

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK-SELÜLÖLİTİK BAKTERİ
CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM
KULLANILARAK SELÜLOZ VE
SELÜLOZİK ATIKLARIN PARÇALANMASI
VE ŞEKER BİRİKİMİNİN
OPTİMİZASYONU

Özlem ÖZPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

GEBZE
2007

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TERMOFİLİK-SELÜLÖLİTİK BAKTERİ
CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM
KULLANILARAK SELÜLOZ VE SELÜLOZİK
ATIKLARIN PARÇALANMASI VE ŞEKER
BİRİKİMİNİN OPTİMİZASYONU

Özlem ÖZPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr. Melek ÖZKAN

GEBZE
2007



**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/05/2007 tarih ve 2007/19 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/06/2007 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Özlem ÖZPINAR 'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Termofilik-Selüolitik bakteri *Clostridium thermocellum* Kullanılarak Selüloz ve Selülozik Atıkların Parçalanması ve Şeker Birikiminin Optimizasyonu

YAZAR ADI: Özlem Özpınar

Bu çalışmada doğada bol miktarda bulunan ve yenilenebilir bir karbon kaynağı olan selüloz ve selüloz içerikli lignoselülozik atıkların termofilik, selüolitik ve anaerobik bir bakteri olan *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 suşu tarafından kullanımı araştırılmıştır. Kültür ortamında selüloz kullanımı sonucu biriken şekerlerin etanol üretim kapasitesi daha yüksek olan mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılabilceği düşünülerek proses sonucunda biriken glukoz miktarı takip edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında besiyeri bileşen konsantrasyonlarının ve ortam koşullarının selülozun parçalanması sonucu biriken şeker miktarına ve etanol üretimine olan etkisi incelenmiştir. Besiyerindeki fosfat, magnezyum, demir ve kalsiyum bileşenlerinin şeker birikimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. 50°C inkübasyon ısısının ve azot gazı atmosferinin şeker birikimini ve etanol üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında tarımsal kaynaklı lignoselülozik atıkların *C. thermocellum* hücreleri tarafından kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu maddeler içerisinde hemiselüloz, lignin gibi enzim hidrolizini yavaşlatıcı polimerler içerdiğinden bunları gidermek için kaynatma ve alkali uygulaması gibi ön işlemler yapıldıktan sonra besiyerine ilave edilmiştir. Arpa ve buğday sapında uygulanan alkali hidrolizi ile glukoz birikiminde sırasıyla %14 ve %10'lük bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu kısımda ayrıca kağıt fabrikası atıklarının *C. thermocellum*

tarafından parçalanması ve etanol üretimi incelenmiştir. Farklı miktarlarda kağıt atığı içeren *C. thermocellum* kültürlerinde en yüksek glukoz birikimi (5,9 g/l) 20 g/l kağıt içeren kültürde gerçekleşmiştir.

Tez çalışmasının son kısımda ise glukoz birikiminin sürekliliğini sağlayabilmek için *C. thermocellum* kültürleri yarı sürekli sistemde üretilmişlerdir. Her gün, iki günde bir ve üç günde bir 5 ml ve 10 ml hacimlerde taze besiyeri ile seyreltilen kültürlerden üç günde bir 5 ml seyreltme yapılan kültürde optimum glukoz birikimi sağlanmış ve 5,7 g/l olarak tespit edilmiştir. Kültürlerde etanol üretimi 0,3 ile 0,8 g/l arasında değişmiştir.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Cellulose and cellulosic waste degradation by thermophilic cellulolytic bacteria *Clostridium thermocellum* and optimization of glucose accumulation

AUTHOR: Özlem ÖZPINAR

In this study, the use of cellulose and renewable lignocellulosic wastes, which are found in waste amount in nature, by thermophilic, cellulolytic and anaerobic bacterium *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 strain was studied. Glucose accumulated in *C. thermocellum* culture at the end of cellulose degradation can be used as substrate for microorganisms which have higher ethanol production capacity. Because of that glucose accumulation at the end of cellulose degradation was monitored.

In the first part of the thesis, the effect of medium component concentration and environment conditions on sugar accumulation as a result of cellulose degradation and ethanol production was investigated. It was determined that phosphate, magnesium, iron and calcium components in the medium were effective on the sugar accumulation. Incubation temperature of 50°C and nitrogen gas atmosphere increased the sugar accumulation and ethanol production.

In the second part of the study, the usage of agricultural lignocellulosic wastes by *C. thermocellum* cells was examined. These lignocellulosic wastes contain some polymers like hemicellulose and lignin which slow down the enzymatic hydrolysis. In order to ease the hydrolysis some pretreatment methods like boiling and alkaline hydrolysis were performed. It was shown that glucose accumulation increased respectively % 14 and 10 with alkaline hydrolysis applied to barley and wheat. In this part of the thesis, degradation of wastes from paper pulp industry by *C.*

thermocellum was also studied. It was shown that the highest glucose accumulation (5,9 g/l) occurred in the culture which contained 20 g/l paper pulp waste .

In the last part of the study, semi-batch *C. thermocellum* cells were run for sustaining glucose accumulation. The cultures were diluted every day, every two days and every three days with 5 ml and 10 ml volumes of fresh RM containing 10 g/l cellulose. Optimum glucose accumulation was observed in the culture which was diluted with 5 ml fresh medium every three days. Amount of glucose was measured as 5,7 g/l in that culture. The ethanol concentration in the cultures varied between 0,3 to 0,8 g/l.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bana her zaman yol gűsteren ve yardımcı olan değerli danıőman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Melek ŐZKAN'a, çalıőmalarım sırasında yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Pınar KARAGŐZ, Őzlem TERZİ ve İbrahim TAN'a ve hayatımın her aőamasında desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen aileme teőekkűrű bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Lignoselülozun yapısı ve Lignoselülozik Maddeler.....	3
2.1.1. Hemiselüloz.....	3
2.1.2. Lignin	4
2.1.3. Selüloz.....	4
2.1.3.1. Selülozun Yapı ve Özellikleri	5
2.1.3.1.1. Zincirsel Yapı.....	5
2.1.3.1.2. Süpermoleküler Yapı.....	6
2.2. Selülitik Mikroorganizmalar ve Selülaz Enzim Sistemleri.....	9
2.2.1. Selülozun Parçalanmasında Selülitik Yol ve Enzimler.....	10
2.3. Selülitik Termofilik Mikroorganizmalar ve Özellikleri	16
2.3.1. <i>Clostridium thermocellum</i> 'un Genel Özellikleri.....	17
2.4. Selüloz İçeren Kaynaklar ve Kimyasal Hidroliz Yöntemleri.....	21
2.5. Lignoselülozik Atıkların Biyo-Etanol Üretiminde Kullanımı.....	27
3. MATERYAL.....	30
3.1. Deneyde Kullanılan Mikroorganizma.....	30
3.2. Kullanılan Besiyeri.....	30
3.3. Hücrelerin Ekilmesi.....	31
3.4. Maya Özütü Hazırlanması.....	31
3.5. Yarı Sürekli Kültür Ortamının Hazırlanması.....	32

3.6. Lignoselülozik Kaynakların Kimyasal Hidrolizi.....	32
3.7. Kağıt Fabrikası Atıklarının <i>C. thermocellum</i> Tarafından Kullanılması ve Etanol Üretimi.....	33
4.YÖNTEM.....	34
4.1. Toplam İndirgen Uçlu Şeker Miktarının Tespiti.....	34
4.2. Kalan Selüloz Miktarının Tespiti.....	35
4.3. Glukoz, Sellobiyoz, Etanol, Laktik Asit ve Asetik Asit Miktarının HPLC (High Pressure Liquid Cromotography) Kullanılarak Tespit Edilmesi.....	35
5.BULGULAR.....	37
5.1. Besiyeri Bileşen Konsantrasyonları ve Fiziksel Parametrelerin <i>C. thermocellum</i> Kültüründeki Glukoz Birikimi, Selüloz Kullanımı ve Fermentasyon Son Ürünlerinin Üretimine Etkisi.....	37
5.2. Modifiye Edilmiş RM Besiyerinde Toplam Şeker ve Glukoz Birikimi.....	48
5.3. Değişik Lignoselülozik Kaynakların <i>C. thermocellum</i> Tarafından Kullanımı.....	50
5.4. Yarı Sürekli <i>C. thermocellum</i> Kültüründe Glukoz Birikiminin Optimizasyonu.....	56
6. TARTIŞMA.....	60
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

dk: Dakika

Da: Dalton

kDa: Kilodalton

PD: Polimerizasyon derecesi

rpm: Dakikadaki devir sayısı

RM: Russian Medium, besiyeri

μm : Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Selüloz molekülünün kimyasal yapısı.....	7
2.2. Selülozun fibriler yapısı.....	8
2.3. Bir selüloz molekülündeki kristalin ve amorf bölgeler.....	9
2.5. Selülozun parçalanmasındaki selüloolitik enzimlerin işlevleri.....	12
2.4. Sellobiyohidrolaz (CBH) ve endoglukonaz (EG)'in sinerjistik ativitesinin şematik gösterimi.....	13
2.6. Selüloz parçalanması ve Embden Meyerhorf metabolik yolu.....	15
2.7. <i>C. thermocellum</i> hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	18
2.8. <i>C. thermocellum</i> kültüründe iki haftalık inkübasyon sonucunda kağıdın parçalanması.....	20
2.9. Lignoselülozik maddelerin şekere dönüştürülmesi için uygulanan ön işlemler ve fermentasyon ile etanol üretim prosesi.....	26
3.1. Besiyerlerinin hazırlandığı ve <i>C. thermocellum</i> hücrelerinin üretildiği anaerobik kabin.....	31
4.1. İndirgen uçlu şeker miktarının tespiti için kullanılan standart eğri.....	34
4.2. Selüloz konsantrasyonunun tespiti için kullanılan standart eğri.....	35
4.3. HPLC analizinde standart sellobiyoz, glukoz , laktik asit, asetik asit ve etanol'e ait siyal pikleri.....	36
5.1. <i>C. thermocellum</i> kültüründe zamana bağlı toplam şeker ve glukoz birikimi.....	38
5.2. Besiyeri hacminin <i>C. thermocellum</i> kültüründeki glukoz birikimine (A) ve etanol üretimine (B) etkisi.....	38
5.3. RM besiyerindeki <i>C. thermocellum</i> hücre miktarının glukoz birikimine (A) ve etanol üretimine (B) etkisi.....	39
5.4. Selüloz konsantrasyonlarının <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	40
5.5. Üre konsantrasyonunun <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	41

5.6. Fosfat konsantrasyonunun <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	42
5.7. Maya özütü konsantrasyonunun <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	43
5.8. Mineral konsantrasyonunun <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	44
5.9. Laboratuarda hazırlanan maya özütü konsantrasyonunun <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	45
5.10. Ortam sıcaklığının <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	46
5.11. Ortam atmosfer gazlarının <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	47
5.12. Ortam pH'sının <i>C. thermocellum</i> kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.....	48
5.13. Modifiye edilmiş ve orjinal RM besiyerlerinde glukoz birikimi.....	50
5.14. Değişik selüloz kaynaklarının <i>C. thermocellum</i> tarafından kullanımı sonucu biriken glukoz miktarı (A) ve etanol üretimi (B).....	51
5.15. Kaynatma ve alkali hidroliz işlemlerinden geçirilmiş tarımsal atıkların <i>C. thermocellum</i> tarafından kullanımı; glukoz birikimi ve etanol üretimi (A) Arpa sapı, (B) Buğday sapı, (C) Sazlık otu, (D) Mısır kabuğu, (E) Palmiye ağacı lifleri, (F) Barbunya kabuğu.....	53
5.16. Farklı konsantrasyonlarda kağıt fabrikası atığı içeren <i>C. thermocellum</i> kültüründe glukoz birikimi (A), etanol üretimi (B).....	55
5.17. Değişik oranlarda kağıt fabrikası atığı + ticari selüloz içeren <i>C. thermocellum</i> kültüründe glukoz birikimi (A) ve etanol üretimi (B).....	56
5.18. Kesikli <i>C. thermocellum</i> kültüründe glukoz birikimi (kontrol).....	57
5.19. Yarı sürekli sistemde besleme miktarı ve besleme periyodunun glukoz birikimine etkisi; 24 saatte bir (A), 48 saatte bir (B), 76 saatte bir (C).....	58
5.20. Yarı sürekli sistemde seyreltme miktarı ve periyodunun son ürün konsantrasyonlarına etkisi.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bazı tarımsal kaynakların ve atıkların lignoselüloz içerikleri.....	4
2.2. Çeşitli lignoselülozik bileşiklerin selüloz içerikleri.....	5
2.3. Selülaz bileşenlerinin değişik substratlar üzerine etkisi.....	12
2.4. Türkiye'nin yıllık tarımsal üretiminden çıkan atıklar.....	22
5.1.Orjinal ve modifiye edilmiş RM besiyeri bileşenlerinin Konsantrasyonları.....	48
5.2. Yarı sürekli kültürde farklı seyreltme miktarlarında proses sonunda elde edilecek kültür hacmi ve glukoz miktarı.....	60

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışına ve gelişen teknolojiye paralel olarak enerjiye olan talep sürekli artmaktadır. Bununla birlikte fosil enerji kaynak rezervlerinin sınırlı ve yakın bir gelecekte tükenerek olması günümüzde alternatif enerji kaynaklarının daha verimli bir şekilde değerlendirilmesi mecburiyetini doğurmaktadır. 1973 Dünya enerji krizi enerji kaynaklarının mevcut varlığının gelecekte tükenmek üzere olduğunu ortaya koymuş ve tüm insanlığı enerji konusuna yoğunlaştırmıştır. Dünyada birçok ülke, tükenbilir enerji kaynaklarına olan bağımlılığı azaltmak için yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarından daha fazla yararlanma yoluna gitmektedir.

Yeni ve yenilenebilir enerji kaynakları başlıca; biyokütle, güneş, hidrolik, rüzgar, jeotermal, gel git, dalga enerjisi şeklinde sınıflandırılabilir. Bu enerji kaynaklarının büyük bir kısmı dünyada yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kullanımı en yaygın olan enerji kaynaklarından birisi de biyokütlenin sahip olduğu enerjidir. Biyokütle; 100 yıllık bir zaman diliminden daha kısa sürede yenilenebilen, karada ve suda yetişen bitkiler, hayvan atıkları, besin endüstrisi ve orman yan ürünleri ile kentsel atıkları içeren tüm organik maddeler olarak tanımlanmaktadır. Biyokütle; her yerde yetiştirilebilmesi, çevre korunmasına katkısı, elektrik üretimi, kimyasal madde ve özellikle taşıt araçları için yakıt elde edilebilme özellikleri nedeni ile hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelere büyük önem taşımaktadır [Coombs, 1992]. Tarımsal bitkiler ve atıkları, endüstriyel odun ve tomruk atıkları, çiftlik hayvanı atıkları biyokütle kaynaklarıdır.

Orman ve tarım ürünü olan selülozik maddeler yeryüzünde en geniş yenilenebilir karbonhidrat kaynaklarını oluştururlar. Bu nedenle selüloz içeren ürünler ile kentsel ya da endüstriyel atıklar, kimyasal hammadde ve enerji üretimi için çok büyük bir öneme sahiptir.

Lignoselülozik biyokütle en önemli alternatif enerji kaynaklarından biridir. Lignoselülozik atıkların içeriğindeki selüloz enzimatik ve kimyasal hidrolizle parçalanarak şeker açığa çıkarılır. Bu şekerler alternatif bir enerji kaynağı olan etanolun elde edilmesi için bazı bakteri ve mayalar tarafından ham madde olarak kullanılabilir.

Dünya çapında yılda yaklaşık $1,3 \times 10^{10}$ milyon ton bitki atığı üretilmektedir [Demain et al, 2005]. Bu bitki kalıntılarının ve diğer selülozik atıkların hidrolizi ve endüstriyel biyoetanol gibi ürünlere dönüştürülmesi büyük bir ekonomik potansiyele sahiptir. Bunun yanı sıra fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltacak olması nedeniyle çevrenin korunmasında pozitif etki yaratacaktır.

Bugün biyoetanol büyük çapta şeker pancarı veya nişasta açısından zengin materyallerden üretilmektedir. Tarımsal yan ürünlerin ham madde olarak kullanılması biyoetanol üretimi için ham madde miktarını artacak ve maliyeti düşürecektir. Ancak biyoetanolün lignoselülozik ham maddelerden üretimi şeker ve nişastadan üretimine kıyasla çok daha zordur. Lignoselülozun monomerik şekerlere dönüştürülmesi birkaç proses içermektedir. Lignoselülozik materyal buharla muamele edildikten sonra enzimatik hidroliz ile ortamda bulunan selüloz molekülleri monomer şekerlere parçalanır [Ohgren et al, 2006].

Bu tez çalışmasında selüloz ve selülozik bitki kalıntılarının *C. thermocellum* tarafından parçalanması sonucu biriken şeker miktarı ve üretilen etanol miktarı ölçülmüş, farklı parametrelerin glukoz miktarı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Lignoselülozun yapısı ve Lignoselülozik Maddeler

Lignoselülozik maddeler doğada; ağaç, ot, zirai atıklar, ormancılık atıkları ve evsel katı atıkların yapısında bulunur. Eskiden yakacak odun, hayvan yemi ve inşaat malzemesi olarak kullanılan lignoselülozik maddeler artık kağıt hamuru ve kağıt ürünlerinde lif kalitesini arttırmak için kimyasal hammaddeler ve alternatif enerjiler üretmek için de kullanılmaktadır. Lignoselülozik biyokütle etanol gibi sıvı yakıtlara ve karboksil asit gibi kimyasallara dönüştürülebilir [Bothast et al, 1999; Szczodrak and Fiedurek, 1996; O'Dwyer 2005]. Yenilenebilir selüloz veya lignoselülozik materyallerin, yenilenemeyen fosil materyallerle rekabet edebilecek yakıtlara dönüştürülmesi araştırmaları yanı sıra lignoselülozik kaynaklardan farklı amaçlarla kullanılacak kimyasal hammadde üretimi üzerine de farklı araştırmalar sürdürülmektedir [Eager et al, 1983; Genç, 2002].

Bitki hücre duvarı, lignin ve hemiselüloz içine gömülmüş selüloz liflerinden oluşan bir makromoleküldür [Brett and Waldon, 1996; O'Dwyer, 2005]. Odunsu ve lifli bitkilerin yapısında bulunan lignoselülozik materyal başlıca üç polimerden oluşur; selüloz, hemiselüloz ve lignin. Bunlara ilaveten çeşitli miktarlarda nişasta, pektin, proteinler, çeşitli ekstraktlar veya reçineli materyalleri de içermektedir. Lignoselüloz kuru ağırlık olarak %35-50 selüloz, %20-35 hemiselüloz ve %10-15 lignin içermektedir [Wyman 1994; O'Dwyer, 2005]. Selüloz ve hemiselüloz ağırlık yüzdesi olarak sert tahtalı ağaçlarda yumuşak tahtalı ağaçlara ve buğday sapına göre daha fazladır. Buna karşın yumuşak tahtalı ağaçlarda lignin içeriği fazladır. Çizelge 2.1'de değişik atıklar ve bitkilerin yapısında bulunan lignoselülozik maddelerin miktarları karşılaştırılmıştır.

Hemiselüloz mikrofibriller oluşturmak üzere selüloz liflerinin etrafında sıralanan kompleks bir karbonhidrat polimerdir [Akmaz, 2001]. Ağacın kuru ağırlığının %25-30'unu hemiselüloz oluşturur. Hemiselüloz selülozdan daha düşük

moleküler ağırlığa sahip bir polimerdir. Selülozla asıl farkı hemiselülozun kısa yan dallanmaya sahip olması ve amorf yapıda şeker zincirleri içermesidir. Hemiselüloz amorf yapıdaki morfolojisinden dolayı daha kolay hidrolize olabilir ve suda çözünebilir.

Çizelge 2.1. Bazı tarımsal kaynakların ve atıkların lignoselüloz içerikleri [Howard et al, 2003].

Lignoselülozik materyaller	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Sert ağaç sapı	40-55	24-40	18-25
Yumuşak ağaç sapı	45-50	25-35	25-35
Fındık kabuğu	25-30	25-30	30-40
Mısır koçanı	45	35	15
Kağıt	85-99	0	0-15
Buğday samanı	30	50	15
Pirinç samanı	32,1	24	18
Yaprak	15-20	80-85	0
Keten tohumu	80-95	5-20	0
Gazete kağıdı	40-55	25-40	18-30
Kimyasal kağıt hamurundan gelen kağıt atığı	60-70	10-20	5-10
Ön atıksu katıları	8-15	-	24-29
Küspe	33,4	30	18,9
Domuz atığı	6	28	-
Katı sığır gübresi	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Ot	25	35,7	6,4
Çimen	45	31,4	12

2.1.1. Hemiselüloz

Hemiselüloz polimerindeki en önemli şeker molekülü ksilozdur. Çoğunlukla üç heksoz (D-glukoz, D-galaktoz ve D-mannoz) ve iki pentoz (D-ksiloz ve L-arabinoz) içerir [Holtzaple, 1993; O'Dwyer, 2005]. Hemiselüloz zinciri homopolimer (genellikle tek tip şeker molekülünün tekrar etmesi) ve heteropolimer (farklı şekerlerin karışımı) şeklinde olabilir.

Ksilanlar hemiselülozlar içinde nicelik açısından önemli bir yer tutarlar. Kara bitkilerinin ligninli dokularındaki hemiselüloz kısımlarının temel bileşenidirler. Tahıl sapları ile tohum kabuklarının kuru ağırlık olarak %20-30'u ksilandır [Aspinall, 1970; Ateş, 1990].

2.1.2. Lignin

Selüloz ve hemiselüloz farklı şeker moleküllerinden meydana gelmiş makromoleküllerdir. Lignin karmaşık yapıya sahip, polisakkarid olmayan, hidroksil ve metoksil gruplarını içeren fenilpropan birimlerinden oluşmuş üç boyutlu amorf heteropolimer yapılı ve doğada çok fazla bulunan bir polimerdir. Her ne kadar selüloz ve lignin selülozlu maddelerin asıl bileşenlerinden olsalar da bunların kimyasal özellikleri tamamen farklıdır. Lignin hücre duvarında yapısal destek, su geçirimsizliği ve mikrobiyal etkilere karşı direnç sağlar [Perez et al, 2002].

2.1.3. Selüloz

Selüloz yeryüzünde en çok bulunan organik bileşiktir. Yaklaşık olarak her yıl 100 trilyon kg selüloz oluşmaktadır [Bailey and Ollis, 1986]. Selüloz, hemiselüloz ve ligninle birlikte bitkilerin hücre duvarlarının ana bileşenidir. Çizelge 2.2'de bazı bitkiler selüloz içeriklerine göre sıralandırılmıştır.

Çizelge 2.2. Çeşitli lignoselülozik bileşiklerin selüloz içerikleri [O'Dwyer, 2005].

Lignoselülozik materyaller	Selüloz içerikleri %
Keten	95-99
Hasır	80-90
Bambu	40-50
Odun	40-50
Ağaç kabuğu	20-30

Ağaçların kuru ağırlığının %45'i selülozdur bu oran bitkinin yaşına ve büyüme durumuna göre farklılık gösterir. Bitki ve ağaçlarda hücre duvarının, baklagil tohumlarının ve meyvelerin kabuklarının büyük bir kısmını selüloz oluşturur. En basit karbonhidrat birimlerinden olan glukoz selülozun önemli ara ürünlerinden biridir [Akmaz, 2001].

2.1.3.1. Selülozun Yapı ve Özellikleri

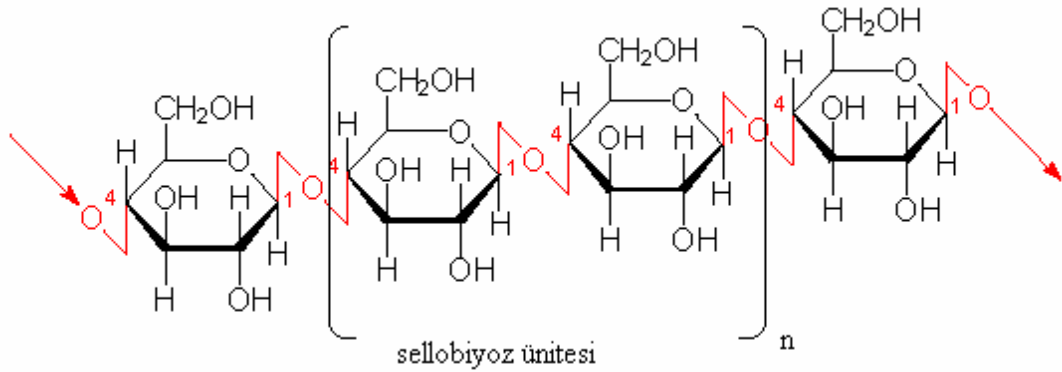
Selüloz zincirsel ve süpermoleküler olmak üzere iki yapısal düzeyde incelenebilir.

2.1.3.1.1. Zincirsel Yapı

Selüloz $(C_6H_{10}O_5)_n$, D-glukoz birimlerinin β -(1-4) glukozidik bağı ile birleşmesi sonucu oluşmuş dallanmamış doğrusal bir polimerdir. Selüloz, iki glukoz birimi içeren sellobiyozun izotaktik polimeri olarak düşünülürse sellobiyoz temel birim olarak kabul edilebilir. Her bir glukoz biriminin 2. 3. ve 6. karbonlarında primer ve sekonder alkoller için bilinen reaksiyonlara girebilecek hidroksil grupları bağlı bulunmaktadır. Bu hidroksil grupları birbirleriyle ya da O⁻, N⁻, S⁻ gruplarıyla hidrojen bağları ile ilişkilenebilirler. Ayrıca hidrojen bağları selülozun OH⁻ gruplarında ve su moleküllerinde bulunmaktadır. Bu hidroksil grupları selüloz yüzeyini hidrofobik hale getirir [Palonen, 2004]. Selüloz zincirinin her iki sonunda bulunan hidroksil grupları farklı davranışlar göstermektedirler. C1 ile sonlanmış uç indirgen özelliklere sahipken serbest hidroksil grubuna sahip glukoz birimi ile sonlanmış C4 karbonu ucu indirgen olmayan grup içermektedir [Akmaz, 2001]. Şekil 2.1'de selüloz molekülünün kimyasal yapısı gösterilmiştir.

Polimer moleküllerinde birbirlerine bağlanan monomer moleküllerinin sayısı polimerizasyon derecesi olarak adlandırılmaktadır. Monomer glukozdan polimer selüloza geçişte polimerizasyon derecesi (PD) 6'nın üzerinde olduğu zaman sudaki çözünürlük azalır [Akmaz, 2001]. PD 6'dan küçük olduğunda selodekstrinler çözünebilir. Moleküller arası güçlü hidrojen bağları ve entropik sistem etkilerinden

dolayı çözünebilirlikleri PD derecesinin artmasıyla düşer [Zhang et al, 2006]. Selülozdaki kristalinitenin nedeni hidrojen köprüleridir. Bundan dolayı selüloz molekülleri, kolay çözünmeyen, sert ve lifli bir polimer olarak bitkilerin hücre duvarlarında ideal bir yapı oluştururlar [Ateş, 1990].

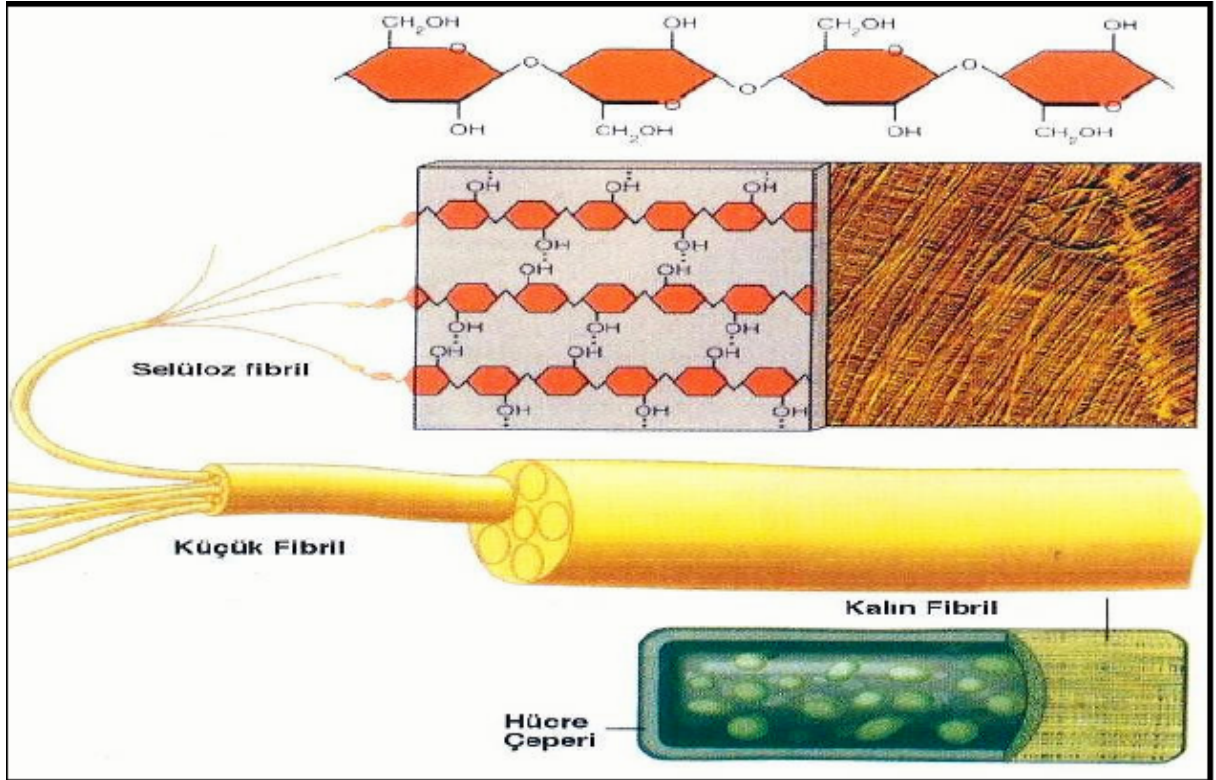


Şekil 2.1. Selüloz molekülünün kimyasal yapısı [Perez et al, 2002].

2.1.3.1.2. Süpermoleküler Yapı

Doğal kaynaklardan elde edilmiş selüloz farklı zincir uzunluklarında karışık yapı içerir. Bu zincirler arasında hidrojen bağı oluşur. Selüloz molekülleri demetler şeklinde birbirleriyle birleşmişlerdir. En küçük demet elementel fibril olup, aynı yönde uzanan 40 selüloz molekülünden meydana gelir. Elementel fibriller bir araya gelerek daha büyük demetleri, mikrofibrilleri oluşturur. Mikrofibriller fibrilleri, fibriller lamelleri oluşturur [Hafizoğlu, 1982].

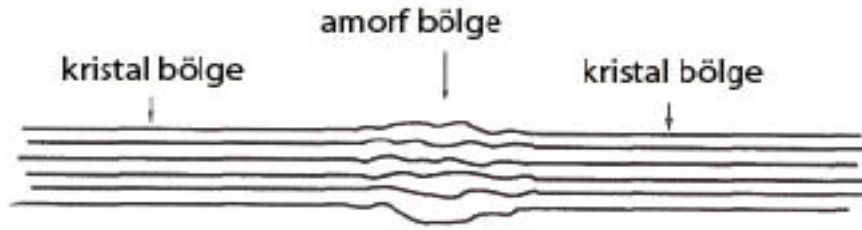
Fibriler yapı içerisinde selüloz moleküllerinin birbirine paralel olacak şekilde düzgün sıralandığı kristalin bölgeler ve moleküllerin düzensiz olarak sıralandığı amorf bölgeler bulunmaktadır [Kırcı, 2000]. Şekil 2.2’de bir selüloz molekülünün fibriler yapısı görülmektedir. Selüloz, içerisinde çok düzenli kristalin bölgelerin bulunması nedeniyle su molekülleri tarafından çok az çözünür.



Şekil 2.2. Selülozun fibriler yapısı [Kırcı, 2000].

Selüloz yapısının %85'i kristalin bölgeden oluşmaktadır. Amorf bölge olarak adlandırılan ve daha az düzenli olan bölge ise selülozun %15'ini oluşturur [Ulbrik, 1991]. Şekil 2.3'de bir selüloz molekülündeki kristalin ve amorf bölgeler görülmektedir. Selülozun kristalin yapısına hidrojen bağları sebep olur. Kristalinite selüloza suda çözünememe, gerilme kuvveti ve reaksiyonlara dirençlilik özellikleri kazandırır. Kristalin bölge selülozun enzimatik kullanımında en büyük dezavantajdır [Ryu and Mandels, 1980; Ulbrik, 1991]. Amorf bölge daha kolay hidrolize olur [Tsao, 1978; Ulbrik, 1991].

Kristal ve amorf bölgeler haricinde de değişik düzensizlikler mevcuttur ve düzensizlikler yüzey alanını genişleterek kısmen de olsa suda çözünmeyi kolaylaştırır. Saf selülozla çalışıldığında, selülozun amorf bölgesinin kristalin bölgesine kıyasla mantarlar tarafından 5-10 kat daha hızlı parçalandığı görülmüştür [Klyosov, 1990; Gama et al, 1994; Lynd et al, 2002].



Şekil 2.3. Bir selüloz molekülündeki kristalin ve amorf bölgeler [Ulbrink, 1991].

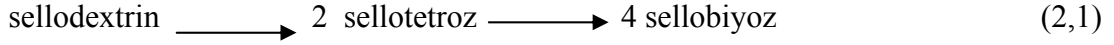
2.2. Selülitik Mikroorganizmalar ve Selülaz Enzim Sistemleri

Günümüzde endüstriyel selülaz kaynağı olarak genellikle mantarlar kullanılmaktadır. Ancak bu organizmaların enzimleri genellikle yüksek protein ürünleri ile birlikte üretilmekle beraber düşük spesifik aktivite ve istenmeyen biyokimyasal özellikler taşımaları nedeniyle, daha aktif ve dış etkilere daha az hassas selülazları üreten bakteriler üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle bazı *Clostridium* türleri [Giallo et al, 1985], rumen bakterileri [Coughan and Ljungdahl, 1988] ve *Acetovibrio cellulolyticus* [Saddler and Khan, 1981] üzerindeki çalışmalar artmıştır.

Selüloz hidrolizi küçük bir grup mikroorganizma tarafından gerçekleştirilmektedir. Selülozu hidrolize eden enzimler geniş çapta mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Bu enzimler selüloza kuvvetlice bağlanırlar ve hidroliz ederler.

Bakterilerde selülozun parçalanması aerobik veya anaerobik olarak gerçekleştirilebilir. Bu işlem sonucunda selüloz basit şekerlere dönüşür [Hungate, 1950; Bryant and Robinson, 1961; Miller and Wolin, 1974]. Selülozun parçalanmasında görev alan birden fazla enzimden oluşan yapıya selülozom adı verilir. Selülozom ilk kez *Clostridium thermocellum*'da keşfedilmiştir. *C. thermocellum*'un selülozom enzim sistemi yaklaşık 3000 kDa civarındadır.

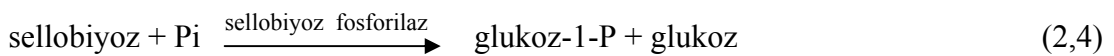
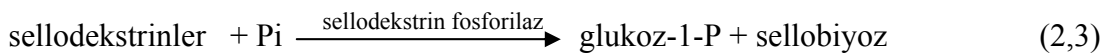
Selülozom birçok anaerobik bakteride ve mantarda bulunmaktadır [Fanutti et al, 1995; Li et al, 1997]. Selülozomun selülozu parçalaması sonucu ortaya çıkan ürün sellobiyoz'dur [Ulbrik, 1991].



Kesikli sistemde selülaz enzimi selüloza bağlı olarak ya da ortamda serbest olarak bulunabilir. Selülozom logaritmik fazdan önce hücreye yapışık olarak bulunur ve eksponansiyel faz sonunda ortamda serbest kalır, durağan fazda ise selülozu parçalamaya başlar [Demain et al, 2005]. *C. thermocellum* hücreleri selülozu ya da sellobiyozu substrat olarak kullandığında YAS (yellow affinity substance) adı verilen sarı renkte bir madde üretir. Bu sarı renk selülaz varlığının göstergesidir. YAS selüloz liflerine yapışır ve selülolitik sistemle selüloz arasında köprü görevi görür. Molekül ağırlığı 1500 Da civarında olan YAS etanol ve asetonda çözünür ve selüloza yapıştığı oksidasyon için stabil hale geçer.

2.2.1. Selülozun Parçalanmasında Selülolitik Yol ve Enzimler

C. thermocellum selülozu parçalamak için iki farklı yola sahiptir. Bunlar hidroliz ve fosforolizasyondur. Bayer ve arkadaşları (1988) *C. thermocellum*'un hidrolitik sisteminde yaklaşık 14 bileşenin olduğunu rapor etmişlerdir. Aşağıda selülozun parçalanmasında kullanılan hidrolitik ve fosforolitik yollar gösterilmiştir [Carreira et al, 1983; Ulbrik, 1991].



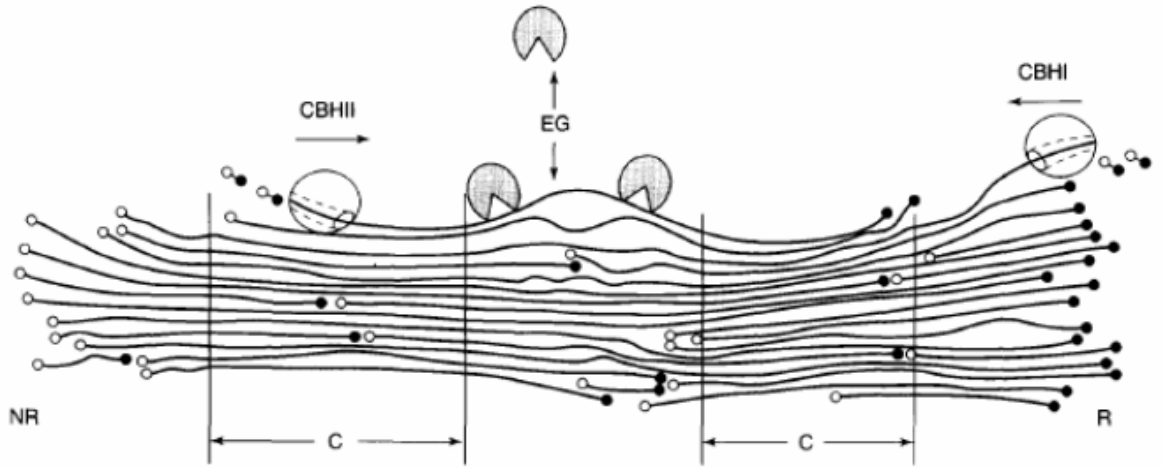
C. thermocellum'un selülozu parçalamak için kullandığı enzimler ve özellikleri aşağıda sıralanmıştır;

Endoglukanazlar: Selüloz moleküllerini, molekül boyunca rastgele yerlerden hidroliz ederler. İndirgen olmayan zincir sonları oluşturmak için β -1,4 glukozidik bağlar üzerinde aktivite gösterirler. İlk harekette bulunan bileşenin, kristalin selüloz üzerine atak yapma ve iç glikozid bağlarını rastgele bölme özelliklerine sahip endoglukanazlardan biri olduğu düşünülmektedir. Endoglukanazlar daha çok selülozun amorf kısımlarında aktiftirler. *C. thermocellum*'un en az yedi endoglukanaz enzimine sahip olduğu biyokimyasal ve genetik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Birincil hidroliz endoglukanaz ve ekzoglukanazın katı substrat yüzeyine yapışmasıyla başlar. Enzimatik depolimerizasyonda endoglukanaz ve ekzoglukanaz hız kısıtlayıcı basamaktır. İkincil hidroliz sıvı fazda birincil hidrolizden açığa çıkan sellobiyozun β -glukosidaz tarafından glukozu dönüştürülmesini içerir. Bazı β -glukosidazlar büyük sellodekstrinlerin hidrolizinde de görev alırlar [Zhang and Lynd, 2004].

Ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar): Selülaz bileşenleri arasında en az kararlılığa sahip sellobiyohidrolazdır. Bu enzim grubu selüloz lifinin sonundaki indirgen olmayan şeker zincirinden sellobiyozun kurtarılmasını katalizler. Genel olarak ilk hücum bileşeni olmasalar da sellobiyohidrolazların kristalin selüloz hidrolizi için gerekli olduğu kabul edilmektedir. Endoglukanazlarla ekzoglukanazların sinerjistik etkisinin olduğuna dair literatürde birçok çalışma mevcuttur. Şekil 2.4 bu sinerjistik etkiyi göstermektedir.

β glukosidaz (sellobiyazlar): Glukosidazlar β bağlı glukoz oligomerlerini parçalayarak sellotetroz ve sellobiyozu açığa çıkarırlar ve sellobiyozu glukozu hidrolize ederler. Glukosidazlar ile reaksiyon başlamadan önce endoglukanazlar ve sellobiyohidrolazlar selüloz yüzeyine tutunurlar [O'Dwey et al, 1982; Akmaz, 2001].

Enzimlerin biyosentezi indüksiyon mekanizması ve katabolit baskı tarafından kontrol edilmektedir. Selülaz enzimi indüklenebilen bir enzimdir; substratı ortamda mevcut ise yeterli miktarda enzim üretilir [Mandels, 1975; Ateş, 1990].

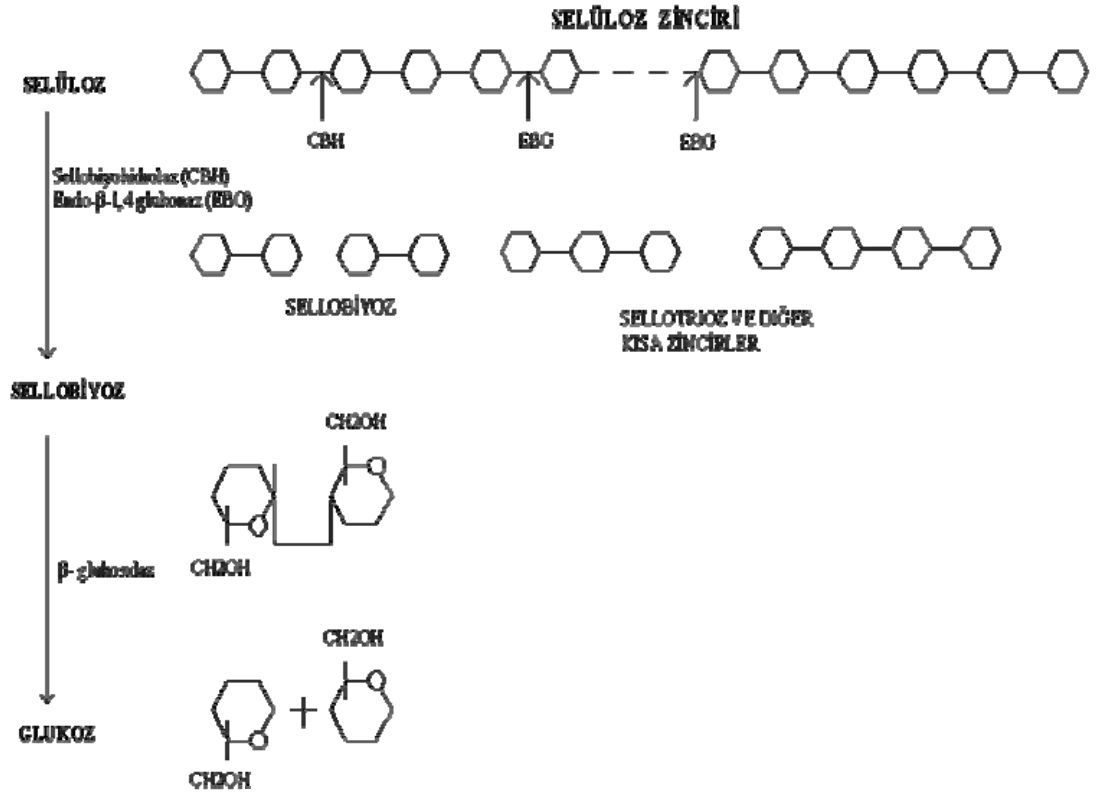


Şekil 2.4. Sellobiyohidrolaz (CBH) ve endoglukonaz (EG)'in sinerjistik ativitesinin şematik gösterimi [Teeri, 1997]: İçi boş daireler (NR) ile simgelenmiş indirgen olmayan uçları, içi dolu olan daireler (R) ile simgelenmiş indirgen uçları ve (C) ile gösterilen kısımlar kristalin bölgeyi temsil etmektedir.

Çizelge 2.3. Selülaz bileşenlerinin değişik substratlar üzerine etkisi [Wood and Campayo, 1990].

Enzimler	Substratlar				
	Kristal selüloz	Amorf selüloz	CMC (Karboksimetil selüloz)	Sello-oligosakkaritler	sellobiyoz
Sellobiyohidrolaz	Yavaş	Çok aktif	Aktif değil	Aktif	Aktif değil
Endoglukonaz	Aktif değil	Çok aktif	Çok aktif	Aktif	Aktif değil
β -Glukosidaz	Aktif değil	Aktif değil	Aktif değil	Aktif	Aktif

Çizelge 2.3'de selülaz enzim siteminde bulunan enzimlerin değişik substratlar üzerindeki aktivitesi karşılaştırılmıştır. Çizelgede adı geçen selülaz enzim sisteminin üyesi olan enzimlerin selülözün parçalanmasındaki görevleri ise Şekil 2.5'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Selülozun parçalanmasındaki selülitik enzimlerin işlevleri [O'Dweyer, 2005].

Fosforilizasyon kendi başına bir selülitik yol değildir fakat selülozun parçalanmasını hızlandırır. Sellodekstrin ve sellobiyoz gibi hidroliz ürünlerinin kullanıldığı ikinci bir yoldur. Sellodekstrin hücre içine transfer olduğunda aşağıdaki intrasellüler reaksiyon gerçekleşmektedir. Sellodekstrin fosforilazlar ilk kez Sheth ve Alexander (1969) tarafından hücre özütlerinden saflaştırılmıştır.



Sellodekstrin fosforilaz, selloheksoz (N=6) (N=Zincirdeki şeker sayısı), sellopentoz (N=5), sellotetroz (N=4), ve sellotriozu (N=3) parçalar ancak sellobiyozu (N=2) parçalayamaz. Sellobiyozun fosforilizasyonu sellobiyoz fosforilaz enzimi

tarafından gerçekleştirilmektedir. Hidrolitik yolla selüloz parçalanmasında büyük miktarda üretilen sellobiyoz sellobiyoz fosforilaz enziminin yardımıyla parçalanır [Ng and Zeikus 1986; Ulbrik, 1991].

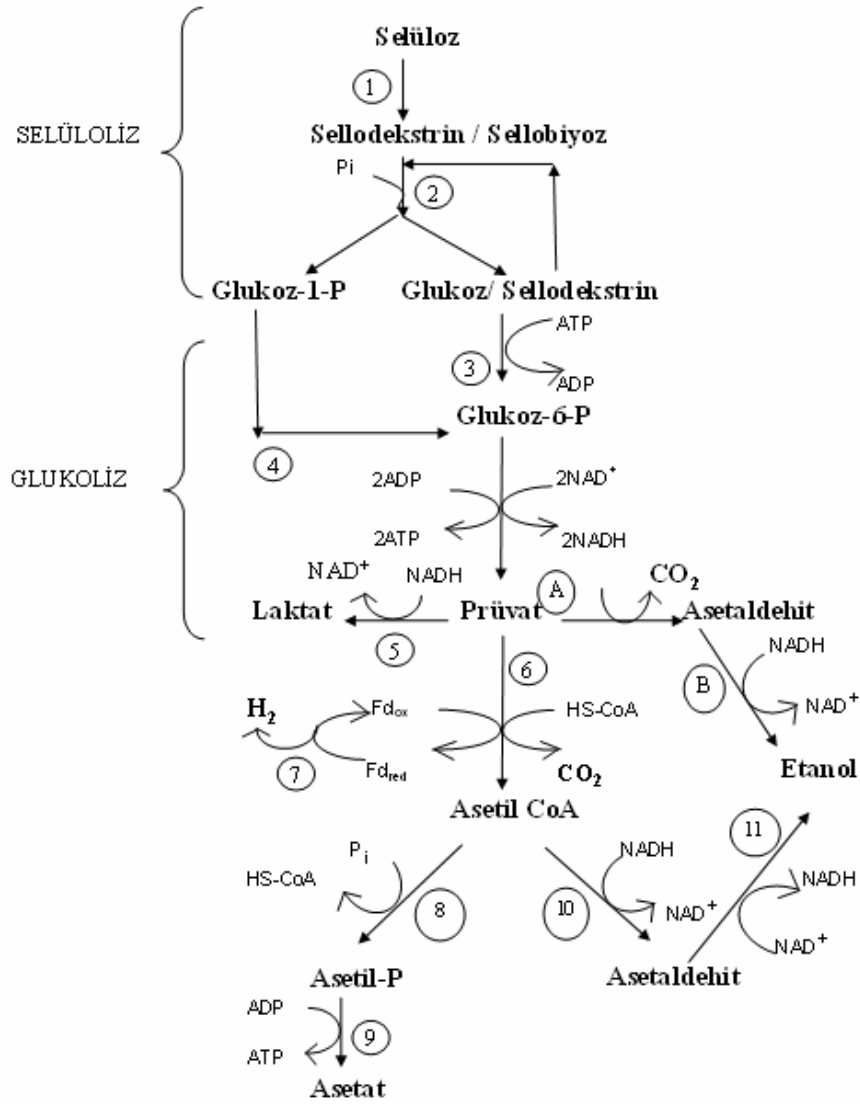


İki enzimin aktivitesi sonucu ortaya çıkan son ürünler glukoz ve glukoz-1-P'tir. Glukoz fermentasyon ortamında birikir. *C. thermocellum*'un kompleks karbonhidratların varlığında glukozu parçalayamadığı fakat glukoz-1-P'ı parçaladığı belirtilmiştir. Bu nedenle her iki yol (hidrolitik ve fosforilitik) sonucunda da oluşan glukoz *C. thermocellum* tarafından kullanılmamaktadır [Ulbrik, 1991].

Patni ve Alexander (1971) tarafından *C. thermocellum*'un fruktoz-1,6-difosfat (FDP) aldolaz ve glukokinaz içeren Embden-Meyerhorf metabolik yolu ile glukozu katabolizlediği bildirilmiştir. Şekil 2.6'da bu yol gösterilmiştir. Hücre özütlerindeki glukolitik enzimlerin varlığında glukoz prüvik asite parçalanmaktadır [Ben-Bassat, 1980; Ulbrik, 1991]. Glukoz ve glukoz-1-P selülozün ürünleridir. Embden Meyerhorf metabolik yolunun başlangıç noktası olan serbest glukoz, glukokinaz enzimi ile glukoz-6-P'ye dönüşür ve metabolik yola bağlanır. *C. thermocellum*'da fosfoglukomutaz izole edilememiştir fakat ortamda glukoz-6-P birikmesi bu enzimin varlığını ortaya koymaktadır.



Emden Meyerhof metabolik yolunda son ürünler prüvik asit ve ATP'dir. Prüvik asit laktat dehidrogenaz ile laktik asite veya prüvat dehidrogenaz tarafından asetil-CoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA ise etanol ve asetik asite dönüştürülür.



Şekil 2.6. Selüloz parçalanması ve Embden Meyerhorf metabolik yolu [Guedon et al, 2002]. 1-sellobiyaz, 2-sellodekstrin fosforilaz ve sellobiyoz fosforilaz, 3-glukokinaz, 4-fosfoglukomutaz, 5- L-Laktat dehidrogenaz (L-LDH), 6-prüvat dehidrogenaz (PFO), 7-hidrogenaz, 8-fosfotransasetilaz, 9-asetat kinaz, 10-asetaldehyt dehidrogenaz, 11-alkol dehidrogenaz (ADH), fosfat (P); ferrodoksin (Fd); oksidasyon (ox); redüksiyon (red); HS-CoA, koenzimA

2.3. Selüloolitik Termofilik Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar diğer mikroorganizmaların üreyemediği ya da çok az gelişme gösterdikleri şartlarda gelişebilirler. Mikroorganizmalar yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için çeşitli stres faktörlerine uyum sağlarlar. Birçok kimyasal ve fiziksel faktör, organizmaların gelişimini ve canlılığını kontrol eder.

Organizmanın gelişimini arttıran veya azaltan her bir faktör, aynı zamanda organizmaların biyolojik ve ekolojik gruplarını da belirlemektedir. Sıcaklık canlıların evrimi ve hayatsal faaliyetlerini kontrol eden en önemli çevresel faktörlerden biridir [Kristjansson and Hreggvidsson, 1995; Son, 1999; Skirnisdottir, 2000].

Termofilik mikroorganizmalar 50-70°C gibi yüksek sıcaklık değerleri arasında yaşayabilen organizmalardır. Bu mikroorganizmalar için optimum üreme ısı, Brock (1967) tarafından 55-60°C olarak önerilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu değerin üzerinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilen hipertermofilik mikroorganizmaların varlığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu bakteriler için optimum gelişme ısısının 80-85°C olduğu belirlenmiştir [Bilgehan 1994; Son, 1999; Skirnisdottir, 2000; Hjørleifsdottir et al, 1997].

Termofilik organizmalar gelişimleri için ihtiyaç duydukları optimum sıcaklığa göre 3 gruba ayrılırlar;

1. Optimum gelişim sıcaklığı 65-75°C olan zorunlu veya aşırı termofiller,
2. 35°C'de gelişebilen, fakat optimum gelişme sıcaklığı 50-60°C olan fakültatif termofiller
3. 30°C ve alt sıcaklıklarda gelişebilen, maksimum gelişim sıcaklığı 45-50°C olan termotolerant bakteriler.

Termofilik mikroorganizmaların ekstrem sıcaklık değerlerinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri bazı yapısal farklılıklarına bağlıdır. Bunlar; membran lipitlerinin erime noktasının mezofillere göre yüksek olması, DNA'larındaki G-C

içeriğinin dolayısıyla hidrojen bağlarının sayılarının fazlalığı, düşük su aktivitesine sahip olmaları, içerdikleri proteinlerin çok sayıda alt birimden oluşması, daha az polar aminoasit ve daha fazla sayıda yüklü aminoasit ihtiva etmeleri şeklinde sıralanabilir [Tolner et al, 1997; Haney et al, 1999; Spink and Chaires, 1999; Dülger, 2003].

Termofilik bakterilerin yayılım gösterdikleri bölgeler çok çeşitlidir. Bu mikroorganizmalara tüm jeotermal alanlarda, termal topraklarda ve çöllerde rastlanmaktadır. Jeotermal bölgelere örnek olarak nötral pH'lı kaplıcalar, kükürtçe zengin asidik kaplıcalar ve derin deniz dipleri verilebilir [Adıgüzel, 2006].

Lignoselülozik materyallerin hidrolizinden açığa çıkan şekerlerin fermentasyonunu yapabilen yeterince mikroorganizma olmaması bu materyalin kullanımını engelleyen ana faktörlerden biridir. Bazı termofilik bakteriler ve genetik araştırmalar sonucunda elde edilen bazı suşlar selülozun etanole direkt dönüşümünde önemli rol oynarlar [Jeewon, 1997]. Optimum üreme sıcaklığı 60°C olan ılımlı termofilik bakteriler etanol fermentasyonu konusunda çok sık gündeme gelirler [Camganella and Wiegel, 1993; Hogsett et al, 1992; Kurose and Tonomura, 1994; Lamed and Bayer, 1988]. Çünkü termofilik fermentasyonun birtakım avantajları vardır. Örneğin yüksek sıcaklıklarda ortamda yoğunluk ve yüzey direnci az, substrat çözünürlüğü ve reaksiyon hızı yüksek, biyoreaktör soğutması ekonomik, kontaminasyon riski düşük, oksijen çözünürlüğü az, ürünün elde edilmesi kolay, substrat ünitesine düşen ürün üretimi yüksek, ve ürün birimine düşen hücre miktarı düşüktür.

2.3.1. *Clostridium thermocellum*'un Genel Özellikleri

Clostridium thermocellum selülozu parçalayabilen anaerobik-termofilik, etanol üreten ve gram pozitif bir mikroorganizmadır. Biyokütle içerisindeki selülozu direkt olarak tek basamakta etanole dönüştürme yeteneğine sahiptir. Buna karşın düşük etanol toleransına sahip olması bu bakterinin en önemli dezavantajıdır.

C. thermocellum ilk kez Viljoen, Fred ve Peterson tarafından 1926'da at gübresinden izole edilmiştir [Viljoen et al, 1926]. Daha sonra McBee tarafından karakterize edilmiş ancak saf kültürün elde edilmesi 25 yıl almıştır [Mcbee, 1950]. *C. thermocellum* doğada yaygın bir şekilde çürümüş organik materyallerde bulunur. Bilim adamları bu suşu en çok evsel ve zirai atıklardan, atıksu çamurundan, topraktan, pamuktan, nehir çamurundan ve sıcak bölgelerden izole etmişlerdir [Ulbrink, 1991].

C. thermocellum'un selülitik enzim sistemi selülozu parçalayabilen anaerobik bakteriler ve funguslar için model teşkil etmektedir [Johnson et al, 1982]. *C. thermocellum*'un selülaz enzim sisteminin spesifik aktivitesi ticari değeri yüksek olduğu bilinen ve yaygın kullanıma sahip bir fungus olan *Trichoderma reesei*'nin selülaz enziminin seksen katıdır [Johnson, 1983].

Bu mikroorganizma tamamen anaerobiktir ve termofilik sıcaklık aralığında ürer. Hücreler genelde uca doğru incelen düz veya biraz eğri çubuk şeklinde ayrı ayrı veya çiftler halinde bulunur. Sporlar oval ve kabarık hücrelerdir. Yüzey kolonileri sulu, biraz konveks ve genellikle çözünebilir sarı pigmentler üretir [Ulbrink, 1991]. *C. thermocellum*'un mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. *C. thermocellum* hücrelerinin mikroskopik görüntüsü [Bayer and Lamed, 1988].

C. thermocellum selüloz ve eser miktarda maya özütü içeren (%0,05) minimal besiyerinde iyi üreme gösterir. Fazla miktarda maya özütü veya pepton eklenmesi büyüme desteklememektedir. Karbon kaynağı olarak selüloz, sellobiyoz, hemiselülozu kullanabilirken glukoz, fruktoz, mannoz, galaktoz, arabionoz, sukroz ve maltozu fermente edemezler [McBee, 1950]. Ancak uzun bir adaptasyon fazından sonra glukoz, fruktoz gibi şekerleri parçalayabildiği gösterilmiştir [Freier et al, 1988; Carreira et al, 1983; Ulbrik, 1991]. Nitrojen kaynağı olarak amonyum, nitrat, üre veya belirli aminoasitleri kullanabildiği gösterilmiştir. Bu mikroorganizmanın ksileni parçalayabildiği fakat sonuçta ortaya çıkan ksiloz ve ksiloz oligomerlerini kullanamadığı görülmüştür [Demain et al, 2005]. *C. thermocellum* farklı formlardaki selülozu farklı hızlarda parçalamaktadır. Saf ya da artırılmış haldeki selülozu mikrokristal halindeki işlenmiş polimerden daha hızlı parçaladığı bilinmektedir [Ulbrik, 1991].

C. thermocellum bakterisinin üremesi yavaştır. Selüloz içeren ortamda en kısa çoğalma zamanı 7 saattir. Sellobiyoz içeren ortamda ise bu süre 2,5 saate iner. Kesikli çalışmalarda durağan faza fermentasyonun on birinci gününden sonra ulaştığı gösterilmiştir [Maugeri and Goma, 1988; Ulbrik, 1991].

Selülozun parçalanması çözünebilir substrata yani selüloza hücrelerin tutunmasıyla başlar. Tutunma ortamın şartlarına bağlıdır. Kesikli sistemde glukozun ortamda birikmesi inhibe edicidir. Diğer son ürünler etanol, asetik asit, laktik asit enzimin substrata tutunmasında etkili değildirler. Açık sistemlerde selüloz parçalanması üremeye bağlantılıdır. Ortam şartları uygun değilse sporlar oluşur [Ulbrik, 1991].

Selülitik fermantasyonun asıl ürünü glukoz, sellobiyoz, laktik asit, asetik asit, formik asit, etanol, CO₂ ve H₂'dir [Freier et al, 1988; Ulbrik, 1991]. *C. thermocellum* ATCC 27405 suşunun 25 mM (1,15 g/l) etanol, 10 mM (1,12 g/l) laktat ve 7,5 mM (0,45 g/l) asetat ürettiği rapor edilmiştir [Sato et al, 1991]. Kesikli kültürde ATCC 27405 suşunun 4-16 g/l etanol varlığında %50 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir [Demain et al, 2005].

C. thermocellum'un kullanımındaki potansiyel problem sellobiyoz birikiminden kaynaklanan güçlü inhibisyondur. Bu inhibisyon β -glukosidazların eklenmesiyle ya da amorf substratların fosforik asitle muamele edilmesiyle düşürülebilir [Lee et al, 1997]. Mc Bee (1948) glukozun, besi ortamında %0,15'den fazla selüloz olduğunda ve fermentasyon yavaşladığında ya da durduğunda biriktiğini tespit etmiştir.

C. thermocellum hücreleri selüloz ve selülozik atıkları karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir, hiçbir ön işleme tabi tutulmamış kağıt atıklarını sahip olduğu selülozik enzimler sayesinde parçalayıp glukoz ve direkt olarak etanole dönüştürebilmektedir. Şekilde 2.8'de *C. thermocellum* hücrelerinin karbon kaynağı olarak kullandığı kağıdı parçalama aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.8. *C. thermocellum* kültüründe iki haftalık inkübasyon sonucunda kağıdın parçalanması.

2.4. Selüloz İçeren Kaynaklar ve Kimyasal Hidroliz Yöntemleri

Sürekli üretimi yapılan ve tüketilen bitkilerin lignoselülozik sap kısımları (mısır, arpa, buğday sapsarı gibi), kereste imalathanelerinden elde edilen talaş ve diğer kalıntılar düşünüldüğünde önemli bir biyokütle potansiyeli ortaya çıkmaktadır. En yüksek atık miktarı buğday ve arpa yetiştiriciliğinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, mısır ve pamuk yetiştiriciliğinden de önemli miktarda atık oluşmaktadır [Başçetinçelik ve ark, 2005]. Türkiye'nin sahip olduğu potansiyel düşünüldüğünde bu atıklardan faydalanılması ve yararlı ürünlere dönüştürülmesi bir zorunluluk halini almıştır. Çizelge 2.4'de Türkiye'nin tarımsal ürünlerinden açığa çıkan atık miktarları verilmiştir. Sürdürülebilir ve yenilenebilir bu doğal kaynaklardan temiz enerjiler üretilmesi çevre sağlığının da korunmasına yardımcı olacaktır.

Tarımsal atıklar üç grupta incelenebilir;

1. Yıllık ürün atıkları: Ürünlerin hasadından sonra tarlada kalan kalıntılardır. Türkiye'de temel yıllık ürünler tahıllar, mısır, pamuk, pirinç, tütün, ayçiçeği şeklinde sıralanabilir.
2. Çok yıllık ürün atıkları: Budama atıkları, kabuklar ve çekirdekler gibi kalıntılardır.
3. Tarıma dayalı endüstri atıkları: Pamuk ve çırçır atığı, zeytinyağı fabrikaları, pirinç ve mısır endüstrileri, şarap ve çekirdek fabrikaları atıkları bu gruba girmektedir.

Lignoselülozik atıkların içerdiği ligninin dirençli yapısından dolayı bakteriyel olarak parçalanması zordur bu yüzden bu atıklardan glukoz ve etanol gibi ürünler elde etmek için bir takım ön işlemlere gerek duyulmaktadır.

Lignoselülozik maddelerin parçalanması esas olarak üç adım içerir. İlk aşamada kirliliğin uzaklaştırılması ve ham maddenin boyutunun küçültülmesi için ham madde yıkanarak ve ufalanarak fiziksel olarak hazırlanır, sonra biyolojik ve ya kimyasal ön işlemlerle hemiselülozlar ve ligninin çözünebilir parçaları ayrılır. Daha

sonra selüloz basit şekerlere dönüştürülür. Şekerleştirme işlemlerinde selülozu daha verimli kullanılabilir hale getirmek için birçok ön işlem uygulanır.

Çizelge 2.4. Türkiye'nin yıllık tarımsal üretiminden çıkan atıklar [Başçetinçelik ve ark, 2005].

Tarla ürünleri	Atıklar	Üretimler (ton)	Alan (ha)	Toplam atıklar (ton) Gerçek	Kullanılabilirlik (%)
Buğday	Saman	22.439.043	9.265.785	23.433.811	15
Mısır	Sap	2.952.394	565.109	4.964.802	60
	Koçan			1.905.027	60
Arpa	Saman	7.921.456	3.549.858	8.394.564	15
Çavdar	Saman	253.243	145.907	358.221	15
Yulaf	Saman	322.830	146.020	321.938	15
Darı	Sap	7.283	3.605	0	0
Pirinç	Saman	332.142	67.161	209.534	60
	Kabuk			77.749	80
Tütün	Sap	181.320	222.515	410.487	60
Pamuk	Sap	2.474.868	687.787	2.554.418	60
	Çır çır atığı			742.463	80
Ayçiçeği	Sap	839.066	545.914	2.280.098	60
Yer fıstığı	Saman	71.594	25.167	0	0
	Kabuk			28.638	80
Soya	Saman	45.944	15.114	22.214	60

Fiziksel ön işlem metodları ıslatma, öğütme, çekme ve yayma, yüksek basınçlı buhar ve buharla ısıtmadır. Öğütme en genel fiziksel ön işlemdir. Bu işlemle hidroliz kabındaki katı derişimi artır, parçacık boyutu ve kristalinite azalır böylece enzim duyarlılığı artır [Fan et al, 1980; Ateş, 1990].

Kimyasal ön işlem metodları alkali hidroliz, asit hidrolizi, gaz artımı, oksidasyon, selüloz çözücüleri, lignin özütü çözücüleri ve kimyasal kabartıcıların kullanımı ile gerçekleştirilebilir [Kamm et al, 2006]. Biyolojik ön işlem metodları olarak lignin parçalayan mikroorganizmalar, selüloz parçalayan mikroorganizmalar

ya da her ikisinin birlikte kullanıldığı kompakt sistemler kullanılabilir [Kamm et al, 2006]. En yaygın kullanılan ön işlem metodu asit katalizli ya da katalizsiz buharla ısıtmadır [Galbe and Zacchi, 2002].

Kimyasal ön işlemler iki amaçla yapılır;

1. Selülozun kristalin yapısını değiştirmek; Lignoselülozik maddelerdeki selüloz kristalin ve amorf olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. Enzimatik hidrolizde amorf olan kısımlar kristalin kısımlara göre daha çabuk parçalanmaya uğrar. Kimyasal ön işlemler ile selülozun kristalin bölgelerinde fiberler arasında şişme gerçekleşir ve böylece amorf içeriği artar ve enzim bu bölgelere daha kolay girer, enzimatik hidroliz hızlanır.

2. Lignin karbonhidrat kompleksini açmak ve enzimatik hidrolizde fiziksel bir engel olan lignini çözünür hale getirmek; Lignin makromolekülü çok çeşitli oksitleyicilerden etkilenmektedir. Ligninin parçalanmasına göre oksitlenme tepkimelerini, ligninin aromatik karbonil ve karboksilik asit bileşiklerine parçalandığı tepkimeler ve aromatik halkanın parçalandığı tepkimeler olarak sınıflandırmak mümkündür.

Selüloz içeriği yüksek olan atıkların termofilik anaerobik selüloolitik bir bakteri olan *C. thermocellum* tarafından parçalanması için herhangi bir ön işlem gerekmemektedir. Bakterinin kültür ortamında üretmiş olduğu selülaz enzim sistemi sayesinde selülozik maddeler sellobiyoz ve glukoz moleküllerine parçalanırlar. Bu açıdan değerlendirildiğinde selülozun bakteriyel olarak parçalanması basit ve ekonomik bir işlemdir. Oluşan glukoz yine aynı bakteri ile ve ya ikinci bir proses ile etanol üretim kapasitesi yüksek bir mikroorganizma tarafından kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Ancak tarımsal bazı bitkilerin sap kısımlarının parçalanması için bazı kimyasal ön işlemlere gerek duyulmaktadır. Aşağıda bu yöntemlerle ilgili detaylı bilgiler verilmiştir.

Seyreltik Asit Hidrolizi: Selüloz parçalanmasını arttırmada, yüksek sıcaklıkta seyreltik asit kullanımı etkili bir ön işlemdir. Lignoselülozik maddelerin seyreltik asit hidrolizi (%0,2-2 sülfürik asit, 121-220°C) hemiselülozların hidrolizinden açığa çıkan monomerik şeker şuruplarının elde edilmesi, lignin ve hemiselülozun bir kısmının uzaklaştırılması gibi yararlar sağlar [Ingram et al, 1997]. Kalıntı selüloz ve lignin elektrik veya buhar üretimi için kullanılır. Açığa çıkan şeker, etanol üretimi için değerlendirilebilir.

Konsantre Asit Hidrolizi: Bu yöntem seyreltik asit hidrolizi ile şeker üretimini takip eden selülozun konsantre asit dekrizalizasyonuna dayanmaktadır. Şekerlerden asidin ayrılması, asidin geri kazanılması ve asidin yeniden konsantre hale getirilmesi yöntemin kritik noktalarıdır. Daha sonra fermantasyon işlemi ile şeker etanole dönüştürülür. Bu uygulamada lignoselülozik materyaller derişik H_2SO_4 ve HCl gibi asitlerle muamele edilirler [Galbe and Zacchi, 2002; Cheng and Sun, 2002]. Yöntemin en önemli kısmı seyreltik asit hidrolizi ile takip edilen dekrizalizasyon işlemidir. Dekrizeasyondan önce hemiselülozu ayırmak için seyreltik asit ile ön işlem yapılır. İşlemler hidroliz reaktörlerinde gerçekleştirilir.

Selüloz hidrolizinde konsantre asit kullanılmasının bir takım dezavantajları vardır. Konsantre asit korozif ve toksik olmasından dolayı borularda tahribatlara neden olur. Prosesin ekonomik olarak verimliliğinin sağlanması için hidrolizden sonra kullanılan asidin geri dönüşümü sağlanmalıdır [Sivers and Zacchi, 1995; Cheng and Sun, 2002]. Endüstriyel skalada düşünöldüğünde suyun tekrar kullanımı söz konusudur. Suyun her dönüşümlü kullanımında inhibitörlerin seviyesi yükselir bu da hidrolitik fermentasyon basamağını (selülaz enzimlerini ve mikroorganizmaları) olumsuz etkileyen faktörlerden biridir.

Alkali Hidrolizi: Lignoselülozik maddelerin lignin içeriğine bağılı olarak bazı selülozik atıklarda alkali hidroliz asit hidrolizine kıyasla daha etkili olmaktadır. Alkali hidrolizde seyreltik NaOH kullanımı ile karbonhidrat ve lignin arasındaki çapraz bağların bozulmasıyla lignoselülozik maddenin porozitesi artar, polimerizasyon derecesi düşer ve kristalinite azalır [Fan et al, 1987].

Normal sıcaklıklarda NaOH gibi alkali çözeltilerde alkali konsantrasyonu bir eşik değere ulaştığı zaman Selüloz liflerinin suda olduğundan daha fazla şiştiği, elastikleştiği ve kısaldığı bilinmektedir [Maldas et al, 1996]. Alkali ön işlemler daha çok kağıt endüstrisinde ligninin tamamını uzaklaştırmak için kullanılır. % 5 alkali ortamda 130-180°C'de ligninin depolimerizasyonu ve çözünmesi gerçekleşir. Bu işlem sırasında hemiselülozlar çözünerek uzaklaşır. Ayrıca yüksek sıcaklıkta önemli miktarda karbonhidrat sakkarinik asite dönüşür. Bu nedenle düşük sıcaklıkta uzun süreli seyreltik alkali ile ön işlem kısmi olarak lignini uzaklaştırırken hemiselülozlara etki etmediği ve istenmeyen yan ürünler vermediği için daha çok tercih edilir.

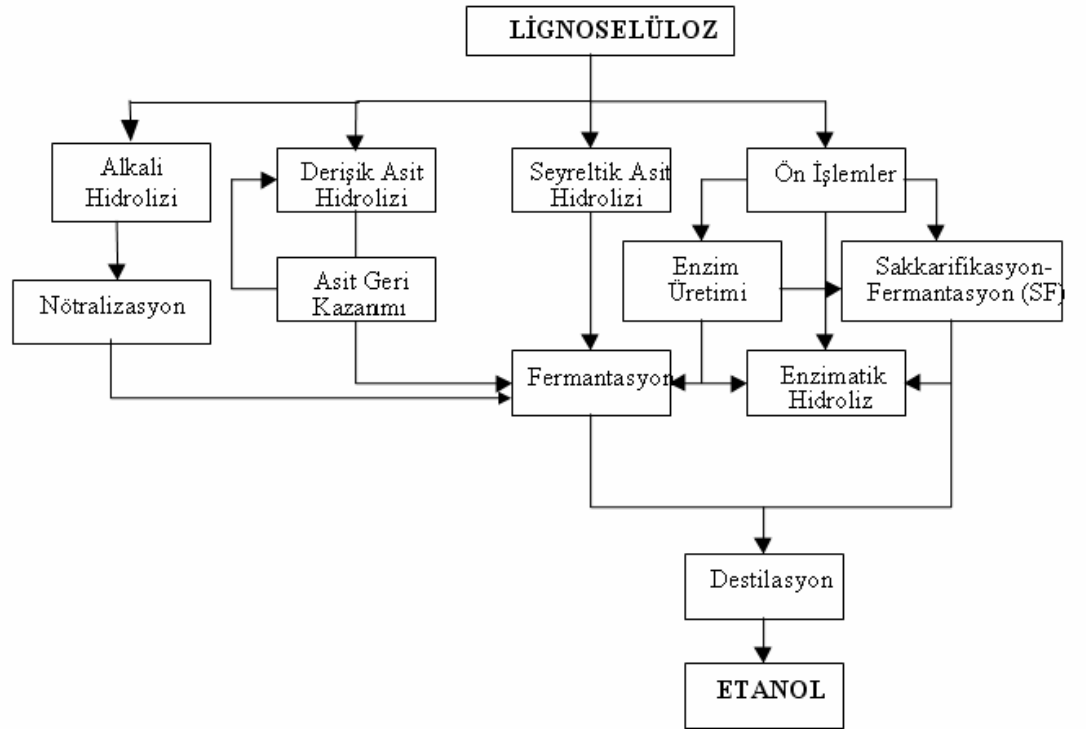
Selülozik maddenin cinsine göre ligninin % 20-65 oranında uzaklaştırılması enzimatik hidroliz açısından yeterlidir [Cowling and Kırk, 1976]. Rani ve arkadaşları (1997) pirinç samanı, sorgum ve mısır koçanı atıklarına kimyasal ön işlem olarak alkali hidroliz (%1 NaOH) uygulamışlardır.

Enzimatik Hidroliz: Lignoselülozik maddenin enzimatik hidrolizi substrat ve enzim özelliklerine, derişimlerine, sıcaklık, pH ve zaman gibi parametrelere bağlıdır. Substratın kristal yapısındaki değişiklikler; enzim etkileşimi, polimerizasyon derecesi, tepkime hızı ve adsorpsiyon üzerine etkilidir [Caston and Wilke, 1980; Ateş, 1990].

Biyokütlenin enzimatik hidrolizi için yapılan önemli bir proses modifikasyonu bir çok şeker substratının birlikte fermente olmasını sağlayan eş zamanlı şekerleştirme ve fermantasyon işleminin geliştirilmesidir. Bu işlemde selülaz ve fermente edici organizmalar birleştirilmektedir. Selülozik bakterilerin selülozu parçalamasıyla açığa çıkardıkları glukoz molekülleri mayalar tarafından fermente edilerek etanole dönüştürülür. Böylece ürünlerden kaynaklanan inhibisyon azaltılmış olur. Bu sistemin birkaç avantajı vardır; düşük enzim gereksinimi, yüksek ürün eldesi, glukoz hemen uzaklaştırıldığı için etanol üretiminde düşük sterilizasyon gereksinimi, kısa proses süresi avantajları arasında sayılabilir. Buna rağmen bu tip bir proste etanol inhibisyonu görülebilir [Cheng and Sun, 2002; Wu and Lee, 1997].

Selülozun enzim yoluyla hidrolizi, selülozun şekere yüksek miktardaki dönüşümünü sağlarken minimum seviyede yan ürün oluşur. Ilımlı şartlarda gerçekleştiği için enerji gereksinimi düşüktür. Ayrıca enzimler fermentasyon tanklarında her hangi bir korozyona neden olmazlar. Bu nedenle diğer hidroliz yöntemlerine göre enzimatik hidroliz daha avantajlıdır [Walds et al, 1984; Ateş, 1990].

Şekil 2.9'da lignoselülozik maddelerin şekere dönüştürülmesi için uygulanan ön işlemler ve fermentasyon ile etanol üretim prosesi aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Lignoselülozik maddelerin şekere dönüştürülmesi için uygulanan ön işlemler ve fermentasyon ile etanol üretim prosesi.

2.5. Lignoselülozik Atıkların Biyo-Etanol Üretiminde Kullanımı

Fosil yakıtta dayalı enerji kullanımı; fosil yakıt dışalımının büyümesi, ithalat giderinin artması gibi olumsuzluklardan başka, çevre kirlenmesinin de artmasına neden olmaktadır. Yeryüzündeki petrol kaynaklarının tükenmeye yüz tutmasıyla birlikte petrol dışında alternatif enerji kaynakları üretme çalışmalarında dünya çapında bir artış gözlenmektedir. Yaklaşık yirmi yıldır, taşıma sektöründe ihtiyaç duyulan, % 97'sini petrol kaynaklarının oluşturduğu enerjinin değişik yollardan sağlanması için yeni teknolojiler geliştirilmeye çalışılmaktadır [Mielenz, 2001]. Atık maddelerin enerjiye dönüştürülmesi için yapılan araştırmalar bu çalışmaların en güncel ve ümit verici örneğidir. Atığın enerjiye dönüştürüldüğü güvenli ve doğaya zararsız olan bu işlemde kullanılan atığın hacminin %90 oranında azaldığı saptanmıştır [VanWyk, 2001].

Etanol günümüzde birçok ülkede yakıt eklentisi veya genişleticisi olarak kullanılmaktadır. Yeniden formüle edilmiş benzin ile kıyaslandığında %95 etanolün (E95) (%95 etanol, %5 benzin karışımı) sülfür emisyonunu %60-%80 oranında azalttığı tespit edilmiştir. E95 yakıtlı arabalardan çıkan organik emisyon oranı %13-15 oranında daha düşüktür [Tyson et al, 1993].

Ingram ve arkadaşlarının 1999 yılında önerdikleri lignoselülozdan etanol üretimi işleminde, lignoselülozun asit hidrolizi ve katı sıvı ayrımı yapıldıktan sonra ortaya çıkan hemiselüloz şurubu CaOH ile işlem gördükten sonra *E. coli* tarafından fermentasyonda kullanılmıştır. Ortaya çıkan lignin ise katıdan ayrılıp fabrikada yakıt olarak kullanılmıştır. Bu arada selüloz ticari selülaz enzimi kullanılarak hidrolize edilmiş ve ortaya çıkan glukoz *S. cerevisiae* tarafından etanole dönüştürülmüştür. Ancak selülaz enziminin pahalı olmasından dolayı etanol üretimi için *S. cerevisiae* yerine daha az miktarda selülaz enzimi gerektirmesi nedeniyle selülozun parçalanması sonucu ortaya çıkan sellobiyoz ve selotriozları kullanabilen etanol üreticisi rekombinant *Klebsiella oxytoca* P2 kullanılmıştır [Zaldivar et al, 2001]. Bu proses literatürde SHF (Seperate Hidrolysis and Fermentation) ayrı hidroliz ve

fermentasyon olarak bilinen proseslerin örneklerinden biridir [Zaldivar et al, 2001]. SHF farklı mikroorganizmalar kullanılarak ve farklı ürünlerin üretimi amacıyla da kullanılmaktadır. Örneğin buğdayın *Aspergillus awamori*'nin ürettiği enzimlerle parçalanması sonucunda glukoz açısından ve bu mantarın hidrolizi nedeniyle diğer mikro besin kaynaklarınca zengin bir fermentasyon solüsyonu ortaya çıkar. Bu solüsyon biyoetanol, organik asit, gliserol, çözücüler, biyolojik olarak parçalanabilen plastikler ve aminoasitlerin mikrobiyal yollarla üretimlerinde besiyeri olarak kullanılabilir [Kountinas et al, 2004].

Bakteriyel direkt dönüştürme prosesi etanol üretim maliyetini düşürmenin ümit verici bir yoludur. Etkili bir direkt dönüşüm prosesi için tek ya da iki organizmanın birleşimiyle oluşan mikrobiyal sistemin aşağıdaki özelliklere sahip olması gerekir: 1. Yüksek miktarda aktif selüloz ve hemiselüloz enzim sistemi sentezlemesi 2. Selüloz ve hemiselülozdan şeker fermentasyonu yapabilmesi 3. İstenen ürünü istenmeyen diğer yan ürünlerden daha fazla miktarda üretebilmesi ve bu ürünün saf olarak ayrıştırılabilmesi. Yukarıda belirtilen tüm özelliklere sahip bir mikroorganizma henüz mevcut değildir.

Biyoetanol üretim maliyetinin geniş bir kısmını oluşturan besiyeri maliyetinin minimum seviyeye çekilmesi için lignoselüloz gibi yenilenebilir ve ucuz karbon kaynaklarının kullanılması gerekmektedir. Termofilik, anaerobik bir bakteri olan *C. thermocellum*' un selülitik enzim sistemi selülozu parçalayabilen anaerobik bakteriler ve funguslar için model teşkil etmektedir. Ancak selülozu parçalaması sonucunda ürettiği etanol miktarı genellikle çok düşüktür.

Bu tez çalışmasında biyoetanol üretiminde kullanılabilecek glukozun elde edilmesi amacıyla termofilik selülitik bir bakteri olan *C. thermocellum*'un selülozu parçalama kapasitesinden faydalanılmıştır. İlk olarak selülozun *C. thermocellum* tarafından parçalanması sonucu ortamda biriken glukoz miktarını arttırmak amacıyla şeker birikimini etkileyen faktörler araştırılmıştır. Çalışma sırasında uygulanan işlemlerin mikroorganizmanın etanol ve diğer fermentasyon son ürünlerinin üretimine etkisi de takip edilmiştir. Ayrıca lignoselülozik atıkların alkali hidrolizi ve *C. thermocellum* tarafından parçalanması sonucu ortamda biriken glukoz miktarları

tespit edilmiştir. Tez çalışmasının son bölümünde *C. thermocellum*'un selülozu parçalamasıyla ortaya çıkan glukoz miktarının yükseltilmesi ve üretimin sürekliliğinin sağlanması amacıyla yarı sürekli sistem çalışmaları yapılmış, yüksek miktarda glukoz elde edilebilmesi için gerekli olan reaktör besleme zaman aralıkları ve eklenecek substrat miktarı tespit edilmiştir.

3. MATERYAL

3.1. Deneyde Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışmada Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection) temin edilmiş olan *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 suşu kullanılmıştır. *C. thermocellum* kısa süreli saklamalar için bölüm 3.2'de içeriği verilmiş olan RM sıvı besiyerine periyodik olarak ekilmiştir. Uzun süre muhafaza için logaritmik faza kadar üretilen hücreler % 20 gliserol içeren RM besiyerinde -20 °C de saklanmışlardır.

3.2. Kullanılan Besiyeri

Bakterilerin üretilmesi için RM (Russian Medium) besiyeri kullanılmıştır [Tsoi et al, 1987]. RM besiyeri 10 g/l karbon kaynağı (selüloz veya selüloz içeren atık maddeler), 2 g/l üre, 2 g/l KH₂PO₄, 3 g/l K₂HPO₄, 5 g/l maya özütü, 0,2 g/l MgCl₂.6H₂O, 0,05 g/l CaCl₂.2H₂O, 0,0025 g/l FeSO₄.7H₂O ve 1 g/l L-Sistin amino asiti içermektedir. Besiyeri 100 ml'lik septum şişelerinde karbon kaynağı (C), üre (RM I), tampon (RM II), maya özütü (RM III) ve metaller ve sistin (RM IV) olmak üzere beş ayrı bileşen şeklinde hazırlanıp anaerobik kabinde 15 dakika bekletilerek oksijenden arındırılmışlardır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilen besiyerleri hücrelerin üretilmesi için kullanılmıştır. Besiyerinin oksijenden arındırıldığıının anlaşılması için RM II bileşenine 2 ml resazurin (1 g/l) indikatörü eklenmiştir. Anaerobik ortam sağlanması için kullanılan kabin Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Kabin atmosferi deneylerin amacına göre karışım gazı (% 10 CO₂+% 5 H₂+% 85 azot gazı) veya yalnızca azot gazı içermektedir.



Şekil 3.1. Besiyerlerinin hazırlandığı ve *C. thermocellum* hücrelerinin üretildiği anaerobik kabin.

3.3. Hücrelerin Ekilmesi

Deneye başlanmadan önce hücreler üç gün boyunca RM besiyerinde 55°C’de karışım gazı içeren anaerobik kabinde üretilmişlerdir. Tüm deneyler aynı şartlarda hazırlanıp üretilmiş taze kültürden ekim yapılarak başlatılmıştır. Ekim yapmak için steril enjektörler kullanılmış, 50 ml RM besiyeri içeren 100 ml’lik lastik kapaklı septum şişelerine 5 ml kültür ekilmiştir. Tüm deneylerde başlangıç kültürü (aşı) miktarı toplam kültür hacminin 1/11’i olacak şekilde ayarlanmıştır

3.4. Maya Özütü Hazırlanması

Laboratuarda maya özütü hazırlamak için RM besiyerinde büyütlen *S. cerevisiae* hücreleri 6500 rpm’de 5 dk çöktürülmüştür. Dipte kalan hücreler saf su ile iki kez yıkandıktan sonra etüvde kurutularak maya özütü elde edilmiştir.

3.5. Yarı Sürekli Kültür Ortamının Hazırlanması

Yarı sürekli sistem deneyleri 50 ml RM besiyeri içeren 100 ml'lik septum şişelerinde gerçekleştirilmiştir. RM besiyeri karbon kaynağı olarak 10 g/l selüloz içermektedir. *C. thermocellum* hücreleri ekilerek oluşturulan kültürler anaerobik kabin içinde bulunan inkübatör içerisinde 55°C'de üretilmişlerdir. Kültürler on gün herhangi bir besin eklemesi yapılmadan üretilmişler, onuncu gün sonunda proses farklı periyotlarda ve farklı miktarlarda beslemeler yapılarak yarı sürekli hale getirilmiştir. Üç farklı besleme periyodu ve iki farklı besiyeri miktarı ile toplam altı farklı yarı sürekli kültür oluşturulmuştur. Buna göre kültürlerden her gün, iki günde bir ve üç günde bir 5 ml veya 10 ml kültür dışarı alınarak yerine aynı miktarlarda 10 g/l selüloz içeren RM besiyeri eklenmiştir. Alınan örneklerdeki glukoz ve etanol miktarları HPLC cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

3.6. Lignoselülozik Kaynakların Kimyasal Hidrolizi

Lignoselülozik atıkların *C. thermocellum* tarafından parçalanması ve glukoz birikiminin saptanması amacıyla arpa sapı, buğday sapı, mısır kabuğu, sazlık otu, palmye ağacı lifi ve barbunya kabuğu RM besiyerine miktarları 10 g/l olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol kültürlerinde kullanılan karbon kaynakları herhangi bir ön işleme tabi tutulmamışlardır. Diğer kültürlerde ise eklenecek olan atıklar küçük parçalara ayrıldıktan sonra yarım saat süresince saf su içinde kaynatılmışlar ve besiyerine eklenmişlerdir. Etkisi incelenecek ikinci koşul olan alkali hidroliz yöntemi için atıklar küçük parçalara ayrıldıktan sonra saf suda 30 dakika kaynatılmışlardır. Daha sonra üzerlerine %1'lik NaOH çözeltisinden 5 ml eklenerek otoklavlanmışlardır. Otoklavdan sonra nötralizasyon için üzerlerine %1'lik H₂SO₄ çözeltisi damlatılarak pH 7,0'ye ayarlanmıştır. Kalıntılar saf su ile üç kez yıkandıktan sonra çöktürülmüş ve çökelek kısımlar 60°C etüvde iki gün kurutulduktan sonra besiyerine ilave edilmişlerdir [Rani et al, 1997].

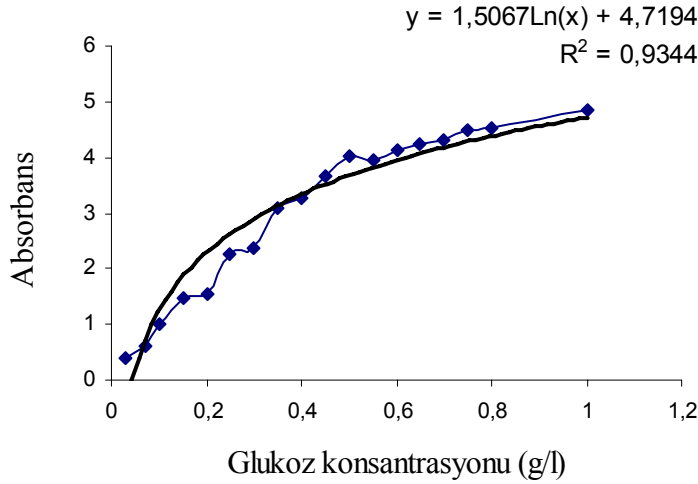
3.7. Kağıt Fabrikası Atıklarının *C. thermocellum* Tarafından Kullanılması ve Etanol Üretimi

TOPRAK KAĞIT fabrikasından (Bilecik, Türkiye) alınan sıvı ve katı atık örneklerinde bulunan selülozun *C. thermocellum* tarafından kullanımı ve etanol üretiminin belirlenmesi amacıyla alınan örneklerdeki selüloz miktarı fenol sülfürik asit metodu ile tespit edilmiştir. Bu yöntem ile kağıt atığı çözeltilsinin selüloz içeriği 0,17 g/ml olarak hesaplanmıştır. Kağıt atığı çözeltilsinden selüloz miktarları 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150 g/l olacak şekilde alınarak besiyerlerine eklenmiş, *C. thermocellum* hücreleri ile ekim yapıldıktan sonra fermentasyon sonunda biriken glukoz miktarı ve etanol üretimi tespit edilmiştir. Bazı kültürlerde kağıt atıkları selüloz ile 1/4, 1/2, 3/4 ve 1/1 oranında karıştırılarak karbon kaynağı miktarı toplam 10 g/l olacak şekilde besiyerine eklenmiştir.

4. YÖNTEM

4.1. Toplam İndirgen Uçlu Şeker Miktarının Tespiti

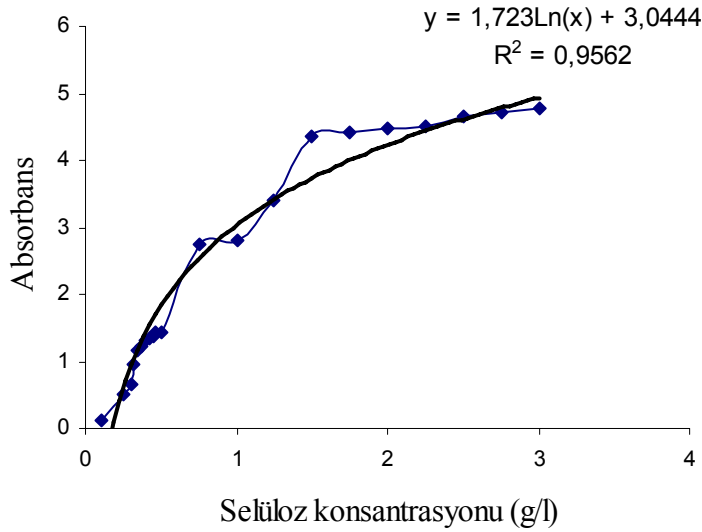
Toplam şeker miktarını tespit etmek amacıyla ‘fenol-sülfürik asit’ metodu [Dubois et al, 1956] modifiye edilerek kullanılmıştır. Standart eğri oluşturmak için; 0,03-1 g/l aralığında glukoz konsantrasyonuna sahip stok çözeltiler hazırlanmıştır. Bu standartlardan 500 µl alınarak üzerine 500 µl %5 fenol çözeltisi ve 2,5 ml derişik H₂SO₄ eklenip 30°C’de 15 dk su banyosunda bekletilmiştir. Oluşan renk UV-VIS Spektrofotometre (GBC-Cintra-20) kullanılarak 490 nm dalga boyunda okunmuştur. Şekil 4.1 indirgen uçlu şeker miktarının tayininde kullanılan standart eğri ve denklemini göstermektedir. Numunelerdeki toplam şeker miktarını tespit etmek için alınan 1 ml örnek 6500 rpm’de 5 dk çöktürülmüş ve üst sıvı alınarak fenol sülfürik asit metodu uygulanmıştır.



Şekil 4.1. İndirgen uçlu şeker miktarının tespiti için kullanılan standart eğri.

4.2. Kalan Selüloz Miktarının Tespiti

Kalan selüloz miktarını belirlemek için bir önceki bölümde anlatılmış olan ‘fenol-sülfürik asit’ metodu kullanılmıştır. Standart eğri oluşturmak için; 0,1- 3 g/l aralığında selüloz içeren standartlar hazırlanmıştır. Numunelerdeki kalan selüloz miktarını tespit etmek için 1ml numune 6500 rpm’de 5 dk çöktürülmüş ve dipte kalan çökelti kısmına fenol sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Selüloz miktarının belirlenmesi için kullanılan standart eğri ve denklemi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

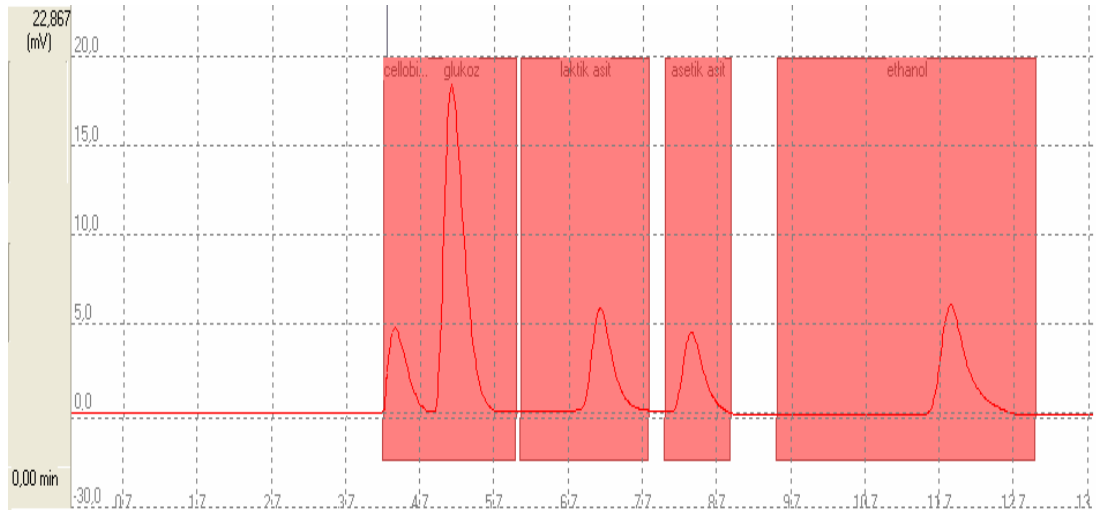


Şekil 4.2. Selüloz konsantrasyonunun tespiti için kullanılan standart eğri.

4.3. Glukoz, Sellobiyoz, Etanol, Laktik Asit ve Asetik Asit Miktarının HPLC (High Pressure Liquid Cromotography) kullanılarak Tespit Edilmesi

Kültür ortamında biriken glukoz ve sellobiyoz ayrıca oluşan fermentasyon son ürünlerinin (etanol, laktik asit ve asetik asit) miktarları HPLC (Essence system, Lab Alliance) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. HPLC cihazına numune verilmeden

önce 1 ml numune 0.45 µm gözenek genişliğine sahip filtreden süzölmüştür. Süzölen numune 45°C’de çalışan kolon fırını içine yerleştirilmiş polymer IEXH form 8 µm şeker kolonu ve 45°C’de çalışan refraktif indeks dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz olarak 9 mM sülfürik asit çözeltilisi kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlanmıştır. şekil 4.3’de HPLC analizlerine ait sellobiyoz, glukoz, laktik asit, asetik asit ve etanol standartlarına ait sinyal pikleri gösterilmiştir.



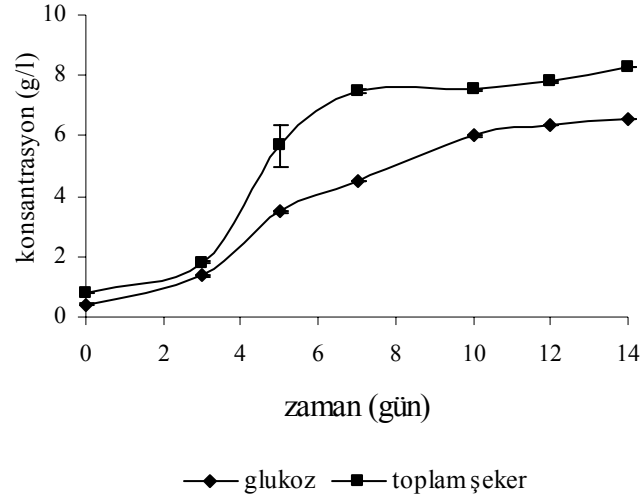
şekil 4.3. HPLC analizinde standart sellobiyoz, glukoz, laktik asit, asetik asit ve etanol’e ait sinyal pikleri.

5. BULGULAR

5.1. Besiyeri Bileşen Konsantrasyonları ve Fiziksel Parametrelerin *C. thermocellum* Kültüründeki Glukoz Birikimi, Selüloz Kullanımı ve Fermentasyon Son Ürünlerinin Üretimine Etkisi

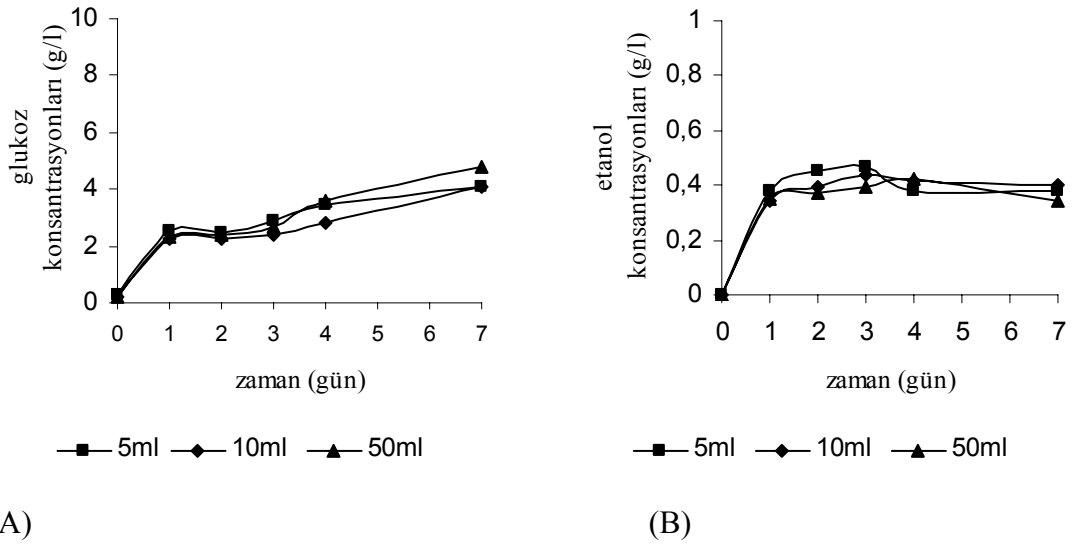
Tez çalışmasının bu bölümünde *C. thermocellum* 27405 kültüründe selüloz kullanımı, glukoz ve toplam şeker birikimi, etanol ve diğer fermentasyon son ürünlerinin üretimi değişik kültürel koşullarda incelenmiştir. Test edilen parametreler ve sınırları şöyledir; inokulum (aşı) miktarı (kültür hacminin 1/11, 1/6, 3/13 ve 2/7'si olacak şekilde), besiyeri hacmi (5, 10, 50 ml), besiyeri bileşenlerinin değişik konsantrasyonları: selüloz (5-30), üre (0-20 g/l), fosfat (0-200 mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0-1 g/l), $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ (0-0,25 g/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0-0,5 g/l), maya özütü (1-10 g/l), laboratuvar koşullarında hazırlanan maya özütü konsantrasyonları (1-10 g/l), pH (4,5-11), sıcaklık (50°C, 55°C ve 60°C) ve atmosfer gazları (argon, azot ve karışım gazı)

Öncelikle 10 g/l selüloz içeren RM besiyerinde *C. thermocellum* hücrelerinin selüloz aktivitesi sonucu ortamda biriken glukoz ve toplam şeker (indirgen uçlu şeker) iki hafta boyunca izlenmiştir. Fermentasyonun üç ve yedinci günleri arasında toplam şeker miktarı logaritmik bir artış göstererek 7,9 g/l'ye ulaşmış ve daha sonra kayda değer bir artış göstermemiştir (Şekil 5.1). Glukoz konsantrasyonu ise fermentasyonun onuncu gününe kadar artış göstermiştir. Toplam şeker ve glukoz miktarları fermentasyonun ikinci haftası sonunda sırasıyla 8,3 ve 6,5 g/l'ye ulaşmıştır.



Şekil 5.1. *C. thermocellum* kültüründe zamana bağlı toplam şeker ve glukoz birikimi.

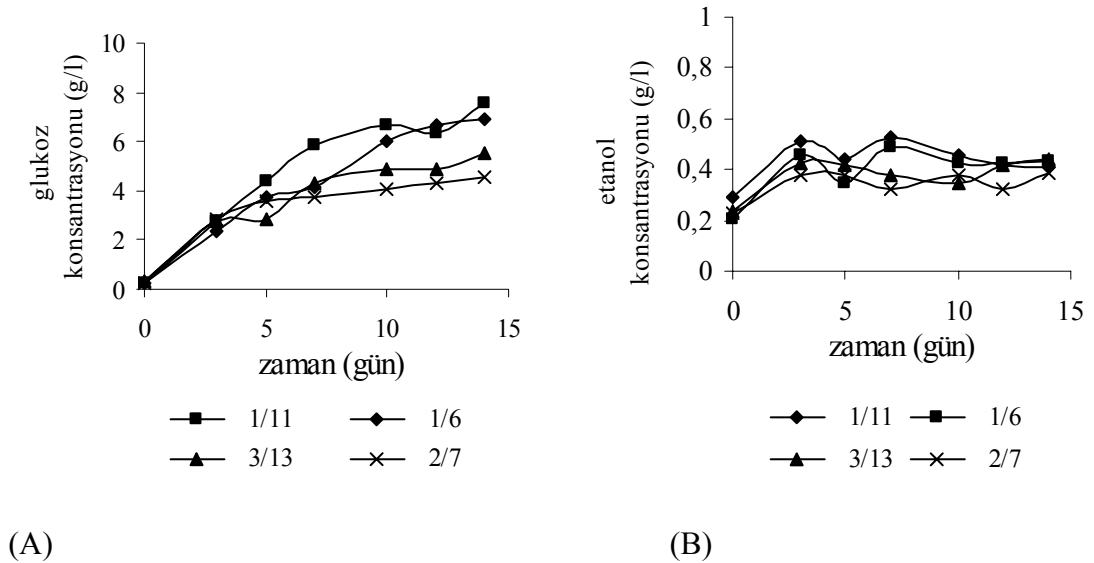
Besiyeri hacminin glukoz birikimi ve etanol üretimine olan etkisini incelemek için 5, 10 ve 50 ml'lik RM besiyerleri hazırlanarak *C. thermocellum* hücreleri ekilmiş, glukoz ve etanol miktarındaki artış bir hafta boyunca izlenmiştir.



Şekil 5.2. Besiyeri hacminin *C. thermocellum* kültüründeki glukoz birikimine (A) ve etanol üretimine (B) etkisi.

Besiyeri hacminin değiştirilmesi glukoz birikiminde önemli bir artışa neden olmamıştır. Bir hafta sonunda en yüksek glukoz miktarı 50 ml hacimdeki besiyerinde 4,8 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.2. A) . Etanol üretimi ise 5 ml’lik kültürde diğer hacimlere kıyasla biraz daha yüksektir. 50 ml’lik kültürde etanol miktarı ikinci gün sonunda 0,4 g/l iken 5 ml’lik kültürde 0,5 g/l olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.2. B).

Glukoz birikimi ve etanol üretimini arttırmak için 50 ml RM besiyerine ekilecek optimum hücre miktarını belirlemek amacıyla *C. thermocellum* aşu kültüründen kültür hacminin 1/11, 1/6, 3/13, 2/7’si olacak şekilde ekim yapılmıştır. Aşu kültürü hacminin glukoz birikimine ve etanol üretimine etkisi Şekil 5.3 A ve B’de görülmektedir.



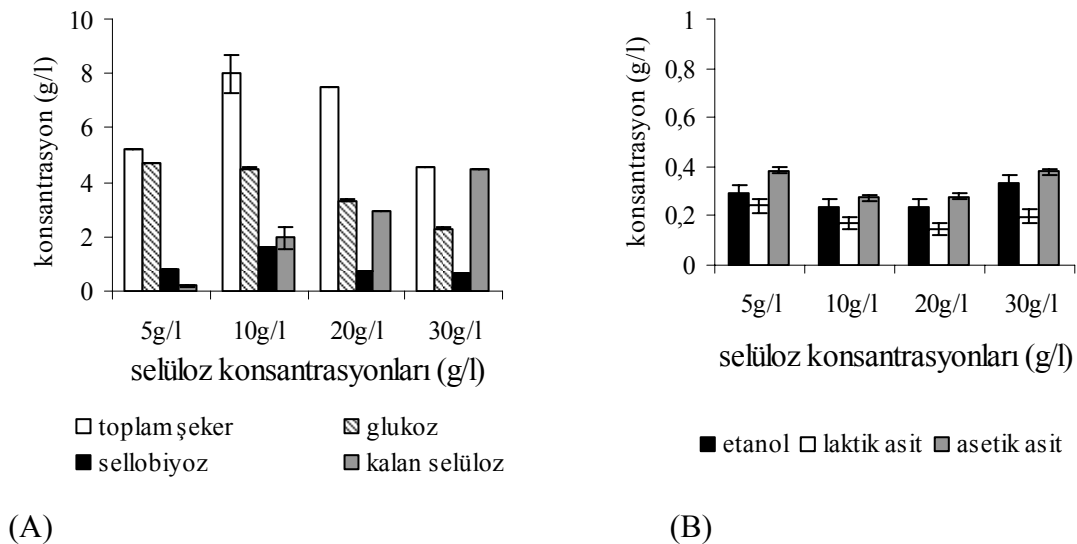
Şekil 5.3. RM besiyerindeki *C. thermocellum* hücre miktarının glukoz birikimine (A) ve etanol üretimine (B) etkisi.

Besiyerine ekilen hücre kültürü miktarının glukoz birikimi için önemli olduğu görülmüştür. En yüksek glukoz birikimi aşu kültürü miktarı besiyerinin 1/11’i iken elde edilmiştir ve 7,6 g/l olarak ölçülmüştür. Besiyerine fazla hücre ekilmesi ortamda biriken glukozun miktarında düşüşe neden olmuştur (Şekil 5.3. A).

Aşı kültürü miktarı kültür hacminin 1/11'i olduğunda etanol üretimi diğer kültürlerdeki üretime kıyasla daha yüksektir (Şekil 5.3. B). Bu kültürde etanol miktarı fermentasyonun üçüncü gününde 0,5 g/l'ye ulaşmıştır.

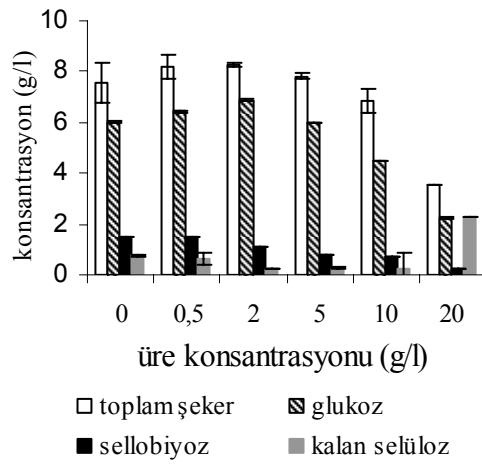
C. thermocellum tarafından karbon kaynağı olarak kullanılan ticari selülozun optimum miktarını tespit etmek için 5, 10 (kontrol), 20, 30 g/l selüloz konsantrasyonlarına sahip besiyerleri hazırlanmış ve *C. thermocellum* hücreleri 1/11 olacak şekilde besiyerlerine ekilmiştir. Hücreler iki hafta boyunca 55°C'de anaerobik kabinde üretilmişlerdir. Şekil 5.4. A' da iki hafta sonunda kültür ortamında biriken toplam şeker, glukoz, sellobiyoz ve kalan selüloz miktarı gösterilmektedir. Fermentasyon son ürünleri olan etanol, laktik asit, ve asetik asit miktarları ise Şekil 5.4. B' de gösterilmiştir.

En yüksek şeker ve glukoz birikimi 10 g/l selüloz içeren besiyerinde gerçekleşmiş ve ikinci haftanın sonunda sırasıyla 8 ve 4,5 g/l olarak ölçülmüştür. Selüloz konsantrasyonunun artışı glukoz miktarında düşüğe neden olurken etanol üretiminin 5 g/l ve 30 g/l selüloz içeren besiyerlerinde diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 5.4. B).

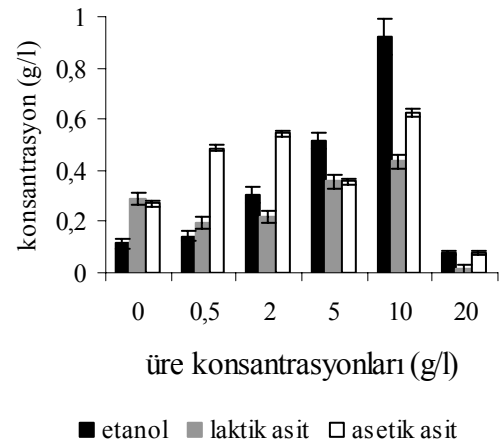


Şekil 5.4. Selüloz konsantrasyonlarının *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

En uygun üre konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla başlangıç konsantrasyonu 0, 0,5, 2 (kontrol), 5, 10, 20 g/l olacak şekilde altı farklı üre konsantrasyonu içeren RM besiyeri hazırlanmıştır. Selülozun parçalanabilmesi için besiyerine üre eklenmesinin gerekli olmadığı ancak daha yüksek parçalanma hızı için besiyerindeki üre konsantrasyonunun 2 g/l olması gerektiği görülmüştür (Şekil 5.5. A).



(A)



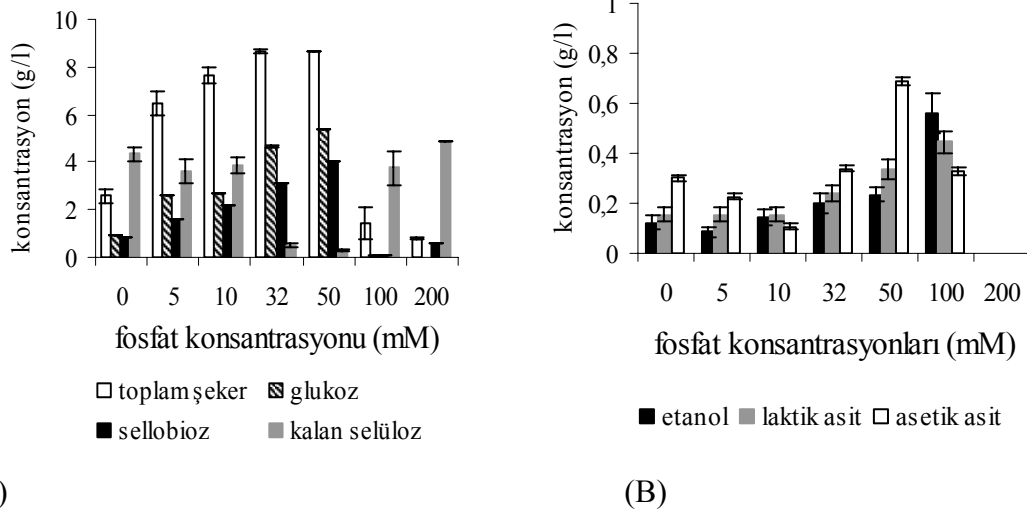
(B)

Şekil 5.5. Üre konsantrasyonunun *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

Üre konsantrasyonunun artırılması glukoz birikimini artırmamıştır. Optimum şeker birikimi ve selüloz yıkımı besiyeri 2 g/l üre içerdiğinde gerçekleşmiştir. Üre konsantrasyonundaki artış selüloz kullanımını ve şeker birikimini düşürürken etanol üretiminde artışa neden olmuştur. 10 g/l üre içeren besiyerinde 0,9 g/l etanol üretilmiştir. Besiyerindeki üre konsantrasyonunun 20 g/l'ye çıkarılması ise hücre üremesini engellemiştir.

Besiyerindeki fosfat miktarının etkisi 0, 5, 10, 32 (kontrol), 50, 100, 200 mM fosfat içeren yedi farklı RM besiyerinde incelenmiştir. Besiyerindeki fosfat konsantrasyonunun selüloz kullanımı ve glukoz birikimi üzerine oldukça etkili

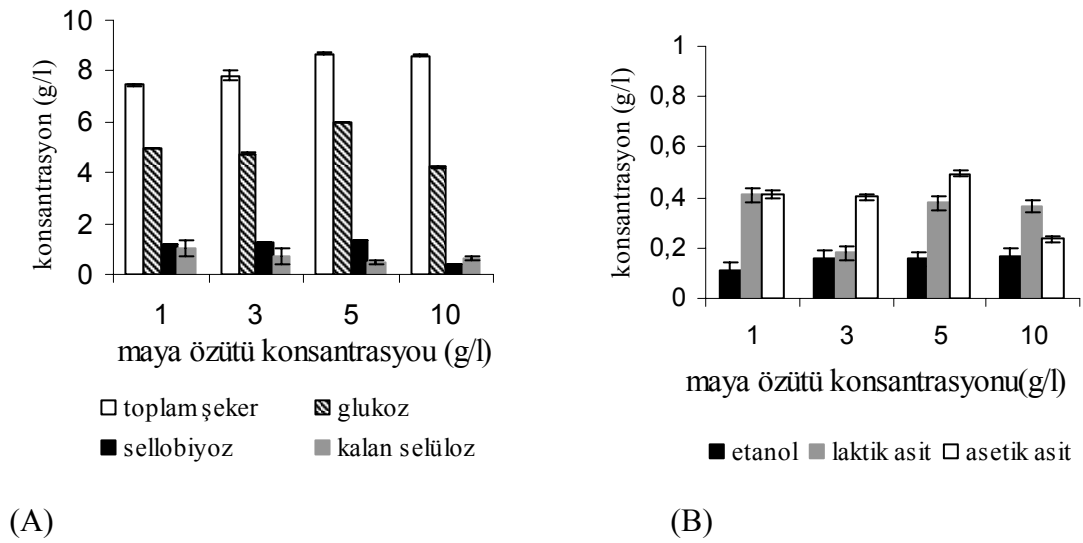
olduğu görülmüştür. En yüksek glukoz birikimi besiyerindeki fosfat konsantrasyonu 50 mM olduğunda elde edilmiştir (5,4 g/l). Fosfat konsantrasyonunun artırılması toplam şeker ve glukoz birikiminde inhibe edici bir rol oynamış ve glukoz birikimi düşmüştür (Şekil 5.6. A). Buna karşılık etanol üretimi yüksek fosfat içeriklerinde artmıştır (Şekil 5.6. B). En yüksek etanol üretimi 100 mM fosfat içeren besiyerinde gözlemlenmiştir ve 0,6 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.6. B). Bu konsantrasyonda selüloz kullanımı ve glukoz birikimi kontrole kıyasla sırasıyla % 34 ve % 83 oranında düşüş göstermiştir. 200 mM fosfat içeren besiyerinde ise fermentasyon ürünü saptanamamıştır.



Şekil 5.6. Fosfat konsantrasyonunun *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

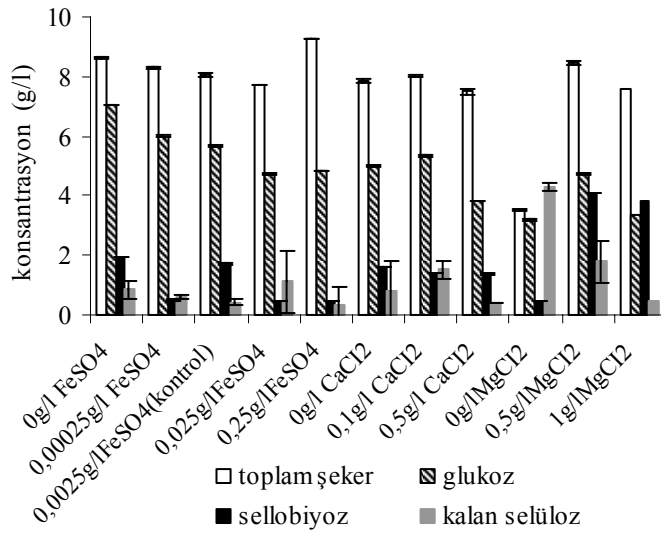
Deneylerin birçoğunda fermentasyonun homoasetojenik (etanol/asetat ve etanol/laktat oranı <1) olduğu gözlemlenmiştir. Ancak üre ve fosfat konsantrasyonlarındaki artış bu oranları yükseltmiştir. 10 g/l üre içeren besiyerinde etanol/asetat oranı 2,1, etanol/laktat oranı ise 1,5 olarak bulunmuştur. 100 mM fosfat içeren besiyerinde ise etanol/asetat oranı 1,7, etanol/laktat oranı ise 1,3 olarak hesaplanmıştır.

Maya özütünün etkisini belirlemek amacıyla besiyerinde 1, 3, 5 (kontrol), 10 g/l olacak şekilde dört farklı maya özütü konsantrasyonu denenmiştir. Yapılan çalışmada 5 g/l maya özütünün glukoz üretimi için en uygun konsantrasyon olduğu görülmüştür (Şekil 5.7. A). Etanol üretiminin ise maya özütü miktarından fazla etkilenmediği 3-10 g/l maya özütü içeren besiyerinde yaklaşık 0,2 g/l seviyesinde olduğu görülmüştür.

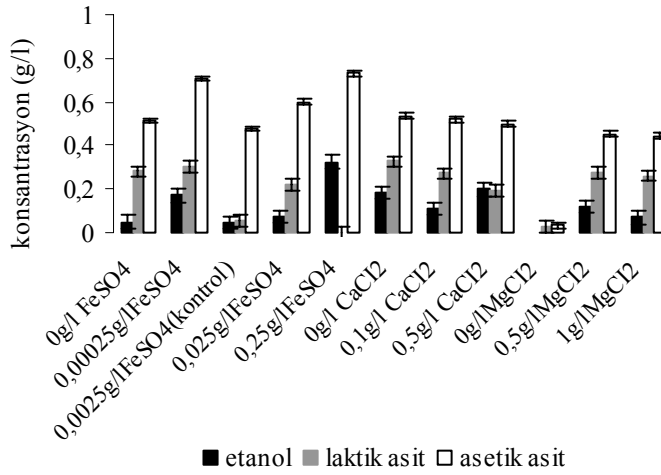


Şekil 5.7. Maya özütü konsantrasyonunun *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

Besiyerindeki mineral konsantrasyonlarının etkisini araştırmak için RM besiyerinde bulunan demir, kalsiyum ve magnezyumun grafikte verilmiş olan konsantrasyonları denenerak şeker üretimi için en uygun mineral konsantrasyonları tespit edilmiştir. Toplam şeker miktarının, besiyerindeki $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ miktarı 0.25 g/l olduğunda diğer konsantrasyonlara kıyasla daha hızlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Ortamda demir elementinin olmaması glukoz birikimini tetiklemiş, demir konsantrasyonunun artırılması ise biriken glukoz miktarında düşüşe neden olmuştur (Şekil 5.8. A). Buna karşın $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunun 0,25 g/l' ye çıkarılması etanol üretimini arttırmıştır (Şekil 5.8. B).



(A)



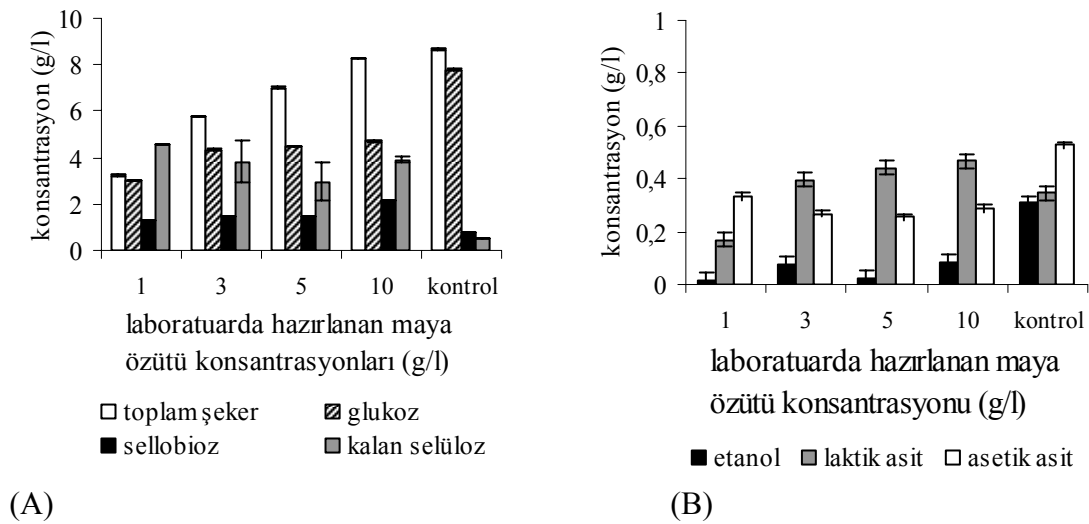
(B)

Şekil 5.8. Mineral konsantrasyonunun *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

Ortamda $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0 ve 0,05 g/l olduğunda toplam şeker miktarı 7,8 g/l'ye çıkarken kalsiyum miktarının arttırılması toplam şeker miktarının 6 g/l'ye kadar düşmesine neden olmuştur. Glukoz birikimi en yüksek değerine ortamda 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ varken ulaşmıştır (5,3 g/l). Ortamdaki kalsiyum miktarının 0,5 g/l'ye yükseltilmesi biriken glukoz miktarında düşüşe neden olmuş (Şekil 5.8. A), etanol miktarında ise artış gözlenmiştir (Şekil 5.8. B).

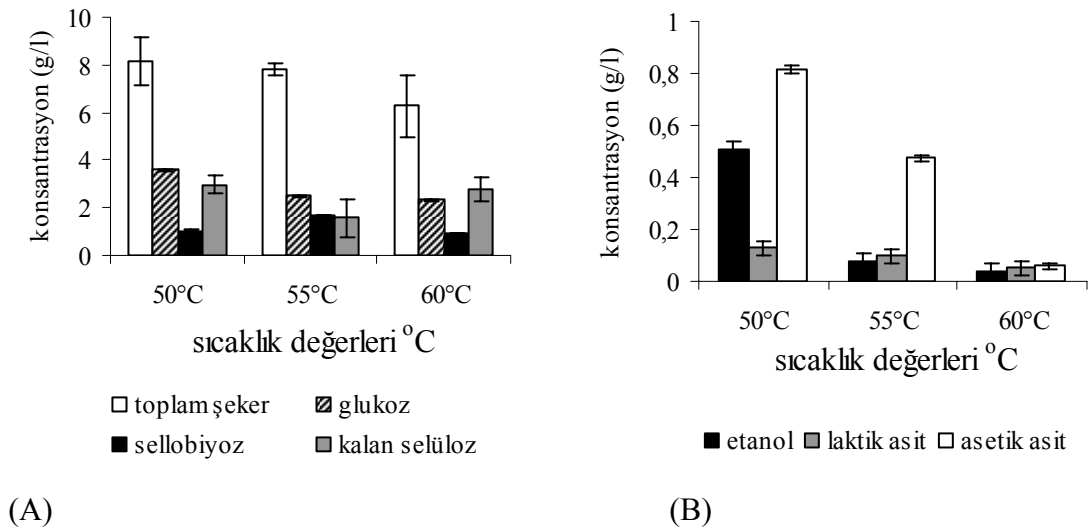
Selüloz kullanımı ve şeker birikimini etkileyen en önemli elementin Mg olduğu gözlemlenmiştir. Selüloz kullanımı ve toplam şeker birikimi Mg içermeyen besiyerinde şiddetli düşüş göstermiştir. Genellikle 7-8 g/l’lerde seyreden toplam şeker miktarı Mg içermeyen besiyerinde 3,2 g/l’ye düşmüştür (Şekil 5.8.A). 0,5 g/l MgCl₂.6H₂O içeren besiyerinde ise glukoz birikiminin en yüksek değerini (5 g/l) bulduğu gözlemlenmiştir.

Laboratuarda üretilen mayalardan hazırlanmış olan maya özütünün *C. thermocellum* 27405 hücrelerinin selüloz kullanımı ve etanol üretimine etkisi Şekil 5.9’da gösterilmiştir. Elde hazırlanmış maya özütü içeren besiyerinde selüloz kullanımı düşmüştür, besiyerinde iki hafta sonunda 3 g/l selüloz kullanılmadan kalmıştır. 5 g/l ticari maya özütü içeren kontrol besi yerinde 7,8 g/l glukoz birikirken aynı miktarda laboratuvar koşullarında hazırlanmış maya özütü içeren besiyerinde 4,3 g/l glukoz birikimi olmuştur (Şekil 5.9. A). Etanol üretiminin de kontrol kültüründeki değerine kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Laboratuvar ortamında hazırlanan maya özütünün laktik asit üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 5.9. B).



Şekil 5.9. Laboratuarda hazırlanan maya özütü konsantrasyonunun *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

Ortam sıcaklığı, atmosfer gazları ve ortam pH'sı etkisi incelenen diğer parametrelerdir. Besiyeri ortam sıcaklığının *C. thermocellum* kültürlerinin toplam şeker, glukoz birikimi, selüloz kullanımı ve fermentasyon ürünlerinin üretimine olan etkisi Şekil 5.10 'da gösterilmiştir.

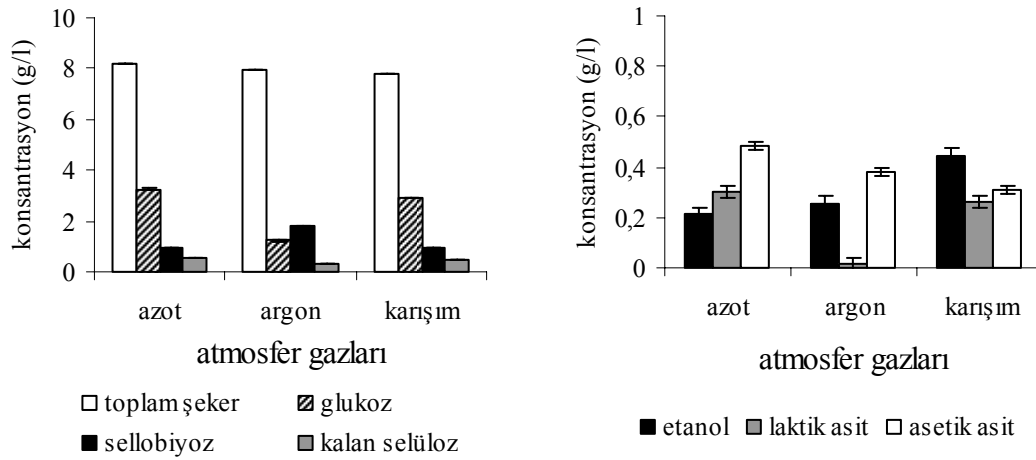


Şekil 5.10. Ortam sıcaklığının *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

Şeker üretimi, glukoz birikimi ve selüloz kullanımı için en uygun sıcaklığın 50°C olduğu ve kalan selülozun 1,6 g/l, toplam şekerin ise 8,5 g/l olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.10. A). Etanol üretimi için de 50°C en uygun sıcaklık olarak tespit edilmiştir. Bu sıcaklıkta etanol konsantrasyonu ikinci haftanın sonunda 0,5 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.10. B).

Atmosfer koşullarının selüloz kullanımına, toplam şeker ve glukoz birikimine, fermentasyon son ürünlerine olan etkisini belirlemek için *C. thermocellum* kültürleri üç farklı atmosfer koşulunda üretilmiştir. Hücrelerin farklı atmosferlerde üretilmeleri selüloz kullanımlarını ve ortamda biriken şeker miktarını etkilememiştir. Ancak argon içeren ortamda *C. thermocellum* kültürlerindeki glukoz birikiminin diğer atmosfer gazlarındaki glukoz miktarına kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 5.11. A). Ayrıca argon gazının kullanılması laktik asit üretimini engellemiştir (Şekil 5.11. B). Glukoz birikimi için en uygun atmosferik ortamın azot

gazı içeren besiyeri olduğu görülmüştür. Etanol üretiminin karışım gazı içeren atmosfer koşullarında diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 5.11. B). Anaerobik kabin içine sızabilecek oksijenden kurtulmak için oksijenin katalizör yardımıyla H₂ ile birleştirilerek suya dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle en güvenli kabin içi atmosferinin bir miktar hidrojen gazı içermesi gerekmektedir (% 10 CO₂, % 5 H₂ ve %85 N₂). Ancak karışım gazı azot gazına kıyasla pahalı bir gazdır ve kullanımı proses maliyetini yükseltmektedir.

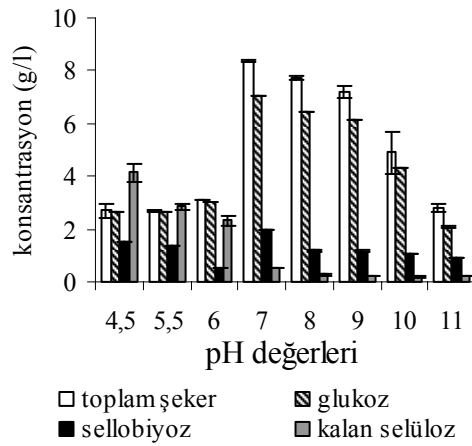


(A)

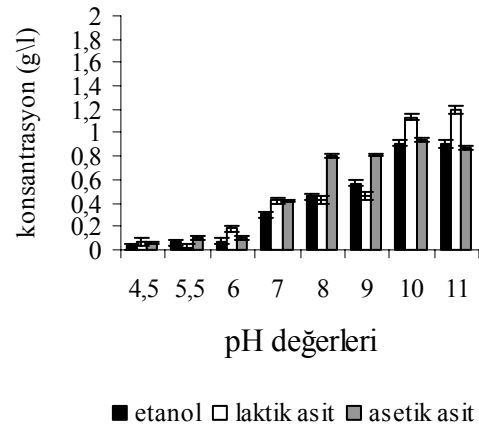
(B)

Şekil 5.11. Ortam atmosfer gazlarının *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

Besiyeri pH'sının glukoz birikimi ve etanol üretimine olan etkisi Şekil 5.12. A ve B'de gösterilmiştir. İki haftalık fermentasyon sonucunda en yüksek selüloz gideriminin pH 7-11 arasında gerçekleştiği görülmüştür. En yüksek miktarda glukoz (7 g/l) ve etanol (0,9 g/l) sırasıyla pH 7 ve pH 10'da oluşmuştur (Şekil 5.12. B). pH 10 ve 11'de laktik asit konsantrasyonunda artış görülmüştür. Şekil 5.12. A'da görüldüğü gibi pH 4,5-6 değerleri arasında selüloz kullanımı, toplam şeker ve glukoz birikimi çok düşüktür. pH'nın sellobiyoz birikiminde kayda değer bir değişime neden olmadığı gözlemlenmiştir.



(A)



(B)

Şekil 5.12. Ortam pH'sının *C. thermocellum* kültüründeki şeker birikimine (A) ve fermentasyon son ürünlerinin üretimine (B) etkisi.

5.2. Modifiye Edilmiş RM Besiyerinde Toplam Şeker ve Glukoz Birikimi

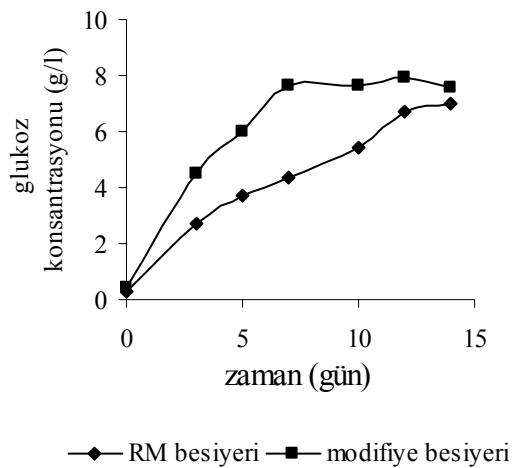
RM besiyeri kullanılarak yapılan bu çalışmalar ışığı altında besiyeri bileşenlerinin en yüksek glukoz birikimini sağlayan konsantrasyonları tespit edilmiş ve bu konsantrasyonları içeren yeni bir RM besiyeri hazırlanmıştır. Bu sonuçlara dayanılarak oluşturulan modifiye RM besiyerinin içeriği Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Orjinal ve modifiye edilmiş RM besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonları

Bileşenler (g/l)	RM	Modifiye RM
Selüloz	10	10
Üre	2	2
KH_2PO_4	2	3,125
K_2HPO_4	3	4,6875
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0025	0
Maya özütü	5	5

Modifiye edilmiş besiyeri ile orjinal RM besiyerindeki toplam şeker ve glukoz birikimi arasındaki farkı incelemek için iki ayrı besiyeri hazırlanmış ve 50 ml'lik besiyerlerine aynı şartlarda üretilmiş 5 ml'lik *C. thermocellum* kültürleri ekilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda glukoz birikimi için en uygun ortam sıcaklığının 50°C olduğu ve atmosferin ise azot gazından oluşması gerektiği görüldüğünden kabin içi inkübatör sıcaklığı 50°C ve atmosfer gazı azot olacak şekilde ayarlanmıştır ve iki hafta boyunca glukoz miktarı ölçülmüştür.

Glukoz birikiminin modifiye RM besiyerinde fermentasyonun daha erken günlerinde başladığı görülmüştür. Modifiye edilmiş besiyerinde hızlı bir şekilde artan glukoz miktarı birinci haftanın sonunda 7,9 g/l'ye çıkmış, sonraki günlerde artış görülmemiştir. Orjinal RM besiyerinde ise glukoz miktarındaki artış devam ederek fermentasyonun ikinci haftasının sonunda en yüksek değerini bulmuştur (7 g/l). (Şekil 5.13). Modifiye edilmiş RM besiyerinde fermentasyonun birinci haftası sonunda orjinal RM besiyerine kıyasla %77 oranında daha fazla glukoz biriktiği tespit edilmiştir.



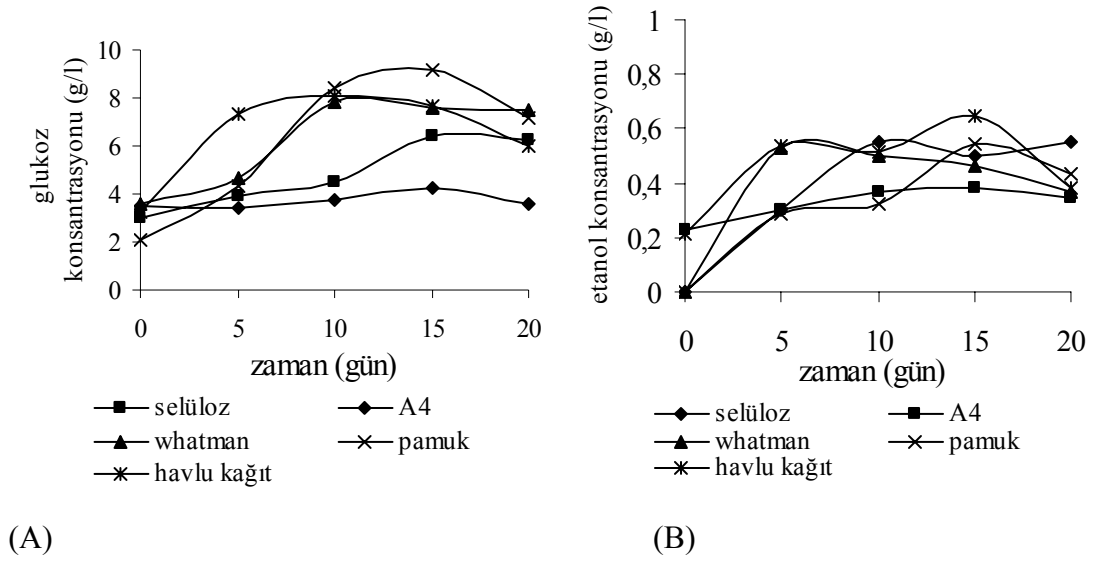
Şekil 5.13. Modifiye edilmiş ve orjinal RM besiyerlerinde glukoz birikimi.

5.3. Değişik Lignoselülozik Kaynakların *C. thermocellum* Tarafından Kullanımı

Tez çalışmasının bu bölümünde, farklı kağıtlar, tarımsal atıklar ve kağıt fabrikası atıklarının *C. thermocellum* tarafından kullanımı, glukoz birikimi ve etanol üretimi incelenmiştir.

Öncelikle karbon kaynağı olarak 10 g/l olacak şekilde Whatman filtre kağıdı (no:1), A4 kağıdı, havlu kağıt, pamuk ve selüloz tartılıp hiçbir kimyasal ön işlem yapılmadan küçük parçalara bölünerek modifiye RM besiyerine eklenmiştir. *C. thermocellum* hücreleri ekilmiş ve yirmi günlük fermentasyon süresince glukoz konsantrasyonu ölçülmüştür. Proses sonunda kullanılmayan kağıt kalıntıları kurutulup tartılarak parçalanmış miktarları tespit edilmiştir.

Selülozun doğada en saf halde bulunduğu madde olan pamuk içeren besiyerinde en yüksek glukoz konsantrasyonu elde edilmiştir (9,13 g/l) fakat üretilen etanol miktarında fazla bir artış görülmemiştir (Şekil 5.14. B). Whatman filtre kağıdında en yüksek glukoz konsantrasyonu onuncu günde 7,9 g/l olarak ölçülmüştür, etanol miktarı ise 0,5 g/l olarak tespit edilmiştir. 10g/l selüloz içeren besiyerinde ve havlu kağıt içeren besiyerinde on beşinci günde sırasıyla 6,4 ve 8 g/l glukoz birikimi olduğu görülmüştür. A4 kağıdının ise *C. thermocellum* tarafından parçalanma hızının çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Havlu kağıt içeren besiyerinde asetik asit üretiminde artış görülmüştür beşinci günden itibaren asetik asit miktarı 1,1 g/l' ye çıkmıştır. Etanol konsantrasyonu ise on beşinci günde 0,6 g/l' ye çıkabilmiştir.



Şekil 5.14. Değişik selüloz kaynaklarının *C. thermocellum* tarafından kullanımı sonucu biriken glukoz miktarı (A) ve etanol üretimi (B)

Yirmi günlük proses sonunda ortamda 0,071 g/l havlu kağıt, 0,05 g/l whatman filtre kağıdı, 0,09 g/l pamuk, 0,36 g/l A4 ve 0,43 g/l selüloz kullanılmadan kalmıştır.

Tarımsal kaynaklı lignoselülozik atıklardan; arpa sapı, buğday sapı, sazlık otu, mısır kabuğu, palmye ağacı lifi ve barbunya kabuğu *C. thermocellum* kültürleri için selüloz kaynağı olarak kullanılmış ve bu atıkların parçalanması sonucu biriken glukoz miktarları tespit edilmiştir.

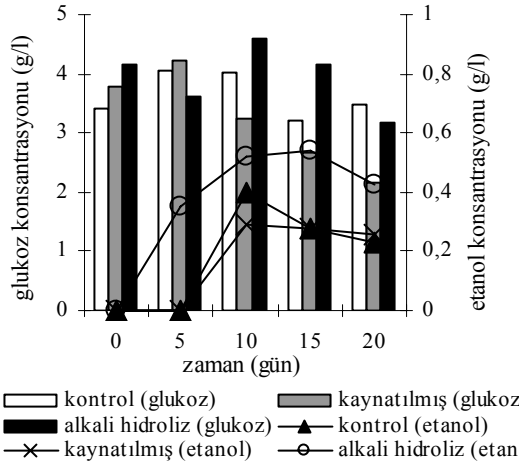
Arpa sapı içeren besiyerlerinde en fazla glukoz konsantrasyonu ön işlem (alkali hidroliz) görmüş olan numunelerde elde edilmiştir. Alkali hidroliz edilen numunelerdeki glukoz miktarı onuncu ve on beşinci günler için sırasıyla 4,6 ve 4,1 g/l olmuştur (Şekil 5.15. A). En yüksek glukoz değeri onuncu günde elde edilmiştir. Kontrolle oranla glukoz konsantrasyonu alkali hidroliz yapılmış numunelerde onuncu günde alınan değerlere göre % 14 artmıştır. Kaynatılmış numunelerde ilk beş gün içinde glukoz konsantrasyonu artmış daha sonra düşüş göstermiştir (Şekil 5.15. A).

Etanol üretiminin alkali hidroliz yapılan arpa sapının karbon kaynağı olarak kullanıldığı kültürlerde daha yüksek olduğu gözlemlenmiş, fermentasyonun onuncu ve on beşinci günlerinde 0,5 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.15. A).

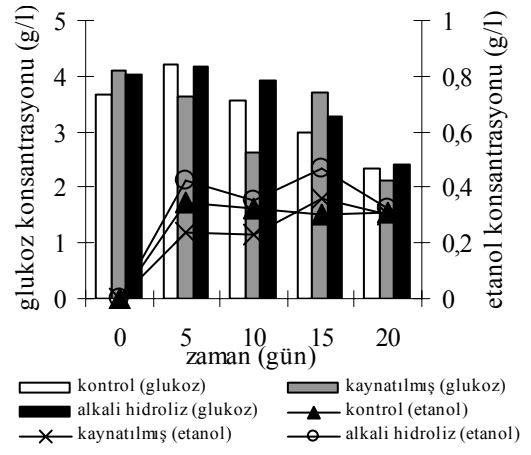
Alkali hidrolizinin buğday sapının parçalanma hızını ve sonuç olarak glukoz miktarını arttırdığı görülmüştür. Kontrole kıyasla alkali hidrolizine tabi tutulan buğday saplarını içeren besiyerinde glukoz birikimi %10 oranında artış göstermiştir. Fermentasyonun beşinci gününde 4,2 g/l glukoz birikimi olmuştur (Şekil 5.15. B). Ayrıca alkali hidrolizine tabi tutulmuş buğday sapının bulunduğu kültürlerde diğerlerine kıyasla biraz daha fazla etanol üretimi olmuş ve on beşinci günde 0,5 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.15. B).

Alkali hidroliz uygulamasının sazlık otunun hidrolizini kolaylaştırdığı ve glukoz birikimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu kültürde onuncu günde 4 g/l glukoz biriktiği görülmüştür. Fermentasyonun onuncu gününde etanol konsantrasyonu yaklaşık 0,7 g/l'ye ulaşmıştır (Şekil 5.15. C).

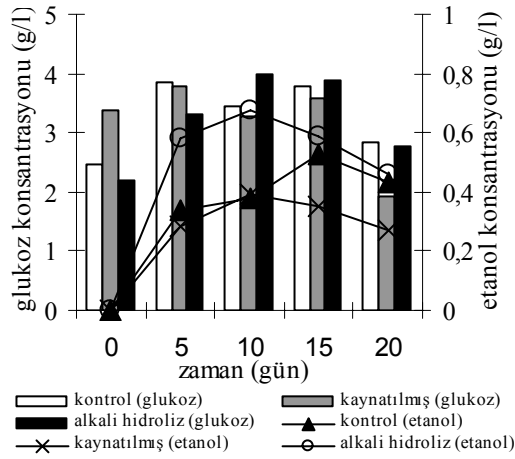
Mısır kabuğu içeren besiyerlerinin tümünde fermentasyonun on beşinci gününde glukoz konsantrasyonu en yüksek değerine ulaşmıştır. En yüksek glukoz birikimi kontrol numunesinde gerçekleşmiştir on beşinci günde glukoz miktarı 4,7 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 5.15. D). Ancak kontrolde etanol üretimi kaynatılmış ve alkali hidroliz uygulanmış örneklerdekine kıyasla düşüktür.



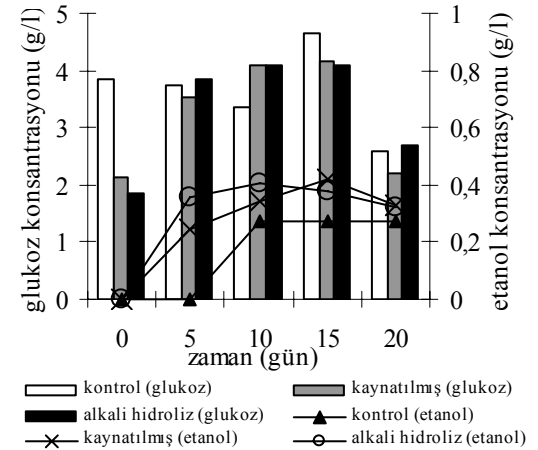
(A)



(B)

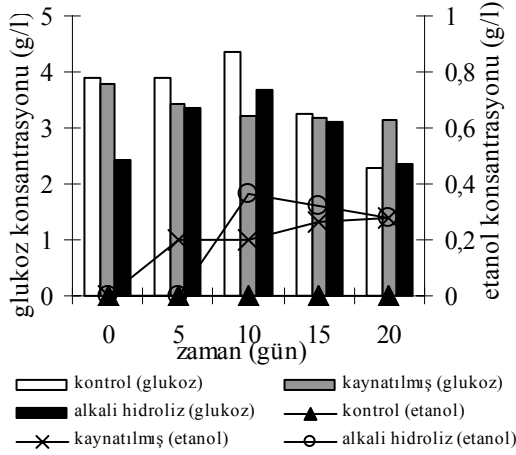


(C)

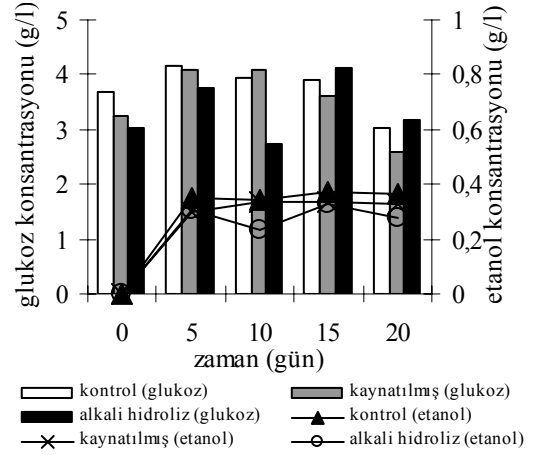


(D)

Şekil 5.15. Kaynatma ve alkali hidroliz işlemlerinden geçirilmiş tarımsal atıkların *C. thermocellum* tarafından kullanımı; glukoz birikimi ve etanol üretimi Arpa sapı (A), Buğday sapı (B), Sazlık otu (C), Mısır kabuğu (D), Palmiye ağacı lifleri (E), Barbunya kabuğu (F) (Şekil arka sayfada devam ediyor).



(E)



(F)

Şekil 5.15. Devamı.

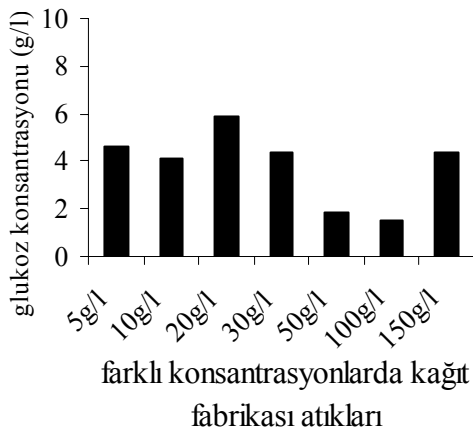
Palmye ağacı lifi için uygulanan ön işlemlerin glukoz birikimi için etkili olmadığı görülmüştür. Ancak kontrolde hiç etanol üretimi görülmezken alkali hidrolize tabi tutulan örneklerde etanol konsantrasyonu onuncu günde 0,4 g/l'ye ulaşmıştır (Şekil 5.15. E). En yüksek glukoz konsantrasyonu onuncu günde kontrol numunesinde 4,4 g/l olarak ölçülmüştür.

Benzer şekilde barbunya kabuğu için uygulanan ön işlemlerinde glukoz birikimine faydalı olmadığı görülmüştür. En yüksek glukoz konsantrasyonuna beşinci günde kontrol numunesinde ulaşılmış ve 4,2 g/l olarak ölçülmüştür. Kaynatma işlemi uygulanan numunelerde onuncu günde 4 g/l glukoz elde edilmiştir. Uygulanan ön işlemler etanol konsantrasyonunda da bir artış sağlamamıştır (Şekil 5.15. F).

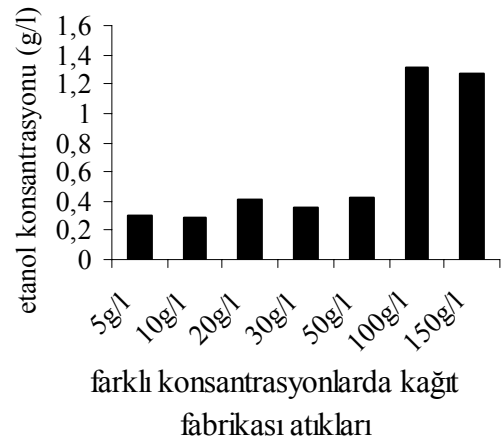
Çalışmanın bu bölümünde TOPRAK KAĞIT (Bilecik, Türkiye) fabrikasından alınan kağıt atığı örneklerinin *C. thermocellum* hücreleri tarafından kullanımı incelenmiş, glukoz ve etanol miktarı on beş günlük fermentasyon sonucunda tespit edilmiştir. Şekil 5.16. A'da görüldüğü gibi en yüksek şeker birikimi (5,9 g/l) 20 g/l kağıt atığı içeren kültürde gerçekleşmiştir.

Atık miktarının yükseltilmesi glukoz birikimini arttırmamıştır. Etanol üretimi ise 100 ve 150 g/l kağıt atığı içeren kültürlerde yaklaşık aynı olup diğerlerine kıyasla çok daha yüksektir. Bu kültürlerde etanol konsantrasyonu 1,3 g/l'ye ulaşmıştır (Şekil 5.16. B)

Kağıt atıkları hücre üremesinin desteklenmesi amacıyla toplam miktarı 10 g/l olacak şekilde belli oranlarda ticari selüloz ile karıştırılarak besiyerine eklenmiştir. Şekil 5.17. A'da görüldüğü gibi en yüksek parçalanma en fazla ticari selüloz içeren besiyerinde (kağıt atığı/ticari selüloz: 1/4) gerçekleşmiştir. Bu kültürde fermentasyonun sonucunda 6 g/l glukoz birikimi olmuştur.



(A)

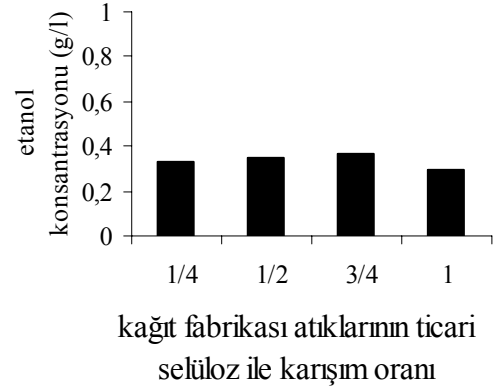


(B)

Şekil 5.16. Farklı konsantrasyonlarda kağıt fabrikası atığı içeren *C. thermocellum* kültüründe glukoz birikimi (A), etanol üretimi (B).



(A)



(B)

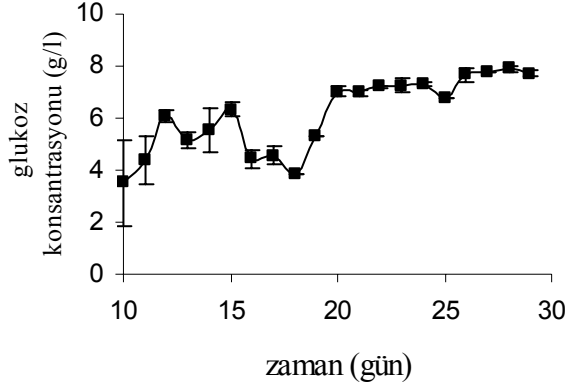
Şekil 5.17. Değişik oranlarda kağıt fabrikası atığı + ticari selüloz içeren *C. thermocellum* kültüründe glukoz birikimi (A) ve etanol üretimi (B).

Besiyerinde yalnızca kağıt fabrikası atığı içeren ortamda toplam şeker konsantrasyonu 1/4 oranında kağıt fabrikası atığı içeren ortama göre %94 düşüş göstermiştir. En yüksek glukoz birikimi 1/4 kağıt fabrikası atığı içeren besiyerinde 6 g/l olarak elde edilmiştir (Şekil 5.17. A). Kağıt fabrikası içeriğinin artırılması glukoz birikimini engellerken en yüksek etanol konsantrasyonu 3/4 atık içeren besiyerinde 0,4 g/l olarak belirlenmiştir.

5.4. Yarı Sürekli *C. thermocellum* Kültürlerinde Glukoz Birikiminin Optimizasyonu

C. thermocellum kültüründe selüloz parçalanması ve glukoz birikiminin sürekliliğinin sağlanması amacıyla üç farklı periyotta iki farklı besin miktarı ile seyreltilen altı adet yarı sürekli kültür toplam kırk gün süresince 55°C'de ve anaerobik kabin içinde inkübe edilmiştir. İlk on gün boyunca kültür ortamındaki şeker konsantrasyonunun en yüksek seviyelere çıkması beklenmiş ve herhangi bir besiyeri eklemesi yapılmamıştır. Onuncu günden itibaren 5 ml/24 saat, 10 ml/24 saat, 5 ml/48 saat, 10 ml/48 saat, 5 ml/76 saat ve 10 ml/76 saat olacak şekilde kültür alınarak taze besiyeri ile değiştirilmiştir.

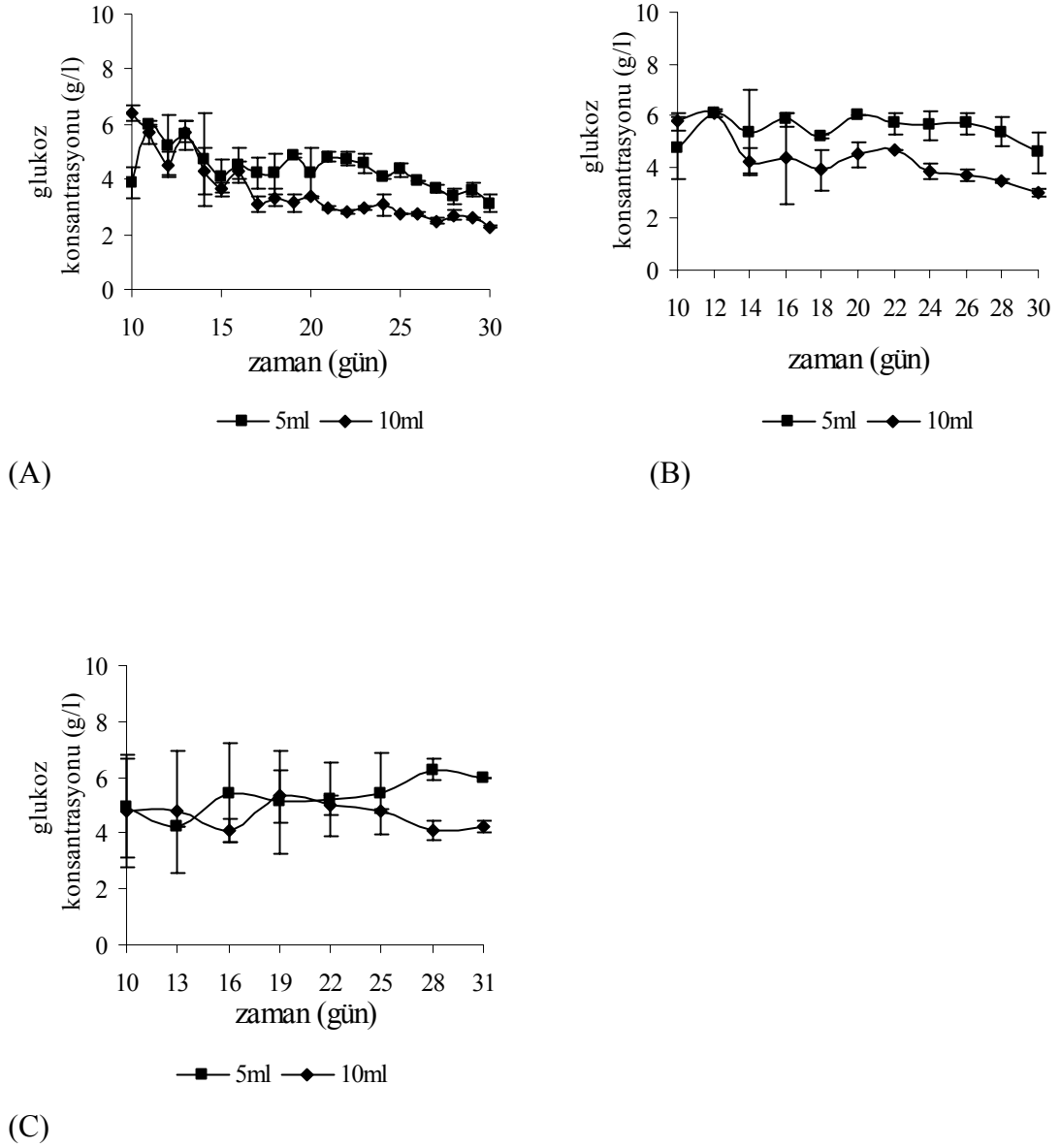
Kesikli sistem olan kontrol kültüründe en yüksek glukoz birikimi gerçekleşmiş ve bir ay sonunda 7,9 g/l'ye kadar yükselmiştir. Kontrol kültüründe 0,3 g/l civarında etanol üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.18. Kesikli *C. thermocellum* kültüründe glukoz birikimi (kontrol).

Şekil 5.19. A'da 5ml ve 10ml/24 saat besleme yapılan yarı sürekli sistemde ölçülen glukoz miktarları gösterilmiştir. Yarı sürekli sistemin başlangıcında yaklaşık 6 g/l olan glukoz miktarı otuzuncu günün sonunda 4 g/l'nin altına düşmüştür. 5 ml/24 saat beslenen kültürde etanol üretimi 0,3 g/l civarında seyretmiştir. Asetik asit:etanol oranı ise 0,9 g/l olarak hesaplanmıştır. 10ml/24 saat besleme yapılan kültürde etanol miktarı da 0,3 g/l olarak ölçülmüştür.

Seyreltme miktarı azaldıkça yarı sürekli sistemde glukoz birikiminin arttığı gözlemlenmiştir. 5 ml/76 saat seyreltilen kültürde glukoz miktarı diğer seyreltme değerlerine kıyasla daha yüksektir. Şekil 5.19. C'de görüldüğü gibi 5 ml/76 saat seyreltme yapıldığında prosesin son günlerinde ortamdaki glukoz miktarı 6 g/l'nin üzerine çıkmıştır. Yarı sürekli sistem deney sonuçları 76 saatte bir 5 ml yapılacak seyreltmenin glukoz miktarı yüksek bir kültür elde edilebilmesi için ideal olduğunu göstermiştir.

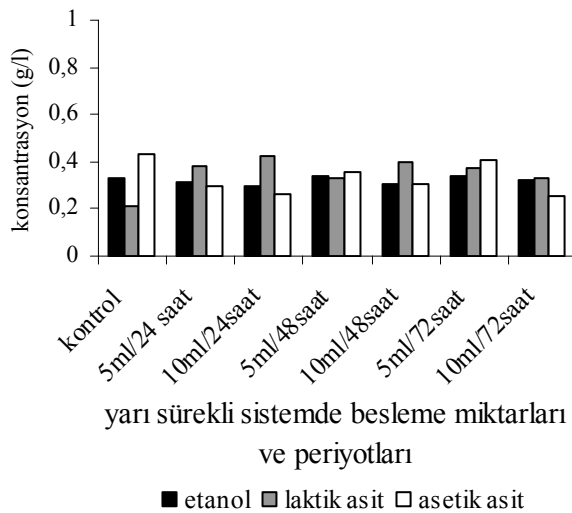


Şekil 5.19. Yarı sürekli sistemde besleme miktarı ve besleme periyodunun glukoz birikimine etkisi; 24 saatte bir (A), 48 saatte bir (B), 76 saatte bir (C).

Çizelge 5.2. Yarı sürekli kültürde farklı seyreltme miktarlarında proses sonunda elde edilecek kültür hacmi ve glukoz miktarı

	Seyreltme Miktarları		
	5ml/24saat	5ml/48saat	5ml/76saat
Bir ay sonunda toplam hacim (ml)	$(5 \times 21) + 50 = 155$	$(5 \times 11) + 50 = 105$	$(5 \times 8) + 50 = 90$
*Ortalama glukoz konsantrasyonu (g/l)	4	5,5	5,7
	10ml/24saat	10ml/48saat	10ml/76saat
Bir ay sonunda toplam hacim (ml)	$(10 \times 21) + 50 = 260$	$(10 \times 11) + 50 = 160$	$(10 \times 8) + 50 = 130$
*Ortalama glukoz konsantrasyonu (g/l)	2,8	3,8	4,5

*Ortalama glukoz konsantrasyonu prosesin son on gününde alınan değerlerin ortalamasıdır.



Şekil 5.20. Yarı sürekli sistemde seyreltme miktarı ve periyodunun son ürün konsantrasyonlarına etkisi.

Farklı seyreltme miktarları ve periyotları üretilen etanol miktarı üzerinde çok etkili olmamıştır. Ancak kontrole kıyasla laktik asit konsantrasyonları artış göstermiştir. En yüksek etanol konsantrasyonu iki günde bir ve üç günde bir 5 ml besleme yapılan besiyerlerinde aynı olup 0,34 g/l olarak ölçülmüştür. Seyreltme yapılan yarı sürekli kültürlerde daha fazla etanol üretildiği Şekil 5.20'de görülmektedir.

6. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında termofilik-anaerobik, selülitik etanol üreticisi bir bakteri olan *C. thermocellum* ATCC 27405 suşunun selüloz ve selüloz içeren atıkları parçalama kapasitesi ile selülozu parçalaması sonucu ortaya çıkan glukoz miktarındaki değişim farklı koşullarda incelenmiştir. Selüloz kullanımı ve glukoz birikiminin yanı sıra bakterinin ürettiği etanol miktarı da diğer fermentasyon yan ürünleri ile birlikte ölçülmüştür.

C. thermocellum'un etanol üretim kapasitesi çok yüksek değildir. 10 g/l selüloz içeren besiyerinde etanol üretimi çoğu zaman 1 g/l'yi geçmemektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda farklı *C. thermocellum* suşlarının ürettiği etanol miktarlarının yaklaşık 0,5-1 g/l civarında olduğu rapor edilmiştir [Lamed and Zeikus, 1980; Rani et al, 1997]. Ancak Rani ve arkadaşları (1997) izole etmiş olduğu *C. thermocellum* suşlarının 2,8 g/l etanol ürettiklerini rapor etmiştir.

Selüloz ve selüloz içeren atıkların *C. thermocellum* kullanılarak etanole dönüştürülmesi verimliliği düşük bir işlem olacaktır. Bu nedenle selülozik atıkların *C. thermocellum* kullanılarak, dışarıdan herhangi bir selüloz enzimi eklenmeksizin parçalanması ve ortamda biriken glukozun daha etkin bir etanol üreticisi mikroorganizma tarafından etanole dönüştürülmesi işleminin daha ekonomik ve verimli olacağı düşünülmüştür.

Tez çalışmasının ilk aşamasında glukoz birikiminin artırılması için ortam şartları ve besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonlarında değişiklikler yapılmış ve etkileri gözlenmiştir. Deney sonuçları *C. thermocellum* kültüründe selüloz parçalanması ve glukoz birikiminin kültür koşullarına karşı hassasiyet gösterdiğini göstermiştir. Özellikle pH, üre, fosfat, Mg ve Fe konsantrasyonunun önemli parametreler olduğu ortaya çıkmıştır.

Stevenson ve Weimer (2005) düşük üreme hızlarında *C. thermocellum* kültüründe fermentasyonun homoasetojenik olduğunu ve etanol üretiminin düşük olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada *C. thermocellum* hücrelerinin üreme hızının yüksek miktarlarda glukoz birikimi için elverişli olduğu ancak yüksek miktarlarda etanol üretimi için düşük bir hız olduğu görülmüştür.

C. thermocellum kültüründe asidik besiyerlerinde (pH 6'nın altında) selülitik aktivitenin çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum hücrelerin düşük pH'larda üreyememeleri ile bağdaştırılabilir. *C. thermocellum* kültüründe selüloz kullanımı pH 7'de % 94, pH 9'da % 98 olarak bulunmuştur. Bu değerleri mezofilik selülitik *Clostridium cellulolyticum* hücrelerinin selüloz kullanımı ile kıyaslandığımızda selüloz kullanımının 50°C de çok daha etkin olduğunu söyleyebiliriz. *C. cellulolyticum* için pH 7,2'deki selüloz kullanımı % 67 olarak rapor edilmiştir [Desvaux et al, 2001].

Besiyerindeki fosfat konsantrasyonu selüloz kullanımını büyük ölçüde etkilemiştir. Besiyerindeki fosfat konsantrasyonu 10 mM'ın altında ve 100 mM'ın üstünde olduğunda selüloz kullanımı büyük ölçüde düşmüştür. 100 mM fosfat konsantrasyonunda selüloz kullanımı düşerken etanol üretimi en yüksek seviyelere çıkmıştır. Ayrıca bu konsantrasyonda glukoz birikimi de düşmüştür. Zhang ve Lynd (2004) ortamda bulunan inorganik fosfatın glukozun fosforilasyonu için sellobiyoz fosforilaz ve sellodekstrin fosforilaz enzimlerine fosfat sağladığını rapor etmişlerdir. Bu işlem glukozun hücreler tarafından kullanılabilmesi için gerekli olan bir işlemdir. Bu çalışmada yüksek fosfat konsantrasyonuna sahip olan besiyerinde görülen glukoz miktarındaki düşüşün sebebi hücrelerin sellobiyoz ve glukoz kullanımının artmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Metallerin çok düşük konsantrasyonlarda hücre üremesini tetiklediği yüksek konsantrasyonlarının ise üremeyi engellediği ve organizmaya zarar verdiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'nun varlığının glukoz birikimini inhibe ettiği fakat 0,25 g/l konsantrasyonunda etanol üretiminin en yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bahl ve Gottschalk (1984) besiyerindeki Mg limitasyonunun *Clostridium acetobutylicum* hücrelerinin solvent üretimi için uygun olmadığını bildirmiştir. Bizim deneylerimiz sonucunda da besiyerindeki Mg limitasyonunun *C. thermocellum* hücrelerinin etanol üretimi ve selüloz kullanımı için uygun olmadığı görülmüştür.

Test edilen üç atmosfer ortamından etanol üretimi için en uygun atmosfer karışım gazı, şeker birikimi için en uygun atmosfer ise azot gazı olarak bulunmuştur. Önceki çalışmalardaki bulgulara dayanarak [Lamed et al, 1988; Bothun et al, 2004] etanol üretimindeki artıştan karışım gazında bulunan % 5 oranındaki hidrojen gazının sorumlu olabileceği söylenebilir.

Sato ve arkadaşlarının 1991 yılında yapmış oldukları çalışmada *C. thermocellum* suşunun etanol ve laktat üretiminde yaklaşık % 0,6 maya özütüne ihtiyaç duyduğunu, konsantrasyonun artırılmasının etanol ve laktat oranını değiştirmediğini göstermişlerdir. Demain ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada düşük maya özütü konsantrasyonlarında (% 0,2) *C. thermocellum*'un karbon kaynağı olarak sadece selüloz ve sellobiyozu kullandığı, maya özütü konsantrasyonu artırıldığında (% 0,6) ise glukozu özümseyebildiği görülmüştür.

Yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanarak yeniden oluşturulan ve 10 g/l selüloz içeren modifiye edilmiş RM besiyerinde glukoz birikimi daha erken günlerde başlamış ve fermentasyonun yedinci gününde orjinal RM besiyerine kıyasla %77 oranında daha fazla glukoz biriktiği görülmüştür.

Çalışmanın ikinci kısmında tarımsal atıkların değerlendirilmesi amacıyla lignoselülozik içerikli atıkların *C. thermocellum* tarafından kullanılma potansiyelleri incelenmiştir. Atıkların parçalanması sonucu biriken glukoz miktarları ve etanol üretimleri tespit edilmiştir. Bu amaçla arpa sapı, buğday sapı, sazlık otu, mısır kabuğu, palmye ağacı lifi ve barbunya kabuğu kullanılmıştır. Bu kaynakların içeriğinde enzimatik hidrolizi engelleyen lignin bulunması nedeniyle fiziksel ve kimyasal ön işlemlerden geçirilerek besiyerine eklenmiştir.

Alkali hidrolizi yapılan bitki artıklarının birçoğunun *C. thermocellum* tarafından daha kolay kullanıldığı ve bu kültürlerde etanol üretiminin kontrole kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Arpa sapı içeren besiyerinde alkali hidrolizinden geçirilen numunelerde glukoz birikiminin kontrole oranla %14 arttığı gözlenmiştir. Buğday sapı ve sazlık otu içeren besiyerinde de alkali hidrolizin etkili olduğu kontrole kıyasla glukoz birikimini %10 ve 15 oranında arttırdığı görülmüştür. Alkali hidrolizinin yanı sıra tarımsal atıkların hidrolizini kolaylaştırmak amacıyla kullanılan ön işlemler tezin kuramsal temeller bölümünde listelenmiştir. Tarımsal atıkların daha etkin bir şekilde parçalanabilmesi için diğer ön işlemlerin de test edilmesi ve en uygun işlemin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasındaki bulgular daha sonra yapılacak olan detaylı ön işlem uygulamalarına ışık tutacaktır.

Tarımsal atıklarının yanı sıra kağıt fabrikası atıkları da *C. thermocellum* kültürleri için selüloz kaynağı olarak kullanılmıştır. Kağıt fabrikası atıklarının, selüloz içeriği fenol sülfürik asit metodu ile tespit edilmiş ve besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek fermentasyon sonucunda glukoz birikimi ve etanol üretimi tespit edilmiştir. Kağıt fabrikası atıklarının ticari selüloz kadar kullanılabilir olduğu görülmüştür. 20 g/l kağıt fabrikası atığı içeren besiyerinde 6 g/l glukoz biriktiği tespit edilmiştir. Ticari selüloz gibi kağıt fabrikası atıklarının besiyerindeki konsantrasyonunu arttırmanın glukoz birikimine bir katkısı olmamıştır.

Etanol üretim maliyetinin geniş bir kısmını selülaz enziminin üretim maliyeti oluşturur. Bu yüzden selülaz enzimini daha ucuz üretmenin yolları araştırılmaktadır [Szijarto et al, 2004]. Saddler ve Mes-Hartree'nin 1984 yılında aspenağacının buhar gücü ile küçük parçalara ayrılmasından sonra *Trichoderma* ve *Clostridium thermocellum* tarafından selülaz enzimi üretmek için substrat olarak kullanılabilme kapasitelerini ölçmüşlerdir. Bu suşların aspenağacını kullanabildiklerini ve selülaz enzimi ürettiklerini tespit etmişlerdir. En yüksek selülaz aktivitesini % 1 konsantrasyonda substrat eklediklerinde gözlemlemişlerdir yüksek substrat konsantrasyonunun (% 10-20) selülaz aktivitesini engellediğini rapor etmişlerdir. *T. harzianum* kültürüne dışarıdan % 0.1 g/l olacak şekilde glukoz eklenmesi ise selülaz aktivitesini engellemiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonunun selülaz aktivitesini engellediği diğer çalışmalarla da gösterilmiştir [Sun and Cheng, 2002].

Kültür ortamındaki selüloz miktarının ve biriken glukoz miktarının fazla olması selülozun kullanımını engellediği literatürde rapor edilmektedir. Bu nedenle selülozun kesikli kültür yerine sürekli kültür ortamında parçalanması ve biriken glukozun ve üretilen etanolün ortamdaki uzaklaştırılması daha akılcı bir çözümdür. Tez çalışmasının son bölümünde sürekli selüloz parçalanması ve sürekli glukoz üretimi için optimum seyreltme miktarı tespit edilmiştir. Yapılan yarı sürekli kültürlerde elde edilen sonuçlar yüksek glukoz eldesi için en uygun seyreltme miktarının 76 saatte bir 5 ml olduğunu göstermiştir. En yüksek glukoz konsantrasyonu kesikli kültürde elde edilmiştir. Seyreltme faktörü azaldıkça zamanla elde edilen glukoz içerikli kültür hacminin düşmesi nedeniyle 76 saatten daha uzun sürelerde yapılacak seyreltmenin verimliliği düşüreceği görülmüştür.

Selülozun parçalanması sonucu ortamda biriken glukoz etanol üretim kapasitesi daha yüksek bir mikroorganizma tarafından substrat olarak kullanılabilir. Ticari bir selülaz enzimi kullanılmaksızın gerçekleştirdiğimiz deneyler sonucunda ortamda biriken glukozun sürekli birikimi sağlanmıştır. Dışarıdan selülaz enzimi eklenerek veya selülozik maddelere ön işlem uygulanarak daha yüksek miktarlarda selüloz veya selülozik maddenin parçalanması ve daha yüksek glukoz eldesi sağlamak mümkündür. Elde edilen glukoz içeriği yüksek kültürün biyoetanol üretim prosesinde kullanılması besiyeri maliyetini önemli ölçüde düşürecektir.

KAYNAKLAR

Adams, M.W.W., 1993. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:627-258.

Adıgüzel, A., 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.

Akmaz, S., 2001. Selülozun enzimli hidroliz yoluyla glukozaya dönüştürülmesi ve tepkime kinetiğinin incelenmesi, İstanbul Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilimdalı Proses ve Reaktör Tasarımı Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Aspianll, G.O., 1970. Polysaccharides. Pergamon Press., Headington Hill Hall. Oxford.

Ateş, S., 1990. Pamuk bitkisi saplarının kimyasal ve enzimatik yöntemlerle değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim dalı Doktora Tezi, Ankara.

Bailey, E.J., Ollis, D.F., 1986. Sugars and Polysaccharides, *Biochemical Engineering Fundamentals*, Second Edition, Mc Graw-Hill International Editions, 35-42.

Başçetinçelik, A., Öztürk, H.H., Karaca, C., 2005. Türkiye’de tarımsal atıkların değerlendirilmesi rehberi proje no: Life 03 tcy/tr /000061.

Bayer, E.A., Lamed, R., 1988. Cellulosomes from *C. thermocellum*. *Methods in Enzymology*, 160 57:472-482.

Ben-Bassat, A., 1980. Metabolic control for microbial fuel production during thermophilic fermentation of biomass. In *Energy from biomass and waste IV*, 275-301, Institute Gas Technology.

Bilgehan, H., 1994. Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi, Barış yayınları, s,180, İzmir.

Bothast, R., Nichols, N., Dien, B., 1999. Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnol prog* 15:867-875.

Brett, C., Waldron, K., 1996. *Physiology and biochemistry of plant cells walls*, 2nd ed. Champmn&Hall pres, New York.

Brock, T.D., 1967. Life at high temperatures. *Science*, 158:1012-1019.

Bryant, M.P., Robinson, I.M., 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal varration in numbers of bacteria in the rumen. *Journal Dairy Science*, 41:1446-1456.

Camganella, F., and Wiegel, J., 1993. The potantial of thermophilic clostridia in biotechnology, In:Woods, D.R., *The clostridia in Biotechnology*. Butterworth-Heinemann, Boston.pp, 393-429.

Carreira, L., Wiegel, J., Ljungdahl, L.G., 1983. Production of ethanol from biopolymers by anaerobic thermophilic and extreme thermophilic bacteria. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*13:183-191.

Caston, M., and Wilke, C.R., 1980. Adsorption and recovery of cellulases during hydrolysis of newspaper. *Bitechnol. Bioeng.* XXII:1053-1073.

Cheng, J., and Sun, Y., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11.

Coombs, J., 1992. A strategy for commerical Exploitation of Biomass in Europe 2nd World Renewable Energy Congress. Pergamon Pres, Vol:3, 1192-1193.

Coughlan, M.P., Ljungdahl, L.G., 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. *Journal System Bacteriology*, 44: 11-30.

Cowling, E.B., and Kirk, T.K., 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:95-123.

Demain, A., Newcomb, M., Wu, D.J.H., 2005. Cellulase, clostridia, ethanol. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 69:124-154.

Desveaux, M., Guedon, E., and Pettitdemange, H., 2001. Kinetics and methabolism of cellulose degradation at high substrate concentrations in steady-state continous cultures of *clostridium celluloyticum* on chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3042-3048.

Dewey, D., Ryu, Y., Kim, C., 1982. Enzymatic hidrolysis of cellulose :Recent Advances in Reaction Mechanisms. *Synfuels conf.* 3,55-91.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28,350-356.

Dülger, S., 2003. Gönen, Kestanbul ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması. K.T.Ü,Fenbilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.

Eagar, R.L., Psprep, J.M., Ror, J.C., 1983. Chemical studies on oils derived from aspen poplar wood, cellulose and anlsolated aspen poplar linin can.*Chem.*, 61:2010-2015.

Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., 1987. In: Cellulose hydrolysis of cellulosic substances. *Biotechnol. Bioeng.* 21:131-146.

Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.W., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J., 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic rumen fungi functions as a docking domain. *J. Biol. Chem.* 270:29314-29322.

Freier, D., Mothershed, C.P., and Wiegel, J., 1988. Characterization of *C. thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(1):204-211.

Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:618-628.

Gama, F., Teixeira, J., Mota, M., 1994. Cellulose morphology and enzymatic reactivity: a modified solute exclusion technique. *Biotechnol Bioeng* 43:381-387.

Genç, T., 2002. Enerji kaynağı olarak değerlendirilen lignoselülozik maddelerin bazı parametrelerinin tayini. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Van.

Giallo, J., Gaudin, C., Belaich, J.P., 1985. Metabolism and Solubization of Cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10. *Application Environment Microbiology*, 49: 1216-1221.

Guedon, E., Desvaux, M., Petitdemange, H., 2002. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 68:53-58.

Hafizoğlu, H., 1982. Orman ürünleri kimyası. K.T.Ü, Orman Fakültesi, K.T.Ü Basımevi, Fakülte Yayın No:52, Trabzon, s,1-245.

Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R., Olsen, G., 1999. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic methanococcus species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:3578-3583.

Hann, R.D., Rose, S.H., Lynd, L.R., and Van Zyl, W.H., 2007. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabol. Eng.* 9:87-94

Hjörleifsdóttir, S., Ritterbusch, W., Petursdóttir, S., and Kristjánsson, J.K., 1997. Thermostabilities of DNA ligase and DNA polymerases from four genera of thermophilic eubacteria. *Biotechnology Letters*. 19(2),147-150.

Hogsett, D.A., Ahn, H.J., Hill, P.W., South, C.R., and Lynd, L.R., 1992. Direct microbial conversion: Prospects, Progress, and Obstacles. *Appl. Biotechnol. Prog* 15:855-866.

Holtzapfel, M., 1993. Cellulose. In: Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ, editors. *Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition*. London Academic Press. 2731-2738.

Howard S. Howard R.L., Abotsi E., Jansen Van Resburg E.L., 2003. review Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production.

Hungate, R.E., 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriology Rev.* 14: 1-50.

Ingram, L.O., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., and York, S.W., 1997. Fuel ethanol production from lignocellulose using genetically engineered bacteria. In: Saha, B.C., Woodward, J. (Eds), *Fuels and Chemicals from Biomass*. American Chemical Society, Washington, DC, pp, 57-73.

Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C.C., Causey, T.B., Martinez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yamono, L.P., York, S.W., Zaldivar, J., and Zhou, S., 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog* 15:855-866.

Jeewon, L., 1997. Biological conversion of biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56:1-24.

Johnson, E.A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A., and Demain, A.L., 1982. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1125-1132.

Johnson, E.A., 1983. Regulation of cellulase activity and synthesis in *Clostridium thermocellum*. Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.

Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Hirth, T., Schulze, M., 2006. Lignocellulose-based chemical products and family trees. In: *Biorefineries: Industrial Processes and products Vol.2*. Eds. Kamm B, Gruber PR, Kamm M. Wiley-VCH Weinheim, Germany, pp, 97-149.

Kırcı, H., 2000. Kağıt hamuru endüstrisi ders notları. K.T.Ü, Trabzon, s.269.

Klyosov, A., 1990. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry* 29:10577-10585.

Kountinas, A.A., Wang, R., and Webb, C., 2004. Restructuring Upstream Bioprocessing: Technological and Economical Aspects for Production of Generic Mikrobial Feedstock From Wheat. *Biotechnol Bioeng.* Mar 5;85(5):524-38.

Kristjansson, J.K., Hregguridsson, G.O., 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World J. Microbiol Biotechnol.* 11:17-25.

Kurose, N., and Tonomura, K., 1994. In Y. Murooka, T. Imaka (eds) *Rekombinant Microbes for industrial and Agricultural Applications*. Marcel Dekker, New York, p741.

Lamed, R., and Bayer, E.A., 1988. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. In Laskin, A.I. (ed) *Adv. Appl. Microbiol.* 33:2.

Lamed, R., and Zeikus, J.G., 1980. Ethanol production by thermophilic Bacteria: Relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii* Journal of Bacteriology, Vol.144 no.2 p.569-578.

Lee, S.B., Ha, J.K., Kang, H.S., McAllister, T., and Cheng, K.J., 1997. Overview of energy metabolism, substrate utilization and fermentation characteristics of ruminal anaerobic fungi. Korean J. Anim. Nutr. Feed-stuffs 21:295-314.

Li, X.-L., Cheng, H., and Ljungdahl, L.G., 1997. Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus orpinomyces strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. Appl. Environ. Microbiol. 63:4721-4728.

Lynd, L., Weimer, P., VanZyl, W., Pretorius, I., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev 66:506-577.

Maldas, D., Shiraishi, N., 1996; Liquefaction of Wood in the Presence of Phenol Using Sodium Hydroxide as a Catalyst and Some of its Characterizations. Polym.-Plast. Technol.Eng., 35, 6, 917-933

Mandels, M., 1975. Microbial sources of cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp 5:81-105.

Mandels, M., Andreotti, R., 1971. Continuous conversion of cellulose to glucose J.Polymer. Sci. 36:445-459.

Maugeri, F., and Goma, G., 1988. Thermophilic degradation of cellulose by *C. thermocellum*. Rev. Microbiol. 19, 3:271-276.

McBee, R.H., 1948. The culture and physiology of thermophilic cellulose-fermenting bacterium. J.Bact. 56:653-663.

McBee, R.H., 1950. The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria. Division of plant Nutrition, University of California, Berkeley, California.

Miller, T.L., Wolin, M.J., 1974. A. Serum bottle modification of the hungete technique for cultivating obligate anaerobes, *Application Microbiology*, 27: 985-987.

Mielenz, J.R., 2001. Ethanol production from biomass:technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:324-329.

Ng, T.K., and Zeikus, J.G., 1988. Endoglucanase from *C. thermocellum*. *Methods in Enzymology*, 160(38):351-254.

O'Dwyer, J.P., 2005. Developing a fundamental understanding of biomass structural features responsible for enzymatic digestibility. University of Louisiana-Lafayette.

Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Graulund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., and Zacchi, G., 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharoyces cerevisiae* TMB 3400. *J.Biotechnol.* 126:488-499

Palonen, H., 2004. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. University of Technology Espoo, Finland.

Patni, N.J., and Alexander, J.K., 1971. Utilization of glucose by *Clostridium thermocellum*. Presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts. *J.Bacteriol.* 105:220-225.

Perez, J., Munoz-Dorado, J., Rubia, T., Martinez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An Overview.

Rani, S.K., Swamy, M.V., and Seenayya, G., 1997. Production of ethanol from various pure and natural cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* strain SS21 SS22. *Process Biochemistry* Vol, 33 pp.435-440.

Ryu, D.D.Y., Mandels, M., 1980. Cellulase biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2:91-102.

Saddler, J.N., Khan, A.W., 1981. Cellulolytic enzyme system of *Acetovibrio cellulolyticus*. *Can. Journal Microbiology*, 1730-1736p.

Sato, K., Goto, S., Yonemura, S., Sekine, K., Okuma, E., Takagi, Y., Hon-Nami, K., and Saiki, T., 1991. Effect of yeast extract and vitamin B12 on ethanol production from cellulose by *Clostridium thermocellum* I-1-B.

Shet, K., and Alexander, J.K., 1969. Purification and properties of b-1,4-oligoglucan:orthophosphate glucosyltransferase from *C. thermocellum*. *J.Biol.Chem.*,244 2:457-464.

Silverstein, R., 2004. A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. Biological and Agricultural engineering, Ph. D. Thesis North Carolina State University.

Sivers, M.V., Zacchi, G., 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour. Technol.*51:43-52.

Skirnisdottir, S., 2000. Phylogenetic characterization of microbial mats and isolation of thermus spp.and sulfur-oxidizing bacteria from Icelanddic hot springs. Fjölritunarstofa Daniels Halldarssonar, Department of Biotechnology Lund University, Sweden, pp 3-6.

Son, Ç.D., 1999. Isolation and optimization of growth conditions of thermophilic bacteria from Turkish soils and hot springs.Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Spink, C.H., Chaires, J.B., 1999. Effects of hydration, ion release, and excluded volume on the melting of triplex and duplex DNA. *Biochemistry*, 38:496-508.

Stetter, K.O., 2001. In: Astrobiology-The quest for conditions of life (G.Horneck and Ch.Baumstork-Khan, eds) Springer verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, London, Milan, Paris, Tokyo, pp.169-184.

Stevenson D.W., and Weimer, D.J., 2005. Expression of 17 genes in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during fermentation of cellulose or cellobiose in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol 71:4672-4678

Szczodrak, J., Fiedurek, J., 1996. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Biomass Bioenergy 10:367-375.

Szijarto, N., Szengyel, Z., Liden, G., and Reczey, K., 2004. Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. Appl. Biotechnol. Spring; 113-116:115-24.

Teri, T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobihydrolases. Tibtech 15:160-167.

Tolner, B., Poolman, B., and Konings, W.N., 1997. Adaptation of microorganismis and their transport systems to high temperatures. Comp. Biochem. Physiol., 118A/3,423-428.

Tsao, G.T., 1978. Fermentation substrates from cellulosic materials:production of fermentable sugars from cellulosic materials. Ann. Rep. Ferment. Proc. 21-21.

Tsoi, T.V.,Chuilvilskaya, A.,Atakishieava,Y., Akimenko, V.K., and Boronin, A.M., 1987. Genetika, Mikrobiologiga, Virusologiya 11:18-23

Tyson, K.S., Riley, C.J., and Humphereys, K.K., 1993. Fuel cycle evaluations of biomass ethanol and reformulated gasoline. Report no. NREL/TR-463-4950, National renewable energy labrotary: Golden, CO,Vol.1.

Ulbrik, T.Y.L., 1991. Cellulolytic fermentation by *Clostridium thermocellum*. P.h. D, Georgia Institute of Technology,

Van Wyk, V., and Jacobus, P.H., 2001. Biotechnology and utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in Biotechnol.* 19(5):172-177.

Viljoen, Fred and Peterson., 1926. The fermentation of cellulose by thermophilic bacterie. *J. Agric. Sci. Camb* 16:1-17.

Wald, S., Wilke, C.R., and Blanch, H.W., 1984. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 26:221-230.

Wood, TM.G., Campayo, V., 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1:147-61.

Wu, Z., Lee, Y.Y., 1997. Inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotech. Lett.* 19:977-979.

Wyman, C., 1994. Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation. *Appl. Biochem Biotechnol* 45/46:897-915.

Zaldivar, J., Nielsen, J., and Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jul;56(1-2)17-34.

Zhang, Y., Himmel, M.E, Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24:452-481.

Zhang, Y.H., Cui, J.B., Lynd, L.R., Kuang, L.R., 2006. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidences from enzymatic hidrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*, 7(2):644-8.

Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of clostridium thermocellum. *Appl Environ Microbiol* 70:1563-9.

ÖZGEÇMİŞ

Özlem Özpınar, 1981’de İzmit’te doğdu. Merkez Ortaokulu’nu bitirdikten sonra lise eğitimini Özel Kocaeli Lisesi’nde tamamladı. 2000 yılında Kocaeli Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde Çevre Mühendisliği bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.