

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KO-İMMOBİLİZE AMİLOGLİKOZİDAZ – *Zymomonas mobilis*
HÜCRELERİ İLE SÜREKLİ KARIŞTIRMALI BİYOREAKTÖRDE
NIŞASTADAN ETİL ALKOL ÜRETİMİ**

Evrım GÜNEŞ

170144

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

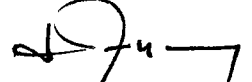
2005

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK danışmanlığında, Evrim GÜNEŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, 08 /07 / 2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. M.Lütfü ÇAKMAKÇI

İmza



Üye : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

İmza



Üye : Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KO-İMMOBİLİZE AMİLOGLİKOZİDAZ - *Zymomonas mobilis* HÜCRELERİ İLE SÜREKLİ KARIŞTIRMALI BİYOREAKTÖRDE NİŞASTADAN ETİL ALKOL ÜRETİMİ

Evrım GÜNEŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Sürekli karıştırılmalı bir biyoreaktör içerisinde amiloglikozidaz ve *Zymomonas mobilis* hücreleri ile oluşturulan ko-immobilize sistemde, nişastadan etil alkol üretimi üzerinde çalışılmıştır. Nişastanın şekerlendirilmesinin ve etil alkole fermentasyonunun tek reaktör içinde gerçekleştirildiği bu sistemde, amiloglikozidaz kitin üzerine bağlanarak *Zymomonas mobilis* hücreleri ile birlikte Ca-aljinat jeli içinde immobilize edilmiştir.

Denemeler, sıcaklık ve santrifluj hücre ağırlıklarının 35 °C ve 20.3 gram; 30 °C ve 19.0 gram; 35 °C ve 29.2 gram olarak belirlendiği 3 ayrı koşulda gerçekleştirilmiştir. Tüm denemeler için substratın başlangıç pH'sı 5.5'e ayarlanmıştır. En yüksek hacimsel verimlilik değeri (7.6 g/L.h) 35 °C'de 29.2 gram santrifluj hücre ile yapılan denemede, 0.20 1/h dilüsyon hızında, 0.45 g/g verim katsayısıyla elde edilmiştir. En yüksek etanol konsantrasyonu (43.5 g/L), 0.15 1/h dilüsyon hızında, %98 substrat dönüşümü ile elde edilmiştir.

Reaktörde çalışılan farklı koşullar kıyaslandığında, reaktör içerisinde immobilize edilen başlangıç hücre konsantrasyonunun etil alkol fermentasyonunun kinetik parametrelerini önemli ölçüde olumlu etkilediği görülmektedir.

Sürekli simultane sakkarifikasyon ve fermentasyon (SSF) gerçekleştirdiği üretim denemeleri, kontaminasyon ve ko-immobilize sistemin bozulması sorunlarıyla karşılaşılmaksızın, 3 hafta süresince, başarıyla sürdürülmüştür.

2005, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler : *Zymomonas mobilis*, amiloglikozidaz, ko-immobilizasyon, etil alkol üretimi, simultane sakkarifikasyon ve fermentasyon, sürekli karıştırılmalı biyoreaktör.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ETHANOL PRODUCTION FROM STARCH BY CO-IMMOBILIZED AMYLOGLucOSIDASE – *Zymomonas mobilis* CELLS IN A CONTINUOUS STIRRED BIOREACTOR

Evrım GÜNEŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Filiz ÖZÇELİK

Continuous ethanol production from starch was studied in a continuously-stirred bioreactor using co-immobilized amyloglucosidase and *Zymomonas mobilis* cells. In this process, saccharification of starch and fermentation to ethanol were carried out in a single reactor after amyloglucosidase was bound on chitin, and then co-immobilized with *Zymomonas mobilis* cells in small beads of Ca-alginate.

The experiments were carried out at three conditions for which temperature and centrifuged cell weight were 35 °C and 20.3 g ; 30 °C and 19.0 g; 35 °C and 29.2 g ,respectively. The initial pH of the substrates was 5.5 for all the conditions. The maximum volumetric ethanol productivity (7.6 g/L.h) was achieved with 0.45 g/g yield at the 0.20 1/h dilution rate at 35 °C, with the initial centrifuged cell concentration of 29.2 gram. The maximum ethanol concentration (43.5 g/L) was obtained at the 0.15 1/h dilution rate with a 98% conversion of substrate.

When experimental conditions in the reactor was compared to each other, the initial concentration of immobilized cells has been found to have a significant positive influence on the kinetic parameters of ethanol fermentation.

The continuously-stirred bioreactor for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) was successfully operated over three weeks, without any problems related to contamination and or the destruction of biocatalyst beads.

2005, 58 pages

Key Words : *Zymomonas mobilis*, amyloglucosidase, co-immobilization, ethanol production, simultaneous saccharification and fermentation, continuously-stirred bioreactor.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımda bulunan, ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, ve tüm bilgisini benimle paylaşan danışman hocam sayın Prof.Dr. Filiz ÖZÇELİK'e, çalışmalarım sırasında önemli yardımlarda bulunan sayın Prof.Dr. Sedat DÖNMEZ ile Arař.Grv. Safiye KARAAĞAÇ'a ve manevi destekleri için sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Projeleri kapsamında desteklenen "Ko-immobilize Amiloglukozidaz - *Zymomonas mobilis* Hücreleri ile Akışkan Yataklı Biyoreaktörde Nişastadan Etil Alkol Üretimi" konulu projenin bir bölümüdür.

Bu tez çalışması " TÜBİTAK, Bilim Adamı Yetiřtirme Grubu" tarafından Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu ile desteklenmiştir.

Evrim GÜNEŞ

Ankara, Haziran 2005

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Etanol Üretimi ve Etanol Üretiminde Hammadde Seçimi.....	3
2.2. <i>Zymomonas mobilis</i> Bakterisiyle Etanol Üretimi ve SSF Prosesi.....	5
2.3. İmmobilizasyon ve Ko-immobilizasyon Yöntemleriyle Etanol Üretimi.....	11
2.4. Sürekli Sistemde Etil Alkol Üretim Proseslerinde Kinetik Parametreler.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Nişasta çözültüsünün hazırlanması.....	25
3.2.2. İmmobilizasyon yöntemleri.....	25
3.2.3. Fermentasyon işlemi.....	26
3.2.4. Fiziksel ve kimyasal analizler.....	30
3.2.4.1. pH tayini.....	30
3.2.4.2. Hücre konsantrasyonu tayini.....	30
3.2.4.3. Etil alkol tayini.....	30
3.2.4.4. Glikoz ve toplam şeker tayini.....	31
3.2.4.4.1. Glikoz tayini.....	31
3.2.4.4.2. Toplam şeker tayini.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Sürekli Karıştırmalı Reaktördeki Ko-immobilize Sistemde Etil Alkol Üretimi.....	34
4.2. Ko-immobilize Sistemde Sürekli Etil Alkol Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	35
4.3. Ko-immobilize Sistemde Sürekli Etil Alkol Üretimi Üzerine Hücre Konsantrasyonunun Etkisi.....	44
5. SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	55
EK 1 <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 10988'in Optik Yoğunluğa Karşı Hücre Kuru Ağırlıkları.....	56
EK 2 Glikoz Standart Kurvesi.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

SİMGELER DİZİNİ

AMG	Amiloglukozidaz
D	Dilüsyon Hızı; 1/h
D _c	Kritik Dilüsyon Hızı; 1/h
D _m	Maksimum Dilüsyon Hızı; 1/h
E	Teorik Verimin Yüzdesi; %
F	Besleme Hızı; mL/h
K _s	Gelişme İçin Sabit Substrat Limitasyon Değeri; g/L
P	Ürün (Etanol) Konsantrasyonu; g/L
S	Atık Substrat Konsantrasyonu; g/L
S ₀	Başlangıç Substrat Konsantrasyonu; g/L
SML	Sentetik Değirmen Sıvısı
SSF	Simultane Sakkarifikasyon ve Fermentasyon
V	Hacim; mL
V _p	Hacimsel Ürün Verimliliği; g/L.h
V _x	Hacimsel Biyokütle Verimliliği; g/L.h
X	Biyokütle (<i>Zymomonas mobilis</i>) Konsantrasyonu; g/L
Y _{p/s}	Ürün Verim Katsayısı; g/g
Y _{x/s}	Biyokütle Verim Katsayısı; g/g
μ	Özgül Gelişme Hızı; 1/h

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücrelerin Ca-aljinat içerisinde immobilizasyonu.....	13
Şekil 2.2. SSF prosesinde ayrı ayrı immobilize edilmiş enzim ve hücre kullanımı.....	15
Şekil 2.3. SSF prosesinde ko-immobilize enzim ve hücre kullanımı.....	16
Şekil 3.2. Sürekli SSF işleminin gerçekleştirildiği sistemin akış şeması.....	27
Şekil 3.3. Denemelerde kullanılan reaktörün şekli ve boyutları.....	28
Şekil 3.4. Ko-immobilize sistemde kullanılan düzenek.....	29
Şekil 4.1. 35 °C’de 20.3 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ilk denemede dilüsyon hızına karşılık toplam şeker ve glikoz konsantrasyon değerleri.....	38
Şekil 4.2. 35 °C’de 20.3 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ilk denemede dilüsyon hızına karşılık substrat dönüşümü ve hacimsel verimlilik değerleri.....	38
Şekil 4.3. 30 °C’de 19 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ikinci denemede dilüsyon hızına karşı toplam şeker ve glikoz konsantrasyon değerleri.....	43
Şekil 4.4. 30 °C’de 19.0 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ikinci denemede dilüsyon hızına karşılık substrat dönüşümü ve hacimsel verimlilik değerleri.....	43
Şekil 4.5. 35 °C’de 29.2 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen üçüncü denemede dilüsyon hızına karşılık toplam şeker ve glikoz konsantrasyon değerleri.....	47
Şekil 4.6. 35 °C’de 29.2 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen üçüncü denemede dilüsyon hızına karşılık substrat dönüşümü ve hacimsel verimlilik değerleri.....	47
Şekil 4.7. Dilüsyon hızlarına karşılık etanol konsantrasyonları.....	48
Şekil 4.8. Dilüsyon hızlarına karşılık substrat dönüşümü değerleri.....	49
Şekil 4.9. Dilüsyon hızlarına karşılık hacimsel verimlilik değerleri.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Etil alkol üretiminde kullanılan hammaddeler.....	3
Çizelge 2.2. <i>Zymomonas mobilis</i> 'in değişik bazı hammaddelerden etanol üretimindeki performansı.....	7
Çizelge 2.3. Nişastadan SSF prosesi ile etil alkol üretiminde kullanılan immobilizasyon metotları için elde edilen kinetik değerler.....	22
Çizelge 2.4. Sıvılaştırılmış kassava nişastasından ko-İmmobilize <i>Zymomonas mobilis</i> ve <i>Saccharomyces diastaticus</i> ile sürekli etanol üretim prosesi için hesaplanan kinetik parametreler.....	23
Çizelge 3.1. Glikoz tayininde gerekli çözelti ve örnek miktarları.....	32
Çizelge 4.1. Sürekli karıştırmalı reaktörde AMG ve <i>Zymomonas mobilis</i> ko-immobilizatları ile nişastadan etil alkol üretimine ilişkin ilk denemeye (35 °C, 20.3 g santrifüj hücre) ait bulgular ve hesaplanan kinetik değerler.....	36
Çizelge 4.2. Sürekli karıştırmalı reaktörde AMG ve <i>Zymomonas mobilis</i> ko-immobilizatları ile nişastadan etil alkol üretimine ilişkin ikinci denemeye (30 °C, 19.0 g santrifüj hücre) ait bulgular ve hesaplanan kinetik değerler.....	41
Çizelge 4.3. Sürekli karıştırmalı reaktörde AMG ve <i>Zymomonas mobilis</i> ko-immobilizatları ile nişastadan etil alkol üretimine ilişkin ilk denemeye (35 °C, 29.2 g santrifüj hücre) ait bulgular ve hesaplanan kinetik değerler.....	45

1. GİRİŞ

Son yıllarda petrolün giderek azalması ve buna bağlı olarak da petrol fiyatlarındaki artış çok yönlü bir enerji kaynağı olan etil alkole gittikçe artan bir gereksinim duyulmasına neden olmuştur. Bu da tüm dünyada etil alkol üzerindeki araştırmaları teşvik etmektedir.

Fermentasyon yoluyla alkol üretiminde, yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı dünyada enerji krizinin başlamasıyla birlikte büyük önem kazanmıştır.

Etanol günümüzde benzinin oktan sayısını artırması ve eksoz gazlarındaki CO içeriğini azaltması gibi olumlu özellikleri nedeniyle benzine katkı olarak kullanılmaktadır.

Etanol çözücü özelliği, germisid olarak kullanılması, antifriz olması, deprezant olması ve en önemlisi yakıt olarak kullanılabilmesi özelliklerinden dolayı eşsiz bir organik bileşendir.

Etil alkol üretiminde kullanılan şekerler başlıca üç çeşit hammaddeden türetilirler. Bunlar; şeker içeren substratlar, seltülozlu materyaller ve nişastalı hammaddelerdir. Substrat seçimi etil alkol üretiminde maliyeti önemli oranda etkileyecek bir parametredir. Yapılan çalışmalar ucuz olan nişastalı hammaddeler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Fakat nişastalı hammaddelerin fermente olabilir şekerlere dönüştürülmesi için ilave bir hidroliz aşamasına gereksinim göstermeleri üretim maliyetini artırır. Ancak son yıllarda geliştirilen yeni tekniklerle, nişastanın hidrolizi çok daha ekonomik olarak gerçekleştirilmektedir. Sakkarifikasyon aşamasıyla oluşan glikoz, ortamda birikmeye vakit bulmadan etil alkole fermente olmakta; böylelikle substratın inhibitör etkisi azalır, nişastanın sakkarifikasyon hızı artmaktadır (Matsumura and Hirata 1988, Kim and Rhee 1993). Şekerlendirme ve fermentasyon aşamalarının birlikte gerçekleştirildiği SSF (Simultane Sakkarifikasyon ve Fermentasyon) prosesi, sakkarifikasyon ve fermentasyonun ayrı ayrı gerçekleştirildiği proseslerle kıyaslandığında, hidroliz hızının fazla, fermentasyon süresinin kısa ve kapital giderlerin az olması gibi üstünlüklere sahiptir (Lee *et al.* 1987).

SSF prosesinin gerçekleştirilmesinde immobilize hücre ve enzim kullanımı son yıllarda çok dikkat çeken bir konudur. İmmobilize hücre kullanımının serbest hücre kullanımına göre oldukça fazla üstünlükleri söz konusudur. İmmobilize hücreler serbest hücrelere göre üründen kolayca ayrılabilirler, tekrar tekrar kullanılabilirler, hacimsel verimlilik değerini artırırılar, proses kontrolünü kolaylaştırırılar ve kontaminasyona daha az duyarlıdırılar (Göksungur ve Güvenç 2002).

Son yıllarda SSF prosesinde enzim ve hücrelerin birlikte immobilize edildiği ko-immobilize sistemler söz konusudur. Yapılan birçok çalışmada ko-immobilize hücre olarak *Zymomonas mobilis* bakterisi ve enzim olarak da Amiloglikozidaz (AMG) tercih edilmiştir (Lee *et al.* 1987, Kim and Rhee 1993).

Günümüzde endüstriyel alkol üretiminde genellikle mayalar kullanılmaktadır. *Zymomonas mobilis*'in *Saccharomyces cerevisiae*'ya etil alkol verimi ve hacimsel verimlilik yönlerinden üstünlükleri söz konusudur. *Zymomonas mobilis* bakterisinin endüstriyel etil alkol üretimindeki çeşitli avantajları şöyle özetlenebilir (Özçelik 1986):

- Yüksek etil alkol verimi (*Zymomonas mobilis* için %97, maya için %89),
- Yüksek glikoz konsantrasyonuna karşı dayanıklılık,
- Mayanın aksine, tümüyle anaerobik gelişme yeteneği. Böylece sürekli fermentasyonda havalandırma gerekmeyecektir.
- Üretilen birim etanole karşılık daha az yan ürün,
- Yan ürün olarak değerlendirilecek biyokütleinin daha yüksek birim değeri,
- Genetik çalışmaların mayaya oranla daha kolay olması.

Bu çalışmada; nişastalı hammaddelerden etil alkol üretiminde maliyeti azaltmak için ucuz hammadde kullanımı yanında daha etkin bir mikroorganizma ve daha verimli bir proses geliştirme yönünde çalışılmıştır. Kitin üzerine bağlanmış AMG, *Z. mobilis* hücreleri ile birlikte Ca-aljinat jeli içerisinde ko-immobilize edilmiş, substrat olarak kullanılan nişastanın sıvılaştırılması aşamasında α -amilaz kullanılmıştır. Son yıllarda sık kullanılan paket yataklı reaktör veya akışkan yataklı reaktörün yerine sürekli karıştırılmalı biyoreaktör tercih edilmiş, sürekli karıştırma sayesinde kütle transferini hızlandırmak ve CO₂ gazının ortamdaki rahatça ayrılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Etanol Üretimi ve Etanol Üretiminde Hammadde Seçimi

Etil alkol, şeker içeren değişik materyallerin fermentasyonu sonucu oluşmaktadır. Etil alkol üretiminde kullanılabilen hammaddeleri 3 grup altında toplamak mümkündür; şekerler, nişastalı hammaddeler ve selülozlu hammaddeler.

Şeker içeren hammaddeler (şeker pancarı, şeker kamışı, melas, çeşitli meyveler) mikroorganizmalar tarafından doğrudan etil alkole fermente edilebilmektedirler. Nişastalı hammaddeler (tahıllar, patates vb.) fermentasyondan önce malt enzimleri veya küflerden elde edilen enzimlerle hidrolize edilmek zorundadırlar. Selülozlu hammaddeler (ağaç, tarımsal atıklar, kağıt hamuru ve kağıt fabrikasından elde edilen atık sülfite sıvısı) de kullanımdan önce mineral asitlerle fermente olabilen şekerlere dönüştürülürler (Anonymous 2005).

Etil alkol üretiminde ülkeler, kendi bölgelerinde yetişen ürünlere ve bunların ekonomik oluşlarına göre değişik hammaddeler kullanılmaktadırlar.

Çizelge 2.1 Etil alkol üretiminde kullanılan hammaddeler (Esser and Schmidt 1982)

Şekerli Hammaddeler	Nişastalı Hammaddeler
Şeker kamışı melası	Tahıllar
Şeker pancarı melası	Pirinç
Peynir altı suyu	Patates
Meyve ekstraktı	Kassava

Esser ve Schmidt (1982) hammadde seçiminde hammaddenin fiyatının, içerdiği karbonhidrat miktarının önemli olduğunu belirterek şeker içeren substratların doğrudan etil alkol üretiminde kullanıldığını, ancak nişastalı hammaddelerin bazı pahalı önışlemler gerektirdiğini belirtmişlerdir.

Keim (1983) etil alkol üretiminde kullanılan nişastalı hammaddelerin; mısır, buğday, arpa gibi tahıllar ve patates olduğunu belirtmiştir. Şeker içeren hammaddeler olarak da şeker kamışı, şeker pancarı, meyve ve peynir altı suyunun kullanıldığını ifade etmiştir. Şeker içeren hammaddeler etil alkole daha kolay işlenir. Çünkü mayalar şekeri doğrudan fermente edebilir. Diğer karbonhidrat içeren hammaddeler fermentasyondan önce şekerlere hidrolize edilmelidir. Hammaddelerin etil alkol üretiminde kullanılması için düşük fiyatla elde edilmesi gerekir. Tahıllar pek çok ülkede bol miktarda yetiştirilmektedir ve depolanmaları da kolaydır.

Yapılan bir çalışmada sakkaroz içeren hammaddelerden immobilize *Zymomonas mobilis* bakterisi kullanılarak etil alkol üretilmiştir. Çalışmada sakkaroz içeren hammaddelere ön bir işlem uygulanmış ve glikozlu besiyeri ile çalışılan koşullara benzer bir ortam yaratılmıştır. Yatışkın koşullarda 150 g/L sakkaroz içeren besiyeri ile çalışıldığında; $D=0.05-0.10 \text{ h}^{-1}$ için etanol konsantrasyonu 65-68 g/L civarında bulunmuştur. Glikozlu besiyeri kullanılan çalışmalarla kıyaslandığında, yüksek dilüsyon hızlarında, yan ürün olan levanın miktarı artacağından daha düşük verim elde edilmektedir. Immobilize *Zymomonas mobilis* hücreleriyle etanol üretiminde substrat olarak melas, şeker pancarı suyu ve sentetik değirmen sıvısı (SML: Sentetic Mill Liquor: şeker pancarı suyu ve melas karışımı) birbiriyle kıyaslanmış, bunların ek besine gerek duymadan etanol üretiminde kullanılabilen uygun substratlar olduğu vurgulanmıştır (Grote and Rogers 1985).

Grote ve Rogers (1985) etil alkol üretiminde hammadde olarak, şeker pancarı suyu ve SML kullandıkları çalışmalarında, yatışkın koşullarda, $0.05-0.10 \text{ h}^{-1}$ dilüsyon hızları için maksimum etanol konsantrasyonunu 50-55 g/L bulmuşlardır. *Zymomonas mobilis*'in geliştirilmiş bir suşu için iki aşamalı bir proseste hammadde olarak SML kullandıklarında, 72 g/L etanol konsantrasyonu elde edebilmişlerdir. Melasla çalıştıklarında, 250-300 saatlik bir periyotta, 0.05 h^{-1} dilüsyon hızında, 65 g/L etanol konsantrasyonuna ulaşmışlar, *S. uvarum* için aynı koşullarda etanol konsantrasyonunu 77 g/L olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada immobilize *Z. mobilis*'le sakkaroz içeren hammaddeler kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonun, glikoz içeren hammaddeler kullanılan fermentasyona göre daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı

zamanda immobilize *Z. mobilis*'in immobilize maya hücrelerinden daha az etkili olduğu da çalışmanın sonucu olarak belirtilmektedir. Bunun sebebinin *Z. mobilis*'in oluşturduğu yan ürünler (levan, sorbitol) ile melas vb. substratların yüksek seviyelerde içerdiği K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ve Cl^- 'den kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Özçelik (1986) *Zymomonas mobilis* VTT-E-78082 ve ATCC 31821 suşları ile şeker pancarı melasından etil alkol üretimi üzerinde çalışmış, melastan etil alkol üretiminde mayanın *Zymomonas mobilis*'e oranla daha başarılı olduğunu belirtmiştir.

Torres ve arkadaşları (1986) yer elması suyundan etil alkol üretimi üzerinde çalışmışlar ve maya ekstraktı gibi pahalı katkılar kullanmaksızın yüksek verimlilik elde etmişlerdir.

Shmala ve Sreekantiah (1988) yalnızca buğday kepeği ekstraktıyla güçlendirilmiş nişastadan üretilen etil alkol verimi ile maya ekstraktı, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ katkıları içeren ortamda üretilen etil alkolün verimini kıyaslamışlar ve bu amaçla *Zymomonas mobilis* ZYM-TS1 suşunu kullanmışlardır. Bu suş glikoz, fruktoz ve sakkaroz ek olarak hidrolize olmuş mısır unu ve mısır nişastasını da verimli bir biçimde kullanabilmektedir. Sonuçlar buğday kepeği ekstraktının, etil alkol üretimi için gerekli tüm besinleri sağlayabileceğini göstermiştir.

Park ve Baratti (1991) *Zymomonas mobilis* ATCC 31821'in sıcağa dayanıklı mutant bir suşuyla şeker pancarı melasından etil alkol üretmişlerdir. *Zymomonas mobilis*'in şeker pancarı melasından etil alkol üretmeye uygun olmadığını belirtmişlerdir. Ancak ultrafiltrasyonla tuzu ayrılan melas kullanıldığında mikroorganizma gelişmesinin ve etil alkol veriminin arttığını bildirmişlerdir.

2.2 *Zymomonas mobilis* Bakterisiyle Etanol Üretimi ve SSF Prosesi

Birçok bakteri türü etanol üretme yeteneğine sahip olmasına rağmen bunların çoğu etil alkolün yanında; çeşitli alkoller (bütanol, izopropilalkol, 2,3-bütandiol), organik asitleri (asetik asit, formik asit ve laktik asit), şeker alkollerini (arabitol, gliserol, ksilitol),

ketonları (aseton) ya da çeşitli gazları (metan, karbondioksit, hidrojen) da son ürün olarak oluşturmaktadır (Anonymous 2005).

Amutha ve Gunasekaran (2001)'a göre; *Saccharomyces cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* endüstriyel etil alkol üretimi amacıyla seçilebilecek en uygun mikroorganizmalardır.

Z. mobilis'in gelişme besiyeri glikoz, fruktoz veya sakkaroz içermesi durumunda bakterinin özgül gelişme hızı artmakta ve etanol üretiminin maksimumuna ulaştığı görülmektedir (Anonymous 2005).

Z. mobilis %97 etanol verimine sahip olup, bu değer diğer bakterilerinkinden, hatta mayanınkinden (%89) de yüksektir. Bu bakterinin etanol toleransı (%7) diğer bakterilerinkine oranla yüksek, fakat mayanınkine (%8-10) oranla düşüktür. Son yıllarda bu bakteri üzerinde yoğunlaştırılan çalışmalarla yüksek etanol toleransına (%12) sahip suşlar elde olunmuştur. Buna karşın *Z. mobilis* bakterisinin üstünlükleri değişik ve çeşitli substrat kullanımının sınırlı olması özelliği ile dengelemektedir. Ayrıca tüm suşları glikoz ve fruktozu kullanabilmesine rağmen, ancak %50'si sakkarozu kullanabilmekte ve sakkarozdan yan ürün olarak önemli ölçüde levan ve sorbitol oluşturmaktadırlar. Etanol üretiminde yüksek kinetik parametrelere sahip *Z. mobilis* bakterisi, substrat seçiciliği sorunu çözümlendiği takdirde ideal bir etanol üreticisidir (Özçelik 1985).

Çizelge 2.2 *Zymomonas mobilis*'in değişik bazı hammaddelerden etanol üretimindeki performansı (Gunasekaran and Raj 2005)

Parametre	Kesikli	Sürekli	İmmobilize
Substrat: glikoz			
Başlangıç şeker konsantrasyonu, g/L	250.00	150.0	150.00
Etanol konsantrasyonu, g/L	117.00	65.0	63.00
Etanol verim katsayısı, g/g	0.48	0.50	0.50
Hacimsel verimlilik, g/L.h	5.00	12.0	5.00
Substrat: sakkaroz			
Başlangıç şeker konsantrasyonu, g/L	100.00	100.0	150.00
Etanol konsantrasyonu, g/L	37.50	50.0	65.20
Etanol verim katsayısı, g/g	0.46	0.46	0.47
Hacimsel verimlilik, g/L.h	4.56	10.0	3.62
Substrat: nişasta (hidrolize)			
Başlangıç şeker konsantrasyonu, g/L	150.00	154.0	150.00
Etanol konsantrasyonu, g/L	29.03	62.6	58.90
Etanol verim katsayısı, g/g	0.36	0.44	0.41
Hacimsel verimlilik, g/L.h	4.8	7.32	3.57

Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi hammadde seçimi ve kullanılacak fermentasyon yöntemi *Zymomonas mobilis*'in performansını etkilemektedir. Substrat olarak glikozun tercih edilmesi durumunda sürekli sistem ve immobilize sistem daha avantajlı görünürken, substrat olarak sakkaroz tercih edildiğinde verim katsayısı açısından immobilize sistem, hacimsel verimlilik yönünden bakılırsa sürekli sistem tercih edilebilir. Önişlem gerektiren substrat (nişasta) kullanımında sürekli sistem daha başarılı sonuçlar vermektedir.

Esser ve Schmidt (1982) şeker içeren hammaddelerden endüstriyel etil alkol fermentasyonunda genellikle *Saccharomyces* ve *Schizosaccharomyces* mayalarının kullanıldığını belirtmişlerdir. Bu mayalar ekonomik substrat dönüşüm hızına sahip, yüksek verimli türlerdir. Optimum pH'ları 3-4 arasında olup, bu yüzden kontaminasyona uğrama riskleri azdır. Fakat az sayıda hammaddeyi kullanabilirler. 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişmelerinin ve ürün oluşturmalarının engellenmesi nedeniyle, fermentasyon esnasında bir soğutma sistemine ihtiyaç duyulur. Bu problemden kurtulmak için sıcaklığa dayanabilen mikroorganizmalar kullanılabilir.

Etil alkol fermentasyonu için *Zymomonas mobilis* tercih edilebilir. Bu bakterinin verimliliği mayaya kıyasla daha yüksek olmasına rağmen endüstriyel etil alkol üretiminde kullanımı kısıtlı olup, nedenleri şunlardır (Esser and Schmidt 1982):

- 1- Yan ürün olarak %2-5 asetik asit oluşturur. Bunun damıtma sırasında alkolden ayrılması zordur.
- 2- *Z. mobilis*'in optimum gelişme pH'sı 5.0'ın üzerindedir. Bu da kontaminasyon riskini artırır.
- 3- Substrat olarak sadece glikoz, fuktoz ve sakkaroz içeren hammaddeleri kullanabilir.

Lee ve arkadaşları (1983) *Z. mobilis*'le etanol üretiminde fermentasyon parametrelerini araştırmışlardır. Kinetik değerleri etkileyen başlıca faktörler; yüksek substrat seviyesi, substrat sınırlaması ve ürün inhibisyonu olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın sonunda etanol üretiminde *Z. mobilis*'in mayalara oranla birçok üstünlüğe sahip olduğu yargısına varılmış, bu üstünlükler de; etanol üretim hızındaki artış, substrat dönüşüm yüzdesindeki gelişme ve etanol toleransında iyileşme olarak özetlenmiştir.

Spangler ve Emert (1986) etil alkol üretiminde mayaya alternatif bir mikroorganizma olarak *Zymomonas mobilis*'in kullanılabilceğini belirtmişler; Rogers ve arkadaşlarının *Zymomonas mobilis*'in avantajlarını anlattığını ve Viikari ve arkadaşlarının *Zymomonas mobilis*'in pek çok şununun referans maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'ya göre daha fazla etil alkol üretme kapasitesinde olduğunu rapor ettiklerini bildirmişlerdir.

Sreekumar ve Basappa (1991) etil alkol üretiminde *Zymomonas mobilis* ZM4'ün sıcağa dayanıklı mutant bir şununun elde ettiklerini belirtmişler ve bu şununun özelliklerini tanımlamışlardır.

Lee ve Huang (2000) *Z. mobilis* ATCC 10988 bakterisi ile glikoz ve fruktozlu besiyeri kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda *Z. mobilis*'in etanol fermentasyonunda glikoz ve fruktoz karışımı kullanıldığında alkol üretiminde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Tao ve arkadaşları (2005) sterilizasyon koşullarının sağlanmadığı bir ortamda aside dayanıklı *Z. mobilis* bakterisiyle etanol üretimi üzerine çalışmışlardır. Aside dayanıklı *Z. mobilis* ATCC 31821 bakterisi mutantını nitrozoguanidin (NTG) ile muamele sonucu elde etmişlerdir. Sterilizasyonsuz proses koşullarıyla sağlanacak enerji tasarrufu ve *Z. mobilis*'le etanol üretim etkinliği kombine edildiği takdirde düşük maliyetle ve yüksek verimlilikle etanol üretimi sözkonusu olabilmektedir. Bu çalışmada pH 4.5 olarak sabitlenmiş ve olası yabancı kontaminasyon riski en aza indirilmiştir. Otoklavlanarak sterilizasyonun sağlandığı prosesle karşılaştırıldığında 40 saatlik bir fermentasyon sonunda etanol miktarının 70.3'den 73.2 g/L'ye yükseldiği, şeker konsantrasyonunun ise 5.3'den 1.3 g/L'ye indiği görülmüştür. Bu yeni processte glikozun etanole dönüşüm verimi 0.488 g/g olarak tespit edilmiştir.

Etil alkol üretiminde kullanılan klasik yöntemlerin yeterince ekonomik olmaması nedeniyle yeni yöntem ve teknikler geliştirmek üzere çeşitli araştırmalar yapılmaktadır.

Son yıllarda şekerlendirme ve fermentasyon aşamalarının birlikte gerçekleştirildiği (Simultane Sakkarifikasyon ve Fermentasyon; SSF) prosesler üzerinde çalışılmaktadır (Lee *et al.* 1987, Kim and Rhee 1993, Özçelik vd. 1996).

SSF, nişasta ve selüloz gibi polisakkaritlerden etil alkol üretiminde kullanılan yeni bir procesdir. SSF prosesinde, polisakkaritlerin enzimatik yolla hidrolizi ve glikozun etil alkolle fermentasyonu tek bir aşamada gerçekleşmektedir (Matsumura and Hirata 1988, Kim and Rhee 1993).

SSF prosesi işletmenin yatırım masrafını azaltmakta, geleneksel proseslere kıyasla %25 ve daha fazla verimlilik sağlamaktadır (Spangler and Emert 1986).

Nişastalı hammaddelerin etil alkolle fermentasyonunda kullanılacak SSF prosesiyle işletmenin kuruluş masrafı ve enerji girdisini azaltmak, fermentasyon süresini kısaltmak; böylece üretimin daha ekonomik olmasını sağlamak mümkün olmaktadır (Özçelik vd. 1996).

SSF prosesinin en büyük sorunu, şekerlendirme amacıyla kullanılacak enzimin optimum çalışma sıcaklığının (60 °C), fermentasyon sıcaklığına (30-35 °C) oranla daha yüksek olmasıdır (Lee *et al.* 1987).

Kassava nişastasının kullanıldığı bir çalışmada 225 g/L glikoza eşdeğer şeker içeren nişastanın sıvılaştırılması ve bu sayede SSF prosesinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Sıvılaştırma işlemi için en uygun α -amilaz miktarı %0.125 (mL/g), sıcaklık 80 °C ve sıvılaştırma süresi de 1 saat olarak belirlenmiştir. Fermentasyon 35 °C'de %0.7 (mL/g) AMG ile *Z. mobilis* ZM4 ile 20 saatte gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda etanol konsantrasyonu 114 g/L (teorik verimin %95'i) olarak belirlenmiştir. Aynı koşullarda *S. uvarum* ATCC 26602 ile 33 saatlik fermentasyonda 106 g/L (teorik verimin %90'ı) etanol konsantrasyonuna ulaşılabilmektedir. Araştırmacılar fermentasyon sırasında dikkat edilmesi gereken faktörlerin; AMG konsantrasyonu düşük olduğunda ortaya çıkan substrat limitasyonu ve yüksek AMG konsantrasyonlarında oluşabilecek substrat inhibisyonu olduğunu belirtmektedirler (Poosaran *et al.* 1985).

Dellweg ve Luca (1988) nişasta içeren hammaddelerden etil alkol üretiminde enerji girdisini en aza indirecek bir yöntem üzerinde çalışmışlar ve SUPRAMYL adını verdikleri yöntem ile SSF işlemini 40 °C'de gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde ısı enerjisinin bir kısmı mekanik enerji yerine kullanılmış ve bu, enerji masrafını azaltmıştır.

Kim ve arkadaşları (1992) simultane sakkarifikasyon ve fermentasyonla *Z. mobilis* bakterisini kullanarak nişastadan etanol üretimini pilot ölçekte gerçekleştirmişlerdir. SSF prosesini kesikli ve yarı kesikli olmak üzere iki şekilde düzenlemişler, kesikli sistem için 72 L'lik bir karıştırmalı tank fermentörü kullanmışlardır. Bu sistemde %20'lik sago nişastası içeren çözeltilerden 92.6 g/L etil alkol elde edilerek, teorik verimin %97.4'üne ulaşılmıştır. Yarı kesikli SSF prosesinde hücre döngüsünü ultrafiltrasyon sistemiyle sağlamışlar ve kesikli SSF ile karşılaştırıldığında etanol verimliliğinde %80'lik bir artış olduğunu ifade etmişlerdir. Endüstriyel etanol üretiminde, bu çalışmada belirtilen yarı kesikli SSF prosesinin geliştirilmesi durumunda, gelecekte çok dikkat çekici avantajlarının olduğu belirtilmiştir.

SSF işleminde substrattan kaynaklanan maliyeti düşürmek amacıyla Krishna ve arkadaşları (1998) şeker kamışı ile etanol üretimi üzerine çalışmışlardır. Şeker kamışının yapısında bulunan ligninin parçalanmasını ve böylece de şekerlendirme işleminin kolaylaşmasını sağlamışlardır. Bu ön işlem için alkali hidrojen peroksit kullanmışlardır. Ardından ön işlemde geçirilmiş substratı, *Trichoderma reesei* QM 9414 ve *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-132'den alınmış selülozik enzim kompleksini ve *S. cerevisiae* hücrelerini SSF prosesine almışlardır. SSF sırasındaki sakkarifikasyon işlemi aşağıdaki eşitlikle kontrol edilmiştir;

$$\% \text{ sakkarifikasyon} = \frac{\text{indirgen şeker miktarı} \times 0.9}{\text{substrattaki karbonhidrat miktarı}} \times 100$$

SSF işlemi pH 5.1'de 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL'lik konik bir reaktörde gerçekleştirilmiştir. 40 °C'de 48 saatlik fermentasyonda %10 (mL/g) substrattan %1.6 (mL/g) etanol elde edilmiştir. Fermentasyon süresi 96 saate uzatıldığında etanol %2'ye yükselmiş, β-glikozidaz enzimi kullanıldığında ise 72 saatlik fermentasyonun sonunda etanol %2.2 (mL/g) değerine ulaşmıştır.

2.3 İmmobilizasyon ve Ko-immobilizasyon Yöntemleriyle Etanol Üretimi

İmmobilizasyon; biyokatalizörleri suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlayarak veya yine suda çözünmeyen bir matris içinde tutuklamak suretiyle hareketlerini engellemek, buna karşın substrat ve ürünün hareketine olanak veren bir sistem oluşturmaktır (Özçelik 1987).

İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri şöylece özetlenebilir (Özçelik 1987);

- . enzimin tekrar kazanılması ve tekrar kullanımı,
- . çevre koşullarına (sıcaklık, pH vb.) karşı dayanıklılık,
- . enzimin kinetik özelliklerinin iyileştirilmesi,
- . sürekli işlemlere uygulanabilirlik,
- . son ürünün enzim içermemesi,
- . ürün oluşumunun kontrol altında tutulabilmesi,
- . birbirini izleyen çok kademeli reaksiyonlar için uygun oluşu,
- . enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis, self-digestion) olasılığının azalması.

İmmobilize hücrelerin serbest hücelere göre başlıca avantajları şunlardır (Özçelik 1987, Göksungur ve Güvenç 2002);

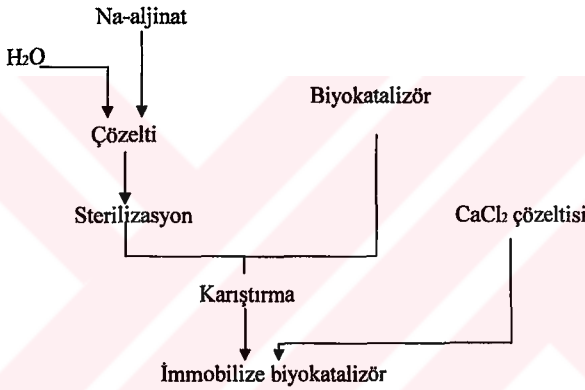
- immobilize hücreler istenilen biyodönüşüm sonucunda ortamdan kolayca ayrılabilirler ve tekrar tekrar kullanılabilirler,
- immobilize hücreler işlem sonrasında ortamdan ayrıldıkları için fermentasyon ortamını kirletmezler ve ürünün ayrılması işlemleri kolaylaşır,
- immobilize hücreler sürekli sistemde çalışmaya çok uygundurlar ve bunlarla daha yüksek hacimsel verimlilik değerleri elde edilebilir,
- substrat biyokütle oluşumu için harcanmayacağından, aynı mikroorganizma kullanılarak serbest hücelere göre daha fazla ürün elde edilebilmektedir,
- immobilizasyon birçok durumda hücre aktivitesine kararlılık kazandırır ve immobilize hücreler kontaminasyona daha az duyarlıdır.

İmmobilize hücrelerle çalışılırken göz önüne alınması gereken dezavantajlar ise; hücreler ile reaksiyon sıvısı arasındaki kütle-transfer kısıtlamaları, bazı hallerde immobilize hücre zarının bir süre sonra parçalanıp istenmeyen yabancı maddelerin reaksiyon ortamına karışabilmesi ve immobilize hücrelerle dönüşüm sırasında hücrede bulunan diğer enzimlerin aktiviteleri sonucunda yan reaksiyonlar oluşabilmesi ve daha az safılıkta ürün elde edilebilmesidir. Hücre immobilizasyonu için özellikle son 20 yıldan beri yapılan çalışmalarda kullanılan değişik teknikler temel olarak taşıyıcıya bağlama ve tutuklama olmak üzere 2 ana grupta incelenebilir. Bu yöntemlerden polimer içerisinde tutuklama ile immobilizasyon, hücre immobilizasyonunda kullanılan en basit ve yumuşak koşullar kullanıldığı için en güvenli yöntemdir. Enzimlerin immobilizasyonunda ise destek maddesinin gözenek çapının genişliği nedeni ile daha az tercih edilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan polimerler aljinat, karragenan, agar ve poliakrilamittir (Göksungur ve Güvenç 2002).

Etanol fermentasyonunda maya hücrelerinin aljinatla immobilizasyonu çok iyi bilinen ve eski bir yöntemdir. Fakat son zamanlarda immobilizasyon işlemi çok daha farklı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Na-aljinatla karıştırılmış hücreler $CaCl_2$ çözeltisi içine damlatılır, kalsiyum iyonları damlacıktaki aljinat jeline difüze olur. Bu geleneksel jelleşme metodu ile elde edilen küresel bilyecikler paket yataklı veya akışkan yataklı

biyoreaktörde kullanıldığında gaz çıkışının küresel bilyecikleri havaya kaldırması problemi sözkonusudur. Bu gazın yukarı doğru çıkış sorunu çeşitli biyoreaktör dizaynları yapılarak çözümlenebilir. Ancak bu çözümler bir fermentasyon fabrikası için maliyeti ve enerji tüketimini artırabilir (Johansen and Flink 1986).

Ca-aljinat içerisinde immobilizasyon Şekil 2.1'de görüldüğü gibi yapılmaktadır. Aljinat-biyokatalizör karışımı bir iğneden, damlalar iğne ucundan düşecek fakat fişkırmayacak bir hızda zorlanarak akıtılır. Basıncı ayarlamak suretiyle jel taneciklerinin boyutları düzenlenebilir (Özçelik 1987).



Şekil 2.1 Hücrelerin Ca-aljinat içerisinde immobilizasyonu (Özçelik 1987)

Kalsiyum aljinat jelinin dayanıklılığını etkileyen temel faktörler; aljinatın tipi (gluronik asit ve mannuronik asit içeriği), Na-aljinate konsantrasyonu ve CaCl₂ çözeltisinin konsantrasyonudur (Göksungur ve Güvenç 2002).

Son yıllarda immobilize hücrelerle etanol üretiminin önemli bir ticari potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir. Laboratuvar ölçekli denemeler sonucunda, melasın substrat olarak kullanıldığı immobilize *S. cerevisiae* hücreleriyle yapılan uzun süreli fermentasyonlarda, 1500 saat süren bir çalışma için etanol konsantrasyonu 80 g/L

bulunmuştur. Bu çalışmada melasın dönüşüm oranı %95, hacimsel verimlilik ise 20 g/L.h olarak hesaplanmıştır (Grote and Rogers 1985).

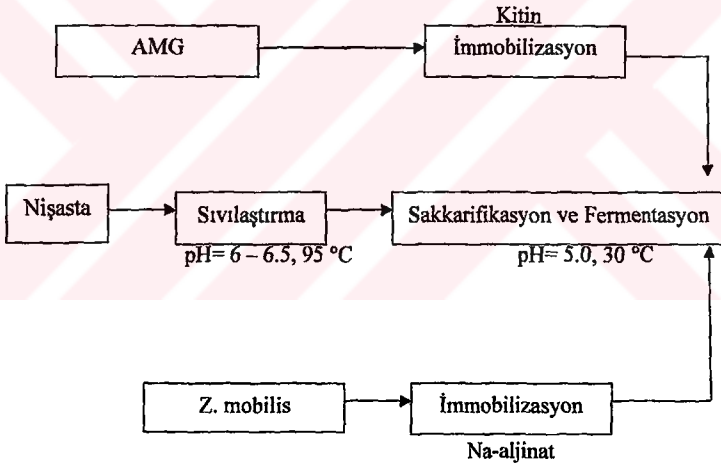
Z. mobilis türleri hızlı ve verimli etanol üretmek gibi avantajlara sahip bakterilerdir. Jel içerisinde immobilize hücre çalışmalarında başarılı sonuçlar elde etmede *Z. mobilis*'in bu avantajlarından yararlanılmaktadır. *Z. mobilis* hücreleri jel içinde tutuklandığında, verimlilik açısından, mayalara oranla %200-300 arasında daha yüksek sonuçlar vermektedir. Yapılan bir çalışmada, laboratuvar ölçekli biyoreaktörde immobilize *Z. mobilis* hücreleri, substrat olarak ise sakkaroz içeren ham materyaller kullanılmıştır. 150 g/L sakkarozlu besiyeri kullanıldığında 0.05-0.10 1/h dilüsyon hızları için 65-68 g/L seviyelerinde etanol elde edilmiştir. Yüksek dilüsyon hızlarında levan ve sorbitol oluşumunun, glikozlu besiyeri kullanılan fermentasyonla kıyaslandığında, verimde düşmeye yol açtığı görülmüştür. Substrat olarak melasın kullanıldığı çalışmalarda immobilize *Z. mobilis*'in, maya hücrelerine oranla daha az etkili olduğu saptanmıştır (Grote and Rogers 1985).

Yüksek etanol konsantrasyonunun damıtma masrafını düşürdüğü ve yüksek etanol verimliliğinin de fermentör masrafını azalttığı bilinmektedir. Bununla beraber geleneksel alkol endüstrisinde düşük substrat konsantrasyonları ile çalışılıp, yüksek şeker veya etanol konsantrasyonunun inhibisyon etkisi olmadan hızlı bir fermentasyon yapılmaya çalışılmaktadır (Bajpai and Margaritis 1987).

Yapılan bazı çalışmalarda da substrattan kaynaklanan yüksek maliyet düşürülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Cross ve arkadaşları (1993) *Z. mobilis* hücrelerinin çapraz bağlanarak immobilize edildiği reaktörde, sentetik ve kompleks besiyeri ile etanol üretmeye çalışmışlardır. *Z. mobilis* ATCC 31821 suşu glutaraldehitte muamele edilerek çapraz bağlanmış, jelatinle kaplanmış küresel tanecikler bir immobilize hücre reaktörü (ICR) içine alınmıştır. Besleme sıvısındaki glikoz konsantrasyonu 150-200 g/L olarak ayarlanmış, inorganik azot ve tuzlarını içeren bir sentetik besiyeri ile maya ekstraktı içeren kompleks besiyeri birlikte kullanılmıştır. İki tane asit-baz tamponu olan süksinat ve asetat pH'yı düzenlemek için besiyerine eklenmiştir. Asetat eklenmiş besiyeriyle çalışıldığında, asetatsız elde edilen 16 g/L.h etanol verimliliğinin 19 g/L.h'e yükseldiği

görülmüştür. Besiyerine asetat eklenmesiyle hücre gelişme hızı düşürülerek, reaktörle daha uzun süre (34-57 gün) çalışılmıştır. Substrat olarak sentetik besiyerinin kullanıldığı ICR'de maksimum hacimsel etanol verimliliği 16 g/L.h olup, fermentasyon boyunca sıcaklığın 4-6°C arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda besiyerine asit-baz tamponlarının katılmasının şart olduğu bildirilmiştir. Ticari proseslerde reaktör boyutu büyüyeceğinden, 4-6 °C farklılığın oluşması nedeniyle, ısı transfer sorununun daha da önem kazanacağına dikkat çekilmiştir.

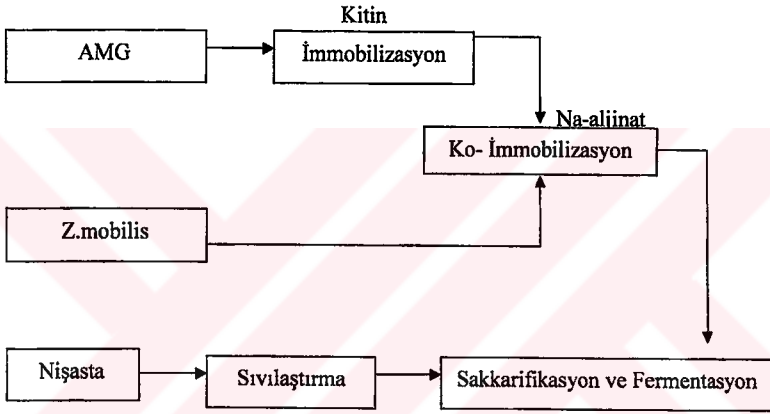
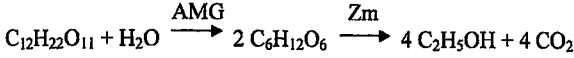
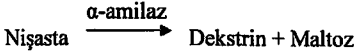
Son yıllarda, nişastalı hammaddelerden SSF prosesi ile etil alkol üretiminde immobilize *Z. mobilis* ve immobilize Amiloglikozidaz enzimi kullanılmaktadır. *Z. mobilis* hücreleri Ca-aljinat ve K-karagenan gibi polimerik matrisler içinde tutuklanmakta, AMG ise genellikle kitin üzerine bağlanmaktadır (Kim and Rhee 1993).



Şekil 2.2 SSF prosesinde ayrı ayrı immobilize edilmiş enzim ve hücre kullanımı (Kim and Rhee 1993)

SSF prosesinde enzim ve hücrelerin ayrı ayrı immobilizasyonundan başka bir de ko-immobilizasyon tekniği söz konusudur. Ko-immobilize sistemlerde enzim ve hücre birlikte immobilize edilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda ko-immobilize sistem için en uygun immobilizasyon materyallerinin kitin ve Na-aljinat olduğu tespit

edilmiştir (Kim and Rhee 1993). Bu sistemde ön işlem olarak α -amilaz'la sıvılaştırılmış nişasta, maltoz ve dekstrinlere dönüştür, maltoz ise AMG ile glikoza dönüştürülüp, bakteri tarafından alkole fermente olmaktadır.



Şekil 2.3 SSF prosesinde ko-immobilize enzim ve hücre kullanımı (Kim and Rhee 1993)

Lee ve arkadaşları (1987) etil alkolü geleneksel yöntemlerdekinden daha ekonomik üretebilmek için immobilize AMG ve *Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821) kullanarak nişastayı sürekli SSF ile fermente etmişlerdir. SSF yönteminin hidroliz oranının artmasını, fermentasyon süresinin ve yatırım masrafının azalmasını sağladığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar sürekli SSF işleminin ve immobilize enzim kullanımının, yüksek etil alkol verimliliğine, enzimin tekrar kullanılmasına ve reaktörde yüksek enzim yoğunluğuna olanak sağladığını bildirmişlerdir.

Kim ve arkadaşları (1988) benzer bir çalışmada AMG'yi kitine bağlayıp *Z. mobilis* ile birlikte aljinat içerisinde immobilize ederek ko-immobilize bir sistem kullanmışlardır.

0.84 l/h dilüsyon oranında reaktörle 40 gün çalışmışlar, yataşkın koşullarda etanol konsantrasyonunu 44 g/L (teorik yüzdenin %93'ü), hacimsel verimliliği 37 g/L.h olarak bulmuşlardır.

Akışkan yataklı bir biyoreaktörde *Z. mobilis* ve glikoamilazın ko-immobilize olarak kullanıldığı bir çalışmada nişastadan etil alkol üretimi üzerinde çalışılmıştır. Akışkan yataklı reaktör 2.54 cm çapında ve 120 cm uzunluğunda cam bir kolondan yapılmış, *Z. mobilis* ve AMG küçük ve tekdüze K-karregenan tanecikleri (1.2-2.5 mm çapında) içerisinde immobilize edilerek kolona yerleştirilmiştir. Etanol üretimi için substrat olarak çözünebilir nişasta, kompleks besin kaynağı olarak ise mısır ıslatma suyu kullanılmıştır. Denemeler 35 °C'de 4.0-5.5 pH aralığında gerçekleştirilmiş, substrat konsantrasyonları 40-185 g/L ve besleme hızı 10-37 mL/dak arasında değişiklik göstermiştir. Sterilizasyon koşulları çok önemsenmeden, bu sistem 22 gün boyunca çalıştırılmış ve herhangi bir kontaminasyon ya da ko-immobilizat yataklarında yapısal bir bozulma gözlenmemiştir. Hacimsel verimlilik 38 g etanol/L.h düzeyinde gerçekleşmiş, bu da beklenen maksimum değer in %74'üne karşılık gelmiştir. Ortalama hacimsel verimlilik 15-20 g/L.h aralığında hesaplanmıştır. Ortalama verim 0.49 g etanol/g nişasta olup, bu değer teorik verimin %90'ına karşılık gelmektedir. Reaktör içerisinde gözlenen çok düşük düzeylerdeki glikoz konsantrasyonları, nişasta hidrolizinin etil alkol üretim hızını sınırlayan etken olduğunu göstermektedir (Sun *et al.* 1998).

Krishnan ve arkadaşları (1999) mısır nişastasından akışkan yataklı bir biyoreaktörde ko-immobilize edilmiş glikoamilaz – *Z. mobilis* kullanarak, SSF prosesi ile etil alkol üretimi üzerine çalışmışlardır. Sakkarifikasyon ve fermentasyon işlemleri hem simultane hem de ayrı ayrı olarak iki değişik şekilde gerçekleştirilmiştir. SSF denemelerinde 1.5-2.5 mm çapında K-karregenan tanecikleri kullanılmıştır. Öğütülmüş %15 nişasta içerecek şekilde hazırlanmış nişasta çözeltilerinin hidrolizi ile elde edilen dekstrin çözeltisi reaktörlere pompalanmış ve alıkonma süresi 1.5-4 saat arasında değişiklik göstermiştir. Dekstrinlerin dönüşümü %54-89 arasında değişirken, hacimsel verimlilik 9-15 g/L.h, etanol konsantrasyonları 23-36 g/L arasında değişmiştir. Reaktör içerisindeki çok düşük düzeylerdeki glikoz konsantrasyonu, sakkarifikasyonun üretim

hızını sınırlayıcı aşama olduğunun bir göstergesidir. Hidroliz ve fermentasyonun ayrı ayrı gerçekleştirildiği denemelerde, öncelikle immobilize glikoamilazla doldurulmuş kolon içerisine 150-160 g/L konsantrasyonunda dekstrin çözeltisi aktarılmış ve 55°C'de 1 saat süre sonunda %95'den fazla bir dönüşüm sağlanmıştır. Elde edilen 162-172 g/L glikoz içeren çözelti daha sonra immobilize *Z.mobilis* içeren akışkan yataklı biyoreaktöre pompalanmıştır. İki saatlik süre sonunda %94'lük bir dönüşüm oranı ile 70 g/L'lik etanol konsantrasyonuna ulaşılmış ve proses sonunda 23 g/L.h'lik bir hacimsel verimlilik elde edilmiştir. 1.5 ve 1 saatlik alıkonma sürelerinde ise sırasıyla, %75 ve %76 oranında dönüşüm gerçekleşmiş ve 49 g/L ve 47 g/L etanol konsantrasyonları ve 19 ve 25 g/L.h'lik hacimsel verimlilik değerleri elde edilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae'nin kullandığı başka bir araştırmada ise M 238 suşunun serbest, immobilize ve amiloglikozidazla ko-immobilize sistemlerini kullanarak pişirilmemiş nişastaya simultane sakkarifikasyon ve fermentasyon uygulanmış ve düşük sıcaklıkta ısıtmalı bir sistem kullanılarak enerji girdisi azaltulmuştur (Nam *et al.* 1988).

Ko-immobilizasyon yönteminde enzim ve hücrelerin birlikte immobilizasyonundan başka, bazı araştırmalarda birden fazla mikroorganizmanın ko-immobilizasyonu üzerine çalışılmıştır.

Yapılan bir araştırmada nişastalı hammaddelerden etil alkol üretimi için ko-immobilize karışık kültür kullanılmış, amilaz üreticisi olarak *Aspergillus awamori* Nakazawa IFO 4033, etil alkol üreticisi olarak da *Zymomonas mobilis* IFO 13756 seçilmiştir. Bu iki mikroorganizma Ca-aljinat jel yatağı içinde immobilize edilmiş, oksijence zengin jel yatağının yüzeyinde *Aspergillus awamori*, anaerobik jel merkezinde ise *Zymomonas mobilis* gelişmiştir. Bu sistemde nişastalı hammaddelerden etil alkol doğrudan üretilmiş ve yüksek verimlilik sağlanmıştır (Tanaka *et al.* 1986).

Bir başka çalışmada; ham nişastadan direk etanol üretiminde ko-immobilize *Aspergillus awamori* (A) ve *Z.mobilis* (Z) hücrelerinden oluşan A-Z sistem ile ko-immobilize *Rhizopus japonicus* (R) ve *Z.mobilis* hücrelerinden oluşan R-Z sistemleri kullanılmıştır.

Bu her iki sistem için de fermentasyon süresinin oldukça uzun olduğu , etanol konsantrasyonunun çok düşük olduğu ve pH 4.0'e indiği zaman jel taneciklerinden hücre sızıntısının çok fazla olduğu kaydedilmiştir. R-Z sisteminde AMG aktivitesinin çok yüksek olduğu görüldükçe, A-Z sisteminde α -amilaz aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. Üç mikroorganizma türünün birlikte kullanılması durumunda ise (A-R-Z sistem) ham nişasta hidrolizinin çok yüksek olduğu tespit edilmiş, fakat A-Z sistemle kıyaslandığında etanol verimliliği sadece %50 civarında bulunmuştur. Fermentasyon ortamı 18 saatlik bir aerobik ortamın ardından anaerobik ortama dönüştürüldüğünde, jel taneciklerinden hücre kaçışının olmadığı ve pH 4.8 civarında nişastadan etanole dönüşüm oranının teorik değerin %96'sı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca fermentasyon ortamına %0.1-0.2 oranında Vantocil IB antibiyotikinin eklenmesi durumunda, sıcak sterilizasyon uygulanmadan etanol üretiminin gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (Lee et al. 1993).

Amutha ve Gunasekaran (2001) sıvılaştırılmış nişastadan etanol üretiminde ko-immobilize *Z.mobilis* ve *Saccharomyces diastaticus* hücrelerini kullanmışlardır. *S.diastaticus*'la kesikli fermentasyonda, sıvılaştırılmış nişastadan etanol üretimi ile kıyaslandığında, bu sistemde daha yüksek etanol konsantrasyonlarına ulaşabilmişlerdir. Örneğin; *S.diastaticus*'la tek başına çalışıldığında 37.5 g/L etanol konsantrasyonuna ulaşabiliyorken, ko-immobilize *S.diastaticus-Z.mobilis* sisteminde 150 g/L sıvılaştırılmış nişastadan 46.7 g/L etanol elde etmişlerdir. Yine *Z.mobilis* ve *S.diastaticus* hücrelerinin serbest halde bulunduğu karışık kültürle çalıştıklarında elde edilen değerlere göre etanol konsantrasyonunu oldukça yüksek bulmuşlardır. Tekrarlamalı kesikli sistemde bu ko-immobilize hücre tekniğini kullandıklarında, etanol konsantrasyon değerinin 53.5 g/L'ye yükseldiğini görmüşlerdir. Ko-immobilize jel tanecikleri, kararlılıkları bozulmadan, kesikli sistemde 7 kez başarılı bir şekilde kullanılabilmiştir. Sürekli fermentasyon sisteminde, ko-immobilize hücre sistemiyle paket yataklı bir kolon reaktörle çalıştıklarında, 15 mL/h besleme hızında(kalış süresi 4 saat) maksimum etanol verimliliğini 8.9 g/L.h bulmuşlardır. Gelecekteki çalışmalarda daha yüksek etanol konsantrasyonlarına, ko-immobilize amilolitik maya olan *S.diastaticus* ve *Z.mobilis* kullanılarak kesikli, tekrarlamalı kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde ulaşılabilirliğini belirtmişlerdir.

2.4 Sürekli Sistemde Etil Alkol Üretim Proseslerinde Kinetik Parametreler

Sürekli kültürü açık bir gelişme ortamı olarak tanımlamak mümkündür. Çünkü yeni substrat ilavesi ve hücre de içeren reaksiyon karışımının dışarıya alınması sürekli olarak gerçekleştirilmektedir. Sürekli bir mikrobiyel kültürde gelişme uzun süre korunabilir. Ayrıca hücre konsantrasyonu, özgül gelişme hızı, substrat ve ürün konsantrasyonu gibi kültür koşullarının zamana bağlı olarak değişmediği yataşkın durum (steady state) muhafaza edilebilir.

Sürekli kültürde gelişmeyi sınırlayan substratın konsantrasyonunun gelişme hızını sınırlayacak düzeye kadar düşmesine izin verilir. Mikroorganizma gelişmeyi sınırlayan substratın besleme hızı tarafından kontrol edilen ölçülerde gelişebilir (Özçelik 2004).
Bu durumda;

$$F/V = D = \mu$$

olur. Bir fermentasyon prosesi;

- 1- verimlilik,
- 2- substrat dönüşüm oranı,
- 3- son ürün konsantrasyonu

dikkate alınarak değerlendirilir. Sürekli kültürde biyokütleyle ilişkin verimlilik değeri:

$$V_x = D \cdot X$$

$$X = Y_{x/s} \cdot (S_0 - \frac{D_c \cdot K_s}{D_c - D})$$

$$V_x = D \cdot [Y_{x/s} \cdot (S_0 - \frac{D_c \cdot K_s}{D_c - D})]$$

Maksimum verimliliğin elde edilmesi için gerekli dilüsyon hızı eşitliğin 1. türevinin sıfıra eşitlenmesiyle hesaplanır:

$$D_m = D_c \cdot [1 - (\frac{K_s}{K_s + S})^{1/2}]$$

Maksimum verimlilik mutlaka maksimum verim veya maksimum substrat dönüşümü ile ilgili dilüsyon hızında meydana gelmeyebilir. Bu nedenle proses sırasında sık sık

verimlilik, dönüşüm verimi ve dışarıya akıştaki atık substrat konsantrasyonu aralarındaki uyumu sağlayacak optimizasyon gerçekleştirilmelidir.

Proseslerin değerlendirilmesinde hangi kriterin hangi koşullarda daha önemli olduğunun açıklanması gerekir. Fermentasyon masraflarının daha pahalı olduğu bir proses için en önemli kriter hacimsel verimlilik ve dönüşüm verimidir. Fermentasyon masrafı fazla olan proseste düşük ürün konsantrasyonu tüm proses ekonomisi için fazla önemli olmayabilir. Ürünün kazanılması masrafının fazla olduğu proseste düşük ürün konsantrasyonu ürün maliyetini önemli ölçüde artırabilir. Etil alkol üretiminde fermentasyon masrafı fazla olduğundan hacimsel verimlilik ve dönüşüm verimi üzerinde durulması gereken önemli parametrelerdir (Özçelik 2004).

Bazı kinetik parametrelerin hesaplanması aşağıda belirtilen şekilde yapılmaktadır (Özçelik 2004):

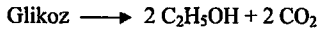
Dilüsyon hızı: $D = \text{Besleme hızı} / \text{çalışma hacmi, 1/h}$

Verim katsayısı: $Y_{p/s} = \frac{\text{oluşan ürün konsantrasyonu}}{\text{tüketilen substrat konsantrasyonu}} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$

Hacimsel verimlilik: $V_p = \text{ürün konsantrasyonu} \times D, \text{ g/L.h}$

Substrat dönüşümü = $\frac{S_0 - S}{S_0} \times 100, \%$

Teorik ürün veriminin hesaplanması için bazı sitokiyometri bilgileri gerekir. Glikozun etil alkole fermentasyonunda;



2 mol etil alkol / 1 mol glikoz'dan oluşur.

Ya da molekül ağırlığı dikkate alırsa;

$2 \times 46 = 92/180 = 51.1 \text{ g etil alkol} / 100 \text{ g glikoz değeri elde edilir.}$

Teorik verimin yüzdesi (E) hesaplanırken; bulunan $Y_{p/s}$ değeri teorik ürün verimine oranlanır.

Lee ve arkadaşları (1983), çalışmalarında, hacimsel verimlilik değerinin düşük olduğunu belirtmişler ve bunun düşük biyokütle konsantrasyonundan kaynaklandığını

ifade etmişlerdir. Hücre döngüsü veya sedimentasyon gibi işlemler yapıldığı takdirde *Zymomonas* fermentasyonunda yüksek hücre konsantrasyonunun sağlanabileceğini, dolayısıyla yüksek verimlilik değerlerinin elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Kim ve arkadaşları (1988) immobilize *Z. mobilis* ve AMG ile nişastadan etil alkol üretiminde değişik immobilizasyon metotları kullanmışlar ve bu farklı prosesler için kinetik parametreleri incelemişlerdir. Reaktör besleme sıvısını %10-15 nişasta içerecek şekilde hazırlamışlardır.

Çizelge 2.3 Nişastadan SSF prosesi ile etil alkol üretiminde kullanılan immobilizasyon metotları için elde edilen kinetik değerler (Kim *et al.* 1988)

İmmobilizasyon Metodu	D (h ⁻¹)	P (g/L)	E (%)	V _p (g/L.h)
K-karregenanda tutuklanmış AMG ve <i>Zymomonas mobilis</i> ko-immobilizasyonu	0.1	45.0	94.7	4.5
	0.4	26.5	55.8	10.6 (maks)
Kitin üzerine bağlanmış AMG ile birlikte Na-aljinat içerisinde tutuklanmış <i>Zymomonas mobilis</i> ko-immobilizasyonu	0.4	46.0	96.8	18.9
	3.3	22.0	46.3	72.6 (maks)
Kitin üzerine bağlanmış AMG ve <i>Zymomonas mobilis</i> 'in ayrı ayrı immobilizasyonu	0.4	46.1	97.0	18.4
	0.9	40.0	84.2	36.0 (maks)

Çizelge 2.3'de görüldüğü gibi araştırmacılar en yüksek verimlilik değerlerini kitine bağlanmış AMG'nin *Zymomonas mobilis* ile birlikte Na-aljinat içerisinde ko-immobilizasyonu sonucu elde etmişlerdir.

Amutha ve Gunasekaran (2001) ko-immobilize *Zymomonas mobilis* ve *Saccharomyces diastaticus* ile paket yataklı kolon reaktörde çalışmışlardır. Çalışma hacmi 60 mL olan

reaktöre 150 g/L konsantrasyonundaki sıvılaştırılmış kassava nişastası bir peristaltik pompa ile beslenmiştir. Değişik besleme hızları için hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4 Sıvılaştırılmış kassava nişastasından ko-immobilize *Zymomonas mobilis* ve *Saccharomyces diastaticus* ile sürekli etanol üretim prosesi için hesaplanan kinetik parametreler (Amutha and Gunasekaran 2001)

Besleme hızı (mL/h)	P	S	V _p	V _s	Y _{p/s}	E
5	49.2	33.3	4.1	9.7	0.4	64.4
10	50.6	37.8	5.0	11.2	0.5	66.2
15	53.5	31.2	8.9	19.7	0.5	69.9
20	43.0	32.8	8.6	23.4	0.4	56.2
25	37.5	38.4	7.5	22.3	0.3	49.0

*Başlangıç substrat konsantrasyonu; 150 g/L.

Araştırmacılar en yüksek etanol konsantrasyonunu (53.5 g/L), 15 mL/h besleme hızında; 0.5 g etanol/g substrat verim katsayısıyla elde etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırmada 1 kg'lık paketler halinde piyasadan sağlanan buğday nişastası kullanılmış olup, 1 g (%9 nemli) nişastanın 0.99 glikoza eşdeğer olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 suşu Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakteri kültürü 10 g/L maya ekstraktı, 10 g/L Bacto-pepton ve 20 g/L glikoz içeren YPG sıvı besiyerinde geliştirilmiş ve ayda bir yenilenmiştir. Bakteri geliştirme ortamı olarak 40 g/L glikoz, 5 g/L maya ekstraktı, 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ içeren besiyeri pH 5.0'e ayarlanarak kullanılmıştır.

Nişastanın hidrolize edilmesi işlemi sıvılaştırma ve şekerlendirme olmak üzere iki aşamada yapılmış, bu işlemler için SIGMA firmasından temin edilen iki tip enzim preparatı kullanılmıştır. Sıvılaştırma amacıyla kullanılan α -amilaz (E.C.3.2.1.1) XIIA (Sigma Katalog no: A-3403) *Bacillus licheniformis*'den elde edilmiş olup aktivitesi bir milyon ünitedir (Bir ünite; 1 dakikada pH 6.9 ve 20 °C'de nişastadan 1 mg maltoz açığa çıkarır). Şekerlendirme için kullanılan amiloglikozidaz (E.C.3.2.1.3) (Sigma Katalog no: A-3042) *Aspergillus niger*'den üretilmiş olup, aktivitesi 6100 ünite/mL'dir (Bir ünite; 3 dakikada pH 4.5 ve 55 °C'de nişastadan 1 mg glikoz açığa çıkarır).

Enzim immobilizasyonu için kitin (Sigma C-7170) ve glutaraldehit (Merck), hücre ve enzimin ko-immobilizasyonu için sodyum aljinat (Sigma A-7128) kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Nişasta çözeltisinin hazırlanması

Nişasta çözeltisi Özçelik ve arkadaşları (1996)'na göre hazırlanmıştır. Litrede 100 g glikoza karşılık gelecek miktarda tartılan buğday nişastası musluk suyu ile sulandırılmıştır. Buğday nişastasının yanında, 10 g/L maya ekstraktı ve immobilizasyonda jel kararlılığını sağlamak amacıyla 1.5 g/L CaCl₂ besiyerine eklenmiştir. pH 2 N NaOH ile 6.5'e ayarlanıp, başlangıç viskozitesini düşürmek ve sıvılaştırmayı kolaylaştırmak amacıyla %0.1 (mL/g nişasta) α-amilaz eklenmiş ve 75 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra tekrar %0.1 (mL/g) α-amilaz eklenerek, 95 °C'deki su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Her iki aşamada da nişasta çözeltisi sık sık karıştırılarak sıvılaştırma ve dekstrinleştirme işlemi tamamlanmıştır.

Nişasta çözeltisi oda sıcaklığına soğutulduktan sonra süzölmüş, pH'sı 1 N H₂SO₄ ile fermentasyon başlangıç pH'sına (5.5) ayarlanmıştır. Çözeltinin briksi 10.1'e ayarlandıktan sonra 110 °C'de 30 dakika otoklavlanmıştır. Bir gece bekletildikten sonra oluşan tortu süzülerek ayrılmış, pH ve briksi kontrol edildikten sonra 10 L hacimli besleme kabına konup, 110 °C'de 30 dakika tekrar sterilize edilmiştir.

3.2.2 İmmobilizasyon yöntemleri

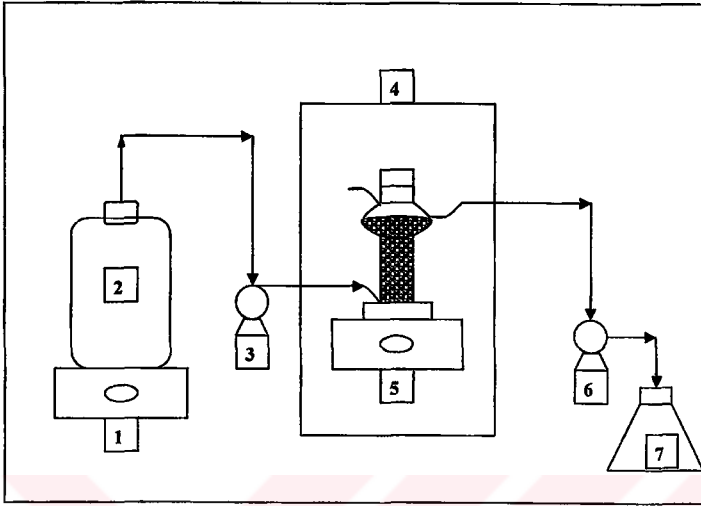
Amiloglukozidaz (AMG) enzimi toz kitin üzerine Stanley ve arkadaşları (1978)'nin önerdikleri yöntemle immobilize edilmiştir. Sıvı AMG'nin belirli bir miktarı steril damıtık su ile karıştırılmış, 0.2 mL AMG/g kitin olacak şekilde hazırlanan bu enzim çözeltisi %50 oranında nemlendirilmiş kitin üzerine ilave edilmiştir. Enzimin kitin üzerinde iyi dağılabilmesi için enzim çözeltisinin hacmi nemli kitin ağırlığının iki katı olacak şekilde seçilmiştir. Üzerine sıvı fazda %1 glutaraldehit oluşturacak miktarda glutaraldehit eklenerek, steril bagetle bir saat karıştırılarak kitine emdirilmiştir. Bir gece +4 °C'de bekletilen karışım steril porselen süzgeçli cam kolonlara aktarılıp, aseptik koşullarda bir saat saf su ile yıkanmıştır. Sonra 3 M NaCl çözeltisi içinde 15 dakika bekletilip, tekrar saf su ile bir saat yıkanmış, son olarak 0.1 M asetat tamponu (pH 4.5)

içinde 15 dakika bekletilmiştir. Kitin üzerine immobilize edilmiş AMG enzimi ko-immobilizasyonda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

AMG ve *Z. mobilis* hücrelerini içeren ko-immobilizat aşağıda belirtilen yöntemle hazırlanmıştır: Logaritmik gelişme evresindeki *Z. mobilis* hücreleri 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek toplanmış (%23.7-24.2 kuru madde içeren 19.0-29.2 g santrifüj edilmiş yaş hücre) ve daha önce 7.5 g kitin üzerine immobilize edilerek hazırlanmış AMG karışımıyla birlikte, 80 mL fizyolojik su içinde yeniden sulandırılmıştır. Bu bulamaç 45 °C'de bekletilen 75 mL %4'lük sodyum aljinat çözeltisi içerisine dikkatlice karıştırılmıştır. Oluşturulan kıvamlı karışım peristaltik pompa vasıtasıyla bir manyetik karıştırıcı üzerinde yavaşça karıştırılan 0.2 M CaCl₂ çözeltisi içerisine, yaklaşık 20 cm yüksekten damlatılmıştır. Yaklaşık 2-3 mm çapında (yağmur damlası şeklinde) oluşturulan küreciklerin bu çözelti içinde +4 °C'de 1 saat bekletilip sertleşmeleri sağlanmıştır. Toplam oranı %5'i aşmayan uzun şekilli ve şekilsiz oluşumlar uzaklaştırılmış ve kullanılabilir özellikteki küreciklerin toplam hacmi 85-95 mL olarak ölçülmüştür.

3.2.3 Fermentasyon işlemi

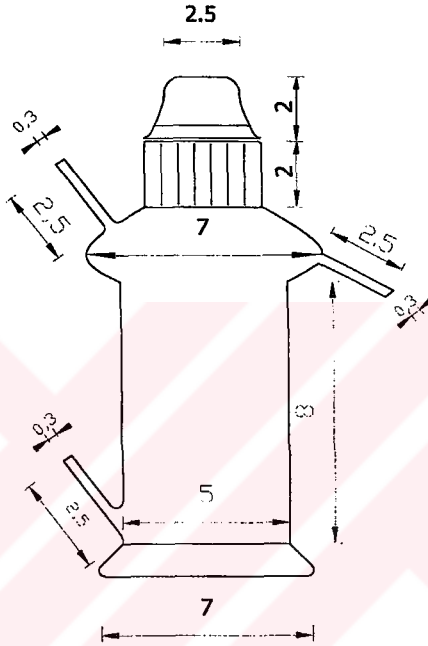
AMG ve *Z. mobilis* hücrelerinin ko-immobilizatı ile doldurulmuş tek aşamalı reaktörde, sıvılaştırılmış nişasta çözeltisinin simultane sakkarifikasyonu ve fermentasyonu (SSF) işlemi gerçekleştirilmiştir. AMG ve *Z. mobilis* hücrelerinin kullanıldığı sürekli sakkarifikasyon ve etil alkol fermentasyonu işlemi sürekli karıştırılmalı cam bir reaktör içerisinde gerçekleştirilmiş olup, sistem akış şeması Şekil 3.2'de verilmiştir.



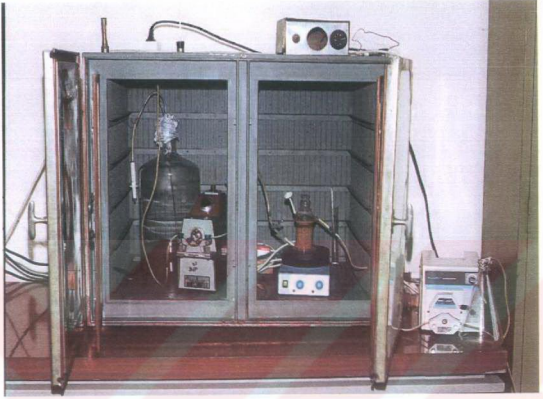
- 1→ manyetik karıştırıcı
 2→ besleme kabı
 3→ peristaltik pompa
 4→ sürekli karıştırılmalı reaktör
 5→ manyetik karıştırıcı
 6→ peristaltik pompa
 7→ ürün toplama kabı

Şekil 3.2 Sürekli SSF işleminin gerçekleştirildiği sistemin akış şeması

Manyetik bir karıştırıcı üzerine yerleştirilen reaktörün düz yapıdaki alt kısmında teflon kaplı bir karıştırıcı sayesinde, çok yavaş hızda, sürekli karıştırma sağlanırken, kürecikler karıştırmanın etkisiyle reaktör içerisinde hareketlilik kazanmışlardır. Reaktöre sıvı girişinin ve reaktörden sıvı çıkışının sağlandığı borulara elek monte edilmiş olup, bu elekler sayesinde küreciklerin reaktör içerisinde kalması sağlanmıştır. Reaktörün çalışma hacmi 175 mL olarak ölçülmüş olup, şekli ve boyutları Şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3 Denemelerde kullanılan reaktörün şekli ve boyutları (şekil üzerindeki ölçüler cm cinsindedir)



Şekil 3.4 Ko-immobilize sistemde kullanılan düzenek

Fermentasyon sırasında oluşan CO_2 gazının reaktör içerisinde toplanmasını önlemek amacıyla reaktörün üst kısmına, gaz çıkışına olanak verecek bir filtre yerleştirilmiştir.

Reaktörün üstteki sıvı çıkış borusuna kadar olan kısmı küreciklerle doldurulduktan sonra küreciklerin toplam hacmi denemelere göre değişmek üzere 85-95 mL, sıvı hacmi 80-90 mL olarak ölçülmüş, kinetik hesaplamalar bu 80-90 mL'lik boş hacim (sıvı çalışma hacmi) dikkate alınarak yapılmıştır. Reaktör çevre ısısını kontrol amacıyla bir inkübatör içine yerleştirilmiş, bir peristaltik pompa (WATSON MARLOW, H.R. FLOW INDUCER) yardımıyla alt kısmından besleme yapılmıştır. İkinci bir peristaltik pompa ile çıkış sıvısı reaktörden uzaklaştırılmıştır.

Reaktör 30 ve 35 °C sıcaklıklarda, nişasta çözeltisinin başlangıç pH'sı 5.5 değerinde ve değişik besleme hızlarında çalıştırılarak, yatışkın durumun kazanılmasından sonra pH, hücre konsantrasyonu, toplam şeker, glikoz ve etil alkol analizlerinin yapıldığı örnekler

toplanmıştır. pH örneğın alınmasından hemen sonra ölçölmüş, diğeri analizler için örnekler -20 °C'de bekletilmiştir.

3.2.4 Fiziksel ve kimyasal analizler

3.2.4.1 pH tayini

Alınan örneklerde pH tayini, Orion Research (Model 701) dijital tip pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4.2 Hücre konsantrasyonu tayini

Örnekler santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısım ayrılıp, hücre çökeltisi saf suyla eski hacmine tamamlanmıştır. Yeterli oranda seyreltilen ve iyice karıştırılan hücrelerin dibe çökmesine olanak vermeden 600 nm'de saf su tanığına karşı optik yoğunluk değeri ölçölmüştür.

Absorbans değeri ölçölen hücre çözeltileri, daha önce 105 °C'de kurutulup desikatörde soğutulduktan sonra darası alınmış kuru madde kaplarına aktarılıp, tartılmıştır. Ardından 105 °C'de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulduktan sonra desikatörde oda sıcaklığına soğutulmuş ve tekrar tartılmıştır. Böylece optik yoğunluğa karşılık gelen hücre kuru ağırlıklarını gösteren standart çizilerek (EK 1), değeriendirmeler bu standart üzerinde yapılmıştır.

3.2.4.3 Etil alkol tayini

Etil alkol tayini berraklaştırma işleminden sonra, Shimadzu GC-14B Gaz Kromatografisi'nde yapılmıştır. Gaz Kromatografisi'nde 2 m uzunluğunda, iç çapı 1/8 inch olan, Chromosorb 101 (80/100 mesh) ile doldurulmuş cam kolon kullanılmıştır.

Berraklaştırma işlemi: Berraklaştırma işlemi Carrez çözeltileri yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Çözeltiler:

Carrez I Çözeltisi: 15 g potasyum ferrosiyandır ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) damıtık suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

Carrez II Çözeltisi: 30 g çinkosülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) damıtık suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanır.

İşlem:

Santrifüj edilmiş örneğin berrak kısmından 1 mL 1.5 mL'lik eppendorf tüpüne alınır. Berraklaştırma amacıyla üzerine 0.1 mL Carrez I ve 0.1 mL Carrez II çözeltileri ilave edilip her aşamada dikkatlice karıştırıldıktan sonra, santrifüjde (Heraeus Sepatech Biofuge 15) 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Üstteki berrak kısımdan 1 µL alınarak, kolona enjekte edilir. Değerlendirmede kromatografik saflıktaki (%99.9'luk) mutlak etil alkolden (MERCK) hazırlanan standart çözeltilerden yararlanılmıştır.

Gaz Kromatografisi çalışma koşulları:

Kolon sıcaklığı: 160 °C

Enjeksiyon sıcaklığı: 220 °C

Dedektör sıcaklığı: 250 °C

Taşıyıcı gaz: Azot

Örnek miktarı: 1 µL

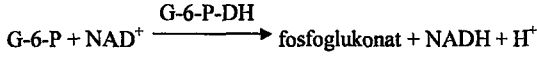
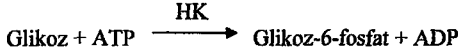
3.2.4.4 Glikoz ve toplam şeker tayini

3.2.4.4.1 Glikoz tayini

Glikoz tayini enzimatik yöntemle (SPINREACT Enzymatic test-UV/Hexokinase kitlerinden yararlanılarak) SHIMADZU UV-1208 (UV-VIS Spectrophotometer) dijital tip spektrofotometrede yapılmıştır.

Örnekler 3.2.4.3 'de belirtilen şekilde berraklaştırıldıktan sonra Enzimatik Glikoz tayin kitleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Tayinin prensibi;



Bu iki reaksiyonun ardından ortamda bulunan NAD^+ 'ın 340 nm'de verdiği pik esas alınarak tayin gerçekleştirilmektedir.

Analiz için gerekli çözelti ve örnek miktarları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir;

Çizelge 3.1 Glikoz tayininde gerekli çözelti ve örnek miktarları

	Kör	Standart	Numune
Standart	—	20 µL	—
Numune	—	—	20 µL
Çalışma reaktifi	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL

Çalışma reaktifinin hazırlanması: NAD^+ , Hexokinase, G-6-P-DH içeren Reaktif 2 (R2) şişesi TRIS tamponu, ATP, Mg^{2+} içeren Reaktif 1 (R1) şişesinin içinde çözündürülür. Hazırlanan Kör, Standart ve Numune tüpleri karıştırılıp, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilip, Kör karşısında 340 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama;

$$\text{Glikoz (mg/dL)} = \frac{\text{Örnek absorbansı}}{\text{Standart absorbansı}} \times \text{Standart konsantrasyonu (mg/dL)}$$

Analizde kullanılan Standart konsantrasyonu değeri sabit olup; 100 mg/dL'dir.

3.2.4.4.2 Toplam şeker tayini

Toplam şeker tayini, bölüm 3.2.4.3'de belirtilen şekilde berraklaştırılan örneklerin asit ile hidrolizinden sonra yapılmıştır.

Berraklaştırılan örneklerin hidrolizasyonu için örnekten 1 mL alınmış, üzerine 2 mL 2 N HCl eklenerek kaynar su banyosunda 2 saat tutulmuştur. Soğutulduktan sonra 2 mL 2 N NaOH ilave edilerek nötralize edilmiştir.

Toplam şeker tayini değiştirilmiş Miller yöntemine göre (Forouchi and Gunn 1983) DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) kullanılarak, glikoz eşdeğeri indirgen şeker olarak, SHIMADZU UV-1208 dijital tip spektrofotometrede yapılmıştır.

Çözeltiler:

DNS çözeltisi: 10 g DNS, 10 g NaOH ve 1.6 g fenol bir miktar damıtık suda eritilerek litreye tamamlanır. Kullanımdan önce, çözeltinin her 100 mL'si için %10'luk sodyum sülfid çözeltisinden 1 mL eklenir.

Rachelle tuzu çözeltisi: 40 g sodyum-potasyum tartarat damıtık suyla 100 mL'ye tamamlanır.

İşlem: Berraklaştırma ve hidrolizasyondan sonra örnek yeterli oranda seyreltilir. Bu seyreltilmiş örnekten 1 mL alınıp, üzerine 2 mL DNS çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Kaynar su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra, oluşan sarı-kahve rengin stabilizasyonu için üzerine 1 mL Rachelle tuzu çözeltisi eklenip tekrar karıştırılır. Laboratuvar sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 mL damıtık su ilave edilip tekrar karıştırılır. 575 nm dalga boyunda tanığa karşı absorbans değerleri okunur.

Hesaplama 0.15-1.5 g/L glikoz içeren çözeltiler yardımıyla önceden çizilen standart eğri kullanılarak yapılır (EK 2).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Sürekli Karıştırılmalı Reaktördeki Ko-immobilize Sistemde Etil Alkol Üretimi

AMG ve *Zymomonas mobilis* hücrelerinin ko-immobilizasyonu ile oluşturulan küreciklerin biyokatalizör olarak kullanıldıkları sürekli etil alkol üretiminde, reaktör olarak, Şekil 3.3'de şekli ve boyutları belirtilen reaktör kullanılmıştır. Bu reaktör silindirik yapıda, düz tabanlı olup; üst kısmı genişletilmiş ko-immobilizat küreciklerinin doldurulduğu cam bir hazne şeklindedir. Üstte bulunan traşlı cam kapak, aseptik koşullarda ko-immobilizat küreciklerinin reaktöre doldurulmasına yardımcı olmaktadır. Reaktörün üst kısmındaki boruya ilave edilen filtre, oluşan CO₂ gazının ko-immobilizat küreciklerinin içerisinde sıkışmadan, sistemden ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Reaktör bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilip, sterilizasyon öncesi içerisine ilave edilen teflon kaplı bir karıştırıcı yardımıyla, çok yavaş hızda karıştırılmıştır. Böylece reaktör içerisindeki ko-immobilizat küreciklere, çok yavaş bir salınım hareketi kazandırılmış; bu sayede kitle transferinin artması, substrat ve biyokatalizörlerin daha kolay temas sağlaması, en önemlisi de oluşan CO₂ gazının sistem içinde sıkışarak reaktör içinde kullanılmayan bir gaz boşluğu oluşturmasının engellenmesi amaçlanmıştır. Reaktörün toplam hacmi 175 mL olarak ölçülmüş, farklı denemelerde oluşturulan ko-immobilizat küreciklerinin hacimlerinin 85-95 mL arasında değişiklik gösterdiği dikkate alındığında reaktörün sıvı ile dolu olan çalışma hacmi de 80-90 mL arasında değişmiş ve kinetik hesaplamalar, farklı denemelerdeki bu 80-90 mL arasındaki çalışma hacmi dikkate alınarak yapılmıştır. Taşıyıcı olarak kullanılan kitin üzerine bağlanabilecek sıvı AMG miktarının seçiminde; daha önce yapılmış çalışmalarda (Özçelik vd. 2002) belirlenen 0.2 mL enzim / g kitin oranı, tercih edilmiştir. Kitin üzerine, glutaraldehitin de yardımıyla, AMG immobilizasyonunda en uygun enzim miktarının 0.1-0.2 mL enzim / g kitin (Stanley *et al.* 1977) ve 0.2 mL enzim / g kitin olduğu (Lee *et al.* 1987, Özçelik vd. 2002) belirtilmekte olup, bu çalışmada kullanılan enzim miktarı da, daha önceki bulgular doğrultusunda, 0.2 mL AMG / g kitin olarak seçilmiştir.

4.2 Ko-immobilize Sistemde Sürekli Etil Alkol Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Niştahlı hammaddelerden etil alkol üretiminde, nişastanın şekerlendirilmesinin ve etil alkole fermentasyonunun tek bir reaktör içinde gerçekleştirildiği SSF (Simultane Sakkarifikasyon ve Fermentasyon) prosesinin en önemli sorunu; şekerlendirme amacıyla kullanılacak AMG enziminin en uygun çalışma sıcaklığının (55-60 °C), etil alkol üreticisi mikroorganizmanın çalışacağı sıcaklığa (30-35 °C) oranla çok yüksek olmasıdır. Bu nedenle, her iki amaca uygun bir sıcaklık seçiminin yapılması zorunludur. Sürekli karıştırımlı ko-immobilize sistemde niştadan alkol üretiminde, şekerlendirme ve alkol fermentasyonu işlemlerinin tek bir reaktör içinde gerçekleştirileceği en uygun sıcaklığı saptamak amacıyla reaktör 30 ve 35 °C'lerde sürekli üretim için çalıştırılmıştır. Değişik besleme hızlarında 2-3 gün sürdürülen işlemden günlük örnekler alınmış; örneklerde pH, hücre konsantrasyonu, hidroliz sonrası toplam indirgen şeker (glikoz cinsinden), glikoz, etil alkol tayinleri yapılarak sürekli üretime ilişkin verim katsayısı ($Y_{p/s}$), hacimsel verimlilik (V_p ; g/L.h) ve substrat dönüşüm oranı (%) hesaplanmıştır.

Reaktör öncelikle 35 °C'de, 7.5 g kitin üzerine bağlanmış AMG ve 20.3 gram %23.7 kuru madde içeren *Z. mobilis* hücreleri ile karıştırılarak oluşturulan ko-immobilizat tanecikleri ile doldurulduktan sonra sürekli etil alkol üretimi için çalıştırılmıştır.

İki ayrı parti halinde hazırlanan ve α -amilaz ile sıvılaştırıldıktan sonra pH'ları 5.5'e ayarlanan nişasta çözeltilerinin konsantrasyonları 102.9 ve 99.2 g/L glikoz eşdeğeri olarak belirlenmiş; substrat dönüşümü ve etil alkol verim katsayısı ($Y_{p/s}$) nişasta çözeltilerinin başlangıç konsantrasyonları dikkate alınarak, kullanılan glikoz eşdeğeri konsantrasyon üzerinden hesaplanmıştır.

Reaktör çalışma kapsamındaki en düşük dilüsyon hızı olan 0.05 1/h dilüsyon hızında iki gün, sonra sırasıyla 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 ve 0.30 1/h dilüsyon hızlarında üçer gün çalıştırılarak yatışkın durumun (steady state) oluşması için beklenmiş, aynı zamanda oluşan yatışkın durumun kararlılığı gözlenmeye çalışılmıştır.

Değişik dilüsyon hızlarında ($D = 0.05-0.30$ 1/h arasında) sürdürülen üretimde elde edilen bulgular ve hesaplanan kinetik değerler Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 Sürekli karıştırılmalı reaktörde AMG ve *Zymomonas mobilis* ko-immobilizatları ile nişastadan etil alkol üretimine ilişkin ilk denemeye (35°C , 20.3 g santrifüj hücre) ait bulgular ve hesaplanan kinetik değerler

ÖRNEK NO	S_0 , g/L	D , h^{-1}	Süre, h	X, g/L	pH	Toplam Şeker, g/L	Glikoz, g/L	Etil Alkol, g/L	V_p , g/L.h	Substrat Dönüşümü, %	Y_{ps} , g/g
1	102.9	0.05	18	0.16	4.24	3.5	0	42.1	2.3	97	0.42
2	102.9	0.05	25	0.10	4.20	0	0	44.7	2.2	100	0.43
3	102.9	0.10	22	0.35	4.31	2.2	0.2	44.5	4.5	98	0.44
4	102.9	0.10	24	0.22	4.26	1.5	0.1	44.8	4.5	98	0.44
5	102.9	0.10	24	0.13	4.20	1.8	0.3	43.6	4.4	98	0.43
6	102.9	0.16	25	0.83	4.18	10.8	1.2	40.2	6.4	88	0.44
7	102.9	0.15	23	1.01	4.14	12.1	2.8	40.6	6.1	88	0.44
8	102.9	0.15	24	0.79	4.16	10.5	0.7	41.2	6.2	90	0.45
9*	102.9	-	28	-	-	-	-	-	-	-	-
10	102.9	0.19	20	1.95	4.20	25.8	13.6	33.7	6.4	75	0.44
11	102.9	0.20	24	2.01	4.16	26.7	15.3	32.8	6.6	74	0.43
12	102.9	0.20	24	1.55	4.13	28.1	16.2	32.3	6.5	72	0.43
13	102.9	0.24	24	1.65	4.15	45.6	26.7	22.9	5.5	56	0.40
14	99.2	0.25	24	1.15	4.21	50.8	28.1	21.2	5.3	49	0.44
15	99.2	0.25	27	2.62	4.25	47.3	26.2	21.6	5.4	52	0.42
16	99.2	0.30	24	1.39	4.32	64.8	38.3	14.7	4.4	35	0.43
17	99.2	0.30	21	2.83	4.35	62.2	35.0	16.1	4.8	38	0.44
18	99.2	0.29	24	2.62	4.28	61.3	33.4	16.8	4.6	38	0.44
19	99.2	0.10	24	1.01	4.25	5.2	0.2	39.2	3.9	95	0.43
20	99.2	0.10	25	1.33	4.22	3.5	0	41.3	4.1	96	0.43

* Örnek alınmadı.

0.05 ve 0.10 1/h dilüsyon hızlarında yapılan beslemelerde substratın hemen hemen tamamı (%97-100) kullanılarak 42.1-44.8 g/L etil alkol konsantrasyonuna ($Y_{ps} = 0.42-0.44$ verim katsayısıyla) ulaşılmıştır. Reaktörün substrat ile doldurulmasından ve sürekli üretime başlanmasından 18 saat sonra alınan ilk gün örneğinde 3.5 g/L glikoz eşdeğeri substrat belirlenmesi, bu süre içinde reaktörde yatışkın durumun henüz kazanılmadığını göstermektedir. Aynı dilüsyon hızında yapılan beslemede ikinci gün substratın tamamı kullanılmış, 0.43 g/g verim katsayısı ile 44.7 g/L etil alkol konsantrasyonu (teorik verimin %84'ü) elde edilmiştir. $D = 0.10$ 1/h dilüsyon hızında 3 gün sürdürülen üretimde çok az miktarda (0.1-0.3 g/L) glikoz ve 1.5-2.2 g/L konsantrasyonunda hidroliz sonrası toplam şeker belirlenmiştir. Bu dilüsyon hızında substrat %98 oranında tüketilmiş, bu deneme serisindeki en yüksek etil alkol konsantrasyonları (ortalama 42.7 g/L) ortalama 0.44 verim katsayısı ile (teorik verimin %86'sı) elde edilmiştir. Belirtilen

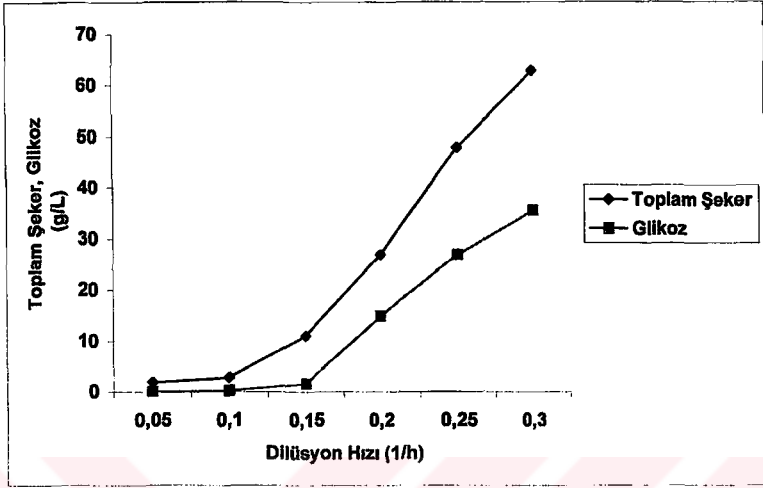
dilüsyon hızında (0.10 1/h), ko-immobilizat taneciklerinin kapladığı hacmin (85 mL) dışında kalan, reaktörün sıvı alabilen çalışma hacmi (90 mL) dikkate alınarak hesaplanan hacimsel verimlilik (V_p) değeri, ortalama, 4.5 g/L.h olarak belirlenmiştir.

Dilüsyon hızı 0.15 1/h'e çıkarıldığında ortalama 0.44 verim katsayısıyla birlikte, daha yüksek hacimsel verimlilik değerlerine (6.1-6.4 g/L.h) ulaşılmış, ancak substrat dönüşüm oranı dikkate değer ölçülerde azalmış (%88); substratın bir kısmı (10.5-12.1 g/L glikoz eşdeğeri) etil alkole dönüşmeden sistemden ayrılmıştır.

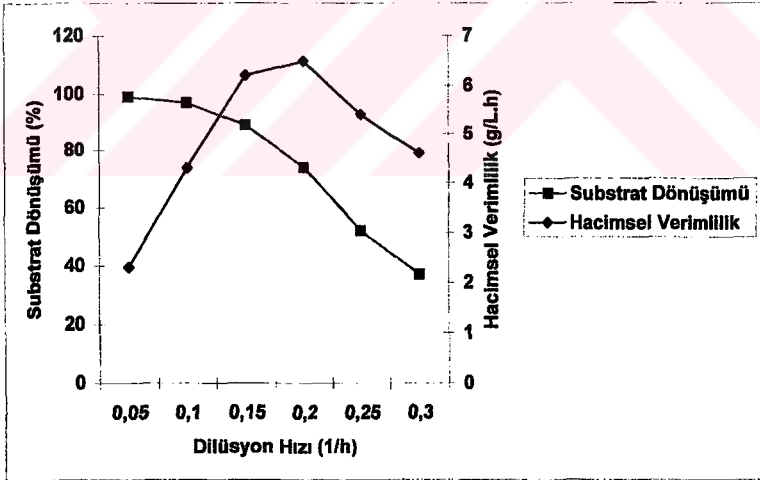
Belirtilen dilüsyon hızında yapılan beslemede reaktörden ayrılan sıvıda çok az miktarda glikoz (0.7-2.8 g/L) belirlenmiş olması, substratın kullanılamamasının en önemli nedeninin, nişastanın hidrolizinin yeterli olmamasından kaynaklandığını göstermektedir.

$D = 0.20$ 1/h dilüsyon hızında, bu deneme serisinin en yüksek hacimsel verimlilik değerlerine (ortalama 6.5 g/L.h) ulaşılmış olmakla birlikte, etil alkol konsantrasyonu 32.3-33.7 g/L'ye, substrat dönüşümü %72-75'e düşmüştür. Substratın önemli bir kısmı (25.8-28.5 g/L glikoz eşdeğeri) reaktörden ayrılmış, bunun 13.6-16.2 g/L'sinin glikoz olduğu gözlenmiştir. Belirtilen dilüsyon hızında yapılan sürekli üretimde, örneklerde glikozun belirlenmesi, nişastanın hidroliz hızının yetersizliğinin yanı sıra, substratın reaktörde alıkonma süresinin de etil alkol fermentasyonu için yeterli olmadığını göstermektedir.

Daha yüksek dilüsyon hızlarında ($D = 0.25$ ve 0.30 1/h), substrat çok daha önemli oranlarda (45.6-64.8 g/L glikoz eşdeğeri) etil alkole dönüşmeden reaktörden ayrılmış, bunun önemli bir kısmının da (26.2-38.3 g/L) glikoz olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla artan besleme hızı ile birlikte etil alkol konsantrasyonu ve substrat dönüşüm oranı azalmış; 0.30 1/h dilüsyon hızında etil alkol konsantrasyonu 14.7-16.3 g/L'ye, substrat dönüşümü %35-38'e kadar düşmüştür (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1 35 °C'de 20.3 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ilk denemede dilüsyon hızına karşılık toplam şeker ve glukoz konsantrasyon değerleri



Şekil 4.2 35 °C'de 20.3 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ilk denemede dilüsyon hızına karşılık substrat dönüşümü ve hacimsel verimlilik değerleri

35 °C'de gerçekleştirilen bu deneme serisinin son iki gününde, dilüsyon hızı 0.10 l/h'e düşürülmüş; 20 gün süren üretim sonunda sistemin kararlılığının tartışılması arzulanmıştır. Denemenin 3., 4. ve 5. günlerinde, aynı dilüsyon hızında elde edilen değerlerden kısmen daha düşük değerler elde edilebilmiş; substrat dönüşümü %98'den %95-96'ya, hacimsel verimlilik 4.5 g/L.h'den ortalama 4.0 g/L.h'e düşmüştür. Böylece sistemin kararlılığının, 20 günlük süreç sonunda bir miktar azalmaya karşın, önemli ölçüde korunabildiği kanısına varılmıştır.

Bu çalışma kapsamında elde edilen etil alkol verim katsayıları ($Y_{p/s} = 0.42-0.45$) diğer araştırmacıların (Kim *et al.* 1992, Sun *et al.* 1998, Tao *et al.* 2005) 0.46-0.48 olarak buldukları değerlerin oldukça altındadır. Bunun temel nedenlerinden biri, 35 °C'de, çok düşük devirde de olsa, sürekli karıştırılan reaktörden kolaylıkla ayrılan CO₂ gazının yanısıra bir miktar alkol buharının da reaktörden uzaklaşması olabilir.

Denemede, iki ayrı partide hazırlanan nişasta çözeltilerinin otoklav öncesi başlangıç pH'larının 5.5 olmasına karşın, reaktörden ayrılan ortam örneklerinin pH'ları 4.13-4.29 arasında değişerek; 1.21-1.37 birim aralığında azalma göstermiştir. Benzer bulgular Krishnan ve arkadaşları (1999) ile Özçelik vd. (2002) tarafından da vurgulanmıştır.

Çalışmanın ilk günlerinde alınan örneklerin oldukça berrak olduğu, 6. günden itibaren örneklerde gittikçe artan bir bulanmanın görüldüğü belirlenmiştir. Ko-immobilizatları oluşturan küreciklerin yapılarında herhangi bir bozulma olmamasına karşın, optik yoğunluk ölçümleriyle belirlenen hücre konsantrasyonunun 6. günden itibaren dikkate değer bir artış göstermesi, bulanıklığın hücre konsantrasyonundaki artıştan kaynaklandığını kanıtlamaktadır (Çizelge 4.1). Bunun nedeni; jel tanecikleri yüzeyinde gelişen *Zymomonas mobilis* hücrelerinin tanecik yüzeyinde daha fazla tutunamayıp dışarı çıkış sıvısıyla birlikte reaktörden uzaklaşmasıdır. Çizelge 4.1'de, 6. günden itibaren alınan örneklerdeki hücre konsantrasyonunun önemli ölçüde dalgalanma gösterdiği (0.83-2.83 g/L) görülmektedir. Bu da, reaktörden hücre kaçışının, üretim süresi ve dilüsyon hızı da dahil, belli bir esasa bağlı olmadan değiştiğini göstermektedir. Reaktörden hücre kaçışı Lee ve arkadaşları (1993) ile Özçelik ve arkadaşları (2002) tarafından paket yataklı reaktörde yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir.

Z. mobilis hücrelerinin canlılığının ortamdaki etil alkol konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağımlı olduğu ve 35 °C'de, kısmen yüksek etil alkol konsantrasyonunda önemli ölçüde azalabileceği belirtilmektedir (Lee *et al.* 1983). Bu nedenle, benzer koşullardaki bir sürekli üretim denemesi 30 °C'de tekrarlanmıştır.

Reaktör, 7.5 g kitin üzerine bağlanmış AMG ve 19.0 gram %24 kurumadde içeren *Z. mobilis* ATCC 10988 hücreleri ile karıştırılarak oluşturulan ko-immobilizat kürecikleri ile doldurulduktan sonra 30 °C'de, sürekli etil alkol üretimi amacıyla çalıştırılmıştır.

İki ayrı parti halinde hazırlanan sıvılaştırılmış ve pH'ları 5.5'e ayarlanmış nişasta çözeltilerinin konsantrasyonları 99.3 ve 100.8 g/L glikoz eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

Denemede, 35 °C'deki çalışmaya benzer şekilde, en düşük dilüsyon hızında ($D = 0.05$ 1/h) çalışmaya başlandıktan sonra, sırasıyla 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 1/h dilüsyon hızlarında üçer gün üretim sürdürülmüştür. Değişik dilüsyon hızlarında ($D = 0.05$ -0.30 1/h) sürdürülen üretimde elde edilen bulgular ve hesaplanan kinetik değerler, Çizelge 4. 2'de özetlenmiştir.

Reaktörde çalışılan en düşük dilüsyon hızında ($D = 0.05$ 1/h) en yüksek substrat dönüşüm değeri (%100) elde edilmiş ve yine en yüksek etanol konsantrasyonuna (45.8 g/L) bu dilüsyon hızının 3. gününde ulaşılmıştır. Dördüncü gün dilüsyon hızı 0.10 1/h'e çıkarılmış ve substrat dönüşümünün 0.05 1/h dilüsyon hızına göre düştüğü gözlenirken, hacimsel verimlilik değerinin 4.2 g/L.h'e yükseldiği görülmüştür. 0.10 1/h dilüsyon hızında çalışılan 3 gün içerisinde etanol konsantrasyonu 41.8-42.5 g/L arasında değişmiş ve bu süre içerisinde reaktörden çıkan sıvıda glikoz hiç belirlenemezken, hidroliz sonrası toplam şekerin 6.7-9.3 g/L arasında kullanılmadan reaktörden ayrıldığı saptanmıştır. 0.15 1/h dilüsyon hızında ise hidroliz sonrası toplam şekerin konsantrasyonu (21.4 g/L) artarken, ortamda az miktarda glikozun (1.2 g/L) da bulunduğu görülmüştür. 0.15 1/h dilüsyon hızında 2. ve 3. gün örneklerinde de aynı şekilde sırasıyla; 18.6 ve 22.1 g/L hidroliz sonrası toplam şeker değerleri elde edilirken, 1.4 ve 2.6 g/L miktarlarında glikoz bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Hidroliz

Çizelge 4.2 Sürekli karıştırılmalı reaktörde AMG ve *Zymomonas mobilis* ko-immobilizatları ile nişastadan etil alkol üretimine ilişkin ikinci denemeye (30 °C, 19.0 g santrifüj hücre) ait bulgular ve hesaplanan kinetik değerler

ÖRNEK NO	S ₀ , g/L	D, h ⁻¹	Süre, h	X, g/L	pH	Toplam Şeker, g/L	Glikoz, g/L	Etil Alkol, g/L	V _p , g/L.h	Substrat Dönüşümü, %	Y _{ps}
1	99.3	0.05	18	0.15	4.38	1.7	0.0	41.5	2.1	98	0.43
2	99.3	0.05	25	0.13	4.32	0.3	0.0	45.1	2.3	100	0.46
3	99.3	0.05	24	0.12	4.42	0.5	0.0	45.8	2.3	100	0.45
4	99.3	0.10	24	0.10	4.35	6.7	0.0	42.3	4.2	93	0.46
5	99.3	0.10	23	0.19	4.38	8.2	0.0	42.5	4.3	92	0.47
6	99.3	0.10	25	0.10	4.40	9.3	0.0	41.8	4.2	91	0.46
7	99.3	0.15	24	0.19	4.43	21.4	1.2	36.4	5.5	78	0.47
8	99.3	0.16	24	0.73	4.45	18.6	1.4	36.3	5.8	81	0.45
9	99.3	0.15	24	1.46	4.47	22.1	2.6	37.1	5.6	78	0.48
10	99.3	0.20	24	0.93	4.52	32.5	14.2	30.6	6.1	67	0.46
11	99.3	0.20	24	1.07	4.50	31.8	13.8	31.2	6.2	68	0.46
12	99.3	0.20	24	1.26	4.53	30.3	12.3	31.0	6.2	70	0.45
13	100.8	0.25	23	0.60	4.46	48.3	18.6	23.7	5.9	51	0.46
14	100.8	0.25	24	2.04	4.48	51.6	20.1	22.3	5.6	48	0.47
15	100.8	0.25	24	2.57	4.45	52.1	19.4	22.9	5.7	48	0.47
16	100.8	0.30	22	1.31	4.42	63.8	23.4	16.8	5.0	37	0.45
17	100.8	0.30	24	2.01	4.40	65.3	25.7	17.1	5.1	35	0.48
18	100.8	0.30	24	2.46	4.45	64.6	26.1	16.7	5.0	36	0.46
19	100.8	0.10	25	1.79	4.35	10.3	0.3	40.6	4.0	90	0.45
20	100.8	0.10	24	1.19	4.32	12.1	0.6	39.4	3.9	88	0.44
21	100.8	0.10	23	1.34	4.28	11.6	0.3	40.1	4.0	88	0.45

sonrası toplam şekerin yüksek olmasına rağmen ortamda glikozun bu denli az bulunmasının, nişastanın hidrolizinin yetersiz olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Substrat dönüşümü 0.15 1/h dilüsyon hızında %78-81 iken, 0.20 1/h dilüsyon hızında bu değerlerin daha da düştüğü gözlenmiştir. Çalışma boyunca elde edilen en yüksek hacimsel verimlilik değerine (6.2 g/L.h) bu dilüsyon hızında ulaşılmıştır. Belirtilen dilüsyon hızında etanol konsantrasyonu ortalama 30.9 g/L olarak bulunurken, ortamda biriken hidrolize olmamış nişastanın yanında, glikozun da kullanılmadan birikip 12.3-14.2 g/L arasında bulunduğu tespit edilmiştir.

0.25 1/h dilüsyon hızında bakteri şekerin önemli bir kısmını (18.6-20.1 g glikoz) kullanamamış ve 3 günlük süre içerisinde en yüksek etil alkol konsantrasyonu 23.7 g/L (%51 substrat dönüşüm oranıyla) olmuştur. Bu dilüsyon hızında ortalama 0.47 verim

katsayısıyla hacimsel verimlilik değeri, ortalama, 5.7 g/L.h olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).

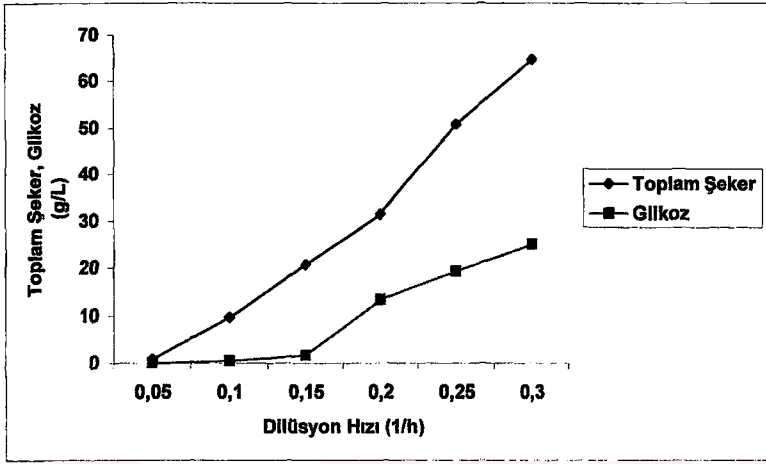
Dilüsyon hızı 0.25'ten 0.30 1/h'e çıkarıldığında, substrat dönüşümünde ve etanol konsantrasyonunda belirgin bir azalma gözlenirken; glikoz ve hidroliz sonrası toplam şekerde artış gözlenmiş ve 0.30 1/h dilüsyon hızında çalışılan 3 gün için, sırasıyla 5.0 (0.45 verim katsayısıyla), 5.1 (0.48 verim katsayısıyla) ve 5.0 (0.46 verim katsayısıyla) g/L.h hacimsel verimlilik değerleri elde edilmiştir.

Çalışmanın son 3 gününde dilüsyon hızı 0.10 1/h düşürülmüş, etanol konsantrasyonu 39.4-40.6 g/L arasında, substrat dönüşümü %88-90 arasında, hacimsel verimlilik ise 3.9-4.0 g/L.h arasında değişmiştir. Dışarıya çıkış sıvısında hidroliz sonrası toplam şekerin 10.3-12.1 g/L arasında olup fazla artmamış olması, glikozun ise 0.3- 0.6 g/L arasında olması, reaktörün kararlılığını koruduğunun bir göstergesi olarak düşünülmüştür.

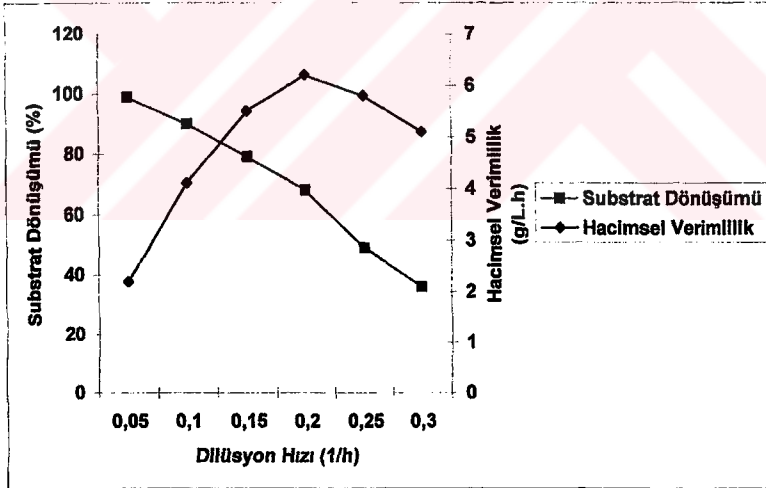
Bu çalışmada elde edilen ve 0.43-0.48 g/g arasında değişen verim katsayısı değerleri, Sun ve arkadaşları (1998)'nin verim katsayısını 0.49 g/g olarak buldukları çalışmalarındakinden düşük, Lee ve arkadaşları (1987)'nin yaptıkları çalışmada elde edilen değerden (0.43 g/g) yüksektir.

Denemede, değişik dilüsyon hızlarında alınan örneklerin pH'ları 4.28-4.52 arasında değişmiştir. Nişasta çözeltilerinin başlangıç pH'ları dikkate alındığında, 0.98-1.22 birim aralığında azalma görülmektedir. Bu azalmanın, ilk denemedeki (35 °C) örneklerin pH değerlerindeki azalmadan daha düşük olması dikkate değer bir bulgudur.

Çizelge 4.2'de, optik yoğunluk ölçümleri ile belirlenen hücre konsantrasyonları incelendiğinde, ilk 7 gün içinde önemli bir hücre konsantrasyonu belirlenemezken, 8. günden itibaren hücre konsantrasyonunun arttığı; ancak reaktörden ayrılan bu hücre miktarının (0.73-2.46 g/L hücre kuru ağırlığı) belli bir esasa bağlı olmadan önemli oranda dalgalanma gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.3 30 °C'de 19 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ikinci denemede dilüsyon hızına karşı toplam şeker ve glüköz konsantrasyon değerleri



Şekil 4.4 30 °C'de 19.0 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen ikinci denemede dilüsyon hızına karşılık substrat dönüşümü ve hacimsel verimlilik değerleri

4.3 Ko-immobilize Sistemde Sürekli Etil Alkol Üretimi Üzerine Hücre Konsantrasyonunun Etkisi

İlk iki parti denemede elde edilen değerlere bakıldığında; özellikle yüksek dilüsyon hızlarında, çıkış sıvısındaki ortamda önemli oranda glikozun biriktiği, bu nedenle de reaktör içerisinde etil alkol fermentasyonunu gerçekleştirecek immobilize hücre konsantrasyonunun yetersiz olduğu düşünülmüş, 3. denemede daha yüksek hücre konsantrasyonu ile çalışılmıştır.

Reaktör, 7.5 g kitin üzerine bağlanmış AMG ve daha önceki çalışmadan farklı olarak 29.2 gram %24.2 kurumadde içeren *Z. mobilis* ATCC 10988 santrifüj hücre ile karıştırılarak oluşturulan ko-immobilizat kürecikleri ile doldurulduktan sonra ilk denemede olduğu gibi, 35 °C'de, sürekli etil alkol üretimi amacıyla çalıştırılmıştır.

Sıvılaştırılmış nişasta çözeltilerinden ilkinin konsantrasyonu 98.8 g/L, ikincinin ise 97.6 g/L glikoz eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

Üçüncü denemede de dilüsyon hızları diğer iki denemede olduğu şekilde seçilmiştir (D = 0.05-0.30 1/h). Dilüsyon hızları 0.05 1/h'ten 0.30 1/h'e düzenli bir şekilde çıkarıldıktan sonra yeniden 0.05 1/h'e indirilmiştir. Denemede elde edilen bulgular ve hesaplanan kinetik değerler Çizelge 4.3'te görülmektedir.

Denemede ilk beş gün 0.05 ve 0.10 1/h dilüsyon hızlarında çalışılmış ve %98-100 substrat dönüşümüyle; 43.5 g/L ye kadar yükselebilen etanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Denemeye ait en yüksek etanol konsantrasyonu (43.5 g/L) 0.10 1/h ve 0.15 1/h dilüsyon hızları ile çalışıldığında elde edilmiştir. 0.10 1/h dilüsyon hızında hacimsel verimlilik 4.3-4.8 g/L.h, hidroliz sonrası toplam şeker 0-1.2 g/L, glikoz ise 0-0.2 g/L değerlerinde tespit edilmiştir. Bu partideki denemenin en dikkat çekici özelliği ise, 0.15 1/h dilüsyon hızındaki 3 gün dahil olmak üzere ilk 8 gün boyunca alınan örneklerde glikozun nerdeyse hiç tespit edilememiş olması ve hidrolizasyon sonrası toplam şekerin ise en fazla 4.2 g/L seviyesine ulaşmış olmasıdır (Şekil 4.5). Bu, glikoza

Çizelge 4.3 Sürekli karıştırmalı reaktörde AMG ve *Zymomonas mobilis* ko-immobilizatları ile nişastadan etil alkol üretimine ilişkin üçüncü denemeye (35 °C, 29.2 g santrifüj hücre) ait bulgular ve hesaplanan kinetik değerler

ÖRNEK NO	S_{D_0} , g/L	D_1 , h ⁻¹	Süre, h	X, g/L	pH	Toplam Şeker, g/L	Glikoz, g/L	Etil Alkol, g/L	V_p , g/L.h	Substrat Dönüşümü, %	$Y_{p/s}$
1	98.8	0.06	16	0.24	4.28	2.1	0.0	39.8	2.4	98	0.41
2	98.8	0.05	24	0.09	4.32	1.0	0.0	43.1	2.2	99	0.44
3	98.8	0.11	24	0.18	4.26	0.0	0.0	43.2	4.8	100	0.44
4	98.8	0.10	24	0.23	4.30	1.2	0.2	43.5	4.4	99	0.45
5	98.8	0.10	23	0.33	4.25	0.7	0.0	42.6	4.3	99	0.43
6	98.8	0.16	25	0.30	4.22	2.2	0.2	43.5	7.0	98	0.45
7	98.8	0.15	24	1.02	4.30	1.3	0.0	43.1	6.5	99	0.44
8	98.8	0.15	23	0.63	4.28	4.2	0.0	43.2	6.5	96	0.46
9	98.8	0.21	25	1.29	4.33	16.5	2.3	36.2	7.6	83	0.45
10	98.8	0.20	24	2.39	4.30	10.5	0.8	36.8	7.4	89	0.42
11	98.8	0.20	24	2.15	4.34	12.0	1.2	37.1	7.4	88	0.43
12	98.8	0.24	24	2.28	4.35	27.2	8.6	30.8	7.4	72	0.43
13	98.8	0.25	24	2.42	4.30	32.8	11.2	30.5	7.6	67	0.46
14	97.6	0.25	23	2.27	4.42	31.3	10.6	29.1	7.3	68	0.44
15	97.6	0.31	25	2.07	4.38	48.6	25.3	21.7	6.7	50	0.44
16	97.6	0.30	24	2.57	4.35	45.8	25.3	23.1	6.9	53	0.45
17	97.6	0.15	24	2.07	4.28	7.4	1.8	38.6	5.8	92	0.43
18	97.6	0.16	24	1.79	4.25	8.6	1.2	37.1	5.9	91	0.42
19	97.6	0.15	24	1.63	4.22	6.8	2.5	39.1	5.9	93	0.43
20*	97.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	97.6	0.10	24	1.77	4.20	2.2	0.0	41.2	4.1	99	0.43
22	97.6	0.05	24	0.30	4.25	0.6	0.0	41.8	2.1	99	0.43

* Örnek alınmadı.

dönüşüm hızının , fermentasyon hızından düşük olduğu anlamına gelmektedir. Diğer bir ifadeyle, nişasta glikoza parçalanır parçalanmaz etanol ve CO₂'e dönüşmüş ve reaktör içinde birikmeye vakit bulamamıştır. Bu bulguların ışığında, 0.15 1/h dilüsyon hızına kadar %96 nın üzerinde substrat dönüşümünün gerçekleştirilebildiği görülmektedir (Şekil 4.6).

Denemeye ait en yüksek hacimsel verimlilik değeri, 0.20 1/h dilüsyon hızında, 7.6 g/L.h olarak (0.45 verim katsayısıyla) elde edilmiştir. Daha önceki dilüsyon hızlarında en az %96 seviyesinde olan substrat dönüşümü; 0.20 1/h dilüsyon hızında ortalama %87 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).

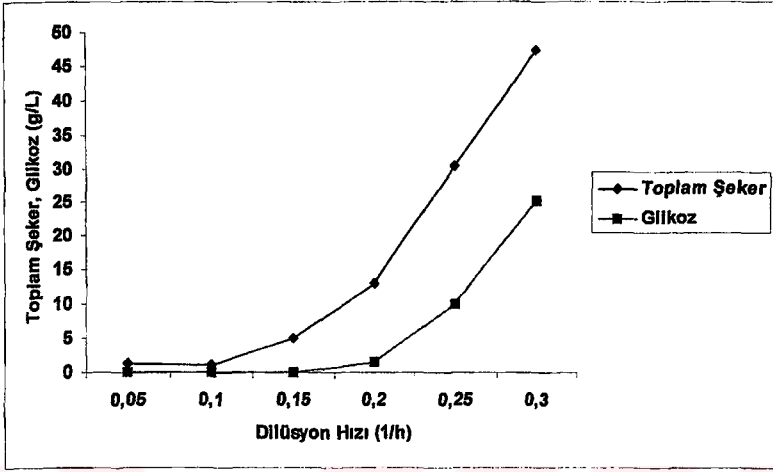
0.25 1/h dilüsyon hızında, hidrolizasyon sonrası toplam şeker 27.2-32.8 g/L, bunun 8.6-11.2 g/L'si de glikoz olarak belirlenirken, etanol konsantrasyonu 29.1-30.8 g/L arasında

bulunmuştur. Denemenin en yüksek hacimsel verimlilik değerine (7.6 g/L.h) belirtilen dilüsyon hızında, 0.46 verim katsayısıyla, yeniden ulaşılmıştır. Çalışmada kullanılan en yüksek dilüsyon hızında ($D = 0.30$ 1/h), etanol konsantrasyonu için ortalama 22.4 g/L değeri tespit edilirken, dışarıya çıkış sıvısında hidroliz sonrası toplam şeker ve glikozun daha da arttığı görülmüştür. Bu dilüsyon hızında substrat dönüşümü de %50-53 olarak belirlenmiştir. Denemenin son 5 günü dilüsyon hızı düşürülmüş ve bu sürenin ilk üç günü dilüsyon hızı 0.15, dördüncü gün 0.10 ve son gün de 0.05 1/h'e olarak ayarlanmıştır. Bu süre içerisinde substrat dönüşümü gittikçe artarak yeniden %99'a, etanol konsantrasyonu 41.8 g/L'e yükselmiştir. Denemenin 20-22. günlerinde bile sistemin kararlılığının, önemli oranda korunduğu, AMG enziminin aktivitesinin devam ettiği ve oluşan glikozun mikroorganizma tarafından etkin bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.

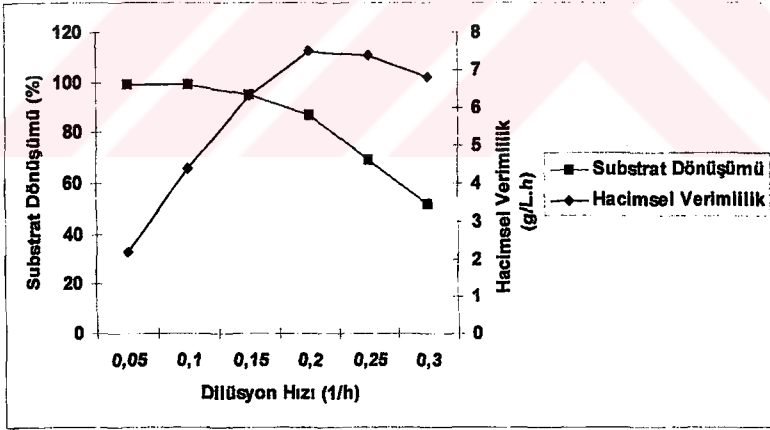
Elde edilen bulgular, sistemde başlangıçta immobilize edilen bakteri hücrelerinin miktarının artmasının, kinetik değerleri olumlu yönde etkilediğini işaret etmektedir.

35 °C'de 29.2 gram hücre lapası ile gerçekleştirilen 3. denemede elde edilen en yüksek verim katsayısı (0.46 g/g), 30 °C de gerçekleştirilen ikinci denemede elde edilen en yüksek 0.48 g/g değerinden ve Tao ve arkadaşları (2005)'nin tespit ettiği 0.488 g/g değerinden düşüktür. Çalışmada 2.1- 7.6 g/L.h arasında değişim gösteren hacimsel verimlilik değerleri Sun ve arkadaşları (1998)'nin akışkan yataklı reaktörde yaptıkları çalışmada elde ettikleri 3-17 g/L.h arasında değişen değerlerden düşüktür.

35 °C'de, 29.2 g santrifüj edilmiş *Z. mobilis* hücrelerinin immobilizasyonu ile gerçekleştirilen 3. denemede de örneklerin pH değerleri 4.20-4.42 arasında değişmiş, substratın başlangıç pH'sına göre 1.08-1.30 birim aralığında azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular, Krishnan ve arkadaşları (1999) ile Özçelik ve arkadaşları (2002)'nin bulgularıyla uyusmaktadır.



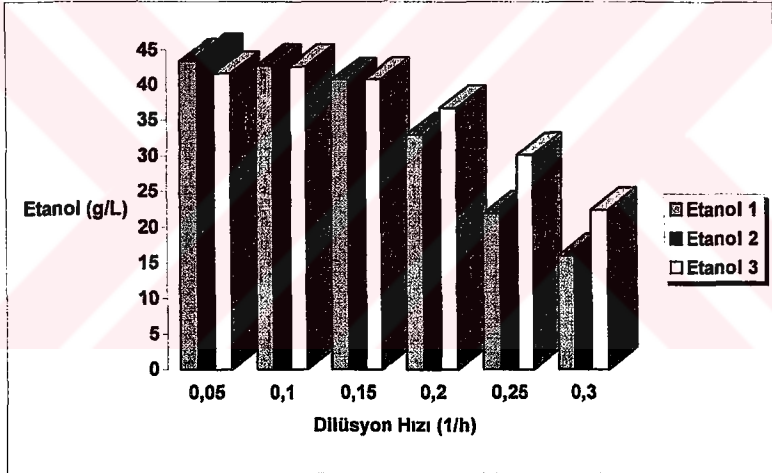
Şekil 4.5 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen üçüncü denemede dilüsyon hızına karşılık toplam şeker ve glukoz konsantrasyon değerleri



Şekil 4.6 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen üçüncü denemede dilüsyon hızına karşılık substrat dönüşümü ve hacimsel verimlilik değerleri

Örneklerdeki hücre konsantrasyonu ilk 6 gün içerisinde 0.09-0.33 g/L seviyelerinde iken, 6. günden itibaren önemli bir artış göstermiştir. Reaktörden ayrılan hücrelerin sebep olduğu bulanma, gözle de izlenebilecek şekilde belirgin olmuş, fakat günlere göre belli bir esasa bağlı kalmadan önemli dalgalanmalar (0.63-2.42 g/L hücre kuru maddesi) göstermiştir.

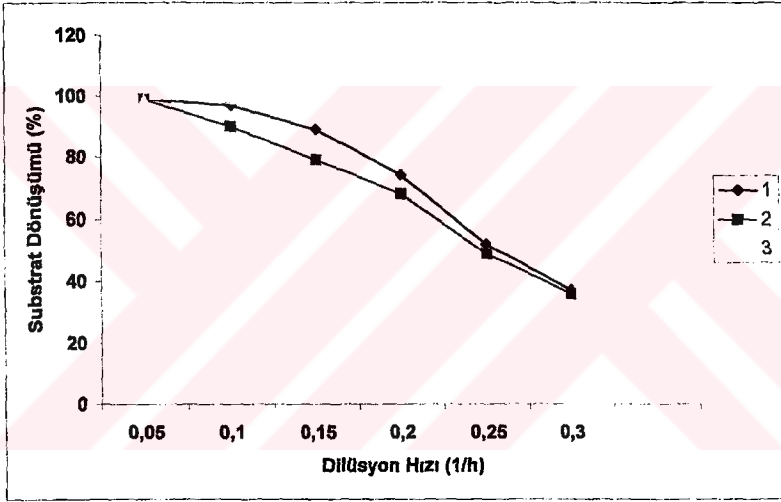
Reaktör dışına hücre kaçıışının olduğu Lee ve arkadaşları (1993) ve Özçelik ve arkadaşları (2002) tarafından paket yataklı reaktörde yapılan çalışmada da vurgulanmıştır. Ancak bu çalışmada hücre konsantrasyonları, Özçelik ve arkadaşları (2002)'nin değerlerinden daha yüksektir.



Şekil 4.7 Dilüsyon hızlarına karşılık etanol konsantrasyonları (1: 35 °C'de 20.3 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme, 2: 30 °C'de 19 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme, 3: 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme)

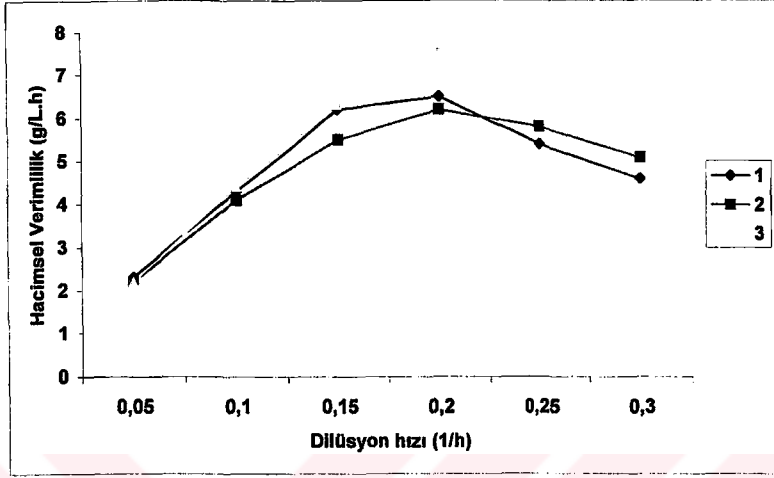
Şekil 4.7'de, değişik dilüsyon hızlarında elde edilen etanol konsantrasyonları, 3 ayrı denemeye göre, kıyaslanmıştır. Düşük dilüsyon hızlarında (0.05-0.10 1/h) elde edilen etanol konsantrasyonları arasında belirgin bir farklılık görülmemekte olup, grafikte izlenen küçük farklılık başlangıçtaki substrat konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır.

0.15 1/h dilüsyon hızında, 1. ve 3. denemelerde benzer etanol konsantrasyonu değerleri elde edilmiş olup, 30 °C'de gerçekleştirilen 2. denemede etanol miktarı düşmüştür. Daha yüksek dilüsyon hızlarında (0.20, 0.25 ve 0.30 1/h) başlangıç hücre konsantrasyonu yüksek olan 3. denemede, belirgin bir şekilde, daha yüksek etanol konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Bunun nedeni; daha önce de açıklandığı gibi, 3 nolu çalışmada başlangıç immobilize hücre konsantrasyonunun yüksek tutulması ve bu sayede, artan dilüsyon hızlarında bile, bakterinin fermentasyon etkinliğinin yüksek oluşudur.



Şekil 4.8 Dilüsyon hızlarına karşılık substrat dönüşümü değerleri (1: 35 °C'de 20.3 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme, 2: 30 °C'de 19 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme, 3: 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme)

Şekil 4.8'de substrat dönüşümleri kıyaslanmıştır. Başlangıç dilüsyon hızında (0.05 1/h) her üç denemeye ait substrat dönüşüm değerleri birbirine çok yakınken (ortalama %98-99); dilüsyon hızı 0.10 1/h'in üzerine çıkarıldığında, 3 nolu denemede elde edilen substrat dönüşümü, diğerlerine göre daha yüksek bulunmuş, dilüsyon hızı arttıkça, 3 nolu denemenin diğer denemelere üstünlüğü daha da belirginleşmiştir.



Şekil 4.9 Dilüsyon hızlarına karşılık hacimsel verimlilik değerleri (1: 35 °C'de 20.3 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme, 2: 30 °C'de 19 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme, 3: 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile yapılan deneme)

Şekil 4.9'da, farklı denemelere ait hacimsel verimlilik değerleri kıyaslanmıştır. Düşük dilüsyon hızlarında 3 deneme birbirine yakın sonuçlar verirken; dilüsyon hızının artmasıyla, 3 nolu denemede elde edilen hacimsel verimlilik değerlerinin, belirgin biçimde yüksek olduğu görülmektedir. 0.20 1/h dilüsyon hızı her 3 deneme için hacimsel verimlilik değerinin en yüksek seviyede bulunduğu dilüsyon hızıdır. Bu dilüsyon hızında 1 nolu deneme %74 substrat dönüşümüyle 6.5 g/L.h, 2 nolu denemede %68 substrat dönüşümüyle 6.2 g/L.h, 3 nolu denemede %87 substrat dönüşümüyle 7.5 g/L.h hacimsel verimlilik değerine ulaşmıştır.

Bu çalışmada elde edilen en yüksek hacimsel verimlilik değeri (%83 substrat dönüşümünde 7.6 g/L.h) Lee ve arkadaşları (1987) ile Kim ve arkadaşları (1988)'nin paket yataklı çalışmalarında elde ettikleri, sırasıyla, 37 g/L.h ve 72.2 g/L.h değerlerinden; Sun ve arkadaşları (1998) ile Krishnan ve arkadaşları (1999)'nın akışkan yataklı reaktörde elde ettikleri sırasıyla 38 g/L.h ve 15.1 g/L.h değerlerinden düşük bulunmuştur.

5. SONUÇ

Sürekli karıştırılmalı bir biyoreaktör içerisinde AMG ve *Z. mobilis* hücreleri ile oluşturulan ko-immobilize sistemde nişastanın simultane sakkarifikasyonu ve fermentasyonu tek aşamada gerçekleştirilmiştir. Üç haftadan daha uzun bir süre başarıyla sürdürülen sürekli üretimde kontaminasyon ve ko-immobilize biyokatalizör taneciklerinin bozulması gibi sorunlarla karşılaşılmemiştir. Başlangıç substrat pH'ları 5.5 olmak üzere; 35 °C'de 20.3 gram santrifüj hücre ile, 30 °C'de 19.0 gram santrifüj hücre ile ve 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile gerçekleştirilen üretimlerden 35 °C'de 29.2 gram santrifüj hücre ile yapılan denemede en uygun kinetik veriler elde edilmiştir. Belirtilen koşullarda, 0.15 1/h dilüsyon hızına kadar, 0.45 verim katsayısıyla substratın tamamına yakını (%98 substrat dönüşümü) etil alkole fermente edilmiştir. Başlangıç bakteri miktarının yüksek oluşuna bağlı olarak fermentasyonun daha etkin gerçekleşmesi bunun nedeni olarak gösterilebilir.

Bu çalışmada nişastadan etil alkol üretimine ilişkin en uygun verilerin elde edildiği 35 °C'de 29.2 g santrifüj hücre ile gerçekleştirilen denemede, en yüksek hacimsel verimlilik değeri 7.6 g/L.h, en yüksek verim katsayısı ise 0.46 g/g olarak elde edilmiş olup; bu değerler diğer çalışmalara göre oldukça düşüktür. Verim katsayısının düşük olmasının en önemli nedeninin 35 °C'de sürekli karıştırılan reaktörden bir kısım alkolün buharlaşarak ayrılması olduğu düşünülmektedir. Alkolün sıcaklık ve karıştırmanın etkisiyle buharlaşarak uzaklaşması sorunu, basit bir yoğunlaştırıcı düzenek kurularak aşılabılır.

KAYNAKLAR

- Amutha, R. and Gunasekaran, P. 2001. Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *Bioscience and Bioengineering*, 92(69); 560-564.
- Anonymus, 2005. Fermentation of ethanol. [http://www.andrew.cmu.edu/user/jitkangl/Fermentation %20 of %20](http://www.andrew.cmu.edu/user/jitkangl/Fermentation%20of%20). Erişim Tarihi: 07.03.2005.
- Bajpai, P.K. and Margaritis, A. 1987. Effects of ethanol concentration on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol. *J. Ferment. Technol.*, 65(2); 233-237.
- Cross, J.S., Vega, J.L. and Clausen, E.C. 1993. Performance of a cross-linked immobilized cell reactor with *Zymomonas mobilis* using synthetic and complex media for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 4(4); 283-291.
- Dellweg, H. and Luca, S.F. 1988. Ethanol fermentation: suggestions for process improvements. *Process Biochem.* August, 100-104.
- Esser, K. and Schmidt, U. 1982. Alcohol production by biotechnology. *Process Biochem*, May-June, 46-49.
- Forouchi, E. and Gunn, D.J. 1983. Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1905-1911.
- Göksungur, Y. ve Güvenç, U. 2002. Kalsiyum aljinatta hücre immobilizasyonu ve biyoteknolojideki uygulamaları. *Gıda*, 27(6); 511-518.
- Grote, W. and Rogers, P.L. 1985. Ethanol production from sucrose-based raw materials using immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Biomass*, 8, 169-184.
- Gunasekaran, P. and Raj, K.C. 2004. Ethanol fermentation technology - *Zymomonas mobilis*. 1-21. [http:// www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles_14.htm](http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles_14.htm) Erişim Tarihi: 03.12.2004.
- Johansen, A. and Flink, J.M. 1986. Immobilization of yeast cells by internal gelation of alginate. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, March, 145-148.
- Keim, C.R. 1983. Technology and economics of fermentation alcohol-an update. *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 103-114.
- Kim, C.H., Lee, G.M., Abidin, Z., Han, M.H. and Rhee, K. 1988. Immobilization of *Zymomonas mobilis* and amyloglucosidase for ethanol production from sago starch. *Enzyme Microb. Technol.*, 10, July, 426-430.
- Kim, C.H., Abidin, Z., Ngee, C.C. and Rhee, K. 1992. Pilot-scale ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* from simultaneously saccharified sago starch. *Bioresource Technology*, 40, 1-6.
- Kim, C.H. and Rhee, S.K. 1993. Process development for simultaneous starch saccharification and ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 28, 331-339.
- Krishna, S.H., Prasanthi, K., Chowdary G.V. and Ayyanna, C. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochem*, 33(8); 825-830.

- Krishnan, M.S., Nghiem, N.P. and Davison, B.H. 1999. Ethanol production from corn starch in a fluidized-bed bioreactor. *Biochem. and Biotechnol.*, 77-79, 359-372.
- Lee, J.H., Pagan, R.J. and Rogers, P.L. 1983. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zymomonas mobilis*. *Biotech. and Bioeng.*, 25, 659-669.
- Lee, G.M., Kim, C.H., Abidin, Z., Han, M.H. and Rhee, S.K. 1987. Continuous ethanol production from sago starch using immobilized amyloglucosidase and *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Technol.*, 65(5); 531-535.
- Lee, W., Ebata, T., Liu, C. and Tanaka, H. 1993. Co-immobilization of three strains of microorganisms and its application in ethanol production from raw starch under unsterile conditions. *J. Ferment. and Bioeng.*, 75(1); 36-42.
- Lee, W. and Huang, C. 2000. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. *Biochem. Engineer. J.*, 4, 217-227.
- Matsumura, M. and Hirata, J. 1988. Continuous simultaneous saccharification of raw starch by glucoamylase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 42, 51-67.
- Nam, K.D., Choi, M.H., Kim, W.S., Kim, H.S. and Ryu, B.H. 1988. Simultaneous saccharification and alcohol fermentation of unheated starch by free, immobilized and coimmobilized systems of glucoamylase and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.*, 66(4); 427-432.
- Özçelik, F. 1985. Bakteriye etanol üretimi. *Gıda*, 10(6); 347-353.
- Özçelik, F. 1986. *Zymomonas mobilis* bakterisiyle melastan etil alkol üretimi. *Gıda*, 11(6); 351-357.
- Özçelik, F. 1987. Biyokatalistlerin immobilizasyonu. *Gıda*, 12(2); 81-87.
- Özçelik, F., Özderen, T. ve Balk, M. 1996. Nişastanın şekerlendirilmesi sırasında *Zymomonas mobilis* ile etil alkole fermentasyonu. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 20, 21-25.
- Özçelik, F. 2002. Ank.Üniv. Araştırma fonu proje 2000-17-11-003. Basılmamış sonuç rapor. Ankara. 1-14.
- Özçelik, F. 2004. Fermentasyon kinetiği ders notları. (Basılmamış). Ank. Üniv. Müh. Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü. Ankara.
- Park, S.C. and Baratti, J. 1991. Batch fermentation kinetics of sugar beet molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotech. and Bioeng.*, 38, 304-313.
- Poosaran, N., Heyes, R. H. and Rogers, P. L. 1985. Ethanol production from cassava starch using a highly productive strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. *Biomass*, 7, 171-183.
- Shamala, T.R., Sreekantiah, K.R. 1988. Use of wheat bran as a nutritive supplement for the production of ethanol by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Appl. Bacteriol.*, 65(6); 433-436.
- Spangler, D.J. and Emert, G.H. 1986. Simultaneous saccharification/fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Biotech. and Bioeng.*, 28, 115-118.
- Sreekumar, O. and Basappa, S.C. 1991. Characterization of a superior thermotolerant mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 for ethanol production in glucose medium. *Biotech. Letters*, 13(5); 365-370.

- Stanley, W.L., Watters, G.G., Kelly, S.H. and Olson, A.C. 1978. Glucoamylase immobilized on chitin with glutaraldehyde. *Biotechnol. Bioeng.* 20, 135-140.
- Sun, M.Y., Nghiem, N.P., Davison, B.H., Webb, O.F., Brienkowski, P.R. 1998. Production of ethanol from starch by co-immobilized *Zymomonas mobilis*-glucoamylase in a fluidized-bed reactor. *Biochem. and Biotechnol.*, 70-72, 429-439.
- Tanaka, H., Kurosawa, H. and Murakami, H. 1986. Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *Biotech. and Bioeng.*, 28, 1761-1768.
- Tao, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y., Zhang K.C. 2005. Ethanol fermentation by an acid – tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochem.*, 40, 183-187.
- Torres, E.F., Allais, J.J. and Baratti, J. 1986. Kinetics of batch fermentations for ethanol production with *Zymomonas mobilis* growing on jerusalem artichake juice. *Biotech. and Bioeng.*, 18, 850-856.

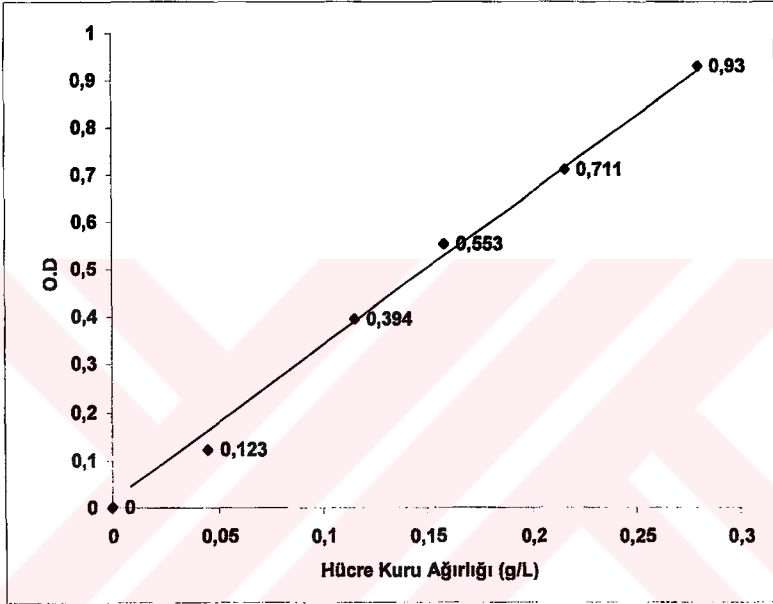
EKLER

EK 1 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988'in Optik Yoğunluğa Karşı Hücre Kuru Ağırlıkları

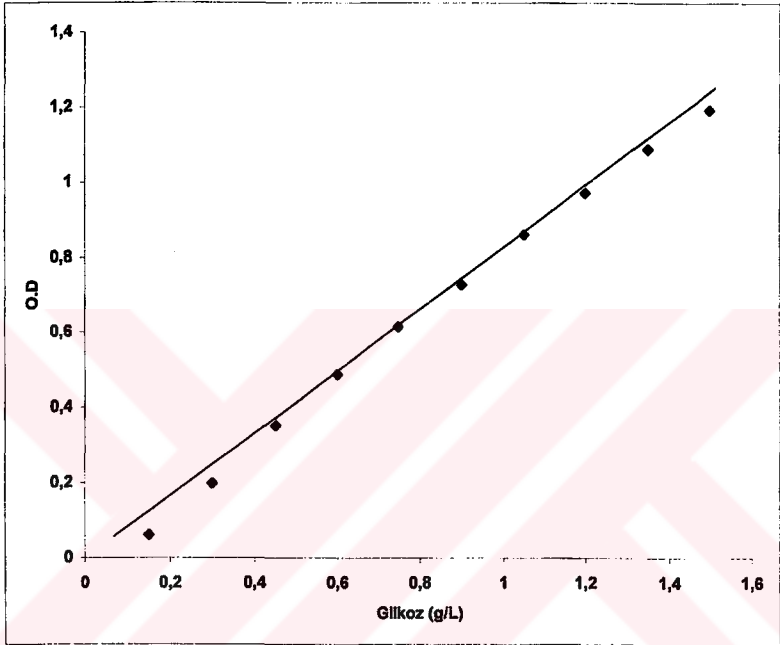
EK 2 Glikoz Standart Kurvesi



EK 1 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988'in Optik Yoğunluğa Karşı Hücre Kuru Ağırlıkları



EK 2 Glikoz Standart Kurvesi



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Evrim GÜNEŞ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 03.04.1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Alparslan Lisesi 1999

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
2003