

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FENBİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUTUKLANMIŞ MAYA HÜCRELERİ
(*Saccharomyces cerevisiae*) KULLANILARAK
SÜREKLİ SİSTEMDE ETANOL ÜRTİMİ

PINAR KARAGÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2007

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FENBİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUTUKLANMIŞ MAYA HÜCRELERİ
(*Saccharomyces cerevisiae*) KULLANILARAK
SÜREKLİ SİSTEMDE ETANOL ÜRTİMİ

PINAR KARAGÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
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 Pınar KARAGÖZ 'ün tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

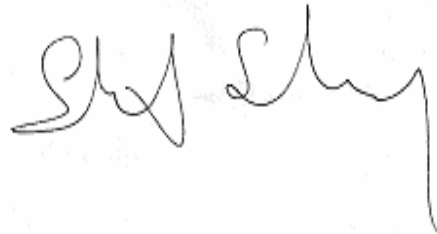
ÜYE

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



ÜYE

: Doç. Dr. Elif ERHAN



ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK



ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI : Tutuklanmış Maya Hücreleri (*Saccharomyces cerevisiae*) Kullanılarak Sürekli Sistemde Etanol Üretimi

YAZAR ADI : Pınar KARAGÖZ

Biyoeanol, günümüzde petrole alternatif olarak kullanılan bir yakıt olmakla birlikte yenilenebilir enerji kaynağı olması sebebiyle de büyük önem taşımaktadır. Biyoeanol üretimi ve kullanımı açısından diğer Avrupa devletlerine kıyasla geride olan ülkemiz için bu konuda yapılan ve yapılacak olan çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 maya hücrelerinin etanol üretimi incelenmiştir. İlk olarak besiyeri bileşenlerinin ve fiziksel koşulların etanol üretimine olan etkisi kesikli kültürde araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda besiyerindeki maya özütü konsantrasyonunun etanol üretimi için önemli olduğu ve en uygun konsantrasyonun 5 g/L olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek metal konsantrasyonlarının etanol üretimine olumsuz etki yaptığı görülmüştür. Sıcaklığın etanol üretimi üzerinde fazla etkili olmadığı, ancak 37 °C’de diğer sıcaklıklara kıyasla üretimin daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında *S. cerevisiae* hücreleri iç faz emülsiyonu yüksek bir polimer olan polyHIPE polimer üzerine tutuklanmış ve sürekli sistemde etanol üretimi takip edilmiştir. Besiyerindeki farklı glukoz konsantrasyonlarının sistemin performansına olan etkileri incelenmiştir. 6,7-250 g/L aralığında glukoz konsantrasyonuna sahip besiyerleri 1 ml/dk akış hızıyla ve 50 g/L glukoz içeren besiyeri 1, 2, 3, 6, 9, 12 ml/dk akış hızlarıyla çalışılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyerlerinin sabit akış hızı ile sisteme verildiği deneyler sonucunda

50 g/L glukoz içeren besiyeri 1 mL/dk hızla geçirildiğinde reaktörün en yüksek verimlilikte çalıştığı gözlenmiştir. Besiyerindeki glukoz konsantrasyonu 150 g/L'yi geçtiğinde sistemde substurat inhibisyonu görülmüştür. En yüksek etanol üretkenliğine (929 g/gün) 50 g/L glukoz içeren besiyeri 6 ml/dk akış hızı ile sistemden geçirildiğinde ulaşılmıştır. Reaktör içerisindeki kuru hücre ağırlığı destek materyalin gramı başına iki gram olarak hesaplanmıştır. Tarayıcı Elektron Mikroskobu ile yapılan incelemeler polyHIPE polimer matrisinin maya hücrelerinin immobilizasyonu için son derece kullanışlı olduğunu ve hücrelerin polimerin yalnızca yüzeyine tutunduğunu göstermiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında ise selülitik anaerobik bir mikroorganizma olan *Clostridium thermocellum* bakterisinin selülozu kullanımı sonucu ortaya çıkan glukozun tutuklanmış maya hücreleri tarafından kullanımı ve etanol üretimi incelenmiştir. *C. thermocellum* kültür sıvısıyla gerçekleştirilen deneylerde bu sıvının *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi içi kullanılabilir nitelikte olduğu görülmüştür. Yaklaşık 7 g/L glukoz içeren *C. thermocellum* kültürü ile reaktörün beslenmesi sonucunda glukozun % 19 oranında etanole dönüştüğü görülmüştür. Kültür sıvısında metabolik artıklar ve besin yetersizliği olabileceği düşünülerek %75 oranında taze besiyeri ilavesi yapılmış ve sürekli sistemde etanol üretiminin % 83 oranında artışı görülmüştür.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Ethanol Production by Using Immobilized Yeast Cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in Continuous System

AUTHOR : Pınar KARAGÖZ

Being renewable and clean energy source, bioethanol is an important fuel which can be used as an alternative to petroleum. Studies on bioethanol production has great importance in Turkey because our country is not as competitive as other European countries in bioethanol production and use.

In this study, bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 strain was investigated. First, effect of media components and physical parameters on ethanol production by this strain were studied. Yeast extract was found to be effective nutrient on ethanol production. The most suitable yeast extract concentration was determined to be 5 g/L in the medium for increased ethanol production. High metal concentrations in the medium caused a decrease in the amount of ethanol. It was also shown that ethanol production at 37 °C was higher as compared to those obtained at other incubation temperatures. Nonetheless, the effect of incubation temperature on production was not so remarkable.

In the second part of thesis, *S. cerevisiae* cells were immobilized on polyHIPE polymer, which has high internal phase emulsion, and ethanol production in continuous packed-bed reactor was monitored at various glucose concentration in the feed medium. A large initial concentration range of glucose between 6,7-250 g/L was studied at 1 mL/min and 50 g/L glucose gave the maximum efficiency. Substrate inhibition was observed when glucose concentration in feed medium was higher than 150 g/L. 50 g/L glucose containing medium was fed into the reactor at flow rates of 1, 2, 3, 6, 9, 12 ml/min. Ethanol productivity reached its highest value (929 g/d) at

the flow rate of 6 ml/min. The dried weight of the cells was found to be ca. two g for per gram of cell supporting material. Scanning electron microscope photographs showed that the polyHIPE polymer can successfully be used for yeast cell immobilization. A very homogenous thick layer of yeast cells were seen from the scanning electron micrographs only on the surface of the polymer giving rise to less diffusion limitations.

In the last part of the thesis, glucose accumulated at the end of cellulose degradation was used as substrate for immobilized *S. cerevisiae* cells in batch and packed-bed reactor. Cellulose was degraded in *Clostridium thermocellum* culture and about 7 g/L glucose accumulated at the end of this degradation process. It was observed that the culture was found to be usable by *S. cerevisiae*. 19% of glucose in *C. thermocellum* culture was converted to ethanol by yeast cells. It was thought that presence of some metabolic by products and nutrient limitation in *C. thermocellum* culture might cause limited utilization of glucose. Ethanol production increased by 83% when the culture mixed with 75% fresh medium was fed into the reactor.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını sunan, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Melek ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca immobilize hücre reaktörü çalışmalarında yol gösteren ve her zaman destek olan değerli hocam Doç. Dr. Elif ERHAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Başta Özlem ÖZPINAR olmak üzere yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarım Özlem TERZİ, İbrahim TAN, Derya Yüksel KÖSEOĞLU, Şeyda KORKUT ve Ülker Diler KERİŞ'e en derin duygularla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Biyoetanol	3
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3. Dünyada Biyoetanol Kullanımı ve Üretimi	7
2.3.1. Biyoetanolün Tercih Edilme Sebepleri	7
2.3.2. Dünya, Avrupa ve Türkiye’de Biyoetanol Üretimi	8
2.4. Biyokütleden Etanol Üretim Prosesleri	11
2.4.1. Şeker Pancarından Etanol Üretimi	14
2.4.1.1. Temizleme ve Öğütme Aşaması	14
2.4.1.2. Fermentasyon	14
2.4.1.3. Distilasyon/Rektifikasyon (İleri Distilasyon) /Saflaştırma	14
2.4.2. Mısırdan Etanol Üretimi	16
2.5. Biyoetanol Üretiminde Ucuz Karbon Kaynağı Arayışları	17
2.6. İmmobilizasyon ve Biyoetanol Üretiminde İmmobilize Sistemler	20
2.6.1. Askıda ve İmmobilize Sistemler	20
2.6.2. Hücre İmmobilizasyonu	21
2.6.2.1. Hücre İmmobilizasyonu Metotları ve Biyoetanol Üretimi	23
2.6.3. İmmobilize Hücreler İçin Reaktör Tipleri	24
3. MATERYAL	26
3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	26

3.2. Besiyerleri	26
3.3. Reaktörün ve Polimerin Hazırlanışı	26
3.4. Maya Özütü Hazırlanması	27
4. YÖNTEM	28
4.1. Kesikli Sistemde Mikroorganizmaların Ekimi	28
4.2. Üremenin Takibi	28
4.3. Glukoz ve Etanol Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	29
4.4. Sürekli Reaktörde <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinin Tutuklanması	30
4.5. Hücre Tutuklamalı Reaktör Çalışmalarında Kullanılan Eşitlikler	31
4.6. Reaktördeki Kuru Hücre Ağırlığının Tespiti	32
4.7. PolyHIPE Polimere Tutuklanmış Maya Hücrelerinin Tarayıcı (Scanning) Elektron Mikroskobu ile Görüntülenmesi	32
5. BULGULAR	33
5.1. <i>S. cerevisiae</i> ile Etanol Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi	33
5.2. Besiyeri Bileşen Konsantrasyonlarının ve Fiziksel Parametrelerin <i>S. cerevisiae</i> 'nin Etanol Üretimine Etkisi	37
5.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hücrelerinin PolyHIPE Polimere Tutuklanması ve Dolgu Yataklı Reaktörde Etanol Üretimi	53
5.4. <i>C. thermocellum</i> Kültür Sıvısında Selülozun Parçalanması Sonucu Biriken Glukozun Etanol Üretiminde Kullanımı	59
6. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	73
EK 1	74

SİMGELER DİZİNİ

cm	: santimetre
Cso	: Giriş glukoz konsantrasyonun
Cs	: Çıkış glukoz konsantrasyonu
dk	: dakika
dm ³	: desimetre küp
E (%)	: Glukoz kullanım verimi
Ep (%)	: Etanol üretim verimi
g	: gram
k	: Maksimum spesifik substurat parçalama hızı
kg	: kilogram
Km	: Yarı hız sabiti
Ks	: Substurat inhibisyon sabiti
L	: Litre
M	: Molar
ml	: mili litre
µm	: mikro metre
mmHg	: milimetre civa
mmol	: mili mol
nm	: nano metre
P	: Etanol Konsantrasyonu
P/M	: Üretilen etanolün biyomassa oranı
Pf	: Etanol üretkenliği
Q	: Debi
rpm	: Dakikada devir sayısı
-rsu	: Substurat parçalama hızı
S	: Substurat konsantrasyonu
SEM	: Tarayıcı Elektron Mikroskobu
t	: Bekleme süresi
V	: Reaksiyon hızı
Vm	: Maksimum reaksiyon hızı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Mikroorganizmalar tarafından etanol oluşumunda izlenen yollar	4
2.2. Pirüvatın etanole dönüşümündeki enzimatik basamaklar	5
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nin Tarayıcı Elektron Mikroskopunda elde edilmiş görüntüsü	6
2.4. Tarihsel süreçte biyoetanol kullanım türleri	8
2.5. Avrupa Birliği'nde biyoyakıt kullanımının gelişimi	10
2.6. Biyokütlenin enerji üretiminde kullanımı	11
2.7. Etanol üretim prosesinde zamana bağlı değişimler	13
2.8. Şeker pancarından biyoetanol üretim prosesi	15
2.9. Mısırdan yaş öğütme yöntemiyle etanol üretimi	17
2.10. Lignoselülozik kaynaklardan biyoetanol eldesi prosesi	19
2.11. En çok kullanılan immobilize hücre reaktörü tipleri	24
3.1. İmmobilize hücre reaktörü	27
4.1. HPLC analizinde glukoz ve etanole ait sinyal pikleri	29
5.1. 20 g/L glukoz içeren besiyerlerinde <i>S. cerevisiae</i> 'nin üremesi (A) ve etanol üretimi (B)	35
5.2. 100 g/L glukoz içeren besiyerlerinde <i>S. cerevisiae</i> 'nin üremesi (A) ve etanol üretimi (B)	36
5.3. Besiyerindeki fosfat konsantrasyonunun <i>S. cerevisiae</i> 'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi	39
5.4. Üre konsantrasyonunun <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimine etkisi	40
5.5. Besiyerindeki ticari ve laboratuarda hazırlanmış maya özütü konsantrasyonunun <i>S. cerevisiae</i> 'nın etanol üretimine etkisi	41
5.6. Besiyerindeki mineral konsantrasyonunun <i>S. cerevisiae</i> 'nın üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi	42
5.7. Besiyeri pH sınırının <i>S. cerevisiae</i> 'nin üreme hızına (A) ve etanol (B) etkisi	44
5.8. Farklı şekerler içeren besiyerlerinde <i>S. cerevisiae</i> 'nın üreme hızları	45
5.9. Kesikli sistemde glukoz konsantrasyonunun <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimine (A) ve glukoz kullanım ve etanol üretim verimlerine (B) etkisi	47

- 5.10. Atmosfer koşullarının *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol 49
üretimine (B ve C) etkisi
- 5.11. Sıcaklığın *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) 50
etkisi
- 5.12. Çalkalama koşullarının *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol 51
üretimine (B) etkisi
- 5.13. Basıncın *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi 52
- 5.14. 100 g/L giriş glukoz konsantrasyonu ve 1 ml/dk akış hızında sürekli 55
sistemin zamanla satabil hale ulaşması
- 5.15. 1 ml/dk debide giriş glukoz konsantrasyonunun etanol üretim ve glukoz 56
kullanımı verimleri (A) ve reaksiyon hızına (B) etkisi
- 5.16. 50 g/L glukoz içeren besiyerinde debinin çıkış etanol ve glukoz 58
konsantrasyonları (A), etanol üretim verimi ve glukoz kullanım verimi (B) ve
etanol üretkenliği ve glukoz kullanım hızı (C) üzerine etkisi
- 5.17. *C. thermocellum* kültüründe zamana bağlı glukoz birikimi ve etanol 59
üretimi
- 5.18. Dolgu yataklı reaktörde kullanılan polimerler ve tutuklanmış maya 62
hücrelerinin SEM görüntüleri

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Biyoetanolün fiziksel özellikleri	3
2.2. Çeşitli bitki türleri için biyoyakıt verimi	12
4.1. Kinetik hesaplamalarda kullanılan eşitlikler	31
5.1. <i>S. cerevisiae</i> için kullanılan dört farklı besiyeri ve içerikleri	34
5.2. <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimi üzerinde etkisi incelenen besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonları ve pH değerleri	38
5.3. Besiyeri optimizasyonunda incelenen mineral kombinasyonları	41
5.4. Etanol üretimi üzerinde etkisi incelenen fiziksel parametreler	48
5.5. Hücre tutuklamalı dolgu yataklı reaktörde farklı glukoz konsantrasyonları ve farklı debilerde elde edilen veriler	54
5.6. Farklı oranlarda taze besiyeri ile karıştırılmış <i>C. thermocellum</i> kültür sıvısında maya hücrelerinin glukoz kullanım verimi ve etanol üretim miktarı	60

1. GİRİŞ

Hızlı nüfus artışı, sanayileşme, insan ihtiyaçlarının artması ve çeşitlilik kazanması ihtiyaç duyulan enerji miktarını gün geçtikçe arttırmaktadır. Artan enerji ihtiyacına karşılık sürekli azalmakta ve tükenmekte olan petrol, doğalgaz gibi sınırlı rezerve sahip yakıtlar, dünya ülkeleri sınırları içerisinde eşit olarak dağılmadığından gün geçtikçe daha büyük boyutlu sorunlar yaratmaktadır. Oluşumu uzun zaman almış olan fosil kaynakların tüketimi bu kaynakların azalmasına ve fiyatlarının artmasına sebep olmuştur. Günümüzde insan ihtiyaçlarının artması ve bu ihtiyaçların farklılaşması nedeniyle enerji ihtiyacı da artış göstermiştir. Azalmış olan fosil kaynakları artık insanoğlunu yenilenemeyen petrol kaynakları yerine yenilenebilir enerji arayışlarına itmiştir. Fosil yakıtların çıkarımı, hazırlanması ve yakılması sonucunda ortaya çıkan çevresel sorunların görmezden gelinemeyecek düzeye ulaşması bu arayışın en önemli sebeplerinden biridir.

Yenilenebilir ve temiz enerji elde etmek için yapılan çalışmalar sonucunda ‘temiz enerji’ olarak adlandırılan güneş, rüzgar, dalga enerjisi ve hidrolik enerji bulunmuştur. Bu kaynakların yanı sıra biyokütleden elde edilen ve ‘yeşil yakıtlar’ olarak bilinen biyodizel, biyogaz ve biyoetanol gibi enerji kaynakları tespit edilmiştir. Yeşil yakıt olarak adlandırılan bu biyoyakıtların kullanımının yaygınlaşması trafikten kaynaklanan hava kirliliğinin önemli ölçüde azalmasına katkıda bulunacaktır.

Yeşil enerji kaynaklarından biri olan biyoetanol, genellikle şeker pancarı, mısır, buğday gibi tarımsal ürünlerden elde edilen; çevre dostu ve oktan sayısı yüksek bir biyoyakıttır. Benzine katılmasıyla oktan sayısını artırır ve hidrokarbon, CO emisyonlarını azaltarak sera etkisini azaltıcı özellik kazandırır. Ayrıca etanol, çeşitli kimyasal maddelerin üretiminde hammadde olarak da kullanılmaktadır.

Biyoetanol, en basit ifadesiyle, şekerin fermentasyonu sonucunda elde edilen bir üründür. Günümüzde daha çok mısır ve şeker pancarı kullanılarak üretilmektedir. Yakın gelecekte bu maddelerin temininde sınırlamalar

olabileceğinden lignoselülozik biyokütle etanolün gelecekteki tedarığı için çekici bir besin stoğu olarak görülmektedir [Gray et al, 2006]. Lignoselülozik maddelerden etanol üretimi için pek çok ön arıtma ve parçalama teknikleri geliştirilmiş olmakla beraber, kullanılan her bir yöntemin maliyeti arttırıcı etkisi söz konusudur. Bu nedenle maliyeti düşük ve etkili olan ön arıtma ve parçalama prosesleri arayışları devam etmektedir. Bu arayışlardan biri de fermentatif mikroorganizma kullanımıdır. Biyoetanol üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalardan biri olan *Saccharomyces cerevisiae*, özelliklerinin çok iyi bilinmesi, bu amaçla uzun yıllardır kullanılması ve insana zararlı etkisinin bulunmaması nedeniyle günümüz çalışmalarında oldukça sık rastlanan bir türdür.

Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri biyoetanol üretiminde dünya ülkeleri arasında en başta gelmektedir. Bu iki ülkede de E85 olarak isimlendirilen, %85 etanol, %15 petrol içeren yakıt ile çalışan araçların kullanımı oldukça yaygındır. Biyoetanol üretimi ve taşıtlarda yakıt olarak kullanımı günümüzde Avrupa ülkelerinde de hızla yaygınlaşmaktadır. Ne yazık ki ülkemiz biyoetanol üretimi ve kullanımı açısından Avrupa ülkelerinin oldukça gerisinde kalmıştır. Ülkemiz, geniş ve verimli tarım alanlarına, mısır ve buğday üretiminin yıllardır yapılmakta olması nedeniyle bu alanda yetişmiş çiftçi kapasitesine sahip olması bakımından aslında biyoetanol üretimi için oldukça avantajlı bir konumdadır. Ancak bu alanda yapılan araştırma ve çalışmaların yetersizliği, gerekli ilgi ve desteği bulamaması nedeniyle biyoetanol üretimi ve kullanımı bakımından oldukça geri kalmıştır.

Bu tez çalışmasında maya hücreleri tarafından gerçekleştirilen etanol üretiminin artırılması ve selülozun parçalanması sonucu oluşan glukozun kullanılması suretiyle besiyeri maliyetinin düşürülmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyoetanol

Etanol en basit ifadesiyle, başta maya olmak üzere mikroorganizmalar tarafından şekerin fermentasyonu sonucunda oluşan, kıymetli bir üründür. Biyoetanolün fiziksel özellikleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir. 1815’te Gay-Iussac tarafından bulunan etanolün oluşma reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir:

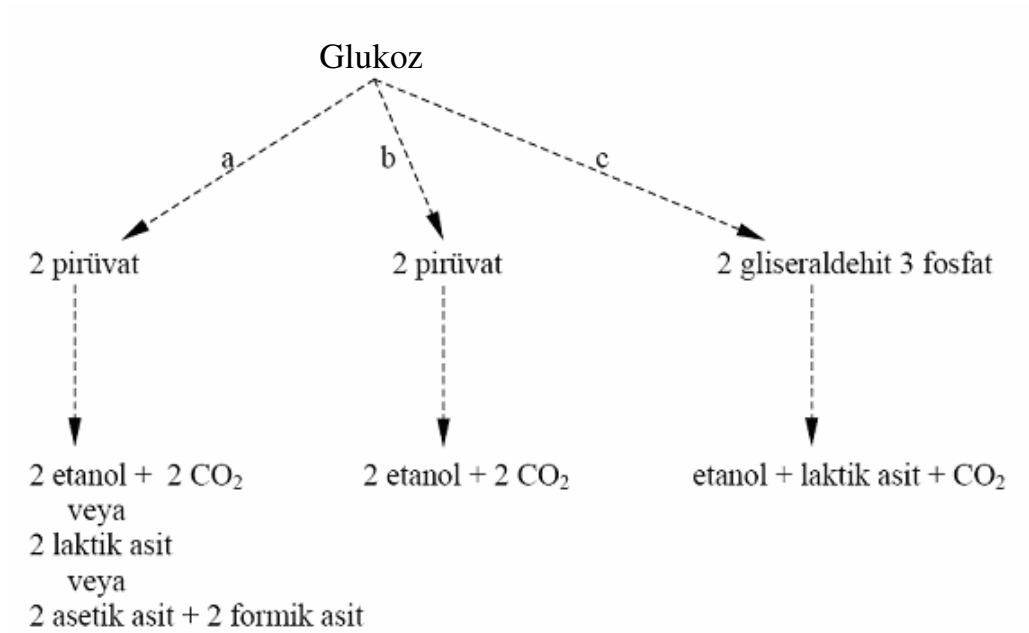


Bu reaksiyon formülüne göre 100 gram glukozdan 51,142 gram etanol oluşmaktadır. Bu teorik verim olarak da adlandırılabilir. Ancak yapılan pek çok çalışmada mikroorganizma türü, ortam şartları, karbon kaynağının bileşimi gibi pek çok unsurun etanol üretim verimi üzerinde etkili olduğu görülmüştür [Avcı, 2004].

Çizelge 2.1. Biyoetanolün fiziksel özellikleri [Acaroğlu ve ark., 2004]

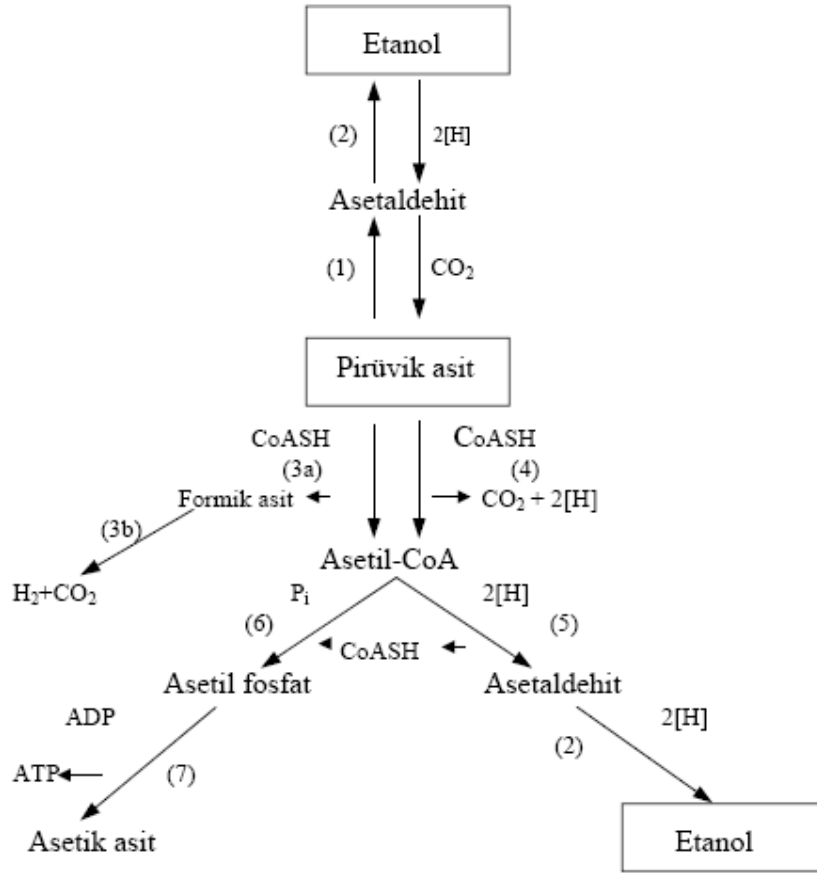
Özgül Ağırlık	0,79 kg/dm ³
Buhar Basıncı (38 °C)	50 mmHg
Kaynama Sıcaklığı	78,5 °C
Dielektrik Katsayısı	24,3
Suda Çözünme	∞

Şekerin mikroorganizma tarafından kullanılıp etanol ürününe dönüştürülmesinde farklı metabolik yollar izlenmektedir. Kullanılan üç farklı metabolik yol Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Etanol üretimi için günümüzde en çok kullanılan mikroorganizma, bir maya türü olan *S. cerevisiae*’ dır. Mayalar glukozu parçalamak için fruktoz-di fosfat yolunu kullanırlar ve bu yol sonucunda bir molekül glukozdan iki molekül etanol oluştururlar [Wiegel, 1980].



Şekil 2.1. Mikroorganizmalar tarafından etanol oluşumunda izlenen yollar: (a) mayalar, birçok mezofilik ve termofilik bakterilerde kullanılan FDP (Fruktoz di fosfat) izyolu; (b) *Zymomonas* ve *Pseudomonas*'larda kullanılan KDPG (ketodeoksifosfoglukanasit) izyolu; (c) Heterofermentatif izyolu [Wiegel, 1980].

FDP izyolunu izleyen birçok mikroorganizmada ve bütün heterofermentatif laktik asit bakterilerinde asetik asitin yanında bir miktar laktik asit de oluşmaktadır. Heterofermentatif laktik asit bakterilerinin, glukozu parçalamak için değişik bir izyolu izlediği (Şekil 2.1.(c)), bunlarda ksilüloz-5-fosfat üzerinden, gliseraldehit-3-fosfat ve asetil fosfat oluştuğu; asetil fosfatın, önce asetil-CoA' ya, daha sonrada etanole dönüştürüldüğü belirlenmiştir [Wiegel, 1980]. Şekil 2.1.(a) ve (b)'de görülen pirüvatın etanole dönüşüm izyolu ve işlev gören enzimler Şekil 2.2'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

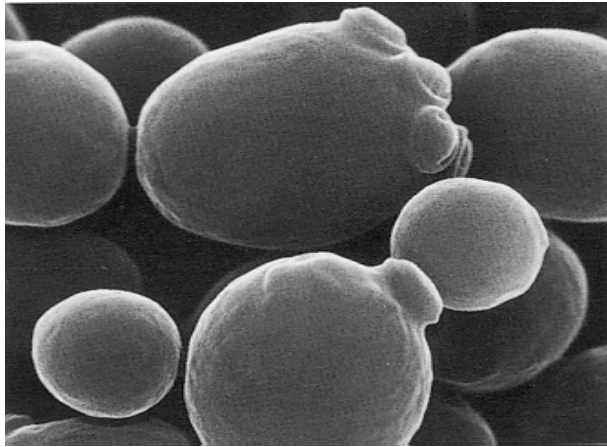


Şekil 2.2. Pirüvatın etanole dönüşümündeki enzimatik basamaklar: (1) Pirüvat dekarboksilaz, (2) Alkol dehidrogenaz, (3a) pirüvat-format liyaz, (3b) Format hidrojen-liyaz reaksiyonu, (4) Pirüvat-ferrodoksin oksidoredüktaz, (5) Asetaldehit dehidrogenaz, (6) Fosfotransasetilaz, (7) Asetat kinaz. CoASH.

Etanol üreticisi mikroorganizmaların, izyoluna ve oluşan etanol miktarına bağlı olarak enerji verimleri arasında da önemli farklılıkların bulunduğu saptanmıştır: Mayalar, 1 mol glikozdan 2 mol etanol oluşturmakta ve 2 ATP kazanmaktadırlar; *Zymomonas*' lar KDPG yolu ile 1 ATP, heterofermentatif laktik asit bakterileri ise eğer asetil-CoA'nın tamamını etanole dönüştürürlerse, 1 ATP oluşturmaktadırlar. FDP yolunu izleyen bakterilerin çoğu, 2 ATP' yi bu izyolundan, ayrıca asetil fosfat yoluyla asetik asit oluşumundan da 1 ATP olmak üzere toplam 3 ATP kazanmaktadırlar [Avcı, 2004].

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae çok eski zamanlardan beri ekmek ve bira yapımında kullanılan bir mayadır. Tomurcuklanarak çoğalan, yuvarlak biçimli, hücre çapları yaklaşık 5-10 μm olan ökaryotik bir mikroorganizmadır. Ökaryotik mikroorganizmalar arasında çok fazla çalışılmış bir canlıdır. Ökaryotik canlıların hücre fizyolojisi ve genetik bilgilerine ait çalışmalarda son derece önemli bir rol oynamıştır. Endüstride yaygın olarak kullanıldığından günümüzde halen önemini sürdürmektedir. *S. cerevisiae* glukoza parçalamak için fruktoz-di fosfat yolunu kullanırlar ve bu yol sonucunda bir molekül glukozdan iki molekül etanol üretirler.



Şekil 2.3. *Saccharomyces cerevisiae*'nin Tarayıcı Elektron Mikroskobunda elde edilmiş görüntüsü [<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.gif>]

Günümüzde yaklaşık 600 maya türü bilinmektedir. Genellikle mayanın alkol endüstrisinde üremesi ve fermentasyonu kesikli veya yarı kesikli olarak çalışılmaktadır. Kesikli sistemde maya değişik yaşam evrelerinden geçer. Hücrenin tüm bu yaşamsal evreleri geçirebilmesi için enerjiye, dolayısıyla besin maddesi ve bir son elektron alıcısına ihtiyacı vardır. Çoğu mikroorganizma için son elektron alıcısı oksijendir. Hücre içinde oksijen alımı bir difüzyon mekanizmasını takip eder. Düşük oksijen konsantrasyonları altında oksijen alım hızı besiyerindeki oksijen konsantrasyonuyla sınırlanır. Oksijen konsantrasyonundaki artışla hız bir maksimum

değere erişir. Bu kritik oksijen konsantrasyonu 22 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Yalnızca çok yüksek oksijen konsantrasyonlarında solunum inhibe olur ve oksijen alım hızı düşer. Substrat miktarı ve substrat türü de son derece önemlidir. Bir mayanın spesifik bir substrat karşısındaki davranışı, yalnızca DNA daki genetik bilgiye değil aynı zamanda çevresel koşullara da bağlıdır. Önemli parametreler besiyerinin nitel ve nicel bileşimi, sıcaklık ve çözünmüş oksijen erişilebilirliğidir.

2.3. Dünyada Biyoetanol Kullanımı ve Üretimi

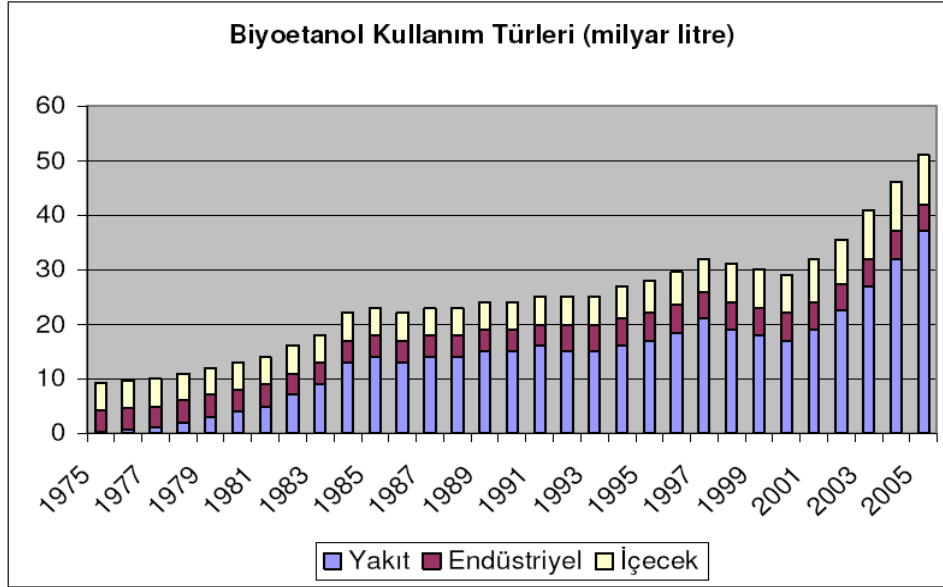
2.3.1. Biyoetanolün Tercih Edilme Sebepleri

Biyoetanole duyulan ilgi enerji sektöründeki çeşitli endişelerden ve biyoetanol kullanmanın potansiyel faydalarından kaynaklanmaktadır. Bu ilginin nedenleri şöyle sıralanabilir [Bulut, 2006]:

- İthal edilen petrole bağımlılığı azaltmak,
- Fosil kaynaklı olmayan yakıtlar üretebilmek,
- Çevre ile ilgili sorunlara çözüm oluşturabilmek, hava kirliliğini ve sera etkisi yapan gaz emisyonlarını azaltmak,
- Yakıtlarda tutuşmadan sıkıştırılabilme derecesini ifade eden oktan sayısını yükseltmek ve dolayısı ile motordan daha iyi verim alabilmek,
- Yurtiçi tarımsal ürünlere olan talebi arttırmak ve böylelikle kırsal alandaki istihdamı sağlamak.

Son 30 yıl boyunca biyoetanole duyulan ilgilinin nedenleri değişkenlik göstermiştir. 1970'lerdeki petrol krizi enerji güvenliği konusunu gündeme getirmiş, biyoetanol araştırma ve geliştirme çalışmalarını birçok ülkede hızlandırmıştır. 1980'lerde ise düşen petrol fiyatları nedeni ile enerji güvenliği endişesi nispeten

azalmıştır. 1990'ların başından itibaren yerel, küresel ve çevresel endişeler biyoetanol çalışmalarının itici gücü olmuştur [Bulut, 2006].



Şekil 2.4. Tarihsel süreçte biyoetanol kullanım türleri [Berg, 2004].

Yukarıdaki şekilden de anlaşılacağı üzere gün geçtikçe etanolün yakıt olarak kullanımı artmıştır. Gelecek 15 yıl içinde dünya araç sayısının iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir. Dünyada araç sayısının gittikçe artması, her geçen gün trafik sorunuyla karşı karşıya kalan şehirlere bir yenisinin daha eklenmesi nedeniyle bir taşıt akaryakıtı olarak biyoetanol ihtiyacı artmakta ve yenilenebilir ve ucuz bir enerji kaynağı olarak büyük önem kazanmaktadır.

2.3.2. Dünya, Avrupa ve Türkiye’de Biyoetanol Üretimi

Günümüzde Biyoetanolün dünyadaki toplam üretimi 21 milyar m³/yıl civarındadır. Brezilya yaklaşık 13 milyar litre/yıl şeker kamışından biyoetanolün yıllık üretimi ve 12,4 milyar litre/yıl ile lider ülkedir. Amerika mısırdan biyoetanol üreten (5,5 milyar litre/yıl) geniş kapasiteli üretim tesisleri ile dünyada 2. ülkedir [Acaroğlu ve ark., 2004]. Amerika Birleşik Devletleri Enerji Politikası Hareketleri

2005 yılında petrol endüstrisinin, 2012 yılına kadar benzine karıştırılacak 7,5 milyar ton yenilenebilir yakıtı ihtiyacı olduğunu açıklamıştır [Gray, 2006].

Atmosferde fosil yakıtların kullanılması yüzünden CO₂ ve ısıyı tutan diğer gazların miktarındaki artış, atmosferin ısısının yükselmesine sebep olmaktadır. Bu da küresel ısınma olarak ifade edilir. Bu durumun, buzulların erimesi ve okyanusların yükselmesi gibi ciddi sonuçlar doğuracak iklim değişmelerine yol açmasından endişe edilmektedir [http://www.cevreorman.gov.tr/hava_02.html].

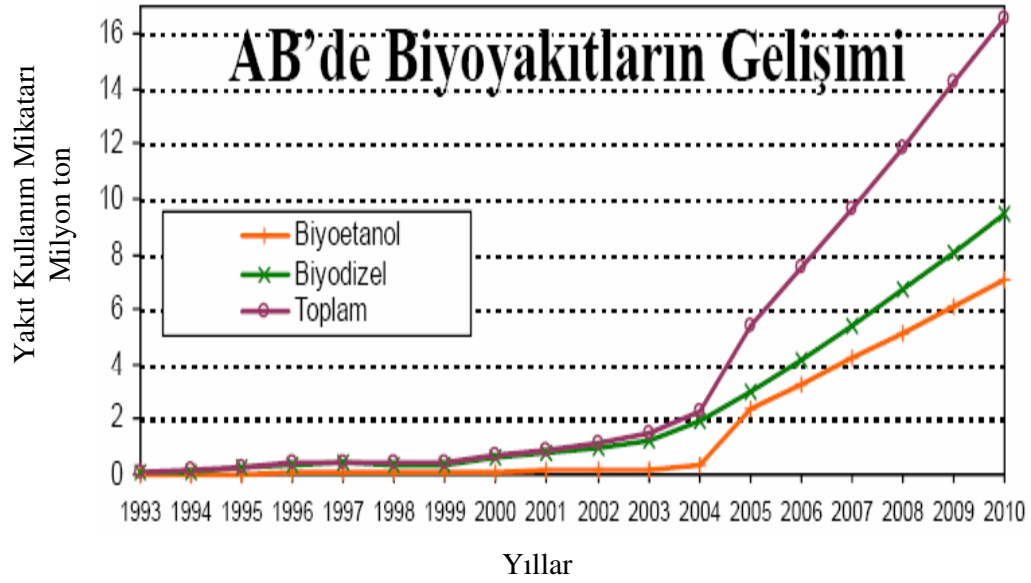
Avrupa Komisyonu mevcut yenilenebilir enerji kullanımını iki katına çıkararak sera etkisini azaltmak amaçlı olarak bir program geliştirmiştir. Bilindiği gibi sera etkisinde en önemli gazlardan biri olan karbondioksitin atmosfere salınımında en önemli etkenlerden biri de taşımacılıktır. Bu nedenle Avrupa Komisyonu'nun sera etkisini azaltmaya yönelik hedeflerinden biri de taşımacılıkta kullanılan yenilenebilir enerji kaynaklarına ağırlık vermek ve kullanımlarını arttırmaktır.

Biyoetanol gibi temiz enerji kaynaklarının kullanımı hava kirliliği seviyesi ve karbondioksit emisyonlarını azaltılabilir. Bu nedenle biyoetanol hava kalitesi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Ayrıca biyoetanol, temelini güneş ışığının oluşturduğu yenilenebilir bir enerji kaynağı olması nedeniyle de son derece önemlidir.

2003 yılında Avrupa Komisyonu biyoyakıtların ve taşıma sektöründe kullanılan diğer yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımının artırılmasına yönelik bir talimat yayınlamıştır. Bu talimat gereğince Avrupa Birliği içerisinde yakıtlardaki biyoyakıt oranının Aralık 2010 itibarı ile %5,75 olması hedeflenmektedir. Bu hedef bir zorunluluk değildir fakat hükümetlerin bu hedefi gerçekleştirmek için plan geliştirmeleri gerekmektedir [Schmitz et al, 2005].

Biyoetanol üretiminde Avrupa lideri olan Fransa'da hükümet, ulusal çapta biyoyakıt üretimi için yapılacak yatırımları teşvik etmek amacı ile oluşturulan ve

finansal kolaylıklar içeren biyoyakıt üretim programını desteklemektedir [Bulut, 2006].



Şekil 2.5. Avrupa Birliği'nde biyoyakıt kullanımının gelişimi [Çağlar, 2006].

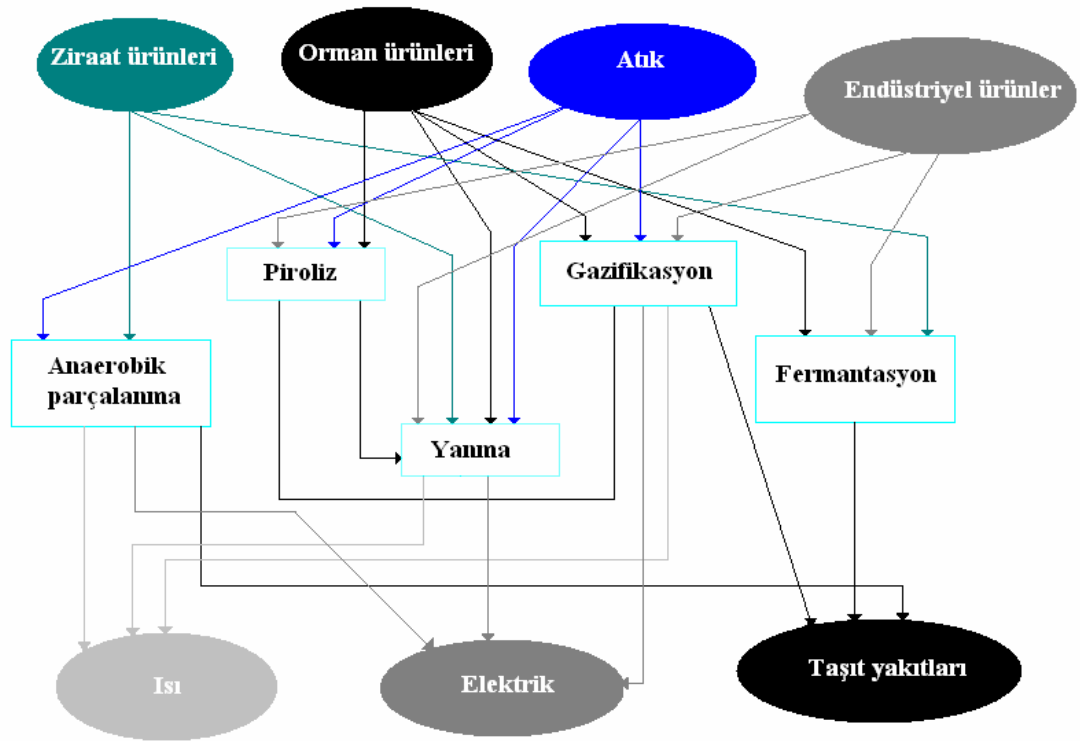
Biyoetanol ihtiva eden kurşunsuz benzinler yıllardır kullanılmakta olmasına rağmen, bu durum Türkiye için oldukça yenidir. Avrupa Birliği uyum süreci içerisinde alınan önemli kararlardan biri de petrole %5 oranında biyoetanol ilave edilmesidir. Kurşunsuz benzin içerisinde %2 oranında biyoetanol ihtiva eden yakıt, “BioBenzin” markası altında Petrol Ofisi tarafından üretilip satılmaya başlanmıştır.

Yerli tarım ürünlerinden üretilen biyoetanolün kurşunsuz benzine %2 oranında ilave edilmesiyle Türkiye yıllık yaklaşık 25 milyon \$ döviz tasarrufu sağlayabilmektedir[(http://www2.dunyagazetesi.com.tr/news_display.asp?upsale_id=229807)].

2.4. Biyokütleden Etanol Üretim Prosesleri

Ana bileşenleri karbonhidrat bileşikleri olan bitkisel ve hayvansal kökenli tüm maddeler biyokütle, bu kaynaklardan üretilen enerji ise biyokütle enerjisi olarak tanımlanmaktadır.

Biyokütle, dünya genelinde ağırlıklı ortalama alındığında %65 selüloz, %17 hemiselüloz, %17 lignin ve %1 karbonhidrat, yağ ve protein içermektedir [Erdin ve ark., 2002]. Biyokütle doğrudan yakıt olarak kullanılarak veya çeşitli işlemlerle yakıt kalitesi artırılıp, mevcut yakıtlara eşdeğer özelliklerde alternatif biyoyakıtlar elde edilerek enerji teknolojisinde değerlendirilmektedir (Şekil 2.6). Biyoyakıtlar içerisinde yer alan biyoetanol hızla yaygınlaşmaktadır, bunun en önemli sebepleri ekonomik olarak benzin yakıtı ile değerlendirilebilmesi ve çevreye olumsuz etkisinin daha az olmasıdır.



Şekil 2.6. Biyokütlenin enerji üretiminde kullanımı [Sürdürülebilir Biyoyakıt Sertifikasyon Toplantısı 28 Kasım 2006- Lozan, İsviçre]

Etanol üretimi, daha önceki bölümlerde de anlatıldığı gibi oldukça eskiye dayanmaktadır. Üretim prosesleri kullanılan hammaddeye ve elde edilecek etanolün hangi amaçla kullanılacağına göre farklılık göstermekte ancak temel bazı ortak özellikler de taşımaktadır.

Biyometanol çeşitli kaynaklardan elde edilebilen bir akaryakıttır. Tahıllar, tohumlar, şeker mahsulleri ve diğer nişasta kaynakları biyometanol üretmek için kolaylıkla fermente edilebilirler. Üretilen etanol tamamen veya benzine belli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir. Ağaçları, çeşitli otları, evsel atıkları da içine alan selülozik malzemeler alkole dönüştürülebilme potansiyeline sahiptir. Fakat bu yöntem şeker ve nişasta içeren tarım ürünlerinin işlenmesi yöntemine göre daha karmaşıktır. Bu alandaki teknikler sürekli geliştirilmektedir. Endüstriyel üretimde etanol, petrol ürünü olan etilenin hidrasyonu (bir su molekülü katılması) ile veya asetaldehidin indirgenmesi ile sentetik olarak elde edilebilir [Bulut, 2006].

Dünya üzerindeki biyometanol üretiminin %95'inden fazlası tarımsal ürünlerin işlenmesi ile elde edilmektedir [Tsai et al, 2007]. Çeşitli bitki türlerinin hektar başına düşen biyometanol verimi Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

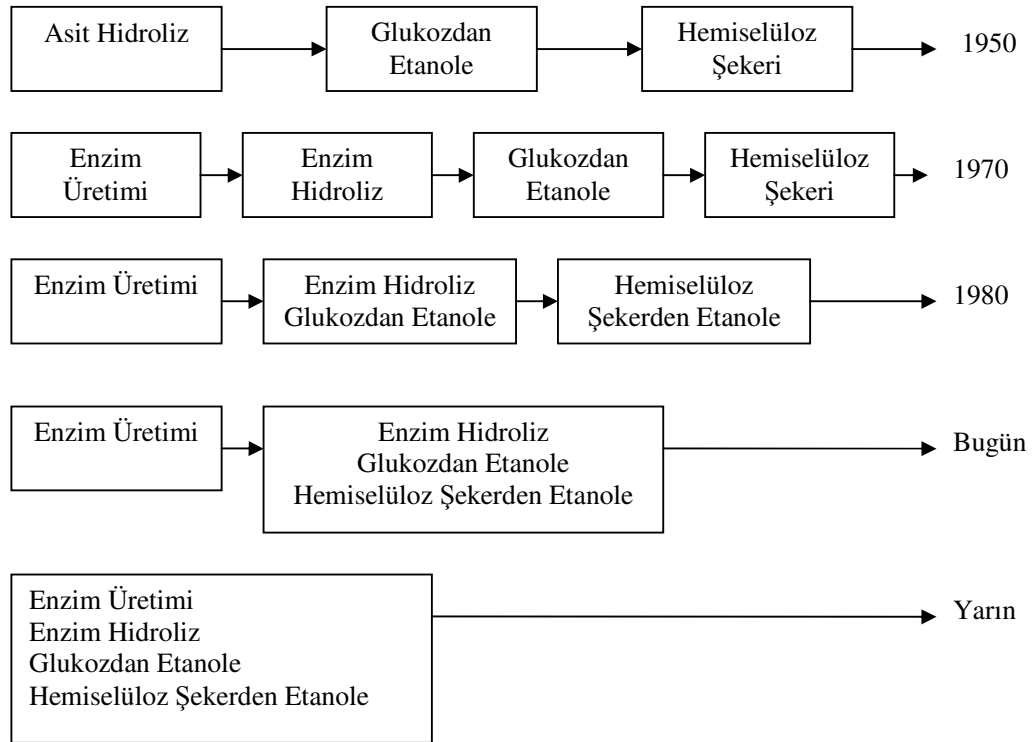
Çizelge 2.2. Çeşitli bitki türleri için biyoyakıt verimi [Erdin ve ark., 2002].

Bitki Türü	Biyoyakıt Verimi L biyometanol/hektar
Şeker pancarı	6 000
Patates	5 000
Topinambur	5 000
Mısır	2 300
Buğday	2 000
Hardal otu	1 350

Biyokütleden etanol elde etmek için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Biyokütleden etanol üretimi prosesinin en önemli aşamalarından biri kuşkusuz hidroliz aşamasıdır. Hidroliz, en basit ifadesiyle, birbirine bağlı olan büyük

şekerlerin parçalanarak küçük şekerlere dönüşmesi işlemidir. Hidroliz aşaması ile ilgili pek çok araştırma yapılmış ve bu alanda pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar temel olarak asit hidrolizi, seyreltik asit hidrolizi ve enzimatik hidrolizdir.

Yaklaşık 60 yıldan beri etanol üretiminde kullanılan ilk yöntem asit hidrolizi yöntemidir. Ancak gelişen teknolojiyle beraber yukarıda sıralanan yöntemler etanol üretiminde kullanılmaya başlamıştır. Etanol üretiminin tarihsel gelişimi Şekil 2.7’de gösterilmektedir. 1950 lerde enzim kullanılmazken bugün etanol enzim hidrolizinden sonra tek bir proses ile üretilebilmektedir.



Şekil 2.7. Etanol üretim prosesinde zamana bağlı değişimler [İmrağ, 2006]

Kullanılan hammaddenin özelliğine göre günümüzde pek çok etanol üretim prosesi geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın kullanılanları şeker pancarı ve mısırdan etanol üretim prosesleridir.

2.4.1. Şeker Pancarından Etanol Üretimi

2.4.1.1. Temizleme ve Öğütme Aşaması

Prosesle başlarken şeker pancarlarının temizlenmesi gerekmektedir. Bu işlem esnasında şeker pancarları yüzey alanlarının genişletilmesi için presleme işlemine tabi tutulurlar.

2.4.1.2. Fermentasyon

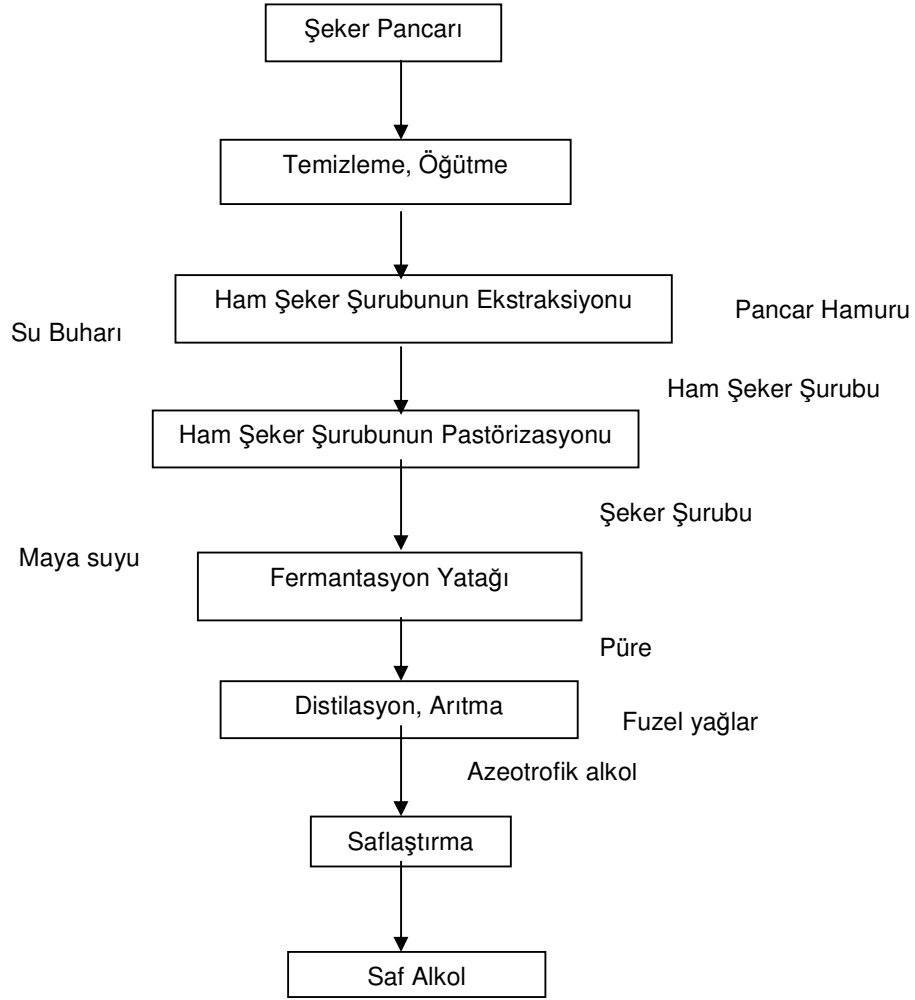
Ekstrakte olan şeker şurubu maya hücreleriyle fermente edilir. Bunun yanı sıra bazı bakteri ve mantar türleri de şekerli etanole fermente edebilirler. Alkol verimi, fermentasyon hızı ve fermentasyon ürünlerinin kompozisyonları fermentasyon için kullanılacak mikroorganizmaya göre değişim gösterir.

2.4.1.3. Distilasyon / Rektifikasyon (İleri Distilasyon) / Saflaştırma

Fermentasyon prosesinden sonra oluşan püre içerisindeki alkol konsantrasyonu çeşitli yöntemlerle arttırılır. İlk aşama olarak alkol konsantrasyonu distilasyon prosesinin ardından %35 değerine varır. Arıtma prosesinin ardından alkol konsantrasyonu %96 değerine ulaşır. Atmosferik koşullar altında alkol konsantrasyonu arttırmak mümkün değildir çünkü, bu koşullar altında alkol ve su bir azeotrof formu kazanırlar. İleri purifikasyon için distilasyon girişkenleri (benzen, hekzan veya gazolin/benzen karışımı) kullanılır. Son adım olarak distilasyon girişkenleri saf etanolden ayrılmalıdır [<http://www.isi.fhg.de>].

Ana ürün olan etanolün yanı sıra bu işlem esnasında maya hücreleri pek çok yan ürün oluşturur. Distilasyondan çıkan diğer ürünler, üretilen etanolün hacminin 9-14 katına varır. Çıkış ürünü fermentasyon ara ürünü olan gliserin ve fuzel yağlar olarak bilinen diğer yan ürünleri içerir.

Çıkış ürünü ve prosesin ilk aşamalarında oluşan pancar hamuru hayvan yemi olarak, biyogaz ünitelerinde besleme stoğu olarak yada bir biyogaz tesisinde fermentasyon sonrası bir yakım yakıtı veya gübre olarak kullanılabilir.

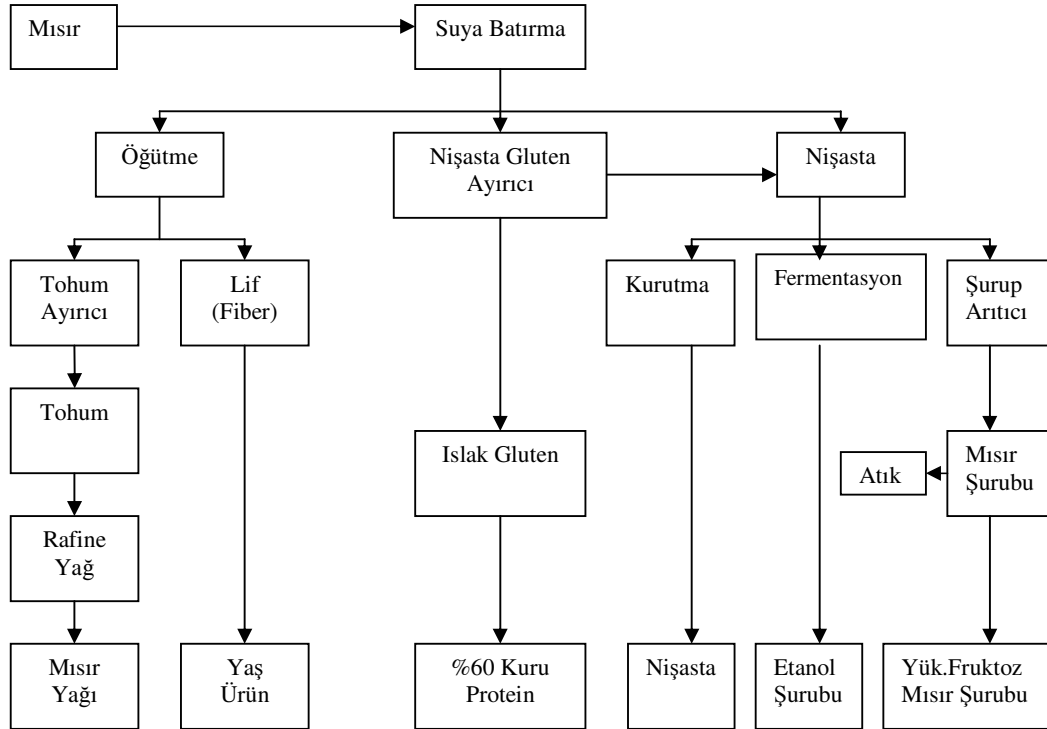


Şekil 2.8. Şeker pancarından biyoetanol üretim prosesi [<http://www.isi.fhg.de>]

2.4.2. Mısırdan Etanol Üretimi

Mısır, nişasta, şeker, yağ, fiber, protein ve kül içerir. Mısırın içeriğinin %70-75'ini nişasta ve şeker oluşturur. Bunlar içerisinde nişasta en büyük paya sahiptir. Tohum veya mısır özünün yağı yaklaşık % 4-5, fiber ise % 3-4 lük kısmını oluşturur. Fiber klasik teknolojiler ile etanole dönüştürülemeyen selülozik karbonhidratlar içerir. Kül kalan kısmın %2 sini oluşturur, ve mısır içerisindeki nem varlığı genellikle yaklaşık %15 civarındadır. Nişasta molekülleri pek çok glukoz moleküllerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Bu yüzden nişastalı maddeler nişasta moleküllerinin basit glukoz moleküllerine parçalanmasının ardından fermente edilebilir. Biyoetanol üretimi için dünya genelinde yoğun olarak kullanılan nişastalı maddeler örnek olarak patates, tatlı patates, tapyoka, tahıldır. Nişastalı maddeler nişastanın su ile reaksiyonu sonrası fermente olabilen şekerlere dönüşmesi sonucunda kullanılabilirler. Bu işleme şekerleme (şekere dönüştürme=saccharification) işlemi denir [<http://www.isi.fhg.de>].

Mısırdan etanol üretimi için iki temel metot bulunmaktadır. Bunlar kuru öğütme ve ıslak öğütme yöntemleridir. Kuru öğütme işlemi her yıl 50 milyon galondan daha az etanol üreten fabrikalarda kullanılırken yaş öğütme işlemi normal olarak, senede birkaç yüz milyon galon etanol üreten tesislerde kullanılır. Üretim yöntemi şeması Şekil 2.9'da gösterilmiştir [İmrağ, 2006].



Şekil 2.9. Mısırdan yaş öğütme yöntemiyle etanol üretimi [İmrağ, 2006].

2.5. Biyoetanol Üretiminde Ucuz Karbon Kaynağı Arayışları

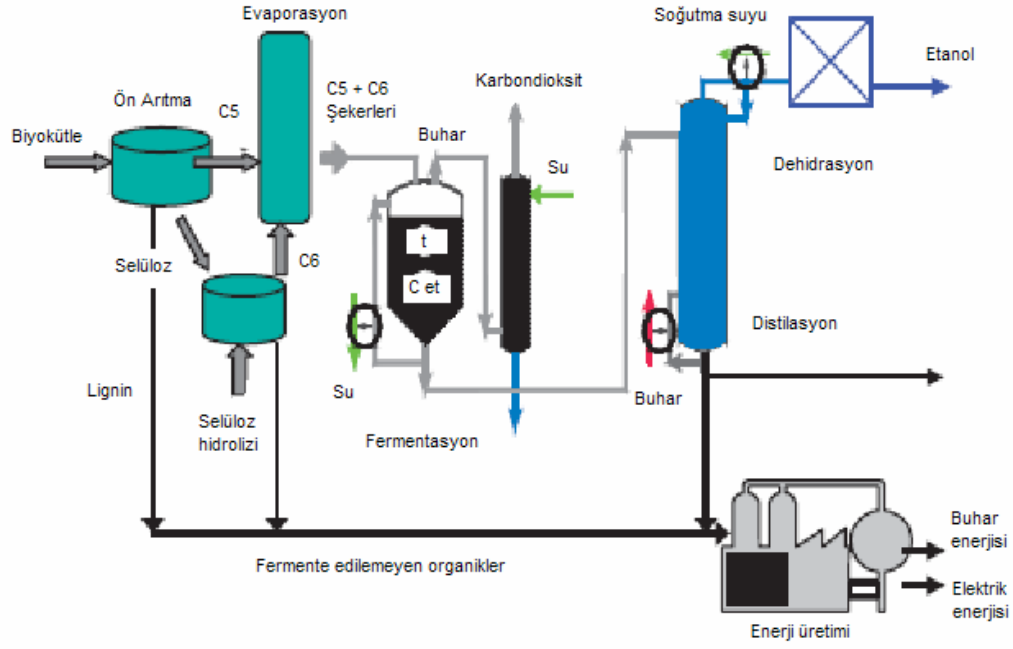
Çeşitli lignoselüloz esaslı bitkisel ve odunsu artık ve atıklar yakılmak ve atılmak suretiyle çevre kirliliğine sebep olmaktadır [Zadrazil, 1978]. Artık ve atıkların çevreye zarar vermeyecek şekilde değerlendirilerek, doğaya yeniden kazandırılması, bir taraftan kıt kaynakların optimum değerlendirilmesi, diğer taraftan da çevre kirliliğinin önlenmesi bakımından kaçınılmaz bir zorunluluk halini almıştır [Baysal ve ark., 1993].

Biyokütle kullanılarak etanol elde edilmesi atıkların değerlendirilmesinin yanı sıra etanol üretim miktarını ve üretim maliyetini de azaltacaktır. Biyokütle, selüloz, hemi-selüloz ve ligninden meydana gelmektedir. Hem selüloz hem de hemi-selüloz, uygun bir ön arıtma ve hidroliz işleminden sonra etanole fermente edilebilir [Reith et al, 2002]. Yakın geçmişte hayata geçirilmiş çalışmalar, biyoteknolojik yeniliklerle

biyokütlenin etanole dönüştürülmesini daha ekonomik bir hale getirmiştir. Selülozik maddeleri parçalayan enzimlere selülaz adı verilir. Bu enzim mantarlarda, termit sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmalarda bolca bulunur. Biyoteknolojik araçlar etanol üretimi için kullanışlı ve etkin selülazların tanımlanmasında ve üretilmesinde son derece önemlidir. Biyoteknolojik gelişime paralel olarak lignoselülozik kaynakların etanol üretiminde başarılı bir şekilde kullanımı gerçekleşmiştir. Mısır fiberi gibi ekonomik lignoselüloz kaynağından biyoetanol üretimi pek çok araştırmacının dikkatini çekmiştir [Pimentel and Padzek, 2005; Rumbold et al, 2003; Saha and Bothast, 1998; Schell et al, 2003].

Lignoselülozun biyoetanol üretiminde kullanımını inceleyen Hollanda'da yapılmış bir çalışmada, bu amaçla kullanılabilir lignoselülozik biyokütle miktarının 12 milyon ton kuru kütle/yıl olduğu rapor edilmiş ve bunun karşılığında elde edilebilecek etanol miktarı 2,5 milyon ton/yıl olarak hesaplanmıştır [Reith et al, 2002].

Lignoselülozik kaynaklardan biyoetanol üretim prosesi Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi öncelikle biyokütle bir ön arıtma işleminden geçirilmektedir. Arıtma işleminden sonra beş karbonlu şekerlerden ayrılan selüloz polimerleri altı karbonlu şekerlere hidrolize edilmektedir. Fermentasyon prosesi ile beş ve altı karbonlu şekerlerden etanol üretilmekte fermente edilemeyen lignin ise tesiste enerji üretimi için yakılmaktadır.



Şekil 2.10. Lignoselülozik kaynaklardan biyoetanol üretim prosesi [Reith et al, 2002]

Kağıt günlük yaşantımızın içinde önemli yeri olan ve her geçen gün kendine yeni kullanım alanları bulan bir maddedir. Kültürün, bilimin gelişimine paralel olarak gelişmekte olan kağıt endüstrisi bugün oldukça önemli ekonomik güce sahiptir. Kağıdın hammaddesi odundur ve kağıt üretim prosesi boyunca selüloz ve benzeri maddeleri içeren atıklar oluşmaktadır. Oluşan bu atıkların giderilmesi bu endüstri için ayrı bir maliyet gerektirir. Kullanılmış kağıt artıkları, kağıt üretim ve kağıt hamuru hazırlanılması proseslerinde oluşan atıklar çeşitli işlemlerden geçirildikten sonra ekonomik değere sahip ürünler elde edilebilir. Bu değerli ürünlerden biri de etanoldur.

Yapılan çalışmalar [Fan et al, 2003] kağıt atıklarının ve kağıt çamurunun birleştirilmiş bir şekerleştirme ve fermentasyon ünitesi ile etanole başarılı bir şekilde dönüştürülebileceğini göstermiştir. Bu çalışmalarda bir birini takip eden enzim içerikli şekerleştirme ve fermentasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir.

2.6. İmmobilizasyon ve Biyoetanol Üretiminde İmmobilize Sistemler

2.6.1. Askıda ve İmmobilize Sistemler

Diğer üretim proseslerinin pek çoğunda olduğu gibi etanol üretiminde askıda, karıştırmalı ve immobilize reaktörler kullanılmaktadır. Seçilecek reaktör sürekli ya da kesikli çalıştırılabilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar immobilize hücre reaktörleri kullanımının etanol üretimi için son derece elverişli olduğunu göstermektedir. Ucuz ve yenilenebilir substratlardan yüksek etanol verimi almak ve üretim işleminde enerji ihtiyacını düşürmek alkolik fermentasyon çalışmalarında üzerinde durulan önemli iki konudur. Bu amaca ulaşabilmek için sürekli kültür, tutuklanmış hücreler ve hücrelerin tekrar kullanımı gibi işlemler geliştirilip kullanılmıştır. Tutuklanmış hücrelerin kullanılması genellikle katalizör aktivitesini iyileştiren bir işlemdir. Bir matrise tutturulduklarında normal bir süspanse kültürde olduğundan daha yoğun bir hücre konsantrasyonuna ulaşmak mümkündür. Canlı hücre miktarının artırılması reaktörün verimini artıran bir etmendir. Literatürde bu sistemlerde etanol üretimi ile ilgili pek çok araştırma mevcuttur [Glazzo and Bailey, 1990; Tyagi et al, 1992; Nolan et al, 1994; Rocca et al, 1996; Nigam, 2000; Sheoran et al, 1998; Najafpour et al, 2004].

Yapılan pek çok çalışmayla enzimlerin bazı davranışlarının, dayanıklılık özelliklerinin immobilizasyon ile değiştiği saptanmıştır. Hücre ve hücrenin bazı bileşenlerinin immobilize edilmesi çalışmaları gerek mikrobiyoloji gerekse biyoteknoloji alanında çokça rastlanmaktadır. Enzim immobilizasyon tekniklerinin değişik modifikasyonları hücrelerin immobilizasyonu için de kullanılmaktadır. Temelde iki ayrı metot vardır. Bunlar bir destek üzerine ekleme ve tutuklamadır.

İmmobilize hücrelerle gerçekleştirilen deneylerde şekerlerin etanole fermentasyonu sırasında en çok karşılaşılan sorun substrat ve ürün inhibisyonudur. 1983 yılından günümüze yapılan çalışmalarda yüksek şeker konsantrasyonlarında

substurat ve ürün inhibisyonuna rastlandığı gözlenmiştir. Sürekli sistemlerde substurat şiddeti, reaktör içerisine verilen besiyerinin akış hızının ayarlanmasıyla kontrol altına alınabilir.

2.6.2. Hücre İmmobilizasyonu

Doğal çevrelerinde tutuklanmış hücreler oldukça etkin ürerlerken, yapay şekilde tutuklananların üreme hızları düşüktür. İmmobilize enzimlerin endüstriyel alanlarda başarılı uygulamaları raporlandıktan sonra dünya çapında pek çok araştırma grubu, mevcut mikrobiyal fermentasyon proseslerine alternatif olarak tüm-hücre immobilizasyonu ile ilgilenmişlerdir. Çeşitli immobilizasyon metotları ve çok sayıda taşıyıcı materyal çalışılmıştır [Ramakrishna et al, 1999].

Hücre immobilizasyon prosesi biyoreaktör dizaynına ilgiyi başlatmış, değişik biyoreaktör konfigürasyonlarında immobilize hücre kullanımı başarılı sonuçlar vermiştir. İmmobilize hücre fizyolojisi ve noninvazif ölçüm teknikleri üzerine yapılan çalışmalar, immobilize koşullar altında mikroorganizma metabolizmasının anlaşılması üzerine oldukça etkili olmuştur.

Mikroorganizma kullanan endüstriyel bitoteknoloji proseslerinde, genellikle proses boyunca fermentasyon besiyeri içindeki hücrelerin kullanımı temel alınır. Klasik fermentasyonlar düşük yoğunluk, besin kısıtlamaları ve kesikli mod gibi problemler içerir. Yapılan çalışmalar, mikroorganizmal hücre yoğunluğunun yüksek hacimsel üretkenliklere ulaşmada birincil öneme sahip olduğunu göstermiştir [Ramakrishna et al, 1999]. Serbest (askıda) hücrelerle sürekli sistemde fermentasyon gerçekleşirken reaktör çıkışında sürekli olarak hücre kaybı olur. Bu nedenle reaktördeki hücre konsantrasyonunu sabit tutmak için geri döngü miktarı, spesifik üreme ve seyreltme hızı gibi parametreler son derecede kritik öneme sahiptir. İmmobilize reaktörler kullanılarak serbest hücrelerle yapılan çalışmalarda ortaya çıkan güçlüklerin ortadan kaldırılması veya azaltılması hedeflenmiştir.

Hücrelerin immobilizasyonu, hücrelerin yada bir parçalarının substurat, ürün, inhibitör gibi maddelerin transferine olanak sağlayan farklı bir katı faza eklenmesi olayıdır; ancak bu durum aynı zamanda katalitik hücre biyokütlesini substurat ve ürün içeren sıvı fazdan ayırır. Immobilizasyon işlemi genellikle aljinat, agaroz gibi yüksek moleküler hidrofilik polimerik jeller kullanılarak gerçekleştirilir [Ramakrishna et al, 1999].

İmmobilize hücreler kullanılarak gerçekleştirilen prosesler hücre yoğunluğu gibi sebeplerle oldukça üretkendir. Prosesin immobilize hücreler ile işletilebilirliğine karar verirken maliyet, atık transferi kısıtlamaları, spesifik son ürünlere uygulanabilirliği gibi pek çok parametre önemle incelenmelidir.

İmmobilize hücre kullanımının belli başlı avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir [Asenjo and Merchuk, 1995]:

1. Çok aşamalı bir enzim reaksiyonuna uygulanması mümkündür,
2. Immobilizasyonda enzim aktivite verimliliği yüksektir,
3. İşlevsel kararlılık genellikle yüksektir,
4. Enzim ekstraksiyonu ve/veya saflaştırması için işlevler gerekli değildir,
5. Yüksek hücre yoğunluğu sağlanabilir,
6. Hücre yoğunluğu ve enzim aktivitesi uzun süreli işlev sağlayabilir,
7. Ürünler, immobilize hücrelerden kolaylıkla yeniden elde edilebilir,
8. İmmobilize hücrelerin, mikrobiyal kontaminasyona daha az duyarlı olduğu görülür.

İmmobilize hücrelerin yukarıda sayılan avantajları yanında belli başlı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar da aşağıdaki gibi sıralanabilir [Asenjo and Merchuk, 1995]:

1. Çeşitli enzimler tarafından istenmeyen köşe reaksiyonları katalizlenebilir,
2. Taşıyıcıdan olabilecek sızıntılar kontaminasyona neden olabilir,
3. Hücre membranı boyunca substurat ve ürün geçirgenliği sınırlanabilir.

Bu sakıncalara rağmen immobilize hücre sistemleri çekici özellikleri ve potansiyelleri nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

2.6.2.1. Hücre İmmobilizasyonu Metotları ve Biyoetanol Üretimi

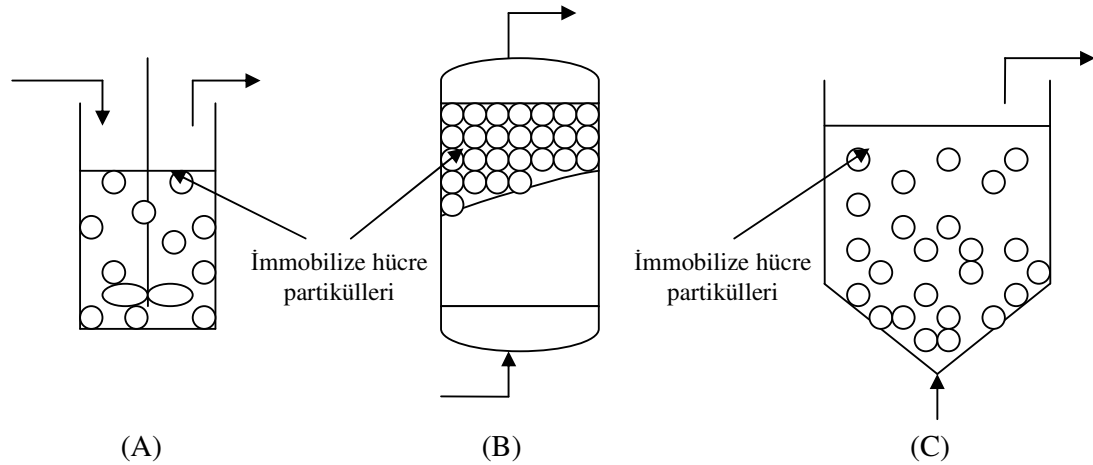
Hücrelerin boyut ve özellikleri birbirlerinden oldukça farklı olduğundan hücre immobilizasyon metotları enzim immobilizasyonundan farklılıklar gösterir. Hücreler belli bir matrise adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve hapsetme yöntemleri ile immobilize edilirler. Adsorpsiyon metodunda hücreler destek materyaline elektrostatik etkileşim ile; kovalent bağlama metodunda bir bağlayıcı ajan varlığında kovalent bağ oluşturarak; çapraz bağlamada glutaraldehit, toluendiizosiyenat gibi tek veya çok fonksiyonlu ajanlar kullanılarak; hapsetme metodunda ise agar, aljinat, selüloz ve türevleri, kolojen, jelatin, poliakrilamid, polyester, polistren ve poliüretan gibi matrisler içine hapsedilerek tutunurlar. Bunun yanı sıra kütle transferinin iyileştirilmesiyle besinlerin hücrelere ulaşmasını ve ürün alımını daha etkin hale getirmek amacıyla immobilizasyon destek matrisi değişik geometrilere hazırlanabilir [Asenjo and Merchuk, 1995].

Günümüzde pek çok araştırmacının ilgisini çeken konulardan biri olan biyoetanol üretiminde immobilize edilmiş maya hücreleri kullanımı oldukça sık rastlanan bir yöntemdir. Bu amaçla maya hücreleri farklı materyaller üzerinde adsorplanmış, jel içerisinde tutuklanmış veya çeşitli çapraz bağlama çalışmaları geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle yapılan deneysel çalışmalar, pek çoğu laboratuvar ölçekli olarak uygulansa da, sonucunda elde edilen veriler son derecede umut vaat edicidir. Yapılan çalışmalar sonucunda en çok rastlanan problemlerden biri sürekli sistem çalışmalarında aşırı miktarda üretilen CO₂'in alkol fermentasyonu üzerinde olumsuz etki yapmasıdır. Bu olumsuzluğu gidermek için pek çok çalışma yapılmıştır. CO₂ 'in olumsuz etkisini giderme metotlarından en çok rastlanan ve en uygulanabilir olan metot kuşkusuz basınçsız reaktör kullanımıdır. CO₂'in sistemden uzaklaştırıldığı gaz sıyırma düzenekler de geliştirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan polyHIPE polimer matrisi daha önce bakteri immobilizasyonu amaçlı kullanılmış, 120 gün boyunca gerçekleştiren çalışma sonucunda polimerin %90 poroziteye sahip olmasına rağmen kütle transferi sınırlamalarından dolayı hücreler polimer parçalarının yüzeyinde birikmiştir. PolyHIPE polimer çok güçlü hidrofobik yapıya sahiptir. Bu nedenle immobilizasyon hücre ve biyomateryal arasındaki hidrofobik interaksyona dayanır [Erhan et al, 2004].

2.6.2. İmmobilize Hücreler İçin Reaktör Tipleri

İmmobilize hücreler kullanılarak hazırlanacak reaktör tipinin belirlenmesinde pek çok faktörün önemi vardır. Bu faktörlerden bazılarının kütle transferi koşullarının, oksijen kazanımının ve gaz uzaklaştırmanın doğası örnek olarak verilebilir. Uygulanacak immobilizasyon metodu, partikül boyutu diğer önemli faktörleri oluşturur. En çok uygulama alanına sahip reaktör türleri ve bunların sınıflandırılması Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. En çok kullanılan immobilize hücre reaktörü tipleri : (A) karıştırılmalı tank reaktörleri; (B) sabit yatak reaktörleri; (C) akışkan yatak reaktörleri [Asenjo and Merchuk, 1995].

Dolgulu yatak reaktörlerinde substurat sabit bir hareketle immobilize hücrelerin bulunduğu yatak içerisinden geçer. Bu tip reaktörler işletilme kolaylığı ve yüksek reaksiyon hızı gibi avantajlara sahiptir. Reaktör içerisine doldurulan partikül katalistler, katı-sıvı teması için yüksek spesifik yüzey alanına sahiptirler [Asenjo and Merchuk,1995]. Bu tip reaktörlerde iyi bir karışım, ısı ve kütle transferi gerektiği durumlarda geri dönüşümlü bir sistem dizayn edilebilir.

Dolgulu yatak reaktörleri bir çok çalışmada kullanılmıştır. Kalsiyum aljinat yatak üzerinde immobilize edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri kullanılarak sürekli sistemde etanol üretimi [Linko and Linko, 1981], poliakrilamide immobilize edilmiş *E. coli* hücreleri kullanılarak fumarik asitin aspartik asite dönüştürülmesi [Chibata et al, 1974] gibi çalışmalar bunlara örnek verilebilir.

Bu tez çalışmasında yukarıda şematik olarak gösterilmiş olan reaktör tiplerinden dolgulu sabit yatak reaktörü kullanılmıştır *S. cerevisiae* ATCC 26602 suşu polyHIPE polimer matrise tutuklanmış ve farklı glukoz konsantrasyonlarında etanol üretim kapasitesi incelenmiştir. Öncelikle kesikli kültürlerde besiyeri bileşen konsantrasyonları ve farklı fiziksel parametrelerin etanol üretimine olan etkileri çalışılmıştır. Tez çalışmasının son bölümünde hazırlanmış olan dolgu yataklı reaktör selülozun mikrobiyal parçalanması sonucu ortaya çıkan glukozdan etanol üretimi için kullanılmıştır.

3. MATERYAL

3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında etanol üretimi için kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 suşu ve selülozun parçalanması işleminde kullanılan *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 suşu Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (American Typ Culture Collection) temin edilmiştir.

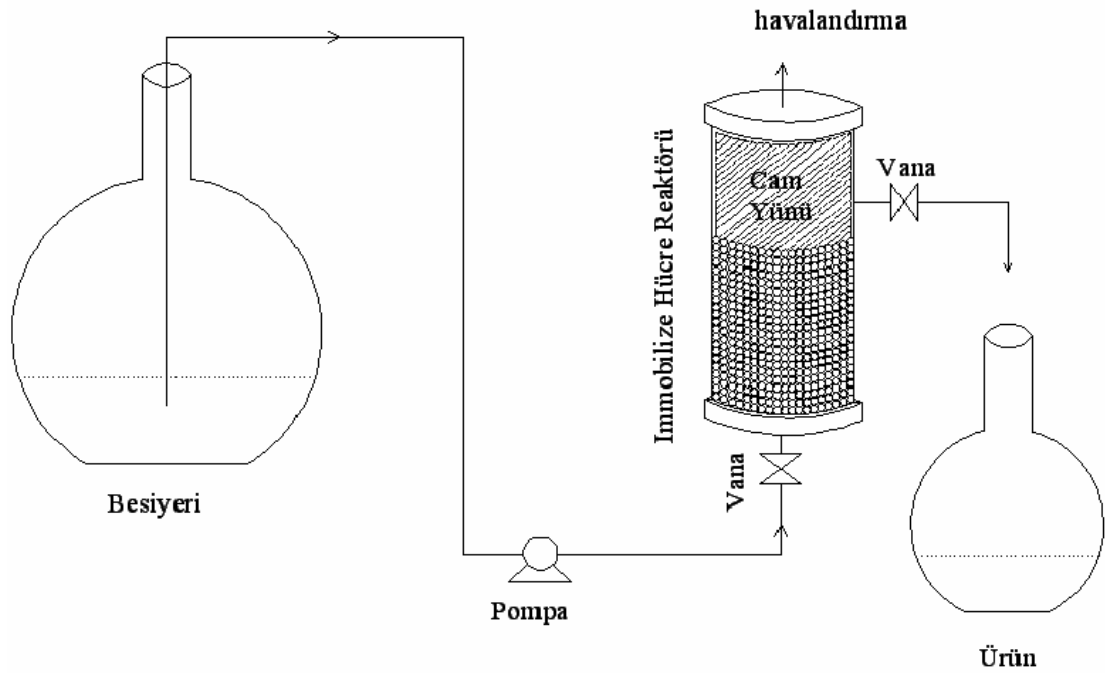
3.2. Besiyerleri

S. cerevisiae'nin etanol üretimi üzerinde dört farklı besiyerinin etkisi incelenmiştir. Bunlar tanımlanmış içeriğe sahip RM [Tsoi et al, 1987], ZZ [Zhishang and Zhang, 2004], CA besiyerleri [Sonderegger et al, 2004] ve zengin bir besiyerleri olan YM [Limtong et al, 2002] besiyeridir. Besiyerlerinin içerikleri EK-1'de verilmiştir.

3.3. Reaktörün ve Polimerin Hazırlanışı

Deneysel çalışmalarda kullanılan ve Şekil 3.1'de gösterilen reaktör, paslanmaz çelikten yapılmış, iç çapı 5 cm ve duvar et kalınlığı 3 mm olup 9,2 cm su sütunu yüksekliğine ve toplam 180 ml hacme sahiptir. Reaktör içerisine konulan polimer Ünsal (2003) tarafından tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır. Polimeri hazırlamak için 5,6 ml stiren, 2,6 ml divinil benzen ve 1,8 ml span80 50 ml'lik falkon tüp içerisinde karıştırılmış daha sonra 40 ml %1,25 potasyum peroksi disülfat eklenip hızlı bir şekilde 5 dk elde çalkalanmıştır. 60 °C'lik etüvde 5 dk dik bir şekilde bekletildikten sonra 3 dk hızlı bir şekilde çalkalanıp karıştırılarak tekrar etüve yerleştirilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra polimer etüvde 24 saat bekletilmeye alınmıştır. 24 saat sonunda katılaştıran polimer falkon tüpünden dikkatlice çıkarıldıktan sonra yine aynı sıcaklıktaki etüvde kurumaya bırakılmıştır. İyice kuruyan polimer daha sonra el

ile küçük parçalara ayrılmış ve bu parçalar elekten geçirilmiştir. Boyutu 4-8 meş (3,2-6,3 mm) aralığındaki tanecikler reaktörde hücre tutuklamak için kullanılmışlardır. Polimer %90 poroz yapıya sahiptir. Reaktörde kullanılacak polimerlerden 7,9 g tartıldıktan sonra reaktör bu malzemeye doldurulmuş ve polimerlerin üzerine cam yünü konularak reaktör kapağı kapatılmıştır. Steriliasyon için reaktör ve kullanılacak hortum gibi malzemeler, alüminyum folyo ile sarılıp 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.



Şekil 3.1. İmmobilize hücre reaktörü düzeneği

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.

4. YÖNTEM

4.1. Kesikli Sistemde Mikroorganizmaların Ekimi

Kesikli olarak yürütülen çalışmalarda steril çalışma ortamı sağlamak, farklı mikroorganizmalar ile kontaminasyonu önlemek amacıyla besiyerleri 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Numune alma, ekim yapma işlemleri sırasında steril enjektör, pipet, öze kullanılmış ve kontaminasyonu engellemek amacıyla ateş yanında çalışılmıştır.

Kesikli sistem deneylerinin başlatılması için *S. cerevisiae* hücreleri içeriği EK-1'de verilen YM katı besiyeri üzerinde 30 °C'de 3 gün üretilmiş ve üreyen hücrelerden öze ucunu dolduracak kadar hücre alınarak steril saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan bu hücre çözeltisinden 5 ml alınarak 50 ml besiyerine ekim yapılmıştır.

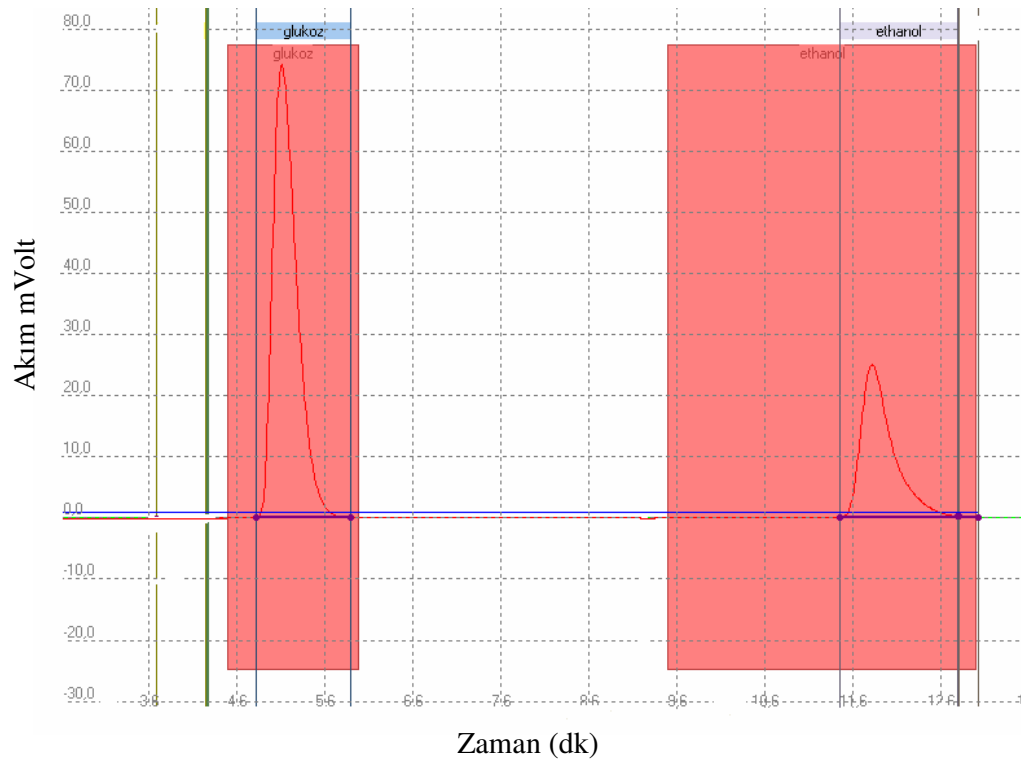
C. thermocellum hücreleri anaerobik şartlarda (kabin atmosferi % 85 nitrojen, % 10 CO₂ ve % 5 hidrojen içermektedir) hazırlanmış 100 ml lik serum şişeleri içinde bulunan 50 ml RM besiyerinde 55 °C' de üretilmiştir. *C. thermocellum* tarafından selülozun parçalanması sonucu oluşan glukozların *S. cerevisiae* tarafından kullanımını ve etanol üretimini takip etmek amacıyla bu kültüre maya hücreleri yukarıda anlatıldığı gibi ekilmiştir.

4.2. Üremenin Takibi

S. cerevisiae kültüründe hücre miktarındaki zamana bağlı artış UV-VIS Spektrofotometre (GBC-Cintra-20) ile ölçülmüştür. Üreme eğrileri hücre kültürlerinin 600 nm dalga boyunda verdiği absorbans değeri kullanılarak oluşturulmuştur.

4.3. Glukoz ve Etanol Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Dolgu yataklı reaktörde *S. cerevisiae* tarafından üretilen etanol ve kullanılan glukoz konsantrasyonunun ölçülmesi için HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) (Esence System, Lab Alliance) cihazı kullanılmıştır. HPLC cihazına numune verilmenden önce 1 ml numune 0.45 μm gözenek genişliğine sahip filtreden süzölmüştür. Süzölen numune 45 °C de çalışan kolon fırını içine yerleştirilmiş 8 μm polimer IEXH form şeker kolonu ve 45 °C de çalışan refraktif indeks dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz olarak 9 mM sülfürik asit çözeltisi kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlanmıştır. HPLC analizinde 8 g/L glukoz ve 8 g/L etanol standartlarına ait sinyallerin pikleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. HPLC analizinde glukoz ve etanole ait sinyal pikleri

Kesikli sistemde etanol üretiminin optimizasyonuna ilişkin deneylerde üretilen etanol miktarı Near Infrared (NIR) cihazı (MPA, Bruker) kullanılarak ölçülmüştür. Çalışmalar sırasında alınan 1'er ml lik numuneler 6000 rpm de çöktürüldükten sonra üst sıvı kısmı alınarak NIR tüplerine konulmuş ve cihazda ölçüm gerçekleştirilmiştir. NIR ile yapılan ölçümlerin doğruluğunun tespiti için numunelerden bazıları ve standart olarak hazırlanmış etanol konsantrasyonu bilinen numuneler HPLC cihazı kullanılarak da ölçülmüş ve her iki cihazdan alınan sonuçlar kıyaslanmıştır. NIR cihazından alınan sonuçlar özellikle 5 g/L etanol konsantrasyonunun üzerindeki değerlerde HPLC cihazından alınan sonuçlar ile tutarlılık göstermiştir. NIR cihazı HPLC kadar hassas olmamakla birlikte ekonomik ve hızlı bir cihazdır. Bu nedenle numune miktarı fazla olduğunda tercih edilen bir cihazdır.

4.4. Sürekli Reaktörde *S. cerevisiae* Hücrelerinin Tutuklanması

Sürekli reaktör çalışmasında maya hücrelerinin polimere tutuklanması için hücreler öncelikle pH değeri 7 olan sıvı YM besiyerinde üretilmişlerdir. 100 g/L glukoz içeren 1 L YM besiyerinde 3 gün süreyle oda sıcaklığında ve çalkalanmadan üretilen maya hücreleri peristaltik pompa (Masterflex, Cole-Palmer) aracılığıyla 15 ml/dk akış hızı ile reaktöre verilmiştir. Daha sonra sisteme 24 saat boyunca 20 g/L glukoz içeren pH değeri 7 olan sıvı YM besiyeri ve ardından pH değeri 1,2 M steril HCl ile 5,5'e ayarlanmış sıvı RM besiyeri 1 ml/dk debi ile geçirilerek reaktör içerisindeki hücrelerin üremeleri sağlanmıştır. Deneysel çalışmalar esnasında reaktör içerisinde herhangi bir kontaminasyon riski oluşmaması amacıyla besiyerine tetrasiklin antibiyotiği konsantrasyonu 5 mg/L olacak şekilde eklenmiştir.

4.5. Hücre Tutuklamalı Reaktör Çalışmalarında Kullanılan Eşitlikler

Kinetik hesaplamalarda kullanılan eşitlikler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kinetik hesaplamalarda kullanılan eşitlikler

Sembol	Kullanılan Formül	Tanımı
X	sabit 81,315	biyomas (mikroorganizma) konsantrasyonu (g/L)
V	sabit 101,5	Boşluk hacmi (ml)
Q		Debi (ml/dk)
t	$\frac{V}{Q}$	Hidrolik bekleme süresi (gün)
C _{so}		Giriş glukoz konsantrasyonu (g/L)
C _s		Çıkış glukoz konsantrasyonu (g/L)
P		Çıkış ürün (etanol) konsantrasyonu (g/L)
E (%)	$\frac{100 \times (C_{so} - C_s)}{C_{so}}$	Proses glukoz kullanım verimi (%)
r _{su}	$-\frac{Q \times (C_{so} - C_s)}{V}$	Substrat parçalanma hızı (g/L.gün)
Ep (%)	$\frac{100 \times P}{C_{so}}$	Proses etanol üretim verimi (%)
Pf	$\frac{Q \times P}{V}$	Etanol üretkenliği (g/gün)
Reaktör etkinliği (%)	$\frac{100 \times P}{0,51 \times C_{so}}$	Deneysel etanol konsantrasyonunun teorik etanol konsantrasyonuna (g/g)
P/M	$\frac{Q \times P}{V \times X}$	Üretilen etanolün biyomasa oranı (g/g.gün)
k	$\frac{C_{so} - C_s}{X \times t}$	Maksimum spesifik substrat parçalama hızı (g/g .gün)
V _m	$V = \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{S}{K_s}\right) + S}$	Maksimum reaksiyon hızı (g glukoz/L dk)

Çizelge 4.1. Devam

K_m	$V = \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{S}{K_s} \right) + S}$	Yarı hız sabiti (g/L)
K_s	$V = \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{S}{K_s} \right) + S}$	Substrat inhibisyon sabiti (g/L)

4.6. Reaktördeki Kuru Hücre Ağırlığının Tespiti

Fermentasyon sonrasında reaktör içerisindeki polimer üzerine immobilize olmuş maya hücreleri kurutulmuş ve tartılmıştır. Reaktöre başlangıçta konulan polimerin ağırlığı, toplam kuru ağırlıktan çıkarılarak kuru hücre ağırlığı hesaplanmıştır.

4.7. PolyHIPE Polimere Tutuklanmış Maya Hücrelerinin Tarayıcı (Scanning) Elektron Mikroskobu İle Görüntülenmesi

Reaktör içerisinden alınan polimer örnekleri %4 gluteraldehit solüsyonunda 4 °C’de mikroskopik tayinin yapılacağı güne kadar saklanmıştır. Görüntü öncesinde hücrelerin tutunmuş olduğu polimer parçaları küçük bir parça ıslak pamuk ile birlikte petri kutusuna yerleştirilmiş ve hücrelerin kurumasını önlemek amacıyla dört gün boyunca pamuk ıslatılmıştır. Dört gün sonunda nemli ortamda kuruyan polimer parçaları Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Bölümü’nde bulunan Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntülenmiştir.

5. BULGULAR

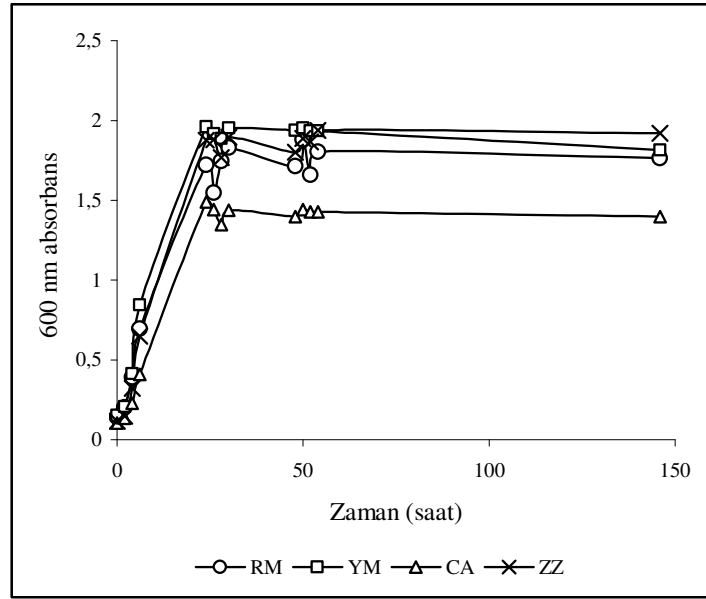
5.1. *S. cerevisiae* İle Etanol Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi

Tez çalışması boyunca kullanılacak en uygun besiyerinin seçilmesi amacıyla *S. cerevisiae* hücrelerinin dört farklı besiyerinde üreme ve etanol üretimi takip edilmiştir. İçerikleri Çizelge 5.1’de kıyaslanmış olan RM, YM, CA ve ZZ besiyerlerinin pH ları 5.5’e ayarlandıktan sonra *S. cerevisiae* hücreleri ekilmiş ve 30 °C’de 150 rpm’de üretilmiştir. Besiyerleri iki farklı glukoz konsantrasyonu kullanılarak hazırlanmış ve *S. cerevisiae*’nın bu besiyerlerinde üremesi ve etanol üretimi takip edilmiştir

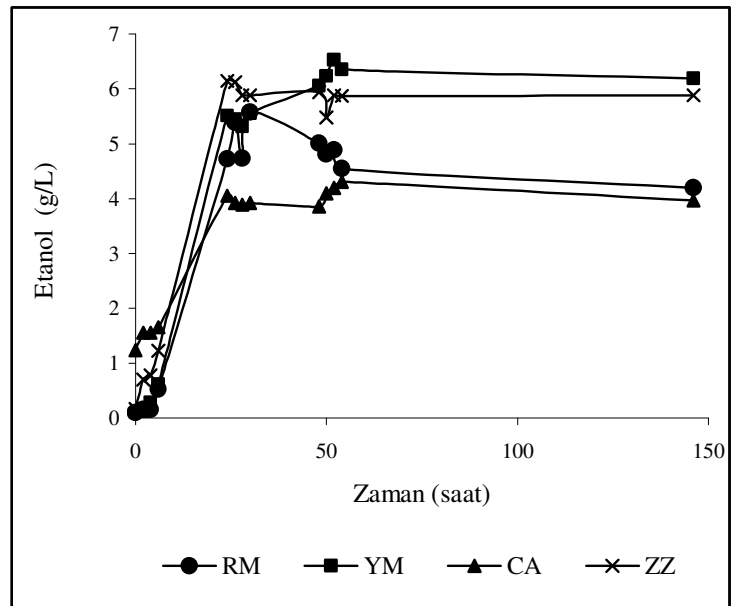
Şekil 5.1 A, *S. cerevisiae*’nın 20 g/L glukoz içeren dört farklı besiyerindeki üreme eğrilerini göstermektedir. En yüksek hücre konsantrasyonuna ZZ besiyerinde ulaşılmıştır. Şekil 5.1 B’ de görüldüğü gibi bu besiyeri etanol üretimi açısından da diğer besiyerlerine kıyasla daha verimlidir. RM besiyerinde ise etanol üretimi fermentasyonun ilk gününde 5,8 g/L olarak ölçülmüştür. Glukoz konsantrasyonu 100 g/L ye çıkarıldığında (Şekil 5.2) ise üreme ve etanol üretiminin zengin bir besiyeri olan YM besiyerinde maksimum seviyelere ulaştığı görülmüştür.

Çizelge 5.1. *S. cerevisiae* için kullanılan dört farklı besiyeri ve içerikleri

Bileşenler	Besiyerlerinde Bulunan Konsantrasyonları (g/L)			
	RM	ZZ	CA	YM
Üre	2	10		
KH ₂ PO ₄	2	2		
K ₂ HPO ₄	3			
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2			
MgSO ₄ .7H ₂ O		1		
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05			
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0025			
Glukoz	20	20	20	20
Maya Özütü	5	10		3
YNB			1.6	
Amonyum sülfat			5	
Sitrik asit			20	
Malt özütü				3
Pepton				5

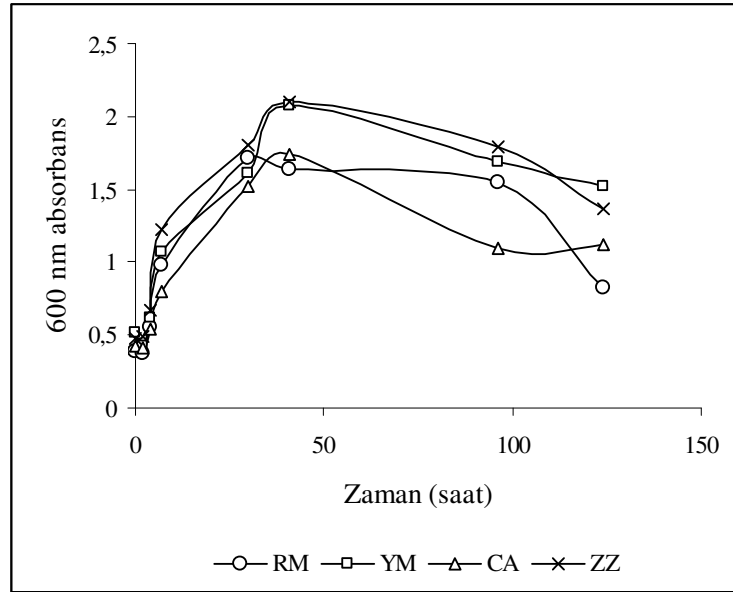


(A)

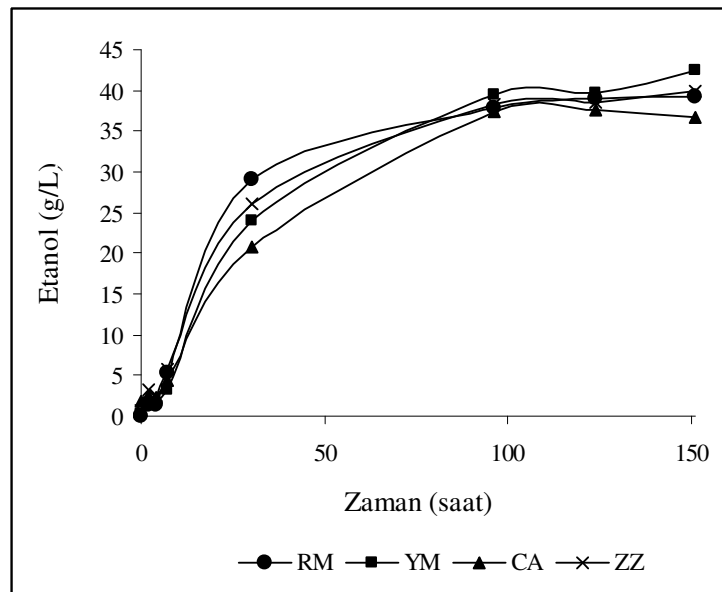


(B)

Şekil 5.1. 20 g/L glukoz içeren besiyerlerinde *S. cerevisiae*'nin üremesi (A) ve etanol üretimi (B)



(A)



(B)

Şekil 5.2. 100 g/L glukoz içeren besiyerlerinde *S. cerevisiae*'nin üremesi (A) ve etanol üretimi (B)

En yüksek üreme hızı ve etanol üretimi YM besiyerinde gerçekleşmiştir. Ancak bu besiyeri zengin bir besiyeridir ve ekonomik değildir. 100 g/L glukoz içeren RM besiyerinde etanol üretiminin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.2 B).

Besiyerleri 20 g/L glukoz konsantrasyonuna sahip olduklarında ise ZZ besiyerinin etanol üretimi ve üreme hızını artırdığı görülmüştür (Şekil 5.1 A ve B). ZZ besiyeri RM den farklı olarak daha fazla üre, maya özütü, $MgSO_4$ içermektedir, fosfat konsantrasyonu ise düşüktür (Çizelge 5.1). Ekonomik açıdan değerlendirildiğinde RM besiyeri daha düşük oranda maya özütü içermesi sebebiyle üretim için daha uygun bir besiyeridir. CA besiyerinin ise etanol üretimi açısından diğer besiyerlerine kıyasla elverişsiz olduğu tespit edilmiştir.

Selülitik bir mikroorganizma olan *C. thermocellum*'un üretildiği besiyeri olan RM besiyerinin *S. cerevisiae*'nın üremesi ve etanol üretimi için uygun olması RM'nin ortak besiyeri olarak kullanılabileceğini göstermektedir. *C. thermocellum* tez çalışmasının son bölümünde RM besiyerindeki selülozun parçalanmasında kullanılmış ve bu kültürde biriken glukoz *S. cerevisiae* tarafından etanol üretimi için kullanılmıştır.

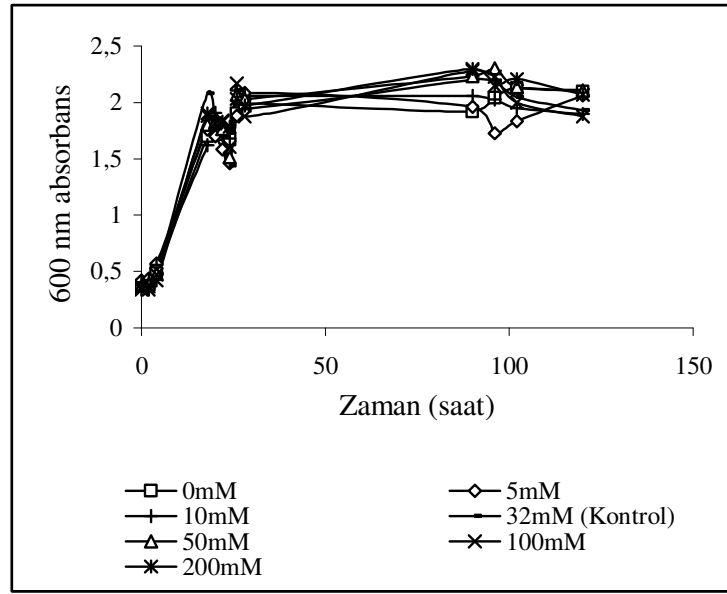
5.2. Besiyeri Bileşen Konsantrasyonlarının ve Fiziksel Parametrelerin *S. cerevisiae*'nin Etanol Üretimine Etkisi

RM besiyerinde bulunan besin maddelerinin konsantrasyonlarının etanol üretimine olan etkisini incelemek amacıyla fosfat, mineral ve maya özütü değişen konsantrasyonlarda besiyerine eklenmiş ve *S. cerevisiae* hücreleri ekilerek üreme ve etanol üretimi takip edilmiştir. Bunun yanı sıra sekiz farklı pH değeri, üç farklı sıcaklık ve üç farklı atmosfer koşulunun etkisi de incelenmiştir. Çalışmada etkisi incelenen besiyeri bileşen konsantrasyonları ve pH değerleri Çizelge 5.2'de verilmiştir. Besiyerleri glukoz miktarı 100 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır.

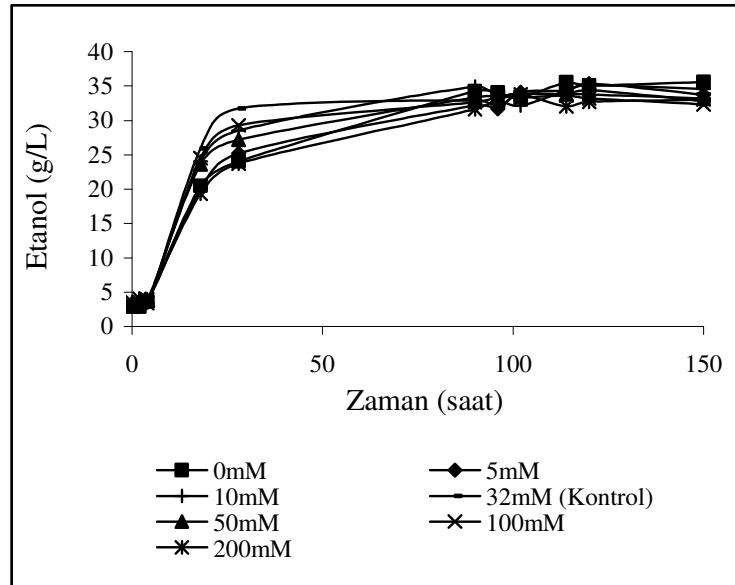
Çizelge 5.2. *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi üzerinde etkisi incelenen besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonları ve pH değerleri

Besiyeri bileşeni	Etkisi incelenen değerler
Fosfat	0, 5, 10, 32, 50, 100, 200 mM
Üre	0, 2, 5, 10, 20 g/L
Maya özütü	1, 3, 5, 10 g/L ticari maya özütü 1, 5, 10 g/L laboratuarda hazırlanmış maya özütü
Mineraller	Bkz. Çizelge 7.2 B
pH	3.5, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8
Şeker kaynağı (20 g/L)	Glukoz, Ksiloz, Selobioz ve Şekersiz
Glukoz	5, 10, 20, 50, 100, 150, 170, 200, 250 g/L

Farklı konsantrasyonlarda fosfat içeren RM besiyerinde *S. cerevisiae*'nin üremesi ve etanol üretimi izlenmiştir. Şekil 5.3 A ve B'de fosfat konsantrasyonunun üreme ve etanol üretimine etkisi görülmektedir. Üremenin 2. gününden itibaren 0-10 mM aralığındaki fosfat miktarlarında hücre miktarının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Etanol üretim hızının 32 mM fosfat içeren besiyerinde (kontrol) diğer besiyerlerindekiye kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu besiyerinde fermentasyonun 35. saatinde 32 g/L etanol üretilmiştir. Daha düşük ve daha yüksek fosfat miktarlarının etanol üretim hızını düşürdüğü görülmektedir. Ancak fermentasyonun ileriki saatlerine bakıldığında besiyerinde bulunan fosfat miktarının etanol üretimi üzerinde çok etkili olmadığı görülmektedir. Fermentasyonun 4. ve 5. günlerinde fosfat içermeyen besiyerinde en yüksek etanol üretimi gerçekleşmiştir.



(A)

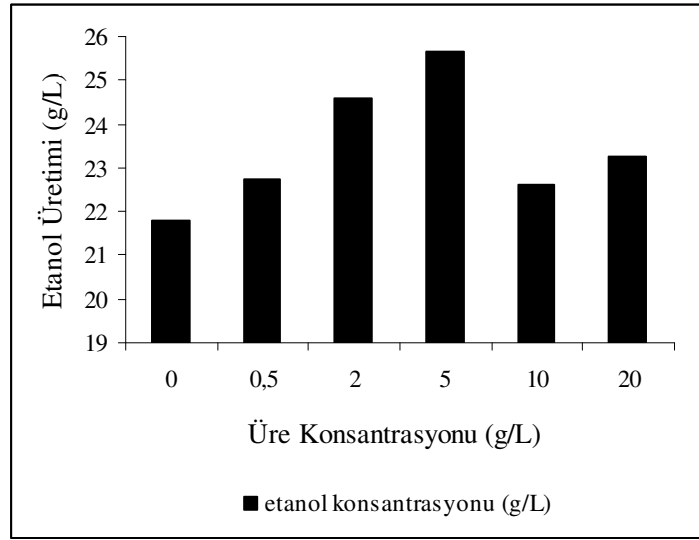


(B)

Şekil 5.3. Besiyerindeki fosfat konsantrasyonunun *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi

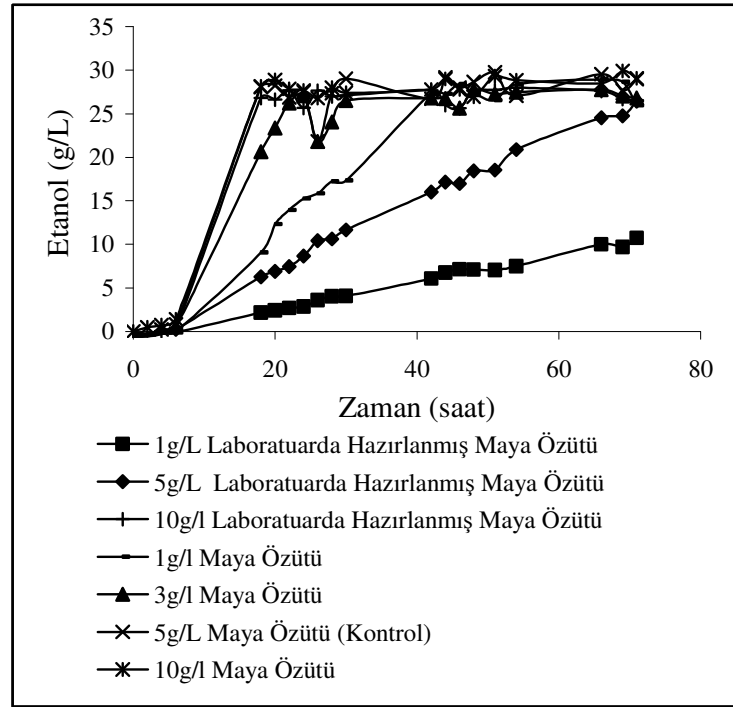
Üre konsantrasyonunun *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla hücreler farklı üre konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde üretilmişlerdir. En yüksek etanol üretiminin 5 g/L üre içeren besiyerinde

gerçekleştiği, 10 g/L ve 20 g/L üre konsantrasyonlarında ise üretilen etanol miktarının düştüğü görülmüştür (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Üre konsantrasyonunun *S. cerevisiae*'nin etanol üretimine etkisi

Laboratuarda hazırlanmış maya özütünün etanol üretimine olan etkisi ticari maya özütü ile kıyaslanmıştır (Şekil 5.5). Laboratuar koşullarında hazırladığımız maya özütünü içeren besiyerinde üreme bulanıklıktan dolayı sağlıklı olarak ölçülememiştir. Laboratuar koşullarında hazırlanmış maya özütü içeren besiyerinde etanol üretiminin çok düşük olduğu saptanmıştır. *S. cerevisiae* hücreleri 5 g/L laboratuarda hazırlanmış maya özütü içeren besiyerinde fermentasyonun 48. saatinde yaklaşık 28 g/L etanol üretilmişlerdir. Laboratuar koşullarında hazırlanmış maya özütü miktarı 10 g/L'ye çıkartıldığında ise hücreler kontrol besiyerindeki (ticari maya özütü konsantrasyonu 5 g/L) etanol üretim kapasitelerine ulaşabilmişlerdir.



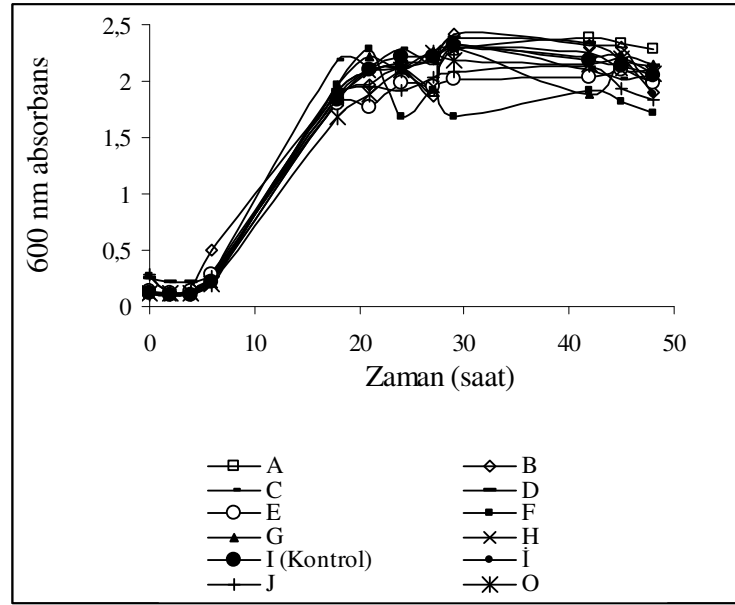
Şekil 5.5. Besiyerindeki ticari ve laboratuarda hazırlanmış maya özütü konsantrasyonunun *S. cerevisiae* 'nın etanol üretimine etkisi

Besiyerindeki mineral konsantrasyonlarının etkisini incelemek amacıyla Çizelge 5.3'te görülen 12 farklı mineral konsantrasyonuna sahip besiyerleri (A-O) hazırlanmış ve maya hücreleri ile ekim yapılmıştır.

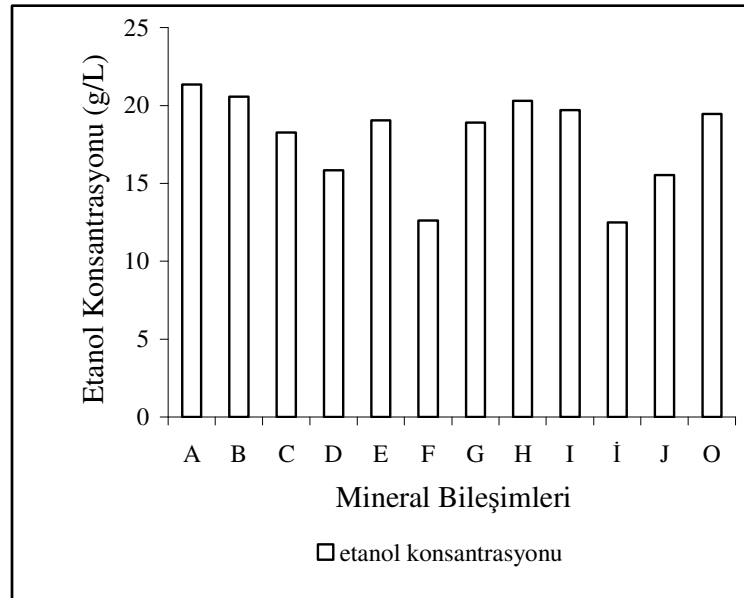
Çizelge 5.3. Besiyeri optimizasyonunda incelenen mineral kombinasyonları

Mineraller	Mineral Kombinasyonları (g/L)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	İ	J	O
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0	0,00025	0,025	0,25	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025	0,0025	0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0	0,05	0,1	0,5	0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,5	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0

Değişen mineral konsantrasyonları koyu yazılmıştır.



(A)



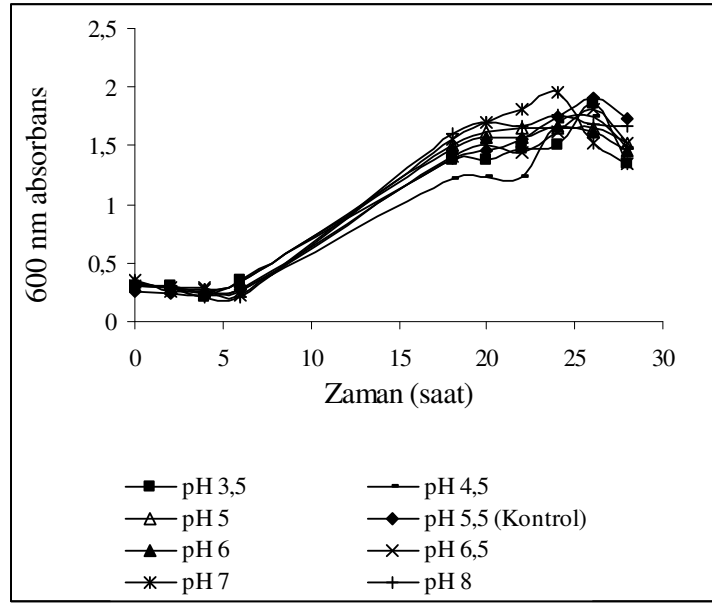
(B)

Şekil 5.6. Besiyerindeki mineral konsantrasyonunun *S. cerevisiae* 'nın üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi

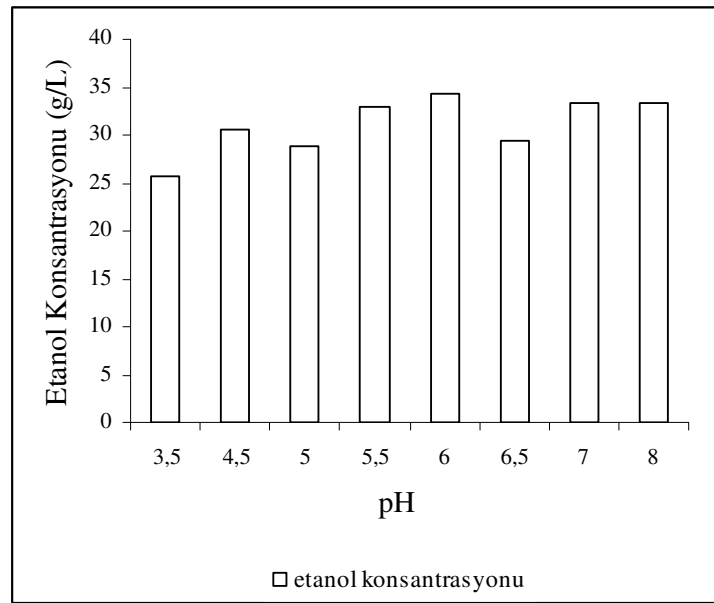
Besiyerindeki demir miktarındaki artış maya hücrelerinin etanol üretiminde düşüşe neden olmuştur (Şekil 5.6 B, Çizelge 5.3 sütun D). Mineral içermeyen besiyerinde (O kombinasyonu) maya hücrelerinin etanol üretiminin kontroldeki (I kombinasyonu) etanol üretimi ile aynı seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.6

B). Bu durumda maya hücrelerinin etanol üretmek için test edilen minerallerden (Fe^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2}) hiçbirine ihtiyaç duymadığı söylenebilir. Üreme eğrilerine bakıldığında en yüksek hücre miktarına demir içermeyen besiyerinde (A kombinasyonu) ulaşılmıştır. Besiyerindeki $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ miktarının 0.2 g/L den 0.5 g/L (F kombinasyonu) ye yükseltilmesi üremeye olumsuz etki etmiştir.

Besiyerindeki pH değerinin *S. cerevisiae*'nın üremesi ve etanol üretimi üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla farklı pH değerlerine sahip RM besiyerleri hazırlanmıştır. Gerçekleştirilen deneyde pH değerleri steril asit (1,2 M HCl) ve baz (10 M KOH) solusyonları kullanılarak ayarlanmış ve bu besiyerlerindeki üreme ve etanol üretimindeki farklılıklar izlenmiştir. Sonuçlar Şekil 5.7 A ve B ile gösterilmiştir. En yüksek üreme hızlarına pH sı 7 ve 8 olan besiyerlerinde ulaşılmıştır. En yüksek etanol üretimi ise pH 6, 7 ve 8 iken gerçekleşmiş ve fermentasyonun ikinci gününde yaklaşık 34 g/L olarak ölçülmüştür.



(A)

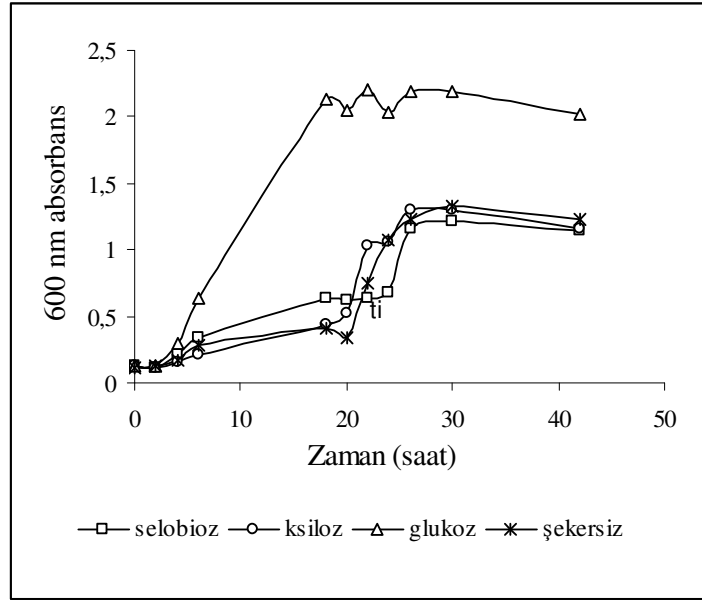


(B)

Şekil 5.7. Besiyeri pH sın *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi

S. cerevisiae 26602 hücrelerinin selülozik katı atıkların parçalanması sonucu ortaya çıkan ksiloz ve selobioz gibi şekerleri kullanma kapasitesini araştırmak amacıyla söz konusu şekerleri içeren RM besiyerlerindeki üreme hızları aynı miktarda glukoz içeren besiyerindeki üreme hızları ile kıyaslanmıştır. Şekil 5.8'de de görüldüğü gibi ksiloz ve selobioz hücreler tarafından tercih edilen ve kullanılan

şekerler değildir. Bu şekerleri içeren besiyerinde üremenin sağlıklı olduğu görülmüştür. Karbon kaynağı içermeyen ve karbon kaynağı olarak selobioz, ksiloz içeren besiyerlerinden alınan örnekler HPLC de analiz edilmiş ve etanol üretiminin gerçekleşmediği saptanmıştır.



Şekil 5.8. Farklı şekerler içeren besiyerlerinde *S. cerevisiae* 'nın üreme hızları

Etanol üretimini daha ekonomik olarak gerçekleştirmek için oda sıcaklığında çalkalama olmaksızın yapılan deneylerle kesikli bir sistem için glukoz konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. 5-250 g/L aralığında glukoz içeren 50 ml'lik RM besiyerlerinde *S. cerevisiae*'nin glukoz kullanım ve etanol üretim miktarı belirlenmiştir. Dört günlük fermentasyon sonucunda yapılan analizler yüksek glukoz konsantrasyonlarında (175, 243 g/L) glukoz kullanım ve etanol üretim veriminin düşmekte olduğu (Şekil 5.9 A), üretilen etanol miktarının azaldığı görülmüştür (Şekil 5.9 B). Glukoz kullanım verimi (%E) ve etanol üretim veriminin (%Ep) hesaplanması için aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

$$\%E = \frac{C_{So} - C_s}{C_{So}} \times 100 \quad (5.1)$$

$$\%Ep = \frac{P}{C_{So}} \times 100 \quad (5.2)$$

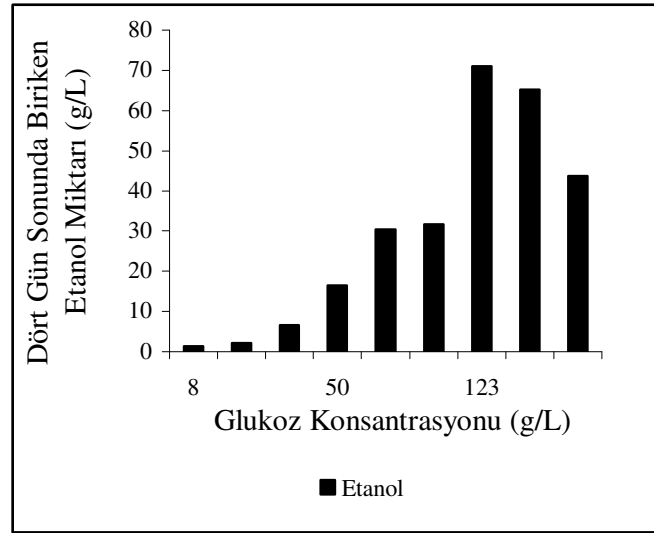
%E : Glukoz kullanım verimi,

%Ep : Etanol üretim verimi,

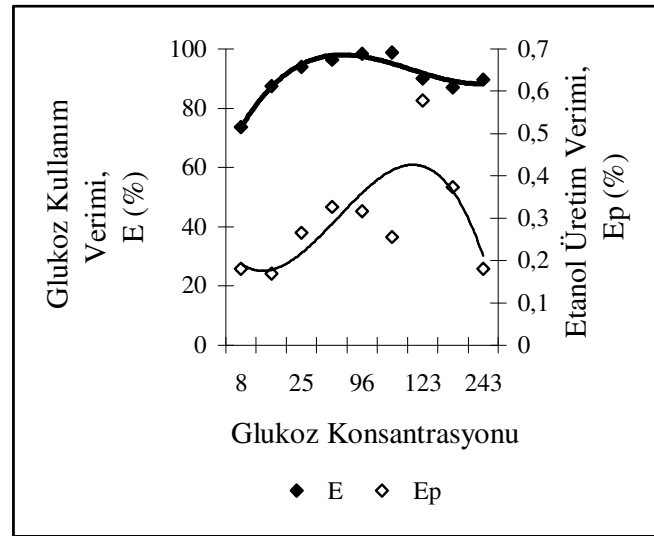
C_{So} : Giriş glukoz konsantrasyonu,

C_s : Çıkış glukoz konsantrasyonu,

P : Çıkış etanol konsantrasyonu.



(A)



(B)

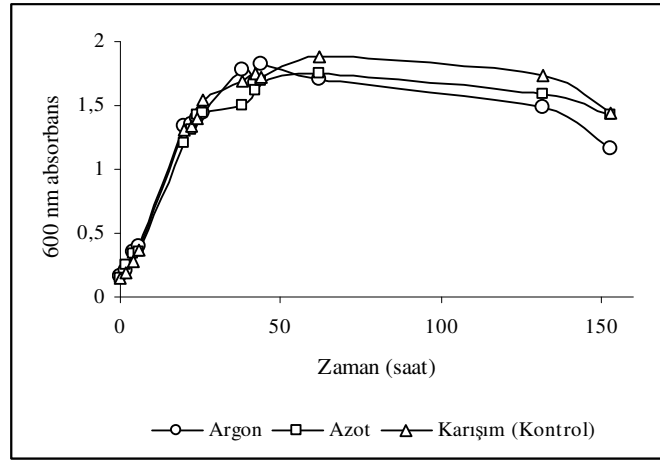
Şekil 5.9. Kesikli sistemde glukoz konsantrasyonunun *S. cerevisiae*'nın etanol üretimine (A)ve glukoz kullanım ve etanol üretim verimlerine (B) etkisi

Fiziksel parametrelerin etanol üretimine etkisinin incelenmesi amacıyla *S. cerevisiae* hücreleri Çizelge 5.4'te verilmiş olan şartlarda üretilmişlerdir. Değişik atmosfer koşullarının *S. cerevisiae*'nın etanol üretimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı Şekil 5.10 B'de görülmektedir. Ayrıca, aerobik atmosfer şartlarında anaerobik (karışım gazı) ortama kıyasla 2 g/L daha fazla etanol üretimi gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 5.10 C). Yüksek etanol üretimi için 30-37 °C'nin uygun olduğu

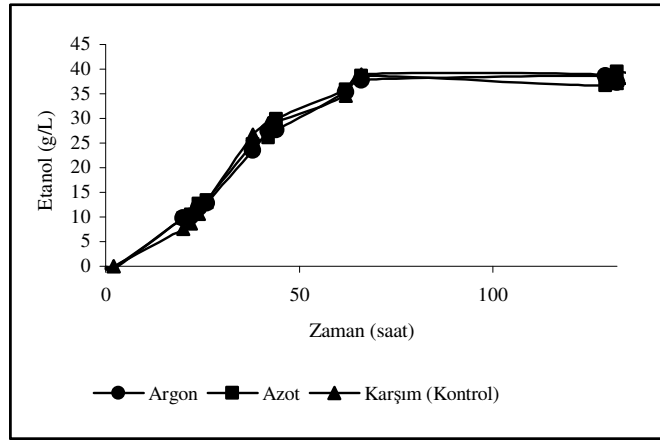
tespit edilmiştir. Bu sıcaklıklarda yaklaşık 32 g/L etanol üretilmiştir. Hücrelerin 37 °C’ de fermentasyonun ileriki saatlerinde parçalandıkları görülmüştür (Şekil 5.11 A). Oda sıcaklığında ise etanol üretiminin diğer sıcaklıklardaki etanol üretimine kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.11 B). Oda sıcaklığında etanol üretiminin 37 °C’ye kıyasla fermentasyonun üçüncü gününde % 7 oranında daha düşük olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.4. Etanol üretimi üzerinde etkisi incelenen fiziksel parametreler

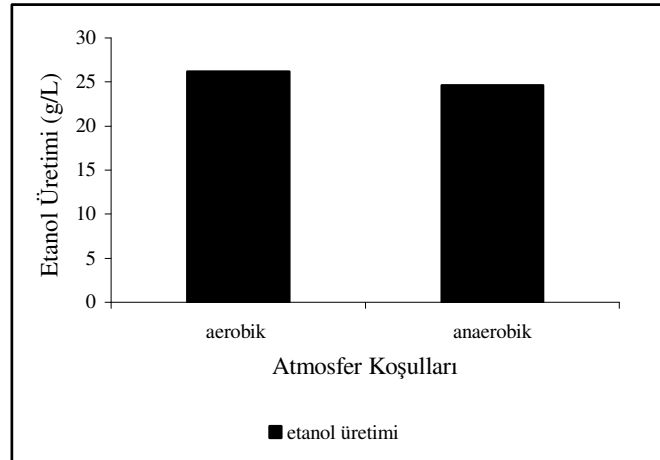
Fiziksel Parametreler	İncelenen Değerler
Atmosfer gazları	Argon, Azot, Karışım (%5 H ₂ , %10 CO ₂ , %85 N ₂), Aerobik
Sıcaklık	30 °C, 37 °C, oda sıcaklığı
Çalkalama koşulları	150 rpm’de çalkalamalı ve çalkalamasız
Basınç	Basıncılı ve basıncsız



(A)

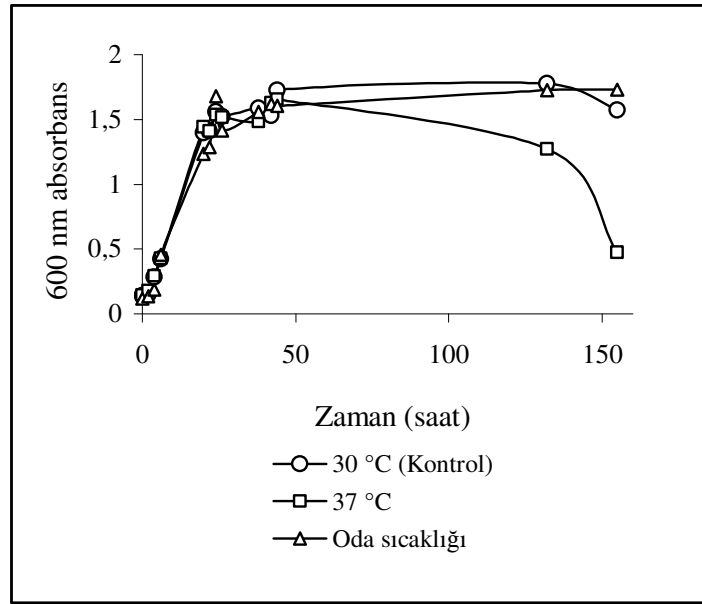


(B)

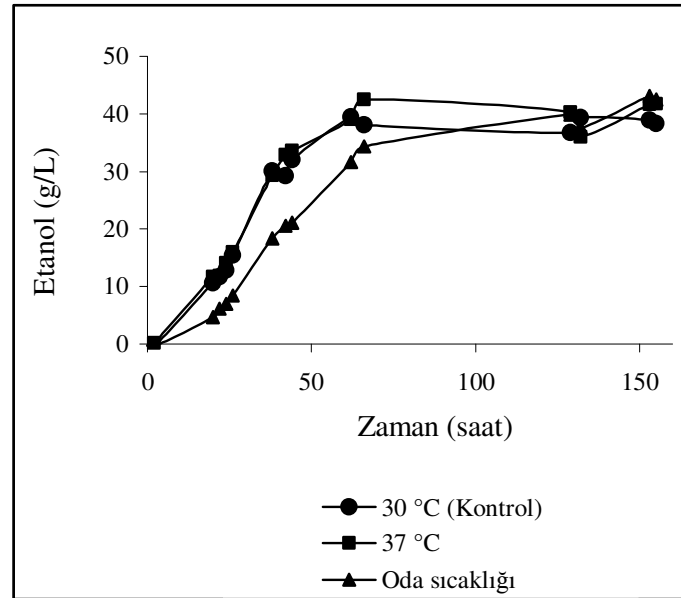


(C)

Şekil 5.10. Atmosfer koşullarının *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B ve C) etkisi



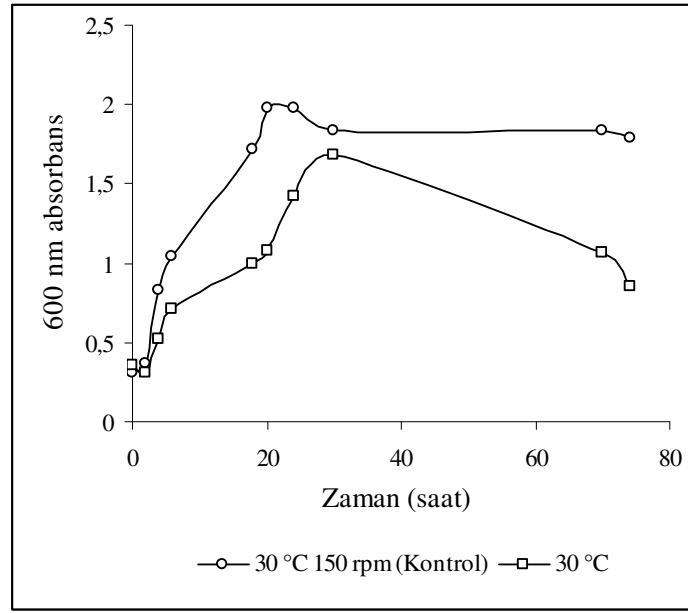
(A)



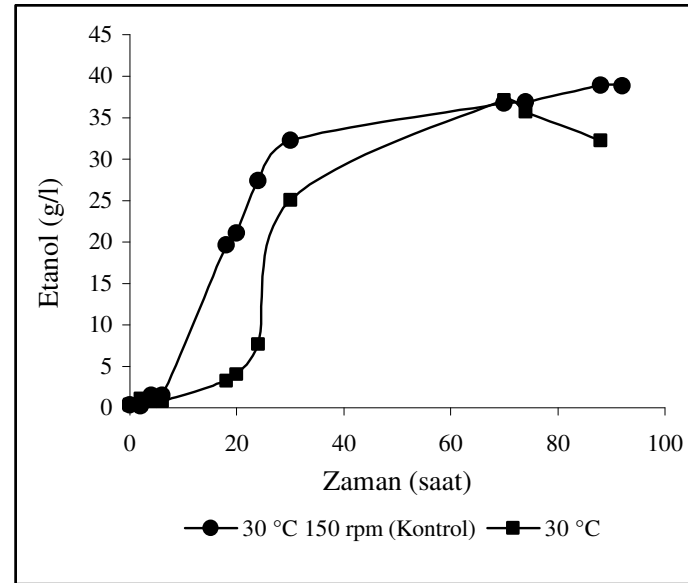
(B)

Şekil 5.11. Sıcaklığın *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi

Şekil 5.12 çalkalamanın maya hücrelerinin üreme ve etanol üretimine etkisini göstermektedir. Kültürlerin çalkalanması etanol üretimini özellikle fermentasyonun ilk günlerinde arttırmaktadır. Hücrelerin birbirlerine yapışmamasının ve çökelek oluşturmamalarının yüksek üretim için gerekli olduğu görülmüştür.



(A)

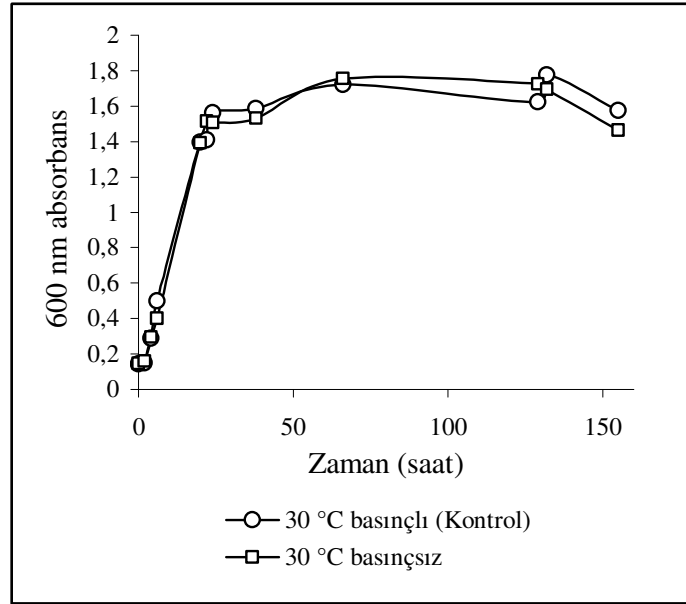


(B)

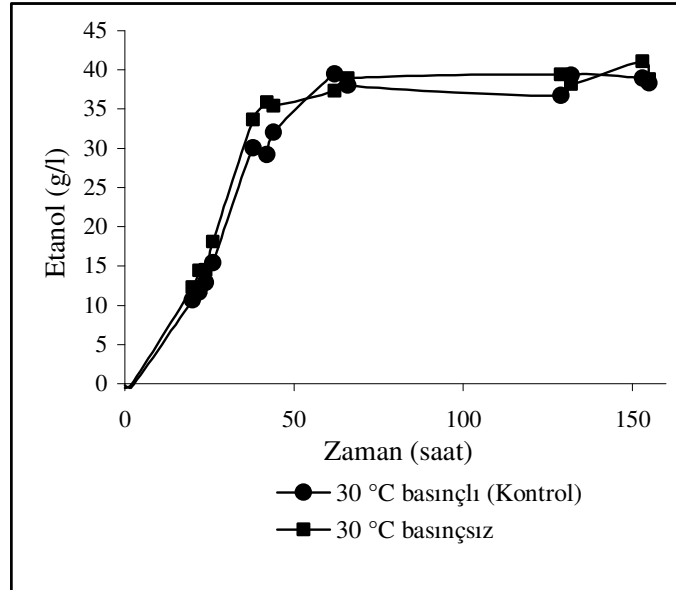
Şekil 5.12. Çalkalama koşullarının *S. cerevisiae*'nin üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi

S. cerevisiae hücreleri metabolizmaları sonucunda CO₂ gazı oluşturmaktadırlar. Oluşan bu gaz kullanılan cam serum şişeleri içerisinde birikmekte ve basınç yaratmaktadır. Şişeler içinde oluşan gazların sistemden uzaklaştırılmasını sağlamak için serum şişelerinin plastik tıplarına enjektör iğnesi

takılarak oluşan gazların uzaklaştırılması ve iç basıncın düşmesi sağlanmıştır. Daha önceden uygun görülen çalışma sıcaklığı olan 30 °C’de gerçekleştirilen bu deney sonucunda şişelerde oluşan basıncın üreme ve etanol üretimi üzerinde büyük bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.13). Fermentasyonun ikinci gününde basınçlı ve basınçsız kültürlerde sırasıyla 32,1 ve 35,8 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir.



(A)



(B)

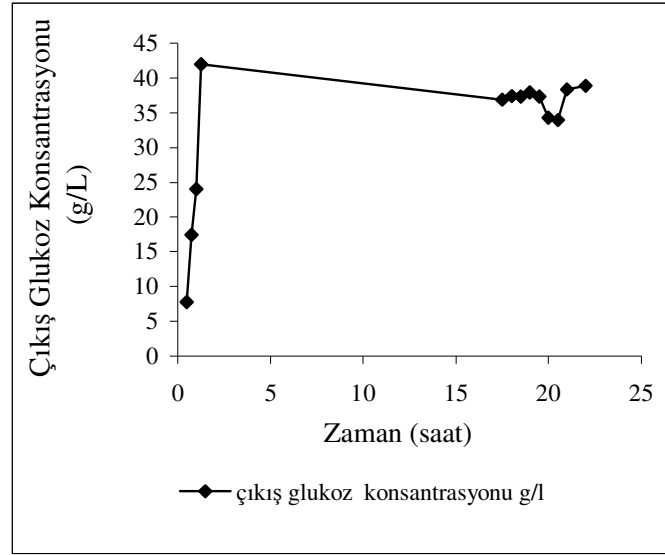
Şekil 5.13. Basıncın *S. cerevisiae*’nın üreme hızına (A) ve etanol üretimine (B) etkisi

5.3. *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerinin PolyHIPE Polimere Tutuklanması ve Dolgu Yataklı Reaktörde Etanol Üretimi

Özellikleri Bölüm 3.3’de anlatılan ve Şekil 3.1’de gösterilen *S. cerevisiae* hücrelerinin tutuklandığı dolgu yataklı reaktör kullanılarak sürekli sistemde etanol üretim verimi arttırılmaya çalışılmıştır. Uygun giriş glukoz konsantrasyonu ve uygun debi çalışmaları yapılmış, kinetik parametreler hesaplanmıştır. Uygun giriş glukoz konsantrasyonunun tespiti için 6,7-250 g/L aralığında glukoz konsantrasyonuna sahip RM besiyeri 1 ml/dk debi ile hücre tutuklamalı reaktöre verilmiştir. Sistem kararlı hale geçtikten sonra çıkış glukoz ve etanol konsantrasyonları ölçülmüş ve tüm veriler bu değerlere göre hesaplanmıştır. Şekil 5.14’te 100 g/L glukoz konsantrasyonuna sahip besiyeri reaktörden geçirildiğinde zamana bağlı çıkış glukoz konsantrasyonlarındaki değişim sistemin kararlılığına örnek olarak gösterilmiştir. Farklı glukoz konsantrasyonlarında yapılan tüm deneyler için sistemin kararlı hale geçmesi beklenmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarının etanol üretimini ve glukoz kullanımını azalttığı gözlenmiştir. En yüksek etanol üretim verimi 50 g/L glukoz içeren RM besiyeri sisteme 1 ml/dk akış hızı ile verildiğinde %43 olarak hesaplanmıştır. Kuru hücre miktarı tutuklama materyalinin gramı başına 2 gram olarak hesaplanmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonlarında ve debilerde reaktörde elde edilen veriler Çizelge 5.5’te özetlenmiştir.

Çizelge 5.5. Hücre tutuklamalı dolgu yataklı reaktörde farklı glukoz konsantrasyonları ve farklı debilerde elde edilen veriler

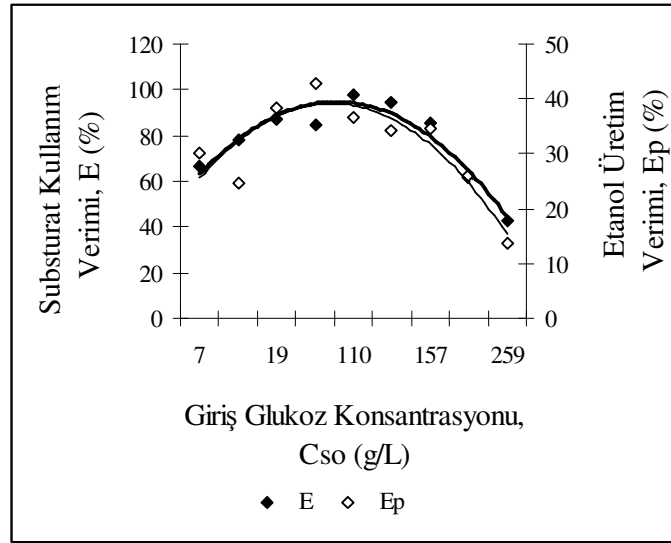
Deney No	Q (ml/dk)	C _{so} (g/L)	C _s (g/L)	E (%)	P (g/L)	Ep (%)	t (dk)	Pf (g/L.gün)	Reaktör verimi	P/M (g/g.gün)	-r _{su} (g/gün)
1	1	6,5	2,2	65,4	2,0	31,1	101,5	28,5	61,0	0,4	60,0
2	1	19,1	2,4	87,6	7,3	38,3	101,5	104,0	75,1	1,3	237,9
3	1	50,0	7,5	85,1	21,5	43,0	101,5	304,8	84,2	3,7	603,5
4	3	50,6	21,4	57,7	10,2	20,2	33,8	434,7	39,6	5,3	1243,9
5	6	51,9	25,2	51,5	10,9	21,0	16,9	929,1	41,2	11,4	2273,5
6	9	50,9	34,8	31,7	5,9	11,7	11,3	757,4	22,8	9,3	2058,3
7	12	48,6	36,9	24,1	3,0	6,1	8,5	506,7	12,0	6,2	1992,1
8	1	110,9	2,9	97,4	40,5	36,6	101,5	575,2	71,7	7,1	1531,7
9	1	146,6	8,5	94,2	50,4	34,4	101,5	714,9	67,4	8,8	1958,3
10	1	157,4	23,5	14,9	46,2	29,3	101,5	654,8	57,5	8,1	1900,4
11	1	176,9	67,9	38,4	35,1	19,8	101,5	497,4	38,9	6,1	1545,6
12	1	259,2	148,2	42,8	35,1	13,5	101,5	497,4	26,5	6,1	1575,0



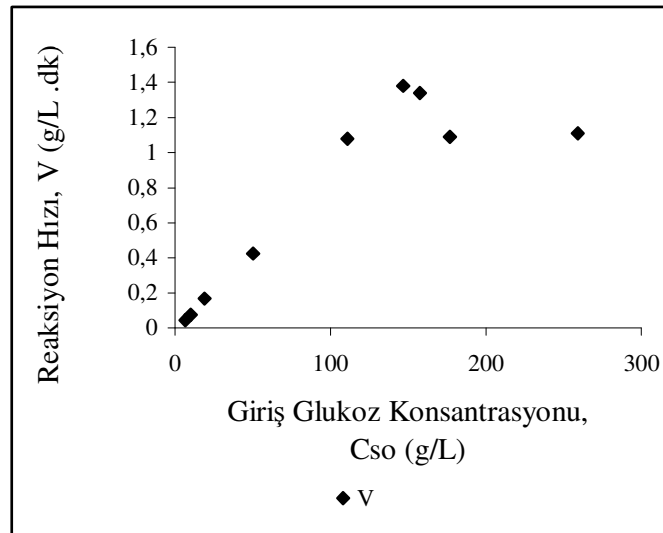
Şekil 5.14. 100 g/L giriş glukoz konsantrasyonu ve 1 ml/dk akış hızında sürekli sistemin zamanla satabil hale ulaşması

Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren besiyerleriyle 1 ml/dk debiyle yapılan deneyler sonucunda glukoz konsantrasyonunun etanol üretimi ve glukoz kullanımı verimleri üzerine etkisi Şekil 5.15 A'da gösterilmektedir. Glukoz konsantrasyonundaki 147 g/L'ye kadar olan artışın substurat kullanım ve etanol üretim verimini arttırdığı görülmektedir.

Substurat inhibisyon kinetiklerine göre besiyeri içerisindeki glukoz tek karbon kaynağı olarak kabul edilmiş, maya özütü ve azot gibi kaynaklardan gelen karbon miktarı ihmal edilmiştir. Hesaplamalar sonucunda V_m değeri 2,591 g/dk, K_m değeri 270,78 g/L ve K_s değeri 1534 g/L olarak bulunmuştur. Substurat ve ürün inhibisyonlarının denenen glukoz konsantrasyonlarında (6,7-250 g/L) reaktör içerisine verilen glukozdan kaynaklandığı varsayılmıştır. Şekil 5.15 B yükselen glukoz konsantrasyonlarında inhibisyon etkilerini göstermektedir.



(A)



(B)

Şekil 5.15. 1 ml/dk akış hızında giriş glukoz konsantrasyonunun etanol üretim ve glukoz kullanımı verimleri (A) ve reaksiyon hızına (B) etkisi

Reaksiyon sabitleri substurat inhibisyonu için verilen Michaelis-Menten eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Kullanılan bu eşitlik aşağıda formüle edilmiştir:

$$V = \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{S}{K_s} \right) + S} \quad (5.1)$$

V : Reaksiyon hızı,

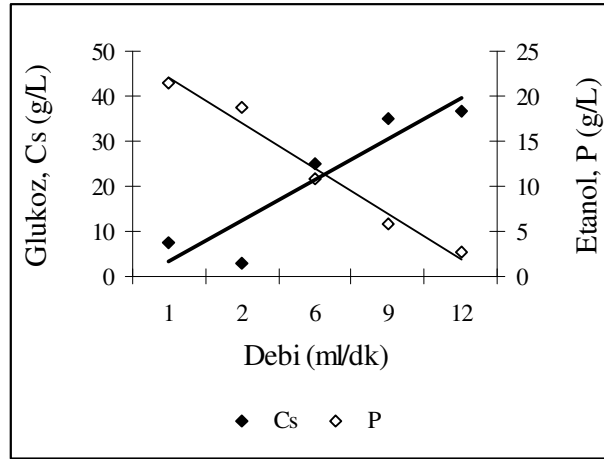
V_m : Maksimum reaksiyon hızı,

K_m : Yarı hız sabiti,

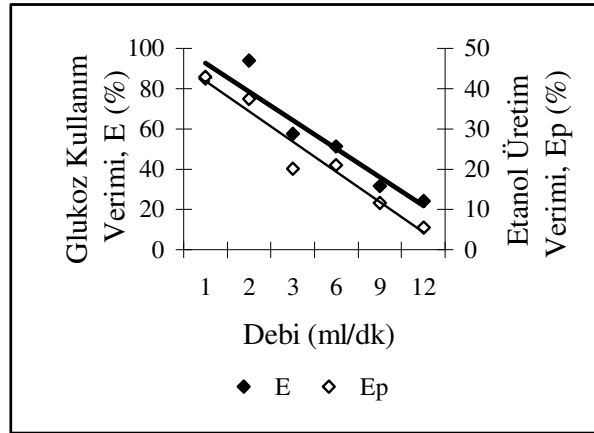
S : Substurat konsantrasyonu,

K_s :Substurat inhibisyon katsayısı.

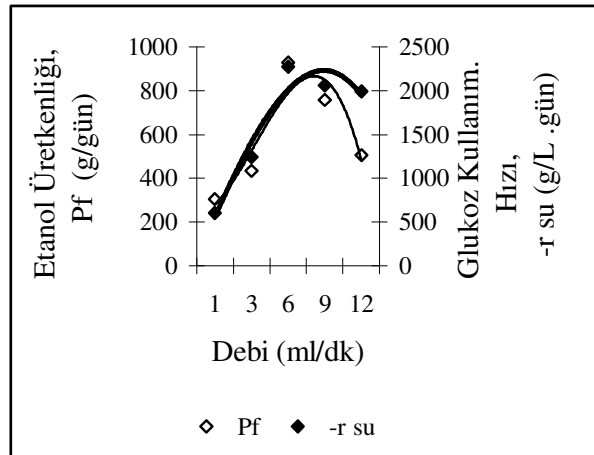
Reaktörden 1, 2, 3, 6, 9 ve 12 ml/dk akış hızıyla 50 g/L glukoz içeren besiyeri geçirildiğinde düşük bekleme sürelerinde çıkış etanol konsantrasyonunun düştüğü, çıkış glukoz konsantrasyonunun ise arttığı gözlenmiştir (Çizelge 5.4 ve Şekil 5.16 A). Buna bağlı olarak etanol üretim ve glukoz kullanım verimleri düşmektedir (Şekil 5.16 B). Akış hızının üretkenlik ve glukoz kullanım hızı üzerindeki etkisi Şekil 5.16 C’de gösterilmektedir. En yüksek etanol üretkenlik değeri olan 929 g/gün değerine 6 ml/dk akış hızıyla çalışılırken ulaşılmıştır.



(A)



(B)

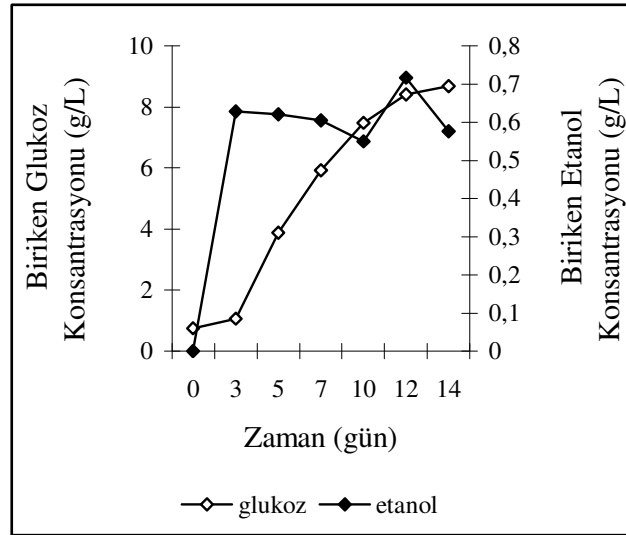


(C)

Şekil 5.16. 50 g/L glukoz içeren besiyerinde debinin çıkış etanol ve glukoz konsantrasyonları (A) etanol üretim verimi ve glukoz kullanım verimi (B) ve etanol üretkenliği ve glukoz kullanım hızı (C) üzerine etkisi

5.4. *C. thermocellum* Kültür Sıvısında Selülozun Parçalanması Sonucu Biriken Glukozun Etanol Üretiminde Kullanımı

Çalışmanın bu bölümünde *C. thermocellum*'un selülozu parçalaması sonucu kültür ortamında biriken glukozun maya hücreleri tarafından etanol üretimi için kullanım potansiyeli kesikli sistemde ve maya hücrelerinin tutuklanmış olduğu hücre tutuklamalı sürekli reaktör sisteminde incelenmiştir. 10 g/L selüloz içeren RM besiyerinde *C. thermocellum*'un selülozu parçalaması sonucu biriken glukoz ve üretilen etanolün zamana bağlı değişimi Şekil 5.17 'te verilmiştir (Özpınar, 2007).



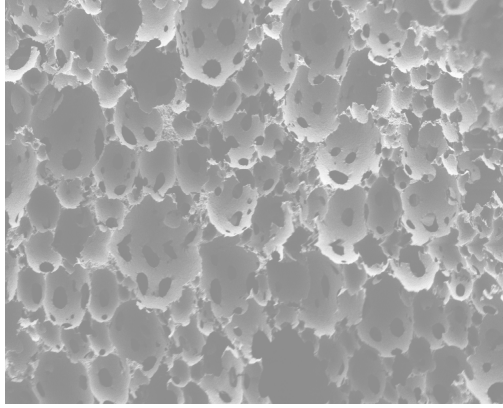
Şekil 5.17. *C. thermocellum* kültüründe zamana bağlı glukoz birikimi ve etanol üretimi

Çizelge 5.6. Farklı oranlarda taze besiyeri ile karıştırılmış *C. thermocellum* kültür sıvısında maya hücrelerinin glukoz kullanım verimi ve etanol üretim miktarı

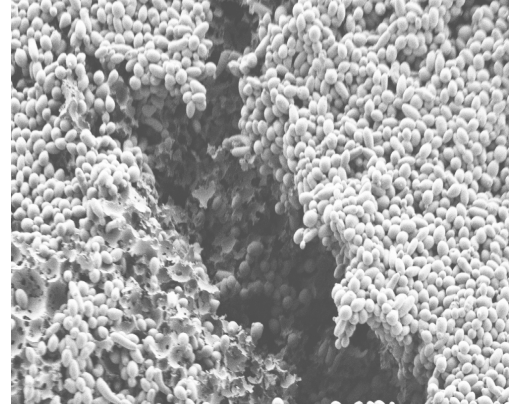
Besiyeri	Kesikli Sistemde Glukoz Kullanım Verimi (%) $\frac{C_{so} - C_s}{C_{so}} \times 100$	Kesikli Sistemde Etanol Üretimi (g/L)	Hücre Tutuklamalı Reaktörde Glukoz Kullanım Verimi (%) $\frac{C_{so} - C_s}{C_{so}} \times 100$	Hücre Tutuklamalı Reaktörde Çıkış Etanol Konsantrasyonu (g/L)	Hücre Tutuklamalı Reaktörde Etanol Üretkenliği (g/L.gün) $Q \times \frac{P}{V}$
<i>C. thermocellum</i> kültürü : Taze RM, Glukoz Konsantrasyonu					
1 : 0, 7 g/L	44	1,30	47	1,2	17
1 : 3, 7 g/L	68	1,44	48	2,2	31,2
0 : 1, 7 g/L (Kontrol)	81	1,45	67	2	28,4
1 : 3, 20 g/L	89	6,20	78	5,5	78
0 : 1, 20 g/L (Kontrol)	88	5,73	87	7,3	103,6

C. thermocellum kültür sıvısı farklı miktarlarda glukoz içeren RM besiyeri ile karıştırılarak ve karıştırılmadan kesikli ve sürekli sistemde besiyeri olarak kullanılmıştır. Çizelge 5.6'da farklı oranlarda taze besiyeri ile karıştırılmış *C. thermocellum* kültür sıvısında maya hücrelerinin glukoz kullanım verimi ve etanol üretim miktarı verilmiştir. Çizelge 5.6'da görüldüğü gibi glukoz kullanım verimi ve etanol üretimi taze besiyeri miktarıyla oldukça ilişkilidir. Taze RM besiyeri içermeyen *C. thermocellum* kültüründe glukoz kullanım verimi %44 olarak hesaplanmıştır. Bu değer 7 g/L glukoz içeren taze RM besiyerinde % 81 olarak bulunmuştur. Yüksek glukoz konsantrasyonunda (20 g/L) özellikle kesikli sistem çalışmalarında taze besiyeri miktarının substrat kullanım verime olan etkisinin daha az olduğu saptanmıştır.

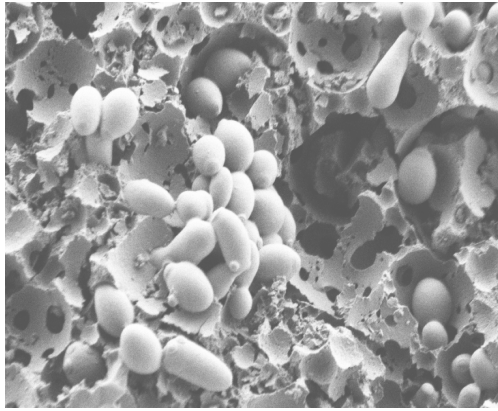
Bu çalışmada kullanılan dolgu yataklı sürekli reaktörde tutuklama materyali olarak kullanılan polyHIPE polimerin maya hücrelerinin tutuklanması için son derece verimli bir matris olduğu görülmüştür. Reaktördeki kuru hücre ağırlığı destek materyalinin gramı başına 2 gr olarak hesaplanmıştır. Reaktörden alınan polimer örneklerinin SEM görüntüleri polimer yüzüne maya hücrelerin çok başarılı bir şekilde tutundukları göstermektedir (Şekil 5.18). Gözenek boyutlarının maya hücrelerinin boyutlarından küçük olması nedeniyle hücreler polimerin yalnızca yüzeyine tutunmuşlar, gözenekler içine hareket edememişlerdir. Porozite yoğunluğu hücre tutuklanmasına katkıda bulunmuştur.



(A)



(B)



(C)

Şekil 5.18. Dolgu yataklı reaktörde kullanılan polimer ve tutuklanmış maya hücrelerinin SEM görüntüleri: Boş polyHIPE polimer (büyütme gücü 4000 X) (A), maya hücreleri ile kaplanmış polimer yüzeyi (büyütme gücü 2000 X) (B) ve polimer gözeneklerinde tutuklanmış maya hücreleri (büyütme gücü 5000 X) (C)

6. TARTIŞMA

Saccharomyces cerevisiae içecek ve biyoyakıt üretmek amacıyla şekerleri etanole dönüştürmek için kesikli sistemlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Etanol üretim prosesinin önemi bilinmesine rağmen glikoliz ve etanol üretimini limitleyen fizyolojik baskılar tam olarak anlaşılamamıştır [Casey and Ingledew, 1984; Ingram and Buttke, 1984; Moulin et al, 1984]. Bu baskıların belirlenmesi proses koşullarının ve kullanılan organizmaların geliştirilmesi ve iyileştirilmesi için önemli birer adım olacaktır. Bu gelişmeler varolan fermentasyon ünitelerindeki etanol üretim kapasitelerinin artmasını ve gelecekteki proseslerin maliyetinin azaltılmasını sağlayabilir [Dombek and Ingram, 1987]. *S. cerevisiae*'nın optimum koşullar sağlandığında çok hızlı glikoliz ve etanol üretim hızına ulaşabileceği ve etanol üretiminin 50 mmol etanol/saat/gram hücre proteini değerine ulaşabileceği rapor edilmiştir [Dombek and Ingram, 1986].

Bu tez çalışmasında öncelikle besiyeri bileşen konsantrasyonlarının ve fiziksel koşulların *S. cerevisiae* ATCC 26602 suşunun kesikli sistemde etanol üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Test edilen dört farklı besiyeri arasından hazırlanmış maliyetinin düşük olması ve yüksek etanol üretiminin elde edilmesi nedeniyle RM besiyeri seçilmiş ve optimizasyon deneyleri bu besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda fosfat konsantrasyonundaki değişimin etanol üretimi üzerinde çarpıcı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Besiyerinde nitrojen kaynaklarından biri olan maya özütü varlığının hücrelerin çoğalması ve etanol üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu görülmüştür. Nitrojen kaynağının etanol üretimi için önemi farklı çalışmalarda da rapor edilmiştir (Chandel et al, 2007; Bai, 2007). Literatürdeki bilgiler [Dombek and Ingram, 1986] magnezyum elementinin fermentasyon prosesi için önemli olduğunu göstermesine rağmen bu tez çalışmasında besiyerinde $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ varlığının *S. cerevisiae* hücrelerinin etanol üretimini artırmadığı görülmüştür.

Deney sonuçları çalkalamanın ve sıcaklığın etanol üretimi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Çalkalamasız koşullarda hücrelerin birbirine yapışmalarının

etanol üretimi açısından elverişsiz bir ortam yarattığı sonucuna varılabilir. En yüksek etanol üretimi 37 °C’de gerçekleşmiş, oda sıcaklığında etanol üretiminin 37 °C’deki üretime kıyasla %7 oranında azaldığı görülmüştür. Reaktör ısıtma maliyeti düşünüldüğünde oda sıcaklığında gerçekleştirilecek olan fermentasyonun daha ekonomik olacağı söylenebilir.

Ucuz ve yenilenebilir substratlardan yüksek etanol verimi almak ve üretim işleminde enerji ihtiyacını düşürmek alkolik fermentasyon çalışmalarında üzerinde durulan önemli iki faktördür. Bu amaca ulaşabilmek için sürekli kültür, tutuklanmış hücreler ve hücrelerin tekrar kullanımı gibi işlemler geliştirilip kullanılmıştır. Tutuklanmış hücrelerin kullanılması genellikle katalizör aktivitesini iyileştiren bir işlemdir. Bir matrise tutturulduklarında normal bir süspanse kültürdekinde olduğundan daha yoğun bir hücre konsantrasyonuna ulaşmak mümkündür. Canlı hücre miktarının artırılması reaktörün verimini artıran bir etmendir. Bunun yanı sıra kütle transferinin iyileştirilmesiyle besinlerin hücrelere ulaşmasını ve ürün alımını daha etkin hale getirmek amacıyla immobilizasyon destek matrisi değişik geometrilere hazırlanabilir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde dolgu yataklı reaktörde farklı substrat konsantrasyonlarının ve farklı akış hızlarının polyHIPE polimer materyaline tutuklanmış maya hücrelerinin substrat kullanım ve etanol üretim verimlerine olan etkisi incelenmiştir. Uzun süreli bir proses olan sürekli sistemde proses uzun sürdüğü için kontaminasyon riski yükselmektedir. Kesikli sistem çalışmalarında nötral pH aralığının etanol üretimi için daha elverişli olduğu görülmesine rağmen sürekli sistemde kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla besiyeri pH sı 5,5 e ayarlanmıştır. Reaktör oda sıcaklığında çalıştırılmıştır. Reaktörün en yüksek verimliliğe 50 g/L glukoz içeren besiyeri 1 ml/dk akış hızıyla verildiğinde ulaşmıştır. Reaktöre giren glukoz konsantrasyonu arttıkça üretilen etanol miktarında da artış gözlemlenmiştir. Besiyerindeki glukoz konsantrasyonu 150 g/L’yi geçtiğinde ise şiddetli inhibisyon etkisi gözlemlenmiş, hücrelerin glukozu verimli kullanamadıkları ve etanol üretim kapasitelerinin düştüğü görülmüştür. Önceki çalışmalarda yüksek glukoz konsantrasyonlarında etanol üretiminin düştüğü [Najafpour et al 2004] ve ozmotik

basıncıdan dolayı hücrelerin fizyolojik olarak zarar gördüğü [Hartmeier, 1972] rapor edilmiştir.

50 g/L glukoz konsantrasyonuna sahip besiyeri reaktöre farklı akış hızlarıyla verildiğinde ise çıkış etanol konsantrasyonunun yüksek akış hızlarında düştüğü gözlemlenmiştir. Ancak üretkenlik 6 ml/dk debide 929 g etanol/gün olarak en yüksek değerini bulmuştur. İmmobilize reaktörler için üretkenlik ve substrat parçalama hızları difüzyonel sınırlamalar nedeniyle başlangıçta akış hızının artmasıyla artmaktadır. Kütle transfer rezistansı biyofilm çevresinde düşük akış hızlarında nispeten daha etkilidir [Erhan et al, 2004]. Bu yüzden yüksek akış hızları üretkenliğin arttırımı için tercih edilir.

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 biyoetanol gibi endüstriyel ürünlere dönüştürülmesi büyük bir ekonomik potansiyele sahiptir. Ayrıca, lignoselülozik atıkların biyoetanol üretiminde kullanımı fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltacak olması nedeniyle çevrenin korunmasında da pozitif etki yaratacaktır.

Bugün biyoetanol büyük çapta şeker pancarı veya nişasta açısından zengin materyallerden üretilmektedir. Biyoetanol üretiminde tarımsal yan ürünlerin ham madde olarak kullanılması, ham madde miktarının arttırılması ve üretim maliyetinin düşürülmesi açısından önemlidir. 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] ve bu şekerler daha sonra etanol üretimi için kullanılır. Enzimatik hidroliz dışarıdan selülaz enzimi eklenerek veya selüloolitik bir mikroorganizma kullanılarak gerçekleştirilebilir. Selülaz enziminin dışardan eklenmesi çok miktarda enzim gerektirdiğinden proses maliyetini yükselten bir etkidir [Haan et al, 2007].

Bu tez çalışmasının son bölümünde selülitik termofilik bir bakteri olan *C. thermocellum* ATCC 27405 suşunun kültür ortamında bulunan selülozu parçalaması sonucu oluşan glukozun *S. cerevisiae* tarafından kullanılma potansiyeli ve etanole üretim kapasitesi incelenmiştir.

C. thermocellum dışarıdan herhangi bir enzim ilavesi olmaksızın 10g/L selülozdan yaklaşık 7 g/L glukoz üretebilmektedir. Çalışmada yaklaşık 7 g/L glukoz içeren *C. thermocellum* kültürü taze besiyeri ile karıştırılmadan ve 1 : 3 oranında karıştırılarak *S. cerevisiae* için besin maddesi olarak kullanılmıştır. *C. thermocellum* kültür ortamı glukozun yanı sıra başka yan ürünler ve hücresel atıklar da içermektedir. Bu nedenle kültür taze besi yeri ile %25 (%75 taze besiyeri+ %25 *C. thermocellum* kültürü) oranında karıştırılarak kullanıldığında glukoz kullanım verimi kesikli sistemde %44'ten %68'e ve etanol üretimi 1,3 g/L'den 1,44 g/L'ye çıkmıştır. 7 g/L glukoz içeren *C. thermocellum* kültürü glukoz miktarı 20 g/L olacak şekilde %75 taze besiyeri ile karıştırıldığında glukoz kullanım verimi %89'a ulaşmıştır. Dolgu yataklı reaktörde glukoz kullanım veriminin kesikli sisteme kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Reaktör düşük akış hızlarında beslendiği takdirde besiyerinin reaktör içinde daha uzun süre kalması sağlanabileceğinden glukoz kullanım ve etanol üretim verimlerinin artacağı düşünülmektedir. Üretim verimini arttıracak diğer bir etken ise reaktör boyutunun 1 L'ye çıkarılmasıdır. Bu faktörlerin sürekli sistemde etanol üretimine etkisi ileriki çalışmalarda araştırılacaktır.

Yapılan deneyler sonucunda *C. thermocellum* kültürünün taze besiyeri ile karıştırıldığında *S. cerevisiae* tarafından verimli bir şekilde kullanıldığı görülmüştür. Selülozik atıkların parçalanması sonucunda oluşan glukozun biyoetanol üretiminde değerlendirilmesinin özellikle yüksek ölçekte üretim yapıldığında üretim maliyetini önemli ölçüde düşüreceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

Acaroğlu, M., Oğuz, H., Ünal, M., Türkiye İçin Alternatif Bir Yakıt, Biyoetanol, Yakıt Olarak Kullanımı ve Emisyon Değerleri. 2004, Biyoenerji Sempozyumu İzmir.

Asenho, A. J., and Merchuk, C. J. 1995. Bioreaktor System Design. Marcel Dekker, Inc.

Avcı, A. 2004. Bazı thermoaerobakter suşlarının etanol üretim oranlarının karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

Ayberk, S. 2002. Hava Kirliliği ve Meteorolojik Olaylar. Kocaeli Üniversitesi Yayın No : 83. Kocaeli.

Bai, F., Process Oscillations in Continuous Ethanol Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. 2007, A thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Chemical Engineering, Waterloo, Ontario, Canada,

Baysal, E., Yalınkılıç, K., Peker, H., Çolak, M., Göktaş, O., Özen, E., ve Çolak, A. M. 2003. Atık kağıtların çeşitli bitkisel ve odunsu atık/artık substratlarla *Pleurotus ostreatus* Jacq. ex Fr. Kummer kültüründe değerlendirilmesi. Ekoloji ve Çevre Dergisi. 49:12-16.

Berg, C. 2004. World fuel ethanol analysis and outlook. [<http://www.distill.com/world-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>].

Bulut, B., Tarıma Dayalı Alternatif Yakıt Kaynaklarından Biyoetanol ve Türkiye İçin En Uygun Biyoetanol Maddesi Seçimi. 2006. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Casey, G. P., and Ingledew, W. M. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. Crit. Rev. Microbiol. 13:219-290.

Chandel, A.K., Es, C., Rudvaram, R., Narasu, M. L., Rao, L.V., and Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2:014-032.

Chibata, I., Tosa, T., and Sato, T. 1974. Immobilized aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. Appl. Environ. Microbiol. 27:878-885.

Çağlar, M., Türkiye'de Biyodizel Konusunda Yasal Altyapı, Yatırım ve Dünya Perspektifi. 2006. PAL Danışma Kurulu Toplantısı.

Demain, A. L., Newcomb, M., and Wu, J.H.D. 2005. Cellulase, Clostridia, and Ethanol. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69:124-154

Dombek, K. M., and Ingram, L. O. 1986. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 52:975-981.

Dombek, K. M., and Ingram, L. O. 1987. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* : Changes in glycolytic enzymes and internal pH. Appl. Environ. Microbiol. 53:1286-1291.

Erdin, E., Şirin, G., ve Alten, A. 2002. Biyokütle Enerjisi ve Avrupa Birliği. Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü. Buca-İzmir.

Erhan, E., Yer, E., Akay, G., Keskinler, B., and Keskinler, D. 2004. Phenol degradation in a fixed-bed bioreactor using micro-cellular polymer-immobilized *Pseudomonas syringae*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 79:195-206.

Fan, Z., South, C. and Lyford, K. 2003. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solid-fed reactor. Bioprocess Biosyst. Eng. 26:93-101.

- Glazzo, J. L., and Bailey, J. E. 1990. Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *S. cerevisiae*. *Enz. Microb. Technol.* 12:162-172.
- Gray, K. A., Zhao, L., and Emptage, M. 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biol.* 10:141-146.
- Gunasekaran, P. And Raj, K. C. 1999. Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*. *Curr. Sci. India.* 77(1): 56-68
- Haan, 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.
- Hahn-Ha-gerdal, B., Wahlbom, C. F., Gardonyi, M., Van Zyl, W. H., Cordero Otero, R. R. and Jonsson, L. J. 2001. Metabolik engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73:53-84.
- Hartmeier, W. 1972. Untersuchungen über die kinetik der mikrobiellen Sauerstoff-Aufnahme und den Einfluß des Sauerstoff-Partialdruckes auf den Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Fachbereich Lebensmitteltechnologie und Biotechnologie, Technische Universität, Berlin.
- Ingram, L. O. and Buttke, T. M. 1984. Effects of ethanol on micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 25:253-300.
- İmrağ, H. 2006. Benzinli motorlarda bioetanol kullanımının motor karakteristik değerlerine ve egzoz emisyonlarına etkilerinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir.
- Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P., and Lotong, N. 2002. Yeast diversity in thai traditional alcoholic starter. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 36:149-158.

Linko, Y. Y., and Linko, P. 1981. Continuous ethanol production by immobilized yeast reactor. *Biotechnol. Lett.* 3:21-26.

Metcalf&Eddy, Inc. 2003. Wastewater engineering, treatment, disposal and reuse. 4th edition, McGraw-Hill Inc.

Moulin, G., Bozet, H., and Galzy, P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 25:365-382.

Najafpour, G., Younesi, H., and Ku Ismail, S. 2004. Ethanol fermentation in immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.* 92:251-260.

Nigam, P., Banat, I. M., Singh, D., Michale, A. P., and Marchant, R. 1997. Continuous ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* imb3 immobilized on mineral kissiris at 45 °C. *Microbiol. Biotechnol.* 13:283-288.

Nolan, A. M., Baron, N., Bardy, D., Mcaree, T., Michale, L. and Michale, A. P. 1994. Ethanol production at 45 °C by an alginate immobilized thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* following growth on glucose containing media. *Biotechnol. Lett.* 16:849-852.

Öhgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, 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 *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J. Biotechnol.* 126:488-499

Özpınar, Ö. 2007. Termofilik selülozik bakteriler kullanılarak Selüloz ve selülozik atıkların parçalanması ve şeker birikiminin optimizasyonu. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Basılmamış Yüksek Lisans Tezi.

Pimentel, D., and Patzek, T. W. 2005. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research.* 14:65-75.

Ramakrishna, S. V., and Prakasham, R. S. 1999. Microbial fermentations with immobilized cells. Biochemical and Environmental Engineering, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad 500 007, India.

Reith, J. H., Veenkamp, J. M. and van Ree, R. 2002. Co-production of bio-ethanol, electricity and heat from biomass residues. Proceedings of the 12th European Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, 17-21 June 2002, Amsterdam. 1118-1123.

Roca, E., Flores, J., Nunez, M. J. and Lema, J. M. 1996. Ethanolic fermentation by immobilized *Sacchomyces cerevisiae* in a semipilot pulsing packed-bed bioreactor. *Enz. Microb. Technol.* 19:132-139.

Rumbold, K., Biely, P., Mastihubova, M., Gudelj, M., Gübitz, G., Robba, K. H., and Prior, B. A. 2003. Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by *Aueobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5622-5626.

Saha, b. C., and Bothast, R. J. 1998. Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aueobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3774-3780.

Shell, D. J., Railey, J. C., Dowe, N., Farmer, J., Ibsen, K. N., Ruth, M.F., Toon, S. T. and Lumpkin, R. E. 2004. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. *Bioresource Technol.* 91:179-188.

Schimitz, N., Henke, J. M., Klepper, G., Wilkening, C. L., Wilkening, L., Nolte, B., and Kalies, M. 2005. Innovations in the production of bioethanol and their implications for energy and greenhouse gas balance. *Schriftenreihe, Nachwachsende Rohstoffe*, Band 26, Münster.

Sheroan, A., Yadav, B. S., Nigam, P. And Singh, D. 1997. Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1. J. Basic Microbiol. 38(2):123-128.

Sonderegger, M., Jeppson, M., Larsson, C., Gorwa-Grauslund, M. F., Boles, E., Olsson, L., Spencer-Martins, I., Hahn-Hagerdal, B. and Saver, U. 2004. Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *S. cerevisiae* strains. Biotechnol. Bioeng. 87:90-98.

Tsai, W., Lan, H., and Lin, D. 2007. An analysis of bioethanol utilized as renewable energy in the transportation sector in Taiwan. Renewable and Sustainable Energy Reviews.

Tsoi, T.V., Chuvilskaya, A., Atakishieva, Y., Dzhavakhishvili, T. D., Akimenko, V. K., and Boronin, A. M. 1987. Molekulyarnaya genetika. Mikrobiologiya i viruslogiya. 11:18-23.

Tyagi, R. D., Gupta, S. K. and Chand, S. 1992. Process engineering studies on continuous ethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. 27:23-32.

Ünsal, M. 2003. Membran Biyoreaktörler Kullanılarak Maltoz Üretimi. Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Wiegel, J. 1980. Formation of ethanol by bacteria. A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. Experientia. 36:1434-1446.

Zadrazil, F. 1980. Conversion of different plant wastes into feed by basidiomycetes. Eur. Jour. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9:31-35.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Kocaeli’nde doğdu. 2000 yılında İzmit Atılım Lisesi’nden mezun oldu. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Çevre Mühendisliğini Bölümü’nü kazandı ve 2004 yılında öğrenimini tamamlayarak Çevre Mühendisi unvanını aldı. 2004 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

EK 1

KULLANILAN BESİYERLERİ

CA (Sitrik Asit) BESİYERİ

YNB	1,6 g/L
Amonyum sülfat	5,1 g/L
Sitrik Asit	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0,5 g/L
Glukoz	Gerekli konsantrasyonlarda eklenmiştir

Besiyeri pH'sı 5,5 e ayarlandıktan sonra ergosterol ve Tween 80 son konsantrasyonları 0,01 g/L ve 0,42 g/l olacak şekilde besiyerine eklenmiştir.

YM (Yeast Medium) BESİYERİ (KATI)

% 0,3	Maya özütü
% 0,3	Malt özütü
% 0,5	Pepton
% 1	Glukoz
%1,5	Agar

YM (Yeast Medium) BESİYERİ

Maya özütü	3 g/L
Malt özütü	3 g/L
Pepton	5 g/L
Glukoz	Gerekli konsantrasyonlarda eklenmiştir

ZZ BESİYERİ

Maya özütü	3 g/L
Malt özütü	3 g/L
Pepton	5 g/L
Glukoz	Gerekli konsantrasyonlarda eklenmiştir

RM (Russian Medium) BESİYERİSon Konsantrasyon

Karbon Kaynağı	Gerekli konsantrasyonlarda eklenmiştir
----------------	--

RM I

Üre	2 g/L
-----	-------

RM II

KH ₂ PO ₄	2 g/L
K ₂ HPO ₄	3 g/L

RM III

Maya özütü	5 g/L
------------	-------

RM IV

MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0025 g/L

C. thermocellum üretimi için besiyerinin oksijenden arındırılması amacıyla RM IV bileşenine besiyerindeki son konsantrasyonu 1 g/L olacak şekilde L-Sistein ve RM II bileşenine son konsantrasyonu 0.002 g/L olacak şekilde resazurin indikatörü eklenmiştir. 5X konsantre hazırlanan yukarıdaki bileşenler ayrı ayrı otoklavlanmış ve soğutulduktan sonra birleştirilmiştir.