

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SODYUM ALJİNAT-AŞI-POLİ(N-VİNİL-2-PIROLİDON)'A İMMOBİLİZE
EDİLMİŞ BAZI MAYA TÜRLERİNDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ

MURAT İNAL

ARALIK 2011

ÖZET

SODYUM ALJİNAT-AŞI-POLİ(N-VİNİL-2-PIROLİDON)'A İMMOBİLİZE EDİLMİŞ BAZI MAYA TÜRLERİNDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ

İNAL, Murat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Aralık 2011, 116 Sayfa

Sodyum aljinat-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) matriks, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan, hidrofilik, şelat oluşturabilme ve jelleşebilme gibi özelliklerinden dolayı, biyoetanol üretimi için bir mikroorganizma taşıyıcı materyal olarak geliştirildi. Kalsiyum klorür ile çapraz bağlanan matriks *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* ve *Kluyveromyces marxianus* mayalarının immobilizasyonu için kullanıldı. Maya immobilizasyonu için en uygun kalsiyum klorür derişimi %2,5 (w/v) olarak bulundu. Boş ve maya immobilize sodyum aljinat ve sodyum aljinat-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) kürelerin morfolojisi ve iç yapısı oda sıcaklığında taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri ile incelendi. Geleneksel sodyum aljinat matriks ile karşılaştırıldığında sodyum aljinat-aşı-poli(N-

vinil-2-pirolidon) matriksin biyoetanol üretim hızının arttığı ve daha verimli olarak kullanılabilceği tespit edildi. Biyoetanol üretim performansı başlangıç glikoz derişiminden ve fermantasyon ortamındaki immobilize maya kürelerin yüzdesinden etkilenmektedir. Biyoetanol üretim hızının, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces bayanus* için glikoz derişiminin 50 g/L'den 100 g/L'ye; *Kluyveromyces marxianus* için 50 g/L'den 150 g/L'ye çıkarılması ile arttığı bulundu. Glikoz derişimi daha fazla arttırıldığı zaman, biyoetanol üretim hızı yavaşladı. Fermantasyon ortamındaki immobilize maya kürelerinin oranı %10'dan %20'ye çıkarıldığı zaman, biyoetanol üretim hızının arttığı gözlemlendi. Sodyum aljinat-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) matrikse immobilize mayalar aktivitesini kaybetmeden altı kez tekrarlanan fermantasyon boyunca kullanıldı. Maya immobilizasyonu için önerilen sodyum aljinat-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) matriksin, biyoetanol üretim sürecinde endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Sodyum aljinat, N-vinil-2-pirolidon, Aşı kopolimerizasyon, Immobilizasyon, Biyoetanol üretimi, Maya

ABSTRACT

PRODUCTION OF BIOETHANOL
FROM IMMOBILIZED SOME YEAST SPECIES IN
SODIUM ALGINATE-GRAFT-POLY(N-VINYL-2-PYRROLIDONE)

İNAL, Murat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

December 2011, 116 Pages

Sodium alginate-graft-poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) matrix was developed as a microorganism carrier support for bioethanol production owing to its biocompatible, biodegradable, non-toxic, hydrophilic, chelating able and gelable properties. The matrix that crosslinked with calcium chloride was used for immobilization of yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Kluyveromyces marxianus*. The most suitable calcium chloride concentration for yeast immobilization was found at 2,5% (w/v). The scanning electron microscope (SEM) images were examined for the morphology and inside structure of empty and yeast immobilized sodium alginate and sodium alginate-graft-poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) spheres at room temperature. Sodium alginate-graft-poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)

matrix compared with conventional sodium alginate matrix have been identified which increased productivity of bioethanol and can be used more efficiently. The production performance of bioethanol has been affected by initial glucose concentration and percentage of immobilized yeast spheres in the fermentation medium. The productivity of bioethanol has increased when the glucose concentration was increased from 50 to 100 g/L for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*; from 50 to 150 g/L for *Kluyveromyces marxianus*. When the concentration of glucose was increased more than, the productivity of bioethanol has decreased. When the rate of immobilized yeast spheres in the fermentation medium was increased from 10% to 20%, the productivity of bioethanol has increased. The yeast immobilized into the sodium alginate-graft-poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) matrix can be used six repeated fermentation without losing their activity. The proposed sodium alginate-graft-poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) matrix for immobilization of yeasts has used potential in industrial applications of the bioethanol production process.

Key Words: Sodium alginate, N-vinyl-2-pyrrolidone, Graft copolymerization,

Immobilization, Production of bioethanol, Yeast

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana her türlü imkânı sağlayan ve değerli bilgileriyle yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU'na,

Tezimin hazırlanması süresince değerli bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Bekir SARI ve Prof. Dr. Gülsu Akın ÖKTEM'e,

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı başta Nuran ERDURAN ve Murat GÖKGÖZ olmak üzere bütün mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması ve hazırlanması aşamasında bana sürekli destek olan, yardım eden ve sabır gösteren eşime, her türlü desteklerini arkamda hissettiğim biricik aileme ve eşimin saygıdeğer ailesine de teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak hayatım boyunca bana sürekli yol gösteren bütün aile fertlerine, özellikle rahmetli dedeme (saygıyla anıyorum) sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enerji Kaynakları ve Biyoyakıtlar.....	3
1.2. Etanol ve Biyoetanol.....	6
1.2.1. Biyoetanol ve Benzinin Karşılaştırılması.....	7
1.2.2. Dünyada Biyoetanol Üretimi.....	9
1.2.3. Türkiye’de Biyoyakıtlar ve Biyoetanol.....	12
1.3. Fermantasyon.....	14
1.3.1. Etanol Fermantasyonu.....	24
1.3.2. Etanol Fermantasyonunda Kullanılan Mayalar ve Özellikleri.....	26
1.4. Mikroorganizma İmmobilizasyonu.....	31
1.5. Aşı Kopolimerler ve Eldesi.....	37
1.6. Sodyum Aljinat (NaAlg).....	39
1.7. N-vinil-2-Pirolidon (NVP).....	41
1.8. Sodyum Aljinat Küreleri ile İlgili Biyoetanol Üretim Çalışmaları.....	42
1.9. Çalışmanın Amacı.....	44
2. MATERYAL VE YÖNTEM	47

2.1. Kimyasal Maddeler.....	47
2.2. Kullanılan Cihazlar.....	48
2.3. Sodyum Aljinat-aşı-Poli(N-vinil-2-pirolidon) (NaAlg-aşı-PVP) Aşı Kopolimerlerinin Sentezi.....	49
2.4. <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> ve <i>K. marxianus</i> İçin Kültür Ortamları.....	49
2.4.1. Katı Besi Ortamı.....	49
2.4.2. Sıvı Besi Ortamı.....	50
2.4.3. Fermantasyon Ortamı.....	50
2.5. Mayaların Polimerik Desteklere İmmobilizasyonu.....	50
2.6. Maya Kuru Kütlesinin Belirlenmesi.....	51
2.7. Fermantasyon Deneyi.....	52
2.8. Glikoz Tayini.....	52
2.9. Gaz Kromatografisi ile Etanol Tayini.....	53
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	54
3.1. NaAlg-aşı-PVP Kopolimerinin Karakterizasyonu.....	54
3.1.1. Aşı Kopolimerlerin Element Analizi Sonuçları.....	54
3.1.2. Aşı Kopolimerin Termogravimetrik Analiz Sonuçları.....	54
3.1.3. Aşı Kopolimerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüsü....	58
3.2. Elde Edilen Polimerik Kürelerin Karakterizasyonu.....	59
3.2.1. NaAlg ve Aşı Kopolimer Kürelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri.....	59
3.2.2. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP Polimerik Kürelerinin Şişme Derecesi.....	59

3.2.3. Boş ve Mikroorganizma İmmobilize Edilmiş NaAlg ve NaAlg- aşı-PVP Kürelerinin SEM Görüntüleri.....	61
3.3. İmmobilizasyon ve Etanol Üretim Çalışmaları.....	63
3.3.1. Serbest Mayaların Kuru Hücre Kütlesi ve Glikoz Derişiminin Değişimi.....	63
3.3.2. Polimerik Kürelere İmmobilize Mayalardan Etanol Fermentasyon.....	65
3.3.3. Maya İmmobilize NaAlg-aşı-PVP Kürelerinin Karakterizasyonu.....	70
3.3.4. Fermentasyon Ortamındaki Küre Yüzdesinin Etanol Üretimine Etkisi.....	75
3.3.5. Glikoz Derişiminin Etanol Üretimi Üzerine Etkisi.....	78
3.3.6. Maya İmmobilize Kürelerin Kararlılığına Tekrarlanan Fermentasyonun Etkisi.....	83
4. SONUÇLAR.....	86
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünyada biyoetanol üretiminin yıllarla değişimi.....	9
1.2. Kıtalara göre yakıt biyoetanol üretiminin milyar litre olarak dağılımı.....	10
1.3. Ülkelere göre yakıt biyoetanol üretiminin milyar litre olarak dağılımı.....	11
1.4. Nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenme-yükseltgenme tepkimesi....	16
1.5. Glikozun glikoliz döngüsü ile etanole dönüşüm mekanizması.....	25
1.6. <i>S. cerevisiae</i> mayalarının fotoğrafı.....	27
1.7. <i>S. bayanus</i> MCYC 623 suşunun SEM görüntüsü.....	29
1.8. <i>K. marxianus</i> CBS712 suşunun fotoğrafı.....	30
1.9. Azobisizobütiranitril'den radikal oluşum tepkimesi.....	39
1.10. Sodyum Aljinatın molekül formülü.....	40
3.1. NaAlg, PVP ve NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin karşılaştırmalı TGA termogramları.....	56
3.2. NaAlg, PVP ve NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin karşılaştırmalı DTGA termogramları.....	57
3.3. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin SEM fotoğrafları.....	58
3.4. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerik kürelerinin SEM fotoğrafları.....	59
3.5. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerik kürelerinin denge şişme derecelerinin zamanla değişimi.....	61
3.6. Boş ve <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> ve <i>K. marxianus</i> immobilize edilmiş kürelerin kesit alanlarının SEM görüntüleri.....	62

3.7. <i>S. cerevisiae</i> için zamana karşı kuru hücre kütesinin ve glikoz derişiminin değişimi.....	63
3.8. <i>S. bayanus</i> için zamana karşı kuru hücre kütesinin ve glikoz derişiminin değişimi.....	64
3.9. <i>K. marxianus</i> için zamana karşı kuru hücre kütesinin ve glikoz derişiminin değişimi.....	64
3.10. Fermantasyon ortamına ilave edilen <i>S. cerevisiae</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₁ kürelerin yüzdesinin etanol üretimine etkisi.....	76
3.11. Fermantasyon ortamına ilave edilen <i>S. bayanus</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₁ kürelerin yüzdesinin etanol üretimine etkisi.....	76
3.12. Fermantasyon ortamına ilave edilen <i>K. marxianus</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₃ kürelerin yüzdesinin etanol üretimine etkisi.....	77
3.13. <i>S. cerevisiae</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₁ kürelerinin etanol fermantasyonuna glikoz derişiminin etkisi.....	79
3.14. <i>S. bayanus</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₁ kürelerinin etanol fermantasyonuna glikoz derişiminin etkisi.....	80
3.15. <i>K. marxianus</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₃ kürelerinin etanol fermantasyonuna glikoz derişiminin etkisi.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. NaAlg-aşı-PVP kopolimerlerinin isimleri, azot miktarları ve N-vinil-2-pirolidon aşılama yüzdeleri	54
3.2. <i>S. cerevisiae</i> immobilize edilmiş NaAlg ve aşı kopolimer kürelerinin etanol üretim sonuçları.....	66
3.3. <i>S. bayanus</i> immobilize edilmiş NaAlg ve aşı kopolimer kürelerinin etanol üretim sonuçları.....	66
3.4. <i>K. marxianus</i> immobilize edilmiş NaAlg ve aşı kopolimer kürelerinin etanol üretim sonuçları.....	67
3.5. PVP aşılmasına göre maya immobilize kürelerin etanol üretim sonuçlarının karşılaştırılması.....	69
3.6. <i>S. cerevisiae</i> immobilize edilmiş kürelerin fiziksel karakteristiğine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi.....	71
3.7. <i>S. bayanus</i> immobilize edilmiş kürelerin fiziksel karakteristiğine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi.....	72
3.8. <i>K. marxianus</i> immobilize edilmiş kürelerin fiziksel karakteristiğine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi.....	73
3.9. Maya immobilize kürelerin yüzdesine bağlı olarak etanol üretim sonuçlarının karşılaştırılması.....	77

3.10. Glikoz derişimine bağlı olarak etanol üretim sonuçlarının karşılaştırılması.....	82
3.11. Tekrarlanan fermantasyon boyunca <i>S. cerevisiae</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₁ kürelerin etanol üretim sonuçları.....	84
3.12. Tekrarlanan fermantasyon boyunca <i>S. bayanus</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₁ kürelerin etanol üretim sonuçları.....	84
3.13. Tekrarlanan fermantasyon boyunca <i>K. marxianus</i> immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP ₃ kürelerin etanol üretim sonuçları.....	84

1. GİRİŞ

Son yıllarda dünyadaki petrol rezervlerinin sanılandan daha hızlı bir şekilde sonlanmasına bağlı olarak, özellikle taşımacılıkta kullanılan yakıtların ve petrol türevi ürünlerin aşırı kullanımı sonucu çevresel kirlenme ve sera etkisinin artması insan toplumunu önemli bir şekilde tehdit etmektedir. Bu sebeple fosil yakıtlarının hızla azalmasına bağlı olarak ve CO₂'nin atmosferdeki derişiminin kontrol edilmesini sağlayacak daha temiz, daha güvenilir, yenilenebilir, düşük maliyetli ve fosil yakıtlarına olan bağımlılığı azaltacak alternatif enerji kaynaklarına ihtiyaç vardır. Geçen 10 yılda, mikrobiyal biyoetanol üretimi geleneksel bir enerji kaynağı olmamasına rağmen çok önemli bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır. Biyoetanol tek başına yakıt olarak kullanılabilirdiği gibi, genellikle benzinle çeşitli yüzdelerde karıştırılarak da kullanılabilir. 2010 yılında dünya çapında biyoetanol üretimi 87,18 milyar litreye ulaşmıştır [1-4].

Mikroorganizmalardan başta *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* gibi mayalar ve *Zymomonas mobilis* gibi bakteriler en iyi bilinen etanol üreticileridir. Mikroorganizmalar metabolik çevrim ile başta glikoz olmak üzere karbonhidratlardan enerji üretme yeteneğine sahiptir. Mikroorganizmalar karbonhidratların fosforilasyonu ile kendileri için gereken enerjiyi üretirken ayrıca çeşitli metabolik adımlardan geçerek sonuçta ikişer mol etanol ve karbondioksit üretmektedirler [3-5].

Mikroorganizmaların bir destek üzerine tutulmasına veya bir desteğin içine hapsedilmesine immobilizasyon denilmektedir. İmmobilize edilmiş mikroorganizmalarla yürütülen fermantasyonun, serbest mikroorganizmalara oranla

pek çok avantajları vardır. Etanol fermantasyonunda da immobilizasyonun çeşitli faydaları olduğu bu konudaki çalışmalarda gösterilmiştir. Fermantasyon sırasında yüksek substrat derişimi veya mikroorganizmanın ürettiği etanol mikroorganizmanın inhibe olmasına sebep olmaktadır. Nagodawithana vd. (1976) göre kültür ortamına etanol eklenmesi mikroorganizmanın kendi ürettiği etanolden daha az toksik etkiye sahiptir [6]. Immobilizasyon ile mikroorganizmalar direkt substrat ve ürün ile etkileşmediklerinden mikroorganizmanın yüksek substrat derişimi toleransı artar ve etanol inhibisyonu azalır. Ayrıca immobilizasyon, serbest mikroorganizmaların üründen ayrılması için gerekli olan filtrasyon ve santrifüjleme gibi ekstra masraflardan kurtarmakta ve mikroorganizmalar serbest halde olmadıklarından hücre dışı enzimlerin aktivite kayıplarının azalmasını da sağlamaktadır. Immobilizasyon ile birim hacmindeki mikroorganizma yoğunluğunun daha yüksek olması; yüksek verim ve üretim hızı elde edilmesini sağlamaktadır [3,4,7,8].

Mikroorganizmaların immobilizasyonu için organik ve anorganik materyaller, doğal veya sentetik polimerler olmak üzere çeşitli destekler kullanılmaktadır. Immobilizasyon için destek materyal olarak; üzüm kabuğu, portakal kabuğu, süpürge darısı gibi organik materyaller, mineral killer ve γ -alümina gibi anorganik materyaller, aljinat, kitosan gibi doğal veya poli(vinil alkol), poli(akril amit) gibi sentetik polimerler kullanılabilir [4, 9-16].

Bugün endüstriyel ölçekte etanol fermantasyonun da sıklıkla kullanılan mikroorganizmalar mayalardır. Serbest ve immobilize edilmiş mayalardan biyoetanol üretimiyle ilgili literatürde pek çok çalışma mevcuttur [1,17-23]. Bu çalışmalarda immobilizasyon ile yüksek substrat derişiminden ve üretilen etanolden kaynaklanan inhibasyonun önlenildiği, ayrıca yüksek oranda maya derişimine bağlı

olarak fermantasyon zamanlarının kısaldığı ve ürün veriminin ve ürün yüzdesinin arttığı, hücrelerin ürün üretim potansiyelinde kayıp olmaksızın çok uzun süreler saklanabildiği rapor edilmiştir [4,10,11,18].

Özellikle polimerik küreler oluşturularak yapılan immobilizasyonun dezavantajları; immobilizasyonun mikroorganizmaların çoğalmasını engellemesi veya geciktirmesi, substratın kürelerin içine ve ürünlerinde dışarı difüzyonunu kısıtlamasıdır. Bu dezavantajların önüne geçmek için polimerik kürelerin fermantasyon ortamında şişerek, mikroorganizmaların rahatça çoğalabileceği, substrat ve ürünlerin de kolayca difüzyonunun sağlanacağı bir ortam hazırlanmalıdır. Polimerler üzerine yapılan çeşitli aşı çalışmalarında aşılınmış polimerle elde edilen kürelerin su tutma kapasitelerinin dolayısıyla sudaki şişme derecelerinin daha yüksek değerlere ulaştığı bulunmuştur [24-26].

1.1. Enerji Kaynakları ve Biyoyakıtlar

Enerji kaynakları, genel olarak üç ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar, fosil yakıtlar, nükleer kaynaklar ve yenilenebilir kaynaklardır. Fosil yakıtlar olan kömür, petrol ve doğal gaz dünyadaki enerji kaynaklarının en değerlilerinden bazılarıdır. Bunlar tarih öncesi hayvan veya bitki artıklarından meydana geldikleri içinde fosil yakıtları olarak tanımlanmaktadır [27]. Enerji kaynaklarının ikincisi olan nükleer kaynaklar, fizyon ve füzyon sonucu çeşitli radyoaktif elementlerden elde edilmektedir. Enerji kaynaklarının sonuncusu olan yenilenebilir kaynaklar, su, rüzgâr, güneş, jeotermal, gel-git ve akıntı, dalga ve biyolojik kütle (biyokütle) alt sınıflamalarından oluşmaktadır [28]. Yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyokütle, bütün organizmalar ve onların artıkları için kullanılan bir isimdir.

Çimenleri, ağaçları ve diğer karada ve suda yetişen bitkileri içeren biyokütle enerji için kullanılır. Ölü ağaçlar, dallar, ağaç kütükleri, talaş, gıda artıkları, hayvan gübresi, kanalizasyon atıklarında biyokütle olarak kullanılmaktadır. Biyokütle güneşten aldığı enerjiyi, kimyasal enerjiye çevirir. Biyokütle; yandığında, yenildiğinde, sindirildiğinde, gaz veya sıvı benzine dönüştürüldüğünde güneşten aldığı enerjisini geri yayar. Biyokütle enerji kaynakları katı, sıvı ve gaz biyokütle (biyogaz) olarak üç ana kısımda sınıflandırılmaktadır. Katı biyokütle ısınma, aydınlanma, elektrik üretimi ve yemek pişirme amacıyla çok eski devirlerden bu yana kullanılırken, sıvı ve gaz biyokütle kaynakları son yüzyılda kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda ortaya çıkan ve kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşan sıvı biyokütle enerji kaynakları, otomobil motorlarında yakıt ham maddesi olarak kullanıldığı için biyoyakıt olarak tanımlanmaktadır [29].

Sanayileşme ile birlikte artan enerji gereksinimini karşılamak için fosil yakıtlar gibi sınırlı enerji kaynaklarının yetersiz kalması, fosil yakıtların yanmasından kaynaklanan sera gazlarının atmosferdeki seviyelerinin giderek artması ve küresel ısınma gibi tehditler enerji krizi riskini giderek arttırmaktadır. Dünyanın birçok yerinde kentsel hava kirliliğinin önemli bir kısmını motorlu taşıtlar meydana getirmektedir [30,31]. Goldemberg vd. (2008) göre motorlu taşıtlar, küresel karbonmonoksit (CO) yayılımlarının %70'den, küresel karbondioksit (CO₂) yayılımlarının ise %19'dan fazlasını oluşturmaktadırlar [32]. Dünya üzerinde şu anda 700 milyon adet motorlu taşıt bulunmaktadır. Bu sayının 2030 yılında 1,3 milyara, 2050 yılında ise 2 milyar araca çıkacağı öngörülmektedir. Motorlu taşıtların sayısının bu hızla artışı küresel petrol rezervlerinin yanı sıra küresel iklim ve ekosistemlerin istikrarını etkileyebileceği düşünülmektedir [30,33]. 2008 yılında yayınlanan BP

dünya enerji istatistiği raporuna göre rezerv/tüketim oranı göz önüne alındığında dünyadaki petrol, doğalgaz ve kömür rezervlerinin sırasıyla yaklaşık 41, 60 ve 133 yıldan daha az ömrü kaldığı öngörülmüştür [34]. Bütün bu sonuçlarla beraber petrol rezervlerinin sınırlı olması, sera gazı yayılımlarından kaynaklanan iklim değişiklikleri ve kırsal ekonomileri teşvik etmek gibi kaygılar nedeniyle son yıllarda biyoyakıt endüstrisi Avrupa, Asya ve Amerika'da son derece hızlı bir şekilde genişlemektedir [30,35]. Yapılan araştırmalara göre motorlu araçlarda petrol türevi ürünler yerine biyoyakıtların kullanılmasının genel hava kirleticilerinin (karbonmonoksiti %60, toplam hidrokarbonları %70, partiküler maddeleri %50) ve başlıca sera gazlarının (karbondioksiti %80) yayılım oranlarını azalttığı belirtilmiştir [36-38].

Biyoyakıt, elektrik üretmek için doğrudan yanan yakıtlar için kullanılan bir terim olmasına rağmen, genelde ulaştırma sektöründeki sıvı yakıtlar için kullanılmaktadır [39]. Biyoyakıtların sera gazlarının atmosferdeki derişimlerinin artmasında çok az etkisi olduğu bilinmektedir. Biyoyakıtların eldesinde, yaygın olarak fotosentetik bitkiler kullanılmasına rağmen, teorik olarak herhangi bir biyolojik karbon kaynağından da (biyokütle) elde edilebilmektedirler. Birçok farklı bitki ve bitkisel kaynaklı materyaller biyoyakıt üretimi için kullanılmaktadır. Bugün, biyoyakıtlar ağırlıklı olarak biyokütle kaynaklarından üretilmektedir [35,40-42].

Biyoyakıtların kullanımının; petrole olan ağır bağımlılığın ve karbon yayılımlarının azaltılmasında ve enerji güvenliğinin arttırılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir [35,43]. Biyoyakıt üretimi için iki ortak strateji vardır. Birincisi şeker (şeker kamışı, şeker pancarı ve süpürge darısı) ya da nişasta (darı ve mısır) oranı yüksek bitkileri yetiştirmek ve daha sonra maya fermantasyonunu kullanarak

etil alkol üretmektir. İkincisi bir palm veya soya yağı gibi yüksek oranda yağ içeren bitkileri yetiştirmektir. Bu yağlar ısıtıldığı zaman onların viskozitesi azalır ve direkt dizel motorlar da yakılabilir veya bazı kimyasal işlemlerle biyodizele dönüştürülebilirler [35].

1.2. Etanol ve Biyoetanol

Etanol, molekül kütlesi 46,07 g/mol, yoğunluğu 0,789 g/cm³, erime noktası -114 °C ve kaynama noktası 78 °C olan uçucu, yanıcı ve renksiz bir sıvıdır. Sentetik etil alkol, ham petrol, doğal gaz veya kömürden petrokimyasal olarak etilenin hidrasyonu yoluyla elde edilmektedir. Biyoetanol ise, tahıllar, melas, meyveler, şeker kamışı özü, selüloz ve çok sayıda diğer kaynaklardan mikroorganizmalar tarafından şekerlerin fermante edilmesiyle biyolojik olarak üretilmekte ve sonra damıtmayla elde edilebilmektedir. Her iki ürün de, hem fermantasyon hem de sentetik olarak elde edilen etanol kimyasal olarak aynıdır [44,45].

Endüstriyel ham madde veya çözücü olarak kullanılan etanol petrokimyasal ürünlerden etilenin asit katalizli hidrasyonu ile elde edilir. Katalizör olarak genellikle silika jel veya toprak gibi gözenekli bir destek üzerine adsorplanan fosforik asit kullanılmaktadır. Alkollü içeceklerde kullanılan ve yakıt olarak kullanılacak etanolün büyük çoğunluğu, fermantasyon ile üretilmektedir. Mayaların (örneğin *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Pichia stipitis*...) ve bakterilerin (örneğin *Zymomonas mobilis*, *Clostridium ljungdahlii*..) belirli türleri şekerleri çeşitli yollardan etanol ve karbondioksite çevirmektedirler [46].

Günümüzde etanol genellikle, ilaç, plastik, cila, yumuşatıcı ve kozmetik üretiminde çok önemli bir kimyasal ve ara ham madde olarak kimyasal reaktif veya

organik çözücü olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ilaç formülasyonları, biyodizel üretimi (yağ asidi etil esterleri), elektronik ve askeri sanayide kullanılmaktadır. Biyolojik kaynaklardan elde edilen biyoetanol, çevresel kirliliğe sebep olmayan temiz bir yakıt olduğu için benzine mükemmel bir alternatif olarak kabul edilir [47-52].

Biyoetanol, etil alkol veya tahıl alkolü olarak isimlendirilmektedir. Biyoetanol ve biyoetanol/benzin karışımları alternatif ulaşım yakıtı olarak ilk kez içten yanmalı motor endüstrisi geliştikten sonra 1894 yılının başlarında Almanya ve Fransa'da kullanılmaya başlanmıştır. Biyoetanol, 1925 yılından bu yana bir ulaşım yakıtı olarak Brezilya'da kullanılmaktadır. Sonraki yıllarda biyoetanolün kullanımı oldukça azalmıştır. 1970'lerin başında Petrol İhraç Eden Ülkeler Örgütü'nün (OPEC) uyguladığı petrol ambargosu nedeniyle benzin sıkıntısı meydana gelmiş ve etanol yakıt katkısı olarak kullanılmıştır. Bu nedenden dolayı takip eden yıllarda etanol endüstrisi tekrar gelişme göstermiştir. Alternatif bir yakıt olarak biyoetanol kullanımında 1980'lerden bu yana önemli bir artış meydana gelmiştir [47,53,54]. Uygun şekilde tasarlanmış otomotiv sistemleri içinde, biyoetanol düşük gaz yayılım seviyeleri elde etmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Ayrıca, biyoetanol gibi yenilenebilir ve oksijen miktarı yüksek olan yakıtların yanma ürünleri olan sera gazı yayılımlarını oldukça azalttığı kabul edilmektedir [47,55].

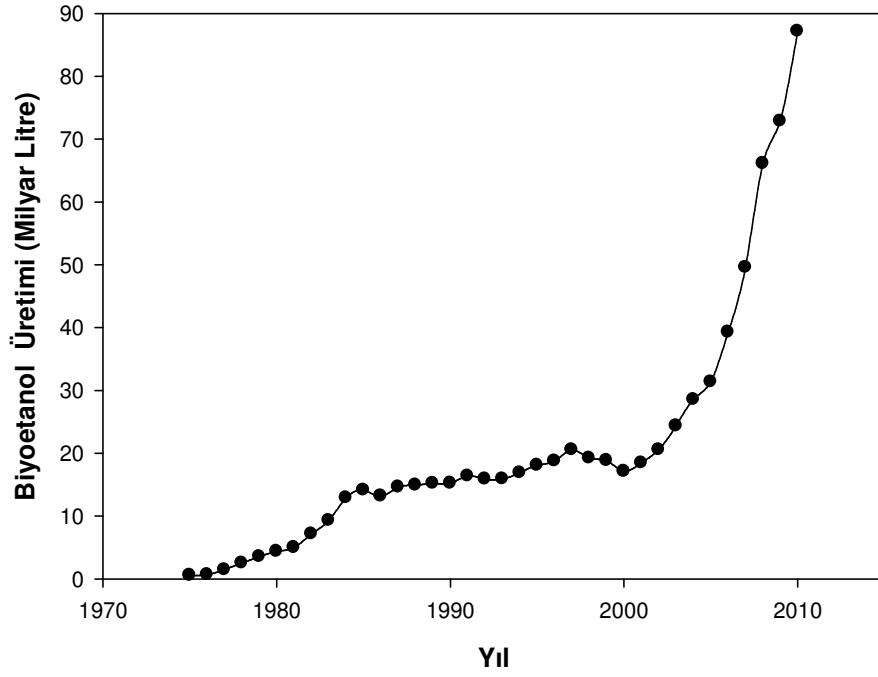
1.2.1. Biyoetanol ve Benzinin Karşılaştırılması

Etanol, mükemmel bir benzin karışım bileşeni olarak yüksek oktan sayısına, yüksek alevlenme hızına ve yüksek buharlaşma ısısına sahiptir. Bu özellikleri, daha kısa yanma süreleri sağlayarak, bu sayede içten yanmalı motorlarda benzine göre

daha yüksek verim alınmasını ve bir aracın en iyi performansla yakıt sistemini temiz tutarak çalışmasına yardımcı olur [47,56]. Etanol'ün buharlaşma ısısı benzinden daha fazladır, buna karşılık alev sıcaklığı ise daha düşüktür. Ayrıca ,%35 oksijen içeren oksijenli bir yakıt olduğu için benzinin aksine yanmak için daha az havaya ihtiyaç duymaktadır. Biyoetanol, özellikle çocuklar ve yaşlılar için tehlike oluşturan karbonmonoksit, uçucu organik bileşikler, toksik maddeler ve solunabilir partiküllerin yayılımlarını azaltmaktadır. Dört zamanlı benzinli motorlarda benzin-etanol karışımlarının kullanıldığı çalışmaların çoğunda başta karbonmonoksit olmak üzere sera gazlarının ve yanmamış hidrokarbonların yayılımlarının azaldığı ancak azot oksitlerin (NO_x) yayılımlarının arttığı bulunmuştur [57-59]. Bir ulusal laboratuvar tarafından çeşitli yakıt karışımlarının sera gazı yayılımları incelenmiştir. Sera gazı yayılımlarını, B20 olarak bilinen (%20 biyodizel) biyodizel-petrodizel karışımının %8, geleneksel E85 (%85 etanol) etanol-benzin karışımının %17, selülozik etanolün ise %64 düşürdüğü belirlenmiştir [60]. İçten yanmalı motorlarda benzinin verimsiz yanması sonucu önemli ölçüde benzin, asetaldehit ve formaldehit gibi yanma ürünleri atmosfere verilmektedir. Bu yan ürünlerin atmosferdeki miktarının artışı ozon tabakasında önemli ölçüde fotokimyasal tepkimelerin oluşmasına sebep olmaktadır ve bu da ozon tabakasına zarar vermektedir [61,62]. Etanol ile karşılaştırıldığında benzinin egzoz gazı yayılımlarının ozon tabakasına 2,14 kat daha fazla zarar verdiği bulunmuştur [63]. Etanolün hacimsel ısı değeri benzinden daha azdır ve birim hacim başına etanol benzine oranla yaklaşık %68 enerji vermektedir [64]. Ayrıca biyoetanolün, korozyona sebep olması, düşük buhar basıncı (motor soğukken çalıştırmanın zor olması), su ile karışabilmesi ve benzinle karıştırıldığı zaman asetaldehit, azot oksit ve uçucu bileşenlerin yayılımlarını arttırması gibi dezavantajları olduğu da rapor edilmiştir [49,56].

1.2.2. Dünyada Biyoetanol Üretimi

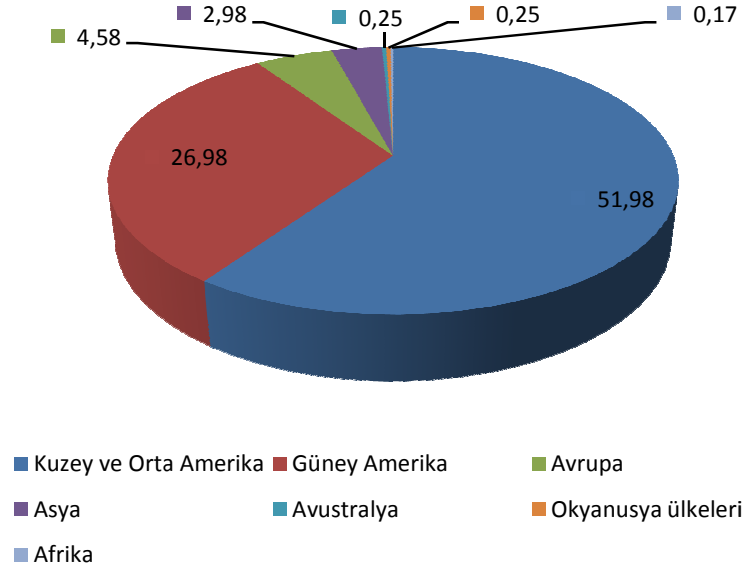
1970'lerde ki petrol krizinden sonra dünyada biyoetanol üretimi ve bunun yakıt olarak kullanımının da önemli bir artış meydana gelmiştir. Bundan dolayı takip eden yıllarda etanol endüstrisi önemli bir gelişme göstermiştir. Dünyada biyoetanol üretiminin yıllara göre dağılımı Şekil 1.1'de verilmiştir.



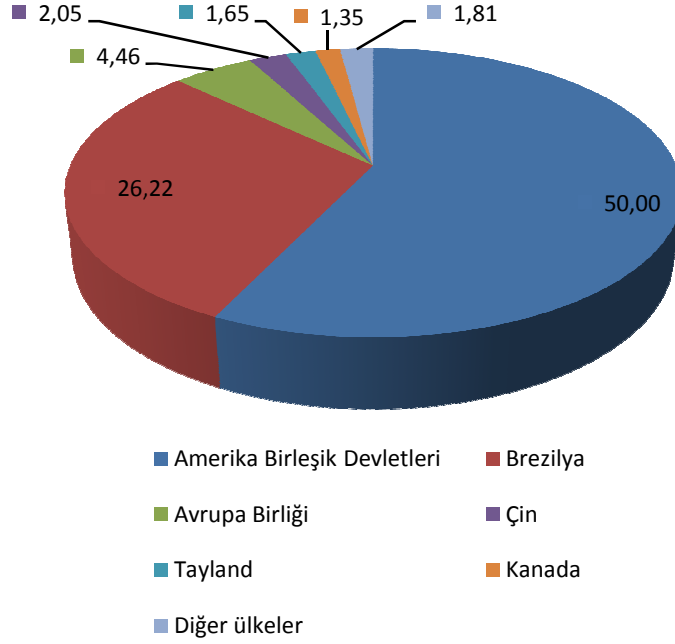
Şekil 1.1. Dünyada biyoetanol üretiminin yıllarla değişimi [65-67]

1975 yılından 90'lı yıllara kadar hızla artan biyoetanol üretimi, 2000 yılına kadar durağan bir eğilim göstermiştir. Özellikle 2000 yılından sonra yakıt biyoetanol üretimi çok hızlı bir şekilde artmıştır. 2000 yılında toplam üretim 17,12 milyar litreyken bu rakam 2010 yılında %509 artarak 87,18 milyar litreye kadar ulaşmıştır

[67]. 2009 ve 2010 yıllarındaki verileri göre dünyada yakıt etanol üretiminin kıtalara ve ülkelere göre dağılımı Şekil 1.2. ve 1.3.'te verilmiştir.



Şekil 1.2. Kıtalara göre yakıt biyoetanol üretiminin milyar litre olarak dağılımı
[67,68]



Şekil 1.3. Ülkelere göre yakıt biyoetanol üretiminin milyar litre olarak dağılımı [67,68]

Bir ulaşım yakıtı olarak biyoetanol kullanımı Brezilya, Amerika ve Hindistan gibi ülkelerde teşvik edilmektedir. Biyoetanol kullanımı Brezilya ve Hindistan'da petrol ithalatına olan bağımlılığı azaltmak için, Amerika'da ise tarımı geliştirmek ve aynı zamanda çevresel kirlenme göz önüne alınarak teşvik edilmektedir [4]. Alternatif bir ulaşım yakıtı olarak biyoetanol kullanımında Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri en büyük etanol üreticileridir ve bu iki ülke 2010 yılında dünyada ki yakıt etanolün %88'ini üretmişlerdir. Bu iki ülkeyi, Çin, Hindistan, Fransa, Rusya, Güney Afrika ve İngiltere takip etmektedir [46,67]. Biyoetanol, ulaşım yakıtı olarak doğrudan kullanılabildiği gibi benzinle karıştırılarak da kullanılmaktadır [30].

Avrupa Birliği ülkelerinde yakıt etanol üretimi gerçekten henüz istenilen duruma gelmiş değildir. Ancak, Avrupa Birliği Komisyonu tarafından biyoyakıtlarla ilgili iki önemli karar alınmıştır. 2003 yılı mayıs ayında üye ülkeler tarafından kabul edilen kararlara göre, üye devletler yenilenebilir yakıtların payını 2005 yılı sonuna kadar %2'ye ve 2010 yılı sonunda %5,75'e çıkarmakla yükümlüdürler. Bu karar taşımacılıkta kullanmak için piyasaya sürülen tüm yakıtlara uygulanacaktır. Avrupa ülkelerinde yakıt etanol üretimi için şeker pancarı tercih edilmektedir. Avrupa Birliği ülkelerinde EN 228 kalite standardına göre bioetanol benzin ile %5 karışım olarak kullanılabilir. Bu karışım, motor değişikliği gerektirmediği için araç garantilerini etkilememektedir. Motor değişikliği yapıldığında ise E85 (% 85 bioetanol) ve E95 (% 95 bioetanol) gibi yüksek seviyelerde bioetanol olarak kullanılabilir [41,45].

1.2.3. Türkiye'de Biyoyakıtlar ve Biyoetanol

Ülkemizde 2000'li yıllara kadar biyoyakıtların üretimine yönelik çalışma sayısı sınırlıdır. Bununla birlikte, özellikle petrol fiyatlarındaki aşırı artışlar, dünyadaki değişimlere uyum sağlamak ve Avrupa Birliği uyum sürecindeki gelişmeler çerçevesinde özellikle son 10 yılda biyodizel başta olmak üzere biyoyakıt üretimi konusunda önemli gelişmeler sağlanmıştır. Özellikle tarım sektöründe işletmelerin kendi ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla biyodizel üretimi son yıllarda oldukça yaygınlaşmış olmasına rağmen Türkiye'de üretilmekte olan bioetanol halen yürürlükteki özel tüketim vergisi muafiyetinin yüzde 2 ile sınırlandırılması sebebiyle yalnızca bu oranda benzinle harmanlanarak satılmaktadır [69,70].

Türkiye’de yalnızca üç firma, Tarımsal Kimya Teknolojileri (TARKİM) Sanayi ve Ticaret A.Ş., Tez kim Tarımsal Kimya (TEZKİM) İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş. ve Konya Şeker Sanayi ve Ticaret A.Ş., tarafından araçlarda yakıt olarak kullanılabilecek nitelikte susuz biyoetanol üretilmektedir. Ülkemizde biyoetanol üretimi ilk defa, TARKİM firması tarafından 2004 yılında Bursa-Mustafakemalpaşa’da açtığı tesiste gerçekleştirilmiştir. Firma ham madde olarak buğday ve mısır nişastası kullanarak yılda 40 milyon litre kapasiteyle biyoetanol üretmektedir [71]. Türkiye’de biyoetanol üretimi için açılan ikinci firma, 2007 yılında Adana’da faaliyete geçen TEZKİM’dir. Firmada mısır nişastasından maya fermantasyonu yoluyla yaklaşık yıllık 35 milyon litre %99,5 saflıkta biyoetanol üretilmektedir [72]. Ülkemizde son yıllarda yukarıda saydığımız firmalar haricinde biyoetanol üretimi yapan kuruluşlar sadece şeker fabrikalarıdır. Türkiye’de şu anda Eskişehir (21 milyon litre), Turhal (14 milyon litre), Malatya (12,5 milyon litre) ve Erzurum (12,5 milyon litre) Şeker Fabrikaları’nda biyoetanol üretimi yapılmaktadır. En büyük biyoetanol üreticisi ise Konya Şeker’in 2007 yılında Çumra’da kurmuş olduğu tesisidir. Çumra Şeker Entegre Tesisleri içinde bulunan biyoetanol üretim tesislerinde yılda yaklaşık 84 milyon litre biyoetanol üretilmektedir. Şeker fabrikalarında biyoetanol, şeker pancarından şekerin üretim sürecinde ham şerbet, sulu şerbet ve koyu şerbet gibi ara ürünlerin veya melasın fermantasyonu ile elde edilmektedir. [73-76].

Ülkemizde biyoetanol şeker pancarı şekerinden veya mısır ve buğday nişastasından elde edilebilmektedir. Üretim ve biyoetanol verimliliği göz önüne alındığında dünyadaki birçok ülkede şeker pancarı veya şeker kamışı kullanılarak biyoetanol elde edilmektedir. Ülkemiz koşullarında üretim yapılan bin metrekarelik bir alanda, buğdaydan 150 litre, mısırdan 250 litre ve şeker pancarından yaklaşık 500

litre etanol elde edilebilmektedir. Ayrıca şeker pancarı üretim aşamasında sağladığı ekonomik katkılar ve üretimi sırasında havaya verdiği oksijen ve toprağa verdiği pek çok mineral nedeniyle çevreci bir bitkidir. Sonuçta, biyoetanol üretiminde ülkemiz için en avantajlı bitkinin şeker pancarı olduğu düşünülmektedir [75].

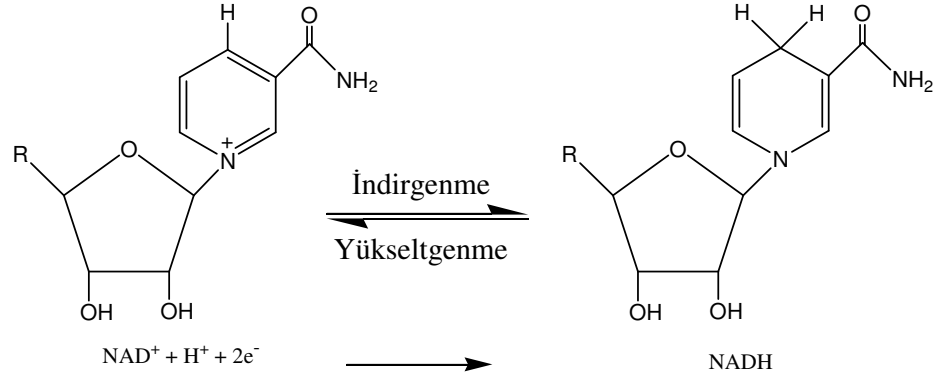
Ülkemizin yıllık akaryakıt tüketiminin yaklaşık 19,05 milyar litresini dizel yakıtlar ve 3,75 milyar litresini ise benzin oluşturmaktadır. Yıllık tüketim sonuçları incelendiğinde ülkemizde dizel yakıt kullanımının benzine oranla beş kat daha fazla olması mevcut biyoyakıt üretim sektörünün daha çok biyodizel üretimine yönelmesine sebep olmuştur. Kullanım azlığı ve diğer eksilerine rağmen biyoetanol üretimi ülkemizde yıllık 220 milyon litreye ulaşmıştır. Ülkemizde yıllık yakıt olarak kullanılacak bu kadar biyoetanol üretilmesine rağmen, üretilen miktarın %50'den fazlasının kullanılmadığı ve firmaların elinde kalarak depo edilmek zorunda kaldığı bilinmektedir. Ayrıca ülkemizde üretilen biyoetenolün aktif bir şekilde kullanılabilmesi için Avrupa Birliği ülkelerinde ve diğer dünya ülkelerinde olduğu gibi benzine belirli bir oranda biyoetanol katılmasının zorunlu hale getirilmesi ve özel tüketim vergisi muafiyetinin % 2'den % 5'e çıkartılmasının gerektiği vurgulanmaktadır [77-79].

1.3. Fermantasyon

Fermantasyon kelimesi Latince “fervere” fiilinden türemiştir. “Fervere”, tahıl veya meyve özlerinin mayalarla etkileşimi sonucu meydana gelen kaynama şeklindeki görüntüye verilen isimdir. Bu görüntünün sebebi, özlerde bulunan şekerin parçalanması sonucu ortaya çıkan karbondioksit kabarcıklarıdır. Bununla birlikte fermantasyon biyokimyacılar ve endüstriyel mikrobiyologlar tarafından farklı

şekillerde ifade edilmektedir. Biyokimyacılar tarafından, organik bileşiklerin parçalanması sonucu enerji üretimi olarak anlaşılmamasına rağmen, endüstriyel mikrobiyolojide çok daha geniş şekilde ifade edilmektedir. Fermantasyon kelimesi biyolojik değişim anlamıyla tanınmakta ve yaygın şekilde kullanılmaktadır. En genel haliyle ise “Tek mikroorganizma ile belirli en uygun koşullarda gerçekleştirilen biyolojik değişimler yoluyla üretim teknolojisi” şeklinde tanımlanabilir [80,81].

Fermantasyonda şekerlerin parçalanması nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) gibi nükleotidlerin indirgenmesi ile sonuçlanan bir oksitlenme sürecidir ve sürecin devamında bunların tekrar yükseltgenmeleri gerekmektedir. Metabolik çevrim genellikle nükleotidin yükseltgenmesi ile organik bir bileşiğin indirgenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Bunu etanol fermantasyonuna uygularsak, meyve ya da tahıl özleri maya ile etkileştiklerinde, pirüvik asit etanole dönüşürken bu sırada da NADH molekülü NAD^+ molekülüne yükseltgenmektedir (Şekil 1.4.). Böylece, fermantasyon terimi, biyokimyasal anlamda organik bileşiklerin elektron vericileri ve elektron alıcısı olarak hareket ettiği bir enerji üretim sürecini ifade etmek için kullanılmaktadır [80].



Şekil 1.4. Nikotinamit adenin dinükleotitin indirgenme-yükseltgenme tepkimesi (R, Adenozin difosfat olarak tanımlanmıştır)

Fermantasyonun kökeni çok eski çağlara dayanmaktadır. Hem eski Mısırlılar hem de Sümerlerin nişastalı tahıl ürünlerini fermantasyon yoluyla alkole dönüştürdükleri bilinmektedir. Bununla birlikte fermantasyon teknolojisinin gelişimi kısaca beş kısma ayrılabilir. Bunlardan ilki 1900'lere kadar olan ve sadece içki, sirke gibi maddelerin üretildiği adımdır. 1700'lere kadar bu ürünlerin kişisel olarak küçük çapta üretimi yapılmaktaydı. 1700'ler de fabrika ölçeğinde içki ve sirke üretimi yapılmaya başlanmıştır. Fermantasyonda ilkel termometreler, yoğunlukölçerler ve ısı dönüştürücüler kullanılmaktaydı [80,82].

1900-1940 arası ekmek mayası, sitrik asit, laktik asit, gliserol, aseton ve bütanol gibi yeni ürünlerin üretildiği ikinci adımı oluşturmaktadır. Bu periyodun en önemli avantajları ekmek mayasının ve sıvı fermantasyonun geliştirilmiş olmasıdır. Birinci dünya savaşı boyunca ilk gerçek aseptik fermantasyon olan aseton ve bütanol fermantasyonu geliştirilmiştir. Fermantasyonun gerçekleştirildiği tanklar basınç altında buharla sterilize edildiği için mikroorganizma bulaşma riski en aza

indirilmekteydi. Fermantasyonda ilkel termometreler yerine sıcaklık ölçer cihazlar ve pH elektrod kullanılmaktaydı [80].

Fermantasyon teknolojisinin gelişiminin üçüncü kısmını aseptik şartlar altında sıvı kültürde penisilin üretimi oluşturmaktadır. Penisilin üretimi aerobik bir süreç olduğu için en büyük problem mikroorganizma bulaşma riskidir. Bu risk oldukça viskoz sıvı besiyeri kullanımı ve steril hava ile önlenmiştir. Penisilin üretimi için kurulan teknoloji yeni sistemlerin geliştirilmesi için zemin hazırlamıştır. Fermantasyon teknolojisindeki bu gelişme ile diğer antibiyotikler, vitaminler, bitki hormonları, aminoasitler ve enzimler gibi yeni maddeler üretilmiştir. Fermenterde sterilize edilebilir pH ve oksijen elektrotları ve bütün sistemin kontrolünü sağlayan üniteler kullanılmıştır. Ayrıca, fermantasyon mekanik karıştırılmalı tanklar kullanılarak kesikli sistemde gerçekleştirilmekteydi [80].

1960'ların başında birkaç çok uluslu şirket yiyecek proteini olarak kullanmak için biyolojik kuru kütlelerin üretimi üzerine çeşitli araştırmalar yapmışlardır. Bu gelişmeler fermantasyon teknolojisinin dördüncü adımını oluşturmaktadır. Ancak, biyolojik kuru kütle diğer fermantasyon ürünlerine göre nispeten daha büyük miktarlarda ve daha düşük satış fiyatları sebebiyle üretimi sürecinin karlı olabileceği düşünülmüştür. Bu fermantasyonlarda karbon kaynağı olarak hidrokarbonların kullanılması yüksek ısı çıkışlarına ve oksijen ihtiyacının artmasına sebep olmaktadır. Bu tür gereksinimler basınç döngülü fermantasyon tanklarının geliştirilmesini sağlamış, buda mekanik karıştırma ihtiyacını ortadan kaldırmıştır. Ayrıca diğer adımlarla karşılaştırıldığında, sistemin daha ekonomik olması için sürekli besin kaynağı ilave edilen sistemler üretilmiştir. Fermantasyonun

bütün adımlarını kontrol etmek için bilgisayar kontrollü sistemler geliştirilmiştir [80].

Mikroorganizma veya hayvan hücreleri kullanılarak bazı insan proteinlerinin üretilmeye başlaması ve yine hayvan hücreleri tarafından antikor üretimi gibi gelişmeler fermantasyon teknolojisinin beşinci adımını oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen ürünlerin anti bakteriyel aktivite göstermesine bağlı olarak 1990'lı yıllarda yeni mikrobiyal ürünlerin sayısı son derece artmıştır. Bunlardan, siklosporin (bağışıklık sistemini güçlendirici), imipenem (antibiyotik), lovastatin (kolesterol düşürücü) ve ivermektin (parazit önleyici) marketlerdeki yerlerini almıştır. Bu safhada fermantasyonun bilgisayar kontrollü olarak izlenmesinin yanı sıra çeşitli sensörler de geliştirilerek kullanılmaya başlanmıştır [80,83].

Günümüzde fermantasyon endüstrisi ürün çeşitliliği ve üretimdeki büyümeye paralel olarak çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Geleneksel fermantasyonun aksine, modern fermantasyon teknolojisi 20. Yüzyılda aerobik fermantasyonla beraber basit ürünlerden, mali değeri yüksek ürünlerin üretimine kadar geniş bir alanda kullanılmaya başlamıştır. Yukarıda verilen örneklerden de görüldüğü üzere yeni ürünlerin üretiminde fermantasyon teknolojisi ümit vaat etmektedir. Fermantasyon yoluyla elde edilebilecek ticari öneme sahip ürünler şu şekilde sıralanabilir [80,81];

Antibiyotikler ve vitaminlerin üretimi: Alexander Fleming tarafından 1929 yılında fermantasyon yoluyla elde edilen ilk antibiyotik penisilindir. Daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından pek çok farklı antibiyotik türü yine fermantasyon

yoluyla elde edilmiştir. A, B ve C vitaminleri, pantotenik asit, folik asit yine fermantasyon yoluyla üretilerek insan ve hayvanlar için kullanılan vitaminlerdir.

Enzimlerin üretimi: Enzimler ticari olarak bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklardan üretilmektedirler. Ancak, mikrobiyal enzimlerin üretiminde fermantasyon tekniklerinin kullanılması ile büyük miktarlarda üretilibilmeleri sağlanmıştır. Ayrıca, bir bitki veya hayvan ile karşılaştırıldığında bir mikrobiyal sistemin verimliliğini arttırmak son derece kolaydır. Ayrıca, gen kodları kopyalanarak rekombinant DNA teknolojisi sayesinde üretilen enzimlerin sayısı arttırılabilir.

Mikrobiyal biyokütlelerin üretimi: Mikrobiyal biyokütlelerden, mayalar alkollü içki üretiminde kullanılmaktadır. Bazı alg veya mayalar gibi biyokütleler ise yüksek miktarda protein içermelerinden dolayı besin değerlerini arttırmak amacıyla insan ya da hayvan gıdası olarak üretilmektedir.

Aminoasitlerin üretimi: Lizin, valin, triptofan, glutamik asit gibi aminoasitler fermantasyon yoluyla mikroorganizmalardan elde edilerek, besin ve tedavi amaçlı ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır.

Proteinlerin üretimi: Doğal proteinler, rekombinant proteinler, peptitler ve antikorların birçoğu mikrobiyal fermantasyon ile üretilmektedir. Özellikle tedavi amaçlı kullanılan rekombinant proteinler ilaç endüstrisinin hızla büyüyen bir kısmını oluşturmaktadır. Bu şekilde elde edilen antikorlar, virüs ve bakteri aşılarının hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Alkollü içkilerin üretimi: Çok eski çağlardan bu yana mikroorganizmaların bile bilinmediği zamanlarda alkollü içkiler fermantasyon yoluyla elde edilmekteydi.

Günümüzde pek çok içki fermantasyon yoluyla en gelişmiş tekniklerle üretilmektedir.

Besin maddelerinin üretimi: Ekmek, yoğurt, peynir, turşu, sirke gibi maddeler eski çağlardan bu yana mikroorganizma fermantasyonu yoluyla elde edilmektedir.

Organik çözücülerin üretimi: Endüstride sıklıkla kullanılan alkol, aseton gibi çözücüler çeşitli mikroorganizmalar tarafından fermantasyon yoluyla elde edilmektedir.

Atık maddelerden çeşitli ürünlerin üretimi: Endüstriyel ve şehirsal artıklar fermantasyonda mikroorganizmalar için besin maddesi olarak kullanılarak alkol ve biyogaz üretiminde kullanılmaktadır.

İçinde, istenilen miktarda ürünün elde edilebilmesi için yeterli besi ortamı barındırabilen, çeşitli biyolojik reaksiyonlar gerçekleşerek ürünlerin elde edildiği kaplara fermanter adı verilmektedir. Bir fermanter, mikroorganizmaların veya hayvan hücrelerinin büyümesi ve istenilen ürünün elde edilebilmesi için kontrollü bir ortam oluşturur.

Bir fermantasyonun türü ne olursa olsun, bu önemli süreç altı kısma ayrılabilir [80];

1. İnokulumun hazırlanması sürecinde ve endüstriyel ölçekte üretimin yapılacağı fermanterde kullanılmak üzere organizmanın gelişimi için kullanılacak ortamın bileşiminin belirlenmesi.
2. Büyüme ortamının, fermanterin ve yardımcı parçaların sterilizasyonu.

3. Yeterli miktarda aktif, saf kültürün üretim yapmak amacıyla fermantere verilmesi.
4. Ürün oluşumu için uygun koşullar altında fermanterde mikroorganizmanın büyümesi.
5. Ürünlerin ortamdaki ayrılması ve saflaştırılması.
6. Mikroorganizma tarafından üretilen atık ürünlerin yok edilmesi.

Fermantasyonda esas amaç mümkün olan en kısa sürede, en az ham madde kullanarak en fazla ürün elde edilmesidir. Uygulanan işlem ve kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak gerek üretim ortamının yapısı, gerekse fermantasyon süreleri farklılık göstermektedir. Ayrıca mikroorganizmaların gelişimi ve maksimum ürün elde edilmesi için gerekli en uygun üretim ortamı tam olarak belirlenmek zorundadır. Eğer üretim ortamı uygun seçilmemişse ya mikroorganizma büyümesi az olacak ya da fermantasyon ürünü yeterli verimde elde edilemeyecektir. İdeal bir üretim ortamının; substrattan ürünü veya biyokütleyi hızlı ve maksimum verim ile üretebilmesi, istenmeyen yan ürünlerin miktarının düşük olması, kararlılığını uzun süre koruyabilmesi, hazırlanması ve sterilizasyonu sırasında sorunlara neden olmaması, özellikle fermantasyon sırasında havalandırma, karıştırma, saflaştırma aşamalarında herhangi bir olumsuzluk oluşturmaması gibi özellikleri taşıması istenmektedir. Tüm mikroorganizmaların üretimi için ihtiyaç duyulan besinler şu şekilde sıralanabilir [80,81];

- a. Mikroorganizmanın yapısını meydana getiren karbon, azot, hidrojen ve oksijen gibi elementleri içeren besinler.
- b. Mikroorganizma için ikinci derecede önemli olan magnezyum, fosfor, kükürt, potasyum gibi elementleri sağlayan besinler.

- c. Mikroorganizmanın yapısındaki enzimlerin işlevi için gerekli vitaminleri sağlayan besinler.
- d. Çoğalma için gerek duyulan eser elementleri (Fe, Zn, Cu, Mn, B, Co, Mo v.b...) sağlayan besinler.

Üretim ortamlarının bileşimini oluşturan maddeler aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

Karbon Kaynakları

Üretim ortamında kullanılacak karbon kaynağının yapısı ve oranı ürünlerin ve biyokütlenin özelliklerini etkilemektedir. Üretim ortamlarında bulunan karbonun çoğu hücre yapısı için ve kalan kısmı da enerji üretimi için kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların üretimi için kullanılan besiyerlerinin bileşiminde karbon kuru kütle olarak %40–65 civarında eklenmektedir [84-86]. Mikroorganizmaların üretim ortamlarında sıklıkla kullanılan karbon kaynakları karbonhidratlardır. Karbonhidrat olarak en çok tahıllar ve patatesten elde edilen nişasta kullanılmaktadır. Ayrıca nişastanın seyreltik asitler ve enzimlerle hidrolizi sonucu oluşan glikoz ve glikoz şurubu da kullanılabilir. Arpadan elde edilen malt özü özellikle içki endüstrisinde kullanılmaktadır. Yine şeker fabrikalarından elde edilen melasta pek çok maddenin üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Karbon kaynağı olarak kullanılan diğer maddeler yağlardır (zeytin, mısır, pamuk tohumu, keten tohumu, soya fasulyesi, v.b...) [80,87,88].

Azot Kaynakları

Mikroorganizmalar tarafından kullanılabilen azot kaynakları çeşitlilik göstermektedir. Kültür ortamında kullanılan azot kaynaklarının türü ve derişimi

mikroorganizmanın üretimini etkilemektedir. Mikroorganizmaların üretimi için kullanılan besiyerlerinin bileşimine kuru kütle olarak %7,5–15 civarında azot eklenmektedir [89-92]. Endüstride sıklıkla kullanılan azot kaynakları inorganik veya organik kaynaklardan elde edilmektedir. İnorganik azot, amonyak gazı, amonyum tuzları veya nitratları olarak kullanılabilir. Organik azot ise, aminoasitler, proteinler veya üreden elde edilebilmektedir ve bunun için mısır unu, hidrolize edilmiş soya fasulyesi, soya fasulyesi unu, yer fıstığı küspesi, pamuk tohumu küspesi, maya özü, balık unu ve peynir altı suyu kullanılabilir [80,81,88].

Anorganik Bileşikler

Tüm mikroorganizmaların çoğalması ve metabolik faaliyetleri için üretim ortamında bazı anorganik bileşiklerin bulunması gerekmektedir. Birçok üretim ortamına gerekli miktarda magnezyum, fosfor, potasyum, kükürt, kalsiyum ve klorun farklı bileşikler şeklinde eklenmeleri gerekmektedir. Ayrıca, kobalt, bakır, demir, mangan, molibden ve çinko gibi elementlerinde eser miktarlarda da olsa üretim ortamında bulunmaları zorunludur [80,81,89,90].

Fosfor, mikroorganizmaların hücre duvarı, fosfolipit ve nükleik asitlerinin bileşimini oluşturmaktadır. Bu nedenle üretim ortamında diğer mineral bileşiklere oranla derişimi oldukça yüksektir ve kullanılan besiyerlerinin bileşimine kuru kütle olarak %0,4–4,5 civarında eklenmektedir. Ayrıca fosfor en çok fosfat şeklinde, fermantasyon ortamının pH değerini kontrol etmek amacıyla tampon olarak kullanılmaktadır [80,81,84-86].

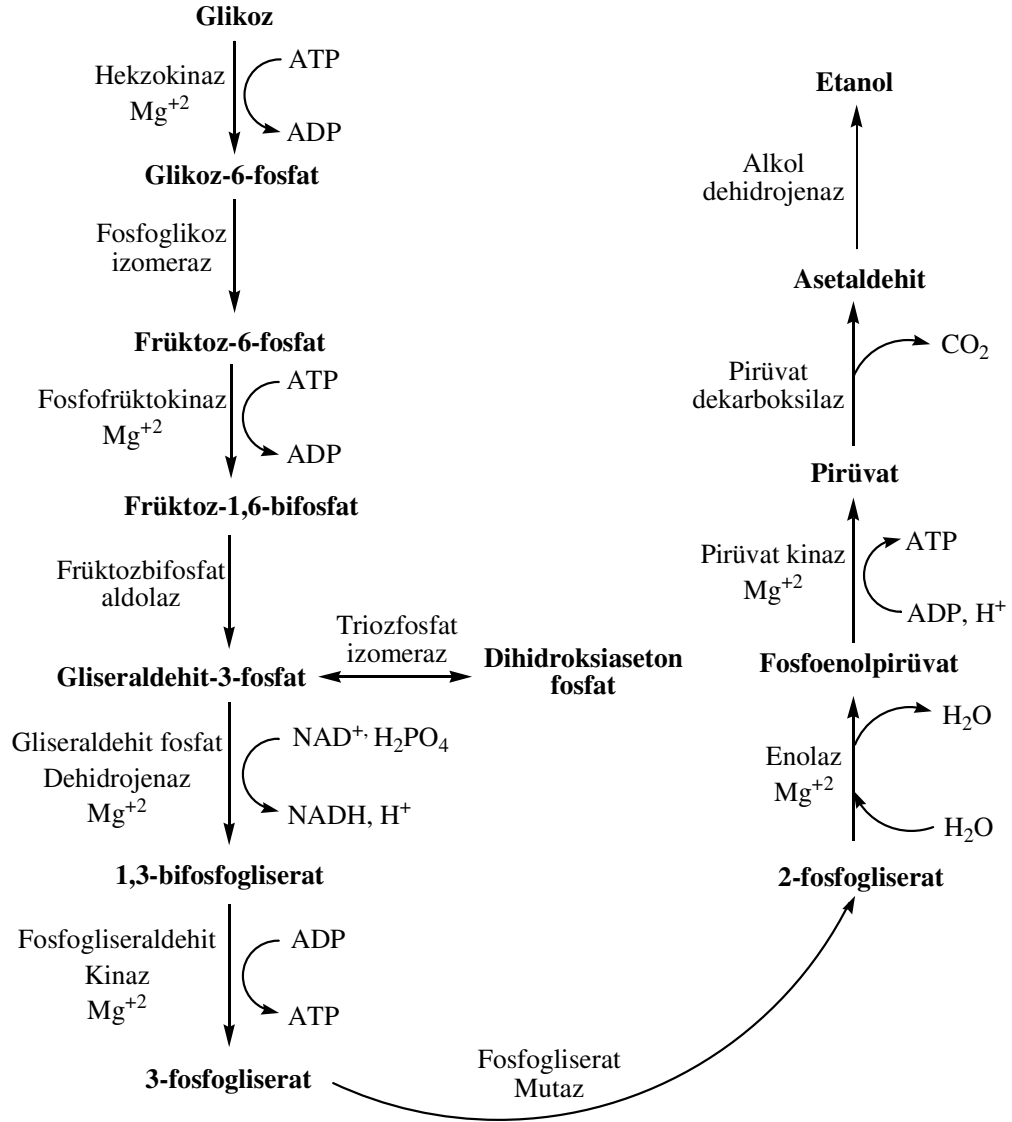
Vitamin Kaynakları

Bazı mikroorganizmalar, hücre bileşenlerini tam sentezleyemedikleri için büyüme faktörleri olarak adlandırılan bileşiklere ihtiyaç duyarlar. En yaygın olarak kullanılan büyüme faktörleri ise vitaminlerdir. Karbon ve azot kaynaklarının büyük bir kısmı mikroorganizmanın büyümesi için gerekli olan vitaminlerin çoğunu içermektedirler. Mikroorganizmanın gereksinimine ve ekonomik kaygılarda göz önüne alınarak bu kaynaklar karışım şeklinde üretim ortamına eklenebilmektedir. Ancak vitaminleri içeren kaynakların pahalı olmasından dolayı endüstride sentetik vitaminlerin kullanımı oldukça yaygındır [80,81,91].

1.3.1. Etanol Fermantasyonu

Alkol fermantasyonu olarak ta adlandırılan etanol fermantasyonu, başta glikoz olmak üzere değişik karbonhidratlardan mikroorganizmaların enerji üretmek amacıyla çeşitli metabolik adımlardan geçerek ürün olarak etanol ve karbondioksit oluşturdukları biyolojik bir süreçtir. Alkollü içeceklerde kullanılan ve yakıt olarak kullanılacak etanolün büyük çoğunluğu, etanol fermantasyonu ile üretilmektedir. Mikroorganizmalardan başta *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis* v.b... mayalar ve *Zymomonas mobilis*, *Clostridium ljungdahlii* v.b... bakteriler en iyi bilinen etanol üreticileridir [3-5,46].

Etanol fermantasyonundaki metabolik döngü glikolizi içermektedir, 1 mol glikoz metabolize olarak 2 mol pirüvata dönüşmektedir. Daha sonra pirüvat CO₂ salımı ile etanole indirgenmektedir. Glikozun çeşitli yollardan geçerek glikoliz döngüsü ile etanole dönüşüm mekanizması şematik olarak Şekil 1.5.'te verilmiştir [46].



Şekil 1.5. Glukozun glikoliz döngüsü ile etanole dönüşüm mekanizması

Etanol fermantasyonunda başta glukoz olmak üzere çeşitli karbonhidratlar kullanılmaktadır. Günümüzde ucuz karbonhidrat kaynaklarından etanol üretimine olan ilgi dünya çapında hızla artmaktadır [92]. Son yıllarda, mısır, şeker kamışı, soya fasulyesi gibi yenilenebilir enerji kaynaklarından etanol üretimi yaygınlaşmaktadır. Etanol fermantasyonunda kullanılan ham maddeler üç ana gruba ayrılabilir: (1) şeker

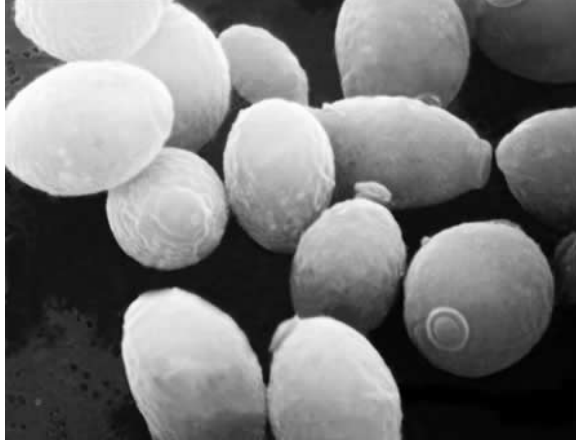
içeren ham maddeler (örneğin, şeker kamışı, şeker pancarı, süpürge darısı ve meyveler), (2) nişastalı ham maddeler (örneğin mısır, buğday, pirinç, patates ve arpa) ve (3) lignoselülozik biyoküteller (örneğin, tarım ve ağaç işlemedeki atık ürünler, çim, odun, saman ve otlar). Genel olarak, etanol, birinci nesil olarak adlandırılan nişasta ve şeker gibi ham maddelerden üretilmektedir, fakat bu maddelerin pahalı oluşu dezavantajlı yönlerini oluşturmaktadır [30,93-97]. Etanol fermantasyonunda bu ham maddelere alternatif 2. nesil atık biyokütle materyalleri kullanılabilir ve bu ham maddeler başlıca lignoselülozik atıklardır [93,98-104]. Lignoselülozik ham maddelerin en büyük kaynakları altı karbonlu heksoz ve beş karbonlu pentoz şekerleridir. Lignoselülozik ham maddeler selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi karbonhidrat polimerlerinin bir birleşimidir ve bu yüzden seyreltik asitler ve enzimlerle hidroliz edilerek fermante edilebilir şekerlere dönüştürülebilmektedir [105,106].

1.3.2. Etanol Fermantasyonunda Kullanılan Mayalar ve Özellikleri

Saccharomyces cerevisiae

"Saccharomyces" sözcüğü Yunanca ve Latince'den türemiştir ve "şeker mantarı" demektir; "cerevisiae" Latince "biradan" demektir. Mikroorganizmanın diğer isimleri ise ekmek mayası (ama başka organizmalar da bu amaç için kullanılır), bira mayası ve üst fermantasyon mayasıdır. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), tomurcuklanan bir maya türüdür. Eski çağlardan beri bira, şarap ve ekmek yapımında kullanılmasında dolayı en önemli maya türü olduğu söylenebilir. Üzüm kabuğu ve diğer koyu kabuklu meyvelerin kabuklarındaki mumun içindeki beyaz tabakanın bir bileşenin mayaya olduğu tahmin edilmektedir *S. cerevisiae*

hücreleri yuvarlak veya yumurta biçimlidir, çapları 5-10 mikrometredir. Tomurcuklanma olarak bilinen bir bölünme yoluyla üremektedirler. *Escherichia coli* ile birlikte üzerinde moleküler ve hücre biyolojisi ile ilgili en çok çalışılmış türlerden biridir [107]. *S. cerevisiae* mayalarının fotoğrafı Şekil 1.6.'da sunulmuştur.



Şekil 1.6. *S. cerevisiae* mayalarının fotoğrafı [108]

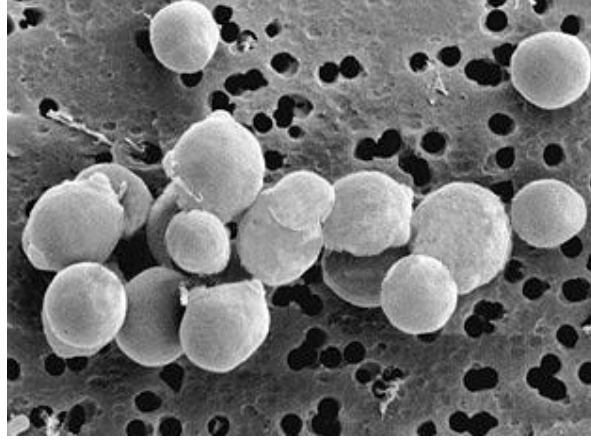
S. cerevisiae ile etanol fermantasyonu pek çok araştırmacı tarafından çalışılmasına rağmen onun metabolik döngüsünden kaynaklanan bazı eksiklikleri vardır. Etanol fermantasyonundaki metabolik döngü glikolizi içermektedir, 1 molekül glikoz metabolize olarak 2 molekül pirüvata dönüşmektedir. Daha sonra pirüvat CO₂ salımı ile etanole indirgenmektedir. Teorik olarak glikozun metabolize olmasıyla %51,1 etanol, %48,9 CO₂ oluşmaktadır. Çeşitli biyoreaksiyonların enerji gereksinimleri için maya hücrelerinin biosentezi boyunca glikolizde 2 ATP harcanmaktadır. Bu yüzden etanol üretimi maya hücrelerinin büyümesine sıkı sıkıya bağlıdır. Yani etanol üretiminden önce mayaların bir ön ürün üretmesi gerekmektedir [3,46].

Etanol fermantasyonu boyunca etanol ve CO₂ yanında başka yan ürünlerde oluşmaktadır. Çoğu etanol fermantasyonunda %1 (w/v) oranında gliserolde oluşmaktadır. Gliserolün oluşumunda ara ürünlerin kullanılması yüzünden pH'da artış ve ozmotik basıncın artması pirüvatın dönüşümünün azalmasına sebep olmaktadır. Daha az oranda uzun zincirli alkoller ve organik asitler gibi yan ürünlerde oluşmaktadır. Bazı ara ürünlerin direkt bu yan ürünlerin oluşumunda veya maya hücrelerinin büyümesinde metabolik çevrimde kullanılmasından dolayı etanol üretimi azalmaktadır [3,109].

Etanol fermantasyonu boyunca maya hücreleri çeşitli etkilere maruz kalırlar. Bunlardan bazıları; besin eksikliği, yüksek sıcaklık, kontaminasyon gibi çevresel sebeplerden, bazıları ise yüksek substrat ve etanol derişiminin maya hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmesi, yüksek şeker derişiminden kaynaklı ozmotik basınç, pH, yan ürünlerin oluşumu gibi maya hücre metabolizmasından kaynaklanır. Bunların çoğu maya hücrelerinin yaşayabilirliğini azaltarak daha düşük etanol üretimine sebep olmaktadır [3].

Saccharomyces bayanus

Saccharomyces bayanus (*S. bayanus*), *Saccharomyces* türü bir mayadır, sıklıkla soğuga dayanıklı bir maya olarak sirke, şarap ve şampanya fermantasyonu için kullanılır. *S. bayanus* MCYC 623 suşunun SEM görüntüsü Şekil 1.7.'de verilmiştir.



Şekil 1.7. *S. bayanus* MCYC 623 suşunun SEM görüntüsü [110]

S. bayanus ve *S. cerevisiae* mayalarının genlerinin yaklaşık %40'ı benzerlik göstermektedir. Mevcut sınıflandırma da, *S. bayanus*, *Saccharomyces* için bir tür kompleksi olarak kabul edilebilir. *S. cerevisiae* biyoetanol üretimi için en sık kullanılan maya türü olmasına rağmen, özellikle güçlü çoğalma oranları ve yüksek etanol toleransı sebebiyle *S. bayanus* diğer *Saccharomyces* türlerine göre avantajlıdır [111-113]. Soğuğa dayanıklı *S. bayanus* suşları düşük asitli şıradan şarap yapımında kullanılırlar, ayrıca *S. cerevisiae*'dan daha fazla gliserol, daha az asetik asit ve etanol üretmektedirler [114]. Genellikle, *S. cerevisiae* fermantasyon ortamı olarak 30 °C'yi tercih ederken [115], *S. bayanus* ise 1 °C ile 30 °C arasında değişen sıcaklıklarda çoğalmakta ve etanol üretebilmektedir [116-118]. Yapılan araştırmalarda *S. bayanus*'un iyi etanol toleransına sahip olduğu gösterilmiştir. Belloch vd. (2008) İspanya'daki şaraplardan izole ettikleri *S. bayanus*, %15 etanol içeren ortamda da büyümeyi başarmıştır [119]. Etanol içeren ortamda maya çoğalması inhibisyona uğrarken, çok yüksek seviyede şeker içeren ortamlarında inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Maya suşlarının çoğu teorik olarak 400 g/L şekere eşit ortamda bile

substrat toleransı göstermektedir [120] ve araştırmalarda, *S. bayanus* için 200, 250 ya da 300 g/L glikoz içeren ortamlarda normal çoğalmasını devam ettirdiği gösterilmiştir [119].

Kluyveromyces marxianus

Kluyveromyces marxianus (*K. marxianus*), *Kluyveromyces* sınıfından bir maya türüdür. *K. marxianus* ilk olarak zmden izole edilerek E. C. Hansen tarafından 1888 yılında tanımlanmıştır ve o yıllarda *Saccharomyces marxianus* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda pek çok *Kluyveromyces* türü yoğurt, peynir, kefir, akciğer, kımız, insan bademciği, yutak, çürüyen sisal yaprakları, şeker fabrikası kanalizasyonu gibi pek çok değişik habitattan izole edilmiştir [121]. Spor ve spor keselerinin morfolojisindeki farklılıklar ve farklı şekerleri fermante etme kapasitelerinden dolayı gerçek *Saccharomyces* mayaları ile karşılaştırıldığında *Kluyveromyces* trlerinin yeni bir sınıflandırmaya sokulması gerektiği düşünülmüştür [122]. Son yıllardaki çalışmalarla beraber toplamda 17 adet *Kluyveromyces* türü sınıflandırılmıştır [123]. *Kluyveromyces marxianus* CBS712 suşunun fotoğrafı şekil 1.8.'de sunulmuştur.



şekil 1.8. *K. marxianus* CBS712 suşunun fotoğrafı [124]

K. marxianus mayasına ait suşların izole edildiği habitatlar büyük bir çeşitlilik göstermektedir. Bunun bir sonucu olarak, biyoteknolojik uygulamalarda bu maya türünün kullanım alanları da çok farklıdır ve bunlar; enzimlerin (β -galaktosidaz, β -glukosidaz, inülinaz ve poligalakturonaz v.b...), tek hücre proteinlerinin, yiyeceklerde kullanılan aromalı bileşiklerin ve etanolün üretimini (yüksek sıcaklıkta ve eş zamanlı fermantasyon süreçlerinde); gıda ürünlerinin üretiminde laktoz içeriğinin azaltılması; peynir altı suyundan biyolojik bileşiklerin sentezi; proteinlerin üretimi çalışmaları olarak sıralanabilir [125].

1.4. Mikroorganizma İmmobilizasyonu

Mikroorganizma immobilizasyonu; istenilen katalitik aktivitenin varlığında gerekli bölgelere mikroorganizmaların yerleşmesi veya fiziksel hapsolmesi olarak tanımlanır. İmmobilizasyon serbest mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında, mikroorganizmaların kararlılığını arttırması, yüksek hücre yoğunluğu dolayısıyla fermantasyon verimini arttırması, düzenlemenin düşük maliyeti, tekrar tekrar kullanılabilmesi, sürekli fermantasyona uygun olması gibi avantajları sebebiyle fermantasyon çalışmalarında büyük öneme sahiptir. Son yıllarda, yakıt etanol üretimi için fermantasyon işlemlerinde immobilize mikroorganizma teknolojisine daha çok önem verilmektedir, çünkü immobilize hücre sisteminin fermantasyon performansında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir [7,126-130].

İmmobilize sistemler, geleneksel serbest mikroorganizma fermantasyonu ile karşılaştırıldığında pek çok avantajlar sağlamalarından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir [4,7,131-133];

1. İmmobilizasyon desteği, mikroorganizmaları herhangi bir ağır metale, çözücülere, sıcaklığa ve pH'nın fizikokimyasal etkilerine karşı koruyucu bir ajan gibi davranmaktadır.
2. Fermanterin birim hacmindeki mikroorganizma derişiminin yüksek olması, fermantasyonda yüksek hacimsel verimlilik ve daha kısa sürelerde ürün elde edilmesini sağlamaktadır.
3. İmmobilizasyon ile hücreler direkt substrat ve ürün ile etkileşmediklerinden mikroorganizmanın yüksek substrat ve ürün inhibisyonu azalır.
4. Sürekli fermantasyona imkan sağlamaktadır.
5. Üründen serbest hücrelerin ayrılmasının gerektirdiği filtrasyon ve santrifüjleme gibi ekstra masraflar ortadan kalkmakta ve buna bağlı olarak daha kolay ürün geri kazanımı ve enerji gereksiniminin azalmasını sağlamaktadır.
6. Yüksek hücre yoğunluğu ve fermantasyon aktivitesi yüzünden kontaminasyon riskinin azalmasını sağlamaktadır.

Mikroorganizmaların immobilizasyonu için organik veya anorganik materyaller, doğal veya sentetik polimerler olmak üzere çeşitli destekler kullanılmaktadır. İmmobilizasyon için kullanılan desteklere; üzüm kabuğu[9], portakal kabuğu[10], süpürge darısı[11] gibi organik materyaller, mineral kil[12] ve γ -alümina[13] gibi anorganik materyaller, sodyum aljinat[4,18], kitosan[14], κ -karragenon [134,135] gibi doğal veya poli(vinil alkol)[15], poli(akril amit)[16], poliüretan[136] gibi sentetik polimerler örnek olarak verilebilir.

Mikroorganizma immobilizasyonu için kullanılan destek maddelerinde aranan özellikler aşağıda gösterilmiştir [137,138];

1. Destek mikroorganizmaların bağlanabileceği fonksiyonel gruplar ile geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır.
2. Destek kolaylıkla ve yeniden kullanılabilir olmalıdır.
3. Mikroorganizmalar için toksik etki oluşturmamalı ve çalışma boyunca dayanıklılığı oldukça yüksek olmalıdır.
4. İmmobilize mikroorganizmaların biyolojik aktivitesi immobilizasyon işleminden etkilenmemelidir.
5. Desteğin gözenekliliği kontrol edilebilmeli, substratın, ürünlerin, gazların ve kofaktörlerin geçişine izin vermeli ve tekdüze olmalıdır.
6. Destek mekanik, termal, kimyasal ve biyolojik kararlılığını korumalı ve enzimlerden veya çözücülerden etkilenerek kolaylıkla parçalanmamalıdır.
7. Destek ve immobilizasyon tekniği kolay, ucuz ve çoğaltılmaya uygun olmalıdır.
8. Destek saf olmalı, ürünün kalitesini etkilememelidir ve kolaylıkla temin edilebilmelidir.

İmmobilizasyon genellikle doğal yapıların içine veya yüzeyine hücrelerin büyümesi sırasında meydana gelir. Pek çok fermantasyon çalışmalarında avantajlarından dolayı immobilizasyon teknikleri kullanılmaktadır ve bu yüzden pek çok teknik ve destek materyali önerilmiştir. İmmobilizasyonda kullanılan teknikler fiziksel mekanizmaları temel alan 4 ana kategoriye bölünmüştür [7,139];

- Katı destek yüzeyine immobilizasyon
- Gözenekli matriks içine hapsetme
- Çapraz bağlayıcılar veya doğal topaklanma ile kümeleşme
- Hücrelerin bir bariyerin arkasında tutulması

1. Katı Destek Yüzeyine İmmobilizasyon

Bu tür immobilizasyon, mikroorganizmaların katı bir destek üzerine tutunması ile gerçekleşir ve bu immobilizasyon türünün göreceli olarak diğerlerinden daha kolay olmasından dolayı kullanımı yaygındır. Katı desteklere mikroorganizma immobilizasyonunda hücre duvarı ve destek materyalin hidrofobiklik, yük, elektron verici ve elektron alıcı özellikleri gözönüne alınmalıdır. İmmobilizasyonda metal oksitler, glutraldehit veya aminosilanlar gibi çapraz bağlayıcılar kullanılabilir. Fakat bunlar zararlı oldukları için genellikle doğal immobilizasyon tercih edilmektedir. Doğal immobilizasyon çok basittir, ancak mikroorganizma değişimi genellikle düşüktür. Ayrıca çözelti ve mikroorganizmalar arasında bir engel olmadığı için hücre ayrılması ve yer değiştirmesi mümkün olmaktadır [7,140].

Örnek olarak bu tip immobilizasyonda kullanılan katı taşıyıcılar; selülozik materyaller (selüloz, ağaç parçaları, talaş) ve inorganik materyallerdir (palygorskite, montmorillenit, hidromika, gözenekli porselen, gözenekli cam). Ayrıca cam ve selüloz gibi katı materyallerin adsorpsiyon yeteneğini arttırmak için kitosan ve diğer kimyasallarla işlemler uygulanabilir [7,141,142].

2. Gözenekli Matriks İçine Tutuklama

İmmobilizasyonun ikinci önemli kategorisi bir gözenekli matriks içinde mikroorganizmaları tutulamaktır. İki çeşit tutuklama yöntemi vardır. İlk olarak, mikroorganizmaların gözenekli matriks içine difüzyonu sağlanır. Mikroorganizmalar çoğalmaya başladıktan sonra, onların hareketliliği diğer hücrelerin varlığı ve matriksin rijit ağ yapısı sebebiyle engellenir, böylece etkili bir

şekilde tutuklanma sağlanmış olur [143]. Bu tutuklama yönteminde genellikle sünger, sinterlenmiş cam, seramik, silisyum karbür, poliüretan köpük, kitosan ve paslanmaz çelik fiberler gibi malzemeler kullanılmaktadır [144-147].

İkinci yöntem, mikroorganizmaların etrafında bir gözenekli matriks sentezlemektir. Bu amaçla genellikle kalsiyum aljinat, κ -karragenon, agar, jelatin, kollojen, poliüretan, polistiren ve poli (vinil alkol) gibi doğal veya sentetik polimer hidrojeller kullanılmaktadır [148]. Bu şekilde elde edilen kürelerin çapları genellikle 0,3 ile 3 mm arasında değişmektedir. Bu immobilizasyon türünün, mikroorganizma tutuklaması oldukça yüksek olmasına rağmen çeşitli sakıncaları nedeniyle fermantasyon endüstrisinde kullanımları sınırlıdır. Hidrojel matriks içindeki yüksek hücre derişiminden dolayı besinlerin ve ürünlerin difüzyonu sınırlanmaktadır ve hidrojel küreler kimyasal ve fiziksel olarak kararlı değildir [140]. Örneğin etkili oksijen difüzlenme oranı karragenon kürelerinde 0,08-0,1 mm [149], aljinat kürelerinde 0,1-0,15 mm [150] olarak ölçülmüştür. Bu dezavantajların önüne geçmek için polimerik kürelerin fermantasyon sırasında şişerek, hücrelerin rahatça büyüyebileceği, substrat ve ürünlerin de kolayca difüzlenmesinin sağlanacağı bir ortam hazırlanmalıdır. Polimerler üzerine yapılan çeşitli aşı çalışmalarında aşılınmış polimerle elde edilen kürelerin su tutma kapasitelerinin dolayısıyla şişme kapasitelerinin daha yüksek değerlere ulaştığı bulunmuştur. Bunun, aşılama ile polimerin yapısına hidrofilik bir polimer grubunun girmesinin suyun kürelerin içine difüzlenmesini kolaylaştırmasından kaynaklandığı düşünülmüştür [24-26].

Polisakkarit hidrojel küreler gibi gözenekli matriks içine mikroorganizmaların tutuklanmasında problemlerden biri de hücrelerin çoğalarak kürelerin dış yüzeyine yerleşmesi veya kürelerin dışına salınmasıdır. Bu şekilde

serbest ve immobilize mikroorganizmaları içine alan bir sistem meydana gelmiş olur. Hücreleri içeren iç bir tabaka bulunan hidrojel kürelerin geliştirilmesi ile çift katmanlı kürelerle bu problem önlenmiştir ve dış tabaka hücrelerin yüzeyden kaçışını önlemektedir [151,152].

3. Bir Bariyer Arkasında Mekanik Hapsetme

Mikroorganizmalar, mikrogözenekli membran filtreler veya mikrokapsüller kullanılarak bunların arkasına tutuklanmaktadır. Bu immobilizasyon türüne, serbest ürünlerin elde edilmesi veya yüksek molekül ağırlıklı ürünlerin atıklardan ayrılmasının gerektiği çalışmalarda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu immobilizasyon çeşidinin asıl dezavantajları kütle transferini sınırlaması [153] ve hücre büyümesinde membranın biyozorluğa sebep olmasıdır [154].

4. Mikroorganizma Topaklanması

Pek çok araştırmacı tarafından, süspansiyonlardaki mikroorganizmaların özelliğine göre daha geniş bir birim formu oluşturmak için birleşerek veya yapışarak topaklanmaları mikroorganizma topaklanması olarak tanımlanmışlardır [155]. Topaklanmanın mümkün olduğunca reaktörlerin kullanıldığı fermantasyon çalışmalarında, hücrelerin potansiyellerine göre birleşerek geniş bir boyut oluşturduğu bir immobilizasyon tekniği olduğu düşünülmüştür. Topaklanmayı etkileyen hücre duvarının bileşimi, pH, çözülmüş oksijen ve ortamın bileşimi gibi pek çok faktör vardır. Özellikle *S. cerevisiae* gibi maya hücreleri doğal olarak birleşerek topaklanma yeteneğine sahiptirler. Maya hücreleri hücre duvarında bulunan lektin benzeri proteinleri ile bitişik maya hücrelerinin hücre duvarlarında

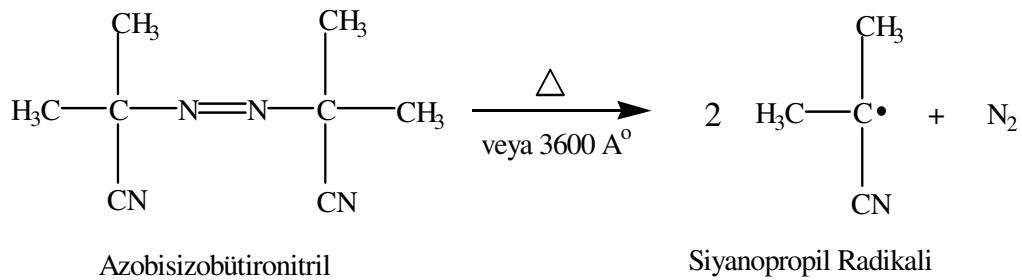
bulunan mannoz kalıntularına bağlamaktadırlar. Topaklanma yeteneği esas olarak mantar, bitki ve küf hücrelerinde de görölmektedir. Doğal olarak topaklanmanın olmadığı koşullarda hücrelerin birleşmesini sağlamak için çapraz bağlayıcılar veya yapay topaklanma ajanları kullanılmaktadır [7,155,156].

Maya ve bakteri türlerinin immobilizasyonu mikroorganizmanın büyümesi, fizyolojisi ve metabolik aktivitesinin değişmesini etkilemektedir. Genellikle immobilizasyon nedeniyle oluşan metabolik değişikliklerin türünü ve büyüklüğünü önceden belirlemek güçtür. İmmobilize ve serbest mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda immobilizasyon ile polisakkarit depolanmasının arttığı, toksik veya inhibitör bileşiklere ve substratın yüksek derişimlerine karşı toleransın arttığı, ürün veriminin yükseldiği, daha düşük yüzdede fermantasyon yan ürünlerinin oluştuğu, yüksek hücre içi pH değerleri elde edildiği ve hücre içi enzim aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir [7,133,141,157,158].

1.5. Aşı Kopolimerler ve Eldesi

Bir polimer zinciri üzerine, başka bir monomerin bir polimer zinciri oluşturmak üzere kimyasal bağlarla bağlanması sonucu oluşan yeni moleküle aşı kopolimer denir. Bu iki bileşenden asıl polimere polimer ana zinciri (veya substrat polimer) ve diğerine yan zincir polimer (veya kaburga polimer) isimleri verilmektedir. Aşı kopolimerizasyon polimer ana zincirinin özelliklerini değiştirmek ve geliştirmek için kullanılabilir. Aşı kopolimerler, bir polimerin bulunduğu ortamda başka bir tür monomerin polimerleşmesi ile elde edilir. Yan zincir polimerin, aşılınmayan kısımları homopolimer olarak adlandırılmaktadır ve bu kısım uygun bir çözücü ile ekstrakte edilerek aşı kopolimerden uzaklaştırılmaktadır [159,160].

Aşı kopolimerleşme yöntemlerinin temeli, bir polimer zinciri üzerinde aşlamayı başlatabilecek aktif merkezler oluşturmaya dayanır. Bu aktif merkezler bir serbest radikal olabildiği gibi, anyonik veya katyonik bir merkez ya da kondensasyon polimerleşmesini başlatabilecek bir kimyasal grup olabilir. Aşı kopolimerizasyonda en çok ana zincir üzerinde radikalik aktif merkezler oluşturularak yürütülmektedir. Bu amaçla serbest radikal katılma polimerleşmesi kullanılmaktadır. Polimerizasyon radikaller üzerinden başlar ve zincir büyümesi yine radikaller üzerinden ilerler. Büyüme adımında aktif bir zincirin ucundaki tek elektron (radikal) monomerin çift bağındaki π -elektronlarından birisiyle etkileşerek yeni bir monomeri zincire katar, diğer π -elektronu zincir ucuna aktarılır ve kopolimerizasyon bu şekilde devam etmektedir. Aşı kopolimerizasyonunun başlayabilmesi için polimer ana zinciri üzerinde serbest radikaller oluşturulmalıdır. Serbest radikaller, kimyasal maddeler kullanılarak ya da fiziksel etkenlerden yararlanılarak üretilebilir. Bu amaçla kullanılan kimyasal maddelere başlatıcılar denir. Bu başlatıcı molekülleri ısı veya ışık etkisiyle parçalanarak polimerizasyon ortamında serbest radikaller oluşturmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan başlatıcılar; organik peroksitler, hidroperoksitler, azo ve diazo bileşikleridir [161-163]. Örneğin azobisisobütironitril ısıyla parçalanarak aşağıdaki radikali verir;

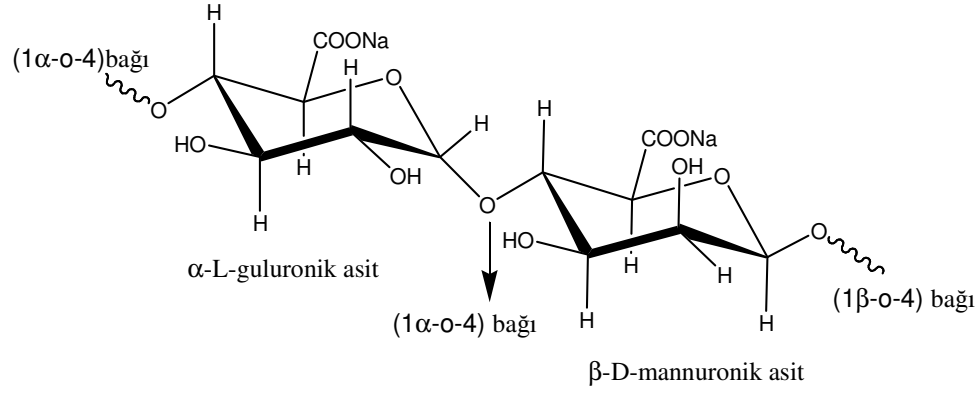


Şekil 1.9. Azobisisobütiranitril'den radikal oluşum tepkimesi

Deneysel koşulların özellikleri aşılamaı etkilemektedir. Özellikle sıcaklığın aşılamaı büyük ölçüde etkisi vardır. Genel olarak sıcaklığın artırılması ile kısıtlayıcı bir değere ulaşana kadar aşılama yüzdesi artmaktadır. Sıcaklığın belli bir değerin üzerine çıkarılması ile radikal sonlanma tepkimelerinin sayısı artacağı için aşılama yüzdesi azalacaktır. Aynı şekilde başlatıcının derişiminin artırılması ile aşılama yüzdesi artacak, fakat belli bir değerden sonra yine azalacaktır. Aşılama reaksiyonunun süresi aşılama yüzdesini artırır, ancak belli bir süre sonra bu eğilim azalmaya başlamaktadır. Monomer derişiminin yüzde üzerindeki etkisi biraz karmaşıktır. Çünkü bazı durumlarda monomer derişimindeki bir artış olumlu bir etki yaparken, diğer durumlarda olumsuz bir etkiye sebep olabilmektedir. Genellikle yüksek monomer derişimlerinde daha fazla homopolimer oluştuğu görülmüştür [159,164].

1.6. Sodyum Aljinat (NaAlg)

Aljinat, endüstriyel olarak su yosunlarının yapısında bulunan kahverengi alglerin hücre duvarlarından elde edilen doğal anyonik bir polisakkarittir. Kendi ağırlığının 200-300 katı kadar su absorplama yeteneğine sahiptir. Aljinat ayrıca bakteriyel kaynaklardan da (*Pseudomonas* ve *Azobacter* türlerinden) üretilmektedir. Bakteriyel aljinatlar tıbbi uygulamalar için mikro veya nano yapıların üretimi için uygundur. Aljinat, α -L-guluronik asit ve β -D-mannuronik asit birimlerinin α -glikozit bağları ile birleşmesi sonucu meydana gelen bir kopolimerdir. Blokların uzunluğu yosunların büyüme koşullarına ve sıcaklığa göre değişiklik göstermektedir [165-171].



Şekil 1.10. Sodyum aljinatın molekül formülü

Aljinat, su yosunlarından aljinik asit şeklinde elde edilmekte ve bu daha sonra sodyum karbonat gibi çeşitli tuzlarla muamele edilerek sodyum aljinat elde edilebilmektedir. Sodyum aljinatın; yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu, bitkisel kökenli oluşu, şelat oluşturabilmesi, jelleşebilmesi ve kimyasal modifikasyona uygun olması gibi pek çok faydalı özellikleri vardır. Yapılan araştırmalar sodyum aljinatın tamamen güvenli olduğunu, oral yolla verildiği zaman vücutta birikim yapmadığını ve herhangi bir toksik veya iltihaplandırıcı yan etkiye sebep olmadığını göstermiştir. Sodyum aljinatın iki veya daha çok değerlikli katyonlarla etkileşimi sonucu üzerindeki guluronik asit birimlerinin çapraz bağlanması ile hidrojel küreler elde edilmektedir. Sodyum aljinatın fonksiyonelliği genellikle mannuronik asit ve guluronik asit birimlerinin oranına göre kontrol edilmektedir ve bu oran 0,3 ile 2,3 arasında değişmektedir. Daha yüksek guluronik asit içeren polimerler daha rijit jel formları oluşturmaya yatkınken, daha yüksek mannuronik asit içeren polimerler daha yumuşak jel formları oluşturmaya yatkındırlar. Sodyum aljinat mikrobiyal etkilere karşı birçok diğer karbonhidrattan daha az etkilenir. Ancak, polimer zincirlerinin mikrobiyal enzimlerle

parçalanması sonucu viskozitesinde kayıplar olmaktadır. Sodyum aljinatın istenmeyen bu özelliklerini ortadan kaldırmak için aljinat üzerine sentetik monomerlerin aşılması çalışmaları yapılmıştır. Sentetik monomerler ile özellikleri geliştirilen sodyum aljinat kontrollü ilaç salımı ve enzim immobilizasyonu çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [172,173-184].

Aljinik asit ve tuzlarının, gıda, eczacılık, tıp, tekstil, kağıt ve kozmetik alanlarında yaygın bir kullanımı vardır. Gıda endüstrisinde emülsifiyer ve viskozite artırıcı olarak E-401 ismiyle, tekstil ve kağıt sanayinde boyar maddelerin akış özelliklerin kontrol etmek ve kalınlaştırıcı olarak, tıp alanında yaraların iyileşmesindeki olumlu etkileri sebebiyle hemostatik bandajların yapımında, diş hekimliğinde dolgu veya ölçü alma maddesi olarak, eczacılıkta ilaçların kontrollü salım formülasyonlarının hazırlanmasında, tabletlerde dağıtıcı ve bağlayıcı ajan olarak, emülsiyon sistemlerinde stabilizatör olarak ve kozmetikler de kalınlaştırıcı ve süspansiyon ajanı olarak kullanılmaktadır [185-194].

1.7. N-vinil-2-Pirolidon (NVP)

N-vinil-2-pirolidon, kapalı formülü C_6H_9NO , molekül kütlesi 111,1 g/mol erime noktası 13,5 °C, kaynama noktası 193 °C olan, renksiz, hidrofilik, iyonik olmayan sıvı bir monomerdir. Radikalik, termal ve foto başlatıcılarla kolaylıkla polimerleşebilir ve poli(N-vinil-2-pirolidon) PVP kısaltmasıyla kullanılmaktadır. PVP suda ve diğer polar çözücülerde çözünebilen, alifatik hidrokarbonlarda çözünmeyen, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu, yüksek jelleşme özelliğine ve ayrıca çok iyi şelat veya kompleks oluşturma yeteneğine sahip son derece hidrofilik bir polimerdir. PVP çapraz bağlanmış üç

boyutlu ağ yapısı yüksek su absorplama kapasitesine sahip bir hidrojeldir, fakat buna karşılık mekanik dayanıklılığı düşüktür [195-199].

PVP bu haliyle kullanılabileceği gibi, başka bir polimer ile kopolimeri oluşturularakda çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Akrilik asit, akrilat, vinil asetat ve akrilonitril monomerleri ile fenolik reçinelerin sentezinde, PVP-iyot kompleksi şeklinde sterilize edici ve enfeksiyon önleyici olarak tıpta, kağıt ve tekstil endüstrisinde ultraviyole kurutmalı baskı mürekkeplerinin üretiminde yardımcı madde olarak, kozmetik sanayinde katkı maddesi olarak, tablet kaplama ve katkı maddesi olarak çeşitli eczacılık uygulamalarında, fabrika atığı sularından metal iyonlarının arındırılmasında, foto emülsiyon katkı maddesi ve renk algılayıcı olarak fotoğrafçılıkta, virüs saflaştırılmasında, jel geçirgenlik kromotografisinde destek madde olarak ve bunların yanında yapıştırıcı, kağıt, seramik, elektrik, deterjan endüstrilerinde de geniş kullanım alanları vardır [196,197,199,200].

1.8. Sodyum Aljinat Küreleri ile İlgili Biyoetanol Üretim Çalışmaları

İmmobilize kültürde etanol üretiminin, serbest kültüre göre bazı avantajları [127] olduğu bilindiğinden son yıllarda bu sistemin kullanımı artmaktadır. Mikroorganizmaların immobilizasyonunda organik, anorganik, doğal veya sentetik polimerler olmak üzere çeşitli destek materyalleri kullanılmaktadır. Farklı immobilizasyon destekleri arasında kalsiyum aljinat hidrojeller, basitliği ve tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi faydalarından dolayı mikroorganizma immobilizasyonunda en fazla kullanılan materyaldir. Bu immobilizasyon tekniği sodyum aljinat-mikroorganizma karışımının kalsiyum klorür çözeltisi içine damlatılması ve bu şekilde mikroorganizma immobilize edilmiş kürelerin elde

edilmesini temel alır. Kalsiyum aljinat hidrojelleyerle ilgili literatürde pek çok çalışma mevcuttur [201].

Lee vd. (2011) kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile 100–150 g/L glikoz içeren fermantasyon ortamında etanol üretmişlerdir. Sodyum aljinat ve glikoz derişiminin, sıcaklığın ve pH'nın etanol üretimi üzerine etkisini incelemişlerdir. En uygun sodyum aljinat derişimi %2 (w/v), glikoz derişimi 100 g/L, sıcaklık 30 °C ve pH 5 bulunmuştur. En yüksek etanol derişimini 51,1 g/L ve üretim hızını 5,11 g/Lsaat olarak bulmuşlardır [202].

Bangrak vd. (2011) kalsiyum aljinat-lif kabağı desteği üzerine immobilize ettikleri *S. cerevisiae* ile 200–248 g/L gibi farklı şeker derişimlerinde etanol üretmişlerdir. En yüksek etanol derişimini 57,4 g/L ve üretim hızını 11,5 g/Lsaat bulmuşlardır [203].

Liu vd. (2008) kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile süpürge darısı sapı suyundan elde ettikleri şekerden etanol üretmişlerdir. Süpürge darısı sapı suyundan elde ettikleri 10 g/100 mL glikoz ve sükroz karışımından hacimce %5,85–6,35 aralığında etanol üretmişlerdir [1].

Liu vd. (2009) Mn-Zn tozu içeren kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile 90–225 g/L aralığında şeker içeren melastan etanol üretmişlerdir. En yüksek etanol derişimini 66 g/L, üretim hızını ise 26,3 g/Lsaat olarak bulmuşlardır [18].

Yan vd. (2011) kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile gıda artıklarını enzim ile hidrolize ederek elde ettikleri 160–220 g/L farklı şeker

derişimlerinde etanol üretmişlerdir. En yüksek etanol derişimini 89,28 g/L, üretim hızını 49,88 g/Lsaat ve verimi 0,48 g/g olarak bulmuşlardır [204].

Ghorbani vd. (2011) kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile 50-150 g/L farklı şeker derişimlerinde melastan immobilize hücre rekatörde etanol üretmişlerdir. En yüksek etanol derişimini 19,15 g/L, üretim hızını 2,39 g/Lsaat ve verimi 0,4623 g/g olarak bulmuşlardır [205].

Razmovski vd. (2011) kalsiyum aljinat-mısır gövdesi artıkları desteği üzerine immobilize ettikleri *S. cerevisiae* ile 130 g/L şeker içeren melastan etanol üretmişlerdir. En yüksek etanol derişimini 60,36 g/L, üretim hızını 2,51 g/Lsaat ve verimi 0,493 g/g olarak bulmuşlardır [206].

Gough vd. (1998) kalsiyum aljinata immobilize ettikleri *K. marxianus* ile 80–140 g/L gibi farklı derişimlerde şeker içeren melastan etanol üretmişlerdir. 120 g/L şeker içeren melastan, en yüksek etanol derişimini 44 g/L, üretim hızını 106 g/Lgün ve verimi 0,67 g/g olarak bulmuşlardır [207].

Brady vd. (1997) kalsiyum aljinata immobilize ettikleri *K. marxianus* ile %4 (w/v) laktoz içeren fermantasyon ortamında etanol üretmişlerdir. Fermantasyon ortamında Mn^{+2} bulunmasının etanol üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Mn^{+2} bulunan ortamda serbest mikroorganizmanın en fazla 3 g/L etanol ürettiği, immobilize *K. marxianus*'un ise 12 g/L etanol ürettiği bulunmuştur [208].

1.9. Çalışmanın Amacı

Çeşitli destek materyallere immobilize mayalardan biyoetanol üretimiyle ilgili literatür de pek çok çalışma mevcuttur. Doğal veya sentetik polimerik

desteklerle yapılan bu çalışmalar incelendiğinde, hemen hemen hepsinde tek bir polimer kullanılmış, çok az sayıda çalışmada ise polimerler blend haline getirilerek immobilizasyon işlemi uygulanmıştır. Literatürde doğal polimerler üzerine aşılansmış sentetik bir monomerle oluşturulmuş aşu kopolimerlerle yapılmış hiçbir biyoetanol üretim çalışması bulunamamıştır. Bu sonuç bize çalışmanın özgünlüğünü göstermektedir.

Bu çalışmada polimerik destek üzerine immobilize edilmiş mikroorganizmalardan biyoetanol üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla daha önce laboratuvarımızda sentezlenen [172] N-vinil-2-pirolidon aşılansmış sodyum aljinatın mikroorganizma immobilizasyonun da destek materyal olarak kullanılması düşünülmüştür. Mikroorganizma olarak yüksek yüzdede etanol üretmelerinden dolayı *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayalarının kullanılması planlanmıştır.

Çalışmamızda, mikroorganizmaların sodyum aljinat-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) destek içine immobilize edilmesi ve elde edilen maya immobilize edilmiş kürelerden biyoetanol üretiminin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. İmmobilizasyon çalışmamızda destek materyal olarak kullanılması düşünülen N-vinil-2-pirolidon aşılansmış sodyum aljinatın sudaki şişme yeteneğinin aljinatın yapısına giren son derece hidrofilik N-vinil-2-pirolidon'dan dolayı arttığı rapor edilmiştir [172]. Kullanılacak destek materyalin bu özelliğinin fermantasyon sırasında hücre büyümesini, substrat ve ürünlerin difüzyonunu kolaylaştırabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, sodyum aljinat üzerine PVP aşılansmasının, çapraz bağlayıcı kalsiyum klorür derişiminin, fermantasyon ortamındaki şeker derişiminin, ortama eklenen

kürelerin yüzdesinin ve kürelerin tekrar tekrar kullanımının biyoetanol üretimi üzerine etkisinin araştırılması çalışmanın amaçlarını oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler

Aşı kopolimerin eldesinde kullanılan Sodyum aljinat (NaAlg) (saflık %100) Sigma (Amerika), N-vinil-2-pirolidon (NVP) (d=1,04 g/mL, saflık >%98)Fluka (İsviçre), azobisisobütironitril (AIBN) (saflık >%98) ve hidrokinon (saflık %99) Merck (Almanya), aseton (d=0,79 g/mL, saflık %100) ve etanol (d=0,788 g/mL, saflık %99,5) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edilmiştir. N-vinil-2-pirolidon 2 mmHg vakum altında ve 65 °C'de distilasyon ile saflaştırılarak, AIBN aseton-su karışımında kristallendirilerek kullanılmıştır.

Mikroorganizmalardan; *S. cerevisiae* suşu Pakmaya (Türkiye) firmasından, *S. bayanus IA* ve *K. marxianus NCYC 587 suşları* Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

Kültür ortamlarında kullanılan malt özü Difco (Amerika), pepton ve besi agarı Lab M (İngiltere), potasyum dihidrojen fosfat (saflık >%98) ve magnezyum sülfat (saflık >%98) Riedel-de Haen (Almanya), glikoz (saflık %100) Carlo Erba (İngiltere), maya özü, amonyum sülfat (saflık >%98) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Elde edildikleri şekilde kullanılmışlardır.

Glikoz tayininde ve diğer deneylerde kullanılan sodyum klorür (saflık %100) Riedel-de Haen (Almanya), dinitrosalisilik asit (saflık >%99) Fluka (İsviçre), sodyum potasyum tartarat (saflık %100), sodyum hidroksit (saflık %97), kalsiyum klorür (saflık >%99) ve sodyum sitrat (saflık >%99) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Element analizi çalışmaları: Elde edilen NaAlg-aşı-PVP aşı kopolimerinin C-, H-, N- miktarlarının tayini için element analizi Elementar Analysensysteme GmbH vario MICRO CHNS marka (Amerika) cihaz ile gerçekleştirildi.

UV spektrofotometresi çalışmaları: Shimadzu UV-1800 marka (Japonya) UV/Visible spektrofotometre kullanılmıştır.

Gaz kromatografisi (GC) çalışmaları: Mikroorganizmaların ürettiği etanol HP 6890 marka (Amerika) gaz kromatografisi cihazı ile yapılmıştır. DB-FFAP (kolon uzunluğu 30m, kolon kalınlığı 0,32mm, film kalınlığı 0,5µm, 40-250 °C aralığında kararlı) kolon, analiz için alev iyonlaştırma detektörü ve taşıyıcı gaz olarak da yüksek saflıkta (%99,999) azot gazı kullanılmıştır.

Termogravimetrik analiz (TGA) çalışmaları: TGA Q500 model TA marka (Amerika) cihazla gerçekleştirilmiştir.

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) çalışmaları: JSM 5600 marka (Tokyo, Japonya) taramalı mikroskop ile yapılmıştır.

Yukarıdaki temel cihazların yanında şu cihazlar da kullanılmıştır;

- Çalkalamalı su banyosu (Jeitech BS-21, Kore)
- Manyetik karıştırıcı (Corning PC-420, Amerika)
- Etüv (Nüve FN-055, Türkiye)
- pH metre (Hanna instruments HI 221, Romanya)
- Analitik terazi (Precisa XB 220A, Amerika)

- Santrifüj (Nüve NF-200, Türkiye)
- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- Mikrodalga fırın (Philco, Türkiye)

2.3. Sodyum Aljinat-aşı-Poli(N-vinil-2-pirolidon) (NaAlg-aşı-PVP) Aşı Kopolimerinin Sentezi

Mikroorganizma immobilizasyonu için destek materyal olarak kullanılacak NaAlg-aşı-PVP kopolimeri laboratuvarımızdaki daha önceki bir çalışmada [172] tanımlandığı şekilde sentezlenmiştir ve Fourier transform infrared (FTIR), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve elementel analiz çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmada kullanılacak aşı kopolimerler önceki çalışma ile karşılaştırıldığında, %2,5 (w/v) NaAlg ve monomer derişimi değiştirilerek sentezlendi.

2.4. *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* İçin Kültür Ortamları

2.4.1. Katı Besi Ortamı

Her üç maya için benzer besi ortamı kullanıldı. Katı agar ortamı 1 litre çözelti için; 3 g maya özütü, 3 g malt özütü, 5 g pepton, 20 g besi agarı ve 10 g glikoz, deiyonize suda çözülerek hazırlandı. Çözelti 121 °C'de 10 dakika sterilize edilerek steril petri kaplarına döküldü. Mayalar platin tel ile agar ortamına aşılandı. Bu ortam 30 °C'de 48 saat inkübatörde mikroorganizmaların gelişmesi için bekletildi ve +4 °C'de depolandı. Katı ortam her ay yeniden hazırlanarak kullanıldı.

2.4.2. Sıvı Besi Ortamı

1 Litre üretim ortamı *S. cerevisiae* için; 40 g glikoz, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g maya özü ve 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; *S. bayanus* için; 80 g glikoz, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g maya özü ve 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; *K. marxianus* için; 60 g glikoz, 1 g KH_2PO_4 , 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g maya özü ve 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içerecek şekilde deiyonize suda çözülerek hazırlandı. Hazırlanan ortamlar 121 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Sonra katı ortamdan platin tel ile mikroorganizmalar sıvı üretim ortamına alındı ve 30 °C'de 120 rpm çalkalama hızında çeşitli sürelerde su banyosunda mikroorganizmalar büyütüldü.

2.4.3. Fermantasyon Ortamı

Fermantasyon ortamı 1 litre çözültide *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* için 50-200 g glikoz, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; *K. marxianus* için 50-200 g glikoz, 1 g KH_2PO_4 , 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içerecek şekilde deiyonize suda çözülerek hazırlanarak 121°C'de 10 dakika otoklavda sterilize edildi.

2.5. Mayaların Polimerik Desteklere İmmobilizasyonu

NaAlg polimerinden %2 (w/v) ve üç farklı aşılama yüzdesine sahip NaAlg-aşı-PVP kopolimerlerinden % 3'lük (w/v) çözülteleri hazırlanmıştır ve 121°C'de 10 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra kullanılmıştır. Sıvı besi ortamında inkübe edilen mayalar santrifüjlenerek ayrıldıktan sonra %0,9'lük (w/v) NaCl ile yıkanmıştır. Mayaların üzerine steril deiyonize su ilave edilerek hazırlanan polimer çözültelerine hacimce %10 olacak şekilde eklenmiştir. Polimer-mikroorganizma

çözeltileri, %2,0-3,5 CaCl₂ (w/v) çapraz bağlayıcı çözeltilerine pipetle damlatılarak küreler oluşturulmuştur. Küreler 30 dakika çapraz bağlandıkları çözeltilerde bekletildikten sonra 5 dakika sterilize edilmiş saf su ile yıkandıktan sonra üretim ortamına eklenmiştir.

2.6. Maya Kuru Kütlesinin Belirlenmesi

Fermantasyon sırasında kullanılacak maya miktarını gram/litre (g/L) olarak belirlemek amacıyla besiyeri hazırlandı ve sterilize edildikten sonra platin tel ile katı üretim ortamından alınan mayalar aşılansarak 30 °C'de 120 rpm çalkalama hızında su banyosunda büyütüldü. Mikrodalga fırında 1 dakika kurutularak boş ağırlıkları alınmış olan tüplere 5 mL örnek alındı ve deney tüpleri 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üstteki sıvı kısım atıldı ve üzerlerine %0,9'luk (w/v) NaCl'den 5 mL ilave edilerek tekrar 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üstteki kısım yine alındı ve tüpler 1 dakika süre ile mikrodalga fırında kurutuldu. Kurutulan tüpler içinde CaCl₂ olan desikatörde soğutuldu ve tüplerin ağırlıkları tartıldı.

İmmobilize mayaların kütlesini belirlemek amacıyla; maya immobilize edilmiş küreler sterilize edilmiş sıvı besi ortamına alınarak 30 °C'de 120 rpm hızda karıştırılarak çoğalmaları sağlandı. Daha sonra inkübe edilen kürelerden 10 adet alınarak 5 mL %2 (w/v) sodyum sitrat çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle çözüldü. Daha sonra karışım 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi, üstteki sıvı kısım atıldı ve üzerlerine %0,9'luk (w/v) NaCl'den 5 mL ilave edilip tekrar 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üstteki sıvı kısım yine alındı ve tüpler 1 dakika süre ile mikrodalga fırında kurutuldu. Kurutulan tüpler içinde CaCl₂ olan desikatörde soğutuldu ve tüplerin ağırlıkları tartıldı. Aynı işlem maya immobilize edilmemiş küreler içinde

yapılarak bu karışımın ağırlığı dala olarak alındı. Serbest mayalar için kuru hücre ağırlığı gram/litre (g/L) olarak Eşitlik 2.1.'den yararlanılarak belirlendi.

$$\text{Kuru Maya Kütlesi (g/L)} = \frac{A - B}{V} \times 1000 \quad (\text{Eşitlik 2.1.})$$

Burada; A dolu tüp kütlesi, B boş tüp kütlesi ve V örnek hacmi olarak tanımlanmıştır. İmmobilize mayalar için kuru hücre ağırlığı ilk olarak yukarıdaki eşitlikten 10 tane küre için hesaplanmış, daha sonra besi ortamındaki toplam küre miktarı ile çarpılarak bütün kürelerdeki kuru kütle bulunmuştur.

2.7. Fermantasyon Deneyi

Maya immobilize edilmiş NaAlg ve çeşitli aşı yüzdelere sahip NaAlg-aşı-PVP küreleri hazırlanan fermantasyon ortamlarına eklenerek 30 °C'de 120 rpm çalkalama hızında karıştırılarak etanol üretimi gerçekleştirildi ve belirli sürelerde ortamdan örnekler alındı. Bu örneklerden immobilize mayaların zamanla glikoz tüketim ve etanol üretim miktarları belirlendi.

2.8. Glikoz Analizi

Glikoz tayini için, dinitro salisilik asit (DNSA) reaktifi ile glikozun oluşturduğu kahverengi çözeltinin 540 nm'deki renk yoğunluğu ölçüldü [4]. DNSA reaktifi 100 mL çözelti için şu şekilde hazırlanmıştır; 25 mL 2 M sıcak NaOH içinde 1 g DNSA çözüldü, ayrı bir yerde 30 mL suda 30 g sodyum potasyum tartarat çözüldü, sıcak DNSA çözeltisi sodyum potasyum tartarat çözeltisi üzerine ilave edildi, karışım su ile 100 mL'ye tamamlandı, 45 °C'de bir süre karıştırıldı. Tayin için

glikoz çözeltisinden deney tüpüne 0,5 mL alındı üzerine 1,5 mL DNSA reaktifi eklenerek 5 dakika kaynayan su içerisinde bekletildi. Çözeltiye 5 mL deiyonize su eklendi. Çözeltinin renk yoğunluğu 540 nm dalga boyunda cam küvet kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon grafiği için 0,2-2,0 g/L derişim aralığında glikoz çözeltileri hazırlanarak DNSA reaktifi ile verdikleri renklerin absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Derişimi bilinmeyen glikoz çözeltilerinin derişimleri de bu eğrinin eğiminden yararlanılarak belirlendi.

2.9. Gaz Kromatografisi ile Etanol Tayini

İlk olarak cihazın çalışma sıcaklıkları; enjeksiyon bloğu için 200, kolon için 190 ve dedektör için 200 °C olarak ayarlandı. Etanol tayini, 0,2-2 g/L aralığında deiyonize su ile hazırlanan derişimleri belli etanol çözeltilerinin gaz kromatografi cihazına enjekte edilerek, alev iyonlaştırma dedektörü ile elde edilen pik alanlarına göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Derişimi bilinmeyen etanol çözeltilerinin derişimleri ise yine cihazdan elde edilen pik alanlarına göre kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlendi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. NaAlg-aşı-PVP Kopolimerinin Karakterizasyonu

3.1.1. Aşı Kopolimerlerin Element Analizi Sonuçları

Çizelge 3.1.'de elde edilen NaAlg-aşı-PVP kopolimerlerinin element analizi ölçüm sonuçlarından hesaplanan aşılama yüzdeleri ve polimerlerin isimleri görülmektedir. Elde edilen aşı kopolimerlerde monomer derişiminin artışı ile aşılama yüzdesi artmaktadır.

Çizelge 3.1. NaAlg-aşı-PVP kopolimerlerinin isimleri, azot miktarları ve N-vinil-2-pirolidon aşılama yüzdeleri

Polimerin Kodu	Aşı Kopolimer	Monomer Miktarı (Mol)	Azot Miktarı (%)	Aşılama Yüzdesi (%)
A ₁	NaAlg-aşı-PVP ₁	4,2x10 ⁻²	1,34	12,21
A ₂	NaAlg-aşı-PVP ₂	6,3x10 ⁻²	1,66	15,09
A ₃	NaAlg-aşı-PVP ₃	8,4x10 ⁻²	2,13	19,88

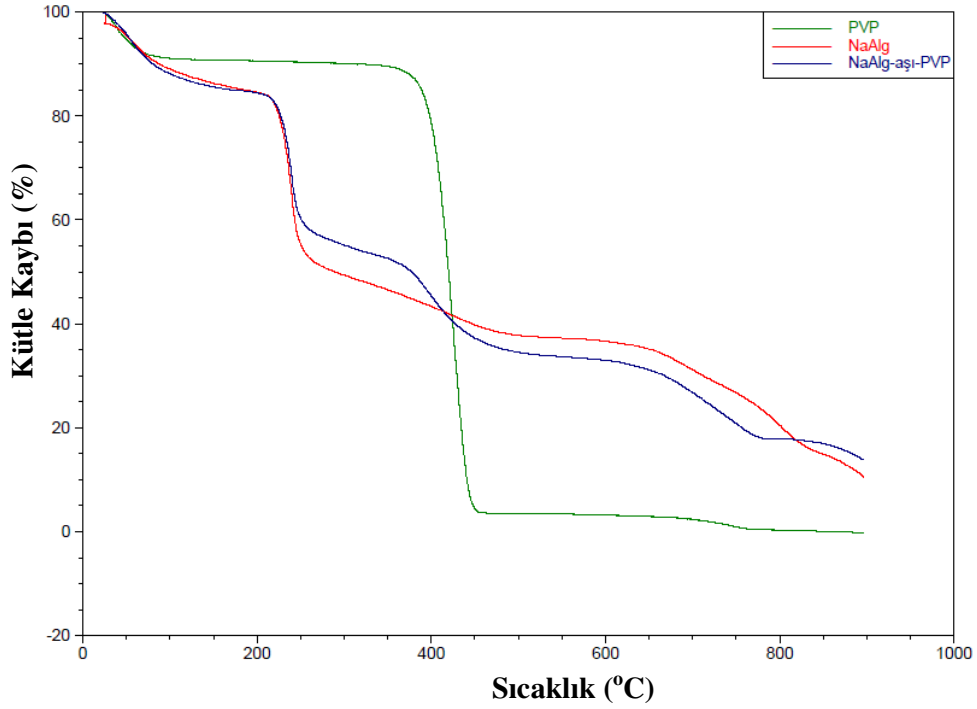
3.1.2. Aşı Kopolimerin Termogravimetrik Analiz Sonuçları

NaAlg, PVP ve NaAlg-aşı-PVP (%19,88 aşı yüzdesine sahip kopolimer için) polimerlerinin termogravimetrik analiz sonuçları Şekil 3.1.'de sunulmuştur. NaAlg'nin termogramı incelendiğinde, 30-220 °C, 220-253 °C ve 253-488 °C sıcaklık aralıklarında üç aşamada ısıl bozunmaya uğradığı gözlenmiştir. 30-220 °C sıcaklık aralığında ve polimerin kütesinin yaklaşık olarak %16'sını kaybettiği bozunma, polimerin yapısındaki suyun uzaklaşmasını göstermektedir. 220-253 °C ve

253-488 °C sıcaklık aralıklarında ve polimerin kütlesinin sırasıyla yaklaşık %31 ve %16'sını kaybettiği bozunmalar, NaAlg'nin ısı parçalanmasına atfedilebilir.

PVP'nin termogramında 30-66 °C ve 400-445 °C sıcaklık aralıklarında iki aşamada ısı bozunmaya uğradığı gözlenmiştir. 30-66 °C sıcaklık aralığında ve polimerin kütlesinin yaklaşık %9'unu kaybettiği bozunma, polimerin yapısındaki suyun uzaklaşmasını göstermektedir. 400-445 °C sıcaklık aralığında ve polimerin kütlesinin yaklaşık %85'ini kaybettiği bozunma, PVP'nin ısı parçalanmasına atfedilebilir.

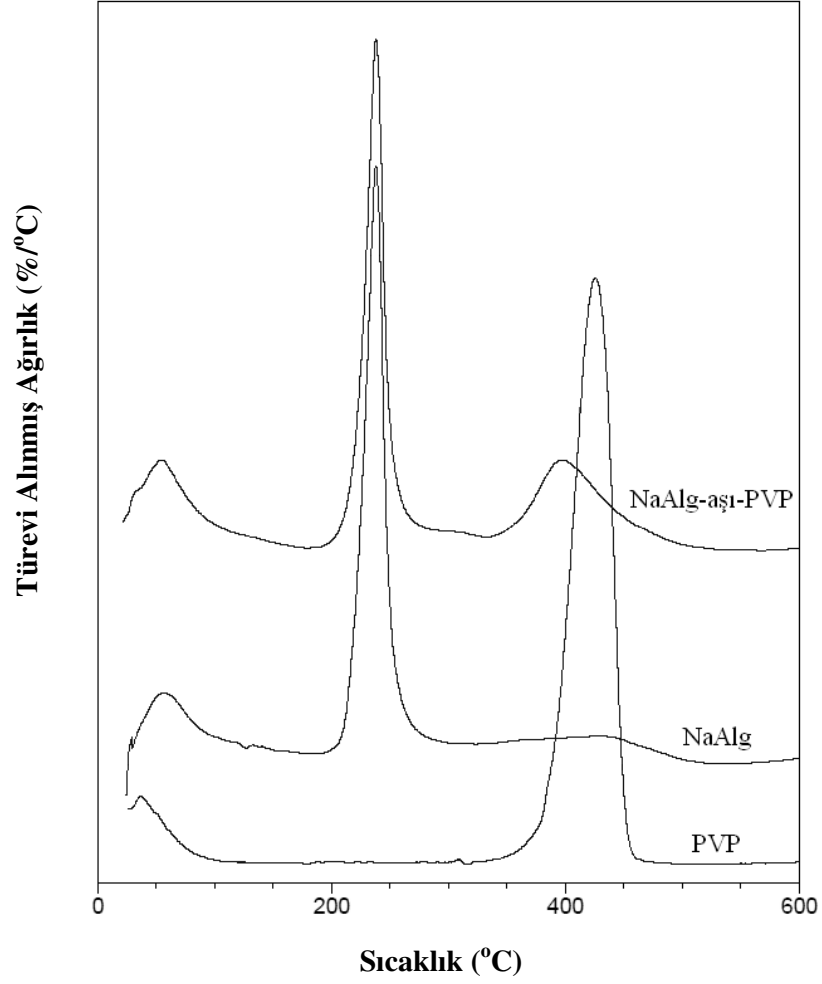
NaAlg-aşı-PVP'nin termogramında NaAlg'ye benzer şekilde 30-224 °C, 224-245 °C ve 245-450 °C sıcaklık aralıklarında, üç aşamada ısı bozunmanın meydana geldiği gözlenmiştir. NaAlg'ye benzer şekilde 30-224 °C sıcaklık aralığında ve polimerin kütlesinin %16'sını kaybettiği bozunma, polimerin yapısındaki suyun uzaklaşmasını göstermektedir. Yine NaAlg'ye benzer şekilde görülen, 224-245 °C sıcaklık aralığında çıkan ve polimerin kütlesinin %25'ini kaybettiği bozunma, NaAlg'nin ısı parçalanmasına atfedilebilir. 245-450 °C sıcaklık aralığında ve polimerin kütlesinin %24'ünü kaybettiği bir bozunma gözlenmektedir. Bu bozunmanın olduğu yerde NaAlg'ye oranla yaklaşık %8 daha fazla kütle kaybı meydana gelmiştir. Ayrıca PVP'nin aynı sıcaklık aralığında %85 gibi büyük bir kütle kaybına uğraması aşı kopolimerdeki bu bozunmanın NaAlg'nin yanında, yapıdaki PVP gruplarının da ısı parçalanmaya uğradığını göstermektedir.



Şekil 3.1. NaAlg, PVP ve NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin karşılaştırmalı TGA termogramları

Başlangıç bozunma sıcaklıklarına göre ısıl kararlılığı en yüksek olan PVP (yaklaşık 400 °C) olarak bulunmuştur. NaAlg ile NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin başlangıç bozunma sıcaklıkları (yaklaşık 224 °C) ise aynı bulunmuştur.

Literatürde de benzer sonuçlar bulunmaktadır. Alla vd. (2007), gama radyasyonu ile poli(N-vinil-2-pirolidon)/poli(akrilik asit) hidrojelleri hazırlamışlardır. Bu hidrojellerin ısıl davranışlarını incelediklerinde, yapılar da ısıl dayanıklılığı daha yüksek olan PVP'nin miktarının artmasına bağlı olarak hidrojellerin ısıl dayanıklılığının da arttığını belirlemişlerdir [209].



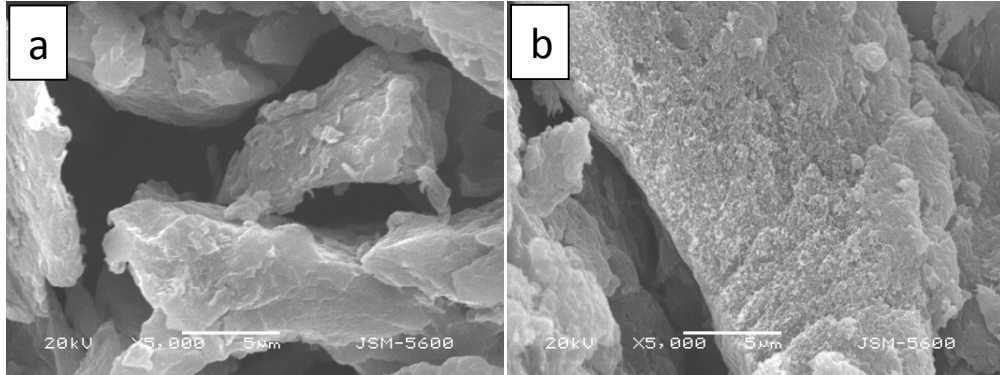
Şekil 3.2. NaAlg, PVP ve NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin karşılaştırmalı DTGA termogramları

NaAlg, PVP ve NaAlg-aşı-PVP (%19,88 aşı yüzdesine sahip kopolimer için) polimerleri için diferansiyel termogravimetrik analiz (DTGA) eğrileri incelendiğinde (Şekil 3.2.) NaAlg (238 °C) ve PVP için (425 °C) tek, NaAlg-aşı-PVP₃ (239 ve 402 °C) ise iki ayrı maksimum bozunma sıcaklığı gözlenmiştir. Aşı kopolimerde gözlenen maksimum bozunma sıcaklıkları, saf NaAlg ve saf PVP'ye çok yakın gözlenmiştir. Başka bir ifadeyle aşı kopolimerde 239 ve 402 °C'de

gözlenen bu maksimum bozunmalar sırasıyla NaAlg ve PVP'nin ısı parçalanmasına atfedilebilir. Benzer sonuçlar Çaykara vd. (2005) poli(etilen oksit) ve NaAlg ile yaptıkları çalışmalarda gözlenmiştir [210].

3.1.3. Aşı Kopolimerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüsü

Şekil 3.3.'te NaAlg (a) ve NaAlg-aşı-PVP kopolimerinin (%19,88 aşı yüzdesine sahip kopolimer için) (b) 5000 büyütme SEM fotoğrafları sunulmuştur. NaAlg'nin SEM görüntüsünde polimer üst üste istiflenmiş bir yapı göstermektedir. N-vinil-2-pirolidon ile aşı kopolimerizasyondan sonra NaAlg-aşı-PVP kopolimerinin yüzeyinin daha pürüzlü bir görünüme sahip olduğu ve yüzeydeki düzensizlikler açıkça görülmektedir. NaAlg'nin yüzey görüntüsündeki bu değişim bize polimer zincirlerinin içine PVP gruplarının girdiği bir kanıttır. Aşı kopolimerlerle ilgili benzer sonuçlar literatürde verilmiştir [211].

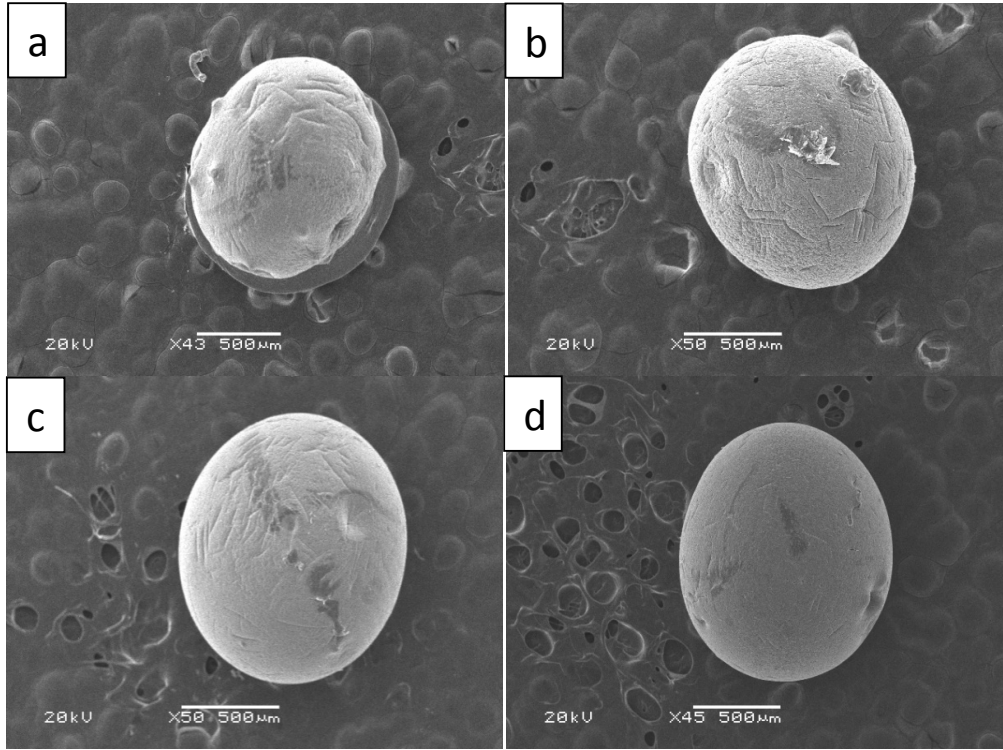


Şekil 3.3. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerlerinin SEM fotoğrafları

3.2. Elde Edilen Polimerik Kürelerin Karakterizasyonu

3.2.1. NaAlg ve Aşı Kopolimer Kürelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Şekil 3.4.'te %2,5 (w/v) CaCl_2 ile 30 dakika çapraz bağlanarak elde edilmiş NaAlg (a) ve NaAlg-aşı-PVP kopolimer kürelerinin (A_1 için b, A_2 için c, A_3 için d) SEM fotoğrafları sunulmuştur. Bütün polimerik kürelerin SEM fotoğrafları incelendiğinde yapılarının küresel şekilli oldukları görülmektedir.



Şekil 3.4. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerik kürelerinin SEM fotoğrafları

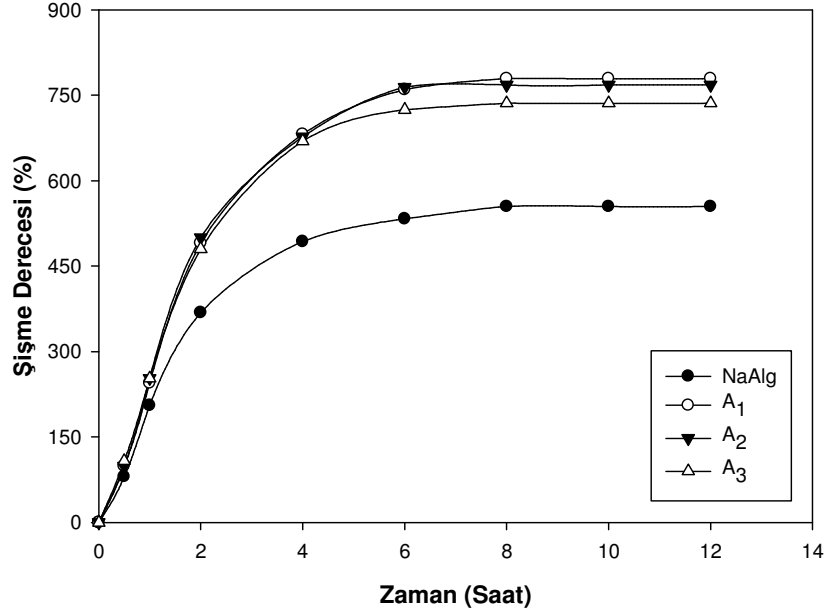
3.2.2. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP Polimerik Kürelerinin Şişme Derecesi

Çapraz bağlanmış boş kürelerin şişme dereceleri 30 °C su banyosunda gravimetrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla %2,0 (w/v) CaCl_2 ile 30 dakika çapraz

bağlanarak hazırlanmış NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerik kürelerinden 10 adet alınmış ve 25 mL *S. cerevisiae* mikroorganizmalarının besiyeri içine atılmışlardır. Belirli zamanlarda küreler bu ortamdan alınmış, üzerlerindeki sıvı uzaklaştırılarak tartılmışlardır. Şişme derecesi değerleri Eşitlik 3.1. ile belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.5.'te verilmiştir.

$$\text{Şişme derecesi (\%)} = \frac{(M_s - M_d)}{M_d} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1.})$$

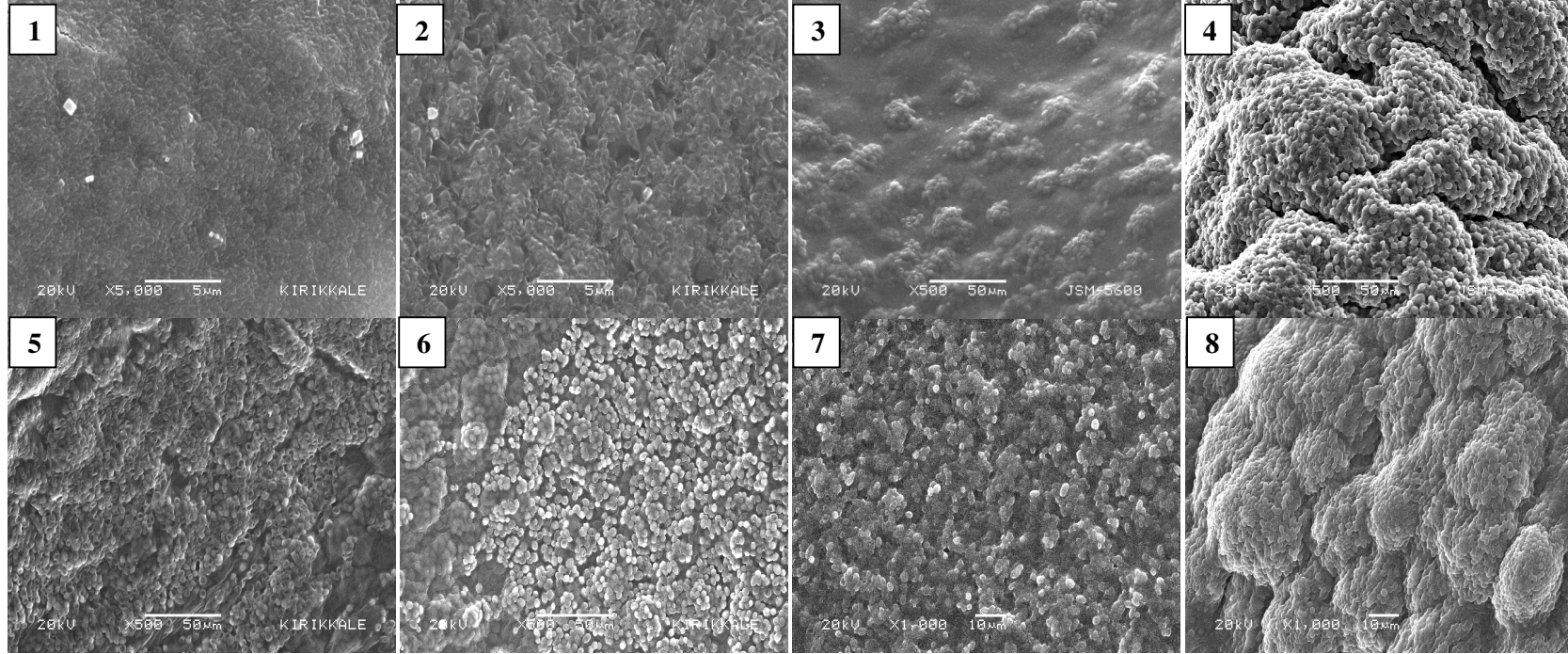
Burada M_s ve M_d sırasıyla şişmiş ve kuru kürelerin kütleleri olarak alınmıştır. Polimerik kürelerin şişme dereceleri 8 saat sonunda dengeye ulaşmış, NaAlg için %554,77, kopolimer kürelerinden A_1 için %779,14, A_2 için %768,20 ve A_3 için %735,95 olarak belirlenmiştir. NaAlg üzerine PVP aşılması ile şişme derecesi değerlerinin yaklaşık %554'ten %780 seviyelerine kadar arttığı bulunmuştur. NaAlg üzerine hidrofilik karakteri yüksek PVP gruplarının yan dallar şeklinde girmesi NaAlg'nin hidrofilik özelliğini de arttırmıştır. Bu sebeple kopolimer kürelerinin şişme derecelerinin NaAlg'ye oranla oldukça yüksek değerlere ulaştığı belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda benzer sonuçlara ulaşıldığı belirtilmiştir [172,181,212]. Bizim daha önce yaptığımız çalışmada NaAlg üzerine PVP aşılması ile 27 °C distile suda kürelerin denge şişme derecelerinin %142,02'den %227,18'e arttığı gözlenmiştir [172]. Katime vd. (2001) poli(N-izopropilakrilamit-ko-itakonik asit) hidrojelleri ile yaptıkları çalışmada itakonik asit yüzdesinin 5'ten 20'ye artırılması ile hidrojellerin denge su içeriklerinin %68,33'ten %97,64 seviyelerine arttığını bildirmişlerdir [212].



Şekil 3.5. NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP polimerik kürelerinin şişme derecelerinin zamanla değişimi

3.2.3. Boş ve Mikroorganizma İmmobilize Edilmiş NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP Kürelerinin SEM Görüntüleri

SEM görüntüleri hücre immobilizasyonunu aydınlatmak için gerçekleştirilmiştir. Boş ve mikroorganizma immobilize edilmiş NaAlg ve NaAlg-aşı-PVP kürelerinden alınan kesitlerin SEM görüntülerinden (*S. cerevisiae* immobilize NaAlg küreleri %2,0 (w/v) CaCl₂, *S. bayanus* ve *K. marxianus* immobilize NaAlg ve bütün NaAlg-aşı-PVP küreleri %2,5 (w/v) CaCl₂ ile 30 dakika olgunlaştırılarak elde edilmiştir.) elde edilen sonuçlar Şekil 3.6.'da gösterilmiştir. Boş ve immobilize kürelerin SEM görüntüleri karşılaştırıldığında çok sayıda maya hücrelerinin polimer duvarlarına tutunmuş olduğu gözlemlendi.

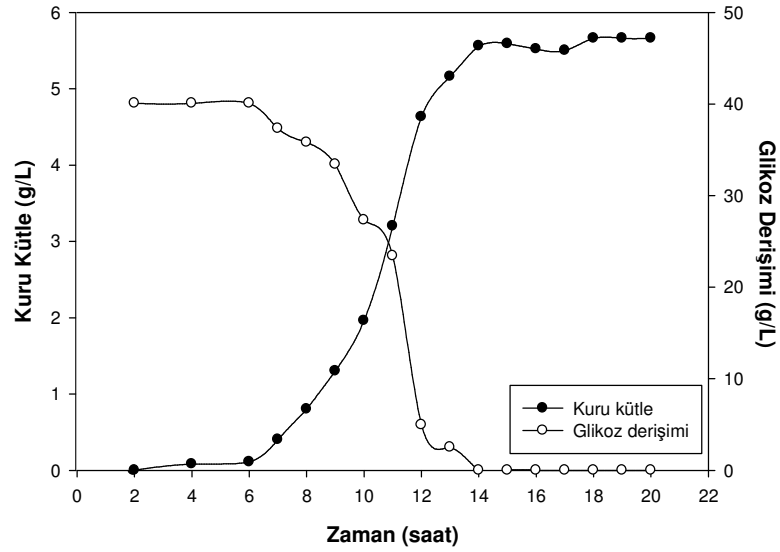


Şekil 3.6. Boş ve *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* immobilize edilmiş kürelerin kesit alanlarının SEM görüntüleri: (1 ve 2) boş NaAlg ve A₁ kürelerinin 5000 büyütmeli; (3 ve 4) *S. cerevisiae* immobilize edilmiş NaAlg ve A₁ kürelerinin 500 büyütmeli; (5 ve 6) *S. bayanus* immobilize edilmiş NaAlg ve A₁ kürelerinin 500 büyütmeli; (7 ve 8) *K. marxianus* immobilize edilmiş NaAlg ve A₃ kürelerinin 1000 büyütmeli SEM görüntüleridir

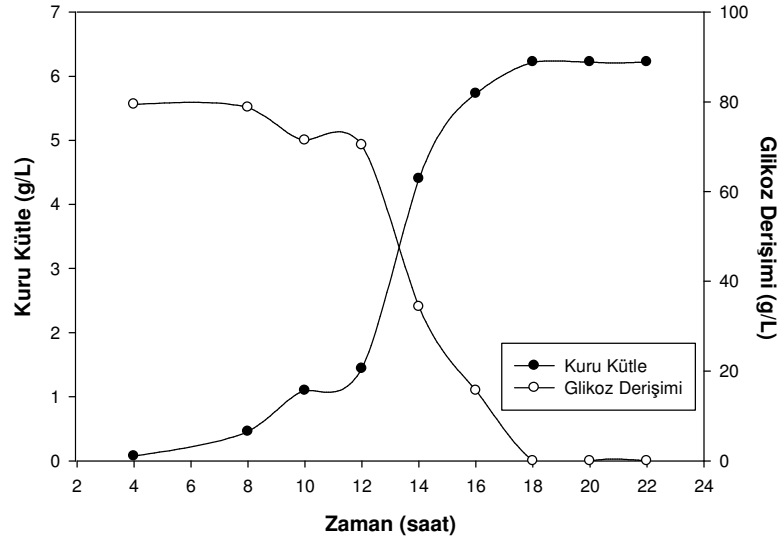
3.3. İmmobilizasyon ve Etanol Üretim Çalışmaları

3.3.1. Serbest Mayaların Kuru Hücre Kütlesi ve Glikoz Derişiminin Değişimi

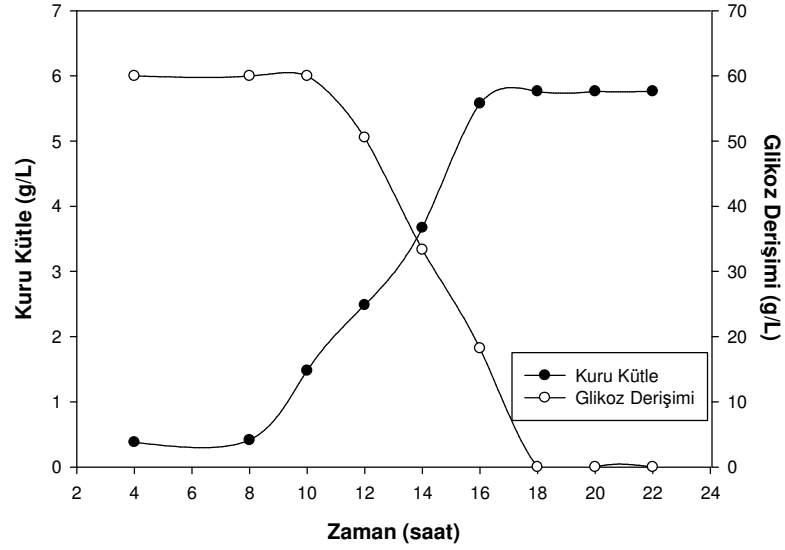
Serbest mikroorganizmaların kuru hücre kütlesini gram/litre olarak belirlemek amacıyla sıvı besiyerine mayalar aşılanarak 30 °C'de 120 rpm çalkalama hızında mikroorganizmalar büyütülmüştür. Çeşitli sürelerde üretim ortamından alınan 10 mL'lik örnekler santrifüjlenip, mikrodalga fırında kurutulduktan sonra tüpler içindeki kuru kütle tartılarak belirlenmiştir. Ayrıca alınan örnekler içindeki glikoz derişimleri de DNSA metodu ile belirlenerek zamana karşı kuru hücre kütlesinin ve glikoz derişiminin değişimi Şekil 3.7., 3.8. ve 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.7. *S. cerevisiae* için zamana karşı kuru hücre kütlesinin ve glikoz derişiminin değişimi



Şekil 3.8. *S. bayanus* için zamana karşı kuru hücre kütesinin ve glikoz derişiminin değişimi



Şekil 3.9. *K. marxianus* için zamana karşı kuru hücre kütesinin ve glikoz derişiminin değişimi

Şekiller incelendiğinde kuru hücre kütlesi ve glikoz derişimi değerlerinin birbiriyile son derece uyumlu çıktığı görölmektedir. Glikoz derişiminin zamanla azalmasıyla kuru kütle değerleri bununla orantılı olarak artmaktadır. İnkübasyon ortamındaki glikoz derişimi zamanla sıfıra yaklaştığında ortamda mayaların üremesini sağlayacak karbon kaynağı kalmadığı için kuru kütle değerleri de *S. cerevisiae* için yaklaşık 14 saat, *S. bayanus* ve *K. marxianus* için 18 saat sonunda sabit bir değere ulaşmıştır. Polimerik kürelere immobilize edilecek mikroorganizmalar maksimum üreme miktarına ulaşmış serbest mayalardan alınarak kullanılmıştır.

3.3.2. Polimerik Kürelere İmmobilize Mayalardan Etanol Fermantasyonu

İmmobilize mikroorganizmaların kuru hücre kütlesini belirlemek amacıyla büyüme ortamından alınan küreler sodyum sitrat içinde çözüldükten sonra örnekler santrifüjlenip, mikrodalga fırında kurutulduktan sonra tüpler içindeki kuru kütle tartılarak gram/litre olarak belirlenmiştir. Ayrıca mayalar kürelere immobilize edildikten sonra üretim sırasında mikroorganizmaların kürelerin içinde büyümesine bağlı olarak bir miktar maya kürelerden dışarı kaçmaktadır. Üretim süresince kürelere immobilize olan mayaların yüzdesi Eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon yüzdesi} = \frac{M_i}{M_i + M_s} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2.})$$

Burada M_i immobilize mayaların, M_s ise serbest mayaların kuru kütlesi olarak tanımlanmıştır.

NaAlg ve farklı aşı yüzdelerine sahip NaAlg-aşı-PVP kopolimerleri ile hazırlanan küreler için kuru hücre kütlesi ve immobilizasyon yüzdesi değerleri Çizelge 3.2., 3.3. ve 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. *S. cerevisiae* immobilize edilmiş NaAlg ve aşı kopolimer kürelerinin etanol üretim sonuçları

Polimer	Etanol Derişimi (g/L)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)	Etanol Verimi (g/g)	Küredeki Toplam Kuru Kütle (g/L)	İmmobilizasyon Yüzdesi (%)
NaAlg	53,65	3,95	0,537	4,05	85,76
A ₁	56,32	4,69	0,563	4,35	83,22
A ₂	54,01	4,50	0,540	4,38	87,97
A ₃	56,14	4,68	0,561	4,97	91,40

Çizelge 3.3. *S. bayanus* immobilize edilmiş NaAlg ve aşı kopolimer kürelerinin etanol üretim sonuçları

Polimer	Etanol Derişimi (g/L)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)	Etanol Verimi (g/g)	Küredeki Toplam Kuru Kütle (g/L)	İmmobilizasyon Yüzdesi (%)
NaAlg	46,36	4,21	0,464	5,19	90,79
A ₁	43,55	4,84	0,436	5,25	88,83
A ₂	44,96	5,00	0,450	5,48	90,98
A ₃	44,70	4,96	0,447	5,62	89,53

Çizelge 3.4. *K. marxianus* immobilize edilmiş NaAlg ve aşı kopolimer kürelerinin etanol üretim sonuçları

Polimer	Etanol Derişimi (g/L)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)	Etanol Verimi (g/g)	Küredeki Toplam Kuru Kütle (g/L)	İmmobilizasyon Yüzdesi (%)
NaAlg	35,25	1,82	0,353	3,38	74,77
A ₁	36,32	1,86	0,363	3,93	78,93
A ₂	37,43	2,14	0,374	3,96	78,90
A ₃	36,15	2,15	0,362	3,69	74,95

Sonuçlar incelendiğinde kürelerden dışarı kaçan maya miktarı immobilize mayalara oranla *S. cerevisiae* için yaklaşık %15, *S. bayanus* için %10 ve *K. marxianus* için %20 seviyelerinde kalmaktadır. İmmobilizasyon yüzdeleri incelendiğinde, her üç kopolimerle de elde edilen kürelerin immobilizasyon yüzdelerinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur.

Phisalaphong vd. (2007) kalsiyum klorür ile çapraz bağlayarak elde ettiği kalsiyum aljinat–su kabağı matrikse immobilize edilmiş *S. cerevisiae* mayasından etanol üretim çalışmalarında immobilizasyon yüzdeleri %87–93 aralığında değişmektedir [23]. Bizim sonuçlarımızın bu çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Etanol üretim deneylerinde, fermantasyon ortamlarına azot kaynağı ilave edilmemiştir. Fermantasyon ortamına ilave edilen azot, mikroorganizmaların canlılığını koruması ve çoğalmaları için gereklidir. Bu amaçla ön büyütme ortamına mikroorganizmaların çoğalmaları için azot kaynağı olarak maya özü ve amonyum

sülfat ilave edilmiştir. Fermantasyon ortamında mikroorganizmaların daha fazla çoğalmasını ve bu sırada glikoz tüketimini engellemek, dolayısıyla daha yüksek etanol verimi sağlamak amacıyla azot kaynağı ilave edilmemiştir [213,214]. Ayrıca, etanol fermantasyonu ilk olarak serbest mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirildi, fakat fermantasyon ortamı herhangi bir azot kaynağı içermediği için serbest mikroorganizmalardan etanol üretimi sağlanamadı. Bu sebeple, immobilize ve serbest mikroorganizmalardan etanol üretimiyle ilgili herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Etanol üretimi üzerine N-vinil-2-pirolidon'un ve aşılama yüzdesinin etkisinin araştırılması amacıyla, NaAlg ve çeşitli aşı yüzdelere sahip NaAlg-aşı-PVP küreleri *S. cerevisiae* için %2 (w/v) CaCl₂, diğer mayalar için %2,5 (w/v) CaCl₂ ile 30 dakika çapraz bağlanarak hazırlanmışlardır. Etanol derişimi, üretim hızı ve verimi Çizelge 3.2., 3.3. ve 3.4.'te verilmiştir. Etanol üretim hızı ve verimi Eşitlik 3.3. ve 3.4. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Etanol üretim hızı (Q}_P\text{)} = P/t \quad (\text{Eşitlik 3.3.})$$

$$\text{Etanol verimi (Y}_{P/S}\text{)} = P/S \quad (\text{Eşitlik 3.4.})$$

Burada; P, gram/litre (g/L) olarak üretilen etanol derişimi, t, saat olarak etanol üretimi için geçen süre ve S, gram (g) olarak harcanan glikoz miktarı için kullanılmıştır.

Maya immobilize kürelerin, 100 g/L glikozdan elde edilen en iyi etanol üretim sonuçları her bir maya için karşılaştırılmış ve Çizelge 3.5.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.5. PVP aşılmasına göre maya immobilize kürelerin etanol üretim sonuçlarının karşılaştırılması

	Polimer	Etanol Derişimi (g/L)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)	Etanol Verimi (g/g)
<i>S. cerevisiae</i>	A ₁	56,32	4,69	0,563
<i>S. bayanus</i>	A ₂	44,96	5,00	0,450
<i>K. marxianus</i>	A ₃	36,15	2,15	0,362

Çizelgeler incelendiğinde maya immobilize NaAlg ve her üç kopolimerle hazırlanan küreler için etanol derişimi ve etanol verimi değerleri çok farklılık göstermemektedirler. Buna karşılık, etanol üretim hızı değerlerinde, NaAlg üzerine PVP aşılama ile belirli bir artış gözlenmiştir. Maya immobilize kürelerden *S. cerevisiae* için 3,95'ten 4,69 g/Lsaat'e, *S. bayanus* için 4,21'den 5,00 g/Lsaat'e ve *K. marxianus* için 1,82'den 2,15 g/Lsaat'e kadar artmaktadır. Bununla birlikte etanol üretim hızı değerleri, *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* immobilize küreler için PVP aşılama yüzdesinden çok fazla etkilenmezken, *K. marxianus* immobilize küreler için %18'lik bir artış gözlenmiştir. Bundan sonraki tüm çalışmalarda, *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* immobilize kürelerle yapılan etanol üretim hızı sonuçlarının benzerliği nedeniyle A₁ kopolimeri, *K. marxianus* immobilize küreler için etanol üretim hızının artması sebebiyle A₃ kopolimeri kullanılmıştır.

Bütün sonuçlar incelendiğinde, polimerik hidrojel kürelerin şişme kapasitelerinin fermantasyon hızının artmasında önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Sodyum aljinat yapısına son derece hidrofilik PVP gruplarının eklenmesi hidrojel kürelerin denge şişme derecelerini arttırmıştır. Bunun bir sonucu

olarak, gözenekli kürelerden besinlerin ve ürünlerin difüzyonu kolaylaşmıştır. Besin maddelerinin kürelerin içine difüzyonunun kolaylaşması ile maya hücrelerinin çoğalması kolaylaşmış ve etanol üretim hızları artmıştır. Benzer sonuçlar literatürde bildirilmiştir [172,215]. Ayrıca diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde edilen etanol üretim miktarı, etanol verimi ve etanol üretim hızı sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüştür [1,216-218]. Laopaiboon vd. (2009) süpürge darısı sularından elde ettikleri toplam 280 g/L şeker içeren fermantasyon ortamından etanol üretim çalışmalarında üretim, etanol üretim hızı ve etanol verimi değerlerini sırasıyla 120,68 g/L, 2,01 g/Lsaat ve 0,51 g/g olarak belirlemişlerdir [216]. Kourkoutas vd. (2003) ayva parçalarına immobilize mayadan şarap üretimi çalışmalarında etanol üretim miktarını 84,5 g/L, etanol üretim hızını ise 3,016 g/Lsaat olarak bulmuşlardır [217]. Gupta vd. (2009) Prosopis juliflora bitkisinin artıklarını enzimatik olarak ve asitle hidrolize ederek elde ettikleri şekerden *Pichia stipitis* ve *S. cerevisiae* ile etanol üretmişlerdir. Etanol üretim miktarı 11,61-18,52 g/L aralığında, etanol verimi 0,28-0,49 aralığında, etanol üretim hızını 0,62-2,44 g/Lsaat aralığında bulmuşlardır [218].

3.3.3. Maya İmmobilize NaAlg-aşı-PVP Kürelerinin Karakterizasyonu

Aşı kopolimer-maya karışımı %1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ve 3,5 (w/v) CaCl₂ çözeltileri içinde 30 dakika çapraz bağlanarak maya immobilize edilmiş küreler elde edilmiştir. Büyüme ortamından çeşitli sürelerde 10 tane küre alınarak immobilize mayaların kuru hücre ağırlığı belirlenmiştir. Maya immobilize edilmiş kürelerin fiziksel özelliklerine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi Çizelge 3.6., 3.7. ve 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. *S. cerevisiae* immobilize edilmiş kürelerin fiziksel karakteristiğine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi

%CaCl₂(w/v)	1,5	2,0	2,5	3,5
Küre çapları (mm)	4,203±0,058	4,136±0,062	4,098±0,061	3,974±0,059
Başlangıçtaki fiziksel görünüm	Esnek	Esnek ve yeterince sert	Esnek ve yeterince sert	Çok sert
Ön büyütmeden sonra kararlılık	Kararlı değil	Yeterince kararlı	Çok kararlı	Çok kararlı
Ön büyütmeden sonra kürelerin içindeki hücre derişimi (g/L)	4,16±0,21	4,23±0,11	4,35±0,19	4,45±0,30
Ön büyütmeden sonra küre dışına çıkan hücrelerin derişimi (g/L)	1,26±0,07	0,72±0,02	0,46±0,03	0,36±0,03
İmmobilizasyon yüzdesi (%)	76,77	85,30	90,66	92,25
Etanol derişimi (g/L)	57,72	56,32	54,13	49,52
Etanol üretim hızı (g/Lsaat)	4,81	4,69	4,51	3,54
Etanol verimi (g/g)	0,577	0,563	0,541	0,500

Çizelge 3.7. *S. bayanus* immobilize edilmiş kürelerin fiziksel karakteristiğine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi

%CaCl₂ (w/v)	2,0	2,5	3,0	3,5
Küre çapları (mm)	3,820±0,044	3,731±0,062	3,768±0,041	3,663±0,047
Başlangıçtaki fiziksel görünüm	Esnek ve yeterince sert	Esnek ve yeterince sert	Esnek ve biraz sert	Çok sert
Ön büyütmeden sonra kararlılık	Yeterince kararlı	Çok kararlı	Çok kararlı	Çok kararlı
Ön büyütmeden sonra kürelerin içindeki hücre derişimi (g/L)	4,63±0,27	5,25±0,11	5,19±0,13	4,97±0,26
Ön büyütmeden sonra küre dışına çıkan hücrelerin derişimi (g/L)	0,71±0,04	0,66±0,18	0,62±0,08	0,48 ±0,05
İmmobilizasyon yüzdesi (%)	86,06	88,83	89,33	91,19
Etanol derişimi (g/L)	43,15	43,55	45,39	43,94
Etanol üretim hızı (g/Lsaat)	4,79	4,84	4,54	4,39
Etanol verimi (g/g)	0,432	0,436	0,454	0,440

Çizelge 3.8. *K. marxianus* immobilize edilmiş kürelerin fiziksel karakteristiğine ve etanol fermantasyon kapasitelerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi

% CaCl₂ (w/v)	2,0	2,5	3,0	3,5
Küre çapları (mm)	3,827±0,061	3,810±0,073	3,771±0,074	3,667±0,035
Başlangıçtaki fiziksel görünüm	Esnek	Esnek ve yeterince sert	Esnek ve biraz sert	Çok sert
Ön büyütmeden sonra kararlılık	Yeterince Kararlı	Çok kararlı	Çok kararlı	Çok kararlı
Ön büyütmeden sonra kürelerin içindeki hücre derişimi (g/L)	3,69±0,13	4,02±0,07	3,94±0,07	3,56±0,20
Ön büyütmeden sonra küre dışına çıkan hücrelerin derişimi (g/L)	1,23±0,17	0,95±0,01	0,74±0,01	0,67±0,14
İmmobilizasyon yüzdesi (%)	75,00	80,88	84,19	84,16
Etanol derişimi (g/L)	35,95	36,15	38,99	39,15
Etanol üretim hızı (g/Lsaat)	2,25	2,15	2,05	2,06
Etanol verimi (g/g)	0,360	0,362	0,390	0,392

Maya immobilize edilmiş kürelerin hazırlanması sırasında CaCl₂ derişimi, kürelerin fiziksel özellikleri, çapları, immobilizasyon yüzdeleri, etanol üretimleri ve hazırlanan kürelerdeki hücre derişimi gibi çeşitli parametreleri etkilemektedir. Kürelerin çapları elektronik kumpas kullanılarak (Mitutoyo IP.65, Japonya) 10 adet örneğin ölçüm sonucunun ortalaması alınarak verilmiştir. CaCl₂ derişimi, fermantasyon boyunca besinlerin kürelerin içine, ürünlerin ise kürelerin dışına kolayca taşınmalarını sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır.

Çizelgelerden görüldüğü üzere, kürelerin fermantasyon boyunca kararlılığını koruması, yüksek immobilizasyon yüzdesine sahip olması ve glikoz

moleküllerinin difüzyonunu kolaylaştırarak etanol üretim hızını arttırması, gibi özelliklerinden dolayı etanol fermantasyonu için en uygun CaCl_2 derişimi bütün maya immobilize küreler için %2,5 (w/v) olarak alınmıştır.

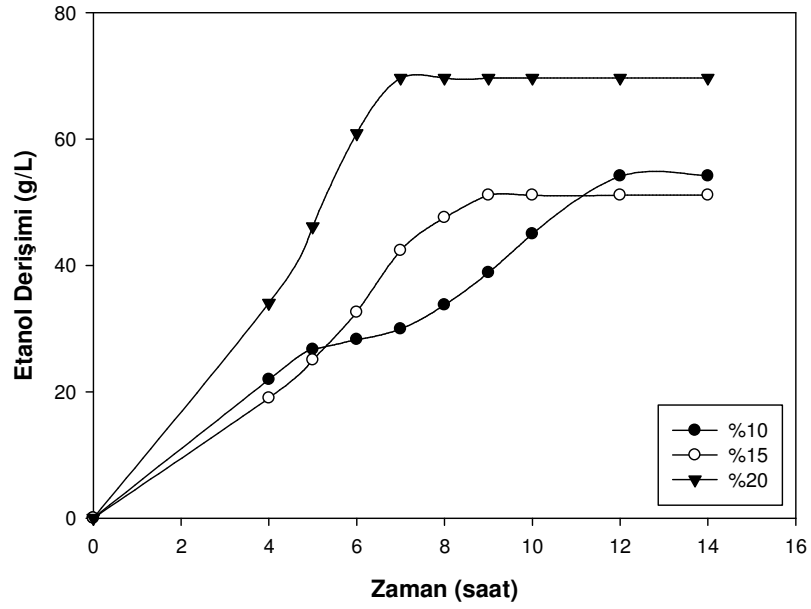
%1,5 ve 2,0 (w/v) CaCl_2 ile çapraz bağı küreler, kararlı olmadığı için fermantasyon sırasında belirli bir süre sonra yüzeylerinde çatlamlar meydana gelmiştir. Bunun sebebinin, kürelerin üç boyutlu ağ yapısındaki çapraz bağ yoğunluğunun az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

%3 ve 3,5 CaCl_2 (w/v) ile çapraz bağlanmış kürelere mayaların immobilizasyon yüzdesinin artmasına rağmen çok sert bir yapıya sahip oldukları gözlenmiştir. Kürelerin sertleşmesinin, yapılarındaki çapraz bağ yoğunluğunun artmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Etanol fermantasyonu sırasında kürelerdeki çapraz bağ yoğunluğunun artışı besinlerin kürelerin içine difüzyonunu zorlaştırmaktadır ve buna bağlı olarak etanol üretim hızları düşmektedir. Ayrıca %2,0 ve 2,5 (w/v) CaCl_2 ile çapraz bağlanan kürelerin iç yüzeyinde maya hücrelerinin çoğalmasını sağlayacak alanın %3,0 ve 3,5 (w/v) CaCl_2 ile hazırlanan kürelerden daha geniş olabileceği düşünülmüştür. Kürelerin geniş iç yüzeyi, besinlerin difüzyonunu kolaylaştırarak immobilize mayaların büyüebilmesi ve etanol fermantasyonu için uygun bir ortam sağlayabilir [208]. Bu sebeplerden dolayı bundan sonraki çalışmalarda çapraz bağlayıcı derişimi olarak %2,5 CaCl_2 (w/v) kullanılmıştır. Kalsiyum aljinatın immobilizasyon için polimerik destek olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuştur [4,18,215,219–221]. Adinarayana vd. (2004) kalsiyum aljinat kürelere immobilize edilmiş *Bacillus subtilis* ile proteaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Kalsiyum klorür derişimi 0,01 M ve 0,125 M seviyelerinde olduğunda proteaz üretimi yüksek olmasına rağmen, elde

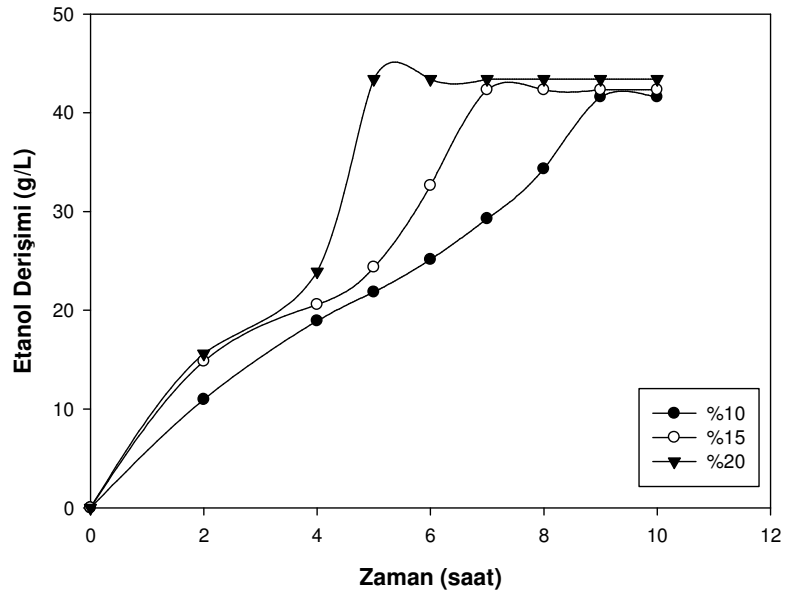
edilen hidrojeller küresel şekilli elde edilememiş. Buna karşılık kalsiyum klorür derişimi 0,375 M'a çıkarıldığında proteaz üretimi oldukça düşmüştür. Bu yüzden en uygun çapraz bağlayıcı derişimi 0,25 M olarak alınmıştır [219]. Konsoula vd. (2006) kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *Bacillus subtilis*'ten α -amilaz üretim çalışmalarında çapraz bağlayıcı CaCl₂ derişiminin %2'den %3,5'e (w/v) arttırılması ile kürelerden dışarı kaçan bakterilerin miktarının azaldığını, buna karşılık α -amilaz üretiminin arttığını belirlemişlerdir. CaCl₂ derişiminin %3,5'in üzerine çıkarılması ile substratın kürelerin içine difüzyonunun azalmasına bağlı olarak α -amilaz üretiminin azaldığını bulmuşlardır [220].

3.3.4. Fermantasyon Ortamındaki Küre Yüzdesinin Etanol Üretimine Etkisi

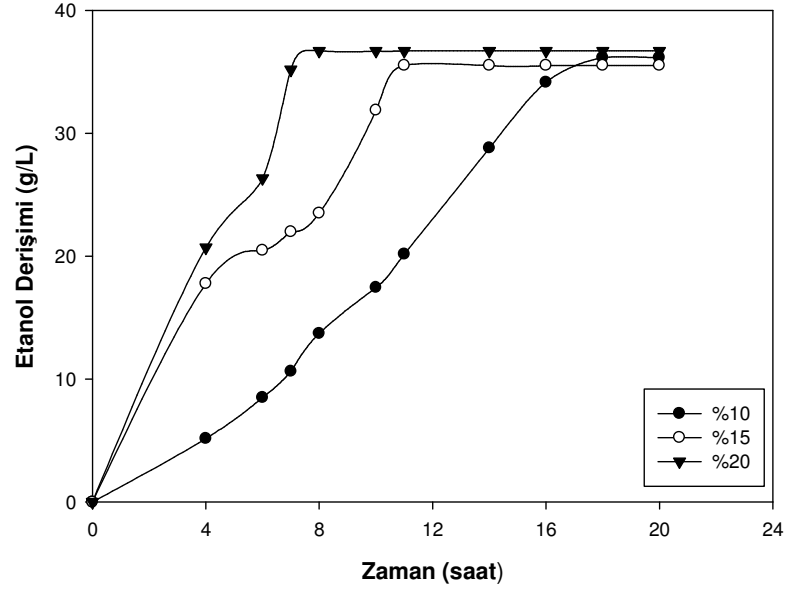
Fermantasyon ortamındaki immobilize mikroorganizmaların üretim hızı onların sıvı ortam içindeki toplam derişimlerine bağlıdır. Herhangi bir immobilize sistemin avantajı, fermantasyon ortamındaki kürelerin miktarının arttırılması sonucu mikroorganizmaların ortamdaki derişimlerinin artmasıdır. Bütün çalışmalar boyunca maya immobilize kürelerin (elde edildiği polimerin hacmine eşit alınmıştır) fermantasyon ortamının hacmine oranı %10 olarak kullanıldı. Bu oran değiştirilerek etanol üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Sonuçlar Şekil 3.10., 3.11. ve 3.12.'de sunuldu.



Şekil 3.10. Fermantasyon ortamına ilave edilen *S. cerevisiae* immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP₁ kürelerin yüzdesinin etanol üretimine etkisi



Şekil 3.11. Fermantasyon ortamına ilave edilen *S. bayanus* immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP₁ kürelerin yüzdesinin etanol üretimine etkisi



Şekil 3.12. Fermantasyon ortamına ilave edilen *K. marxianus* immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP₃ kürelerin yüzdesinin etanol üretimine etkisi

Fermantasyon ortamına ilave edilen maya immobilize kürelerin yüzdesi %20 olacak şekilde 100 g/L glikozdan elde edilen en iyi etanol üretim sonuçları her bir maya için karşılaştırılmış ve Çizelge 3.9.'da verilmiştir.

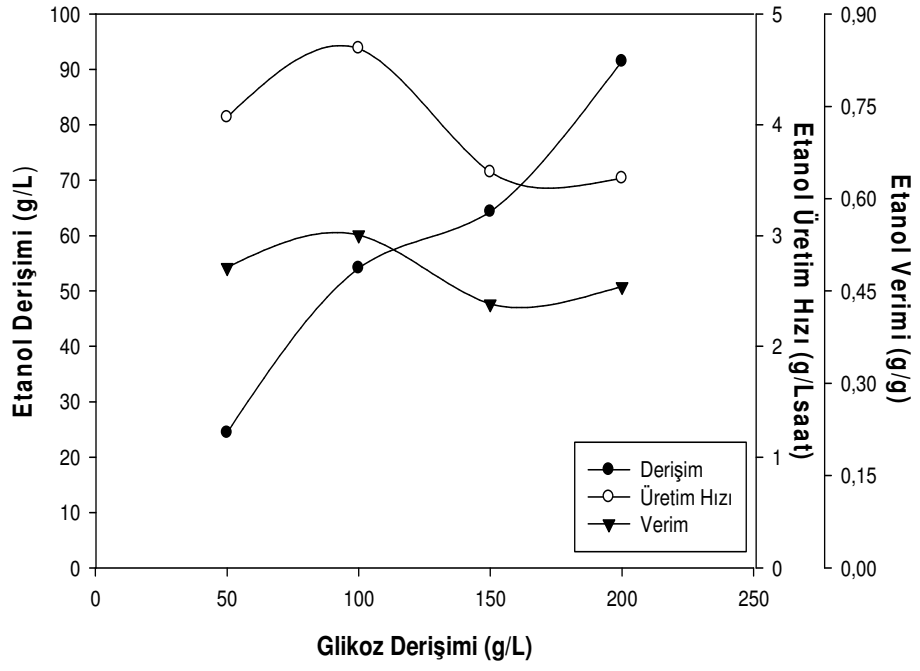
Çizelge 3.9. Maya immobilize kürelerin yüzdesine bağlı olarak etanol üretim sonuçlarının karşılaştırılması

	Polimer	Etanol Derişimi (g/L)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)	Etanol Verimi (g/g)
<i>S. cerevisiae</i>	A ₁	69,67	8,71	0,697
<i>S. bayanus</i>	A ₁	43,39	8,68	0,434
<i>K. marxianus</i>	A ₃	36,69	4,16	0,367

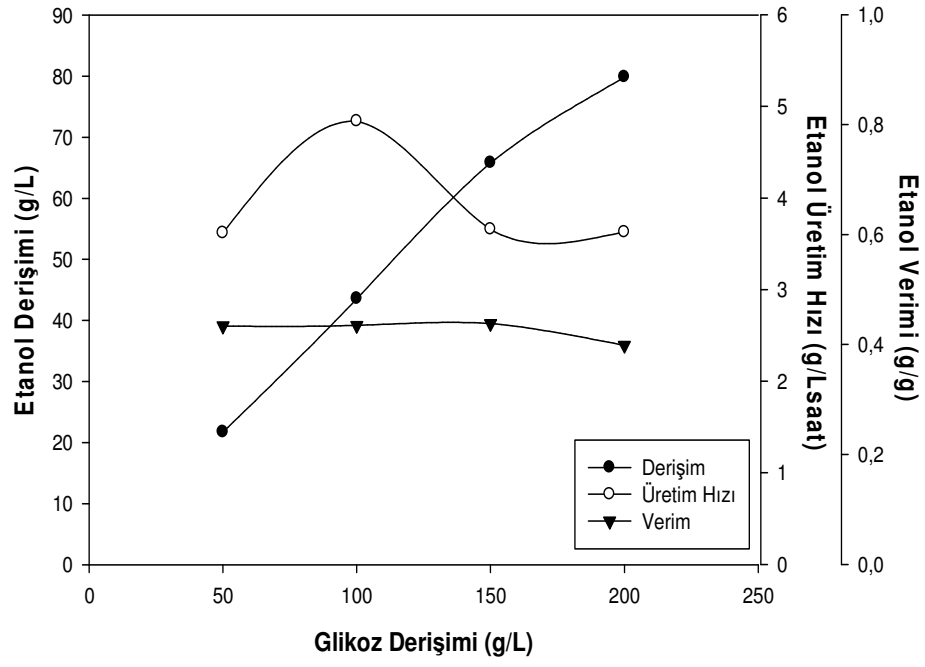
Etanol üretim hızı maya immobilize edilmiş kürelerin, fermantasyon ortamının hacmine oranının %10'dan %20'ye artırılması ile *S. cerevisiae* için 4,51'den 8,71 g/Lsaat'e, *S. bayanus* için 4,84'ten 8,68 g/Lsaat'e ve *K. marxianus* için 2,15'ten 4,16 g/Lsaat'e yükseldi. Etanol fermantasyon ortamına eklenen kürelerin sayısı artırıldığı zaman, dolaylı olarak ortamdaki maya miktarı da arttırılmaktadır. Fermantasyon ortamına ilave edilen küre yüzdesinin artmasıyla etanol üretim hızının artmasının sebebinin ortamdaki etanol üreten maya miktarının arttırılmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür ve benzer sonuçlar çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [18,220,221]. Liu vd. (2009) manyetik akışkan yataklı reaktörde manyetik kalsiyum aljinat kürelerinden etanol fermantasyonu çalışmalarında da benzer sonuçlar bulunmuştur ve reaktördeki küre yüzdesinin %26'dan %41'e yükseltilmesi ile etanol üretim hızı 10 g/Lsaat'ten 13 g/Lsaat'e çıktığı bulunmuştur [18].

3.3.5. Glikoz Derişiminin Etanol Üretimi Üzerine Etkisi

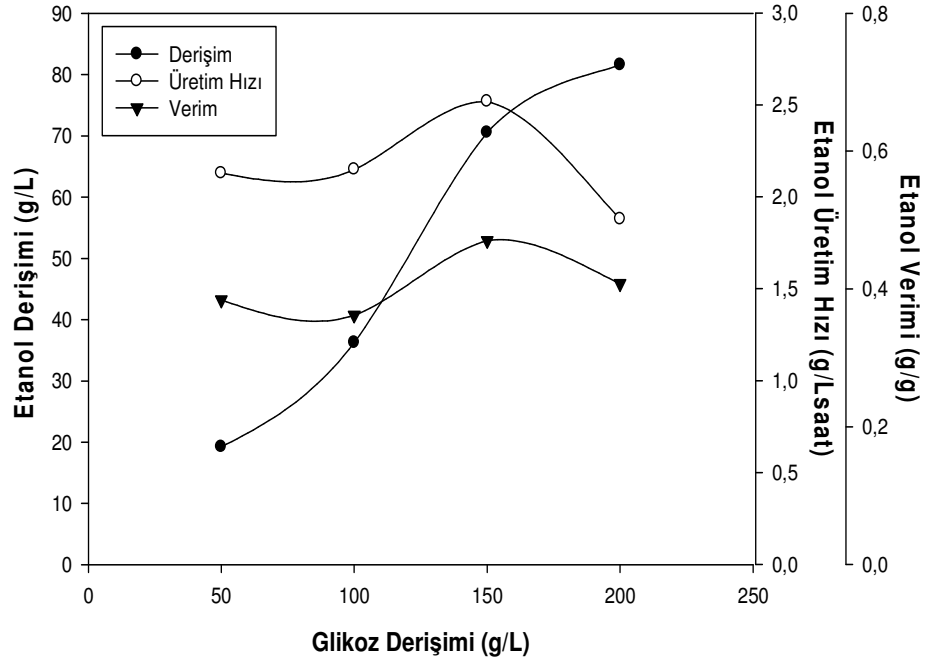
Mikroorganizmalar fermantasyon ortamında direkt substrat ile etkileştiklerinde yüksek substrat derişimi hücrelerin çoğalmasını inhibe etmekte, hatta ölümlerine bile sebep olabilmektedir. Bu sebeple etanol fermantasyonu için substrat olarak kullanılacak karbon kaynaklarının derişimi son derece önemlidir ve etanol üretimini çok fazla etkilemektedir. NaAlg-aşı-PVP kürelerine immobilize edilmiş mayaların etanol fermantasyonuna glikoz miktarının etkisi derişim 50–200 g/L aralığında değiştirilerek incelendi ve sonuçlar Şekil 3.13., 3.14. ve 3.15.'te gösterildi.



Şekil 3.13. *S. cerevisiae* immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP₁ kürelerinin etanol fermantasyonuna glikoz derişiminin etkisi



Şekil 3.14. *S. bayanus* immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP₁ kürelerinin etanol fermantasyonuna glikoz derişiminin etkisi



Şekil 3.15. *K. marxianus* immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP₃ kürelerinin etanol fermantasyonuna glikoz derişiminin etkisi

Maya immobilize küreler ile fermantasyon ortamındaki glikoz derişimi değiştirilerek elde edilen en iyi etanol üretim sonuçları her bir maya için karşılaştırılmış ve Çizelge 3.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.10. Glikoz derişimine bağlı olarak etanol üretim sonuçlarının karşılaştırılması

	Polimer	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)	Etanol Verimi (g/g)
<i>S. cerevisiae</i>	A ₁	100	4,51	0,541
<i>S. bayanus</i>	A ₁	100	4,84	0,435
<i>K. marxianus</i>	A ₃	150	2,52	0,470

Fermantasyon sırasında glikoz derişiminin arttırılması ile maya immobilize edilmiş kürelerden elde edilen etanol derişimi de orantılı olarak artmaktadır.

S. cerevisiae immobilize küreler için etanol verimi, glikoz derişimi 50'den 100 g/L'ye yükseltildiği zaman 0,4882 g/g'dan 0,5412 g/g'a artmaktadır, derişim 200 g/L'ye çıkarıldığında ise 0,4572 g/g'a düşmektedir. Etanol üretim hızı ise glikoz derişimi 50'den 100 g/L'ye yükseltildiği zaman hızla artmakta (4,07'den 4,69 g/Lsaat'e), 100 g/L'den 200 g/L'ye yükseltildiği zaman ise hızla azalmaktadır (4,69'den 3,52 g/Lsaat'e).

S. bayanus immobilize küreler için etanol verimi, glikoz derişimi 50'den 150 g/L'ye yükseltildiği zaman değişmeyerek yaklaşık 0,435 g/g seviyelerinde kalmaktadır, derişim 200 g/L'ye çıkarıldığında ise 0,400 g/g'a düşmektedir. Etanol üretim hızı ise glikoz derişimi 50'den 100 g/L'ye yükseltildiği zaman hızla artmakta (3,62'den 4,62 g/Lsaat'e), 100 g/L'den 200 g/L'ye yükseltildiği zaman ise hızla azalmaktadır (4,62'den 3,63 g/Lsaat'e).

K. marxianus immobilize küreler için, etanol verimi, glikoz derişimi 50'den 150 g/L'ye yükseltildiği zaman 0,3842 g/g'dan 0,4702 g/g'a artmaktadır, derişim 200

g/L'ye çıkarıldığında ise 0,4079 g/g'a düşmektedir. Etanol üretim hızı ise glikoz derişimi 50'den 150 g/L'ye yükseltildiği zaman hızla artmakta (2,13'den 2,52 g/Lsaat'e), 150 g/L'den 200 g/L'ye yükseltildiği zaman ise hızla azalmaktadır (2,52'den 1,88 g/Lsaat'e).

Etanol üretim hızı ve verimindeki azalmanın, yüksek glikoz ve etanol derişiminin maya hücrelerinin inhibisyonuna sebep olmasından kaynaklanabileceği düşünöldü. Benzer sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [18,216,222-225]. Göksungur vd. (2001) dolgulu yatak biyoreaktörde kalsiyum aljinata immobilize edilmiş maya hücreleri ile melastan etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında şeker yüzdesinin 10,90'dan 22,70'e arttırılması ile etanol üretim hızı 10 g/Lsaat'ten yaklaşık 5 g/Lsaat'e, etanol verimi ise %85'ten %20'lere kadar düşmektedir [223].

3.3.6. Maya İmmobilize Kürelerin Kararlılığına Tekrarlanan Fermantasyonun Etkisi

Bu çalışmada maya immobilize NaAlg-aşı-PVP küreleri %2,5 (w/v) CaCl₂ ile 30 dakika çapraz bağlanarak hazırlanmıştır. *S. cerevisiae* immobilize edilmiş kürelerin, fermantasyon ortamında hacimce oranı %10, *S. bayanus* ve *K. marxianus* immobilize edilmiş kürelerin %20 olacak şekilde 30 °C'de 120 rpm çalkalama hızında su banyosunda etanol üretmeleri sağlandı. Fermantasyon ortamında, maya immobilize edilmiş küreler *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* için sırasıyla 24, 5 ve 8 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Daha sonra küreler süzölmüş ve yeni fermantasyon ortamına ilave edilmişlerdir. Alınan örneklerden üretilen etanol derişimleri belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.11., 3.12. ve 3.13.'te verilmiştir.

Çizelge 3.11. Tekrarlanan fermantasyon boyunca *S. cerevisiae* immobilize edilmiş

NaAlg-aşı-PVP₁ kürelerin etanol üretim sonuçları

Kürelerin tekrar kullanım sayısı	Etanol derişimi (g/L)
1	54,13
2	50,59
3	48,00
4	44,75
5	40,40
6	40,20

Çizelge 3.12. Tekrarlanan fermantasyon boyunca *S. bayanus* immobilize edilmiş

NaAlg-aşı-PVP₁ kürelerin etanol üretim sonuçları

Kürelerin tekrar kullanım sayısı	Etanol derişimi (g/L)
1	43,55
2	42,55
3	43,37
4	41,57
5	41,43
6	40,07

Çizelge 3.13. Tekrarlanan fermantasyon boyunca *K. marxianus* immobilize edilmiş

NaAlg-aşı-PVP₃ kürelerin etanol üretim sonuçları

Kürelerin tekrar kullanım sayısı	Etanol derişimi (g/L)
1	36,15
2	38,26
3	37,45
4	34,93
5	35,09
6	35,15

Tekrarlanan fermantasyon deneyleri sonunda, *S. cerevisiae* immobilize kürelerin aktivitelerinin bir kısmını kaybettiği, buna karşılık diğer maya immobilize kürelerin aktivitelerinde hiçbir kayıp meydana gelmeden art arda kullanılabilceği bulunmuştur. Fakat tekrar kullanım sayısının artması ile etanol miktarında bir miktar azalma olduğunu görülmektedir. Etanol üretiminin, altı kere tekrarlanan fermantasyon sonunda *S. cerevisiae* kürelerinde 54,13'ten 40,20'ye, *S. bayanus* kürelerinde 43,55'ten 40,07 g/L'ye, *K. marxianus* kürelerinde 36,15'ten 35,15 g/L'ye azaldığı gözlemlendi. *S. cerevisiae* immobilize kürelerde etanol derişiminin büyük miktarda azalmasının sebebinin, diğer kürelerle karşılaştırıldığında fermantasyon ortamında uzun süre kalarak etanol ile daha fazla etkileşmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Mikroorganizmaların ürettiği etanolün hücrelerin inhibisyonuna sebep olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [6]. Ayrıca bütün mayalardan kullanım sayısının artması ile etanol üretiminin azalmasının, bazı immobilize maya hücrelerinin ürün inhibisyonu sebebiyle canlılığını kaybetmesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Bulunan sonuçların daha önceki çalışmalarda uyum içinde olduğu bulunmuştur [16,134,136,226]. Öztop vd. (2003) akril amit-sodyum akrilat hidrojellerine immobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae*'dan etanol üretim çalışmalarında 5 kez tekrarlanan fermantasyon ile üretim 21,5 g/L'den 19 g/L seviyelerine azalmıştır [16]. Adinarayana vd. (2005) kalsiyum aljinat kürelere immobilize edilmiş *Bacillus subtilis* ile proteaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Proteaz üretiminin 480 Unit/mL'den 9 kez tekrarlanan fermantasyondan sonra 180 Unit/mL'ye kadar azaldığı bulunmuştur [135].

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, sodyum aljinat üzerine radikalik bir başlatıcı olan azobisizobütironitril başlatıcısı kullanarak N-vinil-2-pirolidon monomeri aşılınmış ve radikalik polimerizasyonla elde edilen sodyum aljinat-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) etanol fermantasyonun da kullanılmak üzere maya immobilizasyon desteği olarak kullanılmıştır. Mayaların polimerik desteğe immobilizasyonu sıvıda olgunlaştırma yöntemi kullanılarak, kalsiyum klorür içinde çapraz bağlanması ile gerçekleştirilmiştir. Maya immobilize küreler fermantasyon ortamına ilave edilerek etanol üretmeleri sağlanmıştır ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. NaAlg-aşı-PVP matriksin maya immobilizasyonu için verimli bir şekilde kullanılabilceği bulunmuştur.
2. Elde edilen matriksin geleneksel sodyum aljinat matriks ile karşılaştırıldığında bütün maya immobilize edilmiş küreler için etanol üretim hızını belirgin bir şekilde arttırdığı ve daha verimli kullanılabilceği tespit edilmiştir.
3. SEM fotoğrafları mayaların polimerik desteklere immobilize olduklarını ve çok sayıda maya hücrelerinin matriks duvarlarına eklendiğini göstermiştir.
4. Bütün mayaların immobilizasyonun da kullanılan, en uygun çapraz bağlayıcı CaCl_2 derişiminin %2,5 (w/v) olduğu bulunmuştur.
5. Azot içermeyen fermantasyon ortamında serbest mikroorganizmalar ile etanol üretimi gerçekleştirilemezken, immobilize mayalardan yüksek verimle etanol elde edilebilmiştir.

6. Fermantasyon ortamındaki glikoz derişiminin *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* için 100 g/L'ye, *K. marxianus* için 150 g/L'ye artırılması ile immobilize kürelerden etanol üretim verimliliğinin ve hızının arttığı, glikoz derişiminin daha fazla artırılması ile azaldığı bulunmuştur.
7. Fermantasyon ortamındaki immobilize maya kürelerinin yüzdesinin artırılması ile biyoetanol üretim hızının arttığı bulunmuştur.
8. Maya immobilize edilmiş NaAlg-aşı-PVP kürelerin aktivitelerini kaybetmeden 6 kere tekrarlanan fermantasyonda etanol verimlerinde ciddi bir değişim olmadan kullanılabilceğı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, maya immobilizasyonu için önerilen destek materyalin, kolay uygulanabilmesi, düşük maliyetle ve kısa sürede üretilebilmesi, mikroorganizmaların ayrılması için filtrasyon gibi ekstra işlemler gerektirmemesi gibi üstün özelliklerinden dolayı, çeşitli mayaların immobilizasyonu ve biyoetanol üretimi için endüstriyel uygulamalarda büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Maya immobilize aşı kopolimer kürelerin, endüstriyel ölçekte bir üretim için düşünüldüğünde, etanol üretim hızını belirgin bir şekilde arttırmasının, tekrarlanan fermantasyona uygulanabilmesinin, serbest mayaların ayrılması için gereken filtrasyondan kaynaklanan ekstra masrafları azaltmasının büyük ekonomik avantajlar sağlayabileceğı öngörülebilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Liu, R., Li, J., Shen, F., Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation. *Renew. Energ.*, 33, 1130–1135, 2008.
- [2] Staniszewski, M., Kujawski, W., Lewandowska, M., Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions. *J. Food Eng.*, 82, 618–625, 2007.
- [3] Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M., Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.*, 26, 89–105, 2008.
- [4] Najafpour, G., Younesi, H., Ismail, K.S.K., Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.*, 92, 251–260, 2004.
- [5] Gupta, R., Sharma, K.K., Kuhad, R.C., Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis-NCIM 3498*. *Bioresource Technol.*, 100, 1214–1220, 2009.
- [6] Nagodawithana, T.W., Steinkraus, K.H., Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. *Appl. Environ. Microb.*, 31, 158–162, 1976.
- [7] Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A., Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.*, 21, 377–397, 2004.

- [8] Isono, Y., Araya, G.-I., Hoshino, A., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol fermentation on γ -alumina particles using a spray-dryer. *Process Biochem.*, 30, 743–746, 1995.
- [9] Mallouchos, A., Reppa, P., Aggelis, G., Koutinas, A.A., Kanellaki, M., Komaitis, M., Grape skins as a natural support for yeast immobilization. *Biotechnol. Lett.*, 24, 1331–1335, 2002.
- [10] Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., Soupioni, M., Banat, I.M., Marchant, R., Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technol.*, 98, 860–865, 2007.
- [11] Yu, J., Zhang, X., Tan, T., An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *J. Biotechnol.*, 129, 415–420, 2007.
- [12] Bakoyianis, V., Kanellaki, M., Kalliafas, A., Koutinas, A.A., Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. *J. Agr. Food Chem.*, 40, 1293–1296, 1992.
- [13] Loukatos, P., Kiaris, M., Ligas, I., Bourgos, G., Kanellaki, M., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Continuous wine making by γ -alumina-supported biocatalyst quality of the wine and distillates. *Appl. Biochem. Biotech.*, 89, 1–13, 2000.
- [14] Spagna, G., Barbagallo, R.N., Casarini, D., Pifferi, P.G., A novel chitosan derivative to immobilize α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage Technologies. *Enzyme Microb. Tech.*, 28, 427–438, 2001.

- [15] Bezbradica, D., Obradovic, B., Leskosek-Cukalovic, I., Bugarski, B., Nedovic, V., Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. *Process Biochem.*, 42, 1348–1351, 2007.
- [16] Öztop, H.N., Öztop, A.Y., Karadağ, E., Işıkver, Y., Saraydın, D., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide–sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. *Enzyme Microb. Tech.*, 32, 114–119, 2003.
- [17] Jamai, L., Ettayebi, K., El Yamani, J., Ettayebi, M., Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. *Bioresource Technol.*, 98, 2765–2770, 2007.
- [18] Liu, C.Z., Wang, F., Ou-Yang, F., Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresource Technol.*, 100, 878–882, 2009.
- [19] Kannan, T.R., Sangiliyandi, G., Gunasekaran, P., Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. *Enzyme Microb. Tech.*, 22, 179-184, 1998.
- [20] Telli-Okur, M., Eken-Saraçoğlu, N., Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol.*, 99, 2162–2169, 2008.
- [21] Guo, G.L., Chen, W.H., Chen, W.H., Men, L.C., Hwang, W.S., Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresource Technol.*, 99, 6046–6053, 2008.

- [22] Ruanglek, V., Maneewatthana, D., Tripetchkul, S., Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.*, 41, 1432–1437, 2006.
- [23] Phisalaphong, M., Budiraharjo, R., Bangrak, P., Mongkolkajit, J., Limtong, S., Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 214–217, 2007.
- [24] Şanlı, O., Ay, N., Işıklan, N., Release characteristics of diclofenac sodium from poly(vinyl alcohol)/sodium alginate and poly(vinyl alcohol)-grafted-poly(acrylamide)/sodium alginate blend beads. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65, 204–214, 2007.
- [25] Srivastava, A., Behari, K., Synthesis and characterization of graft copolymer (guar gum-g-N-vinyl-2-pyrrolidone) and investigation of metal ion sorption and swelling behavior. *J. Appl. Polym. Sci.*, 100, 2480–2489, 2006.
- [26] Karadağ, E., Üzüm, Ö.B., Saraydın, D., Güven, O., Dynamic swelling behavior of γ -radiation induced polyelectrolyte poly(AAm-co-CA) hydrogels in urea solutions. *Int. J. Pharm.*, 301, 102–111, 2005.
- [27] Morris, N., *Fossil Fuels*. Smart Apple Media, Çin, 2007.
- [28] Ehrfeld, C.F., *Renewable Energy Sources*. Chapter 4, Kluwer Law International, İngiltere, 2009.
- [29] Walker, N., *Biomass: Fueling Change*. Crabtree Publishing Company, Kanada, 2007.
- [30] Balat, M., Balat, H., Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl. Energ.*, 86, 2273–2282, 2009.

- [31] Mohan, S.V., Babu, V.L., Sarma, P.N., Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour. Technol.*, 99, 59–67, 2008.
- [32] Goldemberg, J., Environmental and ecological dimensions of biofuels. In: *Proceedings of the conference on the ecological dimensions of biofuels*, Mart 2008, Washington, Amerika Birleşik Devletleri, 2008.
- [33] Hansen, G., Marx, T., Pritchett, T., Driving technology in the motor vehicle industry. In: *Proceedings of the IPCC expert meeting on industrial technology development, transfer and diffusion*, 21–23 Eylül 2004, Tokyo, 2004.
- [34] British Petroleum Company. *BP Statistical Review of World Energy 2008*. London: BP plc; 2008.
- <http://www.ief.org/whatsnew/Pages/BPStatisticalReview.aspx> (Erişim tarihi: 13.08.2011)
- [35] Sobrino, F.H., Monroy, C.R., Critical analysis of the European Union directive which regulates the use of biofuels: An approach to the Spanish case. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 13, 2675–2681, 2009.
- [36] Lapuerta, M., Armas, O., Fernandez, J.R., Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. *Prog. Energ. Combust.*, 34, 198–223, 2008
- [37] Basha, S.A., Gopal, K.R., Jebaraj, S., A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renew. Sust. Energ.*, 13, 1628–1634, 2009.
- [38] Gaffney, J.S., Marley, N.A., The impacts of combustion emissions on air quality and climate - From coal to biofuels and beyond. *Atmos. Environ.*, 43, 23–36, 2009.

- [39] Balat, M., An overview of biofuels and policies in the European Union countries. *Energ. Source. Part B*, 2, 167–181, 2007.
- [40] Cadenas, A., Cabezudo, S., Biofuels as sustainable technologies: perspectives for less developed countries. *Technol. Forecast Soc.*, 58, 83–103, 1998.
- [41] Demirbaş, A., The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. *Energ. Source, Part B*, 3, 177–185, 2008.
- [42] Demirbaş, A., Biomethanol production from organic waste materials. *Energ. Source. Part A*, 30, 565–572, 2008.
- [43] Hammond, G.M., Kallu, S., McManus, M.C., Development of biofuels for the UK automotive market. *Appl. Energ.* 86, 506–515, 2009.
- [44] Mills, G.A., Ecklund, E.E., Alcohols as Components of Transportation Fuels. *Annu. Rev. Energy*, 12, 47–80, 1987.
- [45] Berg, C., World Fuel Ethanol Analysis and Outlook, , F.O. Licht, April 2004.
<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html> (Erişim tarihi: 24.08.2011).
- [46] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., Nutrition and metabolism. Brock biology of microbiology, 9th edition. Prentice Hall, New Jersey, 2000.
- [47] Kumar, S., Singh, N., Prasad, R., Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 1830–1844, 2010.
- [48] Malhotra, R.K., Das, L.M., Biofuels as blending components for motor gasoline and diesel fuels. *J. Sci. Ind. Res.*, 62, 90–96, 2003.
- [49] Keller, J.L., Alcohols as motor fuel?. *Hydrocarb. Process.*, 58, 127–138, 1979.
- [50] Hobson, G.D., Modern petroleum technology (part-II). 5th ed., John Wiley & Sons, Chichester, 1984.

- [51] Pleeth, S.J.W., Alcohol-a fuel for internal combustion engines. Chapman & Hall Ltd., Londra, 1949.
- [52] Kampen, W.H., Engines run well on alcohols. *Hydrocarb. Process.*, 59, 72–75, 1980.
- [53] Lu, B.C.Y., Estimating salt effect in vapour–liquid equilibria. *Ind. Eng. Chem.*, 52, 871–872, 1960.
- [54] Demirbaş, A., *The Biofuels Handbook. Production of Fuels from Crops.* 201–227. Ed: by J.G.Speight, Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, İngiltere, 2011.
- [55] Kito-Borsa, T., Pacas, D.A., Selim, S., Cowley, S.W., Properties of an ethanol–diethyl ether-water fuel mixture for cold-start assistance of an ethanol-fueled vehicle. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 3366–3374, 1998.
- [56] Balat, M., Global bio-fuel processing and production trends. *Energ. Explor. Exploit.*, 25, 195–218, 2007.
- [57] Malça, J., Freire, F., Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bio-ethyl tertiary butyl ether (bioETBE): assessing the implications of allocation. *Energy*, 31, 3362–3380, 2006.
- [58] Wang, M., Saricks, C., Santini, D., Effects of fuel ethanol use on fuel-cycle energy and greenhouse gas emissions. Argonne (IL): Argonne National Laboratory, 1999.
- [59] Bowman, C. T., Control of combustion-generated nitrogen oxide emissions: Technology driven by regulation. *Symposium (International) on Combustion*, 24, 859–878, 1992.

- [60] Anonim, The Benefits of Biofuels: Environment and Public Health, United Nations Foundation,
http://www.energyfuturecoalition.org/biofuels/benefits_env_public_health.htm
(Erişim tarihi: 12.06.2011)
- [61] California Air Resources Board, Definition of A Low-Emission Motor Vehicle in Compliance with The Mandates of Health and Safety Code Section 39037.05 (Assembly Bill 234, Leonard, 1987). Report by Mobile Sources Control Division, El Monte, California, 1989.
- [62] Bergin, M.S., Russell, A.G., Croes, B.E., Seinfeld, J.H., Ozone Control and Voc Reactivity. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation. 3355–3383. Ed: by R.A. Meyers, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998.
- [63] Lowi, A., Carter, W.P.L., A Method for Evaluating the Atmospheric Ozone Impact of Actual Vehicle emissions. 26 Şubat-2 Mart, SAE International Congress and Exposition, Detroit, Michigan, 1990.
- [64] MacLean, H.L., Lave, L.B., Evaluating automobile fuel/propulsion system technologies. Prog. Energy Combust. Sci.,29, 1–69, 2003.
- [65] World Ethanol and Biofuels Report, Sayfa 63, F.O. Licht, Vol. 6, no. 4, 2007,
<http://www.agra-net.com/portal2/home.jsp?template=showissue&pubid=ag072&seqnum=604> (Erişim tarihi: 21.08.2011)
- [66] World Ethanol and Biofuels Report, Sayfa 3, F.O. Licht, Vol. 7, no. 18, 2009,
<http://www.agra-net.com/portal2/home.jsp?template=showissue&pubid=ag072&seqnum=718> (Erişim tarihi: 21.08.2011)

- [67] World Ethanol and Biofuels Report, Sayfa 328, F.O. Licht, Vol. 8, no. 16, 2010,
<http://www.agra-net.com/portal2/home.jsp?template=showissue&pubid=ag072&seqnum=816> (Erişim tarihi: 21.08.2011)
- [68] 2009 Global Ethanol Production (Million Gallons)". F.O. Licht, cited in Renewable Fuels Association, Ethanol Industry Overlook 2010, pp. 2-22. 2010. Retrieved 12 February 2011,
http://www.ethanolrfa.org/page/-/objects/pdf/outlook/RFAoutlook2010_fin.,pdf?nocdn=1 (Erişim tarihi: 11.05.2011)
- [69] Taşdan, K.,Biyoyakıtların t¼rkiye tarım ¼r¼nleri piyasalarına olası etkileri biyobenzin- etanol, Tarım ve m¼hendislik, 75, 27-29, 2005.
- [70] T¼rkiyeden: Yakıt Biyoetanol¼n¼n T¼rkiye İçin Stratejik ¼nemi,
<http://www.gidasanayii.com/modules.php?name=News&file=article&sid=1242>
1 (Erişim tarihi: 25.09.2011)
- [71] Anonim, Tarkim hakkında,
<http://www.tarkim.com.tr/biyoetanol/index.php> (Erişim tarihi: 29.06.2011)
- [72] Anonim, Tezkim hakkında ve ¼r¼nlerimiz,
<http://www.tezkim.com/hakkimizda.html> (Erişim tarihi: 12.07.2011)
- [73] Oruç, N., Şeker Pancarından Alternatif Yakıt Kaynağı Olarak Biyoetanol ¼retimi: Eskişehir Şeker-Alkol Fabrikası, VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, 17-19 Aralık 2008, İstanbul.

- [74] Karaosmanoğlu, F.,Yakıt Alkolü: Mevcut Durumu ve Geleceği, Su ve Çevre Teknolojileri, 54–60, 2008.
- [75] Recep Konuk, Konya Şeker Fabrikası Yön. Krl. Bşk. ve Pankobirlik Genel Başkanı, Biyoetanol ÷lke için bir fırsattır,
<http://www.globalenerji.com.tr/hab-23000205-104,25@2300.html> (Erişim tarihi: 11.08.2011)
- [76] Biyoetanol ve biyoetanol üretimi,
<http://www.konyaseker.com.tr/?sayfa=icerik&pgid=208&text=208> (Erişim tarihi: 25.04.2011)
- [77] Anonim, Türkiye'de Biyoyakıtlar,
www.albiyobir.org.tr/biyoyakitlar01.htm (Erişim tarihi: 28.03.2011)
- [78] Anonim, Türkiye'nin Biyoetanol Üretim Projeksiyonu, Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü,
http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenerji/03-biyoetanol/be_Turkiye.html
(Erişim tarihi: 21.01.2011)
- [79] Anonim, “Pancar Üretiminin Sürdürebilirliğine Açılan Yol, Biyoetanol”, Pankobirlik Yayını, 2008, Yıl. 19, Sayı:92,
<http://www.pankobirlik.com.tr/Dosyalar/Dergi/dergi92/data/92.pdf> (Erişim tarihi: 03.11.2010)
- [80] Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., Principles of Fermentation Technology, Butterworth-Heinemann Elsevier Science, İngiltere, 1995.
- [81] Çetin, E.T., Endüstriyel mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları, İstanbul, 1983.

- [82] McNeil, B., Harvey, L.M., Fermentation: An Art from the Past, a Skill for the Future. Practical fermentation technology.1–2, Ed: by B. McNeil, L.M. Harvey, John Wiley & Sons, İngiltere, 2008.
- [83] Buckland, B.C., Reduction to practice. In Harnessing Biotechnology for the 21st Century. 215-218, Ed: by M.R. Ladisch, A. Bose, American Chemical Society, Washington, DC, 1992.
- [84] Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F., Scale-up. Biochemical Engineering, 2nd ed. 195–217, Ed: by H.W. Blanch, D.S. Clark, Academic Press, New York, 1973.
- [85] Herbert, D., Stoichiometric aspects of microbial growth. Continuous Culture 6: Applications and New Fields. 1–30, Ed: by C.R. Dean, D.C. Ellwood, C.G.T. Evans, J. Melling, Ellis Horwood, Chichester, İngiltere, 1976.
- [86] Lilly, V. G., The chemical environment for growth, I. Media, macro and micronutrients. The Fungi. 465–478, Ed: by G.C. Ainsworth, A.S. Sussman, Academic Press, New York, 1965.
- [87] Bader, F.G., Boekeloo, M.K, Graham, H.E, Cagle, J.W., Sterilization of oils: data to support the use of a continuous point-of-use sterilizer. Biotech. Bioeng.,26, 848–856, 1984.
- [88] Hutner, S.H., Inorganic nutrition. Ann. Rev. Microbiol.,26, 313–346, 1972.
- [89] Hughes, M.N., Poole, R. K., Metals and Microorganisms. Chapman and Hall, Londra, 1989.
- [90] Hughes, M.N., Poole, R.K., Metal speciation and microbial growth - the hard (and soft) facts. J. Gen. Microbiol.,137, 725–734, 1991.

- [91] Atkinson, B., Mavituna, F., Process biotechnology. In Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook (2nd edition). 43–81, Macmillan, Londra, 1991.
- [92] Mohanty, S.M., Behera, S., Swain, M.R., Ray, R.C., Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Appl. Energy.*, 86, 640–644, 2009.
- [93] Enguídanos, M., Soria, A., Kavalov, B., Jensen, P., Techno-economic analysis of bioalcohol production in the EU: a short summary for decision-makers. IPTS/JRC, Report EUR 20280 EN, Sevilla; May 2002.
<http://ftp.jrc.es/EURdoc/eur20280en.pdf>. (Erişim tarihi: 20.11.2010)
- [94] Kim, S., Dale, B.E., Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass. Bioenerg.*, 26, 361–375, 2004.
- [95] Nguyen, T.L.T., Gheewala, S.H., Garivait, S., Fossil energy savings and GHG mitigation potentials of ethanol as a gasoline substitute in Thailand. *Energ. Policy*, 35, 5195–5205, 2007.
- [96] Lechon, Y., Cabal, H., Sa´ez, R., Life cycle analysis of wheat and barley crops for bioethanol production in Spain. *Int. J. Agric. Resour. Gov. Ecol.*, 4, 113–122, 2005.
- [97] Macedo, I.C., Seabra, J.E.A., Silva, J.E.A.R., Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass Bioenerg.*, 32, 582–595, 2008.
- [98] Kim, S., Dale, B.E., Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass Bioenerg.*, 28, 475–489, 2005.

- [99] Reijnders, L., Ethanol production from crop residues and soil organic carbon. *Resour. Conserv. Recycl.*,52, 653–658, 2008.
- [100] Najafi, G., Ghobadian, B., Tavakoli, T., Yusaf, T., Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 13, 1418–1427, 2009.
- [101] Dien, B.S., Jung, H.J.G., Vogel, K.P., Casler, M.D., Lamb, J.F.S., Iten, L., Mitchell, R.B., Sarath, G., Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass Bioenerg.*, 30, 880–891, 2006.
- [102] Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G., Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg.*, 32, 422–430, 2008.
- [103] Luo, L., Van der Voet, E., Huppes, G., Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 13, 1613–1619, 2009.
- [104] Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process. Biochem.*, 40, 3693–3700, 2005.
- [105] Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P., Angelidaki, I., Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat Straw in a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.*, 100, 2562–2568, 2009.

- [106] Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheenhan, J., Wallace, B., Montague, L., Slayton, A., Lukas, J., Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. National renewable energy lab golden Co., June 2002.
- <http://www.nrel.gov/docs/fy02osti/32438.pdf> (Erişim tarihi:21.01.2011)
- [107] Hutkins, R.W., Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Yayınları, Amerika, 2006.
- [108] Anonim, *Saccharomyces cerevisiae*
- http://www.musee-afrappier.qc.ca/en/index.php?pageid=3411-html&image=3411_levures1 (Erişim tarihi: 02.01.2012)
- [109] Ingledeu WM. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3rd ed. Nottingham University Press, İngiltere, 1999.
- [110] Anonim, diARK, A resource for eukaryotic genome research
- http://www.diark.org/img/species_pict/large/Saccharomyces_bayanus_623_6C/ (Erişim tarihi: 03.01.2012)
- [111] Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T., Pure and Mixed Genetic Lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and Their Contribution to the Lager Brewing Strain Genome. Appl. Environ. Microb., 72, 3968–3974, 2006.
- [112] Kishimoto, M., Goto, S., Growth temperatures and electrophoretic karyotyping as tools for practical discrimination of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Appl. Microbiol., 41, 239–247, 1995.

- [113] Naumov, G.I., Masneuf, I., Naumova, E.S., Aigle, M., Dubourdieu, D., Association of *Saccharomyces bayanus var. uvarum* with some French wines: Genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.*, 151, 683–691, 2000.
- [114] Bertolini, L., Zambonelli, C., Giudici, P., Castellari, L., Higher Alcohol Production by Cryotolerant *Saccharomyces* Strains. *Am. J. Enol. Viticult.*, 47, 343–345, 1996.
- [115] Querol, A., Bond, U., The complex and dynamic genomes of industrial yeasts, *FEMS Microbiol. Lett.*, 293, 1–10, 2009.
- [116] Brown, S.W., Oliver, S.G., The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast, *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnol. Lett.*, 4, 269–274, 1982.
- [117] Pulvirenti, A., Nguyen, H., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., Zambonelli, C., *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 192, 191–196, 2000.
- [118] Serra, A., Strehaiano, P., Taillandier, P., Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus var. uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 257–265, 2005.
- [119] Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A., Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex, *Int. J. Food Microbiol.*, 122, 188–195, 2008.
- [120] Yarrow, D., Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts, 4th ed. The yeasts, a taxonomic study. 77–100, Ed: by C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Elsevier, Amsterdam, 1998.

- [121] Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W., The yeasts: a taxonomic study, 1st ed.. Interscience Publishers, Inc., New York, 1952.
- [122] Van der Walt, J.P., *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. The yeasts-a taxonomic study, 2nd edn. 316-378, Ed: by J. Lodder, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1970.
- [123] Kurtzman, C. P., Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Res.*, 4, 233–245, 2003.
- [124] Anonim, diARK, A resource for eukaryotic genome research
http://www.diark.org/diark/species_list/Kluyveromyces_marxianus_CBS712
(Erişim tarihi: 03.01.2012)
- [125] Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biot.*, 79, 339–354, 2008.
- [126] Karel, S.F., Libicki, S.B., Robertson, C.R., The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem. Eng. Sci.*, 40, 1321–1354, 1985.
- [127] Margaritis, A., Merchant, F.J.A., Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2, 339–393, 1984.
- [128] Stewart, G.G., Russel, I., One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *J. Inst. Brew.*, 92, 537–558, 1986.
- [129] Tzeng, J.-W., Fan, L.-S., Gan, Y.R., Hu, T.-T., Ethanol fermentation using immobilized cells in a multistage fluidized bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1253–1258, 1991.

- [130] Gikas, P., Livingston, A.G., Specific ATP and specific oxygen uptake rate in immobilized cell aggregates: Experimental results and theoretical analysis using a structured model of immobilized cell growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 660–673, 1997.
- [131] Divies, C., Cachon, R., Gavin, J.-F., Prevost, H., Immobilized cell technology in wine fermentation. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14, 135–153, 1994.
- [132] Singh, R. S., Sooch, B.S., High cell density reactors in production of fruits wine with special reference to cider-An overview. *Indian Nat. Prod. Res.*, 8, 323–333, 2009.
- [133] Karandikar, S., Prabhune, A., Kalele, S.A., Gosavi, S.W., Kulkarni, S.K., Immobilization of Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* on Silica Aerogel for Continuous Production of Invert Syrup. *Res. J. Biotechnol.*, 1, 16–19, 2006.
- [134] Chi, M.-C., Lyu, R.-C., Lin, L.-L., Huang, H.-B., Characterization of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase immobilized in Ca-alginate/ κ -carrageenan beads. *Biochem. Eng. J.*, 39, 376–382, 2008.
- [135] Adinarayana, K., Jyothi, B., Ellaiah, P., Production of Alkaline Protease With Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique. *AAPS PharmSciTech.*, 6, E391–E397, 2005.
- [136] Liu, C., Moon, K., Honda, H., Kobayashi, T., Immobilization of rice (*Oryza sativa* L.) callus in polyurethane foam using a turbine blade reactor. *Biochem. Eng. J.*, 4, 169–175, 2000.
- [137] Freeman, A., Gel entrapment of whole cells and enzymes in cross-linked, prepolymerized polyacrylamide hydrazide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 434, 418–426, 1984.

- [138] Martin, A.M., *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. 63–116, Elsevier Applied Science, New York, 1991.
- [139] Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I., Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *J. Inst. Brew.*, 104, 19–31, 1998.
- [140] Verbelen, P.J., De Schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol. Lett.*, 28, 1515–1525, 2006.
- [141] Norton, S., D’Amore, T., Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme Microb. Tech.*, 16, 365–375, 1994.
- [142] Sanjay, G., Suguna, S., Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. *Catal. Commun.*, 6, 525–530, 2005.
- [143] Baron, G.V., Willaert, R.G., Cell immobilization in preformed porous matrices. *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*. 229-244, Ed: by V. Nedovic, R. Willaert, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda, 2004.
- [144] Shen, H.-Y., Moonjai, N., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Impact of attachment immobilization on yeast physiology and fermentation performance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 61, 79–87, 2003.
- [145] Tata, M., Bower, P., Bromberg, S., Duncombe, D., Fehring, J., Lau, V., Ryder, D., Stassi, P., Immobilized yeast bioreactor systems for continuous beer fermentation. *Biotechnol. Prog.*, 15, 105–113, 1999.
- [146] Scott, J.A., O’Reilly, A.M., Use of a flexible sponge matrix to immobilize yeast for beer fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53, 67–71, 1995.

- [147] Masschelein, C.A., State-of-the-art and future developments in fermentation. J. Am. Soc. Brew. Chem., 52, 28–35, 1994.
- [148] Ramakrishna, S.V., Prakasham, R.S., Microbial fermentations with immobilized cells. Curr. Sci., 77, 87–100, 1999.
- [149] Huang, J., Hooijmans, C.M., Briasco, C.A., Geraats, S.G.M., Luyben, K.C.A.M., Thomas, D., Barbotin, J.N., Effect of free-cell growth parameters on oxygen concentration profiles in gel immobilized recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 619–623, 1990.
- [150] Ogbonna, J.C., Matsumura, M., Kataoka, H., Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: a review. Process Biochem., 26, 109–121, 1991.
- [151] Tanaka, H., Irie, S., Ochi, H., A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. J. Ferment. Bioeng., 68, 216–219, 1989.
- [152] Taillandier, P., Cazottes, M.L., Strehaiano, P., Deacidification of grape musts by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads: a continuous-fluidised-bed process. Chem. Eng. J. Bioch. Eng., 55, B29–B33, 1994.
- [153] Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A., Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilising viable yeast cells. Enzyme Microb. Tech., 22, 434–438, 1998.
- [154] Gryta, M., The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. Desalination, 142, 79–88, 2002.
- [155] Jin, Y.L., Speers, R.A., Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Res. Int., 31, 421–440, 1998.
- [156] Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., Sone, H., Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. J. Bacteriol., 180, 6503–6510, 1998.

- [157] Melzoch, K., Rychtera, M., Habova, V., Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. J. Biotechnol., 32, 59–65, 1995.
- [158] Najafpour, G.D., Immobilization of microbial cells for the production of organic acids. J. Sci. I. R. Iran,1, 172–176, 1990
- [159] M. Saçak, Polimer Kimyası, Gazi Kitapevi, Ankara, 2002.
- [160] Eyring, L., Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths 36. cilt, Bölüm 3. The binary rare earth oxides. Ed: by K.A. Gschneidner, J.-C.G. Bünzli, V.K. Pecharsky, Elsevier, Hollanda, 2006.
- [161] M. Arslan, Cu(II) iyonlarının 4-vinil piridin aşılınmış poli (etilen teraftalat) lifler üzerine adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2000.
- [162] R. Coşkun, Benzoil peroksit yardımıyla poli(etilen teraftalat) (PET) lifler üzerine akril amid/itakonik asit monomer karışımının aşırı kopolimerizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2003.
- [163] Kurbanova, R., Polimer Kimyası Deneyler ve Analizler, Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Konya, 1995.
- [164] Bhattacharyya, S.N., Maldas, D., Graft copolymerization onto celluloses. Prog. Polym. Sci., 10, 171–270,1984.
- [165] Raymond, R.C., "Adipic Acid". Handbook of Pharmaceutical Excipients. 11–12, Ed: by R.C., Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn, Pharmaceutical Press, İngiltere, 2009.

- [166] Remminghorst, U., Rehm, B.H.A., "Microbial Production of Alginate: Biosynthesis and Applications". Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors. 13–42, Ed: by B.H.A. Rehm, Caister Academic Press, İngiltere, 2009.
- [167] Gombotz, W.R., Wee, S.F., Protein release from alginate matrices. Adv. Drug. Deliver. Rev., 31, 267–285, 1998.
- [168] Babu, V.R., Sairam, M., Hosamani, K.M., Aminabhavi, T.M., Preparation of sodium alginate–methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine. Carbohyd. Polym., 69, 241–250, 2007.
- [169] Babu, V.R., Krishna, R.K.S.V., Sairam, M., Kumar, N.B.V., Hosamani, K.M., Aminabhavi, T.M., pH sensitive interpenetrating network microgels of sodium alginate-acrylic acid for the controlled release of ibuprofen. J. Appl. Polym. Sci., 99, 2671–2678, 2006.
- [170] Linker, A., Jones, R.S.A., New Polysaccharide Resembling Alginic Acid Isolated from Pseudomonads. J. Biol. Chem., 241, 3845–3851, 1966.
- [171] Gorin, EA.T., Spencer, J.E.T. Exocellular Alginic Acid From *Azotobacter Vinelandii*. Can. J. Chemistry, 44, 993–998, 1966.
- [172] Işıklan, N., İnal, M., Yiğitoğlu, M., Synthesis and characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) grafted sodium alginate hydrogel beads for the controlled release of indomethacin. J. Appl. Polym. Sci., 110, 481–493, 2008.
- [173] Liu, Y., Yang, L., Li, J., Shi, Z. Grafting of Methyl Methacrylate onto Sodium Alginate Initiated by Potassium Ditelluratoargentate(III). J. Appl. Polym. Sci., 97, 1688–1694, 2005.
- [174] Ueng, S.W.N., Yuan, L.J., Lee, N.; In vivo study of biodegradable alginate antibiotic beads in rabbits, J. Orthop. Res., 22, 592–599, 2004.

- [175] Lin, Y.H., Liang, H.F., Chung, C.K.; Chen, M.C., Sung, H.W., Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*, 26, 2105–2113, 2005
- [176] Simpson, N.E., Grant, S.C., Gustavsson, L., Peltonen, V.-M., Blackband, S.J., Constantinidis, I., Biochemical consequences of alginate encapsulation: a NMR study of insulin-secreting cells. *Biomaterials*, 27, 2577–2586, 2006.
- [177] Shi, X.-W., Du, Y.-M., Sun, L.-P., Yang, J.-H., Wang, X.-H., Su, X.-L., Ionically crosslinked alginate/carboxymethyl chitin beads for oral delivery of protein drugs. *Macromol. Biosci.*, 5, 881–889, 2005.
- [178] Kadokawaa, J.-I., Saitou, S, Shoda S.-I., Preparation of alginate polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylatemonomerin the presence of sodium alginate. *Carbohydr. Polym.*, 60, 253–258, 2005.
- [179] Sutherland, I.W., Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 38, 319–328, 1999.
- [180] Crescenzi, V., Paradossi, G., Desideri, P., Dentini, M., Cavalieri, F., Amici, E., Lisi, R., New hydrogels based on carbohydrate and on carbohydrate-synthetic polymer networks. *Polym. Gels Netw.*, 5, 225–239, 1997.
- [181] Işıklan, N., Inal, M., Kurşun, F., Ercan, G., pH responsive itaconic acid grafted alginate microspheres for the controlled release of nifedipine. *Carbohydr. Polym.*, 84, 933–943, 2011.
- [182] Akkaya, A., Uslu, A.H., Sequential immobilization of urease to glycidyl methacrylate grafted sodium alginate. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 67, 195–201, 2010.

- [183] Penman, A., Sanderson, G. R., A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydr. Res.*, 25,273–282, 1972.
- [184] Khan, I.A., Abourashed, E.A., Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs and Cosmetics. John Wiley & Sons, Kanada, 2010.
- [185] Biswal, D.R., Singh, R.P., The Flocculation and Rheological Characteristics of Hydrolyzed and Unhydrolyzed Grafted Sodium Alginate in Aqueous Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.*, 94, 1480–1488,2004.
- [186] Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F., Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 31–40, 2005.
- [187] Kulkarni, R., Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Controlled release of diclofenac sodium from sodium alginate beads crosslinked with glutaraldehyde. *Pharm. Acta Helv.*, 74, 29–36, 1999.
- [188] Kulkarni, A.R., Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Dave, A.M., Mehta, A.M., Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control. Release*, 63, 97–105, 2000.
- [189] Brownlee, I.A., Seal, C.J., Wilcox, M., Dettmar, P.W., Pearson, J.P., 211-228. Applications of Alginates in Food. *Alginates: Biology and Applications*. Ed: by B.H.A. Rehm, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [190] Rousseau, Í., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J.F., Muller, G., Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. *Eur. Polym. J.*, 40, 2709–2715, 2004.

- [191] Xiao, C., Zhou, M., Lin, X., Chemical Modification of Calcium Alginate Gel Beads for Controlling the Release of Insect Repellent N,N-Diethyl-3-methylbenzamide. *J. Appl. Polym. Sci.*, 102, 4850–4855, 2006.
- [192] Mc Dowell, R.H., Properties of alginates. Kelco Intern., İngiltere, 1986.
- [193] Gacesa, P., Alginates. *Carbohydr. Polym.* 8, 161–182, 1988.
- [194] Kakita, H., Kamishima, H., Some properties of alginate gels derived from algal sodium alginate. *J. Appl. Phycol.*, 20, 543–549, 2008.
- [195] Liu Z.-M., Xu Z.-K., Wang J.-Q., Wu J.; Surface modification of polypropylene microfiltration membranes by graft polymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone. *Eur. Polym. J.*, 40, 2077–2088, 2004.
- [196] Bojanic, V., Joranovic, S., Tobakovic, R.; Synthesis and Electrochemistry of Grafted Copolymers of Cellulose with 4-Vinylpyridine, 1-Vinylimidazole, 1-Vinyl-2-pyrrolidinone, and 9-Vinylcarbazole. *J. Appl. Polym. Sci.*, 60, 1719–1725, 1996.
- [197] Chauhan, G.S., Singh, B., Kumar, S.; Synthesis and characterization of N-vinyl pyrrolidone and cellulose based functional graft copolymers for use as metal ions and iodine sorbents. *J. Appl. Polym. Sci.*, 98, 373–382, 2005.
- [198] Lide, D.R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 78th Ed. 3-30, Ed: by B. Raton, CRC Press, Florida, 1997.
- [199] Nippon Shokubai Co., Ltd., Business & Product, PVP: Poly vinyl pyrrolidone, <http://www.shokubai.co.jp/en/products/functionality/pvp.html> (Erişim tarihi: 20.09.2011)

- [200] Gerhartz, W., Yamamoto, Y.S., 2-Pyrrolidone. Ullmann's Encyclopedia of Chemical Technology. 5th rev. Vol. A22. 457–463, Ed: by A.L. Harreus, VCH Publishers, Deerfield Beach, Florida, 1993.
- [201] Rosevear, A., Immobilised biocatalysts-a critical review. J. Chem. Technol. Biot. B, 34, 127–150, 1984.
- [202] Lee, K.H., Choi, I.S., Kim, Y.-G., Yang, D.-J., Bae, H.-J., Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. Bioresource Technol., 102, 8191–8198, 2011.
- [203] Bangrak, P. Limtong, S., Phisalaphong, M., Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers. Braz. J. Microbiol., 42, 676–684, 2011.
- [204] Yan, S., Wang, P., Zhaia, Z., Yao, J., Fuel ethanol production from concentrated food waste hydrolysates in immobilized cell reactors by *Saccharomyces cerevisiae* H058. J. Chem. Technol. Biotechnol., 86, 731–738, 2011.
- [205] Ghorbani, F., Younesi, H., Sari, A.E., Najafpour, G., Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. Renew. Energ., 36, 503–509, 2011.
- [206] Razmovski, R., Vucurovic, V., Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix, Enzyme Microb. Tech., 48, 378–385, 2011.
- [207] Gough, S., McHale, A.P., Continuous ethanol production from molasses at 45 °C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in a continuous-flow bioreactor, Bioprocess Eng., 19, 33–36, 1998.

- [208] Brady, D., Nigam, P., Marchant, R., McHale, A.P., Ethanol production at 45°C by alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. *Bioprocess Eng.*, 16, 101–104, 1997.
- [209] Abd Alla, S.G., El-Din, H.M.N., El-Naggar, A.W.M., Structure and swelling-release behaviour of poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and acrylic acid (AAc) copolymer hydrogels prepared by gamma irradiation. *Eur. Polym. J.*, 43, 2987–2998, 2007.
- [210] Çaykara, T., Demirci, S., Eroğlu, M.S., Güven, O., Poly(ethylene oxide) and its blends with sodium alginate. *Polymer*, 46, 10750–10757, 2005.
- [211] Duan, W., Chen, C., Jiang, L., Li, G.H., Preparation and characterization of the graft copolymer of chitosan with poly[rosin-(2-acryloyloxy)ethyl ester]. *Carbohydr. Polym.*, 73, 582–586, 2008.
- [212] Katime, I., Valderruten, N., Quintana, J.R., Controlled release of aminophylline from poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels. *Polym. Int.*, 50, 869–874, 2001.
- [213] Yu, Z., Zhang, H., Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.*, 90, 95–100, 2003.
- [214] Sakurai, A., Nishida, Y., Saito, H., Sakakibara, M., Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 526–529, 2000.
- [215] Idris, A., Suzana, W., Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.*, 41, 1117–1123, 2006.

- [216] Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., Laopaiboon, P., Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technol.*, 100, 4176–4182, 2009.
- [217] Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Kaliafas, A., Kanellaki, M., Marchant, R., Banat, I.M., Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. *Food Chem.*, 82, 353–360, 2003.
- [218] Gupta, R., Sharma, K.K., Kuhad, R.C., Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technol.*, 100, 1214–1220, 2009.
- [219] Adinarayana, K., Bapi Raju, K.V.V.S.N., Ellaiah, P., Investigations on alkaline protease production with *B. Subtilis* PE-11 immobilized in calcium alginate gel beads. *Process Biochem.*, 39, 1331–1339, 2004.
- [220] Konsoula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M., Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. *Enzyme Microb.Tech.*, 39, 690–696, 2006.
- [221] Song, S.H., Choi, S.S., Park, K., Yoo, Y.J., Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. *Enzyme Microb. Tech.*, 37, 567–573, 2005.
- [222] Ivanova, V., Hristov, J., Dobрева, E., Al Hassan, Z., Penchev, I., Performance of a magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 59, 187–198, 1996.

- [223] Göksungur, Y., Zorlu, N., Production of ethanol from beet molasses by Calcium alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turk. J. Biol.*, 25, 265–275, 2001.
- [224] Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technol. Technol.*, 98, 3367–3374, 2007.
- [225] Jones, A.M., Thomas, K.C., Ingledew, W.M., Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. *J. Agr. Food Chem.*, 42, 1242–1246, 1994.
- [226] Chandel, A.K., Narasu, M.L., Chandrasekhar, G., Manikyam, A., Rao, L.V., Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3. *Bioresource Technol.*, 100, 2404–2410, 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Murat İNAL

Doğum Tarihi : 29.12.1982

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans : Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü, 2004

Yüksek Lisans: Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi

Kimya Anabilim Dalı, 2007