamışını kullanmaktadır. 3. sırada yer alan Avrupa kıtasında ise biyoetanol üretimi için temel hammadde olarak buğday kullanılmaktadır (Melikoğlu ve Albostan 2011; Bengisu 2014).



Şekil 2.4. Dünyadaki ülkelerin biyoetanol üretme oranları (Bengisu 2014).

2.3.1. Tarihçe

Etanolün yakıt olarak kullanımı, uzun bir tarihe sahiptir. 19. yüzyılda Samuel Morey ve 1876'da Nicholas Otto tarafından üretilen içten yanmalı motorların ilk prototipleri, etanolü yakıt olarak kullanabilme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (Demirbaş vd. 2009; Mussatto vd. 2010).

1896'da Henry Ford tarafından üretilen ilk otomobil, saf etanolü yakıt olarak kullanabilme özelliğine sahip iken, 1908'de seri üretilen ilk otomobil olan Ford Model-T ise etanolü de yakıt olarak kullanabilen daha esnek bir araçtır. Bu araçta benzin veya benzin/etanol karışımı yakıt olarak kullanılmaktadır (Solomon vd. 2007; Mussatto vd. 2010).

Biyoetanolün yakıt olarak kullanımı 1900 yılların başlarına dek Avrupa ve ABD'de oldukça yaygındı. Ancak Birinci Dünya Savaşı'ndan sonra üretimi petrol bazlı yakıtlardan daha maliyetli hale geldiği için etanol talebinde bir düşüş yaşandı (Mussatto vd. 2010).

Brezilya, 1927 yılından itibaren otomobiller için alkol üretimine yönelik bir öncü programı başlattı. İlk alkol pompasının kurulduğu tarihten itibaren bu program, bir sonraki on yılın başlarına kadar devam etti (Balat ve Balat 2009; Mussatto vd. 2010).

1975 yılında Brezilya'da oluşturulan Ulusal Alkol Programı (ProAlcool) şeker kamışının hammadde olarak kullanılmasına dayanıyordu ve benzin yerine etanolün geniş

çapta kullanımını hedefliyordu (Mussatto vd. 2010). 1984 yılında, Brezilya'da yeni satılan birçok otomobilde, yakıt olarak %96 biyo-etanol ve %4 su içeren hidratlı biyo-etanol kullanmak gerekiyordu. Şeker-etanol endüstrisi geliştikçe, politikalar değişti ve ProAlcool programı 1999'da aşamalı olarak sona erdi. Esnek yakıtlı araçların yaygın şekilde kullanılması (vergi teşvikleri aracılığıyla desteklenmektedir) artan petrol fiyatlarıyla birleşince, 2000 yılından bu yana biyoetanol ve şeker kamışı üretiminde hızlı bir büyüme olmuştur. Günümüzde, Brezilya'nın mevcut otomobil üretiminin %80'inden fazlası esnek yakıt kapasitesine sahiptir (Mussatto vd. 2010).

Amerika Birleşik Devletleri, yakıt etanol endüstrisini Brezilya'dan daha yavaş bir şekilde dizayn etmiştir. Ancak bugün etanol üretimi ve kullanımı açısından dünya lideri konumundadır (Anonim 5; Mussatto vd. 2010). Bu amaçla özel olarak tasarlanmış araçlarda E85 olarak adlandırılan harmanlanmış yakıt kullanılmaktadır. Bu yakıt, %85 biyo-etanol ve %15 benzin içermektedir. Hükümet, bu karışımın geliştirilmesini teşvik etmekte ve Ford, Chrysler, GM gibi birçok otomobil üreticisi, saf benzinden E85'e kadar benzini ve etanolü kullanabilen esnek yakıtlı araçların üretimini arttırmıştır. Şu anda etanol, dünyada en yaygın kullanılan biyoyakıttır ve kullanımı giderek artmaktadır (Bastos 2007; Mussatto vd. 2010).

2.4. Biyodizel

Biyodizel, hayvansal veya bitkisel yağlar ve bu yağların atıklarından elde edilmektedir. Kimyasal olarak da, uzun zincirli yağ asidi mono alkil esteri şeklinde tanımlanabilmektedir (Alptekin ve Çanakçı 2006). Biyodizel olarak isimlendirilen mono esterlerin, bitkisel ya da hayvansal yağların transesterifikasyon yoluyla üretildiği bilinmektedir. Transesterifikasyon, bir trigliserit molekülünün bir alkol ve katalizör eşliğinde reaksiyona girerek, gliserin ve yağ esterleri üretmesi olarak bilinmektedir (Alptekin ve Çanakçı 2006). Transesterifikasyon yoluyla biyodizel üretimi gösterilmektedir. Biyodizel, genellikle yağlı tohumlardan üretilmektedir. Biyodizel üretiminde başlıca kullanılan bitkiler arasında kolza, kanola, ayçiçeği, soya, pamuk, aspir, keten, kenaf, kenevir, miskantus bitkiler bulunmaktadır (Özertan 2008; Bayraç vd. 2020).

ABD ve Brezilya biyodizel üretiminde hammadde olarak soyayı, Avrupa ülkeleri kanolayı, Hindistan ise jatropha bitkisini kullanırlar (Horuz vd. 2015; Bayraç vd. 2020). Biyodizelin enerji verimliliği biyoetanol ile karşılaştırıldığında daha yüksektir ve aynı zamanda biyoetanole göre daha yüksek yoğunluğa sahiptir (Bayraç vd. 2020).

Bitkisel yağların motor yakıtı olarak kullanılması geçmişe dayanan bir uygulamadır. Ancak, bitkisel yağlar dizel motorlarında kullanımı maliyet açısından zorlayıcıdır. Genellikle acil durumlar veya petrolün yeterli olmadığı zamanlarda kullanılmaktadır. Atık yağların kullanımı ise maliyet açısından oldukça avantajlıdır. Türkiye'de yılda 300 bin ton atık yağ oluşmaktadır. Bu atık yağların biyodizel üretimi için kullanılması durumunda her yıl 480 milyon YTL kazanç elde edilebilecektir. Bununla birlikte, atık yağların biyodizel üretiminde kullanılması, motorin kullanımına göre atmosfere yayılan CO miktarını 900 bin ton azaltabilme potansiyeline sahiptir (Alptekin ve Çanakçı 2006). Bu nedenle, tarım ülkesi olan Türkiye'de bitkisel veya hayvansal yağlardan üretilen biyodizel, biyodizel üretimi için öncelikli bir seçenektir (Alptekin ve Çanakçı 2006).

2.5. Ulaşım için Biyoetanol Kullanımı

Biyoetanol, dünya genelinde en yaygın bilinen biyoyakıt türüdür ve modern araçlarda herhangi bir değişiklik gerektirmeksizin benzinle karıştırılarak kullanılabilir ve ayrıca araç performansını olumsuz etkilemez.

Etanolün belirli oranlarda benzinle karıştırılması, etanoldeki oksijenin karbon atomlarıyla reaksiyona girerek CO ve egzoz gazlarının azaldığı bir sonuç doğurmuştur. Ek olarak, etanolün yüksek oktan sayısı içerdiği için yakıt olarak kullanıldığında performansı artırır (Maryana ve Wahono 2009; Güneş vd. 2020).

Etanolün benzinle karıştırılıp yakıt olarak kullanılmasının, Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da yaygın olduğu belirtilmektedir (Güneş vd. 2020).

Yakıt olarak kullanılan biyoetanol %5, %10 ve %85 oranlarında benzinle karıştırılabilir. Özellikle %10'luk etanol (%90 oranında benzin içerir) E10 karışımı, 2000 yılından itibaren tüm araçlarda kullanımı tavsiye edilmektedir. Bu karışım en yaygın bilinen yakıt seçeneğidir (Güneş vd. 2020).

Brezilya'da, E100 etanol kullanan esnek yakıt sistemine sahip araçlar yaygındır. Yüksek oranda etanol içeriği, bu araçlar için uygunluk sağlarken, %5 ila %10 etanol içeren yakıtlar ise motorlarda herhangi bir değişiklik gerektirmeksizin kullanılabilir (Güneş vd. 2020).

2.6. Etanol Üretimi için Güncel Teknolojiler

2.6.1. Hammaddeler ve prosesler

Biyoetanolün üretilmesi için çeşitli hammaddeler kullanılmaktadır; ABD'de genellikle mısır, Brezilya'da şeker pancarı ve Avrupa'da ise bunlarla birlikte şeker kamışı ile buğday kullanılmaktadır. Dünya çapında biyoetanolün hammaddesi olarak genellikle şeker pancarı ve mısır kullanılmaktadır. Biyodizelin üretilmesi için ise soya fasulyesi ve palm yağı kullanılmaktadır (Güneş vd. 2020).

Şu anda etanolün büyük bir kısmı biyoteknolojik yöntemle üretilmektedir. Dünya çapında üretilen etanolün neredeyse %95'i tarım ürünlerinden elde edilmektedir. (Rossillo-Calle ve Walter 2006; Mussatto vd. 2010). Şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şeker bitkilerinden elde edilen etanol, üretilen toplam biyoetanolün yaklaşık %40'ını oluştururken, üretilen etanolün yaklaşık %60'ını da nişasta bitkileri temsil etmektedir (Anonymous 2; Mussatto vd. 2010).

Çizelge 2.1. Farklı hammaddelerin biyoetanol potansiyelleri

Bitkisel kaynak	Biyoetanol üretim potansiyeli (lt/ton)
Şeker kamışı	70
Şeker pancarı	110
Tatlı patates	125
Patates	110
Manyok	180
Mısır	360
Çeltik	430
Arpa	250
Buğday	340
Tatlı sorgum	60
Posa ve diğer selülozik biyokütleler	280

Etanol üretilmesi temel olarak üç aşamada gerçekleşir. İlk aşamada, fermente edilebilir şeker elde edilir ve ardından, şekerler fermentasyon ile etanole dönüştürülür. Son olarak, etanol genellikle damıtma, rektifikasyon ve dehidrasyon işlemleri ile ayrıştırılıp saflaştırılır (Demirbaş 2005; Mussatto vd. 2010). Fermantasyondan önceki adım, etanol üretim süreçlerinde temel bir farkı ortaya koyar; bu adım, basit şeker, nişasta veya lignoselülozik malzemeden fermente edilebilir şeker elde etmeyi içerir (Şekil 2.5).

Şeker pancarı, şeker kamışı, meyveler ve başka sakkaroz içeren hammaddelerin, fermentasyona kadar ekstraksiyonu için genelde sadece öğütme işlemine tabi tutulur. Şekerlerin çözücü sıvıya kolaylıkla difüze olduğu bu tip kaynaklarda ekstraksiyon dışında herhangi bir hidroliz işlemi gerekmemektedir. Bu durum, şekerin etanole dönüştürülmesini içeren nispeten basit bir süreç haline getirir. Bu süreçte etanol, doğrudan şeker kamışı ekstraktı veya pancar ekstraktından elde edilebileceği gibi, genellikle beyaz şeker üretimindeki ekstraksiyonundan sonra geriye kalan melastan da fermentasyonla üretilmektedir (İçöz vd. 2009; Mussatto vd. 2010).

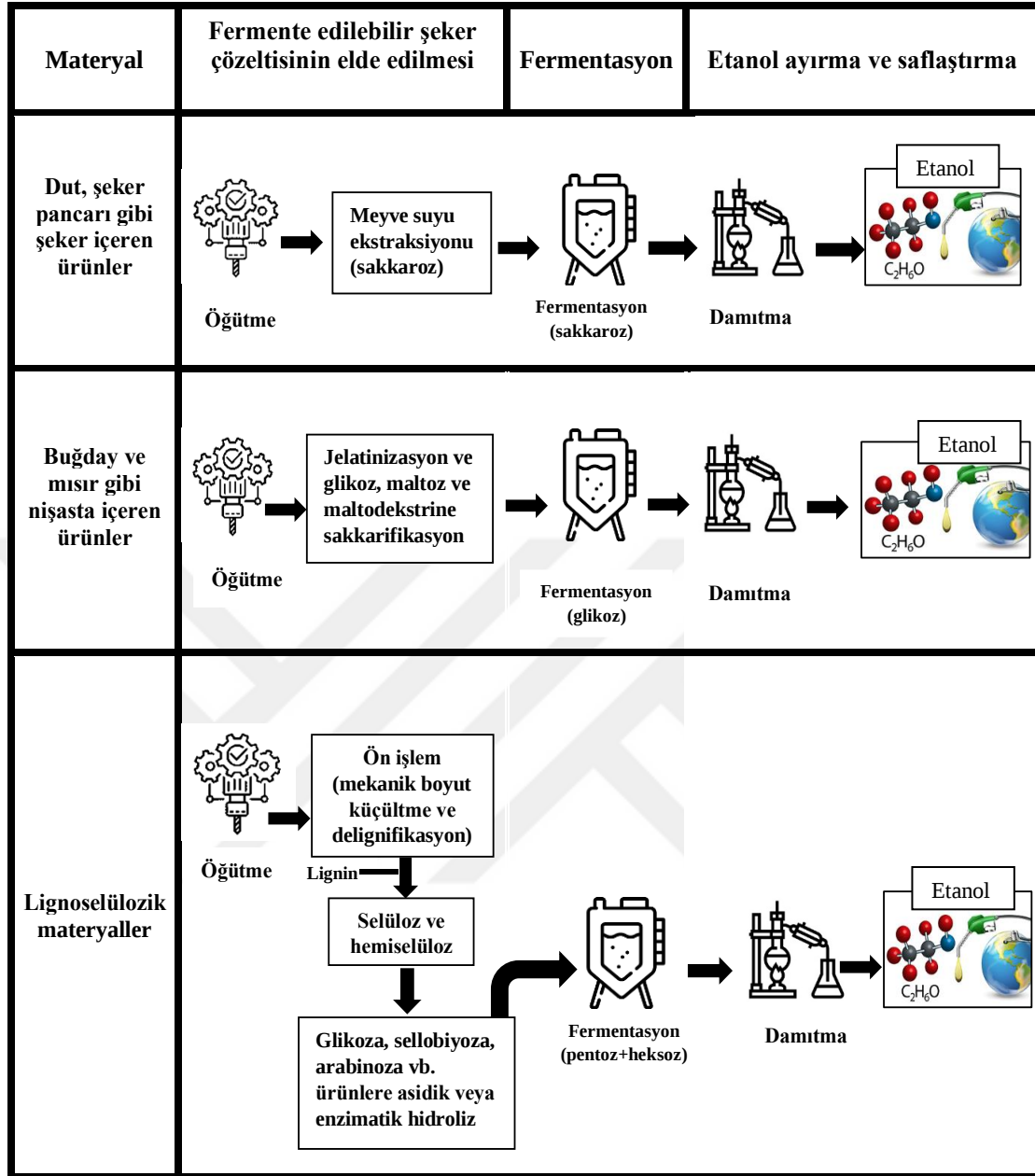
Tahıl, mısır ve manyok gibi nişasta içeren hammaddelerde, fermentasyondan önce sakkrifikasyon işlemi gerekmektedir. Sakkrifikasyon aşamasında, nişasta çirileştirilir ve mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilen glukoz monomerleri oluşturmak üzere enzimatik hidrolize tabi tutulur (Mussatto vd. 2010).

Etanol üretimi için kullanılabilecek başka bir basit şeker kaynağı ise bir süt endüstrisi atığı olan peynir altı suyudur. Peynir üretimi sırasında yan ürün olarak yüksek miktarlarda peynir altı suyu üretilmektedir. Peynir altı suyu proteini, peynir altı suyundan ultrafiltrasyon yöntemiyle elde edildikten sonra, geriye kalan süzöntü, daha yüksek laktoz içeriği elde etmek amacıyla verimli fermentasyon için ters ozmoz kullanılarak konsantre edilir. Peynir altı suyu süzöntüsündeki laktoz, *Kluyveromyces marxianus* mayasının bazı özel türleri tarafından fermente edilmektedir (Dragone vd. 2009; Mussatto vd. 2010). Ayrıca alternatif olarak genetiği değiştirilmiş *S. cerevisiae* suşları da kullanılabilmektedir (Mussatto vd. 2010).

Lignoselülozik hammaddelerden etanol üretimi için kullanılan teknolojiler daha karmaşıktır ve etanol üretim maliyetleri şeker kamışı, şeker pancarı veya mısır gibi

hammaddelerle karşılaştırıldığında daha yüksektir. Ancak, lignoselülozik hammaddelerin çoğu, tarımsal faaliyetlerin ve endüstriyel kalıntıların yan ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır ve dünyada biyoyakıt üretilmesi için büyük bir potansiyel göstermektedir. Lignoselülozik biyokütlenin gelecekte etanol üretimi için ana hammadde olarak kullanılması düşünülmektedir (Mussatto vd. 2010).

Lignoselülozik hammaddeden etanol üretimindeki temel işlem aşamaları sırasıyla (1) Ön işlem (mekanik, kimyasal): Selüloz ve hemiselülozun sonraki aşamalarda daha erişilebilir hale getirilmesi amacıyla uygulanır. Ön işlem tipik olarak parçacık boyutunu küçültmek için mekanik bir adımı ve biyokütleyi daha sindirilebilir hale getirmek için kimyasal bir ön işlemi (seyreltilmiş asit, alkalın, solvent ekstraksiyonu, buhar patlaması vb.) içermektedir; (2) Hidroliz: Polisakkaritlerin asidik veya enzimatik hidroliz ile basit şekerlere parçalanması; (3) Şekerlerin (heksozlar ve pentozlar) mikroorganizmalar tarafından etanole fermentasyonu; (4) Damıtma, düzeltme ve dehidrasyon yoluyla üretilen etanolün ayrılması ve konsantre edilmesi basamaklarından oluşmaktadır (Şekil 2.5) (Sánchez ve Cardona 2008; Mussatto vd. 2010).



Şekil 2.5. Dünyadaki ülkelerin biyoetanol üretme oranları (Bengisu 2014).

2.7. Türkiye’de Biyoetanol Üretimi

Yerli biyoyakıtlardan elde edilen enerji, diğer yakıtların fiyat belirsizliklerini azaltarak önemli bir stabilite sağlayacaktır. Türkiye’de yerli hammaddeler olan buğday, mısır ve şeker pancarı kullanılarak yılda yaklaşık 162 milyon litre biyoetanol üretilmekte, bunun 76 milyon litresi yakıt olarak değerlendirilmektedir. Biyoetanolün %92’si, Türkiye’de benzin ile karıştırılarak kullanılırken, %8’inin ise ihraç edildiği bilinmektedir (Canan ve Ceyhan 2017; Güneş vd. 2020).

Ülkemizde biyoetanol üretimi gerçekleştiren şirketler arasında Tarımsal Kimya Teknolojileri Sanayi ve Ticaret A.Ş. (TARKİM), Tezkin Tarımsal Kimya İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş. (TEZKİM) ve Konya Şeker Sanayi ve Ticaret A.Ş. bulunmaktadır.

Toplamda 149,5 milyon litre biyoetanol üretme kapasiteleri olan bu şirketlerin, net ticaret miktarı ise 70 milyon litredir. Konya Şeker Fabrikasında melas, diğer fabrikalarda ise mısır ve buğday substrat olarak kullanılmaktadır. Türkiye'nin biyoetanol üretim kapasitesi, benzin tüketiminin yaklaşık %7'sini karşılamaktadır. Ancak, pazardaki biyoetanolün benzin tüketiminin %1'inin altında olduğu belirtilmektedir (Adıgüzel 2012; Anonim 1; Kapluhan 2014).

2.8. Etanol Üretici Mikroorganizmalar

Endüstriyel ölçekte etanol üretimi için çeşitli maya, bakteri ve mantar türleri kullanılmaktadır. Ancak etanol üretiminde en çok *Saccharomyces cerevisiae* mayalarının kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte *Schizosaccharomyces pombe* türü mantarları kullanılabilir. Bu mantarlar ozmotik basınca dayanıklıdır (Güneş vd. 2020). *S. cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* mikroorganizmaları; etanol fermentasyonu için glukozu hızlıca tüketip yüksek oranda etanol üretirler. Ancak söz konusu mikroorganizmalar, pentoz karbonhidratları etanole dönüştüremezler (Chen ve Fu 2016). *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* ve *Pachysolan tannophilus* maya türleri heksozların yanında pentozları da hızlıca fermente edebilirler (Chandel vd. 2007). Etanol üretimi için kullanılan diğer bir mikroorganizma *Pichia stipitis*'tir. Bu mikroorganizma ksilozu kullanıp etanol üretebildiği için dikkat çekmektedir (Gupta ve Verma 2015).

2.9. Fermentasyonda Kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* Mayası

Mayalar, tek hücreli mikroorganizmalar olup ökaryotik yapılı mantarlar olarak bilinmektedir (Webster ve Weber 2007).

Etanol genellikle, ekmek mayası olarak bilinen *Saccharomyces cerevisiae* tarafından karbonhidratların fermentasyonu yolu ile üretilir. *S. cerevisiae* etanol üretimi için en çok kullanılan mikroorganizma olarak bilinmektedir (Bhadana ve Chauhan 2016). Bu tez çalışmasında biyoetanol üretimi amacıyla immobilize edilmiş *S. cerevisiae* mayaları kullanılmıştır.

S. cerevisiae suşları 30-37°C aralığında karbonhidratları etanole fermente edebilmekte ve glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkaroz gibi şekerleri karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir (Erkan 2020). *S. cerevisiae*, endüstriyel düzeyde etanol üretimi için filamentli mantarlardan, bakterilerden ve diğer maya türlerine kıyasla çeşitli fizyolojik özellikleri açısından üstündür (Bhadana ve Chauhan 2016).

Endüstride *S. cerevisiae*'nın etanol üretimi için yaygın tercih edilmesinin sebebi (Bengisu 2014; Bhadana ve Chauhan 2016; Erkan 2020);

- Etanol üretimi veriminin yüksek olması ve anaerobik koşullarda sakkarozun %95'ni 20 saatte etanole dönüştürebilmesi,
- Diğer etanol üreticilerine kıyasla yüksek etanol konsantrasyonuna karşı toleransının daha yüksek olması,
- Geniş ve asidik pH aralığını tolere edebilir olması özelliği sayesinde kontaminasyonların engellenmesi,

- Glukozun yanı sıra sakkarozu da karbon kaynağı olarak kullanabilmesi,
- GRAS (The Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli Kabul Edilir) listesinde olması ve güvenle kullanılabilmesi,

sebepler olarak gösterilmektedir.

S. cerevisiae selülozik heksoz şekerlerini (glukoz, mannoz vb.) fermente edebilirken hemiselülozik pentozları (özellikle ksiloz ve arabinoz gibi) fermente edemez. Bu yüzden *S. cerevisiae*'nin pentozu fermente edebilen suşları, çeşitli metabolik mühendislik stratejileri sayesinde ksiloz ve arabinoz yollarını kodlayan genlerin bakteri ve mantarlardan alınmasıyla ortaya çıkmıştır (Mussatto vd. 2010).

2.10. Etanol Fermantasyonu için substrat olarak kullanılan Dut Kurusu

Dut, Moraceae familyasında yer alan *Morus* (M.) cinsine aittir. *Morus* cinsi yaklaşık 19 üye içermektedir (The Plant List 2017; He vd. 2018) ve en yaygın olarak yetiştirilen türler arasında beyaz dut (*M. alba* L.), karadut (*M. nigra* L.) ve kırmızı dut (*M. rubra* L.) bulunmaktadır (Ercisli ve Orhan 2007; He vd. 2018). Bu üç tür arasında *M. alba* baskın olanıdır ve Çin'e özgüdür ve aynı zamanda diğer bölgelerde de geniş bir şekilde yetiştirilmiş ve doğallaştırılmıştır (He vd. 2018).

Dut, geniş bir iklim yelpazesi, farklı topografik özellikler ve çeşitli toprak koşullarına uyum sağlayabilme özelliğiyle yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir (Ercisli ve Orhan 2007; He vd. 2018).

M. alba L. ağacı kısa ömürlü, hızlı büyüyen, küçük ila orta boyda ve yaprak döken bir ağaçtır. Günümüzde *M. alba* L., esasen Güney Avrupa, Kuzey Amerika, Doğu ve Güney Doğu Asya, Güneydoğu Avustralya ve ayrıca Afrika'nın bazı kısımlarını içeren ılıman ve tropik bölgelerde dağılmış durumdadır (Anonymous 3; He vd. 2018).

Dut yetiştiren ülkelerin çoğunda, özellikle Hindistan ve Çin'de dut yaprakları ipek böceğini (*Bombyx mori* L.) beslemek için kullanılır. Bu ülkelerde, dut yetiştiriciliği genellikle yaprak üretimini artırmaya odaklanmıştır (Ercisli ve Orhan 2007; He vd. 2018). Ancak Türkiye ve Yunanistan gibi birçok Avrupa ülkesinde dut, yapraktan ziyade meyve üretimi için yetiştirilmektedir (He vd. 2018). Dut yaprakları, önemli biyoaktif bileşenleri içermekte ve dut yaprağı çayı, dut yaprağı gazlı içecekler gibi çeşitli fonksiyonel gıdaların üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Thirugnanasambandham, Sivakumar ve Maran 2015; Zhang vd. 2016).

2.10.1. Türkiye'de dut meyvelerinin yetiştirilmesi

Türkiye'nin Anadolu Bölgesi, özellikle *Morus alba*, *Morus nigra* ve *Morus rubra* gibi yüksek kaliteli dut meyvelerinin yetiştirilmesi için uygun koşullara sahiptir (Yaltirik 1982; Ercisli ve Orhan 2007). Türkiye'de 2005 yılında dut üretimi 78.000 ton olarak kaydedilmiştir (Anonim 2005; Ercisli ve Orhan 2007). Dut, Türkiye'de 400 yılı aşkın bir süredir yetiştirilmekte olup, bu ülkede yetişen dut ağaçlarının %95'i *M. alba*, %3'ü *M. rubra* ve %2'si *M. nigra* türlerinden oluşmaktadır (Ercisli ve Orhan 2007; He vd. 2018).

2.10.2. Dutun kullanım alanları

Türkiye'de, geleneksel olarak dut pekmezi, dut pestili ve dut köme gibi ürünler duttan elde edilmektedir. Bu meyveler sadece taze olarak tüketilmez, aynı zamanda marmelatlar, meyve suları, likörler, doğal boyalar ve kozmetik endüstrisinde de kullanılır (He vd. 2018).

Binlerce yıl boyunca, beyaz dutun tüm parçaları Geleneksel Çin Tıbbı'nda kullanılmıştır (He vd. 2018). Özellikle yaprakları, meyveleri, dalları ve kök kabuğu, Çin Farmakopesi'nin 2015 baskısında belirtilmiştir (He vd. 2018). Dut tarihsel olarak, Asya'da çeşitli bulaşıcı ve dahili hastalıkların tedavisinde geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. İnsan sağlığını geliştirebilecek zengin bir biyoaktif bileşik kaynağı olarak kabul edilmektedir. Ancak bugüne kadar, değerlendirilmesi için kabul edilmiş ve standartlaştırılmış bir metodolojinin bulunmaması nedeniyle resmi veya bilimsel olarak tanınmamıştır (Wen vd. 2019).

Dut meyveleri, solucan öldürücü, dizanteriye karşı çare, hipoglisemik ve kusturucu, müshil, odon talgik, antelmintik ve balgam söktürücü olarak kullanılabilir (Ercisli ve Orhan 2007; He vd. 2018).

2.10.3. Beyaz dutun polisakkarit içeriği

Dut meyvelerinin ana aktif bileşenleri, polisakkaritlerdir (Wen vd. 2019). Bu çalışmada kullanılan dutun ana karbonhidratları glukoz ve fruktozdur. Mevcut literatüre göre, beyaz dut meyvesinin monosakkarit bileşimi temel olarak glukoz, galaktoz, arabinoz ve galakturonik asit içermektedir (Chen vd. 2015; He vd. 2018). Beyaz dutun polisakkaritlerinin çoğunluğunun asidik heteropolisakkaritler olduğu gösterilmiş olsa da bunların aynı zamanda α , β -glikozidik bağlara sahip olan bir glukan kaynağı olduğu belirtilmektedir (Xia vd. 2009; Zhang vd. 2013; Tian 2014; He vd. 2018).

Ayrıca beyaz dut yapraklarının monosakkarit bileşimi ağırlıklı olarak glukoz, galaktoz, arabinoz, fruktoz, ksiloz, ramnoz, glukuronik asit, galakturonik asit ve az miktar da mannoz ve sorboz içermektedir (He vd. 2018).

2.11. Fermentasyon

Fermentasyon, glukoz, fruktoz ve sakkaroz gibi şekerleri hücreler enerjiye çeviren ve etanol ile karbon dioksit gibi yan ürünler üreten biyolojik bir süreçtir (Güneş vd. 2020). Fermentasyon, tipik olarak 20-40°C sıcaklık aralarında ve 48-168 saat süreyle yapılmaktadır. Ayrıca glukoz ve fruktoz gibi 6 karbonlu şekerlerinin çoğu tipik olarak 48 saat içinde fermentasyona uğramaktadır (Thangavelu vd. 2014; Bader 2017).

Teorik olarak, 1 mol heksozdan 2 mol etanol elde edilirken, 1 mol pentoz kullanıldığında daha düşük bir verim elde edilmektedir (Bader 2017).

Ancak, karbonhidratların bir bölümü hücre gelişimi için kullanıldığı için deneysel olarak edinilen verimler, teorik değerlerden farklılık gösterebilir. Ayrıca, mikroorganizmalar etanolle beraber diğer metabolitleri de üretebildiği için nihai verim azaltılabilir (Bader 2017).

Fermantasyon, kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) ya da sürekli (continuous) olmak üzere 3 şekilde yapılabilir. En elverişli yöntemin seçilmesi için; işlemin maliyeti, mikroorganizmaların kinetik özellikleri ve kullanılan hammadde türüne dikkat edilmelidir (Chandel vd. 2007; Bader 2017).

2.11.1. Kesikli fermantasyon

Kesikli fermentasyon sistemlerinin çoğu, pH'ı kontrol etmek için asit ya da alkali ilavesi ve aerobik fermentasyonlarda hava verilmesi hariç, inokülasyon sonrası herhangi bir ilave yapılmayan kapalı sistemler olarak ifade edilmektedir (Waites vd. 2018).

Kesikli fermantasyon sürecinde, mikroorganizmalar başlangıç aşamasında yüksek bir substrat konsantrasyonunda çalışırlar ve bu süreç sonunda ürün konsantrasyonu yüksek olmaktadır (Olsson ve HanHagerdal 1996; Bader 2017). Alkollü içeceklerin, çoğu amino asitlerin, enzimlerin ve organik asitlerin üretimi kesikli fermentasyon yöntemiyle elde edilir (Waites vd. 2018).

Avantajları

Kesikli sistemlerin avantajları arasında başlangıç yatırım maliyetinin daha düşük olması, kontaminasyon durumunda fermentasyonun sonlandırılmasının ve yeni bir üretim başlatmanın kolay olması bulunmaktadır. Bununla birlikte, kesikli fermentasyon sistemi, birçok geleneksel fermentasyon ürününün ve antibiyotik gibi ikincil metabolitlerin üretiminde başarıyla kullanılabilmektedir (Waites vd. 2018).

Kesikli fermentasyon sistemi, biyokütle ve birincil (üremeye bağlı) metabolik ürünlerin üretimi için daha verimsiz bir üretim yöntemidir. Bunun nedeni, her kesikli fermentasyon döngüsünün sadece sınırlı bir bölümü üretim açısından verimlidir. Çünkü mikroorganizmanın üreme evreleri dikkate alındığında, mikroorganizma lag fazını tamamladıktan sonra logaritmik üreme fazına geçip ürün üretimi gerçekleşmektedir. Bu nedenle her fermentasyon döngüsünde lag fazında zaman ve verimlilik açısından kayıp meydana gelmektedir (Waites vd. 2018).

Kesikli sistemin diğer dezavantajları arasında üretimden üretime üründe değişikliklerin gözlelenebilmesi; her üretimde temizlik, sterilizasyon, dolum ve soğutma gibi işlemlerin tekrarlanması ve bu nedenle verimsiz bir bekleme süresinin (down time) olması bulunmaktadır. Sterilizasyon sayısının artması, ekipman ve elektrotlarda yıpranmaya neden olabilir. Ayrıca, stok kültürlerin hazırlanması ve saklanması için gereken maliyet daha yüksektir ve kesikli başlatma ve kapatma operasyonları için daha fazla personel gerekebilir (Waites vd. 2018).

2.11.2. Kesikli beslemeli fermantasyon

Kesikli beslemeli fermentasyon sistemi, kesikli sistemden biraz farklıdır ve ekmek mayası ve penisilin gibi üretimlerde uzun yıllardır başarıyla kullanılmaktadır (Waites vd. 2018). Bu sistemde ilave besin maddeleri, fermentasyonun ilerleyen aşamalarında ortama eklenmekte ve böylece fermentasyon ortamının hacmi artmaktadır. Kesikli beslemeli fermentasyon sistemi, kesikli sistem gibi başlar ancak bu sistemde hücreler logaritmik üreme fazının sonuna yaklaşırken ilave besin eklenmesi sürekli

olarak, aralıklarla ya da tek seferde gerçekleştirilmektedir. Bu sayede ürün oluşum fazı uzatılabilmektedir (Waites vd. 2018).

Bu yöntemin, özellikle substrat viskozite sorunlarına neden olduğunda veya yüksek konsantrasyonlarda mikroorganizmaya toksik etki yaptığında oldukça kullanışlı olduğu bilinmektedir (Waites vd. 2018). Ayrıca kesikli beslemeli sistemin patik olduğu için Brezilya’da yaygın olarak kullanılmaktadır (Bušić vd. 2018; Güneş vd. 2020).

Kesikli beslemeli fermentasyonunun avantajları arasında, besin azalması sonucunda mikrobiyal gelişimi etkilenmemekte ve ayrıca substrat inhibisyonu yoktur. Bununla birlikte, ortaya çıkan etanolün mikroorganizma için metabolik bir inhibitör bir maddedir ve ilave besin maddeleri eklenmesi ile ortadan kaldırılabilir (Sanchez ve Cardona 2008; Bader 2017).

2.11.3. Sürekli fermantasyon

Sürekli sistem; taze besiyerinin fermentöre sürekli olarak ilave edildiği ve aynı hızda da içeriden ürünün alındığı ve fermentörün çalışma hacminin sabit olan açık bir sistem olarak ifade edilmektedir (Waites vd. 2018). Bu fermantasyon süreci, farklı reaktör tiplerinde tek bir fermentör veya birden fazla fermentörün seri halinde kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir (Bader 2017).

Sürekli sistemlerde, hücreler önceden belirlenen bir üreme hızında, uzun bir zaman aralığında logaritmik olarak gelişirler. Bununla birlikte sürekli sistemlerin, kısıtlayıcı besin maddesi konsantrasyonu ve hücre sayısının zaman içinde değişmediği kararlı bir duruma (steady-state) ulaşma özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (Waites vd. 2018).

Sürekli fermantasyonun üretkenliği diğer fermantasyon yöntemlerine göre daha yüksek olmaktadır. Ayrıca düşük seyreltme hızlarında en yüksek verimliliği sağlama avantajına sahiptir (Chandel vd. 2007; Bader 2017).

Sürekli fermentasyon sistemlerinde, fermentörün kontrolü daha kolay sağlanabilmektedir. Bu fermentasyon sisteminde; temizleme, besiyeri hazırlama, sterilizasyon ve diğer işlemler için harcanan zamanın çoğu ortadan kalkar. Sürekli fermentasyonda hücreler logaritmik fazda çalıştığı için hücre yoğunluğu çok yüksektir. Bu nedenle kesikli fermantasyon (24-60 saat) sistemine kıyasla daha yüksek bir üretkenlik ve genellikle kısa bir proses süresi (4-6 saat) elde edilir. Bu durum, önemli ölçüde tasarruf sağlar ve aynı zamanda yatırım maliyetlerini azaltır (Chandel vd. 2007; Bader 2017).

Sürekli sistem uygulamalarında sıkça rastlanan sorunlar, işletme sürelerinin 20-50 gün ve üzerinde olduğu durumlarda sterilitenin korunması ve sabit bir bileşime sahip fermentasyon ortamının sürekli olarak sağlanmasındaki zorlukları içermektedir. Ancak söz konusu zorluklar iyi üretim uygulamaları ve iyi mikrobiyolojik uygulamalarla başarılı bir şekilde aşılabilmektedir. Bütün bu çabaların yanı sıra, sürekli sistemin işletim koşulları, uygun mikroorganizmanın seçilmesini zorunlu kılmaktadır. Genetik stabilitesi düşük olan mikroorganizmaların kullanılması durumunda, düşük üretim verimine sahip

mutant mikroorganizmaların gelişmelerine ve zaman içerisinde ortamda baskın hale gelmelerine yol açabilmektedir (Waites vd. 2018).

Sürekli fermantasyon sistemlerinde mikroorganizmanın gelişimi son derece kritiktir. Sıcaklık, substrat konsantrasyonu ve diğer fermentasyon parametrelerindeki en küçük değişiklikler bile verim üzerine olumsuz etki yaratabilir. Bu dezavantajlar nedeniyle araştırmacılar çeşitli çözümler önermiştir. Sanchez ve Cardona (2008), verimliliğin artırılması ve negatif fermentasyon parametrelerinin etkilerini indirmek amacıyla hücreleri kalsiyum aljinat, kriyolit vd. maddelerle immobilize etmeyi ya da biyofilm reaktörlerinde hücre sabitleme teknolojilerin kullanılmasını önermektedir (Bader 2017).

Çizelge 2.2. Çeşitli fermentasyon sistemlerinde *S.cerevisiae* ile etanol üretimi (Waites vd. 2018).

Fermentasyon Türü	Etanol Üretim Hızı (g/L/h)
Kesikli	2,5-3,5
Sürekli (karıştırılmalı tank reaktör)	5,0-6,5
Sürekli (immobilize maya hücreleri)	>100

2.12. İmmobilizasyon

Herhangi bir biyoproses işleminin uygulanabilirliği ve sürdürülebilirliği, üretim düzeyine bağlı olarak değerlendirilmektedir. Düşük hacimsel verimlilikler, kar üzerinde kritik bir etkiye sahiptir ve bu zorluğa çözüm getirmek adına mikrobiyal hücre immobilizasyonu önerilmiştir (Nene 2014). İmmobilizasyon; hücrelerin aktivitelerini kaybetmeden belirli bir tutuklama materyalindeki boşluğa tutulması ya da hapsedilmesi olarak tanımlanmaktadır (Uygun 2006; Erkan 2020). İmmobilizasyonda biyokatalizör (mikroorganizma) popülasyonunun yoğunluğu önemli ölçüde artırarak fermentör verimliliği iki veya üç katına çıkarmaktadır (Najafpour vd. 2004; Yu vd. 2007). Lee vd. (2011), aynı kesikli fermantasyon koşulları altında, aljinat boncuklarında immobilize edilen maya hücrelerinin, serbest hücrelerle kıyaslandığında daha yüksek etanol verimi elde ettiğini ve daha kısa fermantasyon sürelerine sahip olduğunu bulmuştur. Çalışmalarının sonuçlarına göre, serbest hücrelerle gerçekleştirilen fermantasyon süresi 24 saat iken, aljinat boncuklarında immobilize edilen maya hücreleri kullanılarak bu süre 10-14 saat olarak belirlenmiştir (Nene 2014).

Hücrelerin immobilizasyonu, biyoreaktörde daha yüksek hücre yoğunluklarına neden olur, bu da reaksiyon hızlarında ve üretkenlikte bir artış sağlar. Bu avantajlarla birlikte, daha kısa kalış süreleri ve daha küçük reaktör boyutları kullanılabilir. Karragenan ve Ca aljinat gibi jellerde hücre tutma, en yaygın kullanılan immobilizasyon

yöntemlerindendir (Yu vd. 2007). Ayrıca, kitin, kitosan, aljinat ve zeolit gibi taşıyıcılar, kolay bulunabilirlikleri ve ekonomik olmaları nedeniyle immobilizasyon işlemlerinde sıkça kullanılan malzemeler arasında yer almaktadır (Kasavi 2006). Hücre immobilizasyonu şu anda eczacılık, gıda işleme, çevre koruma, biyoyakıt üretimi, tarımsal biyoteknoloji ve atık su arıtma gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Rathore vd. 2013; Nene 2014).

2.12.1. İmmobilizasyon işleminin avantajları

İmmobilize hücre teknolojisinin geleneksel sistemlere göre birçok avantajı bulunmaktadır. Kourkoutas vd. (2004)'e göre bunlar;

1. Biyokatalizörün uzun süreli aktivitesi ve stabilitesi, immobilizasyon taşıyıcısının (desteğinin) koruyucu özellikleri sayesinde pH, sıcaklık, çözücüler ve ağır metallerin fizikokimyasal etkilerine karşı direnç gösterebilir,
2. Yüksek hücre yoğunluğu; yüksek üretkenliğe, daha kısa bir fermentasyon süresine olanak tanır,
3. Atık sıvı miktarının azalması,
4. Yüksek hücre yoğunluğu sebebiyle mikrobiyal kontaminasyon riskinin azaltılması,
5. Substrat alımının artması ve buna bağlı olarak verimdeki artış,
6. Sürekli işlemlerde uygulanabilmesi,
7. Yüksek substrat konsantrasyonuna karşı artan tolerans ve son ürün inhibisyonunun azaltılması
8. Ürün kalitesinin iyileştirilmesine yol açan düşük sıcaklıkta fermentasyonun gerçekleştirilebilmesi,
9. Ayırma ve filtreleme gerekliliklerinin azaltılması ve böylece fermentasyon sonrası (down-stream) maliyetlerinin düşürülmesi,
10. Kesikli fermentasyonda biyokatalizörün biyoreaktörden çıkarılmadan uzun süre boyunca yenilenmesi ve yeniden kullanılabilmesi,
11. Basitleştirilmiş proses tasarımları sayesinde daha küçük biyoreaktörlerin kullanılabilmesi ve böylece sermaye maliyetlerinin düşürülmesi,
12. Bazı ürünlerde olgunlaşma sürelerinin kısaltılabilmesi,
13. Kütle transferinin geliştirilmesi,
14. Reaksiyon seçiciliğini arttırılması,
15. Hücre yakınlığı sağlanması,

16. Mekanistik çalışmalar için uygun olması,
17. Hücrelerin kesme kuvvetine karşı korunmasıdır.

2.12.2. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar

İmmobilizasyon işleminde çeşitli özelliklere sahip taşıyıcılar kullanılmaktadır ve taşıyıcı seçimi büyük bir öneme sahiptir (Kasavi 2006). İmmobilizasyonda, birçok doğal veya modifiye organik ve inorganik materyal kullanılabilir. Taşıyıcılar arasında membran, suda çözünmeyen katı veya polimer gibi seçenekler bulunmaktadır (Bozkurt ve Aslım 2004).

İmmobilizasyonun yeni bir stratejisi; hücrelerin doğal olarak yapışabileceği destek materyallerini (saman, talaş, pirinç kavuzu ve diğer doğal lifli materyaller) içermektedir (Iqbal ve Saeed 2005; Bader 2017).

İmmobilizasyon için kullanılan taşıyıcılarda, çeşitli özellikler aranmaktadır. Bu özellikler arasında; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli (poröz) yapı, gözenek çapının; substratın içeri girmesine ve ürünlerin dışarı çıkmasına yetecek kadar geniş olması ve aynı zamanda hücrelerin destek içinde kalmasını sağlayacak kadar dar olması bulunmaktadır. Uygun parçacık formu da önemlidir. Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar, yumuşak koşullarda tepki verebilen grupları taşımalıdır. Ayrıca, mikroorganizmalara karşı dirençli olmalı, ekonomik olmalı, zehirsiz olmalı ve rejenere edilebilmelidir (Demirel 2003; Bozkurt ve Aslım 2004). Taşıyıcı, gıda endüstrisinde kullanılabilir saflıkta olmalı, kalan kalıntılar ürün kalitesini etkilememeli ve tüketiciler tarafından kolayca kabul edilebilir olmalıdır. Ayrıca, hücrelerin tutunabileceği fonksiyonel gruplara sahip geniş bir yüzeye sahip olmalı, iyi bir mekanik, kimyasal, termal ve biyolojik stabiliteye sahip olmalıdır. Enzimler, solventler, basınç değişiklikleri veya kesme kuvvetleri nedeniyle kolayca bozulmamalı ve ölçek büyütme için uygun olmalıdır (Kourkoutas vd. 2004). karragenan, aljinat ve ksantan gibi polimerler, bu özellikleri içeren destek materyalleridir (Bozkurt ve Aslım 2004).

Argiriou vd. (1996), mineral Kissiris üzerine immobilize edilmiş bir *S. cerevisiae* suşunun hücrelerinin 0°C'de ardışık olarak korunmasının hem kesikli hem de sürekli işlemlerde yaklaşık 2,5 yıl boyunca etanol verimliliğini ve biyokatalitik stabiliteyi arttırdığını bulmuşlar (Kourkoutas vd. 2004). Diğer bir çalışmada immobilize maya hücrelerinin, bakteriyel selüloz-aljinat süngeri kullanılarak 15 döngü boyunca tekrar tekrar kullanılabilirliği bulunmuştur (Kirdponpattara ve Phisalaphong 2013; Tesfaw ve Assefa 2014).

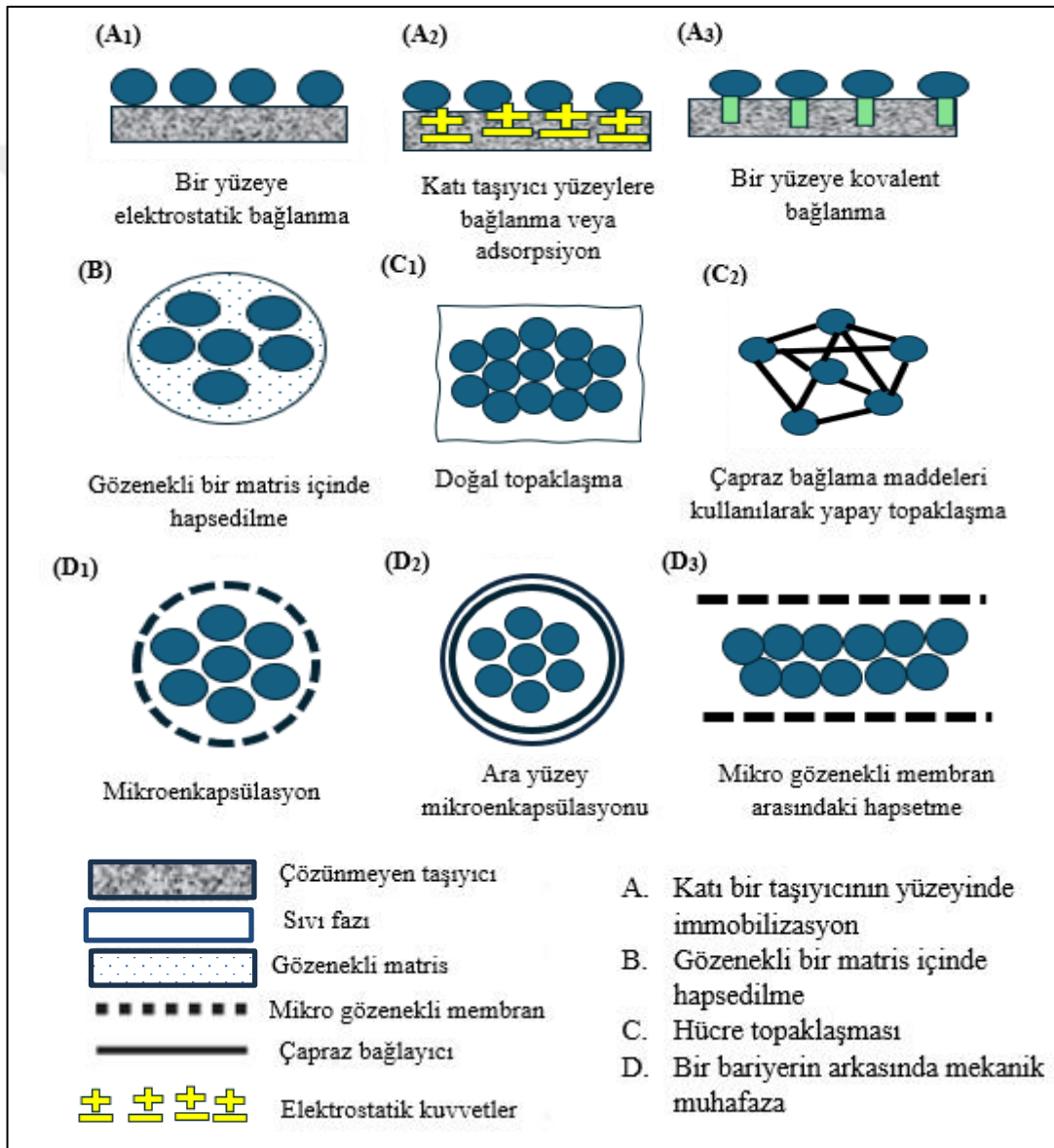
2.12.3. İmmobilizasyon teknikleri

Hücre immobilizasyonu için birçok yöntem bulunmaktadır. Mikroorganizmaların immobilizasyonu; bir destek materyaline tutturma ve hapsetme olmak üzere genellikle iki temel tipte gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerden en yaygın tercih edileni hapsetme metodudur (Demirel 2003; Bozkurt ve Aslım 2004).

Birçok mikroorganizma, doğadaki çeşitli yüzeylere tutunma yeteneğine sahiptir. İmmobilizasyon teknikleri, birçok biyoteknolojik süreçte avantajlıdır ve bu nedenle

çeşitli teknikler ve destek materyalleri önerilmiştir. Bu teknikler, kullanılan fiziksel mekanizmaya bağlı olarak dört temel kategoriye ayrılabilir (Şekil 2.6) (Pilkington vd.1998; Kourkoutas vd. 2004):

- (a) Katı taşıyıcı yüzeylere bağlanma veya adsorpsiyon,
- (b) Gözenekli bir matris içinde hapsedilme,
- (c) Doğal Topaklaşma veya çapraz bağlama maddeleri kullanılarak yapay topaklaşma,
- (d) Bariyerlerin arkasında hücre tutulması.



Şekil 2.6. Hücre immobilizasyonunun temel yöntemleri (Kourkoutas vd. 2004).

a. Katı taşıyıcı yüzeylere bağlanma veya adsorpsiyon

Birçok mikroorganizma, katı yüzeylere yapışma yeteneğine sahiptir. Bu immobilizasyon, elektrostatik kuvvetler (van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri vb.) nedeniyle fiziksel adsorpsiyon veya hücre zarı ile taşıyıcı arasındaki kovalent bağlanma yoluyla gerçekleştirilebilir (Kourkoutas vd. 2004). Ayrıca, fiziksel adsorpsiyonda hidrofobik bağlanmanın gerçekleşebileceği ve en eski immobilizasyon yöntemi olarak bilindiği belirtilmiştir (Kasavi 2006). Bu şekilde, bazı memeli hücreleri polistiren, kolajen, agaroz ve selüloz gibi malzemelere bağlanabilirler (Bozkurt ve Aslım 2004).

Mikroorganizmaların katı yüzeylere yapışmasıyla hücre filminin kalınlığı genellikle bir hücre katmanından 1 mm veya daha fazlasına kadar değişebilir. Bu tür immobilizasyonun göreceli kolaylığı nedeniyle, yüzeyde immobilize edilmiş hücreleri kullanan sistemler geniş bir popülerlik kazanmıştır. Hücrelerle çözelti arasında herhangi bir engel olmaması nedeniyle, adsorbe edilmiş ve serbestçe asılı olan hücreler arasında potansiyel bir denge kurularak hücre ayrılması ve yeniden konumlandırılması mümkündür. Bu tip immobilizasyonda kullanılan katı taşıyıcılara örnek olarak selülozik malzemeler (DEAE-selüloz, ahşap, talaş, delignifiye talaş) ve inorganik malzemeler (poligorsit, montmorillonit, hidromika, gözenekli porselen, gözenekli cam, vb.) verilebilir. Ayrıca cam veya selüloz gibi katı malzemelerin adsorblanabilirliklerini arttırmak için polikasyonlar, kitosan veya diğer kimyasallarla işlenebilmektedir (Norton ve D'Amore 1994; Navarro ve Durand 1977; Kourkoutas vd. 2004).

b. Gözenekli bir matris içinde hapsolma

Bu immobilizasyon yönteminde, hücrelerin ya diğer hücrelerin varlığı nedeniyle hareketlilikleri engellenene kadar gözenekli matrise nüfuz etmelerine izin verilir ya da gözenekli malzeme, yerinde bir hücre kültürü oluşturacak şekilde düzenlenir. Her iki hapsedme yöntemi de hücrelerin ortama yayılmasını önlemek amacıyla katı bir ağ içerisine dahil edilmesine dayanır. Aynı zamanda, besinlerin ve metabolitlerin kütle transferine izin verirler. Yani bu katı ağın gözenekleri, hücre molekülünden küçük, substrat ve ürün moleküllerinden büyüktür. Bu tip immobilizasyonun karakteristik örnekleri, aljinatlar, κ -karragenan, agar, kitosan ve poligalakturonik asit gibi polisakkarit jellerin veya jelatin, kollajen ve polivinil alkol gibi diğer polimerik matrislere hapsedilmesidir (Norton ve D'Amore 1994; Park ve Chang 2000; Kourkoutas vd. 2004).

Gözenekli matristeki hücre gelişimi, taşıyıcının gözenekliliği ve daha sonra biriken biyokütlenin etkisinin neden olduğu difüzyon kısıtlamalarına bağlıdır. Bu durum, homojen olmayan bir hücre popülasyonu modelinin gelişmesine neden olabilir, bu da yüzeye yakın hücrelerin, boncuk içindeki kısmen aç hücrelere kıyasla farklı davranış sergileyebileceği anlamına gelir (Freeman ve Lilly 1998; Kourkoutas vd. 2004). Polisakkarit jel gibi gözenekli bir matris içinde hücre hapsedilmesinin bir sorunu, boncukların dış yüzeyinde yer alan hücrelerin boncuktan salınma yeteneğidir. Bu durum, hareketsiz ve serbest hücrelerden oluşan bir sistemle sonuçlanabilir. Bu sorunu çözmek için, hidrojel boncukların; hücreleri içeren bir iç çekirdeğe ve hücrelerin çekirdekten kaçmasını önleyen bir dış katmana sahip çift katmanlı boncuklar geliştirilmiştir (Tanaka vd. 1989; Taillandier vd. 1994; Kourkoutas vd. 2004).

c. Hücre topaklaşması

Hücre topaklaşması, hücrelerin daha büyük bir birim oluşturacak şekilde bir araya gelmesi veya süspansiyonlardaki hücrelerin kümeler halinde yapışması ve hızla çökmesi olarak belirtilmektedir. Ayrıca çevresel koşullar, hücrelerin bir araya gelmesini teşvik edebilmekte (Bozkurt ve Aslım 2004) ve hücre topaklaşmasının; hücre duvarı bileşimi, pH, çözünmüş oksijen ve ortam bileşimi gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (Kourkoutas vd. 2004).

Mikroorganizmaların büyük kümeleri, reaktörlerde kullanılabilir. Bu nedenle, flokülasyon, bir immobilizasyon tekniği olarak düşünülebilir. Bu tür reaktörler, dolgulu yataklı, akışkan yataklı ve sürekli karıştırılmalı tank reaktörleri gibi çeşitli reaktör tiplerini içerebilir. Agregat oluşturma (bir araya gelme) yeteneği temel olarak küf, mantar ve bitki hücrelerinde gözlemlenir. Ancak yapay topaklaştırıcı maddeler veya çapraz bağlayıcılar, doğal olarak topaklanmayan hücre kültürlerinde topaklanmayı arttırmak amacıyla kullanılabilir (Kourkoutas vd. 2004). Organizmaların hücre duvarları, serbest amino ve/veya karboksil gruplarını içerir. Glutaraldehit, benzidimin, toluen diizosiyanat gibi çapraz bağlayıcılar kullanılarak hücre duvarındaki fonksiyonel gruplar arasında bir çapraz örgü oluşturularak birikme sağlanabilmektedir (Bozkurt ve Aslım 2004).

d. Bariyerlerin arkasında hücre tutulması

Hücrelerin bir bariyerin arkasında tutulması, mikro gözenekli membran filtrelerinin kullanılmasıyla, hücrelerin bir mikrokapsül içinde hapsedilmesiyle veya iki karışmayan sıvının etkileşim yüzeyi üzerinde hücre immobilizasyonu ile gerçekleştirilebilir. Bu tip immobilizasyon, hücre içermeyen ürünlerin ve minimum düzeyde kütle transferinin gerektiği durumlarda idealdir (Park ve Chang 2000; Kourkoutas vd. 2004). Mikro gözenekli membranlar aracılığıyla yapılan hücre immobilizasyonunun temel dezavantajları, kütle transferindeki sınırlamaları (Kourkoutas vd. 2004) ve hücre büyümesinden kaynaklanan potansiyel membran biyolojik kirlenmesidir (Gryta 2002; Kourkoutas vd. 2004).

Mikrokapsül tipi immobilizasyon için birçok kapsülleyici materyal bulunmaktadır. Bu materyaller arasında en sık kullanılanlar aljinat, agaroz, κ -karragenan, nişasta ve jelatindir (Burgain vd. 2011; Nene 2014). Doğal polimerler biyolojik olarak oldukça uyumlu olup, düşük moleküler ağırlıklı besinlerin ve metabolitlerin yüksek geçirgenliğine olanak tanır, bu da kapsüllenmiş mikrobiyal hücrelerin en uygun çalışma koşullarında bulunmasına katkı sağlar (Brun-Graeppe vd. 2011; Rathore vd. 2013; Nene 2014). Modifiye polimerler de kullanılmıştır, ancak doğal polimerlerle kıyaslandığında daha yüksek mekanik mukavemet ve daha iyi kimyasal stabilite sağlamalarına rağmen, zayıf biyo uyumlulukları nedeniyle kullanımları engellenmektedir (Rathore vd. 2013; Nene 2014). Poliakrilamid ve polivinil alkol, modifiye polimer örnekleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, modifiye polimerlerle kapsül üretimi, hücre canlılığını ve bütünlüğünü etkileyen zor koşulları gerektirmektedir (Nene 2014). Buna karşılık, doğal polimerlerle kapsül üretimi yumuşak ve toksik olmayan koşullar altında gerçekleşir, böylece hücre bütünlüğünü ve canlılığını olumsuz etkilemez (Rathore vd. 2013; Nene 2014).

Biyoteknolojik bir süreçte, herhangi bir adımın ortadan kaldırılması karı doğrudan etkiler. Enkapsülasyonla immobilizasyon, kapsüllerin kolay taşınması ve geri kazanılması, teknolojiyi daha da çekici hale getirmektedir. Bu durumun nedeni, ürün geri kazanımı için kullanılan santrifüjleme gibi yüksek enerjiye bağımlı süreçleri ortadan kaldırabilmesidir (Park ve Chang 2000; Nene 2014). Ancak, büyük ölçekli üretimde steril bir ortam sağlama endişeleri, istenen tüm özelliklere sahip bir kaplama malzemesi ve seri kapsül üretimi için gelişmiş teknolojinin henüz bulunmamış olması gibi bazı zorlukları beraberinde getirir (Park ve Chang 2000; Rathore vd. 2012; Westman vd. 2012; Nene 2014).

2.12.4. İmmobilizasyonun hücrelerde neden olduğu değişiklikler

Hem maya hem de bakteri türlerinde hücre immobilizasyonu, hücre büyümesi, fizyolojisi ve metabolik aktivitesinde değişikliklere sebep olabilir. Çeşitli çalışmalar, immobilize edilmiş hücrelerin farklı metabolik davranışlarının nedenlerini ele almıştır (Kourkoutas vd. 2004).

Bu değişikliklerin nedenleri arasında, difüzyonla kütle transferi sınırlamaları (Webb vd. 1986; Kourkoutas vd. 2004), büyüme düzenindeki bozukluklar (Doran ve Bailey 1986; Kourkoutas vd. 2004), yüzey gerilimi ve ozmotik basınç etkileri (Vijayalakshmi vd. 1979; Kourkoutas vd. 2004), su aktivitesinde azalma (Mattiasson vd. 1984; Kourkoutas vd. 2004), hücreler arası iletişim (Shuler 1985; Kourkoutas vd. 2004), hücre morfolojisinde değişiklikler (Shirai vd. 1988; Kourkoutas vd. 2004), membran geçirgenliğinde değişiklik (Brodellius ve Nilsson 1983; Kourkoutas vd. 2004) ve besiyeri bileşenlerinin kullanılabilirliği gibi çeşitli parametrelerin etkili olduğu düşünülmektedir (Chen vd. 1990; Kourkoutas vd. 2004).

İmmobilize ve serbest hücreler üzerinde gerçekleştirilen karşılaştırmalı çalışmalar, maya enerjik metabolizmasının aktivasyonunu, polisakkaritlerin depolanmasında artışı, büyüme oranlarında değişiklikleri, substrat alımında ve ürün veriminde artışı, fermantasyon yan ürünlerinin daha düşük verimini, daha yüksek hücre içi pH değerlerini, toksik ve inhibitör bileşiklere karşı toleransın artmasını ve artan invertaz aktivitesini içermektedir (Norton ve D'Amore 1994; Kourkoutas vd. 2004).

2.13. Destek Materyallerinin Üstünlükleri

Son zamanlarda, destek malzemelerinin ucuz ve kullanımının kolay olması nedeniyle, genel olarak etanol üretiminde klasik immobilizasyon ajanlarından daha avantajlı olduğu belirtilmektedir. Örneğin, lignoselüloz bazlı immobilize materyaller, sodyum veya kalsiyum aljinat gibi yaygın olarak kullanılan destek materyallerine kıyasla daha etkili bir şekilde etanol üretimini desteklemiştir (Singh vd. 2013; Tesfaw ve Assefa 2014). Bunun ana nedeni; Ca-aljinatın fosfatlara karşı kararsızlığıdır. Bununla birlikte, fermantasyon sırasında CO₂ oluşması sonucunda jel parçacıkları bozulmaktadır. Ayrıca, hücrelerin taşıyıcı yüzeyine elektrostatik etkileşimler veya kovalent bağlanması yoluyla bağlandığından, iki önemli dezavantaj ortaya çıkmaktadır. Bunlar; taşıyıcı yüzeyinin biyokütle yükünü sınırlaması ve çeşitli faktörlerin hücre desorpsiyonuna neden olabilmesidir. Bunun sonucunda, operasyonel stabilite sınırlanmaktadır (Yu vd. 2007).

2.14. Biyofilmler

Biyofilm, mikrobiyal olarak üretilmiş organik bir polimer içine gömülmüş ve katı yüzeylere geri dönülemez şekilde yapışan bir mikroorganizma topluluğu ve hücre immobilizasyonunun doğal bir şeklidir (Cheng vd. 2010). İlk biyofilmler Van Leeuwenhoek tarafından dış yüzeyinde keşfedilmiş ve mikroorganizmalar ile katı destek malzeme arasındaki etkileşim, van der Waals'ın çekim ve itme kuvvetleri arasındaki dengenin sonucunda ortaya çıkmaktadır (Cheng vd. 2010). Islak biyofilm kütlesinin %90'ından fazlasını su içerir ve polisakkaritler ve glikoproteinler içeren hücre dışı polimerik maddeler (EPS), kuru biyofilm kütlesinin %70'inden fazlasını oluşturur (Melo ve Oliveira 2001; Cheng vd. 2010). Biyofilm reaktörlerinin olağanüstü stabilitesi, düşük besin gereksinimleri ve uzun vadeli ekim potansiyeli, özellikle etanol ve organik asitler gibi katma değerli ürünlerin büyük ölçekli üretimi için potansiyellerini göstermektedir (Cheng vd. 2010).

Biyofilm reaktörlerinde PKD'ler kullanılarak biyokütle arttırılabilir böylece fermentasyon verimi artmaktadır. Örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* veya *Zymomonas mobilis* mikroorganizmaları için biyofilm reaktörlerinde, süspansiyon kültürüne kıyasla 3 ve 8 kat daha fazla etanol verimliliğinin elde edildiği belirtilmektedir (Kunduru ve Pometto 1996; Cheng vd. 2010). Bunun nedeni; üretim oranlarının artması, yüksek seyreltme oranında sürekli bir fermentasyon uygularken yıkanmanın (wash out) azaltılması, tekrarlanan kesikli fermentasyon sırasında yeniden aşılama ihtiyacının ortadan kaldırılması ve fermentasyon sırasında PKD'lerin kademeli olarak besinleri ortama serbest bırakmasıdır (Fukuda 1995; Cheng vd. 2010).



Şekil 2.7. PKD materyalleri

2.14.1. Biyofilm oluşumu

Tipik bir biyofilm oluşumu 3 ana aşamada gerçekleşmektedir (Bryers 2000; Busscher ve van der Mei 2000; Lewandowski ve Beyenal 2007; Demirci vd. 2007; Cheng vd. 2010). Bunlar; bağlanma, kolonizasyon ve gelişmedir. İlk aşama olarak bağlanma; pürüzlülük ve yük gibi yüzey özelliklerinden ve yüzeye taşınan mikroorganizmaların hızından etkilenmektedir. Mikroorganizmaların yüzeye bağlanması elektrostatik etkileşime dayalı olan adsorpsiyonla gerçekleşmektedir. İkinci ve üçüncü aşamalar yani kolonizasyon ve gelişme, besin taşınması ve difüzyonu, toplu akışın kesme kuvveti ve mikroorganizmaların gelişme hızı gibi faktörlerden etkilenir. Bağlanma aşamasında

sıvıdaki mikroorganizmalar yüzeye difüzyon, konveksiyon ya da kendi kendine hareket etme yoluyla taşınıp katı yüzeyle zayıf, tersine çevrilebilir bir adhezyon oluşturur. 2. Aşamada olan kolonizasyonda ise, mikroorganizmaların salgıladığı EPS ve substrat arasında polimer köprülerin oluşması sonucunda geri dönüşü olmayan bir yapışma meydana gelir (Busscher vd. 1995; Azeredo vd. 1999; Bryers 2000; Cheng vd. 2010). Kolonizasyondan sonra besin varlığına bağlı olarak mikroorganizmalar gelişme aşamasına geçer ve son olarak da gelişme ve ayrılma arasında denge sağlandığında biyofilm maksimum ortalama kalınlığına ulaşmakta ve sistem kararlı duruma varmaktadır (Melo ve Oliveira 2001; Cheng vd. 2010).

2.15. PKD Materyalinin İçeriği

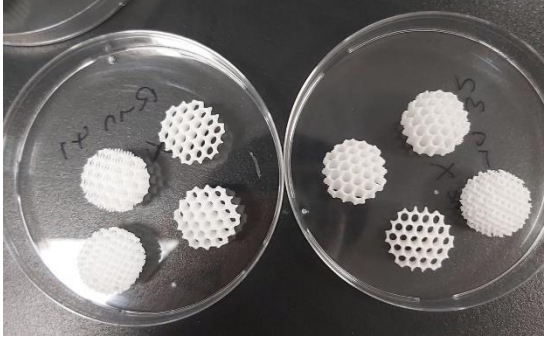
Plastik kompozit destek, polipropilen ve çeşitli tarım ürünlerinden yapılan ekstrüzyonla katı bir destektir (Cheng vd. 2009). Polipropilen bir matris olarak görev yapmakta ve öğütülmüş soya fasulyesi kabukları, soya fasulyesi unu gibi tarımsal karışımları ve sığır albümini, kırmızı kan hücreleri, maya ekstraktı ve pepton gibi mikrobiyal besin maddeleri ile birlikte mineral tuzlarını da entegre eder. Bunun sayesinde; PKD, biyofilm oluşması için uygun bir fiziksel yapı sağlamanın yanı sıra fermentasyon sırasında besin maddelerini kademeli olarak serbest bırakır (Cheng vd. 2009).

PKD halkalı biyofilm reaktörleri ile tek başına polipropilen destekli (PPS) biyofilm reaktörleri karşılaştırıldığında; PKD malzemeleri kullanılarak iki ila on kat daha yüksek etanol verimliliği elde edildi. Bunun nedeni; PKD halkaları üzerindeki yavaşça salınan nitrojen kaynağı, biyofilm canlılığı korumasıdır (Ho vd. 1997; Cheng vd. 2010).

2.16. 3D Materyaller Kullanılarak Hücre İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon uygulamalarında, hücrelerin organik veya inorganik bir matris yüzeyine adsorpsiyon yöntemi, jel matrislerinde hapsedilme yöntemine göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar; daha hızlı kütle transferi ve matrisin özellikle hücre büyümesi söz konusu olunca bozulmamasıdır (Kourkoutas vd. 2004; Belgrano vd. 2018). Hücre adsorpsiyonunun verimliliğini belirlemek için, matris özellikleri (Boyut, gözeneklilik, yüzey özellikleri vb.), yük ve hidrofobiklik oldukça önem taşımaktadır (Samonin ve Elikova 2004; Kilonzo vd. 2011; Belgrano vd. 2018). Bu matrisler, doğal veya modifiye olabilir, ayrıca hücre adsorpsiyonunu teşvik etmek amacıyla kimyasal modifikasyon gerektirebilir (Belgrano vd. 2018).

İmmobilizasyon yönteminde son yıllarda yeni bir uygulama olan 3D materyallere hücrelerin adsorpsiyonu, başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek fermentasyon verimliliği artabilmektedir. 3D materyaller, uygun geometri, boyut ve yazıcı teknolojisi kullanılarak immobilizasyon için kullanılabilirler. Bu materyallerin darbeye dayanıklı, otoklavlanabilir, inert, gıda sınıfı ve yüksek yüzey alanı gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Ünsal vd. 2023). Bu çalışmada 3D naylon materyaller kullanılarak hücre immobilizasyonu gerçekleştirilecektir.



Şekil 2.8. 3D materyaller (Hex)

Bu tez çalışmasında immobilizasyon amacıyla 3D materyaller ve PKD malzemeleri kullanılmıştır. Daha önce dut ekstraktında 3D materyal ve PKD materyalleri ile hücre immobilizasyonu ve etanol üretimi üzerine bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, immobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kullanılarak üretim hızı ve verimi açısından fermentasyon prosesinin performansı geliştirilmiştir. Ayrıca sürekli fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada karbon kaynağı olarak kuru dut (*Morus alba* L.) ekstraktı kullanılmıştır. İlk olarak beyaz dut kurusu 0,5-1 mm'ye kadar öğütülmüştür, sonrasında su banyosunda ekstrakte edilmiştir ve daha önce yapılan araştırmalara göre optimum ekstraksiyon koşulları 3 saat, 80°C ve 1:4 g/ml (katı sıvı oranı) olarak belirlenmiştir. Ayrıca saf karbon kaynağı olarak 45 g/L glukoz (Sigma-Aldrich, Lot.SZBF0140V, Germany), 45 g/L fruktoz (sigma, Lot. SLBN4536V) ve 1 g/L sakkaroz (merck KGaA 6427, 1.07651.1000, Germany) kullanılmıştır. Bu 3 karbonhidrat, kuru dutun şeker bileşenlerini oluşturduğu için bu çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Materyal olarak kullanılan beyaz dut kurusu

2. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizma

Etanol üretiminde kullanılacak olan *S. cerevisiae* (ATCC 36858) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (Monnos, VA)'dan temin edilmiş olup laboratuvarımızda mevcuttur. Mikroorganizmanın gelişmesi için; 50 g/L glukoz, 6 g/L maya ekstraktı, 4 g/L (NH₄)₂SO₄, 1,5 KH₂PO₄, 1 g/L MgSO₄.7H₂O ve 0,3 g/L CaCl₂.2H₂O içecek şekilde bir besiyeri ortamı hazırlanmıştır ve bu besiyerine %1 maya inokülasyonu yapılmıştır. Ardından 30°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Turhan vd. 2010). Bu aşamadan sonra, mikroorganizma, +4 °C'de stok kültür formunda muhafaza edilmekte ve canlılığı korunmak için 2 ayda 1 yenilenmektedir. Bu çalışmada hücreler 3D materyaller (Ünsal vd. 2023) ve PKD malzemeleri (Bader 2017) ile immobilize edilerek kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Fermentasyonda kullanılan *S. cerevisiae* mayasının geliştirilmesi

3.3. Plastik Kompozit Destek Malzemeleri

Biyofilm reaktörlerinde PKD materyalleri destek malzemesi olarak kullanılmıştır. Bu materyaller %50 (w/w) tarımsal malzemelerinden ve %50 oranında (w/w) polipropilenden oluşmaktadır. PKD materyallerinin yapısındaki besin maddeleri (soya fasulyesi gövdesi, soya fasulyesi unu, maya özütü, kırmızı kan hücreleri, sığır albümini ya/ya da mineral tuzları ve tarımsal ürünler) hücre gelişmesini teşvik etmektedir (Germec vd. 2015). Çizelge 3.1.'de bu çalışmada kullanılan 4 farklı PKD materyalinin formülasyonu verilmiştir.

Çizelge 3.1. PKD materyallerinin bileşimi (Germec vd. 2015).

PKD	Küçük tarımsal materyal(ler) (w/w)
SH ^a –SF ^b –YE ^c –S	5% soya fasulyesi unu–5% maya ekstraktı
SH–SF–YE–BA ^d –S	5% soya fasulyesi unu–5% maya ekstraktı–5% sığır albumin
SH–SF–S	10% soya fasulyesi unu
SH–SF–YE–RBC ^e –S ^f	5% soya fasulyesi unu–5% maya ekstraktı–5% kırmızı kan

^a SH: Öğütülmüş 20 gözenekli ve vakumlu kurutulmuş soya gövdeleri (Cargill Soy Processing Plant, Iowa Falls, IA, USA).

^b SF: vakumlu kurutulmuş soya fasulyesi unu (Archer Daniel Midland Co, Decatur, IL, USA).

^c YE: Maya ekstraktı (Ardamine-Z, Champlain Industries, Chifton, NJ, USA).

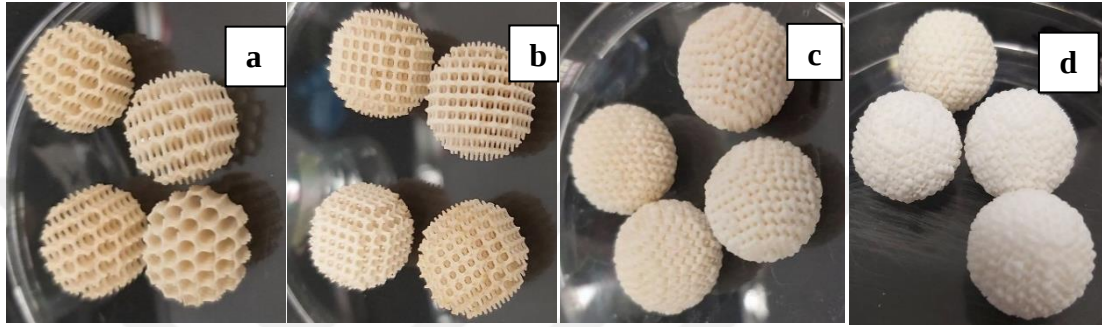
^d BA: Kurutulmuş sığır albumin (American Protein Corporation, Ames, IA, USA).

^e RBC: Kırmızı kan hücreleri (American Protein Corp., Ames, Iowa).

^f S: Tuzlar.

3.4. 3D Materyaller

3D materyaller, uygun geometri, boyut ve yazıcı teknolojisi kullanılarak immobilizasyon için başarılı bir şekilde kullanılabilirler. Bu materyallerin darbeye dayanıklı, otoklavlanabilir, inert, gıda sınıfı ve yüksek yüzey alanı gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Ünsal vd. 2023). Bu çalışmada ilk olarak kafes yapısı açısından 4 farklı tip küreler (Hex, grid, X ve W) karşılaştırılmıştır ve etanol üretimi açısından en iyi 3D küreyi seçmek üzere çalkalamalı inkübatörde fermentasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. İmmobilizasyonda kullanılan 3 D materyalleri; a) Hex; b) Grid; c) X; d) W

3.5. Etanol Üretimi için Uygulanan Deneme Deseni

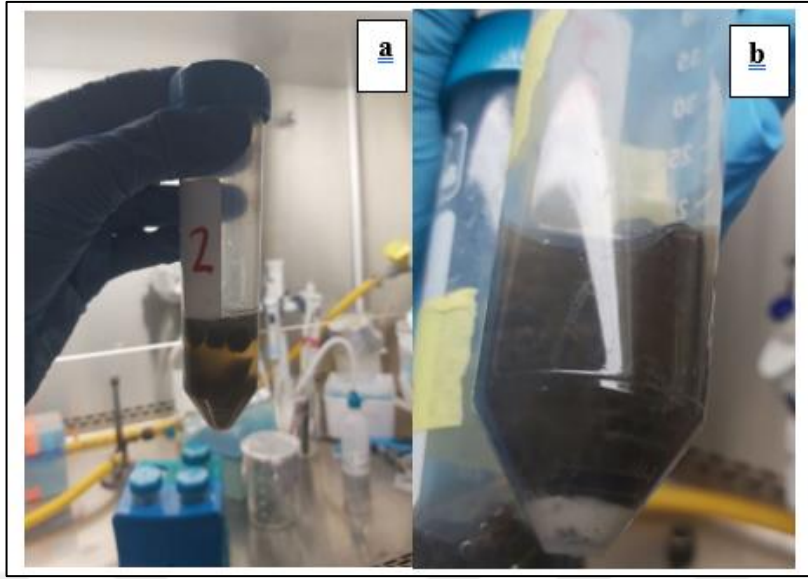
Bu tez kapsamında yapılan fermentasyon denemeleri aşağıda verilmiştir; 1-7 aşamaları beyaz dut kurusu hidrolizatının modifiye ortamında (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz) yapılmıştır. Diğer aşamalar ise beyaz dut kurusu hidrolizatında uygulanmıştır:

- 1) Modifiye ortamda kontrol fermentasyonu (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz)
- 2) *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası kullanarak modifiye ortamda 4 çeşit 3D materyali içinden etanol üretimi açısından en iyi materyalin seçilmesi
- 3) *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası kullanarak modifiye ortamda 4 çeşit PKD materyali içinden etanol üretimi açısından en iyi materyalin seçilmesi
- 4) En iyi 3D materyali kullanılarak modifiye ortamda PBD (Plackett Burman Designs) ile besiyeri bileşiminin optimizasyonu
- 5) En iyi 3D materyalleri için PBD besiyeri optimizasyonunun validasyonu
- 6) En iyi PKD materyali kullanılarak modifiye ortamda PBD ile besiyeri bileşiminin optimizasyonu
- 7) En iyi PKD materyalleri için PBD besiyeri optimizasyonunun validasyonu

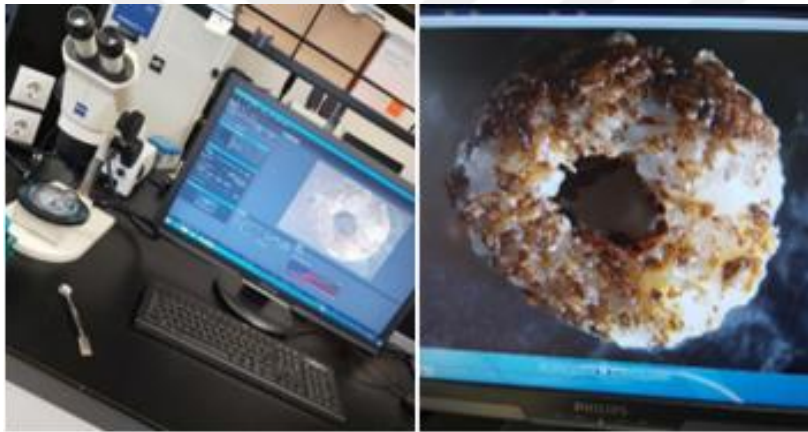
- 8) Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan yapılan kontrol fermentasyonu
- 9) En iyi 3D materyalleri ile zenginleştirilmemiş dut hidrolizatında fermentasyon
- 10) En iyi PKD materyalleri ile zenginleştirilmemiş dut hidrolizatında fermentasyon
- 11) Beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında en iyi 3D materyalleri kullanılarak PBD ile belirlenen parametrelerle doğrulama fermentasyonunun gerçekleştirilmesi
- 12) Beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında en iyi PKD materyalleri kullanılarak PBD ile belirlenen parametrelerle doğrulama fermentasyonunun gerçekleştirilmesi
- 13) Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyon
- 14) Zenginleştirilmiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında (20 g/L pepton, 3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 3D materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyon

3.6. PKD Materyalinin Seçimi için Falkon Tüplerinde Fermentasyon

Dört farklı PKD materyali (Şekil 3.4) *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası için uygun besiyeri içeriklerinde (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz ve 1 g/L sakkaroz) falkon tüplerinde fermentasyona bırakılmıştır. Her bir falkon tüpünde paralel bir şekilde 2,9 g PKD diskleri konulmuştur. Bu PKD diskleri sterilizasyon için 121°C'de 30 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Ardından her bir falkon tüpüne 10 ml steril glukoz, fruktoz ve sakkaroz karışımı ilave edilmiştir. Bu PKD'li tüpler 24 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonunun ardından 10 ml taze glukoz, fruktoz ve sakkaroz karışımı ortama tekrar ilave edildikten sonra (yani 2. günde) tüplere 0.1 ml (%1) *S. Cerevisiae* mayası inoküle edilip 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Falkon tüplerindeki besiyeri her gün belli bir saate steril kabinde aseptik olarak boşaltılmıştır ve bu işlem 6 gün boyunca 5 kere yapılmıştır. Son aktarımdan sonra şeker, etanol ve biyokütle analizleri için örnek alınmıştır (Germec vd. 2015). Bu analizlerden sonra en iyi PKD materyali etanol üretimi açısından seçilerek fermentasyon onunla yapılmıştır. Şekil 3.4'te inkübasyondan önce ve sonrasında PKD materyalleri gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Fermentasyonda kullanılan PKD diskleri; a) inokülasyon öncesi; b) inokülasyon sonrası



Şekil 3.5. Fermentasyonda kullanılan PKD diskleri üzerinde gelişen *S. cerevisiae* mayası

3.7. 3D Materyalin Seçimi için Erlenmayerlerde Fermentasyon

İlk olarak erlenmayerlere 100 mL glukoz, fruktoz ve sakkaroz karışımı eklenmiş ve 3D kürelerden ayrı olarak sterilize edilmiştir. 3D kürelerin sterilizasyonu 100 ml deiyonize su içinde yapılmıştır. Daha sonra 3D küreler aseptik olarak steril glukoz, fruktoz ve sakkaroz ortamına eklenmiştir. Kürelerin besiyerine eklendikten sonra her erlenmayerde %1 (1 mL) *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayasının inokülasyonu yapılmış ve immobilizasyon için 30 °C, 150 rpm çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24 inkubator Shaker Series) inkübe edilmiş (Ünsal vd. 2023). Hücrelerin küreler üzerinde immobilize edilmesi için ortam 5 gün boyunca günlük olarak değiştirilmiştir. Besiyeri değiştirmenin ilk gününde (24. saatte), fermente besiyerinin %90'ı 90 ml steril glukoz, fruktoz ve sakkaroz karışımı besiyeri ile değiştirilmiştir (10 mL eski besiyeri kalacak şekilde). Daha sonra 5. güne kadar her gün tüm besiyeri 100 ml

steril glukoz, fruktoz ve sakkaroz karışımı besiyeri ile değiştirilmiştir. 5 kere aktarımın sonunda, her bir erlenmayerin kullanılmış besiyerinde etanol, şeker ve biyokütle analizleri yapılmıştır. Bu analizlerden sonra en iyi 3D materyali etanol üretimi açısından seçilerek fermentasyon onunla yapılacaktır. Ayrıca, kontrol fermentasyonları, steril glukoz, fruktoz ve sakkaroz karışımı besiyeri ile yenilenmesi suretiyle askıdaki hücrelerle yapılmıştır. Analiz yapmak ve kinetik parametreleri hesaplamak için farklı zamanlarda numuneler alınmıştır.



Şekil 3.6. 3D materyaller kullanılarak çalkalamalı inkübatörde fermentasyonun yapılması

3.8. Beyaz Dut Kurusuna Uygulanan Ön İşlem

Ön işlem için kuru dut materyalleri, bir değirmende (Waring 8011 EB modeli) ortalama 20 saniye 0,5-1 mm'ye kadar öğütülmüştür. Böylece kuru dut materyallerinin yüzey alanı artmakta ve daha hızlı ve verimli hidroliz için hazır hale gelmektedir.



Şekil 3.7. Beyaz dut kurusuna uygulanan ön işlem ve ekstraksiyon

3.9. Beyaz Dut Kurusunun Ekstraksiyonu

Sarnıç ve Esen (2023) tarafından yapılan bir çalışmada beyaz dut kurusunun ekstraksiyonu için optimum koşullar; katı-sıvı oranının 1:4 g/ml, sürenin 3 saat ve sıcaklığın 80°C olduğu saptanmıştır. Bu koşullarda elde edilen fermente şeker miktarı 182,57 g/L'dir (Sarnıç ve Esen 2023).

3.10. Besiyeri Bileşiminin Optimizasyonu

Bu çalışmada optimum besiyeri formülasyonu Plackett Burman Design ile belirtilmiştir. PBD'de kullanılan besiyeri bileşenlerinin seviyeleri için literatür çalışmalarına göre minimum ve maksimum değer aralıkları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Bu besiyeri ayrıca 45 g/L glukoz, 45g/L fruktoz ve 1 g/L sakkaroz içermektedir.

Çizelge 3.2. PBD yönteminde kullanılan minimum ve maksimum seviyedeki parametrelerin konsantrasyon aralıkları

Besiyeri Bileşimi (g/L)	En düşük seviye (-)	En yüksek seviye (+)	Referans
Maya ekstraktı (Merck KGaA, VM1018053, Germany)	0,5	5	İzmirlioglu ve Demirci 2015
Pepton (Bacto, REF: 211677, France)	2	20	Wang vd. 2007
(NH₄)₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Lot.SZBB2870V)	2	6	İzmirlioglu ve Demirci 2015
MgSO₄.7H₂O (Sigma-Aldrich, Lot. BCBD6849V)	0,2	2	İzmirlioglu ve Demirci 2015
KH₂PO₄ (İSOLAB, Lot. MC1151302ALW, Germany)	0,5	3	İzmirlioglu ve Demirci 2015
FeSO₄.7H₂O (Merck KGaA, A730765 633, Germany)	0,01	0.1	İzmirlioglu ve Demirci 2015
CaCl₂.2H₂O (Merck KGaA, A608782 630, Germany)	0,3	3	İzmirlioglu ve Demirci 2015

Çizelge 3.3. PB yönteminde kullanılan parametreler

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)	Glukoz (g/L)	Fruktoz (g/L)	Sakkaroz (g/L)
1	0,50	20	2	2,0	3,00	0,100	0,30	45	45	1
2	5,00	20	2	0,2	3,00	0,010	3,00	45	45	1
3	2,75	11	4	1,1	1,75	0,055	1,65	45	45	1
4	5,00	2	2	2,0	0,50	0,100	3,00	45	45	1
5	0,50	20	6	2,0	0,50	0,010	3,00	45	45	1
6	2,75	11	4	1,1	1,75	0,055	1,65	45	45	1
7	5,00	20	6	0,2	0,50	0,100	0,30	45	45	1
8	5,00	2	6	2,0	3,00	0,010	0,30	45	45	1
9	0,50	2	6	0,2	3,00	0,100	3,00	45	45	1
10	0,50	2	2	0,2	0,50	0,010	0,30	45	45	1

3.11. Toplam Şeker Analizi

Hidrolizatlardaki ve fermentasyon sırasında alınan örneklerdeki indirgen şeker konsantrasyonu DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi ile belirlenmiştir (Miller 1959). DNSA çözeltisi; 10 g/L NaOH, 10 g/L DNSA ve 0.5 g/L sodyum sülfidin öncelikle saf suda çözündürülüp ardından 1 L hacminin tamamlanması ile hazırlanmıştır. Potasyum sodyum tartarat çözeltisinin ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) hazırlanması için de 40 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf su ile 100 mL hacminin tamamlanmasıyla %40'lık $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılmaya hazırlanmıştır.

Şeker analizi için, 50 μL örneğe 1.95 mL saf su eklenmiş, ardından 40 μL 12 M HCl ile karıştırılmıştır. Bu karışım, 100°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilerek hidrolize edilmiştir. Su banyosundan çıkarılan hidrolizatlar üzerine 100 μL 5 N KOH eklenip karıştırılmıştır. Ardından her bir karışım içerisinde 640 μL hacim dışarıya atılmıştır. Böylelikle her bir test tüpündeki hacim 1,5 mL olmuştur ve üzerlerine 1,5 mL DNSA çözeltisi eklenmiştir. Bu sırada 1,5 mL saf su üzerine 1,5 mL DNSA çözeltisi ilave edilerek kör örnekler hazırlanmıştır. Bu solüsyonlar vorteks cihazında karıştırıldıktan sonra 100°C'lik su banyosunda 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Renk stabilizasyonun sağlanması için her bir karışımın üzerine 0.5 mL %40'lık potasyum sodyum tartarat çözeltisi ilave edilmiştir. Ardından oda sıcaklığına soğutulduktan sonra spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen absorban değerleri, Eşitlik 3.1'de yerine yazılarak indirgen şeker konsantrasyonu hesaplanmıştır.

$$y=59,9826 \cdot x+0,7817$$

(3.1)



Şekil 3.8. Toplam şeker analizi

3.12. Biyokütle Analizi

Çalkalamalı inkübatörden belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek amacıyla canlı hücre miktarı analiz edilmiştir. Bu amaçla her bir örnekten 0,1 mL alınıp üzerine 0,9 mL saf su ilave edilerek 10 kat seyreltilmiştir. Kör olarak saf su kullanılmıştır. Canlı hücre miktarının hesaplanması için spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer) 620 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre *Saccharomyces cerevisiae* canlı hücre

miktarı eşitlik 3.2 kullanılarak g/L olarak hesaplanmıştır (Demirci ve Pometto 1995; Demirci vd. 1997).

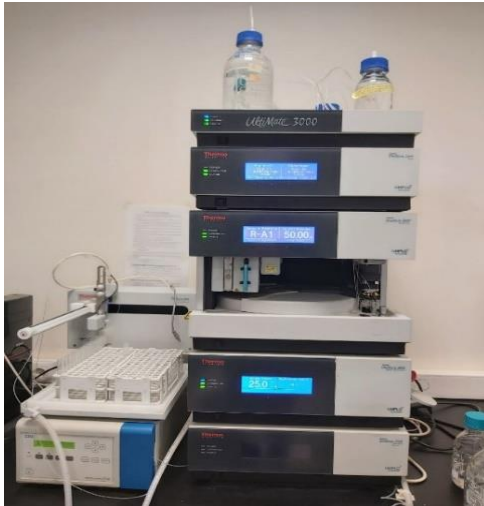
$$y=0,666019*x+0,10634 \quad (3.2)$$



Şekil 3.9. Biyokütle analizi

3.13. Etanol Analizi

Fermentasyon örneklerinde etanol üretimini belirlemek amacıyla Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC cihazı kullanılmıştır. Analiz için hazırlanan örnekler ultra saf su ile 20 kat seyreltilmiştir. Ardından katı partiküllerinin uzaklaştırılması için filtreden (Chromafil PET-45/25) geçirilmiştir. Filtrelenmiş örnekler şırınga kullanılarak viallere aktarılmıştır. Bu analiz; 0,5 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiş olup, 20 µL enjeksiyon hacmi kullanılmıştır. Mobil faz olarak 0,01 N H₂SO₄ kullanılmış ve analiz işlemi 70°C sıcaklıkta Transgenomic ICSep ORH-801 (Apple Valley, MN) kolonu üzerinde yapılmıştır (Germec vd. 2017).



Şekil 3.10. HPLC cihazı

3.14. PKD Materyalleri Kullanılarak Sürekli Etanol Fermentasyonu

Çalkalamalı inkübatörde, test tüplerinde en iyi plastik kompozit destek materyali (PKD 2) belirlendikten sonra, 5 L'lik bir kap (1 L'lik çalışma hacmi) ile karıştırılan bir tank biyofilm reaktöründe (Sartorius Biostad B Plus, Goettingen, Almanya) sürekli etanol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Biyofilm reaktörü için, 4 adet PKD materyali (65 mm uzunluk ve 10,5 mm genişlik), karıştırıcı şaftına ızgara benzeri bir şekilde bağlanmıştır. PKD'li reaktör kabı, deiyonize su ile doldurularak 60 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanıp oda sıcaklığına kadar soğutulmasının ardından, su bir peristaltik pompa ile reaktörden dışarı pompalandı, ardından 1 L taze sterilize zenginleştirilmiş glukoz içeren besiyeri steril biyofilm reaktör kabına aseptik olarak ilave edilmiş (Bader 2017). Reaktör ortamının berraklığına bakarak sterilit kontrolü amacıyla reaktör 30°C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından bu glukoz içeren besiyeri reaktörden peristaltik pompa aracılığıyla dışarıya çekilmiş ve steril beyaz dut kurusu hidrolizatı ortama eklenmiştir. Reaktöre %1 oranında (v/v, 10 mL) çalkalamalı inkübatörde 30°C'de 24 saat boyunca 150 rpm'de inkübe edilen *S. cerevisiae* (ATCC 36858) ön kültüründen inoküle edilmiştir. Biyofilm oluşması amacıyla fermentasyon 30°C, 5.5 pH ve 150 rpm karıştırma hızında yapılmıştır (Turhan vd. 2010). pH kontrolü, otomatik olarak ilave edilen 2N NaOH ve 4N HCL çözeltisi ile yapılmıştır. PKD2 materyalleri üzerinde biyofilmin oluşması için 6 gün boyunca 5 kez transfer ile immobilizasyon yapılmıştır. Biyofilm oluşması için, reaktöründeki besiyeri her 24 saatte bir yenilenmiştir. Ayrıca her 24 saatte bir örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde şeker, etanol ve biyokütle analizleri yapılmıştır (Germec vd. 2015).

3.15. 3D Materyalleri Kullanılarak Sürekli Etanol Fermentasyonu

PKD materyalleri ile benzer bir şekilde, çalkalamalı inkübatörde erlenmayerlerde en iyi 3D materyali (Hex) belirlendikten sonra 5 L'lik bir kap (1 L'lik çalışma hacmi) ile karıştırılan bir tank biyofilm reaktöründe sürekli etanol fermentasyonları yapılmıştır. Bunun için, 30 adet 3D materyali (Hex) biyorektöre koyulmuş ve reaktör kabı, 1 L deiyonize su ile doldurularak 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanıp oda sıcaklığına kadar soğutulmasının ardından, su bir peristaltik pompa ile reaktörden dışarı pompalanmış, ardından 1 L steril ve zenginleştirilmiş (20 g/L pepton, 3g/L KH₂PO₄, 2 g/L (NH₄)₂SO₄) beyaz dut kurusu hidrolizatı steril biyofilm reaktör kabına aseptik olarak ilave edilmiştir. Reaktöre %1 oranında (v/v, 10 mL) çalkalamalı inkübatörde 30°C'de 24 saat boyunca 150 rpm'de inkübe edilen *S. cerevisiae* (ATCC 36858) ön kültüründen inoküle edilmiştir. Biyofilm oluşması amacıyla fermentasyon 30°C, 5.5 pH ve 150 rpm karıştırma hızında yapılmıştır (Turhan vd. 2010). Hex materyalleri üzerinde ve içinde biyofilmin oluşması için 6 gün boyunca 5 kez transfer ile immobilizasyon yapılmıştır. Biyofilm oluşması için, reaktöründeki besiyeri her 24 saatte bir yenilenmiştir. Ayrıca her 24 saatte bir örnekler alınmıştır. Alınan örneklerde şeker, etanol ve biyokütle analizleri yapılmıştır (Germec vd. 2015).

Biyofilm reaktörünü sürekli sistemde çalıştırmak için Watson-Marlow 323E/D modeli peristaltik pompa kullanılmıştır, bu pompa hızı kontrol edilebilir özelliktedir. Bununla birlikte, biyoreaktör içinde sabit bir sıvı seviyesi sağlamak için bir hasat pompası da kullanılmıştır. Bu hasat pompanın ucu tam 1 L'nin üzerinde durduğu için çalışma hacmi 1 L olarak sabit kalmıştır. Dilüsyon oranları 0,06 ila 0,16/saat olarak belirtilmiştir. Dilüsyon oranlarının belirtilmesi için çalkalamalı inkübatörde 2 erlenmayerde paralel bir

şekilde herhangi bir immobilizasyon olmadan beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında fermentasyon gerçekleştirilmiştir ve mikroorganizmanın spesifik gelişmesi dikkate alınmıştır.

Sürekli fermentasyonda mikroorganizmaların logaritmik fazında gerçekleştirilir. Bu fermentasyonda ölüm hızı sıfır olarak dikkate alındığı için dilüsyon oranı ve spesifik gelişme hızı eşit olmaktadır.

$$\mu=D=F/V \quad (3.3)$$

(μ : spesifik gelişme hızı (1/h); D: dilüsyon oranı (1/h); F: besleme hızı (mL/h); V: hacim(mL)).

Dilüsyon oranı 0,06 (1/h) alındığında;

$$0,06 (1/h) = F/1000 (mL), F= 60 mL/h$$

Besleme hızı 60 mL/h olarak belirlendikten sonra pompa hızının (rpm) belirlenmesi için 1 h içinde 60 mL hacmin bir mezürde doldurulması için pompanın hızı ayarlanmıştır. Böylece diğer tüm dilüsyon oranları için pompa hızı ayarlanabilir.

Çizelge 3.4. Sürekli sistemin koşulları

$\mu=D$ (1/h)	F (mL/h)	V (mL)	Pompa Hızı (rpm)
0,06	60	1440	1,6
0,08	80	1920	2,14
0,1	100	2400	2,67
0,12	120	2880	3,2
0,14	140	3360	3,73
0,16	160	3840	4,27

Hacim, besleme hızı*24 olarak hesaplanmıştır. Çünkü besiyeri her 24 saatte bir yenilenmiştir.



Şekil 3.11. Biyoreaktör cihazı

3.16. Kinetik Parametreler

Kinetik parametreler fermentasyonların kinetik metabolik doğası hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için hesaplanmıştır (Germec vd. 2017). Hesaplamalar substrat (S) ve ürün (P) kullanılarak aşağıda bulunan denklemlerle yapılmıştır:

$$\text{Şeker Tüketimi (g/L): } S = S_{\text{max}} - S_{\text{min}} \quad (3.4)$$

$$\text{Etanol Üretimi (g/L): } P = P_{\text{max}} - P_{\text{min}} \quad (3.5)$$

$$\text{Biyokütle Gelişimi (g/L): } X = X_{\text{max}} - X_{\text{min}} \quad (3.6)$$

$$\text{Etanol Verimi (\%): } YP/S = (P/S) * 100 \quad (3.7)$$

$$\text{Biyokütle Verimi (\%): } YX/S = (X/S) * 100 \quad (3.8)$$

$$\text{Şeker Kullanım Oranı (\%)} = (S/S_{\text{max}}) * 100 \quad (3.9)$$

$$\text{Teorik Etanol Verimi (\%)} = ((YP/S)/51,5) * 100 \quad (3.10)$$

$$\text{Maksimum Tüketim Oranı (g/L/saat): Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi} \quad (3.11)$$

$$\text{Maksimum Üretim Oranı (g/L/saat): Etanol kurvesinin en dik kısmının eğimi} \quad (3.12)$$

$$\text{Maksimum Gelişim Oranı (g/L/saat): Biyokütle kurvesinin en dik eğimi} \quad (3.13)$$

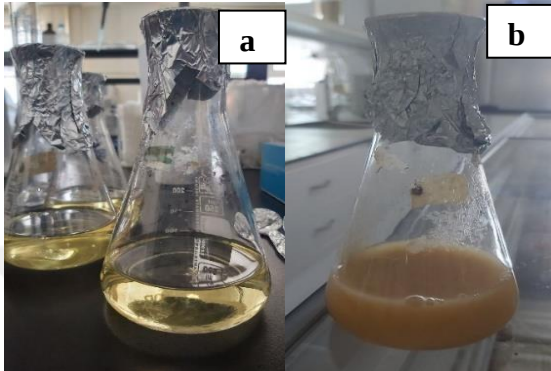
3.17. İstatistiksel Analiz

Besiyeri bileşim optimizasyonunun istatistiksel analizi için State College, PA, USA merkezli Minitab 17 istatistiksel yazılımı kullanılmıştır. Tüm parametre değerleri iki tekerrürün ortalaması olarak hesaplanmış ve tablolarda değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur.

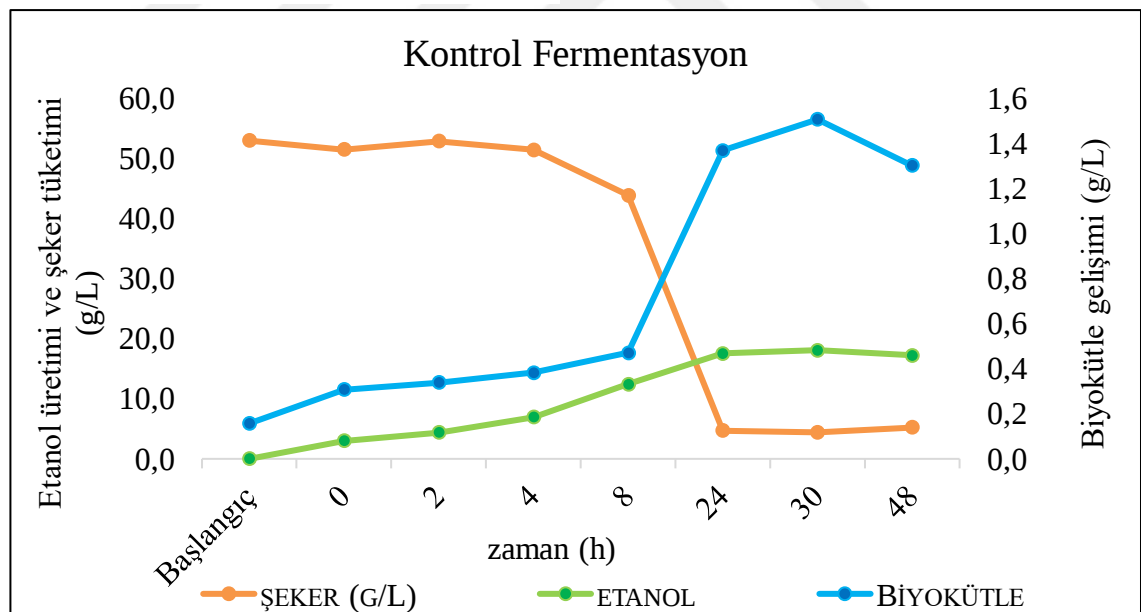
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Modifiye Ortamda Kontrol Fermentasyonun Yapılması

Kontrol fermentasyon 3 D veya PKD materyalleri eklenmeden modifiye ortamda (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz) yapılmıştır. Bu fermentasyonda herhangi bir immobilizasyon işlemi yapılmamıştır ve sadece 48 saat boyunca 2 erlenmayerde paralel bir şekilde fermentasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Etanol fermentasyonu; a) fermentasyon öncesi; b) fermentasyon sonrası



Şekil 4.2. Kontrol fermentasyonunun etanol üretimi, şeker tüketimi ve biyokütle gelişimi grafikleri

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, şeker miktarında 8 ila 24 saat arasında çok büyük bir düşüş gözlenmektedir. Biyokütle gelişimi ise 8 ila 24 saat arasında çok yüksek bir miktarda artmaktadır. Etanol üretimi eğrisine bakıldığında ise 30. saatte en yüksek değerine (18,097 g/L) ulaşmaktadır. Şeker tüketimi ise 30. saatte en düşük miktarına

(4,411 g/L) inmekte ve biyokütle gelişimi de 30. saatte en yüksek değerine (1,507 g/L) ulaştığı gözlenmektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol fermentasyonunun kinetik parametreleri

Kinetik parametreler	Kontrol fermentasyon
Şeker Tüketimi (g/L)	48,556
Etanol Üretimi (g/L)	15,112
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,350
Verim ($Y_{p/s}$)	31,123
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	2,367
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	0,472
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,049
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,056
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	12,422
Şeker Tüketim Oranı (%)	91,673
Etanol Verimliliği (%)	29,573

Çizelge 4.1'e bakıldığında kontrol fermentasyonunun etanol üretimi değeri 15,112 g/L, şeker tüketim oranı %91,673 ve biyokütle gelişimi 1,350 g/L olarak belirtilmiştir.

4.2. Biyofilm ve 3D Materyalinin Seçimi

Biyoreaktörde kullanılacak en iyi PKD ve en iyi 3D küre materyalini seçmek amacıyla 4 çeşit PKD diski (Çizelge 4.2) ve 4 çeşit 3D küre materyali (Çizelge 4.3) karşılaştırılmıştır. Bu amaçla *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası kullanılarak çalkalamalı inkübatörde 6 gün boyunca 5 transfer ile immobilizasyon gerçekleştirilmiş, ardından 2 gün boyunca fermentasyon yapılmıştır. Fermentasyonun farklı saatlerinde örnek alınarak şeker, biyokütle ve etanol analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.2 ve 4.3'te görüldüğü gibi 4 çeşit PKD materyalleri ve 4 çeşit 3D küre materyalleri etanol üretimi açısından karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2. PKD materyallerinin etanol üretimi açısından karşılaştırılması

PKD	PKD1	PKD2	PKD3	PKD4
Etanol üretimi (g/L)	27,068 ± 0,457	28,3375 ± 0,764	22,865 ± 0,52	26,429 ± 1,199

Çizelge 4.3. 3D materyallerinin etanol üretimi açısından karşılaştırılması

3D küre	Hex	Grid	X	W
Etanol üretimi (g/L)	33,076 ± 0,192	32,549 ± 1,014	31,7225 ± 0,524	31,1295 ± 0,937

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi PKD 2 materyali 28,3375± 0,764 g/L etanol üretimi ile en iyi materyal olarak seçilerek fermentasyon onunla devam edilmektedir.

Çizelge 4.3’te görüldüğü gibi Hex materyali 33,076 ± 0,192 g/L etanol üretimi ile en iyi materyal olarak seçilerek fermentasyon onunla devam edilmektedir. Ayrıca maksimum üretim oranı (g/L/saat) Hex, grid, X, W materyalleri için sırasıyla 1,4214, 0,9946, 1,0115, 1,1248 olarak belirlenmiştir. Hex materyalleri en yüksek maksimum üretim oranı değerine (1,4214 g/L/saat) sahiptir.

4.3. Modifiye Ortam Bileşiminin Optimizasyonu

Fermentasyonlarda kullanılacak olan beyaz dut kurusu ekstraksiyonunun modifiye ortam (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz) içeriği, PBD metodu kullanılarak optimize edilmiştir. PBD metoduyla belirtilen 2×10 = 20 (paralelli) fermentasyon; besiyeri optimizasyonu literatürdeki değerler ve bulgulara göre belirlenmiştir. Sonuçlar PBD metoduna göre belirlenen her bir fermentasyon için ayrı ayrı Çizelge 4.24’te verilmiştir.

7 gün boyunca çalkalamalı inkübatörlerde izlenen iki paralel fermentasyonda, PBD yöntemiyle optimize edilmiş her bir besiyeri formülasyonu kullanılmıştır. Fermentasyon süresince mikroorganizmanın şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafikleri aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

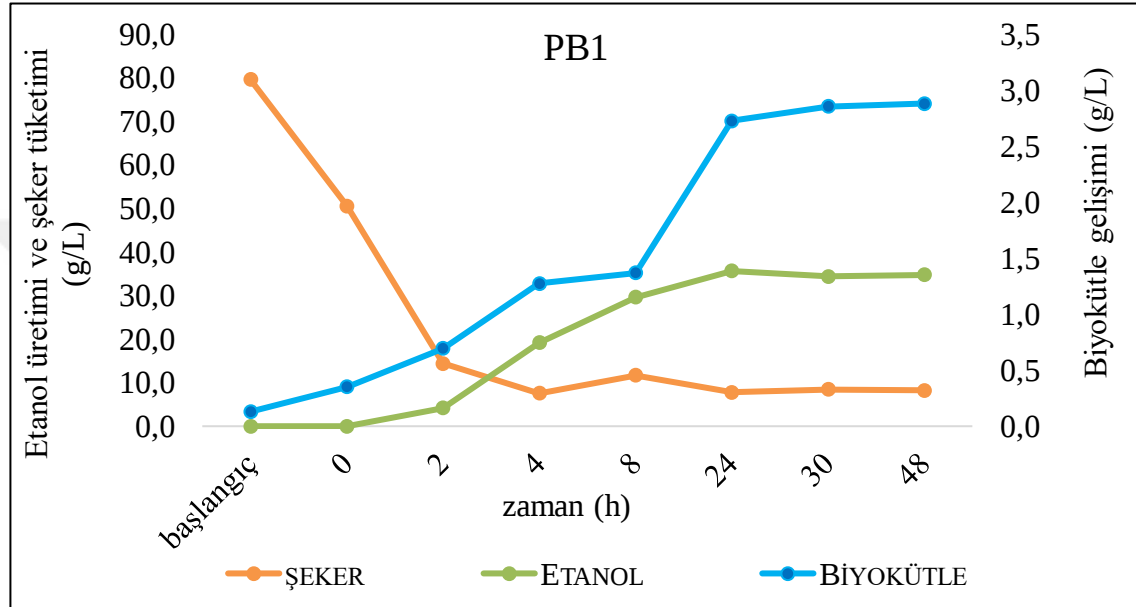
4.4. PBD ile Hex Materyalli Besiyeri Bileşiminin Optimizasyonu

Daha önce belirtildiği gibi PBD yöntemi ile toplam 10 deneme belirlenmiştir. Bunun için öncelikle modifiye ortam hazırlanmıştır. Sonrasında her denem için gerekli olan parametreler tartılıp modifiye besiyerine ilave edilmiştir. Ardından her erlenmayere dörder adet Hex materyalleri konulup üzerine 100 mL saf su ilave edilmiştir. Hex materyalleri ile birlikte hazırlanan modifiye besiyeri 121°C’de 15 dk boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına kadar soğutulan 100 mL modifiye besiyerine steril koşullarda dörder Hex materyalleri eklenmiştir. Steril bir şekilde de %1 *S. cerevisiae* mayası inokülasyonu yapılmıştır. Ertesi gün yani immobilizasyonun 1. Gününde besiyerinin %90’ı boşaltılmıştır. Diğer 5 günde ise besiyerinin hepsi boşaltılıp yeni besiyeri eklenmiştir. Böylece toplam 6 gün immobilizasyon yapılmıştır. Immobilizasyondan sonra 48 saat boyunca fermentasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4. PB 1 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (g/L)
1	0,50	20	2	2,0	3,00	0,100	0,30

Karbon kaynağı olarak 45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz ve 1 g/L sakkaroz kullanılmıştır.

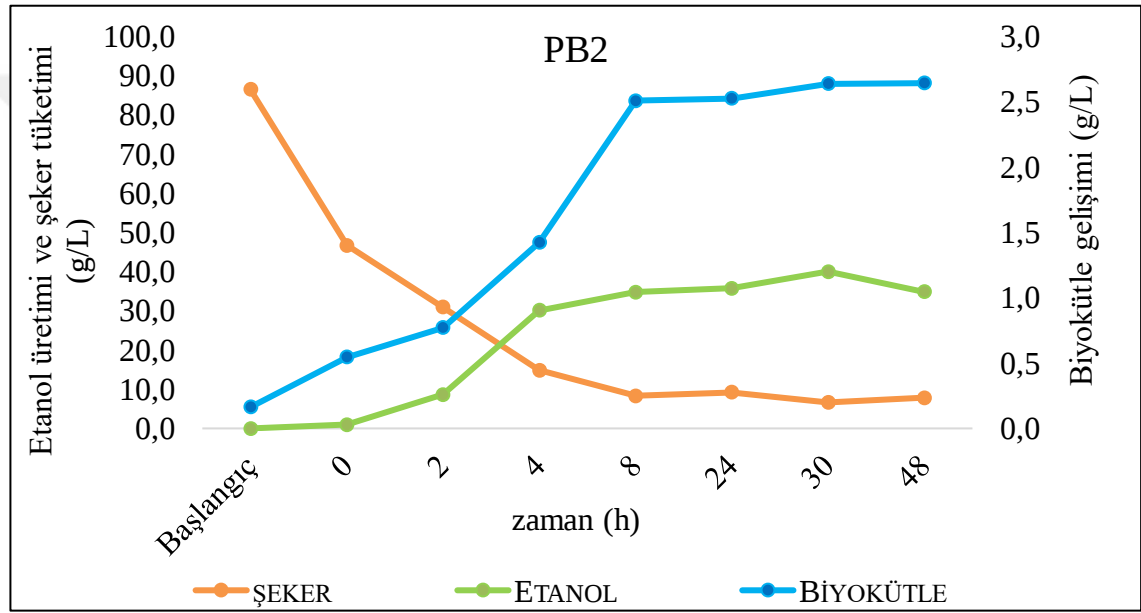
**Şekil 4.3.** PB 1 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)**Çizelge 4.5.** PB 1 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB1
Şeker Tüketimi (g/L)	72,071
Etanol Üretimi (g/L)	35,630
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,752
Verim (Y _{p/s} , %)	49,437
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max}	18,100
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max}	4,018
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max}	0,085
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,052
İkiye Katlanma Süresi (t _d , saat)	13,384
Şeker Tüketim Oranı (%)	90,541
Etanol Verimliliği (%)	69,726

1 numaralı besiyerinde etanol üretimi 35,630 g/L, şeker tüketimi 72,071 g/L, biyokütle gelişimi 2,752 g/L ve verim %49,437 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Şekil 4.3'te görüldüğü gibi etanol üretimi 24. saatte 35,630 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.6. PB 2 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
2	5,00	20	2	0,2	3,00	0,010	3,00



Şekil 4.4. PB 2 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)

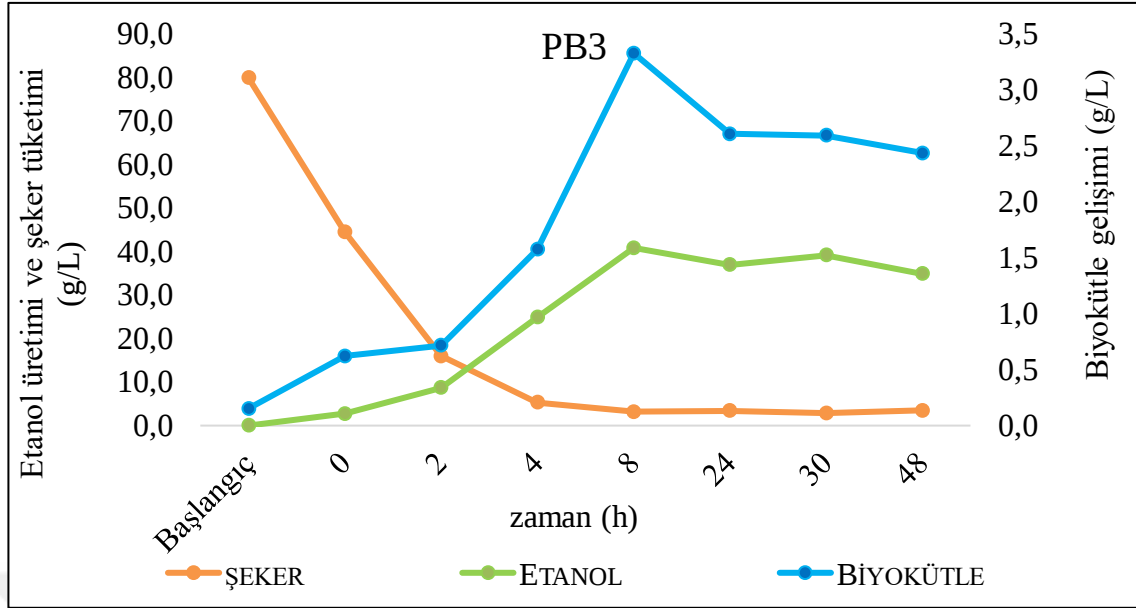
Çizelge 4.7. PB 2 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB2
Şeker Tüketimi (g/L)	79,809
Etanol Üretimi (g/L)	39,063
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,480
Verim ($Y_{p/s}$, %)	48,946
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	7,959
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	7,287
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,287
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,189
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	3,674
Şeker Tüketim Oranı (%)	92,330
Etanol Verimliliği (%)	76,444

2 numaralı besiyerinde etanol üretimi 39,063 g/L, şeker tüketimi 79,809 g/L, biyokütle gelişimi 2,480 g/L ve verim %48,946 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%92,330) sonucunda etanol üretimi 30. saatte 40,0325 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.8. PB 3 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)
3	2,75	11	4	1,1	1,75	0,055	1,65



Şekil 4.5. PB 3 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)

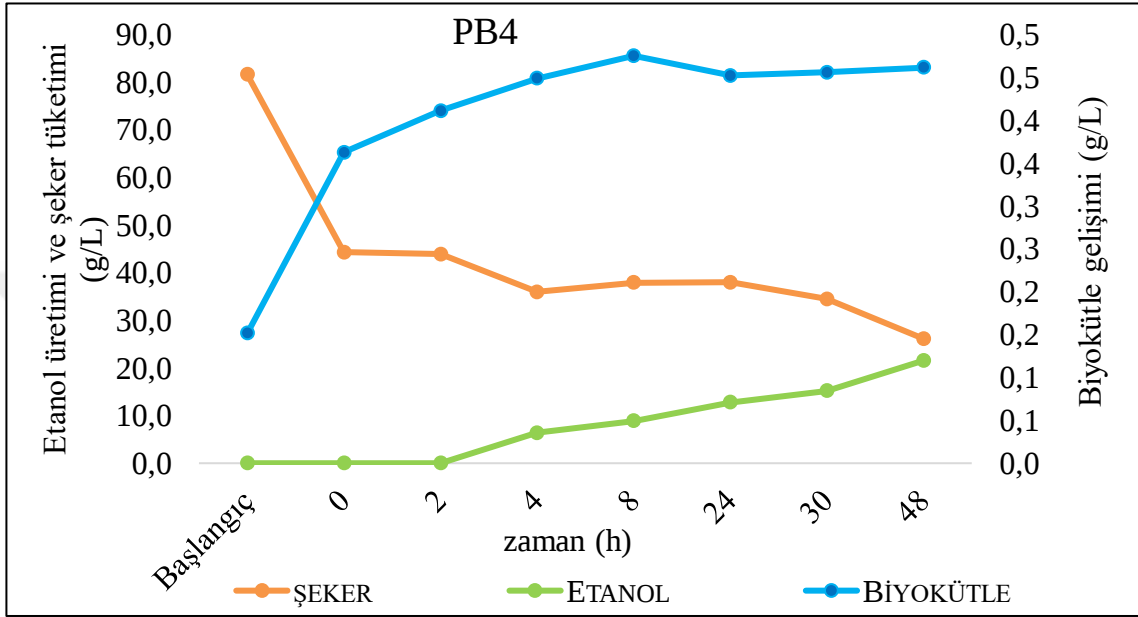
Çizelge 4.9. PB 3 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB3
Şeker Tüketimi (g/L)	76,975
Etanol Üretimi (g/L)	38,070
Biyokütle Gelişimi (g/L)	3,173
Verim ($Y_{p/s}$, %)	49,457
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	9,782
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	4,955
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,435
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,246
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	2,818
Şeker Tüketim Oranı (%)	96,410
Etanol Verimliliği (%)	74,500

3 numaralı besiyerinde etanol üretimi 38,070 g/L, şeker tüketimi 76,975 g/L, biyokütle gelişimi 3,173 g/L ve verim %49,457 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%96,410) sonucunda etanol üretimi 8. saatte 40,8075 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.10. PB 4 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (g/L)
4	5,00	2	2	2,0	0,50	0,100	3,00

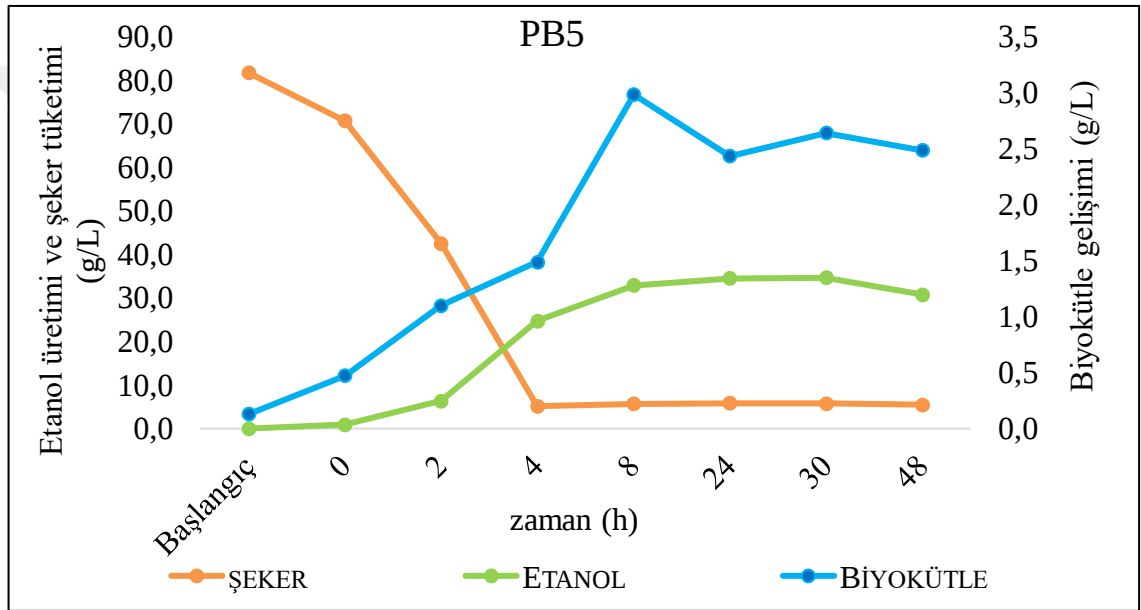
**Şekil 4.6.** PB 4 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)**Çizelge 4.11.** PB 4 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB4
Şeker Tüketimi (g/L)	55,456
Etanol Üretimi (g/L)	21,554
Biyokütle Gelişimi (g/L)	0,324
Verim (Y _{p/s} , %)	38,866
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max}	2,092
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max}	0,319
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max}	0,024
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,062
İkiye Katlanma Süresi (t _d , saat)	11,093
Şeker Tüketim Oranı (%)	67,952
Etanol Verimliliği (%)	42,179

4 numaralı besiyerinde etanol üretimi 21,554 g/L, şeker tüketimi 55,456 g/L, biyokütle gelişimi 0,324 g/L ve verim %38,866 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Şekil 4.6'da görüldüğü gibi şekerin %67,952 tüketimi sonucunda etanol üretimi 48. saatte 21,554 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.12. PB 5 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
5	0,50	20	6	2,0	0,50	0,010	3,00



Şekil 4.7. PB 5 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)

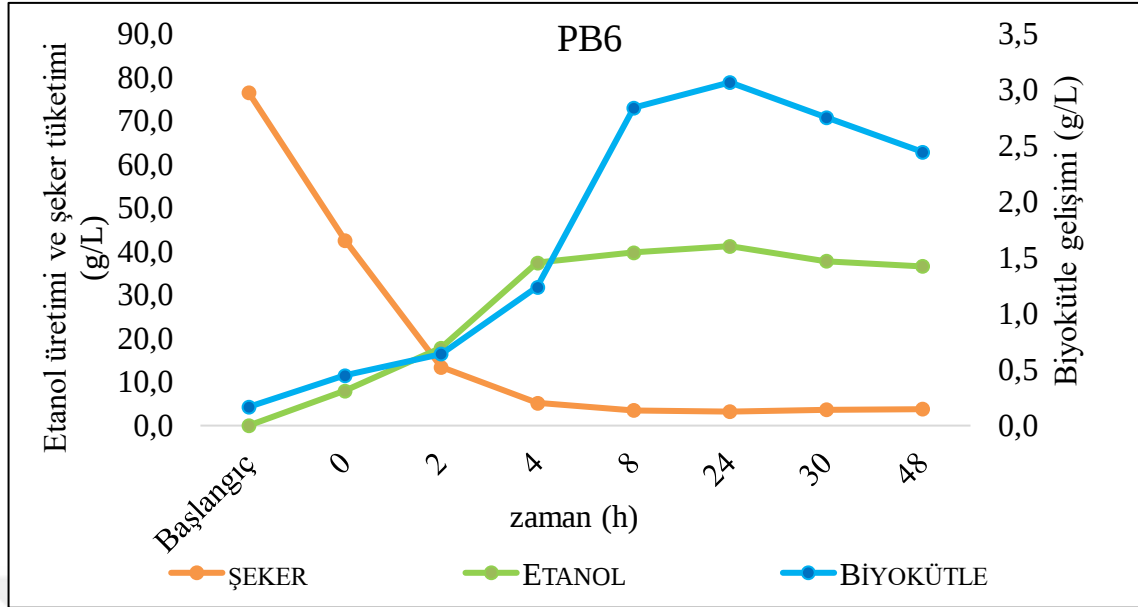
Çizelge 4.13. PB 5 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB5
Şeker Tüketimi (g/L)	76,542
Etanol Üretimi (g/L)	33,695
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,853
Verim ($Y_{p/s}$, %)	44,021
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	16,380
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	5,942
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,310
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,217
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	3,194
Şeker Tüketim Oranı (%)	93,684
Etanol Verimliliği (%)	65,938

5 numaralı besiyerinde etanol üretimi 33,695 g/L, şeker tüketimi 76,542 g/L, biyokütle gelişimi 2,853 g/L ve verim %44,021 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Şekil 4.7’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%93,684) sonucunda etanol üretimi 30. saatte 34,621 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.14. PB 6 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)
6	2,75	11	4	1,1	1,75	0,055	1,65



Şekil 4.8. PB 6 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)

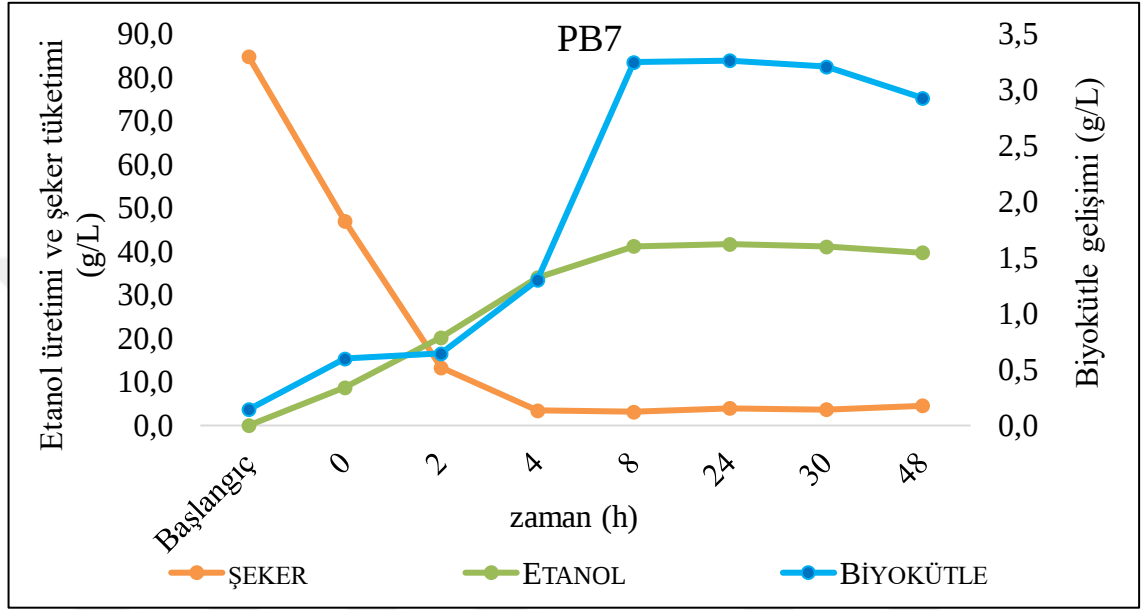
Çizelge 4.15. PB 6 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB6
Şeker Tüketimi (g/L)	73,301
Etanol Üretimi (g/L)	33,255
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,899
Verim ($Y_{p/s}$, %)	45,367
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	9,327
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	7,360
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,069
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,034
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	20,492
Şeker Tüketim Oranı (%)	95,803
Etanol Verimliliği (%)	65,077

6 numaralı besiyerinde etanol üretimi 33,255 g/L, şeker tüketimi 73,301 g/L, biyokütle gelişimi 2,899 g/L ve verim %45,367 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.15'te görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%95,803) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 41,210 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.16. PB 7 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
7	5,00	20	6	0,2	0,50	0,100	0,30

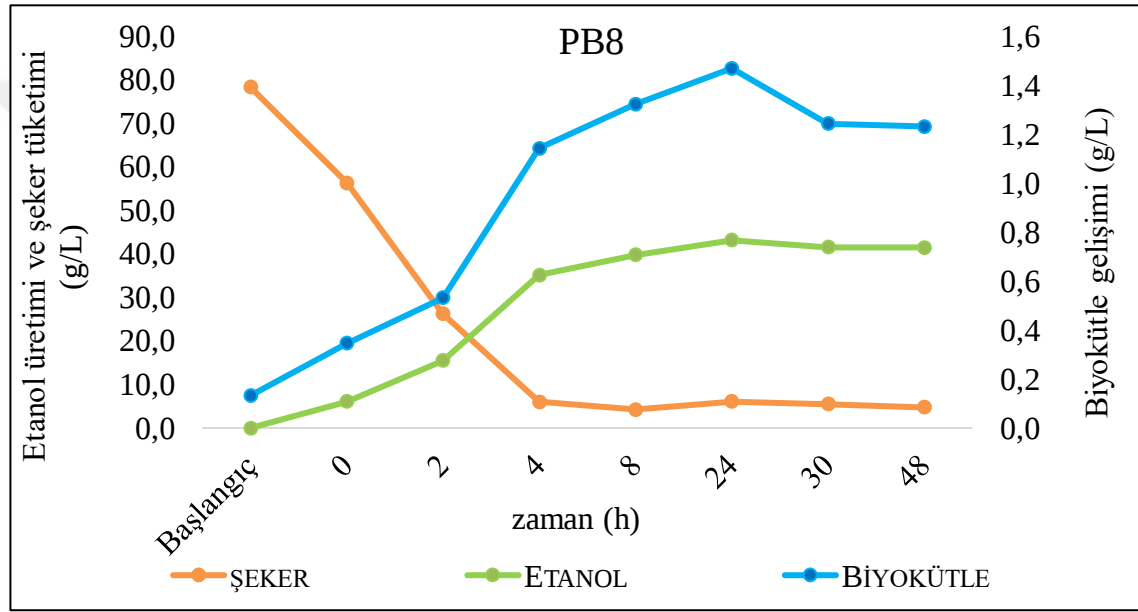
**Şekil 4.9.** PB 7 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)**Çizelge 4.17.** PB 7 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB7
Şeker Tüketimi (g/L)	81,563
Etanol Üretimi (g/L)	32,888
Biyokütle Gelişimi (g/L)	3,116
Verim ($Y_{p/s}$, %)	40,321
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	10,853
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	4,035
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,441
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,264
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	2,622
Şeker Tüketim Oranı (%)	96,263
Etanol Verimliliği (%)	64,359

7 numaralı besiyerinde etanol üretimi 32,888 g/L, şeker tüketimi 81,563 g/L, biyokütle gelişimi 3,116 g/L ve verim %40,321 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.17’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%96,263) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 41,656 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.18. PB 8 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
8	5,00	2	6	2,0	3,00	0,010	0,30



Şekil 4.10. PB 8 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)

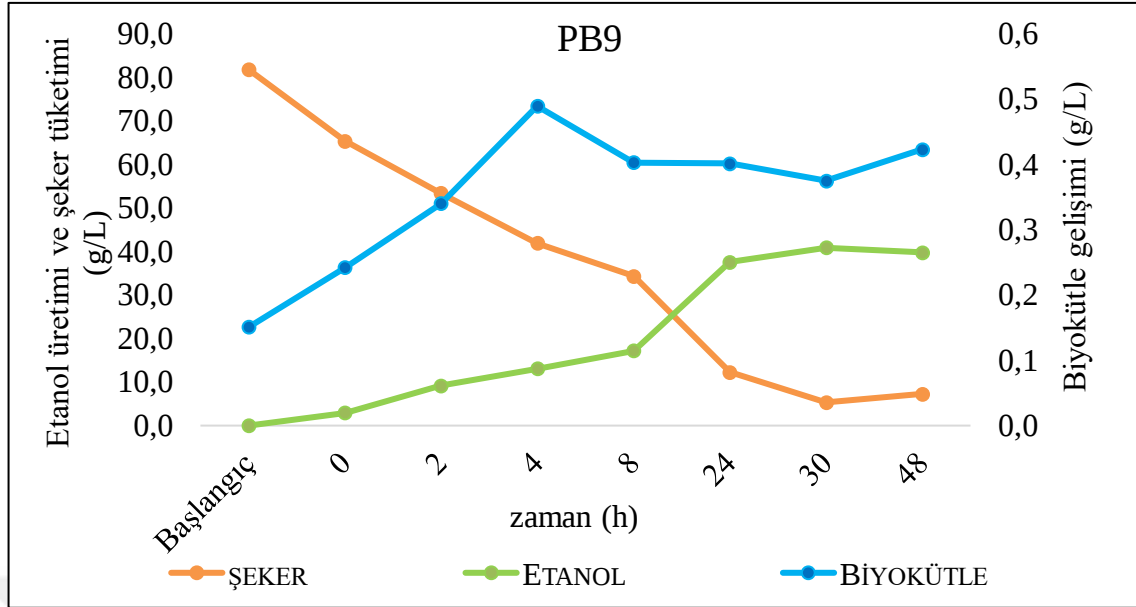
Çizelge 4.19. PB 8 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB8
Şeker Tüketimi (g/L)	76,240
Etanol Üretimi (g/L)	37,051
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,336
Verim ($Y_{p/s}$, %)	48,597
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	12,585
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	7,261
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,119
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,135
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	5,123
Şeker Tüketim Oranı (%)	94,555
Etanol Verimliliği (%)	72,506

8 numaralı besiyerinde etanol üretimi 37,051 g/L, şeker tüketimi 76,240 g/L, biyokütle gelişimi 1,336 g/L ve verim %48,597 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.19’da görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%94,555) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 43,1025 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.20. PB 9 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)
9	0,50	2	6	0,2	3,00	0,100	3,00



Şekil 4.11. PB 9 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)

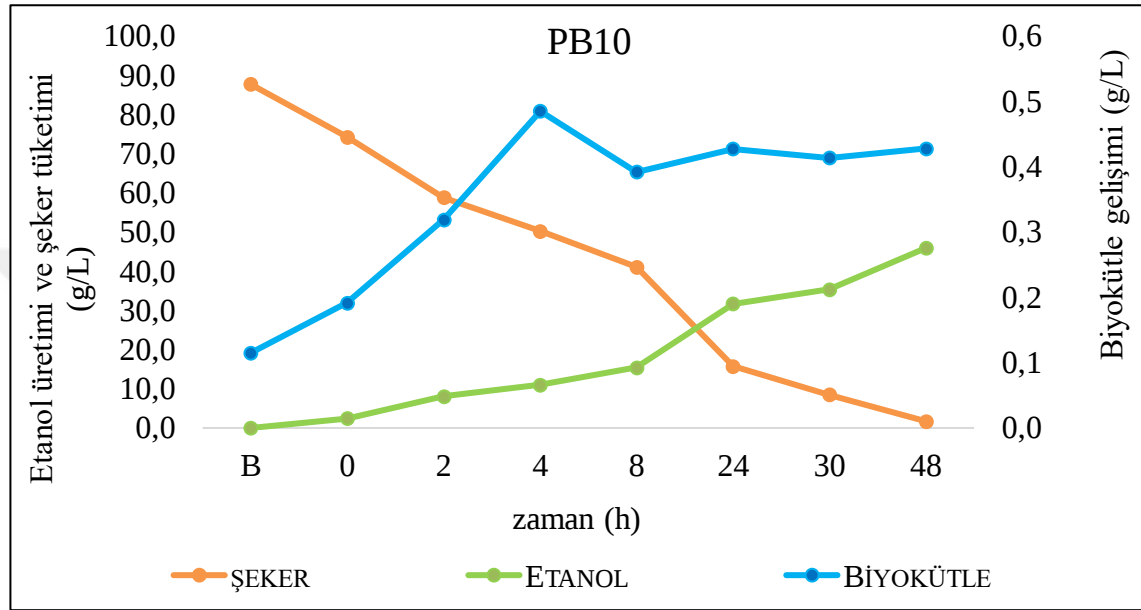
Çizelge 4.21. PB 9 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB9
Şeker Tüketimi (g/L)	76,435
Etanol Üretimi (g/L)	37,875
Biyokütle Gelişimi (g/L)	0,339
Verim ($Y_{p/s}$, %)	49,551
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	5,875
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	1,238
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,062
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,176
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	3,937
Şeker Tüketim Oranı (%)	93,487
Etanol Verimliliği (%)	74,118

9 numaralı besiyerinde etanol üretimi 37,875 g/L, şeker tüketimi 76,435 g/L, biyokütle gelişimi 0,339 g/L ve verim %49,551 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.21’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%93,487) sonucunda etanol üretimi 30. saatte 40,8235 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.22. PB 10 numaralı besiyeri bileşimi (3D materyalleri için)

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
10	0,50	2	2	0,2	0,50	0,010	0,30

**Şekil 4.12.** PB 10 numaralı besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği (3D materyalleri için)**Çizelge 4.23.** PB 10 numaralı besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB10
Şeker Tüketimi (g/L)	88,146
Etanol Üretimi (g/L)	43,505
Biyokütle Gelişimi (g/L)	0,370
Verim (Y _{p/s} , %)	49,355
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max}	7,709
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max}	1,031
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max}	0,073
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,232
İkiye Katlanma Süresi (t _d , saat)	2,985
Şeker Tüketim Oranı (%)	98,048
Etanol Verimliliği (%)	85,136

10 numaralı besiyerinde etanol üretimi 43,505 g/L, şeker tüketimi 88,146 g/L, biyokütle gelişimi 0,370 g/L ve verim %49,355 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.23'te görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (% 98,048) sonucunda etanol üretimi 48. saatte 45,912 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.



Çizelge 4.24. PBD fermentasyon denemeleri kinetik parametreleri (3D materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7	PB8	PB9	PB10
Şeker Tüketimi (g/L)	72,071	79,809	76,975	55,456	76,542	76,542	81,563	76,240	76,435	88,146
Etanol Üretimi (g/L)	35,630	39,063	38,070	21,554	33,695	33,695	32,888	37,051	37,875	43,505
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,752	2,480	3,173	0,324	2,853	2,853	3,116	1,336	0,339	0,370
Verim (Yp/s, %)	49,437	48,946	49,457	38,866	44,021	44,021	40,321	48,597	49,551	49,355
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{\max}$	18,100	7,959	9,782	2,092	16,380	16,380	10,853	12,585	5,875	7,709
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{\max}$	4,018	7,287	4,955	0,319	5,942	5,942	4,035	7,261	1,238	1,031
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{\max}$	0,085	0,287	0,435	0,024	0,310	0,310	0,441	0,119	0,062	0,073
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,052	0,189	0,246	0,062	0,217	0,217	0,264	0,135	0,176	0,232
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	13,384	3,674	2,818	11,093	3,194	3,194	2,622	5,123	3,937	2,985
Şeker Tüketim Oranı (%)	90,541	92,330	96,410	67,952	93,684	93,684	96,263	94,555	93,487	98,048
Etanol Verimliliği (%)	69,726	76,444	74,500	42,179	65,938	65,938	64,359	72,506	74,118	85,136

Çizelge 4.24 veriler ışığında; maksimum etanol üretimi (43,505 g/L) 10 numaralı fermentasyonda görülürken minimum etanol üretimi (21,554 g/L) ve minimum verim (%38,866) 4 numaralı fermentasyonda gözlenmiştir. Ayrıca 10 numaralı fermentasyonda şeker tüketim oranı %98,048 değeri ile en yüksekken, şeker tüketim oranı %67,952 değeri ile 4 numaralı fermentasyonda en düşük olmaktadır.

4.5. PBD ile Etkili Parametrelerin Belirlenmesi (3D materyalleri için)

Analiz sonuçları, Minitab İstatistiksel Yazılımı kullanılarak değerlendirilmiş olup ve "Full Quadratic" Plackett-Burman yöntemi uygulanmıştır. Modelde 7 değişken kullanılmıştır. Bunlar: Maya ekstraktı, Pepton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ değişkenler olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.25'te etanol üretimi için kullanılan besiyeri bileşiminin istatistiksel etkileri ve katsayıları yer almaktadır.

Çizelge 4.25. Etanol üretimi için tahmini etkiler ve katsayılar

Terim	Etki	Katsayı	SH kat.	T	P
Sabit		37,916	0,1005	377,28	0,002
Maya ekstraktı	-2,661	-1,330	0,1005	-13,24	0,048
Pepton	0,137	0,068	0,1005	0,68	0,619
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,269	2,134	0,1005	21,24	0,030
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-8,379	-4,190	0,1005	-41,69	0,015
KH_2PO_4	3,961	1,981	0,1005	19,71	0,032
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-6,001	-3,001	0,1005	-29,86	0,021
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-7,318	-3,659	0,1005	-36,41	0,017
Ct Pt		3,092	0,2247	13,76	0,046

SH kat.: Standart hata katsayıları; Ct: Kontrol toplamı; Pt: Proses toplamı; R^2 : 0,99734, P: Olasılık; * $P < 0,05$

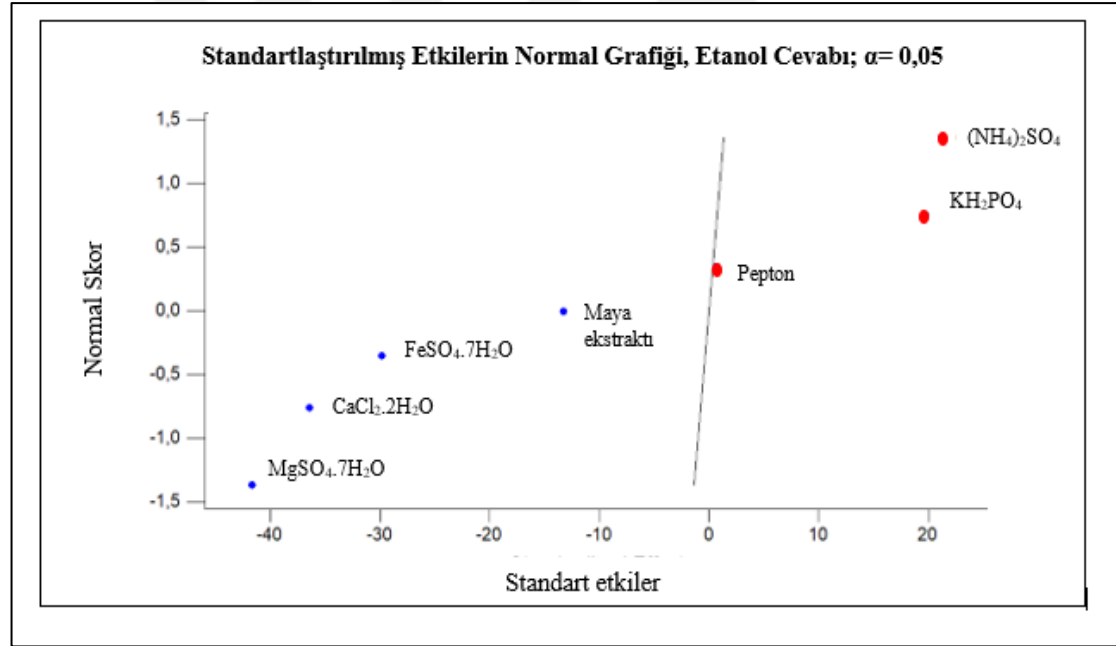
S. cerevisiae (ATCC 36858) mayası ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda etanol üretimine ait modelin R^2 değeri 0,99734 olarak belirlenmiştir. Buna göre etanol üretimi için elde edilen model, fermentasyon sonuçlarının %99,734'sünü başarıyla açıklamaktadır (Çizelge 4.25). P (Probability; Olasılık) değeri istatistiksel analizlerde hipotez testlerinin sonuçlarını yorumlamak için kullanılmaktadır. P değeri istatistiksel anlamlılığın varlığı hakkında bilgi verir (Kul 2014; Ilgın 2017). Bununla birlikte PB tasarımı ve her bir terimin varyans analizi incelenmiş, *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası ile yapılan fermentasyonların etanol üretim oranları (g/L) için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.26'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.26. Etanol üretiminin varyans analizi

Kaynak	SD	Sıralı kareler toplamı	Düzeltilmiş kareler toplamı	Düzeltilmiş kareler ortalaması	F	P
Ana etkiler	7	401,571	401,571	57,3673	709,97	0,029
Eğrilik	1	15,298	15,298	15,2980	189,33	0,046
Kalıntı hata	1	0,081	0,081	0,0808		
Saf hata	1	0,081	0,081	0,0808		
Toplam hata	9	416,950				

SD: Serbestlik derecesi

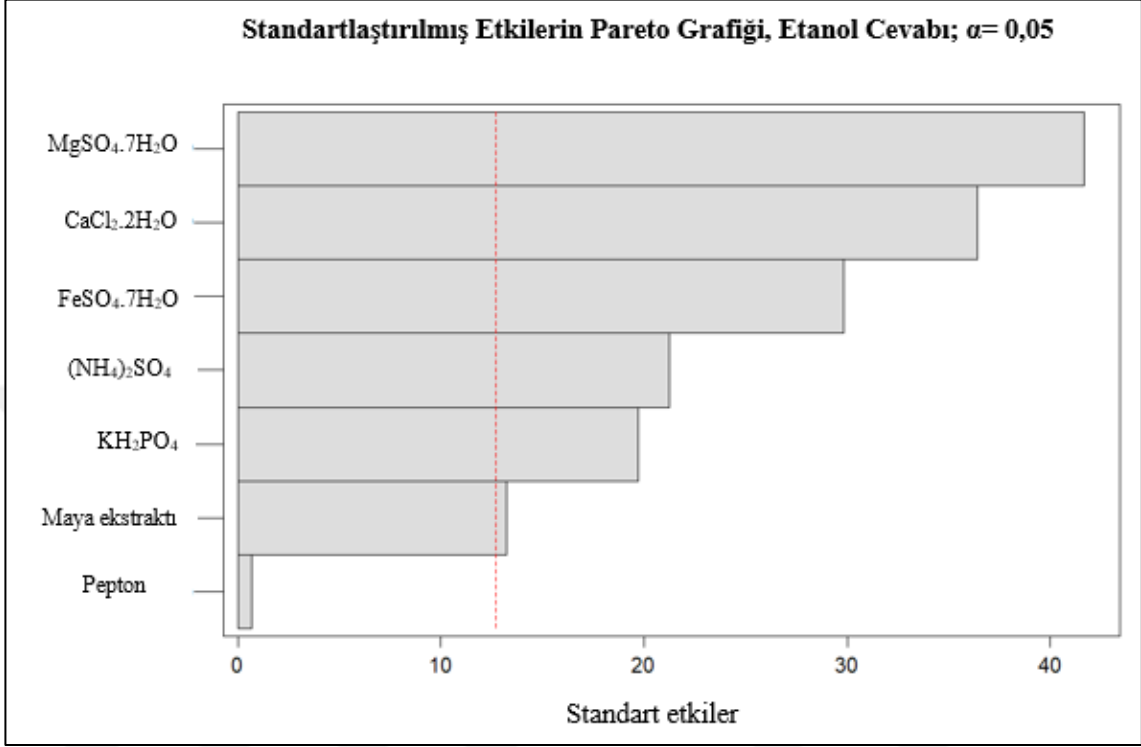
Çizelge 4.26'ya göre; etanol üretimi için PB tasarım metoduna göre modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P < 0,05$) ve varyans analizi sonuçlarına göre modelin önemli ve uyumlu olduğu görülmektedir. Tarama tasarımlarının ana amacı, cevabı etkileyen kilit faktörleri belirtmektir. Bu faktörlerin belirlenmesin için yardımcı olan etkilerin normal grafiği Şekil 4.13'te verilmiştir.

**Şekil 4.13.** Etkilerin normal grafiği (PBD)

Etkilerin normal grafiğine bakıldığında, çizgiden uzak noktalar, genellikle önemli olan etkileri işaret eder.

Şekil 4.13'te $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($p=0,030 < 0,05$; katsayısı: 2,134 (+)) ve KH_2PO_4 ($p=0,032 < 0,05$; katsayısı: 1,981 (+)) değişkenlerinin standart etkisi sıfırdan büyüktür ve etanol üretimini olumlu yönde etkiler ve pozitif etkisi vardır. Peptonun da etanol üretim üzerine pozitif etkisi vardır. Diğer değişkenlerin etanol üretimi üzerine etkisi ise negatif olduğu gözlenmiştir.

Pareto grafiği (Şekil 4.14), standart etkilerin mutlak değerlerini en büyükten en küçüğe doğru gösterir. Ayrıca bu grafik, etkilerin büyüklüğünü ve önemini belirlemek için de kullanılır ve etanol üretimi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olan etkileri belirleyen bir referans çizgisini de içerir.



Şekil 4.14. Pareto grafiği

Pareto grafiğinde, referans çizgisini geçen çubuklar istatistiksel olarak önemli olan faktörleri işaret eder. Şekil 4.14'teki grafikte, referans çizgisini geçmeyen pepton hariç diğer değişkenler istatistiksel olarak önemlidir. Bu değişkenler, $p=0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ve önemlidir. Bu önemli değişkenler arasında sadece (NH₄)₂SO₄ (katsayısı: 2,134 (+)) ve KH₂PO₄ (katsayısı: 1,981 (+)) değişkenlerinin katsayıları pozitif olmaktadır. MgSO₄.7H₂O (p : 0,015<0,05; katsayısı: (-4,190)) değişkeni şekilde de görüldüğü gibi istatistiksel olarak en büyük öneme sahiptir ancak katsayısı negatif olduğu için etanol üretimini negatif yönde etkilemektedir.

Sonuç olarak; Çizelge 4.24 veriler ışığında 10 numaralı besiyeri bileşimi en yüksek etanol üretimi değerine (43,505 g/L) sahiptir. 2. ve 3. denemelerdeki fermentasyonlar 39,063 g/L ve 38,070 g/L etanol üretimi sonuçlarıyla 10 numaralı denemeyi izlemiştir. PBD metoduna göre 7 değişkenin (Maya ekstraktı, Pepton, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, FeSO₄.7H₂O ve CaCl₂.2H₂O değişkenler) maksimum etanol üretimi etkisi araştırılmıştır. PBD sonuçlarına göre; *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası kullanılarak etanol üretimi için önemli ve pozitif etkenlerin KH₂PO₄ ve (NH₄)₂SO₄ olduğunu ayrıca peptonun katsayısı pozitif olduğu için etanol üretimi üzerine pozitif etkisinin var olduğunu göstermiştir. Diğer değişkenlerin ise etanol üretimi üzerine negatif etki gösterildiği belirtilmektedir. Bu bilgiler ışığında bu aşamadan sonraki gerçekleştirilen tüm fermentasyon denemelerinde; besiyeri bileşiminde 7

değişken arasında yalnızca KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve pepton kullanılmıştır. Bir sonraki adımda bu 3 değişken kullanılarak doğrulama denemesi gerçekleştirilmiştir.

4.6. PBD Besiyeri Optimizasyonunun Validasyonu (Hex materyalleri için)

PBD besiyeri optimizasyonunun validasyonu için, Minitab 17 istatistiksel yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak Hex materyalleri kullanılarak optimum etanol üretimi için optimum doğrulama fermentasyon koşulları; 20 g/L pepton, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 3 g/L KH_2PO_4 belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27. PBD yöntemi ile optimum etanol üretimi koşulları

Parametre	Optimum (g/L)
Pepton (g/L)	20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	2
KH_2PO_4 (g/L)	3
Etanol Üretimi (g/L)	32,9695

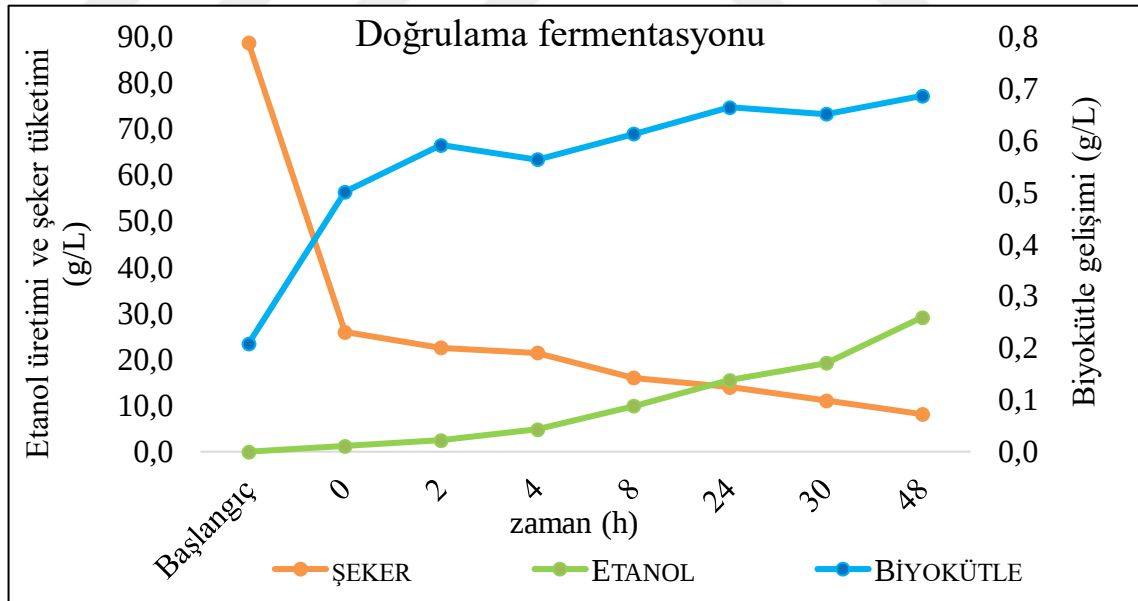
4.7. Doğrulama Fermentasyonu (Hex materyalleri için)

Modifiye ortamda optimum koşullarda (20 g/L pepton, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 3 g/L KH_2PO_4) Doğrulama fermentasyonu çalkalamalı inkübatörde 2 erlenmayerde paralel bir şekilde yapılmıştır. Her erlenmayerde (100 mL çalışma hacmi) 4 adet Hex materyali immobilizasyon için bulunmaktadır. Daha önce anlatıldığı gibi 6 gün boyunca 5 transfer ile immobilizasyon ardından 2 gün doğrulama fermentasyonu gerçekleştirmiştir. Hex materyalleri kullanılarak modifiye ortamda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler belirtilmiştir (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. Modifiye ortamda Hex materyalleri kullanılması ile doğrulama fermentasyonu

Kinetik parametreler	Modifiye ortamda Hex materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu
Şeker Tüketimi (g/L)	80,389
Etanol Üretimi (g/L)	27,882
Biyokütle Gelişimi (g/L)	0,477
Verim ($Y_{p/s}$, %)	34,683
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	1,702
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	0,486
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,045
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,083
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	8,354
Şeker Tüketim Oranı (%)	90,826
Etanol Verimliliği (%)	54,563

Çizelge 4.28'e göre, şekerin %90,826'sının tüketildiği fermentasyon denemelerinde etanol üretimi 27,882 g/L bulunmuş, verim ise %34,683 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Modifiye ortamda Hex materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu

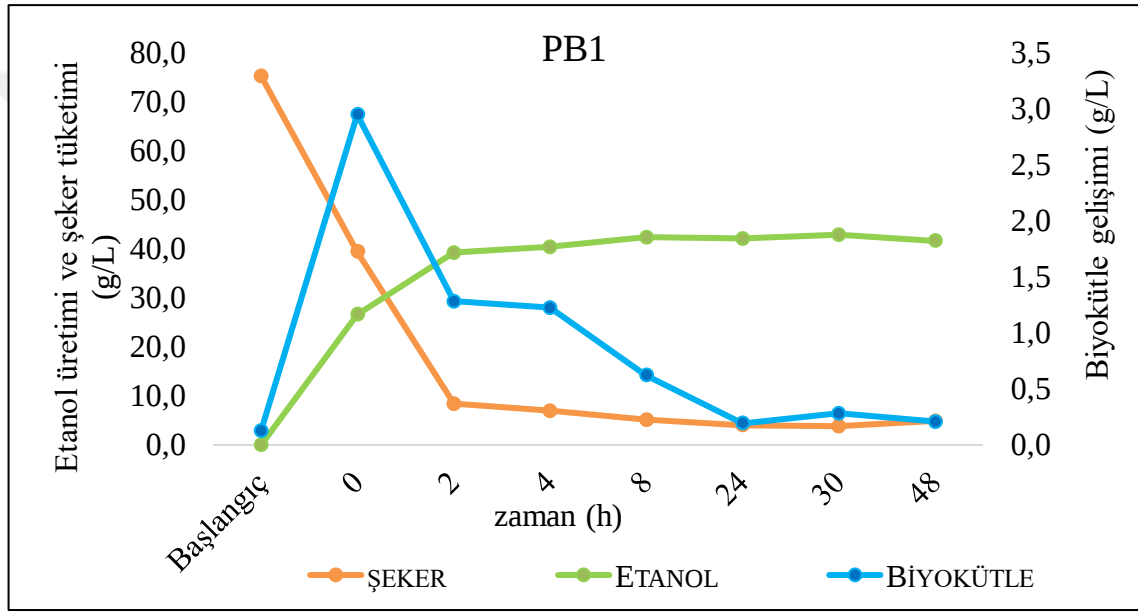
Şekil 4.15'te görüldüğü gibi maksimum etanol üretimi 29,121 g/L değeri ile 48. saatte olurken, şekerin en düşük miktarı (8,120 g/L) da 48. saatte olmaktadır. Biyokütle gelişimi de 48. saatte maksimum seviyesine ulaşmaktadır.

4.8. PBD ile PKD2 Materyalli Besiyeri Bileşiminin Optimizasyonu

Hex materyalleri ile uygulanan besiyeri bileşimi optimizasyonu aynı şekilde PKD 2 materyalleri ile de yapılmıştır. Sonuçlar aşağıda yazılmıştır.

Çizelge 4.29. PB 1 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
1	0,50	20	2	2,0	3,00	0,100	0,30



Şekil 4.16. PB 1 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

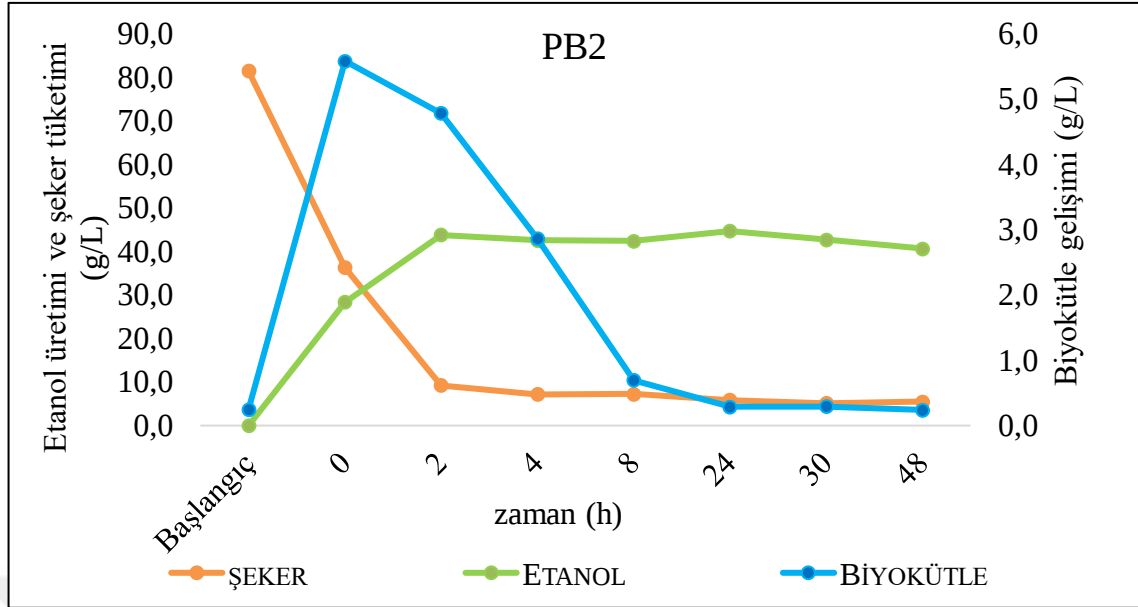
Çizelge 4.30. PB 1 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB1
Şeker Tüketimi (g/L)	71,456
Etanol Üretimi (g/L)	16,266
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,822
Verim ($Y_{p/s}$, %)	22,763
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	15,520
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	6,295
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,252
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,177
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	3,917
Şeker Tüketim Oranı (%)	94,918
Etanol Verimliliği (%)	31,831

1 numaralı besiyerinde etanol üretimi 16,266 g/L, şeker tüketimi 71,456 g/L, biyokütle gelişimi 2,822 g/L ve verim %22,763 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.31. PB 2 numaralı PKD2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)
2	5,00	20	2	0,2	3,00	0,010	3,00



Şekil 4.17. PB 2 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

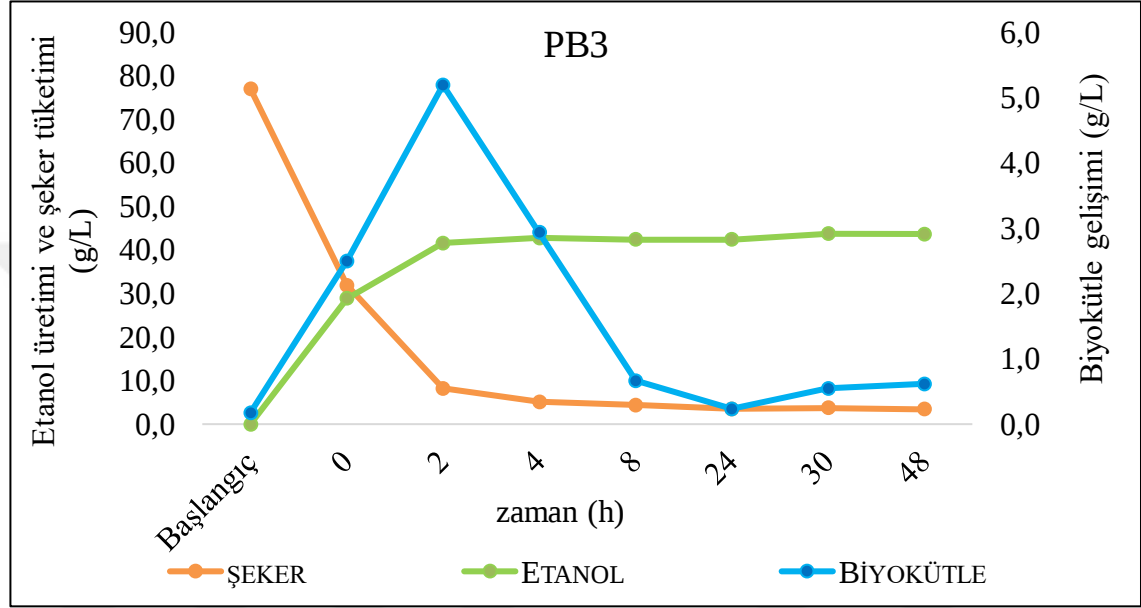
Çizelge 4.32. PB 2 numaralı PKD2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB2
Şeker Tüketimi (g/L)	76,285
Etanol Üretimi (g/L)	16,286
Biyokütle Gelişimi (g/L)	5,335
Verim ($Y_{p/s}$, %)	21,349
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	13,526
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	7,691
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,633
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,271
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	2,559
Şeker Tüketim Oranı (%)	93,716
Etanol Verimliliği (%)	31,871

2 numaralı besiyerinde etanol üretimi 16,286 g/L, şeker tüketimi 76,285 g/L, biyokütle gelişimi 5,335 g/L ve verim %21,349 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.32’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%93,716) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 44,669 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmıştır.

Çizelge 4.33. PB 3 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
3	2,75	11	4	1,1	1,75	0,055	1,65

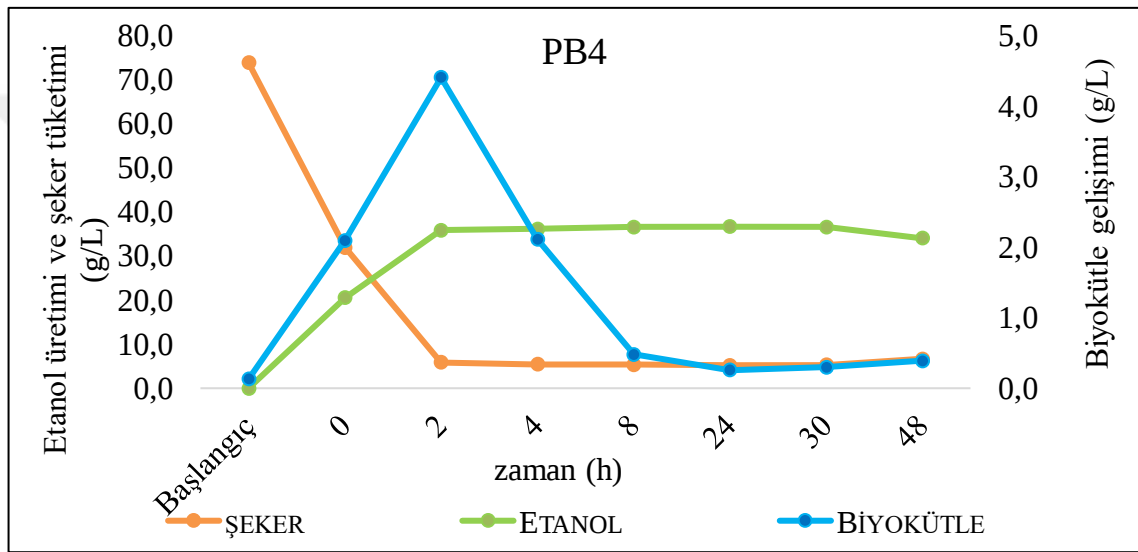
**Şekil 4.18.** PB 3 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği**Çizelge 4.34.** PB 3 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB3
Şeker Tüketimi (g/L)	73,632
Etanol Üretimi (g/L)	14,823
Biyokütle Gelişimi (g/L)	5,017
Verim ($Y_{p/s}$, %)	20,131
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	11,847
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	6,356
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,728
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,347
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	1,998
Şeker Tüketim Oranı (%)	95,598
Etanol Verimliliği (%)	29,008

3 numaralı besiyerinde etanol üretimi 14,823 g/L, şeker tüketimi 73,632 g/L, biyokütle gelişimi 5,017 g/L ve verim %20,131 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.34'te görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%95,598) sonucunda etanol üretimi 30. saatte 43,714 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.35. PB 4 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
4	5,00	2	2	2,0	0,50	0,100	3,00



Şekil 4.19. PB 4 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

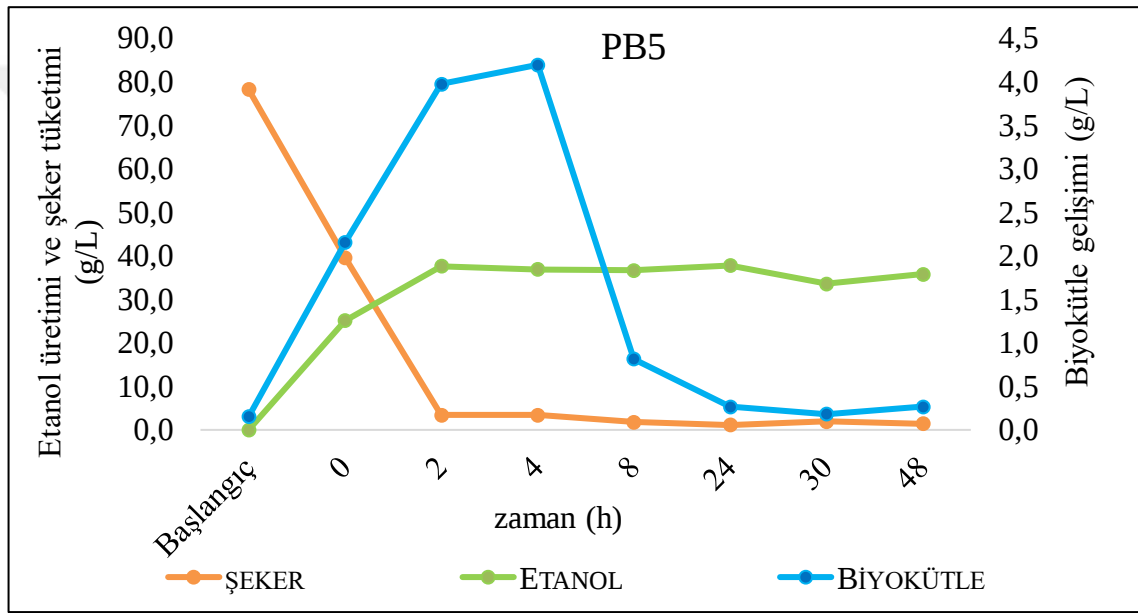
Çizelge 4.36. PB 4 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB4
Şeker Tüketimi (g/L)	68,592
Etanol Üretimi (g/L)	16,117
Biyokütle Gelişimi (g/L)	4,275
Verim (Y _{p/s} , %)	23,497
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max}	13,046
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max}	7,660
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max}	0,619
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,369
İkiye Katlanma Süresi (t _d , saat)	1,878
Şeker Tüketim Oranı (%)	92,927
Etanol Verimliliği (%)	31,540

4 numaralı besiyerinde etanol üretimi 16,117 g/L, şeker tüketimi 68,592 g/L, biyokütle gelişimi 4,275 g/L ve verim %23,497 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.36'da görüldüğü gibi şekerin %92,927 tüketimi sonucunda etanol üretimi 24. saatte 36,637 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.37. PB 5 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
5	0,50	20	6	2,0	0,50	0,010	3,00



Şekil 4.20. PB 5 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

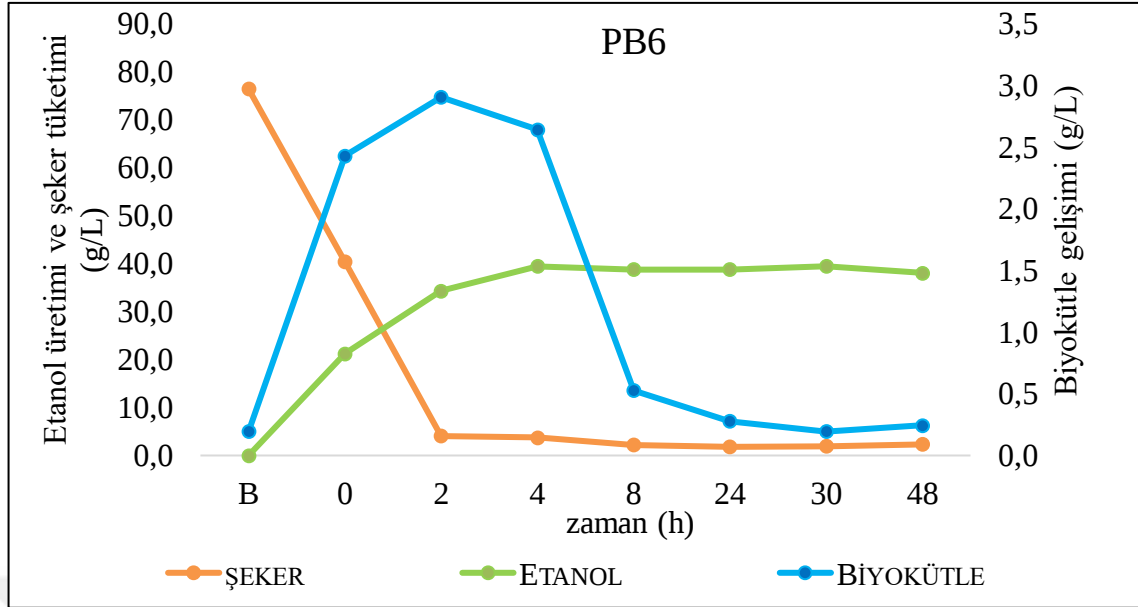
Çizelge 4.38. PB 5 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB5
Şeker Tüketimi (g/L)	76,707
Etanol Üretimi (g/L)	12,621
Biyokütle Gelişimi (g/L)	3,818
Verim ($Y_{p/s}$, %)	16,453
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	18,077
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	6,225
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,221
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,142
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	4,884
Şeker Tüketim Oranı (%)	98,155
Etanol Verimliliği (%)	24,698

5 numaralı besiyerinde etanol üretimi 12,621 g/L, şeker tüketimi 76,707 g/L, biyokütle gelişimi 3,818 g/L ve verim %16,453 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.38’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%98,155) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 37,745 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.39. PB 6 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)
6	2,75	11	4	1,1	1,75	0,055	1,65



Şekil 4.21. PB 6 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

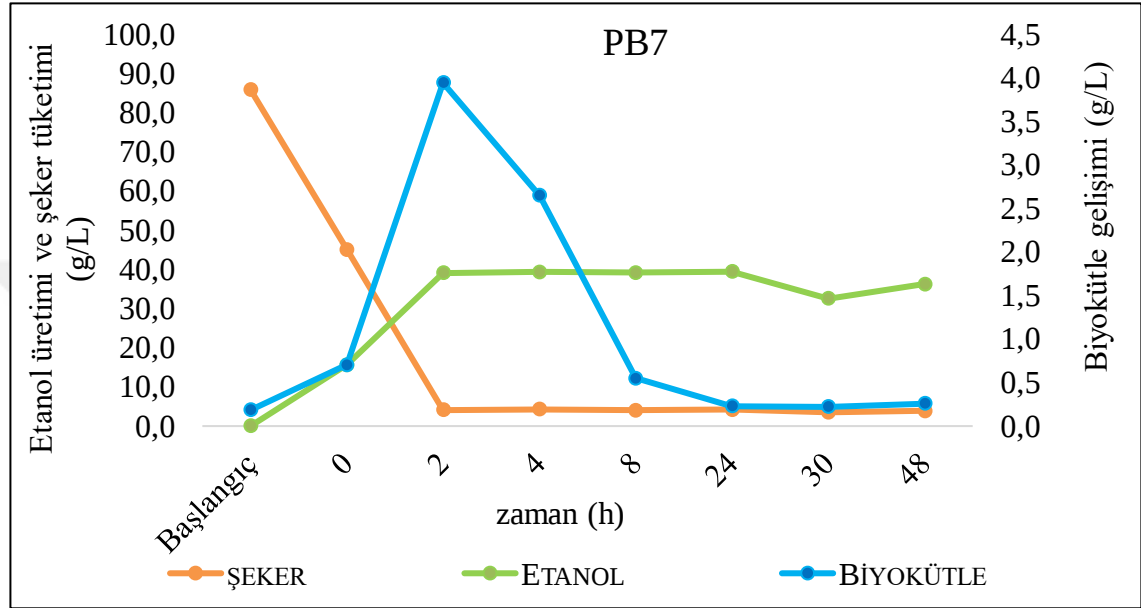
Çizelge 4.40. PB 6 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB6
Şeker Tüketimi (g/L)	74,637
Etanol Üretimi (g/L)	18,209
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,712
Verim ($Y_{p/s}$, %)	24,396
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	18,160
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	6,544
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,089
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,092
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	7,560
Şeker Tüketim Oranı (%)	97,643
Etanol Verimliliği (%)	35,633

6 numaralı besiyerinde etanol üretimi 18,209 g/L, şeker tüketimi 74,637 g/L, biyokütle gelişimi 2,712 g/L ve verim %24,396 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.40’te görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%97,643) sonucunda etanol üretimi 30. saatte 39,471 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.41. PB 7 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
7	5,00	20	6	0,2	0,50	0,100	0,30

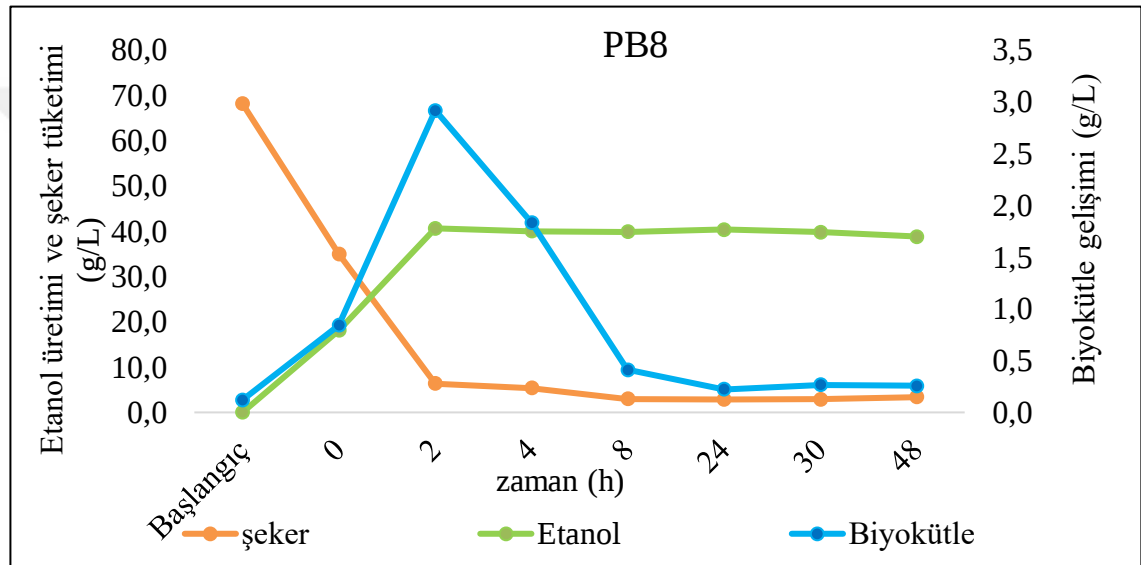
**Şekil 4.22.** PB 7 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği**Çizelge 4.42.** PB 7 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB7
Şeker Tüketimi (g/L)	82,330
Etanol Üretimi (g/L)	23,737
Biyokütle Gelişimi (g/L)	3,758
Verim ($Y_{p/s}$, %)	28,831
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	20,477
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	11,722
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,559
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,337
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	2,055
Şeker Tüketim Oranı (%)	95,910
Etanol Verimliliği (%)	46,451

7 numaralı besiyerinde etanol üretimi 23,737 g/L, şeker tüketimi 82,330 g/L, biyokütle gelişimi 3,758 g/L ve verim %28,831 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.42’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%95,910) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 39,389 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.43. PB 8 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
8	5,00	2	6	2,0	3,00	0,010	0,30



Şekil 4.23. PB 8 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

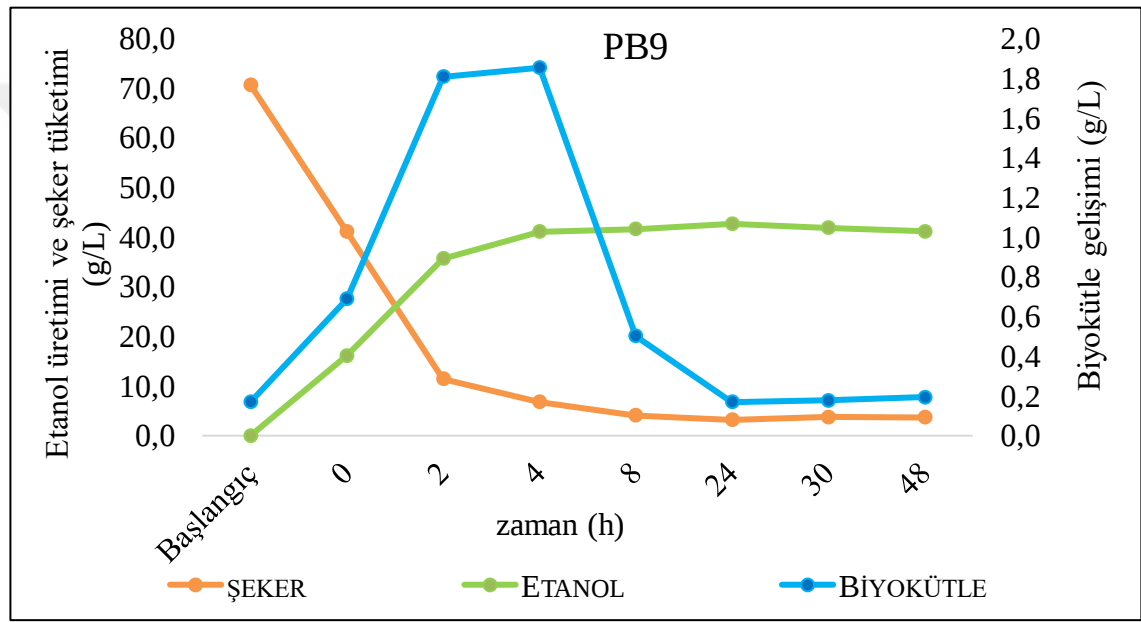
Çizelge 4.44. PB 8 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB8
Şeker Tüketimi (g/L)	65,265
Etanol Üretimi (g/L)	22,552
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,796
Verim (Y _{p/s} , %)	34,554
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max}	14,313
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max}	11,276
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max}	0,408
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,333
İkiye Katlanma Süresi (t _d , saat)	2,083
Şeker Tüketim Oranı (%)	95,814
Etanol Verimliliği (%)	44,132

8 numaralı besiyerinde etanol üretimi 22,552 g/L, şeker tüketimi 65,265 g/L, biyokütle gelişimi 2,796 g/L ve verim %34,554 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.44'te görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%95,814) sonucunda etanol üretimi 2. saatte 40,617 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.45. PB 9 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g/L)
9	0,50	2	6	0,2	3,00	0,100	3,00



Şekil 4.24. PB 9 numaralı PKD 2'li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

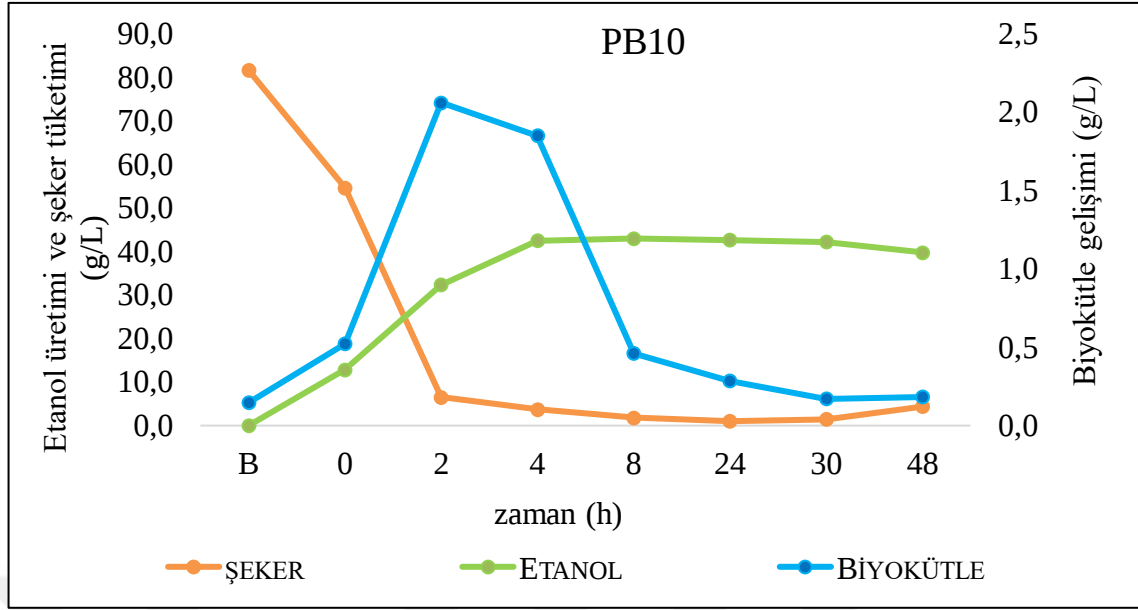
Çizelge 4.46. PB 9 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	PB9
Şeker Tüketimi (g/L)	67,527
Etanol Üretimi (g/L)	26,567
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,685
Verim ($Y_{p/s}$, %)	39,343
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	14,823
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	9,796
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,066
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,105
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	6,620
Şeker Tüketim Oranı (%)	95,521
Etanol Verimliliği (%)	51,990

9 numaralı besiyerinde etanol üretimi 26,567 g/L, şeker tüketimi 67,527 g/L, biyokütle gelişimi 1,685 g/L ve verim %39,343 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.46’da görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%95,521) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 42,705 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.47. PB 10 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimi

Deneme Numarası	Maya ekstraktı (g/L)	Pepton (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)
10	0,50	2	2	0,2	0,50	0,010	0,30



Şekil 4.25. PB 10 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

Çizelge 4.48. PB 10 numaralı PKD 2’li besiyeri bileşimine ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	P10
Şeker Tüketimi (g/L)	80,605
Etanol Üretimi (g/L)	29,795
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,914
Verim ($Y_{p/s}$, %)	36,964
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	24,031
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	9,748
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,278
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,263
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	2,632
Şeker Tüketim Oranı (%)	98,767
Etanol Verimliliği (%)	58,307

10 numaralı besiyerinde etanol üretimi 29,795 g/L, şeker tüketimi 80,605 g/L, biyokütle gelişimi 1,914 g/L ve verim %36,964 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.48’de görüldüğü gibi şekerin yaklaşık hepsinin tüketimi (%98,767) sonucunda etanol üretimi 24. saatte 42,601 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır.

Çizelge 4.49. PBD fermentasyon denemeleri kinetik parametreleri (PKD materyalleri için)

Kinetik parametreler	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7	PB8	PB9	PB10
Şeker Tüketimi (g/L)	71,456	76,285	73,632	68,592	76,707	74,637	82,330	65,265	67,527	80,605
Etanol Üretimi (g/L)	16,266	16,286	14,823	16,117	12,621	18,209	23,737	22,552	26,567	29,795
Biyokütle Gelişimi (g/L)	2,822	5,335	5,017	4,275	3,818	2,712	3,758	2,796	1,685	1,914
Verim (Yp/s, %)	22,763	21,349	20,131	23,497	16,453	24,396	28,831	34,554	39,343	36,964
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt, g/L/saat) _{max}	15,520	13,526	11,847	13,046	18,077	18,160	20,477	14,313	14,823	24,031
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt, g/L/saat) _{max}	6,295	7,691	6,356	7,660	6,225	6,544	11,722	11,276	9,796	9,748
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt, g/L/saat) _{max}	0,252	0,633	0,728	0,619	0,221	0,089	0,559	0,408	0,066	0,278
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,177	0,271	0,347	0,369	0,142	0,092	0,337	0,333	0,105	0,263
İkiye Katlanma Süresi (t _d , saat)	3,917	2,559	1,998	1,878	4,884	7,560	2,055	2,083	6,620	2,632
Şeker Tüketim Oranı (%)	94,918	93,716	95,598	92,927	98,155	97,643	95,910	95,814	95,521	98,767
Etanol Verimliliği (%)	31,831	31,871	29,008	31,540	24,698	35,633	46,451	44,132	51,990	58,307

Çizelge 4.49 veriler ışığında; maksimum etanol üretimi (29,795 g/L) 10 numaralı fermentasyonda görülürken minimum etanol üretimi (12,621 g/L) ve minimum verim (%16,453) 5 numaralı fermentasyonda gözlenmiştir. Maksimum verim (%39,343) ise 9 numaralı fermentasyonda görülmüştür. Ayrıca 10 numaralı fermentasyonda şeker tüketim oranı %98,767 değeri ile en yüksekken, şeker tüketim oranı %92,927 değeri ile 4 numaralı fermentasyonda en düşük olmaktadır.

4.9. PBD ile Etkili Parametrelerin Belirlenmesi (PKD2 materyali için)

Çizelge 4.50. Etanol üretimi için tahmin edilen etkiler ve katsayılar

Terim	Etki	Katsayı	SH kat.	T	P
Sabit		40,955	1,061	38,61	0,016
Maya ekstraktı	-1,254	-0,627	1,061	-0,59	0,660
Pepton	0,447	0,223	1,061	0,21	0,868
(NH ₄) ₂ SO ₄	-1,683	-0,841	1,061	-0,79	0,573
MgSO ₄ .7H ₂ O	-2,955	-1,478	1,061	-1,39	0,396
KH ₂ PO ₄	3,540	1,770	1,061	1,67	0,344
FeSO ₄ .7H ₂ O	-1,089	-0,545	1,061	-0,51	0,698
CaCl ₂ .2H ₂ O	-1,033	-0,516	1,061	-0,49	0,712
Ct Pt		0,637	2,372	0,27	0,833

SH kat.: Standart hata katsayıları; Ct: Kontrol toplamı; Pt: Proses toplamı; R²: 0,99838, P: Olasılık; *P<0.05

Analiz sonuçları, Minitab İstatistiksel Yazılımı kullanılarak değerlendirilmiş olup ve "Full Quadratic" Plackett-Burman yöntemi uygulanmıştır. Modelde 7 değişken kullanılmıştır. Bunlar: Maya ekstraktı, Pepton, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, FeSO₄.7H₂O ve CaCl₂.2H₂O değişkenler olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.50'de etanol üretimi için kullanılan besiyeri bileşiminin istatistiksel etkileri ve katsayıları yer almıştır.

S. cerevisiae (ATCC 36858) mayası ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda etanol üretim oranına ait modelin R² değeri 0,99838 olarak belirlenmiştir. Buna göre etanol üretimi için elde edilen model, fermentasyon sonuçlarının %99,838'ini başarıyla ifade etmektedir (Çizelge 4.50). P değeri istatistiksel analizlerde hipotez testlerinin sonuçlarını yorumlamak için kullanılmaktadır.

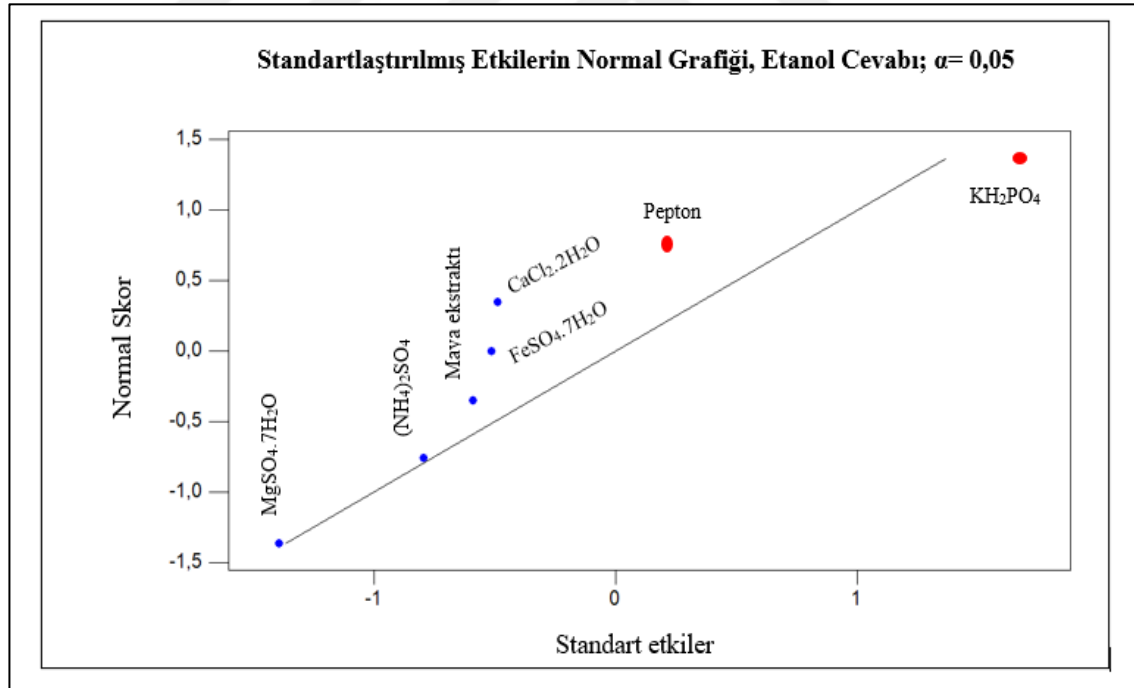
S. cerevisiae (ATCC 36858) mayası ile yapılan fermentasyonların etanol üretim oranları (g/L) için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.51'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.51. Etanol üretiminin varyans analizi

Kaynak	SD	Sıralı kareler toplamı	Düzeltilmiş kareler toplamı	Düzeltilmiş kareler ortalaması	F	P
Ana etkiler	7	56,2487	56,2487	8,0355	0,89	0,675
Eğrilik	1	0,6500	0,6500	0,6500	0,07	0,833
Kalıntı hata	1	9,0015	9,0015	9,0015		
Saf hata	1	9,0015	9,0015	9,0015		
Toplam hata	9	65,9003				

SD: Serbestlik derecesi

Pareto grafiği (Şekil 4.27), standart etkilerin mutlak değerlerini en büyükten en küçüğe doğru gösterir. Ayrıca bu grafik, etkilerin büyüklüğünü ve önemini belirlemek için de kullanılır.



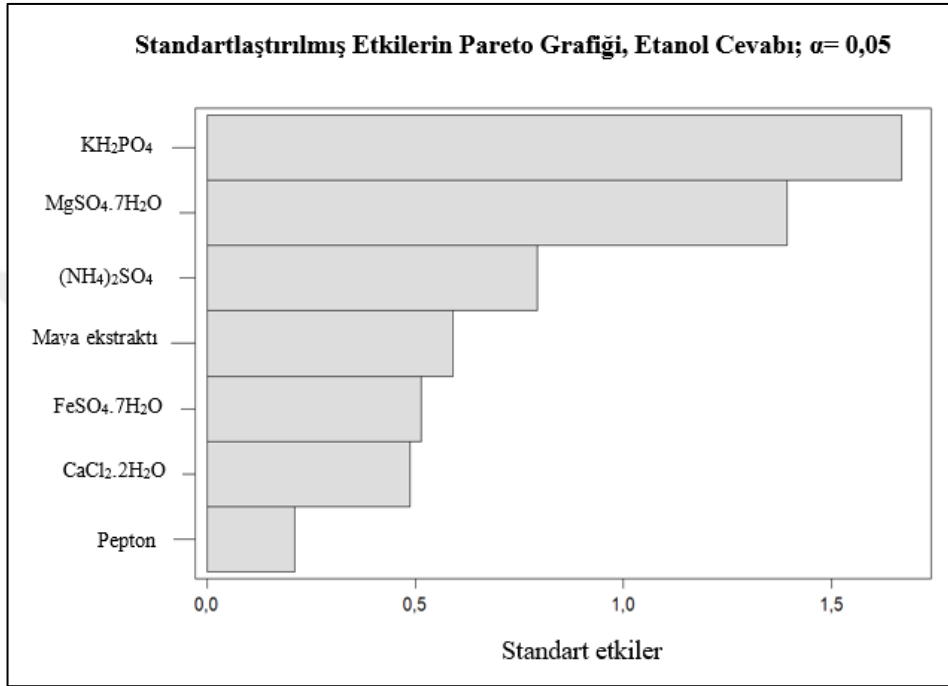
Şekil 4.26. Etkilerin normal grafiği (PBD)

Etkilerin normal grafiğine bakıldığında, çizgiden uzak noktalar, genellikle önemli olan etkileri işaret eder.

Şekil 4.26'da KH₂PO₄ ($p=0,344>0,05$; katsayısı: 1,770 (+)) ve pepton ($p=0,868>0,05$; katsayısı: 0,223 (+)) değişkenlerinin standart etkileri sıfırdan büyük

olduğu için etanol üretimi üzerine pozitif etki göstermektedir, ayrıca Çizelge 4.50'ye bakıldığında bu 2 değişkenin katsayıları pozitif olmaktadır. Diğer değişkenlerinin ise standart etkileri negatif olduğu için etanol üretimini negatif yönde etkilemektedir.

Pareto grafiğinde, istatistiksel olarak anlamlı olan faktörler referans çizgisinden geçer. Şekil 4.27'deki grafikte, referans çizgisi yoktur çünkü bu 7 değişken istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).



Şekil 4.27. Etkilerin Pareto Grafiği (PBD)

4.10. PBD Besiyeri Optimizasyonunun Validasyonu (PKD2 materyalleri için)

PBD besiyeri optimizasyonunun validasyonu için, Minitab 17 istatistiksel yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak PKD2 materyalleri kullanılarak optimum etanol üretimi için optimum doğrulama fermentasyon koşulları; 20 g/L pepton, 0,50 g/L KH_2PO_4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.52).

Çizelge 4.52. PBD yöntemi ile optimum etanol üretimi koşulları

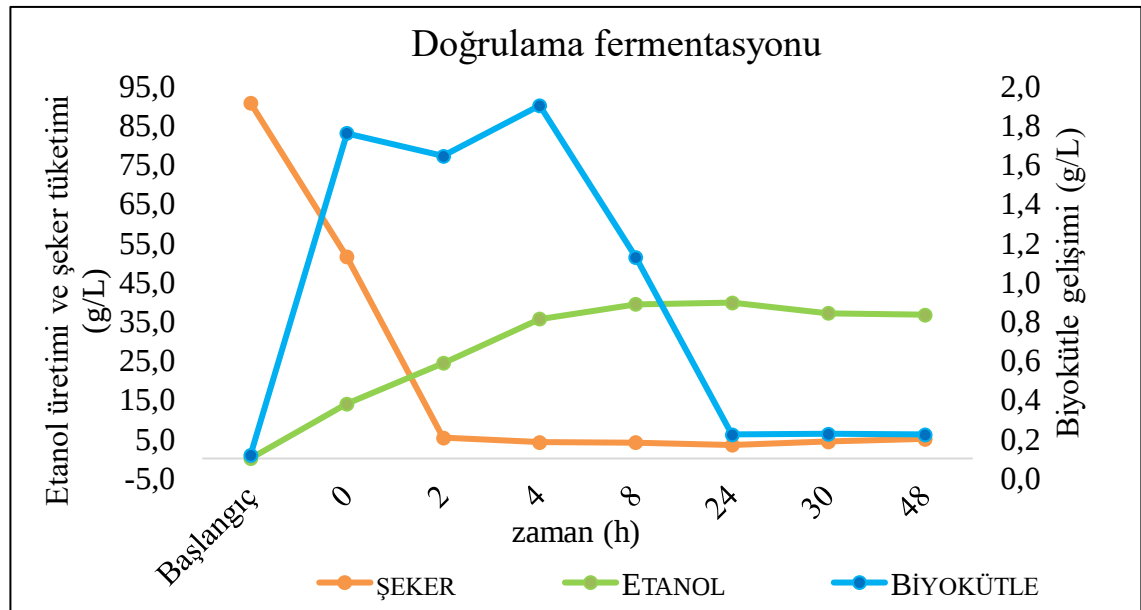
Parametre	Optimum nokta (g/L)
Pepton (g/L)	20
KH_2PO_4 (g/L)	0.50
Etanol Üretimi (g/L)	40,65

4.11. Doğrulama Fermentasyonu

Modifiye ortamda optimum koşullarda (20 g/L pepton, 0.5 g/L KH_2PO_4) Doğrulma fermentasyonu çalkalamalı inkübatörde 2 falkon tüpünde paralel bir şekilde yapılmıştır. Her erlenmayerde (10 mL çalışma hacmi) 2.9 g PKD2 materyali immobilizasyon için bulunmaktadır. Daha önce anlatıldığı gibi 6 gün boyunca 5 transfer ile immobilizasyonun ardından 2 gün doğrulama fermentasyonu gerçekleştirmiştir. PKD2 materyalleri kullanılarak modifiye ortamda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler gösterilmiştir (Çizelge 4.53).

Çizelge 4.53. Modifiye ortamda PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu

Kinetik parametreler	Modifiye ortamda PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu
Şeker Tüketimi (g/L)	87,309
Etanol Üretimi (g/L)	39,722
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,784
Verim ($Y_{p/s}$, %)	45,553
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{\max}$	23,071
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{\max}$	5,418
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{\max}$	0,076
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,106
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	6,548
Şeker Tüketim Oranı (%)	96,214
Etanol Verimliliği (%)	77,832



Şekil 4.28. Modifiye ortamda PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonu

Çizelge 4.53'e göre, şekerin %96.214'ün tüketildiği fermentasyon denemelerinde etanol üretimi 39,722 g/L bulunmuş, verim ise %45,553 olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.28'de görüldüğü gibi maksimum etanol üretimi 39.772 g/L değeri ile 24. saatte olurken, şekerin en düşük miktarı (3,436 g/L) da 24. saatte olmaktadır.

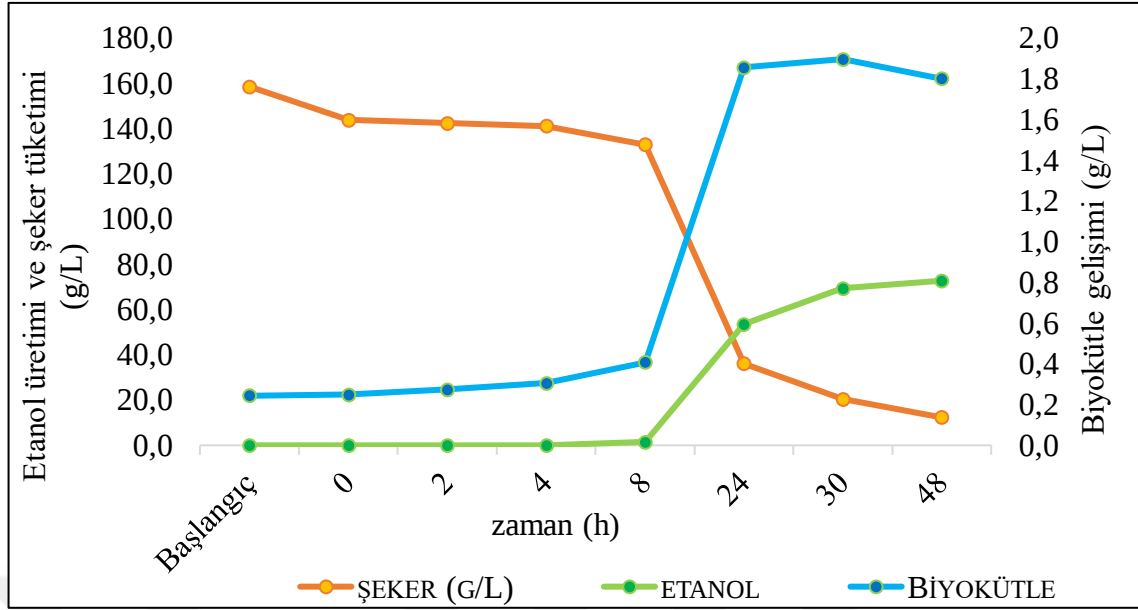
4.12. Kontrol Fermentasyonu

Bu fermentasyon zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilmiştir. Beyaz dut kurusunun optimum koşullarda (80°C, 3 saat, 1:4 (g/ml)) ekstraksiyonu yapıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 2 erlenmayerde (100 mL çalışma hacmi ve %1 maya inokülasyonu) paralel bir şekilde 2 gün boyunca kontrol fermentasyonu gerçekleştirmiştir ve belli saatlerde örnek alınarak şeker, etanol ve biyokütle analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.54'te zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilen kontrol fermentasyona ait kinetik parametreler verilmiştir.

Çizelge 4.54. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu

Kinetik parametreler	Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu
Şeker Tüketimi (g/L)	146,273
Etanol Üretimi (g/L)	72,783
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,654
Verim ($Y_{p/s}$, %)	49,758
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	5,477
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	3,120
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,081
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,092
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	7,574
Şeker Tüketim Oranı (%)	92,227
Etanol Verimliliği (%)	142,432

Çizelge 4.54'te görüldüğü gibi şekerin %92,227'sinin tüketilmesinin sonucunda etanol üretimi 72,783 g/L bulunmuş, verim ise %49,758 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında immobilizasyon olmadan gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu

Şekil 4.29'a göre maksimum etanol üretimi 72,783 g/L değeri ile 48. saatte olurken, şekerin en düşük miktarı (12,328 g/L) da 48. saatte olmaktadır. Biyokütle gelişimin ise 30. saatte maksimum seviyesine (1,897 g/L) ulaşmaktadır.

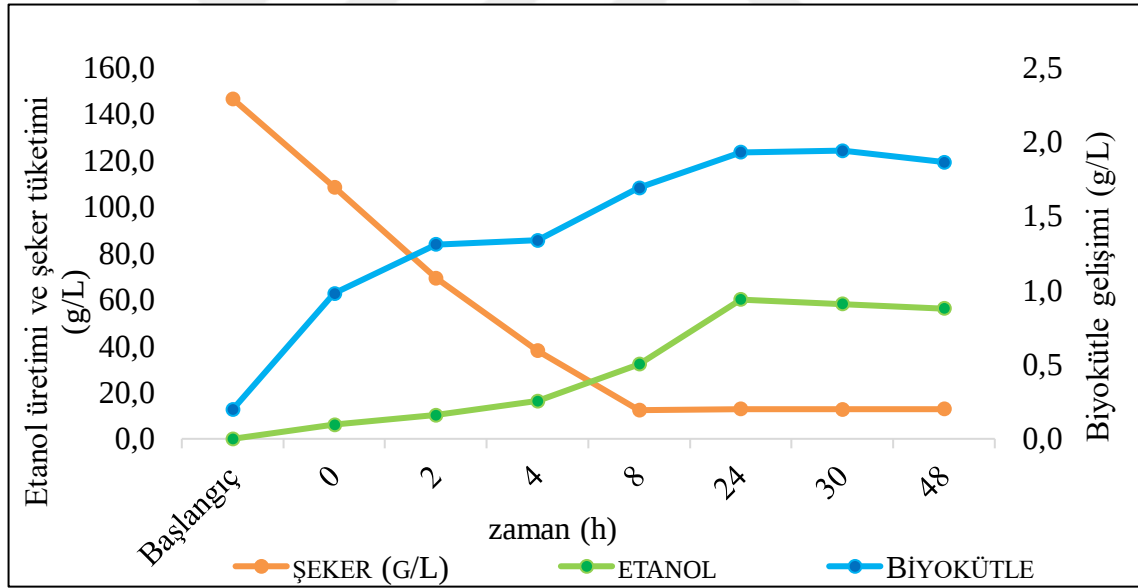
4.13. Hex Materyalleri ile Zenginleştirilmemiş Dut Hidrolizatında Fermentasyon

Bu fermentasyon zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak yapılmıştır. Beyaz dut kurusunun optimum koşullarda (80°C, 3 saat, 1:4 (g/ml)) ekstraksiyonu yapıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 2 erlenmayerde (100 mL çalışma hacmi ve %1 maya inokülasyonu) paralel bir şekilde Hex materyalleri kullanılarak 6 gün boyunca immobilizasyonun ardından 2 gün boyunca fermentasyon gerçekleştirilmiştir ve belli saatlerde örnek alınarak şeker, etanol ve biyokütle analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.55'te zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler verilmiştir.

Çizelge 4.55'te görüldüğü gibi şekerin %91,567'sinin tüketilmesinin sonucunda etanol üretimi 53,773 g/L bulunmuş, verim ise 40,122 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.55. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak fermentasyon

Kinetik parametreler	Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak fermentasyon
Şeker Tüketimi (g/L)	134,024
Etanol Üretimi (g/L)	53,773
Biyokütle Gelişimi (g/L)	1,742
Verim ($Y_{p/s}$, %)	40,122
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	17,597
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	2,054
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,165
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,015
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	44,740
Şeker Tüketim Oranı (%)	91,567
Etanol Verimliliği (%)	105,230



Şekil 4.30. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak fermentasyon

4.14. PKD 2 Materyalleri ile Zenginleştirilmemiş Dut Hidrolizatında Fermentasyon

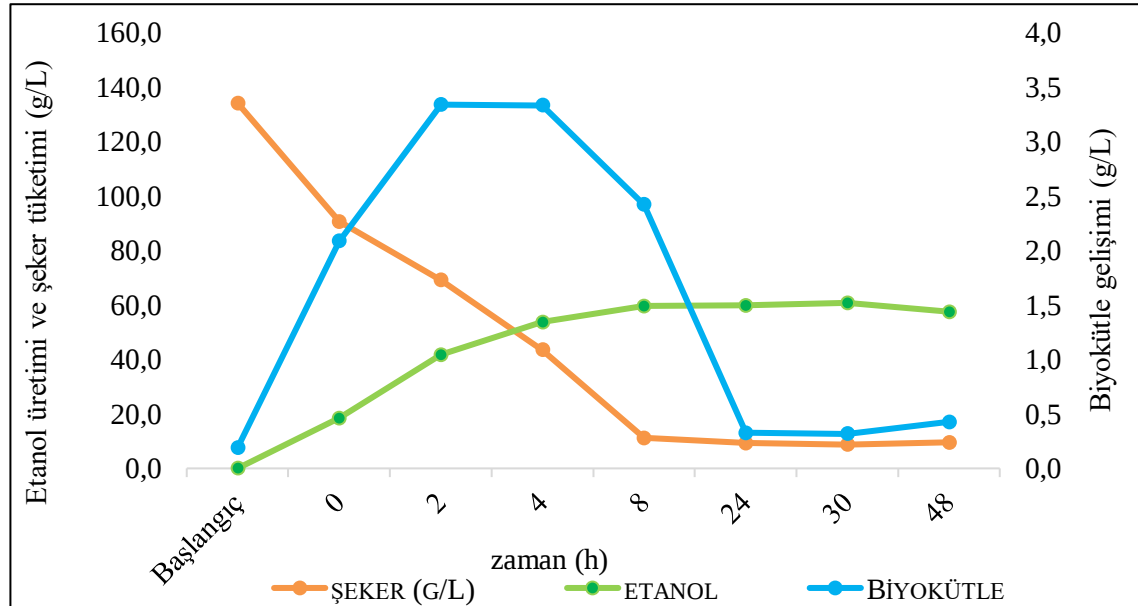
Bu fermentasyon beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Beyaz dut kurusunun optimum koşullarda (80°C, 3 saat, 1:4 (g/ml)) ekstraksiyonu yapıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 2 falkon tüpünde (10 mL çalışma hacmi ve %1 maya inokülasyonu) paralel bir şekilde PKD2 materyalleri kullanılarak 6 gün boyunca immobilizasyonun ardından 2 gün boyunca fermentasyon gerçekleştirilmiştir ve belli saatlerde örnek alınarak şeker, etanol ve biyokütle analizleri

yapılmıştır. Çizelge 4.56’da zenginleştirilmemiş beyaz dut kuru su hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler verilmiştir.

Çizelge 4.56. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kuru su hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak fermentasyon

Kinetik parametreler	Zenginleştirilmemiş beyaz dut kuru su hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak fermentasyon
Şeker Tüketimi (g/L)	125,416
Etanol Üretimi (g/L)	42,315
Biyokütle Gelişimi (g/L)	3,150
Verim (Y_p/s , %)	33,740
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	9,433
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	8,809
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,145
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,119
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	5,827
Şeker Tüketim Oranı (%)	93,493
Etanol Verimliliği (%)	82,808

Çizelge 4.56’da görüldüğü gibi şekerin %93,493’ünün tüketilmesinin sonucunda etanol üretimi 42,315 g/L bulunmuş, verim ise 33,740 olarak belirlenmiştir.

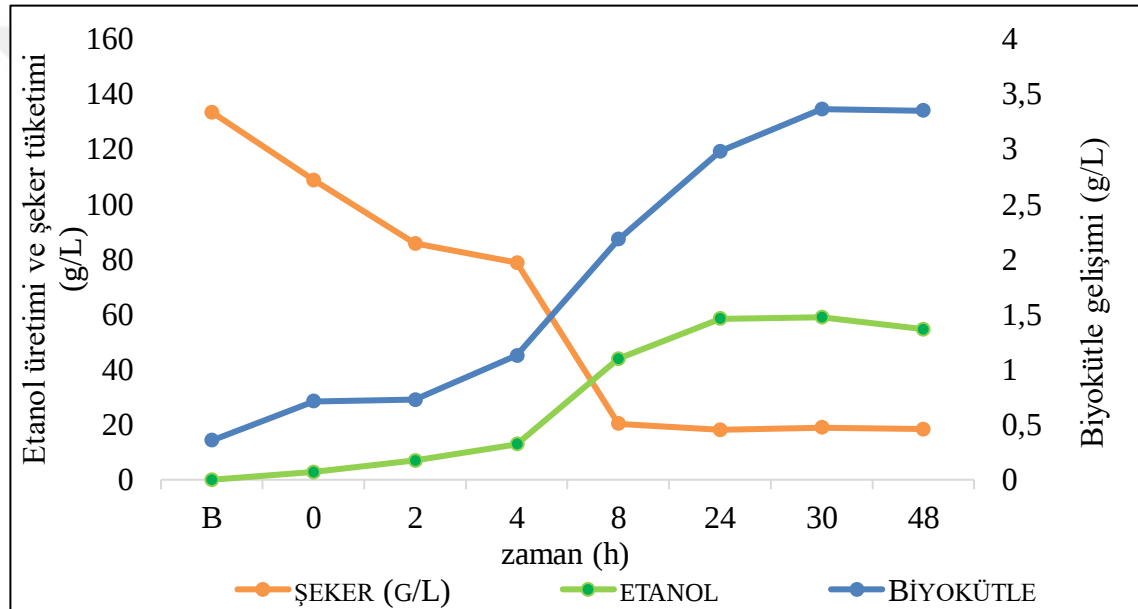


Şekil 4.31. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kuru su hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak fermentasyon

4.15. Hex Materyalleri ile Dut Hidrolizatında Doğrulama Fermentasyonu

Hex materyalleri kullanılarak etanol üretimi için PBD yöntemi ile optimum besiyeri bileşimi (20 g/L pepton, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L KH_2PO_4) belirlendikten sonra doğrulama fermentasyonu hem modifiye ortamda hem beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmıştır. Hex materyalleri kullanılarak beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler Çizelge 4.57’de verilmiştir.

Optimum koşullarda beyaz dut kurusunun ekstraksiyonu yapıldıktan sonra PBD yöntemine göre optimum besiyeri (20 g/L pepton, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L KH_2PO_4) hazırlanıp 121°C ’de 15 dk boyunca otoklavlanıp sterilize edilmiştir. Ardından 2 erlenmayerde paralel bir şekilde 6 gün boyunca Hex materyalleri kullanılarak immobilizasyon yapılmıştır. Arından 2 gün doğrulama fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.32. Beyaz dut kurusu ekstraksiyonunun doğrulama denemeleri sonucunda elde edilen şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiği

Şekil 4.32’de görüldüğü gibi beyaz dut kurusu ekstraksiyonu fermentasyon ortamındaki şeker miktarı 8. saatte büyük oranda düşmektedir. Etanol üretimi, 30. saatte 58,944 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Biyokütle gelişimi de benzer şekilde 30. saatte 3,361 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Doğrulama denemesine ait analiz sonuçları Çizelge 4.57’de verilmiştir.

Çizelge 4.57. Beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonunun gerçekleştirilmesi

Kinetik parametreler	Beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonunun
Şeker Tüketimi (g/L)	115,232
Etanol Üretimi (g/L)	56,183
Biyokütle Gelişimi (g/L)	3,006
Verim ($Y_{p/s}$, %)	48,756
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	10,810
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	1,886
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,095
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,181
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	3,838
Şeker Tüketim Oranı (%)	86,414
Etanol Verimliliği (%)	109,946

Çizelge 4.57’de görüldüğü gibi şekerin %86,414’ünün tüketilmesinin sonucunda etanol üretimi 56,183 g/L bulunmuş, verim ise 48,756 olarak belirlenmiştir.

4.16. PKD2 Materyalleri ile Dut Hidrolizatında Doğrulama Fermentasyonu

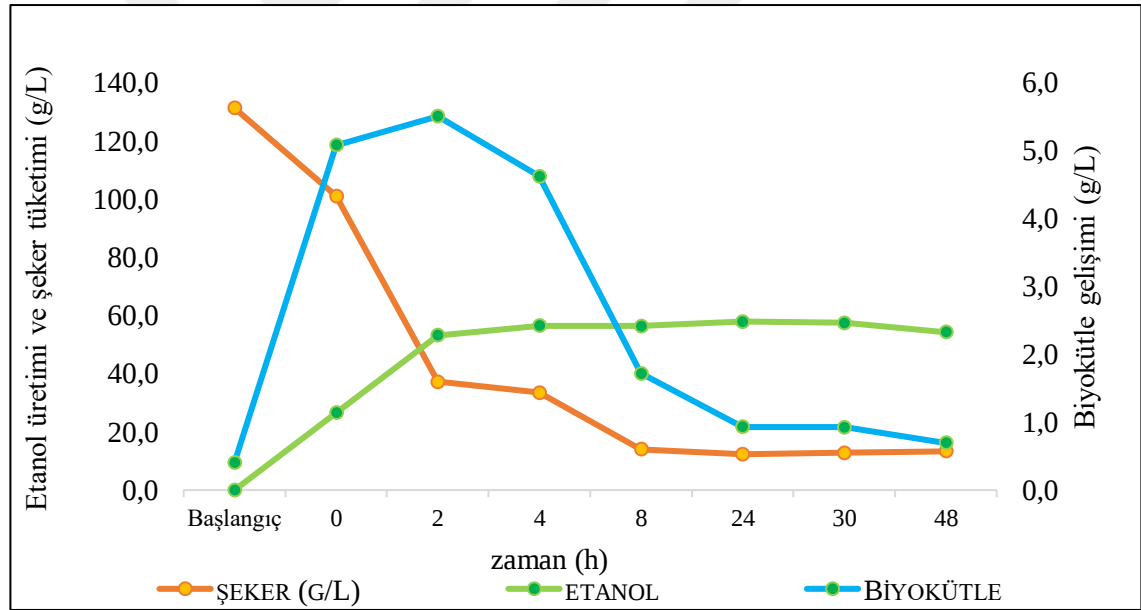
PKD2 materyalleri kullanılarak etanol üretimi için PBD yöntemi ile optimum besiyeri bileşimi (20 g/L pepton, 0.5 g/L KH_2PO_4) belirlendikten sonra doğrulama fermentasyonu hem modifiye ortamda hem beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmıştır. PKD2 materyalleri kullanılarak dut hidrolizatı ortamında gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler gösterilmiştir (Çizelge 4.58).

Optimum koşullarda beyaz dut kurusunun ekstraksiyonu yapıldıktan sonra PBD yöntemine göre optimum besiyeri (20 g/L pepton, 0.5 g/L KH_2PO_4) hazırlanıp $121^{\circ}C$ ’de 15 dk boyunca otoklavlanıp sterilize edilmiştir. Ardından 2 falkon tüpünde paralel bir şekilde 6 gün boyunca PKD2 materyalleri kullanılarak immobilizasyon yapılmıştır. Ardından 2 gün doğrulama fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.58’de görüldüğü gibi şekerin %90,616’sının tüketilmesinin sonucunda etanol üretimi 31,383 g/L bulunmuş, verim ise %26,363 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.58. Beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonuna ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında doğrulama fermentasyonu
Şeker Tüketimi (g/L)	119,043
Etanol Üretimi (g/L)	31,383
Biyokütle Gelişimi (g/L)	5,102
Verim ($Y_{p/s}$, %)	26,363
Mak. Tüketim Oranı, $(-ds/dt)_{max}$	31,926
Mak. Üretim Oranı, $(dp/dt)_{max}$	13,306
Mak. Gelişim Oranı, $(dx/dt)_{max}$	0,187
Spesifik Gelişme Hızı (1/saat)	0,202
İkiye Katlanma Süresi (t_d , saat)	3,433
Şeker Tüketim Oranı (%)	90,616
Etanol Verimliliği (%)	61,415



Şekil 4.33. Beyaz dut kuruşu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak doğrulama fermentasyonuna ait şeker, etanol ve biyokütle grafikleri

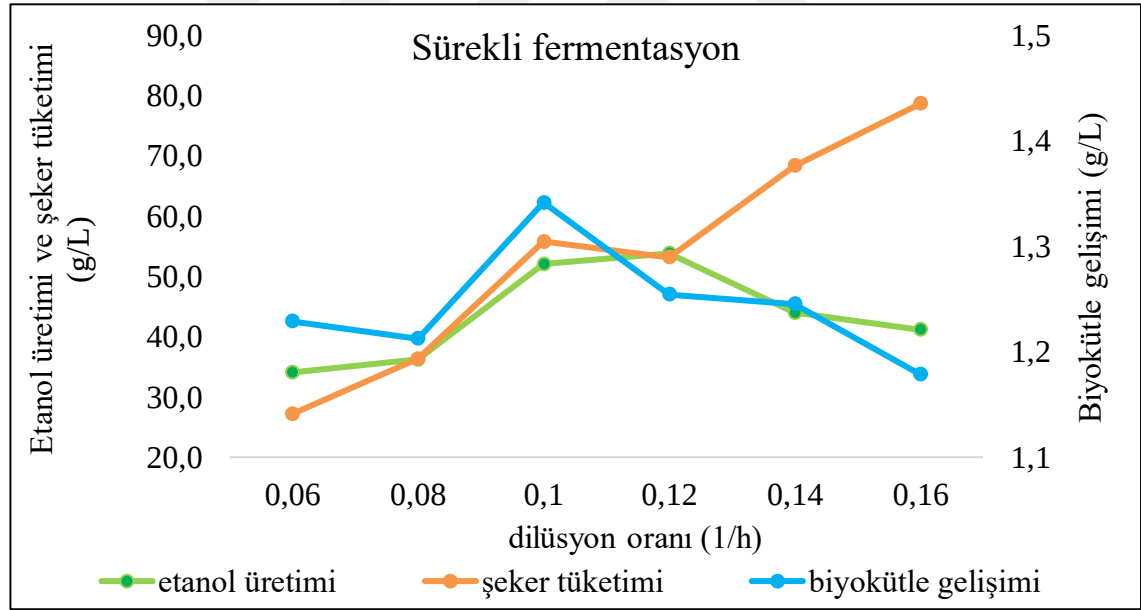
Şekil 4.33'te görüldüğü gibi etanol üretimi, 24. saatte 57,973 g/L değerine ulaşarak maksimum seviyesine, şeker miktarı ise 24. saatte minimum seviyesine (12,328 g/L) ulaşmıştır.

4.17. PKD2 Materyalleri Kullanılarak Sürekli Fermentasyon

Çizelge 3.4'e göre 0,06-0,16 (1/h) dilüsyon oranlarında sürekli fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Materyaller üzerine hücre tutulması için 6 gün boyunca 5 kez transfer ile immobilizasyon uygulanmıştır. Ardından ilk dilüsyon oranı ile besiyeri biyoreaktörün içerisine alınmıştır. Ardından her 24 saatte bir yeni bir dilüsyon oranına geçiş yapılmıştır. Her dilüsyon oranı için örnek alınarak şeker, biyokütle ve etanol analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.59. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyon

D (1/h)	Biyokütle gelişimi (g/L)	Dx (g/L/h)	Kalıntı şeker (g/L)	Etanol üretimi (g/L)	Dp (g/L/h)
0,06	1,229	0,074	27,174	34,058	2,043
0,08	1,212	0,097	36,306	36,187	2,895
0,1	1,341	0,134	55,758	52,015	5,201
0,12	1,254	0,151	53,148	53,779	6,453
0,14	1,245	0,174	68,354	43,936	6,151
0,16	1,178	0,189	78,611	41,150	6,584



Şekil 4.34. Zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında PKD2 materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyonuna ait şeker, etanol ve biyokütle grafikleri

Şekil 4.34'e bakıldığında etanol üretimi 0,12 (1/h) dilüsyon oranında maksimum değerine (53,779 g/L), şeker tüketimi 0,16 (1/h) dilüsyon oranında maksimum değerine (78,611 g/L) ve biyokütle gelişimi ise 0,1 (1/h) dilüsyon oranında maksimum değerine (1,341 g/L) ulaşmıştır.

Etanol üretimi grafiğine bakıldığında 0,06-0,12 (1/h) dilüsyon oranlarında sürekli bir artış gözükmemektedir. Ancak 0,12 (1/h) dilüsyon oranından sonra sürekli bir düşüş

(wash out) gözükmemektedir. Biyokütle gelişimi grafiğine bakıldığında ise 0,1 (1/h) dilüsyon oranından sonra önemli bir düşüş (wash out) gözükmemektedir. Şeker tüketimi grafiğine bakıldığında ise 0,12 (1/h) dilüsyon oranından sonra sürekli bir artış (wash out) gözükmemektedir.

Çizelge 4.59'a bakıldığında en yüksek verimlilik (D_x) 0,16 (1/h) dilüsyon oranında 0,189 (g/L/h) olarak belirlenmiştir. Etanol üretkenliği ise aynı dilüsyon oranında maksimum değerine (6,584 g/L/h) ulaşmıştır.

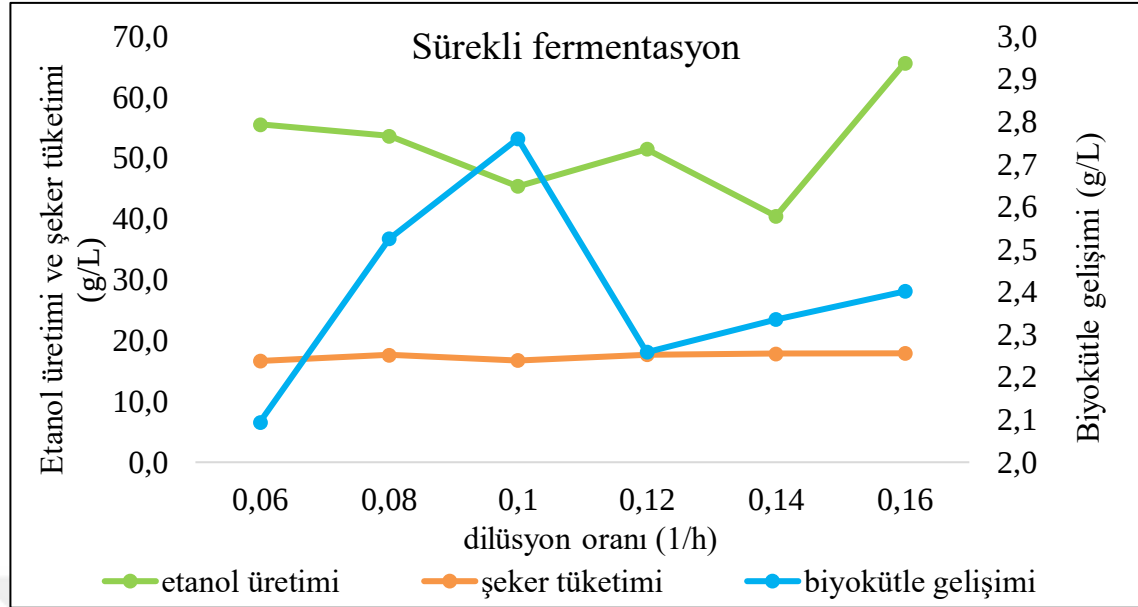
4.18. Hex Materyalleri Kullanılarak Sürekli Fermentasyon

PKD materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyonda olduğu gibi 0,06-0,16 (1/h) dilüsyon oranlarında Hex materyalleri ile sürekli fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Hex materyalleri üzerine ve içinde hücre tutulması için 6 gün boyunca 5 kez transfer ile immobilizasyon uygulanmıştır. Ardından ilk dilüsyon oranı (0,06 1/h) ile besiyeri biyoreaktörün içerisine alınmıştır. Ardından her 24 saatte bir yeni bir dilüsyon oranına geçiş yapılmıştır. Her dilüsyon oranı için örnek alınarak şeker, biyokütle ve etanol analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.60. Zenginleştirilmiş beyaz dut kuru su hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyon

D (1/h)	Biyokütle gelişimi (g/L)	D_x (g/L/h)	Kalıntı şeker (g/L)	Etanol üretimi (g/L)	D_p (g/L/h)
0,06	2,094	0,126	16,647	55,539	3,332
0,08	2,525	0,202	17,657	53,626	4,290
0,10	2,760	0,276	16,767	45,403	4,540
0,12	2,259	0,271	17,712	51,503	6,180
0,14	2,336	0,327	17,832	40,467	5,665
0,16	2,401	0,384	17,907	65,660	10,506

Çizelge 4.60'a bakıldığında en yüksek verimlilik (D_x) 0,16 (1/h) dilüsyon oranında 0,384 (g/L/h) olarak belirlenmiştir. Etanol üretkenliği ise aynı dilüsyon oranında maksimum değerine (10,506 g/L/h) ulaşmıştır.



Şekil 4.35. Zenginleştirilmiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında Hex materyalleri kullanılarak sürekli fermentasyonuna ait şeker, etanol ve biyokütle grafikleri

Şekil 4.35'e bakıldığında etanol üretimi ve biyokütle gelişimi grafiklerinde wash out görülmektedir. Etanol üretimi ve biyokütle gelişimi değerleri en son dilüsyon oranında azalmak yerine artmaktadır. Ayrıca şeker tüketimi grafiğine bakıldığında 0,06-0,16 (1/h) dilüsyon oranları aralığında 16,647 g/L değerinden 17,907 g/L değerine artmaktadır, yani önemli bir artış gözükmemektedir. Bunun sonucunda bu dilüsyon oranları aralığında wash out gözükmediği için olumsuz sonuçlar elde edilmekte ve Hex materyalleri için bu dilüsyon oranları uyumlu değildir.

Literatürde 3D küreleri kullanılarak etanol üretimi için bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ünsal, Tufan vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 3D materyali olan W (20 mm) kullanılarak laboratuvar ölçekli bir biyoreaktörde en az %82 şeker tüketimi kapasitesi ile 100 g/L başlangıç şekeri kullanılarak tüm tekrarlı kesikli döngülerde 37 g/L'nin üzerinde etanol (etanol verimi %41,91-%46,36) üretilmiştir.

Literatürde etanol üretimi için besiyeri bileşimi optimizasyonunun üzerinde birkaç çalışma mevcuttur. İzmirlioglu ve Demirci (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada karbon kaynağı olarak 40,4 g/L endüstriyel atık patates püresi kullanılmış ve bu karbon kaynağının enzim hidrolizi sonrasında herhangi bir katkı yapılmadan 11,63 g/L etanol üretilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda besiyerine 8 bileşenin (maya ekstraktı, malt ekstraktı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) etanol üretimi üzerinde etkisi de incelenmiştir. Sonuçlara göre bu 8 bileşen arasında toplam 5 bileşen (maya ekstraktı, malt ekstraktı, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) etanol üretimi üzerinde anlamlı etki göstermektedir (p-değeri < 0,05). Diğer bileşenler ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3) ise istatistiksel olarak etanol üretimi üzerinde anlamlı etki göstermemiştir (p-değeri > 0,05). İstatistiksel olarak anlamlı olan bu 5 bileşen arasında ise 3 bileşen (maya ekstraktı, malt ekstraktı, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) etanol üretimi üzerine pozitif etki göstermektedir çünkü bu bileşenlerin katsayıları pozitif olmaktadır. Diğer 2 bileşenin (KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) katsayısı negatif olduğu için etanol üretimi üzerine anlamlı etki gösterse de etanol üretimini negatif yönde etkilemektedir. Bu

çalışmada cevap yüzey metodolojisi kullanılarak 40,4 g/L endüstriyel atık patates püresine 50 g/L malt ekstraktı ve 4,84 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bileşenleri eklenerek 30⁰ C’de, 150 rpm ve 48 saatlik etanol fermentasyonu gerçekleştirilmiş ve 24,6 g/L etanol elde edilmiş.

Izmirlioglu ve Demirci (2015)’e göre maya ekstraktının etanol üretimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüş olup bizim çalışmamızdaki Plackett-Burman tarama sonuçlarıyla uyumludur. Bunun sebebi aşırı miktarda nitrojenin etanol üretimini negatif etkilemesi olabilmektedir. Vilanova vd. (2007) aşırı miktarda nitrojenin etanol konsantrasyonunu azalttığını belirtmiştir. Ayrıca, çok yüksek graviteli etanol üretimi için nitrojen takviyesi incelendiği bir çalışmada, yüksek maya ekstraktı konsantrasyonları etanol üretimini desteklemediğini bildirmişlerdir (Chan-u-Tit vd. 2013; Izmirlioglu ve Demirci 2015). Bizim çalışmamızda azot kaynağı olarak 3 bileşen kullanılmaktadır. Bunlar: pepton, maya ekstraktı ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bileşenleridir. 3D materyalleri kullanılarak immobilizasyon yapıldığında modifiye ortamda (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz); PBD sonuçlarına göre bu 3 bileşen arasında maya ekstraktının katsayısı negatif olduğu için etanol üretimini negatif etkilemektedir. Pepton ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bileşenlerinin katsayıları ise pozitif olup etanol üretimini pozitif yönde etkilemektedir. PKD2 materyalleri içeren modifiye ortamda ise PBD sonuçlarına göre azot kaynakları arasında sadece peptonun katsayısının pozitif olduğu belirtilmektedir.

Wang vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada etanol üretimi için karbon kaynağı olarak kullanılan mısır unu hidrolizatına 6 parametre (Mg^{2+} , glisin, maya ekstraktı, biyotin, asetaldehit ve pepton) eklemişler. Bu 6 faktör arasında Mg^{2+} ve pepton konsantrasyonları etanol üretimine en çok katkıda bulunmuştur. Bu araştırmaya göre mısır unu hidrolizatına 50 mM Mg^{2+} ve %1,5 (w/v) peptonun eklenmesi sonucunda 48 saatlik fermentasyonda etanol konsantrasyonu %14,2’den %17 (v/v) değerine ulaşarak %20 artış sağlanmıştır.

Pradee, Sarathi Reddy vd. (2012) etanol üretimi için proses ve besiyeri optimizasyonu ile ilgili yaptığı bir çalışmada karbon kaynağı olarak parmak darı (Eleusine coracana L.) tohumlarını kullanmış ve 7,13 g/L maya ekstraktı, 23,32 mM MgSO_4 ve 4,8 pH değerinde %13,66 (v/v) kadar yüksek bir etanol üretimini gerçekleştirebilmiş.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *S. cerevisiae* (ATCC 36858) mayası kullanılarak beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında ve ayrıca beyaz dut kurusu hidrolizatının şeker içeriğine göre oluşturulan modifiye ortamda (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz) etanol fermentasyonu yapılmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan beyaz dut kurusu su banyosunda ekstrakte edilmiştir ve optimum ekstraksiyon koşulları 3 saat, 80°C ve 1:4 g/ml (katı sıvı oranı) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, 375 gram olarak tartılan beyaz dut kurusundan yaklaşık 1 litre ekstraksiyon elde edilmiştir. Bu beyaz dut kurusu ekstraksiyonu ile yapılan kontrol fermentasyonu sonucunda, *S. cerevisiae* mayasının 146,273 g/L şeker tüketimiyle 72,783 g/L etanol üretilmiştir. Yani, şekerin %49,76'sı etanole dönüşmüştür. Teorik olarak, 1 kg glukozdan %51 etanol ve %49 karbondioksit elde edilir. Ancak pratikte kullanılan mikroorganizmalar, glukozun tamamını tüketemezler (Demirbaş 2005; Bengisu 2014). Bu sebeple bu deneyde elde edilen değer (%49,76) teorik değerden (%51) daha düşük olmuştur.

Etanol fermentasyonunun verimliliğinin artmasının zaman, maliyet ve enerji açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu amaçla bu tez kapsamında immobilizasyon ve besiyeri optimizasyonu yapılmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak immobilizasyon için kullanılan 4 farklı PKD ve 4 farklı 3D materyali arasında etanol üretimi açısından en iyi materyal olarak PKD2 ve Hex materyalleri seçilmiştir. Bu aşama ve besiyeri optimizasyonu aşaması modifiye ortamda (45 g/L glukoz, 45 g/L fruktoz, 1 g/L sakkaroz) yapılmıştır.

Bu tez kapsamında besiyerindeki çözünmüş oksijen miktarının ölçümü yapılmamıştır. Şekil 4.29'a bakıldığında beyaz dut kurusu hidrolizatında yapılan 48 saatlik kontrol fermentasyonda etanol üretimi 8. saate kadar sıfır iken 8. saatten sonra çok hızlı bir şekilde artmıştır. Biyokütle gelişimi de 8. saatten sonra hızlıca artmıştır. Şeker de ilk saatlerde yavaş bir şekilde tüketilirken 8. saatten sonra hızlıca tüketilmiştir. Bunun ana nedeni besiyerindeki çözünmüş oksijenin miktarıdır. Fermentasyonun 8. saatine kadar çözünmüş oksijen miktarı yüksek olduğu için etanol üretimi gerçekleşmemiş, biyokütle gelişimi ve şeker tüketimi düşük olmuştur. 8. saatten sonra ise çözünmüş oksijen miktarı oldukça düşmüş, böylece etanol üretimi, biyokütle gelişimi ve şeker tüketimi hızla artmıştır.

Besiyeri optimizasyonu amacıyla modifiye ortama farklı miktarlarda yedi çeşit besiyeri bileşeni eklenmiş ve 10 çeşit besiyerinin PBD yöntemi ile formülasyonları hem PKD2 materyalleri ile hem de Hex materyalleri ile yapılmış, fermentasyonları gerçekleştirilmiş ve optimum besiyeri bileşiminin PKD2 materyalleri için maksimum etanol üretimi açısından 20 g/L pepton ve 0.5 g/L KH_2PO_4 olduğu, Hex materyalleri için ise 20 g/L pepton, 3g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi olduğu saptanmıştır. Bu verilere göre doğrulama fermentasyonu hem modifiye ortamda hem de beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmış. PKD2'li modifiye ortamda doğrulama denemesinden elde edilen maksimum etanol üretimi 39,772 g/L olarak belirlenmiştir ve beklenen değer (40,65 g/L) ile uyumluluk göstermiştir. PKD2'li beyaz dut kurusu hidrolizatında doğrulama fermentasyonu (20 g/L pepton, 0,50 g/L KH_2PO_4) yapıldığında etanol üretimi 31,38 g/L ve verim %26,36 olarak belirlenmişken; zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu

hidrolizatı ortamında etanol üretimi 42,315 g/L ve verim %33,74 olarak belirlenmiştir. Yani beyaz dut kurusu hidrolizatına hiçbir teşvik edicinin eklenmemesi verimin %28 olarak artışına sebep olmaktadır. Bu nedenle sürekli fermentasyon PKD2 materyalleri için zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmıştır.

Sürekli fermentasyonun hiç zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmasının sebebi PKD2 materyallerinin kendi yapısında %5 soya fasulyesi unu, %5 maya ekstraktı ve %5 sığır albümin gibi azot kaynaklarının içermesidir. Beyaz dut kurusuna aşırı azot kaynağının eklenmesi de etanol üretimini negatif yönde etkilemektedir.

Hex materyalli modifiye ortamda doğrulama fermentasyonu yapıldığında denemeden elde edilen maksimum etanol üretimi 27,882 g/L olarak, beklenen değer ise 32,9695 g/L olarak belirtilmiştir. Hex materyalleri kullanılarak beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında hiçbir teşvik edici kullanmadan maksimum etanol üretimi 53,773 g/L olarak belirlenirken, doğrulama fermentasyonu (20 g/L pepton, 3g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) yapıldığında ise maksimum etanol üretimi 56,183 olarak belirlenmiştir. Yani teşvik edicinin eklenmesi Hex materyalleri için etanol üretimini %4,48 olarak arttırmıştır. Bu nedenle biyoreaktörde sürekli fermentasyon PKD2 materyalleri için zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmışken, Hex materyalleri için doğrulama fermentasyonu sonuçlarına göre (20 g/L pepton, 3g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) zenginleştirilmiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında yapılmıştır.

Bu tez kapsamında, substrat olarak beyaz dut kurusu kullanılmıştır. Bunun nedenlerinden biri, dut ağaçlarından yere dökülen ve kullanılamayan fazla dutun bulunmasıdır. Diğer bir nedeni ise, beyaz dut kurusunun yüksek şeker içeriği sayesinde daha fazla etanol üretimi ve verim elde edilebilmesidir. Ayrıca, beyaz dut kurusunun fermentasyon öncesi işlemleri (up stream) oldukça basittir ve ekstraksiyon dışında başka bir işlem gerektirmediği için maliyeti düşürür.

Bu çalışmada immobilizasyon malzemesi olarak PKD ve 3D materyaller kullanılmıştır. PKD2'li beyaz dut kurusu hidrolizatında doğrulama fermentasyonu (20 g/L pepton, 0,50 g/L KH_2PO_4) yapıldığında etanol üretimi 31,38 g/L ve verim %26,36 olarak belirlenmişken; zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusu hidrolizatı ortamında etanol üretimi 42,315 g/L ve verim %33,74 olarak belirlenmiştir. Yani beyaz dut kurusu hidrolizatına hiçbir teşvik edicinin eklenmemesi verimin %28 olarak artışına sebep olmaktadır. Bunun nedeni, PKD2 materyallerinin yapısında azot kaynakları (%5 soya fasulyesi unu, %5 maya ekstraktı, 5% sığır albümin) içermesidir. Bu özellik, sürekli fermentasyon süreçlerinde ek kimyasal maddelere ihtiyaç duyulmadığı için maliyet açısından avantaj sağlamaktadır.

PKD2 materyalleri kullanılarak zenginleştirilmemiş beyaz dut kurusunda 0,06-0,16 (1/h) dilüsyon oranları arasında sürekli fermentasyon yapıldığında Şekil 4.34'e göre 0,12 (1/h) dilüsyon oranı wash out noktası olarak belirlenmiştir. 0,1 (1/h) dilüsyon oranında biyokütle gelişimi maksimum değerine (1,341 g/L) ulaşmıştır. Ayrıca, bu dilüsyon oranında etanol üretimi oldukça yüksek seviyede gerçekleşmiş ve 52,015 g/L değerine ulaşmıştır. Böylece 0,1 (1/h) dilüsyon oranı en uygun oran olarak

belirlenmiştir. Gelecek çalışmalarda, bu dilüsyon oranında denemeler yapılabilir ve sürekli fermentasyonun bu oran altında kaç gün sürdürülebileceği araştırılabilir.



6. KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A. 2012. Kimyasal ön-işlemlerden geçirilmiş lignoselülozik atıkların *Streptomyces sp. aoa40* enzimleriyle şeker şurubuna dönüştürülmesi. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 158 s.
- Adıgüzel, A. O. 2011. Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi, mersin üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Semineri, 72 s.
- Adıgüzel, A.O. 2013. Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. BEU Journal of Science, 2(2): 204-220.
- Alptekin, E. ve Çanakçı, M. 2006. Biyodizel ve Türkiye'deki durumu. Mühendis ve Makine, 47(561): 57-64.
- Anonim 1: <http://www.dektmk.org.tr/upresimler/enerjirapor2012> [Son erişim tarihi: 05.09.2014].
- Anonim 2: <http://www.cevreorman.com.tr> [Son erişim tarihi: 01.05.2006].
- Anonim 3: <http://www.eie.gov.tr/yenilenebilir/biyoetanol.aspx> [Son Erişim Tarihi: 07.08.2014].
- Anonim 4: <https://www.enerji.gov.tr/tr-TR> [Son Erişim Tarihi: 29.05.2020].
- Anonim5: [https://www.google.com/search?sca_esv=f817bd0bbcf440d1&rlz=1C1SQJL_trTR1075TR1075&sxsrf=ACQVn09u72bA6Ld1USelDj11TWEXpzXR Dg:1707588537128&q=RFA,+Renewable+Fuels+Association+\(available+on+line+http://www.ethanol+rfa.org/+industry/statistics+last+visited:+26+Feb+2010\).&spell=1&sa=X&ved=2ahUKEwi297WBr6GEAxVwX_EDHXTiCM oQBSgAegQICBAC](https://www.google.com/search?sca_esv=f817bd0bbcf440d1&rlz=1C1SQJL_trTR1075TR1075&sxsrf=ACQVn09u72bA6Ld1USelDj11TWEXpzXR Dg:1707588537128&q=RFA,+Renewable+Fuels+Association+(available+on+line+http://www.ethanol+rfa.org/+industry/statistics+last+visited:+26+Feb+2010).&spell=1&sa=X&ved=2ahUKEwi297WBr6GEAxVwX_EDHXTiCM oQBSgAegQICBAC) [Son Erişim Tarihi: 26.02.2010].
- Anonymous 1: When will fossil fuels run out? <https://www.WIricity.co.uk/> [Son Erişim Tarihi: 29.05.2020].
- Anonymous 2: Biofuels Platform. ENERS Energy Concept. Production of biofuels in the world. <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/production.php?id=bio-ethanol> [Son erişim tarihi: 26.02.2010].
- Anonymous 3: <http://eol.org/pages/594885/overview> [Son erişim tarihi: 10.06.2017].
- Azeredo, J., Visser, J., Oliveira, R. 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: Interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. Colloids Surf B Biointerfaces, 14:141–148.
- Bader, N. B. 2017. Pirinç kavuzu hidrolizatının biyofilm reaktörde kesikli ve sürekli sistemlerle etanol fermentasyonu ve üretiminin matematiksel modellerle tanımlanması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 158 s.

- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52 (2): 858-875.
- Balat, M. Balat, H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Appl Energy*, 86:2273–82.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551-573.
- Bastos, V.D. 2007. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. BNDES Setorial. Biofuels Platform. ENERS Energy Concept. Production of biofuels in the world, 25:5-38.
- Bayraç, H. N., Delican, D. ve Karakaş, A. T. 2020. OECD ülkelerinde biyoyakıt politikalarının ulaşım sektöründeki petrol tüketimine etkisi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*, 15(3): 811-828.
- Belgrano, F., dos, S., Diegel, O., Pereira, N. ve Hatti-Kaul, R. 2018. Cell immobilization on 3D-printed matrices: A model study on propionic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 249: 777–782.
- Bengisu, G. 2014. Alternatif yakıt kaynağı olarak biyoetanol. *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 27(2): 43-52.
- Bhadana, B. Ve Chauhan, M. 2016. Bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* with different perspectives: Substrates, growth variables, inhibitor reduction and immobilization. *Ferment. Technol*, 5(2): 2-5.
- Bozkurt, H. ve Aslım, B. 2004. İmmobilizasyonun probiyotik kültürlerde kullanımı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(7): 1-14.
- Brodellius, P., Nilsson, K., 1983. Permealization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 17: 275–280
- Brun-Graeppe, A.K., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D. ve Merten, O.W. 2011. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*, 149: 209-224.
- Bryers, J.D. 2000. Biofilm formation and persistence. In: Bryers JD (ed) *Biofilms II. process analysis and applications* Wiley-Liss Inc., 45–88.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. ve Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104: 467-483.
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Šantek, M. I. Ve Šantek, B. 2018. Bioethanol production from renewable raw materials and

- its separation and purification. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3): 289-311.
- Busscher, H.J., Bos, R., van der Mei, H.C. 1995. Initial microbial adhesion is determinant for the strength of biofilm adhesion: hypothesis. *FEMS Microbiol Lett*, 128:229–234.
- Busscher, H.J., van der Mei, H.C. 2000. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. In: Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott H, Wilson M (eds) *Community structure and co-operation in biofilms*, 25–36.
- Canan, S. Ve Ceyhan, V. 2017. Türkiye’de biyokütle fiyatındaki değişimin biyoetanol maliyeti üzerine etkileri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32(1): 16-22.
- Chandel, A., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, I., Rao, I. ve Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2 (1): 014-032.
- Chandel, A.K., Chan, E., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V. and Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (1): 014-032.
- Chan-u-Tit, P., Laopaiboon, L., Jaisil, P., Laopaiboon, P. 2013. High level ethanol production by nitrogen and osmoprotectant supplementation under very high gravity fermentation conditions. *Energies*. 6: 884–899.
- Chen, C., Dale, M.C., Okos, M.R. 1990. Minimal nutritional requirements for immobilized yeast. *Biotechnol Bioeng*, 36: 993–1001.
- Chen, C., You, L.J., Abbasi, A.M., Fu, X. ve Liu, R.H. 2015. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 130: 122–132.
- Chen, H. ve Fu, X. 2016. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57: 468-478.
- Cheng, K.C., Catchmark, J.M. ve Demirci, A. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of biological engineering*, 3(1): 1-10.
- Cheng, K.C., Demirci, A. Ve Catchmark, J.M. 2010. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Applied microbiology and biotechnology*, 87: 445-456.
- Çöpür, Y., Tozluoğlu, a. ve Özyürek, Ö. 2011. Selülozik biyoetanol üretim teknolojisi. *Ormançılık Dergisi*, 7(1): 10-37.

- Demirbas, A. 2005. Bio-ethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Source*, 27:327–37.
- Demirbas, M.F., Balat, M. ve Balat, H. 2009. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Convers Manage*, 50:1746–60.
- Demirbaş, A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources Part 27*:327–37.
- Demirbaş, A. 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49:2106–2116.
- Demirci, A. Ve Pometto III, A.L. 1995. Repeated-batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production. *Appl. Microbiology. Biotechnology*, 43: 585-589.
- Demirci, A., Pongtharangkul, T. Ve Pometto III, A.L. 2007. Applications of biofilm reactors for production of value-added products by microbial fermentation. *Biofilms in the food environment*, 2: 167-190.
- Demirel, G. 2003. Tutuklanmış *Aspergillus niger* kullanılarak sitrik asit üretimi ve sitrik asit üretimi üzerine çeşitli etkilerin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 64 s.
- Doran, P.M., Bailey, J.E. 1986. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 73–87.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M. ve Teixeira, J.A. 2009. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.*, 12: 929–35
- Ercisli, S. Ve Orhan, E. 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4): 1380–1384.
- Erkan, S. B. 2020. Kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile etanol üretimi üzrine inhibitör maddelerin etkisinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Akdeniz üniversitesi, Antalya, 142 s.
- Esterbauer, H. 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 779–785.
- Freeman, A., Lilly, M.D. 1998. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Rev. Enzyme Microb. Technol.*, 23: 335–345.
- Fukuda, H. 1995. Immobilized microorganism bioreactors. In: Asenjo JA, Merchuk JC (Eds.), *Bioreactor system design*. Marcel Dekker, New York, pp. 339–375.

- Germec, M., Ozcan, A., Yilmazer, C., Tas, N., Onuk, Z., Demirel, F., Turhan, I. 2017. Ethanol fermentation from microwave-assisted acid pretreated raw materials by *Scheffersomyces stipitis*. *AgroLife Scientific Journal*, 6(1): 112-118.
- Germec, M., Turhan, I., Karhan, M. Ve Demirci A. 2015. Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel*, 161: 304-311.
- Gryta, M. 2002. The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. *Desalination*, 142: 79–88.
- Gupta, A. ve Verma, J.P. 2015. Sustainable bio-ethanol production from agroresidues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41: 550-567.
- GÜNEŞ, Z., KIRTIL, H.E., Küçükata, Y.Ş. ve Toprak, B. 2020. Şeker pancarı ve yan ürünlerinden biyoyakıt (etanol) üretimi ve biyoetanolün endüstriyel kullanımının değerlendirilmesi. *İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2): 16-24.
- Hatunoğlu, E. E. 2010. Biyoyakıt politikalarının tarım sektörüne etkileri, DPT. İktisadi Sektörler ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü, 2814: 32-90.
- He, X., Fang, J., Ruan, Y., Wang, X., Sun, Y., Wu, N., ... ve Huang, L. 2018. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry). *Food chemistry*, 245: 899-910.
- Ho, K., Pometto, A.L., Hinz, P.N., Dickson, J.S. and Demirci A. 1997. Ingredient selection for plastic composite supports for L-(+)-lactic acid biofilm fermentation by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Appl Environ Microbiol*, 63 (3): 2516-23.
- Ho, K.G., Pometto, A.L., Hinz, P.N. ve Demirci, A. 1997b. Nutrient leaching and end product accumulation in plastic composite support for L-(+)-lactic acid biofilm fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 63: 2524–2532.
- Horuz, A., Korkmaz, A., Akınoğlu, G. 2015. Biyoyakıt bitkileri ve teknolojisi. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*, 3(2): 69-81.
- İçöz, E., Tugrul, M.K., Saral, A. ve İçöz, E. 2009. Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey. *Biomass Bioenerg*, 33: 1–7.
- İlgin, M. 2017. Keçiboynuzu ekstraktının inülinaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak kullanımı. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 105 s.
- Iqbal, M. ve Saeed, A. 2005. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. *Letters in applied microbiology*, 40(3): 178-182.
- Izmirlioglu, G. ve Demirci, A. 2015. Enhanced bio-ethanol production from industrial potato waste by statistical medium optimization. *International journal of molecular sciences*, 16(10): 24490-24505.

- Kapluhan, E. 2014. Enerji coğrafyası açısından bir inceleme: biyokütle enerjisinin dünyadaki ve Türkiye’deki kullanım durumu. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 30: 97-125.
- Kasavi, C. 2006. Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorpsiyon metotları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 92 s.
- Kilonzo, P., Margaritis, A. ve Bergougnou, M. 2011. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. *Bioresour. Technol.*, 102: 3662–3672.
- Kirdponpattara, S. ve Phisalaphong, M. 2013. Bacterial cellulosealginate composite sponge as a yeast cell carrier for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 77: 103–109.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R. ve Koutinas, A.A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production. *Food Microbiol.*, 21(4): 377–397.
- Krylova, A.Y., Kozyukov, E.A., Lapidus, A.L. 2008. Ethanol and diesel fuel from plant raw materials. *Solid Fuel Chem.*, 42:358–64.
- Kul, S. 2014. İstatistik sonuçlarının yorumu: p değeri ve güven aralığı nedir?/interpretation of statistical results: what is p value and confidence interval?. *Plevra Bülteni*, 8(1):11.
- Kunduru, M.R. ve Pometto Iii, A.L. 1996. Evaluation of plastic composite-supports for enhanced ethanol production in biofilm reactors. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 16(4): 241-248.
- Lee, K.H., Choi, I.S., Kim, Y.G., Yang, D.J. ve Bae, H.J. 2011. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology*, 102: 8191-8198.
- Lee, S.Y., Kim, H.U., Chae, T.U., Cho, J.S., Kim, J.W., Shin, J.H. ve Jang, Y. 2019. Author Correction: A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nature Catalysis*, 2(10): 942- 944.
- Lewandowski, Z., Beyenal, H. 2007. Fundamentals of biofilm research. In: Taylor & Francis Inc. (Eds.), CRC press, New York. 615 p.
- Maryana, R. ve Wahono, S.K. 2009. Production and purification of bioethanol from molasses and cassava. In *AIP Conference Proceedings*, 1169(1): 174-178.
- Mattiasson, B., Larsson, M., Hahn-Haegerdal, B. 1984. Metabolic behavior of immobilized cells-effects of some microenvironmental factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.: Enzyme Eng.*, 434: 475–478.

- Melikoğlu, M. ve Albostan, A. 2011. Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi, 26 (1): 151-160.
- Melo, L.F., Oliveira, R. 2001. Biofilm reactors. In: Cabral JMS, Mota MM, Tramper J (eds) Multiphase bioreactor design. Taylor & Francis Inc., New York, pp 271–308.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31(3): 426-428.
- Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y.C. ve Zhang, M. 2002. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. Appl. Biochem. Biotechnol., 98-100: 885-898.
- Moustafa, K. 2017. A clean environmental week: Let the nature breathe. Science of the Total Environment, 598: 639–646.
- Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimarães, P.M., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., ... ve Teixeira, J.A. 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnology advances, 28(6):817-830.
- Najafpour, G., Younesi, H., Ku, S. ve Ku, I. 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour. Technol., 92: 251–260.
- Navarro, J.M. ve Durand, G. 1977. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. Eur. J. Appl. Microbiol., 4: 243–254.
- Nene, N.E. 2014. Yeast encapsulation for bioethanol production. Master’s Thesis, University of KwaZulu-Natal, South Africa, 97 p.
- Norton, S., D’Amore, T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. Enzyme Microb. Technol., 16: 365–375.
- Özertan, G. 2008. Biyoyakıtların Türkiye’nin enerji, tarım, çevre ve kırsal kalkınma politikaları için önemi. İktisat İşletme ve Finans, 23(262): 17-34.
- Park, J.K. ve Chang, H.N. 2000. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnol. Adv., 18: 303–319.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. ve Russell, I. 1998. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation. J. Inst. Brew, 104: 19–31.
- Pradeep, P., Sarathi Reddy, O.V., Rama Mohan, P. Ve Ko, S. 2012. Process optimization for ethanol production from very high gravity (VHG) finger millet medium using response surface methodology. Iranian journal of biotechnology, 10(3): 168-174.

- Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jørgensen, B. Ve Christensen, C. H. 2007. Bioethanol: fuel or feedstock?. *Journal of Chemical. Technology and Biotechnology*, 82: 329–333.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W. ve Heng, P.W.S. 2013. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116: 369–381.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W. ve Heng, P.W.S. 2013. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116: 369–381.
- Rossillo-Calle, F., Walter, A. 2006. Global market for bio-ethanol: historical trends and future prospects. *Energ Sustain Dev.*, 10(1): 20–32.
- Samonin, V.V., Elikova, E.E. 2004. A study of the adsorption of bacterial cells on porous materials. *Microbiology*, 73: 696–701.
- Sánchez, O.J., Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.*, 99(13): 5270–5295.
- Sarnıç, F. ve Esen, R. 2023. Dut kurusu ve sorgumdan ekstraksiyon ile şeker eldesi. Bitirme tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 25 s.
- Shirai, Y., Hashimoto, K., Yamaji, H., Kawahara, H. 1988. Oxygen uptake rate of immobilized growing hybridoma cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 113–118.
- Shuler, M.L. 1985. Immobilized whole cell bioreactors: potential tools for directing metabolism. *World Biotech. Rep.*, 2: 231–239.
- Singh, D.P. ve Dwevedi, A. 2019. Production of clean energy by green ways. In: Dwevedi, A. (Ed.), *Solutions to Environmental Problems Involving Nanotechnology and Enzyme Technology*. Academic Press, pp. 49-90.
- Singh, P., Sharma, A.K., Saran, N., Singh ve Bishnoi, N.R. 2013. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renewable Energy*, 50: 488–493.
- Solomon, B.D., Barnes, J.R., Halvorsen, K.E. 2007. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass Bioenerg.*, 31: 416–25.
- Taillandier, P., Cazottes, M.L., Strehaiano, P. 1994. Deacidification of grape musts by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads: a continuous-fluidised-bed process. *Chem. Eng. J. Bioch. Eng.*, 55: B29–B33.
- Tanaka, H., Irie, S., Ochi, H. 1989. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. *J. Ferment. Bioeng.*, 68: 216–219.

- Tesfaw, A. ve Assefa, F. 2014. Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. International Scholarly Research Notices, 1-11.
- Thangavelu, S.K., Ahmed, A.S. ve Ani, F.N. 2014. Applied Energy, 128: 277-283.
- Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V. ve Maran, J. P. 2015. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. International Journal of Biological Macromolecules, 72: 1-5.
- Tian, R.J. 2014. Separation, purification and composition analysis of polysaccharides from Mori fructus. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 29: 401-404.
- Turhan, I., Bialka, K.L. ve Demirci, A. 2010. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology, 101: 5290-5296.
- Uygun, M. 2006. Aspergillus niger ATCC 9642'nin aljinat küreleri üzerine immobilizasyonu ve bazı tekstil boyları ile zeytin karasuyunun renk gideriminde kullanılması araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 115 s.
- Ünsal, S. B. E., Tufan, H. N. G., Canatar, M., Yatmaz, H. A., Turhan, İ. ve Yatmaz, E. 2023. Ethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on 3D spheres designed by different lattice structure types. Process Biochemistry, 125: 104-112.
- Vijayalakshmi, M., Marcipar, A., Segard, E. ve Broun, G.B. 1979. Matrix-bound transition metal for continuous fermentation tower packing. Ann. N. Y. Acad. Sci., 326: 249-254.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P.A. 2007. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol., 77: 145-157.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S ve Higton, G. 2018. Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş. In: Turhan, İ. (Ed.), Palme Yayıncılık: 921, Ankara, 148 s.
- Wang, F.Q., Gao, C.J., Yang, C.Y. ve Xu, P. 2007. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. Biotechnology letters, 29: 233-236.
- Webb, C., Fukuda, H. ve Alkinson, B. 1986. The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. Biotechnol. Bioeng., 28: 41-50
- Webster, J. ve Weber, R. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge University Press, New York, 841 p.

- Wen, P., Hu, T.G., Linhardt, R.J., Liao, S.T., Wu, H. ve Zou, Y.X. 2019. Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology. Trends in food science & technology, 83: 138-158.
- Westman, J.O., Ylittero, P., Franzén, C.J. ve Taherzadeh, M.J. 2012. Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology, 96: 1441-1454.
- Xia, W., Shen, F.H., Wang, S.C. ve Zhang, W.Q. 2009. Isolation, purification and structural features of polysaccharide MPA-1 from mulberry leaves. Journal of East China University of Science and Technology, 35: 587–590.
- Yu, J., Zhang, X. ve Tan, T. 2007. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. Journal of biotechnology, 129(3): 415-420.
- Zabochnicka-Świątek, M. ve Sławik, L. 2010. Bioethanol-Production and Utilization. Archivum Combustionis, 30(3): 237-246.
- Zhang, D.Y., Wan, Y., Xu, J.Y., Wu, G.H., Li, L. ve Yao, X.H. 2016. Ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry leaves and their effect on enhancing antioxidant activity. Carbohydrate Polymers, 137: 473-479.
- Zhang, X.M., Liao, W.F., Cong, Q.F., Dong, Q. ve Ding, K. 2013. Isolation and structural characterization of the polysaccharides of cortex mori radices. Acta Chimica Sinica, 71: 722–728.

ÖZGEÇMİŞ

SeyedeH Helıya HASSANI

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2022-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2022	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya