



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



HURDA İNCİRDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ

Yüksek Lisans Tezi

Doğa ÇAKMAK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

HURDA İNCİRDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ

Doğa ÇAKMAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Yekta GÖKSUNGUR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ETİK
KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Hurda İncirden Biyoetanol Üretimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12/09/2024

Doğa ÇAKMAK



ÖZET

HURDA İNCİRDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ

ÇAKMAK, Doğa

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

Eylül 2024, 80 sayfa

Biyometanol, yenilenebilir ve çevre dostu bir fosil yakıt alternatifi olarak artan enerji taleplerine ve çevresel sorunlara sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır. Bu çalışma, atık incirlerden *Saccharomyces cerevisiae* ile biyometanol üretim sürecine ve bu üretimin proses parametrelerinin optimizasyonuna odaklanmaktadır.

Etanol üretimini etkileyen önemli ortam bileşenlerini belirlemek için (maya ekstraktı, pepton, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Plackett-Burman tasarımı kullanılmıştır. Bulgular sonucunda, ortam bileşenlerinin p değerleri 0.05'ten büyük olduğu için etanol üretimine katkısının istatistiksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir. Ortam bileşenlerinin etanol üretimine katkısı belirlendikten sonra fermantasyon parametrelerinin (başlangıç pH, inkübasyon oranı, inkübasyon sıcaklığı, fermantasyon sıcaklığı ve başlangıç substrat konsantrasyonu) etanol üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Maksimum etanol verimi (maksimum etanol konsantrasyonu 90.6 g/L) başlangıç pH'sının 5.5 pH, aşı oranının %4, fermantasyon süresinin 42 saat, inkübasyon sıcaklığının 32°C ve substrat konsantrasyonunun %9.56 olduğu koşullarda sağlanmıştır.

Bu çalışma, ekonomik değeri yüksek olan atık incirlerin biyometanol üretimi için uygun maliyetli ve sürdürülebilir bir substrat olarak kullanılma potansiyelini ortaya çıkarmaktadır. Bu süreç, yalnızca atıkların değerlendirilmesine katkıda bulunmakla kalmayacak, aynı zamanda yenilenebilir enerji üretimini de destekleyecektir. Sonuçlar, atık incirlerden biyometanol üretiminin hem atık yönetimi

hem de enerji üretimi ihtiyaçlarını karşılamak için uygulanabilir bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, hurda incir, *Saccharomyces cerevisiae*, fermantasyon, yenilenebilir enerji, atık değerlendirme, optimizasyon, Plackett-Burman tasarımı



ABSTRACT

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM WASTE FIGS

ÇAKMAK, Doğa

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

September 2024, 80 pages

Bioethanol offers a sustainable solution to the increasing energy demands and environmental issues as a renewable and eco-friendly alternative to fossil fuels. This study focuses on the bioethanol production process from waste figs using *Saccharomyces cerevisiae* and the optimization of process parameters for this production.

To identify the key medium components affecting ethanol production (yeast extract, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), the Plackett-Burman design was employed. The findings indicated that the p-values of the medium components were greater than 0.05, suggesting that their contribution to ethanol production was not statistically significant. After determining the contribution of the medium components, the effects of fermentation parameters (initial pH, inoculation ratio, incubation temperature, fermentation temperature, and initial substrate concentration) on ethanol production were investigated. The maximum ethanol yield (maximum ethanol concentration of 90.6 g/L) was achieved under the conditions of an initial pH of pH 5.5, an inoculation ratio of 4%, an incubation, fermentation time 42h, temperature of 32°C, and a substrate concentration of 9.5%.

This study reveals the potential of using waste figs as a cost-effective and sustainable substrate for bioethanol production, which not only contributes to waste valorization but also supports renewable energy production. The results suggest that bioethanol production from waste figs could be a viable approach to meet both waste management and energy production needs.

Keywords: Bioethanol, waste figs, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, renewable energy, waste valorization, optimization, Plackett-Burman design



ÖNSÖZ

“Hurda incirden biyoetanol üretimi” başlıklı bu tez çalışmasının deneysel aşamaları, Işık Tarım Ürünleri Sanayi ve Tic A.Ş. AR-GE Merkezi’nde yapılmıştır.

Tez çalışmasında, bir atık olan hurda incir *Saccharomyces cerevisiae* ile biyoetanol üretiminde değerlendirilmiş olup laboratuvar ölçeğinde fermantasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırması sonucunda, substrat olarak hurda incirin kullanılması ile gerçekleştirilen etanol üretimi ve bu üretim koşullarının optimize edildiği herhangi çalışmaya rastlanmamıştır. İlk defa gerçekleştirilen üretimden elde edilecek olan optimizasyona ait verilerin ürün konsantrasyonu değerlerini iyileştirilmesi, üretim maliyetini düşürmesi, büyük ölçekte etanol üretiminde izlenilecek yola katkıda bulunması ve literatürdeki bir boşluğu doldurması beklenmektedir. Ayrıca hurda incirin katma değeri yüksek bir ürün üretilmesinde değerlendirilmesi, bu atığın elde edildiği Ege Bölgesi başta olmak üzere tarımsal yöreler için cazip bir ekonomik alternatif oluşturacak ve atık yönetimine yardımcı olacaktır.

İZMİR

12 /09/2024

Doğa ÇAKMAK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Etanol Kullanım Alanları	3
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.3. Etanol Metabolik Yol İzi	9
2.4. Etanol Üretim Yöntemleri	12
2.5. Etanol Üretiminde Farklı Atık ve Mikroorganizmaların Kullanımı	14
2.6. Etanol Üretimine Etki Eden Faktörler ve Gerçekleştirilen Çalışmalar	18
2.7. İncir ve Hurda İncir	19
2.8. Plackett-Burman Tasarımı	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1 Gereçler	27
3.1.1 Mikroorganizma	27
3.1.2. Substrat	28
3.1.3. Kimyasallar	29
3.1.4. Ekipmanlar	29
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. Fermantasyon Ortamının Hazırlanışı	29

3.2.2. Plackett-Burman Tasarımıyla Önemli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi	31
3.2.3. Fermantasyon Ortam Koşullarının Belirlenmesi	32
3.2.4. Analitik Yöntemler	33
3.2.4.1. Toplam Şeker Profilinin Belirlenmesi	33
3.2.4.2. pH	33
3.2.4.3. Etanol Miktarının Belirlenmesi ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması	33
3.2.4.4. Maya Hücre Miktarının Belirlenmesi	34
3.2.4.5. İstatistiksel Değerlendirme	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Çalışmada substrat olarak kullanılan incir ekstraktının bileşimi	36
4.2. Plackett-Burman Tasarımı ile Gerekli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi	36
4.3. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Etanol Üretimine Etkisi	40
4.4. Aşı Oranının Etanol Üretimine Etkisi	43
4.5. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Etanol Üretimine Etkisi	46
4.6. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun ve İnkübasyon Süresinin Etanol Üretimi Üzerine Etkisi	49
4.7. Etanol Üretim Kinetiği	52
5. SONUÇ	57
KAYNAKLAR DİZİNİ	59
TEŞEKKÜR	75
ÖZGEÇMİŞ	76
EKLER	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>S. cerevisiae</i> ve diğer mayalar arasındaki genel farklılıklar (Albergaria & Arneborg, 2016).	8
Şekil 2.2. Embden-Meyerhof-Parnas Glikoliz Yol İzi (Al Abdallah et al., 2016).	11
Şekil 2.3. İncir üretimindeki ilk 10 üretici ülkenin ortalama üretim miktarları (Anonymous, 2019)	23
Şekil 3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mikroskop altındaki görüntüsü (Ejuama vd., 2021).	28
Şekil 3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> petri kaplarında üretim sonrası görüntüsü. 28	
Şekil 3.3. Aflatoksinli incirin UV ışık altındaki görüntüsü	29
Şekil 3. 4. Kuru incir fermantasyon ortamının hazırlanması.....	31
Şekil 3.5. Maya sayımı akış şeması	35
Şekil 4. 1 pH değerinin etanol miktarı üzerine etkisi	41
Şekil 4.2. Farklı aşı oranlarının üretilen etanol miktarı üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.3. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının üretilen etanol miktarı üzerine etkisi	47

Şekil 4.5. Zamana bağılık olarak üretilen etanol teorik verimlerinin değişimi52

Şekil 4.6. Etanol üretim kinetiği53



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı etanol çeşitleri ve endüstrideki kullanım alanları (Rajarajan et al., 2016).....	6
Çizelge 2. 2. Farklı mikroorganizmalar ve substratlar ile elde edilen etanol verimleri.....	15
Çizelge 2.3. Farklı mikroorganizmalar ve substratlar ile elde edilen etanol verimleri	16
Çizelge 2.4. Farklı mikroorganizmalar ve substratlar ile elde edilen etanol verimleri	17
Çizelge 2.5. Kuru incir için besin öğeleri analizi sonuçları (Anonymous, 2018). 21	
Çizelge 2.6. Kuru incir için yağ asidi profili sonuçları (Merieux Nutri Sciences, 2018).....	22
Çizelge 2.7. Kuru incir için 2018-2023 sezonları için ihracat miktarları (25 Mart 2023 tarihi itibarıyla) (Anonim, 2023)	23
Çizelge 2.8. Kuru incir için 2018-2023 sezonları için üretim miktarları (25 Mart 2023 tarihi itibarıyla) (Anonim, 2023)	24
Çizelge 3.1. Plackett Burman denemesi için kullanılan fermantasyon ortamları bileşenleri.....	32
Çizelge 3.2. Etanol üretimi fermantasyon ortamı için üretim parametreleri	32

Çizelge 4. 1. İncir ekstraktı toplam şeker ve karbonhidrat profili	36
Çizelge 4.2. Hurda incir ile hazırlanan fermantasyon ortamında yapılan PB deneme tasarımı ve fermantasyon sonucu üretilen etanol miktarları.....	37
Çizelge 4.3. Etanol üretimi için tahmini etki değerleri ve katsayılar.....	38
Çizelge 4.4. Etanol üretimi için varyans analizi	38
Çizelge 4.5. pH değerinin etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi.....	41
Çizelge 4.6. Aşırı oranının etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi	45
Çizelge 4.7. İnkübasyon sıcaklıklarının etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi	48
Çizelge 4.8. Başlangıç substratın farklı sürelerde etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi	49
Çizelge 4.9. Zamana göre etanol miktarları (g/L).....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ADH	Aldehit Dehidrojenaz
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
Glikoz-6-P	Glikoz-6-fosfat
Fruktoz-6-P	Fruktoz-6-fosfat
Gliseraldehit-3-P	Gliseraldehit-3-fosfat
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
SHF	Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon
SSF	Eşzamanlı Hidroliz ve Fermantasyon
S-SSF	Yarı-eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon
CBP	Konsolide Biyoproses
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	U.S. Food and Drug Administration
UV	Ultraviyole

ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	Varyans analizi
SPSS	İstatistik paket programı
AOAC	Association of Official Analysis Chemists
Adj R ²	Düzeltilmiş regrasyon katsayısı
%FA	Yüzde Fenolik Asit
µm	Mikrometre
kcal	Kilokalori
mcg	Mikrogram
ha	Hektar
mg	Miligram
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre
R ²	Regresyon katsayısı
rpm	Devir/dakika (revolutions per minute)
g/L	Gram/Litre
% v/v	Hacimce yüzde

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
% w/w	Ağırlıkça yüzde
dk	Dakika
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry with headspace
GC/LC	Gas Chromatography / Liquid Chromatography
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
MRD	Maximum Recovery Diluent
YPD	Maya özütü Peptonlu Dekstroz
PB	Plackett-Burman
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnezyum sülfat

1. GİRİŞ

Etil alkol; gıda, tıp ve eczacılık gibi çeşitli alanlarda endüstriyel hammadde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Arı & Dönmez, 1999). Kimyasal olarak, etanol ve biyoetanol aynı moleküllerdir. Literatürde biyoetanol terimi, fosil yakıtlardan sentetik olarak elde edilen etanolden farklı olarak biyokütleden üretilen etanolü ifade etmek için kullanılmaktadır (Adıgüzel, 2013). Etil alkol, su ve benzinle iyi karışan, renksiz, yüksek yanıcı sıvı bir yakıttır (Melikoğlu & Albostan, 2011). Biyoetanol saf bir benzin yerine veya benzinle karıştırılarak kullanılmaktadır. Birçok mikroorganizmanın, bakteriler, mayalar ve filamentöz küfler de dahil olmak üzere, lignoselülozik hidrolizatlardan etanol üretmek için fermantasyon yapabildiği literatürde belirtilmiştir. Bunlar arasında, *E. coli*, *Zymomonas mobilis*, *S. cerevisiae* ve *Pichia stipitis*, lignoselülozik etanol biyoprosesler için en ilgili olanlardır. Bu mikroorganizmaların, lignoselülozik biyokütlelerden etanol üretim süreçlerinde avantajlı veya dezavantajlı olarak düşünülebilecek farklı doğal özellikleri vardır (Girio vd., 2010). *Saccharomyces cerevisiae*, geniş bir pH aralığında çalışabilir olması ve mutasyona dirençli olması nedeniyle biyoetanol üretimi için en tercih edilen mikroorganizmadır. Tarımsal ve endüstriyel atıklar, fermantasyon süreçlerinde hammadde maliyetini düşürdüğü için, birçok çalışma bu substratların biyoetanol üretimi potansiyeli üzerinde odaklanmıştır. Çoğu biyoteknolojik süreçte olduğu gibi, araştırmacılar ürün maliyetlerini düşürmek ve atıklardan yüksek katma değerli ürünler üretmek için çeşitli bölgesel tarımsal ürünleri ve atıkları kullanarak etanol üretimini araştırmışlardır.

Bu tez çalışmasının amacı, tüketilmesi uygun olmayan çok düşük maliyetli hurda incirin substrat olarak kullanılarak *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 mayası ile etanol üretimi için optimum ortam bileşenleri ve fermantasyon parametrelerinin belirlenmesidir. Bu doğrultuda ilk olarak fermantasyonda kullanılacak mayanın inkübasyon koşulları seçilerek biyoetanol üretimi üzerine etkisinin incelenmesi için Plackett-Burman tasarımı ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Buna ek olarak aşı oranı miktarı, başlangıç pH değeri, substrat

konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığı gibi fermantasyon koşullarının etanol verimi üzerine etkisi de değerlendirilmiştir. Optimum etanol veriminin tespit edilmesi amacıyla 6 saat aralıklarla etanol miktarı tespit edilerek etanol üretim kinetiği gözlemlenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etanol Kullanım Alanları

ABD ulaşım sektörü ABD'nin toplam enerji ihtiyacının yaklaşık %30'unu aynı zamanda tüm ABD petrol tüketiminin %70'ini karşılamaktadır. Ulaşım sektöründe çevreye olan olumsuz etkinin azaltılması amacıyla etanol ve diğer alternatif kaynaklardan elde edilen yakıtlara olan ilgi artmıştır (Anonymous, 2024). Söz konusu biyolojik yakıt kaynakları büyük ölçüde petrol, kömür, doğal gaz vb. gibi çeşitli fosil enerji kaynaklarına bağımlılığı da azaltarak sürdürülebilir bir çevre oluşturmakta ve ekonomiye katkı sağlamaktadır. Özellikle büyük kentsel alanlarda aşırı fosil yakıt tüketimi, son birkaç on yılda yüksek düzeyde çevresel kirliliğin oluşmasına sebep olmuştur. Böylece atmosferdeki sera gazlarının seviyesi de büyük ölçüde artmıştır ve artmaya devam etmektedir (Datta et al., 2024).

Fosil yakıtların üretimi ve tüketimi, 1990 ve 2019 yılları arasında sırasıyla yaklaşık %67.5 ve %64 oranında artmıştır. Bu ek üretim ve tüketim eğilimleri, küresel iklim değişikliğinde rol alan küresel karbondioksit emisyonları üzerinde önemli etkiler yaratmıştır. Elde edilen veriler, fosil yakıtların daha fazla kullanılmasıyla atmosfere salınan sera gazı miktarının arttığını ve bunun da küresel ısınmayı daha çok etkilediğini göstermektedir. Bu durum, dünya genelinde iklim değişikliğiyle mücadele çabalarının önemini ve fosil yakıt tüketiminin azaltılması gerekliliğini vurgulamaktadır (Siddik et al., 2021).

Dünya ulaşım, ısı ve enerji için yenilenemeyen enerji kaynaklarına bağımlıdır. Fosil yakıtlar yenilenemeyen birincil enerji kaynaklarıdır ve küresel nihai enerji tüketiminin tahmini olarak %78.4'ünü oluşturmaktadır. Artan enerji gereksinimleri, azalan fosil yakıt kaynakları, sağlık ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, alternatif yenilenebilir yakıtlara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyoyakıtlar, özellikle çok daha düşük sera gazı emisyonları nedeniyle fosil yakıtların yerini alabilecek potansiyel yenilenebilir enerji kaynağıdır. Bununla birlikte biyoyakıtlar, güvenli enerji arzına olanak tanıyan fosil yakıtlara göre coğrafi olarak daha eşit dağılmış ortak biyokütle kaynaklarından üretilebilmektedir. Bu

nedenlerden dolayı, bilim dünyasında biyoyakıtlara artan bir ilgi vardır (Branco et al., 2018;Toor et al., 2020). Günümüzde biyogaz, biyodizel, biyohidrojen ve biyobütanol gibi farklı biyoyakıt türleri mevcuttur ve biyoetanol en çok üretilen biyoyakıt türüdür (Khaire et al., 2021). Biyoetanol şeker, nişasta veya lignoselülozik biyokütle açısından zengin yenilenebilir hammaddelerden üretilmektedir (Ebrahimiyaqda & Ogden, 2018).

Dünyanın dört bir yanındaki ülkeler, Kyoto Protokolü'nde belirtilen karbon dioksit azaltma hedeflerine ulaşmak ve biyokütle arzına bağımlılığı azaltmak amacıyla gelecekteki enerji taleplerini karşılamak için biyokütlenin ekonomik kullanımına yönelik devlet politikalarını değerlendirmiştir. Günümüzde etanol, motorlu taşıtlarda en yaygın kullanılan sıvı biyoyakıttır ve dünya çapında etanol talebi, nüfusun hızlı büyümesi ve sanayileşme nedeniyle sürekli artmaktadır. Ancak, mısır ve şeker kamışı gibi geleneksel ürünler, birincil değerleri olan gıda ve yem nedeniyle küresel biyoetanol üretimi talebini karşılayamamaktadır. Bu nedenle, tarımsal atıklar gibi lignoselülozik maddeler, biyoetanol üretimi için cazip hammaddeler olarak öne çıkmaktadır. Tarımsal atıklar uygun maliyetli, yenilenebilir ve bol miktarda bulunmakta olup, bu atıklardan elde edilen biyoetanol, umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Sarkar vd., 2012).

Biyoetanolün kullanımı ilk olarak 1897 yılında Nikolas Otto tarafından icat edilen içten yanmalı motorlarla sağlanmıştır, Daha sonraki süreçte yakıt-etanol karışımları şeklinde benzine ihtiyaç duyan tüm araçlar ve motorlarda başarıyla kullanılmıştır (Meral & Kamberoğlu, 2012).

Yerel ve ticari çözümler ile aerosollerin, etanol ihtiyacının en yüksek kaynakları olduğu düşünülmektedir. Etanol, mimari yüzey kaplamalarında, yakma veya yakıt yanma faaliyetlerinde (yakıt azaltma ve orman yangınları dahil) kullanılmaktadır. Ayrıca, etanol, alkollü içeceklerde, geniş bir yelpazedeki kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde, ev temizlik ürünleri ve cilalarda, farmasötik ürünlerde, dezenfektanlar ve böcek ilaçlarında, boyalar ve boya ürünlerinde (incelticiler gibi), yonga levhadan yapılmış ürünlerde, yağlama yağlarında, ev ve

endüstriyel mürekkeplerde (basılı malzemeler dahil) ve evcil hayvan ürünlerinde de mevcuttur. (DCCEEW, 2024)

Etanol aynı zamanda sağlık sektöründe de aktif rol almaktadır. Sağlık sektöründeki kullanım olanaklarına dair detaylar aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

1. Metanol zehirlenmesi: Metanolün kendisi, metabolize olmuş hali olan 'formik asit' kadar toksik değildir. Metanol, alkol dehidrojenaz enzimi tarafından 'formaldehit'e dönüştürülmektedir. Ardından, aldehit dehidrojenaz (ADH) enzimi formaldehiti formik aside dönüştürmektedir. Bu metabolit, metanol zehirlenmesinin zararlı etkilerini, görme kaybı ve Parkinson benzeri hareket bozukluklarını ortaya çıkarmaktadır. Etanol metabolizması da ADH tarafından gerçekleştirilir; ancak etanolün ADH'ye olan ilgisi metanolden çok daha yüksektir. Bu nedenle, etanol verilmesi metanolü güçlü bir şekilde inhibe etmekte ve formik asit oluşumunu yavaşlatmaktadır (Sharma et al., 2021).

2. Etilen glikol zehirlenmesi: Etilen glikol, tıpkı metanol gibi karaciğerde alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi tarafından metabolize edilerek glikoaldehit oluşturmaktadır. Glikoaldehit daha sonra glikolik asit ve oksalik aside dönüşmektedir. Zehirlenme sonrası etanol verilmesi, ADH'ye bağlanma konusunda enzimi fazlasıyla doyurabildiği için etilen glikol ile rekabetçi bir şekilde inhibitör rol oynamaktadır. Bu sayede, etilen glikolün ADH ile etkileşimi engellenir ve toksik metabolitlerin oluşumu yavaşlatılmaktadır (Brent, 2001).

3. Alkol bazlı el antiseptikleri genellikle izopropanol, etanol, n-propanol veya bunların karışımını aktif bileşenler olarak içermektedir. Alkolün antimikrobiyal etkinliği, proteinleri denatüre etme ve koagüle etme yeteneğine dayanmaktadır. Bu işlem, mikroorganizmaların koruyucu kaplamalarını kaybetmelerine ve işlevsiz hale gelmelerine neden olmaktadır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), %80 etanol (hacim/hacim oranında) veya %75 izopropil alkol içeren formülasyonları

tavsiye etmektedir; ancak genel olarak, %60 ile %95 arasında alkol içeren dezenfektanlar da kabul edilebilmektedir (Gold et al., 2024).

Etanol sağlık sektörü dışında farklı sektörlerde de aktif olarak kullanılmaktadır. Çizelge 2.1’de etanolün farklı sektörlerde kullanımını ve çeşitli bileşimleri belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı etanol çeşitleri ve endüstrideki kullanım alanları (Rajarajan et al., 2016)

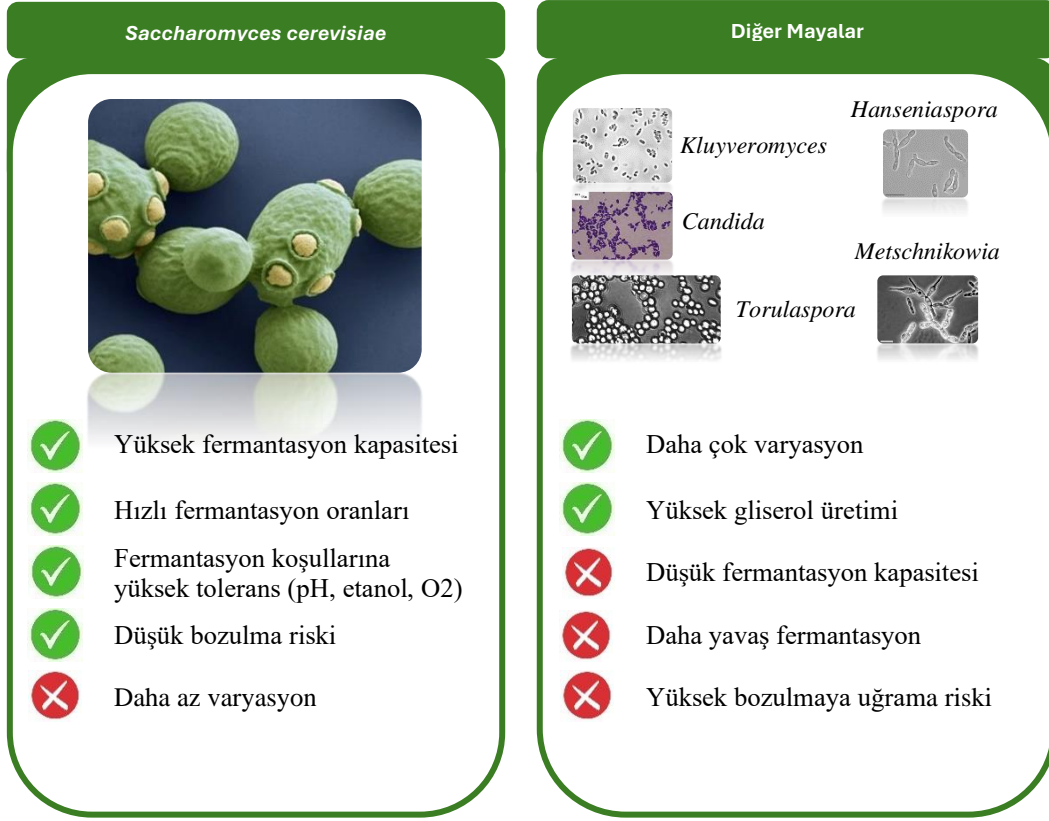
İsim	İsmin Kaynağı	Endüstride kullanımı
EA95	%95 Etil alkol	Endüstriyel çözücü ve renkli metil alkol
95WS	%95 Beyaz ispirto	Endüstriyel çözücü; beyaz sirke; ilaçlar; cerrahi alkol; gıda boyaları; gıda aromaları
NS	Rektifiye Edilmiş Etil Alkol	Yüksek kaliteli deodorantlar, parfümler ve kozmetikler; gıda boyaları; gıda aromaları; alkollü içecekler.
XNS	Ekstra rektifiye edilmiş Etil alkol	Alkollü içecekler; yüksek kalite deodorant ve parfümler
EA99	%99 Etil alkol	Boya, baskı mürekkebi ve ambalaj endüstrileri; endüstriyel çözücüler.
AA	Anhidrous Etanol	Bazı aerosol ürünleri; hastane uygulamaları; farmasötikler.
HGAA	Yüksek dereceli aerosol alkol	Aerosoller, saç bakım ürünleri, farmasötik kozmetik ürünleri

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Binlerce yıl öncesinden beri, özellikle bira ve şarap endüstrilerinde *S. cerevisiae* gibi mayalar alkol üretiminde kullanılmaktadır. Bu mayalar, yüksek etanol verimi, üretkenlik ve etanol konsantrasyonuna dayanabilmesi nedeniyle damıtma maliyetini düşürmektedir. Günümüzde mayalar, yenilenebilir enerji kaynaklarından yakıt olarak kullanılan etanolü üretmek için kullanılmaktadır. *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124), *S. cerevisiae* (RL-11) ve *Kluyveromyces marxianus* gibi bazı maya türlerinin farklı şeker türlerinden iyi etanol üreticileri olduğu belirtilmektedir (Mohd Azhar et al., 2017).

Ancak, *S. cerevisiae* doğal olarak ksiloz, arabinoz ve ayrıca polisakkaritler (nişasta) gibi pentozları metabolize edememektedir. Kullanılabilmesi için ayrı ön işlemler uygulanması gerekmektedir (Somda et al., 2011; Yang et al., 2021). Yalnızca bazı *Pichia*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* ve *Pachysolen* türleri pentozları metabolize ederek etanol üretebilmektedir (Mohd Azhar et al., 2017).

Mayalar, etanol üretimi için kullanılan önemli mikroorganizmalardır; ancak, farklı çevresel koşullar altında etanol üretim kapasiteleri farklılık göstermektedir. Bu nedenle, ticari üretimde kullanılabilmesi için en iyi suşları belirlenmesi gereklidir. *K. marxianus* ETP87 ve *P. fermentans* ETP22 gibi farklı suşları, ticari ekmek mayaları ile benzer bir etanol üretim eğilimi göstermektedir. *Saccharomyces* türlerine ait olmayan mayaların hayatta kalma oranı *S. cerevisiae* suşuna benzer olup, bu durum yüksek fermantasyon kapasiteli mayalar için istenilen bir özelliktir. Söz konusu bu mayaların farklı monosakkaritleri (5-karbon, 6-karbon şekerleri) ve disakkaritleri fermente etme yetenekleri, onları peynir altı suyu ve lignoselülozik hidrolizatlar gibi farklı karbon kaynaklarından, etanol üretimi için iyi adaylar yapmaktadır. Özellikle, *K. marxianus* ETP87'nin, *Saccharomyces cerevisiae* ETP53'ten daha fazla miktarda şeker kullanarak fermantasyonu başlatığı ve etanol üretiminde ETP53 suşu kadar verimli olduğu belirtilmiştir. *K. marxianus* ETP87'nin, *Saccharomyces cerevisiae* ETP53'e kıyasla laktozu daha etkili bir şekilde fermente eden ve bu nedenle daha fazla araştırmaya değer bir maya olduğu vurgulanmıştır (Tesfaw et al., 2021).



Şekil 2.1. *S. cerevisiae* ve diğer mayalar arasındaki genel farklılıklar (Albergaria & Arneborg, 2016).

Saccharomyces cerevisiae mayası binlerce yıldır etanol üretiminde şekeri fermente etmek için kullanılmıştır. Etanol üretimi dışında bu mayalar gıda, kimya ve sağlık endüstrisi alanlarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Etanol üretiminde maya kullanılmasının en önemli nedeni, kısa fermantasyon döngüsü ve yüksek etanol verimine sahip olmasıdır. Ayrıca *Saccharomyces* suşları, heksozlardan yüksek konsantrasyonlarda etanol üretebilme kabiliyeti ve etanol ve diğer inhibitör bileşiklere karşı yüksek toleransa sahiptir. İnsanlık tarihinin en eski zamanlarından beri kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*, uzun süredir bira, şarap ve damıtık alkol üretimi, ekmek pişirme gibi farklı amaçlarla gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu maya türü, maya aleminin en çok incelenen türüdür ve ökaryotik hücre biyolojisine yönelik temel araştırmalar için önemli bir model sistemdir. Ayrıca, *in vitro* genetik teknikler kullanılarak genlerinde yapılan modifikasyonlarla kendini uygun bir şekilde geliştirip değiştirebilme yeteneği, *S.*

cerevisiae'yi ökaryotlar arasında benzersiz bir konuma yerleştirmektedir (Stewart, 2014).

S. cerevisiae'nin bazı endüstriyel uygulamalar için çok önemli olan iki özelliği daha vardır: yüksek şeker konsantrasyonlarına karşı olağanüstü direnci/toleransı ve bir dizi aromatik, uçucu bileşik üretme yeteneğidir. *S. cerevisiae*'nin bulunan diğer suşları, genellikle en elverişli koşullar altında yetiştirilen laboratuvar suşlarına göre çok daha zorlu koşullara maruz kalmaktadır. Çevresel suşların incelenmesi, bu türün laboratuvar veya endüstriyel suşlarının çalışmalarında belirgin olmayan ek hayatta kalma stratejilerini ortaya çıkarmaktadır. Tüm bu suşlar, sporlanabildikleri toprakta zorlu koşullar altında yaşayabilirler. *S. cerevisiae* meşe ağaçları gibi çeşitli bitkilerin yaprak ve gövdelerinde doğal olarak bulunmaktadır. *S. cerevisiae*, üzüm asmaları veya üzüm tanelerinden değil, çevresel kaynaklardan şarap imalathanelerine taşınmaktadır (Parapouli et al., 2020).

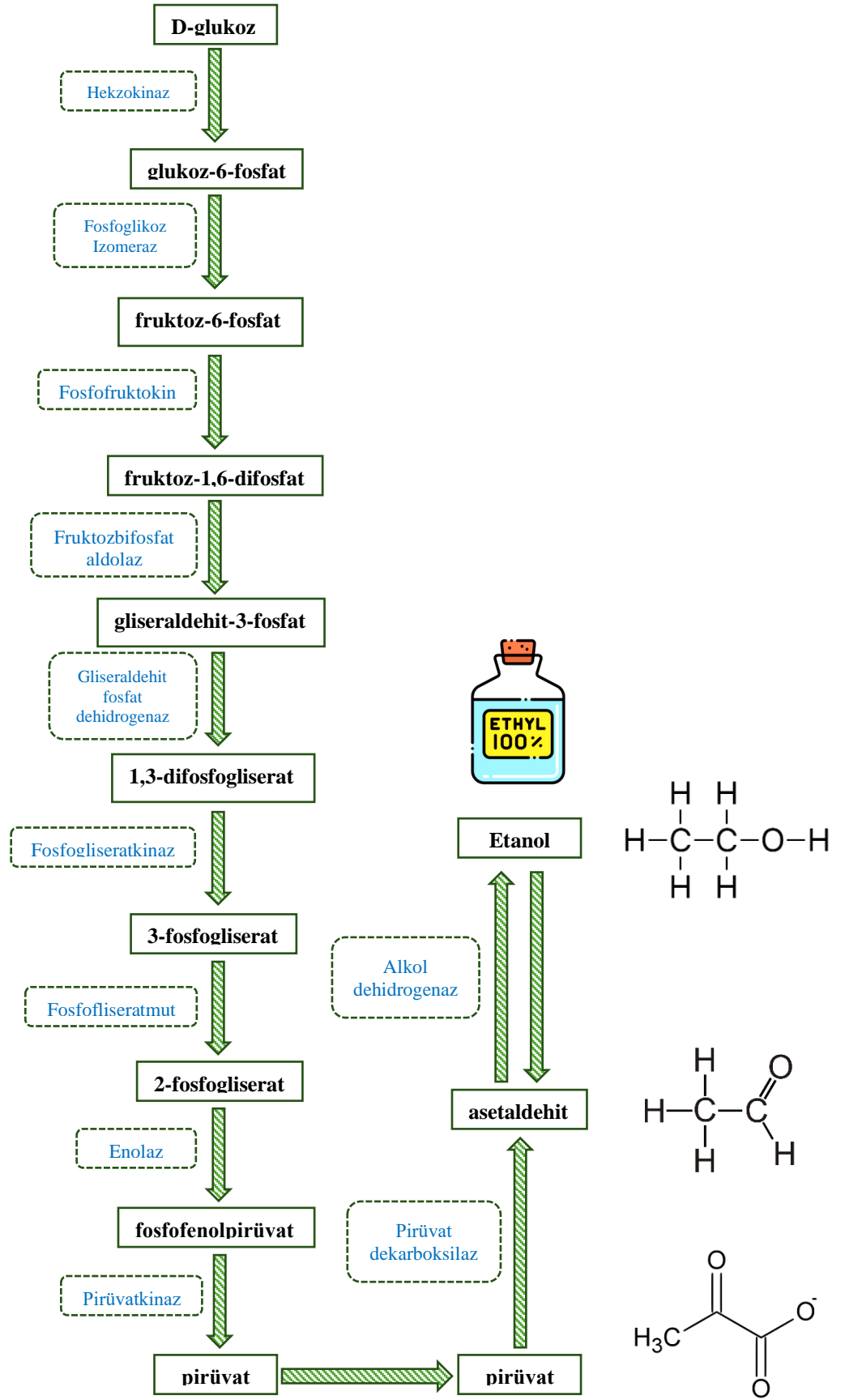
2.3. Etanol Metabolik Yol İzi

Glikoz, çoğu organizma tarafından kullanılan bir enerji kaynağıdır. Birçok metabolizma farklı şekerlerden enerji üretilmesinde glikoliz yolunu kullanmaktadır. Embden-Meyerhof yolu olarak bilinen bu yol, insanlar (ve mayalar) tarafından kullanılan glikoliz yoludur. Glikoliz basit olarak anlatılmak istenirse enerji yatırım ve enerji kazanç aşaması olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. (Godbey, 2022).

EMP yolunun ilk glikoliz aşamasında, glikoz, heksokinaz (EC 2.7.1.1) tarafından fosforilize edilerek glikoz-6-fosfat (glikoz-6-P) haline getirilir ve glikoz-6-fosfat izomeraz (EC 5.3.1.9) tarafından keto izomeri olan fruktoz-6-fosfata (fruktoz-6-P) dönüştürülmektedir. Bir sonraki adımda, 6-fosfofruktokinaz (EC 2.7.1.11) enzimi, fruktoz-6-P'yi fosforilize ederek fruktoz-1,6-bifosfata dönüştürür ve fruktoz-bisfosfat aldolaz (EC 4.1.2.13) tarafından gliseraldehit-3-fosfata (gliseraldehit-3-P) dönüştürülmektedir (Al Abdallah et al., 2016).

İkinci glikoliz aşamasında, gliseraldehit-3-P, pirüvata dönüştürülmektedir. Glikoliz sonrasında, pirüvat, iki aşamalı bir alkollü fermantasyon ile etanole dönüştürülür. İlk aşamada, pirüvat, pirüvat dekarboksilaz (EC 4.1.1.1) tarafından asetaldehite dönüştürülmekte ve asetaldehit, alkol dehidrojenaz (EC 1.1.1.1) tarafından etanole indirgenmektedir. (Al Abdallah et al., 2016).





Şekil 2.2. Embden-Meyerhof-Parnas Glikoliz Yol İzi (Al Abdallah et al., 2016).

S. cerevisiae, glikozu Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) glikoliz yolu ile etanole dönüştürür, bu süreç toplamda 12 enzimatik adımı kapsamaktadır. *S. cerevisiae*, glikozu solunum yoluyla kullanarak her bir mol glikoz başına 16 mol ATP elde edebilmesine rağmen, alkol fermantasyonunu tercih etmektedir. Oksijen varlığında bile yeterli glikozun bulunduğu, *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces* cinsine ait diğer türlerinde etanol oluşumunu tetiklemektedir. Bu olgu, Crabtree etkisi olarak bilinmektedir (Boonekamp et al., 2018).

2.4. Etanol Üretim Yöntemleri

Biyokütleden biyoetanol üretimi için öncelikle bazı ön işlemler uygulanmaktadır. Lignoselülozik olmayan biyokütle için mekanik parçalama yeterli olurken selülozik yapılara sahip olan biyoküteller farklı ön işlemler gerektirmektedir. Bu ön işlem adımı, selüloz-hemiselüloz-lignin matris yapısını değiştirerek hidrolitik enzimlerin selüloz üzerinde etkili olmasını ve bunu fermente edilebilir şekerlere dönüştürmesini sağlamaktadır. Böylece biyoetanol üretimi için fermantasyon sürecinin gerçekleşmesine olanak tanımaktadır. Bu aşama en fazla enerji tüketen ve biyoetanol üretimindeki en pahalı aşamalardan biri olarak kabul edilmektedir. Ön işlemler fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir. Fiziksel ön işlem, öğütme, ekstrüzyon, dondurma ve mikrodalga ısıtma gibi teknikleri içermektedir. Kimyasal ön işlemler ise alkali veya asit, iyonik sıvılar, organik çözücüler ve ozonoliz gibi işlemlerdir. Fizikokimyasal ön işlem için ise patlama, lif patlaması, amonyak, CO₂ patlaması, sıcak su ve ıslak oksidasyon kullanılabilir (Pereira et al., 2021).

Biyokonversiyon aşamasında, yani biyokütlenin fermantasyonunda kullanılan teknolojiler şunlardır: bireysel hidroliz ve fermantasyon (SHF), eşzamanlı hidroliz ve fermantasyon (SSF), yarı-eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (S-SSF) ve konsolide biyoproses (CBP). Genel hatlarıyla belirtmek istenirse SHF prosedüründe, hidroliz ve fermantasyon iki ayrı adımda gerçekleşirken, SSF'de bu işlemler tek bir adımda gerçekleşmektedir. CBP ise, bu işlemlerden farklı olarak yeni gelişen bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır.

Farklı fermantasyon teknolojileri, kullanılan hammadde ve süreçlere bağlı olarak farklı etanol verimleri sağlamaktadır (Devi et al., 2021).

SHF süreci, hidroliz işleminin seçiminde sunduğu esneklik nedeniyle en yaygın kullanılan yöntemdir. Aynı zamanda, hidroliz ve fermantasyon süreçlerinde kullanılan katalizörler ve fermantasyon mikroorganizmaları için optimum koşulların kullanılmasına da olanak tanır. SHF’de hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra ortaya çıkan monosakkaritler genellikle santrifüj veya filtrasyon ile geri kazanılmakta, tekrar oluşturulan fermantasyon ortamına ise gerekli mikroorganizma eklenmektedir. Ayrıca bu teknikte fermantasyon ve hidroliz aynı reaktörde gerçekleştirilebilmektedir. SHF kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada *G. tenuistipitata* deniz yosununa asit hidrolizi işlemi uygulanarak indirgen şeker elde edilmiş ve ardından *Saccharomyces cerevisiae* ile fermantasyon yapılarak etanol verimi 0.042 g/g indirgen şeker olarak elde edilmiştir. SHF’nin kullanıldığı başka bir çalışmada, fermantasyonda *Pichia angophorae* kullanılarak etanol verimi 0.33 g/g indirgen şeker olarak tespit edilmiştir (Offei et al., 2018).

Lignoselülozik biyokütlenin, etanol üretiminde kullanılması için öncelikle ligninin uzaklaştırılması ve ardından selüloz hidrolizi gibi hem zaman alıcı hem de maliyetli bir ön işlem sürecinden geçmesi gerekmektedir. Biyoetanol üretim maliyetini düşürmeye yönelik araştırmalar, nişasta bazlı hammaddelerin geliştirilmiş nişasta hidroliz verimliliği ile eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) sürecinde kullanılmasıyla başarılı olmuştur. SSF süreci, ilk olarak ABD’deki Gulf Oil Company ve Arkansas Üniversitesi tarafından geliştirilmiştir. SSF sürecinin en büyük avantajı, ilk aşama hidroliz işlemiyle ortaya çıkan glikoz gibi basit şekerlerin birikiminin önlemesidir. Bu sayede, maya sürekli olarak glikozu biyoetanol üretimi için kullanmakta ve böylece tüm fermantasyon süreci substrat inhibisyon etkilerinden korunmaktadır. Bu nedenle, lignoselülozik ve nişasta bazlı atık malzemeleri kullanarak gerçekleştirilen SSF sürecinin, düşük maliyetli, çevre dostu ve büyük ölçekli endüstriyel biyoetanol üretimi için yenilikçi ve umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir (Saggi & Dey, 2019).

Yarı-eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (S-SSF) süreci, hem SSF ve hem de SHF'nin avantajlarına sahiptir. Bu süreç, fermantasyondan önce ön hidroliz aşamasını gerektirir. S-SSF, enzimatik ön hidroliz için optimal koşullar altında gerçekleştirilen bir SSF aşaması ve bir ön hidrolitik aşamadan oluşur. S-SSF, SSF ve SHF'nin bir kombinasyonu olduğu için, uygun bir ön hidrolitik süre seçildiğinde SSF ve SHF'den daha yüksek etanol konsantrasyonu ve etanol verimi sağlamaktadır. S-SSF, inhibitör ve hız kontrol eden faktörleri dengeli olarak kullanılabilmesi için fermantasyon başlangıcı öncesi optimum bir süreye ihtiyaç duymaktadır. S-SSF'de substrat konsantrasyonu çok yüksek değildir. Fermantasyon sırasında yüksek substrat konsantrasyonu, inhibitör maddeleri artırarak etanol verimini düşürmektedir (Brent, 2001).

Mayalarda genetik mühendislik yoluyla selüloz hidroliz aktivitesinin kazanılması, lignoselülozik biyokütleden CBP (konsolide biyoproses ile) etanol üretimi için çığır açan bir süreç elde etmenin yolunu açmıştır. Özellikle, doku mühendisliği, çeşitli selüloolitik enzimleri maya hücre yüzeyinde sergileyerek dirençli selülozik malzemeleri etkili bir şekilde hidrolize etmek için güçlü bir araçtır. Rekombinant mikroorganizmaların kullanımı, fiziksel ayrılma için yatırım maliyeti gerektirse de, CBP'nin önemli bir avantajı enzim üretim sürecinin ortadan kaldırılmasıdır. CBP'deki ana dezavantajlardan biri ise, sakkarifikasyon ve fermantasyon arasındaki optimum sıcaklık farkıdır. Ancak termotolerant suşların CBP'ye uygulanması, hidroliz ve fermantasyonu yüksek sıcaklıkta gerçekleştirerek bu dezavantajı ortadan kaldırmaktadır (Hasunuma & Kondo, 2012).

2.5. Etanol Üretiminde Farklı Atık ve Mikroorganizmaların Kullanımı

Mikroorganizmaların farklı substratlar üzerindeki etanol üretim kapasiteleri, literatürde geniş bir yer bulmaktadır. Örneğin, (Ebrahimi vd., 2008), *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak ekmek atıklarından 100 g/L etanol üretirken, Buaban et. al. (2010), *Pichia stipitis* kullanarak şeker kamışı melasından 84 g/L etanol üretmiştir. Çeşitli suşların farklı substratlardan elde edilen selüloz verimleri Çizelge 2.2, 2.3 ve 2.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 2. 2. Farklı mikroorganizmalar ve substratlar ile elde edilen etanol verimleri

Mikroorganizma	Substrat	Etanol Üretim Miktarları	Referans
<i>Recombinant Escherichia coli KO11</i>	Şeker kamışı küspesi	39.81 g/L etanol- 0.50 g etanol/g substrat 0.83 g/L/h hacimsel verimlilik	Takahashi et al., (2000)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Nişasta atıkları	39 g/L etanol – 0.50 g etanol/g substrat %98 teorik verim	Davis et al., (2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nişasta atıkları	36 g/L etanol – 0.46 g etanol/g substrat %90 teorik verim	Davis et al., (2006)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Melas (şeker kamışı)	55.36 g/L etanol – 0,34 g etanol/g substrat 1.15 g/L/h hacimsel verimlilik	Cazetta et al., (2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ekmek artıkları	100 g/L ethanol- 0.40 g etanol/g substrat	Ebrahimi et al., (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sorgum Melas (şeker kamışı)	109.34 g/L etanol – 0.45 g etanol/g substrat 1.52 g/L/h hacimsel verimlilik	Laopaiboon et al., (2009)

Çizelge 2.3. Farklı mikroorganizmalar ve substratlar ile elde edilen etanol verimleri

Mikroorganizma	Substrat	Etanol Üretim Miktarları	Referans
<i>Pichia stipitis</i> <i>BCC15191</i>	Şeker kamışı küspesi	8.4 g/L etanol – 0.29 g etanol/g substrat 0.35 g/L/h hacimsel verimlilik 56.9 % teorik verim	Buaban et al., (2010)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Şeker pancarı atıkları	60.36 g/L – 0.493 g etanol/g substrat 2.51 g/L/h hacimsel verimlilik	Razmovski & Vučurović, (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Restoran gıda atıkları	44 g/L etanol – 0.47 g etanol/g substrat 1.83 g/L/h hacimsel verimlilik	Kim et al., (2011)
<i>Trametes hirsuta</i>	Pirinç samanı	9.1 g/L etanol %89.2 teorik verim	Okamoto et al., (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Restorant gıda atıkları	32.2 g/L ethanol- 0.16 g etanol/g substrat %78.7 teorik verim	Uncu ve Cekmecelioglu, (2011)
<i>Candida kefyr</i>	Peynir altı suyu	% 4.0 g/mL - % 5.0 mL/mL 80.8 % teorik verim	Koushki et al., (2012)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Peynir altı suyu	% 4.6 g/mL – % 5.8 mL/mL % 91.3 teorik verim	Koushki et al., (2012)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Melas (<i>soya</i>)	29.3 g/L etanol – 0.25 g etanol/g substrat 0.25 g/L/h hacimsel verimlilik	Letti et al., (2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Şeker pancarı suyu	92.06 g/L etanol % 85.62 teorik verim 0.11 g/L/h hacimsel verimlilik	Kawa-Rygielska et al., (2013)

Çizelge 2.4. Farklı mikroorganizmalar ve substratlar ile elde edilen etanol verimleri

Mikroorganizma	Substrat	Etanol Üretim Miktarları	Referans
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Peynir altı suyu	8.64 g/L – 0.213 g etanol/g substrat	Ariyanti & Hadiyanto, (2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ananas kabukları	%3.9 mL/mL %96 teorik verim	Tropea et al., (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Peynir altı suyu	28.53 g/L etanol %97 teorik verim	Tomaszewska & Białończyk, (2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	Patates kabuğu, papaya	% 14.17 mL/mL 141.7 g/L etanol	Promon et al., (2018)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melas	49.5 g/L etanol- 0.25 g etanol/g substrat 1.38 g/L/h hacimsel verimlilik	Pattanakittivorakul et al., (2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endüstriyel bisküvi atıkları	16.36-18.02 g/L etanol	Kapusuz, (2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kek atıkları	46.6 g/L etanol- 1.13 g etanol/g substrat	Han et al., (2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pizza atıkları	27.58 g/L etanol – 0.292 g etanol/g substrat	Liu et al., (2020)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Şeker kamışı melası	165 g/L ethanol %92.3 teorik verim 5.50 g/L/h hacimsel verimlilik	Cruz et al., (2021)

2.6. Etanol Üretimine Etki Eden Faktörler ve Gerçekleştirilen Çalışmalar

Biyoetanol üretimini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır; bunlar arasında sıcaklık, şeker konsantrasyonu, pH, fermantasyon süresi, karıştırma hızı ve inokulum oranı yer almaktadır. Mikroorganizmaların büyüme hızı doğrudan sıcaklıktan etkilenmektedir. Hücre büyümesi için elverişsiz olan yüksek sıcaklık, mikroorganizmalar için bir stres faktörü haline gelir (Mohd Azhar et al., 2017).

Lin et al., (2012), yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae*'nin yüksek sıcaklıklarda büyüme ve glikozu fermente etme yeteneği test edilmiş; sıcaklık, başlangıç substrat konsantrasyonu ve pH değerinin etanol verimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada maksimum etanol üretim hızları, farklı başlangıç glikoz konsantrasyonlarında 30 ve 45 °C arasında gözlemlenmiştir. Sıcaklık 45 °C'ye yükseltildiğinde, sistem yüksek sıcaklıkta olmasına rağmen hücrenin büyüme ve etanol üretim hızı yüksektir. Kullanılan substrat konsantrasyonunun artırılması durumunda daha yüksek etanol üretiminin mümkün olduğunu belirtmektedir. Ancak, başlangıç glikoz konsantrasyonları 80 kg/m³'ün üzerinde olduğunda ve pH kontrol edilmediğinde, 30 °C'de daha uzun bir inkübasyon süresi gerekmektedir. Etanol üretim sürecinde farklı pH değerlerindeki değişimin, fermantasyon sonucunu etkileyebileceği görülmüştür.

Zhang et al., (2015), *S. cerevisiae* BY4742 mayası kullanılarak gerçekleştirdikleri etanol fermantasyonunda substrat ve ürün inhibisyonunun etkilerini incelemişlerdir. Test edilen substrat konsantrasyonları arasında, çalışmada kullanılan mikroorganizma suşu için optimum substrat konsantrasyonu 80 g/L olarak bulunmuştur. Bu substrat konsantrasyonunda, 35 °C'de 72 saat sonra etanol verimi %95'e ulaşmıştır. Buna karşılık, kritik substrat konsantrasyonu 160 g/L olarak bulunmuştur. Yüksek substrat konsantrasyonları kullanıldığında, hücre zarlarının akışkanlığının azaldığı ve hücre dehidrasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda yüksek substrat miktarlarının fermantasyon sürecini yavaşlattığı ve mayanın büyüme aktivitesini azalttığı görülmüştür. Fermantasyon sonucu oluşan etanolün, maya hücrelerinin glikoz taşıma ve metabolizma sistemini ciddi şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda

kullanılan mayanın, 70 g/L'den daha yüksek etanol konsantrasyonuna tolerans gösteremediği gözlenmiştir.

de Albuquerque Wanderley et al., (2014), çalışmalarında şeker kamışı küspesinde eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) sürecini kullanarak optimum etanol üretimi için uygun inokulum konsantrasyonunu ve *Saccharomyces cerevisiae* suşunu seçmek için denemeler yapmışlardır. Çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz (100 g/L) içeren bir kültür ortamını fermente etmek için üç aşı konsantrasyonu (0.4, 4.0 ve 8.0 g/L) ve iki *S. cerevisiae* suşunu (*UFPEDA 1238* ve *UFPEDA 1334*) kullanmışlardır. Kullanılan suştan bağımsız olarak, 0.4 g/L inokulum ile gerçekleştirilen etanol üretiminin çok düşük olduğu görülmüştür. 4.0 ve 8.0 g/L aşı oranı ile yapılan deneylerde ise daha yüksek etanol üretimi gözlemlenmiştir. Maksimum etanol konsantrasyonu, *UFPEDA 1238* suşunda ve 8.0 g/L aşı konsantrasyonu ile elde edilmiştir. SSF ile maksimum etanol konsantrasyonu 28 g/L, selülozun enzimatik dönüştürülebilirliği %76 ve hacimsel üretkenlik 0.93 g/L/saat olarak elde edilmiştir.

Laluce et al., (2009), yaptıkları çalışmada *S. cerevisiae* ile etanol üretimi için sıcaklık, şeker konsantrasyonu ve başlangıç inokulum miktarı için optimum değerleri belirlemişlerdir. Maksimum etanol değeri yaklaşık 32 °C'de (yaklaşık 73 g/L etanol) görülmüş olup, bu sıcaklıkta hücre canlılığı %90 olarak kaydedilmiştir. Maksimum hücre canlılığı, 30 °C'de 40 g/L inokulum ile elde edilmiştir ancak bu durumda üretilen etanol miktarı daha düşüktür. Bu nedenle, etanol üretimi 32 °C'ye kadar artmış ancak bu sıcaklığın üzerinde etanol seviyeleri azalmış ve sıcaklık hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkiler göstermiştir.

2.7. İncir ve Hurda İncir

İncir (*Ficus carica* Linn), insanlık tarihinde en eski tüketilen meyvelerinden biri olarak kabul edilmektedir. *Ficus*, *Moraceae* familyasına ait 37 cinsten biridir. *Ficus carica* yüksek genetik çeşitliliğe sahip ve kendi familyası içerisinde en yüksek ticari değere sahip incir türüdür (eşanlamlısı *Ficus kopetdagensis* Pachim.). *Ficus carica* cinsine ait yaklaşık 800 çeşit, sıcak iklimlerde yetiştirilmektedir. Hem

taze hem de kuru incirler, sağlık üzerindeki olumlu etkileri sebebiyle sıkça tüketilmektedir. Buna ek olarak *Ficus carica* yaprakları da hayvancılık sektöründe yem olarak kullanılmaktadır. *Ficus carica*, yılda iki kez hasat edilebilen mevsimlik bir meyvedir ve taze, kurutulmuş, reçel veya meyve suyu olarak tüketilebilmektedir (Ramadan, 2023).

İncir, yüksek antioksidan kapasitesine katkıda bulunabilecek antosiyaninler, flavonol glikozitler ve diğer polifenoller açısından zengindir. İncir, yalnızca mükemmel tadı sebebiyle değil aynı zamanda sağlığı olumlu yönde destekleyen birçok biyoaktif bileşeni içermesi sebebiyle yüksek ticari değere sahiptir. İncirde hidrokisinasitler, hidrokisibenzoit asitler, ellagik asit, flavan-3-oller, antosiyaninler ve farklı flavonol glikozitler gibi farklı fenolik bileşik grupları tespit edilmiştir. Flavonoidler ve fenolik asitler, toplam polifenollerin %30 ile %60'ını oluşturmaktadır (Veberic & Mikulic-Petkovsek, 2016).

F. carica yapraklarının 126 fitokimyasal bileşen içerdiiği ve bunlar arasında polifenolik bileşiklerin baskın olduğu çalışmalar sonucu tespit edilmiştir. *F. carica* yapraklarındaki polifenol içeriği, kırmızı şarap ve çaydan daha yüksektir ve bu nedenle *F. carica* yaprakları, kırmızı şarap ve çaydan daha güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. *F. carica* yapraklarında bulunan aktif bileşenler üzerindeki bilimsel araştırmalar, güçlü hipoglisemik, antioksidan ve anti-enflamatuar aktiviteleri doğrulamış ve böylece *F. carica* yapraklarının antidiabetik etkisini de desteklemiştir (Li et al., 2021).

Genel olarak, incir meyvelerinin rengi çeşidine bağlı olarak yeşil, sarı, kahverengi, morumsu veya siyah olarak değişebilmektedir ve armut şeklinde, kadifemsi veya düz bir yüzeye sahip olabilmektedir. İncir kabuğunun işlevi, meyveyi dış ortamın etkilerinden korumak ve bütünlüğünü sağlamaktır. Kabuğu oluşturan ikincil metabolitler arasında pigmentler, aroma bileşenleri ve tanenler bulunmakta; bu bileşenler meyvenin görünümünü, kalitesini ve saklama süresini etkilemektedir (Hajam & H, 2022).

Kuru incir için besin öğeleri analizi ve yağ asitleri profili Işık Tarım A.Ş. tarafından Merieux Nutri Sciences firmasına yaptırılmış olup, sonuçlar Çizelge 2.5. ve Çizelge 2.6.'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.5. Kuru incir için besin öğeleri analizi sonuçları (Anonymous, 2018).

Besin Öğesi Profili	Birim	100g Başına Değer	Porsiyon Başına Değer (40g)	Kullanılan Test Yöntemi	Referans
Kalori	kcal	317.5	127.0	Calculation	
Toplam Yağ	g	0.31	0.12	AOAC 925.32	
Doymuş Yağ	g	<0.10	<0.04	AOAC 996.06 Mod	
Trans Yağ	g	<0.10	<0.04	AOAC 996.06 Mod	
Kolesterol	mg	<1.0	<0.4	Lab Method	
Sodyum	mg	25.3	10.1	Lab Method	
Potasyum	mg	841	336	Lab Method	
Toplam Karbonhidrat	g	74.9	30.0	Calculation	
Diyet Lifi	g	7.87	3.15	AOAC 991.43 (Mod.)	QA-0220-4410
Toplam Şeker	g	52.20	20.88	AOAC 977.20 Mod	SL-0235-4631
Fruktoz	g	27.0		AOAC 977.20 Mod	SL-0235-4631
Glukoz	g	25.2		AOAC 977.20 Mod	SL-0235-4631
Laktoz	g	<0.10		AOAC 977.20 Mod	SL-0235-4631
Maltoz	g	<0.10		AOAC 977.20 Mod	SL-0235-4631
Sükroz	g	<0.10		AOAC 977.20 Mod	SL-0235-4631
Protein	g	3.78	1.51	AOAC 992.23	QA-9901-2200
Kalsiyum	mg	195	78.0	Lab Method	
Demir	mg	1.1	0.44	Lab Method	
Nem	g	18.86	7.54	AOAC 934.06	QA-0200-4101
Kül	g	2.16	0.86	AOAC 920.153	
Toplam D Vitamini	mcg	<0.55	<0.22	Lab Method	

Kuru incir yüksek karbonhidrat ve şeker içeriği ile dikkat çekmektedir. İncirde bulunan fruktoz ve glukoz gibi şekerler herhangi bir ek işleme gerek

duymadan mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla fermente edilebilir, bu da yüksek etanol verimi sağlamaktadır.

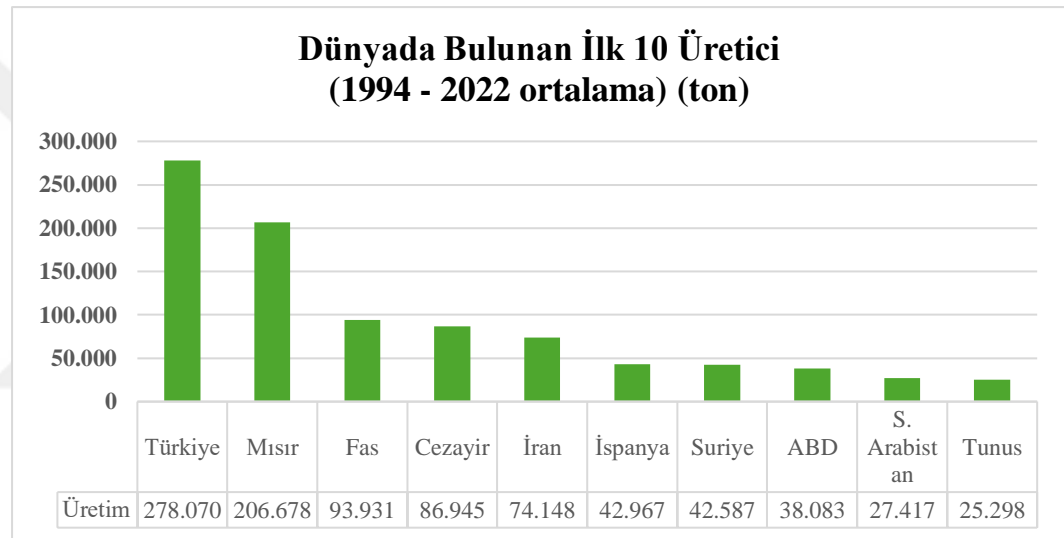
Çizelge 2.6. Kuru incir için yağ asidi profili sonuçları (Merieux Nutri Sciences, 2018).

Yağ Asidi Profili	Birim	Değer (%w/w)	Kullanılan Test Yöntemi
16:0 Palmitik	%FA	8.35	AOAC 996.06 Mod
18:0 Stearik	%FA	3.26	AOAC 996.06 Mod
18:1 Oleik	%FA	18.99	AOAC 996.06 Mod
18:2 Linoleik	%FA	29.61	AOAC 996.06 Mod
18:3 Linolenik	%FA	38.53	AOAC 996.06 Mod
Toplam Doymuş Yağ Asitleri (SFA)	%FA	12.40	AOAC 996.06 Mod
Tekli Doymamış Yağ Asitleri	%FA	19.46	AOAC 996.06 Mod
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri	%FA	68.14	AOAC 996.06 Mod
Toplam Trans Yağ Asitleri	%FA	<0.10	AOAC 996.06 Mod
Omega-6 Yağ Asitleri	%FA	<0.10	AOAC 996.06 Mod
Omega-3 Yağ Asitleri	%FA	0.12	AOAC 996.06 Mod
Konjuge Linoleik Asit	%FA	<0.10	AOAC 996.06 Mod

Tablo incelendiğinde kuru incirlerin doymuş yağ oranının düşük, tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri oranının ise yüksek olduğu görülmektedir. Bu da kuru incirleri tüketimi açısından sağlık açısından uygun yağ asidi profiline sahip bir gıda yapmaktadır.

İncir üretimi Anadolu'da çok eski dönemlere dayanan kültür meyveleri içinde, en eski geliştirme tarihine sahip meyvelerden biridir. İncirin anavatanı Türkiye olup, buradan Suriye, Filistin ve sonrasında Ortadoğu üzerinden Çin ve Hindistan'a yayılım göstermiştir. FAO verilerine göre, 2019 yılı itibarıyla dünyada 290 bin hektar alanda incir üretimi yapılmaktadır. İncir üretim alanında %21.7'lik pay ile Fas birinci sırada, %18,0'lik pay ile Türkiye ikinci sırada, %13.6'lık pay ile Cezayir üçüncü sırada yer almaktadır. Dünya incir üretimi ise 2019 yılında bir

önceki yıla göre %7,4 oranında artış göstererek yaklaşık 1.3 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Dünya incir üretiminde 310 bin ton üretimle Türkiye birinci sırada yer alırken, 225 bin ton ile Mısır ikinci sırada, 153 bin ton üretim ile Fas üçüncü sırada yer almaktadır. Uluslararası Sert Kabuklu ve Kuru Meyveler Konseyi'nin 2020/2021 istatistik yıllığı verilerine göre, dünyada toplam 148 bin ton olan kuru incir üretiminin 85.5 bin tonu (%58) Türkiye tarafından üretilmektedir. Türkiye'yi 25 bin ton (%17) ile İran, 10 bin ton (%7) ile İspanya izlemektedir. Dünya ticaret verileri incelendiğinde ITC (Uluslararası Ticaret Merkezi) veri tabanında incir yaş ve kuru incir olarak birlikte değerlendirilmekte olup bu ürünlerin ayrı ayrı ticarete konu olan miktarı tespit edilememektedir (Anonim, 2021).



Şekil 2.3. İncir üretimindeki ilk 10 üretici ülkenin ortalama üretim miktarları (Anonymous, 2019)

Çizelge 2.7. Kuru incir için 2018-2023 sezonları için ihracat miktarları (25 Mart 2023 tarihi itibarıyla) (Anonim, 2023)

Yıllar	İhracat Miktarı (Ton)
2018/19	59,980
2019/20	69,786
2020/21	72,146
2021/22	70,443
2022/23	47,802

Çizelge 2.8. Kuru incir için 2018-2023 sezonları için üretim miktarları (25 Mart 2023 tarihi itibarıyla) (Anonim, 2023)

	Bütün Kuru İncir	Ezme Kuru İncir	Kesilmiş Kuru İncir	Hurda/Kavrulmuş/ Diğer Kuru İncir	Toplam Kuru İncir
Sezon	Miktar (ton)	Miktar (ton)	Miktar (ton)	Miktar (ton)	Miktar (ton)
2018/19	42,966	10,127	4.868	2,017	59,978
2019/20	51,537	11,678	5.128	1,363	69,706
2020/21	52,540	12,946	5.272	1,280	72,038
2021/22	49,900	13,330	5.526	1,399	70,647
2022/23	36,317*	6,895*	2.666*	1,923*	47,802*

Aflatoksin, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki temel gıdalarda yaygın olarak bulunan bir kontaminanttır. Bu toksin, üretim, hasat, depolama ve gıda işleme süreçleri sırasında küf faaliyetleri sonucu oluşur ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından gıdalarda göz ardı edilemez bir kontaminant olarak kabul edilmektedir. FDA, kontaminasyonu en aza indirmek için düzenlemeler yapmış olsa da, gelişmekte olan ülkelerdeki gıda sistemleri ve teknolojik altyapı eksiklikleri nedeniyle bu yöntemlerin uygulanabilirliği mümkün görülmemektedir. Bu durum, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasında insanların aflatoksinle maruz kalması açısından büyük bir risk oluşturmaktadır (Williams et al., 2004).

Aflatoksinler, esas olarak *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* türleri tarafından üretilen doğal olarak meydana gelen toksik ikincil metabolitler grubudur. *Aspergillus parasiticus*, toprak ortamına iyi adapte olmuşken, *Aspergillus flavus* daha çok bitkilerin havadaki kısımlarına (yapraklar, çiçekler) adapte olmuştur. Aflatoksinlerin oluşumunda hasat öncesi ve sonrasında oluşan elverişsiz ortam koşulları etkili olmaktadır. Doğal olarak meydana gelen aflatoksinler (B1, B2, G1 ve G2) arasında, insanlar ve hayvanlar için en riskli aflatoksin grubu B1'dir (EFSA, 2004).

Kabak, (2016), yaptığı araştırma sonucunda kullandığı kuru incir örneklerinin %12.3'ünde aflatoksin tespit etmiş, içlerinde en yüksek oranda bulunan aflatoksin

türünün B1 olduğunu ve aflatoksinin oluşmasında çevresel faktörlerin en büyük etmen olduğunu ortaya koymuştur. Bu sebeple kuru incirlerin üretildiği ve saklandığı ortam koşullarının sürekli olarak takip edilmesinin önemli olduğunun üzerinde durulmuştur.

Yenilenebilir sıvı biyoyakıtların en önemlisi olan biyoetanolün üretiminde ağırlıklı olarak mısır ve şeker kamışı gibi gıda kaynakları kullanılmaktadır (Branco et al., 2018). Bu biyoetanol kaynakları hem yüksek maliyetli hem de gıda-yakıt rekabeti nedeniyle etik kaygılar taşımaktadır. Alternatif hammadde kaynağı olarak karbonhidrat, lipit ve protein bakımından zengin olan gıda ve tarımsal atıklar ekonomik kayba ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Atıkların içeriğinde bulunan karbonhidratlar hidrolize edildikten sonra elde edilen monosakkaritlerin çeşitli mikroorganizmalarla fermente edilmesi sonucu benzin muadili olarak kullanılan biyoetanol üretimi gerçekleştirilmektedir (Kapusuz, 2019).

Çoğu biyoteknolojik proste olduğu gibi, etil alkol üretiminde de ürün maliyetini azaltmak ve atıklardan katma değeri yüksek ürün üretmek amacıyla araştırmacılar farklı bitkisel atıklardan etil alkol üretimine yönelik çalışmalar gerçekleştirmiştir.

2.8. Plackett-Burman Tasarımı

Plackett–Burman tasarımı (PBD), etanol üretimini etkileyen önemli faktörleri belirlemek için kullanılan iki seviyeli, fraksiyonel faktöriyel bir tarama tasarımıdır. Bu tasarım, deneysel faktörlerin hızlı bir şekilde taranmasını ve en önemli olanların belirlenmesini sağlamaktadır. PBD, özellikle çok sayıda değişkenin etkisinin incelendiği durumlarda kullanışlıdır ve bu sayede hangi faktörlerin süreci en çok etkilediğini saptayarak, optimizasyon çalışmalarına temel oluşturmaktadır (Sivamani & Baskar, 2018).

Plackett-Burman tasarımında kullanılacak ortam bileşenleri, etanol üretimi için literatürde yer alan fermantasyon ortamlarının incelenmesi sonucu belirlenmiştir.

Malik et al., (2020), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC, 204508) mayası ile gerçekleştirdikleri fermantasyon deneyinde *Saccharomyces cerevisiae* aşısının hazırlanması için 50 mL üretim ortamında 0.2 g maya ekstraktı, 1.5 g glikoz ve 0.1 g amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) içeren bir ortam kullanılmıştır.

Netsopa et al., (2022), *Saccharomyces cerevisiae* endüstriyel suşunu kullanarak yaptığı çalışmada aşı hazırlığını 2 aşamada gerçekleştirmiştir. İlk aşamada 3 g/L malt ekstraktı, 3 g/L maya ekstraktı, 5 g/L pepton ve 30 g/L sukroz kullanılmış, ikinci aşamada ise 7 g/L fermente edilebilir şeker içeren ve 2 g/L maya ekstraktı ile 4 g/L di-amonyum fosfat ((NH₄)₂HPO₄) eklenmiş bir melas ortamı kullanılmıştır.

Kasavi et al., (2012), 5 farklı endüstriyel olarak kullanılan BC187, L-1374, L-1528, K11 ve Y9 suşları ile yaptığı fermantasyon çalışmasında aşı hazırlığını maya özütü-pepton-glikoz (YPD) ile gerçekleştirmiş, YPD ortamında (20 g/L d-glikoz, 20 g/L pepton, 10 g/L maya ekstraktı ve 15 g/L agar kullanmıştır.

Singh et al., (2013), *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 174 kullanarak gerçekleştirdiği fermantasyonda aşı içeriği 500 ml Erlenmeyerlerde 200 ml hacimde olacak şekilde, glukoz 30 g/L; maya ekstraktı 5 g/L; amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) 10 g/L; mono potasyum fosfat (KH₂PO₄) 4.5 g/L; magnezyum sülfat 7 hidrat (MgSO₄·7H₂O) üretim ortamı hazırlamışlardır.

Ünal vd., (2022), *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile yaptığı çalışmada fermantasyon ortamı 0.2 g/L aktif kuru maya, 20 g/L glikoz, 8.5 g/L maya ekstraktı, 1.32 g/L amonyum klorür (NH₄Cl), 0.11 g/L magnezyum sülfat (MgSO₄) ve 0.06 g/L kalsiyum klörür (CaCl₂) çözeltisi kullanarak hazırlamıştır.

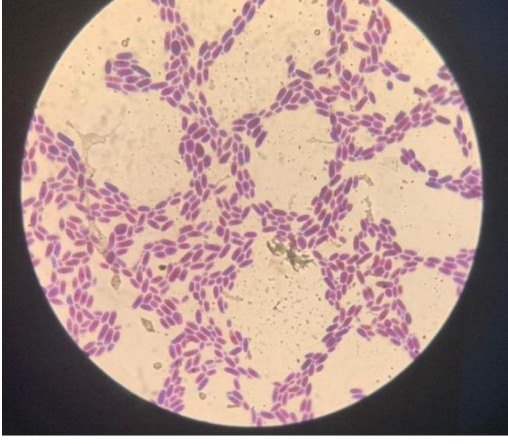
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

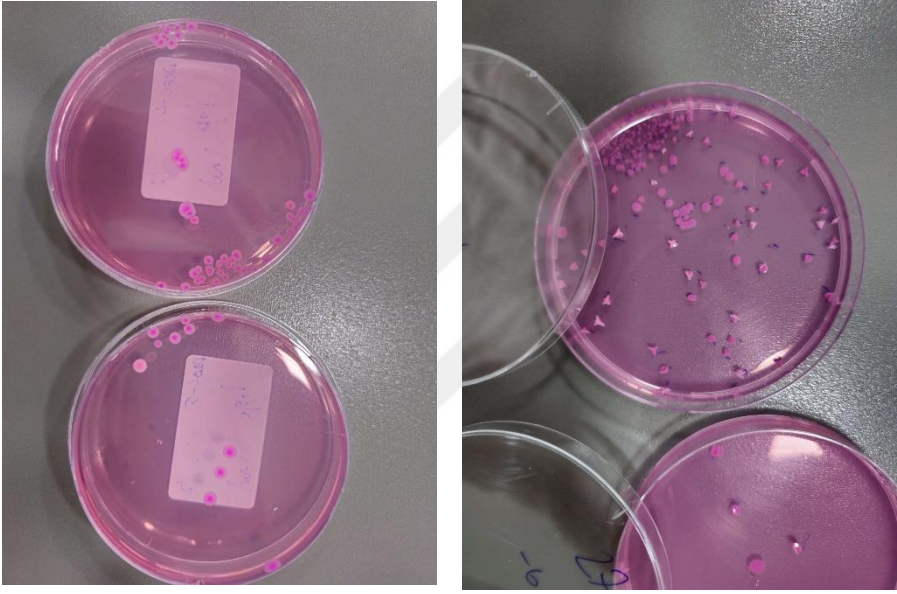
3.1.1 Mikroorganizma

Çalışmalarda kullanılmak üzere Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilen Culti-Loops markalı ATCC 9763 numaralı *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılmıştır. Maya hücrelerinin geliştirilmesi amacıyla Dichloran Rose Bengal Chloromphenicol Agar (DRBC Agar) besiyeri (5 g/L pepton, 10 g/L glukoz, 1 g/L KH_2PO_4 , 0,002 g/L dichloran, 0,5 g/L MgSO_4 , 0,025 g/L Rose Bengal, 0,1 g/L chloromphenicol ve 15 g/L agar-agar) kullanılmıştır. DRBC agar hazırlandıktan sonra 4 farklı petri kabına aktarılmıştır. Culti-Loops kullanılarak hazır olan petri kaplarına çizgi ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 25°C sıcaklıkta 5-7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Anonymous, 2022).

Belirtilen yöntem ile çoğaltılan suş daha sonra YPD agar ortamında (20g/L glukoz, 20g/L pepton, 10g/L maya ekstraktı ve 15g/L agar agar) 24 saat 30°C' de bekletilip 4°C'de muhafaza edilmiştir. İnkübatörde statik olarak geliştirilen kültür her 30 günde bir YPD besiyeri kullanılarak tazelenip, tekrar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Yapılan çalışma sonucu aşı kültüründe bulunan hücre sayısı 1×10^6 (kob/mL) olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.1' de üretilen *Saccharomyces cerevisiae* nin mikroskopik görüntüsü ve Şekil 3.2'de petri ortamında üretildikten sonraki görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 3.1. *Saccharomyces cerevisiae* mikroskop altındaki görüntüsü (Ejuama vd., 2021).

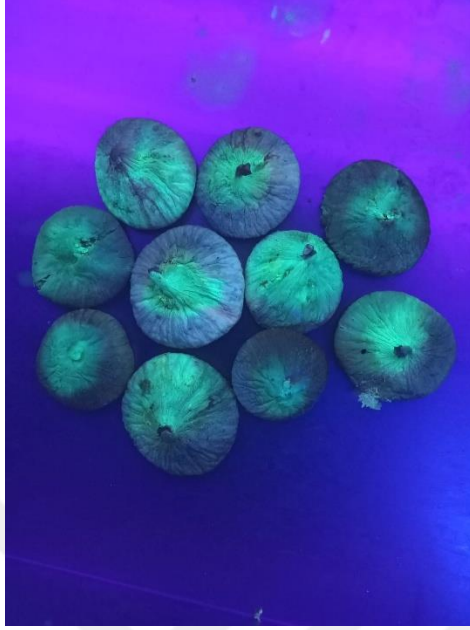


Şekil 3.2. *Saccharomyces cerevisiae* petri kaplarında üretim sonrası görüntüsü

3.1.2.Substrat

Çalışmada substrat olarak kullanılan hurda incir (70.42 ± 1.26 suda çözünür kuru madde (briks), 0.6 ± 0.03 su aktivitesi (aw), 15.8 ± 1.05 nem içeriği (%), 3.4 ± 0.4 protein miktarı (%), 2.6 ± 0.4 kül miktarı (%)) (Analizler Işık Tarım ve Ürünleri Tic. A.Ş tarafından gerçekleştirilmiştir) Işık Tarım ve Ürünleri Tic. A.Ş (Kemalpaşa, İzmir) tarafından sağlanmıştır. Üretim hatlarından ayrılan hurda incirlerde herhangi bir mikrobiyal gelişimin olmaması için incirler denemelere kadar 4°C ' de muhafaza edilmiştir. Denemelerde kullanılan incirler küflü ve yabancı madde içermemekle

birlikte UV ışık altında aflatoksinli olduğu tespit edilen incirlerden seçilmiştir. Aflatoksinli incirlerin UV ışık altındaki görüntüleri Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Aflatoksinli incirin UV ışık altındaki görüntüsü

3.1.3. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, Ek 1'de listelenmiştir.

3.1.4. Ekipmanlar

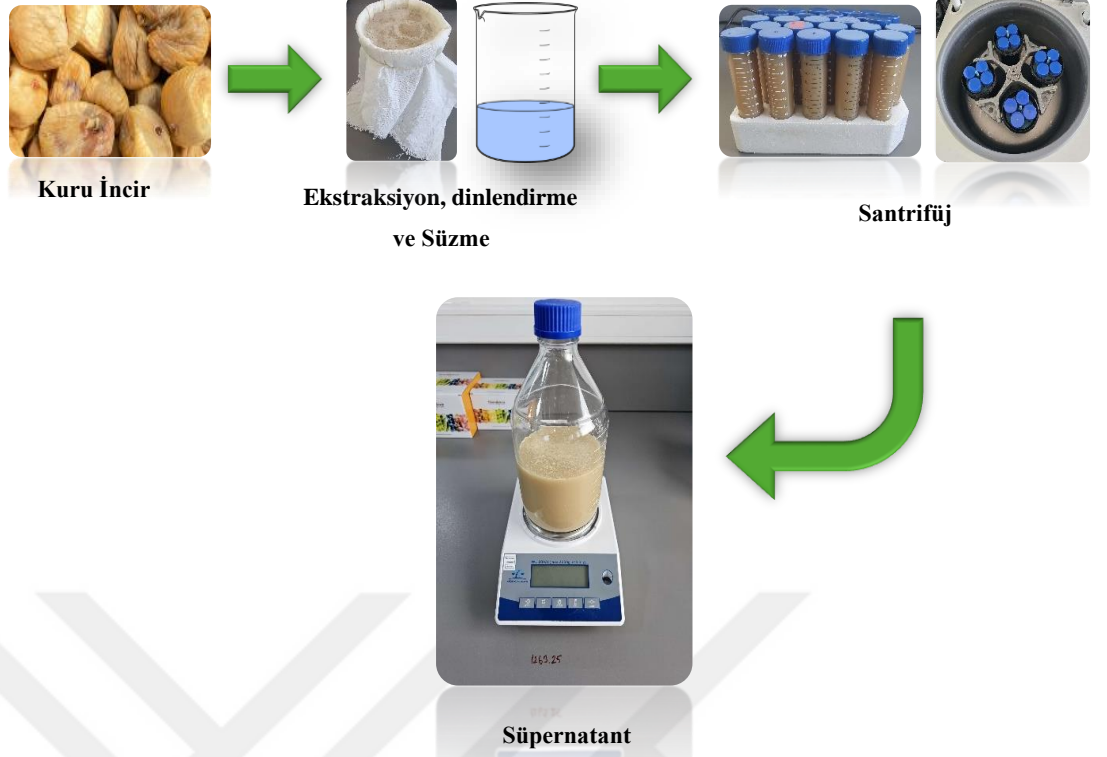
Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, Ek 2'de verilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Fermantasyon Ortamının Hazırlanışı

Etanol üretiminde kullanılacak olan incirdeki şekerin, *Saccharomyces cerevisiae* tarafından verimli bir şekilde kullanılabilmesi için ekstraksiyon işlemi

gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için 300 g hurda incirin mikrodalga fırın yardımıyla sıcaklığı 80°C'ye getirilmiş ve 1500 mL saf su ilave edilerek (Blendtec – Classic 575 marka) parçalayıcı ile karışım 1 dakika boyunca yüksek devirde parçalanmıştır. Parçalama sonrası ekstrakt katı kısımlarından ayrılması için 30 dk boyunca keten bir süzme bezi yardımıyla süzülmüştür. Süzülen kısım 5000 rpm'de (Hettich UNIVERSAL 320 R, Almanya Marka) santrifüj cihazında 25 dk boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir. Uygulanan tüm işlemler sırasıyla Şekil 3.3.'te belirtilmiştir. Elde edilen ekstraktın HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) cihazında toplam şeker içeriği tespit edildikten sonra şeker oranı %5 (aksi belirtilmediği sürece) olacak şekilde saf su ile seyreltilip fermantasyon ortamı hazırlanmıştır. Elde edilen karışımın 50 ml'si fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Otoklavda (Hirayama HG-80, Saitama, Japonya) sterilizasyon işlemi (121°C/15 dakika) uygulanmıştır. Fermantasyon denemeleri için, 30°C sıcaklıkta YPD sıvı besiyeri ile 24 saat aktiveleştirilen maya %2 (mL/mL) (aksi belirtilmediği sürece) oranında fermantasyon ortamına aşılanmış ve fermantasyon ortamı 30°C'de 24 saat herhangi bir çalkama işlemi uygulanmadan (statik kültür) inkübasyona bırakılmıştır. (Kasavi et al., 2012), (Singh et al., 2013), (Malik et al., 2020), (Netsopa et al., 2022), (Ünal et al., 2022)



Şekil 3. 4. Kuru incir fermantasyon ortamının hazırlanması

3.2.2. Plackett-Burman Tasarımıyla Önemli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi

Karbon kaynağı olarak incir ekstraktının kullanıldığı bu çalışmada ilk olarak Plackett-Burman tasarımı ile (Minitab Statistical Software (Release 13.20) maya ekstraktı, pepton, Amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$, Monopotasyum fosfat $[KH_2PO_4]$, ve magnezyum sülfat $[MgSO_4 \cdot 7H_2O]$ bileşenlerinin biyoetanol üretimine olan etkisi incelenmiştir.

5 farklı bileşen için Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi 8 farklı fermantasyon ortamı hazırlanmıştır. Ortam bileşenlerinin belirlenmesinde substrat miktarı 50 ml, pH 5.5, sıcaklık 30 °C, inkübasyon süresi ise 24 saat olacak şekilde fermantasyon koşulları sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Plackett Burman denemesi için kullanılan fermantasyon ortamları bileşenleri

Fermantasyon Ortamı	Bileşenler (g/L)				
	Maya Ekstraktı	Pepton	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
1	5.0	20	1	0.45	1
2	0.5	2	1	0.45	0.1
3	5.0	20	10	0.45	0.1
4	0.5	20	10	4.50	0.1
5	5.0	2	10	4.50	1.0
6	0.5	20	1	4.50	1.0
7	5.0	2	1	4.50	0.1
8	0.5	2	10	0.45	1.0

3.2.3. Fermantasyon Ortam Koşullarının Belirlenmesi

Etanol üretimi üzerine etkilerini incelemek için farklı parametreler ile çeşitli denemeler gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2.'de belirtildiği gibi ilk aşamada kullanılan incir ekstraktlarının pH'ları 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 pH olacak şekilde deneme yapılmış olup en yüksek etanol verimi elde edilen aralık kullanılarak %1, %2, %3, %4, %5, %6, %7 (mL/mL) aşı oranı denemeleri gerçekleştirilmiştir. Yine aynı şekilde en yüksek etanol konsantrasyonu elde edilen aşı oranı miktarı kullanılarak sırasıyla 25°C, 28°C, 30°C, 32°C, 35°C değerlerinde sıcaklık parametreleri denemesi, %2.5, %5, %7.5 ve %9 (mL/mL) olacak şekilde önce substrat konsantrasyonu denemesi ve en son olarak 24, 48, ve 72 saatlerinde inkübasyon süresi parametreleri için fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemelere öncelikli olarak incir ekstraktının pH değerleri ile başlanmış diğer parametreler ise %2 inkübasyon oranı, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 24 saat fermantasyon süresi olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.2. Etanol üretimi fermantasyon ortamı için üretim parametreleri

Parametreler	Değerler
pH	4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0
İnokülasyon oranı %(v/v)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
İnkübasyon sıcaklığı (°C)	25, 28, 30, 32, 35
Başlangıç substrat %(v/v)	2.5, 5, 7.5, 9.5
İnkübasyon süresi (h)	24,48,72

3.2.4. Analitik Yöntemler

3.2.4.1. Toplam Şeker Profilinin Belirlenmesi

Hurda incir ve bu incirden elde edilen ekstrakt için toplam şeker profili analizi yapılmıştır. Toplam şeker profili analizi T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı SGS İstanbul Özel Gıda Kontrol Labrotuarı tarafından yapılmıştır. Analiz için HPLC 1200 Infinity Series – RID Dedector ve Intersil NH2, 5 µm, 4.6x250 mm (UP) kolon kullanılmıştır.

3.2.4.2. pH

İncir ekstraktının pH değerleri dijital bir pH metre (Mettler Toledo, Seven Compact Duo) kullanılarak ölçülmüştür, analizler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Etanol Miktarının Belirlenmesi ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Hurda incirin substrat olarak kullanılması ile elde edilen etanol miktarının belirlenmesi için gaz kromatografisi (Shimadzu GCMS-QP2010 SE markalı) GC-MS Headspace cihazı kullanılmıştır. Cihazda etanol ölçümü yapılmadan önce her bir üretim ortamından 1 mL numune alınarak 10 kat GC/LC cihazlarına uygun saflıkta saf su ile seyreltme uygulanıp, seyreltilen numune 6000 rpm 25 dk santrifüj edilmektedir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra üst fazdan tekrar 1 mL daha alınarak 10 kat daha seyreltilmiştir. Sonuç olarak 100 kat seyreltilmiş numuneden 1 ml örnek alınarak analiz gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan kinetik parametreler aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Srimachai et al., 2015),(Jambo et al., 2019), (Göncü, 2023).

$$\text{Teorik verim (\%)} = \frac{\text{Elde Edilen Etanol Konsantrasyonu (g/L)}}{\text{Substrat Konsantrasyonu} \times 0.511} \times 100 \quad (3.1)$$

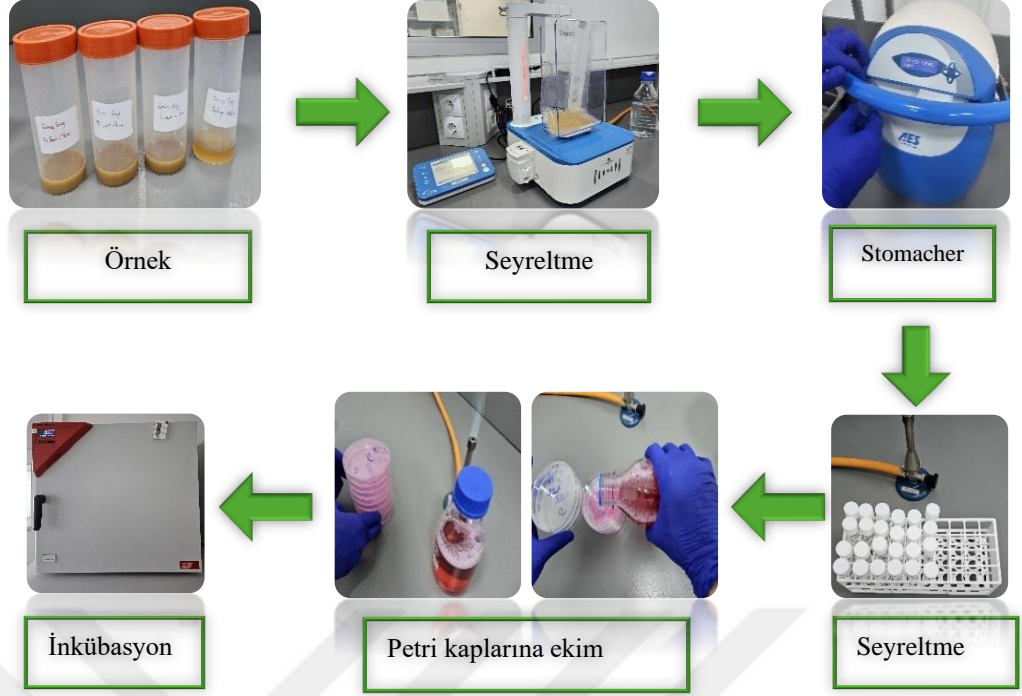
$$\text{Hacimsel verimlilik} \left(\frac{\text{g/L}}{\text{h}} \right) = \frac{\text{Elde Edilen Etanol Konsantrasyonu (g/L)}}{\text{Süre (h)}} \quad (3.2)$$

$$\text{Etanol verimi} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Elde Edilen Etanol Konsantrasyonu (g/L)}}{\text{Başlangıç Substrat (g/L)}} \quad (3.3)$$

3.2.4.4. Maya Hücre Miktarının Belirlenmesi

Maya hücre sayımı için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (Merck 100466) besiyeri kullanılmıştır. Ekim yapılan plaklarda 25 °C'de 5-7 gün inkübasyondan sonra mikrobiyolojik sayım gerçekleştirilmiştir (ISO 21527-1).

Maya hücre miktarının belirlenmesi amacıyla 6 saat ara ile toplam 20 mL olacak şekilde örnekler alınıp steril kaplara alınmıştır. Daha sonra her bir örnekten 10 mL alınarak üzerine BioMérieux Dilumat Expert markalı cihazda 90 mL tamponlanmış peptonlu su ilave edilmiştir. Sıvının homojen olarak karışması için AES Laboratories Smasher markalı stomacher cihazında karıştırıldıktan sonra, önceden hazırlanmış MRD broth sıvısı ile 10⁻⁷ seviyesine kadar 9 mL tüplerde seyreltilir. Her bir seyreltme içerisinde DRBC agar bulunan petri kaplarına dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petri kapları 25°C sıcaklıkta 5-7 gün bekletildikten sonra maya sayımı gerçekleştirilmiştir. Aşağıda gerçekleştirilen sürecin akış şeması Şekil 3.5.'te belirtilmiştir.



Şekil 3.5. Maya sayımı akış şeması

3.2.4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Analiz verileri Minitab 13 programı (Minitab Inc., Minitab 13, State College, PA, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Denemeler üç tekrar, analizler üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Değerler aksi belirtilmediği sürece %5 güven aralığında ($P < 0.05$) olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada substrat olarak kullanılan incir ekstraktının bileşimi

Çalışmada substrat olarak kullanılmış olan incir ekstraktının toplam şeker ve karbon profili Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. İncir ekstraktı toplam şeker ve karbonhidrat profili

Analiz	Sonuç	Birim	Cihaz/Metod
Fruktoz	4.89 ± 0.39	g/100g	HPLC-RID/AOAC 977.20
Glukoz	4.63 ± 0.74	g/100g	HPLC-RID/AOAC 977.20
Maltoz	Tespit Edilemedi	g/100g	HPLC-RID/AOAC 977.20
Sakkaroz	Tespit Edilemedi	g/100g	HPLC-RID/AOAC 977.20
Laktoz	Tespit Edilemedi	g/100g	HPLC-RID/AOAC 977.20

4.2. Plackett-Burman Tasarımı ile Gerekli Besiyeri Bileşenlerinin Belirlenmesi

Karbon kaynağı olarak hurda incirin kullanıldığı fermantasyon ortamına eklenen YPD besiyeri bileşenlerinden etanol üretimi açısından istatistiksel olarak önemli olanlar belirlenmiştir. İncelenen besiyeri bileşenlerinin düşük (-) ve yüksek (+) seviyeleri programa girilerek oluşturulan PB deneme deseni ve bu desene göre yapılan üretim sonuçları Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hurda incir ile hazırlanan fermantasyon ortamında yapılan PB deneme tasarımı ve fermantasyon sonucu üretilen etanol miktarları

Deneme	Maya Ekstraktı	Pepton	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	Etanol (g/L)	Miktarı
1	+	+	-	-	+	22.37	
2	-	-	-	-	-	22.13	
3	+	+	+	-	-	22.55	
4	-	+	+	+	-	21.07	
5	+	-	+	+	+	23.57	
6	-	+	-	+	+	21.81	
7	+	-	-	+	-	22.60	
8	-	-	+	-	+	21.41	

Yurkarıda belirtilen etanol değerleri incelendiğinde en yüksek üretim miktarının 5 numaralı besiyerinde (23.57 g/L), en düşük miktarın ise 4 numaralı besiyerinde (21.07 g/L) olduğu görülmektedir.

5 besiyeri bileşenlerinin her birinin etanol üretimi üzerine etkisini görebilmek için varyans analiz (ANOVA) tablosu incelenmiştir. Çizelge 4.3'te belirtilen her bir bileşen katsayıları incelendiğinde pepton ve (NH₄)₂SO₄, Maya Ekstraktı, KH₂PO₄, MgSO₄ bileşenlerinin etanol üretiminde istatistiksel olarak olumsuz etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bileşenlerin istatistiksel olarak önemini belirleyen p değeri 0.05'ten küçük olması halinde (P<0.05) bileşenin etanol üretiminde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.3'te belirtilen sonuçlara göre tüm bileşenlerin p değerleri (P>0.05) ten büyük olduğu için bu besin maddelerinin etanol üretiminde istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olmadığı görülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre etanol üretiminde herhangi bir ilave bileşen kullanılmamıştır.

Çizelge 4.3. Etanol üretimi için tahmini etki değerleri ve katsayılar

Faktör	Etki	Katsayı	Sh kat*	T	P
Sabit		1.75125	0.01957	89.51	0.000
Maya	0.09250	0.04625	0.01957	2.36	0.142
Ekstraktı					
Pepton	-0.03750	-0.01875	0.01957	-0.96	0.439
(NH ₄) ₂ SO ₄	-0.00750	-0.00375	0.01957	-0.19	0.866
KH ₂ PO ₄	0.00750	0.00375	0.01957	0.19	0.866
MgSO ₄	0.01750	0.00875	0.01957	0.45	0.698

*Sh kat, standart katsayıları

Çizelge 4.4. Etanol üretimi için varyans analizi

Kaynak	SD ^a	KT ^b	Düz. KT ^c	Düz. KO ^d	F	P
Ana etkenler	5	0.020763	0.020763	0.004153	1.36	0.476
Artık hata	5	0.006125	0.006125	0.003063		
Toplam	7	0.026888				

^a Serbestlik derecesi, ^b Kareler toplamı, ^c Düzeltilmiş kareler toplamı, ^d Düzeltilmiş kareler ortalaması

Ayrıca Çizelge 4.3'te belirtilen ANOVA sonucunda sabit p değeri %5 güven aralığında olduğundan dolayı ($p < 0.05$) elde edilen model istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Ingale et al., (2019), immobilize *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak yaptıkları çalışmada biyoetanol verimini optimize etmek için Plackett-Burman (PBD) analizini kullanmışlardır. Çalışmada KH₂PO₄, melas, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, maya ekstraktı, pH, sıcaklık, inkubasyon süresi, immobilize mayalar, karıştırma ve ön işlem görmüş hidrolizatların fermantasyona etkisini incelemişlerdir. PBD analizi sonucunda modelin anlamlı olduğu belirlenmiş ve melas konsantrasyonu, sıcaklık ve inkubasyon süresi faktörlerinin önemli olduğu gözlenmiştir. KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, maya ekstraktı, pH, immobilize maya, karıştırma ve ön

işlemden geçmiş hidrolizat gibi diğer faktörlerin ise önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Singh & Bishnoi, (2012), pirinç samanından *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak yapılan etanol fermantasyonu için PBD ile optimizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada, pH, inkübasyon sıcaklığı, aşı oranı miktarı, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , CoCl_2 , CuSO_4 , üre konsantrasyonu ve fermantasyon süresi değişkenleri seçilmiştir. Çalışma sonucunda $R^2 = 0.96$; düzeltilmiş $R^2 = 0.82$ regresyon analizi tasarımın uygun olduğunu göstermiştir. pH, fermantasyon süresi, sıcaklık, aşı oranı ve üre konsantrasyonu %95'in üzerinde bir güven aralığı seviyesinde anlamlı bulunmuştur. Kalan bütün değişkenlerin anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

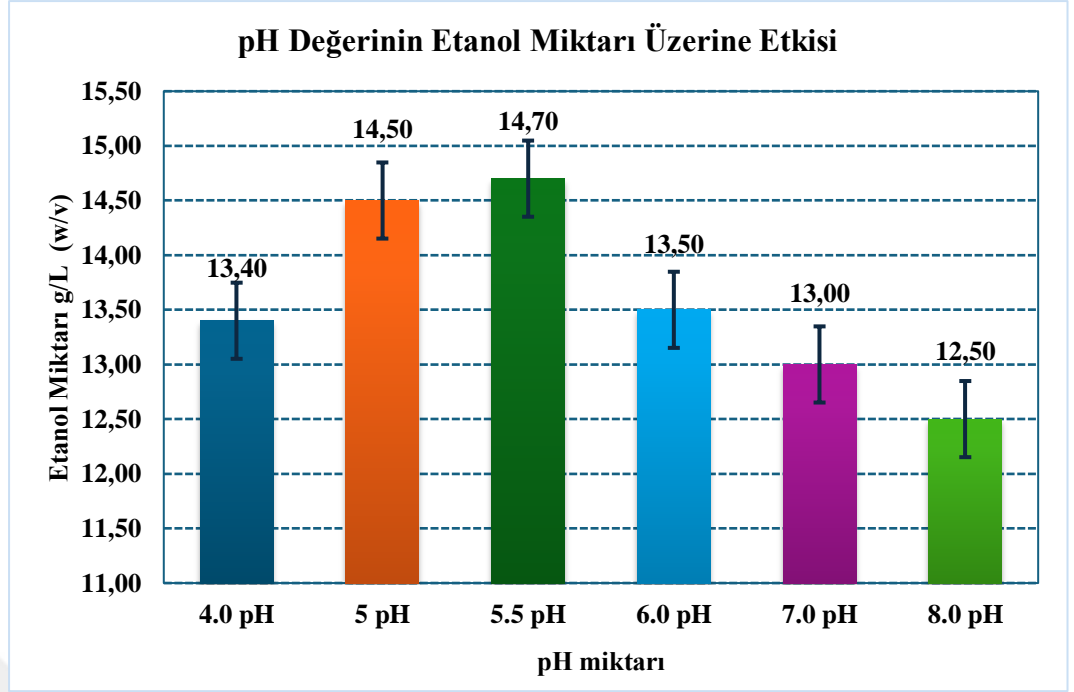
Yücel ve Göycincik, (2015), çay atıklarından *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak yaptıkları etanol fermantasyonu için Plackett-Burman (PBD) analizlerinin ve Merkez Kompozit Tasarım (CCD) modelinin çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. NH_4Cl , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, maya miktarı, pH, sıcaklık, fermantasyon süresi olmak üzere toplam 7 deney grubu incelenmiştir. Model, F testi ve ANOVA ile kontrol edilmiş olup, modelin ANOVA sonuçları çok düşük bir p değeri (<0.0001) ile oldukça anlamlı ve yanıt ile önemli parametreler arasındaki gerçek ilişkiyi temsil edecek kadar yeterli bulunmuştur. Etanol fermantasyonunu etkileyen en önemli parametrelerin maya miktarı, sıcaklık ve NH_4Cl konsantrasyonu olduğu görülmüştür.

Ma et al., (2019), meyve ve sebze atıklarından etanol mayası kullanılarak gerçekleştirdikleri etanol üretimi için PPD kullanarak optimizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada pektinaz, sakkarifikasyon enzimi, selüloz, amilaz ve proteaz enzim olarak, karbon kaynağı olarak maya ekstraktı, MgSO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inorganik tuzlar ve 1 boş kontrol grubu olmak üzere 12 farklı deney grubu incelenmiştir. PBD analizinde, %95 güven aralığında anlamlı etkiye sahip faktörleri belirlemek için p değeri kullanılmıştır ($p < 0.05$). Elde edilen

sonuçlara göre selülaz, maya özü ve KH_2PO_4 anlamlı faktörler olarak belirlenmiştir ($p < 0.1$).

4.3. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Etanol retimine Etkisi

Etanol retiminde farklı başlangıç pH değerlerinin etkisini gözlemlemek amacıyla 6 farklı pH aralığında (4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0) denemeler gerçekleştirilmiştir. Uygulanan sterilizasyon işleminin pH değerinden neredeyse hiç etkilenmediği gözlenmiştir. Bundan dolayı kullanılacak olan ve % 5 oranında şeker içeren 50 ml üretim ortamları 250 mL hacimli erlenmayerlere eklenip, pH değerleri ayarlandıktan sonra sterilizasyon işlemi (121 °C/15 dk) uygulanmıştır. Sterilizasyon işlemi uygulanan ve soğutulan üretim ortamlarına %2 (mL/mL) oranında *Saccharomyces cerevisiae* mayası aşılanmış ve statik ortamda 30°C sıcaklıkta 24 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen alışma sonrası elde edilen etanol miktarları şekil 4.1’de ayrıca etanol hacimsel verimlilik ve teorik verim değerleri sırasıyla izelge 4.5’te sunulmuştur.



Şekil 4. 1 pH değerinin etanol miktarı üzerine etkisi

24 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda pH 5.5 değerine kadar etanol miktarının pH değeri arttıkça yükseldiği gözlemlenmiştir. pH 5.5 değerine geldiğinde üretilen etanol miktarı maksimum değerine (14.70 g/L) ulaşmış daha sonra pH değeri arttıkça azalarak en düşük etanol miktarı (12.50 g/L) pH 8.0 değerinde elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. pH değerinin etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Hacimsel Verimlilik (g/L/h)					
	pH 4.0	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 7.0 pH	pH 8.0
Etanol Miktarı	0.71	0.77	0.78	0.71	0.69	0.66

Etanol Konsantrasyonu	Teorik Verim (%)					
	pH 4.0	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
Etanol Miktarı	66.43	71.89	72.88	66.93	64.45	61.97

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Verimi (g/g)					
	pH 4.0	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
Etanol Miktarı	0.339	0.367	0.372	0.342	0.329	0.317

Çizelge 4.5'te elde edilen sonuçlara göre en yüksek etanol hacimsel verimlilik (0.78 g/L/h) ve etanol verimi (0.367 g/g) pH 5.5 değerinde gözlemlenmiş olup, en düşük etanol hacimsel verimlilik (0.66 g/L/h) ve etanol verimi (0.317 g/g) pH 8.0 değerinde gözlemlenmiştir. Aynı şekilde teorik verim değeri en yüksek pH 5.5 değerinde % 72.88 gözlemlenmiş olup, en düşük teorik verim değeri pH 8.0 değerinde % 61.97 olarak gözlemlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak, (Akponah, E. & Akpomie, (2012), *Saccharomyces cerevisiae* mayası ve casava atıklarını kullanarak yaptıkları çalışmada en yüksek etanol verimini asit hidrolizatında %3.60 v/w ve enzim hidrolizatında %1.88 v/w olarak pH 5.5'te elde etmişler ve fermantasyon ortamı pH değerlerinin artmasıyla beraber şeker tüketiminin de arttığını belirlemişlerdir. En yüksek şeker tüketimi, en yüksek etanol veriminin elde edildiği pH seviyelerinde gözlemlenmiştir. Bu durum, optimum pH seviyesi olan pH 5.5'de fermantasyonun daha verimli gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışma sonucunda optimum fermantasyon süresi olarak 24 saat, optimum pH seviyesi olarak pH 5.5 değerleri belirlenmiştir.

Literatürde farklı pH değerlerinde de yüksek etanol veriminin elde edildiği çalışmalar mevcuttur;

Turhan vd., (2010), keçiyoynuzu ekstraktını kullanarak yaptıkları etanol üretimi için optimum pH'nın 5.0 ile 5.5 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Buna ek olarak pH'nın pH 5.5'te sabit tutulmasının biyoetanol ve biyokütle verimini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Araştırmacılar, pH seviyesi pH 4.0'ın altına düştüğü durumlarda, etanol üretiminin tamamen durduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada pH kontrolü ile etanol konsantrasyonu 42.60 g/L'ye ulaşırken, pH kontrolü olmadan bu değer 40.17 g/L'ye düşmüştür. Benzer şekilde, etanol

hacimsel verimlilik değeri pH kontrolü ile 0.54 g/L/h, pH kontrolü olmadan ise sadece 0.10 g/L/h olduğu tespit edilmiştir.

Lin et al., (2012), gerçekleştirdikleri çalışmaya göre *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 için optimum pH aralığı pH 4.0-5.0 olarak belirlenmiştir. Çalışmada, ortamın pH değerinin 4 altına düşmesi durumunda inkübasyon süresi artarken etanol konsantrasyonunun önemli miktarda değişmediği tespit edilmiştir. pH değerinin pH 5.0 üzerine çıkması durumunda etanol konsantrasyonunda düşüş meydana gelmiştir. pH değerinin pH 4.0 altında oluşan durumun asetik asit konsantrasyonunun ortamda artmasına bağlı olarak maya hücrelerinin metabolik stres altına girmesi kaynaklı olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, pH>5 durumunda ise bütirik asit konsantrasyonunun artması maya için olumsuz ortam koşullarının oluşmasına sebep olmuştur.

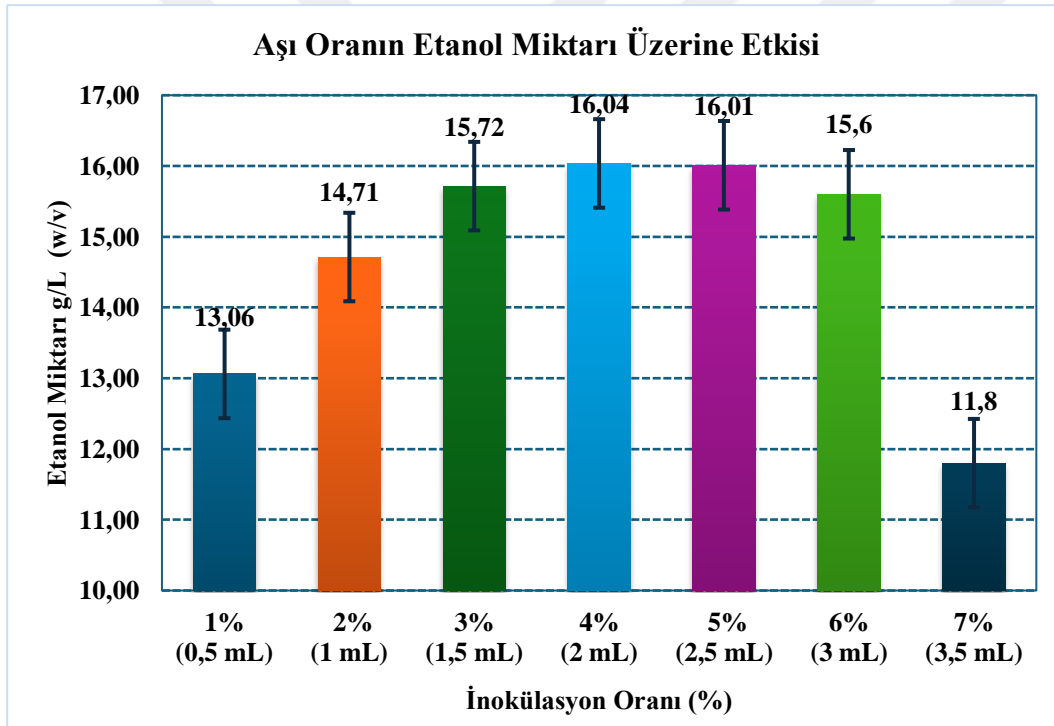
Ortiz-Muñiz et al., (2010), *S. cerevisiae* ITV-01 suşunun şeker kamışı küspesi ile gerçekleştirdikleri fermantasyon çalışmasında, optimum etanol üretim koşulları pH 3.5, 30 °C ve başlangıç glukoz konsantrasyonu 150 g/L olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, maksimum etanol konsantrasyonu 58.4 g/L, etanol hacimsel verimlilik 1.8 g/L/h ve etanol verimi 0.41 g/g elde edilmiştir. Bu durum mikroorganizma türü aynı olsa dahi suşlardaki farklılığın optimum üreme koşullarında da farklılık oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Hu et al., (2012), *S. cerevisiae* JZ1C suşu için, 35°C'de pH 4.0-8.0 aralığında geniş bir optimum pH aralığı rapor etmişlerdir. Optimum veriler 40°C'de 65.2 g/L etanol konsantrasyonu, teorik etanol verimi 79.7% ve etanol hacimsel verimliliği 0.91 g/L/h olarak tespit edilmiştir. Bu suşun geniş bir pH aralığında büyüebilme yeteneği, çevresel koşullara daha esnek ve dayanıklı olduğunu göstermiştir.

4.4. Aşı Oranının Etanol Üretimine Etkisi

En yüksek etanol veriminin elde edildiği pH değeri 5.5 olarak seçilmiş ve diğer denemelerde bu pH değeri sabit tutulmuştur. İnokülasyon oranının etanol üretimine etkisini belirlemek amacıyla aşı oranı %1-7 (mL/mL) olacak şekilde

ayarlanarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Başlangıç substrat konsantrasyonu %5 (5 g toplam şeker/100 ml) olan 250 ml erlenmayer içerisindeki 50 mL fermantasyon ortamının pH değeri pH 5.5'e ayarlandıktan sonra sterilizasyon işlemi (121 °C/15 dk) uygulanmıştır. Sterilizasyon işlemi uygulanan üretim ortamlarına %1, %2, %3, %4, %5, %6, %7 (mL/mL) oranında *Saccharomyces cerevisiae* mayası aşılanmış ve statik ortamda 30°C sıcaklıkta 24 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma sonrası elde edilen etanol miktarları Şekil 4.2.'de, etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi değerleri sırasıyla Çizelge 4.6.'da sunulmuştur.



Şekil 4.2. Farklı aşı oranlarının üretilen etanol miktarı üzerine etkisi

Gerçekleştirilen denemeler sonrasında aşı oranının %4'e kadar artması durumunda etanol miktarının arttığı ancak %4'ten sonra azalışa geçtiği tespit edilmiştir. En yüksek etanol miktarı %4 aşı oranında 16.04 g/L olarak tespit edilmiş, en düşük üretilen etanol miktarı ise %7 aşı oranında 11.8 g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Aşı oranının etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Hacimsel Verimlilik (g/L/h)						
	1% (0,5 mL)	2% (1 mL)	3% (1,5 mL)	4% (2 mL)	5% (2,5 mL)	6% (3 mL)	7% (3,5 mL)
Etanol Miktarı	0.69	0.78	0.83	0.85	0.85	0.82	0.62

Etanol Konsantrasyonu	Teorik Verim (%)						
	1% (0,5 mL)	2% (1 mL)	3% (1,5 mL)	4% (2 mL)	5% (2,5 mL)	6% (3 mL)	7% (3,5 mL)
Etanol Miktarı	64.75	72.94	77.91	79.50	79.47	77.34	58.50

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Verimi (g/g)						
	1% (0,5 mL)	2% (1 mL)	3% (1,5 mL)	4% (2 mL)	5% (2,5 mL)	6% (3 mL)	7% (3,5 mL)
Etanol Miktarı	0.331	0.373	0.398	0.406	0.406	0.395	0.299

Çizelge 4.6.'da elde edilen sonuçlara göre en yüksek etanol hacimsel verimlilik 0.85 g/L/h ve etanol verimi 0.406 g/g olarak %4 ve %5 aşı oranı değerlerinde gözlemlenmiş olup, en düşük etanol hacimsel verimlilik ise 0.62 g/L/h ve etanol verimi 0.299 g/g %7 aşı oranında gözlemlenmiştir. Buna paralel olarak teorik verim değeri en yüksek %4 aşı oranı değerinde %79.50 gözlemlenmiş olup, en düşük teorik verim %7 aşı oranında %58.50 olarak gözlemlenmiştir.

Literatürde çalışmamıza benzer optimum aşı oranları tespit edilmesine rağmen farklı aşı oranlarının da optimum olarak seçildiği çalışmalar mevcuttur. Bu farklılığın sebebinin kullanılan mikroorganizma suşunun ve ortam koşullarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Izmirlioglu ve Demirci, (2012), atık patates püresinden etanol fermantasyonu için farklı aşı oranlarının etanol verimi üzerine etkisini incelemiştir. Bu çalışmada %1, 3 ve 5 olmak üzere farklı aşı oranları denenmiş olup en yüksek etanol üretim hızı (6.48 g/L/saat) %3 aşı oranında elde edilmiştir. %5 aşı oranında etanol veriminin yüksek olmasına rağmen, maya büyüme hızı ve etanol üretim hızının düşük olduğu rapor edilmiştir.

L. Zhang et al., (2011), yaptıkları çalışmada farklı aşı oranlarının (3%, 7%, 10%, 12% ve 15%) kinetik parametrelerde önemli farklılıklara sebep olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek etanol konsantrasyonu (112.4 g/L), şeker kullanımı (99.18%) ve etanol verimi (91.39%), %7 başlangıç aşı oranında elde edilmiş ve bu parametrenin biyoetanol üretimi üzerinde etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. %7 aşı oranından daha yüksek oranları (%10, 12 ve 15) bahsedilen kinetik parametreler üzerinde herhangi bir avantaj sağlamamıştır.

Turhan vd., (2010), keçiyoynuzu ekstraktı kullanarak yaptıkları çalışmada, %1, %3 ve %5 aşı oranı ile yapılan fermentasyonlarda en yüksek etanol konsantrasyonu (42.90 g/L), etanol hacimsel verimi (3.7 g/L/saat) ve etanol teorik verimi (%45) %3 aşı oranı ile elde edilmiştir. Gerçekleştirilen istatistiksel analizler doğrultusunda, %3 aşı oranının etanol konsantrasyonu ve üretim hızında diğer aşı oranlarına kıyasla önemli farklılıklara sebep olduğu tespit edilmiştir.

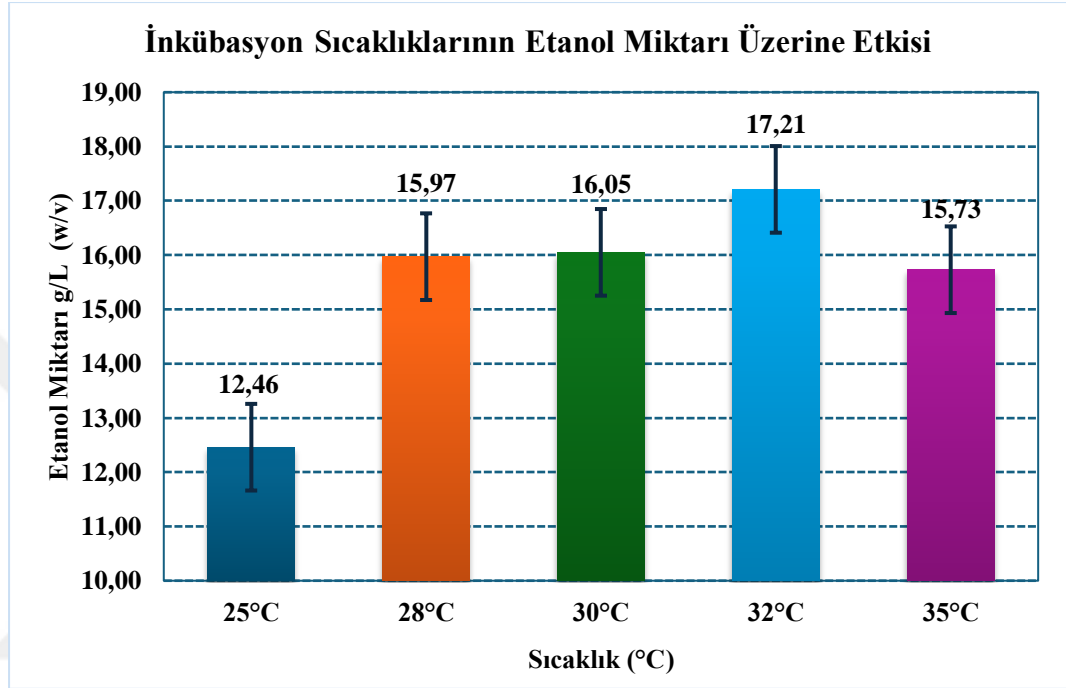
Nikolić et al., (2009), tarafından yapılan çalışmada, %2 ve %5 aşı oranlarının etanol üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. %2 başlangıç aşı oranında; 38 ve 74 saatlik fermentasyon sürelerinde yüksek etanol üretimi ve verimi elde edilmiştir. 38 saatlik fermentasyon süresinde en yüksek üretkenlik 2.21 g/L/h olarak belirlenmiştir. 5% (mL/mL) başlangıç aşı oranı miktarında ise fermentasyon parametrelerinde önemli bir artış sağlamamıştır.

Matsushika & Sawayama, (2010), rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* şusunu (MA-R4) kullanarak farklı aşı oranı miktarlarının (1.60, 3.27, 6.76, 9.87, and 12.7 g/L) fermentasyon sonucu üretilen etanole etkisini incelemişlerdir. Ksilioz ve glikoz içeren ortamda 48 saat fermentasyon sonrası en yüksek etanol konsantrasyonu (34,5 g/L), etanol verimi (0.383 g/g) ve etanol hacimsel verimliliği (6.683 g/L/h) 12.7 g/L aşı oranı ile elde edilmiştir.

4.5. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Etanol Üretimine Etkisi

Önceki çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda aşı oranı %4, pH değeri ise pH 5.5 olarak seçilerek 24 saat inkübasyon süresinde farklı inkübasyon

sıcaklıklarının etanol verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmada diğer önemli bir parametre olan başlangıç substrat konsantrasyonu da %5 olacak şekilde sabit tutulmuştur. Gerçekleştirilen çalışma sonrası elde edilen etanol miktarları Şekil 4.3.'te, etanol hacimsel verimlilik ve teorik verim değerleri sırasıyla Çizelge 4.7.'de belirtilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının üretilen etanol miktarı üzerine etkisi

Gerçekleştirilen fermantasyon işlemi sonrası 28°C'den itibaren etanol üretiminin büyük oranda arttığı tespit edilmiş, en yüksek etanol miktarı (17.21 g/L) 32°C'de elde edilmiştir. En düşük etanol miktarı (12.46 g/L) 25°C'de elde edilmiştir. Bu çalışmaya göre etanol üretimi için en uygun sıcaklık 32°C olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. İnkübasyon sıcaklıklarının etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Hacimsel Verimlilik (g/L/h)				
	25°C	28°C	30°C	32°C	35°C
Etanol Miktarı	0.66	0.84	0.85	0.91	0.83

Etanol Konsantrasyonu	Teorik Verim (%)				
	25°C	28°C	30°C	32°C	35°C
Etanol Miktarı	61.77	79.18	79.57	85.32	77.99

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Verimi (g/g)				
	25°C	28°C	30°C	32°C	35°C
Etanol Miktarı	0.316	0.405	0.407	0.436	0.399

Çizelge 4.7.'de elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek etanol hacimsel verimlilik 0.91 g/L/h, etanol verimi 0.436 g/g ve Teorik verim %85.32 olarak 32°C sıcaklık değerlerinde gözlemlenmiş olup, en düşük etanol hacimsel verimlilik 0.66 g/L/h, etanol verimi 0.316 g/g ve %61.77 teorik verim 25°C değerinde gözlemlenmiştir.

Aldiguiet et al., (2004), tarafından gerçekleştirilen çalışmada, sıcaklığın (27,30,33,36,39°C) etanol verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Sıcaklık değerinin 27'den 36°C'ye artması sonucunda biyokütle ve etanol üretiminin arttığı ancak 39°C'de azalmaya başladığı görülmüştür. En yüksek biyokütle (39 g) ve etanol üretimi (yaklaşık 260 g) 30°C ve 33°C'de elde edilmiştir. Biyokütle üretimi 30°C'de zirveye ulaşmış, ardından 39°C'de ciddi bir düşüş göstermiştir. Bu çalışma, yüksek sıcaklıkların mayanın büyüme ve etanol üretimi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir.

Phisalaphong et al., (2006), yaptıkları çalışmada %17, %20 ve %22 (w/v) başlangıç substrat değerlerinde etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada etanol üretiminin 30-33 °C'de arttığını ancak 35 °C'den sonra azaldığını

saptamışlardır. 35 °C üzeri sıcaklıklarda hücre büyümesi ve etanol üretimi olumsuz etkilendiği için optimum sıcaklık 30°C olarak seçilmiştir.

Park et al., (2013), *Saccharomyces cerevisiae* L3262a ile 30, 34 ve 37°C’de optimum sıcaklığı bulmak için optimizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada optimum sıcaklığın bulunması için asetik asit ve glukoz konsantrasyonu miktarları ölçülmüştür. 30 ve 34 °C’de daha düşük glikoz ve asetik asit konsantrasyonları elde edildiğinden bu sıcaklıkların etanol üretimi için uygun olabileceğini tespit etmişlerdir.

Lip et al., (2020), 13 farklı endüstriyel *Saccharomyces cerevisiae* suşu ile sıcaklık optimizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Farklı suşların maksimum büyüme hızlarının farklı sıcaklıklarda belirlenmesi için kardinal sıcaklık modeli (CTMI) kullanılmıştır. Bu modele göre gerçekleştirilen çalışmada 13 farklı suşun optimum sıcaklıklarının 29°C ile 35°C olduğu tespit edilmiştir.

4.6. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun ve İnkübasyon Süresinin Etanol Üretimi Üzerine Etkisi

Önceki denemelerden elde edilen veriler doğrultusunda; aşı oranı %4, pH değeri 5.5, sıcaklık ise 32 °C olarak seçilmiş ve ilerleyen aşamalarda bu değerler sabit tutulmuştur. Optimum etanol veriminin sağlanması için belirli aralıklarla başlangıç substrat konsantrasyonu (%2.5, 5, 7.5, 9.5) ve inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 saat) değiştirilerek deneme yapılmıştır. Gerçekleştirilen çalışma sonrası elde edilen etanol miktarları, teorik verimleri, etanol verimleri ve etanol hacimsel verimleri Çizelge 4.8.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Başlangıç substratın farklı sürelerde etanol hacimsel verimlilik, teorik verim ve etanol verimi üzerine etkisi

Etanol Konsantrasyonu	Substrat Miktarı (%)			
	%2,5	%5	%7,5	9.5%
24 saat	8.38	21.87	31.70	37.58
48 saat	7.71	20.26	34.01	44.37
72 saat	6.7	18.62	30.17	40.87

Etanol Konsantrasyonu	Teorik Verim (%)			
	%2,5	%5	%7,5	9.5%
24 saat	65.60	85.60	82.71	76.93
48 saat	60.35	79.31	88.75	90.82
72 saat	52.45	72.87	78.73	83.65

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Hacimsel Verimlilik (g/L/h)			
	%2,5	%5	%7,5	9.5%
24 saat	0.35	0.91	1.32	1.57
48 saat	0.16	0.42	0.71	0.92
72 saat	0.09	0.26	0.42	0.57

Etanol Konsantrasyonu	Etanol Verimi (g/g)			
	%2,5	%5	%7,5	9.5%
24 saat	0.34	0.44	0.42	0.39
48 saat	0.31	0.41	0.45	0.46
72 saat	0.27	0.37	0.40	0.43

Çizelge 4.8. incelendiğinde %2.5 başlangıç substrat miktarı ile etanol üretimi, inkübasyon süresi arttıkça zamanla azalan bir eğilim göstermektedir. Bu durum, düşük substrat miktarının kısa sürede tüketildiğini ve mikroorganizmaların daha fazla etanol üretmediğini göstermektedir. %5 substrat miktarı ile etanol üretimi de %2.5 başlangıç substrat miktarında olduğu gibi inkübasyon süresi arttıkça zamanla azalma eğilimi göstermektedir, ancak %7.5 substrat miktarında etanol üretimi 42. saate kadar artmış sonrasında ortamdaki substratın tükenmesi sebebi ile 72. Saatte azalmıştır. Bu durum yüksek substrat miktarlarının etanol üretimini desteklediğini ancak belirli bir noktada doyma noktasına ulaştığını göstermektedir. Substrat miktarı %9.5 iken etanol üretimi diğer substrat konsantrasyonlarına göre yüksek olduğu görülmüştür. Fakat diğer substrat oranlarında da görüldüğü gibi 42. Saatte en yüksek etanol verimi elde edilse de 72. Saatte etanol üretimi azalmıştır. Substrat konsantrasyonu dışında zamanın etanol üretimine etkisi incelendiğinde 42. saatte etanol üretimlerinin maksimum seviyelere ulaştığı 72. saatte ise etanol üretim miktarlarının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre optimum substrat miktarı %9.5; inkübasyon süresi ise 42 saat olarak seçilmiştir.

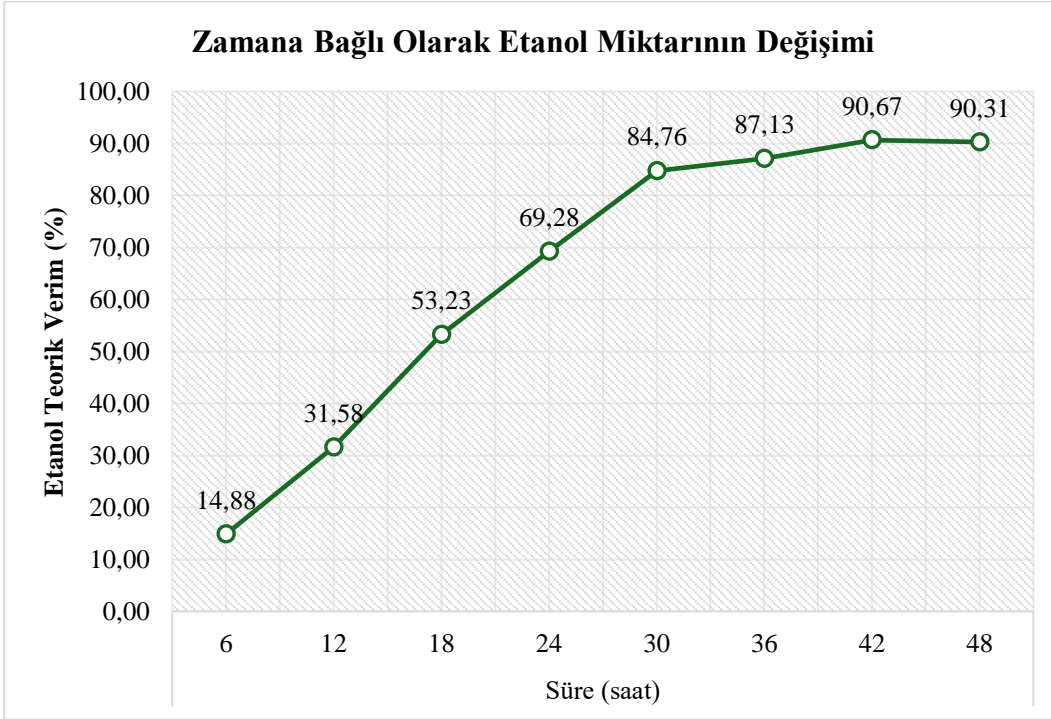
Q. Zhang et al., (2015), tarafından yapılan çalışmada, 160 g/L'ye kadar olan glikoz konsantrasyonlarında hücre yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir. İlk 24 saat yüksek substrat konsantrasyonlarında maya hücrelerinin yoğunluğunun artmasına bağlı olarak artış görülse de inkübasyon süresinin azalması ile etanol verimi %95'ten %65'e düşmüştür. Glikoz seviyelerinin aşırı yüksek olması durumunda ise 96 saatlik fermantasyon süresi sonrasında etanol veriminin %40'a kadar düştüğü, etanol konsantrasyonunun ise 55 g/L olduğu tespit edilmiştir. Bu durum fermantasyon aktivitesinin ciddi şekilde baskılandığını göstermektedir. %95 etanol veriminin elde edildiği 80 g/L glikoz konsantrasyonu bu proses için optimum koşul olarak seçilmiştir. Tüm substrat miktarları göz önünde bulundurulduğunda ise optimum fermantasyon süresinin 72 saat olduğu saptanmıştır.

Chang et al., (2018), %4 - %26 (g/mL) başlangıç substrat konsantrasyonlarında gerçekleşen fermantasyonun etanol üretimi üzerindeki etkilerini incelemiştir. %4 glikoz konsantrasyonunda 20 saat içerisinde glikozun tamamen tükendiği, etanol konsantrasyonunun 1.6 g/L'ye, etanol veriminin ise %50'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Ortalama glukoz tüketim hızının 1.99 g/L/h olduğu gözlenmiştir. Maksimum hücre biyokütlesi 1.7 g/L'ye ulaşmış olup pH ise 18 saat içinde pH 5.5'ten 3.5'a düşmüştür. %10 glikoz konsantrasyonunda ise glikoz 30 saat içinde tükenmiş, maksimum hücre biyokütlesi 5.1 g/L ve teorik etanol verimi ise %50.8 olarak belirlenmiştir.

Ghazanfar et al., (2022), *S. cerevisiae* mayası ile gerçekleştirdikleri, substrat olarak *Bombax ceiba* bitkisinin kullanıldığı fermantasyon ile etanol üretimi için optimizasyon çalışması yapmışlardır. %2, 4, 6, 8 ve 10 oranlarında yapılan çalışmada maksimum elde edilen etanol (57.53 g/L) %8 başlangıç substrat ile elde edilmiştir. %8 başlangıç substrat oranına kadar etanol üretim miktarında artış görülmüş, %10 başlangıç substrat oranında etanol üretiminin %8 e göre azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca maksimum etanol verimi (0.219g/g) 96 saat fermantasyon sonrası gözlenmiş 120 saat sonrası etanol veriminin azaldığı (0.119g/g) görülmüştür.

4.7. Etanol Üretim Kinetiği

Hurda incirden biyoetanol üretimi sürecinde gerçekleştirilen denemeler sonucunda proses parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler göz önünde bulundurularak aşı oranı %4, inkübasyon sıcaklığı 32 °C, ortam pH değeri pH 5.5, başlangıç substrat konsantrasyonu %9.5, inkübasyon süresi ise 42 saat olarak seçilmiştir. Bu koşullar altında etanol üretim kinetiğinin incelenmesi amacıyla 6 saat aralıklarla numune alınmış; maya miktarı ve üretilen etanol miktarı gözlemlenmiştir. Şekil 4.5'te üretilen etanol miktarlarına göre hesaplanmış teorik verim değerleri belirtilmiştir.



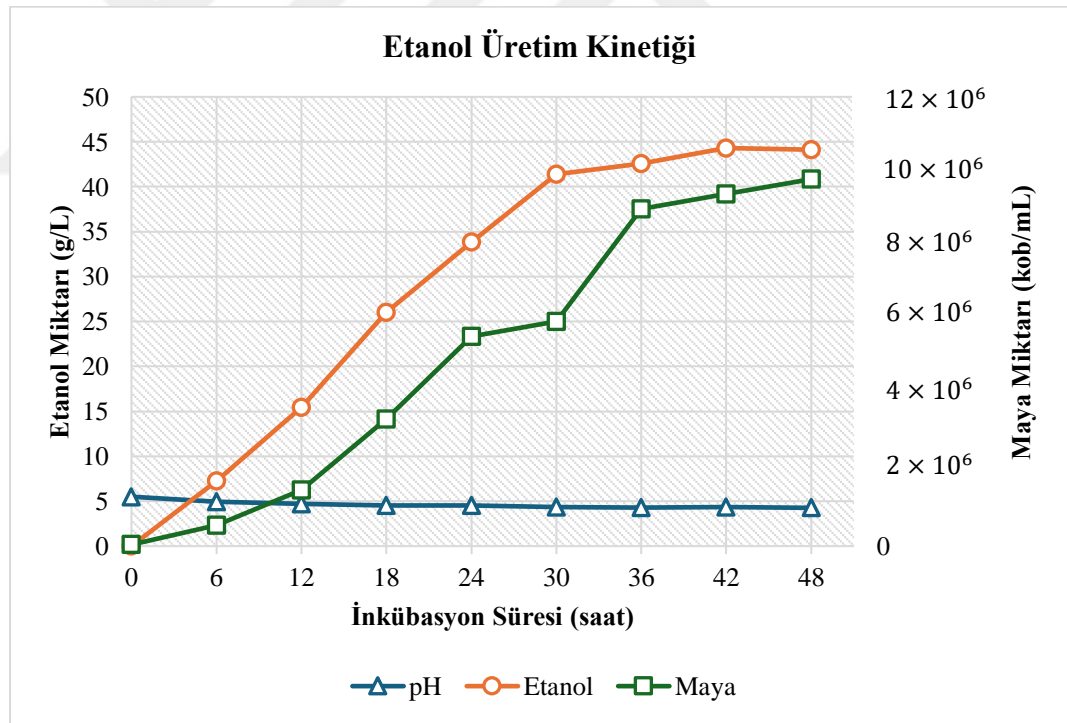
Şekil 4.4. Zamana bağlı olarak üretilen etanol teorik verimlerinin değişimi

Çizelge 4.9. Zamana göre etanol miktarları (g/L)

Etanol Konsantrasyonu(g/L)	Süre (saat)							
	6h	12h	18h	24h	30h	36h	42h	48h
Ortalama	7.27	15.43	26.01	33.85	41.41	42.57	44.30	44.12

Şekil 4.5.'e göre fermantasyonda 6-30 saat aralığında etanol üretiminin arttığı, 30. Saatten itibaren yavaşladığı Çizelge 4.9.'dan da açık bir şekilde görülmektedir. İlk 6 saat sonunda etanol miktarı 14.87 g/L iken 12. Saatin sonunda 31.57 g/L'ye yükselmiştir. 12 saat süresince etanol miktarındaki artış mikroorganizmaların hücre yoğunluğunun fazla olması sebebiyle aktif olarak etanol ürettiğini göstermektedir. Daha sonra 30. saatin sonunda etanol miktarı 84.76 g/L iken 36. Saatten sonra bu miktar 87.13 g/L'ye yükselmiştir. Bu değerlerden de görülebileceği üzere 36. saat sonrası etanol üretim hızı yavaşlamış; 42 ve 48. saatlerde ise neredeyse sabit bir değere ulaşmıştır.

Etanol üretim kinetiğinin incelenmesi amacıyla 6 saat aralıklarla numune alınmış bu numuneler içinden örnek alınarak mikrobiyolojik ekim yapılmıştır. Yapılan ekim sonucu ortaya çıkan maya miktarlarının etanol miktarı ve inkübasyon süresi ile karşılaştırılmış hali Şekil 4.6.'de paylaşılmıştır.



Şekil 4.5. Etanol üretim kinetiği

Sonuçlar incelendiğinde ilk 6 saat içerisinde maya miktarı 4×10^4 kob/mL'den 14 kat artarak 5.6×10^5 kob/mL'ye yükselmiştir. Bu durum, mikroorganizma çoğalmasının hızlı bir şekilde başladığını işaret etmektedir. 12. saatte maya miktarı 2.7 kat artarak 1.5×10^6 kob/mL'ye ulaşmıştır. Fermantasyon ortamının başlangıç pH değeri pH 5.5 olup 12. saat sonunda pH 4.7'ye düşmüştür. Bu süre içerisinde elde edilen etanol miktarı 15.43 g/L olarak tespit edilmiştir. İlk 6 saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte mikroorganizma gelişim hızının azaldığı görülmektedir. 18. saatteki maya miktarı göz önünde bulundurulduğunda miktar 12. saate göre 2.3 kat artarak 3.4×10^6 kob/ml'ye ulaşmıştır. 18. saatte pH değeri pH 4.54 ve üretilen etanol miktarı 26.01 g/L tespit edilmiştir. 24. saatte mikrobiyal üreme hızının yavaşladığı tespit edilmiştir; 24. saatin sonunda üretilen etanol miktarı 33.85 g/L, pH değeri ise pH 4.51 olarak belirlenmiştir. Üretilen etanol miktarı 33.85 g/L olarak tespit edilmiş ve pH 4.51 olarak tespit edilmiştir.

Maya miktarı, 24 saat sonrası 5.6×10^6 kob/mL seviyelerine ulaşmış ve 30. saatte üreme oranı 1.07 kat artışla belirgin bir şekilde yavaşlamıştır. Toplam maya miktarı 30. saatte 6×10^6 kob/mL olarak tespit edilmiştir. 36. saatte maya miktarı 9×10^6 kob/mL, 42. saatte 9.4×10^6 kob/mL ve 48. saatte 9.8×10^6 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Üretilen etanol miktarı 30. saatte 41.41 g/L olarak belirlenmiştir. Etanol miktarı 42. saatte en yüksek değeri olan 44.3 g/L'ye ulaşmıştır. pH değeri 30. saatte pH 4.37 olarak ölçülmüştür. 36. saatte pH 4.26'ya düşmüş ve 48. saatte pH değeri aynı seviyede kalmıştır.

0-18 saat arası maya üremesi hızlı bir şekilde artmış, bu dönem logaritmik (eksponansiyel) büyüme fazı olarak değerlendirilmiştir. 24-30 saat arası üreme hızı yavaşlamış, bu dönem durağan faza geçiş olarak kabul edilmiştir. 36. saatten itibaren üreme hızı belirgin şekilde düşmüş; bu durum, besin kaynaklarının tükenmesi veya toksik maddelerin birikmesi sonucu ölüm fazı olarak değerlendirilmiştir.

Srimachai et al., (2015),palm yağı ağacı saplarını (OPFJ) substrat olarak kullanarak *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile etanol üretim optimizasyonu ve kinetiğini hesaplamak amacıyla 96 saat boyunca fermantasyon gerçekleştirmiştir. Deneme sonucunda optimum 0.39 g-etanol/g-glikoz etanol verimi ve %76.47 teorik etanol verimi elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre yaklaşık 50. saate kadar etanol üretiminin hızlı bir şekilde arttığı, 50. saatten sonra etanol üretiminin yavaşladığı görülmüştür.

Agrawal et al., (2019), yağsız pirinç kepeğini substrat olarak kullanarak farklı sürelerde *Saccharomyces cerevisiae* mayası fermantasyonu ile etanol üretimi optimizasyonu gerçekleştirmiştir. 24,48,72 ve 96 saatlerinde etanol üretim miktarları incelenmiştir. Etanol konsantrasyonları %(mL/mL) oranında 24,48,72 ve 96 saatlerinde sırasıyla %8.49, %9.03, %7.85 ve %7.76 olarak gözlenmiştir. Maksimum etanol üretimi, 48 saatlik fermantasyon sonrasında %9.03 olarak elde edilmiştir.

El-Dalatony et al., (2016), sonikasyon uygulanmış mikroalg biyokütlesi ile simültane sakrifikasyon ve fermantasyon (SSF) koşullarında gerçekleştirdikleri fermantasyon çalışmasında, 48 saat fermantasyon sonrası maksimum etanol konsantrasyonunu 9.64 g/L, etanol verimini 0.5 g/g, etanol hacimsel verimliliği 0.138 g/L/saat elde etmişlerdir. 72 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyonda etanol konsantrasyonunun 24 saat boyunca belirgin bir şekilde artmış olduğu ve 48 saatte doygunluk noktasına ulaştığı görülmüştür.

Sudhakar et al., (2021),*Ganoderma lucidum* kullanılarak elde ettikleri substratları *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile 5 gün boyunca 30 °C'de inkübe etmişlerdir. Üretim ortamındaki indirgen şeker ve etanol miktarı gaz kromatografisi ile 24 saatlik zaman diliminde analiz edilmiştir. Başlangıçta bulunan indirgen şeker miktarı 4.1 ± 0.009 g/L olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde 5. günde indirgen şekerin yaklaşık %50'si kullanılmış olduğu, 24. saate kadar üretilen etanol miktarının hızlı olarak arttığı ve 24. saatten sonra yavaşlayarak durduğu görülmüştür.

Rorke and Kana (2017), *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile sorgum yapraklarından hazırladıkları fermantasyon ortamında glikoz tüketimi ve buna bağılı olan etanol üretim kinetiğini incelemişlerdir. Fermantasyon toplam 32 saat boyunca gözlenmiştir. Bu süreçte ilk 6 saat gecikme fazı olarak değerlendirilmiş olup 32 saat boyunca glikozun hızla tükendiği görülmüştür.

Ghazanfar et al., (2022), yumuşak ağaç hidrolizati kullanılarak elde ettikleri substratları *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile fermantasyon sürecine tabi tutmuş ve etanol üretimi optimizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Maksimum teorik etanol verimi (74.27%) 65.17 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu 24 saat fermantasyon sonucunda elde edilmiştir. Toplamda 48 saat boyunca gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda ilk 24 saat boyunca etanol veriminin arttığı, 24 saat geçtikten sonra fermantasyon sonlandırılana kadar etanol veriminin azaldığı gözlenmiştir.

5. SONUÇ

Son yıllarda, fosil yakıtlara olan bağımlılık ve bunların neden olduğu çevresel sorunlar, yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırmıştır. Bu bağlamda, biyoetanol gibi biyoyakıtlar, fosil yakıtların yerini alabilecek önemli alternatifler olarak öne çıkmaktadır. Atık hurda incirlerin değerlendirilmesi, hem atık yönetimi problemlerine çözüm sunmakta hem de ekonomik değeri düşük bir biyokütleden değerli bir ürün elde edilmesini sağlamaktadır.

Bu çalışma, tüketime uygun olmayan incirlerin ekstrakt haline getirildikten sonra *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6733 mayası ile gerçekleştirilen etanol üretimini ve yapılan bu üretimi optimize etmek için önemli veriler sunmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada başlangıç olarak Plackett-Burman tasarımı ile hurda incir ekstraktının karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarına ek olarak fermantasyonu hızlandırması beklenen besin bileşenlerinin ilave edilerek etkisi incelenmiş, tasarım sonucu elde edilen deneme desenine göre eklenen ortam bileşenlerinin önemli etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bundan dolayı anlamlı etkisi bulunmayan ortam bileşenleri fermantasyon ortamından çıkarılmıştır. Ardından sırasıyla pH değeri, aşı oranı, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç substrat miktarı ve inkübasyon süresi değişkenlerinin etanol üretimine olan etkisi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucu 32°C sıcaklık %9.5 başlangıç substrat 42 saat inkübasyon süresi pH 5.5 ve %4 aşı oranının etanol üretimi için optimize koşullar olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, etanol üretimi sürecinde substrat kompozisyonunun ve fermantasyon koşullarının dikkatlice ayarlanması gerektiğini göstermektedir. Çalışmanın sonuçları, literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur ve etanol üretim süreçlerinin optimize edilmesine katkı sağlamaktadır.

Bu çalışma atık hurda incir kullanılıp herhangi bir ortam bileşeni eklemeyen etanol üretiminin optimize edildiği ilk çalışmadır. Çalışmadan elde edilen sonuçların, pilot üretim için izlenecek yola ve literatüre katkı bulunması beklenmektedir.

Sonuç olarak, atık hurda incirlerin biyoetanol üretimi için kullanılması, hem ekonomik hem de çevresel açıdan olumlu etkiler yaratacak potansiyele sahiptir. Bu tür sürdürülebilir ve yenilikçi çözümler, dünya çapında karşılaşılan enerji ve evre sorunlarına etkili yanıtlar sunmaktadır. Gelecekte, bu yöntemin daha geniş çapta uygulanması ve optimize edilmesi, yenilenebilir enerji kaynaklarının çeşitliliğini arttırarak fosil yakıtların kullanımını azaltmada önemli bir rol oynayabilmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adıgüzel, A. O.**, 2013, Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları, *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.
- Agrawal, T., Jadhav, S. K., & Quraishi, A.**, 2019, Bioethanol production from an agro-waste, deoiled rice bran by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 4780 via optimization of fermentation parameters, The International Journal by the Thai Society of Higher Education Institutes on Environment, *Environment Asia*, 12(1), 20-24.
- Akponah, E. E., & Akpomie, O.**, 2012, Optimization of bio-ethanol production from cassava effluent using *Saccharomyces cerevisiae*, *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(32), 8110-8116.
- Al Abdallah, Q., Nixon, B. T., & Fortwendel, J. R.**, 2016, The Enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol. *Frontiers in Energy Research*, 4, 225120.
- Albergaria, H., & Arneborg, N.**, 2016, Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035-2046.
- Aldigui, A. S., Alfenore, S., Cameleyre, X., Goma, G., Uribelarrea, J. L., Guillouet, S. E., & Molina-Jouve, C.**, 2004, Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(4), 217-222.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Anonymous., 2004, Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. (2004). *EFSA Journal*, 2(3), 39.

Anonymous., 2018, Kuru incir için besin öğeleri analizi ve yağ asitleri profili, Analiz Işık Tarım Ürünleri San ve Tic. A.Ş. tarafından Mérieux NutriSciences Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

Anonim., 2021, Tarım Ürünleri Piyasaları, Tarım ve Orman Bakanlığı, (<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tarim%20Urunleri%20Piyasaları/2021-Haziran%20Tarim%20Urunleri%20Raporu/İncir,%20Haziran%202021,%20Tarim%20Urunleri%20Piyasa%20Raporu,%20TEPGE.pdf>), (Erişim tarihi: 11 Temmuz 2024)

Anonim., 2022, Ege Kuru Meyve ve Mamülleri İhracatçıları Birliği 2021/2022 Sezonu Çalışma Raporu ve Faaliyet Planı, Ege İhracatçıları Birliği.

Anonymous., 2022, Culti-Loops QC Organisms, ThermoFisher Scientific, (<https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/IFUX4766.pdf>) (Erişim tarihi: 10 Temmuz 2024)

Anonymous., 2024, Ethanol Benefits and Considerations, (<https://afdc.energy.gov/fuels/ethanol-benefits>), (Erişim tarihi: 10 Temmuz 2024)

Anonymous., 2024, Ethanol (ethyl alcohol), Australian Government Department of Climate Change Energy the Environment and Water, (Erişim tarihi: 8 Haziran 2024)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anonymous.,** 2019, Production of Figs: top 10 producers , Food and Agriculture Organization of the United Nations, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>, (Erişim tarihi: 10 Temmuz 2024)
- Arı, T., & Dönmez, S.,** 1999, Melastan Etil Alkol Üretiminde Soya Ununun Alkol ve Hücre Konsantrasyonuna Etkisi, *Turkish J. Biol*, 24, 573-584.
- Ariyanti, D., & Hadiyanto, H.,** 2013, Ethanol production from whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation system: kinetics parameters estimation, *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 7(3), 179.
- Boonekamp, F. J., Dashko, S., van den Broek, M., Gehrman, T., Daran, J.-M., & Daran-Lapujade, P.,** 2018, The Genetic Makeup and Expression of the Glycolytic and Fermentative Pathways Are Highly Conserved Within the *Saccharomyces* Genus, *Frontiers in Genetics*, 9, 416284.
- Branco, R. H. R., Serafim, L. S., & Xavier, A. M. R. B.,** 2018, Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock, *Fermentation*, 5(1), 4.
- Brent, J.,** 2001, Current Management of Ethylene Glycol Poisoning, *Drugs*, 61(7), 979-988.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., & Eurwilaichitr, L.,** 2010, Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipites*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), 18-25.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cazetta, M. L., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., & Scarmino, I. S.,** 2007, Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production, *Bioresource Technology*, 98(15), 2824-2828.
- Chang, Y.-H., Chang, K.-S., Chen, C.-Y., Hsu, C.-L., Chang, T.-C., & Jang, H.-D.,** 2018, Enhancement of the Efficiency of Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* via Gradually Batch-Wise and Fed-Batch Increasing the Glucose Concentration. *Fermentation*, 4(2), 45.
- Cruz, M. L., de Resende, M. M., & Ribeiro, E. J.,** 2021, Improvement of ethanol production in fed-batch fermentation using a mixture of sugarcane juice and molasse under very high-gravity conditions, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(3), 617-625.
- Datta, D., Ghosal, R. K., Biswas, S., Mandal, E., & Das, B.,** 2024, Biofuel Production: An Ecofriendly Way to Produce Sustainable Energy. İçinde M. Shah & D. Deka (Ed.), *Emerging Sustainable Technologies for Biofuel Production* (ss. 67-99). Springer Nature Switzerland.
- Davis, L., Rogers, P., Pearce, J., & Peiris, P.,** 2006, Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass and Bioenergy*, 30(8), 809-814.
- de Albuquerque Wanderley, A. C., Soares, M. L., & Gouveia, E. R.,** 2014, Selection of inoculum size and *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of sugar cane bagasse, *African Journal of Biotechnology*, 13(27).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Devi, A., Singh, A., Bajar, S., Pant, D., & Din, Z. U.,** 2021, Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105798.
- Ebrahimi, F., Khanahmadi, M., Roodpeyma, S., & Taherzadeh, M. J.,** 2008, Ethanol production from bread residues, *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 333-337.
- Ebrahimiaqda, E., & Ogden, K. L.,** 2018, Evaluation and Modeling of Bioethanol Yield Efficiency from Sweet Sorghum Juice, *BioEnergy Research*, 11(2), 449-455.
- Ejuama, C. K., Onusiriuka, B. C., Bakare, V., Ndibe, T. O., Yakubu, M., & Ademu, E. G.,** 2021, Effect of *Saccharomyces cerevisiae* – Induced Fermentation on the Antioxidant Property of Roselle Calyx Aqueous Extract, *European Journal of Biology and Biotechnology*, 2(3), 33-38.
- El-Dalatony, M. M., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., Kim, H., Salama, E.-S., & Jeon, B.-H.,** 2016, Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technology*, 219, 98-105.
- Ghazanfar, M., Irfan, M., Nadeem, M., Shakir, H. A., Khan, M., Ahmad, I., Saeed, S., Chen, Y., & Chen, L.,** 2022, Bioethanol production optimization from KOH-pretreated *Bombax ceiba* using *Saccharomyces cerevisiae* through response surface methodology. *Fermentation*, 8(4), 148.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R.,** 2010, Hemicelluloses for fuel ethanol: a review, *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
- Godbey, W. T.,** 2022, Chapter 16 - Fermentation, beer, and biofuels, *W. T. Godbey (Ed.), Biotechnology and its Applications (Second Edition)* (ss. 369-387). Academic Press.
- Gold, N. A., Mirza, T. M., & Avva, U.,** 2024, Alcohol Sanitizer. *StatPearls Publishing.*
- Göncü B.,** 2023, Farklı Ön İşlem Uygulamalarıyla Fıstık (*Pistacia vera L.*) Kabuğu Atıklarından Biyoetanol Eldesi, *Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Hajam, T. A., & H, S.,** 2022, Phytochemistry, biological activities, industrial and traditional uses of fig (*Ficus carica*): A review, *Chemico-Biological Interactions*, 368, 110237.
- Han, W., Xu, X., Gao, Y., He, H., Chen, L., Tian, X., & Hou, P.,** 2019, Utilization of waste cake for fermentative ethanol production, *Science of The Total Environment*, 673, 378-383.
- Hasunuma, T., & Kondo, A.,** 2012, Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains, *Process Biochemistry*, 47(9), 1287-1294.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, N., Yuan, B., Sun, J., Wang, S.-A., & Li, F.-L.**, 2012, Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1359-1368.
- Ingale, S., Parnandi, V. A., & Joshi, S. J.**, 2019, Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Calcium Alginate–Magnetite Beads and Application of Response Surface Methodology to Optimize Bioethanol Yield. *Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies: From Current Status to Practical Implementation* (ss. 147-181). Springer International Publishing.
- Izmirlioglu, G., & Demirci, A.**, 2012, Ethanol production from waste potato mash by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Sciences*, 2(4), 738-753.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Marbawi, H., & Gansau, J. A.**, 2019, Response surface optimization of bioethanol production from third generation feedstock - *Eucheuma cottonii*, *Renewable Energy*, 132, 1-10.
- Kabak, B.**, 2016, Aflatoxins in hazelnuts and dried figs: Occurrence and exposure assessment, *Food Chemistry*, 211, 8-16.
- Kapusuz, D.**, 2019, Bisküvi sanayi atıklarının yakıt amaçlı biyoetanol ve biyodizel üretiminde kullanımı, *Master's thesis, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S. G., Toksoy Oner, E., & Kirdar, B.,** 2012, Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass, *Biomass and Bioenergy*, 45, 230-238.
- Kawa-Rygielska, J., Pietrzak, W., Regiec, P., & Stencel, P.,** 2013, Utilization of concentrate after membrane filtration of sugar beet thin juice for ethanol production, *Bioresource Technology*, 133, 134-141.
- Khaire, K. C., Moholkar, V. S., & Goyal, A.,** 2021, Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview, *Materials Science for Energy Technologies*, 4, 54-68.
- Kim, J. H., Lee, J. C., & Pak, D.,** 2011, Feasibility of producing ethanol from food waste, *Waste Management*, 31(9), 2121-2125.
- Koushki, M., Jafari, M., & Azizi, M.,** 2012, Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains, *Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 614-619.
- Laluce, C., Tognolli, J. O., de Oliveira, K. F., Souza, C. S., & Morais, M. R.,** 2009, Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(4), 627-637.
- Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, P.,** 2009, Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations, *Bioresource Technology*, 100(18), 4176-4182.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Soccol, C. R.,** 2012, Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis* *Biomass and Bioenergy*, 44, 80-86.
- Li, Z., Yang, Y., Liu, M., Zhang, C., Shao, J., Hou, X., Tian, J., & Cui, Q.,** 2021, A comprehensive review on phytochemistry, bioactivities, toxicity studies, and clinical studies on *Ficus carica* Linn. leaves, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111393.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H.,** 2012, Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, *Biomass and Bioenergy*, 47, 395-401.
- Lip, K. Y. F., García-Ríos, E., Costa, C. E., Guillamón, J. M., Domingues, L., Teixeira, J., & van Gulik, W. M.,** 2020, Selection and subsequent physiological characterization of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during continuous growth at sub- and- supra optimal temperatures, *Biotechnology Reports*, 26, e00462.
- Liu, Y., Han, W., Xu, X., Chen, L., Tang, J., & Hou, P.,** 2020, Ethanol production from waste pizza by enzymatic hydrolysis and fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 156, 107528.
- Ma, H., Li, H., Gang, J., & Wang, Q.,** 2019, Optimization of ethanol fermentation from fruit and vegetable waste by plackett-burman and orthogonal experimental design, *BioResources*, 14(1), 1210-1218.
- Malik, K., Salama, E.-S., Kim, T. H., & Li, X.,** 2020, Enhanced ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation post acidic and alkali chemical pretreatments of cotton stalk lignocellulose, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 147, 104869.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Matsushika, A., & Sawayama, S., 2010, Effect of Initial Cell Concentration on Ethanol Production by Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with Xylose-Fermenting Ability, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 1952-1960.

Melikoğlu, M., & Albostan, A., 2011, Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli, *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26(1).

Meral, R., & Kamberoğlu, G. S., 2012, Tahıllardan Etanol Üretimi, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2(3), 61-68.

M.K. Somda, A. Savadogo, C.A.T. Ouattara, A.S. Ouattara, & A.S. Traore., 2011, Improvement of Bioethanol Production using Amylasic Properties from *Bacillus licheniformis* and Yeasts Strains Fermentation for Biomass Valorization, *Asian Journal of Biotechnology*, 3(3), 254-261.

Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F., 2017 Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.

Netsopa, S., Kongkeitkajorn, M. B., Yuvadtkun, P., Matsuno, T., Minamino, A., Kasahara, T., Kobayashi, K., & Funada, S., 2022, Integration of cellulosic sugar syrup produced from sugarcane bagasse to molasses-based ethanol production process and improvement in spent wash quality, *Fuel*, 316, 123336.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nikolić, S., Mojović, L., Rakin, M., Pejin, D., & Nedović, V.,** 2009, Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(4), 497-503.
- Offei, F., Mensah, M., Thygesen, A., & Kemausuor, F.,** 2018, Seaweed bioethanol production: a process selection review on hydrolysis and fermentation, *Fermentation*, 4(4), 99.
- Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N., & Yanase, H.,** 2011, Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*, *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 273-277.
- Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sanchez, B., & Aguilar-Uscanga, M. G.,** 2010, Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(10),
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., & Hatziloukas, E.,** 2020, *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1-31.
- Park, J. M., Oh, B.-R., Seo, J.-W., Hong, W.-K., Yu, A., Sohn, J.-H., & Kim, C. H.,** 2013, Efficient Production of Ethanol from Empty Palm Fruit Bunch Fibers by Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(8), 1807-1814.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pattanakittivorakul, S., Lertwattanasakul, N., Yamada, M., & Limtong, S.,** 2019, Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement, *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(7), 975-990.
- Pereira, L. M. S., Milan, T. M., & Tapia-Blácido, D. R.,** 2021, Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review, *Biomass and Bioenergy*, 151, 106166.
- Phisalaphong, M., Srirattana, N., & Tanthapanichakoon, W.,** 2006, Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 28(1), 36-43.
- Promon, S. K., Kamal, W., Rahman, S. S., Hossain, M. M., & Choudhury, N.,** 2018, Bioethanol production using vegetable peels medium and the effective role of cellulolytic bacterial (*Bacillus subtilis*) pre-treatment, *F1000Research*, 7.
- Rajarajan, G., Irshad, A., Raghunath, B. V, Mahesh kumar, G., & Punnagaiarasi, A.,** 2016, Utilization of Cheese Industry Whey for Biofuel–Ethanol Production, *M. Prashanthi & R. Sundaram (Ed.), Integrated Waste Management in India: Status and Future Prospects for Environmental Sustainability (ss. 59-64)*. Springer International Publishing.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ramadan, M. F., 2023, Fig (*Ficus carica*): Production, processing, and properties.

Razmovski, R., & Vučurović, V., 2011, Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix, *Enzyme and Microbial Technology*, 48(4), 378-385.

Saggi, S. K., & Dey, P., 2019, An overview of simultaneous saccharification and fermentation of starchy and lignocellulosic biomass for bio-ethanol production, *Biofuels*, 10(3), 287-299.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K., 2012, Bioethanol production from agricultural wastes: An overview, *Renewable Energy*, 37(1), 19-27.

Sharma, S., Hashmi, M. F., & Chakraborty, R. K., 2021, StatPearls [Internet] StatPearls Publishing. Treasure Island (FL): Sep, 18.

Siddik, M., Islam, Md. T., Zaman, A., & Hasan, M., 2021, Current Status and Correlation of Fossil Fuels Consumption and Greenhouse Gas Emissions, *International Journal of Energy, Environment and Economics*, 28, 103-119.

Singh, A., & Bishnoi, N. R., 2012, Optimization of ethanol production from microwave alkali pretreated rice straw using statistical experimental designs by *Saccharomyces cerevisiae*, *Industrial Crops and Products*, 37(1), 334-341.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, A., Sharma, P., Saran, A. K., Singh, N., & Bishnoi, N. R.,** 2013, Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices, *Renewable Energy*, 50, 488-493.
- Sivamani, S., & Baskar, R.,** 2018, Process design and optimization of bioethanol production from cassava bagasse using statistical design and genetic algorithm, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 48(9), 834-841.
- Srimachai, T., Nuithitikul, K., O-thong, S., Kongjan, P., & Panpong, K.,** 2015, Optimization and Kinetic Modeling of Ethanol Production from Oil Palm Frond Juice in Batch Fermentation, *Energy Procedia*, 79, 111-118.
- Stewart, G. G.,** 2014, *Saccharomyces* | *Saccharomyces cerevisiae*, C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (ss. 309-315). Academic Press.
- Sudhakar, M. P., Ravel, M., & Perumal, K.,** 2021, Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*, *Fuel*, 306, 121680.
- 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), 829-834.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tesfaw, A., Oner, E. T., & Assefa, F.,** 2021, Optimization of ethanol production using newly isolated ethanologenic yeasts, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 25, 100886.
- Tomaszewska, M., & Białończyk, L.,** 2016, Ethanol production from whey in a bioreactor coupled with direct contact membrane distillation, *Catalysis Today*, 268, 156-163.
- Toor, M., Kumar, S. S., Malyan, S. K., Bishnoi, N. R., Mathimani, T., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A.,** 2020, An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks, *Chemosphere*, 242, 125080.
- Tropea, A., Wilson, D., La Torre, L. G., Curto, R. B. Lo, Saugman, P., Troy-Davies, P., Dugo, G., & Waldron, K. W.,** 2014, Bioethanol production from pineapple wastes, *Journal of Food Research*, 3(4), 60.
- Turhan, I., Bialka, K. L., Demirci, A., & Karhan, M.,** 2010, Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technology*, 101(14), 5290-5296.
- Uncu, O. N., & Cekmecelioglu, D.,** 2011, Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology, *Waste Management*, 31(4), 636-643.
- Ünal, M. Ü., Chowdhury, G., & Şener, A.,** 2022, Effect of temperature and nitrogen supplementation on bioethanol production from waste bread, watermelon and muskmelon by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biofuels*, 13(4), 395-399.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M.,** 2016, Chapter 11 - Phytochemical Composition of Common Fig (*Ficus carica L.*) Cultivars. *M. S. J. Simmonds & V. R. Preedy (Ed.), Nutritional Composition of Fruit Cultivars (ss. 235-255).* Academic Press.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & Aggarwal, D.,** 2004, Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(5), 1106-1122.
- Yang, Y., Ren, W., Xu, H., Cheng, L., Dapaah, M. F., He, R., & Ma, H.,** 2021, Incorporating Transcriptomic-Metabolomic analysis reveal the effect of ultrasound on ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105791.
- Yücel, Y., & Göycüncik, S.,** 2015, Optimization of ethanol production from spent tea waste by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental design, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 5(3), 247-255.
- Zhang, L., Zhao, H., Gan, M., Jin, Y., Gao, X., Chen, Q., Guan, J., & Wang, Z.,** 2011, Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales, *Bioresource Technology*, 102(6), 4573-4579.
- Zhang, Q., Wu, D., Lin, Y., Wang, X., Kong, H., & Tanaka, S.,** 2015, Substrate and Product Inhibition on Yeast Performance in Ethanol Fermentation, *Energy & Fuels*, 29(2), 1019-1027.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, sabrı ve desteği ile her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR ve yüksek lisansa başlamam için destek olan, yol gösteren, katkılarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Taner BAYSAL'a,

Işık Tarım Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.'de görevime devam ederken, tüm yüksek lisans sürecinde makine/ekipman, hammadde, bilgi desteği sağlayan, kendimi geliştirmeme imkan sağlayan, bir parçası olduğum için kendimi güçlü hissetmemi sağlayan şirketime ve Kurucusu Sn. Mehmet Ali Işık'a,

Bu süreçte küçük ya da büyük her türlü desteği sağlayan arkadaşlarıma, iş ve okul arkadaşlarıma,

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren içtenlikleriyle hep yanımda olan, aynı çalışma ortamını paylaştığım, bilmediğim konularda ve tüm stresli zamanlarımda bana destek olan ve bu süreçte çok güzel anılar biriktirmemi sağlayan değerli Işık Tarım Laboratuvar ve AR-GE ekibine,

Bugünlere gelmemi sağlayan, beni her koşulda destekleyen, her zaman arkamda duran, her türlü manevi desteği sağlayan, sevgili babam Reşat ÇAKMAK ve sevgili annem Elvan ÇAKMAK'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Son olarak Türkiye Cumhuriyeti'ni bizlere armağan eden, bu topraklarda özgürce eğitim alabilmemizi sağlayan, ilke ve devrimleriyle ülkemizi aydınlatan Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

12/09/2024

Doğa ÇAKMAK

ÖZGEÇMİŞ

Öğrenim Bilgisi:

Y. Lisans- (2021- 2024)	Ege Üniversitesi / İzmir Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans (Tezli)
Lisans- (2013 – 2018)	Celal Bayar Üniversitesi / Manisa Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Türkçe
Lise- (2009 – 2013)	Bornova Hatice Güzelcan Anadolu Lisesi

İş Tecrübesi:

Işık Tarım Ürünleri San. Tic. A.Ş. / İzmir
Pozisyon : Yardımcı Malzeme ve Yeni Ürün Takip Sorumlusu
Süre : 05.2019– Devam ediyor.

Stajlar:

Işık Tarım Ürünleri San. ve Tic. A.Ş. Ormanlı Şubesi Kdz. Ereğli /ZONGULDAK

Akpınar Gıda San. ve Tic. A.Ş. Sultandağı/AFYONKARAHİSAR

Yabancı Diller:

İngilizce (İleri Seviye), İspanyolca (Başlangıç Seviyesi)

Seminerler:

3. Uluslararası Gıda Kimyası Kongresi 2024
Poster Sunumu
“Bioethanol Production from Different Food Wastes”

Kurslar:

BRCGS Gıda Güvenliği için Küresel Standart – version 9 gerekliliklerini temel alan Gıda Güvenliği ve Kalite Yönetimi Eğitimi / Tunaboşlu Gıda ve Ambalaj Eğitim Enstitüsü (10.02.2023-11.02.2023)

Gıda Üretiminde Isıl İşlem Güvenliği ve Gereklilikleri Semineri / KVS Kaya Validasyon Sistemleri (16.12.2022)

ISO 19011:2018 İç Tetkikçi Eğitimi / KYS Destek Bilişim (20.06.2020)

ISO 27001:2013 Bilgi Güvenliği Temel Eğitimi / KYS Destek Bilişim (06.06.2020-13.06.2020)

HACCP Bilgilendirme Eğitimi / Merieux NutriSciences (18.05.2020)

IFS Food, Version 6,1 / Dose Global Technicals Services (21.12.2019)

ISO 14001:2015 Çevre Yönetim Sistemi İç Denetçi Eğitimi / Türksert Eğitim Merkezi (04.12.2019)

TS-EN ISO 14001 Çevre Yönetim Sistemi / Elginkan Vakfı (20.11.2017)

Beslenme ve Fitokimyasal Maddelerin Kansere Tedavisindeki Rolü: Klinik Öncesi ve Klinik Uygulamalar / Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik ve Tıp Fakülteleri Tarafından (18.05.2015)

EKLER

EK 1. Kullanılan Kimyasallar

EK 2. Kullanılan Malzemeler



EK 1. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge E. 1.

Kimyasal Adı	Marka	Katalog/Lot numarası
Hurda İncir	Işık Tarım A.Ş	-
Maya Ekstraktı	Merck	1.03753.0500
D(+) Glukoz Monohidrat	Merck	1.08342.1000
Pepton	Neogen	NCM0259A
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar	Merck	100466
Agar-Agar	Merck	1.01614.1000
Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄)	Merck	ART 1216
Potasyum fosfat (KH₂PO₄)	J.T. Baker	LOT: 0413810020
Magezyum sülfat (MgSO₄)	J.T. Baker	LOT: 0432110009
Etanol	Merck	1.00983.1011

EK 2. Kullanılan Cihazlar

Çizelge E. 2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Dijital Hassas Terazı	Ohaus AX4202, ABD
Biyogüvenlik kabini	Esco, Labculture, Class II BSC, ABD
Buzdolabı	Uğur USS 374 374 D2KL, Türkiye
Statik inkübatör	Binder, BD115, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Stuart UC152, İngiltere
Otoklav	Hirayama HG-80, Saitama, Japonya
pH metre	Mettler Toledo, Seven Compact Duo
Santrifüj	Hettich Universal 320 R, Tuttlingen, Almanya
Gaz Kromatografisi (GC-MS/HS)	Shimadzu GCMS-QP2010 SE