

**ŞEKER PANCARI KÜSPESİNİN BİYOETANOL ÜRETİMİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE USAGE OF SUGAR BEET PULP
FOR BIOETHANOL PRODUCTION**

HANDE GÜNAN YÜCEL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

KABUL VE ONAY

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Gönül Dönmez

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Zümriye Aksu

Üye :.....
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye :.....
Prof. Dr. Tülay Durusoy

Üye :.....
Prof. Dr. S. Ali Tuncel

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ŞEKER PANCARI KÜSPESİNİN BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hande GÜNAN YÜCEL

ÖZ

Tarımsal bir yan ürün olan şeker pancarı küspesi kullanılarak, petrole alternatif olarak gösterilen biyoetanol üretiminin gerçekleştirildiği bu tez çalışmasında kurutulmuş ve öğütülmüş küspe sülfürik asit çözeltisiyle hidrolize uğratılarak yapısındaki hemiselülozdan elde edilen beş karbonlu şekerler *Pichia stipitis* mayasıyla fermantasyonla etanole dönüştürülmüştür.

İzotermal ve karıştırmalı reaktörde gerçekleştirilen çalışmaların ilk kısmında, kurutulmuş küspenin asidik hidrolizinde sıcaklığın, tanecik boyutunun, karıştırma hızının, katı/sıvı oranının ve asit derişiminin, toplam indirgen şeker ve şekerlerin bozunma ürünü olan toplam furan bileşiklerinin oluşumuna etkileri incelenmiştir. Hidrolizde gerçekleşen seri tepkimeler için öngörülen model kullanılarak tepkime hız sabitleri bulunmuş ve modelin sisteme uygunluğu incelenmiştir. Sonuçlar toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri oluşumunu en çok etkileyen parametrelerin asit derişimi ve sıcaklık olduğunu ve 110°C'da 0.30 M asit derişiminde en yüksek şeker derişimine ulaşıldığını göstermiştir.

Hidroliz sırasında oluşan ve mikroorganizmaya inhibitör etkisi yapan toplam furan bileşiklerinin giderilmesi için uygulanan çeşitli yöntemler içinde ticari aktif karbon ve küspeden elde edilen aktif karbon adsorpsiyonu ardından aşırı kireçlemenin en yüksek giderim verimini sağladığı görülmüştür. Uçucu kül ile zehir gidermede ise hidrolizattaki furan bileşiklerinin yarısının uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir.

Çalışmanın son kısmında ise, önce ksiloz şekerine adapte edilmiş *P. stipitis* mayasının üremesine ve etanol üretimine başlangıç ksiloz derişiminin etkisi 10-75 g/l aralığında incelenmiş ve üreme hız sabitleri belirlenmiştir. Daha sonra mikroorganizmanın hidrolizat ortamına da adaptasyonu gerçekleştirilmiş ve aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile ve uçucu kül ile zehirli giderilmiş hidrolizatlar kullanılarak yapılan deneylerle hidrolizata uygulanan zehir giderme yönteminin, ortama eklenen aşının derişiminin ve sentetik şeker ilavesinin mikroorganizmanın üremesine ve etanol üretimine etkileri araştırılmıştır. Mayanın, sentetik şeker

içermeyen, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş hidrolizattan oluşan besin ortamında ürediği, ortamdaki substratı tükettiği; ancak çok az miktarda etanol üretebildiği gözlenmiştir. Aynı yöntemle zehiri giderilmiş hidrolizatın besin ortamındaki hacimce miktarı %80'e düşürölüp ortama 10 g/l ksiloz (toplam indirgen şeker içeriği 48 g/l) eklendiğinde yüksek verimde hücre ve etanol üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Hidrolizata uygulanan zehir giderme işlemleri uçucu kül ile adsorpsiyon olduğunda ise, furan bileşiklerinin mikroorganizmanın üremesine önemli bir inhibisyon etkisi yapmasına karşın maya hücrelerinin yüksek verimde etanol ürettiği görölmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, şeker pancarı küspesi, asidik hidroliz, zehir giderme, fermantasyon, *P. stipitis*

Danışman: Prof. Dr. Zümriye AKSU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

INVESTIGATION OF THE USAGE OF SUGAR BEET PULP FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Hande GÜNAN YÜCEL

ABSTRACT

Bioethanol fuel which is an alternative of petroleum was produced using sugar beet pulp, an agricultural byproduct in this thesis study. Sugar beet pulp was dried and grinded and then hydrolyzed with sulphuric acid solution and the obtained five-carbon sugars from the hemicellulose structure of pulp were fermented to ethanol by the yeast *Pichia stipitis*.

At the first part of the study the effects of temperature, particle size, agitation rate, solid/liquid ratio and acid concentration on the formation of total reducing sugars and decomposition products of sugars (furan compounds) during the acid hydrolysis of dried sugar beet pulp were investigated in an isothermal and well-mixed reactor. Reaction rate constants were obtained by using the proposed model for the series of reactions carried out during the hydrolysis, and the fitness of the model was investigated. The results showed that the parameters mostly affecting the formation of total reducing sugars and total furan compounds were the temperature and acid concentration and the maximum total reducing sugar concentration was obtained at 110°C and 0.30 M acid concentration.

Adsorptions with commercial activated carbon and activated carbon obtained from sugar beet pulp and then applying overliming were found the most effective methods for the removal of total furan compounds formed during the hydrolysis, which have inhibition effect on the microbial growth. It is determined that half of the furan compounds were removed by the adsorption with fly ash.

At the last part of the study, firstly, the effect of initial xylose concentration in the range of 10-75 g/l on the growth and ethanol production of the yeast *P. stipitis*, which was adapted to the xylose sugar and growth rate constants were determined.

After that, the yeast was adapted to the hydrolysate medium and using the hydrolysates detoxified with activated carbon adsorption+overliming and fly ash, the effects of the detoxification method applied to the hydrolysate, the inoculum

concentration and the addition of synthetic sugar on the growth and ethanol production of the microorganism were investigated. It was seen that the yeast was able to grow in the growth medium containing 100% hydrolysate detoxified with activated carbon adsorption+overliming as substrate and to consume the substrate; but to produce a very little amount of ethanol. However when 80% volumetric hydrolysate detoxified by the same method and 10 g/l xylose (48 g/l total reducing sugar) were added to the growth medium, it was seen that highly yielded cell and ethanol productions were observed. When the detoxification method applied to the hydrolysate was fly ash adsorption, it was seen that yeast cells were able to produce ethanol with high efficiency although the inhibition effect of the furan compounds on the growth of the microorganism was important.

Keywords: Bioethanol, sugar beet pulp, acid hydrolysis, detoxification, fermentation, *P. stipitis*

Advisor: Prof. Dr. Zümriye Aksu, Hacettepe University, Chemical Engineering Department.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tecrübesi, bilgi birikimi ve yorumlarıyla bana hep yön gösteren ve bakış açımı genişleten, çalışkanlığını ve iş ahlakını tüm çalışma hayatım süresince örnek alacağım, ilgisiyle ve anlayışıyla her zaman yanımda olan ve hayatım boyunca da yanımda olmasını dilediğim çok değerli hocam Prof. Dr. Zümriye AKSU'ya,

Bana maddi ve manevi pek çok olanak sunan Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne ve çalışanlarına,

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Laboratuara geldiğim ilk andan itibaren güler yüzü ve içtenliğiyle bana her zaman destek olan çok sevdiğim arkadaşım Arş. Gör. S. Pınar KODAL'a,

Öğrettikleriyle çalışmalarımın hızlanmasını sağlayan Yük. Kimya Müh. Gökhan PAŞAOĞLU'na,

Üç yıl içinde birlikte çalıştığımız, bana yardımcı olan ve güzel bir çalışma ortamı sunan tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Analizlerimin bir kısmını yapmama olanak sağlayarak tezime büyük katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. S. Ali TUNCEL'e ve yardımları için Arş. Gör. Çiğdem GÖLGELİOĞLU'na,

Önerileri ve fikirleriyle tez çalışmamın önemli kısımlarına ışık tutan Arş. Gör. Hande ÜNSAL'a

Pozitif enerjisiyle her zaman işleri kolaylaştıran ve her zor durumda olduğumda düşünmeden yardımına koşan Arş. Gör. K. Özlem NAZLI'ya,

İyiliği ve yardım severliğinin tarifi mümkün olmayan, arkadaşlığının hayatın bana en büyük armağanlarından birisi olduğunu düşündüğüm Arş. Gör. Bilginur MARAŞ'a,

Samimiyeti ve iyi niyetiyle herkesin sahip olmak isteyeceği harika bir dost olan, en kötü zamanlarda bile birlikte gülebilmeyi başarabildiğimiz sevgili arkadaşım Arş. Gör. Gökçe Dicle DEMİR'e,

Her zaman anlayışlı ve sevgi dolu olan, varlıklarının bana verdiği güvenle kendimi daha güçlü hissettiğim canım aileme,

Yaşadığım her sıkıntıyı da mutluluklarımı paylaştığı gibi koşulsuz paylaşan, anlayışı ve fedakârlığı ile ne kadar şanslı olduğumu bana her gün tekrar hatırlatan sevgili eşim Muammer YÜCEL'e,

en içten teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Türkiye’de ve Dünyada Enerji.....	3
2.2. Biyoyakıtlar	3
2.3. Biyoyakıt Olarak Etanol	4
2.3.1. Etanol Üretim Yöntemleri	7
2.3.1.1. Etanolün Kimyasal Üretimi.....	7
2.3.1.2. Etanolün Fermantasyonla Üretimi.....	8
2.3.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütle.....	12
2.3.2.1. Şeker Pancarı Küspesi	14
2.3.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütleyle Uygulanan Ön İşlemler..	15
2.3.3.1. Fiziksel Ön İşlemler:	16
2.3.3.2. Fizikokimyasal Ön İşlemler:	16
2.3.3.3. Kimyasal Ön İşlemler:.....	16
2.3.3.4. Enzimatik Hidroliz:	17
2.3.4. Ön İşlem Sonrası Zehir Giderme	18
2.4. Mikroorganizmalar	19
2.4.1. Mikrobiyal Büyümeye Etki Eden Faktörler.....	21
2.4.2. Mikrobiyal Üreme	22
2.4.3.1. <i>P. stipitis</i>	26
2.5. HPLC Sistemleri	27
2.5.1. Sürekli Faz.....	28
2.5.2. Sabit Faz.....	28
2.6. Biyoatıklardan Biyoetanol Fermantasyonunda Bugüne Kadar Yapılan Çalışmaların Özetlenmesi	28
3. DENEY SİSTEMİNİN MATEMATİKSEL TANIMLANMASI	31
3.1. Hidroliz Reaksiyonu Kinetiği	31
3.1.1. Başlangıç Toplam İndirgen Şeker Oluşum Hızı	34
3.2. Mikroorganizmanın Özgül Üreme Hızı.....	34
3.3. Mikroorganizmanın Substrat Tüketim Hızı.....	35
3.4. Üretkenlik ve Mikroorganizmanın Ürün Oluşum Hızı	35
3.5. Şeker Kaynağı Olarak Sadece Ksiloz İçeren Besin Ortamında Büyüme Kinetiğinin Modellenmesi.....	36
4. DENEYSEL YÖNTEMLER	38
4.1. Şeker Pancarı Küspesinin Hidrolizi.....	38

4.2.	Hidrolizata Uygulanan Ön İşlemler	41
4.3.	Fermantasyon Çalışmaları.....	43
4.3.1.	Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizma ve Üreme Koşulları.....	43
4.3.2.	<i>P. stipitis</i> 'in Hidrolizat Ortamına Adaptasyonu ve Üretilmesi.....	43
4.3.3.	Fermantasyon	45
4.4.	Analiz Yöntemleri.....	45
4.4.1.	Toplam İndirgen Şeker Derişimi Tayini	45
4.4.2.	Toplam Furan Bileşikleri Derişimi Tayini	45
4.4.3.	Mikroorganizma Derişimi Tayini	45
4.4.4.	Etanol Derişimi Tayini	46
5.	DENEYSEL SONUÇLAR	47
5.1.	Şeker Pancarı Küspesinin Asidik Hidrolizine Etkiyen Parametreler.....	47
5.1.1.	Tepkime Sıcaklığının Etkisi.....	47
5.1.2.	Tanecik Boyutunun Etkisi.....	49
5.1.3.	Karıştırma Hızının Etkisi.....	51
5.1.4.	Katı/Sıvı Oranının Etkisi.....	53
5.1.5.	Asit Derişiminin Etkisi.....	55
5.1.5.1.	90°C'da Gerçekleştirilen Hidrolizde Asit Derişiminin Etkisi	55
5.1.5.2.	110°C'da Gerçekleştirilen Hidrolizde Asit Derişiminin Etkisi	57
5.2.	Hidroliz Tepkime Hız Sabitlerinin Bulunması	60
5.3.	Şeker Pancar Küspesi Hidrolizatına Ön İşlemin Etkisi.....	68
5.4.	<i>P. stipitis</i> ile Fermantasyon Çalışmaları.....	71
5.4.1.	Sadece Ksiloz İçeren Sentetik Besin Ortamında <i>P. stipitis</i> 'in Üremesine ve Etil Alkol Üretimine Ksiloz Derişiminin Etkisi	71
5.4.2.	Aktif Karbon+Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizatlı Besin Ortamında <i>P. stipitis</i> 'in Üremesi ve Etil Alkol Üretimi	75
5.4.2.1.	%100 Hidrolizat İçeren Besin Ortamında Yapılan Çalışmalar.....	75
5.4.2.2.	%80 Hidrolizat+10 g/l Ksiloz İçeren Besin Ortamında Yapılan Fermantasyon Çalışmaları.....	75
5.4.2.2.1.	Aşı Derişimi(v/v)'nin Etkisi.....	75
5.4.3.	Uçucu Kül ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizatlı Besin Ortamında <i>P. stipitis</i> 'in Üremesi ve Etil Alkol Üretimi.....	77
5.4.3.1.	%80 Hidrolizat+10 g/l Ksiloz İçeren Besin Ortamında Yapılan Fermantasyon Çalışmaları.....	77
6.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	81
	KAYNAKLAR.....	87
	EKLER	93
	EK 1. DNS YÖNTEMİYLE TOPLAM İNDİRGEN ŞEKER TAYİNİ	93
	EK 2. TOPLAM FURAN BİLEŞİKLERİNİN DERİŞİMİ TAYİNİ.....	95
	EK 3. MİKROORGANİZMA DERİŞİMİ TAYİNİ.....	96
	EK 4. ETANOL DERİŞİMİ TAYİNİ.....	98
	EK 5. HİDROLİZ TEPKİMESİNİN HIZ SABİTLERİNİN BULUNMASI AMACIYLA KULLANILAN PROGRAM ÇIKTILARI.....	100
	ÖZGEÇMİŞ	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glikoliz prosesi.....	10
Şekil 2.2. Biyokütleden fermantasyonla etil alkol üretimi	12
Şekil 2.3. Selülozun yapısı.....	13
Şekil 2.4. Şeker pancarı küspesinin içeriği	14
Şekil 2.5. Ön işlem öncesi ve sonrasında lignoselülozik maddenin yapısı.....	15
Şekil 2.6. Mikroorganizma üreme evreleri.....	23
Şekil 2.7. HPLC cihazının şematik gösterimi	27
Şekil 3.1. Üremeye bağlı ürün oluşumu	36
Şekil 4.1. Asidik hidroliz tepkimelerinin gerçekleştirildiği deney sistemi.....	39
Şekil 4.2. Asidik hidroliz tepkimelerinin gerçekleştirildiği reaktör	40
Şekil 5.1. Tepkime sıcaklığının toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D _p =1.000-1.410 mm) 48	
Şekil 5.2. Tepkime sıcaklığının furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D _p =1.000-1.410 mm) 48	
Şekil 5.3. Tanecik boyutunun toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi; KH=100 rpm; T=90°C)	50
Şekil 5.4. Tanecik boyutunun furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi; KH=100 rpm; T=90°C)	50
Şekil 5.5. Karıştırma hızının toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi; T=90°C; D _p =1.000-1.410 mm)	52
Şekil 5.6. Karıştırma hızının furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi; T=90°C; D _p =1.000-1.410 mm)	52
Şekil 5.7. Katı/sıvı oranının toplam indirgen şeker derişimine etkisi (C _{H₂SO₄} =0.1 M; KH=100 rpm; T=90°C; D _p =1.000-1.410 mm)	54

Şekil 5.8. Katı/sıvı oranının furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi ($C_{H_2SO_4} = 0.1$ M; KH=100 rpm; T=90°C; $D_p=1.000-1.410$ mm)	54
Şekil 5.9. 90°C'da asit derişiminin toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml H_2SO_4 çözeltisi; KH=100 rpm; $D_p=1.000-1.410$ mm)	56
Şekil 5.10. 90°C'da asit derişiminin furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml H_2SO_4 çözeltisi; KH=100 rpm; $D_p=1.000-1.410$ mm)	56
Şekil 5.11. 110°C'da asit derişiminin toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml H_2SO_4 çözeltisi; KH=100 rpm; $D_p=1.000-1.410$ mm)	58
Şekil 5.12. 110°C'da asit derişiminin furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml H_2SO_4 çözeltisi; KH=100 rpm; $D_p=1.000-1.410$ mm)	59
Şekil 5.13. 90°C'da 0.10 M H_2SO_4 derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	61
Şekil 5.14. 90°C'da 0.55 M H_2SO_4 derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	61
Şekil 5.15. 90°C'da 0.75 M H_2SO_4 derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	62
Şekil 5.16. 110°C'da 0.10 M H_2SO_4 derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	62
Şekil 5.17. 110°C'da 0.30 M H_2SO_4 derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	63
Şekil 5.18. 110°C'da 0.55 M H_2SO_4 derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	63

Şekil 5.19. 110°C'da 0.75 M H ₂ SO ₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması.....	64
Şekil 5.20. 90°C'da 0.55 M H ₂ SO ₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması	64
Şekil 5.21. 90°C'da 0.75 M H ₂ SO ₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması	65
Şekil 5.22. 110°C'da 0.30 M H ₂ SO ₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması	65
Şekil 5.23. 110°C'da 0.55 M H ₂ SO ₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması	66
Şekil 5.24. 110°C'da 0.75 M H ₂ SO ₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması	66
Şekil 5.25. Farklı adsorbentlerin şeker pancarı küspesi hidrolizatındaki furan bileşikleri giderimine etkisi	69
Şekil 5.26. Farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen <i>P.stipitis</i> 'in üreme ve etanol üretim eğrileri (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm).....	72
Şekil 5.27. Farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen <i>P. stipitis</i> 'in üreme ve substrat tüketim eğrileri (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm)	73
Şekil 5.28. Başlangıç ksiloz derişiminin <i>P.stipitis</i> 'in özgül üreme hızı üzerine etkisi (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm)	74
Şekil 5.29. <i>P. stipitis</i> 'e ait 1/μ -1/S grafiği (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm)	74

Şekil 5.30. Aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile ve uçucu kül ile zehiri giderilmiş hidrolizat içeren besin ortamlarında elde edilen <i>P. stipitis</i> 'in üreme ve etanol üretim eğrileri (T=30C, pH=5.5, KH=100 rpm)	78
Şekil 5.31. Aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile ve uçucu kül ile zehiri giderilmiş hidrolizat içeren besin ortamlarında elde edilen <i>P. Stipitis</i> 'in üreme ve toplam indirgen şeker tüketim eğrileri (T=30C, pH=5.5, KH=100 rpm)	79
Şekil 6.1. 110°C'da, 0.30 M H ₂ SO ₄ derişimiyle gerçekleştirilen hidroliz tepkimesi sırasında toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşiklerinin zamanla değişimi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml H ₂ SO ₄ çözeltisi; KH=100 rpm; d _p =1.000-1.410 mm)	82
Şekil E.1. İndirgen şeker için kalibrasyon doğrusu	94
Şekil E.2. <i>P. stipitis</i> için yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu	97
Şekil E.3. <i>P. stipitis</i> için yaş mikroorganizma çalışma doğrusu.....	97
Şekil E.4. 15.8 g/l etanol içeren örnek için HPLC'de elde edilen pik.....	98
Şekil E.5. Etanol için kalibrasyon doğrusu.....	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Etanolün fiziksel ve kimyasal özellikleri	6
Çizelge 4.1. Asidik hidrolizde denenen parametrelerin çalışılan aralık değerleri	41
Çizelge 5.1. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları.....	49
Çizelge 5.2. Farklı tanecik boyutlarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları	51
Çizelge 5.3. Farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları	53
Çizelge 5.4. Farklı katı/sıvı oranlarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları	55
Çizelge 5.5. 90°C'da farklı asit derişimlerinde gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları	57
Çizelge 5.6. 110°C'da farklı asit derişimlerinde gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları	59
Çizelge 5.7. 90 ve 110°C'da 0.10-0.75 M arasında değişen H ₂ SO ₄ derişimlerinde Eşitlik 3.11 ve Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler	67
Çizelge 5.8. Farklı adsorbentlerin 6 saat sonunda şeker pancarı küspesi hidrolizatındaki toplam furan bileşiklerini giderim yüzdeleri	69
Çizelge 5.9. Farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen P.stipitis'in özgül üreme hız sabitleri, elde edilen en yüksek mikroorganizma derişimleri, ksiloz tüketim ve etanol üretim hızları	73

Çizelge 5.10. Sadece 10 g/l ksiloz, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş sadece hidrolizat ve % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz; uçucu kül ile zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamlarında elde edilen *P. stipitis*'in özgül üreme hız sabitleri, en yüksek mikroorganizma ve etanol derişimleri, substrat tüketim ve etanol üretim hızları, üretkenlik ve verim değerleri..... 80

Çizelge 6.1. Sadece 52 g/l ksiloz içeren, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş sadece hidrolizat içeren ve % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren; uçucu kül ile zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamlarında *P. stipitis*'in fermantasyonundan elde edilen üretkenlik, etanol üretim hızları ve en yüksek etanol derişimleri 86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- C_{A_1} : Ksilan₁'in t anındaki derişimi (g/l)
- $C_{A_{1,0}}$: Ksilan₁'in başlangıç derişimi (g/l)
- C_{A_2} : Ksilan₂'nin t anındaki derişimi (g/l)
- $C_{A_{2,0}}$: Ksilan₂'nin başlangıç derişimi (g/l)
- C_B : Ksilozun t anındaki derişimi (g/l)
- C_{B_0} : Ksiloz maddesinin başlangıç derişimi (g/l)
- C_C : Furan bileşiklerinin t anındaki derişimi (g/l)
- C_{C_0} : Furan bileşiklerinin başlangıç derişimi (g/l)
- C_i : i maddesinin derişimi (g/l)
- k :Tepkime hız sabiti (1/sa)
- k_1 : Ksilan₁'in harcanma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)
- k_2 : Ksilan₂'nin harcanma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)
- k_3 : Ksilozun harcanma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)
- k_4 : Furan bileşiklerinin bozunma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)
- K_s : Doygunluk sabiti (g/l)
- N_i : i maddesinin mol sayısı (mol)
- P : Ürün derişimi (g/l)
- q_P : Ürün oluşum hızı (g ürün/g kuru mo-sa)
- r_{A_1} : Ksilan₁'in tepkimedede harcanma hızı (mol/l.sa)
- r_{A_2} : Ksilan₂'nin tepkimedede harcanma hızı (mol/l.sa)
- $r_{B,net}$: Ksiloz için net tepkime hızı (mol/l.sa)
- $r_{C,net}$: Furan bileşikleri için net tepkime hızı (mol/l.sa)
- r_i : i maddesinin tepkimedede harcanma hızı (mol/l.sa)
- S : Substrat derişimi (g/l)

t : Zaman (sa)

\ddot{U} : Üretkenlik (g ürün/l-sa)

V : Hacim (l)

X : Kuru mikroorganizma derişimi (g kuru mo/l)

X_m : Üstel üreme evresinin sonunda elde edilen kurutulmuş mikroorganizma derişimi (g/l)

μ : Özgöl üreme hız sabiti (1/sa)

μ_m : En yüksek özgöl üreme hızı (1/sa)

η : Substrat tüketim hızı (g substrat / g kuru mo-sa)

1. GİRİŞ

Dünyanın giderek artan enerji talebinin karşılanmasında kullanılan temel kaynakların fosil kaynaklar olması önemli problemleri de beraberinde getirmektedir. Fosil kaynakların tükeniyor olması, talep artışından dolayı petrol fiyatlarının son zamanların en yüksek değerine ulaşması ve karbondioksit emisyonunun iklim üzerindeki etkileri sebebiyle alternatif enerjiye olan ilgi artmıştır. Bu kapsamda biyoenerji, hidrojen, bor, doğal gaz, elektrik, rüzgâr ve güneş enerjisi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996).

Canlı organizmalar ya da onların metabolik yan ürünlerden üretilen enerji olarak tanımlanan biyoenerji, doğadaki karbon dengesini bozmaması, yenilenebilir ve biyobozunur olması sebebiyle tercih edilen bir enerji türüdür (Nguyen and Saddler, 1991). Üzerinde en fazla çalışma yürütülen biyoenerji çeşitleri olan biyoetanol, biyodizel ve biyogaz; dünyanın çeşitli yerlerinde aktif olarak kullanılmakta ve kullanım alanları da günden güne artmaktadır. Özellikle biyoetanolün mevcut araçlarda modifiye yapmaya gerek olmaksızın benzine belli oranlarda karıştırılarak kullanılabilir olması, günümüzdeki sınırlı miktardaki üretim miktarının hızlı bir şekilde artmasına yol açmaktadır.

Biyolojik maddelerden fermantasyonla elde edilen etil alkol biyoetanol adını almakta olup, yüksek yanma ısı ve oktan sayısı sayesinde genelde yakıt veya yakıt katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ancak, günümüzde üretilen biyoetanolün önemli bir miktarının eldesinde hammadde olarak mısır, buğday gibi gıda ürünlerinin kullanılıyor olması hem üretim maliyetini hem de dünyada yaşanan açlık ve yoksulluğu arttırmaktadır. Bu nedenle ekonomik değeri düşük biyokütleler olan tarımsal atık ve yan ürünlerden etil alkol üretimi üzerine çalışmalar son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bu maddeler yapısal olarak selüloz, hemiselüloz, lignin, pektin gibi polimerlerden oluşmaktadır ve fermantasyondan önce birtakım ön işlemler uygulanarak bu yapılardan mikroorganizmanın kullanabileceği monosakkaritlerin elde edilmesi gerekmektedir. Ancak bu işlemler sonunda genellikle monosakkaritlerin yanı sıra mikrobiyal üremeyi olumsuz yönde etkileyen zehirli bileşikler de oluştuğu için fermantasyondan önce, bu bileşiklerin giderimleri için de çeşitli işlemlerin uygulanması gerekmektedir.

Şeker pancarı küspesi yapısındaki hemiselüloz, selüloz, pektin gibi basit indirgen şekere dönüştürülebilir polimerik yapılar ve düşük kül içeriği ile etanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilir bir biyoatıktır (Cardona et al., 2009).

Bu tez çalışmasının amacı; tarımsal bir yan ürün olan şeker pancarı küspesinin asidik hidrolizi ile içerisindeki polimerik yapılardan basit indirgen şekerlerin elde edilmesi ve şeker verimini etkileyen parametrelerin incelenmesi, hidroliz tepkimesi esnasında oluşan furan bileşiklerinin giderimi için alternatif yöntemlerin denenmesi ve hidrolizatın *Pichia stipitis* mayası ile fermantasyona uğratarak biyoetanol üretim veriminin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Türkiye’de ve Dünyada Enerji

Genel olarak sistemin iş yapma kapasitesi şeklinde tanımlanan enerji; ısı, ışık, nükleer, kimyasal, elektrik gibi farklı formlarda kullanım alanı bulmaktadır.

Hem dünya nüfusunun hem de teknolojik gelişmelerin hızla artıyor olmasının doğal bir sonucu olarak dünyada enerji ihtiyacı da artmaktadır. Oluşumları için uzun zaman gerektiren fosil yakıtlar günümüzde kullanılan temel enerji kaynağıdır; ancak artan talebe karşı bu kaynakların yenilenemiyor olması, yenilenme hızı tükenme hızından daha fazla olan kaynaklar konusunda araştırmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Yenilenebilir enerji kaynakları olarak adlandırılan bu kaynakların başlıcaları güneş, rüzgâr, hidrojen, bor ve biyoenerjidir. Günümüzde pek çok ülke, fosil yakıt tüketimini yenilenebilir enerji kaynaklarıyla destekleyebilmek için gerekli olan altyapıyı kurma çalışmalarını hızlandırmıştır.

Dünyadaki enerji ihtiyacı artışı düşünülerek yapılan hesaplara göre, mevcut petrol rezervlerinin yüz yıldan az sürede tükenmesi beklenmektedir. Petrolün en fazla tüketildiği sektörün ulaşım sektörü olması, alternatif yakıtlar konusundaki çalışmaları da hızlandırmaktadır. Petrol türevi yakıtların atmosfere yaydığı karbondioksit ve karbonmonoksit gazları ve bu gazların atmosferdeki oranının artmasıyla tetiklenen iklim değişiklikleri ve küresel ısınma da göz önünde bulundurulduğunda, araştırmalar doğadaki karbon dengesini bozmayan ve sürekli yenilenebilir olan yakıtların üretilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu kapsamda biyoyakıtlar, üretim yöntemlerinin geliştirilmesinde ve kullanımının yaygınlaşmasında en çok ilerleme kaydedilen yakıt grubudur.

2.2. Biyoyakıtlar

Canlı ya da kısa bir süre öncesine kadar yaşamakta olan biyolojik kökenli organizmalardan elde edilen yakıtlara biyoyakıtlar denmektedir. Biyoyakıtların bu denli ön planda olmasının temel nedeni petrol yakıtlarıyla karıştırılarak kullanımlarının mümkün olması ve mevcut araçlarda modifiye gerektirmeden belli oranlarda kullanılabilmesidir. Böylece bu alanda yapılacak alt yapı çalışmalarının maliyeti de düşmektedir.

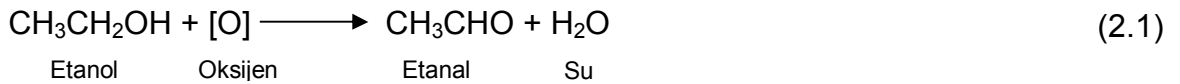
Önümüzdeki 50 yıl içinde enerji sektöründe büyük rolü olacağı ön görülen biyoyakıtların en yaygın kullanımı biyodizel, biyogaz ve biyoetanol şeklindedir (Malça and Freire, 2006). Sıvı fazda olan biyodizel ve biyoetanol, depolanma ve taşınma kolaylığından dolayı bu alanda daha çok tercih edilmektedir. Biyoetanolün benzine eşdeğer yapısı sayesinde özellikle taşımacılık sektöründeki pazar payının büyük olacağı düşünülmektedir.

2.3. Biyoyakıt Olarak Etanol

Kapalı formülü C₂H₅OH, açık formülü CH₃CH₂OH olan etanol; berrak, renksiz, uçucu ve kendine has kokusu olan bir alkoldür. Etanolün Çizelge 2.1'de belirtilen fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre farklı kullanım alanları mevcuttur (Balat, 2010). Donma noktası (-114) °C olan etanol, bu özelliği sayesinde araçlarda antifriz olarak kullanılabilen ve civanın donma noktası olan (-40) °C ve altında termometre sıvısı olarak tercih edilmektedir. Suda çözünmeyen pek çok bileşiği çözdüğü ve sudan daha uçucu bir bileşik olması sebebiyle kolayca buharlaştırılabildiği için endüstride çözücü olarak kullanımı da oldukça yaygındır. Ayrıca etanolün suyla %100 oranında ve pek çok organik çözücüyle de yüksek oranda karışabiliyor olması parfüm, vernik, boya, plastik gibi pek çok kimyasal ürünün üretiminde kullanılmasına da olanak sağlamaktadır.

Etanol ayrıca pek çok ürünün üretilmesi esnasında gerçekleştirilen reaksiyonlarda tepkiyen olarak da kullanılmaktadır.

Etanolden etanal (asetaldehit) eldesinde, asidik sodyum dikromat, potasyum dikromat veya potasyum permanganat katalizörlüğünde gerçekleştirilen oksidasyon tepkimesi Eşitlik 2.1'de verilmiştir.



Etanal, istenilen ürünün sirke asidi ya da asetik asit olarak da bilinen etanoik asit olduğu durumlarda tekrar oksitlendirilerek etanoik asit sentezi gerçekleştirilir.

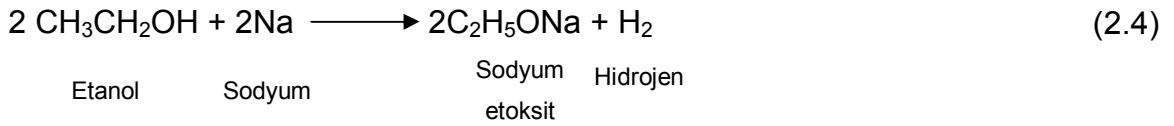


Etanolün 170°C'de derişik H₂SO₄ ile muamelesi sonucu etilen oluşmakta ve bu reaksiyon da etanolün dehidrasyonu olarak adlandırılmaktadır.

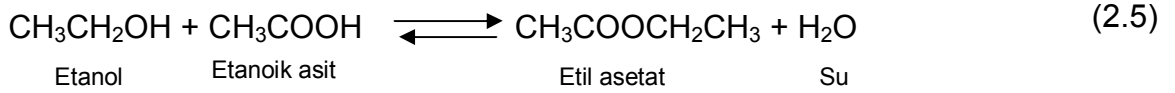


Yukarıda belirtilen tepkime 140°C sıcaklıkta gerçekleştirilirse ürünler dietil eter (C₂H₅OC₂H₅) ve su (H₂O) olmaktadır.

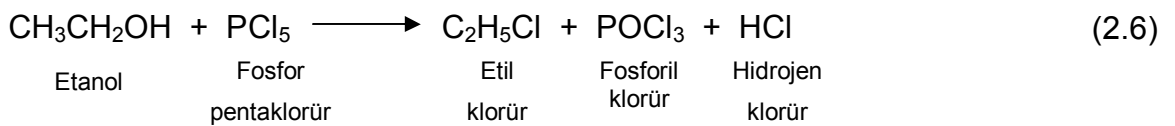
Yenilenebilir enerji konusundaki çalışmalarda önemli bir pay sahibi olan hidrojenin üretim yöntemlerinden birisi de etanolün ve sodyum ile tepkimesidir.



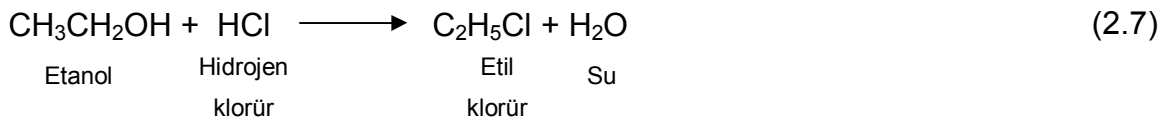
Endüstride yaygın olarak kullanılan bir çözücü olan etil asetat da etanolün etanoik asitle esterleşme reaksiyonuyla elde edilmektedir.



Etanol, fosfor pentaklorür ile tepkimeye girdiğinde ise hidrojen klorür, etil klorür ve fosforil klorür elde edilmekte ve bu reaksiyon etanolün fosfor pentaklorür ile halojenizasyonu olarak adlandırılmaktadır.



Etanolün diğeri bir halojenizasyon yöntemi de hidrojen klorür ile genellikle çinko (II) klorür katalizörlüğünde gerçekleştirilen tepkimedir ve tepkime sonucunda ürün olarak etil klorür ile su elde edilir.



Çizelge 2.1. Etanolün fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül ağırlığı (g/mol)	46.07
Yoğunluğu (g/cm ³) (20°C'de)	0.79
Havaya kıyasla buhar yoğunluğu	1.59
Kaynama noktası (K)	351
Donma noktası (K)	129
Kritik sıcaklığı (K)	516.2
Tutuşma sıcaklığı (K)	636
Viskozitesi (cp)	1.20
Kaynama noktasında buharlaşma ısısı (j/g)	839.3
Yanma ısısı (j/g) (25°C'de)	29676.7
Özgül ısısı (j/g°C) (20°C'de)	2.42
Suda çözünürlüğü (%)	100
Oktan sayısı	108

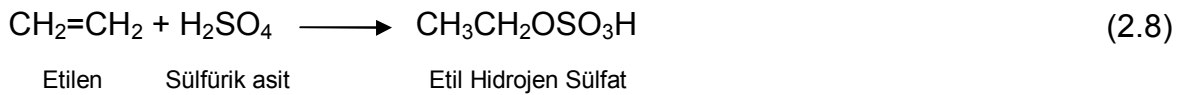
Etanolün son zamanlardaki en yaygın ve en çok araştırılan kullanım alanı ise motorlu araçlarda yakıt olarak kullanımınıdır. İçten yanmalı motorlarda kullanım için hem teknik hem ekonomik açıdan en uygun olan alkoller etanol ve metanoldür. Biyometanolden birim miktar başına elde edilebilen enerji miktarı biyoetanoldekine göre %35 daha düşük olduğu için, yapılan çalışmalar daha çok biyoetanol üzerinde yoğunlaşmaktadır. Tüm alkoller gibi etil alkolün yapısında da bulunan oksijen yanma ısısını düşürmektedir. Ayrıca etanolün oktan sayısının yüksek olması, içten yanmalı motorlu araçlarda oktan arttırıcı olarak kullanımına da olanak sağlamaktadır. İçten yanmalı motorlarda, hava ve yakıt karışımı sıkıştırıldığı zaman karışımın sıcaklığı artmakta ve karışım, buji ateşlenmeden önce tutuşmaktadır. Vuruntu olarak adlandırılan bu olay, motorun hem performansını

düşürmekte hem de ömrünü azaltmaktadır. Yüksek oktanlı yakıt kullanılarak benzinin tutuşması geciktirilebilmektedir. Bu amaçla benzine sentetik olarak üretilen oktan arttırıcı maddeler eklenmektedir; ancak toksik etkileri sebebiyle günümüzde bu kimyasallar hakkında yasal düzenlemeler yapılmakta olup alternatifleri aranmaktadır. Oktan sayısı 108 olan etil alkolün ETBE (etil tertiarü bütül eter) formunda benzine eklenmesi, son zamanlarda uygulanan bir yöntem olmakla birlikte aynı zamanda biyoetanölün günümüzdeki en yaygın kullanım şeklidir. Biyoetanöl benzine farklı oranlarda karıştırılabilmekte ve karışım bu orana göre adlandırılmaktadır. Yüzde 10 oranında etanol ve yüzde 90 oranında benzinden oluşan E10 karışımı, şu anda kullanılan içten yanmalı motorlarda modifiye gerektirmeden kullanılabilir. Motorlar modifiye edildiği takdirde yüzde 85'e kadar etanol eklenebilmektedir (Balat, 2009). Bu uygulamada karşılaşılan en büyük problemler; korozyon ve etil alkolün buhar basıncının düşük olması sebebiyle soğuk havada ilk ateşlemenin zor gerçekleşiyor olmasıdır.

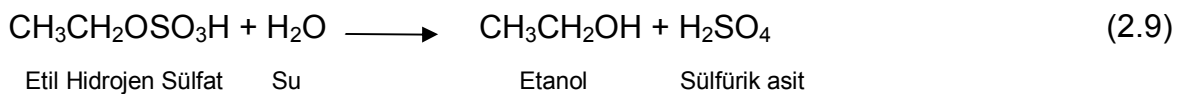
2.3.1. Etanol Üretim Yöntemleri

2.3.1.1. Etanolün Kimyasal Üretimi

Petrolün bir yan ürünü olan etilenin hidrasyonu ile etanol üretimi, yüz yıldan fazla süredir endüstriyel olarak uygulanan bir süreçtir. Söz konusu işlemi gerçekleştirmek için farklı yöntemler uygulanabilmektedir. Birinci yöntemde ilk aşamada, % 35-95 oranında etilen içeren hidrokarbon kaynağı, kolon tipi bir reaktörün içerisinde % 95-98'lik sülfürik asit çözeltisiyle muamele edilerek bir mono-sülfat yapı oluşturulur.

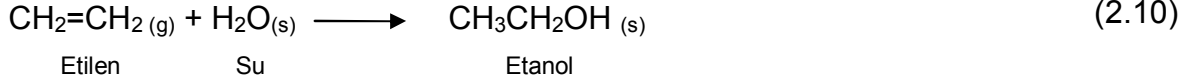


Elde edilen bileşik yeterli miktarda suyla hidroliz edilerek etanole ek olarak % 50-60'lık sülfürik asit çözeltisi de elde edilir.



Bir sıyırma kolonu kullanılarak oluşan etanol seyreltik sülfürik çözeltisinden ayrılır. Son aşamada ise sülfürik asit deriştirilerek sisteme geri beslenir.

Yukardaki proses sülfürik asit kullanılmadan doğrudan hidrasyonla da gerçekleştirilebilmektedir. Sabit yataklı reaktörde genellikle silika jel gibi gözenekli bir destek malzemesine adsorplanmış fosforik asit katalizörlüğünde etilenin su ile gerçekleştirdiği reaksiyon şu şekildedir:



Oluşan etanol sistemden distilasyonla ayrılır.

Asetilen prosesi olarak adlandırılan diğer bir yöntemde etilenin hidrasyonu, sülfürik asit ya da civa (II) sülfat gibi bir katalizör kullanılarak gerçekleştirilir.



İşlemin ikinci basamağı, genellikle oktakarbonildikobalt $[\text{Co}_2(\text{CO})_8]$ katalizörlüğünde asetaldehitin hidrojenasyonudur:

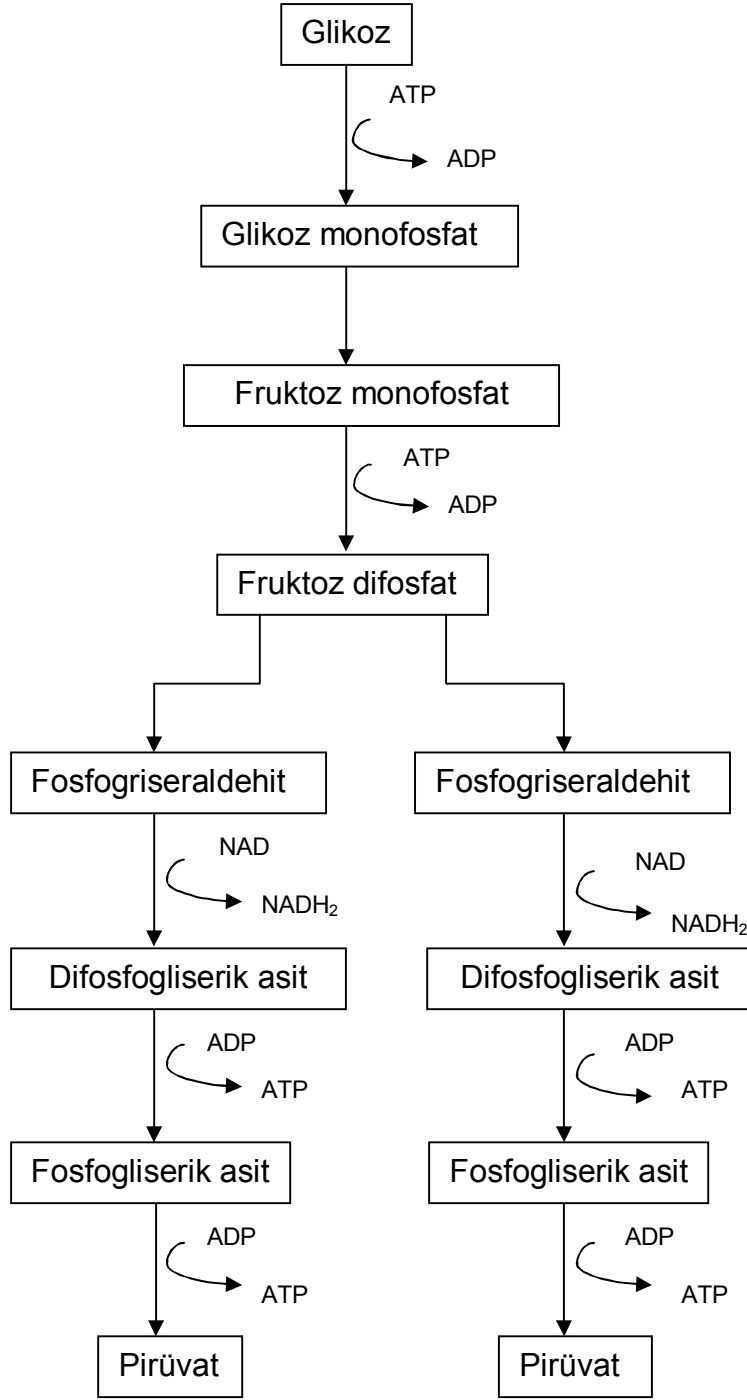


2.3.1.2. Etanolün Fermantasyonla Üretimi

Fermantasyon, genellikle anaerobik koşullarda, hücre içi metabolik olaylar sonucunda besin değeri yüksek organik bileşiklerden farklı ürünlerin oluşmasıdır. Çok uzun zamandır bilinen bir proses olan etil alkol fermantasyonunda hammadde olarak doğrudan fermente edilebilir glikoz, sakkaroz gibi şekerler kullanılabildiği gibi hidrolize edilmiş ve ön işlemlerden geçirilmiş nişasta, selülozik atıklar ve yan ürünleri de kullanılabilmektedir.

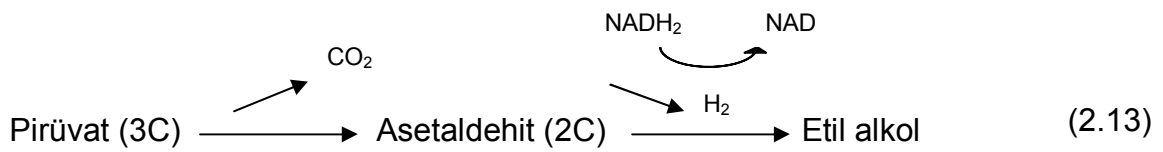
Etil alkol fermantasyonu metabolik olarak, şekerin pirüvata dönüşümü ve pirüvatin etanole dönüşümü olmak üzere iki temel basamaktan oluşmaktadır. Hammadde olarak kullanılan şeker glikoz ise, "glikoliz" adını alan pirüvata dönüşüm işlemi,

Şekil 2.1'de görüldüğü gibi gerçekleşmektedir. Glikolizin başlangıcında glikozun aktive edilmesi için bir ATP molekülü yapısındaki fosfat grubunu ortama bırakır ve bu fosfat ortamdaki glikoza bağlanarak glikoz monofosfatı oluşturur. Oluşan glikoz monofosfat, glikoz izomeraz enzimi yardımıyla fruktoz monofosfata dönüştürülür. Bu aşamada ikinci ATP'nin fosfat grubu fruktoz monofosfata bağlanarak fruktoz difosfat yapısını oluşturur. Altı karbonlu bir molekül olan fruktoz difosfat, iki adet 3 karbonlu fosfogliseraldehit molekülüne ayrılır ve her iki fosfogliseraldehit molekülü de NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotid) koenzimine elektron verip ardından da ADP molekülüne fosfat bırakarak fosfogliseric asit yapısını oluşturur. Son aşamada ise iki fosfogliseric asit molekülü de mevcut ADP moleküllerine birer fosfat grubu bağlayarak ATP molekülünü sentezler ve sonuç olarak pirüvat molekülleri ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$) oluşur.

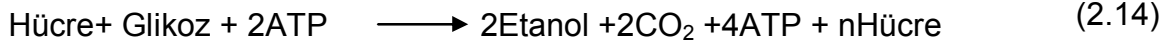


Şekil 2.1. Glikoliz prosesi

Glikolizin ardından pirüvatın etil alkole dönüşümünü ifade eden reaksiyon şu şekildedir:

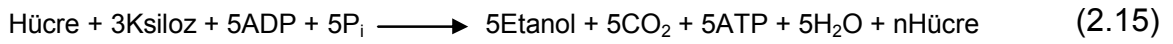


Sonuç olarak glikozdan fermantasyonla etil alkol üretiminin toplam denklemi



şeklinde gösterilebilir. Reaksiyona göre teorik verim 2 mol etanol/1 mol glikoz ya da 0.51 g etanol/g glikoz şeklinde ifade edilebilir.

Kullanılan hammaddedeki şeker beş karbonu ksiloz şekeri olduğunda, sırasıyla ksilitol, ksiluloz ve ksiluloz-5-P oluşumunun ardından pirüvata dönüşüm gerçekleşir ve sonrasında etil alkol üretilir. Ksilozdan fermantasyonla etil alkol üretiminin reaksiyonu genel olarak şu şekildedir:



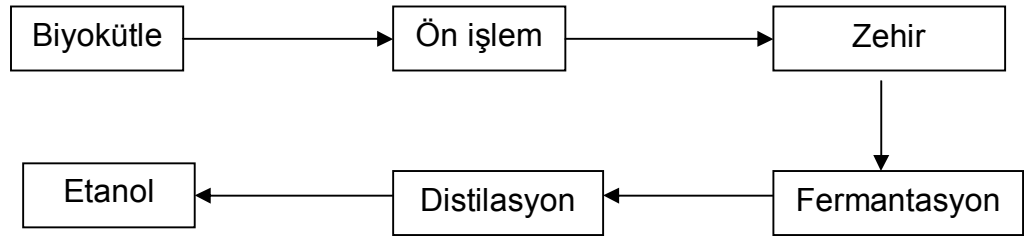
Reaksiyon stokiyometrisine göre, teorik verim 1.67 mol etanol/mol ksiloz ya da 0.51 g etanol/g ksiloz olarak ifade edilir (McMillan, 1993). Uygulamalarda teorik verime ulaşılması mümkün değildir; çünkü besin ortamındaki karbonhidrat kaynakları öncelikli olarak hücre büyümesi ve onarımı için kullanılmaktadır (Roels and Kossen, 1978).

Fermantasyonla üretilen biyoetanolün neredeyse tamamı yakıt ve yakıt katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Dünyada artan enerji krizleri ve çevre kirliliği problemleri, yakıt biyoetanolü üretimini arttırma ve üretim yöntemlerinin geliştirme çalışmalarını belirgin şekilde hızlandırmaktadır. 2007 yılında dünya çapında toplam 13.102 milyar galon yakıt etanolü üretiliyorken, 2010 yılında toplam kapasite 23.013 milyar galona ulaşmıştır. Bu üretimin 13.721 milyar galonu Kuzey ve Orta Amerika'da, 6.921 milyar galonu Brezilya'da, 1.209 milyar galonu Avrupa'da, 0.541 milyar galonu Çin'de gerçekleştirilmektedir (Hoelgaard, 2011).

Türkiye'de de biyoetanol üretimi üzerine çeşitli çalışmalar mevcut olup biyoetanolün kullanımı da bazı akaryakıt şirketleri tarafından benzinle % 2 oranında karıştırılması şeklinde gerçekleştirilmektedir. Yıllık 15 milyon galon civarındaki üretimin tamamı Türkiye Şeker Fabrikaları tarafından karşılanmakta ve hammadde olarak da şeker ve melas kullanılmaktadır. Sıradaki hedef, etanolün benzindeki oranının % 5'e çıkartılmasıyla elde edilen E5 yakıtının kullanımının yaygınlaştırılmasıdır. Türkiye'deki yıllık ortalama benzin tüketim miktarı dikkate alındığında, bu hedefin gerçekleştirilebilmesi için yılda yaklaşık 60 milyon galon

biyoetanol üretiminin gerektiği görülmektedir. Bu kapsamda, farklı biyokütlelerden üretilen etil alkol çeşitlerinin enerji değerleri ve söz konusu biyokütle kaynaklarının yetiştirilebileceği boş araziler konusunda çalışmalar halen devam etmektedir (Melikoğlu ve Albostan, 2011).

Biyokütleden biyoetanol üretebilmek için ise öncelikle biyokütlenin hidroliz edilerek şekerlerine ayrıştırılması, gerektiği takdirde mikroorganizmayı inhibe edecek zehirli maddelerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Biyokütleden hammaddeye, kullanılan mikroorganizmaya ve seçilen üretim yöntemine göre fermantasyonla etil alkol üretiminin temel basamakları Şekil 2.2'de görüldüğü gibidir (Agbogbo and Coward-Kelly, 2008).



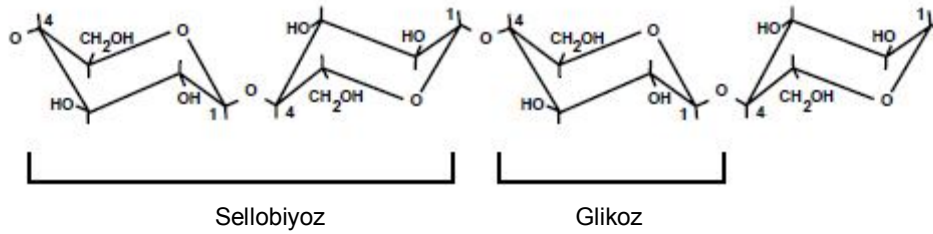
Şekil 2.2. Biyokütleden fermantasyonla etil alkol üretimi

2.3.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütle

Canlı ya da yakın zamana kadar canlı olan biyolojik kökenli maddelere biyokütle denmektedir. Biyokütleden etil alkol üretimi kapsamında pek çok tarımsal ürün, yan ürün ve atık çeşitli işlemlerden geçirilerek fermente edilebilmektedir. Ancak bu konudaki en büyük problem, biyoetanol üretiminin büyük bölümünün mısır, pancar, buğday gibi gıda elde edilen biyokütlelerin hammadde olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmesidir. Dünya nüfusunun iki milyardan fazlasının yoksullukla ve açlıkla mücadele ettiği şu günlerde bu durum hiç etik olmamakla birlikte aynı zamanda büyük tepki toplamaktadır. Bu kapsamda talebin arttığı ürünlerin fiyatları da giderek artmakta dolayısıyla açlık daha da ciddi bir problem haline gelmektedir. Ayrıca bu hammaddelerin fiyatlarındaki artışa karşın etil alkolün fiyatında artış olmaması sebebiyle kâr oranı oldukça düşük olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı büyük ölçekte biyoetanol üretilmesi için hammadde olarak maliyeti düşük ve kolay bulunan biyokütleler (biyoatık) kullanılmalıdır. Bu amaçla değerlendirilebilecek çeşitli lignoselülozik atık ve yan ürünler mevcuttur (Sendelius,

2005; Cheng et al., 2008). Bunların başlıcaları; mısır koçanı, buğday sapı, küspe, bitki atıkları, kentsel katı atıklar, gübre gibi organik maddelerdir. Bu maddeler, ya arıtılması gereken atıklardır ya da ekonomik değeri düşük, etanol üretim potansiyeli yüksek olan hayvansal besin kaynaklarıdır (Agbogbo and Coward-Kelly, 2008).

Lignoselülozik maddeleri içeren biyoatıkların kuru kütlelerinin % 90'a yakını selüloz, hemiselüloz ve ligninden, kalan kısmı ise özütlenmiş maddeler ve külden oluşmaktadır (Dehkoda, 2008). Selüloz, doğadaki bitkisel kaynaklı hammaddelerde en fazla bulunan bileşendir. Kapalı formülü $(C_6H_{10}O_5)_x$ olan selülozun bağ yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Cazemier, 1969). Glikoz moleküllerinin lineer olarak, komşu glikoz molekülüne göre 180° açı ile bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarit olan selülozun yapısına hidroliz reaksiyonuyla su eklendiğinde polisakkarit yapısı kısmen kırılırsa iki glikoz molekülünden oluşan bir disakkarit olan sellobiyoz; tamamen kırılırsa altı karbonlu bir monosakkarit olan glikoz molekülleri elde edilmektedir (Hamelinck et al., 2005).



Şekil 2.3. Selülozun yapısı

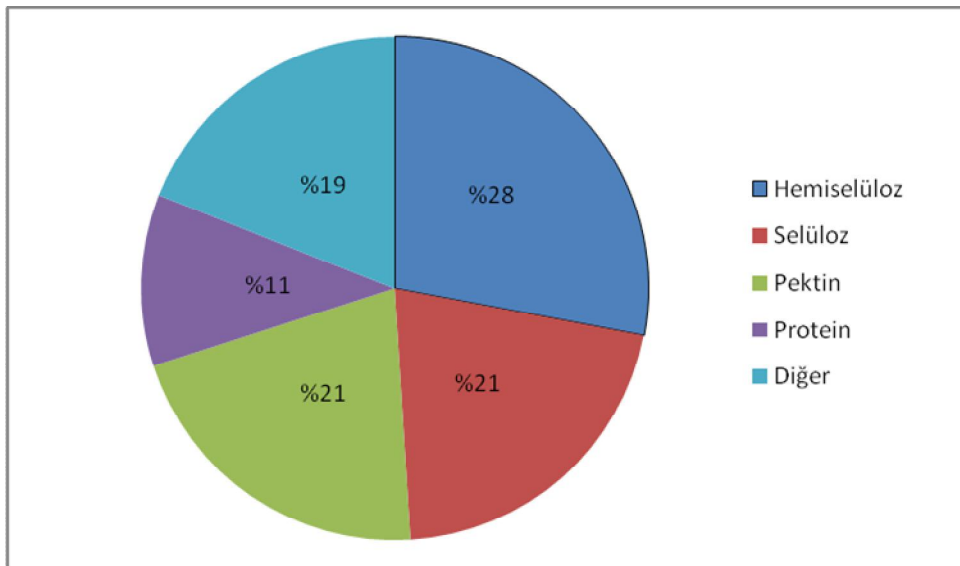
Hemiselüloz, selülozdan farklı olarak kısa, dallanmış ve bitkisel kaynağa bağlı olarak çeşitli beş ve altı karbonlu şekerlerden oluşan polimerik bir yapıdır. Yapısı temel olarak ksilandan oluşan hemiselülozun hidrolizi selüloza kıyasla daha kolay olmakla birlikte hidroliz işlemi sonrasında oluşabilecek şekerler beş karbonlu ksiloz, arabinoz ve altı karbonlu galaktoz, glikoz, mannozdur (Lee et al., 2007). Yapılan çalışmalar sonunda, sert ve odunsu yapılardaki hemiselülozun hidrolizinde en çok oluşan şekerin mannoz; tarımsal atıklardaki hemiselülozun hidrolizinde ise ksiloz olduğu şeklinde bir genelleme yapılabilmektedir (Tahezadeh and Karimi, 2008).

Lignin ise, temel olarak fenilpropan birimlerinin karmaşık matrisler oluşturacak şekilde birbiriyle bağlanmasından oluşan bir yapıdır. Bağlı olan fonksiyonel gruba göre polimerin pek çok özelliği değişmektedir (Feldman et al., 1991). Lignoselülozik maddelerden etil alkol üretiminde, selüloz ve hemiselüloz yapılarının hidroliziyle elde edilen şekerler fermente edilebilirken, ligninin fermantasyonu söz konusu değildir. Buna ek olarak ligninin parçalanması, bu işlemde verimi düşüren ve maliyeti arttıran en önemli problemlerden birisidir (Karunanithy et al., 2008).

Etil alkol fermantasyonunda kullanılabilecek bir tarımsal atık da şeker fabrikalarından çıkan şeker pancarı küspesidir.

2.3.2.1. Şeker Pancarı Küspesi

Türkiye’de yılda ortalama 4 030 000 ton şeker üretilmekte ve bu üretimin % 90’ı şeker pancarından, % 10’u ise nişastadan gerçekleştirilmektedir (Yılmaz, A., 2011). Şeker pancarı küspesi, şeker üretiminin bir yan ürünü olup, üretim sırasında pancarın kıyılmasından ve şekerin özütlenmesinden sonra geriye kalan posa kısmıdır. Pancardan şeker üretimi sırasında 1 ton şeker pancarından ortalama 193.5 gram yaş küspe çıkmaktadır ve bunun da % 25’lik kısmı kuru küttedir. Şekil 2.4’te görüldüğü üzere şeker pancarı küspesi yaklaşık olarak % 28 hemiselüloz, % 21 selüloz, % 21 pektin, % 19 kül, mineral, lignin, sakkaroz ve % 11 protein içermektedir (van der Poel et al., 1998).



Şekil 2.4. Şeker pancarı küspesinin içeriği

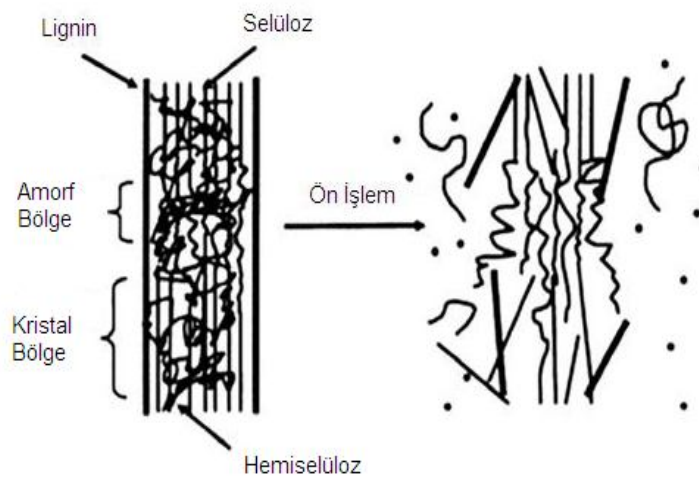
Şeker pancarı küspesinde, diğer polimerlerden daha kolay parçalanabilir bir yapı olan hemiselüloz oranının yüksek olması, bu tez çalışmasında biyoetanol üretimi için hammadde olarak seçilmesinde önemli bir etken olmuştur. 1 tonunun fiyatı ortalama 100 \$ olan küspe, ucuz olması sebebiyle büyük ölçekli üretimde tercih edilebilir bir hammaddedir (Yılmaz, A., 2011). Ayrıca içerdiği kül miktarının pek çok tarımsal atığın içerdiği miktardan daha düşük olması, küspeyi oldukça avantajlı hale getirmektedir (Cardona et al., 2009).

Daha önce de belirtildiği üzere, biyoetanol fermantasyonunda kullanılacak olan biyokütlenin çeşitli ön işlemlere tabi tutularak selüloz ve hemiselüloz yapılarının indirgen şekerlere dönüştürülmesi ve ön işlemden oluşan zehirlerin giderilmesi gerekmektedir.

2.3.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Biyokütle Uygulanan Ön İşlemler

Biyokütlenin içerdiği polisakkaritlerden indirgen şeker eldesi için çeşitli fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik ön işlem yöntemleri mevcuttur. Biyokütleyle yapılacak olan ön işlem seçilirken, şeker oluşumunu sağlaması, karbonhidratların bozunmasına engel olması, mümkün olduğunca az miktarda yan ürün ve inhibitör oluşumuna sebep olması ve maliyetinin düşük olması istenmektedir (Sun and Cheng, 2002).

Ön işlem sonrasında lignoselülozik hammaddenin yapısında meydana gelen değişiklikler Şekil 2.5'te görüldüğü gibidir (Hsu et al., 1980).



Şekil 2.5. Ön işlem öncesi ve sonrasında lignoselülozik maddenin yapısı

2.3.3.1. Fiziksel Ön İşlemler:

i) **Mekanik Öğütme:** Hammaddeyi mekanik olarak ezme ve öğütme, sonrasında uygulanacak işlemleri kolaylaştırması bakımından tercih edilen bir işlemdir.

ii) **Piroliz:** Oksijensiz ortamda hammaddenin sıcaklık etkisiyle yakılması işlemi olan piroliz yönteminin, selülozik atıklara 300°C'den yüksek sıcaklıklarda uygulandığı takdirde yapının hızlı bir şekilde bozunduğu; ancak çok miktarda atık kül oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir (Kilzer and Broido, 1965; Shafizadeh and Bradbury, 1979).

2.3.3.2. Fizikokimyasal Ön İşlemler:

i) **Buhar ile Muamele:** Öğütülmüş olan biyokütlenin yüksek basınçlı doymuş buharla muamele edilmesi temeline dayanır. Bu işlem sonunda hemiselüloz yapısı bozunmakta ve selüloz yapısının hidrolizi kolaylaşmaktadır (Grous et al., 1986).

ii) **Amonyak ile Muamele:** Hammaddenin yüksek basınç ve sıcaklıkta sıvı amonyakla muamele edilmesi işlemidir. Hem hemiselülozun yeterli oranda çözünmemesi hem de amonyakın geri kazanım işleminin zorunluluğu sebebiyle fazla tercih edilmeyen bir yöntemdir.

iii) **Karbondiyoksit ile Muamele:** Yüksek basınçta karbondiyoksitle muamele metodu kullanılarak buhar ve amonyakla muamele metodlarına göre daha düşük verimle hidroliz gerçekleşiyor olmasına rağmen, geri dönüşüm gerektirmemesi açısından amonyakla muameleden; inhibitör oluşumuna sebep olmaması bakımından buharla muameleden daha avantajlı bir yöntem olarak görülmektedir.

2.3.3.3. Kimyasal Ön İşlemler:

i) **Ozonlama:** Ozonun pek çok lignoselülozik hammaddedeki lignin ve hemiselüloz yapılarının oda sıcaklığında bozunmasını sağladığı bilinmektedir (Ben-Ghedalia and Miron, 1984; Vidal and Molinier, 1988). Ancak çok fazla ozon kullanımı gerektirdiği için ekonomik bir yöntem değildir.

ii) **Asit ile Hidroliz:** Genelde H₂SO₄ veya HCl'nin tercih edildiği bu yöntemde hammaddenin yapısına göre derişik asit veya seyreltik asit kullanılabilir.

Parçalanması hedeflenen polimerik yapı selüloz ise derişik asitle kısa zamanda hidroliz gerçekleştirilebilmektedir; ancak ekipman korozyonu, oluşan toksik bileşikler ve asidin geri kazanım zorunluluğu bu yöntemi dezavantajlı hale getirmektedir (Sivers and Zacchi, 1995). Aynı asitleri seyreltik olarak kullanıp reaksiyonu yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirmek daha ekonomik ve verimli bir metottur (McMillan, 1994). Uygun reaksiyon sıcaklığı, asit derişimi ve katı hammadde oranı tespit edildiği takdirde yüksek reaksiyon hızlarına ulaşılabilmekte ve özellikle hemiselülozdan gelen şeker yüksek verimle alınabilmektedir.

Hidroliz reaksiyonunu asidik ortamda gerçekleşmesinin temeli, asit tarafından ortama salınan protonların, hemiselüloz ve selüloz zincirlerindeki şeker monomerlerinin yapısındaki heterosiklik eter bağlarını kırabilmesine dayanmaktadır. Yapıdaki bu bağlar kırıldığında, çoğunlukla ksiloz, glikoz, sellobiyoz ve arabinoz gibi şekerler, çeşitli oligomerler, furfural ve asetik asit bileşikleri açığa çıkmaktadır.

iii) Alkali ile Hidroliz: Seyreltik NaOH ile muamelenin hammaddenin şişmesini, dolayısıyla madde içi yüzey alanının artmasını sağladığı ve maddenin kristallik derecesini azaltarak lignin matriksini bozduğu belirlenmiştir (Fan et al., 1987). Bu yöntem ayrıca hemiselülozu ve selülozu enzimle bozunmaya hazır hale getirmek amacıyla da kullanılmaktadır (Pandey et al., 2000).

iv) Oksidatif Lignin Bozunması: H₂O₂ varlığında peroksidaz enzimiyle özellikle lignin yapısının biyobozunması işlemidir. Sıcaklık, işlem süresi ve H₂O₂ derişimine göre verim değişmektedir.

v) Organosolv Prosesi: Organik asit çözeltisinin inorganik asit katalizörlüğünde kullanıldığı, lignin ve hemiselüloz bozunmasına yönelik bir işlemdir (Chum et al, 1988; Thring et al., 1990). Uzun reaksiyon süresi ve yüksek basınç gerektirmesi, çözücülerin geri kazanımı zorunluluğu, bu yöntemin temel dezavantajlarıdır (Cardona et al., 2010).

2.3.3.4. Enzimatik Hidroliz:

Hidroliz edilmek istenen polimerik yapıya uygun enzimin kullanılmasıyla fermente edilebilir indirgen şekerlerin elde edilmesidir. Yöntemin en büyük avantajı, ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi ve enerji tüketiminin düşük olmasıdır. Ancak

uygulamanın çok yavaş olması ve spesifik enzimlerin gerekiyor olması, yöntemin endüstriyel üretimde kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Cardona et al., 2010).

2.3.4. Ön İşlem Sonrası Zehir Giderme

Lignoselülozik maddelerin ön işlemlerinden sonra elde edilen hidrolizatın içerisinde bulunan bileşikler dört gruba ayrılır:

- 1) Ksiloz, glikoz, arabinoz gibi fermente edilebilir indirgen şekerler
- 2) Hemiselüloz bozunma ürünleri: Polimerlerden gelen oligomerler ve şekere bağlı asetil grupların hidroliziyle oluşan asetik asit
- 3) Lignin bozunma ürünü: Fenol
- 4) Monosakkaritlerin bozunma ürünleri: Pentozların dehidrasyonu ile oluşan furfural; heksozların dehidrasyonu ile oluşan 5-hidroksimetilfurfural

Hidrolizat ortamındaki şeker dışındaki bileşiklerin tümüne zehir denilmekte ve bunların asit, yüksek sıcaklık ve basınçla derişimlerinin arttığı bilinmektedir. Bu maddeler yüksek derişimlerde değilse hidrolizatın fermantasyonu esnasında mikroorganizmalar bu inhibitörleri tolere edebilmektedir. Örneğin mayalar için, 4 g/l'ye kadar asetik asite ve 1 g/l'ye kadar furan bileşiklerine tolerans gösterebildikleri şeklinde bir genelleme yapılabilmektedir (Pattra et al., 2008). Ancak çoğu durumda mikroorganizma büyümesi ve etil alkol üretim verimini arttırmak için fermantasyondan önce ortama bir takım zehir giderme işlemlerinin uygulanması gerekli olmaktadır.

Zehir giderme amacıyla uygulanabilecek çeşitli biyolojik, fiziksel ve kimyasal yöntemler mevcuttur. Yöntemlerin verimliliği hidrolizat bileşimine ve kullanılan mikroorganizmaya göre değişkenlik göstermektedir. Çünkü hidrolizatın inhibitör içeriği hammaddeye, hidroliz koşullarına ve yöntemlerine göre değişmekte iken, mikroorganizmaların da her inhibitöre karşı toleransı farklı olmaktadır (Linden et al., 1992; Palmqvist et al., 1998).

Biyolojik metotlarla zehir giderme işlemlerinin en yaygın kullanımı, mikroorganizmalar tarafından üretilen bir enzimin ya da mikroorganizmanın

kendisinin kullanılmasıyla inhibitörlerin uzaklaştırılması şeklindedir (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000).

Ortamdaki uçucu bileşikler buharlaştırma, ortamı seyreltme ve organik bileşiklerle inhibitörleri özütleme işlemleri fiziksel yöntemler olarak adlandırılmaktadır ve uygun hidrolizatlara uygulandığı takdirde yüksek verimle etanol üretimi sağlanabilmektedir (Palmqvist et al., 1999).

Kimyasal zehir giderme yöntemleri içerisinde en verimli olan ise hidrolizatı ortam pH'ı 9-10 olacak şekilde bir alkali ile muamele etmektir. Bu uygulamanın tercih edilmesinin sebebi yüksek pH'da ortamdaki inhibitörlerin kararsız hale gelmeleri ve ayrıca alkali ile birlikte çökmeleridir. Bu amaçla en çok tercih edilen kimyasallar Ca(OH)_2 , NaOH ve KOH'tir. Bu işlemin ardından H_2SO_4 veya HCl kullanarak pH 5.5-6'ya ayarlanmaktadır (Van Zyl et al., 1988). Söz konusu yöntemle furan türevi bileşiklerin %45.8, fenol bileşiklerinin %35.9 oranında giderilebildiği görülmüştür. En önemli dezavantajlar ise asetik asit gideriminin sağlanamaması ve fermente edilebilir indirgen şeker miktarında kayıp olmasıdır (Chandel et al., 2007).

Nötralizasyon da tercih edilen kimyasal yöntemlerden birisidir. Temelde yapılan işlem, hidrolizattaki asitleri nötralize edip tuz oluşmasını sağlayacak kimyasallar eklemektir. Bu tuzlar düşük çözünürlüklüdür ve filtrasyonla ayrılabilir (Carvalho et al., 2002).

Tek başına uygulandığında furan türevi bileşiklerin % 38.7'sini, fenol bileşiklerinin % 57'sini ve asetik asitin % 46.8'ini giderdiği görülen aktif karbonla adsorpsiyon yöntemi ise, daha fazla inhibitör giderimi sağlayabilmek için diğer yöntemlerden önce veya sonra da uygulanabilir (Chandel et al., 2007).

2.4. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar ribozomal RNA analizlerine göre genel olarak iki ana grupta incelenebilir:

1. Prokaryotlar: Hücre yapıları ökaryotik hücreye benzeyen öbakteriler ve uç çevre koşullarında yaşayan arkebakteriler bu gruba aittirler.

2. Ökaryotlar: Oldukça gelişmiş canlılar olmakla birlikte hücre yapılarında farklılıklar bulunmaktadır. Mantarlar (şapkalı mantarlar, küfler ve mayalar), tek hücreli hayvanlar (protozoalar) ve su yosunları (algler) bu gruba girmektedirler.

Bu canlılar biyokimya mühendisliği kapsamında enzim ve protein ayırma, medikal uygulamalar, çeşitli ürünlerin eldesi, genetik çalışmalar ve atık su arıtımı gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Pekin, 1983; Aksu, 1988; Kargı, 1993; Walker, 2000).

Bakteriler, mayalar ve tek hücreli alglerin hücreleri % 75-80 oranında sudan; kalan kuru ağırlıkları ise proteinler, lipidler, polisakkaritler ve nükleik asitlerden oluşmaktadır. Mantarların hücre yapısı daha karmaşık olmakla birlikte, kuru hücre ağırlıklarının büyük kısmı hücre duvarının yapı maddesi olan inert polisakkarit bileşiklerden oluşmaktadır.

Mikroorganizmaların gelişmesi ve üreyebilmesi için gerekli şartları sağlayan (ortam pH'ı, sıcaklık, nemlilik, çözülmüş oksijen) ve gerekli besin maddelerini içeren ortama besin ortamı denir. Uygun koşullar sağlanmadığı takdirde mikroorganizmalar ya ölürler ya da adapte olurlar. Adaptasyon sağlayabilmesi ortam bileşenlerine ve mikroorganizmanın söz konusu bileşenlere karşı toleransına bağlıdır.

Mikroorganizmaların ideal besin ortamında bulunması gereken besin maddeleri enerji kaynağı, mineral kaynağı ve azot kaynağı olarak üçe ayrılmaktadır.

Enerji kaynağı

Ototrof mikroorganizmalar, büyüme ve sentez için gerekli enerjiyi karbon kaynağı olarak karbondioksiti veya çözülmüş bikarbonatları kullanarak içerdiği klorofil a ve b pigmentleri katalizörlüğünde güneş enerjisinden sağlar. Karanlıkta ise gerekli enerjiyi glikoz ve sakkaroz gibi organik kökenli karbon kaynaklarından temin eder. Heterotrof mikroorganizmalar ise büyüme ve sentez için gerekli enerjiyi karbon kaynağı olarak kullandıkları nişasta, şeker, organik asitler, yağlar ve hidrokarbonlardan elde eder. Özellikle şeker türü maddeler bu mikroorganizmaların büyümesini etkileyen ve üremeyi sınırlayan ana besin maddesidir.

Karbon kaynaklarını parçalayabilme özellikleri ve parçalama şekilleri mikroorganizmaya göre değişmektedir. Mikroorganizmalar normal koşullarda kullanamadığı bir hidrokarbonu adapte edildikten sonra enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir (Ralph, 1967; Aksu, 1988).

Azot kaynağı

Azot kaynağı olarak genelde NH_4 ve NO^{-3} gibi anorganik azotlu maddeler tercih edilmektedir. Bu maddelerin olmadığı durumlarda ürin, pürin, aminoasitler, pepton, maya özütü, protein gibi organik azot kaynakları da kullanılabilir.

Mineral kaynağı

Mikroorganizmaların azot ve karbon kaynaklarından farklı olarak element halinde O, H, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, Ni, V, B ve Na elementlerine ihtiyaç duymaktadırlar (Pekin, 1983). Bu elementlerin çoğu mayaların gelişiminde ve ürün üretme verimlerinde doğrudan etkilidir.

2.4.1. Mikrobiyal Büyümeye Etki Eden Faktörler

i) Ortam pH'ı

Besin ortamındaki hidronyum iyonu derişimi olan pH, mikroorganizmaların besinlerden yararlanma verimleri üzerinde etkili bir parametredir. Hücre zarından besin transferini sağlayan enzimlerin optimum bir pH değeri vardır. Düşük ve yüksek pH değerleri bu enzimlerin aktivitelerinin düşmesine sebep olduğu için hücre büyümesini de yavaşlatmaktadır. Ayrıca dış ortamın asidik olması hücre içerisine hidronyum iyonu transferine; bazik olması ise hidroksit iyonu transferine neden olduğu için hücredeki organellerin çalışması olumsuz etkilenir ve hücre gelişimi yavaşlar.

ii) Sıcaklık

Sıcaklık, mikroorganizmanın biyolojik aktivitesini doğrudan etkileyen etkenlerden birisidir. Mikroorganizmaların gelişebildiği bir sıcaklık aralığı ve bu aralıkta bir optimum değer vardır.

iii) Çözünmüş Oksijen İhtiyacı

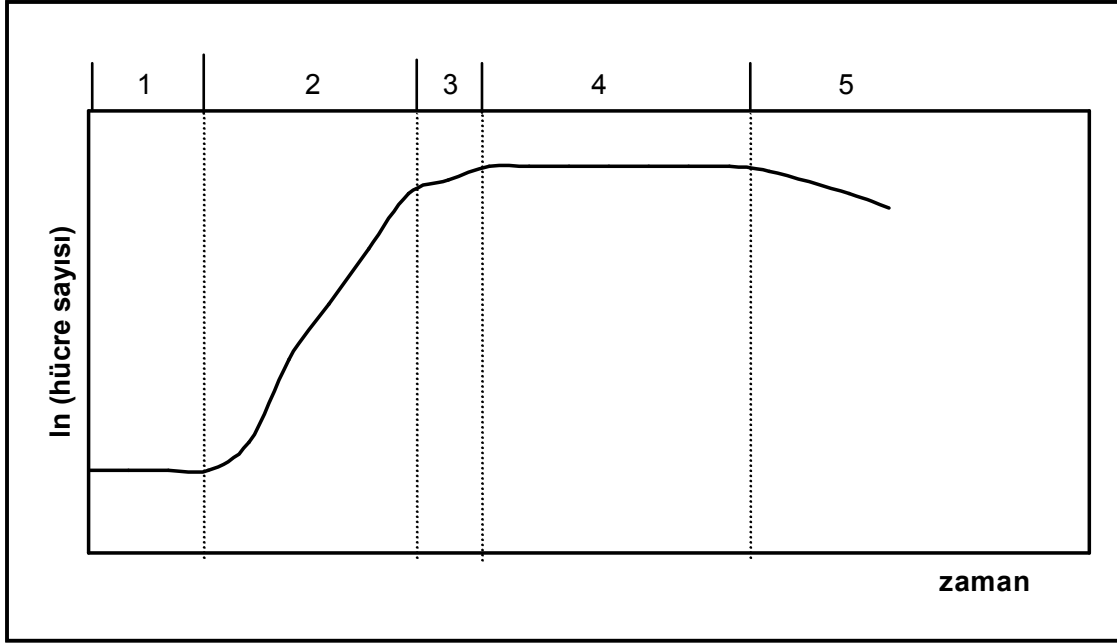
Mikroorganizmanın gelişebilmesi için havadan besin ortamının yüzeyine difüzyonla transfer olan oksijene ihtiyacı vardır. Sürekli karıştırma uygulamak, substratın oksijenle temasını arttırdığından bu işlemi de hızlandırmaktadır (Pekin, 1983; Kargı, 1993; Walker, 2000).

iv) Engelleyici Maddeler (İnhibitörler)

Besin ortamında, mikroorganizmanın büyümesini olumsuz yönde etkileyen bileşiklere inhibitör denilmektedir. Fenol, pestisit gibi kimyasallardan ya da yüksek substrat veya ürün derişiminden kaynaklanan inhibisyon etkileri görülebilmektedir. Özellikle fermantasyon proseslerinde ürünün belli bir derişime ulaştığında mikroorganizma üzerinde toksik etkisi olduğu bilinmektedir (Kargı, 1993). Mikroorganizmaların inhibitörlere karşı toleransı ve adaptasyon yeteneği ortamdaki bileşenlere, mikroorganizmanın yapısına ve o andaki fizyolojik durumuna bağlı olarak değişmektedir (Öztürk, 1999).

2.4.2. Mikrobiyal Üreme

Genel olarak mikroorganizmalarda besin ortamına üremiş ortamdan kültür ilave edilmesinden sonra görülen çeşitli üreme evreleri vardır. Bu evreler Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Mikroorganizmanın üremesine bağlı olarak da substrat tüketimi gerçekleşir. Üreme mikroorganizmanın sayısal artışı veya kütleli artışı şeklinde olur (Pekin 1983; Kargı, 1993).



(1. Gecikme evresi, 2. Logaritmik veya üstel üreme evresi, 3. Duraklama evresi, 4. Sabit evre, 5. Ölüm evresi)

Şekil 2.6. Mikroorganizma üreme evreleri

Gecikme evresi, mikroorganizmanın besin ortamına alıştıktan hemen sonraki evredir. Hücrelerin yeni ortama uyum sağlayıp çoğalmaya başlayıncaya kadarki geçen süredir. Bu evrede hücre sayısı değişmezken, hücre kütlesinde çok az artış olabilir. Ortama adapte olan mikroorganizmaların en yüksek hızda büyüdüğü evre ise logaritmik veya üstel üreme evresidir. Bu evrede hücre sayısı ve kütlesi zamanla üstel olarak artar. Bütün hücre bileşenleri aynı hızla büyüdüklerinden ortalama hücre bileşimi sabit kalır. Bir ya da daha fazla gerekli besin maddesinin tükenmesi veya toksik yan ürünlerin birikmesi sonucu büyümenin yavaşladığı evre duraklama evresidir. Duraklama evresinden sonra başlayan sabit evrede üreme hızı ölüm hızına eşittir. Bu evrede net büyüme hızı sıfır olmasına rağmen hücreler metabolik olarak aktiftir ve ikincil metabolitleri üretirler. Mikrobiyal kinetiğin son evresi ölüm evresidir. Ölme hızı üreme hızına oranla oldukça fazladır (Pekin, 1983; Shuler ve Kargı, 1992).

Biyokütlenin etil alkole fermantasyonunda ön işlem koşullarına ve ortamdaki bileşenlerin türüne göre çeşitli mikroorganizmalar kullanılabilir ve bunlardan en önemlisi mayalardır.

2.4.3. Mayalar

İnsanlar tarafından binlerce yıldır kullanılmakta olan mayaların günümüzde çok çeşitli kullanım alanları mevcuttur. Mayalar kullanılarak endüstriyel ölçekte üretilen başlıca ürünler ekmek mayası, alkol, çeşitli enzimler, pigmentler, bazı gıda asitlendiricileridir. Biyosorpsiyon ve biyobirikim yöntemleriyle atıksuların arıtımı, mayaların çevre biyoteknolojisi alanındaki en temel kullanım alanlarından ve konuyla ilgili araştırmalar halen devam etmektedir. İlaç endüstrisinde de yer alan mayalar, aşı üretimi ve tedaviye yönelik proteinlerin, hormonların ve kan faktörlerinin eldesinde kullanılmaktadır.

Mayalarla etanol fermantasyonu, hammadde olarak biyolojik kökenli kaynakların kullanılmaya başlamasıyla, maya biyoteknolojisinin son yıllardaki en popüler uygulamalarından biri olmuştur. Bu yöntemle üretilen etanolün genellikle yakıt olarak kullanımı tercih edilmektedir. Kullanılan kaynakların yenilenebilir olması ve kullanımı sırasında doğadaki karbon dengesini bozmaması nedeniyle mayalarla gerçekleştirilen bu işlemin gelecekte daha geniş uygulama alanı bulacağı ön görülmektedir.

Etil alkol fermantasyonunda en çok kullanılan mikroorganizmalar olan mayalar, mantar ailesinin geniş bir bölümünü oluşturan küçük ve tek hücreli canlılardır. Yapılarının büyük çoğunluğunu su; geri kalan kısmını ise karbonhidratlar, yağlar, aminoasitler, peptitler, vitaminler ve enzimler oluşturmaktadır. Hücre şekilleri genellikle küresel, silindirik veya ovaldir ve hücre çapları ortalama 1-10 µm aralığında değişmektedir. Yaşadıkları ortam koşullarına bağlı olarak çeşitli hücresel farklılıklar görülebilmektedir (Walker, 2000).

Mayaların üremeleri genellikle bölünerek ya da tomurcuklanarak olmaktadır. Bölünerek çoğalan maya hücreleri, hücre ortasından bölünerek bir ara bölme oluşturur ve hücrenin buradan ikiye ayrılmasıyla aynı büyüklükte iki yavru hücre oluşur. Tomurcuklanarak çoğalan mayalar, uygun çevre koşulları bulurlarsa tomurcuklanma ile bir hücreden bir veya daha çok çıkıntı meydana gelir ve bunlar yeni hücreler halinde gelişir. Gelişen bu hücreler daha sonra ana hücreden ayrılır. Tomurcuklanarak çoğalan bir maya hücresi yaklaşık 50-55 defa tomurcuklanabilmektedir.

Heterotrof mikroorganizmalar olan mayaların gelişebilmeleri ve yaşamsal aktivitelerini sürdürebilmeleri ortam şartlarına ve ortamdaki besin maddelerine bağlıdır. Mayaların üremesini en çok etkileyen ortam koşulları pH, sıcaklık ve havalandırmadır.

Düşük pH değerlerinde üreyebilen mayaların gelişebilmeleri için optimum pH değerlerinin genellikle 4-5.5 arasında değiştiği bilinmektedir. Ancak fermantasyon proseslerinde pH zamanla değişmektedir. Kullanılan azot kaynağı da bu değişimi yönlendiren etkenlerden birisidir. Örneğin azot kaynağı olarak amonyum kullanıldıysa, amonyağın hücre tarafından kullanılması sebebiyle pH düşer ve hidrojen iyonları ortama serbest bırakılır. Azot kaynağının nitrat bileşikleri olduğu durumda ise nitratı amonyağa indirgemek için hidrojen iyonları ortamdaki uzaklaştırılır. Hücresel faaliyetler sırasında bazlar veya organik asitlerin üretildiği durumlarda da ortamın pH değeri değişmektedir. Karbondioksitin ortama eklenmesi ya da ortamdaki uzaklaştırılması işlemlerinin de pH üzerinde büyük etkisi vardır. pH değerinin tüm proses boyunca sabit kalması için pH kontrollü sistemler kullanılabilir.

Mayaların üreyebildikleri sıcaklık aralığı 0-50°C arasında değişse de geneli için optimum sıcaklık değeri 25-30°C arasındadır. Sıcaklık, mayaların metabolizmasını doğrudan etkileyen bir parametre olduğu için, ortam sıcaklığının optimum değerden düşük ya da yüksek olması hücresel aktivitelerini oldukça yavaşlatmaktadır.

Havalandırmanın maya hücre metabolizması üzerinde daha kompleks etkileri mevcuttur. Genel olarak aerobik koşullarda hücre büyümesinin hızlı olduğu; ancak etil alkol gibi bazı ürünlerin fermantasyonunu anaerobik koşullarda gerçekleştirebildikleri bilinmektedir (Shuler ve Kargı, 1992).

Mayalar için ortamdaki besin bileşenlerinin çeşidi ve miktarı da en az ortam koşulları kadar önem taşımaktadır. Karbonhidratlar, hücre büyümesini kontrol eden ve kısıtlayan bileşikler olması sebebiyle en önemli besin kaynaklarıdır. Azot, fosfor, kalsiyum, magnezyum gibi bileşikler de hücre gelişimini doğrudan etkilemektedir.

Lignoselülozik hidrolizattan etanol üretiminde kullanılan genetik olarak modifiye edilmemiş başlıca maya hücreleri *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* ve *Pachysolen tannophilus*'tur. Bunlardan *S. cerevisiae*, altı karbonlu şekerleri yüksek verimle fermente edebilmesine karşı beş karbonlu şekerleri kullanamamaktadır. Beş karbonlu şekerleri de fermente edebilen diğer üç maya türüyle başlangıç substrat derişiminin 50 g/l olduğu durumda gerçekleştirilen etil alkol fermantasyonları sonunda elde edilen verim değerleri; *C. shehatae* için 0.19 g/l.h, *P. tannophilus* için 0.28 g/l.h, *P. stipitis* için ise 0.34 g/l.h bulunmuştur (du Preez and van der Walt, 1983; Woods and Millis, 1985; Tran and Chambers, 1986).

Bu tez çalışmasında ise şeker pancarı küspesi hidrolizatının etil alkole fermantasyonunda *P. stipitis* maya hücreleri kullanılmıştır.

2.4.3.1. *P. stipitis*

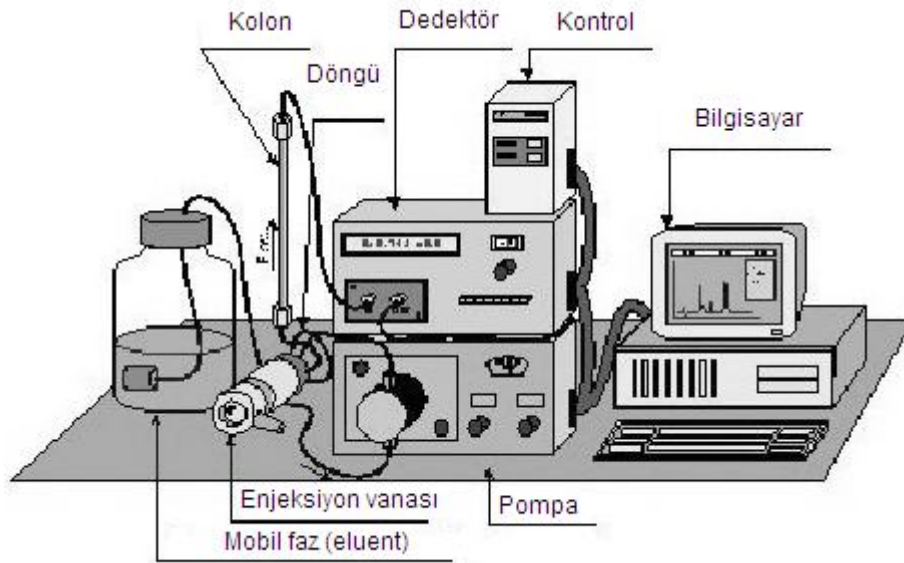
P. stipitis hücreleri, 3-5 µm boyutunda, krem rengine yakın renkli hücrelerdir. Tomurcuklanarak üremeleri sebebiyle şekilleri tam küresel ya da elips değildir. Çürümekte olan tahtadan ve ağaçlarda yaşayan böceklerin larvalarından izole edilen bir maya grubuna ait bir mikroorganizma olması sebebiyle (Toiviola et al., 1984) orman atıklarında mevcut olan glikoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, sellobiyoz şekerlerinin tümünü fermente edebilmektedir (Parekh and Wayman, 1986; Jeffries et al., 2007). Hem ön işlemler sırasında oluşabilecek pek çok kimyasala (furfural, hidroksimetil furfural gibi) hem de etanole karşı toleransı yüksek olması, kontaminasyona karşı büyük bir direncinin olması ve hücre duvarının kalın olması sebebiyle endüstriyel olarak çalışmaya uygun bir maya türüdür (Agbogbo and Coward-Kelly, 2008; Slininger et al., 2009).

P. stipitis'in büyümesinde, etil alkol üretim veriminde ve inhibitörlere karşı toleransının gelişmesinde kültür yaşının ve besin ortamında kullanılan bileşenlerin çok önemli rolü vardır. Yapılan çalışmalarda amino asitlerin etanol verimini ve etanole karşı toleransını arttırdığı, azot kaynaklarının büyümeye bağı olmayan etanol üretimini sağladığı ve ortamdaki zehirli bileşiklerin inhibisyon etkisini azalttığı, magnezyumun redoks dengesinde önemli rol oynadığı, vitaminlerin ise hücre büyümesini geliştirmesine rağmen etanol verimini etkilemediği görülmüştür (Mahler and Nudel, 2000; Slininger et al., 2006; Slininger et al., 2009).

Hücre büyümesi için optimum sıcaklık aralığı 25°C-33°C; optimum pH aralığı ise 4.5-5.5 olarak belirlenmiştir (du Preez at al., 1986). Yüksek havalandırma hızında sadece hücresel büyümenin olduğu; etil alkolü ancak anaerobik koşullarda ya da düşük havalandırma hızı sağlanan ortamlarda üretebildiği deneysel olarak belirlenmiştir (du Preez, 1994). Ancak yapılan çalışmalarda ksilozun hücre içine taşınımının enerji gerektiren bir proses olduğu, oksijenli ortamda büyüyen hücrenin enerjisinin yüksek olduğu ve oksijensiz ortamda hücrenin yavaş büyüdüğü görülmüştür (Rizzi et al., 1989). Bu sebeple, *P. stipitis* mayasının anaerobik etil alkol fermentasyonunda, şekerin hücre içine taşınması kısıtlayıcı basamaktır (Ligthelm et al., 1988).

2.5. HPLC Sistemleri

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Sistemi, temel olarak pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemdeki en önemli kısım, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram adını alır.



Şekil 2.7. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.5.1. Sürekli Faz

HPLC uygulamalarında sürekli faz (eluent) türü ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde kullanılan sürekli fazların yüksek saflık derecesinde, düşük viskozitede, kimyasal olarak inert, dedektör ile uyumlu ve uygun fiyatlı olmaları ve örneği çözebilmeleri gerekmektedir.

Her bir HPLC türünde kullanılan sürekli fazlar birbirinden farklıdır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar polar çözücüler sürekli faz olarak kullanılır. Büyüklükçe ayırma kromatografisinde (Size-exclusion Chromatography, SEC) ise kullanılan çözücüler polimer örneğini çözebilmeli ama dolgu materyali ile kimyasal etkileşime girmemelidir. Doğru molekül ağırlığı tayininde bu çok önemlidir.

2.5.2. Sabit Faz

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir. Adsorbentlerin 3-10 µm partikül boyutunda ve olabildiğince eş boyutlu olmaları, 70-300 Å gözenek boyutu ve 50-250 m²/g yüzey alanına sahip olmaları istenmektedir.

2.6. Biyoatıklardan Biyoetanol Fermantasyonunda Bugüne Kadar Yapılan Çalışmaların Özetlenmesi

Son yıllarda araştırmacılar çeşitli biyoatıkları ve yan ürünleri değişik yöntemlerle hidroliz ederek çeşitli mikroorganizmalarla etanol eldesi üzerine pek çok çalışmayı gerçekleştirmişlerdir.

Patra ve ark. (2008), şeker kamışı küspesinin, hacimce % 0.25 ile % 7 arasında değişen derişimlerde H₂SO₄ kullanarak otoklavda 121°C'de 15-240 dakika arası süreyle hidrolizini gerçekleştirmişler ve hammaddenin belirtilen sıcaklıkta hacimce % 0.5 derişiminde H₂SO₄ ile 60 dakika hidrolizi ile en yüksek toplam indirgen şeker derişimi değerine (24.5 g/l) ulaştıklarını belirtmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda hidrolizatta 11 g/l glikoz, 11.29 g/l ksiloz, 2.22 g/l arabinoz, 2.48 g/l asetik asit, 0.12 g/l furfural olduğunu belirlemişlerdir. Asit derişiminin % 0.5'ten % 1'e çıkarılmasının

hidrolizattaki glikoz derişimini değiştirmediği; % 0.1'den % 5'e çıkarılmasının ise glikoz derişiminin azalmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Nilvebrant ve ark. (2000), ladin ağacı atıklarının seyreltik asitle hidrolizini gerçekleştirmişler ve elde ettikleri hidrolizatta bulunan, fermantasyonu inhibe edebilecek bileşiklerin giderimi üzerinde çalışmışlardır. Bu kapsamda hidrolizatın pH'ını hem NaOH ile hem de Ca(OH)₂ ile 10'a çıkararak, her iki yöntemle de furfural ve hidrosimetilfurfural ile asidik ortamda lignin bozunmasıyla oluşan Hibbert ketonlarının giderim oranlarını kıyaslamışlardır. Sonuç olarak; NaOH kullanıldığında Hibbert ketonlarında % 22 giderim sağlanabilmişken Ca(OH)₂ kullanıldığında bu oran % 30'a çıkmıştır. Furan bileşikleri ise her iki yöntemle de % 20 oranında uzaklaştırılabilmiştir.

Palmqvist ve ark., (1999), lignoselülozik hidrolizatlardaki fermantasyonu olumsuz etkileyen bileşiklerin gideriminde alternatif yöntemleri deneyerek hidrolizatı *S. cerevisiae* mayası ile fermantasyona hazırlamışlardır. pH 10'da anyon değiştirme ve aşırı kireçleme yöntemlerinin uygulandığı hidrolizattan söz konusu mayayla yüksek etanol üretim verimi elde edilmiş; ancak hidrolizat tek başına lakkaz enzimiyle muamele edildiğinde etanol üretim verimi düşük olmuştur. Lakkaz enzimi anyon değiştirme ile birlikte uygulandıında toplam fenol bileşiklerinin % 80'i, zayıf asit bileşiklerinin tamamına yakını ve furan bileşiklerinin % 70'inin giderildiği görülmüştür. Ancak anyon değiştirme yöntemi uygulandıında fermente edilebilir indirgen şekerlerin de miktarında azalma olduğu belirlendiği için bu yöntemin uygulanabilir olmadığı belirtilmiştir.

du Preez ve ark. (1986), *Pichia stipitis* mayasının ksilozu fermantasyon verimine başlangıç substrat derişiminin etkisinin incelemişler ve optimum ksiloz derişiminin 50 g/l olduğunu tespit etmişlerdir.

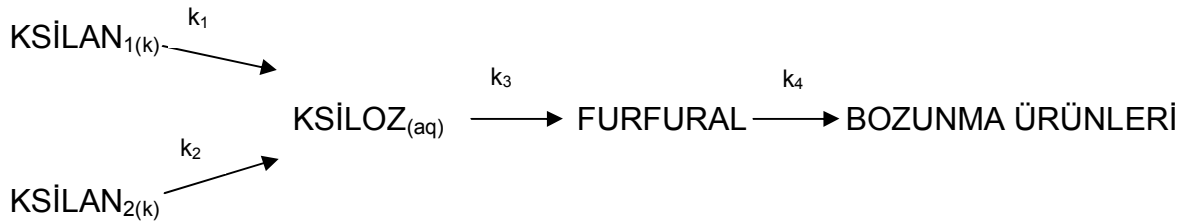
Agbogbo ve ark., (2007), *Pichia stipitis* mayasının ksilozu fermantasyonuna başlangıçtaki aşı derişiminin etkisini araştırmışlardır. Deneylerde, başlangıç ksiloz derişimi 120 g/l olan sentetik besin ortamı hazırlanmış, ortamlara farklı derişimlerde aşı verilerek 192 saat sonunda oluşan etanol derişimleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, başlangıç hücre derişimi 1.8 g/l olduğunda 20.9 g/l etanol; 4.3 g/l olduğunda 34.3 g/l etanol ve 6.5 g/l olduğunda 41.1 g/l etanol elde edilmiştir. Sonuçlara etanol verimi açısından bakıldığında, 1.8 g/l aşı derişiminde 0.36 g/g;

4.3 g/l ve 6.5 g/l aşı derişimlerinde ise 0.38 g/g etanol elde edilmiştir. Bu durumun temel nedeninin, başlangıç aşı derişiminin belli bir değerin üstünde olmasıyla maya hücrelerinin substratı hücrel olarak büyümekten çok etanol üretimi için kullanmaları olduğu belirtilmiştir.

3. DENEY SİSTEMİNİN MATEMATİKSEL TANIMLANMASI

3.1. Hidroliz Reaksiyonu Kinetiği

Biyokütle yapısındaki hemiselüloz polimerini basit monomerlere parçalamak için kullanılan yöntemlerden birisi de sülfürik asit, hidroklorik asit, fosforik asit gibi asitlerle biyoatığın hidrolizidir. Asidik ortamda hidroliz tepkimesi şeklinde gerçekleştirilen işlem, birbiriyle ilişkili olan oldukça karmaşık basamaklardan oluşmaktadır ve bu sistemleri tanımlayan farklı modeller önerilmiştir. Bunlar içerisinde en geçerli olan ve ksilan baz alınarak kurulan modele göre hemiselüloz yapının büyük bölümü ksilandan oluşmaktadır ve ksilan, kolay hidroliz edilen kısım ($Ksilan_1$) ve zor hidroliz edilen kısım ($Ksilan_2$) olarak ikiye ayrılmaktadır. Ksilanların farklı tepkime hızlarında ksiloza dönüşmesinin ardından, ksiloz furfurala ve furfural da bozunma ürünlerine dönüşmektedir. Aşağıda sunulan model temel olarak sıvı fazda birinci dereceden seri tepkime dizilerinden oluşmaktadır (Lavarack et al., 2000).



İzotermal çalışan kesikli karıştırmalı reaktörde herhangi bir "i" tepkiyeni için tepkime hızının zamana ve madde miktarına bağlı ifadesi Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2'deki gibidir.

$$\frac{dN_i}{dt} = r_i V \quad (3.1)$$

$$\frac{d(C_i V)}{dt} = r_i V \quad (3.2)$$

Bu eşitliklerde;

N_i : i maddesinin mol sayısı (mol)

C_i : i maddesinin derişimi (g/l)

r_i : i maddesinin tepkimedede harcanma hızı (mol/l.sa)

V : Hacim (l)

t : Zaman (sa)'dır.

Tepkime ortamı hacmi sabit olduğunda Eşitlik 3.3 elde edilir.

$$r_i = \frac{dC_i}{dt} \quad (3.3)$$

Tepkime esnasında birinci dereceden harcanan i tepkiyi için tepkime hız ifadesi Eşitlik 3.4'teki gibidir.

$$r_i = -kC_i \quad (3.4)$$

Burada;

k :Tepkime hız sabiti (1/sa)'dir.

t=0 anında $C_i = C_{i_0}$, t=t anında $C_i = C_i$ sınır koşulları ile Eşitlikler 3.3 ve 3.4 birlikte çözümlerse Eşitlik 3.5 elde edilir.

$$C_i = C_{i_0} e^{-kt} \quad (3.5)$$

Eşitlik 3.3, modeldeki K_{silan_1} ve K_{silan_2} bileşikleri için yazıldığında Eşitlikler 3.6 ve 3.7 elde edilir.

$$r_{A_1} = \frac{dC_{A_1}}{dt} = -k_1 C_{A_1} \quad (3.6)$$

$$r_{A_2} = \frac{dC_{A_2}}{dt} = -k_2 C_{A_2} \quad (3.7)$$

Bu eşitliklerde;

r_{A_1} : K_{silan_1} 'in tepkimedeki harcanma hızı (mol/l.sa),

C_{A_1} : K_{silan_1} 'in t anındaki derişimi (g/l),

k_1 : K_{silan_1} 'in harcanma tepkimesinin hız sabiti (1/sa),

r_{A_2} : K_{silan_2} 'nin tepkimedeki harcanma hızı (mol/l.sa),

C_{A_2} : K_{silan_2} 'nin t anındaki derişimi (g/l),

k_2 : K_{silan_2} 'nin harcanma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)'dir.

Eşitlikler 3.6 ve 3.7'nin çözümleri Eşitlikler 3.8 ve 3.9 ile gösterilebilir.

$$C_{A_1} = C_{A_{1,0}} e^{-k_1 t} \quad (3.8)$$

$$C_{A_2} = C_{A_{2,0}} e^{-k_2 t} \quad (3.9)$$

Bu eşitliklerde;

$C_{A_{1,0}}$: K_{silan_1} 'in başlangıç derişimi (g/l),

$C_{A_{2,0}}$: K_{silan_2} 'nin başlangıç derişimi (g/l)'dir.

Ksiloz sistemde hem üretildiği hem de harcandığı için sabit hacimli kesikli reaktörde net hız ifadesi Eşitlik 3.10'daki gibi yazılabilir.

$$r_{B,\text{net}} = \frac{dC_B}{dt} = k_1 C_{A_1} + k_2 C_{A_2} - k_3 C_B \quad (3.10)$$

Burada;

$r_{B,\text{net}}$: Ksiloz için net tepkime hızı (mol/l.sa),

C_B : Ksilozun t anındaki derişimi (g/l),

k_3 : Ksilozun harcanma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)'dir.

Eşitlik 3.8, 3.9 ve 3.10 birlikte çözüldüğünde ksiloz derişiminin zamanla değişim ifadesi olan Eşitlik 3.11 bulunur.

$$C_B = C_{B_0} e^{-k_3 t} + \frac{k_1 C_{A_{0,1}}}{k_3 - k_1} e^{-(k_1 + k_3)t} + \frac{k_2 C_{A_{0,1}}}{k_3 - k_2} e^{-(k_2 + k_3)t} \quad (3.11)$$

Bu eşitlikte;

C_{B_0} : Ksiloz maddesinin başlangıç derişimi (g/l)

Furan bileşiklerinin oluşma ve bozunma hızı arasındaki farkı ifade eden net tepkime hızı Eşitlik 3.12'de görölmektedir.

$$r_{C,\text{net}} = \frac{dC_C}{dt} = k_3 C_B - k_4 C_C \quad (3.12)$$

Burada;

$r_{C,\text{net}}$: Furan bileşikleri için net tepkime hızı (mol/l.sa),

C_C : Furan bileşiklerinin t anındaki derişimi (g/l),

k_4 : Furan bileşiklerinin bozunma tepkimesinin hız sabiti (1/sa)'dir.

Eşitlikler 3.11 ve 3.12 birlikte çözüldüğünde elde edilen Eşitlik 3.13, furan bileşiklerinin derişiminin zamanla değişim bağıntısını vermektedir.

$$C_C = C_{C_0} + \frac{k_3 C_{B_0}}{k_4 - k_3} (e^{-k_3 t} - 1) + \left(\frac{k_3}{k_4 - k_1 - k_3} \right) \left(\frac{k_1 C_{A_{0,1}}}{k_3 - k_1} \right) (e^{-(k_1+k_3)t} - 1) \quad (3.13)$$

$$+ \left(\frac{k_3}{k_4 - k_2 - k_3} \right) \left(\frac{k_2 C_{A_{0,2}}}{k_3 - k_1} \right) (e^{-(k_2+k_3)t} - 1)$$

Bu eşitlikte;

C_{C_0} : Furan bileşiklerinin başlangıç derişimi (g/l)'dir.

Tez çalışmasında hammaddeye ve reaksiyon koşullarına göre farklılık gösteren bu tepkime hız sabitlerinin sayısal değerleri, non-lineer regresyon analiz yöntemiyle bulunmuştur.

3.1.1. Başlangıç Toplam İndirgen Şeker Oluşum Hızı

Hidroliz tepkimesinde toplam indirgen şeker başlangıç hızı, oluşan toplam indirgen şeker derişimine karşı zaman grafiğinin $t=0$ anındaki eğim değeri g toplam indirgen şeker/l-sa cinsinden hesaplanmıştır.

3.2. Mikroorganizmanın Özgül Üreme Hızı

Kesikli sistemde üstel üreme evresinde mikroorganizma derişiminin zamanla değışimi özgül üreme hızı ile ifade edilir ve Eşitlik 3.14 ile verilir (Pekin, 1983; Shuler ve Kargı, 1992).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.14)$$

$t=0$ anında $X=X_0$, $t=t$ anında $X=X$ sınır koşullarında Eşitlik 3.14'ün integrasyonu ile Eşitlik 3.15 elde edilir.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (3.15)$$

Bu eşitliklerde;

μ : Özgül üreme hız sabiti (1/sa),

X : Kuru mikroorganizma derişimi (g kuru mo/l),

t : Zaman (sa)' dır.

$\ln(X/X_0)$ 'e karşı t grafiğinin üstel üreme evresindeki eğimi özgül üreme hız sabitini verir.

3.3. Mikroorganizmanın Substrat Tüketim Hızı

Üstel üreme evresinde substrat tüketim hızı ise Eşitlik 3.16'da tanımlandığı şekildedir (Pekin, 1983; Kargı, 1993).

$$\eta = -\frac{1}{X_m} \frac{dS}{dt} \quad (3.16)$$

Bu eşitlikte;

S : Substrat derişimi (g/l),

X_m : Üstel üreme evresinin sonunda elde edilen kurutulmuş mikroorganizma derişimi (g/l),

η : Substrat tüketim hızı (g substrat / g kuru mo-sa)' dir.

Substrat derişimine karşı zaman grafiğinin üstel üreme evresindeki eğimi, üstel üreme evresinin sonunda elde edilen kurutulmuş mikroorganizma derişimine bölünerek substrat tüketim hızı bulunur.

3.4. Üretkenlik ve Mikroorganizmanın Ürün Oluşum Hızı

Mikrobiyal ürünler, mikroorganizmanın ürünü hücresel üremenin hangi evresinde ürettiğine sınıflandırılabilir. Üremeye bağlı ürün oluşumu, hücre üremesiyle eş zamanlı olarak gerçekleşir (Şekil 3.1) ve bu durumda üretkenlik ve ürün oluşum hızı Eşitlikler 3.17 ve 3.18'de belirtildiği şekilde tanımlanır.

$$\dot{U} = \frac{dP}{dt} \quad (3.17)$$

$$q_P = \frac{1}{X_m} \frac{dP}{dt} \quad (3.18)$$

Burada;

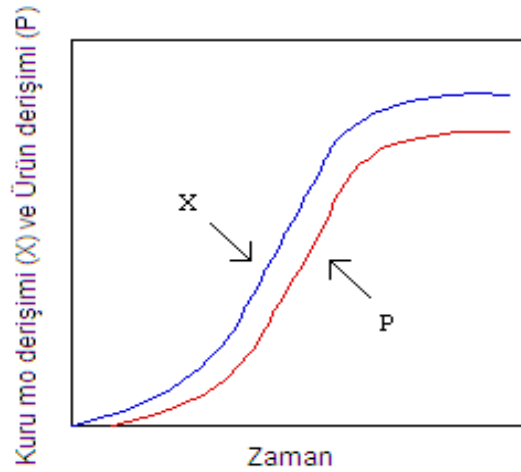
Ü : Üretkenlik (g ürün/l-sa),

q_P : Ürün oluşum hızı (g ürün/g kuru mo-sa),

P : Ürün derişimi (g/l),

t : Zaman (sa)'dır.

Ürün derişimine karşı zaman grafiğinin üstel üreme evresindeki eğimi ile üretkenlik, bu değerin X_m 'ye bölünmesiyle ise özgül ürün oluşum hızı bulunur.



Şekil 3.1. Üremeye bağlı ürün oluşumu

3.5. Şeker Kaynağı Olarak Sadece Ksiloz İçeren Besin Ortamında Büyüme Kinetiğinin Modellenmesi

Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumda özgül üreme hızı ile mikroorganizmanın üreme hızını kontrol eden besin maddesi (substat) arasındaki ilişki Monod eşitliği ile verilir (Eşitlik 3.19) (Pekin, 1980; Kargı, 1992).

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (3.19)$$

Burada;

μ_m : En yüksek özgül üreme hızı (1/sa),

K_s : Doygunluk sabiti (g/l)'dir.

Eşitlik 3.19'un doğrusallaştırılmış şekli Eşitlik 3.20 ile gösterilebilir:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} \quad (3.20)$$

$1/\mu$ 'ye karşı $1/S$ grafiğinin y eksenini kesim noktasından μ_m ; doğrunun eğiminden ise K_s bulunur. Düşük K_s değeri mikroorganizmanın düşük substrat derişimlerinde de hızlı ürediğini gösterir.

4. DENEYSEL YÖNTEMLER

4.1. Şeker Pancarı Küspesinin Hidrolizi

Ankara Şeker Fabrikası'ndan yaş olarak temin edilen şeker pancarı küspesi saf su ile birkaç kere yıkanıp iyice sıkıldıktan sonra 100°C'de etüvde (Binder) kurutulmuştur. Küspe hidroliz işleminden önce öğütücü değirmende (IKA®-Werke MF 10 Basic) mekanik olarak öğütüldükten sonra elek analizi yapılarak farklı boyut aralıklarında tanecikler elde edilmiştir. Değişik boyut aralıklarındaki küspe tanecikleri, derişimi 0.10 M-0.75 M arasında değişen H₂SO₄ (Merck) çözeltisi ile asidik hidrolize tabi tutularak, küспенin hemiselüloz yapısının ksiloz, arabinoz vb. indirgen şekerlere parçalanması sağlanmıştır. Ancak hidroliz esnasında zehir olarak tabir edilen asetik asit, furfural, 5-hidroksimetil furfural, fenol gibi etanol fermantasyonunda kullanılacak mikroorganizmanın üremesini olumsuz etkileyecek ara bileşikler de oluşmaktadır.

Hidroliz deneyleri için çapı 10.3 cm ve yüksekliği 14.2 cm olan pyrex cam ve ona bağlı geri soğutucudan oluşan özel bir izotermal reaktör sistemi yaptırılmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Reaktör kapağı kapatıldığında reaksiyon ortamından buhar ve sıvı çıkışını engellemek için reaktörün ağızı düzleştirilmiş ve uygun boyutta bir o-ring takılmış olan kapağın dışarıdan da kelepçeyle tutturulmasıyla boşluk kalmayacak şekilde oturması sağlanmıştır. Kapak, reaktörden örnek alınabilecek ve üzerine geri soğutucu, karıştırıcı mili, değişik proplar takılabilecek şekilde tasarlanmıştır. Reaksiyon ortamının homojenliğini sağlamak için kullanılan karıştırma sistemi, karıştırıcı motor (Heidolph RZR 2021) ve bu motorun ucuna paslanmaz çelik bağlantı elemanlarıyla takılan 5 cm çapında paslanmaz çelik eğik bıçaklı pervaneden oluşmaktadır. Ortamdaki sulu çözeltinin yüksek sıcaklıklarda buharlaşmasını engellemek için kapağa 40 cm boyunda spiralli bir geri soğutucu takılmış ve çözeltinin hızla yoğunlaştırılabilmesi için, geri soğutucunun bağlı olduğu soğutucu motordaki (Lauda E 100) suyun sıcaklığı düşük değerlerde olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyonun izotermal olarak gerçekleşmesini sağlamak amacıyla ceket sıvısı olarak, hem ortam sıcaklığını sabit tutabilen, hem de kaynama sıcaklığının 140°C'dan büyük olması nedeniyle yüksek sıcaklıklarda da kullanılabilen silikon yağ (Sigma Aldrich 85409) tercih edilmiştir.



Şekil 4.1. Asidik hidroliz tepkimelerinin gerçekleştirildiği deney sistemi



Şekil 4.2. Asidik hidroliz tepkimelerinin gerçekleştirildiği reaktör

Asidik hidroliz deneyleri 500 ml'lik çözelti hacminde gerçekleştirilmiştir. İstenilen çalışma sıcaklığına getirilen belli derişimdeki H_2SO_4 çözeltisine belirlenen miktarda küspenin ilave edildiği an deneyin başlangıç anı olarak kabul edilmiş ve belirli zaman aralıklarında reaksiyon ortamından alınan örneklerde toplam indirgen şeker (hepsi ksiloz kabul edilmiştir) ve toplam furan bileşiklerinin (furfural ve 5-hidroksimetil furfural) analizleri yapılarak, bu bileşenlerin zamanla değişimleri incelenmiştir. Hidroliz deneylerinde karıştırma hızının, tanecik boyutunun, hammaddenin toplam çözeltideki oranının ifadesi olan katı/sıvı oranının, sıcaklığın ve asit derişiminin etkileri araştırılmıştır. Bu parametrelerin çalışılan aralık değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Asidik hidrolizde denenen parametrelerin çalışılan aralık değerleri

Parametre	Çalışılan Değerler
Tanecik boyut aralığı	0.088-0.177 mm 0.707-1.000 mm 1.000-1.410 mm
Karıştırma hızı	50 rpm 100 rpm 200 rpm
Katı/sıvı oranı	1/100 1/50 1/25
Sıcaklık	60°C 90°C 110°C
Asit Derişimi	0.10 M 0.30 M 0.55 M 0.75 M

Altı saat süren tepkime sonucunda, reaktörde kalan hidrolizat, zehir giderme işlemine tabi tutulmak üzere kullanılmak üzere mavi banttı süzülmüştür. Sıvıyı yüksek verimde ve hızlı bir şekilde ayırabilmek için süzme işlemi vakum altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Bu işlem için vakum pompasına (KNF Neuberger) bir Nuçe erleni takılmış ve lastik tıpa ile erlenin üstüne takılan Nuçe hunisinin delikleri tamamen kapanacak şekilde filtre kâğıdı yerleştirilmiştir.

4.2. Hidrolizata Uygulanan Ön İşlemler

Hidroliz reaksiyonundan sonra oluşan hidrolizat, reaksiyon koşullarına bağlı olarak değişen miktarlarda indirgen şekerleri ve zehir bileşiklerini içermektedir. Verimli bir fermantasyon işlemi için, fermantasyondan önce ortamdaki zehirli bileşiklerin

mümkün olduğunca yüksek oranda giderilmesi gerekmektedir. Bu amaçla deneysel çalışmalarda dört farklı yöntem uygulanmıştır.

1. Yöntem: İlk olarak, literatürden bu tür hidroliz proseslerinde en yüksek furan gideriminin sağlandığı ticari aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme yöntemi uygulanmıştır. Bu kapsamda hidrolizat, derişimi 20 g/l olacak şekilde hazırlanan 0.15 mm tanecik boyutundaki ve 1456 m²/g yüzey alanına sahip ticari aktif karbonla (Merck) 30°C sıcaklıkta 24 saat süreyle muamele edilmiş ve zehirlerin büyük kısmının adsorplanması sağlanmıştır. Ardından hidrolizatın pH'ı CaO ile 10'a çıkartılarak bu bileşikler kararsız hale getirilmiş ve derişik H₂SO₄ çözeltisiyle ile pH 6'ya düşürülerek, bu bileşikler çöktürülmüştür (Arslan, Y., 2007). Fermantasyonda kullanılacak sıvıyı bu maddelerden tam olarak ayırabilmek için, karışıma vakum ortamında iki defa süzme işlemi uygulanmıştır.

2. Yöntem: Bu yöntemde ise şeker pancarı küspesi adsorbent olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda hidrolizat, kurutulmuş, öğütülmüş ve elek analizine tabi tutulmuş, kimyasal ve fiziksel başka işlem görmemiş 0.420-0.707 mm tanecik boyut aralığındaki derişimi 20 g/l olacak şekilde hazırlanan şeker pancarı küspesiyle 30°C sıcaklıkta 24 saat süreyle muamele edilerek furan derişimine bakılmıştır.

3. Yöntem: Bu yöntemde, öğütülüp 0.500 mm'lik elekten geçirilmiş ve sıcaklığın 650-750°C arasında kademeli olarak yükseltildiği, içerisinden sürekli olarak azot gazının geçirildiği kül fırınında (Lindberg Blue M 1100 Tube Furnace) aktif karbon haline getirilmiş kurutulmuş şeker pancarı küspesi adsorbent olarak kullanılmıştır (Sezer, K., 2010). Birinci yöntemde uygulanan işlemler aynı şekilde bu yöntemde de uygulanarak şeker pancarı küspesinden elde edilmiş olan aktif karbonun % furan giderimine bakılmıştır.

4. Yöntem: Furan bileşiklerinin yüksek pH değerlerinde kararsız hale gelmesi özelliğinden yararlanarak, ortama katıldığında ortam pH'ını yükselten bir atık olan uçucu külle de zehir bileşiklerinin adsorpsiyona bakılmıştır. Bu yöntem uygulandığında, ikinci basamak olan aşırı kireçlemeye gerek kalmayacağı düşünülmüştür. Hidrolizattaki uçucu kül derişimi 20 g/l olduğunda, ortam pH'ı 10'a çıkmış ve bu pH değerinde 30°C sıcaklıkta 24 saat süreyle adsorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra derişik H₂SO₄ ile pH 6'ya düşürülmüştür.

4.3. Fermantasyon Çalışmaları

4.3.1. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizma ve Üreme Koşulları

Yapılan tez çalışmasında zehiri giderilmiş hidrolizattan fermantasyonla biyoetanol üretiminde United States Department of Agriculture'dan liyofilize halde getirilen *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124) mayası kullanılmıştır. Maya ilk olarak, 10 g/l glikoz, 3 g/l maya özütü, 3 g/l malt özütü ve 5 g/l pepton içeren ve pH 5.5'e ayarlanmış steril besin ortamına aktarılmıştır. Bu amaçla 100 ml besin ortamı içeren 250 ml'lik erlenler ağzuları pamuk ve gazlı bezden oluşan tıkaçlarla ve alüminyum folyolarla sıkıca kapatılmış ve 121°C'de 1.1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Ekilmiş erlenler 25°C'da 100 rpm karıştırma hızında çalışan çalkalamalı inkübatöre (Medline SI-600R) konularak 3 gün süresince bekletilmiştir.

İkinci aşamada fermantasyon deneylerinde maya hücrelerinin ksiloz şekerini fermente edebilmesi istendiğinden maya hücrelerinin ksiloza adaptasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında besin ortamı, şeker dışındaki tüm bileşenlerinin miktarları ilk yapılan ekimde hazırlanan ortamdaki miktarlarla aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Maya, toplam şeker miktarı 10 g/l olan ve glikoz-ksiloz oranları % 25 ksiloz-% 75 glikoz; % 50 ksiloz-% 50 glikoz; % 75 ksiloz-% 25 glikoz ve % 100 ksiloz olan besin ortamlarına sırasıyla % 5 aşı derişimiyle aktararak ksiloza adapte edilmiştir.

4.3.2. *P. stipitis*'in Hidrolizat Ortamına Adaptasyonu ve Üretilmesi

P. stipitis'in elde edilen hidrolizat ortamına, gerek hidrolizatın içerdiği şekerlere, gerekse zehir giderme işlemi uygulanmasına rağmen zehirlerin % 100 giderimi sağlanamadığı için kalan zehirlere alışması amacıyla bir seri deney gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda bundan sonraki adaptasyon ve fermantasyon deneylerinde temel olarak 5 gruptan oluşan besin çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış, sterillenmiş ve ekim sırasında karıştırılarak mikroorganizmanın ekimine ve üretimine hazır hale getirilmiştir.

1. Hidrolizat Çözeltisi: Etanol üretiminde kullanılacak şeker derişiminin 50 g/l olması gerektiğinden hidrolizattaki şeker derişimini arttırmak için 500 ml reaksiyon ortamında, asit derişiminin 0.3 M, sıcaklığın 110°C, katı/sıvı oranının 1/10, tanecik boyutunun 0.707-1.000 mm olduğu koşullarda asidik hidroliz gerçekleştirilmiş ve

reaksiyon sonunda elde edilen hidrolizata, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme zehir giderme işlemi uygulanarak elde edilen çözelti artan oranlarda (hacimce % 20, % 40, % 60, % 80 ve % 100 olacak şekilde) fermantasyon besin ortamına eklenmiştir. Hidrolizat besin ortamına eklenmeden önce sterilleme amaçlı olarak 0.2 mikronluk filtreden (Sartorius) geçirilmiştir. Katı/sıvı oranının hidroliz reaksiyonunun optimizasyonunda belirlenenden farklı olarak kullanılmasının nedeni, bu koşullarda ortalama 50 g/l toplam indirgen şeker elde edilebilmesidir.

2. Şeker (Ksiloz) Çözeltisi: Toplam çözeltideki derişimi 10 g/l olacak miktarda ksiloz, belli miktardaki distile suda çözülmüştür.

3. Şeker Dışı Kaynaklar: Toplam çözeltideki derişimleri 3 g/l maya özütü, 3 g/l malt özütü, 5 g/l pepton olacak şekilde tartılan maya özütü, malt özütü ve pepton belli miktardaki distile suda çözümlü pH'ı 5'e ayarlanmıştır.

4. Destek Bileşen Çözeltisi: Toplam çözeltideki derişimleri 2 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l K_2HPO_4 , 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, olacak şekilde tartılan $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ bileşikleri belli miktardaki distile suda çözümlü pH'ı 6.5'e ayarlanmıştır.

5. İz Element Çözeltisi: Toplam çözeltideki derişimleri 2.5 g/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2.7 g/l $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 1.69 g/l $MnSO_4 \cdot 6H_2O$, 2.42 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 2.87 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.38 g/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ olacak şekilde tartılan $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $MnSO_4 \cdot 6H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H$ bileşikleri belli miktardaki saf suda çözülmüş, üzerine 0.2 ml/l olacak şekilde derişik H_2SO_4 eklenmiş ve çözeltinin pH'ı 6.5'a ayarlanmış ve sterillemiştir. Bu çözeltiden besin ortamına 1 ml/l olacak şekilde eklenmiştir.

Mayanın değişik oranlarda hidrolizat içeren ortamlara alıştırılması amacıyla yukarıdaki çözeltilerin karıştırılmasıyla elde edilen 100 ml'lik besin ortamından öncelikle 20 ml çekilmiş ve sadece ksiloz + diğer besin bileşenlerini içeren besin ortamına adapte edilmiş ve üç günlük süreyle üretilmiş kültür ortamından 20 ml aşı alınarak hidrolizatl besin ortamına eklenmiş ve maya hücrelerinin üremesi beklenmiştir. İlk olarak hacimce % 20 hidrolizat içeren besin ortamına (18 g/l hidrolizat şekeri+10 g/l sentetik ksiloz) alıştırılan mikroorganizmanın bu şekilde

aktarmalara devam edilerek daha yüksek oranda hidrolizat içeren besin ortamlarına alıştıırılması sağlanmıştır.

4.3.3. Fermantasyon

Fermantasyon çalışmaları, 100 ml çalışma hacmine sahip 250 ml'lik steril erlenlerde sabit 30°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızında çalışan çalkalamalı inkübatörde kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. Erlenlerin ağızları pamuklu tıkaç ve parafilm ile sıkıca kapatılarak fermantasyonun tamamen havasız ortamda gerçekleşmesi sağlanmıştır. Deneyler zehiri giderilmiş hidrolizat içeren besin ortamına alıştıırılarak üç günlük süreyle üretilerek üstel üreme evresine gelmiş mikroorganizma çözeltisinden 5 ve 20 ml aşı alınarak, eklenecek aşı kadar miktarda çözeltinin uzaklaştırıldığı besin ortamına eklenmesiyle başlatılmıştır.

4.4. Analiz Yöntemleri

Küspenin asidik hidrolizinde, hidroliz ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örnekler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş (MPW-251) ve sıvı kısımda toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşiklerinin analizleri yapılmıştır.

Fermantasyon ortamından belirli zaman aralıklarında steril olarak alınan örnekler de aynı şekilde santrifüjlenerek, sıvı kısımda toplam indirgen şeker ve etanol analizleri, dipte çöken kısımda ise mikroorganizma analizi yapılmıştır.

4.4.1. Toplam İndirgen Şeker Derişimi Tayini

Hidrolizat ve fermantasyon ortamlarından alınan örneklerdeki toplam indirgen şeker derişimi g/l cinsinden şekerlerin DNS çözeltisiyle verdiği sarı renkli kompleks yardımıyla spektrofotometrik olarak (Thermo Scientific Genesys 10 UV) 575 nm'de absorbans okunarak tayin edilmiştir (Forouchi et al., 1983) (EK-1).

4.4.2. Toplam Furan Bileşikleri Derişimi Tayini

Alınan hidrolizat örneğindeki toplam furan bileşikleri derişimi mg/l cinsinden seyreltilmiş örnek çözeltisinin spektrofotometrik olarak 283 nm'de ve 320 nm'de absorbansı okunarak tayin edilmiştir (Martinez et al., 2000) (EK-2).

4.4.3. Mikroorganizma Derişimi Tayini

Fermantasyon ortamından alınan örnekteki yaş maya derişimi g/l cinsinden spektrofotometrik olarak 600 nm'de absorbans okunarak tayin edilmiştir. Daha sonra yaş- kuru ağırlık mikroorganizma çalışma doğrusundan yararlanarak kuru mikroorganizma derişimine geçilmiştir (EK-3).

4.4.4. Etanol Derişimi Tayini

Fermantasyon ortamından alınan örnekteki etanol derişimi HPLC sisteminde (Shimadzu, Japonya) Refraktif İndeks Dedekörü (Refractive Index Detector-RID) kullanılarak, sülfonik asit bağı poliakrilat kolon ile tayin edilmiştir. 0.2 ml akış hızında, 24 bar basınçta, gerçekleştirilen analizlerde mobil faz olarak 0.0025 N H₂SO₄ çözeltisi kullanılmıştır (EK-4).

5. DENEYSEL SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında tarımsal bir yan ürün olan şeker pancarı küspesi, seyreltik H_2SO_4 ile asidik hidrolize uğratarak içerisindeki selüloz, hemiselüloz, pektin gibi polimerik yapıların basit indirgen şekerlere dönüştürülmesi sağlanmış ve sıcaklık, tanecik boyutu, karıştırma hızı, katı/sıvı oranı, asit derişimi parametrelerinin şeker verimine etkileri incelenmiştir. Ayrıca farklı sıcaklık ve asit derişimlerinde oluşan tepkimeler için bir kinetik model geliştirilerek tepkime hız sabitleri bulunmuştur. Daha sonra hidroliz esnasında oluşan furan bileşiklerinin giderimi için aktif karbonla adsorpsiyon+aşırı kireçleme, kurutulmuş şeker pancarı küspesine adsorpsiyon, aktif karbon haline getirilmiş şeker pancarı küspesiyle adsorpsiyon, uçucu külle adsorpsiyon gibi alternatif yöntemler denenmiştir.

Son olarak da sentetik besin ortamında üretilen *Pichia stipitis* mayasının farklı yöntemlerle zehirli giderilmiş hidrolizat içeren besin ortamlarına adaptasyonu sağlanarak, bunlardan % 100 hidrolizat içeren besin ortamında mikroorganizmanın üremesi ve biyoetanol üretimi incelenmiş ve ayrıca % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamlarında mikroorganizmanın üremesi ve biyoetanol üretim verimine aşı derişiminin etkisi araştırılmıştır.

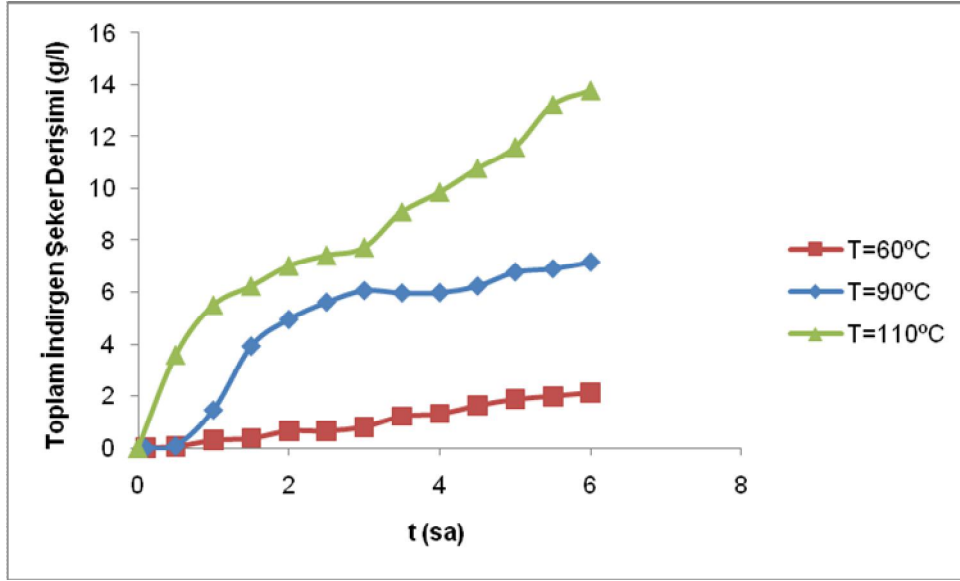
Deneysel sonuçların değerlendirilmesinde bütün küspe hemiselülozünün ksilan yapıdan oluştuğu ve ksilanın ksiloz (toplam indirgen şeker)a ve çok az bir kısmının da toplam furan bileşiklerine dönüştüğü varsayılmıştır.

1.1. Şeker Pancarı Küspesinin Asidik Hidrolizine Etkiyen Parametreler

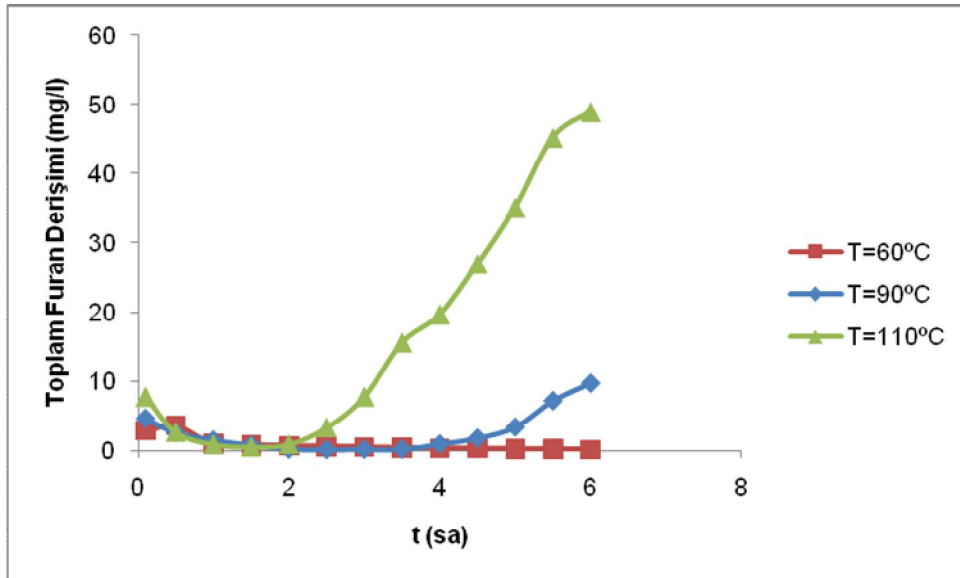
1.1.1. Tepkime Sıcaklığının Etkisi

Sıcaklığın toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşiklerinin oluşumuna etkisini incelemek amacıyla, 500 ml hacmindeki 0.1 M H_2SO_4 çözeltisine 10 g 1.000-1.410 mm tanecik boyut aralığında küspe eklenerek 1 g/50 ml katı/sıvı oranı sağlanmıştır. Altı saat sürdürülen deneyler 100 rpm karıştırma hızında sıcaklık 60°C'de, 90°C'de ve 110°C'de tutularak gerçekleştirilmiştir. Toplam indirgen şeker ve toplam furan derişimlerinin zamanla derişimlerinin sunulduğu Şekil 5.1 ve 5.2 incelendiğinde, hem toplam indirgen şekerin hem de furan bileşiklerinin oluşum miktarlarının ve hızlarının sıcaklıkla belirgin şekilde arttığı görülmektedir. Bu sonucun temel nedeni, sıcaklığın artmasıyla, tepkimeye giren moleküllerin

enerjilerinin de artmasının sonucunda aktivasyon enerjisi bariyerini aşan molekül sayısının da artmasıdır. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda elde edilen toplam oluşan ve birim küspenin oluşturduğu şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları ise Çizelge 5.1.'de sunulmuştur. Bu çizelgeden de sıcaklık arttıkça tepkime hızının ve oluşan şeker miktarının arttığı görülmektedir.



Şekil 5.1. Tepkime sıcaklığının toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D_p=1.000-1.410 mm)



Şekil 5.2. Tepkime sıcaklığının furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D_p=1.000-1.410 mm)

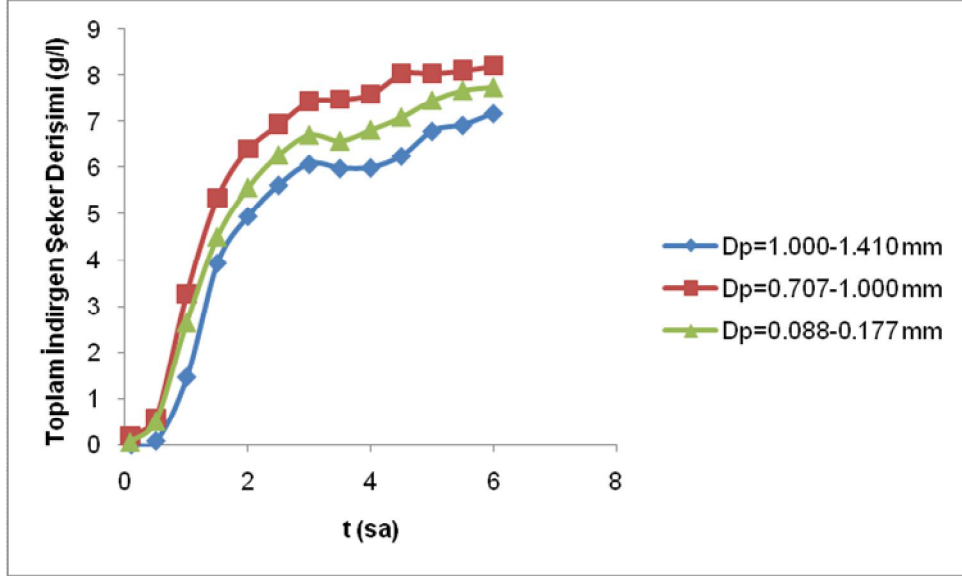
Çizelge 5.1. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları

Sıcaklık (°C)	İndirgen Şeker Oluşum Tepkimesinin Başlangıç Hızı (g/l-sa)	Tepkime Sonucunda Oluşan Şeker Derişimi (g/l)	g Kuru Küspe Başına Oluşan Toplam İndirgen Şeker Miktarı (g şeker/g kuru küspe)
60	0.313	2.12	0.106
90	3.854	7.18	0.539
110	7.184	13.77	0.689

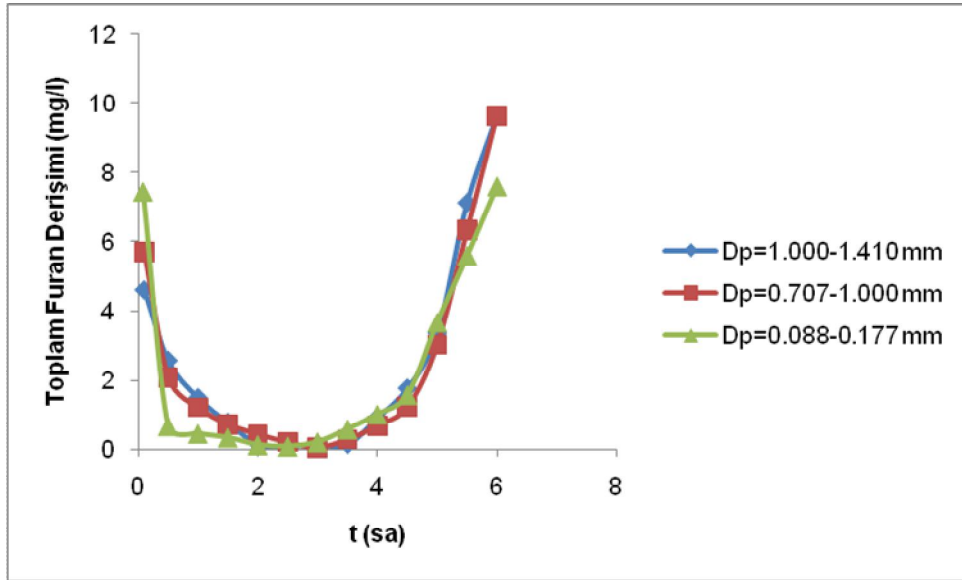
1.1.2. Tanecik Boyutunun Etkisi

Tanecik boyutunun toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşiklerinin oluşumuna etkisi, 0.088-0.177, 0.707-1.000 ve 1.000-1.410 mm boyut aralıklarında hazırlanan taneciklerle 1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi katı/sıvı oranında ve 90°C'de 6 saat süreyle incelenmiştir. Toplam indirgen şeker derişiminin zamanla değişim eğrileri Şekil 5.3'te, elde edilen hız ve şeker miktarları ise Çizelge 5.2'de verilmiştir. Tanecik boyutu şeker ve furan dönüşümünü çok fazla etkilememekle birlikte 0.707-1.000 mm tanecik boyut aralığında en yüksek hız ve dönüşüm değerleri elde edilmiştir. Tanecik boyutu küçüldükçe yüzey alanının artması hem taneciklerin birbirleriyle çarpışma olasılığını hem de katı taneciklerin sıvı yüzeyle temasını arttırmıştır. Tanecik boyutunun daha da küçülmesi tanecikteki tepkimeye girecek aktif bölgeleri azalttığından şeker dönüşümü azalmıştır.

Aynı çalışma koşullarında toplam furan bileşikleri derişiminin zamanla değişimi de Şekil 5.4'te sunulmuştur. Şekilden çalışılan her üç tanecik boyut aralığında da başlangıçta bir miktar toplam furan bileşiklerinin oluştuğu, bunların bozunmaya devam ederek derişimlerinin sıfırlandığı ve ksilanın ksiloza dönüşmesine bağlı olarak zamanla tekrar derişimlerinin arttığı gözlenmektedir. Asidik hidroliz tepkimesinin başlangıcında bir miktar furan bileşiklerinin oluşmasının nedeni olarak kurutulmuş küспенin yapısında yer alan çok az miktardaki sakkarozun furan bileşiklerine dönüştüğu düşünülebilir. Yine tanecik boyut aralığının 0.707-1.000 mm olduğu durumda en yüksek toplam furan bileşikleri oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 5.3. Tanecik boyutunun toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş kúspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; T=90°C)



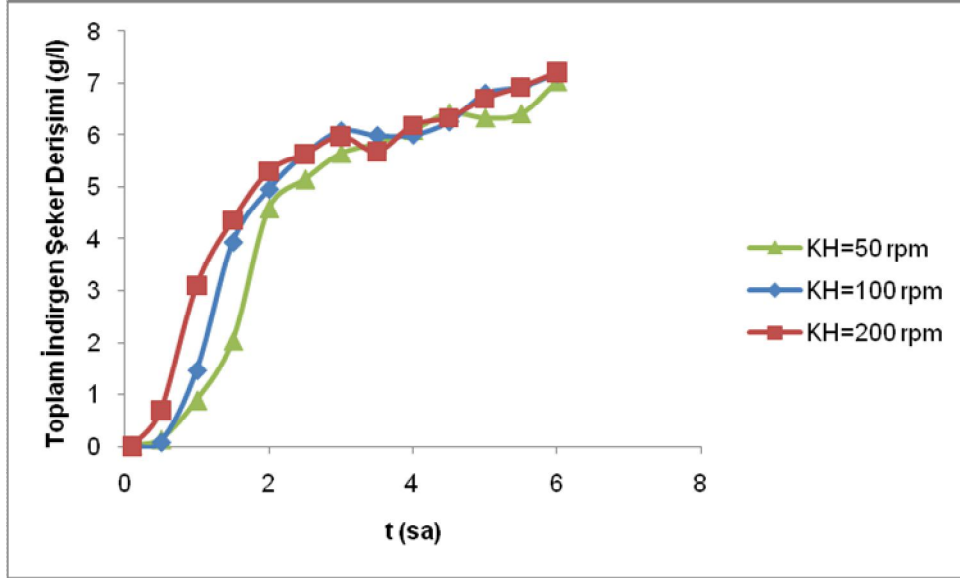
Şekil 5.4. Tanecik boyutunun furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş kúspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; T=90°C)

Çizelge 5.2. Farklı tanecik boyutlarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları

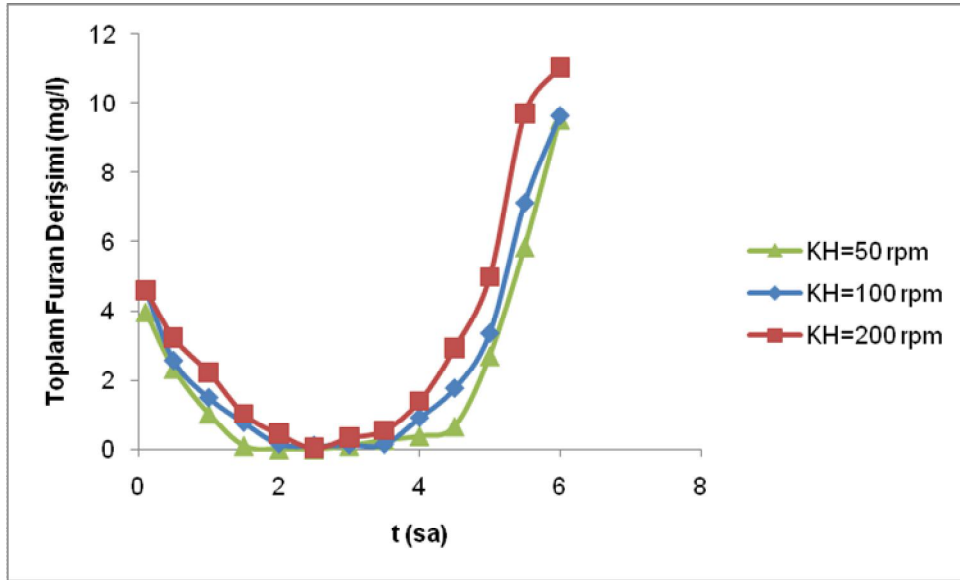
Tanecik Boyut Aralığı (mm)	İndirgen Şeker Oluşum Tepkimesinin Başlangıç Hızı (g/l-sa)	Tepkime Sonucunda Oluşan Şeker Derişimi (g/l)	g Kuru Küspe Başına Oluşan Toplam İndirgen Şeker Miktarı (g şeker/g kuru küspe)
0.088-0.177	4.154	7.74	0.387
0.707-1.000	4.779	8.20	0.410
1.000-1.410	3.854	7.18	0.359

1.1.3. Karıştırma Hızının Etkisi

Toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri oluşumuna karıştırma hızının etkisi 50-200 rpm aralığında incelenmiştir. Bu amaçla 1.000-1.410 mm tanecik boyut aralığında, 90°C'de, 1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi katı/sıvı oranında 6 saat süreyle çalışılmıştır. Karıştırma hızının toplam indirgen şeker ve toplam furan derişimi üzerindeki etkileri Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'da; 50, 100 ve 200 rpm karıştırma hızında elde edilen başlangıç hız değerleri ve toplam indirgen şeker miktarları ise Çizelge 5.3'te sunulmuştur. Her iki şekil de incelendiğinde karıştırma hızı arttıkça toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri oluşum hızlarının ve oluşan toplam furan bileşikleri miktarının arttığı, oluşan şeker miktarının ise fazla değişmediği gözlenmektedir. Akış rejimi her üç durumda da düzenli olduğu için, karıştırma hızının artmasıyla katı taneciklerin asidik sıvıyla temasının da arttığı ve böylece hidronyum iyonunun katalizör olduğu bu tepkimelerin hızlarının da arttığı şeklinde bir genelleme yapılabilmektedir. Çizelge 5.3'ten ve Şekil 5.5'ten altı saat sonunda elde edilen toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri derişimleri incelendiğinde ise, çalışma koşullarında 200 rpm karıştırma hızında 7.20 g/l toplam indirgen şeker ve 11.04 mg/l toplam furan bileşikleri elde edildiği görülmektedir. Karıştırma hızı parametresi oluşan şeker miktarını fazla etkilemediği için sonraki deneyler 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.5. Karıştırma hızının toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi; T=90°C; D_p=1.000-1.410 mm)



Şekil 5.6. Karıştırma hızının furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi; T=90°C; D_p=1.000-1.410 mm)

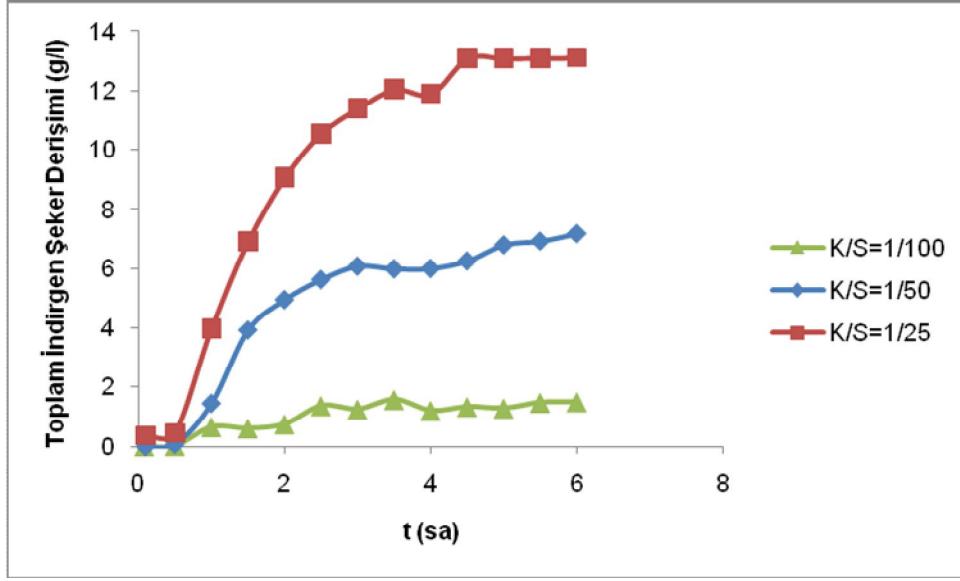
Çizelge 5.3. Farklı karıştırma hızlarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları

Karıştırma Hızı (rpm)	İndirgen Şeker Oluşum Tepkimesinin Başlangıç Hızı (g/l-sa)	Tepkime Sonucunda Oluşan Şeker Derişimi (g/l)	g Kuru Küspe Başına Oluşan Toplam İndirgen Şeker Miktarı (g şeker/g kuru küspe)
50	3.692	7.04	0.352
100	3.854	7.18	0.359
200	4.810	7.20	0.360

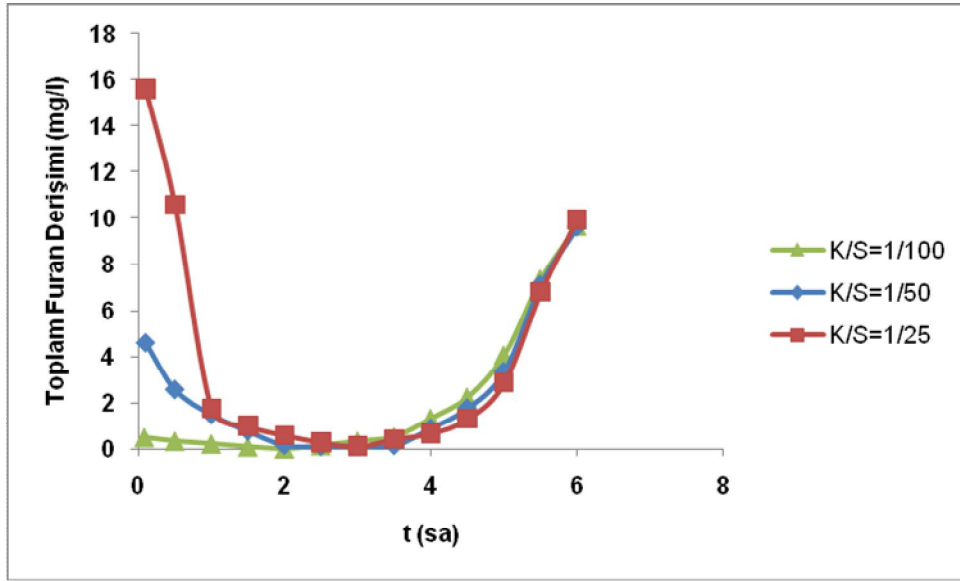
5.1.4. Katı/Sıvı Oranının Etkisi

90°C'de ve 100 rpm karıştırma hızında 1.000-1.410 mm boyut aralığındaki taneciklerle 0.1 M'lık H₂SO₄ kullanılarak 1 g kuru küspe/100 ml 0.1 M asit çözeltisi- 1 g kuru küspe/25 ml 0.1 M asit çözeltisi arasında değişen katı/sıvı oranının şeker ve furan dönüşümü üzerine etkileri araştırılmış, sonuçlar Şekil 5.7 ve 5.8'de ve Çizelge 5.4'te verilmiştir. Şekil 5.7'den katı/sıvı oranı artırıldığında, çözelti içerisindeki küспенin derişimi de arttığı için oluşan toplam indirgen şeker miktarının da belirgin şekilde arttığı gözlenmektedir. Ancak her ne kadar en fazla indirgen şeker derişimine 1/25 katı/sıvı oranında ulaşılmış gibi görünse de önemli olan kuru hammaddenin birim kütlesi başına elde edilen şeker miktarıdır. Çizelge 5.4'te üç farklı katı/sıvı oranı için 1 gram kuru şeker pancarı küspesinden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları karşılaştırıldığında, gram kuru kütle başına en fazla şeker miktarının katı/sıvı oranının 1/50 olduğu durumda elde edildiği görülmektedir.

Katı/sıvı oranının toplam furan derişimine etkisi ise daha farklı olmuştur. Şekil 5.8'den İlk başta oluşan furan miktarının küspe derişimine bağlı olarak arttığı; ancak oluşan furan derişimlerinin son değerlerinin değişmediği görülmektedir.



Şekil 5.7. Katı/sıvı oranının toplam indirgen şeker derişimine etkisi ($C_{H_2SO_4} = 0.1$ M; KH=100 rpm; T=90°C; $D_p = 1.000-1.410$ mm)



Şekil 5.8. Katı/sıvı oranının furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi ($C_{H_2SO_4} = 0.1$ M; KH=100 rpm; T=90°C; $D_p = 1.000-1.410$ mm)

Çizelge 5.4. Farklı katı/sıvı oranlarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları

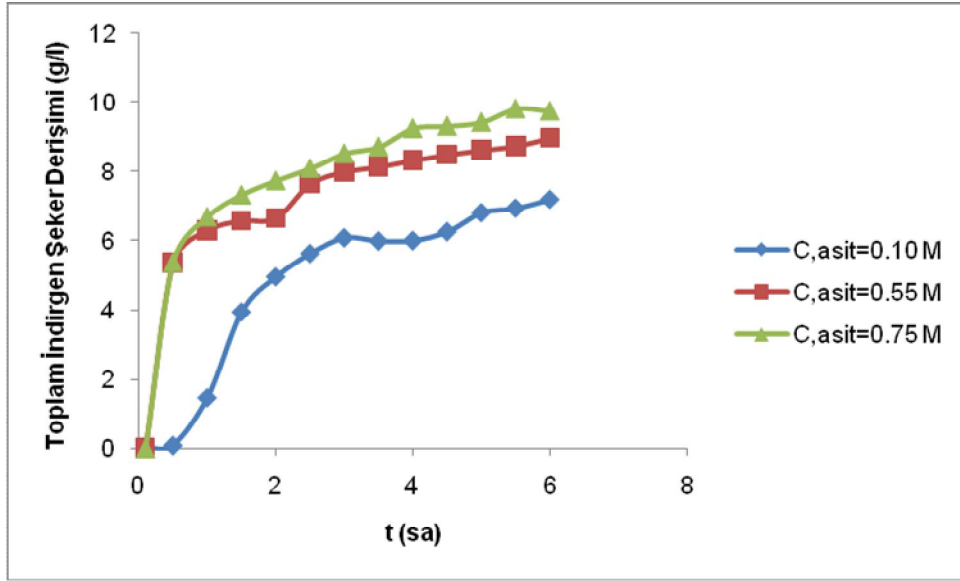
Katı/Sıvı Oranı (g kuru küspe/ml asit çözeltisi)	İndirgen Şeker Oluşum Tepkimesinin Başlangıç Hızı (g/l-sa)	Tepkime Sonucunda Oluşan Şeker Derişimi (g/l)	g Kuru Küspe Başına Oluşan Toplam İndirgen Şeker Miktarı (g şeker/g kuru küspe)
1/100	1.282	1.49	0.149
1/50	3.854	7.18	0.359
1/25	6.447	13.10	0.327

5.1.5. Asit Derişiminin Etkisi

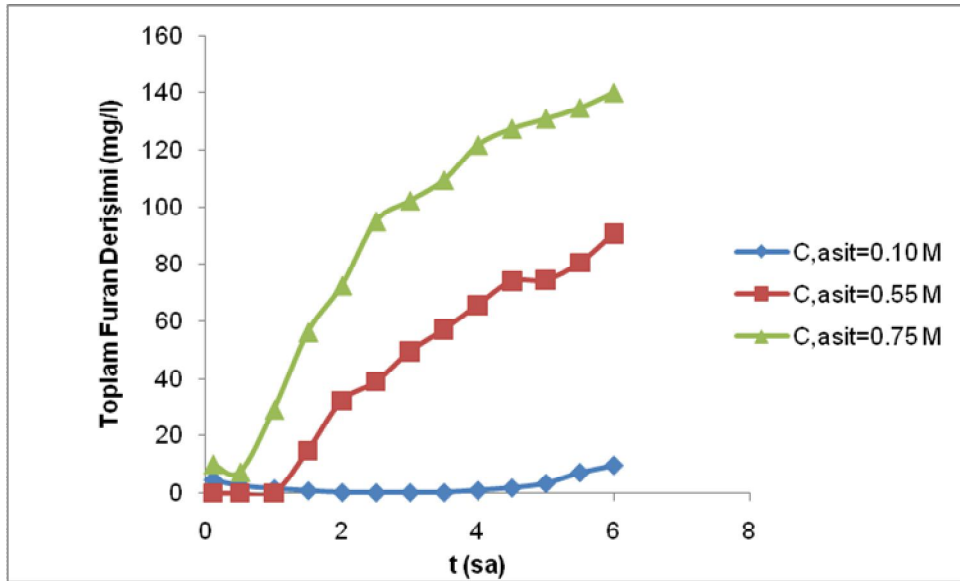
5.1.5.1. 90°C'da Gerçekleştirilen Hidrolizde Asit Derişiminin Etkisi

90°C'da ve 100 rpm karıştırma hızında 1.000-1.410 mm boyut aralığındaki taneciklerle 1 g kuru küspe/50 ml asit çözeltisi katı/sıvı oranında, asit çözeltisinin derişimi 0.10-0.55 M aralığında değiştirilerek, elde edilen zamana karşı toplam indirgen şeker ve dönüşen toplam furan bileşikleri derişimleri Şekil 5.9 ve 5.10'da, elde edilen toplam oluşan ve birim küspenin oluşturduğu şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları ise Çizelge 5.5'te verilmiştir. Şekil 5.9 ve Çizelge 5.5 incelendiğinde, asit derişimi 0.55 M'a kadar arttıkça hem toplam indirgen şeker oluşum hızının hem de oluşan şeker miktarının belirgin şekilde arttığı görülmektedir. Ancak bu sıcaklıkta en yüksek şeker oluşumu 0.75 M asit derişiminde gözlenmiştir ve sırasıyla 9.75 g/l toplam indirgen şeker derişimi ve 0.487 g/g gram küspe başına elde edilen şeker miktarı değerleri bulunmuştur (Çizelge 5.5). Şekil 5.10'dan ise, 0.1 M asit derişiminde furan bileşikleri oluşum hızının çok düşük olduğu ve furan derişiminin 3.5-4 saat sonra az da olsa artmaya başladığı, buna karşın daha yüksek asit derişimlerinde hem furan bileşikleri oluşum hızının hem de oluşan furan bileşiklerinin çok daha kısa sürede ve önemli miktarda arttığı görülmektedir. Şekil 5.10'dan 0.75 M asit derişiminde 140.03 mg/l toplam furan bileşikleri oluştuğu gözlenmektedir. Furan bileşikleri şekerin bozunma ürünleri olduğu için daha yüksek şeker derişimlerinde daha fazla furan bileşikleri elde edilmesi beklenen sonuçtur. Ayrıca yüksek sıcaklıkta şeker oluşumu için

katalizör görevi gören hidronyum iyonun furan oluşumunu da arttırması, furan derişimindeki aşırı artışın bir diğeri nedenidir.



Şekil 5.9. 90°C'da asit derişiminin toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş kúspe/50 ml H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D_p=1.000-1.410 mm)



Şekil 5.10. 90°C'da asit derişiminin furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş kúspe/50 ml H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D_p=1.000-1.410 mm)

Çizelge 5.5. 90°C'da farklı asit derişimlerinde gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş küspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları

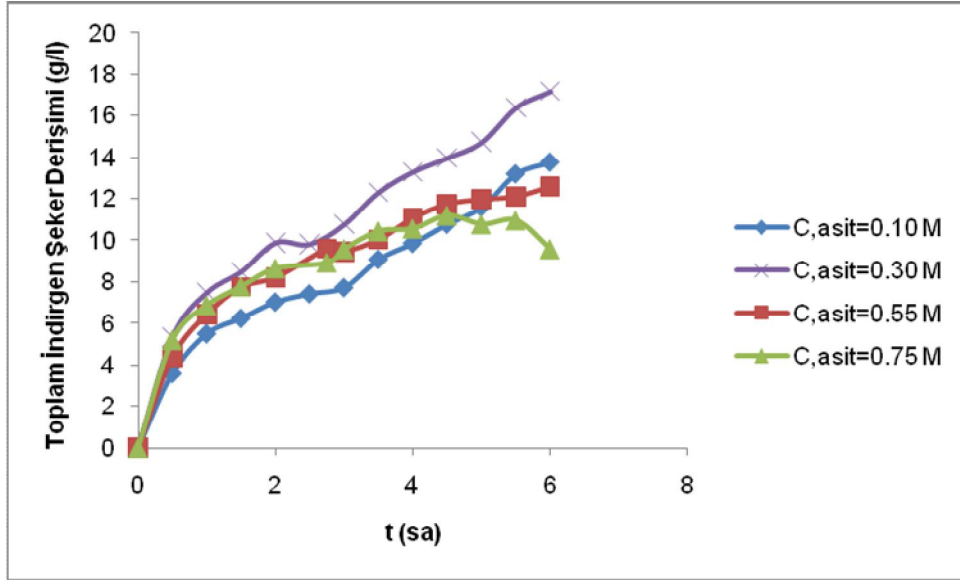
Asit Derişimi (M)	İndirgen Şeker Oluşum Tepkimesinin Başlangıç Hızı (g/l-sa)	Tepkime Sonucunda Oluşan Şeker Derişimi (g/l)	g Kuru Küspe Başına Oluşan Toplam İndirgen Şeker Miktarı (g şeker/g kuru küspe)
0.10 M	4.154	7.18	0.359
0.55 M	10.444	8.98	0.449
0.75 M	10.770	9.75	0.487

5.1.5.2. 110°C'da Gerçekleştirilen Hidrolizde Asit Derişiminin Etkisi

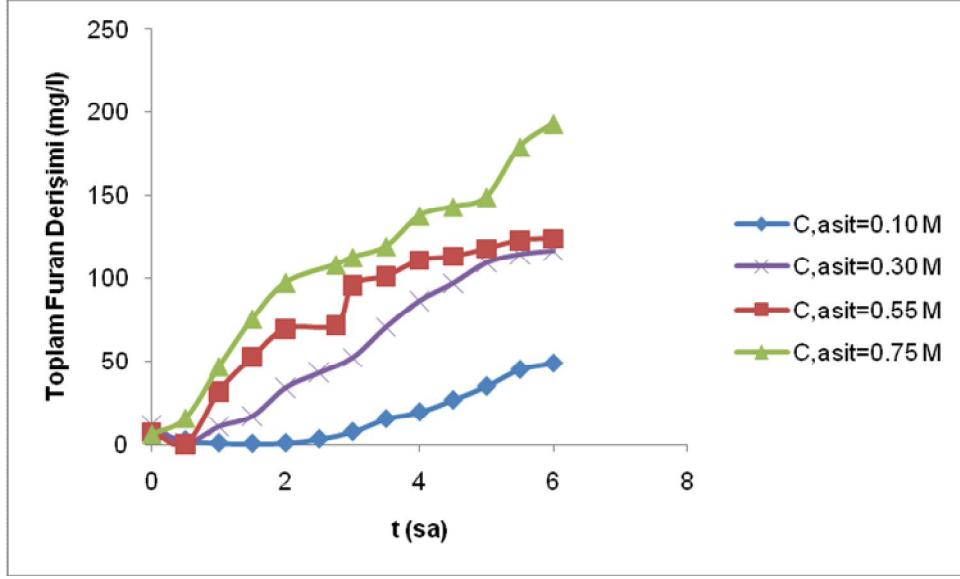
Yine aynı çalışma koşullarında bu defa sıcaklık 110°C'a çıkarılarak asit derişiminin toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri oluşumuna etkisi araştırılmış ve elde edilen zamana karşı toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri derişimleri Şekil 5.11 ve 5.12'de, elde edilen başlangıç şeker oluşum hızları, toplam oluşan ve birim küspenin oluşturduğu şeker miktarları ise Çizelge 5.6'da verilmiştir. Şekil 5.11 ve Çizelge 5.6 incelendiğinde, bu sıcaklıkta asit derişiminin 0.10 M'dan 0.30 M'a çıkarılmasıyla toplam indirgen şeker oluşum hızının ve miktarının arttığı; ancak asit derişimi 0.55 M'a çıkarıldığında tepkime hızının fazla değişmemesine karşın, elde edilen şeker miktarının daha az olduğu gözlenmiştir. Asit derişimi 0.75 M'a çıkarıldığında ise tepkimenin başlangıç hızı ve toplam oluşan şeker miktarı fazla değişmemesine karşın, 5.5 saatten sonra toplam indirgen şeker derişimi azalmaya başlamıştır. Bu durum, toplam furan derişiminin zamanla değişimini veren Şekil 5.12 ile açıklanabilmektedir. Asit derişimi ve sıcaklık arttıkça furan bileşiklerinin oluşum hızı ve miktarı da bariz şekilde artmaktadır. 0.75 M asit derişiminde 193.26 mg/l toplam furan bileşiği oluşumu gözlenmiştir. Daha önceki deney sonuçlarına göre toplam furan derişimi önce azalıp sonra artmaya başlarken, 110°C'da ve asit çözeltisi derişimi 0.75 M olduğunda furan bileşiklerinin toplam derişiminin hiç azalmadan hızla arttığı saptanmıştır. Bu durumda furan bileşikleri oluşumu, furan bileşiklerinin bozunmasından daha hızlı gerçekleşmektedir.

Bu kısımdaki deneysel çalışmaların sonucunda genel olarak 110°C tepkime sıcaklığında, 100 rpm karıştırma hızında 1 g kuru küspe/50 ml 0.3 M asit çözeltisi

katı/sıvı oranında 0.707-1.000 mm boyut aralığındaki taneciklerle en yüksek şeker derişimi (17.18 g toplam indirgen şeker/l veya 0.859 g toplam indirgen şeker/g kuru kúspe)ne ulaşıldığı belirlenmiştir. Ancak bu koşullarda oluşan furan bileşiklerinin toplam derişimi oldukça yüksek olduğundan, fermantasyon çalışmalarından önce hidroliz çözeltisine çeşitli zehir giderme yöntemleri uygulanmıştır.



Şekil 5.11. 110°C'da asit derişiminin toplam indirgen şeker derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş kúspe/50 ml H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D_p=1.000-1.410 mm)



Şekil 5.12. 110°C'da asit derişiminin furan bileşiklerinin toplam derişimine etkisi (K/S=1 g kurutulmuş kúspe/50 ml H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; D_p=1.000-1.410 mm)

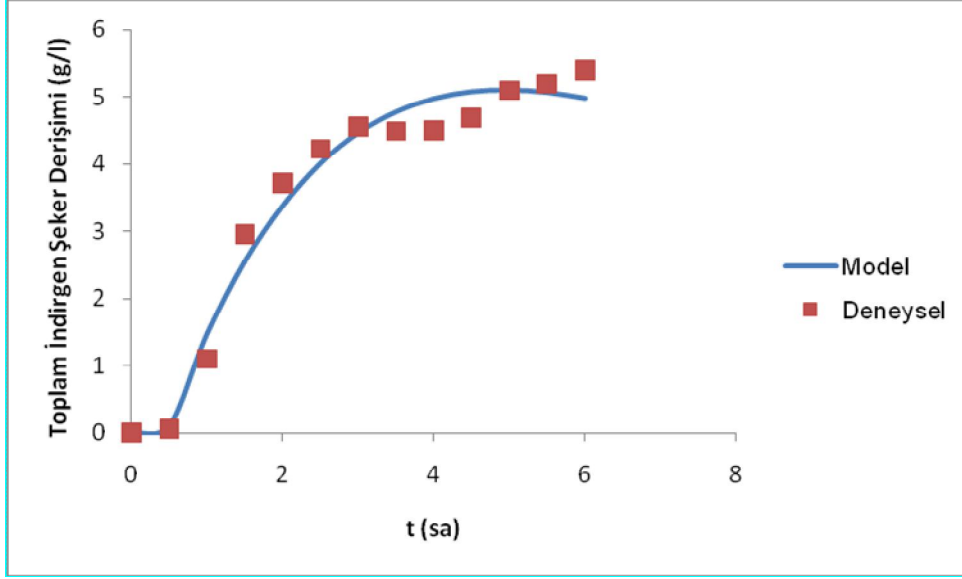
Çizelge 5.6. 110°C'da farklı asit derişimlerinde gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonucunda ve birim kurutulmuş kúspeden elde edilen toplam indirgen şeker miktarları ve başlangıç şeker oluşum hızları

Asit Derişimi (M)	İndirgen Şeker Oluşum Tepkimesinin Başlangıç Hızı (g/l-sa)	Tepkime Sonucunda Oluşan Şeker Derişimi (g/l)	g Kuru Kúspe Başına Oluşan Toplam İndirgen Şeker Miktarı (g şeker/g kuru kúspe)
0.10 M	7.184	13.77	0.689
0.30 M	10.680	17.18	0.859
0.55 M	8.756	12.59	0.629
0.75 M	10.424	9.59	0.479

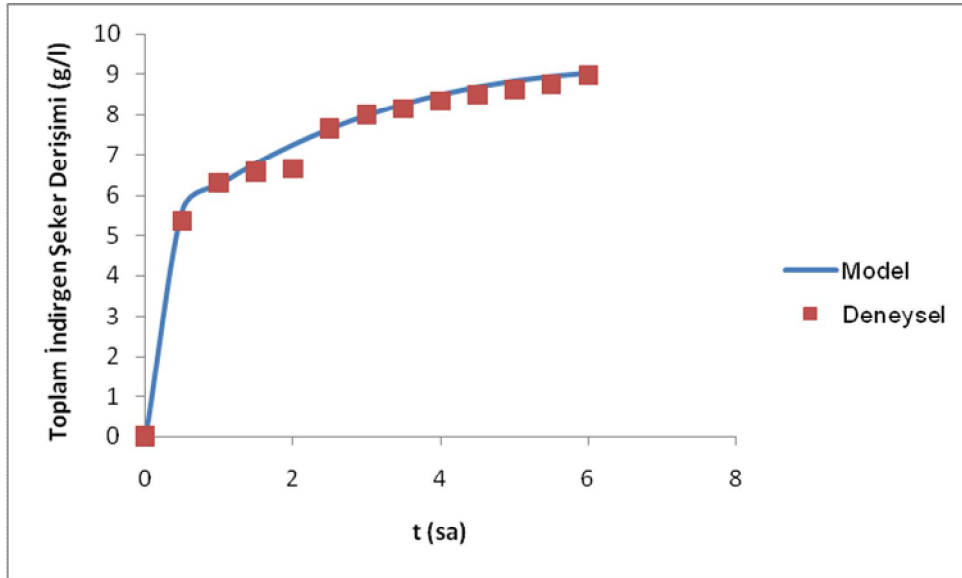
5.2. Hidroliz Tepkime Hız Sabitlerinin Bulunması

Şeker pancarı küspesinin asidik hidrolizinin modellenmesinde bulunan Eşitlikler 3.11 ve 3.13'teki kinetik sabitler NLREG (Version 6.5) programında lineer olmayan regresyon yöntemi yardımıyla, şeker derişimini en çok etkileyen iki parametre olan sıcaklık ve asit derişiminin değiştirildiği deneyler için hesaplanmış, bulunan kinetik sabitler non-lineer korelasyon katsayıları ile birlikte Çizelge 5.7'de sunulmuş ve bu kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verileri Şekil 5.13, Şekil 5.14, Şekil 5.15, Şekil 5.16, Şekil 5.17, Şekil 5.18 ve Şekil 5.19'da; toplam furan derişimi-zaman verileri ise Şekil 5.20, Şekil 5.21, Şekil 5.22, Şekil 5.23 ve Şekil 5.24'te deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Şekillerden ve Çizelge 5.7'de verilen ve oldukça yüksek non-lineer korelasyon katsayılarından görüldüğü üzere, önerilen model deneysel hidroliz verilerine genel olarak uymaktadır. Ancak, modelden elde edilen eşitliklerle, her iki sıcaklıkta da 0.10 M asit derişiminde furan bileşiklerinin bozunma tepkimesinin hız sabiti hesaplanamamıştır. Bu durum, düşük asit derişimlerinde, tepkimeyle oluşan indirgen şekerlerin furan bileşiklerine dönüşümünün yavaş olması nedeniyle tepkimenin ilk anlarında oluşan furan bileşiklerinin tamamına yakınının küspenin yapısındaki az miktardaki sakkarozdan oluşuyor olması ve ön görülen modelin bu durumu tanımlamaması şeklinde açıklanabilmektedir.

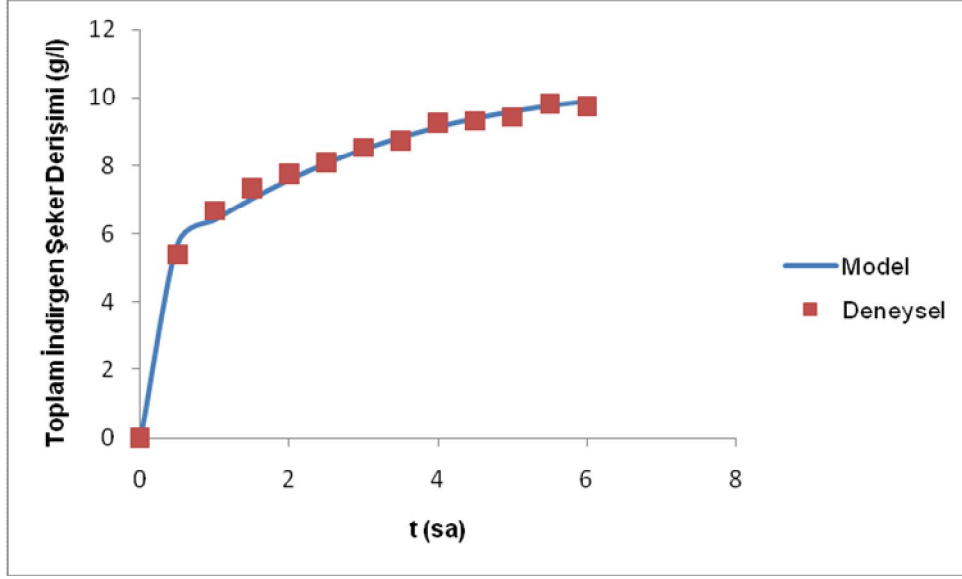
Çizelge 5.7 incelendiğinde, asit derişimi ve sıcaklık arttıkça, toplam indirgen şekeri oluşturan tepkimenin hız sabitinin de arttığı görülmektedir. Tepkime sıcaklığı 110°C ve asit derişimi 0.75 M olduğunda ise, bütün tepkime hız sabitlerinin belirgin şekilde arttığı gözlenmektedir. Bu durumun temel nedeni, bu koşullarda toplam indirgen şeker oluşumunun ve indirgen şekerlerin furan bileşiklerine dönüşümünün daha hızlı gerçekleşmesidir.



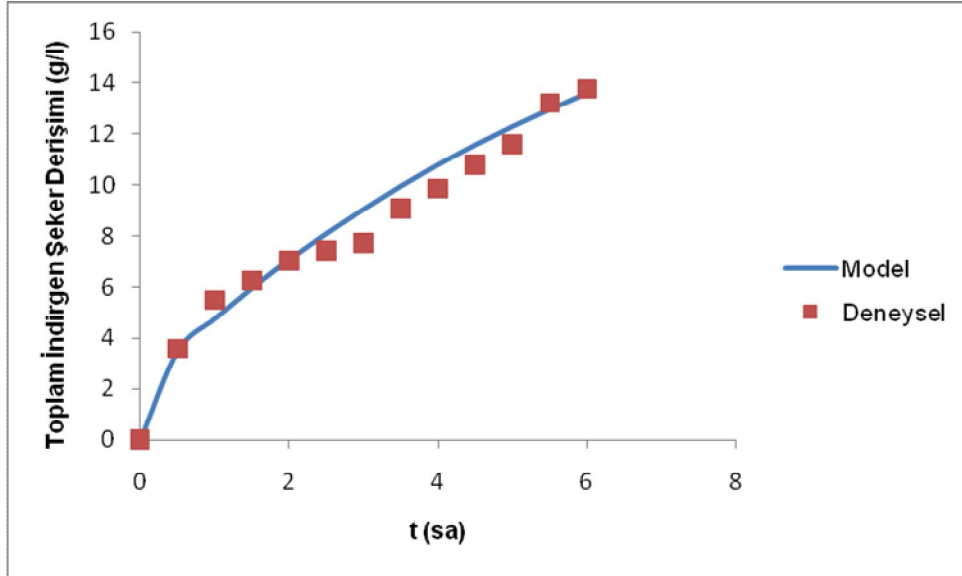
Şekil 5.13. 90°C'da 0.10 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



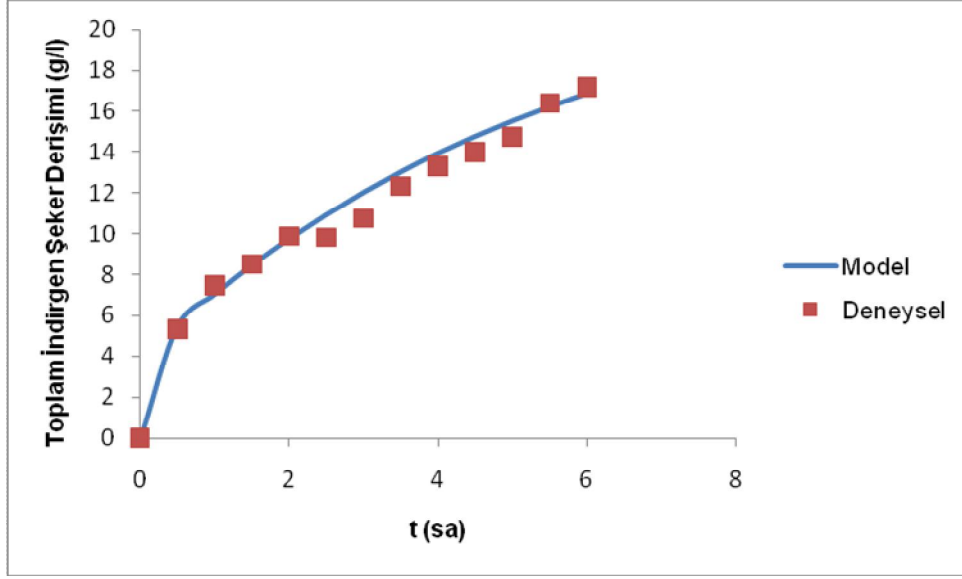
Şekil 5.14. 90°C'da 0.55 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



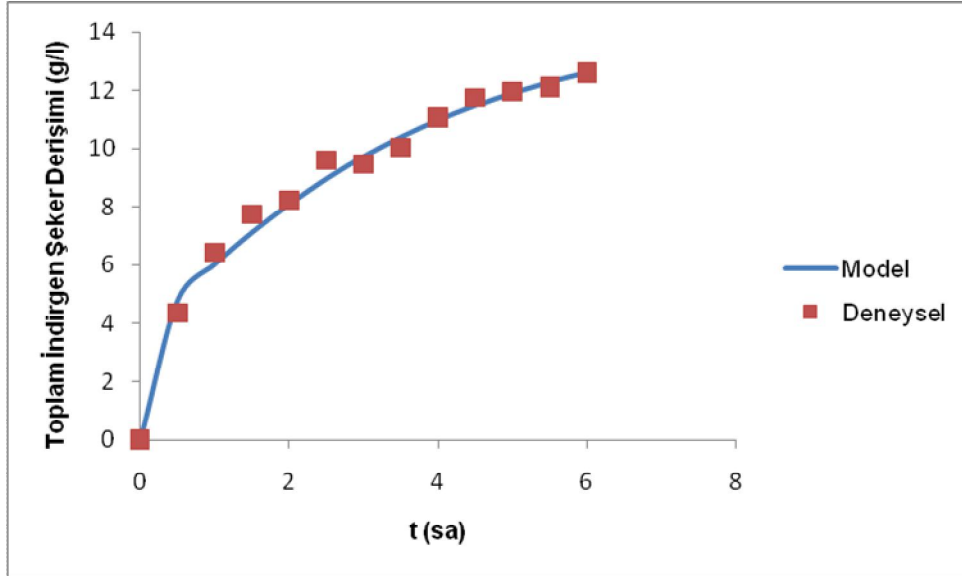
Şekil 5.15. 90°C'da 0.75 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



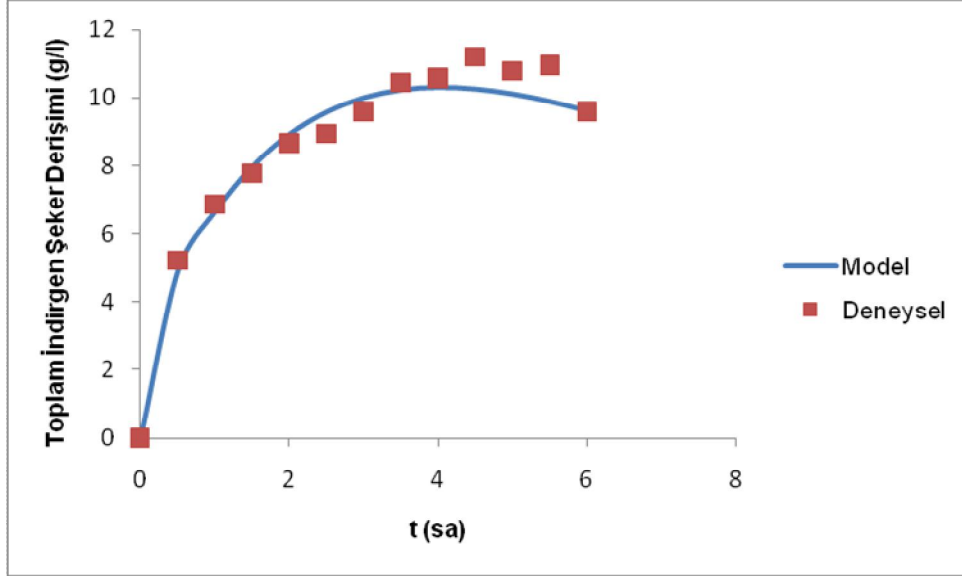
Şekil 5.16. 110°C'da 0.10 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



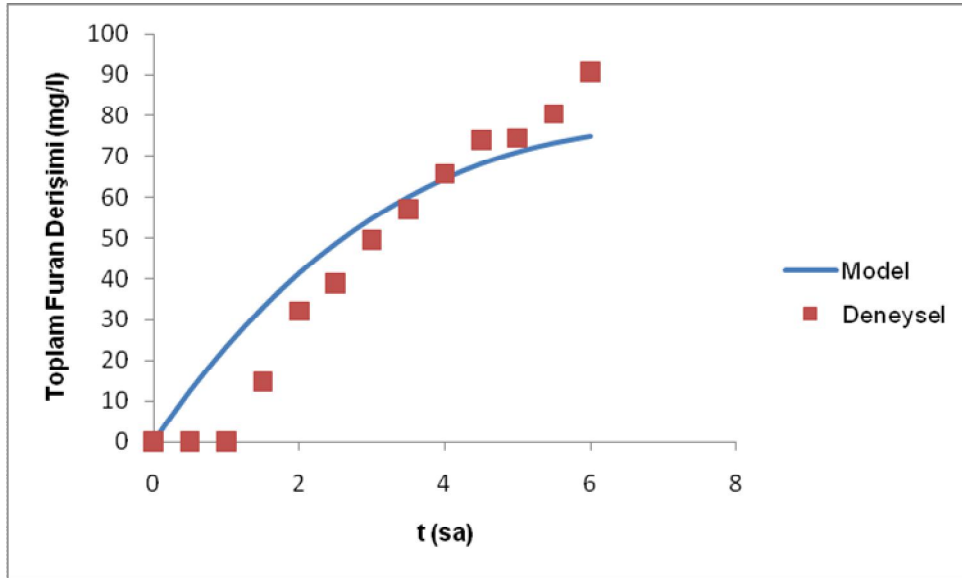
Şekil 5.17. 110°C'da 0.30 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



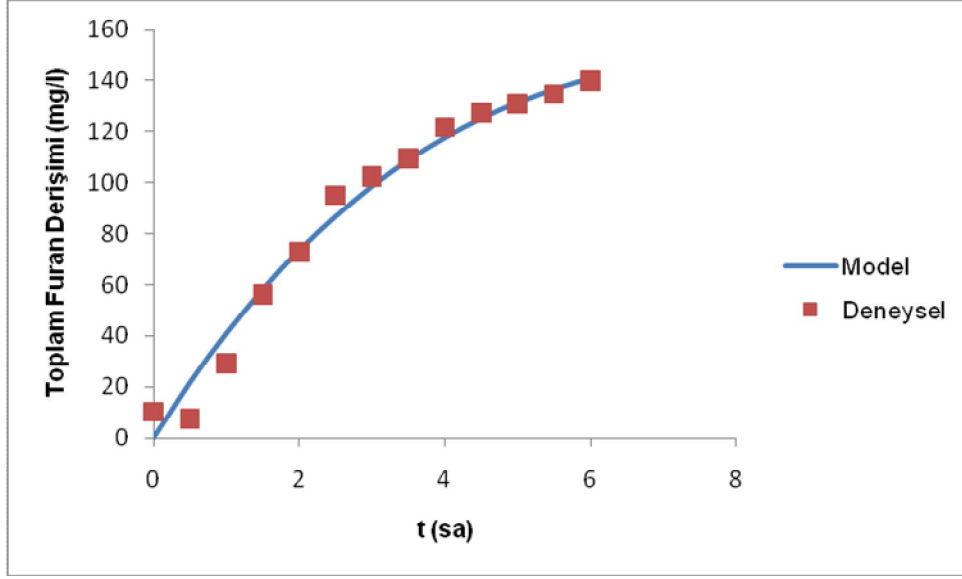
Şekil 5.18. 110°C'da 0.55 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



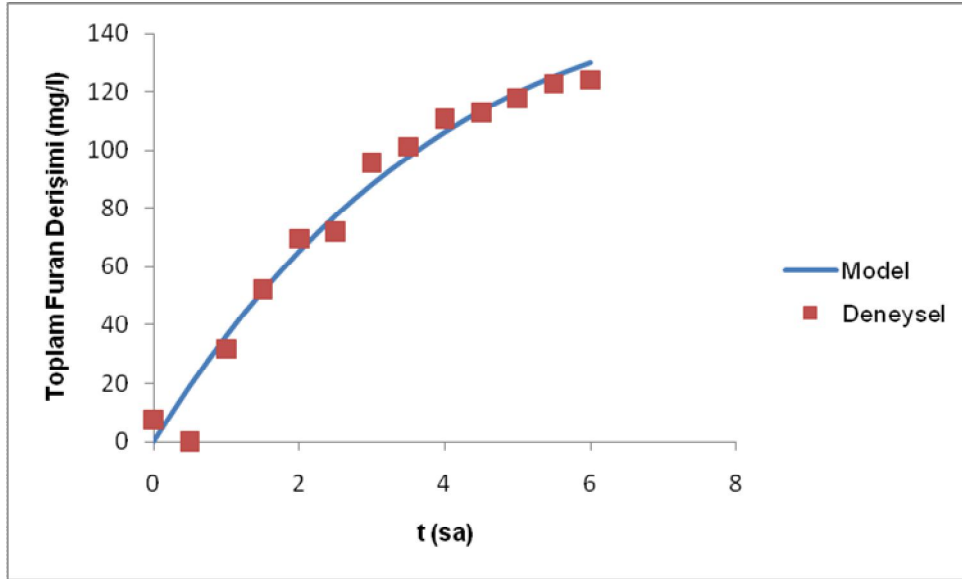
Şekil 5.19. 110°C'da 0.75 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.11'den hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



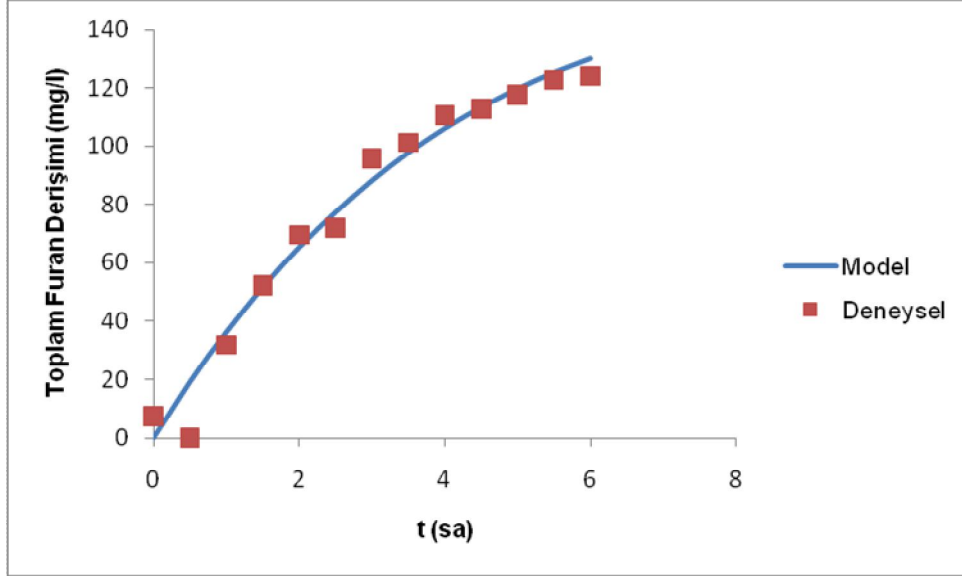
Şekil 5.20. 90°C'da 0.55 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



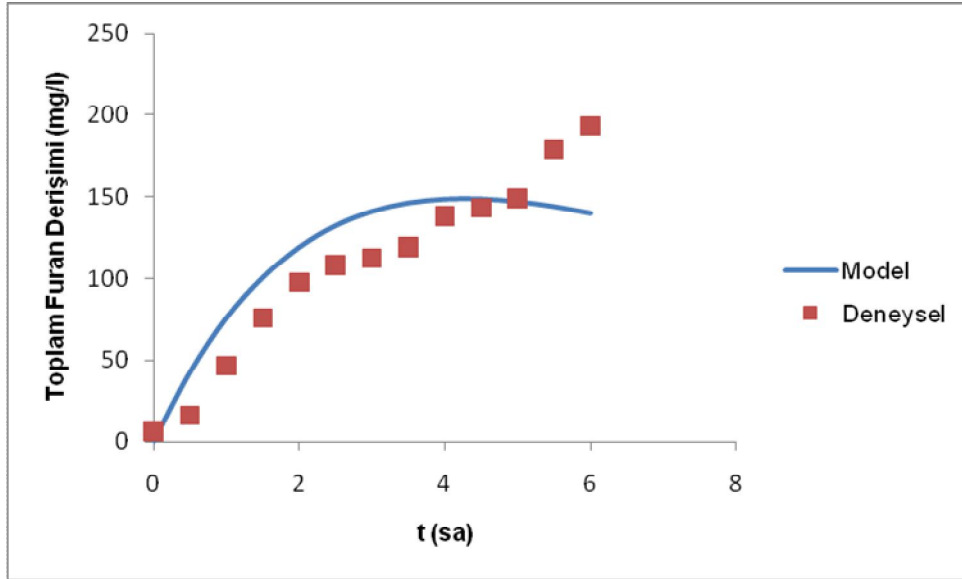
Şekil 5.21. 90°C'da 0.75 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



Şekil 5.22. 110°C'da 0.30 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



Şekil 5.23. 110°C'da 0.55 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması



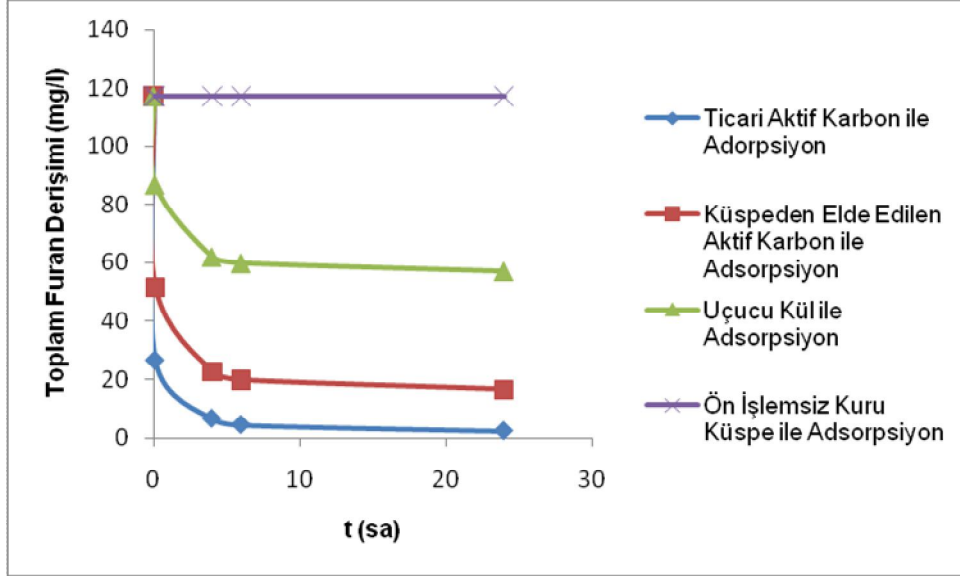
Şekil 5.24. 110°C'da 0.75 M H₂SO₄ derişiminde Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam furan derişimi-zaman verilerinin deneysel verilerle karşılaştırılması

Çizelge 5.7. 90 ve 110°C'da 0.10-0.75 M arasında değişen H₂SO₄ derişimlerinde Eşitlik 3.11 ve Eşitlik 3.13'ten hesaplanan kinetik sabitler

	C_{H₂SO₄} (M)	k₁ (sa⁻¹)	k₂ (sa⁻¹)	k₃ (sa⁻¹)	R²	k₄ (sa⁻¹)	R²
T=90°C	0.10	0.104	0.127	0.108	0.963	-	-
	0.55	0.039	0.086	0.044	0.978	2.689	0.850
	0.75	0.033	0.094	0.037	0.983	1.590	0.982
T=110°C	0.10	1.0x10 ⁻⁸	0.142	1.3x10 ⁻⁸	0.949	-	-
	0.30	1.0x10 ⁻⁸	0.177	1.2x10 ⁻⁸	0.966	2.211	0.972
	0.55	0.019	0.148	0.022	0.982	1.825	0.969
	0.75	0.064	0.263	0.074	0.878	4.481	0.712

5.3. Şeker Pancar Küspesi Hidrolizatına Ön İşlemin Etkisi

Hidrolizatı fermantasyona hazır hale getirmek için 117.32 mg/l derişiminde toplam furan bileşikleri içeren aynı örneğe dört farklı zehir giderme yöntemi uygulanarak, yöntemlerin örnekteki toplam furan bileşiklerini azaltma miktarları ve % giderim verimleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 110°C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında, 1 g kuru küspe/50 ml 0.3 M asit çözeltisi katı/sıvı oranında 0.707-1.000 mm boyut aralığındaki taneciklerle, 6 saat süren hidroliz tepkimesi sonucunda elde edilen hidrolizat örneği kullanılmıştır. Her bir hidrolizat örneğinin ticari aktif karbon ile, şeker pancarı küspesinin kül fırınında azot ortamında piroliziyle elde edilen aktif karbon ile, Afşin-Elbistan Termik Santrali'nin atığı olan uçucu kül ile ve herhangi işleme tabi tutulmamış kuru şeker pancarı küspesiyle adsorpsiyonu 30°C'da ve 100 rpm karıştırma hızında, 20 g/l adsorbent derişiminde 24 saat süre ile incelenmiş ve sonuçlar Şekil 5.25 ve Çizelge 5.8'de sunulmuştur. Şekil 5.25 ve Çizelge 5.8 incelendiğinde, en hızlı ve en yüksek furan bileşikleri gideriminin ticari aktif karbon ile adsorpsiyonda gerçekleştiği ve 6 saatin sonunda en yüksek toplam furan bileşikleri giderimine ulaşıldığı (% 98) görülmektedir. Toplam furan bileşiklerinin giderim hızı ve miktarı bakımından ticari aktif karbonu, sırasıyla küspeden elde edilen aktif karbon ve uçucu kül takip etmektedir. Her üç adsorbentin de furan bileşiklerini ilk 6 saat içinde daha hızlı adsorpladığı ve 6. saatten 24. saate kadar furan bileşikleri miktarında fazla değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Ön işlem görmemiş kuru küspenin ise furan bileşikleri giderimine hiç bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 5.25. Farklı adsorbentlerin şeker pancarı küspesi hidrolizatındaki furan bileşikleri giderimine etkisi

Çizelge 5.8. Farklı adsorbentlerin 6 saat sonunda şeker pancarı küspesi hidrolizatındaki toplam furan bileşiklerini giderim yüzdeleri

Adsorbent	% Giderim
Ticari Aktif Karbon	98.0
Küspeden Elde Edilen Aktif Karbon	85.9
Uçucu Kül	51.8
�n İşlemsiz Kuru Küspe	0.0

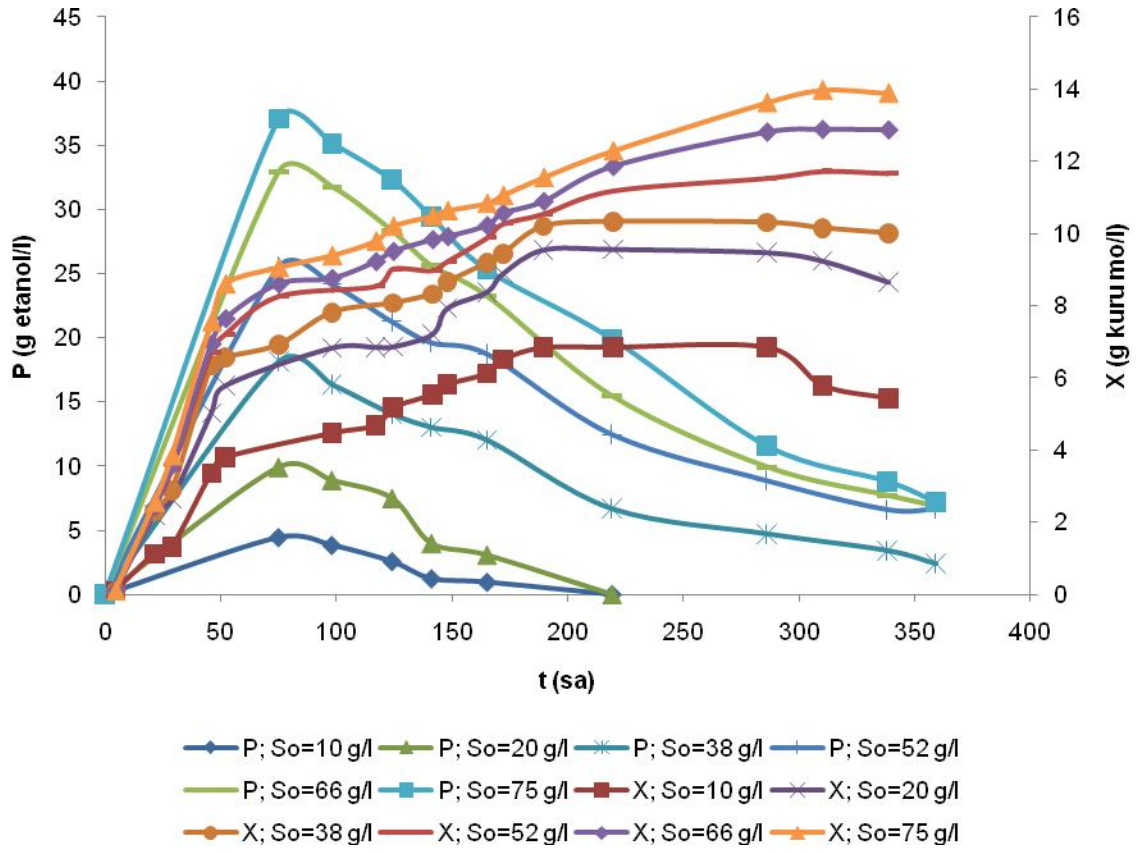
Literatürde lignoselülozik maddelerin asit ile hidrolizinin ardından elde edilen hidrolizattan furan bileşikleri giderimi için önerilen en iyi yöntemin hidrolizatın aktif karbonla muamelesi ve ardından aşırı kireçlemeye tabi tutulması olduğu belirtilmektedir (Arslan, Y., 2007). Bu kapsamda, aktif karbon ile muamele edilmiş hidrolizata CaO ile aşırı kireçleme uygulanıp ardından H₂SO₄ ile ortam pH'ı 6'ya düşürüldüğünde, s z len örneğin sıvı kısmından alınan örneklere yapılan analizler sonucunda, furan bileşiklerinin neredeyse tamamının giderildiği görülmüştür. Aşırı kireçleme işlemi küspeden elde edilen aktif karbonla muamele edilmiş hidrolizata uygulandığında, furan bileşikleri miktarının 16.54 mg/l'den 3.35 mg/l'ye düştüğü (% 97.1 toplam giderim) belirlenmiştir. Bu sonuçlar, literatür bilgisini doğrular niteliktedir. Örneklere CaO ile aşırı kireçleme uygulanmasının nedeni, yüksek pH'da furan bileşiklerinin kararsız hale gelmesidir. Furan

bileşiklerinin bu özelliğinden yararlanmak amacıyla çalışmada, yapısında CaO bulunması ve bu sayede eklendiği ortamın pH'ını yükseltmesi nedeniyle bir atık olan uçucu külle adsorpsiyon da denenmiştir. Uçucu kül hidrolizata 20 g/l derişimde olacak şekilde eklendiğinde, ortam pH'ının 10'a çıktığı belirlenmiştir ve bu pH'da 24 saat süren adsorpsiyon sonucunda % 51.8 oranında toplam furan bileşikleri giderimi sağlanmıştır (Çizelge 5.8). Bu işlemde sonra tek yapılması gereken pH'ı 6'ya düşürmek ve örneği süzerek sıvı kısmı, oluşan çökeltiden ayırmaktır. Uçucu külle furan bileşikleri giderimi, aktif karbonlarla muamele edilen ve sonrasında aşırı kireçlemeye tabi tutulan örneklerdeki giderimlere göre düşük bulunmuştur. Ancak ticari aktif karbonun pahalı bir malzeme olduğu, küspeden aktif karbon elde etmenin yüksek maliyetli bir işlem olduğu ve hidrolizatın uçucu kül ile muamele edildiğinde ikinci bir basamağa gerek kalmadığı düşünülürse, endüstriyel uygulamalarda zehir giderme amacıyla uçucu külü kullanmak daha mümkün görünmektedir.

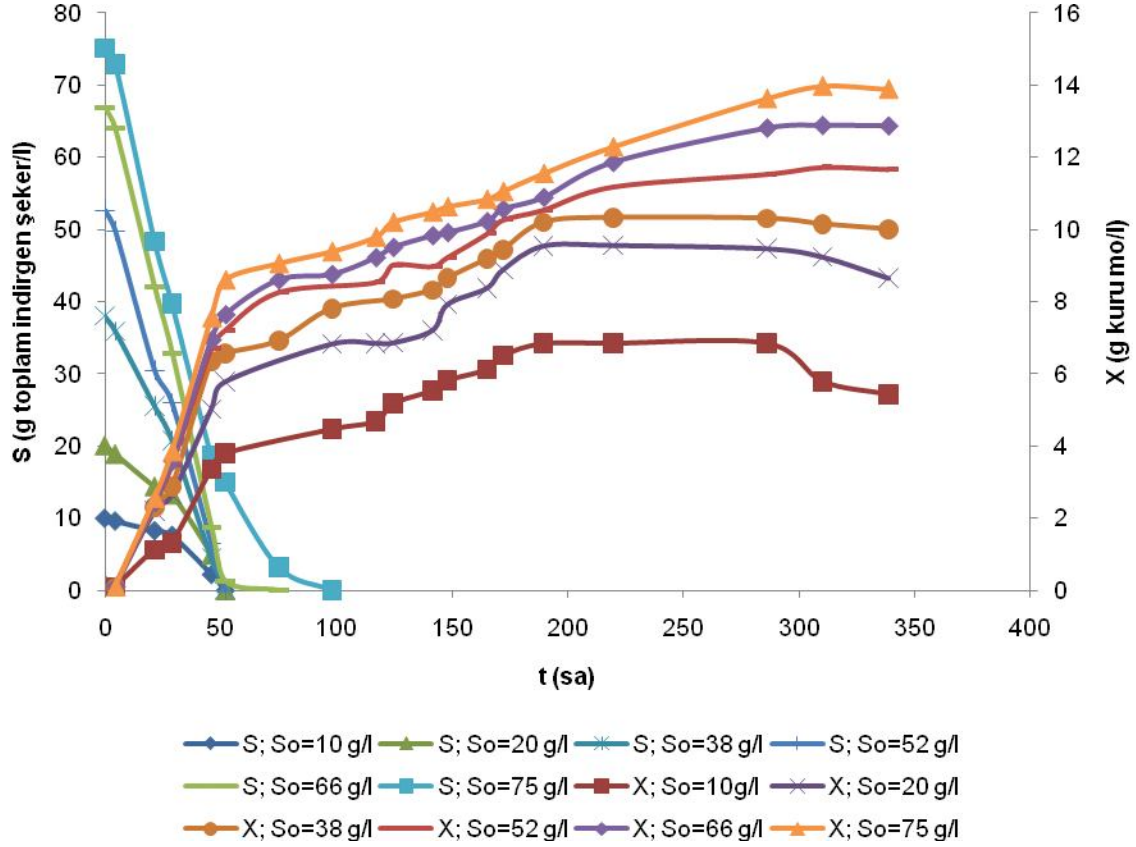
5.4. *P. stipitis* ile Fermantasyon Çalışmaları

5.4.1. Sadece Ksiloz İçeren Sentetik Besin Ortamında *P. stipitis*'in Üremesine ve Etil Alkol Üretimine Ksiloz Derişiminin Etkisi

Mikroorganizmanın üremesini ve ürün üretimini doğrudan etkileyen ve büyümesini sınırlayan ana besin maddesi (substrat) karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları şeker türü (glikoz, sakaroz, ksiloz vb.) maddelerdir. *P. stipitis* mayası da aynı zamanda asidik hidrolizde açığa çıkan ksiloz şekerini yüksek verimle etanole dönüştürebilen bir mikroorganizma türüdür. Deneysel çalışmaların bu kısmında 30°C'da, 100 rpm karıştırma hızında ve pH 5.5'da karbon kaynağı olarak sadece ksiloz içeren sentetik besin ortamında % 5 aşı oranında *P. stipitis*'in üremesine, ksiloz tüketimine ve etil alkol üretimine ksiloz derişiminin etkisi 10-75 g/l aralığında incelenmiş, zamanla kuru mikroorganizma, ksiloz ve etanol derişimlerinin değişim grafikleri Şekiller 5.26 ve 5.27'de sunulmuştur. Şekillerden başlangıç ksiloz derişiminin 75 g/l'ye kadar artmasıyla mikroorganizma derişiminin arttığı ve bu derişim aralığında substrat inhibisyonunun gözlenmediği görülmektedir. Ayrıca etanol mikrobiyal üremeye paralel olarak oluşmaktadır. İlginç bir nokta da üretilen etanolün belli bir süre sonra azalmaya başlaması bu esnada ise mikrobiyal üremenin tekrar artmaya başlamasıdır. Bundan mikroorganizmanın besin ortamındaki ksilozu bitirdikten sonra etanolü substrat olarak kullandığı sonucu çıkarılabilir. Şekillerden görüldüğü gibi yaklaşık bütün ksiloz derişimlerinde maya üremesini 200-300 saat arasında tamamlamakta ve bu süre sonunda en yüksek mikroorganizma derişimlerine ulaşılmaktadır. Başlangıç ksiloz derişimindeki artışa bağlı olarak mayanın ksilozu daha uzun sürede tükettiği de yine Şekil 5.27'den gözlenmektedir. Çizelge 5.9'da ise farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen *P. stipitis*'in özgül üreme hız sabitleri, elde edilen en yüksek kuru mikroorganizma derişimleri, ksiloz tüketim, etanol üretim hızları ve etanol üretkenliği değerleri sunulmuştur. Çizelgeden ksiloz derişiminin 10 g/l'den 75 g/l'ye kadar artmasıyla logaritmik büyüme evresindeki en yüksek mikroorganizma derişiminin 1.32 g kuru mo./l'den 3.85 g kuru mo./l'ye; özgül üreme hız sabitinin 0.105 sa⁻¹'den 0.146 sa⁻¹'e; ksiloz tüketim hızınının 0.062 g ksiloz/g kuru mo-sa'den 0.352 g ksiloz/g kuru mo-sa'e; etanol üretim hızınının 0.045 g etanol/ g kuru mo-sa'den 0.128 g etanol/ g kuru mo-sa'e ve etanol üretkenliğinin 0.060 g etanol/l-sa'den 0.494 g etanol/l-sa'ye arttığı görülmektedir.



Şekil 5.26. Farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen *P.stipitis*'in üreme ve etanol üretim eğrileri (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm)



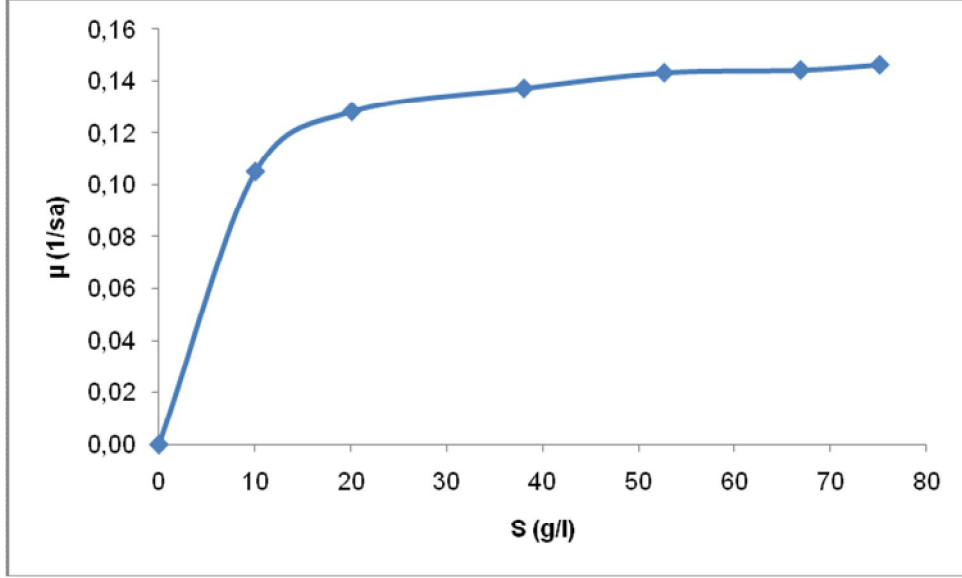
Şekil 5.27. Farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen *P. stipitis*'in üreme ve substrat tüketim eğrileri ($T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.5$, $\text{KH}=100$ rpm)

Çizelge 5.9. Farklı başlangıç ksiloz derişimlerinde elde edilen *P. stipitis*'in özgül üreme hız sabitleri, elde edilen en yüksek mikroorganizma derişimleri, ksiloz tüketim ve etanol üretim hızları

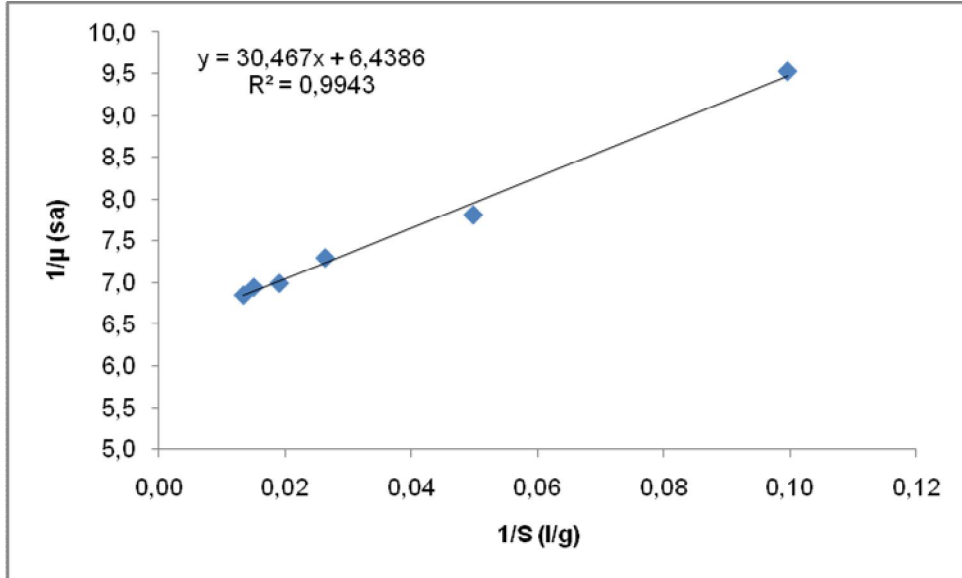
S_0 (g ksiloz/l)	μ (1/sa)	X_m (g kuru mol/l)	η (g ksiloz/g kuru mo-sa)	Üretkenlik (g etanol/l-sa)	q_p (g etanol/g kuru mo-sa)
10.03	0.105	1.32	0.062	0.060	0.045
20.10	0.128	2.84	0.081	0.133	0.047
38.03	0.137	2.88	0.215	0.242	0.084
52.64	0.143	3.47	0.280	0.340	0.098
66.84	0.144	3.59	0.354	0.439	0.122
75.08	0.146	3.85	0.352	0.494	0.128

Başlangıç ksiloz derişiminin mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine etkisi ise Şekil 5.28'de gösterilmiştir. Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumda özgül üreme hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişki Monod eşitliği ile

verilmişti (Eşitlik 3.19). *P. stipitis*'in başlangıç ksiloz derişimine bağlı üremesinin Monod modeline uyduğu varsayılarak, Monod eşitliğinin doğrusallaştırılmış şeklinden yararlanarak, $1/\mu$ 'ye karşı $1/S$ grafiğinden (Şekil 5.29) Monod sabitleri $\mu_{max}=0.155 \text{ sa}^{-1}$ ve $K_s= 4.72 \text{ g/l}$ olarak bulunmuştur. R^2 'nin 0.994 çıkması üremenin Monod modeline iyi uyduğunu göstermektedir.



Şekil 5.28. Başlangıç ksiloz derişiminin *P.stipitis*'in özgül üreme hızı üzerine etkisi (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm)



Şekil 5.29. *P. stipitis*'e ait $1/\mu - 1/S$ grafiği (T=30°C, pH=5.5, KH=100 rpm)

5.4.2. Aktif Karbon Adsorpsiyonu+Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizatlı Besin Ortamında *P. stipitis*'in Üremesi ve Etil Alkol Üretimi

5.4.2.1. % 100 Hidrolizat İçeren Besin Ortamında Yapılan Çalışmalar

110°C'da, 100 rpm karıştırma hızında ve 1 g kuru küspe/10 ml 0.3 M H₂SO₄ çözeltisi katı/sıvı oranında 0.707-1.000 mm boyut aralığındaki taneciklerle 500 ml çalışma hacminde yapılan hidroliz çalışması sonucunda 45.30 g/l toplam indirgen şeker ve 514.50 mg/l toplam furan bileşikleri içeren hidrolizat çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra ticari aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş hidrolizattaki toplam indirgen şeker derişimini arttırmak için, hidrolizattan 100 ml alınarak döner buharlaştırıcıda 2 saat muamele edilmiş ve elde edilen derişik hidrolizat işlem görmemiş hidrolizatla karıştırılmıştır. Sonuç olarak 57.70 g/l toplam indirgen şeker ve 72.53 mg/l toplam furan bileşikleri ihtiva eden hidrolizat ortamı elde edilmiş ve hiç sentetik ksiloz içermeyen % 100'lük bu hidrolizat çözeltisinden hazırlanan besin ortamında 30°C'da, 100 rpm karıştırma hızında, pH 5.5'te *P. stipitis* mayasıyla ortamdaki aşı derişimi % 20 olacak şekilde biyoetanol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda maya hücrelerinin üremesinin, ortamdaki toplam indirgen şeker tüketiminin ve etil alkol üretiminin zamanla değişimi incelenmiş ve elde edilen eğriler Şekil 5.30 ve Şekil 5.31'de; elde edilen özgül üreme hızı sabiti, en yüksek mikroorganizma derişimi, substrat tüketim ve etanol üretim hızı ve üretkenlik değerleri Çizelge 5.10'da sunulmuştur. Şekillerden % 100 hidrolizatta mikroorganizmanın iyi ürediği ancak etanolü çok az miktarda ürettiği gözlenmektedir. Bunun nedeninin, bu ortamda mikroorganizmanın etanol üretiminde kullanılan enzimleri üretememesinin olduğu düşünölmektedir. Şekil 5.31 ve çizelgeden substrat tüketim hızının ise oldukça yüksek olduğu görölmektedir. Bu durum, mikroorganizmanın hiç sentetik şeker olmayan ortamda üreyebilmesi için artan enerji ihtiyacının doğal bir sonucudur.

5.4.2.2. % 80 Hidrolizat+10 g/l Ksiloz İçeren Besin Ortamında Yapılan Fermantasyon Çalışmaları

5.4.2.2.1. Aşı Derişimi(v/v)nin Etkisi

Aynı koşullarda üretilen ve ticari aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat (57.70 g/l toplam indirgen şeker)+10 g/l ksiloz içeren ve

toplamda 48.16 g/l indirgen şeker ve 58.02 mg/l toplam furan bileşikleri ihtiva eden besin ortamında 30°C'da, 100 rpm karıştırma hızında ve pH 5.5'te *P. stipitis* mayasıyla biyoetanol fermantasyonu gerçekleştirilmiş, maya hücrelerinin üremesine, ortamdaki toplam indirgen şeker tüketimine ve etil alkol üretimine aşı derişiminin etkisi % 5 ve % 20 aşı derişimlerinde araştırılmış ve zamanla kuru mikroorganizma ile etanol ve substrat derişimlerinin değişim eğrileri Şekil 5.30 ve Şekil 5.31'de; elde edilen özgül üreme hız sabitleri, en yüksek mikroorganizma derişimleri, substrat tüketim ve etanol üretim hızları ve üretkenlik değerleri Çizelge 5.10'da, 10 g/l ksiloz içeren sentetik ortamdaki % 5 aşı derişimiyle bulunan değerlerle karşılaştırılarak sunulmuştur. Her iki aşı derişiminde elde edilen hücre büyüme eğrileri incelendiğinde, kuru mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerinin benzerlik gösterdiği, gecikme evresi sürelerinin yaklaşık aynı olduğu ve hücrelerin yaklaşık aynı süre sonunda üremelerini tamamladıkları görülmektedir. Ayrıca aşı derişimi fazla tutulduğunda elde edilen en yüksek kuru hücre derişiminin daha yüksek olduğu; buna karşılık aşı derişimi düşük olan ortamda hücrelerin üstel üreme evresindeki büyüme hızlarının daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Maya hücrelerinin sentetik ksiloz içeren besin ortamındaki üremesine benzer olarak yüksek oranda hidrolizattan oluşan besin ortamındaki üremesinin de yine iki aşamadan oluştuğu gözlenmiştir. Aşı derişiminin mikroorganizmanın etanol üretimi üzerindeki etkisi incelendiğinde ise, ortamdaki hücre miktarı arttığında yani yüksek aşı derişiminde elde edilen en yüksek etanol derişiminin de arttığı gözlenmektedir. Şekil 5.30 incelendiğinde, etanolün başlangıçtaki hızlı hücre büyümesiyle orantılı olarak üretildiği, ancak ortamda mikroorganizmanın kullanabileceği şekerler bittiğinde üretilen etanolü kullanarak ikinci bir üreme evresine girdiği görülmektedir. Üremeyi ve ürün üretimini kısıtlayıcı besin bileşeni olan toplam indirgen şekerlerin mikrobiyal üremeye ve zamana bağlı değişiminin verildiği Şekil 5.31 incelendiğinde ise, aşı derişiminin artmasıyla toplam indirgen şekerlerin harcanma hızının arttığı saptanmıştır.

Çizelge 5.10'dan aşı derişiminin % 5'ten % 20'ye artırılmasıyla kuru hücre derişiminin 4.60 g'den 5.10 g/l'ye arttığı; özgül üreme hız sabitinin ise 0.085 sa⁻¹'den 0.027 sa⁻¹'e düştüğü gözlenmektedir. Bu sonuç, hücre derişiminin düşük olduğu durumda mikroorganizmanın ortamdaki substratları ürün üretiminden çok mikrobiyal üreme amacıyla kullanmasından kaynaklanmaktadır. Aynı çizelgeden aşı derişimine bağlı olarak etanol üretimi incelendiğinde ise, ortamdaki hücre miktarı arttığında elde

edilen en yüksek etanol derişiminin 10.91 g/l'den 12.25 g/l'ye; etanol üretkenliğinin ise 0.211 g etanol/l-sa değerinden 0.256 g etanol/l-sa değerine yükseldiği görülmektedir.

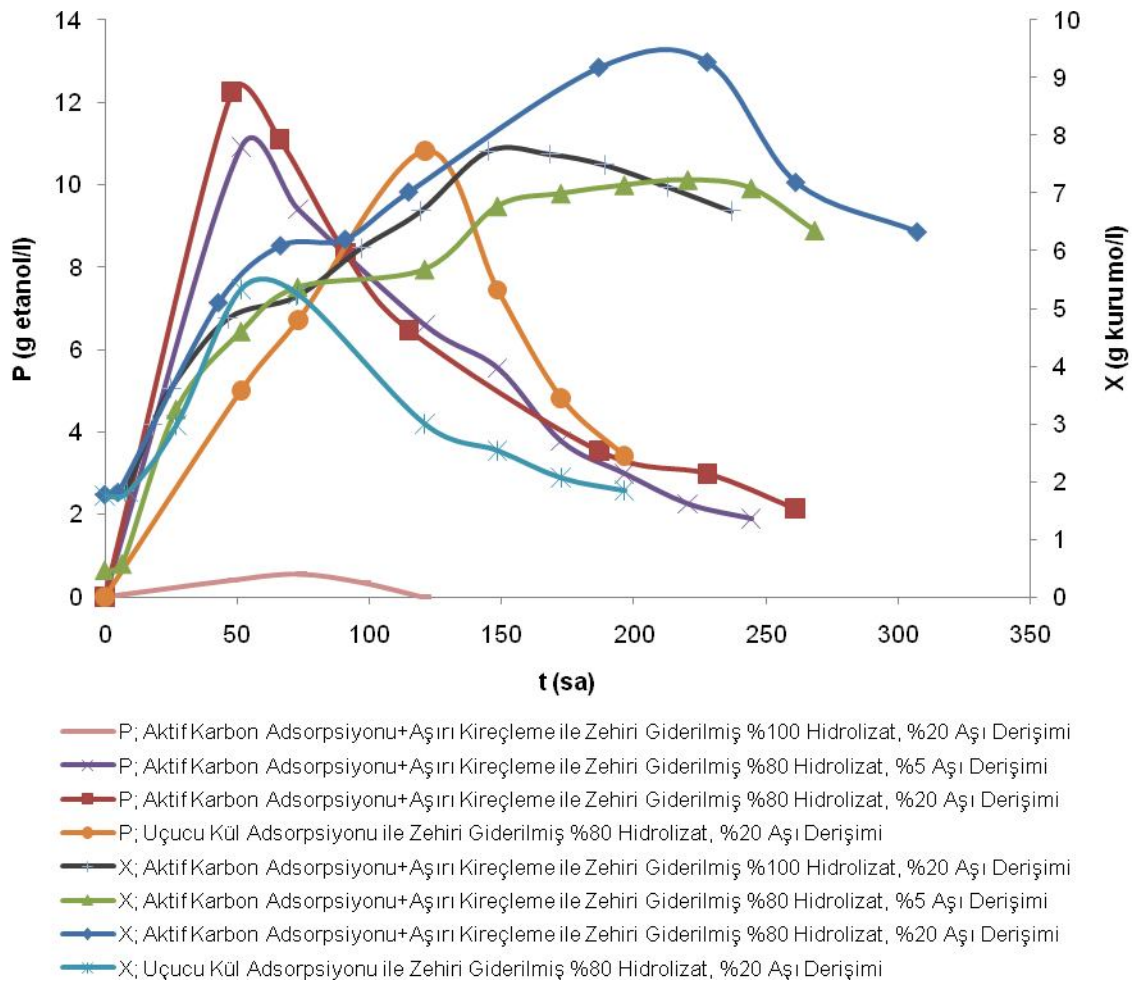
Çizelge 5.10'dan 10 g/l ksiloz içeren sentetik besin ortamındaki ve % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamındaki % 5 aşı derişimiyle bulunan değerler karşılaştırıldığında, sentetik besin ortamında ulaşılan en yüksek kuru hücre derişimi 1.32 g/l ve en yüksek etanol üretimi 4.47 g etanol/l iken; % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamındaki elde edilen en yüksek kuru hücre derişimi 4.60 g/l ve en yüksek etanol üretimi 10.91 g etanol/l olmuştur. Bu durum, mikroorganizmanın sentetik ksiloza ek olarak hidrolizat şekerini de kullandığını göstermektedir.

5.4.3. Uçucu Kül ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizatlđ Besin Ortamında *P. stipitis*'in Üremesi ve Etil Alkol Üretimi

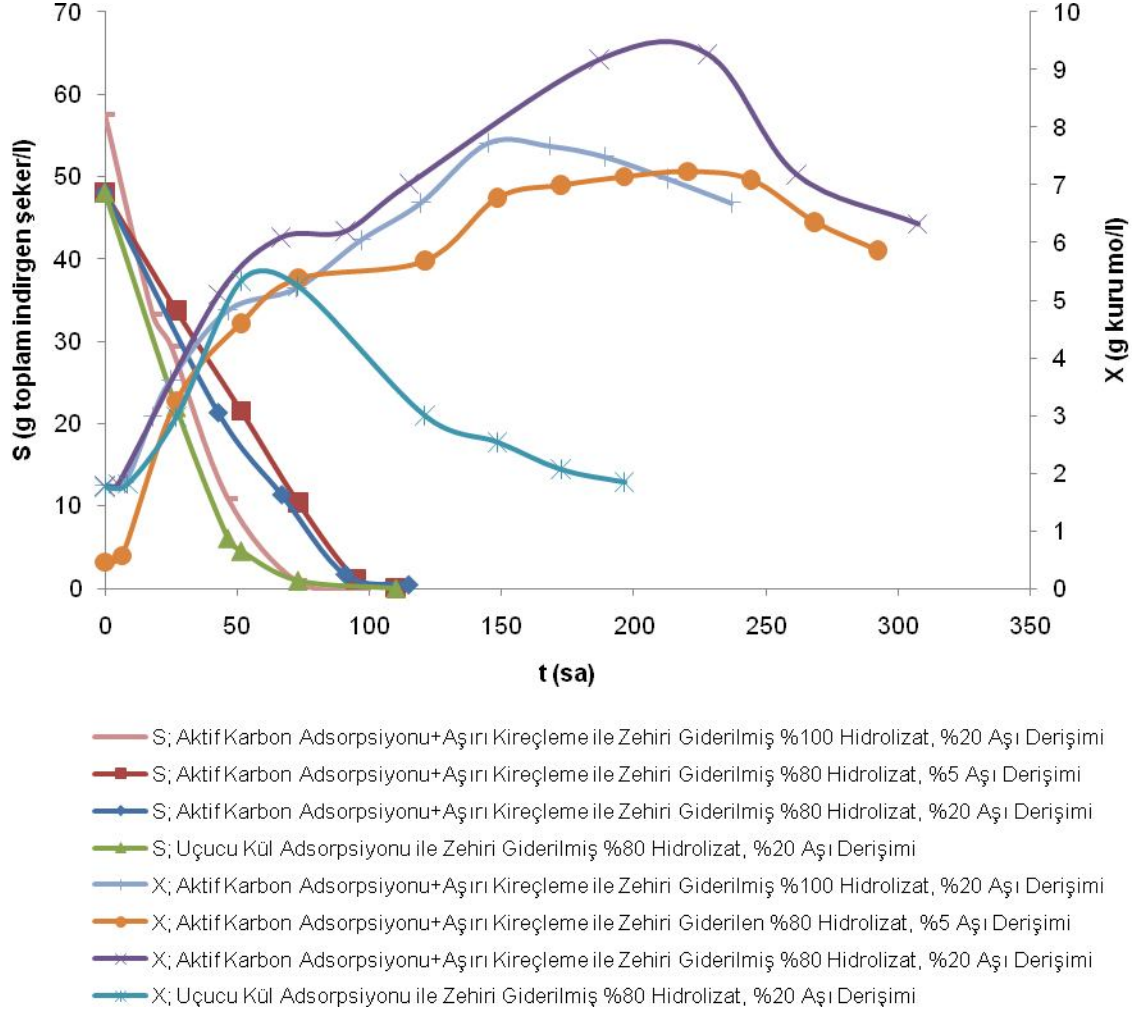
5.4.3.1. % 80 Hidrolizat+10 g/l Ksiloz İçeren Besin Ortamında Yapılan Fermantasyon Çalışmaları

Aynı koşullarda elde edilen hidrolizatın uçucu kül ile zehiri giderildiğinde hidrolizatta yer alan 514.5 mg/l toplam furan bileşikleri derişiminin 217.11 mg/l'ye düştüğü gözlenmiştir. Daha sonra uçucu kül ile zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren ve toplamda 48.16 g/l indirgen şeker ve 173.69 mg/l de toplam furan bileşikleri ihtiva eden besin ortamında 30°C'da, 100 rpm karıştırma hızında, pH 5.5'te ve % 20 aşı derişiminde *P. stipitis* mayasıyla biyoetanol fermantasyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen kuru mikroorganizma, toplam indirgen şeker ve etanol derişimlerinin zamanla değişim eğrileri Şekil 5.30 ve Şekil 5.31'de; bulunan özgül üreme hız sabiti, en yüksek mikroorganizma derişimi, substrat tüketim ve etanol üretim hızları ve etanol üretkenliği değerleri Çizelge 5.10'da sunulmuştur. Şekil 5.30'dan, uçucu kül ile zehiri giderilen hidrolizat aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçlemeyle zehiri giderilmiş hidrolizatın içerdiği toplam furan bileşikleri miktarının 3 katı kadar furan bileşikleri içerdiği için, mayanın üremesinin ve etanol üretiminin zamanla derişiminin diğerlerinden oldukça farklı olduğu görülmüştür. Bu durumda hücreler üstel üreme evresine daha geç ulaşmaktadır. Besin ortamında inhibitör etkisi yapan furan bileşiklerinin fazla olması nedeniyle, hücreler ikinci büyüme evresine geçmeden ölmeye başlamışlar, ancak bu aşamada da bir miktar etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Yine aynı şekilden aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile

zehir giderme yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında uçucu kül ile zehiri giderilmiş hidrolizatla yapılan fermentasyonda etanol üretim hızının daha düşük olduğu ve ulaşılan en yüksek etanol miktarına, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ön işlemlerli fermentasyonda en geç 51 saatte ulaşılırken; uçucu kül ön işlemlerli fermentasyonda bu sürenin 121 saate çıktığı gözlenmiştir. Çizelge 5.10'dan uçucu kül ile zehiri giderilmiş besin ortamında elde edilen en yüksek kuru hücre derişiminin 4.82 g/l, biyoetanol derişiminin 10.83 g/l, mikroorganizmanın özgül üreme hızının 0.026 sa^{-1} , substrat tüketim hızının $0.229 \text{ g toplam indirgen şeker/g kuru mo-sa}$ ve etanol üretkenliğinin $0.097 \text{ g etanol/l-sa}$ olduğu görülmektedir.



Şekil 5.30. Aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile ve uçucu kül ile zehiri giderilmiş hidrolizat içeren besin ortamlarında elde edilen *P. stipitis*'in üreme ve etanol üretim eğrileri (T=30C, pH=5.5, KH=100 rpm)



Şekil 5.31. Aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile ve uçucu kül ile zehiri giderilmiş hidrolizat içeren besin ortamlarında elde edilen *P. Stipitis*'in üreme ve toplam indirgen şeker tüketim eğrileri (T=30C, pH=5.5, KH=100 rpm)

Çizelge 5.10. Sadece 10 g/l ksiloz, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş sadece hidrolizat ve % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz; uçucu kül ile zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamlarında elde edilen *P. stipitis*'in özgül üreme hız sabitleri, en yüksek mikroorganizma ve etanol derişimleri, substrat tüketim ve etanol üretim hızları, üretkenlik ve verim değerleri

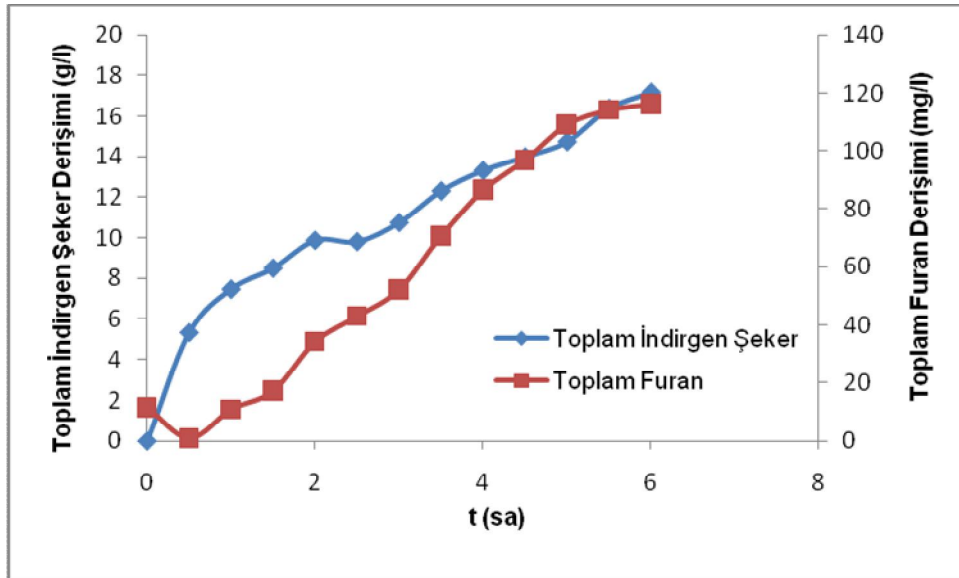
	S_0 (g toplam indirgen şeker/l)	μ (1/sa)	X_m (g kuru mo/l)	η (g toplam indirgen şeker/g kuru mo-sa)	Üretkenlik (g etanol/l-sa)	q_p (g etanol/g kuru mo-sa)	En Yüksek Etanol Derişimi (g etanol/l)	% Verim (g etanol/g toplam indirgen şeker)
Besin Ortamı: 10 g/l Ksiloz %5 Aşı Derişimi	10.04	0.105	1.32	0.061	0.060	0.045	4.47	44.70
Besin Ortamı: %100 Aktif Karbon +Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizat %20 Aşı Derişimi	57.50	0.024	3.62	0.443	0.008	0.002	0.55	0.96
Besin Ortamı: %80 Aktif Karbon +Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizat +10 g/l Ksiloz %5 Aşı Derişimi	48.16	0.085	4.60	0.127	0.211	0.050	10.91	22.65
Besin Ortamı: %80 Aktif Karbon +Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizat +10 g/l Ksiloz %20 Aşı Derişimi	48.16	0.027	5.10	0.138	0.256	0.065	12.25	25.44
Besin Ortamı: %80 Uçucu Kül ile Zehiri Giderilmiş Hidrolizat +10 g/l Ksiloz %20 Aşı Derişimi	48.16	0.026	4.82	0.229	0.097	0.031	10.83	22.49

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında, Türkiye'deki şeker üretiminin en önemli yan ürünlerinden olan şeker pancarı küspesinin yenilenebilir ve çevre dostu bir yakıt olan biyoetanol üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla, hammadde olarak kullanılan şeker pancarı küspesine asidik hidroliz ve zehir giderme gibi işlemler uygulanarak mikrobiyal üremeye uygun bir ortam elde edilmiş ve *P. stipitis* mayasıyla bu ortamda etanol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir.

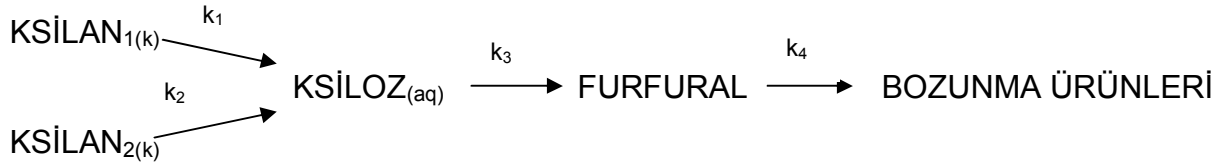
Çalışmanın ilk kısmında şeker pancarı küspesinin yapısındaki hemiselüloz polimerinden mikroorganizmanın kullanabileceği basit indirgen şekerleri elde edebilmek için küspenin asidik hidrolizi gerçekleştirilmiştir. İzotermal ve karıştırmalı kesikli reaktörde gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri sonunda; tepkime sıcaklığına, küspenin tanecik boyutuna, karıştırma hızına, katı/sıvı oranına ve asit derişimine bağlı olarak değişen miktarlarda indirgen şeker oluşumu gözlenmiştir. Ancak indirgen şekerlerin elde edildiği deney koşullarında, bu şekerlerin bozunma ürünleri olan ve mikrobiyal üremeyi olumsuz yönde etkileyen furan bileşiklerinin (furfural ve hidroksimetil furfural) oluşum hızlarının ve miktarlarının da genellikle arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, çalışılan her bir parametrenin farklı değerlerinde gerçekleştirilen hidroliz tepkimeleri esnasında oluşan toplam indirgen şeker derişiminin yanı sıra toplam furan bileşiklerinin derişimi de ölçülerek zamanla değişimleri incelenmiştir. Karıştırma hızının 50, 100 ve 200 rpm değerlerinde, oluşan toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri derişimlerinin ve oluşum hızlarının pek değişmediği görülmüştür. Tanecik boyutu 1.000-1.410 mm aralığında olduğunda tepkime hızının yavaş olduğu; 0.088-0.177 mm aralığında olduğunda yüzey alanı arttığı için tepkime hızının arttığı belirlenmiş; ancak en yüksek tepkime hızına tanecik boyutu 0.707-1.000 mm aralığında olduğunda ulaşılmıştır. 1 g küspe/100 ml asit çözeltisi, 1 g küspe/50 ml asit çözeltisi ve 1 g küspe/25 ml asit çözeltisi katı/sıvı oranı değerlerinde gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda, hammadde derişimi arttığı için hem toplam indirgen şeker hem de toplam furan bileşikleri derişimlerinin arttığı; ancak birim kuru küspe miktarı başına elde edilen en yüksek şeker miktarına 1/50 oranında ulaşıldığı belirlenmiştir. Hidroliz deneylerinde, oluşan toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri miktarlarını en çok etkileyen parametrelerin tepkime sıcaklığı ve asit derişimi olduğu gözlenmiştir. 0.10-0.75 M değerleri arasında değişen çalışılan tüm asit derişimlerinde, tepkime sıcaklığının 90°C'dan 110°C'a

çıkartılmasıyla hem şeker bileşiklerinin hem de furan bileşiklerinin oluşma hızlarının ve miktarlarının belirgin bir şekilde arttığı saptanmıştır. Ancak 110°C'da 0.55 M'ın üzerinde çalışılan H₂SO₄ derişimlerinde oluşan şekerin büyük bir kısmının furan bileşiklerine dönüşerek toplam indirgen şeker derişimini azaltmasından dolayı 110°C ve 0.30 M asit derişimi çalışma koşulu olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak 110°C'da, 100 rpm karıştırma hızında 1 g kuru küspe/50 ml 0.3 M asit çözeltisi katı/sıvı oranında 1.000-1.410 mm boyut aralığındaki taneciklerle bu koşullarda en yüksek değer olan 0.859 g toplam indirgen şeker/ g kuru küspe veya 17.18 g toplam indirgen şeker/l elde edilmiştir. Bu koşullarda oluşan toplam furan bileşikleri derişimi ise 116.30 mg/l olarak bulunmuştur. Şekil 6.1'de bu koşullarda oluşan toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşikleri derişimlerinin zamanla değişim eğrileri sunulmuştur.



Şekil 6.1. 110°C'da, 0.30 M H₂SO₄ derişimiyle gerçekleştirilen hidroliz tepkimesi sırasında toplam indirgen şeker ve toplam furan bileşiklerinin zamanla değişimi (K/S=1 g kurutulmuş küspe/50 ml H₂SO₄ çözeltisi; KH=100 rpm; d_p=1.000-1.410 mm)

İzotermal ve karıştırmalı kesikli reaktörde şeker pancarı küspesinin yapısındaki hemiselülozun büyük oranda ksilandan oluştuğu, ksilanın iki şekilde ksiloza dönüştüğü ve ksilozun bir kısmının da furfurala bozunduğu varsayılarak, oluşan tepkimeler aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.



Eşitlik 3.11 yardımıyla bu tepkimelere ait kinetik sabitler NLREG programında lineer olmayan regresyon yöntemi kullanılarak, şeker derişimini en çok etkileyen iki parametre olan sıcaklık ve asit derişiminin değiştirildiği deneyler için hesaplanmıştır. Bu kinetik sabitler kullanılarak elde edilen toplam indirgen şeker derişimi-zaman ve toplam furan bileşikleri derişimi-zaman verileri deneysel verilerle karşılaştırılmış ve önerilen modelin deneysel hidroliz verilerine çok iyi uyduğu saptanmıştır.

Çalışmaların daha sonraki aşamasında hidrolizatta yer alan toplam furan bileşiklerinin fermantasyon basamağında mikroorganizmanın üremesine inhibisyon etkisi yapacağı düşünöldüğünden, çeşitli yöntemler uygulanarak hidrolizattan zehir giderme yöntemlerinin verimliliği araştırılmıştır. Bu amaçla ticari aktif karbonla, şeker pancarı küspesinin piroliziyle elde edilen aktif karbonla, bir termik santral atığı olan uçucu külle ve ön işlem görmemiş kuru şeker pancarı küspesiyle toplam furan bileşiklerinin adsorpsiyonu çalışılmış ve 117.32 mg/l derişiminde toplam furan bileşikleri içeren ortamda ticari aktif karbonla % 98.0, küspeden elde edilen aktif karbonla % 85.9, uçucu külle % 51.8 oranında furan giderimi sağlanmış olup, ön işlemsiz kuru küspenin furan giderimine hiçbir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ticari aktif karbon ve şeker pancarı küspesinden elde edilen aktif karbonlarla muamele edilen hidrolizatlara adsorpsiyon sonrasında aşırı kireçleme uygulandığında, ticari aktif karbon ile adsorpsiyon yapılan hidrolizattaki toplam furan bileşiklerinin tamamının giderildiği; küspeden elde edilen aktif karbon ile adsorpsiyon yapılan hidrolizattan ise % 97 giderim sağlandığı tespit edilmiştir.

Fermantasyon çalışmalarından önce biyoetanol üretimi için seçilen *P. stipitis* mayası ilk olarak hidrolizattaki şekerin büyük miktarının ksiloz olduğu düşünöldüğü için şeker kaynağı glikoz olan ortamdan ksiloz olan ortama; daha sonra da hidrolizat ortamında daha çok üreyebilmesi ve ürün üretebilmesi için hidrolizat+ksiloza aşamalı olarak adapte edilmiştir. Fermantasyon çalışmalarının ilk basamağı *P. stipitis* mayasının sentetik besin ortamında farklı ksiloz derişimlerinde mikrobiyal üreme, substrat tüketim ve etanol üretim kinetiğinin incelenmesi olmuştur. Bu amaçla yapılan

çalışmalar sonunda başlangıç ksiloz derişiminin 10 g/l'den 75 g/l'ye artmasıyla en yüksek kuru mikroorganizma derişiminin, özgül üreme hız sabitinin, ksiloz tüketim hızının ve etanol üretkenliğinin arttığı belirlenmiştir. Monod eşitliğinden mikroorganizmanın ksilozlu ortamda en yüksek özgül üreme hız sabiti (μ_{max}) 0.155 sa⁻¹ ve doygunluk sabiti (K_s) 4.72 g/l olarak saptanmıştır.

1 g kuru küspe/10 ml 0.3 M H₂SO₄ çözeltisi katı/sıvı oranı sağlanacak şekilde 0.707-1.000 mm boyut aralığında tanecik eklenerek 100°C'da, 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilen 6 saatlik hidroliz tepkimesi sonucunda elde edilen ve toplam 45.30 g/l indirgen şeker ve 514.5 mg/l toplam furan bileşikleri içeren hidrolizat çözeltilerinden birine aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme; diğerine ise uçucu külle zehir giderme işlemleri uygulanmıştır. Zehiri giderilmiş hidrolizat çözeltileri döner buharlaştırıcıda 2 saat bekletilerek ortamdaki toplam indirgen şeker derişiminin ortalama 57.70 g/l olması sağlanmıştır. Bu hidrolizattan diğer zehiri giderilmiş hidrolizatlara ekleme yapılarak istenilen substrat derişimi sağlanmıştır. İlk aşamada aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme uygulanmış olan hidrolizatlarla çalışılmıştır. % 100 hidrolizattan oluşan (toplam 57.70 g/l indirgen şeker) besin ortamında ilave ksiloz eklenmeden % 20 aş derişimiyle çalışıldığında, bu koşullarda mikroorganizmanın üreyebildiği, ortamdaki toplam indirgen şekeri oldukça hızlı tükettiği; ancak çok az miktarda etanol ürettiği görülmüştür. Sonraki aşamada ise, toplam hidrolizat hacmi % 80 olacak şekilde 10 g/l sentetik ksiloz eklenen ve toplam 48.16 g/l indirgen şeker içeren besin ortamlarında aş derişimi % 5 ve % 20 tutularak aş derişiminin mikrobiyal üremeye ve etanol üretimine etkileri araştırılmış ve % 20 aş derişiminde etanol üretkenliğinin; aş derişimi % 5 olduğunda ise hücrenin özgül üreme hızının arttığı görülmüştür. Substrat olarak uçucu külle zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat+10 g/l sentetik ksiloz kullanıldığında ise ortamda daha fazla furan bileşikleri olması sebebiyle hücrelerin özgül üreme hızının ve etanol üretkenliğinin azaldığı, substrat tüketim hızının arttığı, mikroorganizmanın toplam üreme evresini daha hızlı tamamladığı gözlenmiştir.

Çizelge 6.1'de substrat olarak 52 g/l sentetik ksilozla % 5 aş derişimiyle, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş ve toplam indirgen şeker içeriği 57.70 g/l olan % 100 hidrolizat, hem aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile hem de uçucu kül ile zehiri giderilmiş ve toplam indirgen şeker içeriği 48.16 g/l olan hacimce % 80 hidrolizat ve 10 g/l ksiloz kullanılan besin ortamlarında % 20 aş

derişimiyle çalışıldığında, elde edilen etanol üretim hızları, üretkenlik değerleri ve en yüksek etanol derişimleri sunulmuştur. Çizelgeden en yüksek etanol derişiminin 52 g/l sentetik ksiloz içeren besin ortamında 25.52 g/l olarak elde edildiği görülmektedir. %100 hidrolizattan oluşan (toplam 57.70 g/l indirgen şeker) besin ortamında ilave ksiloz eklenmeden çalışıldığında ise en yüksek etanol derişimi 0.55 g/l olarak bulunmuştur. Hem aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile hem de uçucu kül ile zehiri giderilmiş toplam hidrolizat hacmi % 80 olacak şekilde 10 g/l sentetik ksiloz eklenen ve toplam 48.16 g/l indirgen şeker içeren besin ortamlarında yapılan deneyler sonucunda sırasıyla elde edilen en yüksek etanol derişimlerinin ise 12.25 ve g/l 10.83 g/l olduğu görülmüştür. Saf ksilozla yapılan çalışmada elde edilen etil alkol temel olarak alındığında en yüksek verimin % 51.8 olarak aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş hacimce % 80 hidrolizat ve 10 g/l ksiloz içeren besin ortamında bulunduğu görülmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda genel olarak kurutulmuş ve öğütülmüş küspenin indirgen şekerlere hidrolizinin % 85 gibi oldukça yüksek bir verimle gerçekleştirildiği görülmüştür. Dolayısıyla şeker fabrikası yan ürünü olan küspenin ucuz ve verimli olarak şekerlere dönüştürülebileceği ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Fermantasyon öncesi hidrolizattan zehir gidermede yine ilk defa olarak şeker pancarı küspesinin piroliziyle elde edilen aktif karbon ve bir termik santral atığı olan uçucu kül gibi iki farklı adsorbent kullanılmış ve bu adsorbentlerle oldukça yüksek furan bileşikleri giderimi gözlenmiştir. Literatürdeki zehir giderme yöntemlerinin hidroliz basamağına önemli bir ek bir maliyet getirmesine karşın, tez çalışmasında kullanılan bu adsorbentlerle bu basamağın çok daha ucuz bir şekilde gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Zehiri giderilmiş hidrolizatın ksiloz gibi şekerlerle desteklenerek *P. stipitis* mayasıyla fermente edilebildiği ve oldukça yüksek verimde etil alkol elde edilebildiği de bu çalışmada gösterilmiştir. Gelecekte yapılması düşünülen çalışmalarda elde edilen hidrolizatın tam bir analizi gerçekleştirilerek ortamdaki tüm şeker bileşenlerinin ve inhibitörlerin derişimleri ayrı ayrı belirlenecektir. Ortamdaki inhibitör bileşiklerinin mikroorganizmanın üremesine ve etanol üretimine etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi için hazırlanan sentetik ortamlara bu bileşiklerden bilinen derişimlerde eklenerek deneyler yapılacaktır. Etanol veriminin artırılması için, ortam pH'ının ve çözünmüş oksijen derişiminin etkisi karıştırma hızıyla birlikte tam donanımlı ve kontrollü bir fermentörde incelenecektir. Bu amaçla farklı kültürlerin

kullanılması da düşünölmektedir. Ayrıca uygun destekte tutuklanmış mikroorganizma sistemleriyle de etanol üretimi kesikli ve dolgulu kolon reaktörde araştırılacaktır.

Çizelge 6.1. Sadece 52 g/l ksiloz içeren, aktif karbon adsorpsiyonu+aşırı kireçleme ile zehiri giderilmiş sadece hidrolizat içeren ve % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren; uçucu kül ile zehiri giderilmiş % 80 hidrolizat+10 g/l ksiloz içeren besin ortamlarında *P. stipitis*'in fermantasyonundan elde edilen üretkenlik, etanol üretim hızları ve en yüksek etanol derişimleri

	Üretkenlik (g etanol/l-sa)	q_p (g etanol/g kuru mo-sa)	En Yüksek Etanol Derişimi (g etanol/l)	% Verim (g etanol/g toplam indirgen şeker)
Substrat: 52 g/l Ksiloz %5 Aşı Derişimi	0.340	0.098	25.52	49.08
Substrat: Aktif Karbon +Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş %100 Hidrolizat (58 g/l toplam indirgen şeker) %20 Aşı Derişimi	0.008	0.002	0.55	0.96
Substrat: Aktif Karbon +Aşırı Kireçleme ile Zehiri Giderilmiş %80 Hidrolizat+10 g/l Ksiloz (48 g/l toplam indirgen şeker) %20 Aşı Derişimi	0.256	0.065	12.25	25.44
Substrat: Uçucu Kül ile Zehiri Giderilmiş %80 Hidrolizat+10 g/l Ksiloz (48 g/l toplam indirgen şeker) %20 Aşı Derişimi	0.097	0.031	10.83	22.49

KAYNAKLAR

- Agbogbo, F.K. and Coward-Kelly, G., 2007, The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140, 653-662.
- Agbogbo, F.K. and Coward-Kelly, G., 2008, Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*, *Biotechnol Lett*, 30,1515-1524.
- Aksu, Z., 1988, Atıksulardaki Ağır Metal İyonlarının Yeşil Alglerden *Chlorella vulgaris*'e Adsorpsiyonunun Kesikli Düzende Karıştırmalı ve Akışkan Yatak Tepkime Kaplarında İncelenmesi, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 125s.
- Arslan, Y., 2007, Fındık Kabuğunun Etil Alkol Üretiminde Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 317s.
- Balat, M., 2009, Global status of biomass energy use, *Energy Source A*, 31, 1160-1173.
- Balat, M., 2010, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, *Sila Science and Energy Company*, 52, 858-875.
- Ben-Ghedalia, D., Miron, J., 1981, The effect of combined chemical and enzyme treatment on saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 823-831.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C., 2010, Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives, *Bioresour. Technol.*,101, 4754-4766.
- Carvalho W., Silva S.S., Converti, A., Vitolo, M., Felipe, M.G.A., Roberto, I.C., Silva, M.B., Manchilha, I.M., 2002, Used of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98–100,489–496.
- Cazemier, A. E., 1969, Hemicellulose degradation by microorganisms from the intestinal tract of arthropods, *Katholieke Universiteit Nijmegen*, 16.
- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A., Kuhad, R.C., 2007, Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 350, *Bioresour. Technol.*, 98, 1947–1950.
- Cheng, K.K., Cai, B.Y., Zhang, J.A., Ling, H.Z., Zhou, Y.J., Ge, J.P., Xu, J.M., 2008, Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process, *Biochem. Eng. J.*, 38, 105-109.
- Chromatography, Catalog 350, Alltech Associates, 1995, IL, ABD.

- Chum, H.L., Johnson, D.K., Black, S., 1988, Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: 1. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 643-649.
- Dehkoda A., 2008, Concentrating lignocellulosic hydrolysate by evaporation and its fermentation by repeated fedbatch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae*, Master of Science Thesis, Industrial Biotechnology Borås University and SEKAB E-Technology, Sweden.
- du Preez, J.C., 1994, Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts, *Enzyme Microb Technol*, 16:944-956.
- du Preez J.C., Bosch, M., Prior, B.A., 1986, Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration, *Enzyme Microb Technol*, 8:360,364.
- du Preez, J.C. and van der Walt, J.P., 1983, Fermentation of D-Xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*, *Biotechnol. Lett.*, 5, 357-362.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987, In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*, Springer, Berlin, p. 57.
- Feldman, D., Banu, D., Natansohn, A., Wang, J., 1991, Structure-properties relations of thermally cured epoxy-lignin polyblends, *J Appl Polym Sci.*, 42, 1537-1550.
- Forouchi, E., Gunn, d. J., 1983, Some effects on metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media, *Biotech. Bioeng.*, 25, 1905-1911.
- Grous, W.R., Converse, A.O., Grethlein, H.E., 1986, Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar, *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 274-280.
- Hamelinck C.N., Van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C., 2005, Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long term, *Biomass Bioenergy*, 28, 384,410.
- Hoelgaard, L., 2011, F.O. Licht's World Ethanol and Biofuels, <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>.
- Hsu, T.A., Ladisch, M.R., Tsao, G.T., 1980, Alcohol from cellulose, *Chem. Technol.*, 10, 315-319.
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aertz, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.-S., Passoth, V., Richardson, P.M., 2007, Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*, *Nat Biotechnol*, 25(3), 319-326.
- Kargı, F., 1993, Çevre Mühendisliğinde Biyoprosesler, D.E.Ü., Mühendislik Fakültesi Yayınları, No: 234, İzmir.

- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Julson, J.L., 2008, Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated in high shear bioreactor, ASBE Annual International Meeting, Paper No. 084114.
- Kilzer, F.J., Broido, A., 1965, Speculations on the nature of cellulose pyrolysis, *Prodynamics* 2, 151-163.
- Lavarack, B.P., Griffin, G.J., Rodman, D., 2000, Measured kinetics of the acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose, *Catalyst Today*, 63, 257-265.
- Lee, D., Owens, V.N., Boe, A., Jeranyama, P., 2007, Composition of herbaceous biomass feedstocks, South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD.
- Legthelm, M.E., Prior, J.C., du Preez, J.C., Brandt, V., 1988, An investigation of D-xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic conditions, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 28, 293-296.
- Linden, T., Peetre, J., Hahn-Hagerdal, B., 1992, Isolation and characterization of acetic acid tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor plant, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1661-1669.
- Mahler, G., Nudel, C., 2000, Effect of magnesium on the fermentative and respirative functions in *Pichia stipitis* under-oxygen-restricted growth, *Microbiol. Res.*, 155, 31-35.
- Malça, J. and Freire, F., 2006, Renewability and lifecycle energy efficiency of bioethanol and bioethyl tertiary butyl ether (bioETBE): Assessing the implications of allocation, *Energy*, 31, 3362-3380.
- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., 2000, Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass, *Biotechnology Progress*, 16, 637-641.
- McMillan, J.D., 1993, Xylose Fermentation to ethanol: A review, *National Renewable Energy Laboratory*, 3,3.
- McMillan, J.D., 1994, Pretreatment of lignocellulosic biomass, In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, American Chemical Society, Washington, DC, 292-324.
- Melikoğlu, M., ve Albostan, A., 2011, Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli, *Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der.*, 26, 151-160.
- Nguyen, Q.A. and Saddler, J.N., 1991, An integrated model for the technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process, *Bioresour. Technol.*, 35, 275-282.
- Nilvebrant, N.O., Reimann, A., Kleen, M., Larsson, S., Palmqvist, E., 2000, Chemical characterization of fermentation inhibiting dilute acid hydrolysates from spruce.

- Olsson, L. and Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Applied Microbiology*, 18, 312-331.
- Öztürk, İ., 1999, Anaerobik Biyoteknoloji ve Atık Arıtımındaki Uygulamaları, Su Vakfı Yayınları, İstanbul.
- Palmqvist, E., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., 1998, Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 50, 545-551.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 1999, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, I: inhibition and detoxification, *Biosource Technology*, 74, 17-24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, I: inhibition and detoxification, 74, 17-24.
- Palmqvist, E., Meinander, N., Grage, H., Hahn-Hagerdal, B., 1999, Main and interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts, *Biotechnol. Bioeng.*, 63-46-55.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000, Biotechnological potential of agro-industrial residues, I. Sugarcane bagasse, *Bioresour. Technol.*, 74 (2), 69-80.
- Parekh, S., Wayman, M., 1986, Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*, *Biotechnol Lett*, 8(8), 597-600.
- Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Reungsang, A., 2008, Bio-hydrogen production from fermentation of sugar cane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*, *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 5256-5265.
- Pekin, B., 1983, Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji), 2. Kitap, E.Ü. Kim.Fak. Yayınları 4., İzmir, s: 409
- Ralph, A.L., 1967, *Physiology and Biochemistry of Algae*, 3rd ed., Academic Press, USA.
- Rizzi, Klein, M.C., Schultze, C., Bui-Thanh, N., Dellweg, H., 1989, Xylose fermentation by yeasts, Use of ATP balances for modeling oxygen limited growth and fermentation with the yeast *Pichia stipitis* with xylose as a carbon source, *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 509-514.
- Roels, J.A. and Kossen, N.W. F. 1978, On the modeling of microbial metabolism, *Progress in Industrial Microbiology*, 14, 95-108.
- Sendelius, J., 2005, Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production, Master of Science Thesis, Lund University, Sweden.
- Sezer, K., 2010, Şeker Pancarı Küspesinden Elde Edilen Aktif Karbonun Atıksulardaki 2,4-D ve Metribuzin Pestisitlerinin Adsorpsiyonunda

Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 109s.

- SGE, Inc. (Austin, Texas) Chromatography Products, 2001, <http://www.sge.com>.
- Shafizadeh, F., Bradbury, A.G.W., 1979, Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures, *J. Appl. Poly. Sci.* 23, 1431-1442.
- Shuler, M.L., Kargı, F., 1992, *Bioprocess Engineering*, Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- Sivers, M.V., Zacchi, G., 1995, A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour. Technol.*, 51, 43-52.
- Slininger, P.J., Dien, B.S., Gorsick, S.W., Liu, Z.L., 2006, Nitrogen source and mineral optimization enhances D-xylose conversion to ethanol by yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, *Appl. Microbial Cell Physiol.*, 72 (6), 1285-1296.
- Slininger, P.J., Gorsick, S.W., Liu, Z., 2009, Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 788-790.
- Sun, Y., and Cheng, J., 2002, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.*, 83, 1-11.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K., 2008, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *Int J Mol Sci.*, 9, 1621-1651.
- Thring, R.W., Chorent, E., Overend, R., 1990, Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature, *Biomass* 23, 289-305.
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1984, Alcoholic fermentation of D-Xylose by yeasts, *Appl Environ Microbiol.*, 47(6), 1221-1223.
- Tran, A.V., and Chambers, R.P., 1986, Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by yeast *Pichia stipitis* CBS 5776, *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 439-444.
- van der Poel, P.W., Schiweck, H., Schwartz, T., 1998, *Sugar Technology, Beet and Cane Sugar Manufacture*, Berlin.
- Van Zyl, C., Prior, B.A., du Preez, J.C., 1988, Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicelluloses hydrolysate by *Pichia stipitis*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 17, 357-369.
- Vidal, P.F., Molinier, J., 1988, Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust, *Biomass* 16, 1-17.

Walker, Graeme M., 2000, *Yeast Physiology and Biotechnology*, Wiley and Sons, England.

Woods, M.A., and Millis, N.F., 1985, Effect of slow feeding of xylose on ethanol yield by *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Lett.*, 7, 679-682.

Yılmaz, A., 2011, Sürekli Kolonda Adsorpsiyonla Ankara Şeker Fabrikası'nın Ham ve Sulu Şerbetlerinden Melas Yapıcı İyonların Uzaklaştırılmasının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 121s.

EKLER

EK 1. DNS YÖNTEMİYLE TOPLAM İNDİRGEN ŞEKER TAYİNİ

Yöntemde Kullanılan Çözeltiler:

i) DNS çözeltisi: 10 g/l 3,5 dinitro salisilik asit, 10 g/l sodyum hidroksit, 6 g/l fenolün distile suda çözünmesinin ardından çözeltideki oranı 10 ml/l olacak şekilde 10 g/l derişiminde sodyum sülfid çözeltisi eklenerek hazırlanır.

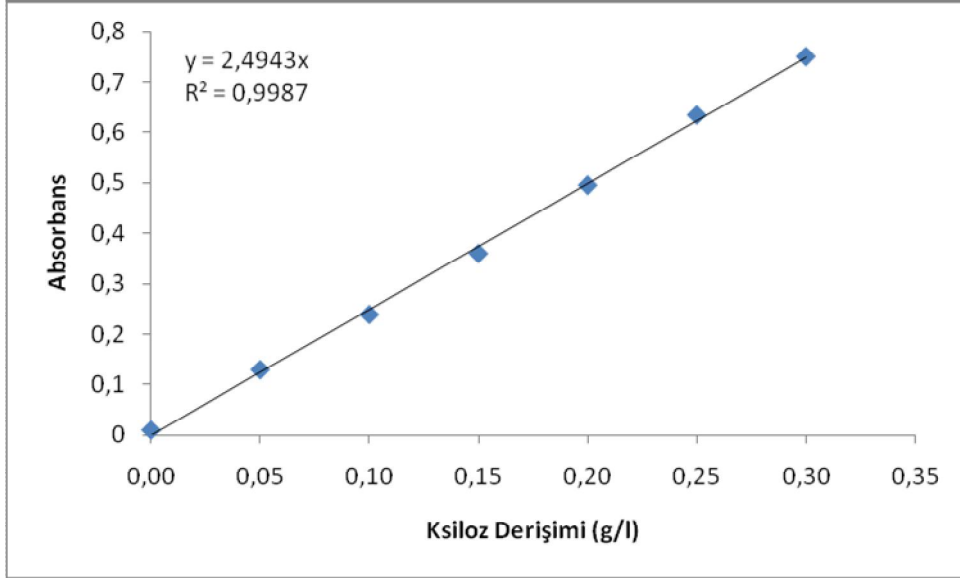
ii) Rochelle tuzu çözeltisi: 400 g/l derişiminde potasyum sodyum tartaratın distile suda çözünmesiyle hazırlanır.

Yöntemin Uygulanışı:

Hem hidrolizatta hem de fermentasyon ortamındaki toplam indirgen şeker derişimi, Miller yöntemi ile spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir (Forouchi et al., 1983). Yöntemin uygulanışı şu şekildedir:

Örnek, analiz öncesinde uygun oranda seyreltilir. Cam deney tüpü içerisine 1.5 ml seyreltilmiş örnek ve 1.5 ml DNS çözeltisi konulur, tüpün ağzı kapatılır ve kaynamakta olan suyun içerisinde 10 dakika boyunca bekletilir. Su banyosundan alınan örneklere 0.5 ml Rochelle tuzu çözeltisi eklenir ve örnekler oda sıcaklığına gelene kadar beklenir. Örneklerin UV spektrofotometrede 575 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülürken, referans olarak 1.5 mL distile su ile hazırlanan ve aynı işlemlerden geçirilen çözelti kullanılır.

Tüm deneylerde ölçülen absorbans değerlerinden toplam indirgen şeker derişimi değerlerini elde edebilmek için, bu işlemler ilk olarak bilinen derişimlerde ksiloz çözeltilerine uygulanmış ve ksiloz derişimi ile absorbans arasındaki ilişkiyi veren kalibrasyon doğrusu (Şekil E.1.) elde edilmiştir.



Şekil E.1. İndirgen şeker için kalibrasyon doğrusu

EK 2. TOPLAM FURAN BİLEŞİKLERİNİN DERİŞİMİ TAYİNİ

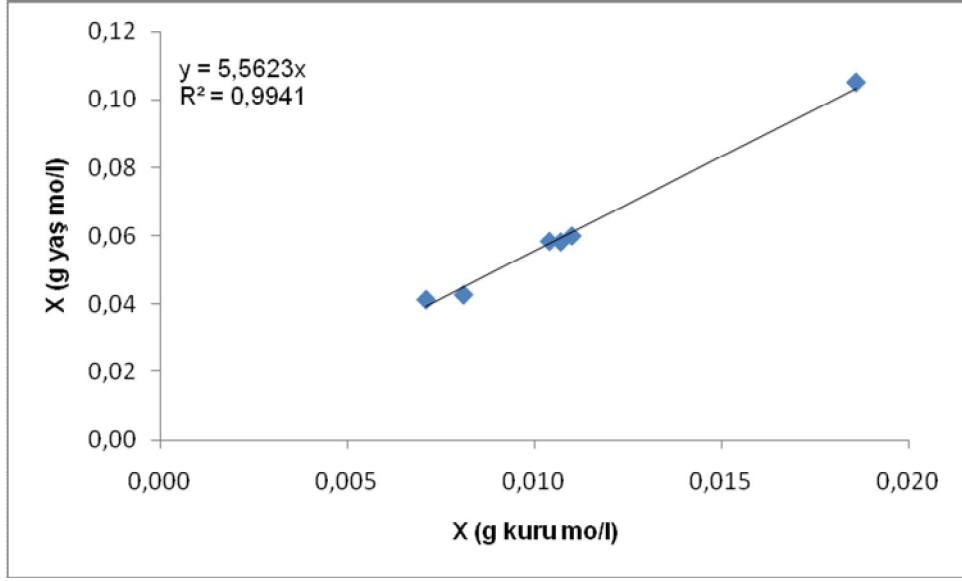
Hemiselüloz hidrolizi sonrasında ortamda bulunan furan bileşikleri olan furfural ve hidroksimetilfurfuralın analizi, geliştirilen spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Martinez et al., 2000). Yöntem temel olarak UV spektrofotometrede 284 nm ve 320 nm dalgaboylarında ölçülen absorban değerleriyle toplam furan derişimi arasında ilişki kurmaktadır. Kurulan bağıntı Eşitlik E.1.'de tanımlanmıştır.

$$A_{284}-A_{320}=0.127 \times \text{Toplam Furan Derişimi (mg/l)} + 0.056 \quad (\text{E.1.})$$

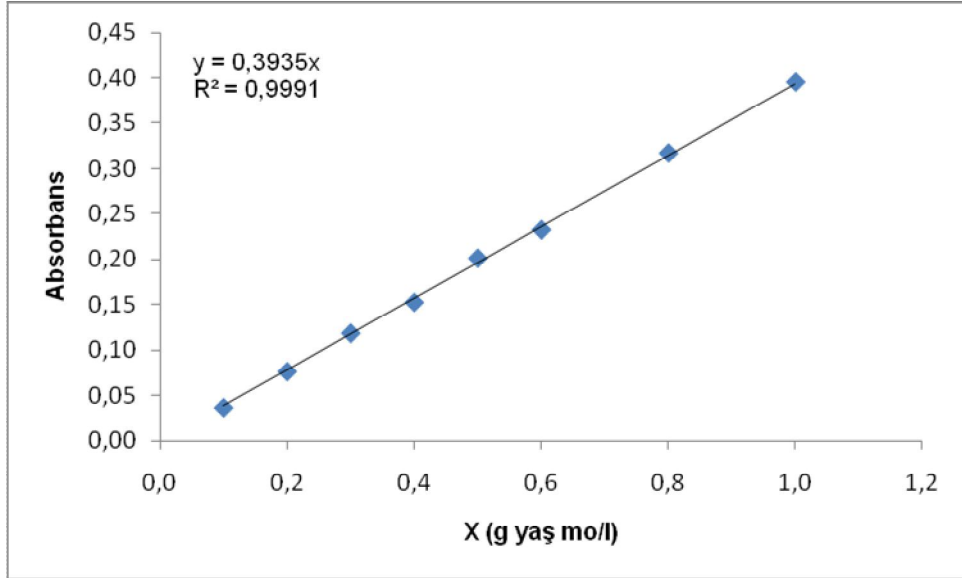
EK 3. MİKROORGANİZMA DERİŞİMİ TAYİNİ

Çalışmada kullanılan bütün mikroorganizma derişimleri için kuru mikroorganizma ağırlığı kullanıldığından, yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek gerekmektedir. Bu amaçla, 25°C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında 3 gün bekletilmiş 4 farklı mikroorganizma büyüme ortamdan, kapaklı ve plastik santrifüj tüplerine her bir ortamdan 3 adet olmak üzere toplam 12 adet 10 ml'lik örnekler alınmıştır. Bu örnekler, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, 6 tanesinin üstündeki sıvı ortamı mikropipetle çekilip atılmış, diğer 6 tanesi ise 35 Hz frekansta vortekslenmiştir. Vortekslenen tüpteki karışımlar, üzerinden sıvısı atılan tüplere aktarılmış ve bu işlem 1 tane tüp kalana kadar tekrarlanmıştır. Kalan son tüpteki karışım santrifüjlendikten sonra sıvı ortam atılmış ve elde edilen yaş mikroorganizma çökeltisi distile suyla 2 defa yıkanmıştır. Daha önceden tartılıp numaralandırılmış olan alüminyum folyoların üzerine farklı miktarlarda mikroorganizma konulmuş ve yine tartılarak yaş mikroorganizma brüt ağırlıkları elde edilmiştir. Bu işlem sonrasında mikroorganizmalar 80°C'de etüve konulmuş, belirli aralıklarla çıkarılıp ağırlıkları ölçülmüş ve ağırlıklarının sabitlendiği değerler kuru mikroorganizma brüt ağırlıkları olarak kaydedilmiştir. Brüt ağırlıklardan, alüminyum folyoların ağırlıklarının çıkarılmasıyla elde edilen net yaş ve kuru mikroorganizma ağırlıklarının doğrusal değişimi Şekil E.2.'de verilmiştir.

Mikroorganizma derişiminin absorbansla değişimini gösteren çalışma doğrusunu elde edebilmek için ise 1 g/l'ye kadar farklı derişimlerde mikroorganizma içeren çözeltiler hazırlanmış ve UV spektrofotometrede *P. stipitis* için optimum dalga boyu olan 600 nm'de çözeltilerin absorbans değerleri ölçülmüştür. Mikroorganizma derişiminin absorbans değerleriyle doğrusal değişimi Şekil E.3'te verilmiştir.



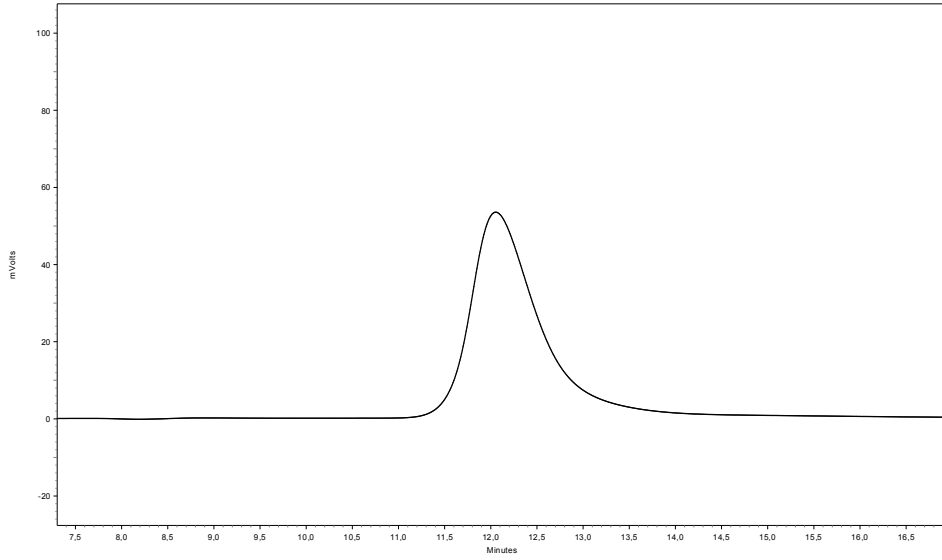
Şekil E.2. *P. stipitis* için yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu



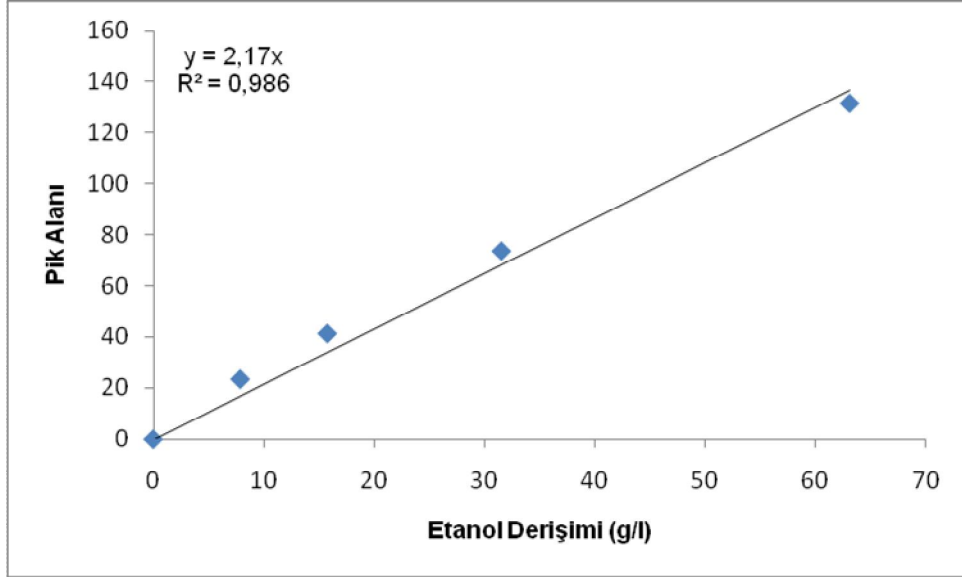
Şekil E.3. *P. stipitis* için yaş mikroorganizma çalışma doğrusu

EK 4. ETANOL DERİŞİMİ TAYİNİ

Fermantasyon ortamından alınan örneklerdeki etanol derişimi tayini, HPLC cihazında (Shimadzu, Japonya) sülfonik asit bağlı poliakrilat kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil E.4'te, ortalama 14 dakikada tamamlanan piklere örnek olarak 15.8 g/l etanol içeren örneğin verdiği pik sunulmuştur. Sisteme enjekte edilen, etanol derişimi 0-75 g/l aralığında değişen örnekler için elde edilen piklere iki tarafından da teğet olacak şekilde ve taban çizgilerini birleştiren oluşturulan üçgenlerin alanları hesaplanarak, alanların etanol derişimiyle değişimini gösteren çalışma doğrusu Şekil E.5.'te sunulmuştur.



Şekil E.4. 15.8 g/l etanol içeren örnek için HPLC'de elde edilen pik



Şekil E.5. Etanol için kalibrasyon doğrusu

EK 5. HİDROLİZ TEPKİMESİNİN HIZ SABİTLERİNİN BULUNMASI AMACIYLA KULLANILAN PROGRAM ÇIKTILARI

Şeker pancarı küspesinin asidik hidrolizi esnasında gerçekleşen tepkimelerin hız sabitleri, non-linear regresyon analiz yöntemiyle NLREG programı kullanılarak bulunmuştur. Asit derişimi ve sıcaklıkla değişen tepkimeler için bulunan hız sabitleri ve deneysel verilerin modele uygunluğunun ifadesi olan korelasyon katsayıları aşağıda verilen program çıktılarında sunulmuştur.

NLREG version 6.5
Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 90C; Acid Concentration: 0.1 M
Number of observations = 12
Maximum allowed number of iterations = 50
Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
Stopped due to: Relative function convergence.
Number of iterations performed = 24
Final sum of squared deviations = 8.8444638E-001
Final sum of deviations = 1.6253439E-002
Standard error of estimate = 0.313483
Average deviation = 0.235731
Maximum deviation for any observation = 0.41961
Proportion of variance explained (R²) = 0.9635 (96.35%)
Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9554 (95.54%)
Durbin-Watson test for autocorrelation = 1.059

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
constrain statements were used.

Analysis completed 21-Jun-2011 17:34. Runtime = 84.43 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	6	3.25	1.802776
Concentration	0.053	4.79	3.405	1.485011

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.701	0.104061116
k2	4.501	0.127230886
k3	1.701	0.108029478

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	23.37338	11.68669	118.92	0.00001
Error	9	0.8844464	0.09827182		
Total	11	24.25783			

NLREG version 6.5

Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature 90C; Acid Concentration: 0.55 M

Number of observations = 12

Maximum allowed number of iterations = 50

Convergence tolerance factor = 1.000000E-001

Stopped due to: Relative function convergence.

Number of iterations performed = 24

Final sum of squared deviations = 3.1859001E-001

Final sum of deviations = 2.7761334E-005

Standard error of estimate = 0.188146

Average deviation = 0.118147

Maximum deviation for any observation = 0.41896

Proportion of variance explained (R²) = 0.9782 (97.82%)

Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9734 (97.34%)

Durbin-Watson test for autocorrelation = 2.245

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because constrain statements were used.

Analysis completed 17-Jun-2011 16:17. Runtime = 225.54 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	6	3.25	1.802776
Concentration	5.372	8.976	7.657333	1.153371

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.101	0.0394269719
k2	2.401	0.0856133588
k3	1.201	0.0437460238

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	14.31432	7.15716	202.19	0.00001
Error	9	0.31859	0.03539889		
Total	11	14.63291			

NLREG version 6.5
 Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 90C; Acid Concentration: 0.75 M
 Number of observations = 14
 Maximum allowed number of iterations = 50
 Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
 Stopped due to: Relative function convergence.
 Number of iterations performed = 36
 Final sum of squared deviations = 4.4610664E-001
 Final sum of deviations = 1.2446358E-003
 Standard error of estimate = 0.201383
 Average deviation = 0.142782
 Maximum deviation for any observation = 0.369665
 Proportion of variance explained (R²) = 0.9829 (98.29%)
 Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9798 (97.98%)
 Durbin-Watson test for autocorrelation = 1.560

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
 constrain statements were used.
 Analysis completed 17-Jun-2011 16:34. Runtime = 245.48 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	5.385	10.344	8.603286	1.418256

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.201	0.0330060479
k2	4.301	0.094072496
k3	0.601	0.0373348266

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	25.70273	12.85136	316.89	0.00001
Error	11	0.4461066	0.04055515		
Total	13	26.14883			

NLREG version 6.5
 Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.1 M
 Number of observations = 14
 Maximum allowed number of iterations = 50
 Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
 Stopped due to: Relative function convergence.
 Number of iterations performed = 50
 Final sum of squared deviations = 9.8428707E+000
 Final sum of deviations = 1.5032400E-007
 Standard error of estimate = 0.945942
 Average deviation = 0.699474
 Maximum deviation for any observation = 1.63849
 Proportion of variance explained (R²) = 0.9493 (94.93%)
 Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9401 (94.01%)
 Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.412
 This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
 constrain statements were used.
 Analysis completed 17-Jun-2011 17:04. Runtime = 66.04 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	3.592	16.293	9.830357	3.86492

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.601	1E-008
k2	4.501	0.141725508
k3	1.901	1.22654554E-008

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	184.346	92.17301	103.01	0.00001

NLREG version 6.5
 Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.3 M
 Number of observations = 14
 Maximum allowed number of iterations = 50
 Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
 Stopped due to: Relative function convergence.
 Number of iterations performed = 48
 Final sum of squared deviations = 8.1587188E+000
 Final sum of deviations = 1.6810223E-007
 Standard error of estimate = 0.861221
 Average deviation = 0.657496
 Maximum deviation for any observation = 1.2926
 Proportion of variance explained (R²) = 0.9658 (96.58%)
 Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9596 (95.96%)
 Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.565
 This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
 constrain statements were used.
 Analysis completed 17-Jun-2011 17:13. Runtime = 87.64 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	5.34	19.164	12.70093	4.284647

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.101	1E-008
k2	0.601	0.176680946
k3	0.301	1.21116796E-008

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	230.4979	115.249	155.38	0.00001
Error	11	8.158719	0.7417017		
Total	13	238.6566			

NLREG version 6.5
Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.55 M
Number of observations = 14
Maximum allowed number of iterations = 50
Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
Stopped due to: Relative function convergence.
Number of iterations performed = 21
Final sum of squared deviations = 1.4471710E+000
Final sum of deviations = 4.7470081E-004
Standard error of estimate = 0.362713
Average deviation = 0.261709
Maximum deviation for any observation = 0.543951
Proportion of variance explained (R²) = 0.9845 (98.45%)
Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9816 (98.16%)
Durbin-Watson test for autocorrelation = 1.690

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
constrain statements were used.
Analysis completed 17-Jun-2011 16:26. Runtime = 120.60 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	4.378	13.455	10.13071	2.676296

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.001	0.0189192361
k2	1.701	0.148404518
k3	0.301	0.022409221

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	91.66615	45.83307	348.38	0.00001

NLREG version 6.5
 Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.75 M
 Number of observations = 14
 Maximum allowed number of iterations = 50
 Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
 Stopped due to: Relative function convergence.
 Number of iterations performed = 14
 Final sum of squared deviations = 4.7037803E+000
 Final sum of deviations = -4.7397944E-002
 Standard error of estimate = 0.653924
 Average deviation = 0.486708
 Maximum deviation for any observation = 1.02824
 Proportion of variance explained (R²) = 0.8777 (87.77%)
 Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.8554 (85.54%)
 Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.684
 This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
 constrain statements were used.
 Analysis completed 17-Jun-2011 16:44. Runtime = 202.68 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	5.212	11.194	9.084857	1.719942

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k1	0.501	0.0638269349
k2	3.501	0.262879686
k3	2.101	0.0742764988

---- Analysis of Variance ----

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob(F)
Regression	2	33.75281	16.8764	39.47	0.00001
Error	11	4.70378	0.4276164		
Total	13	38.45659			

NLREG version 6.5
Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 90C; Acid Concentration: 0.55 M
Number of observations = 12
Maximum allowed number of iterations = 50
Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
Stopped due to: Relative function convergence.
Number of iterations performed = 8
Final sum of squared deviations = 1.6193899E-003
Final sum of deviations = -4.5527731E-002
Standard error of estimate = 0.0121333
Average deviation = 0.0097512
Maximum deviation for any observation = 0.0233394
Proportion of variance explained (R²) = 0.8498 (84.98%)
Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.8498 (84.98%)
Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.231
This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
constrain statements were used.
Analysis completed 17-Jun-2011 16:22. Runtime = 14.45 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	6	3.25	1.802776
Concentration	0	0.091	0.04825	0.03130822

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k4	9.356	2.6894156

NLREG version 6.5
Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 90C; Acid Concentration: 0.75 M
Number of observations = 14
Maximum allowed number of iterations = 50
Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
Stopped due to: Relative function convergence.
Number of iterations performed = 15
Final sum of squared deviations = 4.6102908E+002
Final sum of deviations = -1.6490702E+001
Standard error of estimate = 5.95515
Average deviation = 3.89769
Maximum deviation for any observation = 14.2138
Proportion of variance explained (R²) = 0.9817 (98.17%)
Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9817 (98.17%)
Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.526
This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
constrain statements were used.

Analysis completed 17-Jun-2011 16:39. Runtime = 0.06 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	7.433	144.441	101.0438	44.01001

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k4	0.301	1.59042934

NLREG version 6.5
Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.10 M
Number of observations = 15
Maximum allowed number of iterations = 50
Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
Stopped due to: Both parameter and relative function convergence.
Number of iterations performed = 16
Final sum of squared deviations = 2.6795434E+003
Final sum of deviations = -5.3411615E+001
Standard error of estimate = 13.8346
Average deviation = 11.0461
Maximum deviation for any observation = 29.4686
Proportion of variance explained (R²) = 0.6707 (67.07%)
Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.6707 (67.07%)
Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.206
This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
constrain statements were used.
Analysis completed 17-Jun-2011 17:20. Runtime = 58.10 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0	7	3.52	2.227811
Concentration	0	74.52	22.50653	24.108

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k4	25.986	0.141703436

NLREG version 6.5
Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.30 M
Number of observations = 14
Maximum allowed number of iterations = 50
Convergence tolerance factor = 1.000000E-001
Stopped due to: Both parameter and relative function convergence.
Number of iterations performed = 16
Final sum of squared deviations = 7.6496189E+002
Final sum of deviations = -2.9006520E+001
Standard error of estimate = 7.67093
Average deviation = 6.70918
Maximum deviation for any observation = 12.5805
Proportion of variance explained (R²) = 0.9721 (97.21%)
Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9721 (97.21%)
Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.531
This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because
constrain statements were used.
Analysis completed 17-Jun-2011 17:16. Runtime = 0.82 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	1	140.607	72.37207	45.94066

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k4	0.171	2.21096804E-008

NLREG version 6.5

Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.55 M

Number of observations = 14

Maximum allowed number of iterations = 50

Convergence tolerance factor = 1.000000E-001

Stopped due to: Relative function convergence.

Number of iterations performed = 10

Final sum of squared deviations = 6.9751723E+002

Final sum of deviations = -1.5659960E+001

Standard error of estimate = 7.32497

Average deviation = 5.44001

Maximum deviation for any observation = 19.1257

Proportion of variance explained (R²) = 0.9688 (96.88%)

Adjusted coefficient of multiple determination (Ra²) = 0.9688 (96.88%)

Durbin-Watson test for autocorrelation = 1.168

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because constrain statements were used.

Analysis completed 17-Jun-2011 17:22. Runtime = 0.05 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0.5	7	3.75	2.09165
Concentration	0	146.803	91.77293	41.44968

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k4	0.501	1.82511927

NLREG version 6.5

Copyright (c) 1992-2008 Phillip H. Sherrod.

Temperature: 110C; Acid Concentration: 0.75 M

Number of observations = 14

Maximum allowed number of iterations = 50

Convergence tolerance factor = 1.000000E-001

Stopped due to: Relative function convergence.

Number of iterations performed = 7

Final sum of squared deviations = 1.4150826E+004

Final sum of deviations = -4.5436468E+001

Standard error of estimate = 32.9928

Average deviation = 26.042

Maximum deviation for any observation = 69.4914

Proportion of variance explained (R^2) = 0.7186 (71.86%)

Adjusted coefficient of multiple determination (R_a^2) = 0.7186 (71.86%)

Durbin-Watson test for autocorrelation = 0.202

This Durbin-Watson value indicates autocorrelation or inappropriate function.

Note: Parameter t-statistics and confidence intervals were not computed because constrain statements were used.

Analysis completed 17-Jun-2011 16:52. Runtime = 0.06 seconds.

---- Descriptive Statistics for Variables ----

Variable	Minimum value	Maximum value	Mean value	Standard dev.
Time	0	6.5	3.271429	2.084901
Concentration	0	204.598	113.0889	62.19935

---- Calculated Parameter Values ----

Parameter	Initial guess	Final estimate
k4	2.401	4.481237

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hande GÜNAN YÜCEL

Doğum Yeri : Rize

Doğum Yılı : 14.01.1986

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise 2001-2004 : Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi

Lisans 2004-2008 :Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi

2008-2011 : Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

Görev Aldığı Projeler :

1. Prof. Dr. Zümriye Aksu (Proje Yürütücüsü), Arş. Gör Hande Günan Yücel (Yardımcı Araştırmacı), “Şeker Pancarı Küspesinin Biyoetanol Üretiminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması”, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi- tamamlandı.