

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**REKOMBİNANT *E. coli* KO11 ile
BİYOETANOL ÜRETİMİ ve ÖLÇEK BÜYÜTME**

İrem DENİZ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 09.02.2011

Bornova-İZMİR

2011

İrem DENİZ tarafından yüksek lisans bitirme tezi olarak sunulan “Rekombinant *E. coli* KO11 İle Biyoetanol Üretimi ve Ölçek Büyütme” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09/02/2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

:Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN



Raportör Üye

:Prof. Dr. Murat ELİBOL



Üye

:Doç. Dr. Yekta GÖKSUNGUR



ÖZET**REKOMBİNANT *E. coli* KO11 ile BİYOETANOL ÜRETİMİ ve
ÖLÇEK BÜYÜTME**

DENİZ, İrem

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN

Şubat 2011, 124 sayfa

Bu çalışmada agro-endüstriyel atık olarak nitelendirilen ayva, elma ve portakal posaları substrat olarak kullanılarak *E. coli* KO11 rekombinant suşundan biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla biyoetanol üretiminde önem taşıyan çeşitli parametrelerin üretime etkisi incelenmiştir. Farklı sıcaklık, pH, çalkalama hızı, başlangıç şeker konsantrasyonu ve şeker cinsi ile havalandırmanın üretim verimliliğine etkisi karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; 5 L'lik biyoreaktör denemelerine geçilmiş ve ayva posasından 48. saatte 19,66 g/L biyoetanol eldesiyle teorik verimin %: 64'üne ulaşılmıştır. Ardından büyük ölçek parametreleri denenmiş ve 10 L'lik biyoreaktörde 23,46 g/L etanol eldesi, 0,40 g/g verim ve 0,49 g/L/h verimlilikle üretim için en uygun parametrenin “benzer karışma süresi” olduğu belirlenmiştir. Kazanılan bu ürün (ağırlıkça % 2,3), pervaporasyon ünitesinde 70⁰C'de 7 mbar vakumla 10 saat boyunca ayrıştırılıp, 3499,27 g/m²/h toplam akıyla ve 0,005 ayırım faktörüyle ağırlıkça % 5,3'e konsantre edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Biyoetanol, *E. coli* KO11, agro-endüstriyel atık, pervaporasyon

ABSTRACT**PRODUCTION of BIOETHANOL from
RECOMBINANT *E. coli* KO11 and
SCALE-UP**

DENİZ, İrem

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN

February 2011, 124 pages

In this study, the production of bioethanol was made out from recombinant strain *E. coli* KO11 by using quince, apple and orange pulps, which are described as agro-industrial waste, as a substrate. For this purpose, the effects of various parameters that are important for bioethanol production were investigated. Different temperature, pH, agitation rate, initial sugar concentration and type and aeration conditions were compared in terms of productivity values. According to the outcomes, the operating variables employed at 5 liter bioreactor scale and with 19,66 g/L product concentration from quince pulp, the overall ethanol yield reached 64 % of the theoretical value at 48 h. Then, large scale parameters were tried and it was determined that the most appropriate parameter for bioethanol production was “similar mixing time” with 23,46 g/L bioethanol concentration in terms of 0,4 g/g yield and 0,49 g/L/h productivity. This end-product with a weight fraction of 2,3 % was concentrated to 5,3 % (w/w) by separating it in the pervaporation unit for 10 hours with 7 mbar vacuum at 700 C, along with 3499,27 g/m²/h total flux and 0,005 separation factor.

Key words: Bioethanol, *E. coli* KO11, agro industrial waste, pervaporation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sürecinde, değerli fikirleri ve yol gösterici yardımlarıyla çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesinde, bana sabır ve ilgiyle her türlü desteği veren ve katkılarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN'a ve Ar. Gör. Esra İMAMOĞLU'na; tüm yaşamım boyunca bana destek olan sevgili aileme, yüksek lisans eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan ve güler yüzlerini esirgemeyen tüm hocalarıma, EBİLTEM ve Biyomühendislik ailesine sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	..vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Biyoetanol ve Önemi	4
2.2. Biyoetanol Üretiminde kullanılan Hammaddeler	7
2.3. Agro-Endüstriyel Atıklar	8
2.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	11
2.5. Biyoproseslerde Ölçek Büyütme Parametreleri	16
2.5.1. Benzer kütle transfer katsayısına göre ölçek büyütme	16
2.5.2. Hacim başına tüketilen güç parametresine göre ölçek büyütme	17
2.5.3. Sabit karıştırıcı ucu hızıyla ölçek büyütme	19
2.5.4. Benzer Reynolds sayılarıyla ölçek büyütme	20

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

2.5.5. Sabit karışma zamanıyla ölçek büyütme.....	20
2.6. Biyoetanol Eldesinde Kullanılan Altakım İşlemleri.....	21
2.6.1. Geleneksel yöntemlerle biyoetanol eldesi	21
2.6.2. Pervaporasyon.....	21
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Rekombinant mikroorganizma.....	25
3.1.2. Luria-Bertani ortamı	25
3.1.3. Kullanılan substratlar	26
3.1.4. Kullanılan ekipmanlar.....	26
3.2. Metot.....	27
3.2.1. Kullanılan substratların indirgen şeker içeriklerinin belirlenmesi.....	27
3.2.2. Meyve posalarında C/N oranının hesabı.....	29
3.2.3. Erlen denemeleri	30
3.2.3.1. Üretim ortamının hazırlanışı	30
3.2.3.2. İnokülasyon.....	30
3.2.3.3. Üretim koşulları	30

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.2.4. Biyoreaktör denemeleri	30
3.2.4.1. Üretim ortamının hazırlanışı.....	30
3.2.4.2. İnokülasyon	31
3.2.4.3. Üretim koşulları.....	31
3.2.5. Analitik yöntemler	31
3.2.5.1. Örnek alma	31
3.2.5.2. Türbidite ve flok oluşturan hücre sayısı	32
3.2.5.3. Kuru hücre ağırlığı	33
3.2.5.4. Gaz kromatografisi	33
3.2.5.5. Toplam şeker tayini-fenol sülfürik asit metodu.....	34
3.2.5.6. İndirgen şeker tayini-DNS metodu.....	36
3.2.5.7. Kullanılan substratlarda elementel analiz.....	37
3.2.5.8. Karışma zamanının belirlenmesi	38
3.2.5.9. Verim, Verimlilik ve Toplam Verim hesabı.....	38
3.2.5.10. İstatiksel analiz	39
3.2.6. Ölçek büyütme parametrelerinin belirlenmesi	39
3.2.6.1. Benzer karışma süresi.....	40

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.2.6.2. Benzer karıştırıcı ucu hızı	41
3.2.6.3. Benzer kıa değeri.....	41
3.2.7. Membranın hazırlanması ve pervaporasyon	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	44
4.1. Glikoz Destekli LB Ortamıyla Erlen Denemeleri	44
4.1.1. Çeşitli parametrelerin biyoetanol üretimine etkisinin incelenmesi.....	44
4.1.1.1. Ortam sıcaklığının biyoetanol üretimine etkisi.....	44
4.1.1.2. Ortam pH'sının biyoetanol üretimine etkisi	47
4.1.1.3. Karıştırma hızının biyoetanol üretimine etkisi	50
4.1.1.4. Başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonunun etkisi	52
4.1.1.5. Oksijen varlığının biyoetanol üretimine etkisi.....	58
4.2. Glikoz Destekli LB Ortamıyla Reaktör Denemeleri	64
4.2.1. Havalandırmasız kesikli sistem.....	64
4.2.2. Havalandırmasız kesikli beslemeli sistem	68
4.2.3. Havalandırılmalı kesikli sistem.....	70
4.2.3.1. Havalandırma hızının belirlenmesi	70

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

4.2.3.2. Havalandırma süresinin belirlenmesi	76
4.3. Agro-Endüstriyel Atık Destekli LB Ortamıyla Erlen Denemeleri.....	80
4.4. Agro-Endüstriyel Atık Destekli LB Ortamıyla Reaktör Denemeleri.....	83
4.5. Biyoetanol Üretiminde Ölçek Büyütme	89
4.5.1. Damköhler Sayısı	89
4.5.2. Ölçek büyütme parametrelerinin etkisi	92
4.6. Pervaporasyonla Etanol Ayrımı	96
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	104
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	108
ÖZGEÇMİŞ	124

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Dünyada 1975-2005 yılları arasında biyoetanol üretimi	6
2.2. Glukoz, fruktoz ve sakkarozun kimyasal yapıları	10
2.3. <i>E. coli</i> K12'nin glukoz fermentasyonu sonucu açığa çıkardığı tipik ürünler ve pet operonu eklenmiş <i>E. coli</i> KO11	15
2.4. Sıvı rejimi ve kullanılan bıçak tipine göre Re ve Np sayısı arasındaki ilişki..	18
2.5. Pervaporasyonun şematik gösterimi	23
3.1. Optik dentisite – CFU kalibrasyon grafiği	32
3.2. Absorbans – Kuru Hücre Konsantrasyonu standart eğrisi.....	34
3.3. Toplam şeker – Absorbans kalibrasyon eğrisi.....	35
3.4. İndirgen şeker – Absorbans standart eğrisi.....	37
3.5. İnokülasyondan 10 L'lik biyoreaktöre ölçek büyütmede izlenen yol	40
3.6. Sulzer pervaporasyon ünitesi.....	42
4.1. Biyoetanol üretiminde farklı sıcaklıkların etanol üretimine etkisi.	47
4.2. Biyoetanol üretiminde farklı pH değerlerinin etanol üretimine etkisi.....	49
4.3. Biyoetanol üretiminde farklı çalkalama hızlarının etanol üretimine etkisi. ...	52
4.4. Biyoetanol üretiminde farklı şeker cinsi ve başlangıç konsantrasyonunun etanol üretimine etkisi.	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

4.5. Farklı başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonlarında üretim boyunca ortamda kalan şeker konsantrasyonu	58
4.6. Oksijenin biyoetanol üretimine ve kuru hücre ağırlığına etkisi	61
4.7. Belirlenen en uygun koşullarda üretilen mikroorganizma ve etanol miktarları ile toplam ve indirgen şeker konsantrasyonu	62
4.8. Belirlenen en uygun koşullarda yapılan biyoetanol üretiminde etanol üretim ve glikoz tüketim hızı	64
4.9. 5L'lik havalandırmasız biyoreaktörde elde edilen kuru hücre ağırlığı ve etanol üretimi	67
4.10. 5 L'lik reaktörde havalandırmasız kesikli beslemeli biyoetanol ve biyokütle üretimi	70
4.11. Yatışkın olmayan hal metoduyla 0,035 vvm hava beslemesi için $k_L a$ hesabı	73
4.12. Çeşitli havalandırma hızlarının etanol üretimine etkisi	74
4.13. Çeşitli havalandırma hızlarında <i>rE. coli</i> için kuru kütle ağırlığı	75
4.14. Üretimin başında çeşitli sürelerce beslenen 0,035 vvm havanın etanol üretimine etkisinin havalandırmasız üretimle kıyaslanması	76
4.15. 5 mmol $O_2/L/h$ hava ile farklı havalandırma sürelerinde <i>rE. coli</i> için kuru kütle ağırlığı	77
4.16. Biyoreaktörde ilk 8 saat hava beslemesi ile yarı-anaerobik biyoetanol üretimine ve birim mikroorganizma başına üretilen etanol miktarına etkisi ile ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu	79

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

4.17. Çeşitli karbon kaynaklarından biyoetanol üretimi için farklı karıştırma hızlarında üretilen etanol konsantrasyonu (OTR=5 mmol O ₂ /L/h).	87
4.18. Meyve posalarından biyoetanol üretimi için çeşitli karıştırma hızlarında ortamda biriken indirgen şeker konsantrasyonu (OTR=5 mmol O ₂ /L/h).....	88
4.19. Meyve posalarından biyoetanol üretimi için çeşitli karıştırma hızlarında üretilen kuru hücre ağırlığı (OTR=5 mmol O ₂ /L/h)..	89
4.20. Biyoreaktörde üretim ortamındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun zamanla değişimi	91
4.21. Farklı parametrelere göre yapılan ölçek büyültmelerin biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisi	94
4.22. Sıcaklığın pervaporason süresince permeat ve besleme hattındaki etanol konsantrasyonuna etkisi.....	95
4.23. Farklı parametrelere göre yapılan ölçek büyültmelerin biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisi	100
4.24. Sıcaklığın pervaporason süresince permeat ve besleme hattındaki etanol akısı ve toplam akıya etkisi.....	101
4.25. Sıcaklığın pervaporason süresince permeat ayırım faktörüne (α) etkisi.....	102
4.26. Beslemedeki etanol konsantrasyonunun pervaporason performansına etkisi..	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Etanol ve diğer yakıtların özelliklerinin karşılaştırılması.....	5
2.2. 2005 yılında dünya ülkelerinde yıllık biyoetanol üretim miktarları.....	7
2.3. 100 g hammadde bazında içeriklerine göre birinci nesil agro-endüstriyel atıklar.....	10
2.4. Mezofilik ve termofilik bakterilerin esas fermentasyon ürünü olarak etanol üretimi.....	12
2.5. Etanolün ayrılmasında kullanılan teknikler ve ayırım güçleri.....	21
3.1. Modifiye (LB) kimyasal kompozisyonu.....	25
3.2. Substrat olarak kullanılan agro-endüstriyel atıkların % kuru madde oranları ve indirgen şeker içerikleri.....	27
3.3. Biyoetanol üretiminde kullanılacak agro-endüstriyel atıkların yoğunluğu ...	28
3.4. 60 g/L indirgen şeker içeren meyve atıklarının miktarı.....	29
3.5. Farklı glukoz konsantrasyonlarında hazırlanan glukoz çözeltileri	34
3.6. Farklı glukoz konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilere ve köre eklenecek olan %5' lik fenol çözeltisi ve derişik sülfürik asit çözeltisi miktarları	35
3.7. DNS solüsyonunun hazırlanışı	36
4.1. Farklı ortam sıcaklıklarının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisinin incelenmesi	46
4.2. Farklı ortam sıcaklıklarının biyoetanol üretim verimliliğine etkisinin incelenmesi	46

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.3. Farklı ortam pH'larının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisinin incelenmesi.....	48
4.4. Farklı ortam pH'larının biyoetanol üretim verimliliğine etkisinin incelenmesi.....	49
4.5. Farklı karıştırma hızlarının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisi.....	51
4.6. Farklı karıştırma hızlarının biyoetanol üretim verimliliğine etkisi.....	52
4.7. Farklı başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonlarının biyoetanol üretimine etkisi.....	53
4.8. Farklı başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonlarının biyoetanol üretim verimliliğine etkisi	54
4.9. Oksijen varlığının biyoetanol üretimine etkisi.....	59
4.9. Oksijen varlığının biyoetanol üretimine etkisi.....	60
4.10. Oksijen varlığının biyoetanol üretim verimliliğine etkisi.....	60
4.11. 5 L'lik kesikli biyoreaktörde çeşitli karıştırma hızlarında belirlenen karıştırma zamanları.....	65
4.12. 5L'lik havalandırmasız biyoreaktörde rE. coli'den etanol üretimi.....	67
4.13. Yatışkın olmayan hal metoduyla OTR ve $k_L a$ hesabı için çözünmüş oksijen konsantrasyonu.....	71
4.14. Yatışkın olmayan hal metoduyla hesaplanan oksijen transfer hızlarıyla (OTR) 48 saatte üretilen etanol konsantrasyonları.. ..	73

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. 5 mmol O ₂ /L/h ile farklı havalandırma sürelerinde <i>rE. coli</i> için spesifik büyüme hızı ve 48. saatteki Y _{P/X} verimleri.....	78
4.16. İlk 48 saatte üretilen etanol konsantrasyonu, tüketilen glikoz, verim ve hacimsel verimlilik bakımından havalandırmalı (ilk 8 saat 0,035 vvm-OTR=5 mmol/L/h) ve havalandırmasız üretimin karşılaştırılması.....	81
4.17. Erlenlerde farklı hammaddelerle biyoetanol üretimi.....	83
4.18. Kullanılan agro-endüstriyel meyve posalarının kompozisyonu..	83
4.19. Biyoreaktörde a) ayva b)elma posasından değişik karıştırma hızlarında biyoetanol üretimi (OTR=5 mmol O ₂ /L/h).....	86
4.20. Çeşitli karbon kaynaklarından değişik karıştırma hızlarında elde edilen biyoetanol verim ve verimliliği..	86
4.21. Maksimum mikrobiyal büyüme sırasında, organizma tarafından ortamdaki oksijenin zamanla tüketilmesi..	90
4.22. Büyük ölçek denemelerinde LB destekli ayva posalarıyla üretilen etanol konsantrasyonlarının 2 L'lik havalandırmalı üretimle kıyaslanması.....	93
4.23. Substrat olarak ayva kullanılan büyük ölçek denemelerinde ilk 48 saatte verim ve verimliliğin 2 L'lik havalandırmalı üretimle kıyaslanması.....	93
4.24. Farklı sıcaklıklarda 10 saatlik pervaporasyon işlemi sonuçları.....	99

1. GİRİŞ

Atmosfere yayılan sera gazlarının varlığını azaltmak için dünya, petrol bazlı yakıtlara bir alternatif arayışına girmiştir (Martin et al., 2002). Son yıllarda birçok ülke, bu boşluğu dolduracağına inanılan ve karbon-nötral yakıt olarak da isimlendirilen (Okuda et al., 2008) biyoetanol üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü etanol yandığında açığa çıkan karbondioksit, bitkilerce fotosentez yapabilmek ve selüloz üretebilmek için tekrar kullanılır, böylece atmosfere zarar vermez (Wyman and Hinman, 1999; Chandel et al., 2006). Günümüzde etanol, oktan düzeyini arttırmak için benzinin formülasyonunda ve otomotif eksoz emisyonunun kontrolünde oksijenat olarak kullanılmaktadır. Biyoetanolin bir enerji kaynağı olarak kullanılmasıyla; güneş, rüzgâr ve diğer yenilenebilir enerji kaynaklarıyla yarışabileceği düşünülmektedir (Lin ve Tanaka, 2006). Son 20 yılda bu konuda yapılan çalışmalar, biyokütleden etanol üretimi yaklaşımı için büyük ölçekte üretimin birkaç yıl içinde yaygınlaşacağını göstermektedir (Zhang et al., 2009; Moiser et al., 2005).

Biyoetanol üretiminde en iyi teknolojinin seçimi şu temellere dayanır: (a) yüksek mikrobiyal metabolik verimliliği ve çalışma stabilitesi, (b) ürünün prosese minimum muhtemel negatif etkileri (yüksek ürün konsantrasyonuna tolerantlı hücre kullanımı gibi), (c) yüksek sıcaklık ve düşük pH koşullarına direnç, (d) düşük maliyet, (e) en az kirleticilerle ekosisteme minimum hasar (çeşitli atıkların kullanımı gibi), (g) en yüksek verimlilikle asgari enerji gideri (Kosaric ve Vardar-Sukan, 2001). Günümüzde bu koşulları sağlayacak bir proses optimizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Geleneksel yöntemlerle etanol üretiminde hammadde olarak mısır nişastası ve şeker kamışı gibi şekerler kullanılmaktadır (Aristidou and Penttilä, 2000; Himmel et al., 1997; Ingram et al., 1998; Gray et al., 2006). 2006 yılında dünyadaki en büyük ilk 5 etanol üreticileri; ABD [(yılıda 18.38 milyar litre (Gl/y)], Brezilya (17.00 Gl/y), Çin (3.85 Gl/y), Hindistan (1.90 Gl/y) ve Fransa (0.95 Gl/y)'dır. Ancak mısır nişastasına dayalı teknolojinin kullanımıyla etanol üretimi çok uygulanabilir değildir; çünkü etanol kullanımına yönelik üretilen mısır, gıda ve yem tüketimi için sınırlı tarımsal alanı işgal eder duruma geçmektedir (Sun and Cheng, 2002), dolayısıyla gıda amaçlı üretim miktarı azalmaktadır. Çalışmalar

göstermektedir ki; şeker-veya nişasta- kaynaklı etanol kullanımıyla azalan sera gazı miktarı istenen düzeyde (%13) değildir (Farrel et al., 2006; Zah, 2007); ancak verimli biyokütle kaynaklarının kullanımıyla ekosisteme minimum zarar teşkil edecek üretimin sağlanabilmesi gerekmektedir.

Bir biyoproseste üretimin % 30 kadarını kullanılan hammadde teşkil ettiği için, biyoetanol üretimi için ekonomik olabilecek şekerlerin kullanılması gerekmektedir (Sun ve Cheng, 2002; McAloon et al., 2000). Önemli bir şeker kaynağı olmasından dolayı, agro-endüstriyel atıklar biyoproseslerde substrat olarak önem arz etmektedir (Rebah et al., 2007). Agro-endüstriyel atığın biyoetanole dönüşümü için etkili mikrobiyal biyokatalistlerin geliştirilmesi, bir yandan dünyanın petrole olan bağımlılığını azaltırken; bir yandan da çevre kirliliğinin önlenmesini destekler.

Yakıt olarak kullanılabilmesi için etanolün % 99,5 veya daha yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Distilasyon işlemi ile bu saflık derecesine ulaşamaz, çünkü distilasyonla azeotropik nokta (% 4,4 su) kırılmaz ve % 96'ya varan saflıkta etanol elde edilebilir. Üçlü distilasyon, vakum distilasyon ve moleküler elek adsorpsiyon metotları ile düşük su konsantrasyonlarına ulaşılabilirken, bu teknolojilere alternatif olarak işlem maliyetini azaltan ve enerji tasarrufu sağlayan pervaporasyon işlemi giderek önem kazanmaktadır (Feng ve Huang, 1997; Kober, 1987). Pervaporasyon işlemi ile azeotropik karışımlar ayrılabilir, böylece % 99 ve daha yüksek saflıkta etanol kazanılabilir. Azeotropik noktanın kırılabilmesi için pervaporasyon işleminde kullanılan membranının geçirgenliği ve su seçiciliği yüksek olmalıdır. Solvent dehidrasyon işlemi için birçok polimerik (Yu et al., 2002), inorganik (Hoof et al, 2006) ve kompozit membranlar (van Baelen et al., 2004) geliştirilmiştir. Günümüzde yapılan etanolün saflaştırılmasına dair çalışmalar, etanolün pervaporasyon işlemiyle dehidrasyonu ve standart azeotropik kompozisyonunun (% 95,4 saflıkta etanol) üzerindeki etanol konsantrasyonlarına odaklanmıştır.

Bir prosesin toplam maliyetinin yaklaşık %65'ini altakım işlemleri oluşturur. Üretilen biyoetanolün separasyonu için araştırmacıların üzerinde durduğu diğer bir nokta; yöntemin kolaylıkla geliştirilebildiği (proses sıcaklığını arttırarak permeat akısını yükseltmek gibi), membran seçiciliğinin arttırılabildiği

ve klasik metotlarla yarışabilen bir pervaporasyon tekniğinin geliştirilmesidir (O'Brien, Ruth, & McAloon, 2000). Pervaporasyon gibi membran içeren teknikler ekonomik olmanın yanı sıra yüksek kalitede ayırım imkanı sunar (Lewandowska ve Kujawski, 2007; Seader ve Henley, 1998). Biyoetanol üretim ve altakım maliyetini düşürebilecek optimal bir ayırım sistemi henüz oturtturulamamıştır.

Tüm dünya petrole alternatif yakıt arayışı içindedir. Bu alternatiflerin başını çeken biyoetanolün üretimini yaygınlaştırmak ve ülkemizdeki yurt dışı kaynaklar ile rekabet edebilecek alternatif üretim yöntemleri ve teknolojilerin uygulanmasına katkı sağlayabilmek gerekmektedir. Biyoetanol üretiminin ülkemizde uygulanması ve yaygınlaştırılması için katkısı olacağı düşünülen bu çalışmanın hedefi agro-endüstriyel atıklardan biyoetanol üretimi, büyük ölçeğe geçirilmesi ve pervaporasyonla ayrılmasıdır. Bunun için hem yaygın bulunabilirliği hem de uygun şeker içeriği nedeniyle elma, ayva ve portakal posaları substrat olarak kullanılmış ve rekombinant *E. coli* KO11 ile biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretimlerde başlıca hedef, erlenlerde glukoz ile uygun üretim koşullarının belirlenmesinin ardından büyük ölçekte meyve posalarıyla yüksek verim ve verimlilikte biyoetanol üretiminin sağlanmasıdır. Bu amaçla, erlenmayerlerde en uygun sıcaklık, pH, karıştırma hızı, başlangıç şeker konsantrasyonu ve cinsi belirlenmiş ve havalandırmayla oksijenin etkisi incelenmiştir. Daha sonra belirlenen koşullarda biyoreaktörlerde meyve posaları verim ve verimlilik açısından karşılaştırılmış; seçilen en uygun ölçek büyütme parametresi ile yapılan üretimden pervaporasyon ile farklı sıcaklıklarda etanol ayırımı yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Biyoetanol ve Önemi

Biyoetanol, hammaddesi şeker pancarı, mısır, buğday ve odunsular gibi şeker, nişasta veya selüloz özlü tarımsal ürünlerin fermantasyonu ile elde edilen ve benzinle belirli oranlarda harmanlanarak kullanılan alternatif bir yakıttır. Biyoetanol ulaştırma sektörünün yanı sıra, küçük ev aletlerinin kullanımında, birtakım kimyasal ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Biyoetanolin sahip olduğu bazı özellikler şöyle sıralanabilir (Ma et al., 2009):

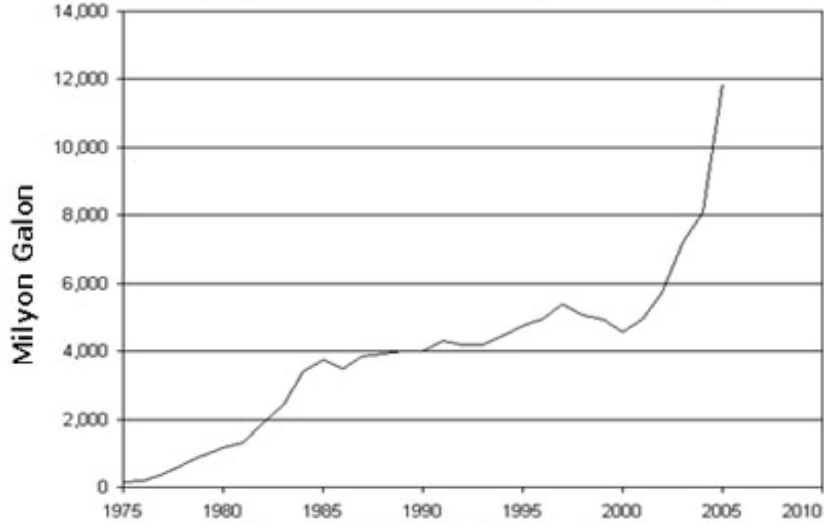
- Biyoetanol berrak, renksiz ve karakteristik bir kokuya sahip sıvıdır,
- Biyoetanol yüksek oktanlı bir yakıttır (113),
- Biyoetanolin kaynama noktası 78,5°C, donma noktası -114,1°C dir,
- Biyoetanol 20 °C de 0,789 gr/ml yoğunluğa sahiptir,
- Biyoetanol içten yanmalı motorlara herhangi bir modifikasyona ihtiyaç duyulmadan %10 miktarında harmanlanarak kullanılabilir,
- Biyolojik olarak bozunurdu, çevre için tehdit oluşturmaz, yenilenebilirdir,
- Fosil yakıtlardan %80 daha az sera gazı yayar,
- Biyoetanol yakıt içindeki oksijen seviyesini arttırmanın en kolay şeklidir. Yakıtın oksijen seviyesini arttırmak, yakıtın daha verimli yanmasını sağlayarak, egzoz çıkışındaki zararlı gazları azaltır,
- Biyoetanol yakıtlarda oktan arttırmak amacı ile kullanılan benzen, metil tersiyer bütıl eter gibi karsenojen maddelerin çevreci alternatifidir,
- Biyoetanol egzoz emisyonlarını azaltır,
- Biyoetanol karışımları, ozon tabakasının azalmasına yol açan, hidrokarbon emisyonlarında büyük ölçüde düşüş sağlar,
- Yüksek seviyeli biyoetanol karışımları azot oksit emisyonlarında %20'ye kadar düşüş sağlar,
- Yüksek seviyeli biyoetanol karışımlarının kullanılması ile Uçucu Organik Madde (VOCs)'lerde 30% ve üstü azalma sağlanmaktadır (VOC's yer seviyesi ozon tabakasının oluşmasının en önemli sebeplerindendir),

- Biyoetanol karsenogen etkisi bulunan benzen ve butadin emisyonlarını 50% oranında azaltır,
- Biyoetanol, sülfür dioksit ve partikül emisyonlarında belirgin bir düşüş sağlar (Çizelge 2.1),
- Biyoetanolun en yaygın iki kullanım şekli E-10 (% 10 Biyoetanol+%90 Benzin) ve E-85 (% 85 Biyoetanol+%15 Benzin) 'dir.

Çizelge 2.1 Etanol ve diğer yakıtların özelliklerinin karşılaştırılması (Türkiye Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü).

Özellik	Metanol	Etanol	Benzin
Kimyasal formül	CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	C ₄ -C ₁₂ Zinciri
Ana maddeler (% ağırlık)	38C, 12H, 50O	52C, 13H, 35O	85-88C, 12-15H
Alt ısı değeri (Btu/lb)	8,570	11,500	18,000-19,000
Benzine göre galon başına yapılan mil	%55	%70	---
Teorik Hava/Yakıt oranı (ağırlık)	6,45	9	14,7

Sahip olduğu tüm bu özellikler nedeniyle dünyada biyoetanol üretimi son yıllarda çok büyük hız kazanmıştır (Şekil 2.1). 1975 yılında 556 milyon L (147 milyon galon) olan biyoetanol üretimi, 2000 yılında 17,315 milyon L'ye (4,574 milyon galon) çıkmıştır. Buna karşın 5 yıl sonra 2005 yılında ise 3 kat artarak 44,875 milyon L'ye (11,855 milyon galon) ulaşmıştır (Licht, 2006). Üretilen biyoetanolün % 67'lik payını Amerika ve Brezilya oluşturmaktadır (Çizelge 2.2). Türkiye'de ise 22 milyon ton toplam akaryakıt tüketimi mevcuttur ve bunun 3 milyon tonu benzinle karşılanırken, sadece 160 bin tonu biyoetanoldür.



Şekil 2.1 Dünyada 1975-2005 yılları arasında biyoetanol üretimi (Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü).

Çizelge 2.2 2005 yılında dünya ülkelerinde yıllık biyoetanol üretim miktarları (Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü).

Ülke	Üretim (milyon litre)	Üretim (milyon galon)
A.B.D.	16.214	4.283
Brezilya	16.067	4.244
Çin	3.800	1.004
Hindistan	1.700	449
Fransa	910	240
Rusya	750	198
Kuzey Afrika	390	103
İspanya	376	99
Almanya	350	92
Tayland	300	79
İngiltere	290	77
Ukrayna	245	65
Kanada	230	61
Polonya	220	58
Endonezya	170	45
Suudi Arabistan	170	45
Arjantin	165	44
İtalya	150	40
Avustralya	125	33
Japonya	113	30
Diğer Ülkeler	2.139	565
Toplam	44.875	11.855

2.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler genel olarak 2'ye ayrılmaktadır. Basit şekerleri içeren ve nişasta içeriği yüksek hammaddeler birinci jenerasyon; selüloz içeren biyokütle ise ikinci jenerasyon hammaddeler grubuna girmektedir (Nigeria, 2010). Basit şeker veya nişasta içeren materyallerin

biyoetanole çevrimleri kolaydır ve şeker kamışı, mısır, şeker pancarı, meyve posaları, turunçgiller birinci jenerasyon hammaddelerindendir. Kompleks şekerlerden selüloz içeriği yüksek ikinci jenerasyon hammaddelere ise selülozla birlikte hemiselüloz ve lignin içeren kavuz, fındık kabuğu, ayçiçeği sapı örnek verilebilir. Bu hammaddelerin substrat olarak değerlendirilebilmesi için öncelikle hidrolizasyona oldukça dirençli ligninin degradasyonu gerekmektedir. Kullanım öncesi çeşitli zorlukları ve maddi giderinin yüksek olması nedeniyle, günümüzde biyoetanol üretiminin % 70'ini birinci jenerasyon hammaddeler oluşturmaktadır (Raposo et al., 2009).

Brezilya'da biyoetanol üretimi şeker kamışından ekonomik bir fermantasyonla sağlanmaktayken, Amerika mısırındaki nişastayı substrat olarak kullanmaktadır. Avrupa Birliği ise, Aralık 2010 tarihi itibarıyla taşıyım yakıtlarının % 5,75'inin organik biyokütle kaynaklardan sağlanmasını hedeflemiştir. Avrupa Birliği ülkeleri biyoetanol üretimi için saman ve diğer çeşitli agro-endüstriyel atıkları değerlendirmeyi tercih etmektedir (Raposo et al., 2009). Bu alanda yürütülen çalışmalar, kullanılan alternatif hammaddelerden en uygununun belirlenmesi ve üretim verimini arttırılmaya yöneliktir. Lignoselülozik ve agro-endüstriyel atıklardan biyoetanol üretimi; geleneksel proseslere göre sağladıkları geniş hammadde seçimi spektrumu ve yüksek şeker içeriği gibi avantajlarıyla en uygun tercihler olarak belirlenmiştir (Kim and Dale, 2004).

Agro-endüstriyel atıklardan sıvı etanol üretimi tarımsal alanlarda yeni iş olanaklarının doğmasını sağlar ve bu yönüyle ülkenin sosyoekonomik gelişiminde de pozitif bir rol oynar (Wyman et al., 2005; Chandel et al., 2007).

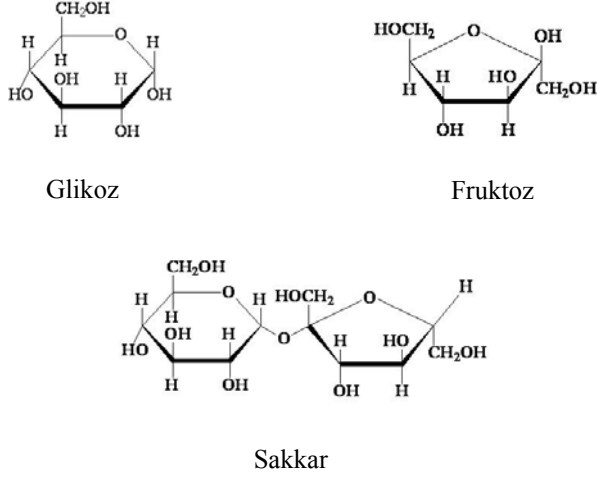
2.3. Agro-Endüstriyel Atıklar

Agro-endüstriyel atıklar; hammadde olarak tarımsal ürünleri kullanan endüstrilerin yan ürünleridir. Örneğin, şeker kamışı küspesi şeker sanayinin bir atığıyken, meyve posası, meyve suyu sanayinin yan ürünüdür (Gomez et al., 2008). Bu biyolojik temelli kaynaklar elverişli, ucuz, bulunabilirliği yüksek, temin edilmesi kolay hammaddelerdir ve yakıt üretimi için kullanılabilir (Alzate ve Toro, 2006). Meyve suyu sanayi atığı olan ayva posasında, kuru maddede

yaklaşık % 17, elma ise % 13 (w/w) şeker bulunur ve bu şekerler içerik yüzdelere göre sırayla fruktoz, glukoz ve sakkarozdur (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001). Fruktoz ve glukoz aynı kimyasal formüle sahiptir ve birbirinin yapısal izomeridir; sakkaroz ise iki molekülün bir araya gelmesiyle oluşmuş bir dimerdir (Şekil 2.2). Meyveler basit şekerler dışında selüloz, hemiselüloz, pektin ve nişasta gibi polisakkaritleri de içerirler. Polisakkaritler genellikle posaya dahil olan kabuk ve çekirdekte olur. Nişasta meyvelerde olgunlaşma öncesi aşamada bulunur ve meyve olgunlaşma ile miktarı azalır; tam olgun meyvede tamamen kaybolur. Pektik madde ise meyvede en çok bulunan polisakkarittir ve pektik maddelerin başında gelen pektin bitki hücresinin özellikle orta lamellerinde ve hücre membranında bulunur. Ayrıca bulunduğu yer meyveden meyveye farklılık gösterebilir; örneğin portakal kabuğu yüksek miktarda pektin içerir (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001).

Azotlu maddelerin meyvelerdeki miktarı çok düşüktür (Çizelge 2.3) ve taze ağırlığın %0,01-0,3'ü kadarını oluşturur. Meyvelerdeki azotlu bileşiklerin başlıcaları aminoasitler, peptitler, proteinler ve proteidlerdir.

Meyve suyu sanayi artığı olan meyve posaları iyi bir besin kaynağıdır ancak, bir kısmı hayvan yemi olarak kullanılırken büyük çoğunluğu değerlendirilmeden atılmaktadır (Yurdagel et al., 1997). Birinci jenerasyon hammadde olarak da nitelendirilen meyve posalarıyla, içerdiği basit şekerler nedeniyle daha kolay biyoetanol üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Nigeria, 2010).



Şekil 2.2 Glukoz, fruktoz ve sakkarozun kimyasal yapıları.

Çizelge 2.3 100 g hammadde bazında içeriklerine göre birinci nesil agro-endüstriyel atıklar (Nigeria, 2010).

Hammadde Adı	Ortalama Şeker (g)	Azotlu Madde (g)	Yağ (g)	Vitamin ve Mineral (mg)
Ayva	17	0,04	0,5	32
Üzüm	15,0	0,7	0,3	250
Elma	13	0,03	0,4	160
Ananas	11,7	0,3	0,5	110
Armut	10	0,5	0,3	163
Şeftali	7,6	0,7	0,1	240
Portakal	5,4	1	0,2	300

Taze meyvelerin toplam kuru maddesinin yaklaşık % 70-90'ini su oluşturur. Kalan katı maddenin % 75'i suda çözünür kuru madde, % 25'i ise suda çözünmeyen kuru maddedir. Meyveler preslenince elde edilen meyve suyunun suda çözünür içeriği ile posanın çözünür kuru madde miktarları aynıdır (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001).

Kullanılacak substrat seçimi yapılırken şeker içeriğinin yanı sıra, metabolize edilebilirliği, varsa diğer kullanım alanları, bulunabilirliği ve mevsimselliği dikkate alınmalıdır. Örneğin buğday sapı, sorgum ve arpa sapı gibi atıklar hayvansal yem olarak kullanılması ve yüksek oranda lignin içermesi nedeniyle; etanol üretiminde tercih edilmezler (Saha et al., 2005).

Türkiye’de yılda 610 bin ton ayva üretilmektedir ve 20 bin ton ayva ihracı ile, Avrupa’nın ayva ihtiyacının % 35’i ülkemizden sağlanmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2008). Ülkemizde yılda 2 milyon ton üretilen elma ise dünyadaki üretime göre 3. sıradadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2009). Elma ve ayva atıklarının yüksek fruktoz ve glukoz içeriklerinin yanı sıra düşük maliyetleri ve yüksek oranda bulunabilirlikleri de, etanol üretimi için potansiyel bir substrat olabilecekleri fikrini desteklemektedir.

2.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Halen etanol üretiminde kullanılan *S. cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* türleri hammadde olarak heksozları kullanır ve pentozları metabolize edemezler. Bu mikroorganizmalar, anaerobik koşullarda Embden-Meyerhof yolağı ile glukozu etanole dönüştürürler. *Zymomonas mobilis* türleri bir mmol glukoz başına 1.9 mmol etanol üretebilmektedir (Çizelge 2.4) (Kosaric ve Vardar-Sukan, 2001). Rekombinant olmayan *Escherichia coli* suşları ise birçok heksoz ve pentozu (glukoz, ksiloz vb.) karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Anaerobik koşullarda mutant olmayan *E. coli* bu şekerleri pirüvik asit, format, asetat, laktat, suksinat ve eser miktarda etanole metabolize edebilmektedir (Böck ve Sawers, 1996). *Z. mobilis* ve *S. cerevisiae* suşlarına göre daha kısa sürede daha yüksek büyüme hızları, kompleks ortamda daha basit gereksinimleri nedeniyle, araştırmacılar rekombinant *E. coli* türleri ile daha yüksek verimde ürün eldesi çalışmalarına yönelmişlerdir.

Biyoetanol üretimine yönelik son çalışmalar etanol verimini arttırmak için rekombinant teknolojilerle yeni suşlar geliştirilmeye yöneliktir. Bunun için 2 metot tercih edilebilir: (1) doğal etanol üreticisi bir mayaya pentoz metabolik yolağı eklemek, (2) heksoz ve pentozları parçalayabilen doğal bir mikroorganizmaya etanol verimini arttıracak genleri eklemek (Jeffries ve Jin, 2000; Dien et al., 2003; Chandel et al., 2007). Ancak mayaların nispeten düşük üretim ve çoğalma hızlarından dolayı ikinci yöntem daha cazip görülmektedir.

Çizelge 2.4 Mezofilik ve termofilik bakterilerin esas fermentasyon ürünü olarak etanol üretimi (Kosaric ve Vardar-Sukan, 2001).

Mezofilik Bakteri	mmol Glukoz başına üretilen mmol Etanol
<i>Clostridium sporogenes</i>	4.15 ^a
<i>Clostridium indolis</i> (patojen)	1.96 ^a
<i>Clostridium sphenoides</i>	1.8 ^a
<i>Clostridium sordelli</i> (patojen)	1.7
<i>Zymomonas mobilis</i> (syn. <i>anaerobica</i>)	1.9 (anaerob)
<i>Zymomonas mobilis</i> ssp. <i>pomaceae</i>	1.7
<i>Spirochaeta aurantia</i>	1.5
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	1.46
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1.1
<i>Erwinia amylovora</i>	1.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.1
<i>Streptococcus lactis</i>	1.0
<i>Sarcina ventriculi</i> (syn. <i>Zymosarcina</i>)	1.0

Termofilik Bakteri	T _{max} (°C)	mmol Glukoz başına üretilen mmol Etanol
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	78	1.9
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	78	1.6
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	78	1.0
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	78	0.95
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	68	1.1
<i>Clostridium thermocellum</i>	68	1.0

^a Çok yüksek miktarda maya ekstraktı varlığında

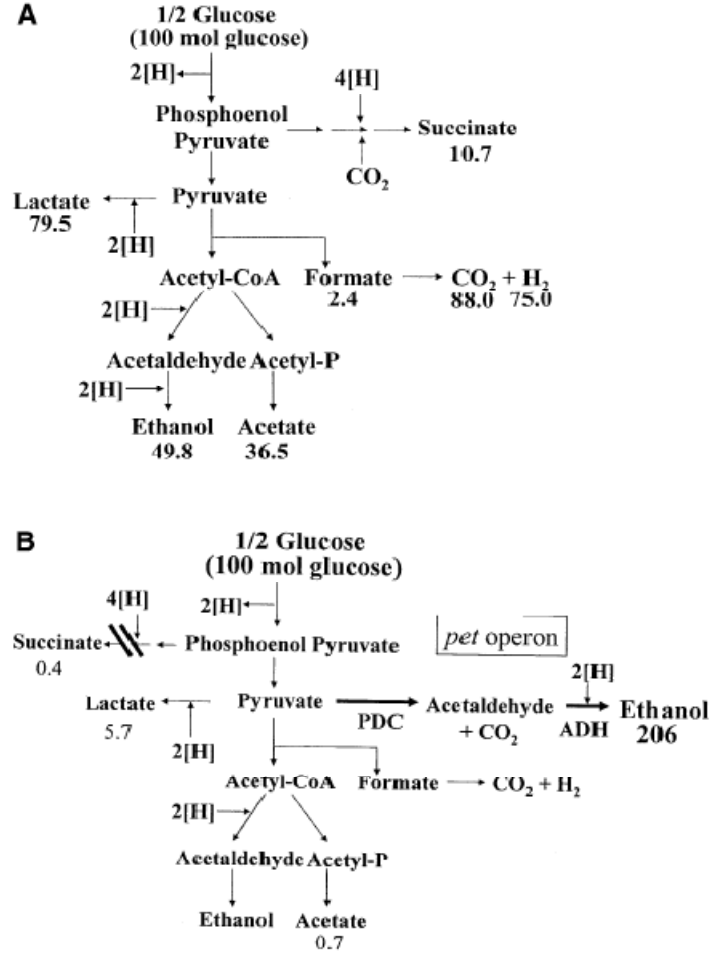
Escherichia coli, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis* genel bir endüstriyel uygulama için en uygun türler olarak belirlenmiştir (Dien et al., 2003). Günümüzde yapılan araştırmalardan biri simültane sakkarafikasyonla fermentasyon (SSF) için uygun gram pozitif ve termofilik bir rekombinant suş geliştirmektir. Ancak bu konu çok yeni gündeme gelmiştir ve SSF için henüz uygun bir suş oluşturulamamıştır.

Etanol veriminin arttırılabilmesi için kullanılacak olan suşun rekabetli reaksiyonları elimine edilmelidir. Bu suşlarda ise gen ekspresyonu için plazmidlere ihtiyaç duyulur; ki bu plazmidler seçici olmayan ortamda büyüyen kültürlerde kaybolabilir. Bu nedenle uygun bir suş gelişimindeki önemli adımlardan birisi de, optimal etanol üretimi için uygun ve kalıcı bir gen ekspresyonu ile entegre edilmiş rekombinant genlerin oluşturulabilmesidir. Bu durum araştırmacıları uygun ortam optimizasyonu ve uzun dönemli adaptasyon stratejilerinin belirlenmesine itmiştir.

Metabolik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle, ürün oluşum yolağı ya da hücresel özelliklerin geliştirilmesiyle verimi arttırmaya yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Stephanopoulos, 1999). Gen ekspresyonunun rekombinant DNA teknolojisiyle modifikasyonu, spesifik verimliliği ve metabolik akıyı arttırarak daha iyi üretim yapabilen suşların doğmasına yol açmıştır. Etanol üretimi için rekombinant *E. coli* suşları geliştirilmeye başlanmış, böylece diğer ürünlerin üretimi baskılanarak etanol üretim titresi arttırılmaya çalışılmıştır (Ingram et al., 1998, 1999; Ohta et al., 1991). *E. coli* KO11 suşu, endüstriyel uygulamalar için geliştirilmiş bir rekombinant suştur (Ingram et al., 1998, 1999; Ohta et al., 1991).

Etanol üretimi için geliştirilmiş rekombinant *E. coli* türlerinin bir biyokatalist olarak kullanımı; geniş spektrumda çeşitli şekerleri fermente edebilme yeteneği, kompleks büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaması endüstriyel olarak zaten kullanılabilirliğini ispatlaması (örneğin rekombinant protein üretimi) gibi birçok üstünlük sunar (Ingram et al. 1998). *E. coli* şekerleri fermente ederek etanol ve çeşitli organik asitleri oluşturur (Şekil 2.3A). Etanol, pirüvat format liyaz (PFL) kullanılarak pirüvattan elde edilir. Bu fermentasyon yolağı dengede değildir, çünkü şekerlerden oluşturulan her bir pirüvat için bir tane NADH,H⁺ üretilirken, pirüvatı etanole dönüştürmek için iki NADH,H⁺ gerekmektedir. Bu dengenin sağlanabilmesi için *E. coli* asetik asit ve süksinik asit de üretir. *S. cerevisiae* ve *Z. mobilis* ise homoetanol fermentatiftirler, çünkü bunlar pirüvattan etanol üretmek için sadece bir tane NADH,H⁺ tüketen pirüvat dekarboksilazı (PDC) kullanırlar. Bu nedenle *pdc* eksprese eden *E. coli* suşu ile sadece etanol üretiminin sağlanabileceği düşünülmüştür (Dien et al., 2003). Pirüvatı etanole

çevirmek için mayalardakine benzer bir yolağın eklenmesiyle yapılan ilk denemeler, *E. coli* türündeki doğal alkol dehidrogenaz (ADH) aktivitesinin etanol üretimi açısından yetersiz olmasından dolayı başarısız olmuştur. Ingram et al. (1998), *Z. mobilis* türünün genomik kütüphanesinden *adh II* genini izole edip, ADH aktivitesi için yeni bir indikatör ortam oluşturmuşlardır. *pdc* ve *adh II* eksprese eden bir plazmidle transforme edilmiş bu *E.coli* suşunun çok daha yüksek etanol üretebildiği belirlenmiştir (Şekil 2.3B), üstelik söz konusu genlerini taşıyan plazmidlerin antibiyotikli ortam varlığında *E. coli* KO11 suşundan ayrılmadığı bilinmektedir (Ingram et al., 1998; Dien et al., 1997; Olsson et al., 1996). Entegre edilen her iki gen de lac promotörü kontrolünde ko-eksprese edilir ve bu yeni operona PET (etanol üretimi) operonu adı verilmiştir (Ingram et al. 1998). Bu doğrultuda kısaca, etanologenik KO11 suşuna; *Z. mobilis* suşundan alınmış olan ve pirüvat format liyaz (*pfl*) promotörü kontrolünde bulunan etanol yolağını içeren genler [pirüvat dekarboksilaz kodlayan *pdc* ve alkol dehidrogenaz kodlayan *adhB* genleri] eklenmiş, suksinat üretimini elimine eden anaerobik fumarat redüktaz geni delesyona uğratılmıştır (Ingram et al., 1998; Ohta et al., 1991). Ayrıca kloramfenikol açıltransferaz (*cat*) kodlayan gen markör olarak *pfl* genine entegre edilmiştir.



Şekil 2.3 A. *E. coli* K12'nin glukoz fermentasyonu sonucu açığa çıkardığı tipik ürünler. Tüketilen 100 mol glukoz başına üretilen ürünlerin mol miktarları verilmiştir (Gottschalk, 1986) ve karbonun %91'i fermentasyon ürünü olarak hesaba katılmıştır. **B.** *pet* operonu eklenmiş *E. coli* tüm glukozu sadece etanole dönüştürür ve bu suş (KO11) ayrıca suksinat üretimini bloke eden bir mutasyona da sahiptir. Üretilen etanol miktarına göre ortaya çıkan CO_2 miktarı 206 mol kadardır (Dien et al., 2003).

E. coli KO11 suşu agro-endüstriyel hammaddede de bulunan çok çeşitli şekerleri kullanabilmektedir (Ingram et al., 1998; Ohta et al., 1991). Kosaric ve Vardar-Sukan'ın (2001) belirlediğine göre mısır hidrolizati içerikli ortamda KO11 suşunun etanol üretimi 21-34 g/L ve verimi 0.41-0.5 g etanol/g tüketilen şeker'dir. Endüstriyel üretimde kullanılan *S. cerevisiae* ve *Z. mobilis* türlerinde ise verim 0.3 g/g'dır (Garay-Arroyo et al., 2004).

2.5. Biyoproseslerde Ölçek Büyütme Parametreleri

Mikrobiyal proseslerin dizaynı ve gelişimi; ürün, mikrobiyal suş, biyodönüşüm koşulları gibi birçok parametreye bağlıdır. Bu nedenle bir prosesin kısa sürede istenen verimlilik ve verimde gerçekleştirilmesi için en uygun yaklaşımın belirlenmesi gerekmektedir. Bu değerler ölçek büyütülürken mümkün olduğunca sabit tutulmalıdır. Ortam dizaynı ve optimizasyon işlemleri erlenlerde paralel olarak kolaylıkla ve kısa sürede yapılabilmektedir; ancak üretimin endüstriyel olabilmesi için büyük çapta da yüksek hacimsel verimlilik sağlayabilmelidir. Biyoreaktörde gerçekleşen transport olayları, kütle transferi, ısı transferi ve kimyasal reaksiyonları etkileyen birçok parametrenin var olmasından dolayı ölçek büyütme işlemi oldukça zordur (Marques et al., 2010). Bu parametreler kütle transferi, karışma, homojenite, verilen güç, karıştırma kaynağı kayma gerilimi, dilüsyon hızı, substrat ve ürün konsantrasyonu, mikronutrientler, stabilizör ajanları, sıcaklık ve pH ile ilişkilidir. Biyokimyasal parametreler biyodönüşüm/büyüme kinetikleriyle optimize edilirken; fiziksel parametreler proses dizaynı ve çalışma koşullarıyla belirlenir. Ölçek büyütme parametreleri fiziksel parametreler arasından seçilir. Değiştirilen parametreler genel olarak oksijen desteği, ısı transferi ve karışma, havalandırma, karıştırma, karışma zamanı, şaftta verilen güç, oksijen transfer katsayısıdır. Genellikle bu fiziksel parametreler birbiriyle ya da diğer değişkenlerle kombine halde sabit olacak şekilde kullanılır ve bu nedenle ölçek büyütme parametresi olarak adlandırılırlar (Schmidt, 2005). Ancak her biyoproses için uniform bir ölçek büyütme stratejisinden söz edilemez. Bu nedenle uygun bir ölçek büyütme yaklaşımı, her ürün ve suşa özel olarak denenerek belirlenmelidir (Burke, 2008). Ölçek büyütmek için kullanılan parametreler; benzer $k_L a$ değeri, benzer hacimsel güç tüketimi, sabit Reynolds sayısı (Re), sabit karıştırıcı ucu hızı, eşit karışma ve resirkülasyon süresidir.

2.5.1. Benzer kütle transfer katsayısına göre ölçek büyütme

Endüstriyel aerobik biyoproses üretimlerinde oksijen, büyüme, bakım ve ürün üretimi için temel bir ihtiyaçtır ve biyoreaktöre düzenli bir şekilde beslenmelidir. Biyoprosesler genellikle derin kültürde gerçekleştirilir; ancak 25°C

ve 101 kPa basınçta 0,272 mmol/L oksijen çözünür; bu nedenle oksijen sınırlayıcı faktör teşkil eder. Reaktörde sıvı ortama oksijen desteği gerekmektedir ancak kütle transferi pek çok parametreden etkilenir. Bunların başında sıvı reolojisi, çalışma koşulları (basınç, sıcaklık, çözünmüş tuz konsantrasyonu vb.) ve reaktör geometrisi gelir. Oksijen transfer hızı (OTR) karıştırmanın ve havalandırmanın artmasıyla artar. Oksijen transfer hızıyla ilişkili oksijen transfer katsayısı, k_{La} , genel olarak 3 şekilde ölçülür. Bunlar yatışkın hal yöntemi, yatışkın olmayan hal yöntemi ve sülfite metodu. Yatışkın hal yöntemi oksijen elektrodu ile yapılır, kesin sonuç verir, mikroorganizmalı sıvıda ölçüm alınabildiği için pratiktir; ancak oldukça pahalıdır. Sülfite metodu ise SO_3 'ün Cu^{+2} varlığında O_2 ile birleşmesiyle, SO_4^{-2} oluşumuyla ilişkilidir, sülfat üretimi sülfat titrasyonu ile belirlenir ve üretim sırasında ortam koşullarına etkiyeceği için yapılması zordur. Ancak yatışkın olmayan hal metoduyla kolaylıkla ölçüm alınabilmektedir. Bu yöntemle zamanla doygunluğa ulaşan sıvıdaki oksijenin konsantrasyonu oksijen probuyla belirlenebilir. Küçük ölçekte belirlenen k_{La} değerini sağlayan karıştırma veya havalandırma hızıyla büyük ölçekte üretim yapıldığından benzer k_{La} parametresi kullanılır (Demirci, 2010).

Aerobik biyodönüşümle yapılan fermentasyon sistemlerinde ölçek büyütülürken gaz-sıvı kütle transferinin etkisi en önemli faktördür (Hubbard et al., 1994). Bu nedenle benzer k_{La} ilkesiyle ölçek büyütme mikroorganizmanın ihtiyacı kadar oksijen sağlanan aerobik fermentasyonlarda en sık kullanılan ölçek büyütme parametresidir (Hubbard et al., 1994; Herbst ve Schumpe, 1992; Ju ve Chase, 1992).

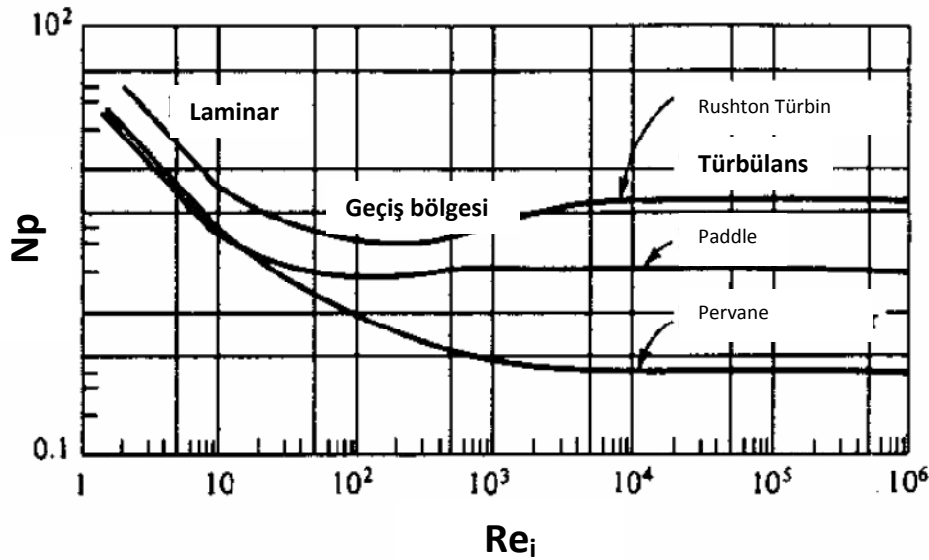
2.5.2. Hacim başına tüketilen güç parametresine göre ölçek büyütme

Güç tüketimi biyokimya mühendisliği için temel bir parametre olmasının dışında ölçek büyütme ve reaktör tasarımı için de önemli bir kriterdir. Hacim başına güç tüketimi (P/V), belirli sürede bir tank içindeki sıvının hareketini sağlamak için gerekli enerji miktarı olarak tanımlanır (Alam ve Razali, 2005). Hacim başına güç tüketimi; türbülans derecesi ve ortamın sirkülasyonunu, ısı ve kütle transferiyle karışma ve sirkülasyon süresinin etkisini temsil eden bir terimdir. Hacim başına güç tüketimi sabit tutularak yapılan ilk üretim penisilin

üretimidir ve günümüzde düşük karıştırma ve havalandırma hızlarında çalışılan (enerji gereksinimleri düşük) prosesler için başarıyla uygulanmaktadır. Çünkü bu üretimlerde büyük hacimli tanklarda hücreye zarar verebilecek büyüklükte kayma gerilimi etkisi yoktur. Bu proseslerde sabit P/V değeriyle ölçek büyütüldüğünde, $k_L a$ değerinde önemli miktarda değişiklik görülmez, bu nedenle hücrenin oksijen ihtiyacını karşılayamama problemi ortadan kalkar.

Bu metot havalandırma verimi ile birim hacim başına güç tüketimi arasında oran kurar. Bu oran tam türbülans bölgesinde net bir şekilde görülmektedir. Fungus ve streptomyces gibi viskoz kültürlerle çalışıldığında, yüksek karıştırma hızlarında bile türbülans rejime ulaşamayabilir ve benzer P/V oranıyla ölçek büyütme zorlaşmaktadır (Mohamad et al., 2001). Bu nedenle havalandırma verimli bir şekilde sağlanabilecekse birim hacim başına güç tüketimi prensibiyle ölçek büyütülmelidir (Geankoplis, 1993). Genel olarak güç tüketimi $1-3 \text{ kW/m}^3$ olan fermentasyon sistemlerinde, ölçek büyütme parametresi olarak P/V oranı kullanılır (Zhang et al., 2005; Nielsen et al., 2003).

Rushton et al. (1950) havalandırmasız bir sistemde karıştırmanın güç girdisini (P_o), D_i karıştırıcı çaplı N karıştırma hızlı reaktörde birimsiz güç sayısı (N_p) Denklem 2.1'deki gibi hesaplamışlardır. Re sayısı belirlenerek reaktördeki sıvı rejimine ve kullanılan bıçak tipine göre N_p değeri Şekil 2.4'ten bulunur.



Şekil 2.4 Sıvı rejimi ve kullanılan bıçak tipine göre Re ve Np sayısı arasındaki ilişki.

$$Po = Np \times \rho \times N^3 \times D_i^5$$

Denklem 2.1

Havalandırmazsız tanklarda güç tüketimi, havalandırılmalı tanklardan daha fazladır. Çünkü karıştırmalı bir reaktöre hava beslendiğinde sıvı fazın görünür yoğunluk ve viskozitesi azalır. Bunun nedeni havalandırılmalı üretimlerde gaz kabarcıklarının dispersiyonudur. Sıvı özelliklerindeki bu değişimler havalandırma için gerekli güce etki eder. Düşük bıçak hızlarında gaz, efektif olarak dağılamadan bıçak boyunca yükselerek sistemi terk eder ve bu duruma *taşma* denir. Yüksek karıştırma hızlarında ise sıvı yoğunluğundaki değişim nedeniyle şaftta uygulanan güç azalır ve bu azalma havalandırma sayısı ile ilişkilidir. Havalandırılmalı bir tankta güç tüketimi (P_g) hesabı ise Denklem 2.2'deki gibidir (Bailey and Ollis, 1986).

$$P_g = m \left(\frac{P_o^2 N D_i^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45}$$

Denklem 2.2

Burada m , kullanılan bıçak türüne göre sabit bir katsayıyı; Q ise, havalandırma hızını simgelemektedir. Rushton türbin tipi karıştırıcılarda m değeri 0,832'dir (Badino et al., 2001).

2.5.3. Sabit karıştırıcı ucu hızıyla ölçek büyütme

Bıçak ucu hızı veya karıştırıcı ucu hızı, kayma gerilimi ile morfoloji arasındaki ilişkinin çok iyi bilinmediği durumlarda önemli bir ölçek büyütme parametresidir. Bu nedenle misel kültürleri, dallanmalı maya, filamentöz bakteri gibi hücre hasarı olan biyoproseslerde tercih edilmesi gereken bir parametredir. Baş parmak kuralına göre mikroorganizmalar için 4 m/s, funguslar için 3,2 m/s karıştırma ucu hızının üstünde hücre hasarı meydana gelir (Marques et al., 2010);

ancak gerçek değer sıvı reolojisi gibi birçok faktöre göre değişiklik gösterir. Sabit karıştırıcı ucuyla ölçek büyütme hasar görme riski düşük bakteri ve mayalar için çok tercih edilmez. Benzer karıştırıcı ucu hızı ile ölçek büyütülürken P/V değeri genellikle azalır; bu durum havalandırma verimine etki eder. Eğer mümkünse bu durumda daha fazla bıçaklı karıştırıcı kullanılabilir; böylelikle P/V değeri de sabit kalır (Midler ve Finn, 1966).

2.5.4. Benzer Reynolds sayılarıyla ölçek büyütme

Reynolds sayısı sıvının akış hareketi hakkında bilgi verir. Prosesteki havalandırmanın etkisi dahil edilmediği için, sabit Re sayısı fermantasyonlarda ölçek büyütülürken çok sık tercih edilmez (Ju ve Chase, 1992). Ayrıca, ölçek büyütmede yüksek Re sayıları tercih edilir.

2.5.5. Sabit karışma zamanıyla ölçek büyütme

Karışma zamanı, reaktöre tek bir noktadan eklenen etkenin reaktör içinde homojen dağılmasına kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır (Marques, 2010). Genel olarak karışma zamanı tm tipik olarak ölçülebilenin yanı sıra, teorik olarak Denklem 2.3 ile hesaplanabilir. Nf, reaktördeki pompalama sayısıdır.

$$tm = \frac{V}{N_f \times N \times D t^3}$$

Denklem 2.3

Biyoproseslerde ölçek büyütme, laboratuvar sonuçlarından geliştirilen verilere bağlı olarak herhangi bir hacimde üretim yaparken prosesteki değişkenlerin belirlenmesiyle yapılır. Re, karıştırma hızı ve havalandırma hızı gibi değerlerin değişmesi ile çeşitli parametrelerin benzerlik prensibi ölçek büyütmenin temellerini oluşturur. Herhangi bir proses için evrensel bir ölçek büyütme stratejisi bulunmamaktadır ve o prosese ait “en iyi” ölçek büyütme parametresi kullanılan hücre, ortam koşulları, reaktör geometrisi gibi pek çok

etkene bağlıdır. Bu nedenle denenen parametrelerden en yüksek verimliliği veren üretim ölçek büyütme için en uygun stratejidir.

2.6. Biyoetanol Eldesinde Kullanılan Altakım İşlemleri

Üretilen biyoetanolün yakıt olarak kullanılması için öncelikle fermentör sıvısından ayrılması ve saflaştırılması gerekmektedir. Etanolün alt akım işlemleriyle eldesi için kullanılan distilasyon ve ekstraksiyon gibi bilinen yöntemlere alternatif olarak yüksek saflıkta ürün konsantrasyonu (%99,5'in üzerinde) sağlayan pervaporasyon tekniği geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.6.1. Geleneksel yöntemlerle biyoetanol eldesi

Etanolün sürekli ayrılması için kullanılan geleneksel teknikler; vakum distilasyonu, ekstraktif fermentasyon, vakum fermentasyonu, hidrofobik adsorbantla on-line adsorpsiyon, solvent ekstraksiyonu, perstraksiyon (membran eklenmiş solvent ekstraksiyonu), membran pervaporasyonu ve CO₂ ile gaz stripping'dir (O'Brien et al., 2000). Adsorpsiyon fermentasyon ortamından nutrientlerin uzaklaşmasına, ekstraksiyon ve perstraksiyon kültür toksisitesine, gaz stripping ise düşük solvent uzaklaşım hızına sahip olduğu için on-line etanol seperasyonu için yeterli bulunmamaktadır (Aroujalian ve Raisi, 2009). Etanol ayrımı için yapılan çalışmaların bazıları kullanılan tekniğe ve ayırım verimlerine göre karşılaştırmalı olarak Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5 Etanolün ayrılmasında kullanılan teknikler ve ayırım güçleri

Ayırım Tekniği	Sıcaklık (°C)	Proses Süresi (h)	% Etanol Eldesi	Referans
Entegre vakum distilasyonu	35	10	80	Cysewski and Wilke, 1977
Adsorbsiyon	35	30	50	Bul et al., 1985
Distilasyon	100	10	80	Jamsak et al., 2007
Pervaporasyon (PDMS-PAN membran)	70	12	99	Staniszewski et al., 2007

2.6.2. Pervaporasyon

Pervaporasyon tekniği, organik komponentin sıvı solüsyondan uzaklaştırılmasına dayanır ve bu teknikle beslemedeki spesifik komponentler vakumla membrandan geçer. Molekülün boyutuna göre (mikrofiltrasyon) ayırım yapan veya yüksek basınç gerektiren ters ozmos sistemleri gibi membran tekniklerinden farklı olarak, pervaporasyonda yapılan ayırım moleküler temeldedir ve molekülün kimyasal yapısına bağlıdır. Membranın iki kısmı arasındaki komponentin kısmi buhar basıncındaki değişim transmembran transportunda yürütücü güç olarak rol alır. Sıvı fazdan geçen moleküller (doğunluktaki kısmi buhar basıncında) permeat kısmına geçer ve burada kısmi buhar basıncı doğunluğun altındadır. Bu nedenle membranı terk eden komponent sıvı fazda bulunmaz, buhar fazındadır; bu nedenle buhar olarak ayrılır (Şekil 2.5).

Organofilik membranla ayırım yapıldığında, organik madde membran içinde çözünerek membran boyunca difüze olur, ardından permeat kısmında vakumla yoğunlaştırılarak fermentör sıvısından uzaklaştırılır. Bu proseste sıvıdan buhara doğru bir faz değişimi olur ve prosesin başarısı seçicilik (organik komponentin uzaklaşım miktarı) ile akı (membran alanı başına membrandan geçen organik uçucu) değerlerine bağlıdır (O'Brien et al., 2000).

Ticari organofilik membranlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, ağırlıkça % 5 etanol içeren çözeltiden, % 42 w/w etanol konsantre edilmiştir (O'Brien et al., 2000). Slater et al. (1990), polidimetilsiloksan membranla maksimum 10,2 seçicilikle (50°C) ve 125g/m²/h akıda etanol separasyonu yapmışlardır. Ağırlıkça %2'lik etanol-su karışımını ayırmak için PDMS membran kullanılan bir başka çalışmada 30°C'de 86 g/m²/h etanol akısı ile 2.85 seçicilikle; 60°C'de 465 g/m²/h etanol akısı ile 2.25 seçicilikle elde edilmiştir.

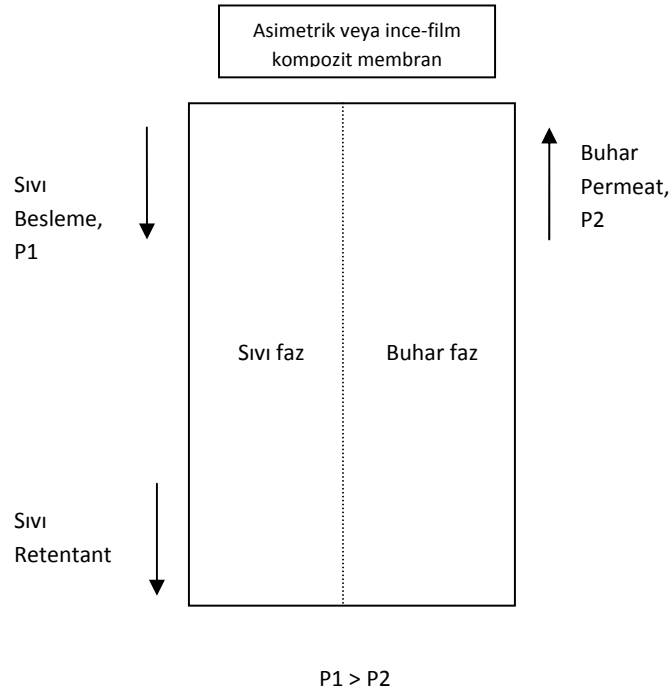
Endüstriyel uygulamalarda kullanılan membranların başlıcaları şunlardır (Sulzer Co.);

- Hidrofilik membran: Membranın sahip olduğu kimyasal özellikleri nedeniyle yüksek su affinitesinin olduğu membranlardır. Bu nedenle su membran boyunca çözünürken; polar olmayan organik moleküller membrandan geçmeden besleme kısmından tanka geri döndürülür. Alkol, ester, eter, keton, hidrokarbon gibi karışımlardan su ayırımında

kullanılırlar. Hidrofilik membranların seçiciliği oldukça yüksektir ve PERVAP 2201 hidrofilik bir membrandır ve $\leq$ % 90 su içerikli karışımların ayrımı için uygundur. Maksimum dayanım sıcaklığı 107°C 'dir.

- Organofilik membran: Ayrılacak komponentin non-polar olduğu durumlarda kullanılır. Bu moleküller membrandan geçerken, diğer polar komponentler ve su tanka geri döndürülür. Bu nedenle organik membranlar sulu sistemlerden uçucu organiklerin uzaklaştırılmasında kullanılır.

- Organik-organik ayırım membranı: Birden fazla organik komponent içeren sıvıdan, istenen molekülün ayrımını sağlayan yüksek seçiciliğe sahip bir membran çeşididir.



Şekil 2.5 Pervaporasyonun şematik gösterimi

Etanol seperasyonunda pervaporasyon için yüksek etanol permeabilitesi ve düşük su permeabilitesi gösteren membranlar kullanılmalıdır (Huang et al., 2009).

Çok yüksek etanol konsantrasyonuna ($> \% 90$ w/w) sahip sulu çözeltilerden etanol eldesi için seramik membranlar kullanır. Ancak fermentasyonla elde edilen biyoetanol konsantrasyonu ağırlıkça $\% 5$ 'i geçmez; bu nedenle fermentörü terk eden sıvıdan biyoetanol eldesinde seramik membranlar tercih edilemezler (Thongsukmak ve Sirkar, 2009). Etanol-permselectif membran olarak kullanılan başlıca polimerler poli [1-(trimetilsilil)-1-propin] (PTMSP) ve polidimetilsiloksandır (PDMS). PTMSP membranlar çok iyi akı ve yeterli etanol-su separasyon faktörüne sahiptirler; ancak performansı zamanla değişmektedir. PDMS membranlar ise günümüzde en sık tercih edilen polimerdir. PDMS, gaz ve uçucular için en yüksek permeabiliteye ve su içindeki organik kimyasallar için endüstride kullanılan diğer polimerlere göre daha yüksek separasyon performansına sahiptir (Huang et al., 2009). Membran modülü olarak oleyil alkol kullanıldığında ise, etanol $\% 14$ w/w'ye kadar saflaştırılabilmektedir (Thongsukmak ve Sirkar, 2009).

Uçucu ürünler için kullanılan pervaporasyon diğer tekniklerin dezavantajlarına sahip olmamasının yanı sıra, onlara göre; yüksek kolaylık, biyokatalizöre nontoksiste, daha konsantre etanol eldesi ve daha az enerji tüketimi gibi birçok avantaj sunar.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Rekombinant mikroorganizma

E.coli KO11 (pLOI 1910) rekombinant suşu Florida Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ingram'dan temin edilmiştir. Suş *E. coli* B (= ATCC 11303) mikroorganizmasından türetilmiştir. Tüm organizmalar ampullerde dondurarak kurutma metodu ile -86 °C de saklanmıştır. Rekombinant hücreler ampüllerde 600 mg/l kloramfenikol içeren katı besin ortamında büyütülmüştür. Rekombinant suşun stok kültürü modifiye Luria-Bertani (LB) agar kullanılarak yapılmıştır.

3.1.2. Luria-Bertani ortamı

Rekombinant özelliklerinin kaybolmaması için, suş 24 saatlik döngüyle 6 mg/L ve 1,6 mg/L kloramfenikol içeren agarda korunmaktadır. Agar içerikli (LB) ortamının bileşenleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Analitik saflıktaki bu kimyasallar Merck markadır.

Çizelge 3.1 Modifiye (LB) kimyasal kompozisyonu (Ingram et al., 1998).

Komponent	Miktar (g/L)
Glukoz	20
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Sodyum klorür	5
Agar	15
Kloramfenikol (antibiyotik)	0,6

Rekombinant suşların büyümesi için katı ortama 20 g/l glukoz, sıvı ortama 50 g/l glukoz ilave edilmiştir. Besin ortamı ile şeker ayrı ayrı 121⁰C’de 15 dakika otoklavlanmış; şeker, kullanımın hemen öncesinde fermantasyon ortamına aseptik koşullarda beslenmiştir.

3.1.3. Kullanılan substratlar

Üretimde karbon kaynağı olarak kullanılan agro-endüstriyeli substratların başlıcaları; ayva, elma, portakaldır. Bu meyveler İzmir’de faaliyet gösteren bölgesel bir marketten temin edilmiştir. Meyveler kullanım öncesi +4⁰C’de saklanmış, üretim öncesi suları sıkılarak ayrılmıştır.

3.1.4. Kullanılan ekipmanlar

Tez çalışması boyunca kullanılan cihazların başlıcaları markalarıyla birlikte aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Spektrofotometre (Unicam-Helios- α)
- Mikrosantrifüj (Sanyo)
- Santrifüj (Hettich Universal 3R)
- Etüv (Memmert)
- Analitik terazi (Precisa XB 220A)
- pH-metre (Hanna PI 9321)
- Otoklav (Hirayama HICLAVE HVE-50)
- Vorteks (Stuart Scientific SA 2)
- Fotoğraf Çekim Aparatı (Olympus CH40)
- İnkübatör (IKA Thermoshake)
- Analitik Terazi (Sartorius BP110 S)
- 5 L’lik Fermentör (Sartorius A plus stat)
- 10 L’lik Fermentör (Sartorius B plus stat)

- Gaz Kromatografisi: 6890N Agilent Technologies Network GC System cihazıyla, flame ionization detektörü (FID) ve 30 m x 0.25 mm kapiller kolonu (J&W Scientific) kullanılmıştır.

- Pervaporasyon ünitesi (Sulzer Co.): Üniteye Pervap 1201 membran kullanılmıştır. Membran polivinil alkol ile yüksek çapraz bağlı Poliakrilonitrilden (PVA-PAN) oluştuğu için hidrofilik özelliklidir (Sulzer Co.). 0,2 mm por çaplı membranın kalınlığı 2 µm ve efektif yüzey alanı 172 cm²'dir.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan substratların indirgen şeker içeriklerinin belirlenmesi

Meyve posaları 60⁰C'lik etüvde kütlesi sabit kalana dek (~48 saat) kurutulduktan sonra boyutu 1 mm olacak şekilde ezilmiştir. Meyvelerin içerikleri Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Substrat olarak kullanılan ayva, elma ve portakal posasının içerdiği indirgen şeker miktarı DNS metoduyla (Miller, 1959) ayrı ayrı hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Substrat olarak kullanılan agro-endüstriyel atıkların % kuru madde oranları ve indirgen şeker içerikleri

Agro-Endüstriyel Hammadde Adı	% Kuru Madde Oranı	İndirgen Şeker Konsantrasyonu (g/L)
Portakal	12,56	89,49
Elma	17,01	180,20
Ayva	19,02	176,07

Hesaplanan en uygun üretim koşullarına göre 100 ml'lik üretim ortamında 6 g glukoz bulunmalıdır. Ortama konacak şeker miktarının belirlenebilmesi için her bir hammaddenin yoğunluğunun bilinmesi gerekir.

Kuru madde yüzdelerine göre posaların yoğunlukları Çizelge 3.3'te verilmiştir (Cemeroğlu, ve Karadeniz, 2001).

Çizelge 3.3 Biyoetanol üretiminde kullanılacak agro-endüstriyel atıkların yoğunluğu

Agro-Endüstriyel Hammadde Adı	Yoğunluk (kg/L)
Portakal	1,051
Elma	1,070
Ayva	1,079

Buna göre portakal posasının indirgen şeker içeriği g Şeker /g Kuru madde cinsinden;

$$\frac{89,49 \text{ g Şeker}}{\text{L posa}} \times \frac{1 \text{ L posa}}{1,051 \text{ kg posa}} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \times \frac{100 \text{ g posa}}{12,56 \text{ g KM}} = 0,68 \frac{\text{g Şeker}}{\text{g KM}}$$

olarak bulunur. Buna göre 6 g/100 mL şeker içeren kuru madde ağırlığı portakal için;

$$6 (\text{g Şeker}) \times \frac{\text{g KM}}{0,68 \text{ g Şeker}} = 8,82 \text{ g KM}$$

kadardır. Aynı işlem diğer meyvelerde de yapılırsa 100 ml ortama eklenecek kuru meyve posalarının ağırlıkları Çizelge 3.4'teki gibi olur. Üretim ortamına glukoz yerine eklenen meyve posaları; 10 g/L tripton, 5 g/L maya ekstraktı, 5 g/L NaCl içeren LB ortamı ile ayrı ayrı 121 °C de 15 dakika süresince otoklavlanıp, aseptik olarak LB ortamına eklenmiştir.

Çizelge 3.4 60 g/L indirgen şeker içeren meyve atıklarının miktarı

Kullanılan hammaddenin adı	6 g/100 ml indirgen şeker içeren hammadde miktarı (g)
Glukoz	6
Ayva	6,98
Elma	6,06
Portakal	8,82

3.2.2. Meyve posalarında C/N oranının hesabı

Üretim ortamına eklenecek meyve miktarı sadece karbon içeriğiyle göre değil, aynı zamanda içerdiği azot oranıyla da ilişkilidir. Erlen denemelerinde belirlenen en uygun koşullara göre karbon/azot (C/N) hesabı yapıp, aynı C/N oranına sahip meyve içeriğinin belirlenmesi için ayva posasındaki toplam organik karbon ve azot miktarları belirlenmiştir (Bkz 3.2.5.7).

60 g/L glukoz içeren 1L sentetik ortamdaki C/N oranı hesaplanmalıdır. Maya ekstraktı % 4,5 g/g azot içerdiğine göre (US Patent No: 6,344,231 B1) 5 g maya ekstraktı içeren 1 L'lik ortamda 0,225 g azot bulunur. Pepton ise % 13 g azot ve % 0,5 g glukoz (Solabia Biotech Group, Fransa) içermektedir; buna göre 10 g peptonda 1,3 g azot ve 0,05 g glukoz bulunur. 60 g glukoz ise 21,8 g karbon içermektedir. Bu durumda sentetik ortam; 14,33 g/g (=46,67 mol/mol) C/N içermektedir.

Ayva posasındaki aynı C/N oranına sahip kuru madde (KM) miktarı;

$$(0,345 \text{ g C/g KM} * X \text{ g KM}) / [(2,3*10^{-3} \text{ g azot / g KM} * X \text{ gKM}) + 1,525] = 14,3$$

$$X= 70 \text{ g KM}$$

olarak bulunur. İndirgen şeker hesabıyla bulunan değer de ayva için 69,8 g/L olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4).

3.2.3. Erlen denemeleri

3.2.3.1. Üretim ortamının hazırlanışı

Üretimlerde 250 ml hacimli erlenmayerler kullanılmıştır. 50 ml'lik 60 g/L substrat ile 50 ml'lik LB ortamı distile suda çözündürülmüştür. Üretim pH'sını ayarlamak için 2 N HCl ve 2 N KOH çözeltileri kullanılmıştır. Erlenmayerlerin ağız kısımları plastik tıpa ile kapatılıp alüminyum folyo ile kaplanarak ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon bitiminde erlenmayerler oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuş ve aseptik koşullarda birleştirilerek 100 ml'lik üretim ortamı elde edilmiştir.

3.2.3.2. İnokulasyon

Standart inokulum ortamı olarak 50 g/L glukoz içeren LB ortamı kullanılmıştır. Aşı için 600 mg/l kloramfenikol içeren petriden izole edilen 3 koloni 100 ml Luria Broth (%5 glukoz) ortamında 250 ml erlende 16 saat boyunca 35 °C de statik koşullarda antibiyotik olmadan büyütülmüştür. Hücreler 5000 g'de 5°C'de 5 dakika santrifügasyon ile hasat edilip ve başlangıç hücre kuru ağırlığı 330 mg/l (OD≈0,2) olacak şekilde fermentöre aşılanmıştır.

3.2.3.3 Üretim koşulları

Erlen denemelerinde sıcaklık (30-37°C), pH (5-7), substrat cinsi ve konsantrasyonu (40-70 g/L), fermentörün çalkalama hızı (100-300 rpm) gibi parametrelerin ürün konsantrasyonuna etkisi incelenmiştir.

3.2.4. Biyoreaktör denemeleri

3.2.4.1. Üretim ortamının hazırlanışı

Üretimlerde 2 L çalışma hacmine sahip 5 L'lik Sartorius A plus biyoreaktörler kullanılmıştır. 1,7 L'lik LB ortamı reaktörde, 0,3 L'lik şeker

erlende (60 g/L) distile suda çözündürülüp 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon bitiminde inokulasyon öncesi şeker çözeltisi aseptik koşullarda reaktöre eklenmiştir.

3.2.4.2. İnokulasyon

İnokulum ortamı olarak 50 g/L glukoz içeren LB ortamı kullanılmıştır. Aşı için 600 mg/l kloramfenikol içeren petriden izole edilen 3 koloni 150 ml Luria Broth (%5 glukoz) ortamında 250 ml erlende 16 saat boyunca 35 °C de statik koşullarda antibiyotik olmadan büyütülmüştür. Hücreler 5000 g’de 5⁰C’de 5 dakika santrifügasyon ile hasat edilip ve başlangıç hücre kuru ağırlığı 330 mg/l (OD≈0,2) olacak şekilde biyoreaktöre aşılanmıştır.

3.2.4.3 Üretim koşulları

Sartorius marka 5 L’lik A plus (çalışma kapasitesi: 1-4 L) ve 10 L’lik B plus (çalışma kapasitesi: 4-9 L) biyoreaktörlerde erlenlerde belirlenen en iyi değerlerle çalışılmıştır. Ortam pH’sı 2 N KOH ile on-line olarak kontrol altında tutulmuştur.

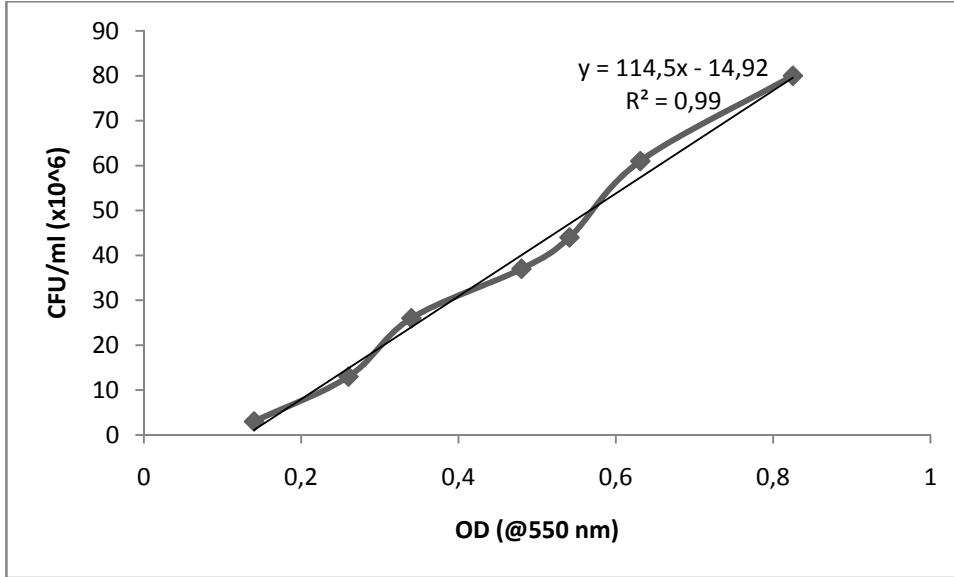
3.2.5. Analitik yöntemler

3.2.5.1. Örnek alma

Fermantasyon boyunca belirli aralıklarla aseptik olarak iki paralel şekilde örnek alımı (3 ml) gerçekleştirilmiştir. Sentetik ortamdaki hücrelerin konsantrasyonu optik densiteyle ölçülmüş, diğer testler için 5⁰C’de 5000g’de 5 dakika santrifüjlenen örneklerin supernatantı test gününe dek (maksimum 10 gün) -20 °C de saklanmıştır. Agro-endüstriyel atıklarla yapılan denemelerde ise alınan örnekler 6-7 kat seyreltilerek LB-agar petrilere aktarılıp, 48 saat sonunda CFU sayımı yapılmıştır. Diğer testler içinse 5⁰C’de 10000g’de 10 dakika santrifüjlenen örneklerin supernatantı test gününe dek (maksimum 10 gün) -20 °C de saklanmıştır.

3.2.5.2. Türbidite ve flok oluşturan hücre sayısı

Rekombinant *E. coli* KO11 hücreleri için spektrofotometrede 550 nm’de optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Substrat olarak agro-endüstriyel atıklar kullanıldığında ise hücreler LB agarına (20 g/L glukoz) ekilerek koloni oluşturan birim (CFU) sayılmıştır. CFU-OD standart eğrisi ile agro-endüstriyel atık içen ortamda üretilen biyokütle konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Eğrinin denkleminde CFU’ya karşılık gelen absorbans belirlenmiş ve o değer Şekil 3.2’den kuru hücre konsantrasyonuna dönüştürmüştür.

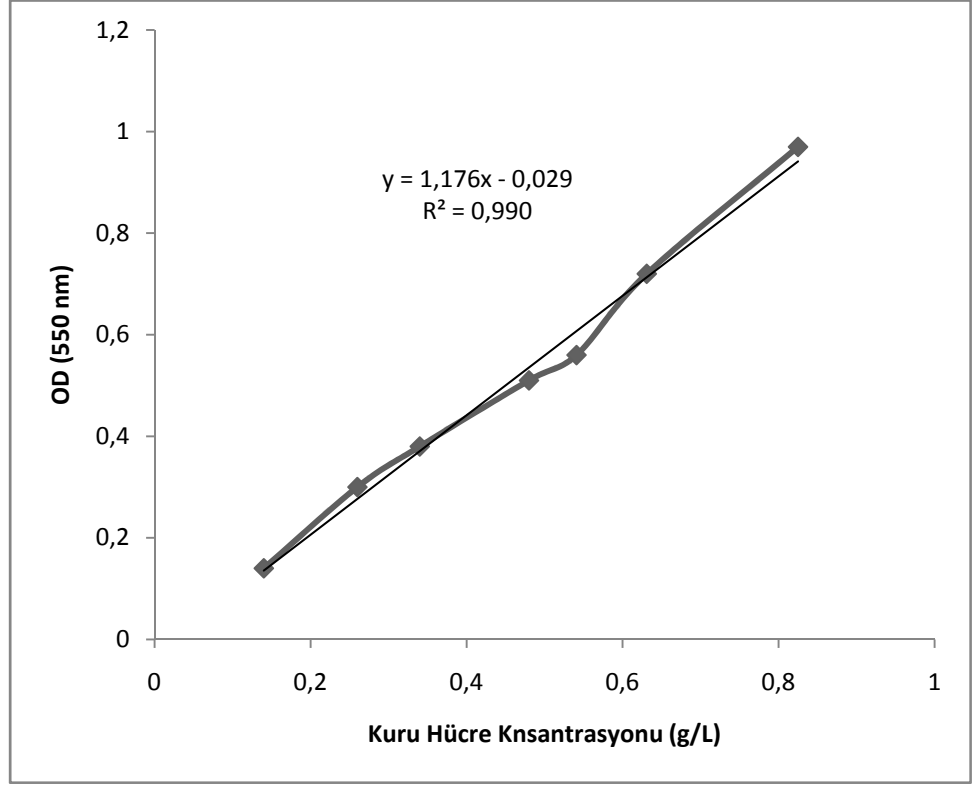


Şekil 3.1 Optik densite – CFU kalibrasyon grafiği. Veriler alınan 2 paralel örneğin ortalamasıdır.

3.2.5.3. Kuru hücre ağırlığı

550 nm’de verdiği OD değeri bilinen 15 ml’lik hücre süspansiyonu, kuru ağırlığı bilinen 0,2 µm’lik filtreden geçirilmiş ve 75°C’lik etüvde bir gün boyunca (sabit tartıma gelene kadar) kurutulmuştur. Ölçülen sabit değerden kuru filtrenin ağırlığı çıkarılarak g/L cinsinden kuru ağırlık belirlenmiş; buna göre optik yoğunluk kuru ağırlık ölçümü ile kalibre edilmiştir (Şekil 3.2). Alınan örneklerde, absorbansı 0,2-0,8 aralığına taşıyacak kadar seyreltme

yapılmıştır. Spektrofotometrede okunan absorbans değerinin, standart eğrinin denkleminde belirlenen kuru hücre ağırlığı seyreltme faktörüyle çarpılarak, o andaki biyokütle konsantrasyonu belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Absorbans — Kuru Hücre Konsantrasyonu standart eğrisi. Veriler alınan 2 paralel örneğin ortalamasıdır.

3.2.5.4. Gaz kromatografisi

Kesikli fermentasyon denemeleri sırasında oluşan etanol konsantrasyonu gaz kromatografisi ile ölçülmüştür.

Etanol analizi için örnekler reaktörlerden alındıktan sonra 10 000 rpm’de santrifuj edilip katı partiküller çöktürüldükten sonra, süpernatant 0.45 mikron por çapına sahip filtrelerden geçirilip 0.5 ml lik vial şişelerine alınmıştır. Örnek üzerine % 20’lik fosforik asit damlatılarak asitlendirilmiştir. 1 µl örnek GC’ye analiz için enjekte edilmiştir.

Kolonun başlangıç sıcaklığı 40 °C (3 dakika bekleme) olmak üzere kademeli olarak 20 °C 'lık artışlar ile önce 60 °C' (3 dakika bekleme) daha sonra 120 °C (4 dakika bekleme) ara sıcaklıklardan sonra final sıcaklığı olan 240 °C (6 dakika bekleme)'ye 30 °C'lık artışlarla ulaşılmıştır. FID detektörü ve inlet (enjeksiyon) sıcaklığı 250 °C'dir. Split enjeksiyon 5:1 oranında kullanılmıştır. Helyum, 103 kPa sabit basınçta taşıyıcı gaz olarak görev almıştır.

3.2.5.5. Toplam şeker tayini - fenol sülfürik asit metodu

İlk olarak 0.01 g glukoz 100 ml suda çözündürülmüş ve %0.01'lik glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra tüpler içine glukozun farklı konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır (Çizelge 3.5). Örnekler de gereken oranlarda (100 veya 1000 kat gibi) seyreltilmiştir.

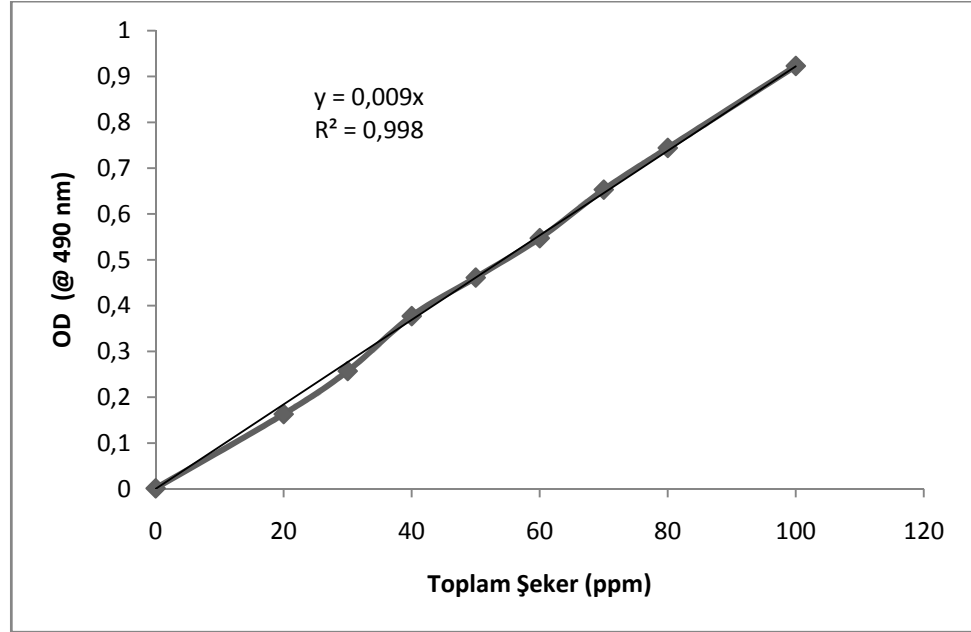
Çizelge 3.5 Farklı glukoz konsantrasyonlarında hazırlanan glukoz çözeltileri

	% 0.01'lik glukoz (ml)	Distile su (ml)	Glukoz konsantrasyonu (mg/ml)
Kör	0	1	0
Standart 1	0,2	0,8	20
Standart 2	0,4	0,6	40
Standart 3	0,6	0,4	60
Standart 4	0,8	0,2	80
Standart 5	1,0	0	100

Hazırlanan çözeltilere %5'lik fenol çözeltisi ve derişik sülfürik asit çözeltisi Çizelge 3.6'de gösterilen oranlarda eklenmiş ve elde edilen çözeltiler vortekslenmiştir. Daha sonra çözeltiler 30 dakika 25-30°C'de su banyosunda bekletilmiş, 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki glukoz miktarı belirlenmiştir. Elde edilen standart eğri Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 Farklı glukoz konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilere ve köre eklenecek olan %5' lik fenol çözeltisi ve derişik sülfürik asit çözeltisi miktarları.

	%5' lik fenol çözeltisi (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)
Kör (1ml)	1	5
Standart 1 (1ml)	1	5
Standart 2 (1ml)	1	5
Standart 3 (1ml)	1	5
Standart 4 (1ml)	1	5
Standart 5 (1ml)	1	5
Örnek 1 (1ml)	1	5
Örnek 2 (1ml)	1	5



Şekil 3.3 Toplam şeker – Absorbans kalibrasyon eğrisi. Veriler alınan 2 paralel örneğin ortalamasıdır.

Toplam şeker miktarı tespiti için 1 ml supernatant alınıp üzerine 1 ml %5'lik fenol çözeltisi ve 5 ml derişik sülfürik asit (%95-98) eklenmiştir. Karışım vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika ve

25-30 °C deki su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda heksozların tespiti için spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

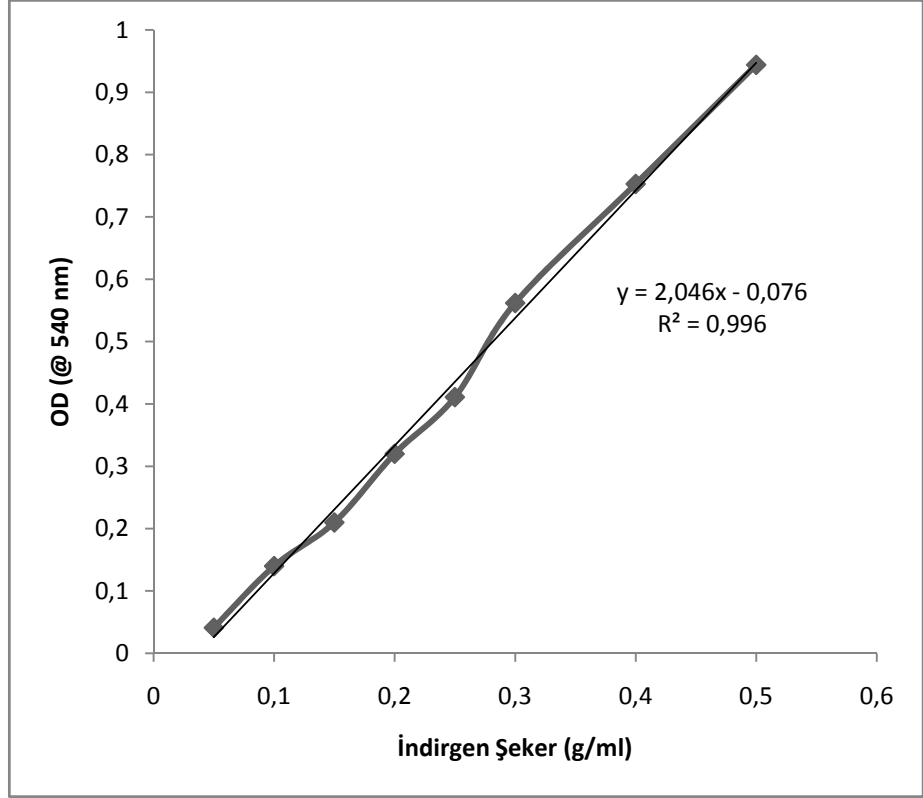
3.2.5.6. İndirgen şeker tayini - DNS metodu

DNS metoduyla, indirgen şeker de denilen serbest karbonil grupların (C=O) varlığı test edilir. Bu şekerler bir aldehid ve keton grubuyla açık zincir içerirler. Aldehid grubu içeren monosakkaritlere aldoz, keton grubu içerenlere ise ketoz denir. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), alkalın koşullarda 3-amino,5-nitrosalicylic acid'e indirgenir. Analiz dinitrosalisilik asit solüsyonu (Çizelge 3.7) ve %40'lık potasyum sodyum tartarat solüsyonu kullanılarak yapılır (Miller, 1959).

Çizelge 3.7 DNS solüsyonunun hazırlanışı (Miller ve Ark., 1959).

Kimyasal Adı	Miktar (g/L)
Dinitrosalisilik asit	10
Fenol	2
Sodyum sülfid	0,5
Sodyum hidroksit	10

Test tübündeki 3 ml'lik şeker konsantrasyonu bilinen glukoz çözeltisinin ve 10-100 kat seyreltilen süpernatantın üzerine 3 ml DNS çözeltisi eklenmiştir. 100°C kaynar su banyosunda 5-15 dakika bekletilen örnekler kırmızı-kahverengini alınca, 1 ml %40'lık potasyum sodyum tartaratın eklenmesinin ardından renk stabilizasyonu sağlanmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan tüplerin 540 nm'de ölçülen absorbanları kaydedilmiştir. Konsantrasyonu bilinen örneklerin verdiği absorbansa göre çizilen grafiğin (Şekil 3.4) yardımıyla fermentasyon ortamından alınan örneklerin indirgen şeker içeriği belirlenmiştir.



Şekil 3.4 İndirgen şeker – Absorbans standart eğrisi

3.2.5.7. Kullanılan substratlarda elementel analiz

Ayva posasında yapılan elementel analiz denemeleri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Bitki Analiz Laboratuvarı'na yaptırılmıştır. Azot miktarı belirlemesi Kjeldahl azot tayin metodu (Barbano et al., 1991) ve toplam organik karbon miktarı analizi Walkley-Black metoduyla (Walkley and Black, 1934) yapılmıştır. Sonuçlara göre 100 g yaş ayva posası 6,9 g C ve 0,047 g N içermektedir. Ayvanın % 19,02'si kuru madde olduğuna göre, 1 g KM 0,345 g karbon ve 2×10^{-3} g azot içermektedir.

3.2.5.8. Karışma zamanının belirlenmesi

Karışma süresinin belirlenmesi için, 60 g/L LB ortamı içeren 100 ml'lik erlen ve 2 L'lik reaktörde taşınabilir pHmetre ile ölçüm yapılmıştır. 1 N HCl, erlen ve reaktöre % 1'lik konsantrasyonda beslenmiş, ölçülen pH değeri sabitlenene kadar beklenmiştir ve sabit değer ile bu değere ulaşana kadar geçen süre kaydedilmiştir. Aynı işlem iki kez tekrarlanmıştır.

3.2.5.9. Verim, Verimlilik ve Toplam Verim hesabı

Dönüşüm verimi belirli bir süre içinde üretilen ürünün, harcanan substrata oranıyla belirtilir. Substrat dönüşüm verimi ($Y_{P/S}$), g ürün/ g substrat cinsinden (Denklem 3.1); birim mikroorganizma başına üretilen ürün miktarı ($Y_{P/X}$), belirli bir süre içinde üretilen ürünün o sürede üretilen hücre konsantrasyonuna oranıyla (g ürün/g hücre) belirtilmiştir (Denklem 3.2). Verimlilik ise (volumetric productivity) belirli sürede üretilen etanolün birim hacim ve birim zamandaki miktarıdır (Denklem 3.3).

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Üretilen Ürün } (\frac{g}{L})}{\text{Harcanan Substrat } (\frac{g}{L})}$$

Denklem 3.1

$$Y_{P/X} = \frac{\text{Üretilen Ürün } (\frac{g}{L})}{\text{Biyokütle } (\frac{g}{L})}$$

Denklem 3.2

$$\text{Verimlilik} = \frac{\text{Üretilen ürün } (g)}{\text{Sıvı Hacmi } (L) \times \text{Süre } (h)}$$

Denklem 3.3

E. coli KO11'den glukoz kullanarak elde edilebilecek maksimum etanol verimi teorik etanol verimi olarak bilinir ve % 51 g etanol/g şeker'dir (Okuda

et al., 2008). Üretim ortamındaki şekerin harcanma performansı ile ilgili bilgiyi vermesi açısından toplam etanol verim hesabı önem taşır (Denklem 3.4).

$$\text{Toplam EtOH verimi (\%)} = \frac{\text{üretilen EtOH konsantrasyonu}}{\text{ortama eklenen şeker}} \times \frac{1}{0,51} \times 100$$

Denklem 3.4

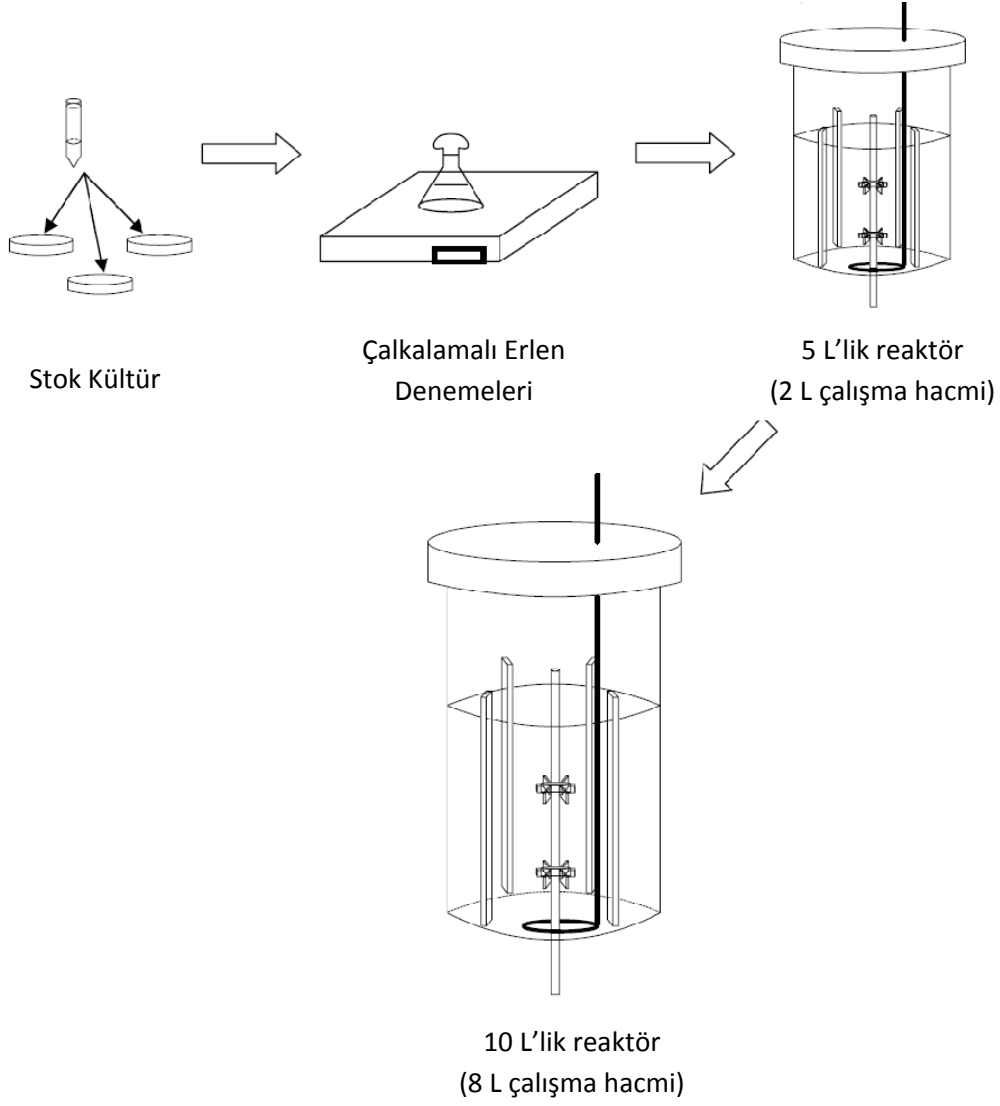
Bu çalışmada da bu bağlantı kullanılarak toplam verim hesaplanmıştır.

3.2.5.10. İstatiksel analiz

Deneysel verilerden elde edilen verimlilik değerleri, “Microsoft Office Excel 2007”nin bir veri değerlendirme fonksiyonu olan tekli-istatistiksel varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatiksel önemlilik düzeyi en az % 5 ($p < 0,05$) olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Ölçek büyütme parametrelerinin belirlenmesi

rE. coli kullanılarak biyoetanol üretimi için ayva posası içeren LB ortamında benzer karışma süresi, benzer $k_L a$ değeri ve benzer karıştırıcı ucu hızı ilkeleri esas alınarak denenmiştir. Bunun için erlenlerde belirlenen en uygun koşullarda ve aynı havalandırma hızında, bu parametrelere uygun karıştırma hızında denemeler yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 İnokülasyondan 10 L'lik biyoreaktöre ölçek büyütmede izlenen yol.

3.2.6.1. Benzer karışma süresi

60 g/L indirgen şeker içeren Ayva posası destekli LB ortamı içeren 8 cm karıştırıcı çaplı 8 L çalışma hacmine sahip 10 L'lik reaktördeki karışma süresinin, 2 L hacimli 5 L'lik reaktörde önceden hesaplanan karışma süresine eşit olması için (Bkz. 3.2.5.8.) gerekli karıştırma hızı (Ni) 330 rpm olarak belirlenmiştir. Karıştırma hızı dışındaki koşullar erlenlerde ayva posası destekli LB denemelerinde belirlenen en iyi duruma göre ayarlanmıştır. Benzer karışma süresiyle elde edilen sonuçlar t_m ile gösterilmektedir.

3.2.6.2. Benzer karıştırıcı ucu hızı

2 L hacimli 5 L'lik reaktördekiyle eşit karıştırıcı ucu hızına (v) sahip 8 L çalışma hacmine sahip 10 L'lik reaktördeki karıştırma hızı hesaplanarak 48 saatlik biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Karıştırma hızı dışındaki koşullar erlenlerde ayva posası destekli LB denemelerinde belirlenen en iyi duruma göre ayarlanmıştır. Benzer karıştırıcı ucu hızıyla elde edilen sonuçlar V_s ile gösterilmektedir. 5 L'lik reaktördeki bıçak çapı ($D_{i,5}$) 6 cm; 10 L'lik reaktördeki bıçak çapı ($D_{i,10}$) 8 cm'dir. Aynı karıştırıcı ucu hızına ulaşabilmek için 5 L'lik reaktördeki karıştırma hızı ($N_{i,5}$) 300 rpm ise, 10 L'lik reaktördeki karıştırma hızının ($N_{i,10}$) ne kadar olması gerektiği Denklem 3.5 ile hesaplanır (Bailey ve Ollis, 1986).

$$\pi \times N_{i,5} \times D_{i,5} = \pi \times N_{i,10} \times D_{i,10}$$

Denklem 3.5

$$N_{i,10} = 225 \text{ rpm}$$

3.2.6.3. Benzer $k_L a$ değeri

5 L'lik A plus Sartorius reaktörde en uygun koşullarda elde edilen $k_L a$ değeri $0,72 \text{ dak}^{-1}$ 'dir. 60 g/L indirgen şeker içeren ayva posası destekli LB ortamı içeren 0,06 vvm hava beslemeli (Bkz. 4.5.) 10 L hacimli reaktörde aynı $k_L a$ değeri sağlamak için yapılan karıştırma hızı denemeleri sonucu, 200, 250, 300, 350, 370 ve 400 rpm içinden $0,72 \text{ (dak}^{-1})$ $k_L a$ değerine en yakın sonucu 370 rpm vermiştir. Karıştırma hızı dışındaki koşullar erlenlerde ayva posası destekli LB denemelerinde belirlenen en iyi duruma göre ayarlanmıştır. Benzer $k_L a$ ile elde edilen sonuçlar $K_L a$ ile gösterilmektedir.

3.2.7. Membranın hazırlanması ve pervaporasyon

Pervaporasyon cihazı (Sulzer Co.) temelde besleme tankı, membran ünitesi ve permeat yoğunlaştırma/ eldesi sisteminden oluşur (Şekil 3.6).

Fermentörden uzaklaştırılan fermentasyon sıvısı pervaporasyon ünitesine aktararak saflaştırılmıştır.

Sistemde üst akımdaki atmosfer basıncına karşın, alt akımda 7 mbar basınç oluşturan vakum pompasına bağlı hidrofilik membrana beslenen sıvının debisi 100 L/h olarak çalışılmıştır. Permeat buharı membrandan geçip sıvı azot ile soğutulan toplama kabında biriktirilmiştir. Toplama kabındaki basınç vakum pompası ile sağlanmıştır.



Şekil 3.6 Sulzer pervaporasyon ünitesi.

Ağırlıkça % 2,3 etanol içeren fermentör sıvısının 65 ve 70°C sıcaklıkta pervaporasyonla ayırım performansı karşılaştırılmıştır. Membranın 2 yüzeyi arasındaki sıcaklık farkı 1°C'nin altına düştüğü an $t=0$ olarak kabul edilerek veriler kaydedilmeye başlanmıştır. Ayrılan sıvının biriktiği balon jojeyi (permeat) çevreleyen toplama haznesindeki sıvı azot tükendikçe basınç farkı düşmektedir. Pervaporasyon işlem kinetiğini takip edebilmek için 30 ya da 60 dakikada bir örnek alınmıştır. İşlemler 10 saat boyunca, permeat miktarı sabitlenene dek sürdürülmüştür. Permeat ve beslemedeki etanol konsantrasyonu GC'de ölçülmüş, permeat akışı ise gravimetrik olarak belirlenmiştir. Permeat kısmındaki toplam akı ($J_{top,p}$) ve etanol akışı ($J_{EtOH,p}$)

hesabıyla; membran selektivitesi (α), kazanım faktörü (β) aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır (Chovau et al., 2010).

$$\alpha = \frac{C_{EtOH,p}/C_{Su,p}}{C_{EtOH,f}/C_{Su,f}}$$

Denklem 3.6

$$\beta = \frac{C_{EtOH,p}}{C_{Su,f}}$$

Denklem 3.7

$$J_{EtOH,p} = \frac{M_{EtOH,p}}{A \times t}$$

Denklem 3.8

$$J_{top,p} = \frac{M_{top,p}}{A \times t}$$

Denklem 3.9

Formüldeki $C_{EtOH,p}$ ve $C_{Su,p}$ sırasıyla permeattaki etanol ve su konsantrasyonunu; $C_{EtOH,f}$ ve $C_{Su,f}$ ise sırasıyla beslemedeki etanol ve su konsantrasyonu temsil etmektedir. $M_{EtOH,p}$ ise t süresince A (= 172 cm²) membran yüzey alanından geçip balon jojede toplanan sıvı kütlesidir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Glikoz Destekli LB Ortamıyla Erlen Denemeleri

Tezin ana konusu olan “Meyve suyu sanayi atıklarından biyoetanol üretimi”nin incelenmesinden önce biyoetanol eldesinde katalizör olarak kullanılan r-DNA suşunun farklı ortamsal koşullarda performansının belirlenmesi ve en iyi üretim koşullarının seçilebilmesi için standart glikoz ortamında üretimler gerçekleştirilmiştir. Buna göre *E. coli* KO11 rekombinant suşundan etanol üretimi için farklı sıcaklık, pH, karıştırma hızı, başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonu gibi faktörlerin etkisiyle birlikte, oksijen varlığının önemi yapılan denemelerle araştırılmıştır.

4.1.1. Çeşitli parametrelerin biyoetanol üretimine etkisinin incelenmesi

4.1.1.1. Ortam sıcaklığının biyoetanol üretimine etkisi

En yüksek biyoetanol konsantrasyonu, farklı suşlar için farklı sıcaklık koşullarında üretilmektedir. *E. coli* KO11’in hangi sıcaklıkta en yüksek biyoetanol verimliliğini sağladığının araştırıldığı çalışmada 30, 33, 35 ve 37°C’de 60 g/L glikoz destekli 100 ml’lik LB ortamında üretim yapılmıştır. 250 ml’lik erlenler orbital çalkalayıcılarda 150 rpm’de çalkalanmıştır (pH 6). Başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu 0,33 g kuru hücre/L olacak şekilde inokulum yapılmıştır.

Uygun sıcaklığın belirlenmesi için çalışılan bu denemede; hacimsel verimlilik değerleri paralel olarak yürütülen iki erlende 48. saatte, o süreye dek üretilen etanol miktarlarına göre ortalama alınarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi 30 ve 33°C’de 48. saate kadar üretilen biyoetanol konsantrasyonu sırasıyla 14,01 ve 14,69 g/L iken, 35°C’de ürün konsantrasyonu 16,98 g/L’ye ulaşmıştır. Ayrıca 35°C’de yapılan kesikli üretimde ilk 48 saatte üretilen 7,62 g/L hücre konsantrasyonuyla 2,23 g/g $Y_{P/X}$ değerine karşın, 30°C’de 6,67 g/L biyokütle eldesiyle birim hücre başına

Üretilen rn konsantrasyonu 2,1'e dmtr. Ancak 33⁰C'de 48. saatteki 6,78 g/L hücre konsantrasyonuyla birim hücre başına üretilen etanol konsantrasyonu 2,17'dir ve $Y_{P/X}$ değeri bakımından 33 ile 35⁰C'de yapılan denemeler birbirinden farksızdır ($p>0,05$). Çizelge 4.2'de görülen harcanan birim substrat başına üretilen ürün konsantrasyonu ($Y_{P/S}$) ve verimlilik değerleri 35⁰C'deki üretimde 30 ve 33⁰C'deki üretimlerden önemli miktarda yüksektir ($p<0,05$). Sıcaklık 35⁰C'nin üzerine çıktığında ise 48. saatte üretilen ürün konsantrasyonu 16,98 g/L'den 13,01 g/L'ye gerilerken verimlilik değerleri 0,35 g/L/h'ten 0,27 g/L/h'e ve verim ise 0,30 g/g'dan 0,16 g/g'a azalmaktadır (izelge 4.1 ve izelge 4.2). Ayrıca birim hücre başına üretilen etanol miktarı ($Y_{P/X}$) 37⁰C'de yapılan kesikli üretimle 2,16 g'a drlmtr ($p<0,05$; izelge 4.2).

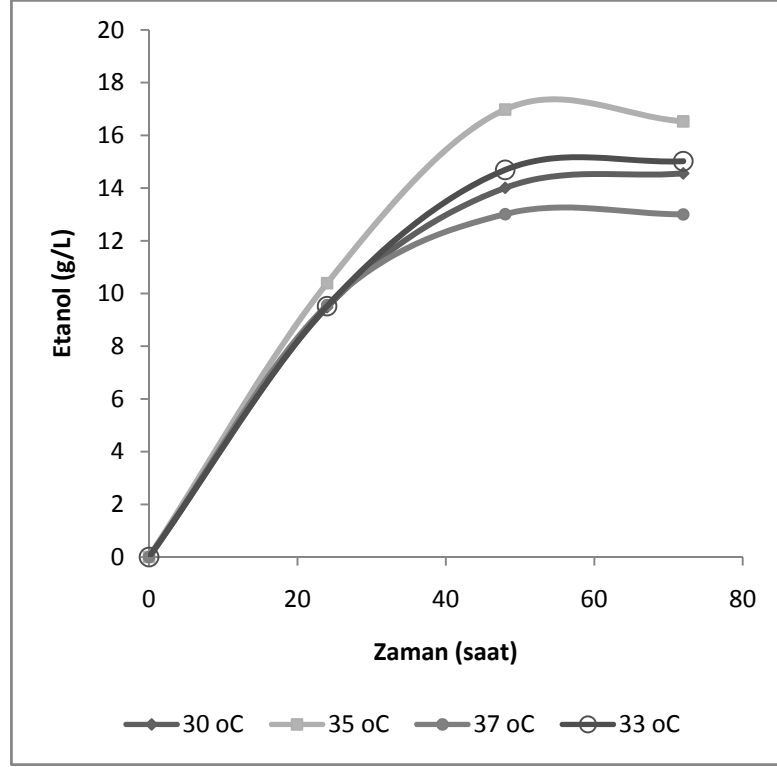
Biyoetanol retiminde uygun sıcaklığın belirlenmesi için çalışılan deneme sonuçlarına göre, biyoetanol üretiminde sıcaklık etkili bir faktördür ve veriler doğrultusunda *E. coli* KO11 suundan biyoetanol üretim için en uygun sıcaklık 35⁰C olarak belirlenmiştir. Moniruzzaman et al. (1998), *E. coli* KO11 suundan etanol rimi için en uygun koşulların 35⁰C ve pH 6 olduğunu belirtmişler ve bu koşullarda 0,44 g etanol/g substrat verimle 39,8 g/L etanol konsantrasyonuna ulamılardır. Yapılan çalışmalarla, bu çalışma sonucu elde edilen verimler arasındaki fark, suun rejenerasyon etkisinin gitgide azalmasıyla açıklanabilir.

Çizelge 4.1 Farklı ortam sıcaklıklarının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisinin incelenmesi ($p<0,05$).

Zaman (saat)		0	24	48	72
30°C	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,48±0,2	14,01±0,4	14,56±0,1
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,11±0,2	6,67±0,1	6,91±0,1
33°C	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,52±0,2	14,69±0,5	15,02±0,5
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,24±0,3	6,77±0,2	6,84±0,2
35°C	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,39±0,1	16,98±0,2	16,53±0,4
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,34±0,1	3,89±0,3	7,61±0,2	7,86±0,1
37°C	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,56±0,1	13,01±0,3	13,21±0,3
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,34±0,1	3,10±0,3	6,02±0,4	6,12±0,4

Çizelge 4.2 Farklı ortam sıcaklıklarının biyoetanol üretim verimliliğine etkisinin incelenmesi ($p<0,05$).

Sıcaklık (°C)	Verim (g/g)		Hacimsel Verimlilik (g/L/h)
	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	
30	0,18	2,10	0,29
33	0,21	2,17	0,31
35	0,30	2,23	0,35
37	0,16	2,16	0,27



Şekil 4.1 Biyoetanol üretiminde farklı sıcaklıkların etanol üretimine etkisi. Sonuçlar iki paralel üretimin ortalamasını yansıtmaktadır ($p < 0,05$).

4.1.1.2. Ortam pH'sının biyoetanol üretimine etkisi

Üretim ortamındaki hidrojen ve hidroksil iyon konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olan pH, herhangi bir üretimde üretim verimine etki eden önemli bir parametredir. *E. coli* KO11 suşunun etanol üretim performansının pH ile ilişkisinin incelendiği çalışmada; 35⁰C'de 60 g/L glikoz destekli 100 ml LB ortamı içeren ve 150 rpm'de çalkalanan tıpalı erlenlerde pH 5, 5.5, 6 ve 7'de yapılan dört farklı kesikli üretim, verim ve verimlilik açısından karşılaştırılmıştır. Başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu 0,33 g kuru hücre/L olacak şekilde inokulum yapılmıştır.

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi 48. saatte üretilen ürün konsantrasyonu pH 5'te 16,68; pH 5,5'te 16,44; pH 6'da 16,98 ve pH 7'de 15,76 g/L'dir ve istatistiksel Anova testi sonucuna göre biyoetanol üretimi bakımından 4 üretim arasındaki fark önemsizdir ($p = 0,22 > 0,05$). Çizelge 4.4'teki hacimsel verimlilik

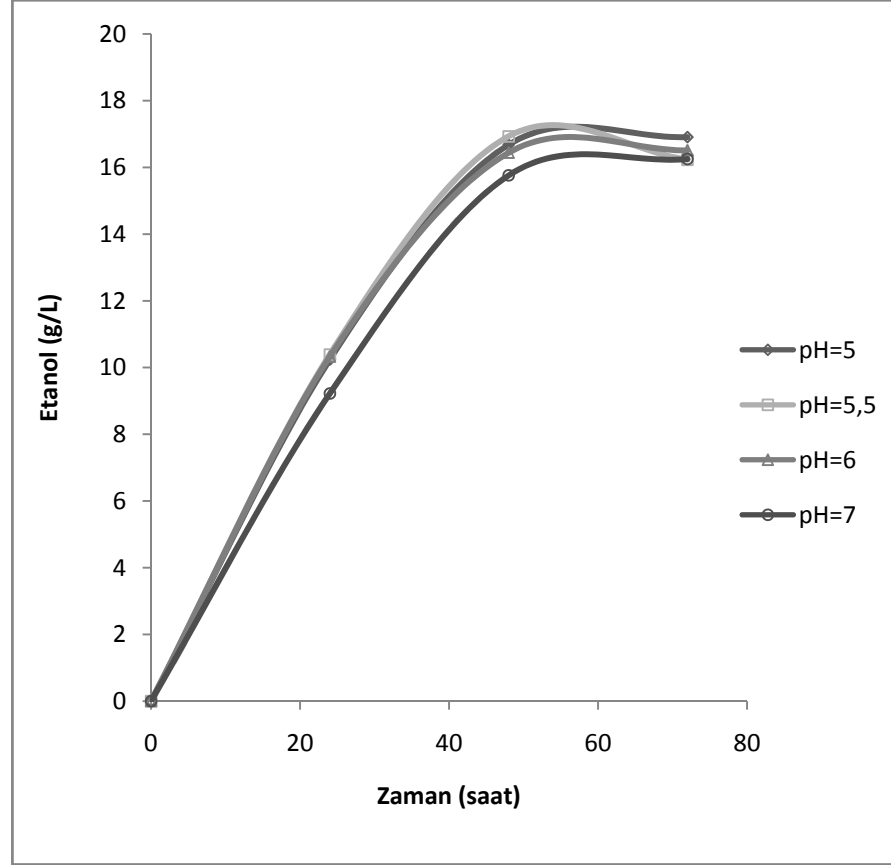
değerleri paralel olarak yürütülen iki erlende ölçüm alınan 48. saatte, o süreye dek üretilen etanol miktarlarına göre ortalama alınarak hesaplanmıştır. Birim substrat ve birim hücre başına üretilen ürün miktarı ve verimlilik bakımından da önemli bir farkın olmadığı ($p>0,05$) belirlenen çalışma sonucuna göre, biyoetanol üretiminde pH değeri tek başına etkili değildir (Çizelge 4.4). Aynı suşu kullanarak Ingram et al. ile Moniruzzaman et al.'nın pH 6'da; Asghari et al. (1996) ile Barbosa et al.'nın (1992) pH 6,5'ta; Tao et al. (2001) ile Martínez et al.'nın (1999) pH 7'de yaptığı denemelerde teorik verimin % 90-95'i kadar verim elde etmeleri de bu sonucu desteklemektedir. *E. coli* KO11'den biyoetanol üretiminde ortaya çıkan karbondioksit çözünürlüğünü minimize edebilmek için pH 6 en uygun pH değeri olarak belirlenmiştir (Moniruzzaman et al., 1998). Bu nedenle ilerleyen denemeler, pH 6'da yapılmıştır.

Çizelge 4.3 Farklı ortam pH'larının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisinin incelenmesi. Elde edilen veriler paralel çalışmalara ait sonuçların ortalamasını yansıtmaktadır ($p>0,05$).

Zaman (saat)		0	24	48	72
pH 5	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,24±0,1	16,68±0,3	16,81±0,5
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,56±0,3	7,87±0,1	7,92±0,1
pH 5,5	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,33±0,4	16,44±0,3	16,51±0,7
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,77±0,1	7,24±0,5	7,55±0,3
pH 6	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,39±0,1	16,98±0,2	16,53±0,4
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,34±0,1	3,89±0,3	7,61±0,2	7,86±0,1
pH 7	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,22±0,3	15,76±0,5	16,25±0,5
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,66±0,2	7,29±0,6	7,49±0,2

Çizelge 4.4 Farklı ortam pH'larının biyoetanol üretim verimliliğine etkisinin incelenmesi ($p>0,05$).

pH	Verim (g/g)		Hacimsel Verimlilik (g/L/h)
	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	
5	0,29	2,12	0,35
5,5	0,27	2,27	0,34
6	0,30	2,23	0,35
7	0,26	2,16	0,33



Şekil 4.2 Biyoetanol üretiminde farklı pH değerlerinin etanol üretimine etkisi. Sonuçlar iki paralel üretimin ortalamasını yansıtmaktadır ($p>0,05$).

4.1.1.3. Karıştırma hızının biyoetanol üretimine etkisi

E. coli KO11 suşunun 100 ml'lik LB ortamı (% 6 glikoz) içeren erlenlerde, orbital çalkalayıcıda farklı karıştırma hızlarında üretim verimliliği karşılaştırılmıştır. 35⁰C'de (pH 6) 250 ml'lik erlenlerde 100, 150, 200 ve 300 rpm'de 72 saat sürdürülen çalışmada zamanla üretilen biyoetanol konsantrasyonları kaydedilmiştir (Çizelge 4.5). Başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu 0,33 g kuru hücre/L olacak şekilde inokulum yapılmıştır. Biyoetanol üretimi için uygun çalkalama hızının denendiği çalışmada hacimsel verimlilik değerleri paralel olarak yürütülen iki erlende ölçüm alınan 48. saatte, o süreye dek üretilen etanol miktarlarına göre ortalama alınarak hesaplanmıştır.

100 rpm çalkalama hızında 48. saatteki biyokütle konsantrasyonu 7,13 g/L iken, $Y_{P/X}$ değeri 2,01 g/g'dır. Ancak 150 rpm'de 7,62 g/L biyokütle konsantrasyonu ile birim hücre başına 2,23 g etanole yükselmiştir. Karıştırma hızının artmasıyla erlen içinde ölü bölgelerin etkisi azaltılmış, böylece mikroorganizma substrata daha kolay erişebildiği için biyokütle ve ürün konsantrasyonu artmıştır (Çizelge 4.6). 150 rpm'lik denemede 48. saatin sonunda sadece 4,09 g/L şeker kullanılmadan kalırken; 100 rpm'lik çalışmada ortamda harcanmadan kalan 10,01 g/L indirgen şeker, ortam homojenitesinin azaldığı ve mikroorganizmanın substrata erişiminin kısıtlandığı sonucunu desteklemektedir.

100 rpm çalkalama hızında 48. saatte 14,34 g/L etanole karşı 0,29 g/g verimle 0,29 g/L/h verimlilik elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Ancak çalkalama hızı 150 rpm'e çıkarıldığında verim 0,30 g/g'a çıkarken, hacimsel verimlilik de 0,35 g/L/h'e yükselmektedir. Buna karşın 200 rpm'de 15,94 g/L ürün konsantrasyonuna karşın 0,29 g/g verim ile 0,32 g/L/h verimlilik elde edilebilmiştir ve $p>0,05$ olduğu için istatistiksel olarak 150 ve 200 rpm deneme sonuçları birbirinden farksızdır (Çizelge 4.6). 300 rpm hızında ise 0,27 g/g verim ve 0,33 g/L/h verimlilikle 15,92 g/L etanol üretilmiştir ve artan karıştırma hızının etkisiyle kütle transferi arttırılarak anaerobik metabolizma olumsuz yönde etkilenmiştir.

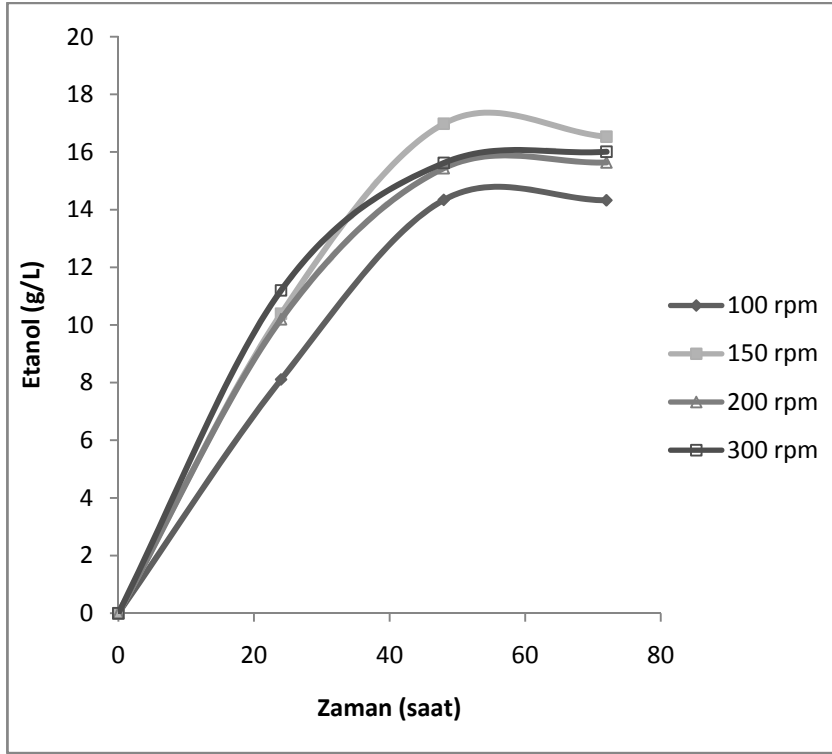
Birim hücre başına üretilen ürün konsantrasyonu 100 rpm’de 2,01 g/g iken 150 rpm’de bu değer % 10,95 arttırılarak 2,23 g/g’a ulaşmıştır ($p<0,05$). Hacimsel verimlilikte olduğu gibi, $Y_{P/X}$ değerleri açısından da 150 ve 200 rpm’de yapılan fermantasyon denemeleri arasında Anova testi sonucuna göre fark bulunmamaktadır; ancak 300 rpm çalkalama hızı birim hücre başına üretilen ürün konsantrasyonunu düşürmüştür (Çizelge 4.6). Buna göre biyoetanol üretiminde çalkalama hızının 150 rpm’e kadar arttırılması, ortam homojenitesi üzerinde olumlu etki göstermektedir. Bu değerlerin üstündeki karıştırma hızlarında ise, sıvıda çözünen oksijen konsantrasyonu arttığından anaerobik metabolizma olumsuz etkilenmektedir (Şekil 4.3). Bu nedenle, *E. coli* KO11’den biyoetanol üretiminde en iyi karıştırma hızı 150 rpm olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada 48. saatin sonunda 16,93 g/L etanol konsantrasyonuna karşın 0,30 g/g verim ve 0,35 g/L/h verimlilikle üretim yapılmıştır. Ingram et al. (1999), 30°C’de (pH 6) ve 150 rpm’de *rE. coli*’den 0,42 g ürün/g glukoz verimle 40 g/L etanol üretmişlerdir. Elde ettikleri $Y_{P/S}$ verim değerinin bu çalışmadan (0,35 g/g) yüksek olması, suşun rejenerasyon yetisinin azalmasıyla açıklanabilir.

Çizelge 4.5 Farklı karıştırma hızlarının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisi. Elde edilen veriler paralel çalışmalara ait sonuçların ortalamasını yansıtmaktadır ($p<0,05$).

Zaman (saat)		0	24	48	72
100 rpm	<i>Etanol (g/L)</i>	0	8,11±0,1	14,34±0,4	14,33±0,5
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,32±0,1	3,11±0,2	7,13±0,1	7,44±0,2
150 rpm	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,39±0,1	16,98±0,2	16,53±0,4
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,34±0,1	3,89±0,3	7,61±0,2	7,86±0,1
200 rpm	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,20±0,5	15,94±0,4	15,98±0,7
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,55±0,4	7,18±0,1	7,66±0,3
300 rpm	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,40±0,3	15,92±0,3	16,01±0,2
	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,27±0,2	7,44±0,4	7,91±0,2

Çizelge 4.6 Farklı karıştırma hızlarının biyoetanol üretim verimliliğine etkisi ($p<0,05$).

Karıştırma Hızı (rpm)	Verim (g/g)		Hacimsel Verimlilik (g/L/h)
	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	
100	0,29	2,01	0,29
150	0,30	2,23	0,35
200	0,29	2,22	0,33
300	0,27	2,14	0,33



Şekil 4.3 Farklı çalkalama hızlarının biyoetanol üretimine etkisi.

4.1.1.4. Başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonunun biyoetanol üretimine etkisi

E. coli KO11 rekombinant suşu çok özel büyüme faktörleri gereksizdir, fruktoz ve glikoz gibi 6 karbonlu basit şekerlerin yanı sıra; ksiloz gibi pentozları ve sakkaroz gibi dimerleri de kullanıp etanol

üretebilmektedir (Dien et al., 2003). Biyoetanol üretimi için en uygun şeker cinsi ve konsantrasyonunun denendiği çalışmada, 35⁰C'de 150 rpm'de çalkalanan çalkalayıcıda glikoz ve fruktoz ile bunların bileşiminden oluşan sakkaroz destekli LB ortamında ayrı ayrı üretim yapılmıştır (pH 6). Başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu 0,33 g kuru hücre/L olacak şekilde inokulum yapılmıştır.

Hacimsel verimlilik değerleri, paralel olarak yürütülen iki erlende ölçüm alınan 48. saatte, o süreye dek üretilen etanol miktarlarına göre ortalama alınarak hesaplanmıştır. Verimlilik üzerinden yapılan Anova testlerinde p değeri $8,8 \times 10^{-7}$ olarak hesaplanmıştır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.7 Farklı başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonlarının biyoetanol üretimine etkisi. Elde edilen veriler paralel çalışmalara ait sonuçların ortalamasını yansıtmaktadır.

Zaman (saat)		0	24	48	72
40 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	7,81±0,3	7,87±0,6	8,10±0,4
Glikoz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	2,11±0,3	6,25±0,4	6,55±0,4
50 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,56±0,2	13,43±0,3	13,68±0,3
Glikoz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,33±0,1	7,34±0,2	7,43±0,2
60 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	10,39±0,1	16,98±0,2	16,53±0,4
Glikoz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,34±0,1	3,89±0,3	7,61±0,2	7,86±0,1
70 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,32±0,4	12,11±0,3	13,22±0,7
Glikoz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,32±0,1	3,74±0,1	7,43±0,4	7,81±0,1
60 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	9,72±0,3	15,71±0,6	15,82±0,4
Fruktoz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,2	3,68±0,2	7,41±0,2	7,55±0,3
70 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	8,92±0,2	11,96±0,3	12,99±0,1
Fruktoz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,34±0,1	3,41±0,4	7,20±0,1	7,43±0,2
40 g/L	<i>Etanol (g/L)</i>	0	7,55±0,4	14,62±0,2	15,24±0,2
Sakkaroz	<i>Biyokütle (g/L)</i>	0,33±0,1	3,01±0,2	6,83±0,1	7,21±0,3

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi farklı şeker cinsi ve konsantrasyonların etanol miktarı ile kuru hücre ağırlığına etkisi önemlidir ($p<0,05$). Glukoz ve fruktoz konsantrasyonunun artması, belli bir yere kadar üretilen hücre ve etanol miktarını destekler (Çizelge 4.7). Underwood (2003), KO11 suşuyla 35⁰C ve 10 rpm’de 90 g/L glukoz kullanarak 39 g/L etanol üretebilmiştir. Ancak Lawford ve Rousseau (1995, 1996) 60 ve 100 g/L glukoz kullandıklarında $Y_{P/S}$ verimini 0,3 g/g olarak hesaplamışlar ve düşük verimin nedenini suşun stabilitesinin çok düşük olmasıyla açıklamışlardır.

Çizelge 4.8 Farklı başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonlarının biyoetanol üretim verimliliğine etkisi. G: Glikoz, F: Fruktoz, S: Sakkaroz ($p<0,05$).

Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	Verim (g/g)		Hacimsel Verimlilik (g/L/h)
	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	
40 G	0,20	1,26	0,16
50 G	0,28	1,83	0,28
60 G	0,30	2,23	0,35
70 G	0,21	1,63	0,25
60 F	0,29	2,12	0,33
70 F	0,21	1,66	0,25
40 S	0,41	2,14	0,30

Üretime 60 g/L glikozla başlandığında üretim verimi 0,30 g ürün/g substrat ve verimliliği 0,35 g/L/h’e ulaşır (Çizelge 4.8). Üretimin 48. saatinde ortamda 4,09 g/L glikoz harcanmadan kalmaktadır; ancak 40 ve 50 g/L şeker konsantrasyonunda başlandığında üretim boyunca hızla artan şeker tüketimine karşın 48. saatte ortamdaki indirgen şeker miktarı sırasıyla 1,3 ve 1,6 g/L’dir (Şekil 4.5) ve düşük şeker konsantrasyonu nedeniyle verim her iki durumda da 60 g/L şeker başlangıcına göre daha düşüktür (Çizelge 4.8).

Fermantasyona 70 g/L glikozla başlandığında, ortamda ilk 48 saatte harcanmayan 13,5 g/L şeker bulunurken (Şekil 4.5), bu noktadaki verim 0,21 g/g ve verimlilik 0,25 g/L/h'tir (Çizelge 4.8).

Glikoz yerine 60 g/L fruktoz kullanıldığında, 48. saatte elde edilen ürün konsantrasyonu 15,71 g/L ve verim 0,29 g/g'dır (Çizelge 4.7 ve 4.8) ve fruktoz konsantrasyonunun 70 g/L'ye çıkması verimliliği 0,33'ten 0,25 g/L/h'e düşürmüştür (Çizelge 4.8). Buna göre, birer monosakkarit olan glikoz ve meyve şekeri fruktoz biyoetanol üretimi için en uygun 60 g/L başlangıç konsantrasyonlarında kullanılmalıdır. Aksi takdirde yüksek şeker konsantrasyonu nedeniyle, üretilen etanol miktarı şeker tarafından represyona uğratılır ve $Y_{P/S}$ verimi düşer.

İstatiksel olarak glikoz ve fruktozun 60 g/L konsantrasyonda verim ve verimlilik açısından önemli fark görülmüştür ($p < 0,05$). Bunun nedeni fruktozun sahip olduğu düşük pentoz fosfat yolu (PPP) aktivitesidir. 70 g/L başlangıç konsantrasyonunda glikoz substrat olarak kullanıldığında 48. saatteki ürün konsantrasyonu % 28,68'lik bir düşüşle 12,11 g/L olmuştur. Benzer olarak, 70 g/L fruktozla yapılan denemede 48. saatteki ürün konsantrasyonu 15,71 g/L'den 11,96 g/L'ye düşmüştür. *E. coli* KO11 kullanılarak tekrarlı kesikli ve sürekli kültür ile daha önceden yapılan çalışmalarda mikroorganizmanın stabilitesini uzun süre koruyamadığı için sürekli sistemle üretime uygun olmadığı; ayrıca *E. coli* KO11 ile yaptıkları çalışmada 50 g/L'den yüksek glukoz konsantrasyonun, şekerin represyon etkisi sonucu ürün oluşumunu baskıladığı belirtilmiştir (Dumsday et al., 1999). Hücre büyümesindeki azalma, 60 g/L'den yüksek glukoz konsantrasyonunun neden olduğu ozmotik basınçla açıklanmaktadır (Qureshi et al., 2006).

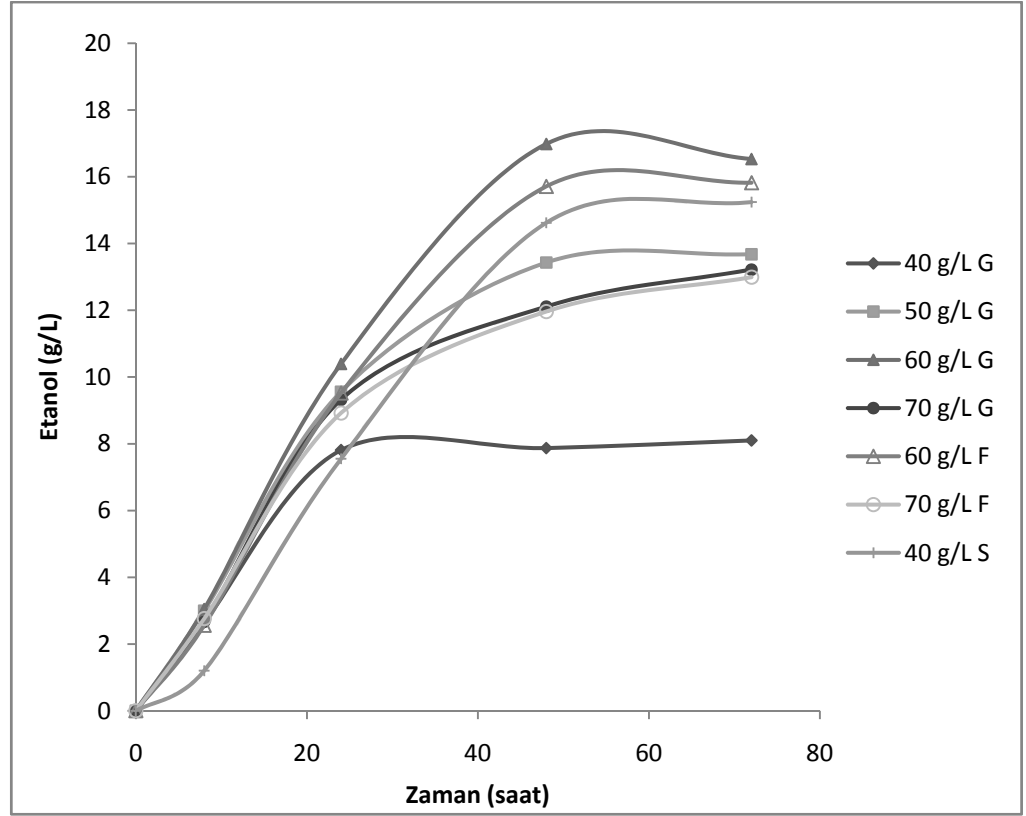
60 g/L glikoz kullanılarak yapılan fermantasyonun 48. saatinde üretilen 7,62 g/L hücreye karşılık gelen $Y_{P/X}$ değeri 2,23 g/g iken; fermantasyona 70 g/L glikozla başlandığında üretilen 7,43 g/L biyokütleyle karşın, birim hücre başına üretilen ürün miktarı 1,63 g'a düşmüştür (Çizelge 4.8). 48. saatte 60 g/L fruktoz destekli LB ortamında üretilen biyokütle miktarı 7,41 g/L iken 70 g/L fruktoz kullanıldığında 7,2 g/L biyokütle üretilmiştir. Buna göre, yüksek glikoz

ve fruktoz konsantrasyonu biyokütle üretiminden çok ürün oluşumuna etki etmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8). 70 g/L şeker konsantrasyonu ile elde edilen $Y_{P/X}$ değeri her iki şeker için de 60 g/L başlangıç şeker konsantrasyonundan daha az olduğundan, yüksek şeker konsantrasyonunda mikroorganizmaların etanolü verimli üretemedikleri sonucuna varılmaktadır. Underwood et al (2002), 100 g/L'den yüksek şeker konsantrasyonunun neden olduğu yüksek ozmotik basınçtan kaynaklanan hasarın tamiri için, KO11 suşunun enerjisini bu etkiyi yok etmeye harcamasıyla ürün veriminde azalmaya dikkat çekmişlerdir. Yapılan çalışmalar osmotik basınca tolere hücrelerin geliştirilmesine yöneliktir (Underwood et al., 2002).

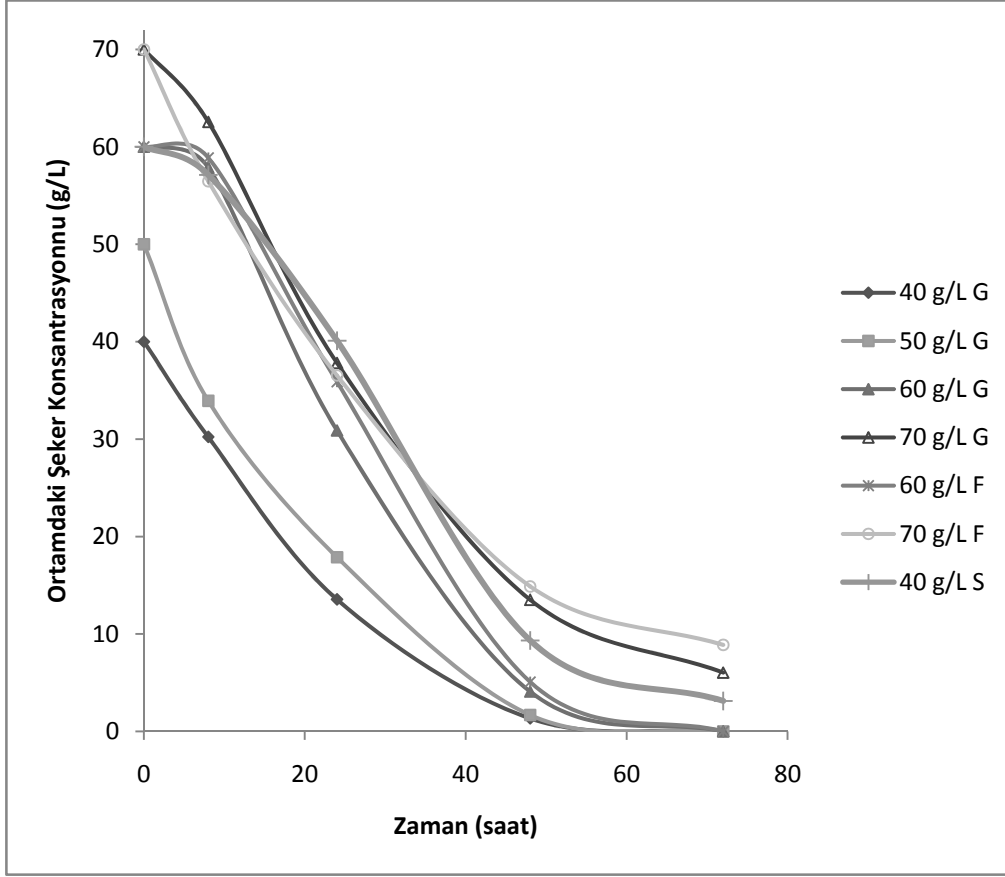
Biyometanol üretimi için karbon kaynağı olarak 40 g/L sakkaroz kullanıldığında 48 saat sonra üretilen hücre konsantrasyonu (6,84 g biyokütle/L), 60 g/L konsantrasyonda glikoz (7,62 g biyokütle/L) ve fruktoz (7,41 g biyokütle/L) kullanılarak üretilen mikroorganizma konsantrasyonundan düşüktür; ancak birim mikroorganizma başına üretilen ürün miktarı 2,14 g/g'dır ve bu değer 60 g/L başlangıç konsantrasyonunda glikozla elde edilen değerlerin % 95,96'sı kadardır (Çizelge 4.8). Ayrıca $Y_{P/X}$ değeri bakımından 60 g/L fruktoz kullanılarak elde edilen verimle, 40 g/L sakkaroz kullanılarak hesaplanan $Y_{P/X}$ verimi istatistiksel olarak farklı değildir ($p>0,05$). Glikozla fruktozun bileşiminden oluşan sakkarozla 40 g/L başlangıç konsantrasyonunda yapılan denemede 48. saatte 0,30 g/L/h verimlilikte 14,62 g/L etanol üretilmişlerdir. Silva et al. (2005) *E. coli* KO11 ile etanol eldesi için yaptıkları çalışmada, 40 g/L sakkaroz destekli LB ortamından 0,81 g/L/h verimlilikle 20,3 g/L etanol üreterek en uygun sakkaroz miktarını 40 g/L olarak belirlemişlerdir.

Anova testi ve elde edilen verilere göre; *E. coli* KO11 suşundan biyometanol üretiminde başlangıç şeker konsantrasyonu önemli bir parametredir ve en yüksek verim ile verimlilik için 35°C'de pH 6'da 150 rpm çalkalama hızında üretime 60 g/L şeker konsantrasyonunda başlanmalıdır (Çizelge 4.8).

Dünyada biyoetanol üretiminde en yüksek paya sahip (toplam % 60'lık pay) sahip 2 ülkeden Amerika glikoz türevli mısır nişastasından; Brezilya ise şeker kamışındaki sakkaroz-glikoz-fruktoz karışımı şekerlerden biyoetanol üretmektedir ve yapılan çalışmalar bu hammaddelere alternatif atıkların kullanılabilirliği üzerine yoğunlaştırılmıştır (Chandel et al., 2007). Ülkemizde meyve suyu sanayi geniş yer tutmaktadır ve açığa çıkan atıkların bir kısmı hayvan yemi olarak kullanılırken bir kısmı işlenmeden atılmaktadır (Halkman et al., 1999). Elde edilen veriler doğrultusunda bu çalışma kapsamında fruktoz ve glikoz gibi şekerlerce zengin agro-endüstriyel atıkların biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabilirlikleri incelenmiştir.



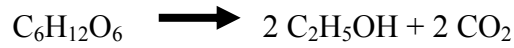
Şekil 4.4 Etanol üretimine farklı şeker cinsi ve başlangıç konsantrasyonlarının etkisi. G: Glikoz, F: Fruktoz, S: Sakkaroz.



Şekil 4.5 Farklı başlangıç şeker cinsi ve konsantrasyonlarında üretim boyunca ortamda kalan şeker konsantrasyonu. Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıdır.

4.1.1.5. Oksijen varlığının biyoetanol üretimine etkisi

Sıcaklık, pH ve karıştırma hızıyla yapılan denemelerde en uygun ortam koşulları için elde edilen hacimsel verimlilik 0,35 g/L/h iken verim 0,30 g ürün/g substrat'tır.



Yukarıdaki genel anaerobik solunum denkleğinden hesaplanarak, KO11 suşuyla glikozdan biyoetanol üretimi için teorik verim % 51 olarak belirlenmiştir (Martinez et al., 1999) ve bu çalışmada denemelerden stekiometrik olarak elde edilen 0,30 g/g $Y_{P/S}$ değerine göre elde edilen toplam verim, teorik verimin % 55,49'u kadardır. Ancak Tao et al. (2001), aynı suşla yaptıkları çalışmada teorik verimin % 94'ü kadar toplam verim elde

etmişlerdir. Buna göre uygun üretim koşullarının belirlenmesinin ardından, hacimsel verimlilik, $Y_{P/S}$ ve toplam verimi arttırabilmek için oksijenin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki 4 düzenek hazırlanmış ve 100 ml'lik LB ortamı içeren 250 ml'lik erlenlerde biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.9 ve 4.10):

1. Gaz giriş-çıkışı sağlayan pamukla kapatılmış erlen (aerobik ortam),
2. İlk 8 saat pamukla kapatılan; ardından tıpa ile gaz girişi engellenmiş erlen (ilk 8 saat aerobik ortam, havalandırmalı),
3. Hava girişi olmaksızın üretim boyunca tıpa kullanılan erlen (yarı anaerobik ortam, havalandırmaz),
4. İnokulasyon öncesi azot beslemesiyle, oksijensiz erlen (anaerobik ortam).

Çizelge 4.9 Oksijen varlığının biyoetanol ve biyokütle üretimine etkisi. Elde edilen veriler paralel çalışmalara ait sonuçların ortalamasını yansıtmaktadır ($p < 0,05$).

Zaman (saat)	Aerobik	İlk 8 saat aerobik	Yarı anaerobik	Anaerobik
	Etanol (g/L)	Etanol (g/L)	Etanol (g/L)	Etanol (g/L)
0	0	0	0	0
8	2,34±0,1	4,01±0,1	3,05±0,1	2,69±0,3
24	6,12±0,4	12,02±0,2	10,39±0,1	9,12±0,3
48	9,11±0,3	17,82±0,6	16,98±0,2	12,15±0,2
72	10,01±0,3	18,01±0,3	16,53±0,4	13,01±0,1

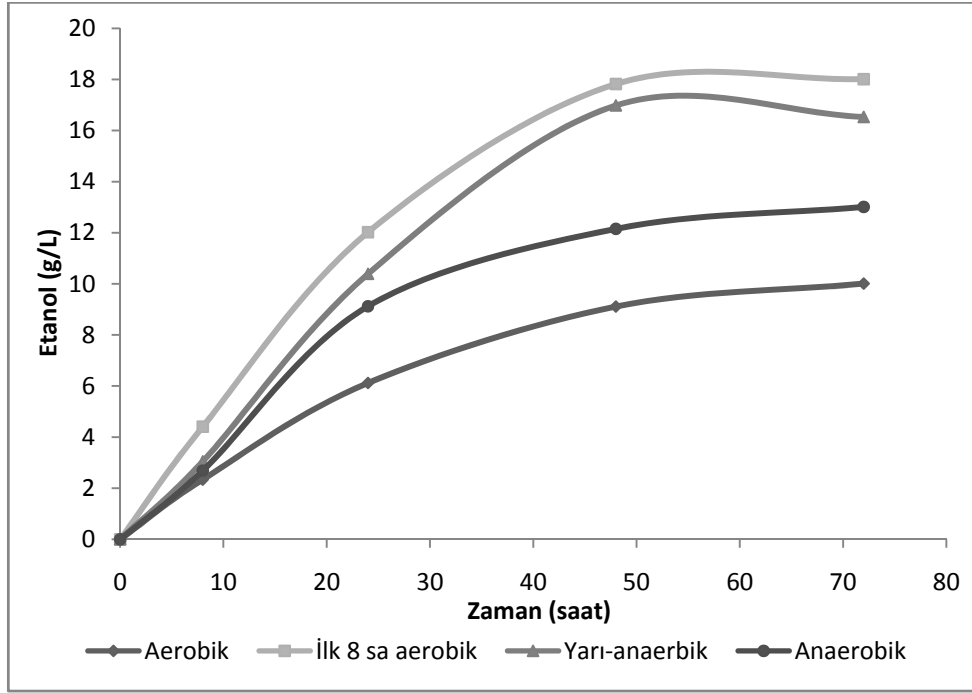
Zaman (saat)	Aerobik	İlk 8 saat aerobik	Yarı anaerobik	Anaerobik
	Biyokütle (g/L)	Biyokütle (g/L)	Biyokütle (g/L)	Biyokütle (g/L)
0	0,33±0,1	0,34±0,1	0,32±0,3	0,33±0,2
8	4,40±0,2	4,25±0,1	3,18±0,1	2,75±0,2
24	7,85±0,7	7,31±0,5	5,63±0,2	4,79±0,2
48	8,69±0,2	8,13±0,3	6,99±0,2	6,67±0,4
72	9,01±0,3	8,55±0,2	7,62±0,4	7,51±0,1

Çizelge 4.10 Oksijen varlığının biyoetanol üretim verimliliğine etkisi ($p<0,05$).

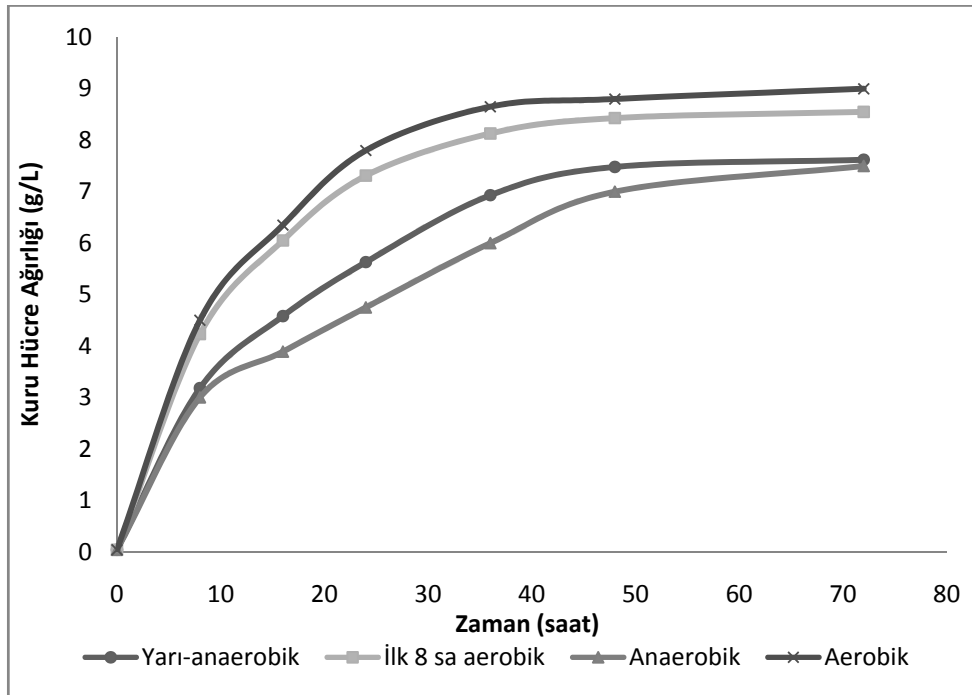
Üretim Ortamı Koşulları	Verim (g/g)		Hacimsel Verimlilik (g/L/h)
	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	
Aerobik ortam	0,20	1,01	0,19
İlk 8 saat aerobik	0,31	2,20	0,37
Yarı anaerobik	0,30	2,23	0,35
Anaerobik ortam	0,23	1,62	0,25

Etanol, net olarak 2 ATP üretilen anaerobik solunum sonucu ortaya çıkar; ancak aerobik koşullarda mikroorganizmalar net olarak 38 ATP ve dolayısıyla daha fazla enerji açığa çıkardıkları için daha hızlı ürerler (Bailey and Ollis, 1986).

Yarı-anaerobik üretimle 0,30 g/g verimle ve 0,35 g/L/h verimlilikle 7,62 g/L biyokütle üretimine karşın $Y_{P/X}$ değeri 2,23 g/g iken; çözülmüş oksijen konsantrasyonunun sıfırlandığı anaerobik ortamda 0,23 g/g verimle 7,5 g/L biyokütle üretilirken, $Y_{P/X}$ değeri 1,62 g/g'e düşmüştür. Bu nedenle başlangıçta sıvıda çözülmüş halde bulunan oksijen varlığının biyoetanol üretimi için büyük öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşın 48 saatlik aerobik üretimle 0,20 g/g verimle ve 0,19 g/L/h verimlilikle üretilen 9 g/l biyokütlenin $Y_{P/X}$ değeri yarı-anaerobik üretime göre 2,23 g/g'dan 1,01 g/g'a düşmüştür.

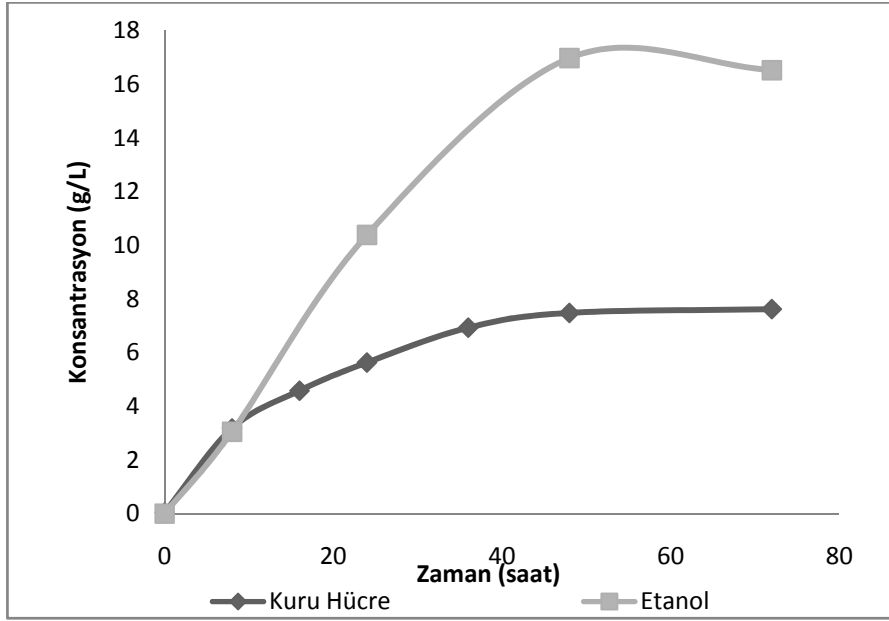


(a)

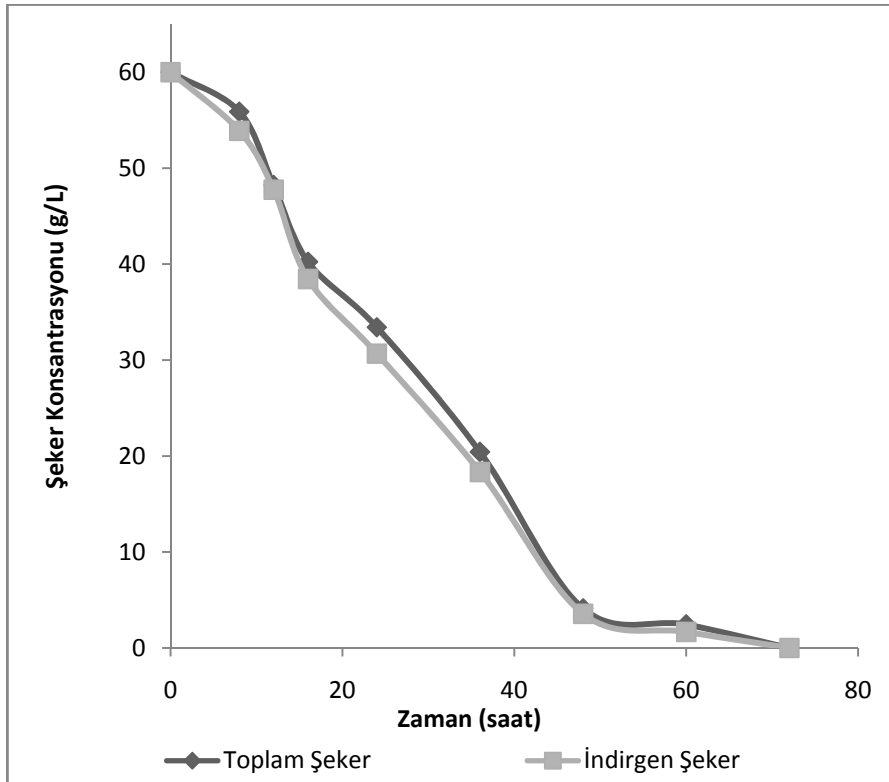


(b)

Şekil 4.6 (a) Oksijenin biyoetanol üretimine ve (b) kuru hücre ağırlığına etkisi. Değerler paralel 2 çalışmanın ortalamasını yansıtmaktadır ($p < 0,05$).



(a)



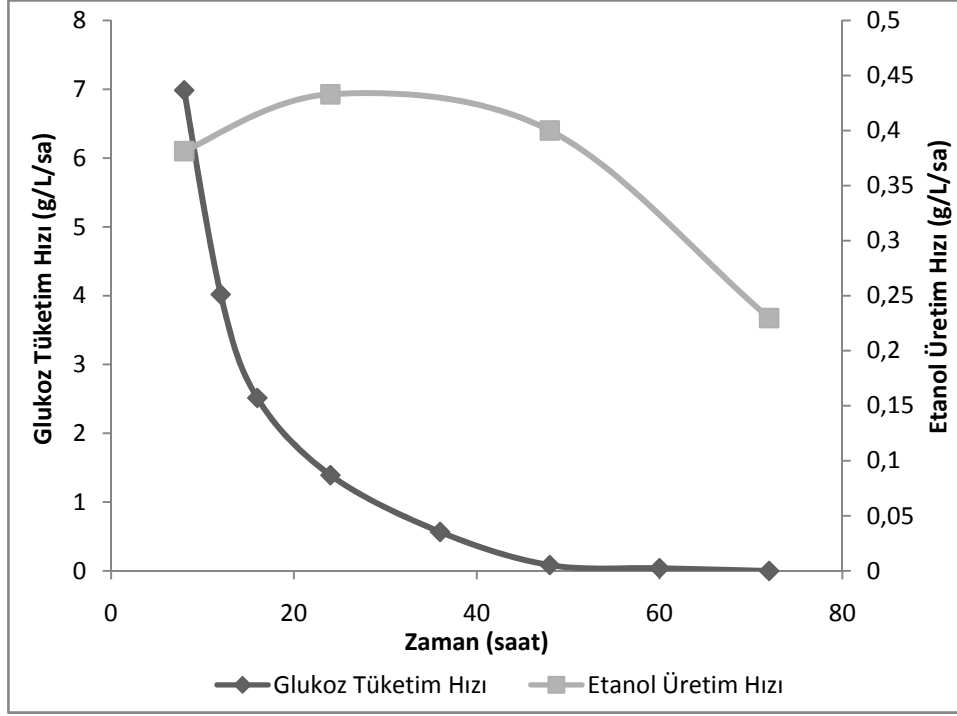
(b)

Şekil 4. 7 (a) Belirlenen en uygun koşullarda (60 g/L glukoz destekli LB içeren 35°C’de, pH 6’da ve 150 rpm’de havalandırmasız erlen) üretilen mikroorganizma ve etanol miktarları, (b) toplam ve indirgen şeker konsantrasyonu. Değerler herhangi bir anda 2 paralel üretimden alınan verilerin ortalamasıdır.

Bu çalışmada hedef; ilk 8 saat hava beslemesiyle biyokütle üretimi sağlayarak, yeterli mikroorganizma sayısına ulaşıldıktan sonra metabolizmayı anaerobik yöne çevirerek etanol üretimini arttırmaktır. İlk 8 saat pamuk yüzeyinden alınan hava ile üretim verimi 0,30 g/g'dan 0,31 g/g'a arttırılabilmektedir (Çizelge 4.10) ve birim mikroorganizma başına üretilen etanol konsantrasyonu da 2,20 g/g'dır. Ancak yarı-anaerobik ve ilk 8 saat hava beslemeli aerobik üretimin verimlilik değerleri istatistiksel açıdan birbirine benzerdir ($p>0,05$). Bu nedenle oksijenin önemini daha iyi gösterebilmek için biyoreaktörlerde kontrollü olarak deneme yapılmıştır (Bölüm 4.3.3.).

250 ml'lik tıpalı erlenlerde yapılan denemelerde en yüksek verim (0,30 g/g) ve verimliliğe (0,35 g/L/h) sahip en uygun koşullara (35°C, pH 6, 150 rpm çalkalama, 60 g/L glikoz başlangıç konsantrasyonu) ait sonuçlar Şekil 4.7 ve 4.8'de özetlenmiştir.

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi etanol konsantrasyonu 48. saatin sonunda 16,93 g/L'ye ulaşırken üretim ortamında kalan şeker konsantrasyonu 4,09 g/L kadardır. İlk 48 saatte üretim boyunca 55,91 g/L şeker kullanılarak 0,30 g/g verim ve 0,35 g/L/h verimlilikle biyoetanol üretilirken, son hücre konsantrasyonu 7,62 g/L'ye ulaşmıştır. 0-24 saatleri arasında ortamdaki şekerin % 48,88'i tüketilmektedir ve 24. saatin sonunda ürün üretim hızı 0,42 g/L/h'lik maksimum değerine ulaşmıştır (Şekil 4.8). 24-48 saat arasında ise etanol konsantrasyonu 10,39 g/L'den 16,98 g/L'ye çıkarken; etanol üretim hızı 0,4 g/L/h kadardır. 48. saatten sonra, mikroorganizmaların logaritmik fazın sonuna yaklaşmaları sonucu, substrat kullanım hızının düşmesine bağlı olarak ürün üretim hızı düşmüştür. Bu nedenle verimlilik değerini arttırmak için reaktör denemeleri 48 saat sürdürülmüştür.



Şekil 4.8 Belirlenen en uygun koşullarda (60 g/L glukoz destekli LB içeren 35°C’de, pH 6’da ve 150 rpm’de havalandırmasız erlen) yapılan biyoetanol üretiminde etanol üretim ve glikoz tüketim hızı. Değerler herhangi bir anda 2 paralel üretimden alınan verilerin ortalamasıdır.

4.2. Glikoz Destekli LB Ortamıyla Reaktör Denemeleri

4.2.1. Havalandırmasız kesikli sistem

Erlenlerde yapılan karıştırma orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir ve bu karıştırma akış dinamiği, kütle ve ısı transferi gibi faktörler nedeniyle reaktörlerde içerden yapılan karıştırmadan farklıdır. Çalkalayıcılarda karıştırma yığınlar halinde olduğu için ölü bölgelerin varlığı üretim verimini düşürebilir. Ancak kullanım kolaylığı, aynı anda birden fazla parametrenin denenebilmesi gibi nedenlerle uygun koşulların belirlenmesinde çalkalayıcıda karıştırılan erlenler kullanılır (Marques et al., 2009).

Erlenlerden 5 L’lik reaktöre ölçek büyütürken “benzer karışma süresi” ilkesi temel alınmıştır. 60 g/L glikoz destekli LB ortamının fiziksel özellikleri aynı sıcaklıktaki suyunkine eşit olarak kabul edilmiştir. Çalkalama hızı 150

rpm (N, s^{-1}), $35^{\circ}C$ 'deki kinematik viskozitesi (ν) $0,72 \times 10^{-6} m^2/s$ ve maksimum iç çapı 0,08 cm (D) olan bir erlende üretimin akış özelliklerini belirten Reynolds sayısı (Re) Denklem 4.1 ile hesaplanır (Peter et al., 2006);

$$Re = \frac{N \times D^2}{\nu}$$

Denklem 4.1

$$Re = 22222,2$$

Reynolds sayısı birimsizdir ve sıvının akım düzeni hakkında bilgi verir. $Re > 10^5$ olduğu için erlen denemelerinde akım tam türbülanstır (Bailey and Ollis, 1986).

150 rpm çalkalama hızında 100 ml'lik glikoz destekli LB ortamı içeren 250 ml'lik erlendeki karıştırma süresi 17 ± 1 s'dir. Reaktörde aynı karışma süresine (t_m) sahip rpm belirlemesi için çalışılan deneme sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir (Bkz 3.2.5.8). 120, 180, 210, 240 ve 270 rpm karıştırma hızlarında karışma süreleri, erlendeki karışma süresinden önemli derecede farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak biyoreaktörde 150 rpm'de elde edilen karışma süresi, erlende 150 rpm'lik çalkalamaya elde edilene istatistiksel olarak benzerdir ($p > 0,05$).

Çizelge 4.11 5 L'lik kesikli biyoreaktörde çeşitli karıştırma hızlarında belirlenen karıştırma zamanları. Çizelgedeki değerler yapılan 2 ölçümün ortalamasıdır ($p < 0,05$).

	120 rpm	150 rpm	180 rpm	210 rpm	240 rpm	270 rpm
t_m (s)	23 ± 1	15 ± 2	13 ± 1	10 ± 1	8 ± 1	6 ± 2

Bıçak çapı 6 cm (D_i), 35°C'deki sıvı viskozitesi (μ) $0,72 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ve yoğunluğu (ρ) 994 kg.m^{-3} (Çengel vd., 2003) olan ve 150 rpm'de (N_i) karıştırılan bir biyoreaktördeki Re sayısı (Re_i);

$$Re_i = \frac{N_i \times \rho \times D_i^2}{\mu}$$

Denklem 4.2

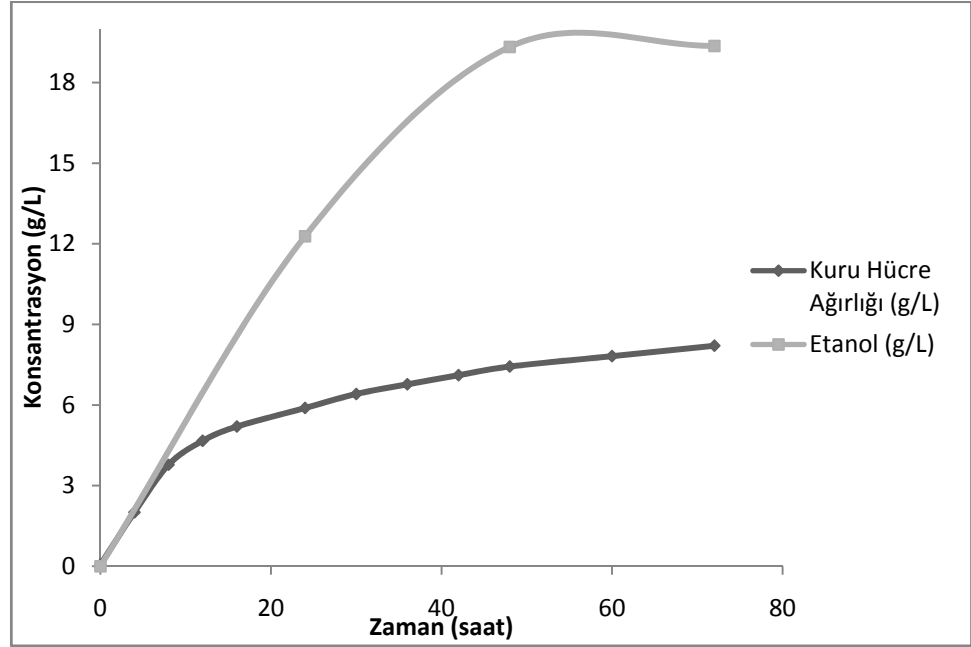
$$Re_i = 12425$$

$Re_i > 10^4$ olduğu için, erlende olduğu gibi biyoreaktörde de tam türbülans bölgesinde çalışılmaktadır. Ayrıca elde edilen t_m süreleri de istatistiksel olarak eşit bulunduğu için glikozla yapılan biyoreaktör denemeleri 150 rpm hızda gerçekleştirilmiştir.

Buna göre 5 L'lik "Sartorius A plus" havalandırmaz biyoreaktörde 35°C'de (pH 6) 150 rpm karıştırma kullanılarak; 60 g/L glikoz içeren 2 L'lik LB ortamında kesikli biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Buna göre 72 saatlik üretim boyunca elde edilen veriler Çizelge 4.12 ve Şekil 4.9'de görülmektedir. Aynı koşullarda gerçekleştirilen erlen denemelerinde 48 saatte üretilen etanol konsantrasyonunun (16,93 g etanol/L) biyoreaktör denemelerinden (19,32 g etanol/L) daha düşük olmasının temel nedeni, biyoreaktörlerde istenen koşulların daha kontrollü bir şekilde sağlanabilmesidir. Çok düşük cevap süresince değişen sıcaklık ve pH'nın düzenlenebilmesinin yanı sıra; içerden engelli karıştırma da erlenlerde oluşan ölü bölge riskini ortadan kaldırdığı için reaktörlerde $Y_{p/s}$ verimi 0,30 g/g'dan 0,34 g/g'a arttırılmıştır. Moniruzzaman et al. (1998) KO11 suşundan 350 ml çalışma hacimli 500 ml'lik tıpalı erlenlerde (yarı-anaerobik) 35 g/L etanol (0,39 g etanol/g glukoz) üretebilirken; Ingram et al. (2001) 1 L çalışma hacimli yarı-anaerobik biyoreaktörde aynı suştan son ürün konsantrasyonunu 41 g/L etanole (0,46 g etanol/g glukoz) yükseltebilmişlerdir.

Çizelge 4.12 5L'lik havalandırmaz biyoreaktörde *rE. coli*'den etanol üretimi. Değerler herhangi bir anda 2 paralel üretimden alınan verilerin ortalamasıdır.

Zaman	Etanol (g/L)
0	0
24	12,28±0,3
48	19,32±0,1
72	19,36±0,3



Şekil 4.9 5L'lik havalandırmaz biyoreaktörde elde edilen kuru hücre ağırlığı ve etanol üretimi. Değerler herhangi bir anda 2 paralel üretimden alınan verilerin ortalamasıdır.

35⁰C ve 150 rpm karıştırma hızında (pH 6) 48 saatte havalandırmaz (yarı anaerobik) erlende harcanan 55,91 g/L glikoza karşın; aynı koşullarda reaktörde 56,04 g/L glikoza tüketilmiştir. Buna göre harcanan şekerle daha yüksek verimde etanol üretilerek, biyodönüşüm verimi arttırılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen toplam verim teorik verimin % 63,14'ü kadardır. *E. coli* KO11 ile maksimum toplam verimde (teorik verimin %95-100'ü kadar) biyoetanol üretebilen pek çok çalışma mevcuttur (Underwood et al., 2002; Ingram et al., 2001). Yapılan çalışmalarla, bu çalışma sonucu elde edilen verimler arasındaki fark, KO11 suşunun düşük stabilitesiyle açıklanabilir. Bunun yanı sıra rekombinant suşun stabilitesinin sağlanamadığı durumlar da olmuştur. Dumsday et al. (1999) glukoz içerikli ortamda *E. coli* KO11'in etanol üretebilirliğinin zamanla azaldığını belirtmişler, durumun yüksek metabolit birikiminden (asetat gibi) kaynaklandığını ekleyen araştırmacılar, mekanizmanın geri-dönüşümsüz olmasına dikkat çekerek genetik instabilitenin verimi negatif yönde etkilediğini vurgulamışlardır.

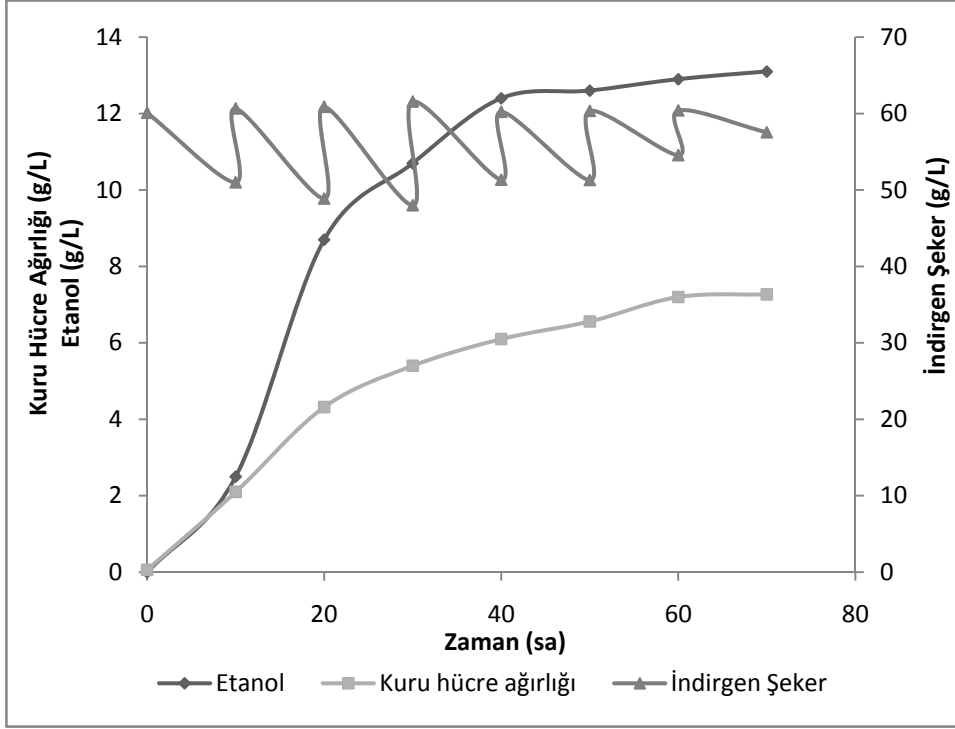
E. coli KO11'den biyoetanol üretiminde verimi arttırabilmek için biyoreaktörlerde kesikli beslemeli üretim ve havalandırılmalı üretim denenmiştir.

4.2.2. Havalandırmasız kesikli beslemeli sistem

Erlen denemelerinde kesikli üretimde 60 g/L glikoz konsantrasyonundan daha yüksek şeker kullanıldığında ürün veriminin 0,30 g/g'dan 0,21 g/g'a düştüğü gözlemlenmiştir (Çizelge 4.8). Ancak 70 g/L glikoz konsantrasyonuyla üretilen 7,43 g/L biyokütleden elde edilen ürün konsantrasyonu 12,11 g/L'dir. Bu inhibisyon etkisi, rekombinant organizmalarda değiştirilen metabolik yolağın etkisiyle substratın kullanılabilirliğinin kısıtlanmasıyla ve yüksek ozmotik basıncın ürün oluşumu üzerine negatif etkisiyle açıklanabilmektedir. Büyüme hızının düşmesi gibi istenmeyen bu değişimler; hücre içi metabolit havuzundaki değişimler, metabolik dengesizlik ve ATP eksikliğinden kaynaklanabilmektedir (Underwood et al., 2002).

Şekil 4.7b ve 4.8'de görüldüğü gibi 24. saatin sonunda ortamdaki şeker miktarının yarılanmasıyla etanol üretim hızı düşmektedir. Bu nedenle yüksek şeker konsantrasyonunun neden olduğu glikozun inhibisyon etkisinin azaltılması için 5 L'lik (2 L çalışma hacminde) reaktörde kesikli beslemeli

Üretim yapılmıştır. 60 g/L konsantrasyonda glikozdan başlanarak her 10 saatte bir kullanılan indirgen şeker kadar glikoz eklemesi yapılmıştır (sabit şeker konsantrasyonuyla kesikli beslemeli retim). Beslenen şeker 80 g/100 ml'lik konsantre şeker çözeltisidir ve dolayısıyla üretim hacminin değişmediği varsayılabilir. 70 saatlik üretim boyunca toplam 61,56 g/L indirgen şeker kullanılmıştır. 48. saatin sonunda kesikli beslemeli üretimle elde edilen etanol konsantrasyonu (12,6 g/L; 0,24 g ürün/g substrat, 0,26 g/L/h), kesikli modla elde edilene (19,32 g/L; 0,34 g ürün/g substrat, 0,4 g/L/h) göre daha düşük çıkmıştır (şekil 4.10). Kesikli üretimle mikroorganizma 40-48. saatin sonuna doğru sekonder faza geçerken (şekil 4.9); kesikli beslemeli üretimde log fazın süresi uzatılarak 60. saate çekilebilmiştir (şekil 4.10). Ancak bu noktadaki ürün konsantrasyonu 12,91 g/L'dir ve verimlilik değeri kesikli üretime göre % 53,78 azalarak 0,22'ye dşmştir. Kesikli beslemeli sistemle istenen verimin sağlanamaması, artan ürün ve biyokütle konsantrasyonundan kaynaklanan birikime bağlanmaktadır. Buna göre, hücre içi ve ortamdaki etanol konsantrasyonu yeni ürün üretimini kısıtlamaktadır (Lin and Tanaka, 2006) ve bu negatif etki üretim hacminin değişmediği bir kesikli beslemeli sistemle önlenememiştir. Bu nedenle etanolün sistemden on-line uzaklaştırılabileceği sürekli bir pervaporasyon sistemine geçiş için kesikli pervaporasyon denemeleri yapılmıştır. *E. coli* KO11 suşuyla kesikli beslemeli bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 4.10 5 L'lik reaktörde havalandırmasız kesikli beslemeli biyoetanol ve biyokütle üretimi. Değerler herhangi bir anda 2 paralel üretimden alınan verilerin ortalamasıdır.

4.2.3. Havalandırılmalı kesikli sistem

4.2.3.1. Havalandırma hızının belirlenmesi

Erlen denemelerinde havalandırmasız üretimle 0,35 g/L/h verimliliğe karşın, kontrolsüz olarak ilk 8 saat gaz girişi sağlanan üretimle 0,37 g/L/h verimliliğe ulaşılmıştır. Ancak iki sistem arasında verimlilik açısından fark görülmemiştir ($p>0,05$). Reaktörde daha kontrollü hava beslemesi sağlanarak verimliliğin belirgin olarak artırılması için öncelikle beslenecek havanın süresi ve miktarının belirlenmesi gerekmektedir. 2 L çalışma hacimli 5 L'lik Sartorius biyoreaktörde çeşitli miktar ve zamanlarda hava beslenerek üretim verimindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla ilk 8 saatte farklı oksijen transfer hızlarında (OTR) oksijen beslenerek en iyi verimliliği sağlayan OTR ve $k_L a$ değerleri bulunmuştur. Hava besleme süresinin 8 saat olmasının nedeni, bu saat sonundaki spesifik büyüme hızının kullanılan rekombinant

mikroorganizma için maksimum spesifik büyüme hızında olmasıdır (Çizelge 4.15). Denemeler önceden belirlenen üretim koşullarında (35⁰C, pH 6, 150 rpm 60 g/L glikoz destekli LB ortamı) sadece havalandırma hızı değiştirilerek yapılmıştır.

Oksijen transfer hızının hesaplanması için yatışkın olmayan hal metodu kullanılmıştır. Havalandırmasız sistemde OTR değeri karıştırma hızındaki değişimle hesaplanmış ve 0,01 mmol/L/h olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.12). 150 rpm ve 0,07 L/dak (0,035 vvm) havalandırmalı bir sistemde OTR hesaplaması için elde edilen değerler ve hesaplamalar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 4.13 Yatışkın olmayan hal metoduyla OTR ve $k_L a$ hesabı için çözülmüş oksijen konsantrasyonu.

Karıştırma: 150 rpm			
Havalandırma: 0,07 L/dak			
Zaman (dak)	% DO	CL (=CL*.*%DO)	ln (CL*-CL)
0,0	3,7	0,25	1,86
0,5	5,2	0,35	1,84
1,0	13,6	0,91	1,75
1,5	30,4	2,03	1,54
2,0	47,4	3,16	1,26
2,5	55,7	3,72	1,08
3,0	63,5	4,24	0,89
3,5	68,4	4,56	0,75
4,0	72,8	4,86	0,59
4,5	78,5	5,24	0,36
5,0	83,6	5,58	0,09
5,5	88,0	5,87	-0,22
6,0	90,1	6,01	-0,42
6,5	92,0	6,14	-0,63
7	92,1	6,14	-0,64

$$OTR \text{ (mg O}_2\text{/L/dak)} = [k_L a \text{ (dak}^{-1}\text{)}] * \ln[(C_L^* - C_L) \text{ (mg O}_2\text{/L)}]$$

Denklem 4.3

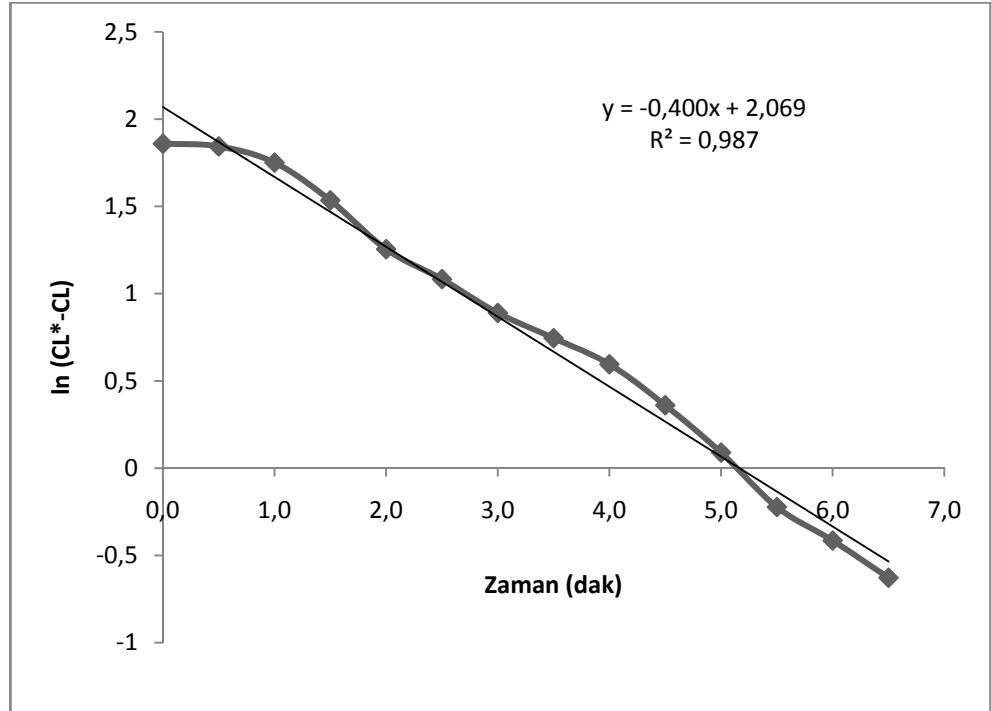
35⁰C ve 1 atm basınçta (gase basınç ihmal edildiğinde), 5 g/L tuz içeren sıvının maksimum oksijen çözünürlüğü (C_L^*) 6,67 mg O₂/L'tır (Bailey and Ollis, 1986). Çizelge 4.13'teki $\ln(C_L^* - C_L)$ değerlerinin zamana göre grafiği çizilirse (Şekil 4.11) grafiğin linear kısmının eğimi $k_L a$ 'yı verir ve bu değer 0,4 dak⁻¹ olarak bulunmuştur.

$$OTR_{max} = k_L \times a \times C_L^*$$

Denklem 4.4

olduğuna göre OTR_{max} değeri 2,67 mg O₂/L/dak (= 5 mmol O₂/L/h)'dir.

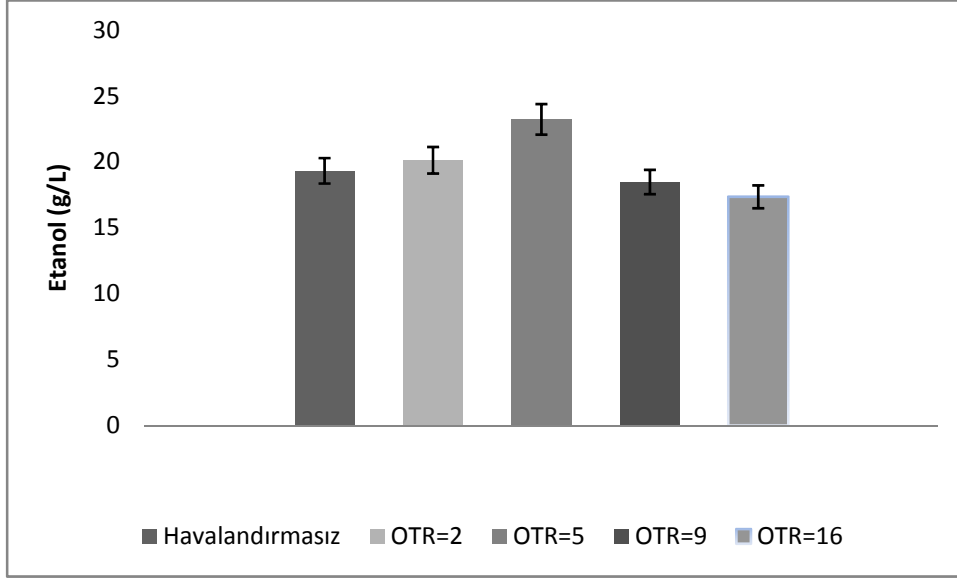
Diğer koşullar sabitken (sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu, karıştırma hızı vb.) sadece ilk 8 saat beslenen hava debisi değiştirilerek 2, 5, 9 ve 16 mmol O₂/L/h OTR değerleriyle etanol üretimi yapılmıştır. En iyi sonuç Çizelge 4.14'te de görüldüğü gibi oksijen transfer hızının 5 mmol O₂/L/h, $k_L a$ 'nın ise 0,4 dak⁻¹ ve besleme debisinin 70 ml/dak (0,035 L/L/dak) olduğu durumda alınmıştır. Bu denemede üretim boyunca reaktör içi sabit bir oksijen konsantrasyonu (% 4) ile (Şekil 4.16c) yüksek ürün konsantrasyonu (23,22 g/L) sağlanabilmiştir. Çizelge 4.14 ve Şekil 4.12'de açıkça görüldüğü gibi beslenen hava debisi arttıkça, oksijenli solunum sonucu izlenen metabolik yolak değiştirilmekte ve etanol verimi azalmaktadır.



Şekil 4.11 Yatışkın olmayan hal metoduyla 0,035 vvm hava beslemesi için $k_L a$ hesabı.

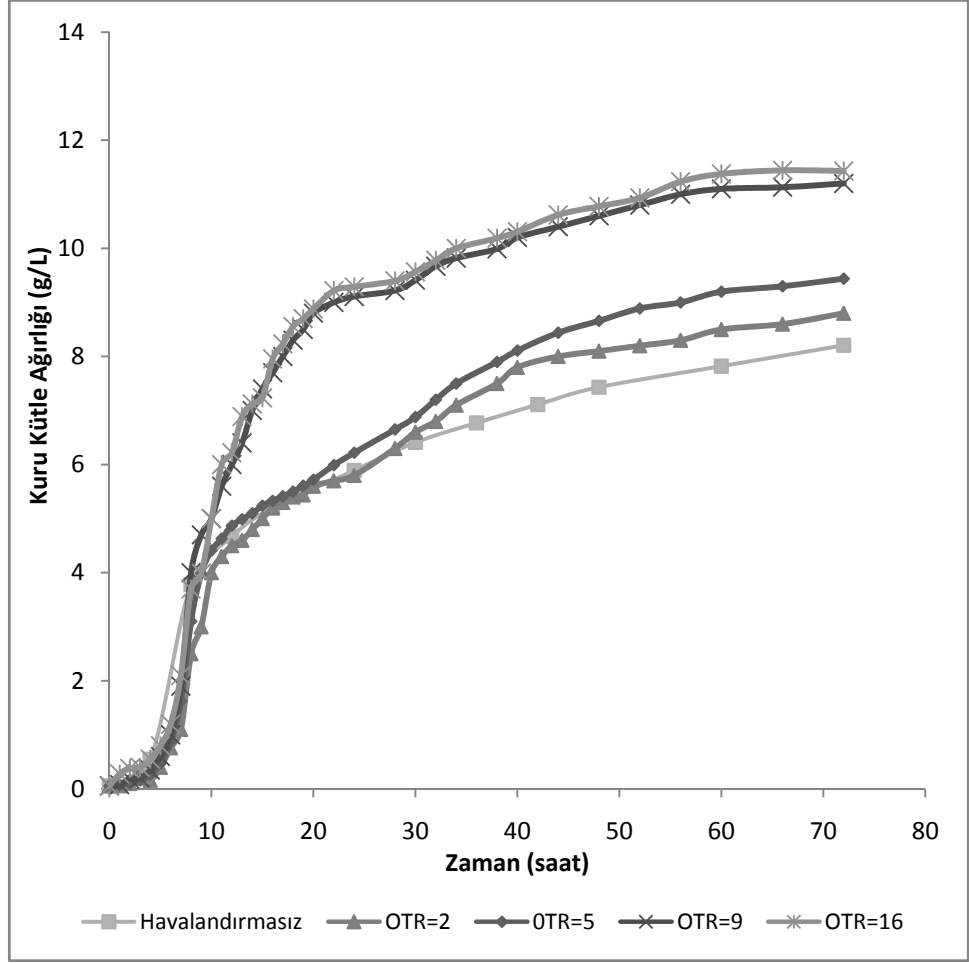
Çizelge 4.14 Yatışkın olmayan hal metoduyla hesaplanan oksijen transfer hızlarıyla (OTR) 48 saatte üretilen etanol konsantrasyonları. Sonuçlar aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasını yansıtmaktadır.

OTR (mmol O ₂ /L/h)	Havalandırma hızı (vvm)	Etanol (g/L)
0,01	0	19,32±0,1
2	0,020	20,12±0,3
5	0,035	23,22±0,1
9	0,047	18,47±0,2
16	0,062	17,35±0,4



Şekil 4.12 Çeşitli havalandırma hızlarının etanol üretimine etkisi. Sonuçlar aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasını standart sapmalarıyla birlikte yansıtmaktadır.

rE. coli KO11 ile etanol üreten Ingram et al. (1999) kompleks ortamlarda; mikroorganizmanın transport, regülasyon, enerji tüketimi, yapısal düzenlemeler gibi ihtiyaçlarını karşılamada glikozu kullanırken, havalandırmaz ortamda kazandıkları düşük enerjilerinden dolayı fermantasyon hızının yavaşladığı ve üretim veriminin azaldığını belirtmişlerdir. Öte yandan etanol üreticisi KO11 suşunun biyodönüşüm verimini arttırmak için Okuda et al. (2007) mikrohavalandırma koşullarının etkisini göstermiştir. Çalışmalarında 4 mmol O₂/L/h havalandırma varlığında pentoz fosfat yolağına geçen mikroorganizmanın ksiloz tüketim hızını ve ürün verimini % 25 arttırmayı başarmışlardır.

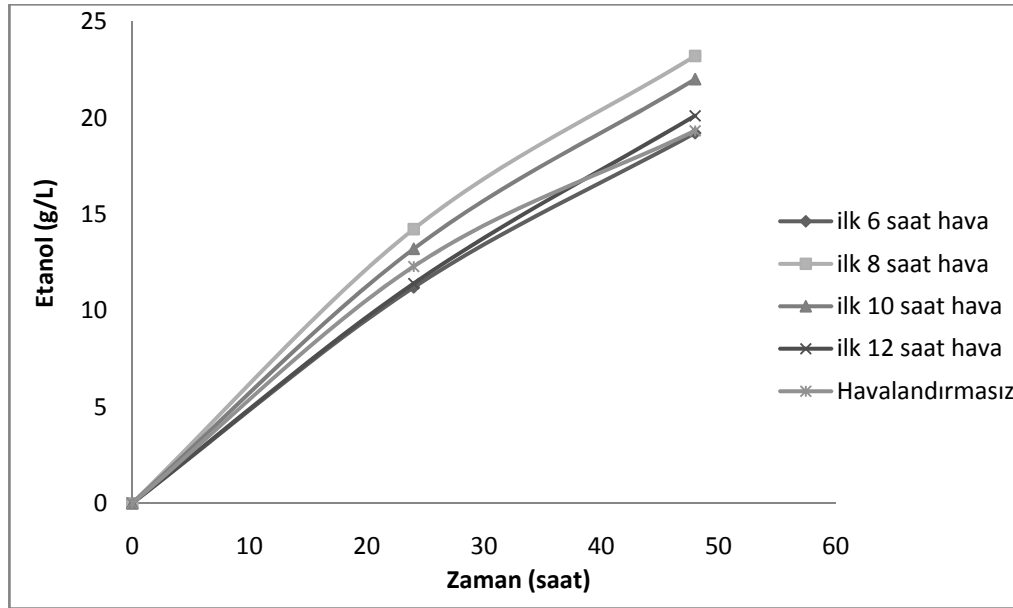


Şekil 4.13 Çeşitli havalandırma hızlarında *rE. coli* için kuru kütle ağırlığı. Sonuçlar aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasını yansıtmaktadır.

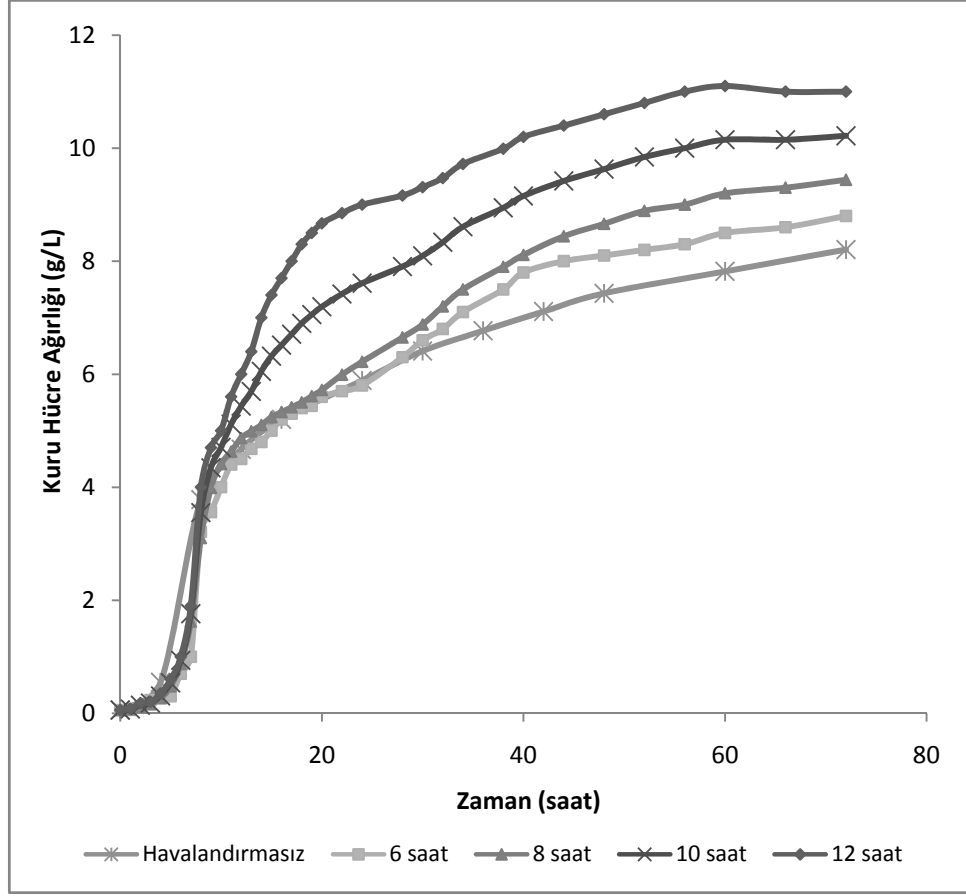
Uygun havalandırma hızının denendiği çalışmada veriler arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0,05$) ve maksimum etanol konsantrasyonu ile sonuçlanan 5 mmol $O_2/L/h$ oksijen transfer hızına sahip denemede 48 saatlik üretim sonunda ulaşılan verim (0,39 g/g); havalandırmasız reaktörde hesaplanan verimden (0,34 g/g) daha yüksektir (Çizelge 4.16, $p < 0,05$). Okuda et al. (2007) oksijen transfer hızının etanol üretimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, KO11 suşundan etanol üretimi için 90 g/L ksiloz içeren LB ortamında 4 mmol $O_2/L/h$ oksijen transfer hızında 0,47 g/g verimle ürün elde etmişlerdir.

4.2.3.2. Havalandırma süresinin belirlenmesi

Bir önceki denemede reaktöre ilk 8 saatte verilecek en uygun hava akış hızı 0,035 vvm ve OTR= 5 mmol O₂/L/h olarak bulunmuştur. Hava beslemesinin ilk 8 saatte verilmeye başlatılmasının temel sebebi *rE. coli*'nin 8. saat sonunda maksimum spesifik büyüme hızında (0,65 h⁻¹) olmasındadır (Çizelge 4.15). Ancak havalandırma süresinin etanol verimine etkisini belirleyebilmek için ilk 6, 8, 10 ve 12 saatte aynı besleme hızında hava verilerek dört ayrı reaktör denemesi yapılmış ve 48. saatte ürettikleri biyoetanol konsantrasyonları kaydedilmiştir. Şekil 4.14'te de görüldüğü gibi, ilk 8 saat hava beslemeli biyoetanol üretimi sonucu elde edilen etanol konsantrasyonu en yüksektir (23,22 g/L). Hava beslemesinin süresi azaldıkça verimlilik üzerindeki etkisi de az olurken; uzadıkça mikroorganizmanın anaerobik yolla etanol üretimleri azalmaktadır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Üretimin başında çeşitli sürelerce beslenen 0,035 vvm havanın etanol üretimine etkisinin havalandırmazsız üretimle kıyaslanması. Sonuçlar aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasını yansıtmaktadır.



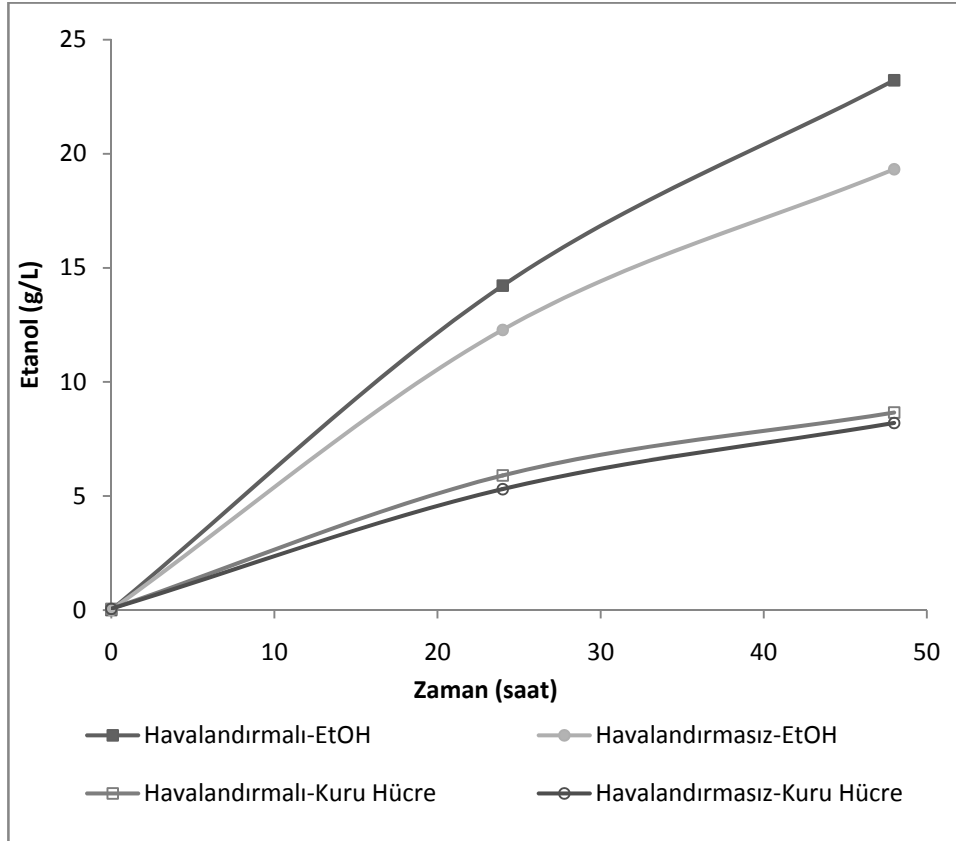
Şekil 4.15 5 mmol O₂/L/h hava ile farklı havalandırma sürelerinde *rE. coli* için kuru kütle ağırlığı. Sonuçlar aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasını yansıtmaktadır.

Uygun havalandırma süresinin belirlenmesi için yapılan her denemede; mikroorganizma verilen hava süresinden bağımsız olarak ilk 8 saatte maksimum spesifik büyüme hızlarına (μ_{max}) ulaşmıştır. İlk 12, 10, 8 ve 6 saat 0,035 vvm hava debisinde yapılan üretimle elde edilen μ_{max} değerleri sırasıyla; 0.79, 0.65, 0.63 ve 0.63'tür (Çizelge 4.15). *rE.coli* KO11 ilk 8 saatte hızla büyümekte, ardından büyüme hızı azalmaktadır (Şekil 4.15). Birim mikroorganizma başına üretilen biyoetanol miktarları ise; 12 saatlik besleme için 1.75, 10 saatlik besleme için 2.15, 8 saatlik besleme için 2.55, 6 saatlik besleme için 2.18 g/g'dır. Hava besleme süresi uzadıkça artan mikroorganizma sayısına karşın, etanol konsantrasyonu düşmektedir (Şekil 4.15). 8. saate kadar reaktöre verilen hava birim mikroorganizma başına üretilen biyoetanol konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Bu nedenle reaktörde agro-

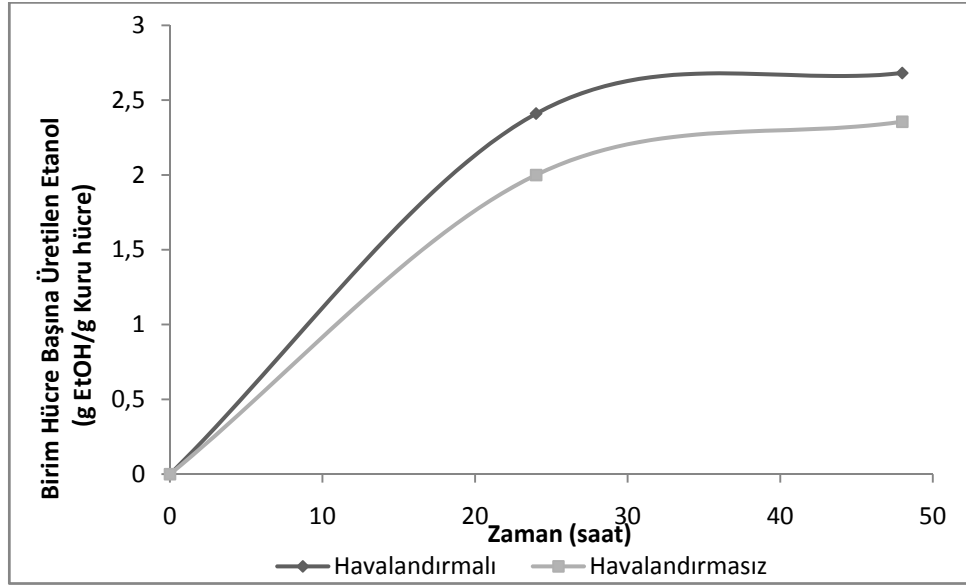
endüstriyel atık denemelerinde ilk 8 saat 5 mmol O₂/L/h hava beslemesi yapılmıştır.

Çizelge 4.15 5 mmol O₂/L/h ile farklı havalandırma sürelerinde *rE. coli* için spesifik büyüme hızı ve 48. saatteki Y_{P/X} verimleri.

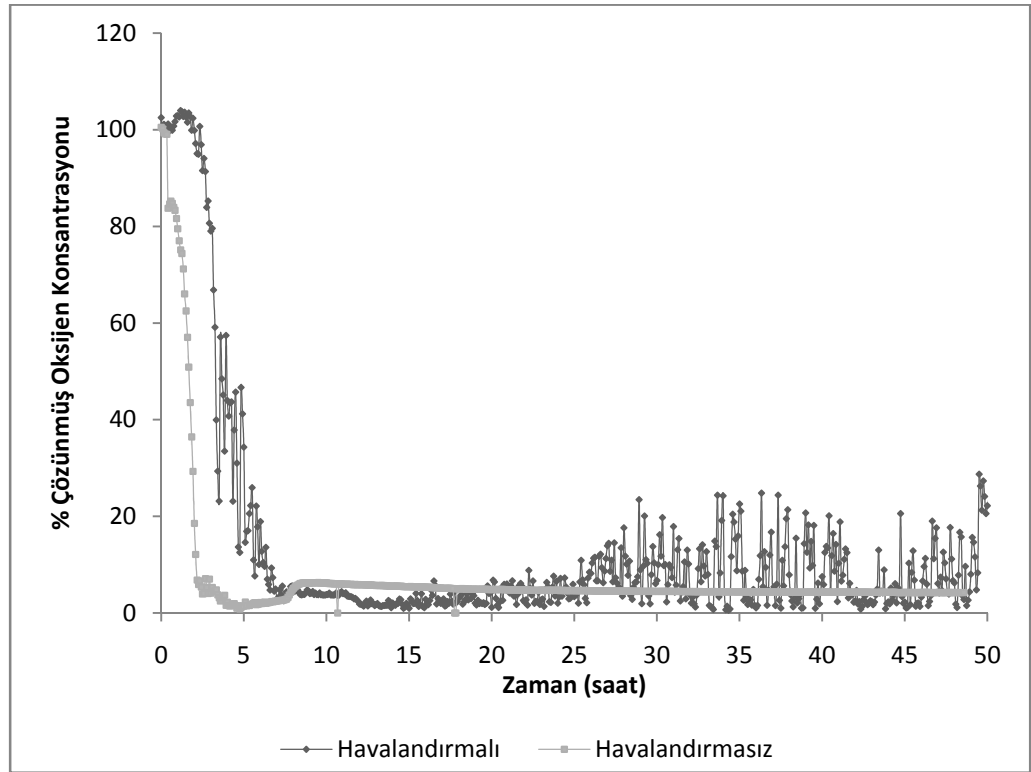
Zaman (saat)	İlk 6 saat		İlk 8 saat		İlk 10 saat		İlk 12 saat	
	$\mu_{\max}$	Y _{P/X}	$\mu_{\max}$	Y _{P/X}	$\mu_{\max}$	Y _{P/X}	$\mu_{\max}$	Y _{P/X}
6	0,61	2,18	0,60	2,55	0,61	2,15	0,64	1,75
8	0,63		0,65		0,65		0,79	
10	0,11		0,10		0,13		0,19	
12	0,04		0,05		0,05		0,06	



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.16 Biyoreaktörde ilk 8 saat hava beslemesi (havalandırmalı) ile yarı-anaerobik (havalandırmasız) koşulların (a) biyoetanol üretimine ve (b) birim mikroorganizma başına üretilen etanol miktarına etkisi (c) ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu. Sonuçlar aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasını yansıtmaktadır.

Reaktöre 8 saat boyunca beslenen hava (havalandırılmalı) ile yarı-anaerobik (havalandırmasız) ortamda üretilen biyoetanolün çeşitli parametrelerce karşılaştırılması Çizelge 4.16 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Verim, hacimsel verimlilik, üretilen etanol konsantrasyonu bakımından iki koşul arasında önemli fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). Havalandırma yapılmadan birim mikroorganizma başına üretilen etanol miktarı 2,36 g/g iken; havalandırılmalı ortamda 2,55 g/g'dır ($p > 0,05$). İlk 8 saat hava beslemesi ile biyokütle üretimi 8,2 g/L'den 9,1 g/L'ye arttırılmıştır; ancak birim hücre başına üretilen ürün konsantrasyonu önemli miktarda değiştirilmeden, 48. saatin sonunda üretilen toplam ürün konsantrasyonu 19,32 g/L'den 23,22'ye yükseltilmiştir (Şekil 4.16 ve Çizelge 4.16).

Şekil 4.16c'de görüldüğü gibi havalandırmasız üretimde ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu daha hızlı tükenmiştir ve 2. saatin sonlarında yatışkın duruma gelmiştir; buna karşın havalandırılmalı üretimde oksijen beslemesiyle 8. saatin sonunda çözünmüş oksijen konsantrasyonu ortalama % 2 değerinde sabit kalarak yatışkın duruma geçmiştir. Ancak biyokütle üretim hızının düşmesiyle (Şekil 4.16a ve 4.16b) 30. saatin sonunda oksijen elektrodunun gösterdiği değerlerde sapmalar görülmeye başlamış; 48. saatten sonra 0,001'in altına düşen spesifik büyüme hızına bağlı olarak (Çizelge 4.15) oksijen tüketimi azalmıştır.

Verim ve verimlilik değerlerinden elde edilen bulgulara göre; 60 g/L glikoz kullanılarak *E. coli* KO11'den biyoetanol üretimi için en uygun koşul 35°C ve 150 rpm'de, ilk 8 saat 0,035 vvm hava beslemesi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.16 İlk 48 saatte üretilen etanol konsantrasyonu, tüketilen glikoz, verim ve hacimsel verimlilik bakımından havalandırılmalı (ilk 8 saat 0,035 vvm-OTR=5 mmol/L/h) ve havalandırmasız üretimin karşılaştırılması.

	Havalandırmasız	İlk 8 saat Havalandırılmalı
Üretilen Etanol (g/L)	19,32±0,1	23,22±0,1
Üretilen Biyokütle (g/L)	8,20	9,10
Tüketilen Glikoz (g/L)	56,04	59,03
Hacimsel Verimlilik (g/L/h)	0,40	0,48
Verim ($Y_{P/S}$)	0,34	0,39
Verim ($Y_{P/X}$)	2,36	2,55

4.3. Agro-Endüstriyel Atık Destekli LB Ortamıyla Erlen Denemeleri

Agro-endüstriyel meyve posalarının içerdiği şekerin % 99'unu fruktoz, glikoz ve sakkaroz oluşturur (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001). Sakkaroz, birbirinin izomeri olan fruktoz ve glikozdan oluşur. Fruktoz ve glikoz hücre içine aynı enzimle (PTS enzim II) girer ve fosforilasyonları aynı yollarla olur (Kornberg et al., 2000). Her iki monomerde de 6 karbon bulunmasına karşın, fruktoz içerdiği 5-üyel hemilzetal halka nedeniyle glikoza göre daha uzun metabolik yolak ve yüksek reaktiviteye sahiptir. Ayrıca fruktoz, glikozdan farklı olarak metabolizmaya fruktoz-1-fosfat yolağından girer (Kiefer et al., 2002).

Mikroorganizmalar logaritmik fazda ortamdaki karbon kaynaklarını değerlendirmek için, Embden-Meyerhof-Parnas yolağı (EMP) alternatifi olan Pentoz Fosfat yolunu (PPP) tercih ederler. PPP altı karbonlu şekerlerin oksidasyonu ile başlar ve pentoz fosfat ile karbondioksit oluşumuyla son bulur. PPP, biyosentezde biyokütle ve ürün oluşumu için NADPH kaynağı olduğu için önemlidir. Kiefer et al., 2002 fruktozun glikoza göre yüksek trikarboksilik asit aktivitesine sahip olmasına karşın, düşük PPP aktivitesi (% 20 daha düşük

karbon akısı) nedeniyle düşük ürün konsantrasyonuna dikkat çekmişlerdir. Ayrıca glikoliziste 1 mol glikoz başına 1,73 mol; 1 mol fruktoz başına 1,33 mol ve 1 mol sakkaroz başına 0,75 mol NADPH üretilmektedir (Kiefer et al., 2002). Bu nedenle ürün ve biyokütle verimleri de farklıdır (Kiefer et al., 2002). Çizelge 4.17’de görüldüğü gibi glikoza göre etanol konsantrasyonu ve verimin fruktozda düşük olması, farklı substratların mikroorganizma tarafından alınması ve metabolizmaya sokulmasında farklılıklar olmasından kaynaklanmaktadır.

Karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği incelenen agro-endüstriyel atık olarak mevsimselliği ve bulunabilirliği nedeniyle ayva, elma ve portakal posaları tercih edilmiştir. Bu meyvelerin posaları meyve suyu sanayisi atığıdır ve bol miktarda indirgen şeker içerdikleri bilinmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001). Meyve posalarının biyoetanol üretiminde substrat olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bu kısımda, LB içinde 60 g/L indirgen şeker içeren agro-endüstriyel atıklar (Bkz 3.2.1) karbon kaynağı olarak eklenerek biyoetanol üretimi yapılmıştır (Çizelge 4.17). Çizelge 4.18’de görüldüğü gibi ayvada içerik olarak yüzde glikoz oranı fruktozdan düşüktür. Ayva posasında biyoetanol verimliliği ile fruktozdan elde edilen verimliliğin birbirine eşit (0,33) olması bu durumun sonucudur (Çizelge 4.17).

Sakkaroz ise bir disakkarittir ve katabolize olabilmesi için öncelikle glikolizhidrolazlarca fruktoz ve glikoza parçalanması gerekmektedir. Elmada ağırlıkça % 1,72 glikoz olmasına karşın % 3,6 sakkaroz olması, üretimin verimliliğini düşürmektedir (Çizelge 4.17). Çünkü 40 g/L sakkarozdan elde edilen verimlilik değeri ile elmadan kazanılan verimlilik değeri istatistiksel olarak birbirinden farksızdır ($p>0,05$). Portakal ise ağırlıkça içerdiği % 2,27 glikoz ve % 2,45 fruktozla birlikte % 3,46 sakkarozla sahip olması nedeniyle diğer meyvelerden daha düşük verimlilik değerine (0,21 g/L/h) sahiptir (Çizelge 4.17). Ayrıca içerdiği düşük şeker konsantrasyonu ortama eklenen kuru madde oranını arttırdığı için ortam diğer posalarla çalışılan ortamlardan çok daha viskozdur. Portakal posasıyla yapılan çalışmalarda verim (0,18 g/g) ve verimlilik (0,21 g/L/h) ayva veya elmadan daha düşük olduğu (Çizelge 4.17)

ve aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu ($p=0,001<0,05$) için, reaktör çalışmaları sadece elma ve ayva ile devam ettirilmiştir.

Çizelge 4.17 Erlenlerde farklı hammaddelerle biyoetanol üretimi. Tüm substratlara LB ortamı ilave edilmiştir. Sonuçlar 2 paralel üretimden elde edilen verilerin ortalamasıdır ($p<0,05$).

Kullanılan hammadde	Kuru hücre ağırlığı (g/L)	İndirgen şeker (g/L)	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Hacimsel verimlilik (g/L/h)
Glikoz	7,62±0,2	4,09	16,98±0,2	0,30	0,35
Fruktoz	7,41±0,4	5,08	15,71±0,6	0,29	0,33
Sakkaroz	6,84±0,3	3,99	14,62±0,2	0,41	0,30
Ayva	7,23±0,3	4,42	15,74±0,3	0,28	0,33
Elma	6,43±0,5	4,19	13,81±0,7	0,25	0,29
Portakal	4,11±0,5	5,21	10,01±0,2	0,18	0,21

Çizelge 4.18 Kullanılan agro-endüstriyel meyve posalarının kompozisyonu (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001).

Kullanılan hammadde	Glikoz (%)	Fruktoz (%)	Sakkaroz (%)
Ayva	4,72	9,13	1,72
Elma	1,72	6	3,60
Portakal	2,27	2,45	3,46

Elde edilen verilere göre, *rE. coli*'den biyoetanol üretiminde ayva posası hammadde olarak kullanılabilir. Üstelik üretim öncesi ezme ve kurutma dışında ön işlem uygulanmadığı için üretim maliyeti düşüktür.

4.4. Agro-Endüstriyel Atık Destekli LB Ortamıyla Reaktör Denemeleri

60 g/L glikoz destekli LB ortamı kullanıldığında 150 rpm'de karıştırılan reaktöre ilk 8 saat hava beslendiğinde üretim veriminin arttırıldığı görülmüştür.

Bu nedenle alternatif karbon kaynağı olarak agro-endüstriyel atıklar kullanılarak yapılan denemelerde de hava beslemesi yapılmıştır.

Biyootanol üretimi için sentetik ortam veya agro-endüstriyel atıklar kullanıldığında, mikroorganizma ve ortam bileşenleri doğrudan sıvıyla temas halde bulunduğundan üretim derin kültür olarak değerlendirilebilir. Ancak meyve posaları suda çözünemediği için üretim ortamı heterojendir. Glikoz kullanılarak yapılan üretimde 48. saat sonundaki mikroorganizma konsantrasyonu 9,1 g/L iken, fruktozdan 8,5 g/L ve ayvadan ise 8,1 g/L hücre üretilmiştir. Ancak birim hücre başına üretilen ürün konsantrasyonu glikozla 2,55 g/g iken; fruktozda 2,4 ve ayvada 2,37'dir. $Y_{P/X}$ değerleri bakımından fruktoz ile ayva üretimleri arasında fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Agro-endüstriyel atıkların glikoz yerine kullanıldığı çalışmalarda 150 rpm'de oksijen transfer hızının 5 mmol O_2 /L/h olması için beslenmesi gereken hava debisi 120 ml/dak (0,06 vvm) olarak belirlenmiştir. Buna göre 150 rpm'de yapılan üretimde 48. saatin sonunda elde edilen etanol konsantrasyonu 11,45 g/L'dir. $Y_{P/S}$ veriminin 0,39 g/g'dan 0,20 g/g'a düşmesi ve son biyokütle konsantrasyonunun 6,2 g/L'de kalması, düşük karıştırma hızı ve yoğun vizkozite nedeniyle reaktörde oluşan ölü bölgelerin varlığıyla açıklanabilir. Ayrıca artan karıştırma hızıyla, sirkülasyon süresi değiştirilerek üretilen etanolün ürün oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisi azaltılabilir. 5 mmol O_2 /L/h'lik oksijen transfer hızına sahip havalandırmalı reaktörde 150 rpm'lik karıştırma hızında glikoz kullanılarak yapılan denemede elde edilen verime (0,39 g/g) ulaşabilmek için oksijen transfer hızında; ancak farklı karıştırma hızlarında denemeler yapılmıştır.

Çizelge 4.19'deki verilere göre, karıştırma hızının biyootanol üretimine etkisinin oldukça belirgin olmasının ($p<0,05$) temel nedeni, ortamın vizkozitesinin yüksek olmasıdır ve karıştırma hızındaki artışın homojenite ve verililiği arttırması beklenen bir durumdur. Maksimum bıçak ucu hızı 6 rushton bıçaklı karıştırıcı için bakterilerde 4 m/s'dir ve mikroorganizmanın zarar görmemesi için bıçak ucu hızının 4 m/s'yi (Bailey and Ollis, 1986)

geçmemesine dikkat edilerek karıştırma hızı aralığı seçilmiştir. Bıçak ucu hızı hesabı şu formülle yapılır;

$$Ts = \frac{\pi \times N \times D_i}{60}$$

Denklem 4.5

$D_i = 6 \text{ cm} = 0,06 \text{ m}$ olduğuna göre;

$$4 = \frac{3,14 \times N_{max} \times 0,06}{60} \quad \text{ise} \quad N_{max} = 1273,89 \text{ rpm}$$

Sartorius A plus reaktörlerde kullanılabilecek maksimum karıştırma hızı 800-1000 rpm ile sınırlandırılmıştır. Kütle transferinin daha hızlı ve uniform sağlanabilmesi için glukoz ve oksijenin hücreye transferini sağlarken; etanolün hücre içinden uzaklaşımı için etkin bir karıştırma hızına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda ayva ve elma posaları ile hücrede üretilen etanolün daha etkin uzaklaştırılması için 200-500 rpm arasında denemeler yapılarak etanol üretimi arttırılmaya çalışılmıştır. Çizelge 4.19’da da görüldüğü gibi 48 saatlik üretim süresince ayvanın substrat olarak kullanıldığı denemelerde 300, 400 ve 500 rpm arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p=0,85>0,05$) ve elde edilen 19,66 g/L’lik etanol konsantrasyonu 200 rpm’deki 14,45 g/L’lik etanol konsantrasyonundan daha yüksek olduğu için, ayva için 300 rpm en iyi karıştırma hızı olarak belirlenmiştir. Elmayla yapılan denemede 3 karıştırma hızı karşılaştırıldığında $p=0,04<0,05$ olduğu için ve 400 rpm ile 500 rpm arasında istatistiksel olarak fark olmadığından ($p=0,6>0,05$) elma posasıyla 400 rpm’de en iyi ürün konsantrasyonu elde edilmiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.16). Her iki atık denemesinde de yüksek karıştırma hızlarının 150 rpm’e göre daha yüksek ürün verimi sağlaması, hücrede üretilen etanolün difüzyonla daha hızlı ve daha etkin biçimde uzaklaştırılmasıyla açıklanabilir.

Çizelge 4.19 Biyoreaktörde a) ayva b)elma posasından değişik karıştırma hızlarında biyoetanol üretimi (OTR=5 mmol O₂/L/h). Çizelge değerleri aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıdır.

Süre (sa)	Glikoz	Fruktoz	Ayva			
	150 rpm	150 rpm	200 rpm	300 rpm	400 rpm	500 rpm
0	0	0	0	0	0	0
24	14,22±0,3	13,08±0,5	9,24±0,3	12,52±0,5	11,78±0,2	12,01±0,4
48	23,22±0,1	20,29±0,1	14,45±0,2	19,66 ±0,8	19,74 ±0,7	20,15±0,3

(a)

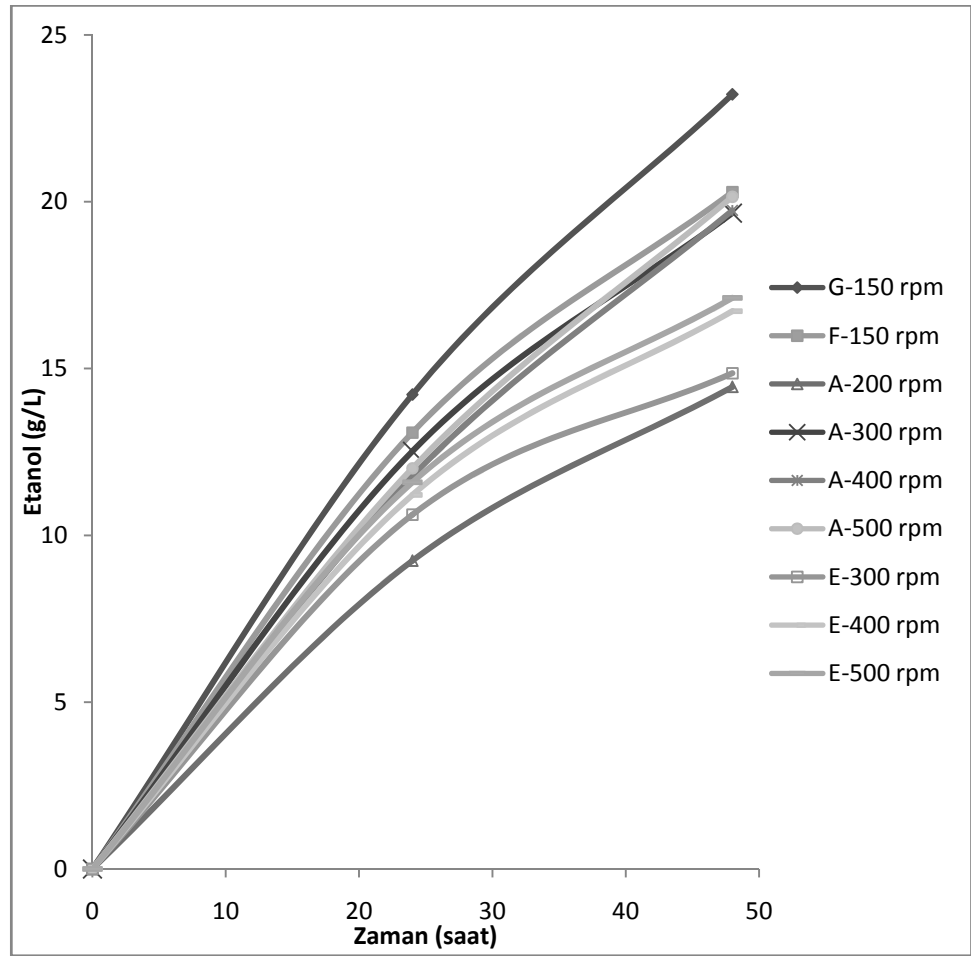
Süre (sa)	Glikoz	Fruktoz	Elma		
	150 rpm	150 rpm	300 rpm	400 rpm	500 rpm
0	0	0	0	0	0
24	14,22±0,3	13,08±0,5	10,62±0,4	11,21±0,2	11,59±0,3
48	23,22±0,1	20,29±0,1	14,86±0,1	16,72±0,4	17,12±0,5

(b)

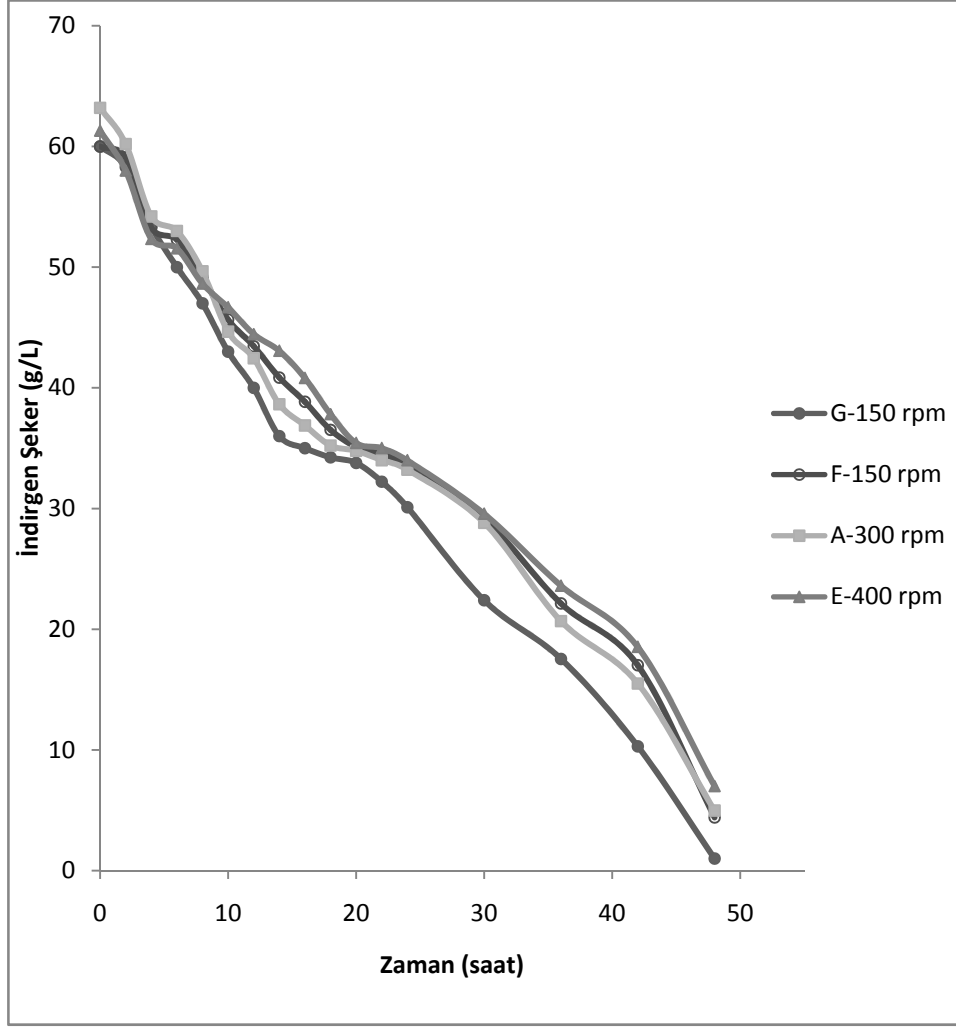
Çizelge 4.20 Çeşitli karbon kaynaklarından değişik karıştırma hızlarında elde edilen biyoetanol verim ve verimliliği (OTR=5 mmol O₂/L/h)

Kullanılan Substrat	Karıştırma hızı (rpm)	Y _{P/S} (g/g)	Verimlilik (g/L/h)
Glikoz	150	0,39	0,48
Fruktoz	150	0,36	0,42
Ayva	200	0,22	0,30
	300	0,36	0,41
	400	0,36	0,41
	500	0,36	0,42
Elma	300	0,26	0,31
	400	0,32	0,35
	500	0,32	0,36

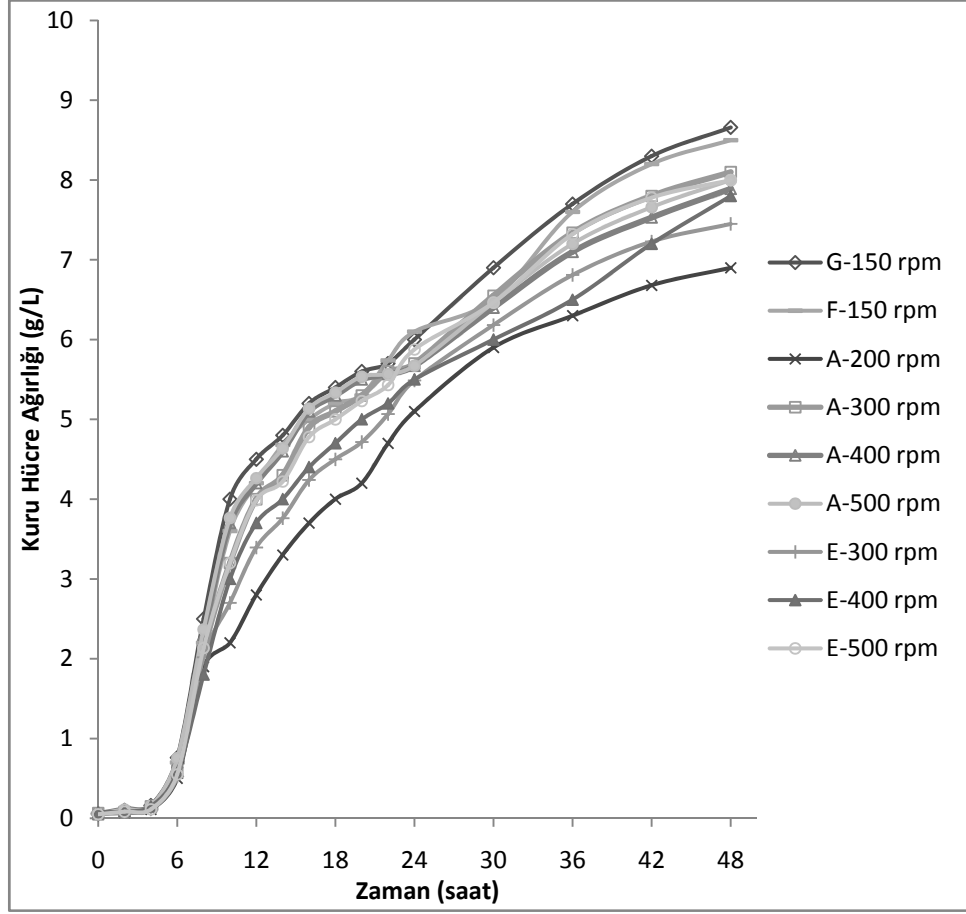
60 g/L glikoz destekli LB ortamı kullanılarak elde edilen son ürün konsantrasyonu 23,22 g/L ve 60 g/L fruktoz destekli LB ortamı kullanılarak elde edilen son ürün konsantrasyonu 20,29 g/L iken; aynı konsantrasyonda indirgen şeker içeren ayva kullanıldığında aynı sürede üretilen etanol konsantrasyonu 19,66 g/L olmaktadır. Benzer olarak 60 g/L indirgen şeker içeren elma posası substrat olarak kullanıldığında ise üretilen etanol konsantrasyonu 16,72 g/L kadardır (Şekil 4.17, Çizelge 4.20).



Şekil 4.17 Çeşitli karbon kaynaklarından biyoetanol üretimi için farklı karıştırma hızlarında üretilen etanol konsantrasyonu (OTR=5 mmol O₂/L/h). Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur. G: Glikoz, F: Fruktoz, A: Ayva, E: Elma (p<0,05).



Şekil 4.18 Meyve posalarından biyoetanol üretimi için çeşitli karıştırma hızlarında ortamda biriken indirgen şeker konsantrasyonu (OTR=5 mmol O₂/L/h). Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur. G: Glikoz, F: Fruktoz, A: Ayva, E: Elma.



Şekil 4.19 Meyve posalarından biyoetanol üretimi için çeşitli karıştırma hızlarında üretilen kuru hücre ağırlığı (OTR=5 mmol O₂/L/h). G: Glikoz, F: Fruktoz, A: Ayva, E: Elma.

Ayvının, glikoza oranla daha yüksek miktarda fruktoz içermesi nedeniyle, biyoreaktörde elde edilen üretim sonuçları fruktoza benzemektedir ($p>0,05$). Veriler doğrultusunda, *rE. coli*'den biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak önışlem uygulanmamış (sadece 1 mm'lik kesim ve kurutma) ayva posasının kullanılabileceği söylenebilmektedir.

4.5. Biyoetanol Üretiminde Ölçek Büyütme

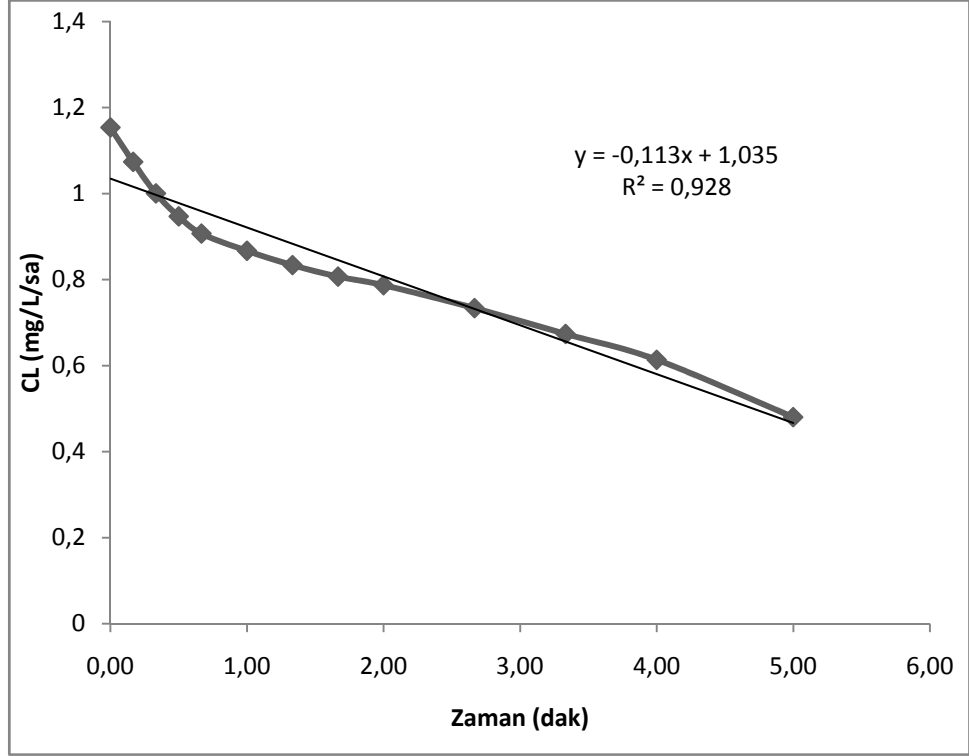
4.5.1. Damköhler sayısı

Yatışkın olmayan hal metoduyla belirlenen maksimum oksijen transfer hızı gibi, yatışkın olmayan hal metoduyla oksijen alım hızı (OUR) de hesaplanabilir.

2 L çalışma hacmine sahip *rE. coli* KO11 erlenlerde belirlenen (Bkz. 4.1) en uygun koşulları sağlayan üretim ortamında maksimum spesifik büyüme hızına ulaşana kadar (8. saat, Çizelge 4.15) 0,035 vvm hava beslemesiyle geliştirilmiştir. Bu noktada hava beslemesi durdurulup oksijen konsantrasyonundaki azalma kaydedilmiştir (Çizelge 21, Şekil 4.20).

Çizelge 4.21 Maksimum mikrobiyal büyüme sırasında, organizma tarafından ortamdaki oksijenin zamanla tüketilmesi.

Zaman (dak)	% DO	C_L (=C_L*%DO)
0,00	17,3	1,15
0,17	16,1	1,07
0,33	15	1,00
0,50	14,2	0,95
0,67	13,6	0,91
1,00	13	0,87
1,33	12,5	0,83
1,67	12,1	0,81
2,00	11,8	0,79
2,67	11	0,73
3,33	10,1	0,67
4,00	9,2	0,61
5,00	7,2	0,48



Şekil 4.20 Biyoreaktörde üretim ortamındaki çözülmüş oksijen konsantrasyonunun zamanla değişimi.

Oksijen alım hızı Şekil 4.20'nin eğiminden hesaplanır ve bu değer 0,11 mg/L/dak (0,21 mmol/L/h) olarak belirlenmiştir. Buna göre Da simgesiyle gösterilen Damköhler sayısı (OUR_{max}/OTR_{max})=0,042 olur. $Da < 1$ olduğu için prosesin biyokimyasal reaksiyon hızı limit bir faktördür ve biyoetanol üretimi için oksijen transfer hızı kritik bir role sahiptir. Biyoetanol üretiminde kütle transferi; hücre içine oksijen ve substrat transferi ve hücrede oluşan etanolün ortama geçişi mekanizmalarında etkin rol oynar. $k_L a$, dizayn ve ölçek büyütme için önemli bir mühendislik parametresidir (Marques et al., 2009). Ölçek büyütme parametrelerinden; benzer $k_L a$ sayıları ($K_L a$), benzer karışma süresi (t_m) ve benzer karıştırıcı ucu hızı (V_s) ile 10 L Sartorius B plus biyoreaktörde etanol üretimi gerçekleştirilip en verimli ölçek büyütme parametresi belirlenmiştir.

4.5.2. Ölçek büyütme parametrelerinin etkisi

Ölçek büyütülürken farklı parametrelerin özellikleri baz alınır ve üretilen madde, biyokatalizör, ortam şartları vb. gibi durumlar için farklı ölçek büyütme parametreleri uygulanır (Marques et al., 2009). Biyoetanol üretimi için en iyi parametrenin belirlendiği çalışmada (Bkz 3.2.6); benzer karıştırma süresi (t_m), benzer karıştırıcı ucu hızı (V_s) ve benzer k_{La} değeri (K_{La}) ile 10 L'lik biyoreaktörde yapılan havalandırılmalı büyük ölçek denemelerinde elde edilen veriler Çizelge 4.22 ve Şekil 4.21'de görülmektedir.

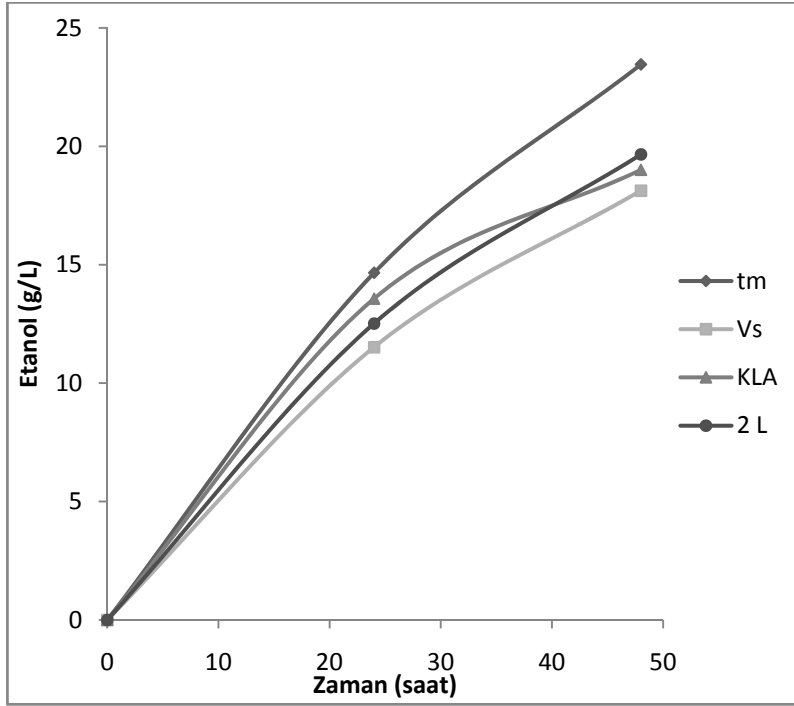
Benzer K_{La} ile yapılan ölçek büyütmede 48. saatte üretilen etanol konsantrasyonu 19,01 g/L iken verim 0,32 g/g ve hacimsel verimlilik 0,4 g/L/h'tir. Benzer t_m denemesinde ise, üretilen etanol konsantrasyonu 2 L'lik ölçekteki 19,66 g/L'den 23,46 g/L'ye çıkartılmıştır. Ayrıca benzer t_m denemelerinde verim 0,40 g/g'a artırılırken, verimlilik 0,49 g/L/h'ye ulaşmıştır. Üretimler kıyaslandığında en yüksek verim ve verimlilik benzer t_m ile yapılan denemede elde edilmiştir (Çizelge 4.23); ancak verimlilik bakımından t_m denemesiyle 2 L'lik üretim arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$). Buna karşın, V_s ile yapılan ölçek büyütmede elde edilen ürün konsantrasyonu diğer parametre sonuçlarından ve 2 L'lik üretim sonuçlarından önemli derecede azdır; ayrıca 48. saatte ortamdaki hücre konsantrasyonu 7,66 g/L'dir. Bunun nedeni 225 rpm karıştırma hızının yetersiz olmasıyla ölü bölgelerin varlığıdır. Üretim sonunda ortamda harcanmadan kalan 8,98 g/L şeker konsantrasyonu bu sonucu desteklemektedir (Şekil 4.22).

Çizelge 4.22 Büyük ölçek denemelerinde LB destekli ayva posalarıyla üretilen etanol konsantrasyonlarının 2 L'lik havalandırılmalı üretimle kıyaslanması. Sonuçlar herhangi bir zamanda alınan 2 örneğin ortalamasının standart sapmasıyla birlikte verilmiştir ($p<0,05$). t_m : Benzer karışma zamanı ile ölçek büyütme, K_{La} : Benzer k_{La} sayılarıyla ölçek büyütme, V_s : Benzer bıçak ucu hızıyla ölçek büyütme.

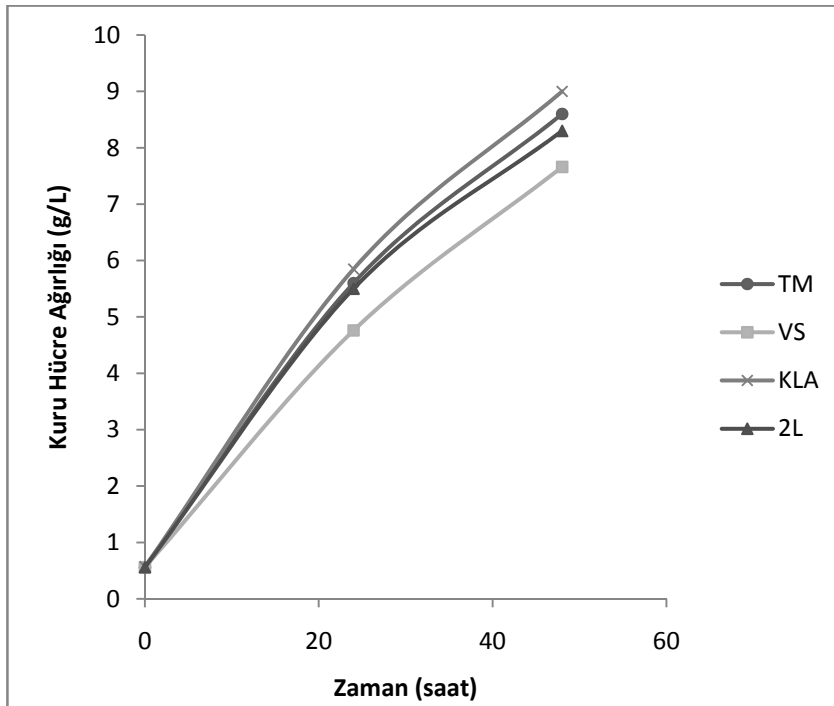
Zaman (saat)	t_m	V_s	K_{La}	2 L
	Etanol (g/L)	Etanol (g/L)	Etanol (g/L)	Etanol (g/L)
0	0	0	0	0
24	14,66±0,6	11,52±0,3	13,57±0,5	12,52±0,5
48	23,46±1	18,13±0,1	19,01±0,1	19,66±0,8

Çizelge 4.23 Substrat olarak ayva kullanılan büyük ölçek denemelerinde ilk 48 saatte verim ve verimliliğin 2 L'lik havalandırılmalı üretimle kıyaslanması ($p<0,05$). t_m : Benzer karışma zamanı ile ölçek büyütme, K_{La} : Benzer k_{La} sayılarıyla ölçek büyütme, V_s : Benzer bıçak ucu hızıyla ölçek büyütme.

	t_m	V_s	K_{La}	2 L
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,40	0,36	0,32	0,36
Verimlilik (g/L/h)	0,49	0,38	0,40	0,41
Biyokütle (g/L)	8,6	7,66	9	8,3
Tüketilen Şeker (g/L)	58,47	51,02	59,33	54,99
$Y_{P/X}$	2,72	2,37	2,11	2,37

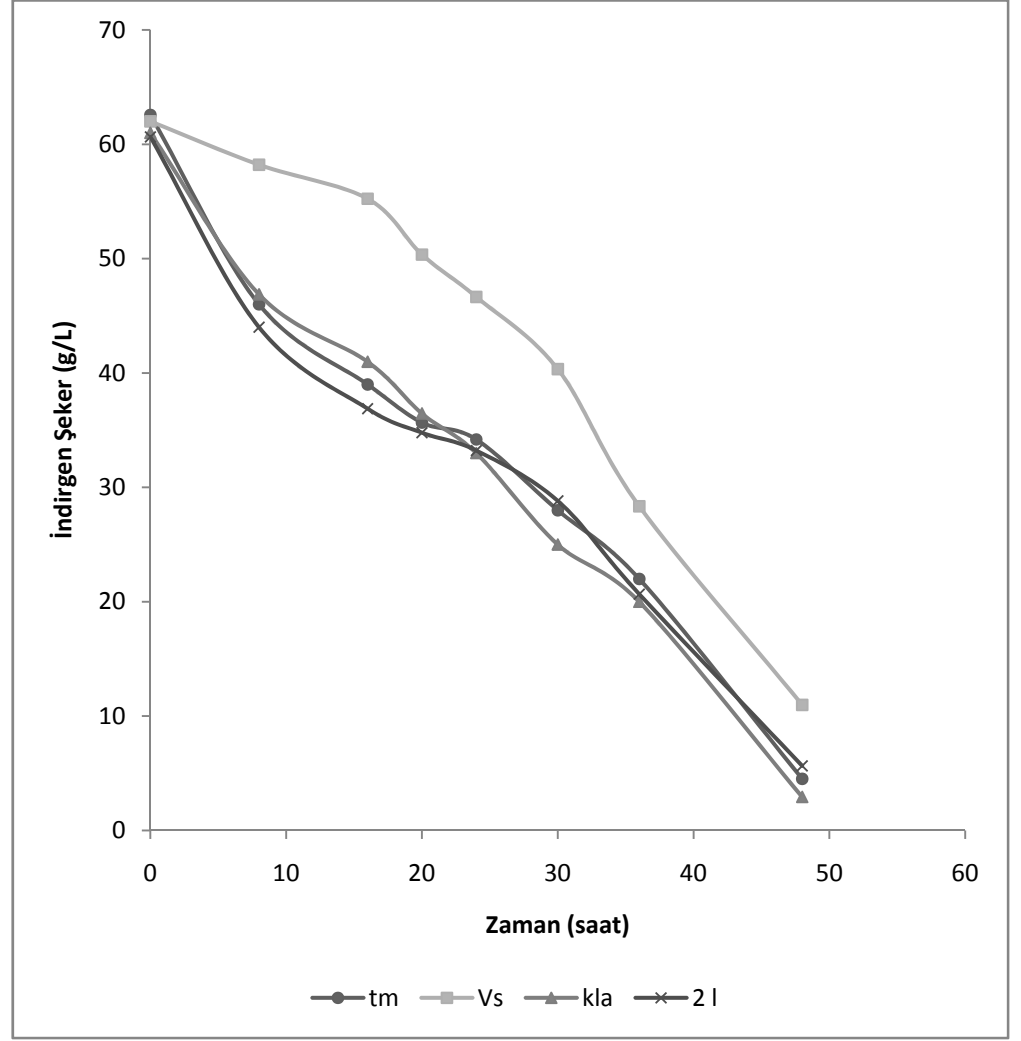


(a)



(b)

Şekil 4.21 Farklı parametrelere göre yapılan ölçek büyütme (a) biyoetanol ve (b) biyokütle üretimine etkisi. t_m : Benzer karışma zamanı ile ölçek büyütme, KLa : Benzer $k_L a$ sayılarıyla ölçek büyütme, V_s : Benzer bıçak ucu hızıyla ölçek büyütme.



Şekil 4.22 Farklı parametrelere göre yapılan ölçek büyütmelerine göre ortamda kalan şeker miktarı. t_m : Benzer karışma zamanı ile ölçek büyütme, K_La : Benzer K_La sayılarıyla ölçek büyütme, V_s : Benzer bıçak ucu hızıyla ölçek büyütme.

Benzer K_La , t_m ile ölçek büyütme çalışmalarında 48. saatte üretilen biyokütle konsantrasyonu sırasıyla 9 ve 8,6 g/L'dir. Buna göre birim hücre başına üretilen ürün konsantrasyonu K_La ile 2,11 g/g iken t_m ile 2,72 g/g'dır. K_La benzerliği esas alınarak yapılan ölçek büyütmede ortamdaki şekerin % 98,88'inin tükenmesi ve 2 L'lik reaktör denemesinden daha yüksek biyokütle konsantrasyonu, mikroorganizmaların oksijeni t_m ve V_s 'tan daha iyi kullandıklarının göstergesidir. Ancak K_La verimi 0,32 g/g iken t_m veriminin 0,40 g/g olmasının nedeni hücrelerin 8 saat oksijenli solunum yaparken, t_m 'te

biyokütleyi etanol üretmek için kullanmalarından kaynaklanmaktadır. Buna karşın K_{La} ile biyokütle üretimi arttırılmaktadır.

K_{La} ile ölçek büyütme, genel olarak tüm proses boyunca aerobik koşullarda yapılan üretimlerde en iyi sonucu vermektedir (Marques et al., 2009). V_S ise hücrelerin hasar oranı yüksekse, misel kültürleri gibi kayma geriliminin yüksek olduğu veya ortam morfolojisinin değişken olduğu durumlarda bir ölçek büyütme parametresi olarak kullanılmalıdır.

Karışma zamanı, reaktöre tek bir noktadan eklenen etkenin reaktör içinde homojen dağılmasına kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır. Karışma zamanı reaktör içindeki akım ve karıştırma performansı ile ilgili önemli bilgiler verir. Bu nedenle önemli bir ölçek büyütme parametresidir (Demirci, 2010). Genel olarak karıştırıcı ucu hızının 2 - 3,2 m/s olması istenir ancak bu değer kullanılan mikroorganizmaya ve sıvı reolojisine göre farklılık gösterebilmektedir (Marques et al., 2009). Yapılan ölçek büyütme denemelerinden çıkarılacak sonuç; *rE. coli*'den biyoetanol üretimi için büyük ölçeğe geçilirken, istenen herhangi bir hacim için dikkat edilmesi gereken parametre, 17 saniye karıştırma süresine sahip karıştırma hızının ayarlanmasıdır.

4.6. Pervaporasyonla Etanol Ayrımı

Verimli bir etanol üretiminin yaygınlaşabilmesi için alt akım işlemlerinin ucuz, pratik ve sürekli bir şekilde sağlanması gerekmektedir. Etanolün ortamda birikiminin, substratı ürüne dönüşüm verimine verdiği negatif etkinin önlenmesi için on-line bir ayırım sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu şekilde üretim ortamıyla paralel ilerleyen sürekli bir ayırım yapılarak ortamdaki ürün konsantrasyonu düşürülür ve ortamda biriken etanolün üretimdeki inhibisyon etkisi önlenebilir. Çalışma kapsamında yürütülen pervaporasyon denemelerinde nihai amaç; üretim ortamından on-line uzaklaştırılan bir etanol

ayırımına model bir çalışma basamağı oluşturarak, üretim verimini arttıracak pervaporasyon denemeleri için ön deneme koşullarını belirlemektir.

Pervaporasyon işlemi, hidrofilik bir membranın iki yüzeyi arasındaki basınç farkının yürütücü kuvvet olarak kullanılmasıyla karışımındaki hidrofilik komponentlerin permeat sıvısıyla uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. 10 L'lik reaktörde (8 L çalışma hacmi) 35⁰C ve 330 rpm çalkalama hızında (pH 6) ayva posası destekli LB ortamı kullanılarak benzer karışma süresi ile ölçek büyütülerek yapılan 48 saatlik üretim sonucu santrifügasyon işlemiyle (5000 g, 5 dakika, 5⁰C) ağırlıkça etanol fraksiyonu % 2,3 olan 5 L süpernatant elde edilmiştir. Bu 5 L'lik süpernatanttaki etanolü konsantre edebilmek amacıyla Sulzer marka pervaporasyon cihazı kullanılarak alt akım işlemi gerçekleştirilmiştir.

100 L/h (2,78x10⁻⁵ m³/s) besleme debisi (Q) için 1 cm hidrolik çaplı (d_h) besleme borusundaki sıvının akış hızı (v, m/s) ve Re sayısı;

$$v = \frac{Q}{A}$$

$$v = 0,35 \text{ m/s}$$

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\mu}$$

Denklemler 4.6

$$Re = 4885,19$$

Re<500 ise akım rejimi laminar, 500<Re<2000 ise geçiş ve Re>2000 ise akım türbülanstır (Aroujalian and Raisi, 2009). Pervaporasyon denemelerinde Re sayısı 4885,19 olarak hesaplanmıştır ve buna göre rejim türbülanstır. Pervaporasyonda akım türbülans iken 2,25 seçicilik değeri ile en yüksek ayırım yapılabilir (Aroujalian and Raisi, 2009).

Pervaporasyon denemesi için 10 L'lik reaktörde ayva posası kullanılarak yapılan üretimin hücre ve katı posadan ari 4 L'lik süpernatantı pervaporasyon

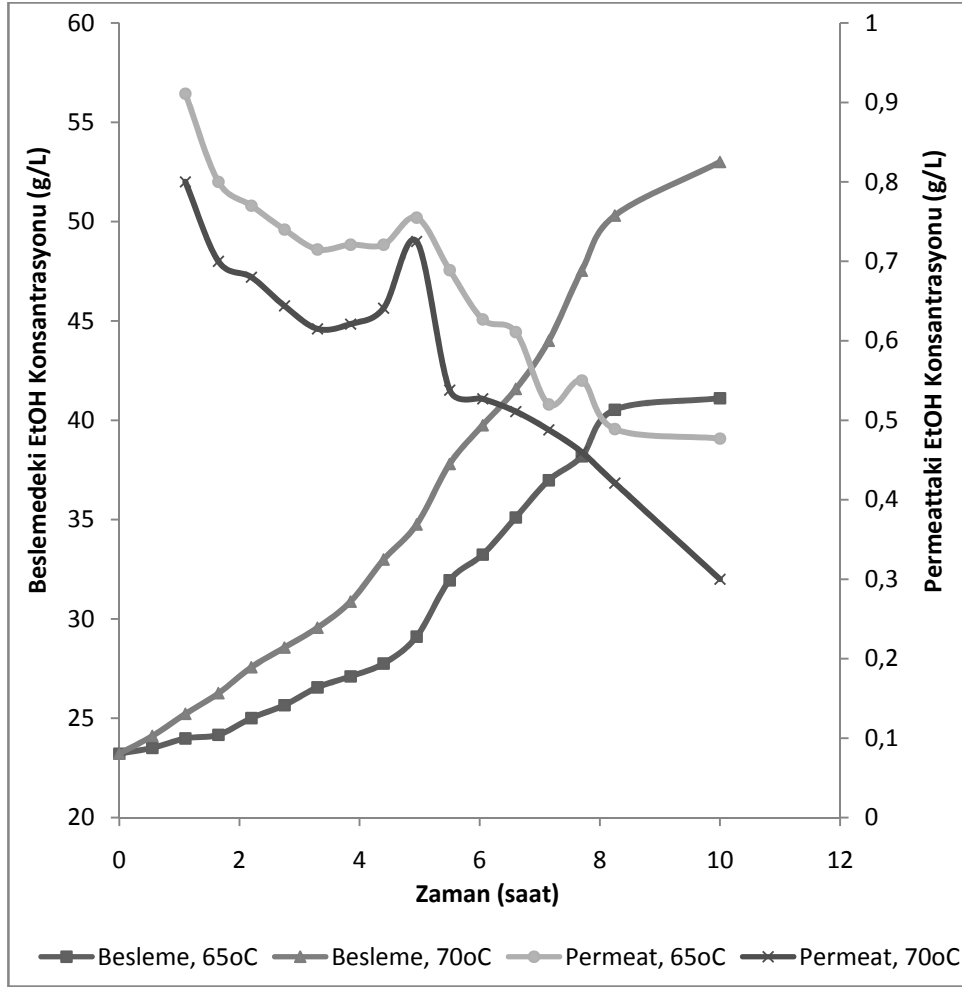
ünitesine 2 ayrı deneme için (65 ve 70°C) 2'şer L hacimle beslenmiştir. Kullanılan membranin hidrofilik özellikli olması nedeniyle permeat kısmında su, retentant kısmında ise sudan arındırılmış etanol bulunmakta; bu retentant tanka tekrar gönderilip yeni ayırım yapılmaktadır. Bu nedenle retentant kısma besleme denilebilmektedir. Membranın üst kısmındaki atmosfer basınca (~1 bar) karşılık, alt kısmındaki akım basıncı 7 mbar'dır ve akış, bu iki yüzey arasındaki basınç farkının sağladığı yürütücü güçle sağlanmaktadır. 65 ve 70°C'de yapılan pervaporasyon denemelerinde permeat kısmında hidrofilik komponentler toplanmaktadır. Bu nedenle α değeri permeattaki etanol konsantrasyonu hakkında bilgi verir ve ne kadar düşükse ayırım o kadar iyi yapılmıştır. Çizelge 4.24'te de görüldüğü gibi, 10. saatin sonunda 70°C'de α değeri 0,005 iken, 65°C'de α değeri 0,011'a çıkmıştır. Ayrıca permeattaki etanol konsantrasyonu 10. saatin sonunda 70°C'de 0,03 g'a kadar düşmüşken, 65°C'de 0,05'tir. Buna karşın, 70°C'de 7 mbar alt akım basıncında yapılan denemede besleme kısmındaki etanol konsantrasyonu 2,3 kat artırılarak ağırlıkça % 2,3'ten % 5,3'e çıkartılmıştır; ancak 65°C membran sıcaklığında beslemedeki ağırlık fraksiyonu % 2,3'ten % 4,11'e kadar konsantre edilebilmiştir (Çizelge 4.24). Chovau et al. (2010) pervaporasyonla etanol uzaklaştırdıkları çalışmada 3 mbar alt akım basıncı kullanarak 12. saatin sonunda etanol konsantrasyonunu ağırlıkça % 5'ten % 30,7'ye çıkartabilmişler ve pervaporasyonda çalışma başarısının basınca bağlı olduğu belirtmişlerdir.

Pervaporasyon denemelerinde kullanılan membran organofilik özellikli ise ayırım faktörünün (α) artması, pervaporasyonun performansının arttığını ve permeattaki etanolün ağırlıkça yüzdesinin yükseldiğini göstermektedir. Ancak bu çalışmada da olduğu gibi, hidrofilik membranla su ayırımı yapıldığında α değeri azaldıkça, suyla birlikte uzaklaştırılan etanol yüzdesi azalırken, besleme tankında depolanan etanol yüzdesi artmaktadır. Buna göre ayırım performansı ile α ters orantılıdır. Çizelge 4.24 ve Şekil 4.25'te görüldüğü gibi 65 ve 70°C'de yapılan pervaporasyon denemesinde α değeri zamanla azalmaktadır; ancak 70°C membran sıcaklığında azalma, 65°C'den daha hızlıdır ve 10.

saatteki 0,005 olan ayırım faktörü 65⁰C’de elde edilen 0,011 ayırım faktöründen 0,45 kat daha düşüktür (p<0,05).

Çizelge 4.24 Farklı sıcaklıklarda 10 saatlik pervaporasyon işlemi sonuçları. Başlangıç beslemesi ağırlıkça % 2,3 etanol içermektedir. Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur.

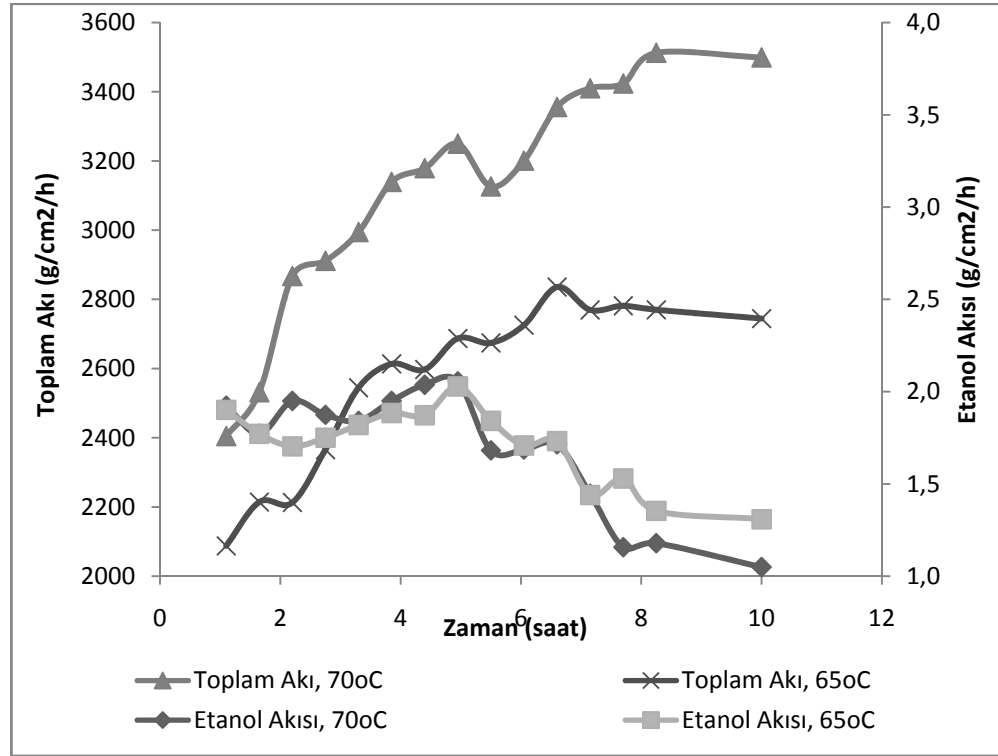
	Permeat						Besleme
	M _{top} (g)	J _{top} (g/m ² /h)	J _{EtOH} (g/m ² /h)	C _{EtOH} (% g/g)	α	β	C _{EtOH} (% g/g)
65 ⁰ C	353,24±0,1	2744,67	1,31	0,05±0,1	0,011	0,011	4,11
70 ⁰ C	425,91±0,2	3499,27	1,05	0,03±0,1	0,005	0,006	5,30



Şekil 4.23 Sıcaklığın pervaporasyon süresince permeat ve besleme hattındaki etanol konsantrasyonuna etkisi. Başlangıç beslemesi ağırlıkça % 2,3 etanol içermektedir. Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur.

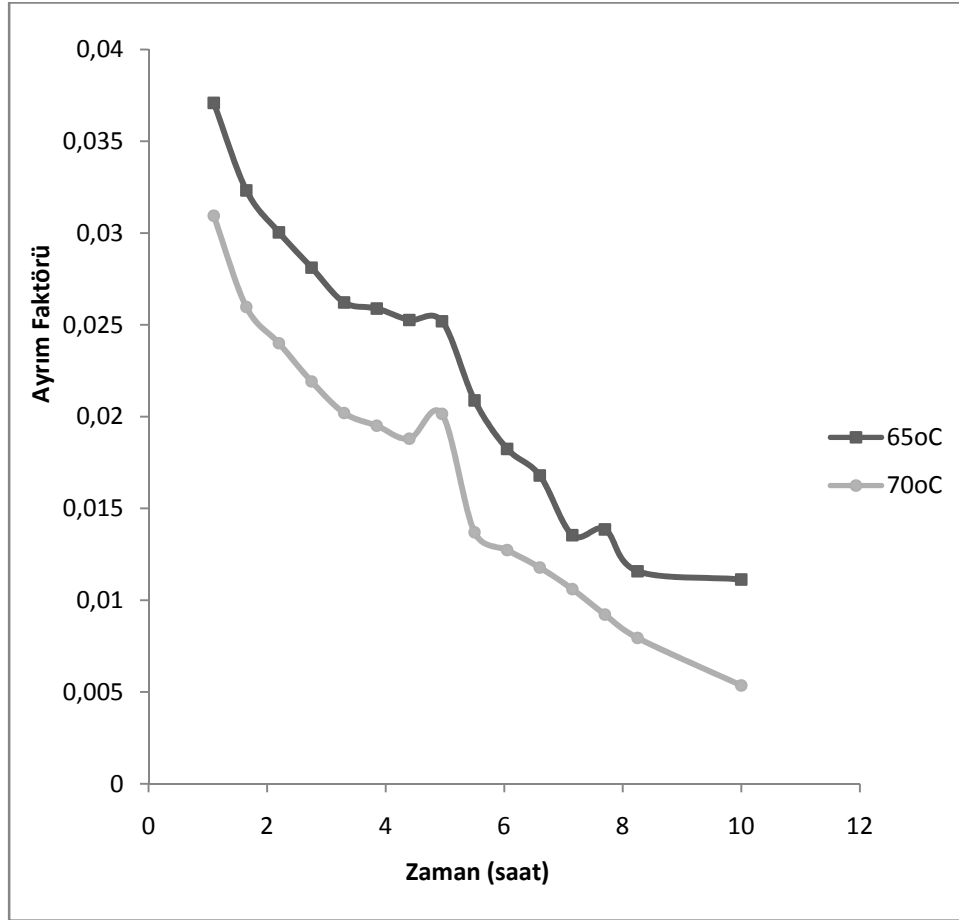
Pervaporasyon denemelerinde akı, etanol ayrımı için yazılan kinetik modellerin oluşturulmasında önemli role sahiptirler (Staniszewski, 2007; Wang, 2010). Yapılan denemede 65 ve 70^oC sıcaklıkta toplam akı zamanla arttırılmıştır (Şekil 4.24). 65^oC membran sıcaklığında 10 saat sonra ulaşılan toplam akı 2744,67 g cm⁻² h⁻¹ iken 70^oC membran sıcaklığında aynı süre sonunda 3499,27 g cm⁻² h⁻¹ akı sağlanmıştır. Her iki denemede de toplam akı 6,5-7. saatler arasında yatışkın duruma gelmiştir (Şekil 4.24). Etanol akısı ise her iki denemede de 5. saat sonrası azalmaya başlamıştır ve 7-8. saatin sonunda yatışkın durumuna ulaşmıştır. Chen et. al (2001) 50^oC üstündeki hidrofilik

membran sıcaklığında toplam akının (membranın şişmesi nedeniyle) arttığını ve ayırım faktörünün azaldığını belirtmişlerdir. Ayırım faktöründeki bu azalış, yükselen sıcaklığa bağlı olarak moleküllerin hareketindeki artıştan kaynaklanmaktadır.



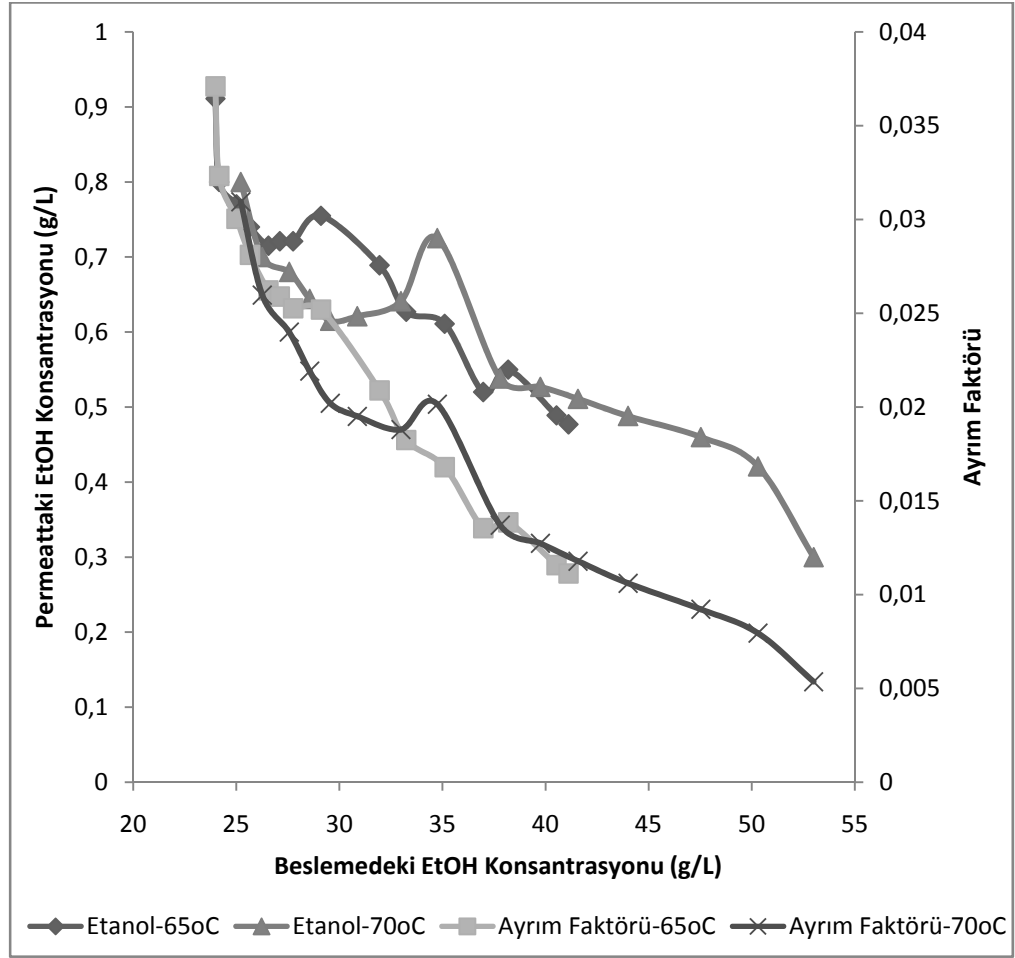
Şekil 4.24 Sıcaklığın pervaporasyon süresince permeat ve besleme hattındaki etanol akısı ve toplam akıya etkisi. Başlangıç beslemesi ağırlıkça % 2,3 etanol içermektedir. Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur.

Wang et al. (2010), en uygun pervaporasyon koşullarının 70°C'de yapıldığını belirtirken; Thongsukmak et al. (2009) yüksek sıcaklıklarda akının ve ayırım gücünün arttığını göstermişlerdir. Chovau et al. (2010) ise organofilik membran (PERVAP 4060) kullanarak 2 mbar alt akım basıncında 30°C'de ağırlıkça % 5'lik etanol konsantrasyonunu % 30,7'ye çıkartabilmişlerdir.



Şekil 4.25 Sıcaklığın pervaporason süresince permeat ayırım faktörüne (α) etkisi. Başlangıç beslemesi ağırlıkça % 2,3 etanol içermektedir. Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur.

Permeatla uzaklaştırılan suya paralel olarak beslemedeki etanol konsantrasyonu arttıkça ayırım faktörü azalmaktadır (Şekil 4.26). Şekil 4.24'te görüldüğü gibi etanol akısı ile permeattaki etanol konsantrasyonu doğru orantılı olarak azalmaktadır. Benzer sonuç Kaseno et al. (1998)'in kullandıkları organofilik membranın alt akımında 2 mbar basınçla yaptıkları çalışmada akının 1000'den 2000 g/m²/h'ten çıkışına paralel olarak etanol konsantrasyonun 150'den 350 g/L'ye çıkartılmasıyla elde edilmiştir.



Şekil 4.26 Beslemedeki etanol konsantrasyonunun pervaporason performansına etkisi. Başlangıç beslemesi ağırlıkça % 2,3 etanol içermektedir. Veriler aynı sürede alınan 2 örneğin ortalamasıyla oluşturulmuştur.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

250 ml’lik erlenlerde başlayan ve 5 ile 10 L’lik reaktörlerde ölçek büyütülerek yapılan deneme sonuçlarında, en yüksek verime *E. coli* KO11 suşuyla 35⁰C’de 330 rpm’de (pH 6), 10 L’lik reaktörde 8 L çalışma hacminde 60 g/L indirgen şeker içeren ayva posası destekli LB ortamı kullanılarak ve ilk 8 saat 5 mmol/L/h oksijen içeren hava beslenerek 23,46 g/L etanol, 8,6 g/L kuru ağırlık ve % 97,83 şeker tüketimiyle 48 saatlik üretim sonunda ulaşılmıştır. Burada elde edilen $Y_{P/X}$ değeri 2,72 g/g; verimlilik değeri 0,49 g/L ve verim 0,4 g etanol/g substrat’tır (teorik verimin % 79’u kadar).

Erlen denemelerinden reaktör sistemlerine geçilirken “benzer karışma süresi” ilkesine göre karıştırma hızı belirlenmiş; bu karıştırma hızında akım rejiminin erlenlerde olduğu gibi tam türbülans bölgede olması için Re sayısı da hesaplanmıştır. Erlenlerde dışarıdan yapılan orbital çalkalamaya karşılık, reaktörde içten karıştırma sayesinde 0,28 g/g $Y_{P/S}$ verimi 0,36 g/g’a çıkartılmıştır. Ayrıca biyoreaktörlerde ısı ve kütle transferi, erlenlere göre daha kontrollüdür. Bu nedenle ayva posasının substrat olarak kullanıldığı erlen denemelerinde elde edilen 15,74 g/L etanole karşılık, 5 L’lik biyoreaktörde 19,66 g/L etanol üretilmiştir. Ancak reaktörlerde, minimum hava partikülü hareketi hızının sağlanması ve alevin kontrolü zorlaştığı için inokulum sırasında kontaminasyon riski daha yüksektir. Bunun yanı sıra erlen veya reaktörlerde yapılan üretimlerde, hücreler rekombinant olduğu için standart bir hücre performansının sağlanması zordur. Etanol veriminin yapılan çalışmalara göre düşük çıkmasının nedeni şu maddelerle açıklanabilir;

- Literatürde yer alan yeni çalışmalarda üretim veriminin düşmesi suşun dejenerasyonunu göstermektedir.
- Oluşan etanol yeni ürünlerin üretiminde inhibisyon etkisi göstermektedir.
- Yüksek hücre içi etanol konsantrasyonu ürün verimini düşürmektedir.

- Agro-endüstriyel atıkların içerdiği farklı şekerlerin üretim verimleri birbirinden farklıdır ve glukoza göre daha yüksek fruktoz içeren atıkların verimi de bu nedenle daha düşüktür.

- Agro-endüstriyel atıklarda üretim ortamının yüksek viskozitesi homojenite üzerinde olumsuz etki göstermektedir.

Yapılan denemelerde agro-endüstriyel atıkların glukoza göre daha düşük verimle etanol vermelerinin bir nedeni, yüksek viskozitenin neden olduğu ölü bölgelerin varlığı ve sirkülasyon süresinin yetersiz kalmasıdır. Karıştırma hızının belli bir değere kadar artması bu durumu önlese de, gelecek çalışmalarda hücre verimine negatif yönde etki etmeyecek viskozite düşürücülerin ortama katılması bu problemi önleyebilir.

Ayva posası içeriğindeki şekerlerin karbon kaynağı olarak kullanıldığı 10 L'lik üretimden elde edilen 5 L'lik süpernatant ile pervaporasyon prosesinde en iyi ayırım; 70⁰C'de 7 mbar alt akım basınçla çalışan hidrofilik membranda, ağırlık fraksiyonu % 2,3 olan beslemedeki etanol oranı % 5,3 g/g'a çıkartılmıştır. Prosesin ayırım faktörü (seçicilik) 0,011'dir ve permeattaki toplam akı 2744,67 g/m²/h iken; etanol akısı 1,31 g/m²/h'dir.

Pervaporasyon çalışmalarında ayırım gücü proses süresine, sıcaklığa ve alt akım basıncına bağlıdır. Etanolün daha iyi ayrılması için sıcaklığın artırılması membranın şişmesine ve dolayısıyla ömrünün kısılmasına neden olmakla birlikte, maliyeti arttırır. Bu nedenle düşük sıcaklıklarda çalışarak; membranın alt yüzeyine uygulanan alt akım basıncının düşürülmesi için daha yüksek çekiş gücüne sahip vakum pompası kullanılmalıdır. Bunun yanı sıra, pervaporasyon sisteminde hidrofilik bir membran yerine poröz politetrafloroetilen, polidimetilsiloksan veya poliorganofosfazen gibi organofilik bir membran tercih edilirse, etanolün permeat akımıyla uzaklaştırılmasıyla çok daha kısa sürede daha yüksek ayırım performansına sahip bir separasyon işlemi elde edilebilmektedir. Pervaporasyon ünitesiyle entegre bir hücresel geri dönüşüm sistemiyle (ultrafiltrasyon gibi) fermentasyon sıcaklığında ayırım yapılarak, üretilen etanolün fermentasyon

ortamından sürekli uzaklaştırılmasıyla azalan ürün konsantrasyonu sayesinde ürün inhibisyonu engellenebilir ve proses sonunda elde edilen ürün verimi arttırılabilir. Uygun bir organofilik membranın yokluğu ve sistemin on-line çalışmaya uygun olmaması nedeniyle bu çalışmada fermentasyona sürekli bir ayırım işlemi denenememiştir. Sistemin kesikli ayırım tankı dinlenme tankı olarak kullanılarak ve yanına konuşlandırılmış biyoreaktöre hücresel geri dönüşümlü bir filtrasyon sistemi entegre edilerek, oluşturulacak düzenek sayesinde yeni bir pervaporasyon ekipmanına gerek duymadan daha yüksek konsantrasyonda üretime ulaşılabilir.

Petrole alternatif yakıtlardan en çok umut vaad eden etanolün biyoproseslerce üretimi için özellikle son yıllarda çok önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar çeşitli lignoselülozik atıkları da içeren agro-endüstriyel atıkların değerlendirilebilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Ayrıca ürünün ortamdan uzaklaştırılması için fermentasyona entegre bir pervaporasyon sisteminin kurulabilmesi için denemeler yapılmaktadır. Avrupa ülkelerinin çoğu ve Amerika başta olmak üzere, pek çok ülkede bu çalışmalara hız vermek için destek yapılmaktadır. En büyük biyoetanol üreticilerinden olan Brezilya'da 1970 yılında "Yakıt Alkolü Programı" yürürlüğe girmiştir. Ülkede hükümet tarafından konan vergi muafiyetleri ve destekler ile biyoetanol üretimi desteklenmektedir. Amerika'da ise yenilenebilir yakıt standartları ve yasal düzenleme mevcuttur. Ayrıca 2012'ye kadar 22 milyon ton biyoetanol harmanlanması zorunlu hale getirilmiştir. Hindistan'da 2003 yılında bazı bölgelerde % 5 etanol içeren benzin (E5) satışı zorunlu hale getirilmiştir. Kanada'da 2010 yılında benzin tüketiminin % 35'inin E10 olarak kullanılması hedeflenmiştir. Japonya'da ise 2003 yılında E3 satışına izin verilmiştir, Petrobras ile Mitsubishi firmalarının etanol üretmek üzere fizibilite çalışmaları sürdürülmektedir. Ülkemizde 2005 yılı itibarıyla 18012 bin ton mısır, 122685 bin ton buğday, 15181 bin ton şeker kamışı üretilmektedir.

Türkiye'de ise, kullanımda olan enerji kaynaklarının tükenme sürecinin başlamasıyla, son yıllarda enerji çeşitliliğini artırmak, yaygınlaştırmak ve belli enerji kaynağı türlerine büyük oranlarda bağımlı olmamak amacıyla alternatif

yakıt arayışına girilmiştir. Ormanların ve doğal kaynakların daha rasyonel kullanımı, doğal ekolojik dengenin korunması ve karbon emisyon değerlerinin düşürülmesi amacıyla ülkemizde de çeşitli biyoetanol tesisleri kurulmuştur ve toplam üretim kapasitemiz 132000 m³ kadardır.

İlerleyen yıllarda biyoetanol üretiminin ve kullanımının yaygınlaşması ile, tarım sektörünün ürünleri daha iyi değerlendirme imkânı bulacak, bunun da çiftçiye olumlu yansıması kaçınılmaz olacaktır. Gelecekte biyoetanol karışım oranına gelecek düzenlemelere bağlı olarak, ülkemizdeki tüketim miktarının artacağı beklenmektedir ve üretimin agro-endüstriyel atıklardan sağlanması için çalışmalar arttırılmaktadır. Tüm bu beklentiler doğrultusunda; rekombinant *E. coli* KO11'den biyoetanol üretimi için ayva posasının kullanılabilirliğini göstermesi, büyük çapta üretim için en uygun parametrenin belirlenmesi ve pervaporasyonla üretilen etanolün konsantre edilmesi, bu çalışmanın literatürde çalışılan diğer konulara göre özgün değerini oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Alam, N., S., Z. and Razali, F., 2005, Scale-up of stirred and aerated bioengineering bioreactor based on constant mass transfer coefficient, *Jurnal Teknologi*, 43(F): 95–110pp.

Alzate, C., Toro, O., 2006, Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass, *Energy*, 31: 2447-2459pp.

Aristidou, A., Penttilä, M., 2000, Metabolic engineering application to renewable resource utilization., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11: 187-198pp.

Aroujalian, A., Raisi, A., 2009, Pervaporation as a means of recovering ethanol from lignocellulosic bioconversions, *Desalination*, 247: 509–517pp.

Asghari, A., Bothast, R., J., Doran, J., B., Ingram, L., O., 1996, Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 42–47pp.

Badino, Jr, A., C., Facciotti, M., C., R., Schmidell, W., 2001, Volumetric oxygen transfer coefficients (k_{La}) in batch cultivations involving non-newtonian broths, *Biochem. Eng.*, New York, 8: 111-119pp.

van Baelen, D., van der Bruggen, B., van den Dungen, K., Degreve, J., Vandecasteele, C., 2005, Pervaporation of water–alcohol mixtures and acetic acid–water mixtures, *Chem. Eng. Sci.*, New York, 60: 1583–1590pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

van Baelen, D., Reyniers, A., van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Degreve, J., 2004, Pervaporation of binary and ternary mixtures of water with methanol and/or ethanol, *Sep. Sci. Technol.*, 39: 563–580pp.

Bailey, J., E., Ollis, D., F., 1986, Biochemical Engineering Fundamentals - Second Edition, *McGraw-Hill Book Company*, 965pp.

Barbano, D., M., Lynch, J., M., Fleming, J., R., 1991, Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl Analysis: Collaborative study, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 74: 281-288pp.

Barbosa, M., F., S., Beck, M., J., Fein, J., E., Potts, D., Ingram, L., O., 1992, Efficient fermentation of *Pinus* sp acid hydrolysates by an ethanologenic strain of *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1382–1384pp.

Bernfeld, P., Colowick, S., P., Kaplan, N., D., 1955, In *Amylases* Eds., *Methods Enzymol.*, 1: 149–158pp.

Bul, S., Veryklos, X., Mutharasan, R., 1985, *In situ* removal of ethanol from fermentation broths. 1. selective adsorption characteristics, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 24: 1209-1213pp.

Burke, F., 2008, Scale up and scale down of fermentation processes in Practical Fermentation Technology, McNeil Band Harvey LM, *John Wiley & Sons*, USA, 231–269pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cegarra J., Alburquerque J.A., Gonzalez J., Garcia D., 2000, A Survey of Olive –Mill Wastes in Spain: Feasibility of Composting 1st International Workshop on Environmental Problems in Olive Oil Production and Solutions, Zeytinli-Balıkesir, 149-153s.

Cemeroğlu, B., Karadeniz, F., 2001, Meyve ve sebze işleme teknolojisi 2. Cilt: Meyve suyu üretim teknolojisi, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, Ankara, 1-50s.

Chandel, A., K., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, M., L., Rao, L., V., Ravindra, P., 2007, Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (1): 014-032pp.

Chandel, A., K., Kapoor, R., K., Kuhar, S., Gupta, R., Kuhad, R., C., 2006, Bioethanol from crop residues, production forecasting and economics: An Indian perspective, *Lignocellulose biotechnology: current and future prospects (Kuhad RC and Singh A eds)*, I.K.International, New Delhi, India.

Chen, S., H., Liou, R., M., Hsu, C., S., Chang, D., J., Yu, K., C., Chang, C., Y., 2001, Pervaporation separation water/ethanol mixture through lithiated polysulfone membrane, *Journal of Membrane Science*, 193: 59–67pp.

Chovau, S., Gaykawad, S., Straathof, A., J., J., Bruggen, B., 2010, Influence of fermentation by-products on the purification of ethanol from water using pervaporation, *Bioresour. Technol.*, 20pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cysewski, G., R., Wilke, C., R., 1977, Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle, *Biotech. Bioeng.*, USA, 19: 1125pp.

Demirci, A., 2010, Bioreactors and Fermentation Seminar Notes, Ankara, 100pp.

Demirtaş C., Ayhan, T., Kaygusuz K., 1998, Drying Behaviour of Hazelnuts, *Journal Science of Agriculture*, 76: 559–564pp.

Dien, B., S., Cotta, M., A., Jeffries, T., W., 2003, Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 258–266pp.

Di Luccia, M., Borges, C., P., Alves, T., L., M., 2002, Economic analysis of ethanol and fructose production by selective fermentation coupled to pervaporation: effect of membrane costs on process economics, *Desalination*, 147: 161-166pp.

Dumsday, G., J., Zhou, B., Yaqin, W., Stanley, G., A., Pamment, N., B., 1999, Comparative stability of ethanol production by *Escherichia coli* KO11 in batch and chemostat culture, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23: 701–708pp.

Farrell, A., E., Plevin, R., J., Turner, B., T., 2006, *Science*, 311 (5760): 506–508pp.

Feng, X., Huang, R., Y., M., 1997, Liquid separation by membrane pervaporation: a review, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36: 1048–1066pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A., A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G., Martinez, A., 2004, Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 734–741pp.

Geankoplis, C., J., 1993, Transport Processes and Unit Operations - 3rd ed., *New York: Prentice Hall*, 535pp.

Gomez, L., D., Steel-King, C., G., McQueen-Mason, J., 2008, Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the wall, *New Phytologist*, 178: 473-485pp.

Gonzalez-Velasco, J., R., Gonzalez-Marcos, J., A., Lopez-Dehesa, C., 2002, Pervaporation of ethanol-water mixtures through poly (1-trimethylsilyl-1-propyne) (PTMSP) membranes, *Desalination*, 149: 61-65pp.

Govindaswamy, S., Vane, L., M., 2007, Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast, *Bioresource Technology*, 98: 677–685pp.

Gray, K., A., Zhao, L., Emptage, M., 2006, Bioethanol, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10: 141–146pp.

Halkman, A., K., Doğan, H., B., 1999, Gıdalarda *E. coli* sayılmasında TS/ISO 6063'ün değerlendirilmesi, KÜKEM 21(3) 41-48 Bd03.

Han, J., S., 1998, Properties of nonwood fibers, in: proceedings of the Korean society of wood science and technology annual meeting, Korea, 3–12pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Himmel, M., E., Adney, W., S., Baker, J., O., Elander, R., McMillan, J., D., Nieves, R., A., Sheehan, J., Thomas, S., R., Vinzant, T., B., Zhang, M., 1997, Advanced bioethanol production technologies: A perspective, *Fuels and Chemicals from Biomass*, American Chemical Society.

van Hoof, P., L., Dotremont, C., Buekenhoudt, A., 2006, Performance of Mitsui NaA type zeolite membranes for the dehydration of organic solvents in comparison with commercial polymeric pervaporation membranes, *Sep. Purif. Technol.*, 48: 304–309pp.

Huang, Y., Fu, J., Pan, Y., Huang, X., Tang, X., 2009, Pervaporation of ethanol aqueous solution by polyphosphazene membranes: Effect of pendant groups, *Separation and Purification Technology*, 66: 504–509pp.

Huerta-Beristain, G., Utrilla, J., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Gosset, G., Martinez, A., 2008, Specific Ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase, *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 55–64pp.

Herbst, H., Schumpe, A., 1992, Xanthan production in stirred tank fermentation: oxygen transfer and scale-up, *Chem. Eng. Technol.*, 15: 425-434pp.

van Hoof, P., L., Dotremont, C., Buekenhoudt, A., 2006, Performance of Mitsui NaA type zeolite membranes for the dehydration of organic solvents in comparison with commercial polymeric pervaporation membranes, *Sep. Purif. Technol.*, 48: 304–309pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Huang, Y., Fu, J., Pan, Y., Huang, X., Tang, X., 2009, Pervaporation of ethanol aqueous solution by polyphosphazene membranes: Effect of pendant groups, *Separation and Purification Technology*, 66: 504–509pp.

Hubbard, D., W., Ledger, S., E., Hoffman, J., A., 1994, Scaling-up aerobic fermentation which produce non-newtonian and viscoelastic broths, *Netherlands: Klover Academic Publishers*.

Hughmark, G., A., 1980, Power requirements and interfacial area in gas–liquid turbine agitated systems, *Ind. Eng. Chem. Process Design Dev.*, 19: 638–641pp.

Hsueh, C., L., Kuo, J., F., Huang, Y., H., Wang, C., C., Chena, C., Y., 2005, Separation of ethanol–water solution by poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) membranes, *Separation and Purification Technology*, 41: 39–47pp.

Ingraham, R., Lin, J., L., Low, E., C., C., Magasanik, K., B., Reznikoff, B., Riley, W., S., Schaechter, M., Umbarger, M., Bock, H., E., Sawers, G., 1996, Fermentation, Curtiss III (Eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, *ASM Press.*, 1: 262–282pp.

Ingram, L., O., Gomez, P., F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B., E., Yomano, L., P., York, S., W., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (2-3): 204–214pp.

Jamsak, W., Assabumrungrat, S., Douglas, P., L., Croiset, E., Laosiripojana, N., Suwanwarangkul, R., Charojrochkul, S., 2007, Thermodynamic assessment of solid oxide fuel cell system integrated with bioethanol purification unit, *Journal of Power Sources*, 174: 191–198pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jeffries, T., W., Jin, Y., S., 2000, Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts, *Adv. Appl. Microbiol.*, 47: 221–268pp.

Ju, L., K., and Chase, G., G., 1992, Improved scale-up strategies of bioreactors, *J. Bioproc. Eng.*, 8 (1-2): 49-53pp.

Jun, Y., Zhang, J., He, J., Liu, Z., Yu, Z., 2009, Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull, *Bioresource Technology*, 100: 903–908pp.

Kaseno, Miyazawa, I., Kokugan, T., 1999, Effect of product removal by a pervaporation on ethanol fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (5): 488–493pp.

Kiefer, P., Heinzle, E., Wittmann, C., 2002, Influence of glucose, fructose and sucrose as carbon sources on kinetics and stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 338–343pp.

Kim, S., Dale, B., 2004, Global potential bioethanol production from wasted crops and crops residues, *Biomass and Bioenergy* 26: 361-375pp.

Kober, P., A., J., 1987, Pervaporation, perstillation and percrystallization, *J. Am. Chem. Soc.* 39: 944–948pp.

Kornberg, H., L., Lambourne, L., T., M., Sproul, A., A., 2000, Facilitated diffusion of fructose via the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system of *Escherichia coli*, *PNAS*, 97 (4): 1808–1812pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kosaric, N., Vardar-Sukan, F., 2001, Part II: Potential source of energy and chemical products, *The Biotechnology of Ethanol*, 87-227pp.

Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., Laopaiboon, P., 2009, Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations, *Bioresource Technology*, 100: 4176–4182pp.

Lawford, H., G., Rousseau, J., D., 1995, Loss of ethanogenicity in *Escherichia coli* B recombinants PLOI297 and KO11 during growth in the absence of antibiotics, *Biotechnol Lett.*, 17: 751–756pp.

Lawford H., G., Rousseau, J., D., 1996, Factors contributing to the loss of ethanogenicity of *Escherichia coli* B recombinants pLOI297 and KO11, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57: 293–305pp.

Lewandowska, M., Kujawski, W., 2007, Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system, *Jour. of Food Engineering*, 79: 430–437pp.

Licht, F., O., 2006, World Ethanol and Biofuels Report, 15pp.

Lin, Y., Tanaka, S, 2006, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 627–642pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Luccio, M., D., Borges, C., P., Tito, L., Alves, M., 2002, Economic analysis of ethanol and fructose production by selective fermentation coupled to pervaporation: effect of membrane costs on process economics, *Desalination*, 147: 161-166pp.

Ma, H., Wang, Q., Qian, D., Gong, L., Zhang, W., 2009, The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage, *Renewable Energy*, 34: 1466–1470pp.

Marques, M., P., C., Cabral, J., M., S., Fernandes, P., 2010, Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale , *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Society of Chemical Industry.

Martinez, A., York, S., W., Yomano, L., P., Pineda, V., L., Davis, F., C., Shelton, J., C., Ingram, L., O., 1999, Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdv* , *adhB*) in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Prog.*, 15: 891–897pp.

Matsumura, M., Kataoka, H., 1987, Separation of dilute aqueous butanol and acetone solutions by pervaporation through liquid membranes, *Biotechnol. Bioeng.*, 30: 887–895pp.

McAloon, A., Taylor, F., Yee, W., Ibsen, K., Wooley, R., J., 2000, NREL/TP-580-28893.

Midler, M., and Finn, R., K., 1966, Model system for evaluating shear in the design of stirred fermenters, *Biotechnol. Bioeng.*, 8: 71pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Miller, G., L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31: 426pp.

Mohamad, R., Ariff, A., Mohd., Yusoff, H., and Kamal, M., N., 2001, Fermenter Design and Scale-up, University Putra Malaysia: Fermentation Unit Technology, Bioscience Institute.

Moniruzzaman, M., Lai, X., York, S., W., Ingram, L., O., 1997, Isolation and Molecular Characterization of High-Performance Cellobiose-Fermenting Spontaneous Mutants of Ethanologenic *Escherichia coli* KO11 Containing the *Klebsiella oxytoca casAB* Operon, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12): 4633–4637pp.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 96: 673–686pp.

Nigeria, B., O., S., 2010, Various Biofuels feedstocks and the associated issues, Biofuels: Policies, Standards and Technologies, *World Energy Council*, 1-24pp.

Nielsen, D., R., Daugulis, A., J., McLellan, P., J., 2003, A novel method of simulating oxygen mass transfer in two-phase partitioning bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 83: 735-742pp.

O'Brien, D., J., Roth, L., H., McAloon, A., J., 2000, Ethanol production by continuous fermentation–pervaporation: a preliminary economic analysis, *Journal of Membrane Science*, 166: 105–111pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

O'Brien, D., J., Senske, G., E., Kurantz, M., J., Craig Jr., J., C., 2004, Ethanol recovery from corn fiber hydrolysate fermentations by pervaporation, *Bioresource Technology*, 92: 15–19pp.

Ohta, K., Beall, D., S., Mejia, J., P., Shanmugam, K., T., Ingram, L., O., 1991, Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase, *II. Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 893–900pp.

Okuda, N., Ninomiya, K., Takao, M., Katakura, Y., and Shioya, S., 2007, Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11, *J. Biosci. Bioeng.*, 103: 350–357pp.

Okuda, N., Ninomiya, K., Katakura, Y., Shioya, S., 2008, Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: inoculum size increase and coculture with *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105 (2): 90–96pp.

Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 312–331pp.

Qureshi, N., Dien, B., S., Nichols, N., N., Saha, B., C., Cotta, M., A., 2006, Genetically engineered *Escherichia coli* for ethanol production from xylose substrate and product inhibition and kinetic parameters, *Food and Bioproducts Processing*, 84(C2): 114–122pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Parisi, F., 1989, Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates, *Adv. Biochem. Eng.*, 38: 53-87pp.

Peter, C., P., Lotter, S., Maier, U., Buchs, J., 2004, Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments, *Biochem. Eng. J.*, 17: 205–215pp.

Raposo, S., Pardao, J., M., Diaz, I., Lima-Costa, M., E., 2009, Kinetic modelling of bioethanol production using agro-industrial by-products, *International Journal of Energy and Environment*, 3: 1-8pp.

Rebah, B., F., Prévost, D., Yezza, A., Tyagi, R., D., 2007, Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review, *Bioresour. Technol.*, 98(18): 3535-46pp.

Rushton, J., H., Costich, E., W., Everett, H., J., 1950, Power characteristics of mixing impellers, *Chem. Eng. Prog.*, 46(2): 467pp.

Saha, B., C., Iten, L., B., Cotta, M., A., Wu, Y., 2005, Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of RHs to fuel ethanol, *Biotechnol. Progr.*, 21: 816–822pp.

Schmidt, F., R., 2005, Optimization and scale up of industrial fermentation processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 425–435pp.

Seader, J., D., Henley, E., J., 1998, Separation Process Principles - 2nd Edition, *John Wiley & Sons*, 920pp.

Slater, C., S., Hickey, P., J., Juricic, F., P., 1990, Pervaporation, *Sep. Sci. Technol.*, 25: 1063–1077pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Staniszewski, M., Kujawski, W., Lewandowska, M., 2007, Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions, *J. Food Eng.*, 82 (4): 618–625pp.

Stephanopoulos, G., 1999, Metabolic fluxes and metabolic engineering, *Metab. Eng.*, 1: 1–11pp.

Sun, Y., Cheng, J., 2002, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Biores. Technol.*, 83: 1-11pp.

Tao, H., Gonzalez, R., Martinez, A., Rodriguez, M., Ingram, L., O., Preston, J., F., Shanmugam, K., T., 2001, Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli* : increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation, *J. Bacteriol.*, 183: 2979–2988pp.

Thongsukmak, A., Sirkar, K., K., 2009, Extractive pervaporation to separate ethanol from its dilute aqueous solutions characteristic of ethanol-producing fermentation processes, *Journal of Membrane Science*, 329: 119–129pp.

Trinh, C., T., Huffer, S., Clark, M., E., Blanch, H., W., Clark, D., S., 2010, Elucidating mechanisms of solvent toxicity in ethanologenic *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, 106 (5): 721–730pp.

Underwood, S., A., Buszko, M., L., Shanmugam, K., T., Ingram, L., O., 2002, Flux through Citrate Synthase Limits the Growth of Ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during Xylose Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (3): 1071–1081pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Walkley, A. and Black, I., A., 1934, An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents, *Soil Sci.*, 63: 251-263pp.

Wang, J., Ma, Y., Tsuru, T., 2010, Prediction of pervaporation performance of aqueous ethanol solutions by nanoporometry characterization, *Separation and Purification Technology*, 74: 310–317pp.

Wei, Z., Xingju, Y., Quan, Y., 1995, Ethanol fermentation coupled with complete cell recycle pervaporation system: Dependence of glucose concentration, *Biotechnology Techniques*, 9(4): 299-304pp.

Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003, Techno-Economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks, *Biotechnol. Prog.*, 19: 1109-1117pp.

Wyman, C., E., Hinman, N., D., 1999, Ethanol fundamentals of production from renewable feedstocks and use as transportation fuel, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24 (25): 735-75pp.

Wyman, C., E., Dale, B., E., Elander, R., T., Holtzapple, M., Ladisch, M., R., Lee, Y.,Y., 2005, Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover, *Biores. Technol.*, 96 (18): 2026-2032pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yu, J., Lee, C., H., Hong, W., H., 2002, Performances of cross-linked asymmetric poly(vinyl alcohol) membranes for isopropanol dehydration by pervaporation, *Chem. Eng. Process.*, 41: 693–698pp.

Yurdagel, Ü., Yaman, Ü.R., Baysal, T., 1997, Meyve Sebze İşleme Sanayinde Atık Su Arıtılması, Artık ve Atıkların Değerlendirilmesi, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 200pp.

Zah, R., 2007, *Schlussbericht*; EMPA: St. Gallen, Switzerland.

Zhang, H., Williams-Dalson, W., Keshavarz-Moore, E., Shamlou, P., A., 2005, Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas–liquid mass transfer in shake flasks, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 41: 1–8pp.

Zhang, S., Marechal, F., Gassner, M., Pe´rin-Levasseur, Z., Qi, W., Ren, Z., Yan, Y., Favrat, D., 2009, Process modeling and integration of fuel ethanol production from lignocellulosic biomass based on double acid hydrolysis, *Energy & Fuels*, 23: 1759–1765pp.

Türkiye İstatistik Kurumu, “Bitkisel Üretim İstatistikleri”, <http://www.tuik.gov.tr/Start.do> (Erişim tarihi: 5 Ocak 2011).

Türkiye Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü, “Biyoeetanol”, <http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenerji/biyoenerji.html> (Erişim tarihi: 5 Ocak 2011).

ÖZGEÇMİŞ

İrem Deniz, 7/03/1986 tarihinde Ankara’da doğmuştur. İlk öğreniminin bir kısmını Gemlik/Bursa’da, diğer kısmını Avcılar/İstanbul’da ve orta öğrenimini Manisa’da tamamlayan Deniz, lisans öğrenimine 2004 yılında İzmir Ege Üniversitesi’nde Biyomühendislik Bölümü’nde başlamıştır ve 9/07/2008 tarihinde lisans eğitimini üçüncülük ünvanıyla tamamlamıştır. Aynı yıl içinde Ege Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. 2008 yılında, IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi’nde dinleyici olarak, 2010 yılında V. Ulusal Biyomühendislik Kongresi’nde görevli olarak ve “The Fourth Annual Workshop of COST FP0602 – Biotechnical Processing of Lignocellulosic Raw Materials” aksiyonunda sekretery ekibinde görevli olarak yer almıştır. Bu aksiyon süresince “Enhanced Bioethanol Production from *E. coli* KO11” ismiyle bir poster çıkaran İrem DENİZ, iyi derecede İngilizce ve başlangıç seviyesinde Almanca bilmektedir.