



**ŞEKER PANCARI MELASINDAN İMMOBİLİZE
REKOMBİNANT *E.coli* KO11 İLE BİYOETANOL
ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nur Kevser DOĞAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KALENDER**

AĞUSTOS-2018

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER PANCARI MELASINDAN İMMOBİLİZE REKOMBİNANT *E.coli* KO11 İLE
BİYOETANOL ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur Kevser DOĞAN

(151132101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 23.07.2018

Tezin Savunulduğu Tarih: 08.08.2018

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KALENDER (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN (F.Ü)

Dr. Öğr. Üyesi Hakan YOĞURTÇU (M.Ü)

ELAZIĞ-2018

ÖNSÖZ

Tez süresi boyunca her konuda bilgi ve yardımını esirgemeyen danışmanım Sn. Dr. Öğr. Üyesi. Mehmet KALENDER'e, deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Lamia ÇAKMAK ve Buşra AKGÜL'e ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı babam Veysel DOĞAN' a, annem Zeliha DOĞAN' a ve kardeşlerim Yusuf İslam DOĞAN ile Muhammed İsmail DOĞAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalar FÜBAP M.F.17.13 nolu proje çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir.

Nur Kevser DOĞAN
ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER TABLOSU

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER TABLOSU	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XII
KISALTMALAR	XIV
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Yenilenebilir Enerji	3
2.2. Biyoetanol.....	4
2.2.1. Biyoetanolün Tarihi ve Günümüzdeki Kullanım Alanları	6
2.2.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	8
2.2.2.1. Şeker İçerikli Kaynaklar	9
2.2.2.2 Nişasta İçerikli Kaynaklar	11
2.2.2.3. Lignoselülozik Kaynaklar	11
2.3. Hammadde Kaynaklarına Uygulanan Ön İşlem Prosesleri	12
2.3.1. Fiziksel Ön İşlemler	13
2.3.1.1. Mekanik Ön İşlemler	13
2.3.1.2 Isıl İşlem	13
2.3.2 Kimyasal Ön İşlemler.....	14
2.3.2.1 Asit ile Ön işlem	14
2.3.2.2. Alkali Ön İşlemler	15

2.3.3. Termo/Fiziko Kimyasal Ön İşlemler	15
2.3.3.1. Buhar Patlatma.....	15
2.3.3.2. Sıcak Su Ekstraksiyonu	15
2.3.3.3. Amonyak Fiber Patlaması (AFEX).....	16
2.3.3.4. Karbondioksit Patlatma	16
2.3.4. Biyolojik Ön İşlemler	17
2.3.4.1. Mikroorganizma ile Ön İşlemler	17
2.3.4.2. Enzimatik Ön İşlemler	17
2.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	17
2.5. Fermantasyon	18
2.5.1. Kesikli Fermantasyon	20
2.5.2. Yarı -Kesikli Fermantasyon.....	23
2.5.3. Sürekli Fermantasyon	24
2.6. Hücre İmmobilizasyonu	25
2.6.1. Hücre İmmobilizasyon Teknikleri ve Destekleri.....	26
2.6.1.1. Katı Taşıyıcı Yüzeye Bağlanma ve Adsorpsiyon	26
2.6.1.2. Gözenekli Matriste Tutuklama	27
2.6.1.3. Flokülasyon (Doğal) veya Çapraz Bağlama Ajanları (Yapay) İle Kendi Kendine Kümeleşme	28
2.6.1.4. Bariyer Arkasında Hücre Tutuklama.....	28
2.7 Literatür Özeti.....	29
3.MATERYAL VE METOT	31
3.1 Materyaller.....	31
3.2. Mikroorganizmanın Suşunun Canlandırılması ve Saklanması.....	31
3.3. Hammaddeye Uygulanan Ön İşlemler	32
3.4. Enzimatik Ön İşlemin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım.....	33

3.5. Fermantasyon Deneyleri.....	33
3.5.1 İmmobilizasyon Deneyleri	36
3.6. Analiz Yöntemleri	37
3.6.1. Şeker Analizi	37
3.6.2. Alkol Analizi	37
3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
4.1. Enzimatik Hidroliz için Optimizasyon Çalışmaları	40
4.2. Fermantasyon Deneyleri.....	47
4.2.1. Kesikli Serbest Hücre Fermantasyonu	47
4.2.2 Kesikli İmmobilize Hücre ile Fermantasyon.....	48
4.2.3. Sürekli Fermantasyon	53
4.3. İmmobilize Hücrelerin Görüntülemesi	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR.....	59
EKLER	65
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖZET

ŞEKER PANCARI MELASINDAN İMMOBİLİZE REKOMBİNANT *E.coli* KO11 İLE BİYOETANOL ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, karbon kaynağı olarak şeker pancarı melası kullanılarak rekombinant *E. coli* KO11'den sürekli sistemde biyoetanol üretimi incelenmiştir. Çalışmalar hidroliz, kesikli fermantasyon (serbest ve immobilize hücrelerle) ve sürekli (immobilize hücrelerle) olmak üzere üç aşamada yürütülmüştür. Melas, içeriğinde yaklaşık % 50 sakkaroz bulunan şeker endüstrisinin bir yan ürünüdür. Yapıdaki sakkarozu yapı taşları olan glikoz ve fruktoza dönüştürmek için iki asidik ve bir enzimatik hidroliz yöntemleri uygulanmıştır. Enzimatik hidroliz diğer hidroliz yöntemlerinden daha iyi sonuç vermiştir. Bu nedenle, enzimatik hidroliz şartları Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ile optimize edilmiştir. Hidroliz deneyleri 50 ml çalışma hacmindeki 250 ml'lik erlenlerde, 55 °C ve pH 4.5'da gerçekleştirilmiştir. MKD ile toplamda 20 deney tasarlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarında invertaz enzimi kullanılmıştır ve optimum koşullar 87,77 g/L melas konsantrasyonu, 0,45 (%v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saat süre olarak belirlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında kesikli reaktörde serbest ve immobilize hücreler kullanarak biyoetanol üretim verimi araştırılmıştır. Serbest ortamda 50 ml çalışma hacmindeki 250 ml'lik erlenler kullanılmıştır. 37 °C sıcaklık ve 100 rpm inkübasyon şartlarında yapılan deneyler sonucunda % 96'lık teorik verimle biyoetanol üretilmiştir. Kesikli immobilize mikroorganizmalarla gerçekleştirilen çalışmalar için uygun boncuk yapısını elde etmek amacıyla farklı aljinat ve CaCl₂ miktarları denenmiştir. En uygun boncuk

yapısı % 3 (w/v) aljinat ile % 5 (w/v) CaCl₂ çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir. Bu boncukların kullanıldığı kesikli fermantasyon deneyinde % 93'lük teorik verime ulaşılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında kesikli sitemdeki uygun immobilizasyon şartlarında üretilen immobilize *E. Coli* KO11 suşları kullanılarak sürekli fermantasyon tekniği ile biyoetanol üretimi incelenmiştir. Bu amaçla, kullanılan sürekli sistem kolonu 3 mm kalınlık, 3 cm iç çap ve 20 cm uzunluğuna sahip borosilikat camdan yapılmıştır. Sürekli sistem kolonu dıştan bir ısıtma ceketine sahip olup, deneyler boyunca kolon sirkülasyonlu su banyosu ile 37 °C çalışma sıcaklığında tutulmuştur. Çalışmalarda hidrolizat pH'ları ise *E. coli*, KO11' in canlılık faaliyetlerini gösterebildiği 6'ya ayarlanmıştır. Farklı seyrelme hızlarının (kolon akış hızı/kolon hacmi) denendiği sürekli fermantasyon deneylerinde ise 1.68 sa⁻¹ seyrelme hızında, % 89 teorik verim elde edilmiştir. Kesikli immobilizasyon ile elde edilen % 93'lük teorik verim ile karşılaştırıldığında, sürekli sistem ile de yüksek oranda biyoetanol üretildiği söylenebilir. Sürekli sistemde maksimum etanol üretildiği sürede kesikli (36 saat) ve sürekli (60 saat) sistemlerin verimliliği karşılaştırıldığında ise, sürekli sistemin açık bir şekilde daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyoetanol, Şeker Pancarı Melası, *E.coli* KO11, optimizasyon, İmmobilize Hücre Reaktörü.

SUMMARY

INVESTIGATION OF BIOETHANOL PRODUCTION FROM SUGAR BEET MOLASSES BY IMMOBILISED RECOMBINANT *E.Coli* KO11

In this study, bioethanol production from sugar beet molasses as a carbon source has been investigated by using *E. coli* KO11 in continuous system. The studies have been conducted in three stages: hydrolysis, batch fermentation (with free and immobilized cells), and continuous (with immobilized cells). Sugar beet molasses is a by-product of the sugar industry with about 50 % sucrose in its content. Two acidic and one enzymatic hydrolysis methods were applied to convert glucose and fructose, which are the building blocks of sucrose existing in the structure. It has been determined that enzymatic hydrolysis is better than other hydrolysis methods used. Thus, the enzymatic hydrolysis conditions have been optimized by central composite design (CCD). The hydrolysis experiments have been carried out at 55 °C, in 50 ml working volume of 250 ml flasks, and at pH 4.5. Total 20 experiments have been designed by CCD. Invertase enzyme has been used in the optimization experiments. The results of enzymatic hydrolysis have been determined as 87.8 g/L molasses concentration, 0.45 (% v/v) enzyme concentration, and 15.93 h time.

The stage of second, yield of bioethanol production have been investigated by using free and immobilization cells in a batch reactor. In free media, working volume of 50 ml has been used flasks with volume of 250 ml. As a results of experiments under conditions carried out incubation at 37 °C and 100 rpm, bioethanol was produced with a theoretical yield of 96 %. To obtain suitable bead structure for studies performed by immobilized microorganisms

in the batch system, different alginate and CaCl_2 quantities were tried. The best available bead structure has been obtained by using solution with alginate concentration of 3 % (w/v) and CaCl_2 concentration of 5 % (w/v). Theoretical fermentation yield of 93% was achieved in the batch fermentation experiment using these beads.

The final stage of this work, the continuous bioethanol production has been investigated by using immobilized *E.coli* KO11 strain obtained at the suitable immobilization conditions in the batch system. For this purpose, the continuous system column made of borosilicate glass has 3 mm of thick, 3 cm of inner diameter, and 20 cm of length. The continuous system column has a heating jacket from the outside. The working temperature of the column has been kept at 37 °C during the experiments. The pH of hydrolysates has been adjusted to 6, where *E.coli* KO11 can show activity. In continuous fermentation experiments, the effect of different dilution rates (column flow rate/column volume) on the bioethanol yield has been examined. 89 % of yield has been obtained from the experiments carried out at dilution rate of 1.68 h^{-1} . Compared with the theoretical yield of 93 % obtained by batch immobilization experiment results, it can be said that bioethanol is produced at high rate by continuous system. It is thought that the continuous system is clearly advantageous when the productivity of the continuous (36 hours) and continuous (60 hours) systems is compared while the maximum ethanol is produced in the continuous system.

Keywords: Bioethanol, Sugar Beet Molasses, *E.coli* KO11, Optimization, Immobilized Cell Reactor.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Dünyadaki toplam enerji üretimi ve yüzde değerleri	3
Şekil 2.2. Dünyadaki toplam yenilenebilir enerji üretim miktarları.....	4
Şekil 2.3. Biyoetanolün kimyasal yapısı	5
Şekil 2.4. Küresel etanol üretimi ve 2017 yılına ön görülen fiyat ve ticareti.....	7
Şekil 2.5. Ülkemizde mevcut biyoetanol üretimi ve toplam potansiyeli,* sadece potansiyel	8
Şekil 2.6. Ön işlem metotlarının sınıflandırılması	13
Şekil 2.7. Glikozun glikoliz döngüsüyle etanole dönüşüm mekanizması.....	20
Şekil 2.8. Kesikli bir sistemde mikroorganizmalara ait tipik bir büyüme eğrisi.....	21
Şekil 2.9. Kesikli fermantasyonun şematik olarak gösterimi.....	22
Şekil 2.10. Yarı kesikli fermantasyonun şematik olarak gösterimi.....	23
Şekil 2.11. Sürekli fermantasyonun şematik olarak gösterimi.....	25
Şekil 2.12. Hücre İmmobilizasyon Teknikleri ve Destekleri	27
Şekil 3.2. İmmobilizasyonun yapılışı.....	39
Şekil 4.1. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre melas konsantrasyonu-enzim miktarı ikili etkileşiminin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisi	43
Şekil 4.2. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre melas konsantrasyonu-süre ikili etkileşiminin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisi	43
Şekil 4.3. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre enzim konsantrasyonu-süre ikili etkileşiminin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisi	44
Şekil 4.4. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre melas konsantrasyonunun indirgen şeker konsantrasyonu üzerine tek başına etkisi	45
Şekil 4.5. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre enzim konsantrasyonunun indirgen şeker konsantrasyonu üzerine tek başına etkisi	45
Şekil 4.6. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre sürenin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine tek başına etkisi	46

Şekil 4.7. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre deneysel karşılık hesaplanan değerlerin değişimi	46
Şekil 4.8. Mikroorganizmanın serbest halde ürettiği biyoetanol konsantrasyonunun zamanla değişimi	48
Şekil 4.9. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında % 2 (w/v)'lik aljinat kullanımı ile yapılan fermantasyon sonucu zamanla biyoetanol konsantrasyonunun değişimi	49
Şekil 4.10. % 3 (w/v)'lik aljinat kullanımı sonucunda yapılan fermantasyon deneyinin sonuçları	51
Şekil 4.11. % 4 (w/v) aljinat kullanımı sonucunda yapılan fermantasyon deneyinin sonuçları	52
Şekil 4.12. Farklı seyrelme hızlarındaki fermantasyon deneylerinin zamana bağlı şeker ve biyoetanol konsantrasyonundaki değişimler D1:1.68 sa ⁻¹ D2:2.4 sa ⁻¹ D3: 4.56 sa ⁻¹	55
Şekil 4.13. Taramalı elektron mikroskopunda taze boncuğu 100 kat büyütülmüş görüntüsü	56
Şekil 4.14. Taramalı elektron mikroskopunda taze boncuğun görüntüsü; (a) 5000 kat büyütülmüş dış yüzeyi; (b) 10000 kat büyütülmüş dış yüzey	56
Şekil 4.15. 1.68 sa ⁻¹ seyrelme hızının kullanıldığı fermantasyon deneyindeki boncuğun 72 saat sonra görüntüsü	57
Şekil 4.16. 2.4 sa ⁻¹ seyrelme hızının kullanıldığı fermantasyon deneyindeki boncuğun 72 saat sonra görüntüsü	57

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Biyoetanolün kimyasal, termal ve fiziksel özellikleri	5
Tablo 2.2. 2016 yılında ülkelerin üretmiş oldukları biyoetanol miktarları.....	7
Tablo 2.3. Şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi (%73-79 kuru madde)	10
Tablo 2.4. Şeker pancarı melasındaki başlıca mineraller (73-79 kuru madde)	10
Tablo 2.5. Şeker pancarı melasındaki aminoasitler (%73-79).....	10
Tablo 2.6. Şeker pancarı melasındaki azot içeren organik bileşikler (%73-79)	10
Tablo 2.7. Şeker pancarı melasındaki önemli anyonlar (%73-79).....	11
Tablo 2.8. Bazı mikroorganizmaların yaşayabileceği pH aralığı.....	19
Tablo 3. 1. Modifiye edilmiş katı Luria-Bertani (LB)	32
Tablo 3.2. MKD ile tasarlanan deney sayısı ve bağımsız değişkenler değeri.....	34
Tablo 4.1. Farklı ön işlemler sonrasında ortamda var olan şeker miktarları	39
Tablo 4.2. Asidik hidrolize etki eden değişkenleri inceleyen aralıkları ve kodlu değişkenler.....	40
Tablo 4.3. Hidroliz şartları için MKD ile elde edilen deneysel çalışma şablonu ve elde edilen sonuçlar.....	41
Tablo 4.4. Kuadratik modelin rsm ile elde edilen anova test sonuçları.....	41
Tablo 4.5. Şeker Pancarı Melasının Enzimatik Hidrolizi için Kuadratik Modelin Uygunluk Testine ait İstatistiksel Parametrelerin Değerleri.....	42
Tablo 4.6. Kesikli serbest hücre fermentasyonu biyoetanol miktarları (g/L).....	47
Tablo 4.7. Farklı kalsiyum klorür içerikleri ve süreler için %2 (w/v)'lik aljinat kullanımı sonucunda oluşan biyoetanol miktarları (g/L).....	49
Tablo 4.8. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında % 2 (w/v)'lik aljinat kullanımı sonucunda oluşan boncukların fiziksel özellikleri ve deneysel kinetik parametreleri	50
Tablo 4.9. Farklı kalsiyum klorür içerikleri ve süreler için %3 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan biyoetanol miktarları (g/L).....	51

Tablo 4.10. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında% 3 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan boncukların fiziksel özellikleri ve deneysel kinetik parametreleri	51
Tablo 4.11. Farklı kalsiyum klorür içerikleri ve süreler için % 4 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan biyoetanol miktarları (g/L).....	52
Tablo 4.12. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında% 4 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan boncukların fiziksel özellikleri ve deneysel kinetik parametreleri	53
Tablo 4.13. Farklı seyrelme hızlarında zamanla oluşan biyoetanol ve ortamdaki şeker konsantrasyonu değerleri.....	54
Tablo 4.14. Farklı seyrelme hızlarındaki fermantasyon denemelerindeki kinetik parametreleri.....	54

KISALTMALAR

MTEP: Milyon ton eşdeğer petrol

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AFEX: Amonyak Fiber Patlaması

MKD: Merkezi Kompozit Dizayn

RSM: Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology)

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

GC: Gaz kromatografisi

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

ICR: İmmobilize Hücre Reaktörü

LB: Luria-Bertani

E.coli: *Escherichia coli*

ppm: Milyonda bir

w/v: ağırlık/ hacim

v/v: hacim/hacim

saat: sa

1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artması ve endüstriyel faaliyetlerin çoğalması sebebiyle dünyada enerjiye duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Bu enerji ihtiyacının büyük bir kısmı fosil yakıtlarla karşılanmaktadır. Fosil yakıtların giderek rezervlerinin tükenmesi ve sebep olduğu çevresel sorunlardan dolayı, alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç vardır. Fosil yakıtların yanmasıyla havaya salınan kirletici gazların sebep olduğu atmosfer kirliliği; dünya üzerinde, sera etkisi yaparak ciddi sorunlara sebep olmaktadır. Örneğin, sera etkisi küresel ısınmanın temel etkeni olup dünya üzerinde yaşayan tüm canlıların yaşamsal faaliyetlerini doğrudan etkilemektedir.

Fosil yakıtların sebep olduğu bu olumsuz durum yenilenebilir enerjiye duyulan ihtiyacı daha da önemli hale getirmektedir. Çevre dostu olması, kaynak çeşitliliği ve fosil yakıtlara göre rezerv zenginliği, yenilenebilir enerjinin dikkat çekici en önemli özelliklerindendir.

Üretilen yenilenebilir enerji türleri arasında ki en büyük paya biyoyakıtlar sahiptir. Biyoyakıtlardan ise en fazla üretilen yakıt, biyoetanoldür. Biyoetanol petrole alternatif bir yakıt olmakla beraber çok işlevsel bir yakıt türüdür. Biyoetanol şeker, nişasta ve lignoselülozik olmak üzere üç temel kaynaktan üretilir. Şeker esaslı kaynaklara şeker pancarı, şeker kamışı, melas gibi fabrikasyon hammadde ve atıklarının yanı sıra birçok sakkaroz ve özellikle glikoz ve fruktoz gibi şekerleri içeren materyaller örnek verilebilir. Sakkaroz biyoetanol üretiminde çoğu durumda direkt fermente edilemediğinden çeşitli yöntemlerle glikoz ve fruktoza dönüştürülmelidir. Nişasta içerikli kaynaklar mısır başta olmak üzere çeşitli tahıllar ve patates, sorgum gibi yumrulu bitki ürünleridir. Bu kaynakların biyoetanol üretiminde kullanılması gıda olarak tüketimde ihtiyaç fazlasının olmadığı durumlarda çok iyi fizibilite çalışması gerektirir. Ülkemizde Konya, Amasya, Adana, Bursa gibi illerimizde melas, mısır ve buğdaydan biyoetanol üretiminin gerçekleştirildiği tesisler bulunmaktadır. Lignoselülozik kaynaklar ise bitki kalıntıları, hububat atıkları ve bitkisel ürünleri işleyen fabrika atıkları başta olmak üzere birçok selüloz, hemiselüloz ve lignin içeren maddelerdir. Lignoselülozik materyaller biyoetanol üretiminde kullanılmadan önce selüloz ve hemiselülozu glikoz ve ksiloz gibi 5 ve 6 karbonlu monosakkaritlere dönüştürülmelidir. Bu amaçla, lignoselülozik hammadde bir

seri ön işleme tabi tutulmaktadır. Ön işlemler bir taraftan proses maliyetini yükseltirken, diğer taraftan bazı ön işlemler ile lignin bir sonraki basamak olan fermantasyonda mikroorganizma faaliyetlerini olumsuz yönde etkileyen fenolik bileşikler gibi bir takım yan ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır.

Biyoetanol üretiminde çeşitli tip reaktörler kullanılabilir. Bu reaktörler kesikli, yarı kesikli ve sürekli olarak sınıflandırılabilir. İyi tasarlanmış sürekli sistem fermantörlerle başta üretim verimliliği olmak üzere birçok yönden avantajlı biyoetanol üretimi yapılabilmektedir.

Melas şeker fabrikalarının atığı olup, yüksek oranda sakkaroz içeren (yaklaşık % 50) vizskoz bir sıvı üründür. Şeker pancarı ya da kamışının türüne bağlı olarak bileşimi değişim gösterebilmektedir. Melas önemli oranda demirin yanında kalsiyum, magnezyum ve potasyum gibi diğer mineralleri de içerir. Başlıca yem, ilaç, gübre, inşaat, kozmetik, tarım olmak üzere birçok endüstride hammadde olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde birçok şeker fabrikasından önemli oranda melas üretilmektedir. Türkşeker 2017 faaliyet raporuna göre ülkemizde 25 şeker fabrikasından 2015, 2016 ve 2017 yıllarına ait toplam melas üretimi miktarı sırasıyla 368, 502 ve 490 Bin tondur. Melasın biyoetanol üretiminde kullanıldığı fabrikaların yanı sıra bu üretim prosesini geliştirici bilimsel araştırma niteliğindeki çalışmalar da yapılmaktadır.

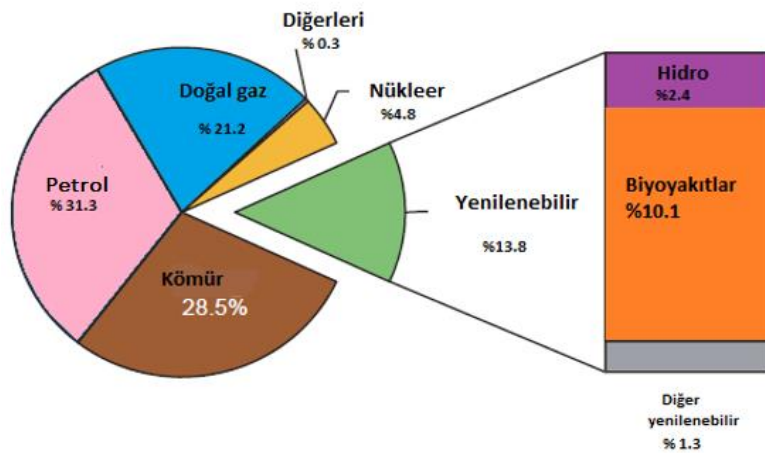
Bu tezde ülkemizde de üretimi olan şeker pancarı melasından rekombinant *E. Coli* KO11 suşunun immobilize edilerek sürekli sistemde biyoetanol üretiminde kullanılması incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ

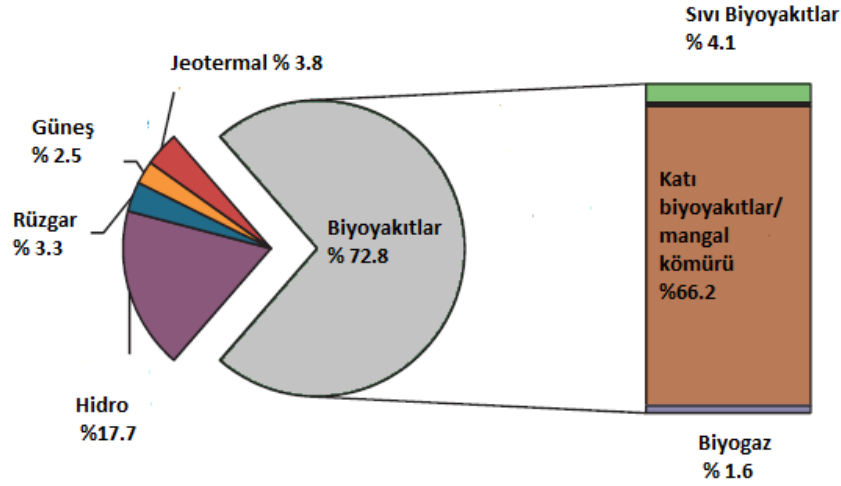
2.1. Yenilenebilir Enerji

Geçmişten günümüze enerji ihtiyacının büyük bir kısmı fosil yakıtlarla karşılanmaktadır. 2014 yılında, dünyadaki toplam birincil enerji arzı 13,700 MTEP (milyon ton eşdeğer petrol)' dur. Bunun 13,8'i (1,894 MTEP) yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilmektedir. 1990 yılından günümüze kadar yıllık % 2,2'lik bir büyüme oranına sahip olan yenilenebilir enerjiye duyulan ihtiyaç ise her geçen gün artmaktadır (Anonim 1). Dünyada üretilen enerji türleri ve üretimdeki payları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Yenilenebilir enerji, güvenli ve sürdürülebilir şekilde elde edilen enerji olup, enerji sektörünün sosyal, çevresel ve ekonomik olumsuzluklarını azaltacak bir enerji türüdür (Dawoud vd., 2007). Başlıca yenilenebilir enerji türleri; biyokütle, güneş, rüzgar, jeotermal ve hidroelektriktir. Dünyada üretilen yenilenebilir enerjideki en büyük paya Şekil 2.2'de gösterildiği gibi % 72,8'lik pay ile biyoyakıtlar sahiptir. Biyoyakıtlar da kendi bünyesinde katı, sıvı ve gaz biyoyakıtlar olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. Biyoyakıtlar birçok yönden avantajlıdır. Başlıca avantajlar; iklim değişikliği ve kirlетici gazların azaltılması, tarımsal faaliyetlerin artması ve atıkların kullanımı, petrol fiyatının orantısız artışı ve enerji piyasasındaki güvensizliğe alternatif, çevresel faydalar ve olumlu sosyo-ekonomik faktörlerdir (Çelebi ve Uğur, 2015).



Şekil 2.1. Dünyadaki toplam enerji üretimi ve yüzde değerleri (Anonim 1)



Şekil 2.2. Dünyadaki toplam yenilenebilir enerji üretim miktarları (Anonim 1)

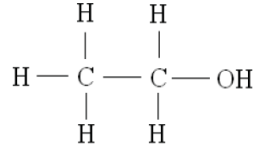
Sahip olduğu bu avantajlar sayesinde biyoyakıtların üretimi her geçen gün artmaktadır. Avrupa’da 2005 ile 2030 yılları arasında sıvı biyoyakıtların % 6,3’lük bir yıllık büyüme oranına sahip olması beklenmektedir. Sıvı biyoyakıtların % 4,1’lik kısmını oluşturan biyoetanol, dünyada bugüne kadar kullanılan en yaygın biyoyakıtlardan biridir (Coppola vd., 2009).

2.2. Biyoetanol

Biyoetanol şeker içeren hammadde kaynaklarından mikroorganizmal faaliyetler sonucu oluşan iki karbonlu bir alkolüdür. Bu tür bir üretim fermantasyon ile gerçekleşip, hammadde kaynağının türüne göre proses farklılıkları içerir. Kısaca biyoetanol petrokimyasal kaynaklardan üretilen etanole alternatif, mikrobiyal fermantasyon sonucu oluşan etil alkoldür (Walker, 2012). Biyoetanolün kimyasal yapısı Şekil 2.3’de gösterilmiştir. Biyoetanolün etil alkolden herhangi bir farkı olmayıp fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

Biyoyakıtlar için biyokütle dönüşümü, hem alternatif enerji kaynağı oluşturma, hem de CO₂, NO₂, SO₂ gibi kirletici gazlar ve toksik yanma ürünlerinin azaltılması ile biyobozunurluk açısından önemli bir seçenek sunmaktadır (Belgiorno vd., 2003). Yüksek oktan sayısı, düşük sera gazı emisyonunu, benzinle her oranda karıştırılabilme, benzinde kurşun yerine oktan artırıcı olarak kullanım, dizel motorlarda setan sayısında uygunluk gibi

birçok özellik ile biyoetanol içten yanmalı (ateşlemeli ve dizel) motorlarda çok büyük avantajlar sağlar (Balat ve Balat, 2009; Hernández ve Kafarov, 2009).



Şekil 2.3. Biyoetanolün kimyasal yapısı (URL-1,2018)

Tablo 2.1. Biyoetanolün kimyasal, termal ve fiziksel özellikleri (Aydoğan vd., 2010)

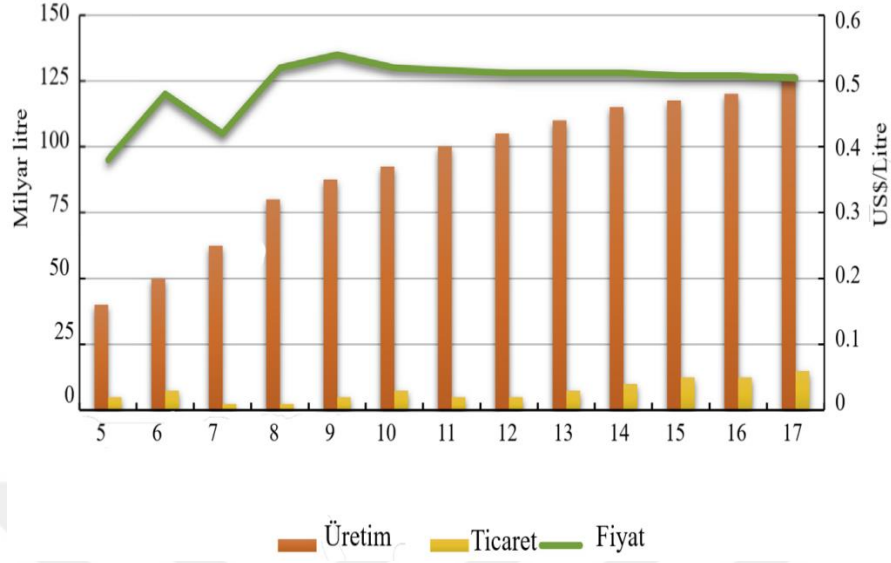
Kimyasal özellikler	
Formül	C ₂ H ₅ OH
Molekül ağırlığı	46,1
Karbon(wt)	% 52,1
Hidrojen(wt)	% 13,1
Oksijen(wt)	% 34,7
C/H(wt)	4
Fiziksel Özellikler	
Özgül Ağırlık (kg/dm ³)	0,79 kg/dm ³
Buhar basıncı (38 °C) (mmHg)	50
Kaynama Sıcaklığı (°C)	78,5
Dielektrik katsayısı	2,3
Suda çözünme	∞
Termal Özellikler	
Alt ısıt değeri (kcal/kg)	6,400
Tutuşma Sıcaklığı (°C)	35
Özgül Isı (kcal /kg °C)	0,6
Erime Noktası (°C)	-115

Biyoetanol sahip olduğu birçok avantajla, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin enerji ve yakıt politikalarında kullanımı zorunlu olan yenilenebilir enerji kaynaklarının başında gelmektedir (Demirbaş, 2009). Ülkemizde de etanolün benzinle karıştırılması için EPDK tarafından yayınlanan tebliğ söz konusudur (URL-2,2018). Görüldüğü gibi yakıt başta olmak üzere etil alkolün kullanıldığı kozmetik, ilaç, içecek, gıda ve daha birçok alanda (Anonim 2) biyoetanol kimyasal olarak üretilen etil alkole alternatif bir kaynaktır.

2.2.1. Biyoetanolün Tarihi ve Günümüzdeki Kullanım Alanları

Etanol yakıt olarak ilk 1800'lü yılların sonlarına doğru modern motorlu taşıtların icadı ile kullanılmaya başlanmıştır (Demirbaş, 2009; Solomon vd., 2007). Biyoetanol ise, 1970'lerdeki OPEC petrol krizinden sonra alternatif bir enerji kaynağı olarak üretilmiştir. 1975 yılında Brezilya şeker kamışından, 1978 yılında ise ABD mısırdan biyoetanol üretmeye başlamıştır. Bu ülkelerde biyoetanol üretimi hükümetler tarafından teşvik edilmiştir. Bu ülkelerin ardından diğer ülkelerde de biyoetanol üretimine başlamıştır (Cardona ve Sánchez, 2007; Kumar vd., 2010; Soccol vd., 2010). Yenilenebilir bu enerji kaynağı günümüzde hala ilgi odağıdır (Göksungur ve Zorlu, 2009). Dünyada üretilen biyoetanol miktarı ve fiyatı hakkında bilgi veren bir grafik Şekil 2.4'de gösterilmiştir. 2015 yılında dünyadaki biyoetanol üretimi % 4,1 oranında artmıştır (Anonim 3). Dünyadaki biyoetanolün yakıtlar içerisindeki payı 2005 yılı tahminleriyle karşılaştırıldığında, 2030 yılı üretim kapasitesi 7 kat artarak benzin tüketiminin %10-20'sine ulaşması beklenmektedir (Walter vd., 2008).

Dünyada biyoetanol üretiminin yapıldığı ülkeler ve üretim miktarları Tablo 2.2'de verilmiştir. Ülkemizde Konya başta olmak üzere diğer bazı şeker fabrikalarında melastan; Bursa ve Adana illerimizde ise mısır ve/veya buğday olmak üzere biyoetanol üretimi gerçekleştirilmektedir. Fakat üretim kapasitesi benzine olan ihtiyacının tamamını veya benzine katkı maddesi olarak katılma miktarını karşılayamamaktadır (Melikoğlu ve Albostan, 2011). Türkiye'deki biyoetanol üretim kapasitesi mevcut biyoetanol üretim tesislerine göre 800.000 L/gün'dür (Bayrakçı ve Koçar, 2012).

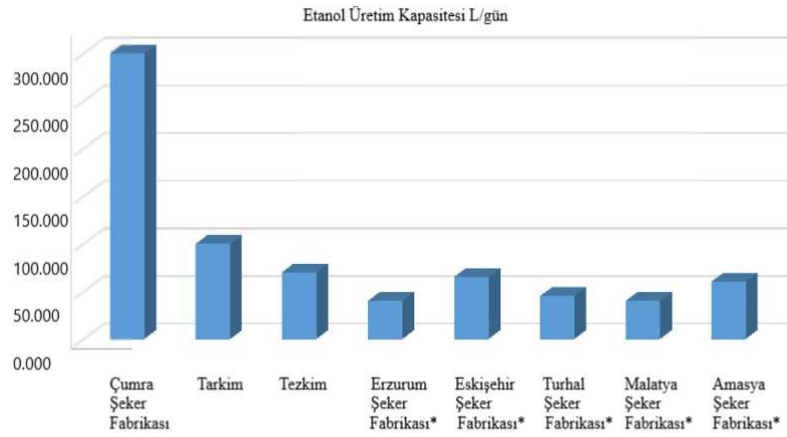


Şekil 2.4. Küresel etanol üretimi ve 2017 yılına ön görülen fiyat ve ticareti (Anonim 4)

Tablo 2.2. 2016 yılında ülkelerin üretmiş oldukları biyoetanol miktarları (Anonim 5)

Ülkeler	Milyon galon
ABD	15250
Brezilya	7295
Avrupa Birliği	1337
Çin	845
Kanada	436
Tayland	322
Arjantin	264
Hindistan	225
Diğer	490

Ülkemizde etanol üreten 12 tesis bulunmaktadır fakat bunların sadece 3 tanesi yakıt olarak biyoetanol üretmektedir. Diğerleri içecek endüstrisi için üretim yapmaktadır (Bayrakçı Özdingiş ve Koçar, 2018). Şekil 2.5'te ülkemizde var olan biyoetanol fabrikalarının ürettiği etanol miktarı ile üretim potansiyeli gösterilmiştir.



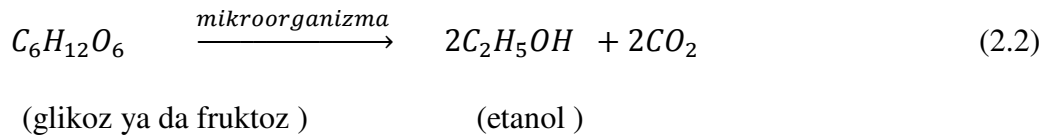
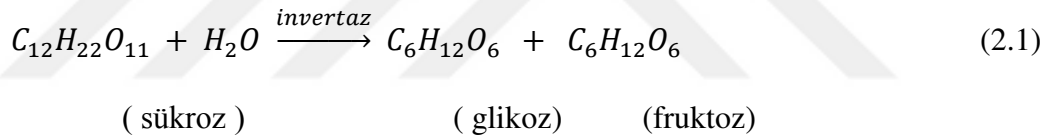
Şekil 2.5. Ülkemizde mevcut biyoetanol üretimi ve toplam potansiyeli,* sadece potansiyel (Özdingiş vd., 2018)

2.2.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Biyoetanol üretiminde çeşitli hammadde kaynakları kullanılmaktadır. Başlıca kullanılan hammadde kaynakları şeker, nişasta veya lignoselülozik yapıları içeren bitkisel kaynaklardır (Bayrakçı, 2009). Ülkelerin iklimsel şartları doğrudan tarımsal faaliyetlerini de etkileyeceğinden, biyoetanol üretimi uygun iklim şartlarında yetiştirilmesi kolay ve bol olan bitkilerden yapılmaktadır. Örneğin, ABD mısırı, Avrupa şeker pancarı ve buğdayı, Brezilya; şeker kamışını biyoetanol üretmek amacıyla kullanmaktadır (Akalın ve Seyrekbasan, 2015). ABD ve Brezilya dünyanın en büyük biyoetanol üreticileridir (Lapan ve Moschini, 2012). Avrupa ülkelerinde etanol üretimin de hammadde olarak en fazla sakkaroz içeren şeker pancar melası kullanılır. Sakkaroz içeren hammaddelerden etanol üretim işlemlerinde hammaddenin ulaşılabilirliği ve taşınması üretim maliyeti üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Melastan biyoetanol üretiminde hammadde maliyeti son etanol fiyatının % 70'ine karşılık geldiği yapılan bir çalışmayla ortaya konulmuştur (Cardona ve Sánchez, 2007). Şeker pancarının işlenmesi sonucu oluşan bir atık olan melas, içerdiği bazı faydalı eser elementler ve yüksek sakkaroz içeriğinden dolayı fermantasyon için kullanımı en uygun materyallerden biridir (Rodríguez vd., 2010).

2.2.2.1. Şeker İçerikli Kaynaklar

Şeker içerikli kaynakların en bilinenleri şeker pancarı ve şeker kamışıdır. Bunun yanında şeker pancarı sapları, şeker pancarı yumrusu, tatlı sorgum sapları ve şeker pancarı melası ile şeker kamışı melası gibi tarımsal atıklarda kullanılır. Şeker içerikli kaynaklar, biyoetanol üretmek için kullanılan diğer selülozik kaynaklar ve nişasta içerikli kaynakların aksine ön işlem gerektirmez ve doğrudan biyoetanol üretmek için kullanılır. Bu durum, sakkarozu düşük verimle biyoetanole dönüştüren mikroorganizmalar için geçerli olmayıp, böyle proseslerde hidrolize ihtiyaç duyulur. Şeker pancarı önemli miktarda şeker içerir bu yüzden Fransa başta olmak üzere Avrupa'daki birçok ülke biyoetanol üretmek amacıyla şeker pancarını kullanır. Ancak, şeker üretiminde de kullanılan şeker pancarından biyoetanol üretimi fabrikanın atığı olan melastan biyoetanol üretimine göre dezavantajlıdır. Bu durum şeker kamışı için de geçerlidir. Şeker pancarı melasının yaklaşık % 48'i, şeker kamışı melasının ise yaklaşık % 60'ı sakkarozdan oluşmaktadır (Ghorbani vd., 2011; Anonim 2; Anonim 6). Sakkarozun glikoza ve fruktoza hidrolizi ve sonrasında fermentasyonla alkol üretim mekanizmaları aşağıda verilmiştir:



Şeker endüstrisinin bir yan ürünü olan melas, kristalize edilemeyen koyu renkli viskoz bir sıvıdır. Yaklaşık %80-85 briks oranına sahip olan melas, hayvan yemi olarak ve fermentasyon teknolojisinde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Hayvan yemi olarak kullanılacak melasın kuru madde oranı seyreltilerek %70-75 oranına çekilmelidir (Draycott, 2008). Şeker pancarı melası içeriğinde yaklaşık olarak %50 sakkaroz ihtiva etmektedir. İçeriğinde bulunan diğer karbonhidratlar glikoz, fruktoz, rafinoz ve oligo ya da polisakkaritler olup içeriğin yaklaşık %1'ini oluştururlar ve üretim süreci melas bileşimini doğrudan etkiler (Anonim 7). Şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi Tablo 2.3'de, içerdiği başlıca mineraller Tablo 2.4'de, aminoasitler Tablo 2.5'te, azot içeren bileşikler Tablo 2.6'da ve anyonlar ise Tablo 2.7'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi (%73-79 kuru madde) (Anonim 7)

	Aralık (kuru madde %)
Ham Kül	6,6-10,0
Ham Protein	6,6-11,1
Eter Ekstreksi	0,0-0,3
Ham Fiber	0,0-0,3
Sakkaroz	43,0-50,5

Tablo 2.4. Şeker pancarı melasındaki başlıca mineraller (73-79 kuru madde) (Anonim 7)

Mineraller	Aralık (kuru madde %)
Kalsiyum	0,1-0,5
Fosfat	0,02-0,06
Magnezyum	0,01-0,3
Sodyum	0,6-1,9
Potasyum	3,2-4,7

Tablo 2.5. Şeker pancarı melasındaki aminoasitler (%73-79) (Anonim 7)

Aminoasitler	Aralık (kuru madde %)
Lisin	0,04
Metiyonin	0,04- 0,01
Metionin+Sistin	0,1-0,11
Treonin	0,1-0,11
Triptofan	0,1-0,24
İzolösin	0,1-0,27
Leucine	0,12-0,26
Valin	0,17-0,20
Histidin	0-0,02
Arginin	0,02
Fenilalanin	0,04-0,06
Glutamik asit	3-4

Tablo 2.6. Şeker pancarı melasındaki azot içeren organik bileşikler (%73-79) (Anonim 7)

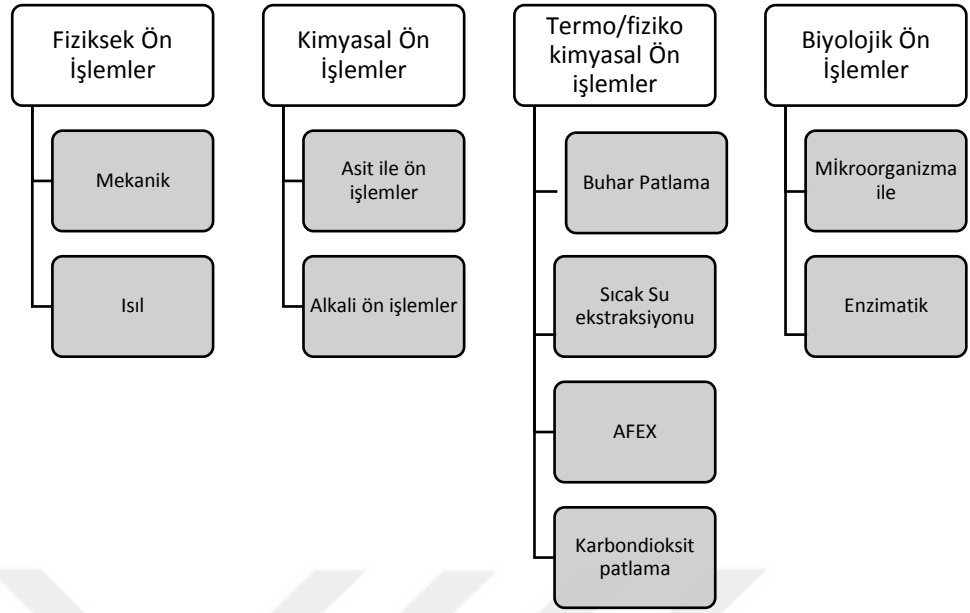
Azot içeren organik bileşikler	Aralık (kuru madde %)
Toplam azot içeren bileşikler	11-16
Betaine	4-5
Amino asitler, pirolidon karbonik asit, peptitler, nükleik asit bileşenleri	3-4
Aminoasit şeker kompleksleri	1-2

Tablo 2.7. Şeker pancarı melasındaki önemli anyonlar (%73-79) (Anonim 7)

Bitkiler; selüloz, hemiselüloz ve lignin içeren selülozik kaynaklardır. Bitki hücrelerinde, hücreyi iç ve dış etkilere karşı korunmayı sağlayan bir hücre duvarı yapısı mevcuttur. Bu duvar yapısal olarak % 40-60 arasında selülozdan, % 20-40 arasında hemiselülozdan ve % 10-25 arasında ligninden oluşur. Bu yapıya genel olarak lignoselülozik yapı denilir. Selüloz, mikrofiber demetlerin içinde toplanan β -glikoz monomerlerinin uzun zincirlerinden oluşur. Hemiselüloz ise bitki türüne bağlı olarak ksilan ve ksilogulakandan olabilir, bu yapıların omurgası da β -glikoz monomer zincirlerinden oluşur. Bu zincirlere de ksiloz (5C) bağlıdır. Lignin ise hücreye sertlik kazandıran bir bileşendir. Bu kompleks polimerler bitkilerin sapları, yaprakları, gövdesi ve kök kısmında bulunur. Bu selülozik ve hemiselülozik kaynaklar önemli oranda şeker ihtiva etmektedir. Fakat bu kaynakları biyokimyasal olarak etanole dönüştürmek zordur. Selülozun içeriğindeki şekeri ortaya çıkarmak hemiselüloz içeriğindeki şekeri ortaya çıkarmaktan daha zordur. Ligninde bu biyokimyasal dönüşüme karşı dirençlidir. Bu nedenle selülozik kaynaklar asidik veya termokimyasal gibi ön işlemlere tabi tutulurlar (Kumar vd., 2010).

2.3. Hammadde Kaynaklarına Uygulanan Ön İşlem Prosesleri

Ön işlemlerde, kullanılacak olan hammadde kaynağının içeriğinde kompleks yapılar basit şekerlere dönüştürülür. Bu işlemin amacı, mikroorganizmaların fermentasyonda basit şekerleri kullanabilmesini sağlamaktır. Ayrıca mikroorganizma inhibisyonuna neden olabilecek hammadde içeriğinde ki yapıların uzaklaştırılması işlemi de ön işlemlerin amaçlarından biridir. Kullanılacak olan hammaddeye göre uygulanacak ön işlemler de değişmektedir. Şeker içerikli hammaddeler doğrudan fermentasyon ortamında kullanılabilecekken selüloz içerikli hammaddeler karmaşık yapılarından dolayı doğrudan fermentasyon ortamına verilemez, bu kaynakların belirli ön işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Ön işlemler; fiziksel ön işlemler, kimyasal ön işlemler, termo/fiziko kimyasal ön işlemler ve biyolojik ön işlemler olmak üzere 4 ana başlık altına toplanabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ön işlem metodlarının sınıflandırılması

2.3.1. Fiziksel Ön İşlemler

2.3.1.1. Mekanik Ön İşlemler

Mekanik ön işlemlerin amacı, hammaddenin yüzey alanını artırmak, polimerizasyon derecesini düşürmek ve lignoselülozik kaynakların kristal yapısını bozmaktır. Öğütme derecesine göre hammaddenin parçacık büyüklüğü yaklaşık olarak 10-30 mm ya da 0.2-2 mm arasında olur. Farklı öğütme prosesleri mekanik ön işlemlerde uygulanabilir. Başlıca kullanılan prosesler; kolloid değirmeni, ekstrüzyon makinesi, merdane değirmeni, kriyojenik değirmen, çekiçli değirmen, bilyalı değirmen ve çekiç frezelemesi prosesleridir. Hammadde kaynaklarının öğütülmesi sırasında kullanılan enerji, hammaddenin özelliğine göre de değişmektedir. Ayrıca kullanılan enerji, maliyeti önemli ölçüde arttırmaktadır ve mekanik ön işlemin bir diğer dezavantajı ise lignini parçalayamamasıdır (Sun ve Cheng, 2002; Taherzadeh ve Karimi, 2008).

2.3.1.2 Isıl İşlem

Isıl işlem bir önceki işlemde mekanik olarak gerçekleştirilen materyalin yapısını ısı enerjisi kullanarak bozmaktır. Bazı kaynaklarda piroliz bu amaç için kullanılan terim olduğundan bu tez çalışmasında da ön işlem başlığı altında değerlendirme yapılmıştır. Piroliz havasız (oksijensiz veya inert) ortamda organik maddelerin yüksek sıcaklıklara ısı

bozundurulması işlemi olarak tanımlanır. Isıtma veya kısmi yanma olan piroliz, biyokütleden ikincil yakıtların ve kimyasal ürünlerin üretiminde kullanılır (Bridgwater, 2003).

Piroliz işlemi üç ana basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamak uçucu madde çıkışının çok fazla olmadığı ve genellikle karbon oksitleri ve suyun açığa çıktığı basamaktır ve 100-300 °C sıcaklık aralığında gerçekleşir. Bozunmanın ikinci basamağında uçucu maddenin %75'i oluşur, üçüncü kademede ise katı ürün oluşumu ile birlikte, ikincil gazlar meydana gelir ve bunu takiben yoğunlaşmayan gazlar, özellikle de hidrojen oluşur. Piroliz işlemi boyunca; parçalanma, izomerizasyon, dehidrojenasyon, aromatikleşme, koklaşma gibi reaksiyonlar oluşmakta ve H₂O, H₂, CO, CO₂, CH₄, C₂H₄ gibi gaz ürünler, bazı organik bileşikler, sıvılar ve katı ürün açığa çıkmaktadır. Katı ürün (char) yüksek kalorifik değere sahip olduğundan yakıt olarak, doğrudan briket olarak ya da aktif karbon hazırlamak için besleme hammaddesi olarak kullanılabilir (Vassilev vd., 2012).

2.3.2 Kimyasal Ön İşlemler

Kimyasal ön işlemlerin asit ile ön işlem ve alkali ile ön işlem olmak üzere iki farklı uygulanması mevcuttur. Bu ön işlem metodu hem etkilidir hem de maliyeti düşüktür.

2.3.2.1 Asit ile Ön işlem

Asit ile ön işlemin amacı biyokütledeki karmaşık yapıları; derişik veya seyreltik asitler yardımıyla monomerlerine ayırma işlemidir. Bu ön işlem metodunda seyreltik asit kullanımı hem ön işlem maliyeti bakımından hem de etanol üretimini inhibe edici bazı bileşiklerin oluşmaması bakımından daha caziptir. Derişik asit kullanımı ekipmanlarda korozyona neden olacağı için bakım ve onarım maliyetlerini arttıracaktır. Ayrıca derişik asit kullanımı bir sonraki adım olan nötralizasyonda zorlukların yanında özellikle lignoselülozik materyaller için lignin parçalama ürünlerinden olan fenolik bileşik oluşumu gibi problemlere de yol açacaktır (Taherzadeh ve Karimi, 2008).

İki tip seyreltik asit ile ön işlem metodu vardır. Bunlardan birincisi yüksek sıcaklıkta (180 °C) kısa süreli muamele, ikincisi de düşük sıcaklıkta (120 °C) uzun süreli (30-60 dakika) muameledir. Yüksek hidroliz verimi için en fazla kullanılan seyreltik asit çözeltisi sülfürik asit çözeltisidir. Sülfürik asidin yanında fosforik asit, nitrit asit, oksalik asit, formik asit, asetik asit ve maleik asit de kullanılmaktadır (Maurya vd., 2013).

2.3.2.2. Alkali Ön İşlemler

Alkali ile ön işlem proseslerinde bazik çözeltiler kullanılır. Bu metot daha çok lignin içeren kaynaklar için kullanılır. Hammadde çözelti içerisinde bir miktar ısıtılarak belirli bir süre ısıtılır. Bu işlemi yapmanın amacı, hammaddenin şişirilerek selülozik iç yüzey alanını arttırmaktır. İç yüzeyi artan selülozik hammaddedeki lignin daha kolay parçalanabilir. Böylece hammaddenin polimerizasyon derecesi ve kristalinitesini de azaltılır (Adıgüzel, 2013; Kumar vd., 2010; Taherzadeh ve Karimi, 2008).

Farklı maddeler kullanarak alkali ön işlemleri gerçekleştirebiliriz. Başlıca kullanılan maddeler kireç ve sulu amonyaktır. Her ikisinin de farklı avantajları mevcuttur. Kireç muamelesinde karbonhidrat kaybı en az tutularak lignin ayrıştırılır. Bu metotta hammadde, kalsiyum hidroksit ile farklı basınç ve sıcaklıktaki suya maruz bırakılır. Bu metodun diğer metotlara göre avantajları, selülozik yapının korunması, pahalı olmaması ve ucuz olmasıdır. Sulu amonyakla muamele genellikle düşük miktarda lignin içeren tarımsal atıklardaki lignin uzaklaştırılması için kullanılır. Amonyanın uçuculuğu, ucuz olması ve işlem sonrasında herhangi bir zararlı yan ürünün oluşmaması bir avantajıdır. Fakat hammadde içeriğinde hala hemiselüloz olması da bir dezavantajdır (Adıgüzel, 2013).

2.3.3. Termo/Fiziko Kimyasal Ön İşlemler

2.3.3.1. Buhar Patlatma

Buhar patlatma, lignoselülozik kaynaklar için en fazla kullanılan termo/fiziko kimyasal ön işlemdir. Bu metotta hammadde bir kaç dakika boyunca yüksek basınçlı buhara maruz bırakılır ve basıncın aniden düşürülmesiyle hidrotermal bir ön işlem yapılmış olunur. Bu ön işlem metodundan hemiselüloz yapısındaki asetil grubunun hidrolizi sağlanır. Su, yüksek basınçta asidik bir etki göstererek kimyasal bir işlem yapmış olur. Mekanik olarak ise basıncın aniden düşmesiyle dekompresyon meydana gelen yapıdaki lifler parçalanır (Alvira vd., 2010; De Araujo vd., 2002).

2.3.3.2. Sıcak Su Ekstraksiyonu

Sıcak su ekstraksiyonda hidrotermal bir metot olup herhangi bir katalizör gerektirmez. Buradaki basınç, yüksek sıcaklıkta suyun sıvı halde tutulmasını ve lignoselülozik materyalin yapısında değişiklikler meydana getirmek için kullanılır. Sıvı sıcak suyun burada ki amacı hemiselülozu çözündürmek ve inhibitörlerin oluşumunu

engellemektir. Ekstraksiyon sonrasında biri katı diğeri sıvı olmak üzere iki farklı fraksiyon oluşur. Katı fraksiyon selülozca zengindir, sıvı fraksiyon ise hemiselüloz yapısından ayrılmış şekerlerce zengindir. Bu ön işlemden inhibitör oluşumunu engellemek amacıyla pH aralığını 4-7 arasında tutmak gerekmektedir. Bu pH aralığında hemiselüloz oligomerik formda olur, monomer oluşumu düşük tutularak üründe bozunma oranı daha da düşük olur. Bu ön işlem %80 hemiselüloz içeren ot–saman gibi otsu bitkiler ile buğday ve şeker kamışı gibi hammadde kaynaklarında da kullanılarak enzimatik sindirilebilirliğini artırır. Bu ön işlemde hemiselüloz içeriğindeki şekeri optimize etmek ve enzimatik sindirilebilirliğini artırmak için iki basamakta gerçekleştirilir. Sıcak su ile ön işlemde lignin depolimerizasyona uğrar fakat bu yeterli değildir yani tam bir dehidrasyon meydana gelmemiştir bu nedenle asit ilave edilir. Bu da kullanılan ekipman da korozyona neden olabileceğini gösterir. Maliyet bakımında tasarruflu sayılabilecek bir prosesdir. Ayrıca giren su miktarının artırılması hemiselüloz ve lignin konsantrasyonunu ürünlerde düşürebileceği için bu metod avantajlıdır (Alvira vd., 2010; Mosier vd., 2005)

2.3.3.3. Amonyak Fiber Patlaması (AFEX)

AFEX ile ön işlem prosesinde hammadde, 60 ile 100 °C'lık sıcaklık aralığında, yüksek basınç altında sıvı amonyak ile muamele edilir. Basınç daha sonra normal şartlara indirilerek hammaddedeki liflerin şişmesiyle fiziksel bozulmalar başlar. Bu selülozun kısmen kristalleşmesine ve karbonhidrat–lignin bağlarının bozulmasına neden olur. Selülozik hammadde ki astil grupların uzaklaştırılmasıyla sindirilebilirliği de artırır. Diğer ön işlemler metodlarında ki gibi burada sıvı ve katı bir fraksiyon oluşmaz. AFEX'le sadece önceden muamele edilmiş bir katı madde üretilir. Bu proses de etanol üretimi engelleyici inhibitör oluşmaması en önemli avantajıdır. Fakat düşük lignin içeriğine sahip hammaddelere uygulanabilmesi, amonyak maliyeti ve çevresel sorunlar oluşturmaması bu metodun dezavantajlarından bir kaçıdır (Alvira vd., 2010; Maurya vd., 2013; Mosier vd., 2005; Sun ve Cheng, 2002).

2.3.3.4. Karbondioksit Patlatma

Bu yöntem CO₂'in süperkritik bir akışkan olarak kullanılması üzerine kurulmuştur. Sıvı benzeri güçlü bir solvent çözücüsü yardımıyla kütle transferi meydana gelmektedir. Enzimatik sindirilebilirliği artırarak lignin açığa çıkmasını sağlar. Süperkritik akışkan olarak CO₂ kullanımı, nispeten düşük maliyetli olması, yanmaması, düşük inhibitör

oluşumu, toksik olmayışı, ekstraksiyondan kolayca geri kazanılması ve çevreye uygunluğu gibi birçok konudan ötürü ekstraksiyon solventi olarak kullanılır. CO₂' in sulu çözeltilerde karbonik asit oluşturarak ve hidroliz oranını artırır (Kim ve Hong, 2001; Schacht vd., 2008; Zheng vd., 1998).

2.3.4. Biyolojik Ön İşlemler

2.3.4.1. Mikroorganizma ile Ön İşlemler

Termo/fiziko kimyasal metotlar biyolojik ön işlemlere kıyasla büyük miktarlarda enerji gerektirmekte ve çevresel kirliliğe neden olmaktadır. Bu nedenle biyolojik ön işlem metotları çevreye dost alternatif bir metot olarak görülmektedir (Wan ve Li, 2012). Bu metotta selülozik veya hemiselülozik yapıyı parçalayabilen, topraktan, canlı bitkilerden veya lignoselülozik atıklardan izole edilmiş olan filamentöz mantarlar kullanılmaktadır (Vats vd., 2013). Yapılan çalışmalarda beyaz çürükçül mantarlarının biyolojik ön işlem metotlarında en etkili mantar türü olduğu belirlenmiştir. Bu beyaz çürükçül mantarlara *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus* ve *P. Chrysosporium* örnek verilebilir. Bu beyaz çürükçül mantarlar lignini parçalayabilecek peroksidaz ve mangana bağımlı peroksidaz enzimlerini üretebilirler (Kumar vd., 2010; Maurya vd., 2013; Mosier vd., 2005).

2.3.4.2. Enzimatik Ön İşlemler

Şeker içerikli, nişasta içerikli ve lignoselüloz içerikli hammaddelere uygun, yapıdaki şekeri açığa çıkaran enzimlerin kullanılmasıyla bu ön işlem metodu yapılır. Enzim kullanımı; sakkarafikasyon ve fermente ortamların da yani yüksek substrat konsantrasyonlarında inhibitör bileşiklerin ortaya çıkmamasına neden olabilir. Düşük enerji gereksinimi, diğer ön işlemlere oranla maliyetinin düşük olması, kimyasal kullanılmaması ve hafif çevre koşullarında ön işlemin gerçekleşmesi enzimatik ön işlemlerin avantajlarından biridir.

2.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyoetanol üretmek amacıyla *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca* ve *Escherichia coli* gibi çeşitli mikroorganizma suşları kullanılmaktadır.

Saccharomyces cerevisiae ökaryotik bir canlı olup büyük ölçekli üretimlerde kullanılan bir mikroorganizmadır. Aerobik koşullarda biyoetanol üretir. Birinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerdeki şekerin fermente edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmanın bir dezavantajı ikinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan selülozik hammaddenin içeriğindeki pentozu fermente edememesidir (Walker, 2012).

Zymomonas mobilis etanol üreten bakteriler arasında en çok bilinen, gram negatif bir bakteridir. Fakat büyük ölçekli üretimlerde besiyeri ortamındaki stres mikroorganizmayı fazlasıyla etkilediği için biyoetanol üretim verimliliği düşüktür (Walker, 2012).

Klebsiella oxytoca, selülozun bir bozulma ürünü olan selobiyoz da dahil olmak üzere çeşitli şeker dizisini metabolize ederek biyoetanol üretiminde kullanılır (Brooks, 2015). Bu mikroorganizma da *Zymomonas mobilis* gibi büyük ölçekli üretimlerde besi yerindeki strese dayanıklı değildir (Walker, 2012).

Rekombinant *Escherichia coli* suşları biyoetanol üretmek amacıyla kullanılır. Günümüzde bu amaçla rekombinant *E.coli* KO11 kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Bu rekombinat bakteri; *Zymomonas mobilis*'in adhB(alkol dehidrojenaz) ve pdc (piruvat dekarboksilaz) gibi genlerinin gen teknolojisi yardımıyla *E.coli*'ye aktarılmasıyla elde edilmiştir. Bu genler, etanol yolak genleri olup, bu genlere sahip mikroorganizma belirli ön işlemler sonrasında pentozu ve heksozu parçalayarak biyoetanol üretir (Cardona ve Sánchez, 2007; Ohta vd., 1991; Takahashi vd., 2000).

2.5. Fermantasyon

Fermantasyon, mikroorganizmaların büyüme, gelişme, üreme, hatta yaşlanması ve ölümü sırasındaki biyokimyasal aktivitelerini içeren bir süreçtir. Bu süreçte mikroorganizmalar katı veya sıvı hammaddeyi çeşitli ürünlere dönüştürürler. Fermantasyon teknolojisindeki temel ilke, organizmanın kullanacağı; karbon, azot, tuz, eser elementler ve vitaminler gibi tüm ihtiyacını karşılayan hammaddelerin sağlanarak uygun koşullar altında ürün oluşumunu sağlamaktır. Fermantasyon teknolojisi ilaç, gıda, alkollü içecek, enzim, hormon, atık su arıtımı ve enerji eldesi gibi yüksek ticari değere sahip çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Chisti, 1999).

Fermantasyon sürecini etkileyen bazı önemli parametreler vardır. Bunlar başlıca; pH, su aktivitesi, oksijen ihtiyacı, sıcaklık ve substrattır.

Tablo 2.8. Bazı mikroorganizmaların yaşayabileceği pH aralığı (Ayhan, 2000)

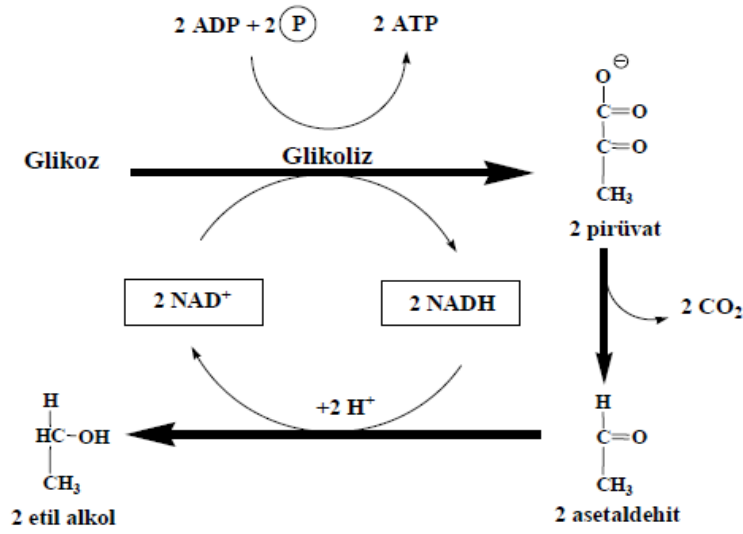
Mikroorganizma	Minumum	Optimum	Maksimum
Bakteri	4,5	6,5-7,5	9,0
Küf	15-3,5	4,5-6,8	9,0-11,0
Maya	1,5-3,5	4,0-6,5	8,0-8,5

pH: Her mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetlerini sürdürebileceği optimum bir pH aralığı vardır. pH değeri bakterinin yaşamını doğrudan etkileyen önemli bir parametredir. Bakterilerin pH aralığı, küf ve mantarlara göre daha dardır. pH gereksinimlerine göre mikroorganizmalar dört grup altında incelenirler. Bunlar; asidofiller, nütrofiller, alkofiller ve eskremofillerdir olup çalışma pH aralıkları Tablo 2.8’de verilmiştir (Ayhan, 2000; A. Bayrakçı, 2009).

Su aktivitesi: Bir hammadde içeriğindeki suyun buhar basıncının, aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına oranıdır. Her mikroorganizmanın kendi yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi için kendisine ait spesifik bir su aktivitesi vardır. Bakteriler 0.91’in altındaki su aktivitelerinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürmezken mayalarda bu rakam 0,88; küflerde ise 0,80’dir (Ayhan, 2000).

Oksijen ihtiyacı: Mikroorganizmalara göre çeşitlilik gösteren farklı bir parametredir, hatta bazı mikroorganizmalar oksijene ihtiyaç duymamaktadır. Oksijen ihtiyacı mikroorganizmanın ürettiği fermantasyon ürünün özelliklerinde de etkilidir. Buna göre, mikroorganizmalar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Arda, 2000):

- Yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için oksijene ihtiyaç duyan (aerobik mikroorganizmalar),
- Oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilen (fakültatif mikroorganizmalar),
- Oksijene ihtiyaç duymadan üreyebilen (anaerobik mikroorganizmalar),
- Havadaki oksijen miktarı yaklaşık % 2-10 arasında olduğunda yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilen (mikroaerofilik mikroorganizmalar)
- Oksijen istemeyen fakat oksijenin varlığında da üreyebilen (aerotolerantlı mikroorganizmalar)



Şekil 2.7. Glikozun glikoliz döngüsüyle etanole dönüşüm mekanizması (Yiğitoğlu vd., 2005)

Etanol fermantasyonunda mikroorganizma anaerobik koşullar altında glikozu; biyoetanol ve karbondioksit'e dönüştürür. Mikroorganizma bu dönüşümü Şekil 2.5'te gösterildiği gibi glikoliz döngüsüyle sağlar (Yiğitoğlu vd., 2005).

Sıcaklık: Her mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu farklı bir sıcaklık değeri vardır. Sıcaklık ihtiyacına göre mikroorganizmalar; psikrofil (5 °C – 25 °C), termofil (50 °C – 60 °C) ve mezofil (25 °C – 40 °C) olarak çeşitlilik gösterebilirler (Ayhan, 2000). Biyoetanol üretimde en fazla kullanılan mikroorganizmalardan *Saccharomyces cerevisiae* 30 °C'de; *Escherichia coli*'de 37 °C'de yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmektedirler.

Substrat: Besin maddeleri mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetleri gerçekleştirip, üreyebileceği; karbon ve azot kaynaklarının yanında hidrojen, fosfor, vitamin ve gerekli iz elementlerini de içermesi gerekmektedir.

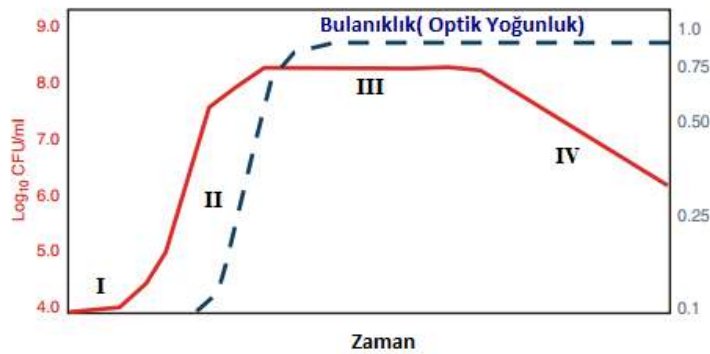
Biyoetanol üretimde kullanılan fermantasyon teknolojileri başlıca kesikli, yarı kesikli ve sürekli sistemlerdir. Her üç sisteminde kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları mevcuttur.

2.5.1. Kesikli Fermantasyon

Endüstriyel proseslerde genellikle kesikli fermantasyon kullanılmaktadır. Kesikli fermantasyonda biyoreaktörün içerisine tüm ortam bileşenleri eklenir, mikroorganizmalar ortama aşılanır ve belirli bir süre inkübasyona bırakılır. Bu süre zarfında biyoreaktöre herhangi bir bileşen eklenmez veya herhangi bir ürün çıkışı yapılamaz. Belirli sürenin

sonunda biyoreaktör boşaltılarak temizlenir ve yeni işlem için hazırlanır (Yılmaz, 2009). Şekil 2.7'dan görüldüğü üzere, büyüme eğrisi değişik fazlardan oluşmaktadır. Bu fazlar; lag fazı, eksponansiyel büyüme fazı, durgun faz ve ölüm fazıdır (Pepper vd., 2011).

- I. Lag Fazı:** Mikroorganizmaların ortama alışma evresidir. Bu fazın süresi mikroorganizma türüne veya kullanılan besi ortamına göre göre değişim göstermektedir. Bu evrede hücre bölünmesi gerçekleşmez. Aşılana mikroorganizma sayısında herhangi bir değişiklik olmaz ama besi ortamından alınan substrat ve su, protein sentezi ve RNA sentezi gibi hücre aktivitelerinde kullanıldığı için mikroorganizma bölünmesi olmadığı halde biyokütle artış meydana gelmektedir.
- II. Eksponansiyel Faz:** Bu fazda mikroorganizmaların çoğalmasında geometrik bir artış meydana gelmektedir. Büyüme hızı maksimuma ulaşmıştır ve pratik olarak büyüme hızı sabittir.
- III. Durgun Faz:** Bu fazda mikroorganizmaların kullandığı karbon kaynakları tükenmiştir ve ortamdaki toksik madde miktarının artışı hücre büyümesini olumsuz yönde etkileyerek, hücrelerin yaşlanmasına ve büyüme hızının yavaşlamasına neden olur. Bu fazdaki büyüme dengesizdir fakat oluşan mikroorganizma ile ölen mikroorganizma sayısı dengelenir ve toplam hücre sayısı sabit kalır.
- IV. Ölüm Fazı:** Büyüme eğrisinin son fazı olan bu fazda net hücre ölümleri meydana gelmektedir. Bu fazda hücre çoğalması meydana gelebilir fakat ölen organizma sayısı oluşan organizma sayısından fazladır.



Şekil 2.8. Kesikli bir sistemde mikroorganizmalara ait tipik bir büyüme eğrisi (Pepper vd., 2011)

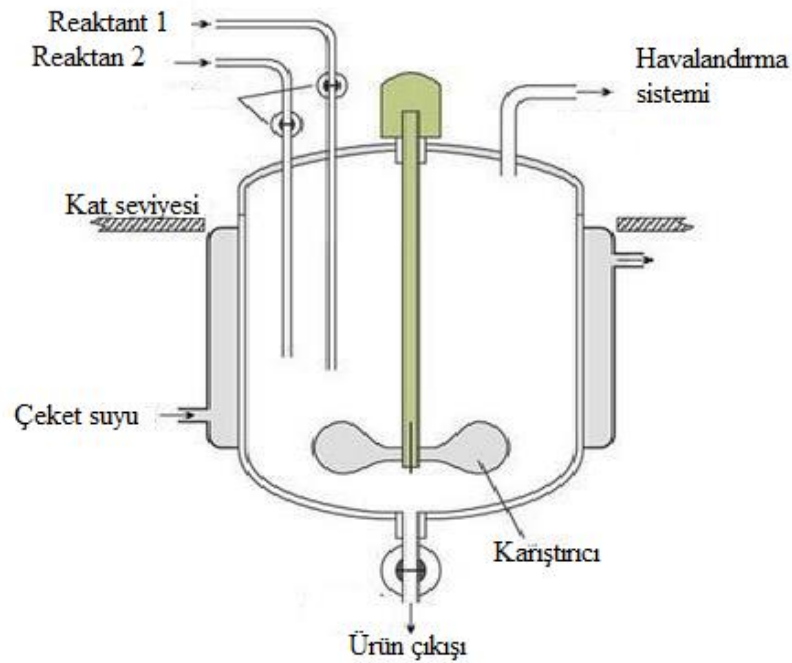
Özellikle lignoselülozik hammadde kaynakları kullanılarak elde edilmiş hidrolizatlardan kesikli sistemlerde biyoetanol üretiminde hücre inhibisyonuna neden olabilecek bileşenlerin ortamda kalma süresi olumsuzluklara yol açabilir. Böyle bir durumda fermantasyon işleminin etkinliği kısıtlanacaktır. Bu nedenle hücreye detoksifikasyon işlemi uygulanmalıdır. Bu durumda da etanolün hacimsel verimliliği düşecektir (Babu vd., 2014).

Kesikli fermantasyonun avantajları:

- Finansal kayıp riski düşüktür.
- Çok iyi tanımlanmış kültürasyon süresine sahip olduğu için daha az kontaminasyon ve hücre mutasyon riski vardır.

Kesikli fermantasyonun dezavantajları:

- Önemli bir zaman kaybı vardır.
- Her üretimden önce yeni bir aşıl hazırlanması gerekmektedir.
- Her işlemde önce ve sonra yapılan sterilizasyon sebebiyle malzemede aşınmalar meydana gelebilir.
- Lag fazının uzunluğu verimliliği düşürür.



Şekil 2.9. Kesikli fermantasyonun şematik olarak gösterimi (URL-3,2018)

2.5.2. Yarı -Kesikli Fermantasyon

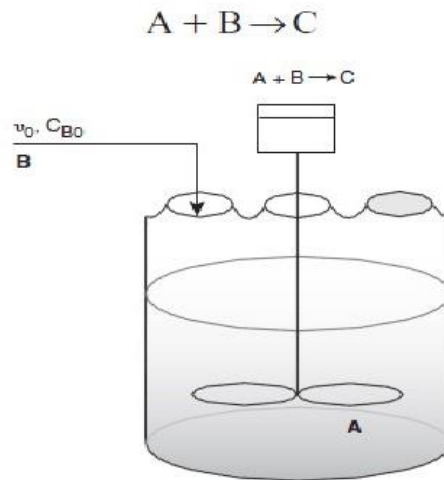
Yarı-kesikli fermantasyonda, fermantasyon ortamına sürekli olarak besleme çözeltisi, mineral ve vitamin eklenmesi yapıldığı halde aynı oranda ürün çıkışı yapılmaz. Reaktör hacminin %75'i dolduğunda proses tamamlanır ve yeni süreç için biyoreaktör boşaltılarak hazırlanır. Yarı kesikli fermantasyon biyoetanol üretiminde kullanılan popüler bir fermantasyon çeşididir ve Şekil 2.10'da şematik olarak gösterilmiştir (Çaylak ve Sukan, 1998).

Lignoselülozik hammadde kaynaklarından elde edilen hidrolizatın kullanıldığı yarı-kesikli fermantasyonu düşük bir substrat ilavesiyle başlanmalıdır ki furfural ve hidroksimetilfurfural gibi inhibisyona neden olabilecek maddelerinin konsantrasyonu düşük seviyede kalsın. Bu maddelerin yüksek konsantrasyonlarda bulunması hücre büyümesini ve dolayısıyla etanol üretimini negatif yönde etkiler (Babu vd., 2014).

Yarı- kesikli fermantasyonun avantajları (Paulov, 2016):

- Daha fazla ürün sentezlenmesine olanak sağlar.
- Yüksek hücre konsantrasyonu ve yüksek biyokütleyle bu sistemle ulaşılabilir. Bu avantajları sayesinde ürün miktarı da artırılır.
- Kontrollü ve ardışık bir şekilde ortama substrat ilavesiyle verim ve ürün kapasitesi artırılır.

Yarı-kesikli fermantasyonun en önemli dezavantajı ise kültür hacminin sabit tutulamamasıdır.



Şekil 2.10. Yarı kesikli fermantasyonun şematik olarak gösterimi (URL-4,2018)

2.5.3. Sürekli Fermantasyon

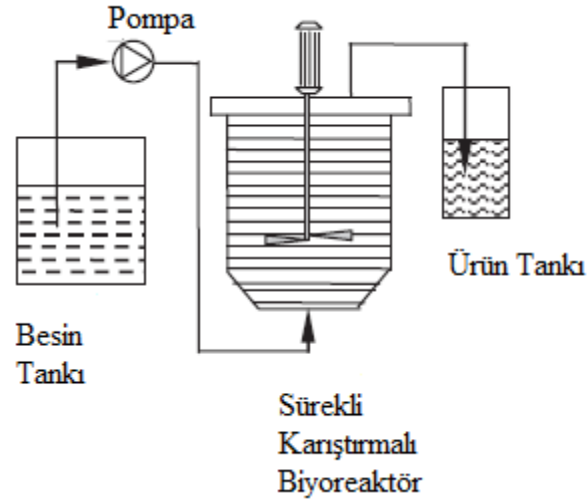
Sürekli sistemlerde mikroorganizmalar eksponansiyel fazda tutulur. Biyoreaktörün içine sürekli ortam bileşenleri eklenir ve aynı anda ortamdaki bileşenler ve hücre uzaklaştırılır. Bu durumda, kültür hacmi, biyokütle veya hücre sayısı, ürün ve substrat konsantrasyonları ile pH, sıcaklık ve çözünmüş oksijen gibi sistemin fiziksel parametrelerinin fermantasyon boyunca sabit kalması sağlanır (McNeil ve Harvey, 2008). Şekil 2.11’de sürekli fermantasyon şematik olarak gösterilmiştir.

Sürekli sistemin avantajları (Journal vd., 2008; McNeil ve Harvey, 2008):

- Kurulum maliyeti kesikli sisteme kıyasla düşüktür. Ayrıca otomasyon sistemi ile üretim maliyetleri düşürülebilir.
- Üretim sırasında besleme akış hızı değiştirilerek büyüme oranı ve verimlilik optimize edilebilir.
- Sistemde aksaklık olmadığı zaman uzun süreli verimlilik sağlanır. Bununla birlikte sistemin sürekli çalışması mekanik arızaya neden olabileceğinde sistem zaman zaman durdurulmalıdır.
- Yüksek hücre konsantrasyonu sağlamak amacıyla sürekli sistemlerde immobilize hücreler kullanılabilir. Immobilize hücreler taze besi yeri ile bir zar yardımı ile temas ettirilir. Hücre oksijen ve substrat ile beslenirken atıklar ve istenilen ürün sistemden sürekli uzaklaştırılır. Hücreler membran bariyerler ile tutulur.
- Bu sistemde mikroorganizmanın evrimi kolayca incelenebilir. Hücreler sabit bir ortamda çoğaltıldığından sıcaklık, pH ve besin sınırlaması gibi faktörlerin neden olduğu fizyolojik, metabolik veya genetik değişimler kolayca incelenebilir.

Sürekli sistemin dezavantajları:

- Kullanılabileceği prosesler sınırlıdır. Antibiyotik, monoklonal antikor ve toksin madde gibi üretimi büyümeye bağlı olmayan ürünlerde plazmid kaybı riski olduğundan sürekli sistemler kullanılmaz.
- Kontaminasyon riski yüksektir.
- Hücre yıkanması meydana gelebileceğinden, ürün kaybı riski mevcuttur.
- Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanıldığı sistemlerde kültür mutasyonu meydana gelebilir ve istenilen ürün üretilemez.



Şekil 2.11. Sürekli fermantasyonun şematik olarak gösterimi (Han vd.,2012)

2.6. Hücre İmmobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu, hücrelerin istenilen biyolojik aktivite kaybı olmadan belirli bir bölgede tutturulması veya hapsedilmesi olarak tanımlanır. Hücreler hareketsiz bir sistemde kapsüllendiğinden mikrokapsülasyon veya biyokapsülasyon terimleri de kullanılmaktadır (Nedovic ve Willaert, 2006).

Son yıllarda fermantasyon teknolojisinde sıkça immobilize edilmiş hücreler kullanılmaktadır. Biyoetanol üretmek amacıyla kullanılan endüstriyel sürekli fermantasyon sistemlerinde immobilize edilmiş hücrelerin kullanılmasının avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Çaylak ve Sukan, 1998; Ghorbani vd., 2011).

- İmmobilizasyon yüksek hücre konsantrasyonu,
- Daha yüksek hücrenin stabilitesi,
- Ürünün ayrılmasında kolaylık,
- Geliştirilmiş ürün proses kontrolü,
- Hücre kontaminasyonundaki duyarlılığın azalması sonucunda verimin artması,
- Yüksek seyrelme oranlarında hücre yıkama sorunlarını ortadan kaldırma,
- Hücre kurtarma nedeniyle oluşan proses maliyetlerinin azalması ve hücrenin tekrardan kullanılabilmesi,
- Genetik kararlılığı artırma,

- Yüksek hücre konsantrasyonu ve yüksek akış oranlarında yüksek hacimsel verimlilik.

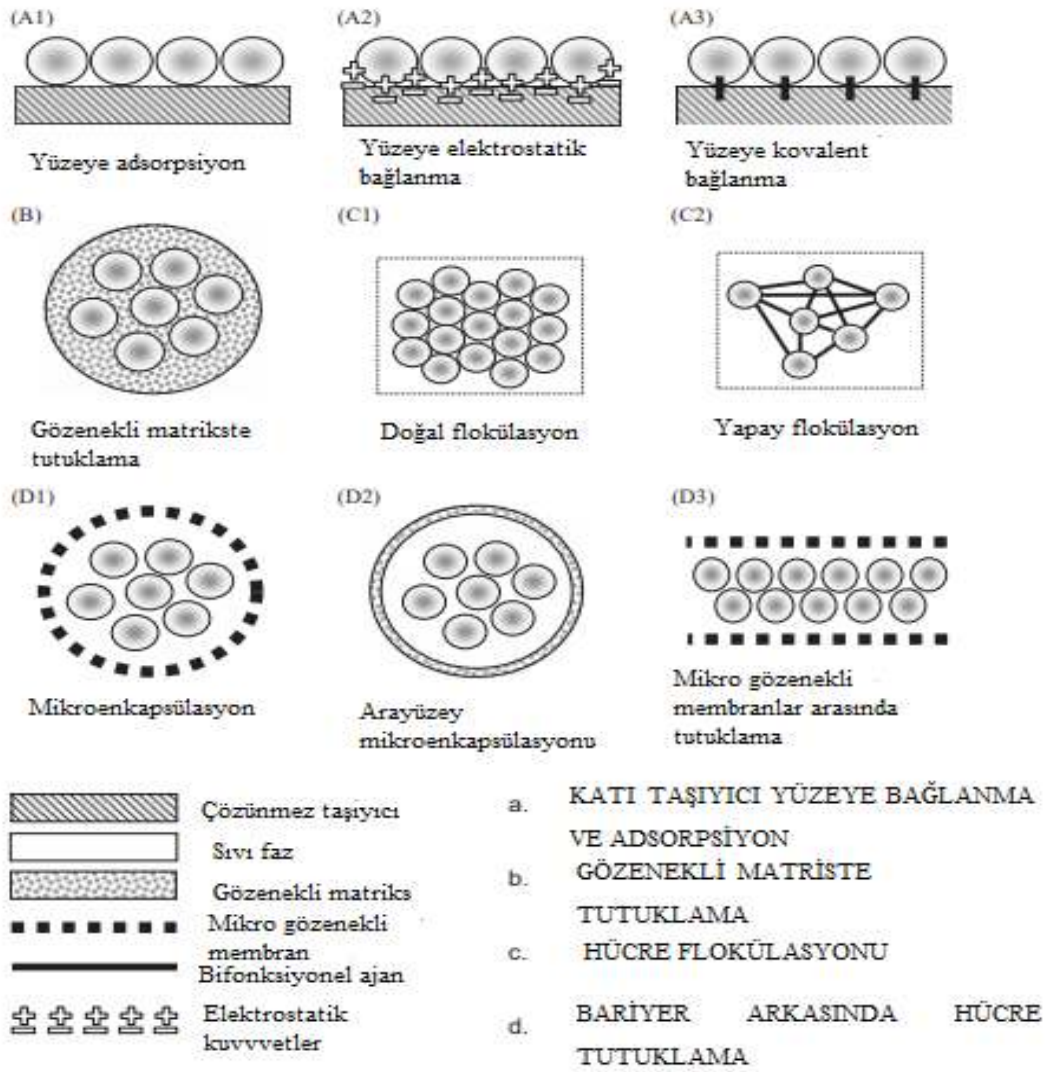
2.6.1. Hücre İmmobilizasyon Teknikleri ve Destekleri

Çok sayıdaki biyoteknolojik proses immobilize hücre kullanımı ile avantajlı hale getirilmiştir. Bu nedenle çeşitli teknikler ve destek materyalleri geliştirilmiştir. Bu teknikler kullanılan fiziksel mekanizmaya göre dört ana kategoriye ayrılır (Pilkington vd., 1998). Bu mekanizmaların görsel olarak şematize edildiği bir grafik Şekil 2.12’de gösterilmiştir.

- a) Katı taşıyıcı yüzeye bağlanma ve adsorpsiyon
- b) Gözenekli matriste tutuklama
- c) Flokülasyon (doğal) veya çapraz bağlama ajanları (yapay) ile kendi kendine kümeleşme
- d) Bariyer arkasında hücre tutuklama

2.6.1.1. Katı Taşıyıcı Yüzeye Bağlanma ve Adsorpsiyon

Katı taşıyıcı yüzeye hücre immobilizasyonu, elektrostatik kuvvetlere bağlı fiziksel adsorpsiyon veya hücre membranı ile taşıyıcı arasındaki kovalent bağ ile yapılır. Bu teknikte hücreler elektrostatik kuvvetlerin veya diğer zayıf kuvvetlerin birlikte etkisiyle yüzeydeki doğal boşluklarda gelişerek immobilize olur. Hücre süspansiyonu ile katı taşıyıcı teması kısa sürelidir. Uygulama kolaylığı nedeniyle bu immobilizasyon tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca taşıyıcı materyaller; DEAE-selüloz, odun, talaş, lignini uzaklaştırılmış talaş, tahıl kepeği vb. gibi selülozik malzemeler ve montmorillonite, gözenekli porselen, gözenekli cam, ponza gibi inorganik malzemelerdir (Kourkoutas vd., 2004; Mishra, 2015).



Şekil 2.12. Hücre İmmobilizasyon Teknikleri ve Destekleri (Kourkoutas vd., 2004)

2.6.1.2. Gözenekli Matriste Tutuklama

Bu immobilizasyon çeşidi hücrelerin gözenekli bir matrikste hücre hareketine izin verilmeyecek şekilde hapsedilmesiyle yapılır. Matrikste toplanan hücreler yüksek hücre yoğunluğuna ulaşabilirler. Oluşturulan gözenekli matriks hücrelerin dışarı çıkmasını engeller fakat besin ve metabolitlerin geçişine izin verir. Bazen de bu yüksek hücre yoğunluğu kütle transferine engel olabilir. Yüzey immobilizasyonu ile karşılaştırıldığında hücreler sıvı kaymalarına karşı daha iyi korunur (Nedovic ve Willaert, 2006).

Çeşitli doğal (polisakkaritler ve proteinler) ve sentetik polimerler, düşük hücre canlılığı kaybı riski oluşturduklarından ve hafif koşullar altında hidrofilik matriksler halinde jelleşebildiklerinden sıkça tercih edilir. Başlıca kullanılan polimerler aljinat tuzları,

selüloz, k-karragenan, agar, pektik asit, kitosan, sentetik poliakrilamid, jelatin, kollajen ve polivinil alkol(PVA) dır (Mishra, 2015; Nedovic ve Willaert, 2006). Polimerlerin kullanıldığı sistemlerde genellikle boncukların çapları 1-5 mm'dir. Bu metotta genellikle doğal polimerler kullanılırken son yıllarda sentetik polimerlerde sıkça kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerin porozitesi, hidrofobik veya hidrofilik özellikleri ayarlanabilir. Ayrıca sentetik polimerlerden oluşturulan jel boncuklarının mekanik mukavemeti ve uzun ömürlülüğü, genellikle doğal polimerlerinkinden daha üstündür (Nedovic ve Willaert, 2006).

Bu immobilizasyon çeşidinde düşük stabilitesine rağmen en yaygın olarak Ca-aljinat kürecikleri kullanılmaktadır. Ca-aljinat yapısı yüksek gözeneklik sağladığından kütle transferine engel olmaz, fakat zamanla meydana gelen aşınmalar ve hücre bölünmeleriyle oluşan yüksek hücre yoğunluğuyla yapının bozularak hücrelerin yapıdan kopmasına neden olabilir. Bu durumda sistemde immobilize ve serbest hücre süspansiyonu bulunur (Biotechnol ve Smidsrd, 1990).

2.6.1.3. Flokülasyon (Doğal) veya Çapraz Bağlama Ajanları (Yapay) İle Kendi Kendine Kümeleşme

Bu immobilizasyon çeşidinde herhangi bir taşıyıcı kullanılmaz onun yerine flokülasyon veya çapraz bağlama ajanları kullanılarak yapılır. Oluşan büyük boyutlu agredat yapıları biyoreaktörlerde kullanım kolaylığı sağladığından, immobilizasyon tekniği olarak kullanılır. Biyoreaktör verimliliğini en üst düzeye çıkarmak için gerekli olan tahminleri ve şartları kontrol altında tutmak çok zor olsa da kullanılan en ucuz ve basit immobilizasyon yöntemidir (Pilkington vd., 1998). Bu metotta agredat oluşturma yeteneği esas olarak küf, mantar ve bitki hücrelerinde gözlenir (Kourkoutas vd., 2004).

2.6.1.4. Bariyer Arkasında Hücre Tutuklama

Bu immobilizasyon çeşidinde hücreler çözünabilir formdaki bir zar tarafından tutulabilir veya hücreler yüzeye tutturulabilir ya da hücreler zar matrisi içinde sıkışabilir. Ayrıca hareketsiz hale getirmek için iki karışmaz sıvı tarafından oluşturulan sıvı-sıvı ara faz bir bariyer olarak da kullanılabilir. Bu yöntemde kimyasal madde kullanımının olmayışı ve sert koşullar kullanılmadan tutuklama işleminin yapılması avantaj olarak görülebilir. Ancak membran tıkanmalarının kütle transferini engellemesi ise bir dezavantajdır (Mishra, 2015; Pilkington vd., 1998; Nedovic ve Willaert, 2006). Atık sudan hücre ayrımı gerektiğinde ya da yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerin veya

spesifik ürün ayrımı gerektiğinde bu immobilizasyon çeşidi oldukça kullanışlıdır (Nedovic ve Willaert, 2016).

2.7 Literatür Özeti

York ve Ingram (1996), ham maya otolizattına (10 g/L; 5.8 çözünür/L) ilave edilen mineral ve vitaminler ile rekombinat *E.coli* KO11' den biyoetanol üretimini incelemişlerdir. Bu ortamdan $46 \pm 1,7$ g etanol/L elde edilmiştir ki bu 5-15 g/L saflaştırılmış, çözünür formdaki ticari protein hidrolizatından (44-48 g/L) elde edilen biyoetanol miktarına denktir. Mayadan otolizatından biyoetanol üretimi, tahıl bazlı ve lignoselüloz esaslı bitkileri arasında biyoetanol üretimi için bir sinerji potansiyeli sunmaktadır (York ve Ingram, 1996).

Sheroran ve arkadaşlarının (1997) yapmış olduğu bir çalışmada şeker kamışı melasından *saccharomyces cerevisiae* HAU-1 kullanılarak sürekli sistemde biyoetanol üretimini incelenmiştir. Deneyler % 1.5 kalsiyum aljinat ile immobilize edilmiş maya hücrelerinin kullanıldığı %30 doluluk oranına sahip dikey kolon reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Yüksek etanol verimine 10 g/L sakkaroz içeren $0,20 \text{ sa}^{-1}$ seyrelme hızında ulaşılmıştır. Kütlece % 30-50 maya hücresi içeren boncuklardan 60 g/Lh verimlilik elde etmiştir (Sheoran vd., 1998).

Göksungur ve Zorlu (2000), dolgulu yatak biyoreaktörde ve sürekli karıştırma tank tipi biyoreaktörde pancar melasında etil alkol üretimini incelemişlerdir. Bu çalışmada Ca-aljinat ile tutuklanmış *saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Dolgulu yatak biyoreaktör gerçekleştirilen çalışma 30°C 'de, $0,22 \text{ sa}^{-1}$ seyrelme hızında ve başlangıç şeker konsantrasyonun % 10,90 olduğu ortamda gerçekleştirilip en yüksek etil alkolü % 4.62, teorik verimi % 82,9 ve hacimsel verimliliği $10,16 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ elde etmişlerdir. Sürekli karıştırma tank tipi biyoreaktörde gerçekleştirilen çalışmada ise %3.94 ile daha düşük etanol konsantrasyonu ile daha düşük teorik verim (% 70,7) ve verimlilik ($10,16 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) elde edilmiştir (Göksungur ve Zorlu, 2009).

Lima ve ark. (2002) heksoz fermentasyonu ile pentoz fermentasyonunu birleştiren bu çalışmada *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak mısır koçanından biyoetanol üretimi gerçekleştirmiştir. Mısır koçanı ksiloz içeren bir hammaddedir. İlk olarak *Escherichia coli* glikoz içeren LB ortamında çoğaltıldı ve hidrolizat fermentasyonunda kullanıldı. Bu fermentasyon, 0,50 g etanol/şeker verimle 163 saatte

tamamladı. Aynı şartlarda fakat ksiloz içeren LB ortamında çoğaltılan *Escherichia coli*'nin kullanıldığı hidrolizat fermantasyonu ise 113 saatte tamamlanmıştır. Verim glikoz içeren LB ortamında çoğaltılan mikroorganizmaya göre düşüktür fakat fermantasyon süresindeki kazanımından dolayı bu çalışmada ksiloz içeren LB ortamında büyütülmüş *Escherichia coli* kullanılmıştır. İki aşamalı fermantasyonun ilk aşamasında 85 g/L ksiloz içeren mısır kocağı hidrolizatına *Escherichia coli* aşılandı ve 95 saatte 40 g/L etanol üretti. İkinci aşama olan hekzos fermantasyonunu içinde ortama 150 g/L sakkaroz ilave edilip *saccharomyces cerevisiae* aşılandı ve 8 saat sonunda ortamda 104 g/L etanol konsantrasyonu bulunmaktadır (De Carvalho Lima vd., 2002).

Najafpour ve ark (2004) kesikli sistem ile sürekli sistemi karşılaştıran fermantasyon deneyleri gerçekleştirmiştir. Sabit hücre yüklü immobilize hücre reaktörü kullanılmıştır. Hücreler Ca-aljinat ile immobilize edilmiştir. 50 g/L glikoz kullanılan çalışmada kesikli sistem için şeker tüketimi % 99,6 olup etanol üretimi % 12,5 (v/v) olmuştur. Immobilize hücre reaktöründe ise şeker tüketimi % 88,5 olup 6 saat alıkonma süresi ile etanol üretimi % 16,7 (v/v) olmuştur. Yüksek glikoz konsantrasyonunda (150 g/L) 6 saat alıkonma süresinde % 5 etanol etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. 150 g/L glikozdan %38' lik verim elde edilerek 24 saatlik 7 saate fermantasyon süresi düşürülmüştür. Hücre büyüme oranının monod denkleme göre yapıldığı bu çalışmada kesikli sistemin kinetik parametreleri K_s and I_m sırasıyla 2,3 g/L ve 0,35 g/Lh, substrata bağlı biyokütle verimi ve ürün verimi ise sırasıyla %50,8 % 32,1'dir. ICR' nin üretkenliği sırasıyla 25, 35, 50 g/L glikoz konsantrasyonu için 1,3, 2,3 ve 2,8 g/L saattir. Kesikli fermentasyonda 50 g/l glikoz ortamında etanolün verimliliği 0,29 g/L saat olarak hesaplanmıştır. Kesikli sisteme göre sürekli sisteminde maksimum etanol üretimi 10 kat artmıştır (Najafpour vd., 2004).

Lau ve ark (2010) su ekstraktı ve amonyak fiber genişmesi gibi bir takım ön işlemlere maruz bırakılmış enzimatik hidrolize uğramış mısır maserasyon sıvısından biyoetanol üretimini incelemek için 3 farklı mikroorganizmayı denemiştir. Kullanılan mikroorganizmalar *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) ve *Zymomonas mobilis* AX101'dir. Yaptıkları çalışmada ksiloz fermantasyonu mısır maserasyon sıvısının fermantasyonundan 5-8 kat daha hızlıdır. Kullanılan maya pentozu tüketmede bakterilere oranla daha başarılı olmuştur (Lau vd., 2010).

3.MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

Bu çalışmada kullanılan *Escherichia coli* KO11 (pLOI 1910) American Type Culture Collection (ATCC) hücre kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Aşı kültürü için kullanılan kimyasallar glikoz (Merck, 1.08342.1000), bakteriyolojik pepton (Carl Roth 8986.1), maya ekstraktı (Hefeextrakt, 9213.0500), sodyum klorür (Merck,1.06404.1000), kloramfenicol (LabM, X009) ve agar (Lab M, LabM098) dır. Fermantasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak kullanılan melas ise Elazığ Şeker Fabrikası'ndan temin edilip deneysel çalışmalar süresince +4°C'de muhafaza edilmiştir. Melasın enzimatik ön işleminde invertaz enzimi (Tito NT91) ve asidik ön işleminde sülfürik asit (Sigma, 30743) kullanılmıştır. Enzim seyreltme işlemi sodyum asetat-asetik asit tamponu ile yapılmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) yapılan analizlerde standart ve mobil faz olarak sülfürik asit (Merck), glikoz (Merck, 1.08342.1000), fruktoz (Carlo Erba, 452666) ve sakkaroz (Carlo Erba, 477187) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analiz saflığındadır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar sirkülasyonlu su banyosu (MİKROLAB), su banyosu (DAİKAN), santrifüj (NÜVE), etüv (MİKROLAB), vorteks (VELP), otoklav (LAB Companion), pH metre (HANNA), hassas terazi (BEL), HPLC (Shimadzu), GC (Shimadzu), laminar flow kabin (Thermo), -80 °C dolabı (NuAire)'dir.

3.2. Mikroorganizmanın Suşunun Canlandırılması ve Saklanması

Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşu liyofilize halde temin edilmiştir. Canlandırma işleminde kullanılacak olan besi yerleri ve cam malzemeler önce 121°C'de 15 dakika steril edildi. Ayrıca tüm çalışma aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Liyofilize haldeki *Escherichia coli* KO11 suşu ilk olarak oda sıcaklığında % 0,9'luk NaCl çözeltisi ortamına alınmıştır. Çözünmüş mikroorganizma suşu içeriği Tablo 3.1'de belirtilen modifiye edilmiş katı Luria-Bertani (LB) besi yeri içeren petri kaplarına ekildi. Ekilen mikroorganizmalar 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda petri kaplarında çoğalmış olan mikroorganizmalar 50 ml'lik çalışma hacmine sahip 250 ml'lik erlenlerde modifiye edilmiş sıvı LB besi yerine alındı. Sıvı besi yerindeki hücre kültür

ortamı 37 °C ve 100 rpm de 16 saatlik bir inkübasyona daha tabi tutuldu. Çoğalan mikroorganizmalar % 60'lık gliserol içeren mikrosantrifüj tüplerine alınarak -80 °C'de stok

Tablo 3. 1. Modifiye edilmiş katı Luria-Berttani (LB)

Besi ortamı	Miktar
Glikoz	20 (g/L)
Maya ekstraktı	5 (g/L)
Pepton	10 (g/L)
NaCl	5 (g/L)
Agar	15 (g/L)
Kloramfenikol	40 µg/L

olarak saklandı. Çalışılan mikroorganizma rekombinant bir mikroorganizma olduğu için her bir petri kabı 10 günde bir -80°C' den canlandırılarak tazelenmiştir.

3.3. Hammaddeye Uygulanan Ön İşlemler

Şeker pancarı melası yaklaşık olarak % 50 şeker içeriğine sahiptir ve yapısındaki şeker sakkarozdur. Çalışmada kullanılan mikroorganizma 5 ve 6 karbonlu şekeri fermente etmede başarılıdır. Bu nedenle melasın içeriğindeki sakkaroz monomerleri olan glikoz ve fruktoza dönüştürülmelidir. Bu dönüşüm için 3 farklı yol izlendi. İzlenen yollardan ikisi asidik ön işlem olup bir tanesi enzimattır.

İlk olarak uygulanan asidik ön işlem metodunda melas çözeltisinin pH'ı 6 M'lık H₂SO₄ çözeltisi kullanılarak 3'e düşürüldü. pH'ı 3 olan melas çözeltisi otoklavlandı (Bae ve Shoda, 2005).

İkinci olarak uygulanan asidik ön işlem metodunda ise, melas çözeltisinin pH'ı 6 M'lık H₂SO₄ çözeltisi kullanılarak 3'e düşürüldü, ardından 60 °C'lik etüvde 1 saat boyunca bekletildi. Bu süre sonunda tekrardan 6 M'lık H₂SO₄ çözeltisi kullanılarak pH 1'e düşürüldü ve 60 °C'lik etüvde 2 saatlik bekletildi (Çakar vd., 2014).

Enzimatik ön işlem uygulamalarında invertaz enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık ve pH aralığı dikkate alınarak bu ön işlem metodu uygulanmıştır. Bu amaçla melas çözeltisinin pH'ı 4,5 olarak ayarlandı, % 1'lik enzim ilavesi ile 55 °C'de 24 saat boyunca 100 rpm de karıştırıldı. 24 saatlik sürenin sonunda enzimin aktivitesini

ortadan kaldırmak için 90 °C’de 5 dakika bekletildi. Fermantasyon çalışmalarında kullanılmak üzere pH’ı tekrardan 5 M’lık NaOH çözeltisi ile 6’ya ayarlandı.

3.4. Enzimatik Ön İşlemin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım

Uygulanan ön işlem denemelerinde sakkarozu monomerlerine dönüştürmede en verimli ön işlemin, ayrıntısı bulgular ve tartışma kısmında verilen sonuçlara göre, enzimatik ön işlem olduğuna karar verildi. Enzimatik ön işlem şartlarının optimizasyonu için istatistiksel bir yöntem olan Cevap Yüzey Yöntemi (Merkezi Kompozit Dizayn, MKD) kullanıldı. MKD ile melas konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve hidroliz süresi bağımsız üç değişkenin ön denemelerle belirlenen aralıkları için 20 farklı deney tasarlandı. MKD de bağımlı değişken olarak indirgen şeker konsantrasyonu seçildi. Ön denemeler ışığında 2000 ul/birim olan enzim, 20 kat seyreltilerek 100 ul/birim seviyesine düşürülmüştür. MKD ile tasarlanan deneysel parametreler ve deney şartları Tablo 3.2’de verilmiştir.

3.5. Fermantasyon Deneyleri

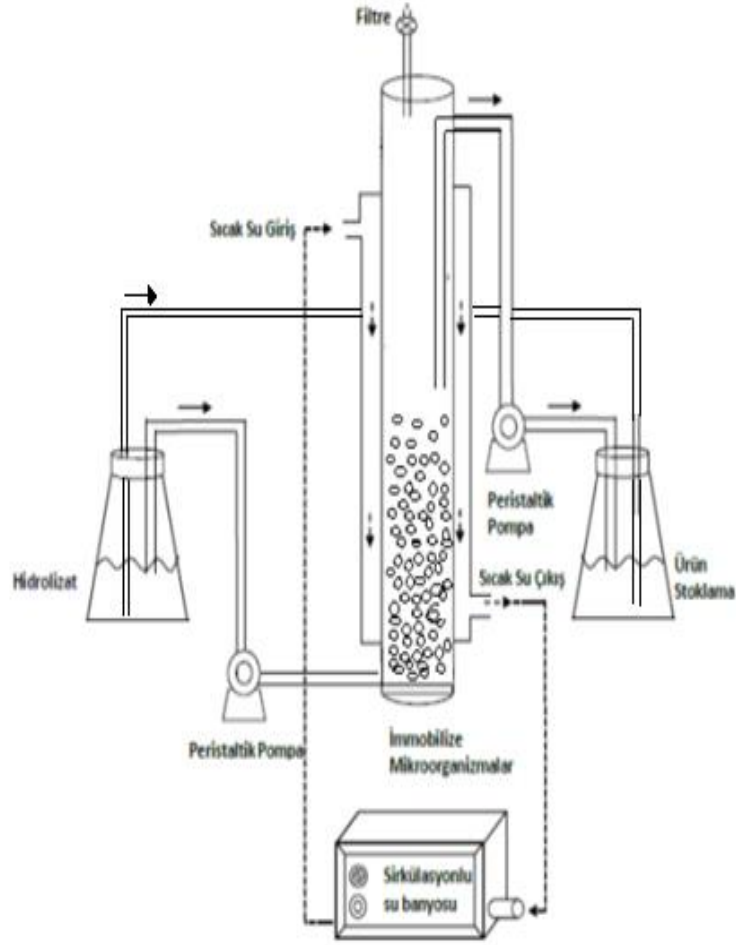
Fermantasyon deneyleri hem kesikli hem de sürekli sistemde yapılmıştır. Her iki sistemde de anaerobik şartlar altında çalışıldı. Karbon kaynağı olarak kullanılan melas, enzimatik ön işleme tabii tutulduktan sonra elde edilen hidrolizatın pH’ı 6 ya yükseltildi ve tüm fermantasyon deneylerinde hidrolizatlara kloramfenikol ilave edildi. Ayrıca fermantasyon ortamlarına azot kaynağı olarak konsantre halde hazırlanmış olan 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton ve 5 g/L NaCl karışımı da ilave edildi.

Kesikli deneyler için CO₂ çıkışına izin veren bir erlen düzeneği tasarlanmıştır. Tüm kesikli çalışmaları 250 ml’lik erlenlerde 50 ml’lik çalışma hacminde 37°C’de çalkalamalı inkübatörde 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildi.

Sürekli deneyler için ise 3 mm borosilikat camdan yapılmış çapı 3cm olan 20 cm’lik immobilize hücre reaktörü kullanılmıştır. Sürekli sistem düzeneğinde de kesikli sistemdekine benzer bir sistemle CO₂ çıkışına izin verilmiştir. Sürekli sistem sıcaklığı reaktör kolonun sahip olduğu ceket içerisinden ayarı sirkülasyonlu su banyosundan sağlanan 37 °C’de su geçirilmesi ile stabil tutuldu. Hidrolizatın reaktöre girişi ve çıkışı peristaltik pompalar yardımıyla sağlandı. Fermantasyon süresince verimi artırmak için substrat immobilize hücre reaktörüne geri devir ettirildi. Şekil 3.1’de immobilize hücre kültürünün kullanıldığı sürekli sistem reaktörü şematik olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.2. MKD ile tasarlanan deney sayısı ve bağımsız değişkenlerin değerleri

Deney No	Melas Konsantrasyonu (g/L)	Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	Süre (saat)
1	70,27	0,28	6,46
2	129,73	0,28	6,46
3	70,27	0,82	6,46
4	129,73	0,82	6,46
5	70,27	0,28	19,54
6	129,73	0,28	19,54
7	70,27	0,82	19,54
8	129,73	0,82	19,54
9	50,00	0,55	13,00
10	150,00	0,55	13,00
11	100,00	0,10	13,00
12	100,00	1,00	13,00
13	100,00	0,55	2,00
14	100,00	0,55	24,00
15	100,00	0,55	13,00
16	100,00	0,55	13,00
17	100,00	0,55	13,00
18	100,00	0,55	13,00
19	100,00	0,55	13,00
20	100,00	0,55	13,00



Şekil 3.1. Sürekli deneylerin gerçekleştirildiği sürekli sistem reaktörünün şematik gösterimi

Fermantasyon deneylerinde verim hesaplanırken aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

$$\text{Etanol verimi, } Y\left(\frac{\text{g}}{\text{g}}\right) = \frac{C_{e,\max}}{C_h} \quad (3.1)$$

$$\text{Etanol verimlilik, } Q_p\left(\frac{\text{g}}{\text{L} \cdot \text{saat}}\right) = \frac{C_{e,\max}}{t_{\max}} \quad (3.2)$$

$$Y_i, (\%) = \left(\frac{C_{e,\max}}{(C_{s,0} - C_{s,\max}) 0.511} \right) 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Etanol verimi} = \frac{C_{e,\max}}{C_{\text{ş},0}} 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Hacimsel verimlilik, } (P_v) = \left(\frac{F \cdot C}{V_c} \right) \quad (3.5)$$

$$\text{Seyrelme hızı, } D(\text{sa}^{-1}) = \frac{F}{V_c} \quad (3.6)$$

$$\text{Alıkonma zamanı, } (s_a) = \frac{1}{D} \quad (3.7)$$

Burada;

$C_{\text{ş},0}$, başlangıç şeker derişimi (g/L),

$Y(\text{g/g})$, etanol verimi-biyokütle verimi

Y_t , Sitokiyometrik (teorik) denkleme göre alkol üretim verimi (%)- yüzde verim

$C_{e,\max}$, maksimum etanol derişimi (g/L),

$t_{\max}$, maksimum etanol miktarının belirlendiğı süre (saat),

$C_{\text{ş},\max}$, $t_{\max}$ 'daki şeker derişimi (g/L),

C_h , tüketilen şeker (g/L)

F , hidrolizat akış hızı (ml/dk)

C , yatışkın haldeki biyoetanol konsantrasyonu (g/L)

V_c , dolu kolon hacmi (ml)

0.511 teorik olarak pentozların etanole çevrim oranıdır.

3.5.1 İmmobilizasyon Deneyleri

Bu çalışmada immobilizasyon yapmak amacıyla taşıyıcı matriks olarak sodyum aljinat, çapraz bağlayıcı olarak da CaCl_2 kullanıldı. İmmobilizasyon için % 2-4'lük sodyum aljinat çözeltileri ile % 1-6'luk CaCl_2 çözeltileri kullanıldı. Hücre kültürü ilk olarak

belirlenen inokülasyon oranında 4100 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernant kısmı atıldı. Pellet kısmı ise sodyum aljinat miktarının %10'u olacak biçimde steril saf su ile karıştırıldı. Sonrasında hücre+aljinat karışımı bir karıştırıcıda karışmakta olan CaCl_2 çözeltisine tek kullanımlık steril enjektör yardımıyla damlatıldı. Oluşan boncuklar 30 dakika boyunca CaCl_2 çözeltisinde karıştırıldı. Bu sürenin sonunda boncuklar 2 defa steril saf su ile yıkanarak CaCl_2 kalıntıları ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonrasında boncuklar fermantasyon için hidrolizat ortamına ilave edildi. İmmobilizasyon işleminin nasıl yapıldığı şematik olarak Şekil 3.2' de gösterilmiştir.

3.6. Analiz Yöntemleri

3.6.1. Şeker Analizi

Şeker analizleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde ICE-COREGEL-87H3 kolon (300 mm uzunluk, 7.8 mm çap, 20.0 ul hacim) kullanılarak yapıldı. Analiz şartları; 45 °C kolon sıcaklığı, 0,600 ml/dk akış hızıdır. Taşıyıcı sıvı olarak 5 mM'lık H_2SO_4 kullanılmıştır. Taşıyıcı sıvı sisteme verilirken içerisinde su baloncuğu bulundurmaması için sonikasyona tabi tutuldu. Enjeksiyon hacmi 1 mikro litredir. Standart çözeltiler % 100 saf sakkaroz, glikoz ve fruktoz ile hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi sakkaroz, glikoz ve fruktozun karışımından oluşan bir çözeltiyle oluşturuldu. Şeker miktarının tayininde bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak, enstrümantal olarak hesaplandı. Şeker analizi yapılacak numune 0,45'lik filtrelerden geçilerek analizi yapıldı.

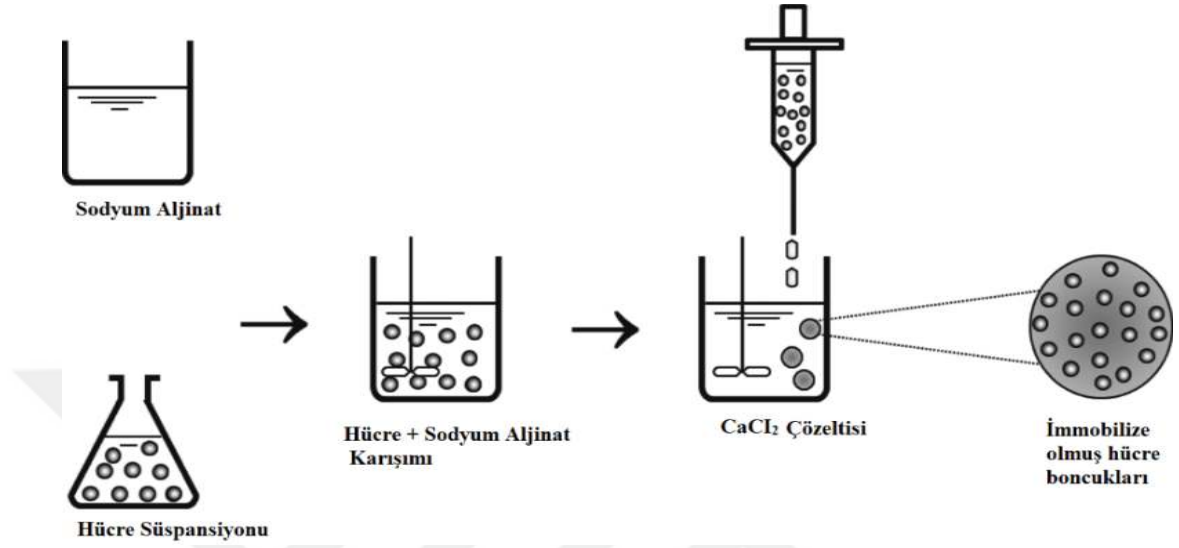
3.6.2. Alkol Analizi

Alkol analizleri gaz kromatografisinde BP20 kolon (25 m uzunluk, 0,32 mm çap, 0,25 mikrometre film kalınlığı) kullanılarak, kolon sıcaklığı 140 °C 'de 50 ml/dak akış hızıyla gerçekleştirildi. Taşıyıcı gaz olarak azot kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 1 mikro litredir. Standart çözeltiler % 99,7'lik etil alkol ile hazırlanmıştır. Sonuçlar standart çözeltinin kalibrasyon eğrisine göre enstrümantal olarak hesaplanmıştır. Alkol analizi yapılacak numune 0,45'lik filtrelerden geçilerek analizi yapılmıştır.

3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

İmmobilize edilmiş hücre boncuklarının görüntülenmesinde Fırat Üniversitesi Merkez Laboratuvarlarında bulunan Zeiss marka taramalı elektron mikroskobunun EVO MA10 numaralı modeli kullanıldı. Boncuğun yapısı ve çapı bu analiz ile belirlendi.

İmmobilize hücrelerin boncuk içerisindeki görüntüleri ise farklı büyütme oranları kullanılarak görüntülendi.



Şekil 3.2. İmmobilizasyonun yapılışı

4. BULGULAR ve TARTİŞMA

Bu çalışmada, şeker pancarı melasında bulunan sakkaroz yapının temel bileşenleri olan glikoz ve fruktoza ayrıştırılmak üzere asidik ve enzimatik iki ön işleme tabi tutulmuştur. Hidroliz çalışmalarında 50 g/L'lik melas çözeltileri kullanılmış olup, bu melas çözeltilerindeki şeker konsantrasyonu 26,13 g/L olarak belirlenmiştir. Asidik ön işlemlerde materyal ve metot kısmında anlatıldığı gibi iki farklı yöntem denenmiştir. İlk olarak uygulanan asidik ön işlem sonrasında ortamda 6,315 g/L sakkaroz, 10,585 g/L glikoz ve 10,605 g/L fruktoz ölçölmüştür. İkinci uygulanan asidik ön işlem sonrasında ise ortamda 18,015 g/L sakkaroz, 4,515 g/L glikoz ve 4,975 g/L fruktoz bulunmaktadır. Asidik yöntemler arasındaki önemli fark ikinci yöntemin ilk etapta 60 °C gibi birinci yöntemle göre çok daha düşük sıcaklıkta gerçekleştirildiğinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Bu yöntemin son aşamasında sıcaklık 121 °C'ye yükseltirse de bu durumda pH'nın 6 olması dönüşümün istenen seviyede gerekleşememesine yol açmıştır. Uygulanan enzimatik ön işlem sonrasında ise ortamda hiç sakkaroz bulunmazken 13,69 g/L glikoz, 13,814 g/L fruktoz bulunmaktadır. Melastaki sakkarozu glikoz ve früktoza dönüştörmek için kullanılan hidroliz yöntemlerinden elde edilen deneysel sonuçları özetleyen bir tablo Tablo 4.1'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda asidik ön işlemeler karşılaştırıldığında düşük pH değerine sahip melas çözeltisinin otoklavlanmasıyla daha fazla monomer açığa çıkmıştır. Buradan da ortam asitliğinin sıcaklığın etkisiyle parçalanmayı arttırdığı açıkça görölmektedir. Enzimatik ön işlem sonucunda ortamdaki sakkarozun tamamının parçalanması ve asidik ön işlem sonrasında ortamda oluşması muhtemel inhibisyona neden olabilecek maddelerin önlenmesi amacıyla, bu yöntemin ön işlem için en iyi hidroliz yöntemi olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı ön işlemler sonrasında ortamda var olan şeker miktarları

Ön işlem	Sakkaroz(g/L)	Glikoz (g/L)	Fruktoz (g/L)
1. asidik yöntem	6,315	10,585	10,605
2. asidik yöntem	18,015	4,515	4,975
Enzimatik	0	13,69	13,814

4.1. Enzimatik Hidroliz için Optimizasyon Çalışmaları

Bu tezde şeker pancarı melasından indirgen şeker (glikoz ve fruktoz) elde edilmesine yönelik hidrolize etki eden değişken parametrelerin belirtilen aralıkları için RSM ile oluşturulan kodlu değerler tablosu Tablo 4.2’de verilmiştir. Merkez noktaların belirlenmesi amacıyla ön çalışmalarla gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.2’deki değerlere göre Design Expert programıyla toplamda 20 deney tasarlanmıştır. Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ile belirlenen bu deneyler için cevap değişkenleri olarak hidroliz sonrası indirgen şeker konsantrasyonu (g/L) ve sakkaroz konsantrasyonu (g/L) seçilmiştir.

Tablo 4.2. Asididik hidrolize etki eden değişkenleri inceleyen aralıkları ve kodlu değişkenler

Faktör	Değişkenler	- α	-1	0	+1	+ α
A	Melas konsantrasyonu (g/L)	50	70,27	100	129,73	150
B	Enzim konsantrasyonu (% v/v)	0,1	0,282	0,55	0,817	1
C	Süre (saat)	2	4,46	13	19,54	24

Şeker pancarı melasının MKD ile elde edilen enzimatik hidroliz şartları için deneysel çalışma şablonu ve cevap değişkenleri olan indirgen şeker ve dönüşmeyen sakkaroz konsantrasyonu değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3’deki verilerden faydalanarak Design Expert programının lineer, iki faktöriyel etkileşim, kuadratik ve kübik gibi eşitliklerle gerçekleştirilen analizler sonucu, program tarafından cevap değişkenlerini incelenen bağımsız değişkenlere bağlayan bir model eşitliği önerilmiştir. Model analizi sonucunda kuadratik etkileşim modelinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Kuadratik etkileşim için ANOVA test sonucu Tablo 4.4’de verilmiştir. Tablo 4.4’den görüldüğü gibi önerilen model için p değerinin ($<0,0001$) $0,05$ ’den küçüktür. Bu durum program tarafından önerilen modelin önemli ya da kabul edilebilir olduğunun göstermektedir. Şeker pancarı melasının enzimatik hidrolizi için MKD ile yapılan analiz sonucu önerilen kuadratik modelin uygunluk testi için istatistiksel parametre değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir. $0,9886$ gibi yüksek R^2 değeri modelin çok iyi olduğunu göstermektedir.

Bu durumu Adj. R^2 ve Pred. R^2 değerlerinin yüksek olması da desteklemektedir. Adj. R^2 ve Pred. R^2 değerleri arasındaki fark 0.2'den ne kadar büyükse modelin uyumluluğu o kadar iyi kriterine göre de MKD sonuçlarının yeterli düzeyin üzerinde olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.3. Hidroliz şartları için MKD ile elde edilen deneysel çalışma şablonu ve elde edilen sonuçlar

Deney No	Melas Kons. (g/L)	Enzim Kons. (% v/v)	Süre (saat)	İndirgen Şeker Kons. (g/L)	Dönüşmeyen Sakkaroz (g/L)
1	70,27	0,28	6,46	30,23	6,57
2	129,73	0,28	6,46	42,31	26,23
3	70,27	0,82	6,46	30,26	6,54
4	129,73	0,82	6,46	61,55	6,98
5	70,27	0,28	19,54	33,87	2,93
6	129,73	0,28	19,54	62,59	5,95
7	70,27	0,82	19,54	31,37	5,43
8	129,73	0,82	19,54	75,40	0
9	50,00	0,55	13,00	23,05	0
10	150,00	0,55	13,00	71,42	11,54
11	100,00	0,10	13,00	45,91	7,05
12	100,00	1,00	13,00	49,99	2,97
13	100,00	0,55	2,00	27,27	25,69
14	100,00	0,55	24,00	45,08	7,88
15	100,00	0,55	13,00	51,14	1,82
16	100,00	0,55	13,00	43,02	9,94
17	100,00	0,55	13,00	51,70	1,26
18	100,00	0,55	13,00	46,04	6,93
19	100,00	0,55	13,00	48,76	4,21
20	100,00	0,55	13,00	49,01	3,95

Tablo 4.4. Kuadratik modelin rsm ile elde edilen anova test sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	3820,13	9	424,46	96,70	<0,0001	Önemli
A- Melas Kons.	2856,90	1	2856,90	650,86	<0,0001	
B-Enzim Kons.	97,54	1	97,54	22,22	0,0008	
C-Süre	347,28	1	347,28	79,12	<0,0001	
AB	149,45	1	149,45	34,05	0,0002	
AC	108,34	1	108,34	24,68	0,0006	
BC	9,93	1	9,93	2,26	0,1635	
A ²	0,81	1	0,81	0,18	0,6769	
B ²	4.508E-003	1	4.508E-003	1.027E-003	0,9751	
C ²	247,74	1	247,74	96,70	<0,0001	

Tablo 4.5. Şeker Pancarı Melasının Enzimatik Hidrolizi için Kuadratik Modelin Uygunluk Testine ait İstatistiksel Parametrelerin Değerleri

Standart Sapma	2,10	R²	0,9886
Ortalama	46,34	Adj R²	0,9784
Varyans Katsayısı (C.V) %	5,52	Pred R²	0,9143
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	331,18	Yeterli Kesinlik	33,545

Design Expert programı ve MKD' a göre şeker pancarı melasının enzimatik hidroliz ile indirgen şeker elde edilmesi için kodlu değerlere bağlı olarak indirgen şeker konsantrasyonu aşağıdaki eşitlikle verilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{İndirgen Şeker Kons. (g/L)} = & (49,32) + (14,46 \times A) + (267 \times B) + (5,04 \times C) + (4,32 \times AB) \\ & + (3,68 \times AC) - (1,11 \times BC) + (0,24 \times A^2) + (0,081 \times B^2) - (4,15 \times C^2) \end{aligned} \quad (4.1)$$

Eşit. 4.2' de değişkenler için kodlanan simgeler Tablo 4.4' de verilmiştir. Eşit. 4.1'den enzimatik hidroliz üretimini en çok etkileyen tekli parametrenin A (Melas Konsantrasyonu), ikili parametrenin ise AB (Melas Konsantrasyonu-Enzim Konsantrasyonu) olduğu görülmektedir. Gerçek değerler cinsinden eşitlik ise Eşit. 4.2' de verilmiştir.

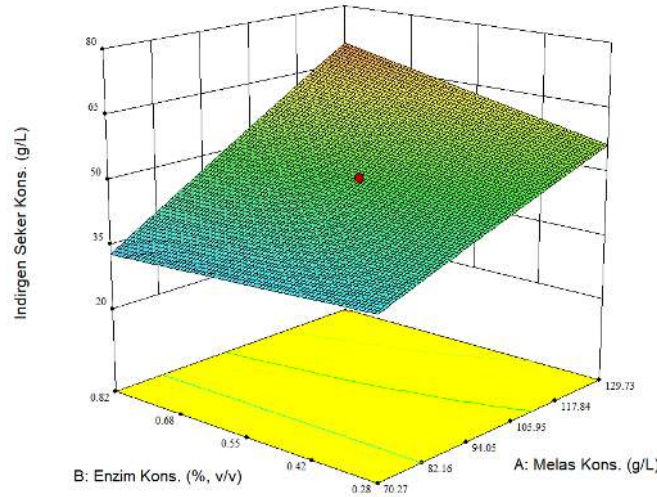
$$\begin{aligned} \text{İndirgen Şeker Kons. (g/L)} = & (16,103) - (4,76 \times 10^{-3} \times C_M) - (36,341 \times C_E) + (1,78 \times t) \\ & + (0,543 \times C_M \times C_E) + (0,019 \times C_M \times t) - (0,636 \times C_E \times t) + (2,68 \times 10^{-4} \times C_M^2) + (0,247 \times C_E^2) - (0,097 \times t^2) \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$+ (0,543 \times C_M \times C_E) + (0,019 \times C_M \times t) - (0,636 \times C_E \times t) + (2,68 \times 10^{-4} \times C_M^2) + (0,247 \times C_E^2) - (0,097 \times t^2)$$

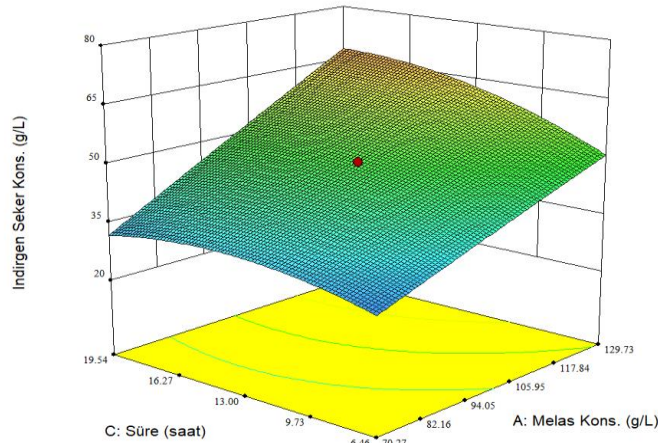
Burada, C_M melas konsantrasyonu (g/L), C_E enzim konsantrasyonu (%v/v), t süre (saat) dir.

Tablo 4.4'den model teriminde etkin olan parametrelerin 0.05'ten küçük değerlere sahip olan A, B, C, AB, AC ve C^2 olduğu anlaşılmaktadır. Design Expert programı ile bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerinde ikili etkileşimlerinin yanında, diğer tüm bağımsız değişkenlerin sabit tutulduğu durumda tek bir parametrenin cevap değişkeni üzerindeki etkisini de veren grafikler üretilebilmektedir. Bu tez çalışmasında Melas konsantrasyonu-enzim konsantrasyonu, melas konsantrasyonu-süre ve enzim konsantrasyonu süre etkileşimlerinin indirgen şeker üretimi üzerine etkileri Şekil 4.3 arasında gösterilmiştir. Şekil 4.1'den görüldüğü üzere yüksek enzim ve melas konsantrasyonlarında indirgen şeker üretiminin arttığı, bununla beraber melas

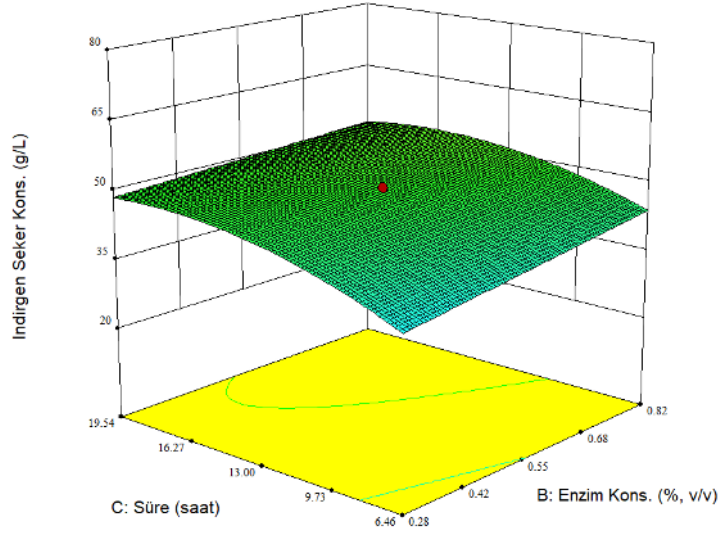
konsantrasyonunun etkisinin daha fazla olduğu söylenebilir. Çalışılan aralıklarda düşük melas konsantrasyonlarında enzim artışı ile indirgen şeker üretimindeki artış miktarının yüksek melas konsantrasyonlarına göre daha düşük olduğu Şekil 4.1'den görülen bir başka sonuçtur. Süre-melas konsantrasyonunun etkisinin görüldüğü Şekil 4.2'de de benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Yüksek melas konsantrasyonu ve sürelerde yüksek dönüşüm olduğu açıkça gözlenmektedir. Melas konsantrasyonu-süre etkileşimi sonucunun melas konsantrasyonu-enzim konsantrasyonundan bir farkı düşük enzim konsantrasyonundan yükseğe gittikçe indirgen şekere dönüşüm miktarının daha belirgin şekilde arttığıdır. Bu durum melas konsantrasyonu-süre etkileşiminde pek gözlenmemektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre melas konsantrasyonu-enzim konsantrasyonu ikili etkileşiminin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisi

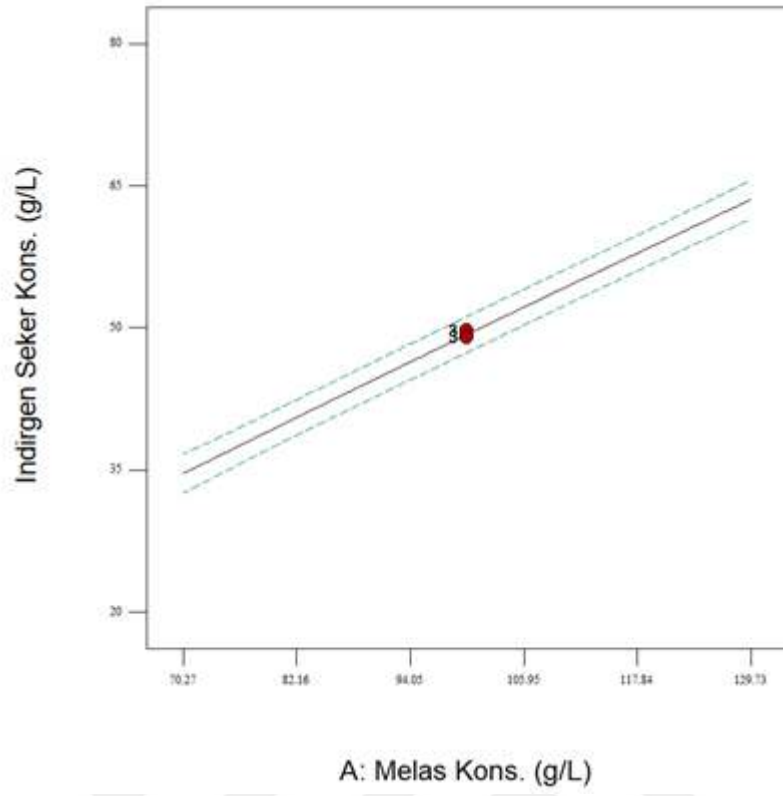


Şekil 4.2. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre melas konsantrasyonu-süre ikili etkileşiminin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisi

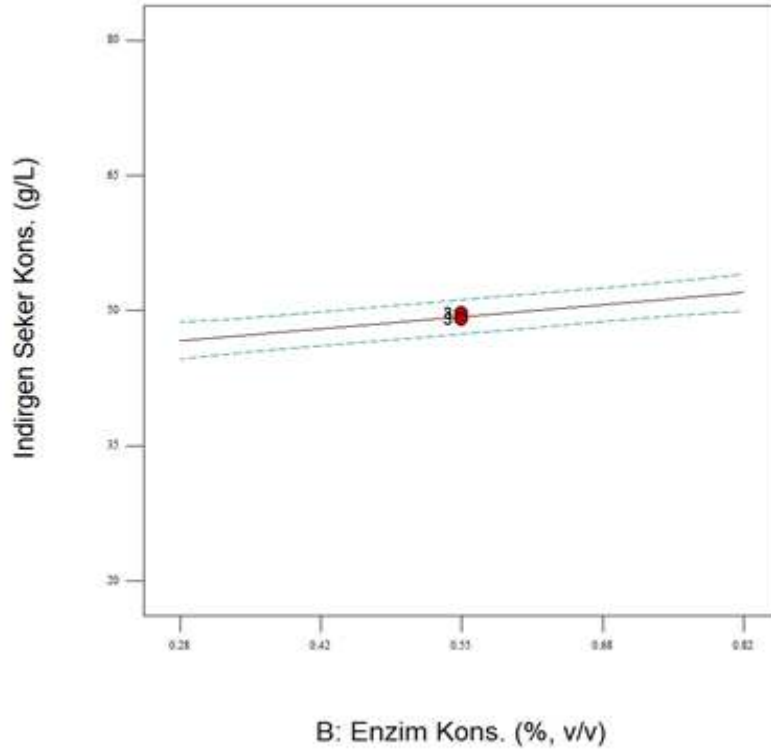


Şekil 4.3. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre enzim konsantrasyonu-süre ikili etkileşiminin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine etkisi

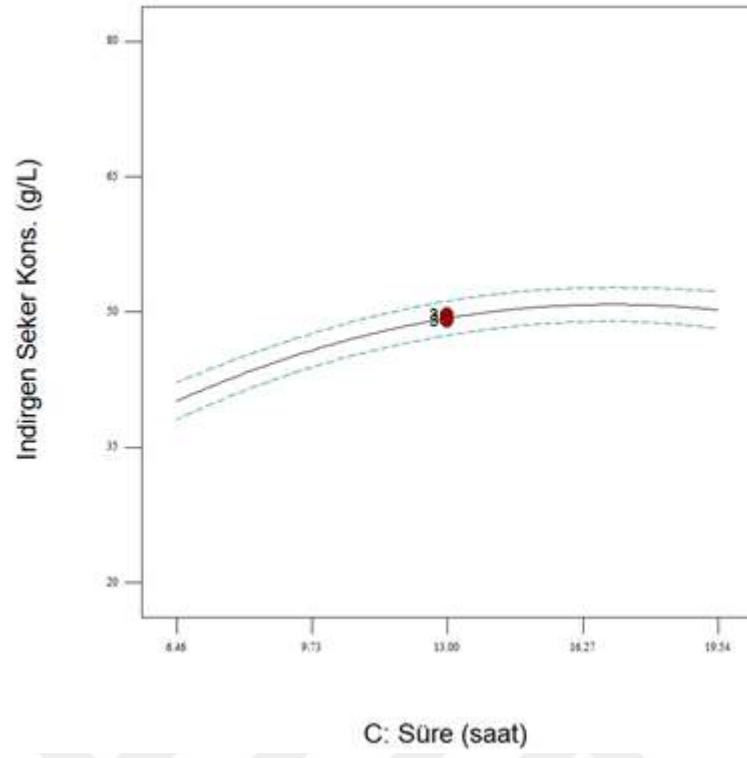
Enzim konsantrasyonu-süre etkileşiminin gösterildiği Şekil 4.3’de ise diğer iki etkileşim sonucuna göre ilk bakışta daha optimum bir noktanın yakalandığı sonucuna varılabilir. Ancak, dikkat edildiğinde düşük dönüşüm konsantrasyon değerleri durumun böyle olmadığını açıklamaktadır. Tablo 4.4’den BC (enzim konsantrasyonu-süre) etkileşim değerinin (0,163) 0,05 değerinden büyük olduğu sonucu da bu yorumu desteklemektedir. MKD ile RSM analizleri ile cevap değişkenine tek bir bağımlı değişken parametresini etkisini gösteren grafikler de elde etmek mümkündür. Buna göre melas konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve sürenin tek başına indirgen şeker üretim miktarına etkilerini gösteren grafikler Şekil 4.6 arasında gösterilmiştir. Şekil 4.4’den görüldüğü gibi melas konsantrasyonu ile indirgen şeker üretim miktarının lineer bir şekilde arttığı görülmektedir. Program tarafından tahmin edilen melas konsantrasyonu 88 g/L olarak öngörülmektedir. Enzim konsantrasyonunun etkisinin gösterildiği Şekil 4.5 enzim konsantrasyonu için değişimin optimum nokta oluşturma eğilimine daha yatkın olduğunu göstermektedir. Buna göre tahmin edilen enzim konsantrasyonu değeri 0,45 (% v/v)’ dir. Son olarak sürenin etkisinin görüldüğü Şekil 4.6’dan uç noktaya yakın olmakla beraber çalışma aralıkları içinde olan değer program tarafından süre tahmininin 15,93 saat olduğu görülmektedir. Design Expert programı ile elde edilen deneysel değerlere karşılık hesaplanan değerler grafiği Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



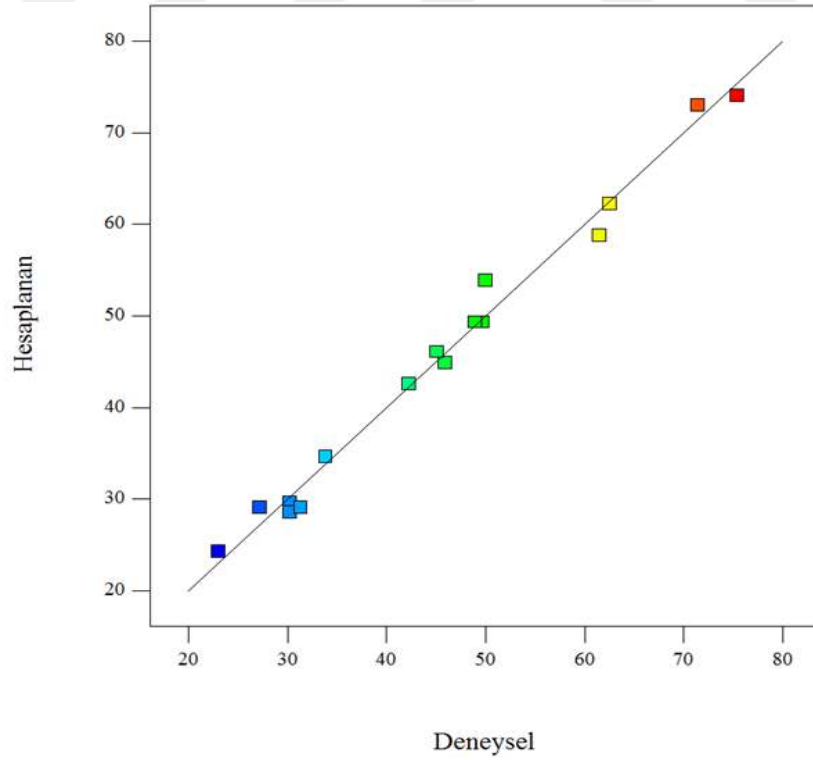
Şekil 4.4. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre melas konsantrasyonunun indirgen şeker konsantrasyonu üzerine tek başına etkisi



Şekil 4.5. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre enzim konsantrasyonunun indirgen şeker konsantrasyonu üzerine tek başına etkisi



Şekil 4.6. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre sürenin indirgen şeker konsantrasyonu üzerine tek başına etkisi



Şekil 4.7. MKD ile tasarlanan deney sonuçlarına göre deneysel karşılık hesaplanan değerlerin değişimi

Özet olarak Design Expert Programı tarafından önerilen çalışma şartları 87,77 g/L melas konsantrasyonu, % 0,45 (v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saat süredir. Bu şartlarda elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu 43,936 g/L ve sakkaroz konsantrasyonu 1,879 g/L'dir. Önerilen şartlarda gerçekleştirilen doğrulama deneyi ile elde edilen sonuçlar ise 41,88 g/L indirgen şeker ve yaklaşık 2 g/L sakkaroz. Görüldüğü gibi model sonucu elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu ile doğrulama deneyi sonucu elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu % 4,5'luk bir oranda hata payı içermektedir ki bu hata oranı kabul edilebilir sınırlar içerisindedir.

4.2. Fermantasyon Deneyleri

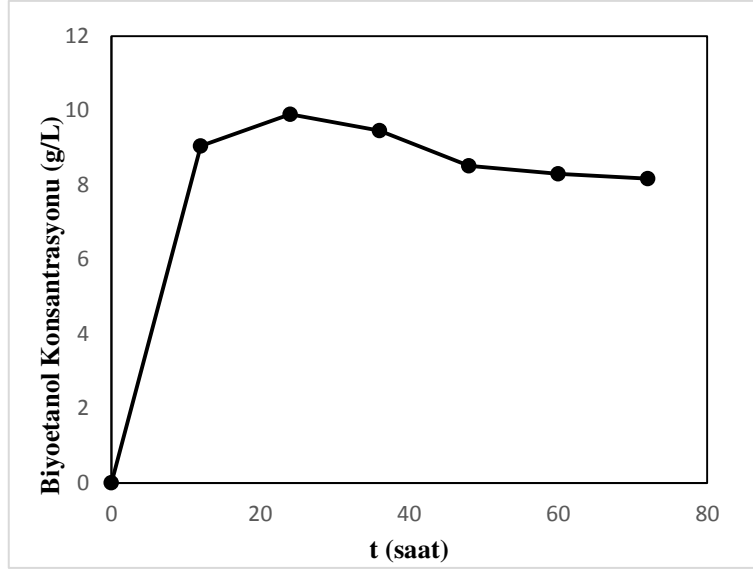
Bu tez çalışmasında şeker pancarı melasından *E. coli* KO11 suşları kullanarak fermantasyonla biyoetanol üretimi kesikli ve sürekli olmak üzere iki reaktör tipinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler kullanılan suşların immobilize edilmesiyle yürütülmüştür.

4.2.1. Kesikli Serbest Hücre Fermantasyonu

Fermantasyon çalışmaları ilk olarak serbest hücre deneyleri ile yapılmıştır. Mikroorganizma 16 saat önceden katı besi yerinden modifiye sıvı LB besi yerinde çoğaltılmıştır. Serbest hücre fermantasyonu 50 ml çalışma hacminde 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 20,24 g/L indirgen şeker içeren melas çözeltisi ile konsantre hazırlanmış olan azot kaynağından 5 ml ilave edilmiştir. 72 saat süren fermantasyona ait biyoetanol miktarları Tablo 4.6 da verilmiştir. Serbest hücrenin kullanıldığı fermantasyonda en yüksek verime 24 saatte ulaşılmıştır. Hücrenin besine ulaşması immobilize hücrelere göre daha kolay olduğundan, bu fermantasyonda Şekil 4.8'de gösterildiği gibi 24. saatte en yüksek biyoetanol üretimini gerçekleştirmiştir. Sitokiyometriye göre verim hesabı yapıldığında % 96'luk teorik etanol verimine ulaşılmıştır.

Tablo 4.6. Kesikli serbest hücre fermantasyonu biyoetanol miktarları (g/L)

Süre (saat)	Biyoetanol (g/L)
0	0
12	9,05
24	9,90
36	9,46
48	8,51
60	8,30
72	8,17



Şekil 4.8. Mikroorganizmanın serbest halde ürettiği biyoetanol konsantrasyonunun zamanla değişimi

4.2.2 Kesikli İmmobilize Hücre ile Fermantasyon

Sürekli sistemde fermantasyon deneylerine geçilmeden önce kesikli sistemde fermantasyon deneyleri yapılmıştır. Farklı aljinat ve CaCl_2 'un denendiği immobilizasyon deneylerindeki amaç sürekli sisteme uygun boncuk yapısını elde etmektir. Elde edilen boncuk hem rijit olmalı hem kütle transferi yönünden mikroorganizmayı etkilememeli hem de yüksek akış hızlarına karşı dayanıklı olmalıdır. Bu amaçla, 18 farklı deney yapılmıştır. İmmobilizasyon deneylerinde 50 g/L'lik melas çözeltisi kullanılmıştır. Uygulanan enzimatik ön işlem sonrasında çözeltide 10,18 g/L glikoz ve 10,06 g/L fruktoz bulunmaktadır.

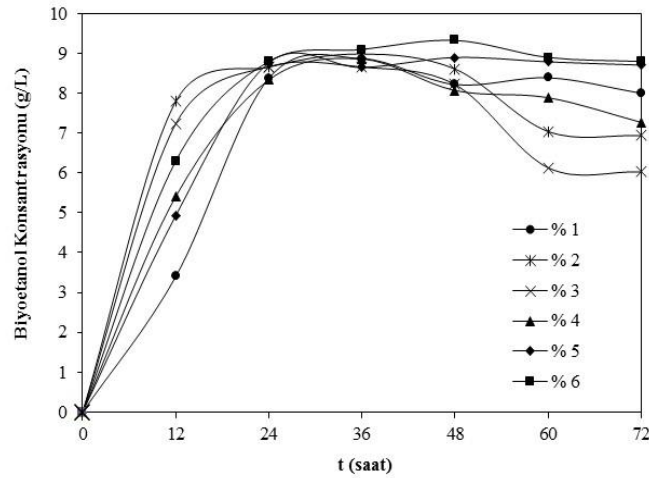
Kesikli denemeler 50 ml çalışma hacminde 250 ml'lik erlenlerde anaerobik olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak mikroorganizma katı besiyerinden öze yarımıyla sıvı modifiye LB ortamına alınarak 37 °C'de 100 rpm'de 16 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda besiyerinde çoğalan mikroorganizmalar % 10 inokülasyon hacmi olacak şekilde immobilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

İlk denemelerde %2'lik (w/v) aljinat çözeltisi kullanılmıştır. CaCl_2 çözeltisi olarak da %1-2-3-4-5-6'lık (w/v) çözeltileri kullanılmıştır. Bu iki farklı çözeltinin kombinasyonu denenmiştir. Tablo 4.7'de mikroorganizmaların 72 saatlik bir fermantasyon sonucunda ürettiği etanol miktarları verilmiştir. Bu tablodaki değerlerin şekil ile gösterimi ise Şekil 4.9'de gösterilmiştir. Tablo 4.7 ve Şekil 4.9 incelendiğinde, tüm ilave edilen CaCl_2

yüzde değerlerinde zamanla 24. saate kadar belirgin bir şekilde biyoetanol konsantrasyonlarında artış gözlenmektedir. Bu saatten sonra % 2 ve 3 CaCl_2 içeren ortam hariç biyoetanol konsantrasyonlarının genellikle çok az değiştiği ya da sabit kaldığı söylenebilir. Yapılan immobilizasyon işleminde boncuk yapısının nasıl olduğu ve fermentasyon süreci sonunda meydana gelen deformasyonlar ile deneysel kinetik parametreler Tablo 4.8’de verilmiştir. Tablo 4.8 incelendiğinde % 5 ve 6 CaCl_2 içeren ortamda elde edilen boncuklar hariç diğer tüm şartlarda üretilen boncukların stabil formda olmadıkları görülmektedir. Aynı tabloda biyokütle verim değerleri ile % verim değerleri en yüksek oranda % 6 CaCl_2 ile sentezlenen boncuklarda elde edilmiştir. Hacimsel verimlilik değerlerine bakıldığında % 5 ve 6 oranında CaCl_2 içeren ortamda hazırlanan boncuklar diğer yüzdelerdeki boncuklara göre düşük değerlere sahip gibi görünse de, bu değerlerin her boncuğun maksimum etanol üretiminin gerçekleştiği süreye göre hesaplandığı unutulmamalıdır.

Tablo 4.7. Farklı kalsiyum klorür içerikleri ve süreler için %2 (w/v)’lik aljinat kullanımı sonucunda oluşan biyoetanol miktarları (g/L)

% Kalsiyum Klorür(w/v)	Süre (saat)						
	0	12	24	36	48	60	72
1	0	3,40	8,38	8,87	8,22	8,39	8,00
2	0	7,80	8,66	8,99	8,61	7,04	6,94
3	0	7,24	8,67	8,66	8,22	6,13	6,03
4	0	5,41	8,34	8,86	8,07	7,89	7,27
5	0	4,93	8,77	8,65	8,9	8,79	8,71
6	0	6,32	8,81	9,13	9,33	8,93	8,82



Şekil 4.9. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında % 2 (w/v)’lik aljinat kullanımı ile yapılan fermentasyon sonucu zamanla biyoetanol konsantrasyonunun değişimi

Tablo 4.8. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında % 2 (w/v)'lik aljinat kullanımı sonucunda oluşan boncukların fiziksel özellikleri ve deneysel kinetik parametreleri

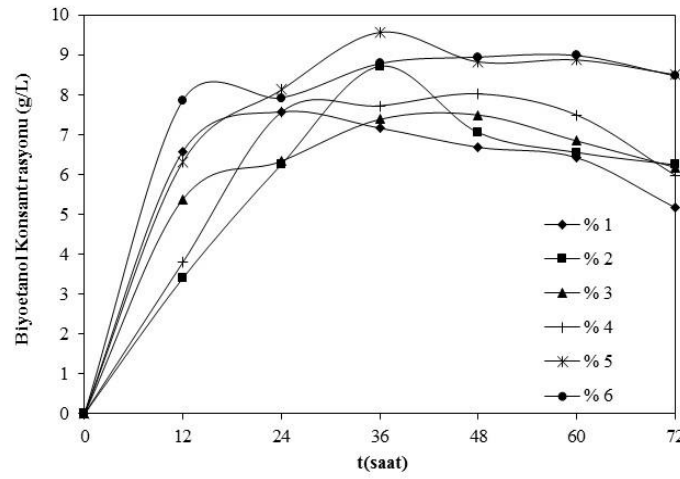
Parametre	% CaCl ₂					
	%1	%2	%3	%4	%5	%6
Boncuk Yapısı	Stabil değil	Stabil değil	Stabil değil	Stabil değil	Stabil	Stabil ve rijit
Y(g/g)	0,44	0,44	0,43	0,44	0,44	0,46
Y_i (%)	86	87	84	86	86	90
Q_p(g L⁻¹ s⁻¹)	0,25	0,25	0,24	0,25	0,19	0,19

Böylece, yukarıdaki tüm değerlendirmeler ışığında en iyi şartlarda üretimin gerçekleştirildiği boncuğun % 6 CaCl₂ içeren ortamda elde edilen boncuk olduğu söylenebilir. Bu boncuk ile üretim için 72 saatlik fermantasyon sonucunda 9,33 g/L biyotanol konsantrasyonu ile en yüksek etanol miktarına 48. saatte ulaşılmıştır. Fermantasyon süresinin sonunda yapıdaki deformeler diğer oranlara göre karşılaştırıldığında oldukça azdır. Maksimum etanol konsantrasyonuna ulaşma süresinin geç olması da yapının rijitliğinden kaynaklanmaktadır. Fakat kütle transferini engelleyici bir etkisi bulunmamaktadır. Yapılan 6 farklı fermantasyonda da maksimum etanol konsantrasyonuna ulaştığı anda ortamda hiç şeker bulunmamaktadır. Stabil olmayan yapılardaki verim düşüklüğü de, ortamın kararsızlığı ve mikroorganizmanın plazmid stabilitesinde ki kararsızlıktan olduğu düşünülmektedir.

İkinci immobilizasyon boncuğu hazırlama deneylerinde % 3'lük (w/v) aljinat çözeltisi kullanılmıştır. CaCl₂ çözeltisi yüzde değerleri yine %1-6 (w/v) arasında olacak şekilde değiştirmiştir. Tablo 4.9'de *E. Coli* KO11'in 72 saatlik bir fermantasyon süresi sonucunda üretmiş olduğu etanol miktarları verilmiştir. Şekil 4.10 ise Tablo 4.9'daki değerlerin şekil ile grafik olarak gösterimidir. Tablo 4.9 ve Şekil 4.10 incelendiğinde % 2 (w/v) aljinat kullanıldığında elde edilen sonuçlara benzer biyoetanol üretimlerinin gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır. Elde edilen boncukların fiziksel özellikleri ile deneysel kinetik parametrelerine ilişkin sonuçlar Tablo 4.10'da verilmiştir. Tablo 4.10 bir önceki boncuk üretimine (% 2 aljinat ile) göre yüzde verim ve hacimsel verimliliği daha yüksek boncukların üretildiğini göstermektedir. Ayrıca stabil şartların daha düşük CaCl₂ oranlarında da (% 3) gözlenmeğe başladığı Tablo 4.10'dan anlaşılan bir diğer sonuçtur.

Tablo 4.9. Farklı kalsiyum klorür içerikleri ve süreler için %3 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan biyoetanol miktarları (g/L)

% Kalsiyum Klorür(w/v)	Süre (saat)						
	0	12	24	36	48	60	72
1	0	6,58	7,58	7,16	6,68	6,42	5,17
2	0	3,4	6,25	8,71	7,05	6,55	6,24
3	0	5,38	6,33	7,38	7,49	6,84	6,18
4	0	3,8	7,56	7,72	8,02	5,98	7,49
5	0	6,32	8,12	9,56	8,82	8,87	8,5
6	0	7,86	7,92	8,78	8,94	8,98	8,47



Şekil 4.10. % 3 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda yapılan fermantasyon deneyinin sonuçları

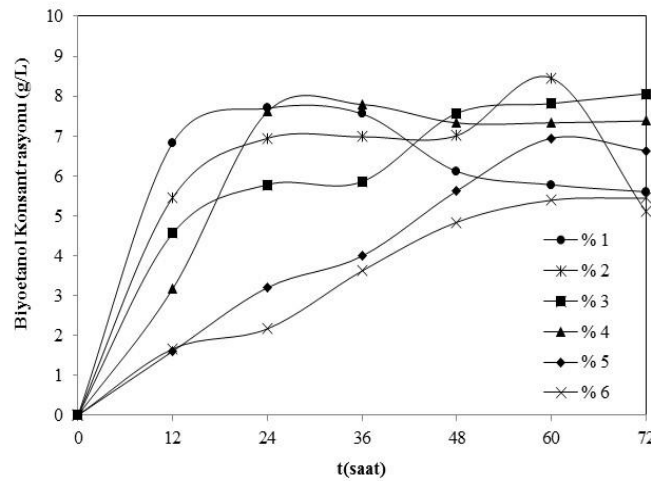
Tablo 4.10. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında% 3 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan boncukların fiziksel özellikleri ve deneysel kinetik parametreleri

Parametre	% CaCl ₂					
	%1	%2	%3	%4	%5	%6
Boncuk Yapısı	Stabil değil	Stabil değil	Stabil	Stabil ve rijit	Stabil ve rijit	Stabil ve rijit
Y(g/g)	0,37	0,43	0,37	0,40	0,47	0,44
Y _i (%)	73	84	71	78	93	87
Q _p (gL ⁻¹ s ⁻¹)	0,32	0,24	0,16	0,17	0,27	0,19

Son olarak yapılan immobilizasyon boncuğu üretme denemelerinde ise % 4'lük (w/v) aljinat çözeltisi kullanılmıştır. CaCl_2 çözeltisi olarak da yine %1-2-3-4-5-6'lık (w/v) çözeltileri kullanıldı. Tablo 4.11 ve Şekil 4.11'de mikroorganizmaların 72'lik saatlik fermantasyon sonucunda ürettiği etanol miktarları verilmiştir. En yüksek teorik verime % 82 ile % 2'lik (w/v) CaCl_2 çözeltisinin kullanıldığı fermantasyon deneyinde ulaşılmıştır. % 2 ve % 3 (w/v) aljinat oranına sahip deneylerin sonuçları ile % 4 (w/v) aljinat oranına sahip deney sonuçları kıyaslandığında verim düşüklüğü açıkça görülmektedir. Bunun başlıca nedenleri ise yapının çok rijit olmasıyla oluşan difüzyon problemleridir. Tablo 4. 12'de görüldüğü üzere % 3 (w/v)'lük CaCl_2 'den sonra yapı hep rijit ve stabildir. Bu rijit yapının verime olan etkisi de Tablo 4.12'de görülmektedir. Ayrıca tüm kesikli deneylerinde etanol konsantrasyonun maksimum olduğu noktada şeker tüketimi de maksimumdur.

Tablo 4.11. Farklı kalsiyum klorür içerikleri ve süreler için % 4 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan biyoetanol miktarları (g/L)

% Kalsiyum Klorür(w/v)	Süre (saat)						
	0	12	24	36	48	60	72
1	0	6,83	7,69	7,56	6,11	5,77	5,60
2	0	5,46	6,94	6,98	7,01	8,45	5,10
3	0	4,56	5,78	5,85	7,57	7,81	8,06
4	0	3,17	7,61	7,79	7,33	7,33	7,38
5	0	1,6	3,20	3,99	5,62	6,94	6,63
6	0	1,66	2,17	3,62	4,84	5,39	5,44



Şekil 4.11. % 4 (w/v) aljinat kullanımı sonucunda yapılan fermantasyon deneyinin sonuçları

Tablo 4.12. % 1-6 arasında değişen kalsiyum klorür miktarlarında% 4 (w/v)'lük aljinat kullanımı sonucunda oluşan boncukların fiziksel özellikleri ve deneysel kinetik parametreleri

Parametre	% CaCl ₂					
	%1	%2	%3	%4	%5	%6
Boncuk Yapısı	Stabil değil	Stabil değil	Stabil ve rijit	Stabil ve rijit	Stabil ve rijit	Stabil ve rijit
Y(g/g)	0,38	0,40	0,42	0,38	0,34	0,27
Y _i (%)	75	82	78	75	67	53
Q _p (gL ⁻¹ s ⁻¹)	0,32	0,15	0,11	0,22	0,12	0,08

4.2.3. Sürekli Fermantasyon

Yapılan kesikli fermantasyon denemelerinde en iyi verim % 3'lük (w/v) ajinat ile %5'lik (w/v) CaCl₂ çözeltisinde elde edilmiştir. Şeker pancarı melasından sürekli sistemde biyoetanol üretimi için bu oranlar kullanılarak *E. Coli* KO11 immobilize edilmiştir. MKD ile önerilen RSM sonuçlarına göre (87,77 g/L melas konsantrasyonu, % 0,45 (v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saat süre) 50 g/L'lik melas çözeltisi için % 0,55 (v/v)' lik enzim konsantrasyonu ile 13 saat hidroliz işlemi ile melastaki tüm sakkarozun hidroliz edilebileceği düşünülerek, bu şartlarda sürekli sistem için hidrolizat hazırlanmıştır. Tablo 4.3 incelendiğinde 9 nolu deney ile enzim seyreltimi hariç burada seçilen şartların yakın olduğu görülmektedir. Tablo 4.3'de % 100 dönüşümün olduğu düşünülürse sürekli fermantasyon öncesi enzimatik hidroliz şartıyla sakkarozun tamamı indirgen şekerlere dönüştürülmüş olacaktır. Bu şartlarda yapılan hidrolizatta beklenen duruma ulaşılmıştır.

Sürekli fermantasyonda 3mm borosilikat camdan yapılmış çapı 3cm, yüksekliği 20 cm olan immobilize hücre reaktörü kullanıldı. Çalışma hacmi kesikli sistemdeki gibi 50 ml'dir. Kolon doluluk oranı ise yaklaşık % 30'dur. Substrat giriş ve çıkışındaki peristaltik pompalar yardımıyla kolon içindeki hacim sabit tutulmuştur. Enzimatik ön işlem sonrasında karbon kaynağı olarak kullanılan melasın içeriğinde 10,02 g/L glikoz ve 10,76 g/L fuktoz bulunmaktadır. Sürekli fermantasyon deneylerinde farklı akış hızlarının fermantasyon verimine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, sürekli fermantasyonda 1,4 ml/dk, 2 ml/dk ve 3,8 ml/dk olmak üzere 3 farklı akış hızında çalışılmıştır. Seyrelme hızları ise sırasıyla 1,68 sa⁻¹, 2,88 sa⁻¹ ve 4,44 sa⁻¹ dir.

Tablo 4.13'de gösterildiği gibi yapılan sürekli fermantasyon deneylerinde, fermantasyon süresi daha uzun tutulması gerektiği açıkça görülmektedir. Çalışılan ilk iki kolon akış hızı değerlerinde zamanla biyoetanol konsantrasyonu artışı ve 72. saatte belirgin bir azalma gözlenmektedir. En yüksek biyoetanol konsantrasyonu (9,44 g/L) değerine 1,68

sa⁻¹ seyrelme hızında ve 60. Saatte ulaşılmıştır. Farklı seyrelme hızları için biyokütle ve yüzde verim ile hacimsel verimlilikler Tablo 4.14’de verilmiştir. Tablo 4.14’de gösterilen kinetik parametrelerde en yüksek verime en düşük akış hızında ulaşılmıştır. Bunun nedeninin düşük kolon akış hızlarında susbtrat ile boncukların teması daha fazla olup, mikroorganizmaya susbtratin içeriğindeki şekerin daha kolay difüze olması söylenebilir. Ayrıca boncuk yapısındaki deformeler en düşük akış hızında meydana gelmiştir. Hücreler boncuk yapısının çözünmesi ile yapıdan koparak serbest hale geçmiştir. Bu da sürekli fermantasyonda immobilize hücre kullanımının avantajlarından biri olan yüksek hücre konsantrasyonuna engel olmaktadır.

Tablo 4.13. Farklı seyrelme hızlarında zamanla oluşan biyoetanol ve ortamdaki şeker konsantrasyonu değerleri

Seyrelme hızı (sa ⁻¹)	Alıkonma Zamanı (sa)	Parametre	Zaman (sa)							
			0	6	12	24	36	48	60	72
1,68	0,59	Şeker (g/L)	20,79	18,64	16,46	14,18	13,11	2,72	0	0
		Biyoeetanol (g/L)	0	0,94	0,96	2,00	2,77	8,64	9,44	6,18
2,4	0,42	Şeker (g/L)	20,79	20,27	18,09	5,71	3,37	0	0	0
		Biyoeetanol (g/L)	0	0	0	6,60	8,08	8,80	7,78	3,25
4,56	2,2	Şeker (g/L)	20,79	19,33	19,30	12,22	3,45	0	0	0
		Biyoeetanol (g/L)	0	0	0	3,65	3,45	2,65	1	0,7

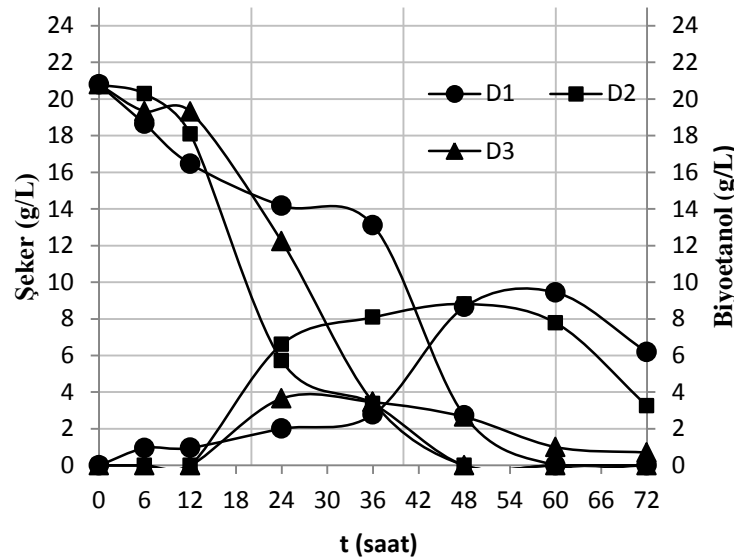
Tablo 4.14. Farklı seyrelme hızlarındaki fermantasyon denemelerindeki kinetik parametreleri

Seyrelme hızı (s ⁻¹)	Y(g/g)	Y _i (%)	Q _p (gL ⁻¹ s ⁻¹)
1,68	0,43	89,01	0,16
2,4	0,42	83,08	0,18
4,56	0,18	34,02	0,15

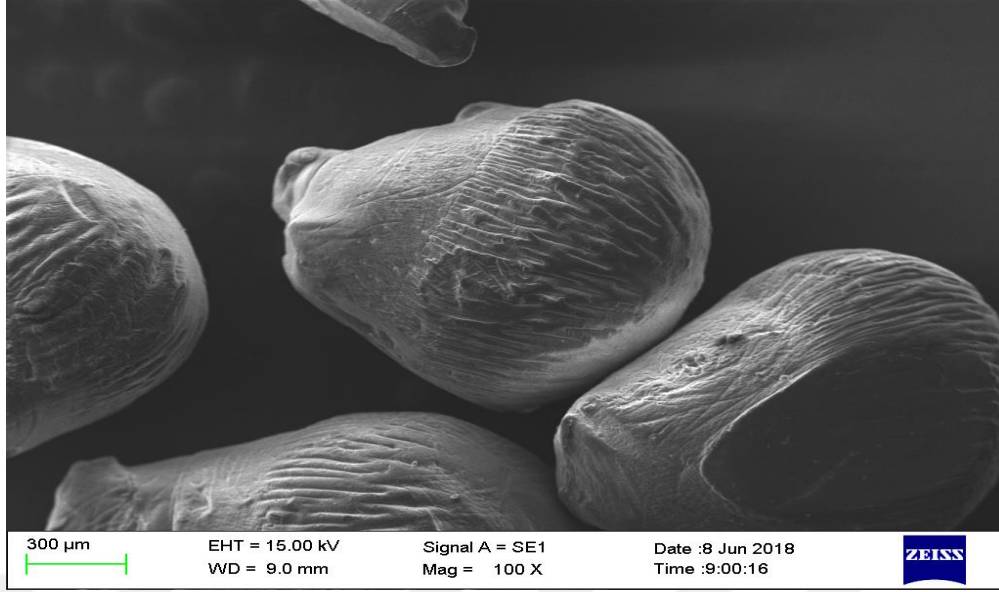
Kesikli ve sürekli fermantasyon sistemlerinin ikisinde de boncuk yapısının bozulması fermantasyon verimini doğrudan etkilediği görülmüştür. Olumsuz yöndeki bu etkinin sebebi ise çözünen boncuk yapısının ortam stabilitesini bozmasıdır. Ayrıca mikroorganizmanın rekombinant olması ve plazmid stabilitesindeki kayıplar verimi düşürmektedir. Şekil 4.12' Farklı seyrelme hızlarındaki fermantasyon deneylerinin zamana bağlı şeker ve biyoetanol konsantrasyonundaki değişimleri gösterilmektedir.

4.3. İmmobilize Hücrelerin Görüntülemesi

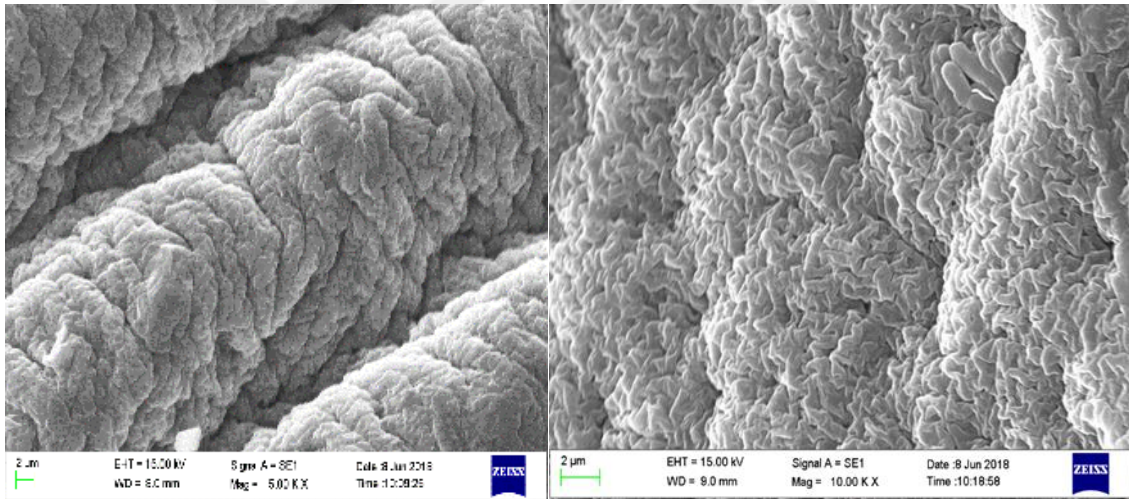
Şekil 4.13' de henüz hidrolizat ortamına verilmemiş taze boncuğun SEM (taramalı elektron mikroskobu) ile 100 kat büyütülmüş hali gösterilmektedir. Yapılan immobilizasyon işlemi sonrasında boncuk çapı yaklaşık olarak 1.35 mm olarak ölçülmüştür. Gözenekli matriste tutuklama işleminde boncuğun dış çeperinde mikroorganizma bulunmaz. Mikroorganizmalar boncuğun iç tarafında tutuklanmıştır. Şekil 4.14' deki ilk görüntüde bu taze boncuk yapısının 5000 kat büyütülmüş halini gösterilmektedir. Şekil 4.14'deki ikinci görüntüde ise boncuk yapısının 10000 kat büyütülmüş hali gösterilmektedir. Uygulanan yöntem uygun olarak dış çeperde mikroorganizma bulunmamaktadır.



Şekil 4.12. Farklı seyrelme hızlarındaki fermantasyon deneylerinin zamana bağlı şeker ve biyoetanol konsantrasyonundaki değişimler D1:1.68 sa⁻¹ D2:2.24 sa⁻¹ D3: 4.56 sa⁻¹



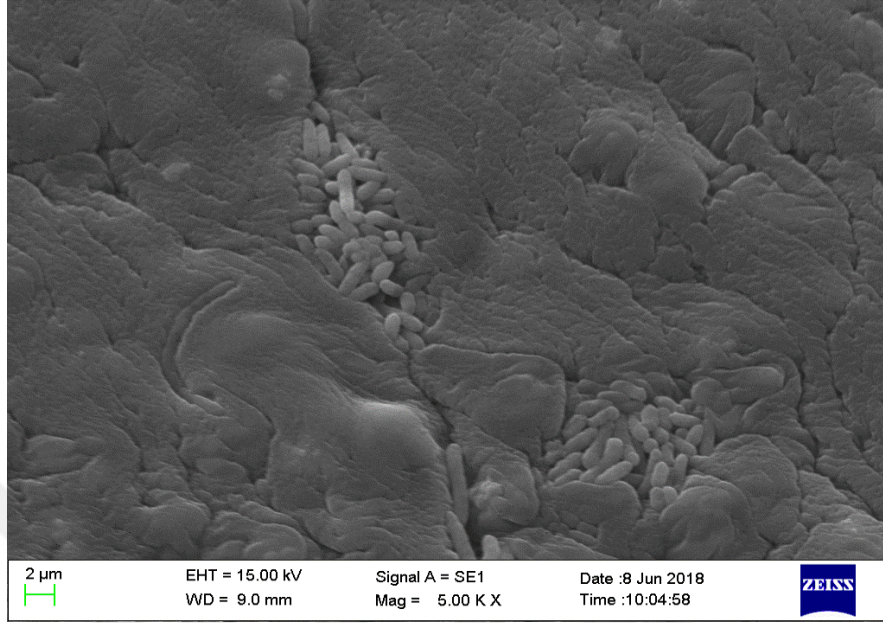
Şekil 4.13. Taramalı elektron mikroskopunda taze boncuğu 100 kat büyültülmüş görüntüsü



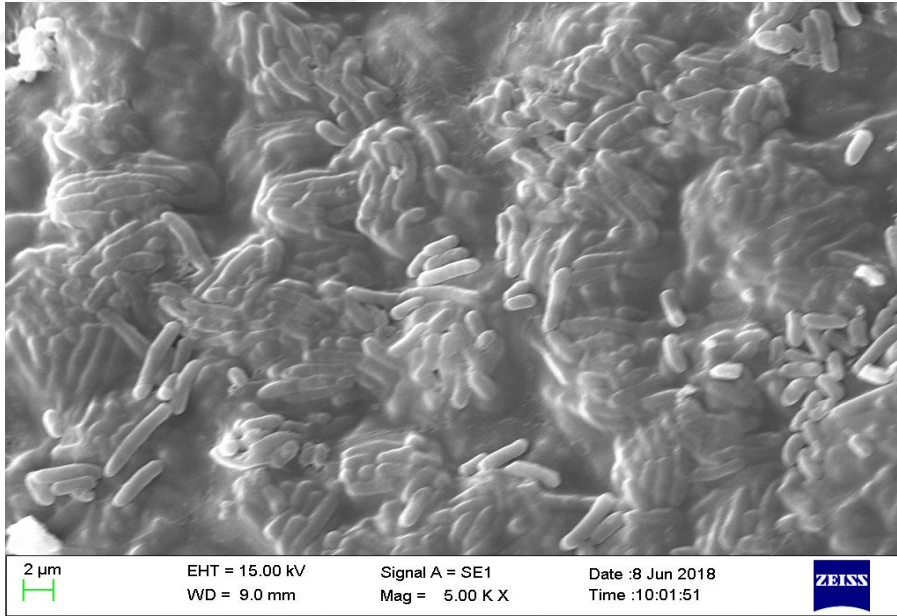
Şekil 4.14. Taramalı elektron mikroskopunda taze boncuğun görüntüsü; (a) 5000 kat büyültülmüş dış yüzeyi; (b) 10000 kat büyültülmüş dış yüzey

Şekil 4.15 ve 4.16’da farklı seyrelme hızlarının kullanıldığı deneylerdeki boncukların 72 saatlik fermantasyon sonucunda yapısındaki deformasyonlar görülmektedir. Bu görüntülerde akış hızlarının boncuk yapısında meydana getirdiği deformasyonlar esasen görülmektedir. İki görüntüde eşit büyütme oranına sahip olup 5000 kat büyütülmüşlerdir. Fermantasyon boyunca boncuk yapısında meydana gelen bu deformasyonların tek sebebi tabiki de akış hızı değildir. Mikroorganizmanın biyoetanol

üretimi sırasında ortama saldığı CO₂, yüksek hücre yoğunluğu, ürettiği diğer asidik yan ürünler boncuk yapısının stabilitesinin ve gözeneklik özelliğinin bozulmasında etkindir.



Şekil 4.15. 1.68 sa⁻¹ seyrelme hızının kullanıldığı fermantasyon deneyindeki boncuğun 72 saat sonra görüntüsü



Şekil 4.16. 2.4 sa⁻¹ seyrelme hızının kullanıldığı fermantasyon deneyindeki boncuğun 72 saat sonra görüntüsü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şeker pancarı melasından *E. coli* KO11 ile biyoetanol üretiminin incelendiği bu çalışmada, hücrelerin serbest ve immobilize halde olduğu kesikli ve sürekli reaktörlerde yürütülen deneyler sonucunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Çalışmanın ilk aşaması olan melas içeriğinde mevcut sakkarozu hidrolizle indirgen şekerlere dönüştürme deneylerinde asidik ve enzimatik hidroliz yöntemlerinden enzimatik hidrolizin daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.
- Enzimatik hidroliz şartları RSM ile optimize edilmiş ve % 20 seyreltilmiş invertaz enzimi ile 87,77 g/L melas konsantrasyonu, % 0.45 (v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saat süre sonunda 43,936 g/L indirgen şeker konsantrasyonu ile başlangıç materyalindeki sakkarozun neredeyse tamamı dönüştürülmüştür.
- Kesikli reaktörde serbest hücrelerle gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda % 96'lık yüksek bir verimle biyoetanol üretilmiştir. Immobilize hücrelerin kullanıldığı kesikli deneylerinde % 93, sürekli sistemin kullanıldığı immobilize deneylerinde ise %89'luk verim elde edilmiştir. Bu değerler kullanılan mikroorganizma ile biyoetanol üretimi gerçekleştirilen çalışmalardaki verim değerlerine çok yakındır.
- Kesikli reaktörde immobilize hücrelerle yürütülen biyoetanol üretimi çalışmalarından da yüksek verim ile biyoetanol üretimi gerçekleştirildiği söylenebilir.
- Çalışmanın son aşaması olan sürekli sistemde biyoetanol üretimi deneyleri sonucu çalışılan aralıktaki düşük akış hızı değerlerinde yüksek verim elde edilmiştir. Kesikli sisteme göre daha yüksek işletme zamanı mikroorganizmaların canlılık faaliyetlerini daha uzun bir sürede tutma olanağı sağlamıştır. Böylece, kesikli sistemde üretimin bittiği sürelerde dahi biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim verimliliği açısından sürekli sistemin kesikli sisteme çok büyük avantaj sağladığı görülmüştür.
- Ca-alinat kullanıldığı immobilizasyon tekniği yerine farklı immobilizasyon materyallerinin kullanıldığı immobilizasyon tekniklerinde verim artabilir.
- Çalışılan hücre immobilize reaktörü daha yüksek hacimlerde tasarlanarak daha düşük seyrelme hızlarında çalışma sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A .** (2013). Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Sakarya University Journal of Science*, 17 (3), 381-397.
- Akalın, B., & Seyrekbasan, A .** (2015). Dünyadaki Biyoetanol Politikalarının Türkiye Koşulları ile Karşılaştırmalı İncelenmesi ve Türkiye Şartlarına Uygunluk Açısından Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddelerin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29 (1), 157-168.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. J., & Negro, M. J.** (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Anonim 1.** (2016). Key Renewables Trends Excerpt from: Renewables information. Energy Information Administration (IEA). <https://www.iea.org/>
- Anonim 2.** (2004). Biofuels for transport: an international perspective. Energy Information Administration (IEA). <https://www.iea.org/>
- Anonim 3.** (2016). Statistical Review of World Energy. BP Group. <http://www.bp.com/statisticalreview/>.
- Anonim 4.** (2008). The State of Food and Agriculture. Biofuels: Prospects, Risks and Opportunities, Food and Agricultural Organization of the United Nations(FAO),Roma. <http://www.fao.org/statistics/tr/>
- Anonim 5.** (2016). Ethanol Exports And Imports Building Global Markets (RFA). <https://ethanolrfa.org/issues/exports-and-trade/>
- Anonim 6.** Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı (2001). D.P:T Yayınları, Gıda Sanayii Özel İhtisas Komisyonu Raporu Şeker Sanayii Alt Komisyon Raporu, Yayın No:641, Ankara.
- Anonim 7.** (2002), Consensus Document On Compositional Considerations For New Varieties Of Sugar Beet: Key Food And Feed Nutrients And Antinutrients: OECD Working Party on Chemicals , Pesticides and Biotechnology Document No: ENJ/M/MONO (2002) 4 <http://www.oecd.org/>
- Arda, M.** (2000). Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayınları. Ankara
- Aydoğan, H., & Acaroğlu M.** (2010), M. E15 Ve E85 Biyoetanol-Benzin Karışımlarının Taşıt Performansı Ve Emisyonlarına Etkisi. *Uluslararası Yakıtlar, Yanma Ve Yangın Dergisi*, (2), 70-75.
- Ayhan, K.** (2000). Gıdalarda mikroorganizma gelişmesini etkileyen faktörler. Gıda

Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası.

- Babu, V., Thapliyal, A., & Patel, G. K.** (2013). *Biofuels production*. John Wiley & Sons.
- Bae, S. O., & Shoda, M.** (2005). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(1), 45-51.
- Balat, M., & Balat, H.** (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied energy*, 86(11), 2273-2282.
- Bayrakcı, A. G.** (2009). Değişik biyokütle kaynaklarından biyoetanölün elde edilmesi üzerine bir araştırma, *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Bayrakcı, A. G., & Kocar, G.** (2012). Utilization of renewable energies in Turkey's agriculture. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 618-633.
- Belgiorno, V., De Feo, G., Della Rocca, C., & Napoli, R. M. A.** (2003). Energy from gasification of solid wastes. *Waste management*, 23(1), 1-15.
- Smidsrød, O., & Skja, G.** (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, 8, 71-78.
- Bridgwater, A. V.** (2003). Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass. *Chemical Engineering Journal*, 91(2-3), 87-102.
- Brooks, L.** (2015). Sugar Beets production, Uses and Health Implications. Nova Publishers, New York
- Cardona, C. A., & Sánchez, Ó. J.** (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*, 98(12), 2415-2457.
- Chisti Y.** (1999), Fermentation (Industrial). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 663-667.
- Coppola, F., Bastianoni, S., & Østergård, H.** (2009). Sustainability of bioethanol production from wheat with recycled residues as evaluated by Emergy assessment. *Biomass and Bioenergy*, 33(11), 1626-1642.
- Cakar, F., Katı, A., Özer, I., Demirbağ, D. D., Şahin, F., & Aytekin, A. Ö.** (2014). Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. *Biochemical engineering journal*, 92, 35-40.
- Çaylak, B., & Sukan, F. V.** (1998). Comparison of different production processes for bioethanol. *Turkish Journal of Chemistry*, 22(4), 351-360.
- Çelebi, A. K., & Uğur A.** (2015). Biyoyakıtlara Yönelik Mali Teşvikler: Türkiye Açısından Bir değerlendirme. *Hacettepe Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler*

- Dawoud, B., Amer, E. H., & Gross, D. M.** (2007). Experimental investigation of an adsorptive thermal energy storage. *International journal of energy research*, 31(2), 135-147.
- De Araújo, Á. A., & Roussos, S.** (2002). A technique for mycelial development of ectomycorrhizal fungi on agar media. *Applied biochemistry and biotechnology*, 98(1-9), 311-318.
- De Carvalho Lima, K. G., Takahashi, C. M., & Alterthum, F.** (2002). Ethanol production from corn cob hydrolysates by *Escherichia coli* KO11. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(3), 124-128.
- Demirbaş, A.** (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied energy*, 86, S108-S117.
- Draycott, A. P. (Ed.).** (2008). *Sugar beet*. Blackwell Publishing. Suffolk
- Ghorbani, F., Younesi, H., Sari, A. E., & Najafpour, G.** (2011). Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36(2), 503-509.
- Godoy, A., Amorim, H. V., Lopes, M. L., & Oliveira, A. J.** (2008). Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International sugar journal*, 110(1311).
- Göksungur, Y., & Zorlu, N.** (2001). Production of ethanol from beet molasses by *Ca*-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turkish Journal of Biology*, 25(3), 265-275.
- Han, W., Chen, H., Jiao, A., Wang, Z., Li, Y., & Ren, N.** (2012). Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 843-847.
- Hernandez, L., & Kafarov, V.** (2009). Use of bioethanol for sustainable electrical energy production. *International Journal of hydrogen energy*, 34(16), 7041-7050.
- Hettinga, W., Junginger, H. M., Hoogwijk, M. M., McAloon, A., & Hicks, K.** (2007, May). Technological learning in US ethanol production. In *From research to market development: proceedings of the international conference held in Berlin, Germany, 7-11 May 2007* (pp. 2232-2237). ETA-Renewable Energies.
- Kim, K. H., & Hong, J.** (2001). Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 77(2), 139-144.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A.** (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), 377-397.

- Kumar, S., Singh, N., & Prasad, R.** (2010). Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 1830-1844.
- Lapan, H., & Moschini, G.** (2012). Second-best biofuel policies and the welfare effects of quantity mandates and subsidies. *Journal of Environmental Economics and Management*, 63(2), 224-241.
- Lau, M. W., Gunawan, C., Balan, V., & Dale, B. E.** (2010). Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 11.
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., Gentry, T. J., & Maier, R. M. (Eds.).** (2011). *Environmental microbiology*. Academic Press.
- Maurya, D. P., Singla, A., & Negi, S.** (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5(5), 597-609.
- McNeil, B., & Harvey, L. (Eds.).** (2008). *Practical fermentation technology*. John Wiley & Sons.
- Melikoğlu, M., & Albostan, A.** (2011). Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26(1).
- Mishra, M. (Ed.).** (2015). *Handbook of encapsulation and controlled release*. CRC Press.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M.** (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.
- Najafpour, G., Younesi, H., & Ismail, K. S. K.** (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 92(3), 251-260.
- Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O.** (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and environmental microbiology*, 57(4), 893-900.
- Özdingis, A. G. B., & Kocar, G.** (2017). Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Paulová, L., Patáková, P., & Brányik, T.** (2013). Advanced fermentation processes. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, 89-110.
- Pilkington, P. H., Margaritis, A., Mensour, N. A., & Russell, I.** (1998). Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the*

Institute of Brewing, 104(1), 19-31.

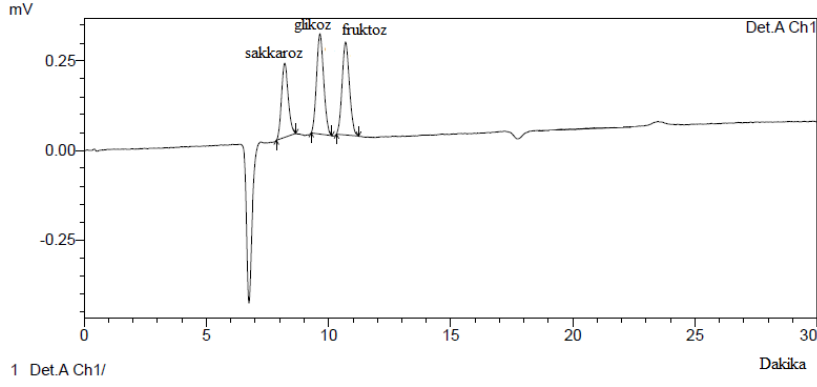
- Rodríguez, L. A., Toro, M. E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M. L., Gouiric, S. C., & Vallejo, M. D.** (2010). Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11), 5914-5917.
- Schacht, C., Zetzl, C., & Brunner, G.** (2008). From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46(3), 299-321.
- Schacht, C., Zetzl, C., & Brunner, G.** (2008). From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 46(3), 299-321.
- Sheoran, A., Yadav, B. S., Nigam, P., & Singh, D.** (1998). Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU- 1. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 38(2), 123-128.
- Soccol, C. R., de Souza Vandenberghe, L. P., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., ... & da Silva Bon, E. P.** (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresource technology*, 101(13), 4820-4825.
- Solomon, B. D., Barnes, J. R., & Halvorsen, K. E.** (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, 31(6), 416-425.
- Sun, Y., & Cheng, J.** (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K.** (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9(9), 1621-1651.
- Takahashi, C. M., de Carvalho Lima, K. G., Takahashi, D. F., & Alterthum, F.** (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(8-9), 829-834.
- URL-1,** 2018 <https://tr.trendxmexico.com/zdorove/117412-spirt-etilovyy-recept-na-latinskom-yazyke.html> TrendxMexico. 15 Nisan 2018.
- URL-2,** 2018 <http://www.epdk.org.tr/Detay/Icerik/3-3098/benzin-turlerine-etanol-harmanlanmasi-hakkinda-teblig> T.C Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu. 10 Nisan 2018.
- URL- 3,** 2018 <https://www.slideshare.net/NasirHussain8/reactor-typesppt> LinkedIn. 18 Haziran 2018.

URL- 4, 2018 http://umich.edu/~essen/html/06chap/html/prs_cstr.htm 19 Haziran 2018

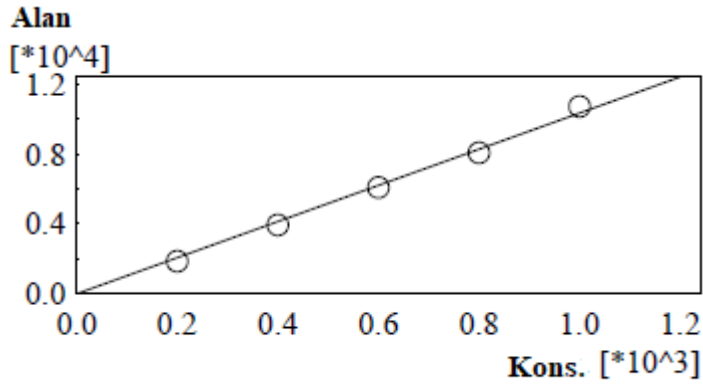
- Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K., Vassileva, C. G., & Morgan, T. J.** (2012). An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*, 94, 1-33.
- Vats, S., Maurya, D. P., Shaimoon, M., Agarwal, A., & Negi, S.** (2013). Development of a microbial consortium for production of blend of enzymes for hydrolysis of agricultural wastes into sugars.
- Walker, G. M.** (2010). *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*. Bookboon.
- Walter, A., Rosillo-Calle, F., Dolzan, P., Piacente, E., & da Cunha, K. B.** (2008). Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass and Bioenergy*, 32(8), 730-748.
- Wan, C., & Li, Y.** (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology advances*, 30(6), 1447-1457.
- Nedovic, V., & Willaert, R. (Eds.).** (2006). *Applications of cell immobilisation biotechnology* (Vol. 8). Springer Science & Business Media.
- Yilmazer, Z.,** 2009. Bir Biyoreaktörde Glikoz Derişimi Kontrolü, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yiğitoğlu, M., Murat, İ. N. A. L., & Gökgöz, M.** (2012). Alternatif Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyotanol. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1(1), 11.
- York, S. W., & Ingram, L. O.** (1996). Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11 using crude yeast autolysate as a nutrient supplement. *Biotechnology Letters*, 18(6), 683-688.
- Zheng, Y., Lin, H. M., & Tsao, G. T.** (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology progress*, 14(6), 890-896.

EKLER

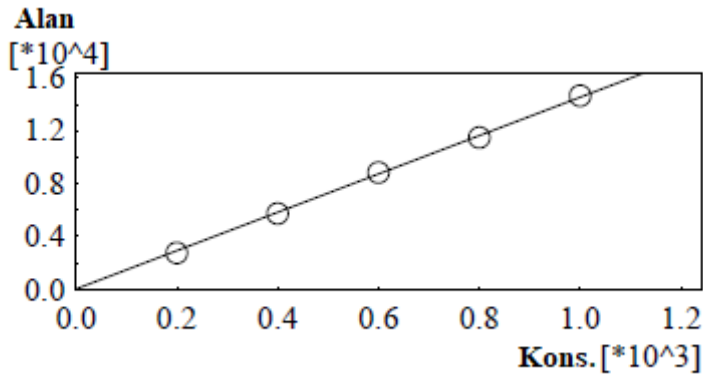
EK.1. HPLC'e ait kromotogram görüntüsü ve kalibrasyon eğrileri



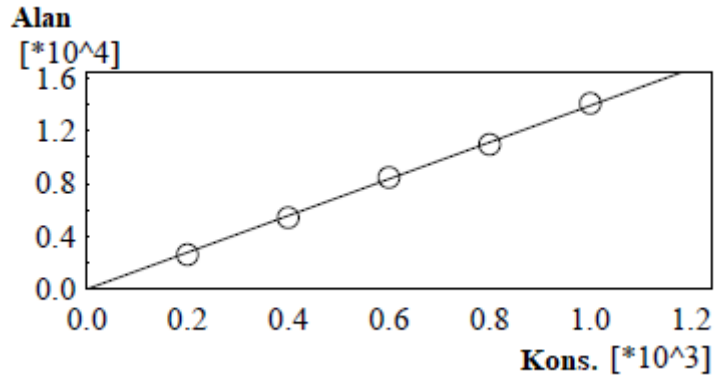
Sakkaroz'a ait kalibrasyon eğrisi



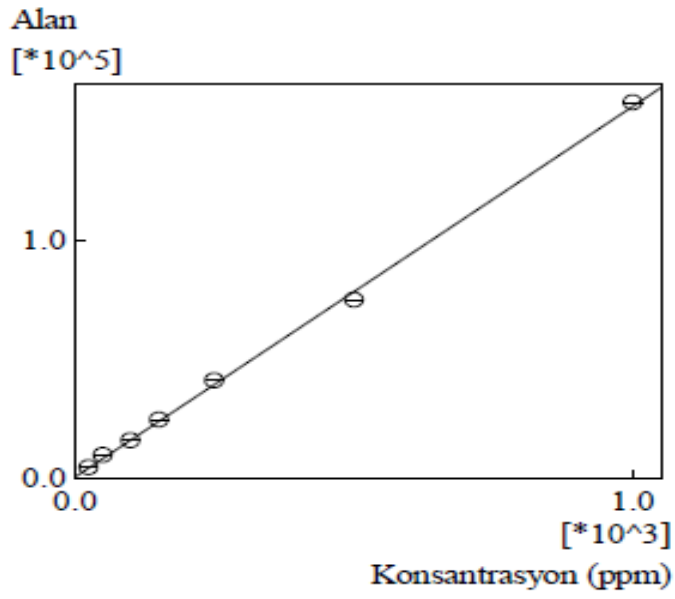
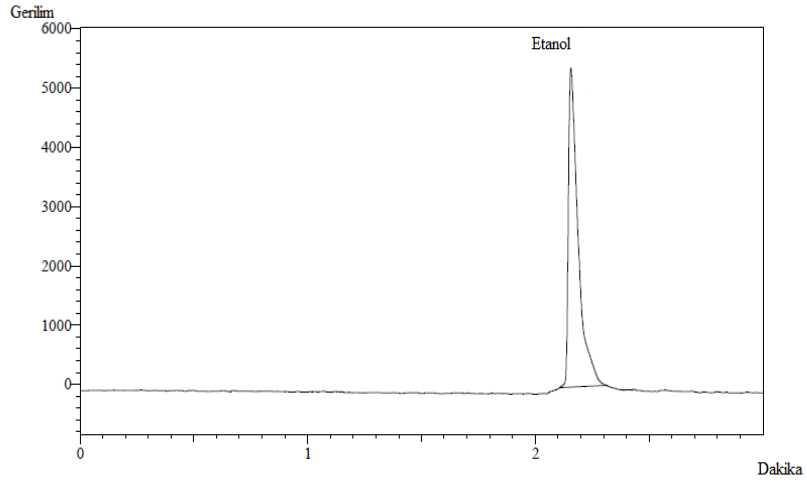
Glikoza ait kalibrasyon eğrisi



Fruktoza ait kalibrasyon eğrisi



EK.2. GC'ye ait kromotogram ve kalibrasyon eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Nur Kevser DOĞAN

Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
23200 ELAZIĞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri: Elazığ
Doğum Tarihi: 14.07.1992
Medeni Durum: Bekâr
Yabancı Dil: İngilizce
Elektronik posta: nurkevserd@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2015-2018: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı
2015-2018: Fırat Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İş Güvenliği ve Sağlığı
2011-2015: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
2006-2010: Balakgazi Lisesi, Sayısal Bilimler

İŞ TECRÜBESİ

Staj, Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2014

Staj, İstanbul Teknik Üniversitesi Dr. Orhan Öcalgıray Moleküler Biyoloji-Biyoteknoloji &Genetik Araştırmalar Merkezi, 2013

PROJELER

Şeker Pancarı Melasından İmmobilize Rekombinant *E.Coli* Ko11 ile Biyoetanol Üretiminin Araştırılması

Proje No: MF.17.13, Araştırmacı, 2017-Devam ediyor

İmmobilize Rekombinant *E.coli* KO11 ile Sürekli Sistemde Çay Atıklarından Biyoetanol Üretimi (TÜBİTAK)

Proje No: 116Y397, Bursiyer, 15.06.2017-Devam Ediyor