

66642

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜREKLİ ETİL ALKOL FERMENTASYONU
PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek ÜSTÜN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

(Temel İşlemler ve Termodinamik Programı)

Danışman: Prof. Dr. Umur DRAMUR

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
FERMENTASYON MERKEZİ

HAZİRAN 1997

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, mikroorganizma olarak PAKMAYA ve *Saccharomyces cerevisiae* cinsi maya, karbohidrat kaynağı olarak da glukoz kullanılarak, kesikli ve sürekli fermentasyon yöntemleri ile etanol üretimi incelenmiştir.

Bu çalışmayı yapmamda bana yol gösterici olan, maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Umur Dramur'a şükranlarımı sunmak isterim.

Ayrıca Sayın Prof. Dr. Ahmet Aydın ve Sayın Doç Dr. Beşir Tatlı'ya da teşekkür etmek isterim.

Çalışmalarımın her aşamasında benimle yakından ilgilenen, karşılaştığım problemlere benimle beraber çözüm arayan Sayın Yard.Doç. Dr. Ş. İsmail Kırbaşlar ve Sayın Yard. Doç. Dr. Muzaffer Yaşar'a da teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimimde ve danıştığım her konuda desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin Gülensoy'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın aksamadan tamamlanabilmesi için gerekli yardımlarını esirgemeyen Proses ve Reaktör Tasarımı Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İsmet Gürgey'e ve Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat Orbay'a teşekkür ederim.

Tezimin her safhasında sabırla ve özveriyle bana yardım eden arkadaşlarım Araştırma Görevlisi F. Ebru Çerçi'ye, Araştırma Görevlisi Erol İnce'ye ve Matematik Mühendisi A. Feyza Dikmen'e gösterdikleri gayret ve verdikleri destek için teşekkürlerimi sunarım

Analizlerde gösterdiği titiz çalışması ve verdiği moral desteği için Sayın Uzman Emel Keskinocak'a, mikrobiyoloji konusunda bilgilerinden yararlandığım, İ.Ü. Veterinerlik Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Kamil Bostan ve Uzman Hilal Çolak ile Biyolog Ayşe Boşluk'a ve İ.T.Ü. Kimya Mühendisliği Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yüksel Avcıbaşı Güvenilir'e de teşekkür ederim.

Anabilim Dalı'mızdaki tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak da beni bu günlere getiren, maddi manevi her konuda sonsuz desteklerini gördüğüm anneme, babama ve kardeşim Gıda Mühendisi Meltem Üstün'e teşekkür etmek istiyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZ ve ABSTRACT	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
TABLO LİSTESİ	VII
I. GİRİŞ	
1.1. Amaç	1
1.2. Tarihçe	1
1.3. Etil Alkol	3
1.3.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
1.3.2 Etil Alkolün Üretim Yöntemleri	
1.3.2.1. Fermentasyon ile Alkol Üretimi	4
1.3.2.2. Sentez Yoluyla Alkol Üretimi	
1.3.2.2.1. İndirekt Hidrasyon Yöntemi ile Alkol Üretimi	8
1.3.2.2.2. Direkt Katalitik Hidrasyon Yöntemi ile Alkol Üretimi	9
1.3.2.2.3. Sentez Gazı ile Alkol Üretimi	9
1.3.3. Türkiye’de Etil Alkol Sektöründeki Kurulu Kapasite ve Etil Alkol Üretimi	10
1.3.4. Etil Alkolün Kullanım Alanları	
1.3.4.1. Alkollü İçkilerde	11
1.3.4.2. Kozmetik ve Tıp Alanında	11
1.3.4.3. Teknikte	12
1.4. Mikroorganizmalar	
1.4.1. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması	14
1.4.2. Mikrobiyal Adlandırma	15
1.5. Mayalar	15
1.6. Enzimler	16
1.7. Fermentasyon	18

1.8. Fermentasyon Ürünleri	
1.8.1. Fermentasyon Ana Ürünleri	23
1.8.1.1. Etil Alkol	23
1.8.1.2. Karbondioksit	23
1.8.2. Fermentasyon Yan Ürünleri	23
1.8.2.1. Gliserin	24
1.8.2.2. Asetaldehit	24
1.8.2.3. Füzel Yağı (Yüksek Alkoller)	24
1.8.2.4. Asit ve Esterler	25
1.8.2.5. Metil Alkol	25
1.9. Fermentasyonu Etkileyen Faktörler	26
1.9.1. Maya Türü ve Suşu	26
1.9.2. Şeker Konsantrasyonu	26
1.9.3. Havanın Bileşimi	27
1.9.4. Sıcaklık	27
1.9.5. pH	27
1.9.6. Maya Konsantrasyonu	27
1.9.7. Alkol Konsantrasyonu	28
1.9.8. Besiyeri Bileşimi	28
1.9.9. Fermentasyon Sıvısının Hareketi	28
1.9.10. Bakteriyal Gelişimin Önlenmesi	28
1.9.11. Fermente Edilmiş Lapanın Destilasyonu	29
1.10. Fermentasyon Tenolojisindeki Gelişmeler	29
1.11. Sterilizasyon	30
1.10.1. Isı ile Sterilizasyon	31
1.10.2. Membran Filtrasyon ile Sterilizasyon	32
1.10.3. Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon	32
1.10.4. Işınlama ile Sterilizasyon	33
II. MATERYAL VE METOD	
2.1 Mikroorganizma	34
2.2 İnokulum Ortamı	34
2.3 Fermentasyon Ortamı	34

IV

2.4 Kimyasallar	
2.4.1 İnokulum ve Fermentasyon Ortamı İçin Kullanılan Kimyasallar	34
2.4.2 Analizlerde Kullanılan Kimyasallar	35
2.5 Analiz Yöntemleri	
2.5.1 Glukoz Miktarının Belirlenmesi	36
2.5.2 Etanol Miktarının Belirlenmesi	36
2.6 Kesikli Fermentasyon Denemeleri	37
2.7 Sürekli Fermentasyon Denemeleri	38
III. BULGULAR	
3.1 Reaktan (Glukoz) Miktarının Belirlenmesi	
3.1.1 UV Çalışmaları	
3.1.1.1 Glukoz İçin Maksimum Absorbansı Veren Dalga Boyunun Bulunması	39
3.1.1.2 Glukoz Konsantrasyonu İle Absorbans Arasındaki Bağıntının Belirlenmesi	40
3.1.1.3. Analiz Sonuçları	40
3.2 Ürün (Alkol) Miktarının Belirlenmesi	42
3.2.1 GC Çalışmaları	42
3.3 Fermentasyon Ortamındaki Maya Miktarının Belirlenmesi	49
3.4 Deney Sonuçlarına Ait Grafikler	49
IV. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
V. ÖZET	53
VI. KAYNAKLAR	57
VII. ÖZGEÇMİŞ	59

ÖZ VE ABSTRACT

Sürekli Etil Alkol Fermentasyonu Parametrelerinin İncelenmesi

Bu çalışmada sürekli fermentasyon ile alkol üretimi laboratuvar ölçekli bir fermentörde yapılmıştır. Fermentasyon mikroorganizması olarak PAKMAYA ve *Saccharomyces cerevisiae* kültür mayası, karbohidrat kaynağı olarak da glukoz kullanılmıştır.

Reaksiyonlar $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de en az 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Zamanla azalan glukoz miktarı kolorimetrik yöntemle, oluşan alkol ise gaz kromatografisinde tayin edilmiştir. Mayanın fermentasyon başlangıcında ve sonundaki miktarı ise dilüsyon tekniği ile hesaplanmıştır.

Denemeler sonunda, sürekli fermentasyonda, *S. cerevisiae* kültür mayası kullanarak ve ortam pH'ını sabit tutarak istenen konsantrasyondaki alkol, kesikli fermentasyon yöntemine göre daha kısa sürede elde edilmiştir. Ayrıca PAKMAYA yerine kültür mayası kullanmanın da verimi artırdığı görülmüştür.

ABSTRACT

Analysis of Continuous Ethanol Fermentation Parameters

In this study, ethanol production by continuous fermentation is performed. PAKMAYA and *Saccharomyces cerevisiae* culture yeast are used as the fermentation microorganism and glucose as the carbohydrate source.

The reactions are realized at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for at least 72 hours.

The time dependence of glucose is determined by colorimetric method. The amount of ethanol produced is also determined by gas chromatography. The amount of yeast in the beginning and in the end of the fermentation is calculated by dilution count technique.

In the end of the experiments the desired alcohol concentration is obtained by continuous fermentation and by keeping the pH of the medium constant. It is also seen that using culture yeast instead of PAKMAYA increases the yield.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Klasik Yöntemle Melastan Etanol Eldesi	6
Şekil 1.2 Tek Hücrelilerin Sınıflandırılması	14
Şekil 1.3 Embden-Meyerhof Yoluyla Glukoz-Parnas'a Göre Mayanın Glukoz Metabolizması Yolu	22
Şekil 1.4 Filtrasyon ile Sterilizasyon	32
Şekil 2.1 Karıştırılmalı Akışlı Fermentör	38
Şekil 2.2 Fermentörün Karıştırıcı Ayarı İle Devir Sayısı Arasındaki İlişki	38
Şekil 3.1 UV'de 10µg/ml 'lik Glukoz Çözeltilisi İçin Uygun Dalga Boyunun Seçimi	39
Şekil 3.2 Glukoz Standart Grafiği	40
Şekil 3.3 I ve II nolu Denemelerde Kullanılan Standart Eğri	43
Şekil 3.4 III nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri	44
Şekil 3.5 IV nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri	45
Şekil 3.6 V nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri	46
Şekil 3.7 VII nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri	48
Şekil 3.8 Analizlerden Birine Ait Örnek Kromotogram	48
Şekil 3.9 I nolu Denemenin Sonucu	49
Şekil 3.10 II nolu Denemenin Sonucu	49
Şekil 3.11 III nolu Denemenin Sonucu	50
Şekil 3.12 IV nolu Denemenin Sonucu	50
Şekil 3.13 V nolu Denemenin Sonucu	50
Şekil 3.14 VI nolu Denemenin Sonucu	51
Şekil 3.15 VII nolu Denemenin Sonucu	51

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Saf Alkolün Sıcaklık - Özgül Ağırlık İlişkisi	3
Tablo 1.2 Etanolün Fiziksel Özellikleri	5
Tablo 1.3 1984 Yılından İtibaren Türkiye’de Etil Alkol Üretiminde Kurulu Kapasite	10
Tablo 1.4 Türkiye’de Etil Alkol Üretimi ($\times 10^3$ Litre)	11
Tablo 1.5 Enzimlerin Sistemik Sınıflandırılmasının Bir Bölümü	18
Tablo 1.6 Fermentasyon Süresi - pH - %Verimi Arasındaki İlişki	27
Tablo 1.7 Bazı Laboratuvar Malzemelerinin Hacimlerine Bağlı Olarak Sterilizasyon Süreleri	31
Tablo 2.1 Denemelerde Kullanılan Fermentasyon Ortamları	35
Tablo 3.1 10 μ g/ml ‘lik Glukoz Çözeltisi İçin Uygun Dalga Boyunun Seçimi	39
Tablo 3.2 495 nm’de Farklı Konsantrasyondaki Glukoz Çözeltileri İçin Absorbans Değerleri	40
Tablo 3.3 Numunelerin UV Spektrofotometresinde Alınan Sonuçları	41
Tablo 3.4 I ve II nolu Denemelerde Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları	43
Tablo 3.5 III nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları	44
Tablo 3.6 IV nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları	45
Tablo 3.7 V nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları	46
Tablo 3.8 VI nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları	47
Tablo 3.9 VII nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli ve Sürekli Fermentasyon Deneme Sonuçları	47

I. G İ R İ Ş

1.1 Amaç

Bu çalışmada sürekli ve kesikli fermentasyon yöntemleri ile etil alkol üretimi incelenmiştir. Mikroorganizma olarak PAKMAYA ve *Saccharomyces cerevisiae*, karbohidrat kaynağı olarak da glukoz kullanılmıştır.

1.2 Tarihçe

Mikroorganizmaların rol aldığı biyolojik olaylar ve meydana getirdikleri ürünler binlerce yıldan beri bilinmektedir. İlk insanların belirli bir müddet bekletilen meyvelerin sularını içtiklerinde keyif duygusunu almalarıyla başlayan bu süreç, toprak ve ağaç kaplarda, meyve kabuklarında; tulumlarda, ilk fermentasyon tekniklerinin doğmasına, başka bir deyişle mikrobiyolojik esasa dayalı bir tekniğin ilk defa ortaya çıkmasına yol açmıştır.

Arkeologlara göre, aşağı Mısır ve Mezapotamya arasında kalan bölgede üzüm suyundan şarabın eldesi en az 10000 yıldan beri biliniyordu. Şarabın Avrupa'da yayılması ise, Roma İmparatoru Marcus Aurelius Probus (M.Ö. 282-276) zamanında Romalıların gittikleri yerlere asma kültürünü de beraberlerinde götürmeleriyle gerçekleşmiştir.

Tarihi kayıtlardan Babil'de 20 çeşit bira benzeri içkinin yapıldığı ve Hamurabi Kanunları'ndan bu içkileri içenler ve satanlar hakkında ceza hükümleri getirildiğini öğreniyoruz.

M.S. 9. yüzyılda, Arap kimyagerleri hurma şarabından alkol elde etmek için bir metod geliştirilmişler ve elde ettikleri ürüne de "En Asil" anlamına gelen "Alkol" (El-Kuul) adını vermişlerdir.

İlk defa 1595 yılında Libavius, fermentasyon (Fermantatio) ile kokuşma (Putrefactio) olaylarının ayrı şeyler olduğunu belirtmiştir. İnsanlar tarafından kullanılan bütün bu geleneksel fermentasyon proseslerinin gerek ekonomisinde ve gerekse faydalanma biçimlerinde son yüz yıla kadar esaslı bir değişiklik olmamıştır. Yöntemlerin başarısı çoğu kez rastlantıya bağlı kalmış ve cereyan eden olaylar daima doğa üstü güçlere yorulmuştur.

Bundan yaklaşık 100 yıl sonra Becker şeker içeren sıvıların fermente olduğunu ve sonuçta alkol oluştuğunu savunmuştur. Helmont 1648'de fermentasyon sırasında gaz çıktığını, Wren de bu gazın CO₂ olduğunu göstermişlerdir.

Daha sonra Lavoisier 1789'da, şekerin fermentasyon yoluyla tamamen alkol ve CO₂'e parçalandığını göstermiş, 1810 yılında ise Gay-Lussac, alkol fermentasyonunun kimyasal reaksiyonunu ortaya koymuştur. Buna göre,



reaksiyonu ile 1 molekül sakkarozdan 4 molekül alkol ve 4 molekül CO₂ meydana gelmektedir.

1828'de Dumas bu eşitliği,



şeklinde ifade etmiştir.

Antonius Van Leeuwenhoeck kendi yaptığı mikroskopla, çeşitli ortamları inceleyerek ilk defa mikroorganizmaların resimlerini çizmiş ve onlara "Küçük Hayvancıklar" adını vermiştir. Bu buluş, fermentasyon mikrobiyolojisinde önemli adımlar atılmasına yol açmıştır.

1837'de Schwann, fermentasyon reaksiyonlarında maya hücrelerinin önemli bir rol oynadığını söylemiştir. Meyen ise, bu organizmaya "Şeker Mantarı" anlamına gelen *Saccharomyces* adını vermiştir.

Pasteur, besin maddelerinde bozulmayı önlemek için düşük ısı uygulamasının yeterli mikroorganizma inaktivasyonunu karşılayamayacağını kanıtlamıştır. Ayrıca, başka bir çalışmada da, besin maddelerinin ısı etkisiyle sterilize edilebileceğini göstermiştir. Böylece, ilk olarak sterilizasyon tekniğinin ilkeleri ortaya konmuştur. Pasteur, denemeleriyle alkol fermentasyonunun canlı varlıklar tarafından yapıldığını kesin olarak ortaya koyarak, fermentasyonun kimyasal-katalitik bir parçalanma olayı değil, "Vitalitik" (biyokimyasal) bir olay olduğunu ispatlamıştır.

Fermentasyona maya hücresinde bulunan ve "ferment" adı verilen bir maddenin neden olduğu ilk defa 1858 yılında Traube tarafından ortaya konmuştur. Buchner, hücre zarını parçalama suretiyle şekeri parçalayabilen bir sıvı elde etmiş ve buna "Zimas" (Zymase) adını vermiştir.

Seynes ise, belli tür mayalarda spor oluştuğunu göstermiştir. Botanikçi Rees tarafından birçok mayada aynı cins sporların bulunduğu gösterilmiş ve böylece ilk olarak *Saccharomyces* cinsi tespit edilmiştir (1).

1.3 Etil Alkol

1.3.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Etil alkol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, berrak, renksiz, keskin kokulu, yakıcı tatta, uçucu bir sıvıdır. Metil karbinol veya kısaca etanol de denir (2). Üretildiği hammaddeye göre hububat alkolü, buğday alkolü, melas alkolü vs. adları da alabilir. Endüstriyel alkol, sınai maksatlarla kullanılan etil alkoldür. Bu terim, benzin ve diğer motor yakıtları ile birlikte kullanılan yakıt alkolünü de kapsar (3).

Etil alkolün elementel bileşimi %52.18 karbon, %34.78 oksijen ve %13.04 hidrojen şeklindedir. Su, eter ve çok sayıda organik sıvılarla kolayca karışabilir. Alkol, doğada fermentasyona uğramış bulunan her tür sıvıda ve keza çok az olmakla birlikte bitkisel ve hayvansal dokularda bulunur.

Su ihtiva etmeyen alkole “mutlak alkol” denir. Saf alkolün özgül ağırlığı sıcaklıkla değişir. Bu, Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1 Saf Alkolün Sıcaklık-Özgül Ağırlık İlişkisi

Sıcaklık, °C	Özgül Ağırlık
0	0.8067
4.0	0.8095
15.0	0.7950
15.5	0.7946
20.0	0.7901

Su ile karışımı, karışım oranına göre ve 15°C ’ de, 0.795-1.0 arasında bir özgül ağırlığa sahiptir. 1 kg saf alkol yanınca 7000 kcal açığa çıkar. Hacmen %3.1-12.45 bileşimindeki alkol-hava karışımı, ateş veya kıvılcımla temas ederse patlama ile tutuşur. Alkol su ile karıştırıldığında kontraksiyona (hacim küçülmesi) uğrar ve bu hacim küçülmesi 53.939 hacim alkol ile 49.816 hacim su karışımında maksimum seviyededir. Belirtilen oranlarda alkol ve su karıştırıldığında toplam hacim 103.755 olması gerekirken tam 100° dür (4).

Piyasada ve teknikte sulu alkoldeki alkol miktarı hacimli yüzde olarak anlatılır ve buna alkol derecesi denir. Örneğin 95° lik alkol demek 100 ml sulu alkolde 95 ml saf alkol var

demektir (5). Alkol miktarını belirlemek için kullanılan bir birim de “proof” tur. Proof, hacmen ifade edilen % Alkol miktarının iki katıdır. Örneğin, % 95’lik alkol çözeltisi 190 proof’tur (3).

Eğer etanol kullanılan ortamda iyi bir havalandırma mevcutsa kısa süreli etanol buharı solumanın bilinen çok büyük bir tehlikesi yoktur. Uygunsuz kullanımı ya da yetersiz havalandırmadan kaynaklanan, etanolün uzun süre solunması, gözlerde ve üst solunum yollarında tahriş, baş ağrısı, sinirlilik, baş dönmesi, titreme, yorgunluk, bulantı ve uyuşturucu etki yapar. Çalışma anındaki konsantrasyon ve kurulacak bir alarm sistemi olası kazaları azaltacaktır. Havadaki etanol buharının eşik miktarı 1000 ppm olarak belirlenmiştir.

Etanol, vücutta CO₂ ve H₂O vermek üzere yanar. Bu nedenle vücutta, birikmeden kaynaklanan bir zehirlenme etkisi görülmez. Alkolden zehirlenme ve sarhoşluk, alkolün buhar olarak solunmasından çok ağız yoluyla vücuda alınmasından kaynaklanır. Ortalama bir insan, ağızdan yaklaşık 75-80 g alkol aldığıında sarhoşluk belirtileri gösterir. 150-200 g alkol insanda uyuşukluğa neden olur ve 250-500 g’ı ise öldürücü doz olabilir (6a).

Etanolün bazı fiziksel özellikleri Tablo 1.2’de gösterilmiştir.

1.3.2 Etil Alkolün Üretim Yöntemleri

Etil alkol fermentasyon ile veya kimyasal sentez ile üretilebilir.

1.3.2.1 Fermentasyon ile Alkol Üretimi

Fermentasyon yoluyla etanol üretiminde kullanılan hammaddeler üç sınıfta toplanırlar (2):

1. Sakkarozlu maddeler : Şeker kamışı, şeker pancarı, melas, meyve suları
2. Nişastalı maddeler : Tahıllar (mısır, malt, arpa, çavdar, buğday, pirinç, yulaf) ve benzerleri
3. Selülozlu maddeler : Odun ve atık sülfite çözeltileri, tarım atıkları

Şeker kamışı, şeker pancarı, melas ve meyvelerden elde edilen şekerler, direkt olarak etanole dönüştürülebilirler. Hububat ve patatesten elde edilen nişasta ise önce, malt ve küflerden sağlanan enzimlerin tesiriyle fermente olabilen şekerlere hidroliz edilmelidirler. Ağaç ve tarım atıklarından elde edilen selüloz da aynı şekilde şekerlere dönüştürülmelidirler. Bu olayda mineral asitler ve özel enzimlerin etkisinden yararlanılır. Selülozun enzimatik olarak ayrılması için gereken selülaz enzimi, *Trichoderma reesei* den elde edilir. Kağıt hamuru değirmenlerinden çıkan atık sülfite sıvısındaki şeker, kağıt üretimi sırasında selüloz ve hemiselülozun hidrolizinden meydana gelir.

Tablo 1.2 Etanolün Fiziksel Özellikleri (6a)

Molekül Ağırlığı	46.7 kg/mol·kg
Donma noktası	-114.15 °C
Kaynama noktası	78.32 °C
Füzyon ısısı	4.64 kJ/kg
Buharlaştırma ısısı	
70 °C'de	855.66 kJ/kg
80 °C'de	900.83 kJ/kg
100 °C'de	799.05 kJ/kg
Spesifik ısısı (16-21 °C)	2.415 J·g ⁻¹ ·K ⁻¹
Isıl iletkenlik (20 °C)	18 μW·m ⁻¹ ·K ⁻¹
Yanma ısısı (sabit hacimde)	1370.82 kJ/mol
Viskozite (20 °C)	1.17 mPa
Yüzey gerilimi (20 °C)	22.03 mN/m
Kırılma indeksi n _D ²⁰	1.36048
Yoğunluk d ₄ ²⁰	0.78942
Havada alevlenme sınırı:	
en düşük	% 3.5 (v)= 67 g/m ³
en yüksek	%15 (v)=290 g/m ³
Tutuşma noktası (autoignition)	425 °C
Alevlenme noktası (flash point)	13 °C

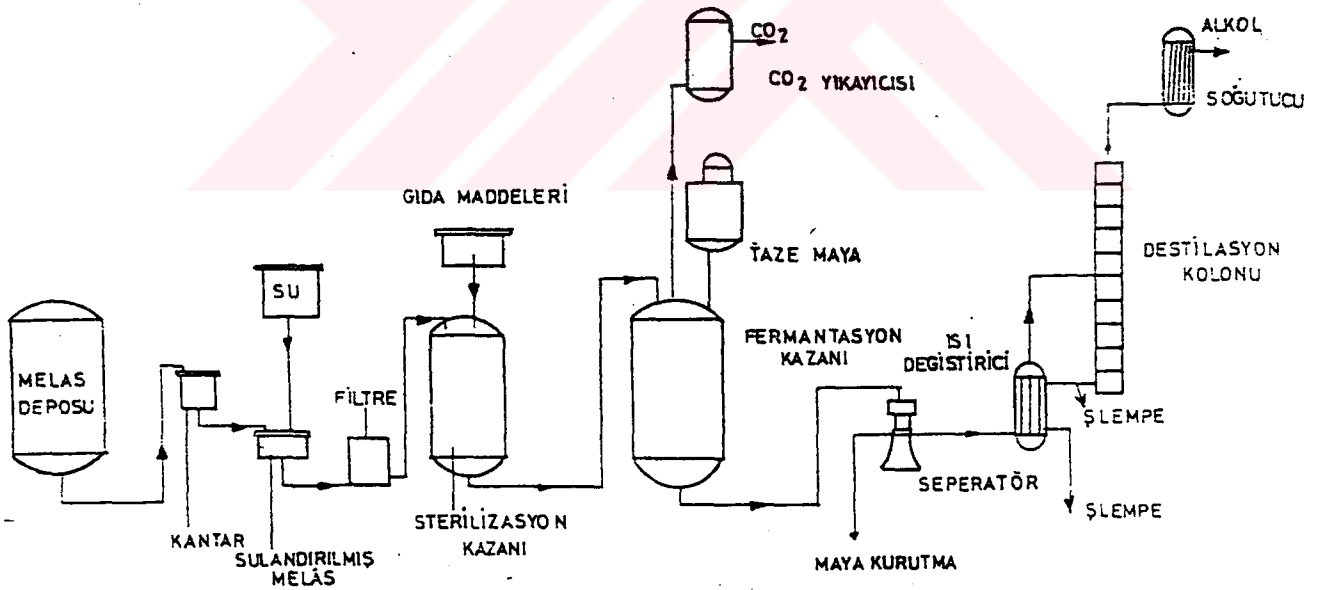
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CO_2 + 2 C_2H_5OH$ denklemi uyarınca, alkol fermentasyonunun farklı adımları için gereken enzimler mayalardan elde edilir. Bu adımlar Embden, Meyerhof ve Parnas tarafından gösterilmiştir (Şekil 1.3). Yabani mayalar da fermentasyon için kullanılabilirler, ancak yüksek etanol konsantrasyonu sağladıklarından genellikle kültür mayaları tercih edilmektedirler.

Monosakkaritler de (heksozlar) fermentasyon için uygundur. Etanol üretmek için genelde ham melastan elde edilen heksoz kullanılır. Çünkü heksoz, şeker kamışından şeker elde etmek için ekonomik bir hammaddedir ve sadece rafinatta seyreltik çözelti olarak kalan kısımdan fermente edilir. Fermentasyon için şekerin ilk saflaştırma adımından sonra elde edilen

melas daha da uygundur. Çünkü melas, mayaların beslenmesinde gerekli olan azot ve fosforlu bileşikleri içeren daha fazla sayıda madde ihtiva etmektedir.

Melas genellikle, %50-55 oranında şeker içerir. Melasın etanol fermentasyonunda hammadde olarak mı, yoksa mikroorganizmalara besin kaynağı olarak mı kullanılması konusunda bir rekabet vardır.

Pratikte hâlâ iki aşamalı kesikli fermentasyon yöntemi kullanılmaktadır. İlk adım, mayaların büyümesi için fermentasyon sıvısına hava üfleyerek gerçekleştirilir. Sıcaklık 27 °C dir. İkinci adım havasız ortamda gerçekleştirilir. Ortamın pH'ı, karşılaşılan duruma göre NH₃ veya H₂SO₄ ilave edilerek 5.6-5.8 değerlerinde sabit tutulmaya çalışılır. Melas kullanıldığında zaten yüksek olan mayşenin mineral içeriğine bağlı olarak, mayaların beslenmesi için ortama amonyum fosfat eklenmelidir. Kültür mayaları kullanıldığında %30 oranında etanol elde etmek mümkündür. Şekil 1.1'de klasik yöntemle melastan etanol eldesine ait bir akım şeması görülmektedir.



Şekil 1.1 Klasik Yöntemle Melastan etanol Eldesi (7)

Etanol fermentasyonu için, genellikle nişasta içeren hububat ile patates kullanılmaktadır. Çavdar ve buğday da aynı amaç için kullanılabilir. Arpa ise polisakkarit nişastasının monosakkaritlere depolimerizasyonu için gerekli olan enzimleri yani amilaz'ı içeren malt'ı yapmakta kullanılır.

Nişasta suda çözünen amiloz (amylose) ve suda çözünmeyen amilopektin (amylopectine) olarak iki kısım içerdiğinden, ilk önce tamamen çözünür hale getirilmelidir. Bunun için nişasta ya atmosfer basıncında pişirilir, ya da 6 bar'a kadar gittikçe yükseltelen basınçtaki doymuş buhar, nişasta ihtiva eden maddenin yüzeyine üflenir.

Çözünmüş nişastanın depolimerizasyonu takiben 60 °C de, malt olarak nişasta ağırlığının yaklaşık %10'u ilave edildikten sonra gerçekleştirilir. Bu arada H₂SO₄ ilavesi ile de pH 5.2-5.4 arasında sabit tutulur.

Nişasta fermentasyonu şeker fermentasyonuna benzer şekilde gerçekleştirilir.

Benzin kıtlığı olan ancak ideal iklim koşulları nedeniyle zirai nişasta kaynaklarına sahip olan bazı ülkeler, yakıt olarak etanol-benzin karışımı kullanmaktadırlar. Bu konuda başta gelen ülke, 1930 yılından beri benzine alkol karıştırarak kullanan, Brezilya'dır. Brezilya'daki otomobiller %10 oranında alkol içeren benzin, yani "gasohol" ile çalıştırılır.

Selülozik materyaller mısır koçanı, pamuk tohumu, yer fıstığı kabuğu gibi atıklardan elde edilirler. Sayılan bu atıkların hepsi potansiyel etanol kaynağı olarak düşünülse de, bunları etanol eldesinde kullanmaktansa yakmak daha ekonomiktir. Selülozik materyaller içinde, bertaraf edilmesi zor olan ve kağıt fabrikalarından çıkan atık sülfite sıvısı da vardır. Selülozun bozunması başlıca, kağıt hamuru hazırlanan değirmenlerde gerçekleşir. Bu yüzden etanol üretimi için kullanılan bu sıvı şeker içeren bir hammadde gibi düşünülebilir.

Fermentasyon için ortam çok asidik olduğundan genellikle kireç taşı ilavesi ile nötrleştirme yoluna gidilir. Kalan sülfürdioksit de fermentasyondan önce, sıvıya hava üfleyerek veya kaynatarak uzaklaştırılır.

Selülozik hammaddelerin fermentasyonundan sonra ele geçen mayşe genellikle %0.7-1.2 oranında etanol içerir. Bu yüzden de fermentasyon sonunda ele geçen sıvı, derişiklendirilir.

Saflaştırma amacıyla kullanılacak sistemin tipi, alkolün kullanılacağı yere göre seçilir. Kozmetik ve tıp alanını da içeren tüm teknik kullanımlar için alkolün saflaştırılmasında en iyi yöntem nötral çalışmadır.

Etanolün saflaştırılması için en az 3 destilasyon kolonuna ihtiyaç duyulur. Birinci aşamada safsızlıkları gidermek için ön destilasyon yapılır. Daha sonra ikinci kolon etanolün rektifikasyonu için, üçüncü kolon da ikinci kolondan gelen çözeltilerdeki yüksek kaynama noktasına sahip maddelerin ayrılması için kullanılır. Birinci sınıf kalitede etanol istenildiğinde dördüncü bir kolon da kullanılabilir (6).

1.3.2.2 Sentez Yoluyla Alkol Üretimi

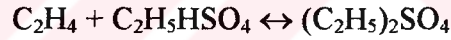
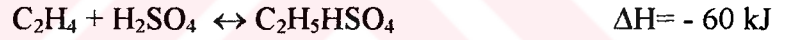
Sentez yoluyla alkol üretimi, indirekt hidrasyon, direkt katalitik hidrasyon ve sentez gazı ile alkol üretim yöntemlerini içermektedir.

1.3.2.2.1 İndirekt Hidrasyon Yöntemi ile Alkol Üretimi

1855 yılında Berthelot tarafından gerçekleştirilmiştir. Üretim, etil sülfat kullanarak, su ve etilenden etanol eldesi esasına dayanmaktadır. Ancak bu yöntem 1929 yılına kadar endüstriyel ölçekte kullanılmamıştır. Halbuki, 1920'li yıllarda, benzer bir yöntemle, propilen ve sudan isopropil alkol üretilmekte idi.

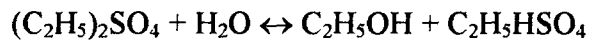
Etilenden etil alkol üretimi aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirilir.

Etilen gazı önce kulelerde %95-98 konsantrasyonundaki sülfat asidi ile muamele edilir.

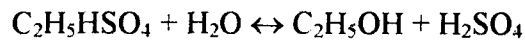


Reaksiyonda 1 mol-g sülfat asidi başına yaklaşık 1.4 mol-g etilen absorblanır. Reaksiyon ekzotermik olduğundan, absorpsiyon kulelerinin soğutulması gereklidir. Etilenin absorpsiyonu kısmi basınçla doğru orantılı olduğundan, reaksiyon basıncı, beslemedeki etilenin konsantrasyonuna bağlı olarak 10-35 bar arasında seçilmelidir. Reaksiyon sıcaklığı 65-85°C arasındadır. Absorpsiyonu hızlandırmak için demir oksitler, magnezyum, bakır, uranyum, vanadyum ve alkali toprak metalleri kullanılır.

Ele geçen dietilsülfat, daha sonra su ile hidrolize uğratılır. Reaksiyon iki kademede gerçekleşir.

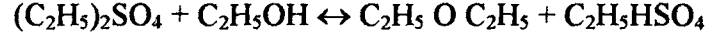


70 °C'deki bu ilk kademedden sonra 100 °C'de ikinci kademe reaksiyon gerçekleşir.



Açığa çıkan sülfat asidinin % 40-55 konsantrasyonda olabilmesi için ortama ayrıca su ilave edilir.

Bu yöntemde



denklemini uyarınca eter oluşabilir.

Etanol, sıyrıcı kolondaki (stripper column) asitten eter ile beraber ayrılır. Kostik soda ile asidi giderilir daha sonra da eterden ayrılır. Bilahare, destilasyon kolonlarında derişiklendirilir (6).

1.3.2.2.2 Direkt Katalitik Hidrasyon Yöntemi ile Alkol Üretimi

Etilenin indirekt hidrasyonunda kullanılan sülfat asidinin korozif etkisi vardır. Bunun için 1948'de Houston, Teksas'ta *Shell Chemical Corp.* tarafından Direkt Katalitik Hidrasyon yöntemi geliştirilmiştir. Gaz fazındaki bu reaksiyon oldukça basittir:



Reaksiyon fazla ekzotermik olmadığından, etanol üretimi düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmektedir.

Reaksiyonun kinetiğini incelemek için Mace ve Bonilla tarafından Wolfram mavi-silika jel katalizör kullanılmıştır. Aynı reaksiyonu silika jel üzerine fosforik asit kullanarak Gelbshtein da araştırmıştır (6).

1.3.2.2.3 Sentez Gazı ile Alkol Üretimi

Etanol eldesinde sentez gazı kullanmak, son zamanlarda üzerinde çok çalışılan bir konudur. Etilen elde etmek için, ham petrol kullanmaktansa doğal gaz ya da kömürden kolaylıkla elde edilen sentez gazını kullanmak daha basit ve ekonomiktir.

Sentez gazından etanol eldesi için birçok yöntem vardır. Bunlardan birinde sentez gazından etanol tek bir adımda üretilebilmektedir. Reaksiyon şartları, yaklaşık 300°C ve 300 bar'dır. Katalizör, %5 oranında rodyum içeren diatome toprağıdır. Tek adımlı bu prosesin dezavantajı nispeten düşük seçimliliğidir. Sentez gazındaki reaksiyona giren karbonun yaklaşık %40'ı ya etanole ya da asetaldehite dönüşür. Asetaldehitin de ardarda hidrojenasyon reaksiyonlarıyla etanole dönüşmesi oldukça kolaydır. Sentez gazındaki karbonun diğer kısmı ise, başlıca metan, metanol ve asetik asit verir.

Sentez gazından önce metanolün elde edildiği iki adımlı diğer bir yöntem bugün için daha yaygın durumdadır. Bu yöntemde oluşan metanol, sentez gazıyla tekrar reaksiyona sokulur. Genel reaksiyon şartları, yaklaşık 175-200°C ve 300-400 bar'dır. Katalizör olarak kobalt bileşikleri kullanılır. Örneğin iyotlu kobalt asetat, metil asetat ve iyotlu kobalt asetat, alkil- ve aril-fosfinli kobalt asetat gibi. Dönüşen metanolün seçimliliği %90'dır (6).

1.3.3 Türkiye'de Etil Alkol Sektöründeki Kurulu Kapasite ve Etil Alkol Üretimi

Tablo 1.3 ve Tablo 1.4'te Türkiye'deki etil alkol üretimindeki kurulu kapasite ve yıllara göre üretim miktarları verilmiştir. Fermentasyon sonunda elde edilen ve %7-8 oranında alkol içeren mayşe, mayalardan ayrıldıktan sonra destilasyona tabi tutulur. Destilasyonla elde edilen bu alkol ham alkol'dür ve ortalama 92 °'lidir. Bu alkol, içindeki yabancı maddelerden temizlenmek için yeniden destillenerek 96.6°'lik saf alkol elde edilir (7).

Tablo 1.3 1984 Yılından İtibaren Türkiye'de Etil Alkol Üretiminde Kurulu Kapasite (7)

Kuruluş	Hammadde	Fabrika Adı	1000 L/GÜN			1000 L/YIL (300 GÜN)		
			Ham	Saf	Toplam	Ham	Saf	Toplam
T.Ş.F.	Pancar	Erzurum	12	48	60	3600	14400	18000
A.Ş.	Melası	Eskişehir	12	45	57	3600	13500	17100
		Malatya	10	30	40	3000	9000	12000
		Turhal	11	24	35	3300	7200	10500
Toplam:			45	147	192	13500	44100	57600
TARİŞ	Hurda İncir	İzmir	0,7	3,3	4	200	1000	1200
Genel Toplam:			45,7	150,3	196	13700	45100	58800
TEKEL	Ham Alkol	Saflaştırma	-	16	16	-	4000	4000

Tablo 1.4 Türkiye’de Etil Alkol Üretimi ($\times 10^3$ Litre) (7)

Kuruluş	Ürün Cinsi	Y I L L A R				
		1983	1984	1985	1986	1987
T.Ş.F	Ham Alkol	6437.0	8301.7	6426.5	9890.5	5845.8
A.Ş.	Saf Alkol	24337.0	26864.1	28491.2	32549.4	31067.6
	Toplam:	30774.0	35165.8	34917.7	42439.9	36913.4
TARİŞ	Ham Alkol	157.8	169.8	139.3	138.3	96.0
	Saf Alkol	993.8	991.6	775.9	762.9	424.4
	Toplam:	1151.6	1161.4	895.2	901.2	520.4
Genel Toplam:		31925.6	36327.2	35812.9	43341.1	37433.8

1.3.4 Etil Alkolün Kullanım Alanları

Etil alkolün belli başlı kullanım alanları aşağıdaki gibidir.

1.3.4.1 Alkollü İçkilerde

Alkol üretimi genellikle hükümetler tarafından kontrol edilmektedir. Alkollü içkilerde kullanılan etanolün, fermentasyonla veya sentez yoluyla üretilmesi arasında kayda değer bir kalite farkı olmamasına rağmen, tarımsal hammaddelerin fermentasyonu ile üretilen alkolün kullanılması mecburiyeti vardır. Tarımsal hammaddelerden ve fosil yakıtlardan yapılan etanollerini ayırt etmenin tek yolu ^{14}C metodudur. Bitkilerin ^{14}C içeriği fermentasyon sonunda açığa çıkan karbondioksit’in ^{14}C içeriği ile dengededir. Bu özellikten faydalanarak alkolün hangi yöntemle üretildiği kolayca anlaşılabilir.

1.3.4.2 Kozmetik ve Tıp Alanında

Narkoz keşfedilmeden önce alkollü içkiler narkoz vasıtası olarak kullanılırdı. Oysa alkolün günümüzde tıpta kullanımı, barbitürat gibi esterlerin sentezinde hammadde olarak kullanılmasıyla sınırlı kalmaktadır.

Bilindiği gibi yüksek kaliteli parfümler, genellikle etanolde çözülürler. Çünkü etanolün karakteristik olan kokusu, insan burnuna en hoş gelen kokulardan biridir.

1.3.4.3 Teknikte

Etanol, denature edici maddeler (etil asetat, benzin, metil isobütil keton gibi) katıldıktan sonra, endüstriyel amaçlar için cilalarda ve verniklerde çözücü olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır. Alkollü çözücülerin yaygın olarak bilinen isimleri şunlardır: Synasol, Shellacol, Quakersol, Tecsol, Jaysol, Pacosol, Neosol, Solox, Anhydrol, Paco, Filmcol, Filmex.

Kimyasal reaksiyonlar

Asetaldehit: Etanol, uzun yıllar boyunca asetaldehit üretiminde kullanılmıştır. Ancak böyle bir prosesin günümüzde pek o kadar önemi kalmamıştır. Çünkü ihtiyaç duyulan asetik asit, artık asetaldehit dışında başka kaynaklardan da sağlanabilmektedir. Asetaldehit ise direkt olarak etilenden üretilmektedir.

Etilen: Fermentasyon yolu ile etil alkolün çokça üretildiği ülkelerde, ihtiyaç duyulan etilen, direkt olarak bu alkolden üretilmektedir. Reaksiyon 235-240 °C'de katalizör yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Katalizör olarak da genellikle, aktive edilmiş alümina, çinko oksit, fosfat ve sülfat asitleri kullanılmaktadır.

Etil Eter: Klasik olarak sülfat asidi veya bazen Al₂O₃ veya silika, alümina katalizörleri kullanılarak etanolden etil eter üretimi, bilinen ve geniş çapta üretimin gerçekleştirildiği bir yöntemdir.

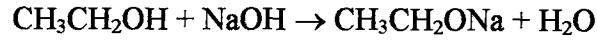
Sirke: Yemelik sirke üretiminde, genellikle fermentasyon ürünü olan alkol kullanılmaktadır. Bakteriyel fermentasyon yöntemi ile çalışılmaktadır. Aynı tür bakterilerle, sentetik etil alkolden de sirke üretilmektedir. Fakat bu, tercih edilen bir yöntem değildir.

Aminler: Etanolün NH₃ ile katalitik reaksiyonu sonucunda mono-, di- ve trietil aminler kolaylıkla üretilmektedir. Katalizör olarak genellikle alümina, bakır ve demir klorürlerle birlikte fosfat asidi ve türevleri de kullanılmaktadır.

Esterler: Esterler, anorganik ve organik asit, asit anhidritler ve asit halojenürler ile etanolün reaksiyonundan oluşurlar. Organik asitlerle esterifikasyon teknolojisinin esası, dengeyi esterifikasyon lehine çevirmek için, oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Derişik sülfat asidi, hidroklorik asit, bor tiriflorid ve p-toluensülfonik asit gibi asidik katalizörler kullanılırlar.

350°C'de %0.1-0.2 toryum oksit içeren bakır oksit üzerinde, etanol doğrudan etil asetata dönüşür. Bu reaksiyonun asetaldehit üzerinden gerçekleştiği düşünülür. Asetaldehitin kondenzasyonu da etil asetat oluşur.

Alkolatlar: Hidroksil grubunun H atomu, aktif bir metalle yer değiştirebilir. Mutlak alkolle sodyum arasındaki reaksiyon bu konuda çok bilinen bir örnektir. Sodyum etoksit, susuz sodyum hidroksit ile mutlak alkolden aşağıdaki reaksiyonla elde edilebilir. Oluşan su, benzenle azeotropik destilasyona tabi tutularak ayrılabilir.

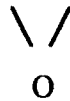
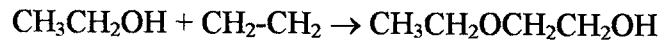


Sodyum etoksit, kondenzasyon ve indirgenme ajanı olarak organik sentezlerde kullanılır. Barbitüratlar (Venoral, Barbital, Luminal, Amytal), etil ortoformat ve diğer kimyasallar da bu şekilde hazırlanırlar.

Alüminyum ve magnezyum da epoksitlerle reaksiyona girerler fakat reaksiyonu genellikle bu metallerin amalgamları katalizler.

Diğer Reaksiyonlar: Etilen oksit, propilen oksit, bütülen oksit ve diğer epoksi tipi bileşiklerin herhangi bir miktarı sıvı, viskoz, yarı-mumsu ve katı bazı ürünleri vermek üzere etanolle reaksiyona girebilir. Bu tür ürünler özelliklerine göre çözücü, boya, antioksidan ve korozyon önleyicilerin üretiminde kullanılırlar.

Bu tür üretilere örnek olarak 1 mol-g etanol ile 1 mol-g etilen oksitin, etilen glikol monoetil eter vermek üzere girdikleri reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Etanolün son zamanlarda en çok önem kazanan kullanım sahası besiyeri olarak tek hücre proteinlerinin üretimidir. Bu amaçla kullanılacak olan maya pH 2.5-4, ve sıcaklık 40°C'de bir miktar tuz içeren %1'lik etanolik besiyerine beslenir. Teknik ölçekli çalışmalar,

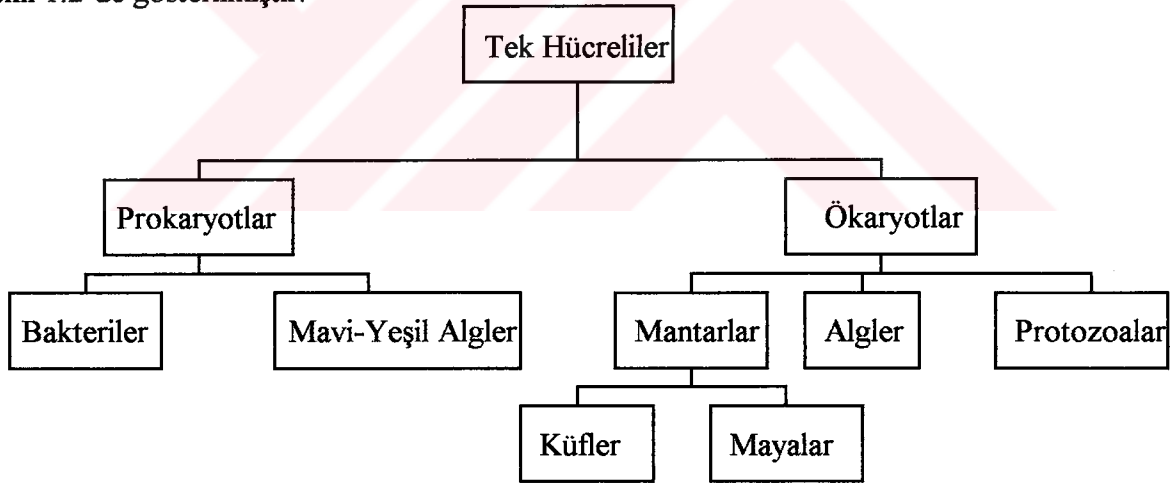
A.B.D.'de Amoco tarafından mikroorganizma olarak *Candida utilis* (Torula mayası) kullanılarak, Japonya'da Mitsubishi tarafından *Candida ethanophilum* ve *acidothermophilum* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler santrifüj edilir ve kurutulur. Kuru hücrelerin verimi kullanılan etanolün %84'üne karşılık gelir (6a).

1.4 Mikroorganizmalar

Bilinçli olarak olmasa bile, mikroorganizmalar, insanların yiyecek, alkol, süt ürünleri gibi ihtiyaçlarını karşılamak için tarih öncesi zamandan beri kullanılmaktadırlar. Bugün mikroorganizmaların kullanımı öncekinden daha geniş bir alana yayılmıştır. Sadece geleneksel mikrobiyal proseslerde değil, endüstriyel ve zirai kimyasallar, enzimler, atık suların temizlenmesi, mineral leaching gibi yeni proseslerde de kullanılırlar.

1.4.1 Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

Canlılar hayvanlar, bitkiler ve tek hücreliler olarak sınıflandırılabilirler. Tek hücreliler olarak adlandırılan mikroorganizmalar da ikiye ayrılırlar. Bu sınıflamanın daha ayrıntılı biçimi Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Tek Hücrelilerin Sınıflandırılması

Prokaryotik hücre küçük ve basittir. Daha kompleks olan ökaryotik hücre; bitki, hayvan, protozoa, mantar ve alglerin temel yapısını oluşturur. Bunlar prokaryotik hücreden 1000-10000 kez daha büyük ve karmaşıktırlar.

1.4.2 Mikrobiyal Adlandırma

Mikrobiyologlar, her organizmanın iki adının olduğu “binomial sistemi” kullanırlar. Organizmanın ismi *italik* ya da altı çizgili olarak yazılır. İlk kelime cins adıdır ve büyük harfle başlar. *Bacillus* ya da *Saccharomyces* gibi. Mikroorganizma ismindeki ikinci kelime, tür adıdır. Büyük harfle yazılmaz. *Bacillus subtilis* veya *Saccharomyces cerevisiae* gibi. (8).

1.5 Mayalar

Klorofilleri olmadığı anlaşıldığından beri maya ve maya benzeri organizmalar “Gerçek Mantarlar” olarak adlandırılırlar.

Mayalar üç ana familya’ya ayrılırlar. Bunlar *Saccharomycetaceae*, *Sporobolomycetaceae* ve *Cryptococcaceae*’dir. Ayrıca tek bir hücrenin ortalama büyüklüğüne bağlı olarak yüksek mantar ve bakteriler arasındaki mikroorganizma grubuna da az çok dahil edilirler. Bu grubun karakteristik özelliği, vejetatif üremenin tomurcuklanma ile olmasıdır. Bununla beraber, bazı türlerinde tomurcuklanma ile birlikte veya tek olarak bölünme ile de çoğalmaları mümkündür. Her ne kadar sporla üreyen hücreler, *Cryptococcaceae* familyasında bulunsalar da bazı maya türlerinin sporlanmaya özgü yapılar oluşturdukları gözlenir. Bu sebeple mayaların kolayca karakterize edilmeleri mümkün değildir (3)

Jörgensen’e göre maya klasik olarak tomurcuklanma yoluyla çoğalabilen ve şekeri alkol ve CO₂’e dönüştürebilen tek hücreli mikroorganizmadır. Fakat bu tanımlama da bugün değerini kaybetmiştir. Çünkü bilinmektedir ki alkol yapmayan, aynı zamanda misel oluşturabilen mayalar da vardır (1).

Mayalar doğada üzüm gibi meyvelerde ve şekerli diğer yiyeceklerde yaygın olarak bulunurlar. Ayrıca toprakta, havada, deride ve hayvanların bağırsaklarında da mevcuttur. Mayalar klorofil içermediklerinden, enerji sağlamak için yüksek bitkilere ve hayvanlara bağımlıdır (8)

Yuvarlak, eliptik veya silindirik şeklindedirler. Büyüklükleri cinslerine göre değişmekle birlikte 2-8 µm çapında ve 3-15 µm uzunluğundadır. Bununla birlikte bazı türlerde uzunluk 100 µm’u bulmaktadır. Hücreler özellikle aktif üreme devresinde düz veya dallı zincirler yapmaktadır.

Mayalar genel olarak bakterilerden büyüklük ve şekil açısından fark gösterdikleri gibi küflerden de miselyum ihtiva etmemeleri ile ayrılmaktadırlar (9).

En önemli maya, ekmek mayalamada ve şarap ve bira yapımında kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* türüdür (8).

1.6 Enzimler

Enzimler doğadaki protein molekülü olan biyolojik katalizörlerdir. Yaşayan hücreler (hayvan, bitki ve mikroorganizmalar) tarafından üretilirler ve biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak gereklidirler. Bir hücredeki her reaksiyon özel bir enzimin varlığına ihtiyaç duyar. Canlı bir sistemdeki enzimlerin fonksiyonu, kimyasal bağların kopmasını ve oluşmasını sağlamaktır. Bu yüzden diğer katalizörler gibi, yapılarında önemli bir değişim olmaksızın reaksiyon hızını artırır.

Enzimlerin katalitik özellikleri, onların protein yapılarından ileri gelmektedir. Belli bir kimyasal reaksiyon aktif nokta olarak bilinen, enzim yüzeyinin küçük bir kısmında katalizlenir. Belirli bir enzimin belirli bir kimyasal reaksiyonu katalizlemesi için gereken birçok fiziksel ve kimyasal etkileşimler bu aktif noktada oluşurlar.

Enzim reaksiyonları kimyasal reaksiyonlardan farklıdır:

1. Bir enzim katalizörü genellikle bir kimyasal reaksiyonu katalizlerler.
2. Enzim katalizörlü bir reaksiyonun hızı, biyolojik olmayan katalizörlü reaksiyona göre daha hızlıdır.
3. Sıcaklık, basınç, pH, vs gibi enzimler için gereken reaksiyon şartları oldukça yumuşaktır. Yani alışılmış biyolojik yaşam şartları gibidir.
4. Enzimler nispeten hassas ya da kararsız moleküllerdir ve dikkatli kullanılmaları gereklidir.

Enzimlerin sistematik olmayan isimleri vardır. Örneğin,

- rennin : peynir yapımı prosesini başlatmak için sütü pıhtılaştırır
pepsin : asidik pH'da proteinleri hidroliz eder
tiripsin : orta derecede alkali pH'da proteinleri hidroliz eder

Daha sonra isimlendirme, enzimle reaksiyona giren substratın ya da katalizlediği reaksiyonun adına *-az* eki eklenerek geliştirilmiştir¹. Örneğin;

Substrat adı + az

α-amilaz : nişasta → glukoz + maltoz + oligosakaritler

laktaz : laktoz → glukoz + galaktoz

lipaz : yağ → yağ asitleri + gliserol

maltaz : maltoz → glukoz

üreaz : üre + H₂O → 2NH₃ + CO₂

sellobiyaz : sellobiyoz → glukoz

Katalizlediği reaksiyon + az

alkol dehidrojenaz : etanol + NAD⁺ ↔ asetaldehit + NADH₂

glüköz izomeraz : glukoz ↔ fruktoz

glukoz oksidaz : D-glukoz + O₂ + H₂O → glukonik asit

laktik asit dehidrojenaz : laktik asit → piruvik asit

Devam eden yıllarda yeni birçok enzim keşfedildiğinden bu sistem karışıklığa neden olmuş ve 1964 yılında Uluslararası Enzim Kurulu (The International Enzyme Commission) tarafından, yeni bir sistematik şema oluşturulmuştur. Yeni sistem ile tüm enzimler, katalizledikleri kimyasal reaksiyonun tipine bağlı olarak 6 ana sınıfa ayrılmışlardır. Her bir sınıf alt grupları, alt alt grupları, ve onlar da alt alt alt grupları içermektedir. Bu yüzden her bir enzim sayısal bir kod sistemi ile tanımlanabilir. Örneğin, alkol dehidrojenaz, Tablo 1.5'te gösterildiği gibi 1.1.1.1 olarak bilinir (8).

¹ Biyolojik reaksiyonlardaki substrat terimi, kimyasal reaksiyonlardaki reaktan terimine eşdeğerdir.

Tablo 1.5 Enzimlerin Sistematik Sınıflandırılması'nın bir bölümü (8)

1. Oksidoredüktazlar
1.1. Substratın =CH-OH grubuyla reaksiyona girenler
1.1.1. Hidrojen alıcısı olarak NAD ⁺ ya da NADP ⁺ ye ihtiyaç duyanlar
1.1.1.1. Spesifik substratı etil alkol olanlar
<i>Örnek</i>
Reaksiyon: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Sistematik adı: alkol NAD oksidoredüktaz (1.1.1.1.)
Geleneksel adı: alkol dehidrojenaz
2. Transferazlar
2.1 Metil gruplarının transferini gerçekleştirenler
2.2 Glikozil gruplarının transferini gerçekleştirenler
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar

1.7 Fermentasyon

Fermentasyon, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri yardımıyla bitkilerde bulunan karbohidratlar gibi bazı baskın organik bileşiklerini kullanarak, karmaşık dönüşümlerle alkol veya organik asit oluşumunu sağlayan reaksiyon zincirleridir. Fermentasyon ürünleri arasında bilinen en yaygın örnekler alkol, peynir, yoğurt ve ekmektir. Fermentasyon reaksiyonlarında, mikrobiyal bir hücre ya da bunların ürettikleri enzimleri içeren bir biyokatalizör kullanılır (5, 10, 11).

Mikrobiyal metabolizmanın tanımı, hücrenin büyümesini gelişmesini ve devamını içeren tüm enzimatik reaksiyonları içerir. Bunlar genellikle disimilasyon, asimilasyon ve biyosentez reaksiyonlarıdır. Büyüme, bir tek mikroorganizma veya bir koloni ya da bir kültür olarak bir arada yaşayan bütün bir organizma için kullanılabilen bir terimdir. Hücre boyutundaki artış, hücrelerin tomurcuklanma veya sporlar gibi özel yapıların oluşmasıyla çoğalması demektir. Asimilasyon, substrat'ın çeşitli bileşenlerinin hücre içine transfer edilmesiyle büyüme veya yaşamsal aktivite için gerekli materyalin sağlanmasıdır. Biyosentez ise, hücre içinde normal

yaşamsal aktiviteleri sağlamak için gereken daha fazla miktarlarda karmaşık bileşikler oluşmasıdır. Biyosentez yoluyla elde edilen bileşikler, enzimler, vitaminler, antibiyotikler, toksikler gibi biyokimyasal olarak aktif maddelerdir. Bunlar hücre içinde kalırlar ve çok nadiren substrat'a verilirler. Biyosentez, mikroorganizmanın cinsine değil, türüne özgüdür. Asimilasyon ve biyosentez, "anabolizma" adını alır. Bunlar enerji tüketen proseslerdir. Burada harcanan enerji, disimilasyon veya katabolizma ile sağlanır. Disimilasyonda organizmanın enerji kaynağı olarak kullandığı substrat bileşenleri, hücre içinde bulunan ve organizmanın enerji deposu olarak kullandığı glikojen ve ATP kendilerinden daha az enerjili yeni ürünlere dönüştürülürler. Böylece enerji elde edilir.

Disimilasyon hücre içinde meydana gelir ve ürünler hücreyi çevreleyen ortama verilir. Disimilasyona uğrayan maddeler, doğal olarak bulunan organik bileşikler, çok az olmakla beraber bazı inorganik bileşikler ve bazı elementlerdir. Örneğin, karbohidratlar, glikozitler, mono- ve polibazik alkoller, aldehitler, mono- ve polibazik asitler, keto ve hidroksi asitler, hidrokarbonlar, aminoasitler ve aminler; bazı demir, mangan, arsenik tuzları, elementel karbon, kükürt vs.

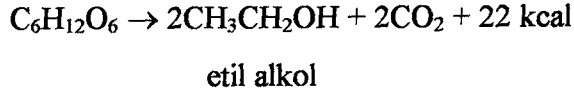
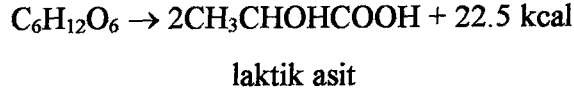
Reaksiyon ortamına giren atmosferik oksijen 'hidrojen tutucu' görevi görürse disimilasyon prosesi aerobiktir. Bu proses, atmosferik oksijen olmadan gerçekleştirildiğinde disimilasyon, gerçek fermentasyondur (ya da anaerobik disimilasyon). Substrat, karbondioksit ve su oluşturmak üzere, aerobik disimilasyon ile tamamen okside olabilir. Ancak oksidasyon, glukonik asit, sakkarik asit, sitrik asit ve oksalik asit gibi tamamlanmamış oksidasyon ürünleri vermek üzere, çeşitli derecelerde de olabilir. Bir molekül glukozun fermentasyonundan iki molekül etil alkol ve iki molekül karbondioksit ya da iki molekül laktik asit oluşur. Aerobik oksidasyonla açığa çıkan enerji, fermentasyon ile oluşan enerjiden çok daha fazladır.

Aerobik oksidasyon:



oksalik asit

Fermentasyon:



Yüksek organizmaların hücrelerinde meydana gelen glukoz oksidasyonu iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada enerji üreten bir anaerobik prosesle (glükolizis) laktik asit üretilir. İkinci aşamada da oksijenin katılmasıyla bir kısım laktik asit, bir seri reaksiyonla su ve karbondioksite oksitlenir. Kalan laktik asit de glukozla çevrilir. Mikrobiyal fermentasyona benzerliği dolayısıyla ilk anaerobik faza “fermentasyon” denir. İkinci faza da hava girişi ve yanma ürünlerinin dışarı atılmasına bağlı olduğu için “solunum” adı verilir.(2b).

Fermentasyon uygulamaları şu şekilde sınıflandırılabilir:

A. Oksijen (hava kullanımı) esasına göre:

1. Aerobik Fermentasyon

a. Derin (submerged) fermentörler

Karıştırıcılı veya karıştırıcısız tipler

b. Tavalı fermentörler

2. Anaerobik Fermentasyon

a. Sulu besiyeri uygulamalı tank tipi fermentörler

b. Kuru uygulamalar için, yeraltı depoları şeklinde yapılan fermentörler

B. İşlemin sürekli ya da kesikli oluşuna göre:

1. Kesikli (batch) fermentörler

2. Sürekli kültür kullanılan (continuous) fermentörler (12).

Silcox ve Lee'ye göre, iyi bir fermentasyon prosesi için, beş temel unsurun varlığı gerekmektedir:

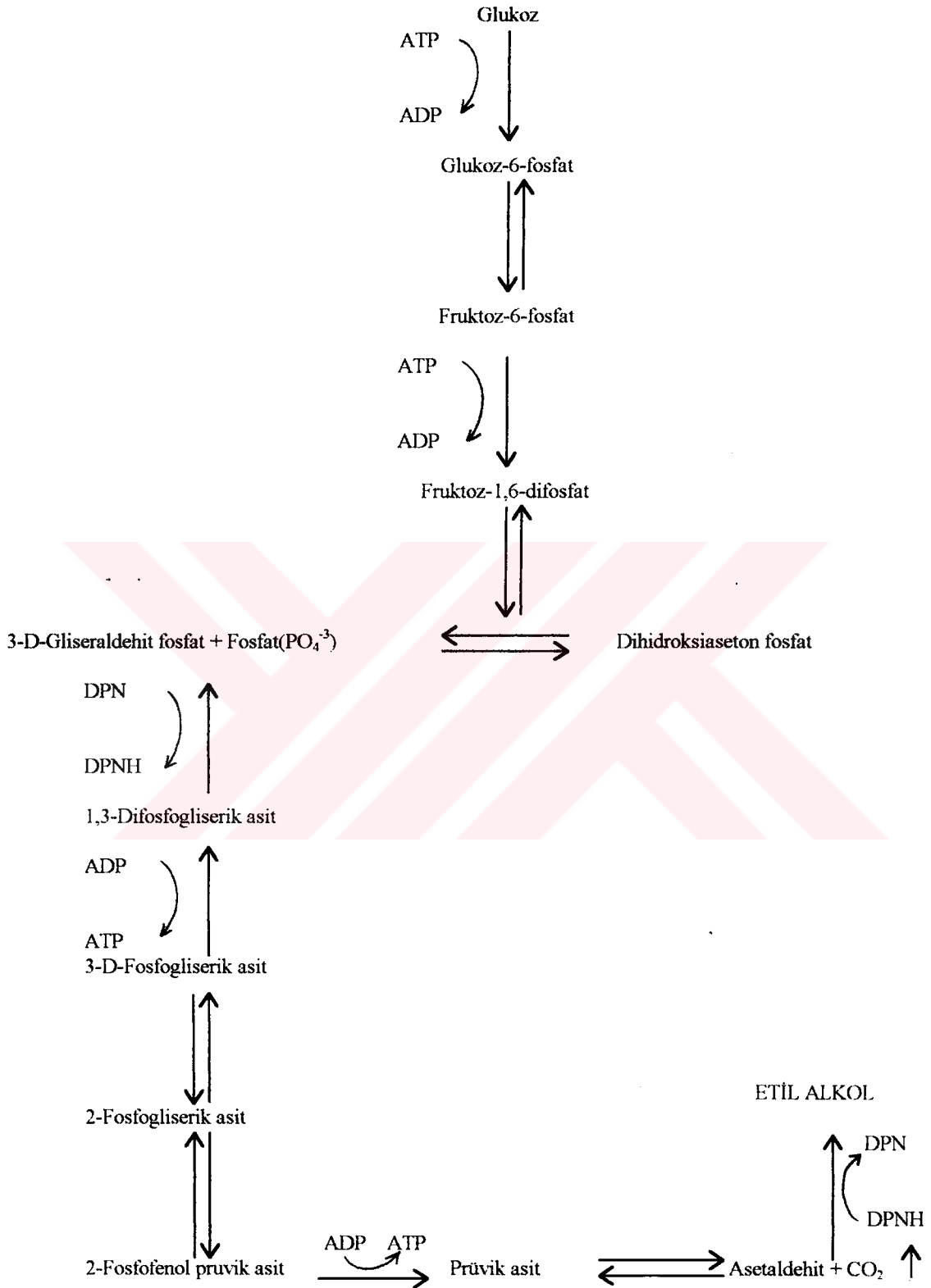
1. İstenilen son ürünü meydana getirecek bir mikroorganizma. Bu mikroorganizma kolaylıkla ve hızla çoğalmalı ve biyolojik tekdüzeliği sağlamaya yetenekli olmalı, diğer bir deyimle, önceden kararlaştırılan verimi sağlayabilmelidir.
2. Substrat için ekonomik bir hammadde.
3. Kabul edilebilir verimlilik.
4. Hızlı fermentasyon.
5. Kolaylıkla ayrılabilen ve saflaştırılabilen bir ürün.(13)

Fermentasyon boyunca ortamda aşağıdaki değişimler görülür:

1. Besiyerini teşkil eden maddelerin (substrat) yapılarının değişimi ve konsantrasyonlarının azalması.
2. Mikroorganizma hücrelerinin çoğalması.
3. Ortam pH'sının değişmesi
4. Sıcaklığın değişmesi
5. Viskozitenin değişmesi
6. Bütün bunların yanında amaçlanan sonuç, biyosentez ürünü konsantrasyonunun artması (12)

Fermentasyon Reaksiyonları

Emden-Meyerhof-Parnas'a göre mayanın glukoz metabolizması yolu aşağıdaki gibidir. Burada ATP=adenozin trifosfat, ADP=adenozin difosfat, DPN=difosforidinnükleotid, DPNH=indirgenmiş difosforidin nükleotid anlamındadır (6b).



Şekil 1.3 Embden-Meyerhof-Parnas'a Göre Mayanın Glukoz Metabolizması Yolu (6b)

1.8 Fermentasyon Ürünleri

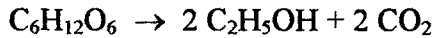
Fermentasyon ürünlerini fermentasyon ana ürünleri ve fermentasyon yan ürünleri olarak sınıflandırmak mümkündür.

1.8.1 Fermentasyon Ana Ürünleri

Bunlar etanol ve karbondioksit'tir.

1.8.1.1 Etil Alkol

Alkol fermentasyonunun asıl önemli ürünü, etil alkoldür. Şekil 1.3 alkol fermentasyonunun, ara ve asıl ürünlerinin oluşumunu göstermektedir.



180.1 g Glukoz 92.1 g Alkol 88 g Karbondioksit

Reaksiyona göre 100 g glukozdan, 51.1 g alkol ve 48.9 g karbondioksit meydana gelmektedir (4).

1.8.1.2 Karbondioksit, CO₂

Alkol fermentasyonunun ikinci asıl ürünü olan CO₂ bir gaz olup Gay-Lussac'ın belirlediği eşitliğe göre fermente olan her 100g şekerden oluşan miktarı kuramsal olarak 48.9 gram'dır. Renksiz, yanmayan, zayıf ekşi tat ve kokuda olan karbondioksit gazının molekül ağırlığı 44.1'dir. Havadan ağır olan karbondioksit, fermentasyon sırasında tabana çöker ve akma olanağı bulamazsa burada toplanır. Bu nedenle sürekli ve fazla miktarda alkol fermentasyonu yapılan yerlerde, tabanın karbondioksitin akışına izin vermesi veya karbondioksit bacalarının inşa edilmesi, yani havalandırmanın sağlanması zorunludur. Ayrıca fermentasyon mahzenlerinde yapılacak çalışmalarda ve kaplarının temizlenmesinde gerekli güvenlik önlemlerinin alınması, en azından buralara girmeden önce yanan bir mumla ortamda karbondioksit toplanıp toplanmadığı mutlaka kontrol edilmelidir.

1.8.2 Fermentasyon Yan Ürünleri

Saf bir alkol fermentasyonu sırasında değişik fermentasyon koşullarına bağlı olarak az miktarlarda da olsa, diğer bazı ürünler oluşur ve bunlara fermentasyon yan ürünleri olarak tanımlanırlar.

1.8.2.1 Gliserin

Nötr ve zayıf asit özelliği olan ortamlarda fermente olan her 100 g sakkarozdan 2.5-3.6 gram gliserin oluşabilir. Alkali ortamda gliserin oluşumu bu miktarın 10-12 katına çıkabilir ve bu durum “protol” yöntemiyle gliserin üretimine esas teşkil eder.

Gliserin üç değerli bir alkol olup $C_3H_5(OH)_3$ şeklinde gösterilir. Renksiz, koyu kıvamlı, su çekici ve tatlı bir sıvıdır. Su ve alkolde her oranda erir.

Gliserin hayvansal ve bitkisel yağlarda yapıtaşı olarak yaygındır. Az miktarda fermente olmuş alkollü içkilerde bulunur.

Alkol fermentasyonu sırasında gliserin oluşumunu etkileyen en önemli etkenler kullanılan maya suşu ve ortamın bileşimi olduğuna göre, bunlar gliserin oluşumunu azaltacak şekilde seçilmelidir. Çünkü gliserin miktarı artacak olursa, ortamda bulunan ve alkole dönüşecek olan şekerin daha fazla bir bölümü bu şekilde tüketileceğinden alkol veriminde kayba neden olur. Gliserin kaynama noktası $290^{\circ}C$ olduğundan damıtma işlemi sırasında şilempede kalır ve bu artık ürünün yem değerini artırır.

1.8.2.2 Asetaldehit

Etil alkolün bir oksidasyon ürünü olan asetaldehit (CH_3CHO), Şekil 1.3 de görüldüğü gibi EMP-yoluyla şekerlerin alkole fermentasyonu sırasında son ve asıl ürün olan alkolden bir önceki aşamada ara üründür. Su, alkol, eter ve benzolde çözünür, birçok madde için iyi bir çözücüdür. Kuvvetli ısıtıldığında metan ve karbondioksit parçalanır. Buharları zehir etkisi yapar.

1.8.2.3 Füzel Yağı (Yüksek Alkoller)

Füzelyağı aslında yüksek alkoller denilen çok sayıda alkoller karışımıdır. Füzelyağı, fermentasyon sırasında ilk kez 1785 yılında Scheele tarafından keşfedilmiştir. Füzel yağının kapsamına giren yüksek alkollerin kaynama noktaları $80-160^{\circ}C$ arasındadır. Füzelyağı alkol fermentasyonunun önemli bir yan ürünü olup, en önemli öğeleri amilalkol, izo-bütül alkol, ve n-propanol'dür. Maya suşu, fermentasyon sıcaklığı ve aşılama miktarı füzel yağının oluşumunu ve bileşimini etkiler.

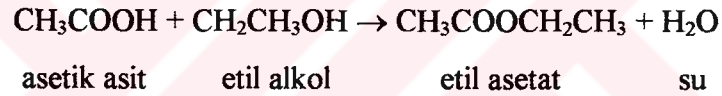
Füzel yağının, fermentasyon sırasında mayanın çoğalma safhasında oluştuğu saptanmıştır. Maya çoğalması durup, asıl fermentasyon başladığında yüksek alkollerin oluşumu

da azalmakta, hatta durmaktadır. Bu nedenle fermentasyonun bu aşamasında gerekli özenin gösterilmesi zorunludur.

1.8.2.4 Asit ve Esterler

Şekil 1.2 deki alkol fermentasyonu şemasında kolayca anlaşılacağı gibi, tümüyle saf bir alkol fermentasyonunda bile mayalar az miktarlarda organik asitler (asetik, laktik, pirüvik, süksinik asit) de oluşturabilirler. Bu asitlerden süksinik asit glutamik asitten oluşmakta olup, alkol fermentasyonu şeması ile ilişkisi yoktur. Diğer organik asitler şekerlerden oluşmaktadır. Bu asitlerin oluşumu fermentasyon sırasında ve özellikle ilk safhalarda pH'ın düşmesiyle kendini belli eder. Saf bir fermentasyonda normal olarak oluşan bu asitlerden uçucu olmayanlar şilempede kalır.

Alkol fermentasyonu sırasında asıl ve yan ürün olarak bu alkoller ve asitler ya fermentasyon sırasında ya damıtmada ya da alkolün bekletilmesi sırasında reaksiyona girerek kendilerine özgü kokudaki esterleri oluştururlar.



1.8.2.5 Metil Alkol

Metil alkol genellikle odunun kuru kuruya damıtılmasıyla elde edildiğinden “odun ruhu” da denir. Saf metil alkol renksiz, yamııcı bir sıvı olup, hoş olmayan bir koku ve yakıcı bir tada sahiptir. Su, alkol ve eterle her oranda karışır. Metil alkol vücutta önce formaldehite, sonra formik aside dönüşerek zehirlenmeye neden olur.

Alkol fermentasyonu sırasında tümüyle pektinden meydana gelir ve oluşumunda pektinesteraz enzimi etkindir. Bu enzim için en uygun pH, 5-6'dır. Eğer ortam daha asidik ise yani pH düşükse metanol oluşumu azalır. Metanolün öldürücü dozunun yüksek olmasına karşın, düşük dozlarda da sağlığa zararlı oluşu özellikle içki alkollerindeki metanol miktarlarının sınırlandırılmasına neden olmuştur (4).

1.9 Fermentasyonu Etkileyen Faktörler

Her proseste başarı, yapılan ön işlemlere ve prosesin kontroluna bağlıdır (3).

Fermentasyon üzerine etkili faktörler şunlardır:

- Maya türü ve suşu (alkole yüksek tolerans ve yüksek verimli alkol üretimi)
- Şeker konsantrasyonu
- Havanın bileşimi (Anaerobik koşulların sürdürülmesi)
- Sıcaklık
- pH
- Maya konsantrasyonu
- Alkol konsantrasyonu
- Besiyeri bileşimi
- Fermentasyon sıvısının hareketi
- Bakteriyal gelişimin önlenmesi
- Fermente edilmiş lapanın destilasyonu (14)

1.9.1 Maya Türü ve Suşu

Alkol fermentasyonunda kullanılan maya suşu mayşenin fermentasyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. Kullanılacak maya, mayşede bulunan şekerleri fermente etme yeteneğinde olmalı, ayrıca istenen süre içinde fermentasyonu bitirebilmelidir (4). Genellikle *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar kullanılır (3).

1.9.2 Şeker Konsantrasyonu

Fermentasyonda kullanılan mayşenin, maya üzerinde yaptığı ozmotik basınç, fermentasyon için önemli bir etkiye sahiptir. Fermentasyonda genellikle %12'lik şeker konsantrasyonunda çalışılır. İstenen şeker konsantrasyonunu sağlamak için ilave edilmesi gereken su miktarı, mevcut analitik verilerden hesaplanır. Şeker konsantrasyonunun daha fazla olması, ozmatik basıncın artması nedeniyle, mayaya yavaşlatıcı hatta durdurucu etki yapar. Daha düşük şeker konsantrasyonlarıyla çalışmak da ekonomik değildir. (3, 4)

1.9.3 Havanın Bileşimi

Oksijen daha çok maya üretiminde söz konusudur. Çünkü mayanın normal olarak tomurcuklanıp çoğalabilmesi için gerekli enerjinin, ortamdaki şekerlerden sağlanmasında, büyük miktarlarda oksijen gereklidir. Fakat alkol üretiminde anaerobik şartlar istenir. Fermentasyon süresince karbondioksit açığa çıkacağından anaerobik şartlar sağlanmış olur.

Fermentasyon başladıktan sonra mayanın hava ile temas etmesi sakıncalıdır. Çünkü bu sırada ortama giren oksijenin etkisiyle, maya, fermentasyon yapmak yerine, çoğalma eğiliminde olacak, bu da fermentasyon yan ürünlerini artıracaktır (3, 4).

1.9.4 Sıcaklık

Alkol fermentasyonu yapan mayaların faaliyet gösterdikleri optimum sıcaklık 30 °C'dir. Bu nedenle de mayşe, bu sıcaklıkta tutulmaya çalışılır. Fermentasyon boyunca mayşenin sıcaklığı artar. Optimum sıcaklığı sağlamak için fermentör dışardan soğutulmalıdır. (3, 4).

1.9.5 pH

Fermentasyonda önemli diğer bir etken, fermentasyon sıvısının pH'sıdır. Fermentasyon, pH 4.0-4.5 arasında gerçekleşir. pH genellikle sülfat asidi ile ayarlanır. Tablo 1.6'da, fermentasyon süresi, pH, son fermentasyon derecesi arasındaki ilişki gösterilmiştir (3, 4).

Tablo 1.6 Fermentasyon Süresi, pH, %Verim Arasındaki İlişki (4)

Zaman, saat	pH	% Verim
34	4.0	1.70
36	4.0	1.60
55	3.9	1.65

1.9.6 Maya Konsantrasyonu

Fermentasyonda maya konsantrasyonu da önemli olup, uygulanan yöntemle göre değişir. Aşılacak maya miktarı, kullanılan mayşeyi kısa sürede ve hızla fermente ederek tüm şekeri arzulanan süre içinde alkole dönüştürecek düzeyde olmalıdır. Düşük oranlı aşılmalarda maya ortamdaki şekeri fermente edebilmek için, önce yeterli miktarda çoğalmak zorundadır. Bu

durumda başlangıç fermentasyonu yavaş seyreder ve dolayısıyla uzun sürer. Bu da kontaminasyonlara ve şeker ve zaman kaybına neden olur (4).

1.9.7 Alkol Konsantrasyonu

Fermentasyon sırasında oluşan alkolün, maya üzerine yaptığı ozmotik basınç önemli bir etkiye sahiptir. Çoğunlukla mayalar, alkol konsantrasyonu %11'in üzerine çıkınca fermentasyon faaliyetini yavaşlatırlar. Bu nedenle mayşe konsantrasyonu olgun mayşenin alkol miktarı %8-10 olacak şekilde ayarlanmalıdır (4).

1.9.8 Besiyeri Bileşimi

Alkol üretiminde kullanılan kimi hammaddeler maya besini bakımından yetersiz olabilirler. Bu durumda maya, fermentasyon sırasında yeterli besini bulamayacağı için hem başlangıç fermentasyonunda, hem de asıl fermentasyonda yeterince çoğalıp etkinlik kazanamaz ve fermentasyon aksar. Maya besini olarak en fazla azotlu ve fosforlu maddeler söz konusudur. (4).

1.9.9 Fermentasyon Sıvısının Hareketi

Alkol fermentasyonunda önemli diğer bir etken karıştırma değildir. Karıştırma olmadığında, başlangıç fermentasyonunda miktar bakımından üst seviyeye ulaşmış olan maya, giderek dibe çökmeye başlar ve bu çökme, fermentasyon hızı düşüp, CO₂ çıkışı azalmaya başladıktan sonra giderek artar. Bu ise daha az sayıda mayanın mayşe içinde erimiş durumdaki şekerle temasa gelmesine neden olur ve fermentasyon süresi uzar. Eğer fermentasyon sıvısı herhangi bir şekilde karıştırılıp, tüm mayanın sıvı içinde yüzer durumda tutulması sağlanırsa, şeker daha fazla maya hücresi ile temasta olacağından fermentasyon daha hızlı gerçekleşir. Sürekli fermentasyon yöntemlerinin esasını bu sistem teşkil eder (4).

1.9.10 Bakteriyal Gelişimin Önlenmesi

Ortamda sadece fermentasyonu gerçekleştirecek olan mikroorganizmanın olması gerekir. Aksi halde istenen fermentasyon gerçekleşemez. İstenmeyen mikroorganizmaların proses ortamına girmesini önlemek için, fermentasyon sıvısının ve kullanılan tüm malzemelerin önce sterilize edilmesi gerekmektedir.

1.9.11 Fermente Edilmiş Lapanın Destilasyonu

Fermente olan mayşe, etil alkol ve füzeli yağlarının ayrılması için destilasyon işlemi gerçekleştirilir. Destilasyonla, alkolün farklı konsantrasyonlardaki fraksiyonları ve bakiye birbirinden ayrılır. %60-90 etil alkol içeren fraksiyonlar “yüksek şaraplar” olarak bilinirler. Bunlar da fraksiyonlu destilasyon ile %95’lik alkol içerecek şekilde derişiklendirilirler. Bakiye genellikle atılır ya da farklı amaçlar için kullanılır. Yeni mayşe hazırlarken melası seyreltmek için, suyla beraber kullanılır. Aynı zamanda biriketleri yapıştırmakta da bu bakiyeden faydalanılabilir. Bakiyedeki katı maddeler, ısı uygulamasıyla konsantre edilerek gübre olarak satılabilirler. Çünkü diğer bileşenlerine ilaveten potasyum ve fosfatlar içermektedirler (3).

1.10 Fermentasyon Teknolojisindeki Gelişmeler

Günümüzde petrol fiyatlarındaki hızlı artışlar ve petrol rezervlerindeki darboğazlar, petrol yerine başka ucuz ve kolay sağlanabilecek kaynakların araştırılmasını gerektirmiştir. Yakıt kalitesindeki etanolü, fermentasyon ile ucuz olarak üretebilmek, bu açıdan günden güne önem kazanmaktadır (15). Bu da, eski fermentasyon proseslerinin incelenmesine ve yeni proseslerin geliştirilmesine yol açmıştır (16).

Biyolojik reaksiyonların hızları kimyasal reaksiyonlara göre daha yavaştır. Önemli miktarda madde üretimi için değişik türde birçok reaktör geliştirilmiştir (16). Ayrıca çoğu kimyasal reaksiyonda olduğu gibi fermentasyon reaksiyonlarında da ürünün, reaksiyonu engelleme (inhibisyon) özelliği vardır. Bu, çözümü oldukça zor bir problemdir (16).

Geleneksel olarak, etil alkol üretiminde kesikli fermentasyon kullanılmaktadır. Kesikli fermentörde substratın ürüne tam dönüşümü için uzun bir fermentasyon süresi gerekmektedir. Sürekli çalışan karıştırmalı fermentör, hücre geri döngülü fermentör veya vakum fermentörleri ile reaksiyon süresi azaltılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu sistemler de işletme güçlüğü ve ekonomik problemler nedeniyle fazla tercih edilmemektedirler.

Reaksiyon hızını arttırmak için kullanılan başka bir sistem de tutuklanmış hücre içeren dolgulu kolonlardır. Bu reaktörde substrat, katı desteklere tutuklanmış organizma üzerinden geçer. Sistemin temel avantajı, birim hacimdeki hücre miktarının yüksek olması nedeniyle yüksek üretkenlik değerinde çalışılabilmesidir. Ayrıca bu sistem, istenen akış hızında çalışma imkanı da vermektedir (16).

Fermentasyon sırasında üretilen etanol, konsantrasyonu (ortamda) 30-40 g/l'ye ulaştığı zaman reaksiyonu gerçekleştiren mayanın büyüme hızını ve reaksiyon hızını düşürmekte, aynı zamanda da hücrelerin ölüm hızını arttırabilmektedir. Etanol derişimi 110-120 g/l'nin üzerine çıktığıdaysa üretim tamamen durmaktadır. Bu sorunu çözümlmek için düşünölen yöntemler arasında son zamanlarda üretim ve ayırmayı birleştiren çözücü ekstraksiyonu, membranla ayırma, hücre geri döngölü vakum fermentasyonu, aktif karbonlu ekstraksiyon bulunmaktadır. Ayrıca fermentasyon sırasında gaz ile etanolü sıyırma tekniğı de son zamanlarda üzerinde çalışılmakta olan bir yöntemdir.

Bütün bu çalışmalarda etanol inhibisyon sorununa bir çözüml geliştirilmeye çalışılmıştır. Ancak etanolün yanı sıra, üretilen bazı ikincil yan ürünler de zamanla birikerek etanol gibi inhibisyona neden olabilmektedirler. Vakumlu fermentasyonda özellikle uçucu olmayan ürünlerin inhibisyonu önem kazanmakta, membranla fermentasyon sistemlerinde ise büyük molekül boyutuna sahip ürünler ikincil inhibisyona neden olabilmektedir. Polar olmayan çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyonlu fermentasyon sistemlerinde de küçük organik asitler birikerek ikincil inhibisyon yaratabilmektedirler. İkincil ürünlerin inhibisyonunu ortadan kaldırmak için sürekli bir sızdırma (bleed) yapılarak bu ürünlerin sistemde birikerek inhibisyona neden olmaları önlenmektedir (15).

1.11 Sterilizasyon

Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan petri kutusu, deney tüpü ve pipet gibi cam malzemeler ile besiyeri, dilüsyon sıvısı ve diğler tüm çözeltilerin, mikroorganizmalardan arındırılması amacıyla sterilizasyon işlemleri uygulanmaktadır. Sterilizasyon herhangi bir materyaldeki tüm mikrobiyal yaşamın sona erdirilmesidir. Sterilizasyon kavramı mutlak olup, derecesi yoktur.

Mikrobiyolojik çalışmalarda sterilizasyon işleminin uygulanması çeşitli şekillerde olmaktadır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Isı ile sterilizasyon
2. Membran fitrasyon ile sterilizasyon
3. Kimyasal maddelerle sterilizasyon
4. Işınlama ile sterilizasyon

1.11.1 Isı ile Sterilizasyon

Otoklavda sterilizasyon, kaynatma, pastörizasyon, ve tinalizasyon gibi nemli ısı uygulamaları ile kuru hava sterilizasyonu en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir.

Nemli sıcak, kuru sığağa oranla mikroorganizmalar üzerinde daha fazla öldürücü etkiye sahiptir.

Otoklavda Sterilizasyon: Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan en yaygın ve etkin sterilizasyon yöntemidir. Otoklav, yüksek basınç ve sıcaklık istenen çalışmalarda kullanılan bir cihazdır. Otoklavda sıcaklık °C veya °F ile, basınç atmosfer veya psi (pound square inch) ile ifade edilir. Otoklavda sterilizasyon; besiyerlerinin, çeşitli dilüsyon sıvılarının ve bazı cam malzemelerin sterilizasyonu ile çalışma tamamlandıktan sonra petri kutusu içinde organizma içeren deney tüpü, erlen ve benzeri kullanılmış tüm malzemelerin sterilizasyonunda kullanılır. Sterilizasyon süresi sterilize edilecek hacimlere göre 121°C'de Tablo 1.7'de verilmiştir.

Tablo 1.7 Bazı Laboratuvar Malzemelerinin Hacimlerine Bağlı Olarak Sterilizasyon Süreleri

Kap Cinsi	Sıvı Hacmi	Zaman, dakika
Test tüpleri	5-15 ml	15
500 ml erlen	250-350 ml	20
1 litre erlen	500-750 ml	25
1 litre erlen	1.0-1.5 litre	30

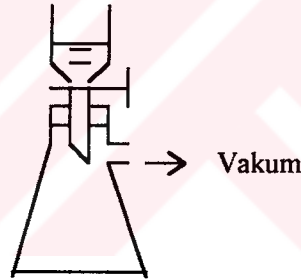
Bazı hallerde besiyerlerinin özel yöntemlerle sterilize edilmesi gerekir. Örneğin besiyerinin bileşiminde dekstroz (glukoz) ve fosfatlar varsa bunlar beraber sterilize edilemezler. Ayrı ayrı sterilize edilip soğutulduktan sonra karıştırılmaları gerekir. Besiyeri bileşimine giren vitaminler ve keto grubu bulunan şekerler de filtrasyonla sterilize edilip, besiyerine sterilizasyondan sonra ilave edilmelidirler. Bu gibi uygulamalarda besiyeri bileşimine giren maddelerin miktarları doğru bir şekilde hesaplanmalıdır.

Kuru Hava Sterilizasyonu: Pipet, petri kutusu gibi cam malzeme otoklavlama sırasında hava paketleri oluşturabilecekleri ve dolayısıyla yeterince sterilize edilememesi riski de dahil olmak üzere pek çok nedenle kuru hava sterilizatörlerinde sterilize edilir. Bu amaçla yapılmış pek çok cihaz bulunmakla beraber, en yaygın kullanılanı etüvlerdir.

Normal olarak doldurulmuş (aşırı yüklenmemiş) kuru hava sterilizatörlerinde sterilizasyon süresi 160 °C'de 2 saat veya 170 °C'de 1 saattir. Etüv çok dolu ise süre uzatılmalıdır.

1.11.2 Membran Filtrasyon İle Sterilizasyon

Karbohidrat, antibiyotik, organik asitler ve tuzlar gibi ısıl işlemde etkilenebilecek çeşitli maddelerin çözeltileri membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilir. Membran filtreler genellikle selülozdan yapılmış olup, 0.45-0.2 mikron gözenek büyüklüklerine sahiptir. Şekil 1.4'de membran filtrasyon düzeneği gösterilmiştir. Bir vakum pompası yardımıyla gerekli vakum oluşturularak sıvının filtreden aşağıya süzülmesi temin edilir. Böylece mikroorganizmalar filtrenin üzerinde kalarak sıvıdan ayrılmış olur. Membran filtreler genellikle steril olarak satılmaktadırlar. Ancak filtreyi taşıyan metal aksam, erlen v.b. kısımlar otoklavda veya kuru hava sterilizatörlerinde steril edildikten sonra kullanılmalıdır. Aksi takdirde filtreden geçen kısmın yeniden mikroorganizmalarla bulaşma tehlikesi vardır.



Şekil 1.4 Filtrasyon İle Sterilizasyon

1.11.3 Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon

Bu amaçla piyasada çeşitli ticari isimlerle üretilmiş maddeler kullanılmaktadır. Ancak bunlar ekipmanların değil, laboratuvarındaki çeşitli yüzeylerin mikroorganizmalardan arındırılmasında yani, dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaktadırlar. Isıl işleme dayanıklı olmayan plastik petri kutusu ve benzeri diğer malzemelerin sterilizasyonu ise etilen oksit ve propilen oksit gibi gazlar kullanılarak yapılmaktadır.

1.11.4 Işınlama İle Sterilizasyon

Gama, katod ve mor ötesi ışınlar, çeşitli alet ve ekipmanlardan, yüzeylerden ve gıda maddelerinden mikroorganizmaların arındırılması amacıyla kullanılan ışınlardır. Bu ışınlar yüksek frekanslı, kısa dalga boylu ve yüksek enerjiye sahiplerdir. Temas ettikleri materyalde sıcaklık artışına neden olmadan mikroorganizmayı öldürürler. Bu yüzden ışınlama ile sterilizasyona “soğuk sterilizasyon” denir (17, 18).



II. MATERYAL VE METOD

2.1 Mikroorganizma

Denemelerde PAKMAYA yaş pres mayası ve A.Ü. Ziraat Fakültesi'den temin edilen *Saccharomyces cerevisiae* (Narince 3) kullanılmıştır.

2.2 İnokulum Ortamı

PAKMAYA ile çalışırken maya, steril fizyolojik tuzlu su (FTS: %0.85 NaCl) içinde aktif hale getirilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* kültür mayası için ise pH 4.5'ta, YPG (10 g/l Bacto-peptone, 10 g/l Yeast-extract, 20 g/l Glukoz) besiyeri kullanılmış, hazırlanan besiyeri, kullanılmadan önce Prior Clave otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

2.3 Fermentasyon Ortamı

Fermentasyon ortamı, Melin ve Shieh (1992)'ye ve Bazua ve Wilke (1977)'ye göre hazırlanmıştır (17, 18). Kullanılmadan önce otoklavda, 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmişlerdir. Fermentasyon 30°C'de en az 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

2.4 Kimyasallar

2.4.1 İnokulum ve Fermentasyon Ortamı için Kullanılan Kimyasallar

Mayaların gelişmesi için gerekli olan YPG besiyeri için kullanılan maddeler Bacto-peptone, Yeast-extract, İ.Ü. Veterinerlik Fakültesi imkanları kullanılarak temin edilmiştir.

Kullanılan fermentasyon ortamları ve bileşimleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 Denemelerde Kullanılan Fermentasyon Ortamları (19, 20)

Fermentasyon Ortamı I: Melin ve Shieh (1992)	Fermentasyon Ortamı II: Bazua ve Wilke (1977)
75.0 g glukoz mono hidrat ($C_6H_{12}O_6$)	10.00 g glukoz mono hidrat ($C_6H_{12}O_6$)
2.0 g KH_2PO_4 (potasyumortoprimerfosfat)	3.00 g KH_2PO_4 (potasyumortoprimerfosfat)
2.0 g NH_4Cl	2.50 g NH_4Cl
0.1 g $MgSO_4$	0.25 g $MgSO_4$
0.1 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.01 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
1.0 L bidestile su	2.50 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$
	5.00 g sitrik asit ¹
	2.50 g sodyum sitrat ¹
	1.00 L bidestile su

Fermentasyon ortamlarında kullanılan bu kimyasallardan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4Cl , $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, sitrik asit ve sodyum sitrat Merck'ten; KH_2PO_4 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve glukoz monohidrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) ise Carlo Erba'dan temin edilmişlerdir. Çözeltiler bidestile su ile hazırlanmışlardır.

2.4.2 Analizlerde Kullanılan Kimyasallar

Etanol miktarını belirlemek için gaz kromografisinden yararlanılmış bu amaçla mutlak alkol ve internal standart olarak n-propanol , U.V. spektrofotometresi'nde glukoz tayini için de %5'lik fenol ve derişik H_2SO_4 kullanılmıştır.

2.5 Analiz Yöntemleri

Denemeler sonunda yapılan analizlerde fermentasyon ortamında kalan glukoz ve oluşan etanol miktarı tayin edilmiştir.

¹ Bu maddeler istenen pH değerinin sabit tutulması amacıyla tampon olarak eklenmişlerdir.

2.5.1 Glukoz Miktarının Belirlenmesi

Fermentasyon ortamındaki glukoz miktarı, Jenway 6105 U.V./Vis. Spektrofotometresi ve “Fenol-H₂SO₄ yöntemi” kullanılarak, kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (21).

Bu amaçla, fermentasyon ortamından alınan her bir numune önce santrifüj ile katı kısımlarından ayrılmış, sonra bu sıvıdan alınan 25µl, bidestile su ile 50 ml’ye tamamlanarak seyreltilmiştir.

İşlem: 50 ml’ye seyreltilen çözeltinin 2ml’si 50 ml’lik şilifli kapaklı erlene konmuştur. 1ml %5’lik fenol çözeltisi eklenmiştir. 5ml derişik H₂SO₄ hızla ilave edilmiştir. İyi bir karışım elde etmek için erlenin kapağı hemen kapatılıp, çalkalanmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında, 10-20 dakika da 25-30°C deki su banyosunda bekletilmiştir. Kör denemeleri hazırlarken şeker yerine aynı miktarda bidestile su kullanılmıştır.

Standart eğriyi oluşturmak amacıyla önce, 10 µg/ml glukoz içeren çözeltinin absorbans değerleri, farklı dalga boylarında okunmuş, çizilen dalga boyu-Absorbans grafiğinden (Tablo 3.1, Şekil 3.1) maksimum absorbansın ölçüldüğü dalga boyu, glukoz için 495 nm olarak belirlenmiş, daha sonra da farklı konsantrasyonlardaki şeker çözeltilerinin absorbansları, belirlenen bu dalga boyunda ölçülerek, denemelerde standart olarak kullanılan grafik elde edilmiştir (Tablo 3.2, Şekil 3.2). Analizlere ait sonuçlar ise Tablo 3.3’te verilmiştir.

2.5.2 Etanol Miktarının Belirlenmesi

Fermentasyon ortamında oluşan etanolün miktarı, Varian 201 Model gaz kromatografisi ve Hewlett Packard 3390A İntegratör kullanılarak yapılmıştır. Operasyon şartları şöyledir:

Dedektör : FID

Kolon : %20 DEGA (Dietilenglikoladipat), %3 H₃PO₄, 60/80 Chromosorb W, aw ve paslanmaz çeliktir. 190-200°C’ye dayanıklıdır

Fırın sıcaklığı: 90°C

Taşıyıcı gaz : Azot (0.6 bar)

Hidrojen : 25 ml/dak.

Fermentasyon ortamından alınan her bir numune, glukoz tayininde olduğu gibi, önce katı kısımlarından ayrılmak için 5000 devir/dakika’da 15 dakika santrifüj edilmiştir (22, 23). Daha sonra, ele geçen bu sıvıdan alınan 10 ml, destilasyona tabi tutulup, 10 ml’lik kapaklı şilifli

mezürde toplanmıştır. İnternal standart katılmadan önce GC’de analizi yapılan numunelerde sadece etanol olduğu tespit edildikten sonra, internal standart (iç standart) olarak yaklaşık 0.150-0.160 gram n-propanol ilave edilmiştir. Mezür içindeki sıvı 10 ml’ye bidestile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu numuneden 0.5µl kolona verilmiş, sonuçlar (etil alkol/iç standart) ağırlık oranları ile pik oranları arasında çizilen standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır. Standart eğriler ve sonuçları içeren tablolar bulgular kısmında verilmiştir.

2.6 Kesikli Fermentasyon Denemeleri

Deneysel çalışmalarda ilk olarak, fermentasyonun ne oranda gerçekleştiğinin görülmesi amacıyla, kesikli yöntem kullanılarak ön denemeler yapılmıştır.

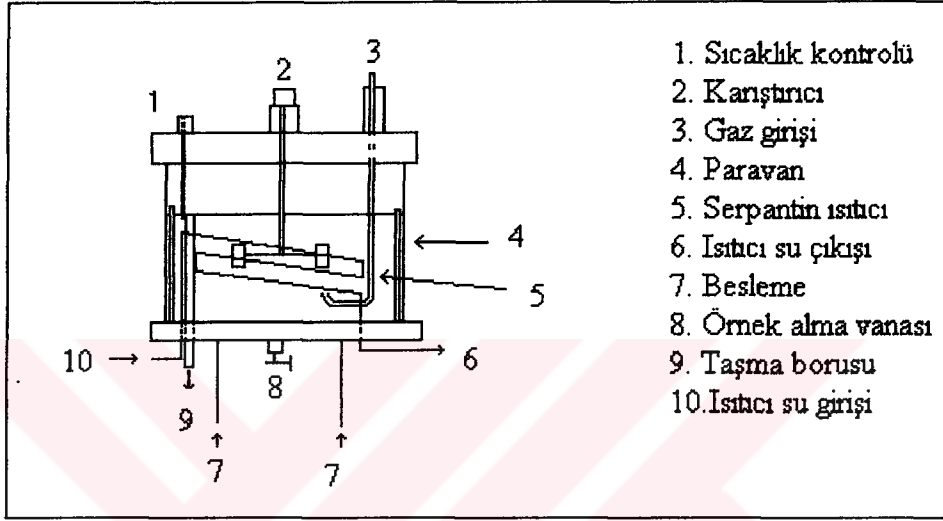
Hazırlanan 1 litre’lik fermentasyon ortamı, otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra, yine steril koşullarda 300 ml’lik 5 adet erlene eşit miktarlarda bölünmüştür. Daha sonra 30°C’deki su banyosuna yerleştirilmiş, belli zaman aralıklarında pH ve sıcaklıkları, pH metre (CD760 WPA) ile ölçülmüştür. Aynı zamanda alkol ve glukoz miktarlarını belirlemek için de bu erlenlerden numuneler alınmıştır.

Çalışmada ilk önce PAKMAYA yaş pres mayası kullanılmış, fermentasyon ortamı ise Melin ve Shieh (1992)’ye göre hazırlanmıştır.

Bilindiği gibi *Saccharomyces cerevisiae* (Narince 3) kültür mayası kullanıldığında, önce mayanın, aktif hale getirilip, çoğaltılması gerekir. Bu amaçla tüpler içinde, dondurularak kurutulmuş olarak getirtilen maya, öze sürme yöntemiyle YPG + %2 agar (pH=5.5) besiyerine ekilmiştir. 24 saat 30°C’de inkübe edilmiştir. FTS ile sulandırılıp, 1 ml’si bir pipetle alınmış ve içinde 9 ml YPG besiyeri (pH=4.5) bulunan tüpe ilave edilmiştir. Bu da 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Böylece 10 ml hacimde gelişen mayalar bu kez, içinde 40 ml YPG bulunan erlene ilave edilip, 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Son olarak 450 ml YPG içeren erlende aynı işlem tekrarlanmıştır. Bu aşamada uygulanan dilüsyonla sayma tekniği ile, mayanın 1×10^8 adet/ml canlı hücre konsantrasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Buradan alınan belli bir miktar, fermentasyon ortamına ilave edilip, fermentasyon başlatılmıştır (24). Yapılan tüm işlemler, kontaminasyon olmaması için steril koşullarda ve steril malzemelerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bulgular kısmında verilmiştir.

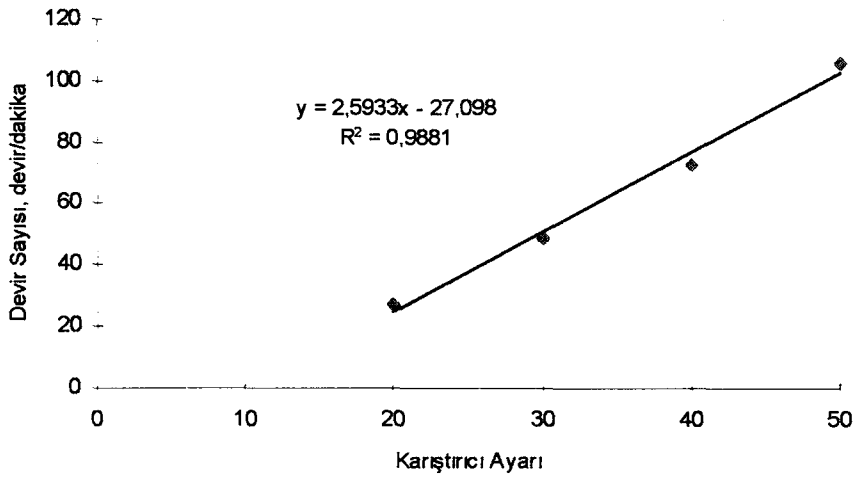
2.7 Sürekli Fermentasyon Denemeleri

Kesikli fermentasyon işleminde istenen alkol verimine (sanayi ölçeğinde %8-10 alkol) ulaşıldıktan sonra fermentasyon işlemine son verilir. Sürekli fermentasyon prosesinde amaç, proses parametrelerini (pH, sıcaklık, karıştırma hızı, besleme hızı vs.) ayarlayarak mayaları canlı tutmak ve dolayısıyla belli bir konsantrasyonda sürekli olarak ürün almaktır. Şekil 2.1 sürekli fermentasyon denemelerinin yapıldığı fermentörü göstermektedir.



Şekil 2.1 Karıştırmalı Akışlı Fermentör

Cihazın karıştırıcı ayarı ile devir sayısı arasındaki bağıntı da Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Fermentörün Karıştırıcı Ayarı İle Devir Sayısı Arasındaki Bağıntı

III. BULGULAR

3.1 Reaktan (Glukoz) Miktarının Belirlenmesi

Fermentasyon ortamından alınan numune ilk önce santrifüj ile katı kısımlarından ayrılmış daha sonra numunedeki şeker konsantrasyonu, UV spektrofotometresinde ölçülebilir sınırlara çekmek için seyreltilmiştir. Bunun için numuneden 0.25 ml (250 µl) alınıp, 50 ml'ye bidestile su ile tamamlanmıştır. Buradan alınan 2 ml'lik numuneye 1 ml, ağırlıkça %5'lik fenol çözeltisi ve 5 ml derişik H₂SO₄ eklenip, önce oda sıcaklığında 10-15 dakika, daha sonra 30°C'deki su banyosunda 15-20 dakika bekletilerek analize hazırlanmıştır.

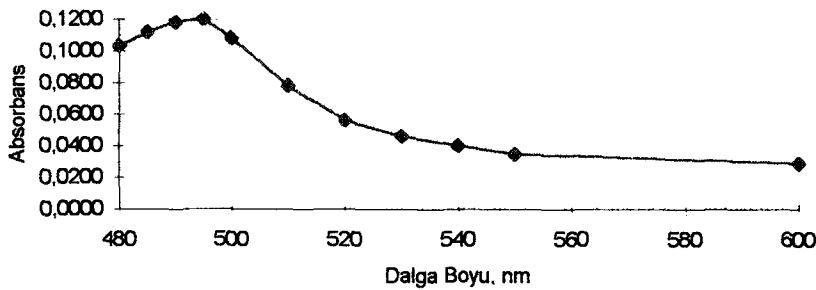
3.1.1 UV Çalışmaları

3.1.1.1 Glukoz için Maksimum Absorbansı Veren Dalga Boyunun Belirlenmesi

Çözelti içindeki glukoz miktarının belirlenmesi için 10 µg/ml'lik glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin 480-600 nm aralığında absorbansları ölçülmüş, elde edilen değerler Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Tablo 3.1'deki değerler, x-ekseni dalga boyu y-ekseni absorbans'ı gösterecek şekilde, Şekil 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 10 µg/ml'lik Glukoz Çözeltisi İçin Uygun Dalga Boyunun Seçimi

Dalga Boyu (nm)	480	485	490	495	500	510	520	530	540	550	600
Absorbans	0,103	0,112	0,118	0,120	0,108	0,078	0,056	0,046	0,040	0,035	0,029



Şekil 3.1 UV de 10 µg/ml'lik. Glukoz Çözeltisi için Uygun Dalga Boyunun Seçimi

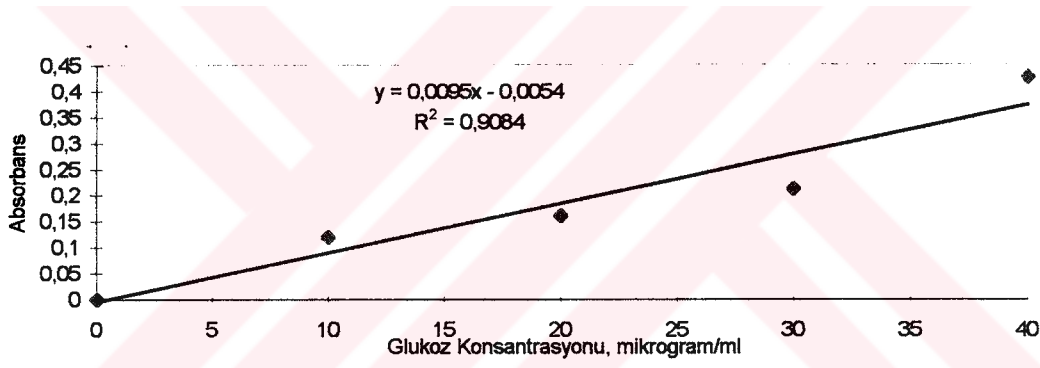
Tablo 3.1 ve Şekil 3.1'den de görülebileceği gibi glukoz 495 nm'de maksimum absorbands (0.120) değerine sahiptir.

3.1.1.2 Glukoz Konsantrasyonu İle Absorbans Arasındaki Bağıntının Belirlenmesi

Tablo 3.2'de farklı konsantrasyonlardaki glukoz çözeltilerinin 495 nm dalga boyunda ölçülen absorbands değerleri görülmektedir. Tablo 3.2'deki değerler için lineer regresyon hesaplamaları yapılmış olup, elde edilen doğrusal bağıntı Şekil 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. 495 nm'de Farklı Konsantrasyondaki Glukoz Çözeltileri İçin Absorbans Değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	0	10	20	30	40
Absorbans	0	0,120	0,160	0,211	0,427



Şekil 3.2 Glukoz Standart Grafiği

3.1.1.3 Analiz Sonuçları

I, II, III, IV ve V no.lu denemeler kesikli sistemde, erlenlerde, VI ve VII no'lu denemeler ise sıcaklık kontrollü karıştırılmalı akışlı bir fermentörde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca pH kontrolü için VI ve VII no.lu denemelerde tampon çözelti içeren fermentasyon ortamı kullanılmıştır.

Sonuçlar, reaksiyon süresine göre, pH değerlerini de içerecek şekilde Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3 Numunelerin UV Spektrofotometresinde Alınan Sonuçları

Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	495 nm'de Glukoz Absorbans	Glukoz Miktarı (µg/ml)
I	0	4.499		
	5	2.102	0.428	45.62
	24	1.910	0.257	27.62
	29	1.882	0.076	8.57
	48	1.948	0.031	3.83
	53	1.916	0.018	2.46
	72	1.962	0.001	0.67
II	0	4.283		
	5	2.106	0.906	95.94
	24	1.879	0.236	25.41
	29	1.822	0.130	14.25
	48	1.921	0.016	2.25
	53	1.901	0.004	0.99
III	0	4.430		
	5	2.175	1.999	210.99
	24	2.077	1.717	181.30
	53	2.024	0.039	4.67
	72	2.133	0.014	2.04
	77	2.024	0.010	1.62
IV	0	4.119		
	5	3.014	1.999	210.99
	24	2.291	0.020	2.67
	53	2.662	0.014	2.04
	72	2.659	0.010	1.62
	77	2.655	0.008	1.41
	96	2.450	0.016	2.25
V	0	4.452		
	24	2.621	0.310	33.20
	48	2.552	0.065	7.41
	72	2.634	0.038	4.57

Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	495 nm'de Glukoz Absorbans	Glukoz Miktarı (µg/ml)
VI	0	4.237		
	24	4.327	0.035	4.25
	48	4.345	0.017	2.36
	53	4.326	0.013	1.94
	72	4.371	0.002	0.78
VII	0	4.237		
	24	4.335	0.341	36.46
	29	4.330	0.333	35.62
	48	4.222	0.099	10.99
	54*	4.332	0.092	10.25
	72*	4.321	0.423	45.09
	78*	4.313	1.205	127.41
	80*	4.323	0.121	13.3

* 0.6 ml/dakika debi ile ortama sürekli taze besiyeri ilave edilip aynı debi ile ortamdan fermentasyon sıvısı alınmıştır.

3.2 Ürün (Alkol) Miktarının Belirlenmesi

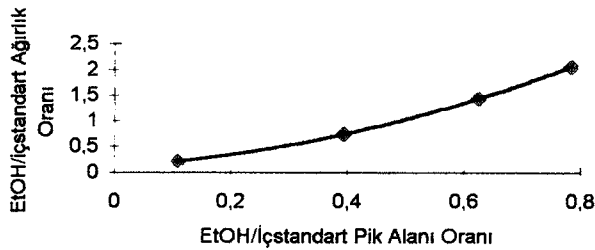
Fermentasyon ortamından alınan her bir numune, glukoz tayininde olduğu gibi, önce katı kısımlarından ayrılmak için 5000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edilmiştir (20, 21). Daha sonra, ele geçen buradan alınan 10 ml'lik sıvı, destilasyona tabi tutulup, 10 ml'lik kapaklı şilifli mezürde toplanmıştır. Numunelerin GC'de yapılan ön analizlerinde ortamda sadece etanol olduğu tespit edildikten sonra destilata, iç standart olarak yaklaşık 0.150 gram n-propanol ilave edildikten sonra mezürdeki sıvı, 10 ml'ye bidestile su ile tamamlanmış, hazırlanan bu numunedan 0.5 µl kolona verilmiştir.

3.2.1 GC Çalışmaları

Tablo 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 ve 3.9, standart olarak hazırlanan çözeltilerin ve numunelerin etanol/n-propanol ağırlık oranları ve pik alanı oranlarını, standart eğrinin denklemi ile birlikte vermektedirler. Bu tablolarda ayrıca reaksiyonlara ait sıcaklık, mikroorganizma ve %verim bilgileri de verilmiştir. Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7 ise standart eğrileri göstermektedir.

Tablo 3.4 I. ve II. Nolu Denemelerde Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları

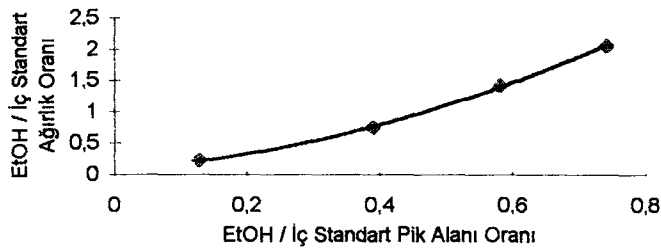
Mikroorganizma : PAKMAYA yaş pres mayası					
Fermentasyon Sıcaklığı : 30± 0.1°C					
İçstandart : n-propanol					
I. Denemede Verim (I) =34.70/38.32=0.91					
II. Denemede Verim (II)=26.23/38.32=0.68					
Glukoz = 75 g/litre					
Standart	Etanol/n-propanol ağırlık oranı-y	Etanol/ n-propanol Pik Alan Oranı -x	Etanol (g/L)		
1	0.2193	0.109	3.43		
2	0.7410	0.395	11.07		
3	1.4230	0.624	21.67		
4	2.0600	0.784	30.86		
Standart eğrinin denklemi: $y = 0.1255 + 0.6183x + 2.3548x^2$					
Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	n-propanol (g/10 ml)	Etanol/ n-propanol Pik Alanı Oranı	Etanol (g/L)
I	0	4.499			
	5	2.102	0.1551	0.451	13.70
	24	1.910	0.1532	0.705	26.30
	29	1.882	0.1515	0.718	27.00
	48	1.948	0.1571	0.714	27.78
	53	1.916	0.1597	0.807	34.44
	72	1.962	0.1537	0.829	34.70
II	0	4.283			
	5	2.106	0.1527	0.189	5.00
	24	1.879	0.1619	0.578	20.55
	29	1.822	0.1566	0.622	22.26
	53	1.901	0.1540	0.644	23.10
	72	2.037	0.1575	0.688	26.23



Şekil 3.3 I ve II. Sayılı Denemelerde Kullanılan Standart Eğri

Tablo 3.5 III. Nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları

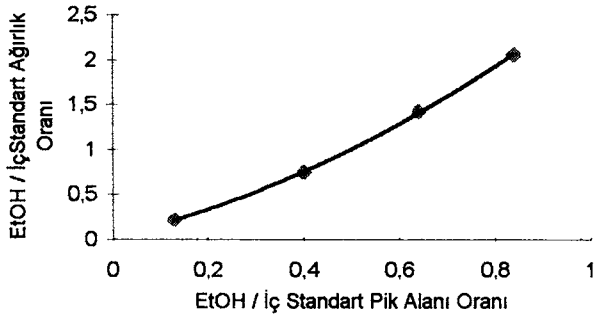
Mikroorganizma : PAKMAYA yaş pres mayası					
Fermentasyon Sıcaklığı : 30± 0.1°C					
İçstandart : n-propanol					
Verim = 27.29/ 38.32=0.71					
Glukoz = 75 g/litre					
Standart	Etanol/ n-propanol ağırlık oranı-y	Etanol/ n-propanol Pik Alanı Oranı -x	Etanol (g/L)		
1	0.2193	0.127	3.43		
2	0.7410	0.391	11.07		
3	1.4230	0.581	21.67		
4	2.0600	0.741	30.86		
Standart eğrinin denklemi: $y = 0.0818 + 0.6970x + 2.6840x^2$					
Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	n-propanol (g/10 ml)	Etanol/ n-propanol Pik Alanı Oranı	Etanol (g/L)
III	0	4.430			
	5	2.175	0.1519	0.212	5.32
	24	2.077	0.1696	0.514	18.34
	29	2.049	0.1566	0.638	25.34
	48	2.075	0.1573	0.651	26.33
	53	2.024	0.1600	0.660	26.34
	72	2.133	0.1545	0.673	27.29



Şekil 3.4 III. Nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri

Tablo 3.6 IV. Nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları

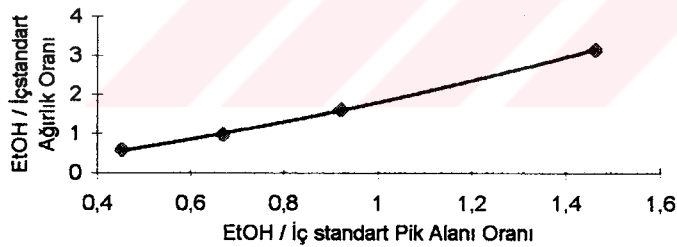
Mikroorganizma : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
Fermentasyon Sıcaklığı : 30± 0.1°C					
İçstandart : n-propanol					
Verim = 33.0/38.32 = 0.86					
Glukoz = 75 g/litre					
Standart	Etanol/ n-propanol ağırlık oranı	Etanol/ n-propanol Pik Alanı Oranı	Etanol (g/L)		
1	0.2193	0.129	3.43		
2	0.7410	0.401	11.07		
3	1.4230	0.643	21.67		
4	2.0600	0.840	30.86		
Standart eğrinin denklemi: $y = 0.0347 + 1.2195x + 1.4266x^2$					
Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	n-propanol (g/10 ml)	Etanol/n-propanol Pik Alanı Oranı	Etanol (g/L)
IV	0	4.119			
	5	3.014	0.1551	0.151	3.90
	24	2.291	0.1609	0.612	21.16
	29	2.675	0.1560	0.642	21.93
	48	2.671	0.1607	0.667	23.83
	53	2.662	0.1603	0.786	26.76
	72	2.659	0.1640	0.825	33.00



Şekil 3.5 IV. Nolu Denemede Kullanılan Standart Eğrisi

Tablo 3.7 V. Nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları

Mikroorganizma : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Narince 3)					
Fermentasyon Sıcaklığı : 30± 0.1°C					
İçstandart : n-propanol					
Verim = 29.13/38.13 = 0.76					
Glukoz = 75 g/litre					
Standart	Etanol/ n-propanol ağırlık oranı-y	Etanol/ n-propanol Pik Alan Oranı -x	Etanol (g/L)		
1	0.5735	0.452	9.05		
2	0.9642	0.669	14.26		
3	1.6130	0.920	23.87		
4	3.152	1.461	46.55		
Standart eğrinin denklemi: $y = -0.1508 + 1.2593x + 0.687x^2$					
Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	n-propanol (g/10 ml)	Etanol/n-propanol Pik Alanı Oranı	Etanol (g/L)
V	0	4.452			
	24	2.621	0.1580	0.820	21.23
	48	2.552	0.1637	0.947	26.19
	72	2.634	0.1565	1.025	29.13



Şekil 3.6 V. Nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri

Bundan sonraki denemede (VI Nolu deneme) 0.0118 g / 5.0 ml konsantrasyonda standart çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin GC’de verdiği pik alanı, 902 olarak bulunmuştur. Bu standarttan faydalanarak elde edilen deneme sonuçları Tablo 3.8’de verilmiştir. Bu denemede pH kontrolü, besiyerine ilave edilen tampon çözelti ile sağlanmıştır.

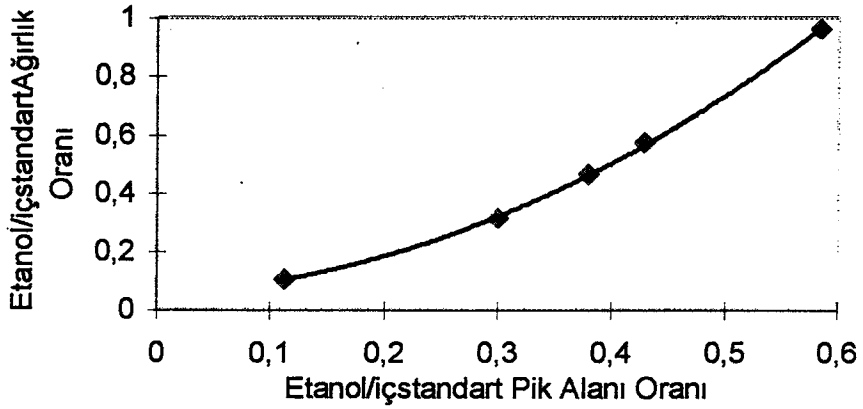
Tablo 3.8 VI nolu Denemeye ait Kesikli Fermentasyon Deneme Sonuçları

Mikroorganizma : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Narince 3)				
Fermentasyon Sıcaklığı : 30± 0.1°C				
İçstandart : n-propanol				
Verim=5.01 / (10*51.1/100) = 0.98				
Glukoz = 10 g/litre				
Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	Etanol Alanı	Etanol (g/L)
VI	0	4.237		
	24	4.327	1248	3.04
	48	4.345	1418	3.46
	53	4.326	1583	3.48
	72	4.371	2054	5.01

Tablo 3.9 VII. Nolu Denemede Kullanılan Etanol Standartı ve Kesikli ve Sürekli Fermentasyon Deneme Sonuçları

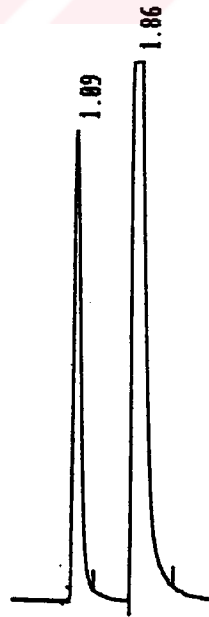
Mikroorganizma : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Narince 3)					
Fermentasyon Sıcaklığı : 30± 0.1°C					
İçstandart : n-propanol					
Verim = 12.46/ (25x0.511) = 0.98					
Glukoz = 25 g/litre					
Standart	Etanol/ n-propanol ağırlık oranı-y	Etanol/ n-propanol Pik Alan Oranı -x	Etanol (g/L)		
1	0.1078	0.113	1.74		
2	0.3139	0.300	5.03		
3	0.4647	0.380	7.57		
4	0.5735	0.429	9.05		
5	0.9642	0.585	14.26		
Standart eğrinin denklemi: $y = 0.0555 + 0.1805x + 2.3536x^2$					
Örnek No.	Reaksiyon süresi (saat)	pH	n-propanol (g/10 ml)	Etanol/n-propanol Pik Alanı Oranı	Etanol (g/L)
VII	0	4.237			
	24	4.335	0.1603	0.495	11.57
	29	4.330	0.1592	0.500	11.69
	48	4.222	0.1615	0.509	12.29
	54*	4.332	0.1589	0.516	11.91
	72*	4.321	0.1565	0.517	12.17
	78*	4.313	0.1607	0.516	12.46
	80*	4.323	0.1598	0.515	12.35
	96*	4.321	0.1571	0.512	12.02
	99*	4.320	0.1633	0.504	12.15

* 0.6 ml/dakika debi ile ortama sürekli taze besiyeri ilave edilip aynı debi ile ortamdaki fermentasyon sıvısı alınmıştır.



Şekil 3.7 VII Nolu Denemede Kullanılan Standart Eğri

Fermentasyon sıvısı santrifüj ve destilasyon ile analize hazırlandıktan sonra direkt olarak GC'ye verilmiş, etanol dışında başka bir madde oluşmadığı anlaşıldıktan sonra, içine internal standart olarak belli miktarda n-propanol eklenmiştir. Tekrar kromografi cihazına verilen numunede alkol/n-propanol pik alanı oranlarından alkol miktarına geçilmiştir. Şekil 3.8'de bu şekilde yapılan analizlerden birine ait, içstandart katılmış fermentasyon sıvısı ve standart çözeltinin kromotogramı görülmektedir. Etanol için ayrılma zamanı 1.09, n-propanol için 1.86'dır.



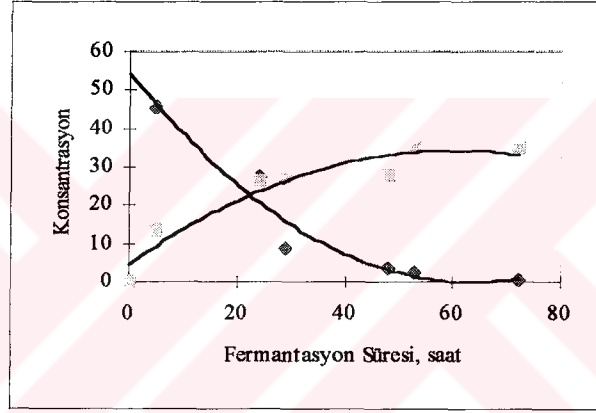
Şekil 3.8 Analizlerden Birine ait Örnek Kromotogram

3.3 Fermentasyon Ortamındaki Maya Miktarının Belirlenmesi

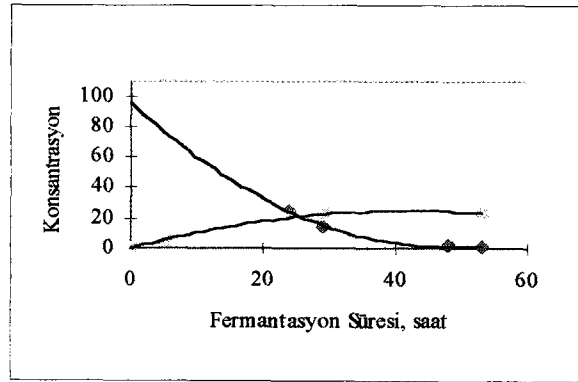
Fermentasyonu başlatmak için ortama ilave edilen mayanın, 1×10^8 adet / ml, fermentasyon sonunda ortamdan alınan sıvıdaki mayanın ise 8.7×10^6 adet / ml konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada dilüsyon sayma yöntemi kullanılmıştır (18).

3.4 Deney Sonuçlarına Ait Grafikler

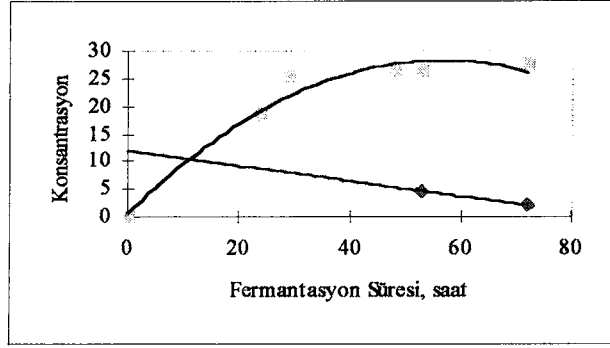
Fermentasyon sırasında glukoz miktarındaki azalma ve etanol miktarındaki artış, çizilen grafiklerden de görülebilmektedir. y- ekseninde yer alan konsantrasyon, glukoz için $\mu\text{g} / \text{ml}$, etanol için g / l cinsindedir.



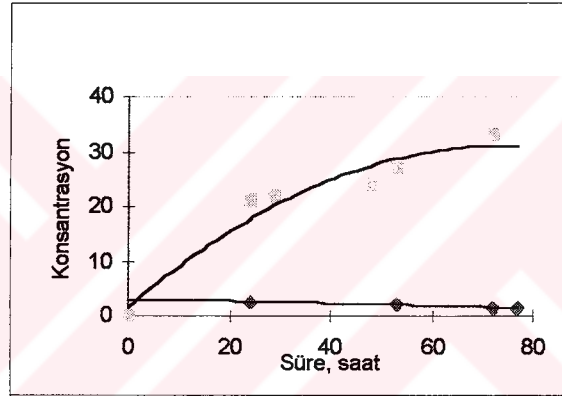
Şekil 3.9 I. Nolu Denemenin Sonuçları



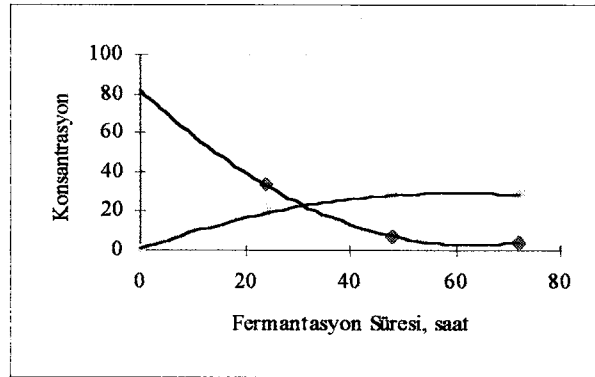
Şekil 3.10 II Nolu Denemenin sonuçları



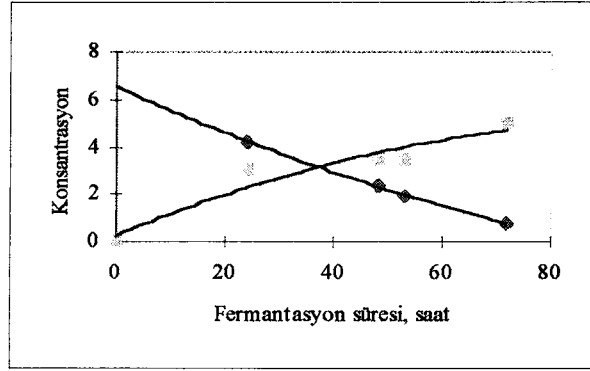
Şekil 3.11 III Nolu Denemenin sonuçları



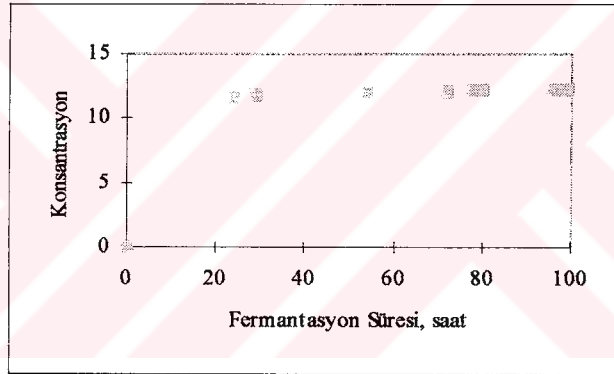
Şekil 3.12 IV Nolu Denemenin sonuçları



Şekil 3.13 V Nolu Denemenin sonuçları



Şekil 3.14 VI Nolu Denemenin sonuçları



Şekil 3.15 VII Nolu Denemenin sonuçları

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada fermentasyon ile etil alkol üretimi sürekli ve kesikli fermentasyon teknikleri kullanılarak, karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Büyük ölçekli etanol üretimi kesikli fermentasyon yöntemi kullanılarak yapılmaktadır. Ancak bu yöntemde istenen ürün konsantrasyonuna ulaşmak uzun zaman almakta ve fermentasyon sonunda ortamda hâlâ canlılığını koruyan maya, alkol inhibisyonu nedeniyle daha fazla alkol üretememektedir. Yaptığımız bu çalışmada da aynı sorunlarla karşılaşmıştır.

Sürekli fermentasyon ile bu dezavantajlar bertaraf edilmeye çalışılmıştır. Böylece hem daha kısa sürede istenen alkol verimi sağlanmış, hem de sürekli beslenen taze besiyeri ile organizmanın canlılığı korunup, belli konsantrasyonda, sürekli, alkol ihtiva eden fermentasyon sıvısı ortamdan alınmıştır.

Sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

Çalışma	pH Kontrolü	Organizma	Ortalama Verim
1	-	PAKMAYA	0.77
2	-	<i>S. cerevisiae</i>	0.81
3	+	<i>S. cerevisiae</i>	0.98
4	+	<i>S. cerevisiae</i>	0.98

Son denemenin ilk 48 saatlik bölümünde kesikli çalışılmış bunu takiben fermentöre taze besiyeri beslenerek fermentörde sürekli sıvı alınmıştır. Reaksiyon 96 saat süreyle devam ettirilip, konsantrasyondaki değişim gözlenmiştir.

Zaman-Etanol Konsantrasyonu ve Zaman-Glukoz Konsantrasyonu grafiklerinden de görülebileceği gibi glukoz, ortamdaki mayalar tarafından tüketildiğinden zamanla azalmakta, buna bağlı olarak da alkol miktarı artmaktadır.

Bundan sonraki çalışmalarımızın devamında pH, sıcaklık ve akış hızının reaksiyon üzerine etkisinin incelenmesine devam edilecektir.

V. ÖZET

SÜREKLİ ETİL ALKOL FERMENTASYONU PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

Sanayi ölçekli etil alkol, daha çok kesikli fermentasyon tekniği ile üretilir. Ancak bu şekilde substratın ürüne tam dönüşümü uzun zaman almaktadır. Fermentasyon süresini azaltmak için sürekli çalışan karıştırımlı fermentör, hücre geri döngülü fermentör ve vakum fermentörleri kullanılabilir. Bu sistemlerin kullanımlarını da işletme güçlüğü ve ekonomik problemler sınırlamaktadır. Reaksiyon hızını artırmak için kullanılan bir diğer sistem de tutuklanmış hücre içeren bir dolgulu kolon kullanmaktır.

Bu çalışmada fermentasyon ile etil alkol üretimi, kesikli ve sürekli fermentasyon teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Denemelerde fermentasyon mikroorganizmaları olarak PAKMAYA ve *Saccharomyces cerevisiae* kültür mayası kullanılmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonlarında, *S. cerevisiae*'nin farklı suşları ile fermentasyon reaksiyonunun ilerleyişi ve elde edilen verimler karşılaştırılmıştır.

PAKMAYA ve *S. cerevisiae* fermentasyon ortamına ilave edilmeden önce sterilizasyon kurallarına uyularak aktif hale getirilmişlerdir.

Fermentasyon $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de en az 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon ortamında zamanla azalan glukoz miktarı UV Spektrofotometresi ile, oluşan etanol miktarı ise gaz kromatografisinde (GC) tespit edilmiştir.

Fermentasyonun başlangıcında ve sonunda ortamdaki maya miktarı ise dilüsyon tekniği ile belirlenmiştir.

Denemeler sonunda, *S. cerevisiae* kültür mayası kullanılıp, pH değeri 4-4.5 arasında sabit tutulduğunda elde edilen verimin diğer denemelerdekinden daha fazla olduğu ve istenen alkol verimine, sürekli fermentasyonda, kesikli fermentasyondakinden daha kısa bir sürede ulaşıldığı gözlenmiştir.

SUMMARY

ANALYSIS OF CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION PARAMETERS

Industrial-scale ethanol is generally produced by batch fermentation. However, it takes a long time for the substrate to change into product this way. Continuous stirred tank fermentor, cell recycle and vacuum fermentors can be used to decrease the fermentation time. But difficulties in operation and economic problems are limiting the use of these systems. Another choice that is used to increase the reaction rate is using a packed-bed column including immobilized cells.

In this study, ethanol production is examined by using batch and continuous fermentation techniques. PAKMAYA and *Saccharomyces cerevisiae* culture yeast are used in the experiments as fermentation microorganisms. Development of the fermentation reaction with different glucose concentrations and different strains of *S. cerevisiae* and the yields were compared.

PAKMAYA and *S. cerevisiae* are activated before inoculated to the fermentation medium, complying with the sterilization rules.

Fermentation is conducted for at least 72 hours at $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

The amount of glucose decreasing with time in the fermentation medium is determined by UV Spectrophotometer and produced ethanol by gas chromatography (GC).

The amount of yeast in the medium at the beginning and in the end of the fermentation is determined by dilution count technique.

At the end of the experiments, it is observed that when *S. cerevisiae* culture yeast is used and pH is kept constant at 4-4.5, the yield is more than the yields of the other experiments and that the constant alcohol yield is obtained in a shorter time than batch fermentation in continuous fermentation.

VI. KAYNAKLAR

1. PAMİR, M.H. (1985): Fermantasyon Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1-5.
2. a KIRK OTHMER (1947): Encyclopedia of Chemical Technology, Alcohol, Industrial, Vol. I, 252, John Wiley and Sons Inc, New York
2. b KIRK OTHMER (1951): Encyclopedia of Chemical Technology, Fermentation, Vol. VI, 317-320, John Wiley and Sons Inc, New York
3. PRESCOT, S.C., DUNN, C.G.(1959): Industrial Microbiology, Third Edition, McGraw-Hill Book Company, INC., Newyork, 102
4. FİDAN, I., ŞAHİN, İ. (1983): Alkol ve Alkollü İçkiler Teknolojisi, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 23.
5. KESKİN, H. (1982): Besin Kimyası, II. Cilt, 4. Baskı, Fatih Yayınevi ve Matbaası, İstanbul, 141.
- 6.a. McKETTA, J.J. (1983): Encyclopedia of Chemical Processing and Design, Ethanol, ISBN 0-8247-2469-0, Vol. 19, Marcel Dekker, INC., New York, 445-460.
- 6.b. McKETTA, J.J. (1977): Encyclopedia of Chemical Processing and Design, Beer and Brewing, ISBN 0-8247-2454-2, Vol.4, 153
7. Etil Alkol- Asetik Asit ve Sitrik Asit VI. Beş Yıllık Kalkınma Planı Ö.İ.K. Raporu (1991), Ankara, 4-6.
8. LEE, J., (1992): Biochemical Engineering, ISBN 0-13-085317-8, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632, 100-103.
9. ÇAKMAKÇI, L., KARAHAN, A.G., (1995): Mikrobiyolojiye Giriş, ISVAK Yayın No:5, Ankara, 101-102.
10. STAINER, R.Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E.A., (1963): The Microbial World, Second Edition, The Beginnings of Microbiology, Prentice-Hall, INC, Englewood Cliffs, New York, 18-19.
11. MITTAL, G.S., ENG, P., (1992): Food Biotechnology, ISBN 0-87762-888-2, Technomic Publishing Company INC., Lancaster, 245.

12. ÇETİN, E.T., (1983): Endüstriyel Mikrobiyoloji, 1. Baskı, İ.Ü. Tıp Fak. Vakfi- BAYDA Yayını, İstanbul, 9-20.
13. ÇATALTAŞ, A.İ. (1985): Kimyasal Proses Endüstrileri, II. Cilt, İnkılâp Kitabevi, Ankara, 194.
14. MAĞDEN, A., MAĞDEN, B., (1995): Üzüm ve Kuru Üzüm Distilatının Bileşenleri, TEKEL Araştırma Enstitüsü Başkanlığı, İstanbul, 1-10.
15. SAİN, S., ÖZGEN, C., GÜRKAN, T., HAMAMCI, H., (1994): Yeni Geliştirilen Etanol Fermantasyon Sistemi UKMK-1 Tebliğ Kitabı, 2. Cilt, ISBN 975-429-075-X, ODTÜ, Ankara, 141.
16. MEHMETOĞLU, Ü., ÇAĞLAR, A., (1988): Kalsiyum Aljinat Jelinde Tutuklanmış *S. cerevisiae* ile Dolgulu Kolonda Etil Alkol Üretimi, DOĞA TU, Müh. ve Çev. D. 12, 2.
17. HEPERKAN, D.,(1996): Mikrobiyoloji Kursu Uygulama Kitabı, İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fak. Gıda Müh. Böl., İstanbul, 4-8.
18. GÜRGÜN, V., HALKMAN, A.K., (1990): Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, 2. Baskı, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7, Basım&Grafik, Ankara, 100-110.
19. MELIN, E., SHIEH, W.K., (1992): "Continuous Ethanol Production from Glucose using *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Fluidized Microcarriers", The Chemical Engineering Journal, 50, B17-B22
20. BAZUA, C.D., WILKE, C.R., (1977): "Ethanol Effects on the Kinetics of a Continuous Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 7, 105-118,
21. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., (1956): "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", Analytical Chemistry, 28, No.3, 350-356.
22. SOLAY, E., (1992): Experimental Studies on Continuous Ethanol Production by Immobilized growing *S. cerevisiae*, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi.
23. KHOURY, Y., (1991): Ethanol Production From Glucose by Immobilized growing *S. cerevisiae*, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi.
24. PANDEY, K., AGARWAL, P.K., (1993): "Effect of EDTA, Potassium Ferrocyanide, and Sodium Potassium Tartarate on the Production of Ethanol from Molasses by *Saccharomyces cerevisiae*", Enzyme Microb. Technol., , vol. 15, October, 887-898.

VII. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Tokat'ta doğdum. 1989 yılında Kadir Has Lisesi'ni bitirip, aynı yıl İ.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü'ne girdim. Haziran 1993 tarihinde mezun oldum. 1994 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Temel İşlemler ve Termodinamik Programında Yüksek Lisans öğrenimine başladım. İngilizce hazırlık ve ders kredilerimi tamamladıktan sonra 1996 Ekim ayından itibaren de tezimin deneysel kısmı ile ilgili çalışmaları yürüttüm.

31 Ağustos 1995 tarihinde Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı'nda bulunan Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Halen aynı Anabilim Dalı'ndaki bu görevime devam etmekteyim.



YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ