

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**BAZI MAYALARIN PENTOZCA ZENGİN ASMA ÇUBUĞU
HİDROLİZATINA ADAPTASYONU VE ETANOL ÜRETİMİ**

Yasemin DOĞAN

**Danışman
Doç. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA**



MANİSA-2018

**Yasemin
DOĞAN**

**BAZI MAYALARIN PENTOZCA ZENGİN ASMA ÇUBUĞU HİDROLİZATINA
ADAPTASYONU VE ETANOL ÜRETİMİ**

2018

TEZ ONAYI

Yasemin DOĞAN tarafından hazırlanan “**Bazı Mayaların Pentozca Zengin Asma Çubuğu Hidrolizatına Adaptasyonu ve Etanol Üretimi**”adlı tez çalışması / / tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS** olarak.....ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mustafa OSKAY

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Tansel ÖZTÜRK

Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversite Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Yasemin DOĞAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLO DİZİNİ	VII
TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET	XII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	4
2.2. Alternatif ve Sürdürülebilir Enerji Kaynağı Olarak Biyokütle Enerjisi ..	5
2.3. Biyoetanol	10
2.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	12
2.4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.4.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	14
2.4.3. Pentoz Fermente Edici Diğer Mayalar	15
2.4.4. Etanol Üretebilen Bakteriler	15
2.5. Lignoselülozik Hammaddeler	18
2.5.1. Selüloz	20
2.5.2. Hemiselüloz	22
2.5.3. Lignin	23
2.6. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ön İşlemler	24
2.6.1. Ön-işlem	24
2.7. Hidroliz	27
2.7.1. Hidroliz Teknikleri	27
2.8. Etanol Fermantasyonu	29
2.8.1. Fermantasyonla İlgili Zorluklar	29
2.8.2. İnhibitör Maddelerin Fermantasyona Etkisi	30
2.9. Ön İşlem Görmüş Lignoselülozik Substrattan Hidroliz ve Fermantasyon	30
Stratejileri	30
2.9.1. Aynı Enzimatik Hidroliz ve Fermantasyon (SHF)	30
2.9.2. Eş zamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon (SSF)	31
2.9.3. Non- İzotermal Eş zamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon (NSSF)	31
2.9.4. Eş zamanlı sakkarifikasyon ve kofermantasyon (SSCF)	32
2.9.5. Birleştirilmiş Biyoproses (CBP)	32
2.10. Strain Geliştirme ve Adaptasyon Çalışmaları	33
3. DENEYSEL KISIM	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Cihazlar	36
3.1.2. Kimyasal	36
3.1.3. Mikroorganizmalar	37
3.1.4. Asma Çubuğu Lignoselülozik Atık	37
3.2. Yöntemler	37
3.2.1. Ortam ve Kültür Koşulları	37
3.2.2. Maya Türlerinin Pentoz Şeker Kullanımının Araştırılması	38
3.2.3. Asma çubuğunun Substrat Olarak Hazırlanması ve Hidrolizasyon	38
Basamakları	38

3.2.4. Fermantasyon Denemeleri	39
3.2.4.1. İnokulum Hazırlanması	39
3.2.4.2. Tanımlı Ortamda Fermantasyon	40
3.2.4.3. Hidrolizat İçeren Besiyerinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	40
3.2.5. Katı Hidrolizat Ortamında Ön-Tarama	40
3.2.6. Adaptasyon İçin Fermantasyon	41
3.2.7. Fermantasyon Sürecinin İzlenmesi Sırasında Yapılan İşlemler	42
3.2.7.1. Hücre Sayım ve Canlılığın Ölçümü	42
3.2.7.2. İndirgen Şeker Ölçümü	42
3.2.7.3. Etanol Ölçümü	45
3.2.7.4. Ksiloz Ölçümü	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	50
4.1. Çalışmada kullanılan moleküler karakterize edilmiş maya türleri	50
4.2. Maya Türlerinin Pentoz Şeker Kullanımının Araştırılması	51
4.3. Fermantasyon Denemeleri	52
4.3.1. Tanımlı Ortamda Fermantasyon	52
4.3.2. Hidrolizat Ortamında Ön-Tarama	55
4.3.3. Hidrolizat Ortamında Fermantasyon	55
4.3.4. Ardışık Fermantasyon	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

YPD	Maya pepton dekstroz
YPX	Maya pepton ksiloz
YNB	Maya nitrojen baz
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
SHF	Ayrı enzimatik hidroliz ve fermantasyon
SSF	Eşanlı Sakkarifikasyon ve fermantasyon
SSCF	Eşanlı sakkarifikasyon ve kofermantasyon
NSSF	Non- izotermal eşanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
HK	Hekzokinaz
PGI	Fosfoglukoizomeraz
PFK	Fosfofruktokinaz
FBPA	Fruktoz bisfosfat aldolaz
TPI	Fruktoz bisfosfat aldolaz
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
PGK	Fosfogliserat kinaz
PGM	Fosfogliseromutaz
ENO	Enolaz
PYK	Piruvat kinaz
PDC	Piruvat dekarboksilaz
ADH	Alkol dehidrogenaz
LEVU	Levansukraz
INVB	İnvertaz
GFOR	Glukoz-fruktoz oksidoredüktaz
FK	Fruktokinaz, GK: glukokinaz
GPDH	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
PGL	Fosfoglukonalaktonaz
EDD	6-fosfoglukonat dehidrataz
KDPG	2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat
EDA	2-keto-3-deoksiglukonat alkolaz
GNTK	Glukonat kinaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Enerji kaynaklarının dünya genelinde kullanım oranı	2
Şekil 2.1. Biyokütle kaynakları	4
Şekil 2.2. Yenilenebilir enerji kaynaklarının dünya genelinde kullanım oranları	7
Şekil 2.3. Lignoselülozik biyokütle bileşenleri	8
Şekil 2.4. <i>S. cerevisiae</i> ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonu'nun metabolik yolağı	13
Şekil 2.5. <i>Z. mobilis</i> teki karbohidrat metabolik yolağı	14
Şekil 2.6. Bitki hücre duvarı bileşenleri	20
Şekil 2.7. Bitki hücresinde selülozun yeri	20
Şekil 2.8. Selülozun genel yapısı	21
Şekil 2.9. Lignoselülozik materyalde hemiselülozun konumu	22
Şekil 2.10. Hemiselülozun genel yapısı	23
Şekil 2.11. Ligninin genel yapısı	24
Şekil 2.12. Ön-işlemin lignoselülozik yapı üzerine etkisi	25
Şekil 2.13. Ön-işlem metodları	26
Şekil 2.14. Pirüvatın etanole dönüşmesi	29
Şekil 3.1. Farklı boyutlara ayrılmış asma çubuğu	38
Şekil 3.2. Asma çubuğunun tartımı	39
Şekil 3.3. Asma çubuğu hidrolizatının pH değerinin ayarlanma	39
Şekil 3.4. Fermantasyon ortamı	40
Şekil 3.5. DNS glikoz standart	44
Şekil 3.6. Glikoz referans eğrisi	44
Şekil 3.7. Etanol Assay platelerinin spektrofotometre absorbans değerleri ölçümü	46
Şekil 3.8. Absorbans ölçümleri için kullanılan plate okuyucu	47
Şekil 3.9. Standart ksiloz çözeltisi konsantrasyonlarına (mg/ml) okunan absorbans değerleri	48
Şekil 3.10. Ksiloz içeriğinin belirlenmesinde kullanılan assay kit	49
Şekil 4.1. Hücre sayım grafikleri	54
Şekil 4.2. Katı tarama besiyerinde (YNB+H) gelişen koloniler	55
Şekil 4.3. Beş suşun hazırlanan hidrolizat (H-UD) ve YNB+ Hidrolizat (YNB+H) ortamlarında 3. ve 4. Günlerdeki etanol ölçüm değerleri	56
Şekil 4.4. Beş suşun hazırlanan hidrolizat (H-UD) günlük indirgen şeker ölçüm değerleri	56
Şekil 4.5. 12 kodlu <i>P. kudriavzevii</i> suşuna ait etanol ve şeker ölçüm değerleri (son periyot)	58
Şekil 4.6. D44 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	60
Şekil 4.7. D27 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	60
Şekil 4.8. D12 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	60
Şekil 4.9. D54 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	60
Şekil 4.10. D88 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	61
Şekil 4.11. D24 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	61
Şekil 4.12. D79 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	61
Şekil 4.13. D85 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler	61

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Türkiye'deki tarıma uygun fakat kullanılmayan arazilerde biyoetanol üretim potansiyeli	3
Tablo 2.1. Yenilenebilir ve yenilenemez enerji kaynakları	5
Tablo 2.2. Farklı kaynaklar kullanılarak üretilen biyoetanolün üretim potansiyellerinin karşılaştırılması	8
Tablo 2.3. Biyokütlenin biyoetanolle dönüşümünde örnek bir akış şeması.....	10
Tablo 2.4. Biyoetanolün kimyasal özellikleri	11
Tablo 2.5. Biyoetanolün fiziksel özellikleri	11
Tablo 2.6. Etanol üreten bakteriler, substratları ve verimleri.....	16
Tablo 2.7. Ksilozu fermente etme kapasitesine doğal olarak sahip olan ve üzerinde çalışılan bakteri türleri	16
Tablo 2.8. Çeşitli lignoselülozik biyokütle materyalleri'nin içerikleri.....	18
Tablo 2.9. Ön işlem metotları.....	26
Tablo 2.10. Adaptasyon ve geri dönüşüm ile geliştirilmiş yerli pentoz fermantatif mayalar	35
Tablo 3.1. Kullanılan ortam kompozisyonları.....	36
Tablo 3.2. Pentoz kullanım tarama besiyeri bileşenleri	38
Tablo 3.3. Katı hidrolizat ortamı bileşenleri	41
Tablo 3.4. DNS solüsyonunun hazırlanışı.....	43
Tablo 3.5. Master reaksiyon karışımı	45
Tablo 3.6. Ksiloz ölçümü	48
Tablo 4.1. 26S rDNA bölgesi D1/D2 Domainin Sekans Analizine göre tanımlanan türler	50
Tablo 4.2. Tanımlı besiyerinde pentoz kullanım aktivitesine sahip oldukları belirlenen suşlar	51
Tablo 4.3. Tanımlı besiyerinde 13 adet tanımlı suş ile yapılan denemelerde elde edilen ölçümler	53
Tablo 4.4. H (UD) ortamındaki fermanstasyon süresince yapılan ölçümlere göre etanol verim değerleri	57
Tablo 4.5. Ardışık fermantasyon öncesi ve sonrası <i>P. kudriavzeii</i> suşunun kullanım, üretilen etanol ve verim değerleri	58
Tablo 4.6. Asma çubuğu hidrolizatının kullanıldığı etanol fermantasyonu Sonuçları	58
Tablo 4.7. Lignoselülozik biyokütle kullanarak pentoz fermantasyonu üzerine yapılan araştırma çalışmalarının özeti	64

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren hazırlanma sürecinin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyerek her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA' ya, yüksek lisans eğitimim sırasında desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa OSKAY', Bu yola çıkmamda bana ön ayak olup benim yanımda olan bana güvenini hiç bir zaman eksik etmeyen bu hayattaki şansım başta sevgili annem şerife YAŞAR olmak üzere, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan sevgili babam Ahmet YAŞAR ve kardeşim Tuğba Nihan YAŞAR'a, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğsleyen bana destek olan çok değerli eşim Yusuf Serdar DOğAN'a yürekten teşekkür ederim.

Yasemin DOğAN

Manisa, 2018

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Mayaların Pentozca Zengin Asma Çubuğu Hidrolizatına Adaptasyonu ve Etanol Üretimi

Yasemin DOĞAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA

Dünya nüfusunun artması ve tüketim alışkanlıklarının değişmesi nedeniyle enerjiye olan talep gün geçtikçe artmaya devam etmektedir. Ancak mevcut kaynaklar oldukça sınırlıdır ve bu kaynakların giderek tükenmesi yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyacı arttırmaktadır. Ana bileşenleri karbohidrat bileşikleri olan bitkisel ve hayvansal tüm maddeler 'Biyokütle Enerji Kaynağı' olarak tanımlanmaktadır ve bu enerji, tarımsal - organik atıklardan, mikrobiyal yolla elde edilebilir/sürdürülebilir bir enerji türüdür.

Çalışmanın birinci bölümünde, 13 adet suş ile, etanol üretiminde adaptasyona seçilecek türün belirlenebilmesi için ön süreç amaçlı olarak tanımlı ortamda fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada aktivite açısından diğerlerine göre yüksek oldukları gözlenen beş suş ile, saf hidrolizat ortamında fermantasyon sürecine geçilerek, tanımlı ortam ile asma çubuğu bitkisi atıklarının seyreltik asit ile hidrolizi ile elde edilen hidrolizat ortamlarında mayaların üretim ve verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Hidrolizat ortamında üretim değeri açısından en yüksek olduğu belirlenen *P. kudriavzevii* ile ardışık fermantasyon denemeleri ile adaptasyon aşamasına geçilmiştir. Bütün fermeantasyon süreçleri boyunca hücre sayımı yapılarak büyüme izlenmiş şeker ve alkol ölçümleri yapılmıştır.

Tanımlı besiyeri ortamı ile saf hidrolizat ortamında *P. kudriavzevii* suşu ile yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen üretim değerleri karşılaştırıldığında; Etanol konsantrasyonunda (g/L) % 63'lük ve Etanol veriminde (g/g) 1,6 katlık bir artış elde edilmiştir.

Sonuç olarak, fermantasyon yoluyla biyoetanol üretimi için uygun tamamen organik atık temelli hidrolizat ortamının, adapte edilmiş mayalar ile sürdürülebilir/biyoekonomik bir yöntem olarak enerji eldesinde alternatif hammadde olarak kullanılabilirliği gösterilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: (Lignoselüloz, Hidrolizat, Hidroliz, Maya Fermantasyonu)

2018, 88 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Adaptation of Some Yeasts to Pentose Rich Vineplant Wood Rods Hydrolysate and Ethanol Production

Yasemin DOĞAN

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA

Due to the increasing World population and changing consuming habits, the need for energy is rising sharply. However, repository sources of energy are limited and the demand for the renewable sources are continually increasing. All the plant or animal based matters which contains carbohydrates as their main components are termed as Biomass Energy Source. And this energy, is a kind of sustainable energy that is obtained from the agricultural –organic wastes.

At the first part of this study according to their positiveness for pentose utilization, 13 strains were submitted to fermentation on defined media as pre process. At this stage, by the five strains that have higher than others in terms of activity, fermentation on hydrolysate medium that was prepared by the hydrolysis of the bunches with weak acid pretreatment were carried. Their productiveness and yields were compared on both fermentation conditions. The strain belong to *P. kudriavzevii* species was determined as superior than others. By using this strain, sequential fermentation studies for the adaptation were carried on hydrolysate medium. During the all fermentation processes, growth of the strains were monitored by counting the cells and measuring the reducing sugar and alcohol concentrations, daily. As the results of the fermentation by *P. kudriavzevii* on defined media and on hydrolysate media were compared; 63% increase in ethanol concentration (g/L) and 1.6 fold (g/g) increase in ethanol productiveness were obtained.

As conclusion, the hydrolysate medium which was prepared totally from organic based waste could be used for the production of energy as an alternative/sustainable by the adapted yeasts due to fermentation is shown.

Keywords : (Lignocellulose, Hydolysate, Hydrolysis, Yeast Fermentation)

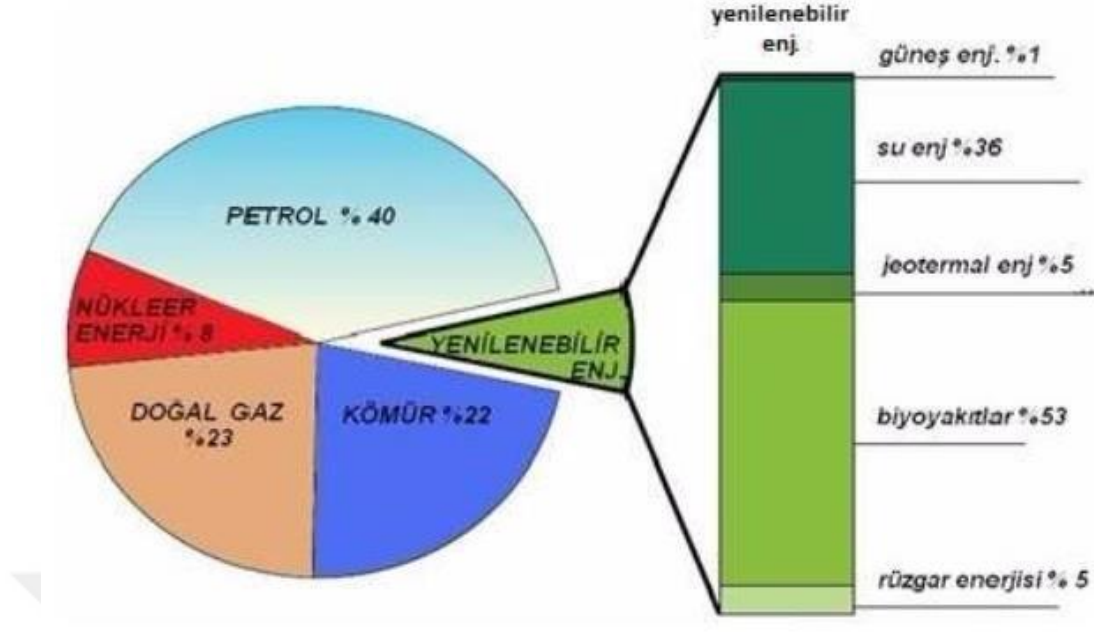
2018, 88 pages

1. GİRİŞ

Enerji tüketiminin yüksek boyutlara ulaştığı günümüzde genel olarak enerji, fosil yakıtlar olarak adlandırılan kaynaklardan sağlanmaktadır. Fosil yakıtların petrol fiyatlarındaki istikrarsızlığı gibi ekonomik götürülerinin yanı sıra sera gazlarının atmosferdeki miktarının önemli oranda artışı gibi ekosistemde de yarattığı büyük oranda zararlar vardır. Son zamanlarda artan bu sıkıntılardan dolayı, çevresel ve politik baskılar gibi birçok olumsuzluğa karşı alternatif olarak yenilenebilir, sürdürülebilir, etkili, düşük maliyetli ve güvenilir enerji kaynaklarına gereksinimi beraberinde getirmiştir [1].

Yenilenebilir hammadde kullanımının önemi birçok Avrupa ülkesinde ve diğer ülkelerde Ar-Ge programlarında vurgulanmaktadır. Çok çeşitli tarımsal maddelere ve değerlendirilemeyen birçok tarımsal ve endüstriyel atıklara sahip olan ülkemizde, bu maddelerin hammadde olarak kullanıldığı biyoteknolojik prosesler için çok geniş imkanlar ve potansiyel bulunmaktadır. Lignoselülozik materyaller yakın bir gelecekte enerji ve hammaddenin en önemli kaynaklarından biri olacağı öngörülmektedir [2].

Tahıl ürünleri bakımından oldukça zengin olan ülkemizde enerji tarımının yapılması ve biyoetanol üretilmesi petrole olan ihtiyacımızı büyük ölçüde azaltacaktır. Diğer yenilenebilir enerji kaynaklarının dünya genelinde kullanım oranı Şekil 1.1.'de gösterilmiştir [3]. Benzinden daha az enerji yoğunluğuna sahip olması, düşük yanma lüminasyonu, düşük buhar basıncı, su ile kolayca karışması ve oksijenlendirilmiş bir yakıt olması nedeni ile nitrojen oksit emisyonunu arttırması gibi bazı özellikler etanolün dezavantajları arasındadır [4].



Şekil 1.1. Enerji kaynaklarının dünya genelinde kullanım oranı [3].

Günümüzde etanol üretimiyle ilgili endüstriyel gelişmeler ile gelen çalışmalarda amaçlanan, mikroorganizmalar yardımıyla bitkisel biyokütleden biyoetanol elde etmeye yöneliktir. Dünyada ekonomisinin temelini oluşturan fosil yakıtlara karşı alternatif biyokütle tarımsal atıklardır. Yenilenebilir biyokütleden hemiselülozik etanol üretimi fosil yakıtlara göre daha avantajlı yönleri bulunmaktadır. Öte yandan bu biyokütle içerisinde bulunan lignoselülozik hammaddelerin bilinen yöntemlerle etanole dönüşümü gerçekleşmemektedir. Biyoetanolün lignoselülozik biyokütleden meydana gelmesi için birçok farklı dönüştürme teknolojisi vardır. Lignoselülozik materyaller bol ve ucuz olmaları nedeniyle biyoetanol üretimi için oldukça uygun ve tercih edilen hammaddelerdir. Lignoselülozik hammadde kaynaklarının içinde pentoz ve heksoz şekerlerden oluşan selüloz ve hemiselülozdan meydana gelen sert odun, yumuşak odun, ormancılık ve tarımsal artıklar ve evsel ve endüstriyel katı atıklar yer alabilir. Tarımsal atıklardaki lignoselülozik materyalden biyoetanol üretiminde pentozların biyokonversiyonu biyoekonomiye katkı sağlayabilecek ve aşılmayı bekleyen bekleyen bir konudur. Biyoetanolün fosil kaynaklara göre ekosisteme ve ekonomiye olumlu etkileri, lignoselülozik maddelerden biyoetanol üretilmesi için yenilenebilir kaynaklara yönelmiştir [1]

Tablo 1.1. Türkiye deki tarıma uygun fakat kullanılmayan arazilerde biyoetanol üretim potansiyeli [5].

Tahıl	Rekolte, Ton hektar	Biyoeanol Üretim Potansiyeli, Ton		Benzin İhtiyacını Karşılama Oranı, %	
		Hasadının %100 kullanılırsa	Hasadının %20 kullanılırsa	Hasadının %100 kullanılırsa	Hasadının %20 kullanılırsa
Arpa	2,204	1047	209	15	3
Mısır	6,838	4677	935	68	14
Patates	27,642	5777	1155	84	17
Şeker Pancarı	41,539	8682	1736	126	25
Buğday	21,282	13748	2750	200	40
Toplam		-	6786	494	99

Lignoselülozik bir madde olarak asma çubuğunun fermantasyonuyla biyoetanol eldesi oldukça ucuz bir kaynaktır. Bu çalışmada asma çubuğu hidrolizatının çeşitli gıda örneklerinden elde edilen mayalar ile etil alkol üretiminde kullanım olanakları amaçlanmıştır. Asma çubuğu hidrolizatının mayalar ile fermente edilebilirliğine farklı adaptasyon yöntemlerin etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoetanol Üretimde Kullanılan Biyokütle Temelli Hammaddeler

Fosil enerji kaynaklarının kısıtlı olduğu, bunun yanında bu kaynakların çevreye verdiği önemli oranda zarardan dolayı biyokütlenin kullanımı enerji sorununu çözmek için önem kazanmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kökenli doğal kaynaklardan elde edilen yenilenebilir enerji “biyokütle enerjisi”nin temel kaynakları karbonhidrat bileşikleridir ve bu kaynaklar oldukça çeşitlilik göstermektedir. Şekil 2.1.’de biyokütle kaynakları gösterilmiştir. Bunun yanında deniz veya karada var olan bitkisel veya hayvansal biyokütle enerji kaynakları aşağıda verilmiştir [6].

- Bitkisel atıklar
- Hayvansal atıklar
- Karbonhidrat bitkileri
- Yağlı tohum bitkileri
- Şehirsal ve endüstriyel atıklar çeşitli biyokütle kaynakları arasında gösterilebilir.



Şekil 2.1. Biyokütle kaynakları.

2.2. Alternatif ve Sürdürülebilir Enerji Kaynağı Olarak Biyokütle Enerjisi

Dünya üzerinde artmakta olan nüfus ve sanayileşme ile birlikte enerjiye ihtiyaç hızla arttığı görülmektedir. Enerji, üretimde zorunlu bir üretim faktörüdür ve gelişmekte olan ülkelerin ekonomik ve sosyal kalkınma potansiyelini göstermektedir. Enerji tüketimiyle sosyal kalkınma arasında yakından bir ilişki söz konusudur ve buda ekonomik gelişme ve refah seviyesinin artmasının enerji tüketiminin de arttığını göstermektedir [7]. Günlük yaşamda genelde; kimyasal, nükleer, mekanik (potansiyel ve kinetik), termal (ısı), jeotermal, hidrolik, güneş, rüzgar, elektrik enerjisi gibi enerji şekilleri kullanılmaktadır. Ekonomik anlamda değişik yöntemlerle enerji elde edilen kaynaklar, enerji kaynakları olarak isimlendirilmektedir ve bu kaynaklar farklı gruplara ayrılmaktadır. Enerji kaynakları kullanımına göre yenilenebilir ve yenilenemez enerji kaynakları olarak ikiye ayrılır (Tablo 2.1). Fosil enerji kaynakları, kısa bir gelecekte tükenebileceği düşünülen enerji kaynakları olup biyokütle kaynaklı yenilenebilir enerji kaynakları ise; kendisini yenileyebilen uzun vadede tükenmeden kalabilecek enerji kaynaklarıdır [8].

Tablo 2.1. Yenilenebilir ve yenilenemez enerji kaynakları [9].



Yenilenemez enerji kaynaklarından biri olan fosil yakıtları yakıt konusunda dışa bağımlılık, yüksek ithalat giderleri ve çevre sorunları gibi önemli olumsuzluklara sahiptir. Bugün dünyada fosil yakıt rezervlerinin hızla tükenmesi nedeniyle yenilenebilir enerji kaynaklarının önemini arttırmakta ve bununla ilgili çalışmalar

yapılmaktadır. Bununla birlikte sürdürülebilir enerji kaynakları, sürekliliği olması nedeni ile sürdürülebilir olmasının yanında dünyanın her ülkesinde bulunabilmesi nedeniyle oldukça önemlidir. Ayrıca ekosisteme verdikleri zarar yenilenemeyen enerji kaynaklarına göre çok daha azdır. Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımının, mevcut teknik ve ekonomik sorunların çözümlenmesi ile birlikte 21. yüzyılda önemini artıracığı öngörülmektedir [10].

Yenilenebilir enerji kaynakları içinde ciddi bir teknik potansiyele sahip olan biyokütle, biyoetanol üretimi için kullanılan önemli hammadde kaynağıdır [11]. Bitkisel ve hayvansal kökenli biyokütlenin temel bileşenleri karbonhidrat bileşikleridir [12].

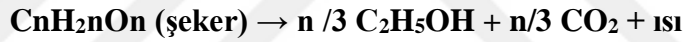
Odun ve yakacak olarak kullanılan bitki ve hayvan atıkları olarak tanımlanan klasik biyokütle enerjisi diğer enerji kaynaklarından yetersiz olduğu bölgelerde ilkelden gelişmişe kullanılabilinen doğrudan yakma teknikleriyle elde edilen bir enerjidir [13]. Bunun yanında ormancılığı ağaç ve endüstri atıkları hayvansal atıklar ve kentsel atıklardan meydana gelen ve pazar işlemleri ile karakterize edilmekte sanayi ulaştırmada ve ticaret sektöründe kullanılmakta olan modern biyokütle kaynaklarında vardır [14]. Dünyada biyoetanol üretiminin %95'inden fazlası bu tarımsal ürünlerin işlenmesi ile elde edilmektedir [15].

Dünyada ısınma yakıt üretme ve elektrik üretmek amacıyla kullanılabilmektedir. Biyokütle enerjisinin çevreye verebileceği zarar son derece az olmaktadır. Bunun nedeni biyokütle içinde fosil yakıtlarda bulunan kanserojen madde ve kükürt yer almamaktadır. Güneş var olduğu sürece bitki yetiştirilmesi devam edeceği için biyokütle tükenmez bir enerji kaynağı olarak kabul edilmektedir [16]. Her yerde yetiştirilebilmesi ve kırsal alanlar için sosyo-ekonomik gelişmelere yardımcı olması nedeniyle biyokütle uygun ve önemli bir enerji kaynağı olarak tercih edilmektedir [17]. Dünya üzerinde yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımına dair sayısal veriler Şekil 2.2.'de gösterilmiştir [18].



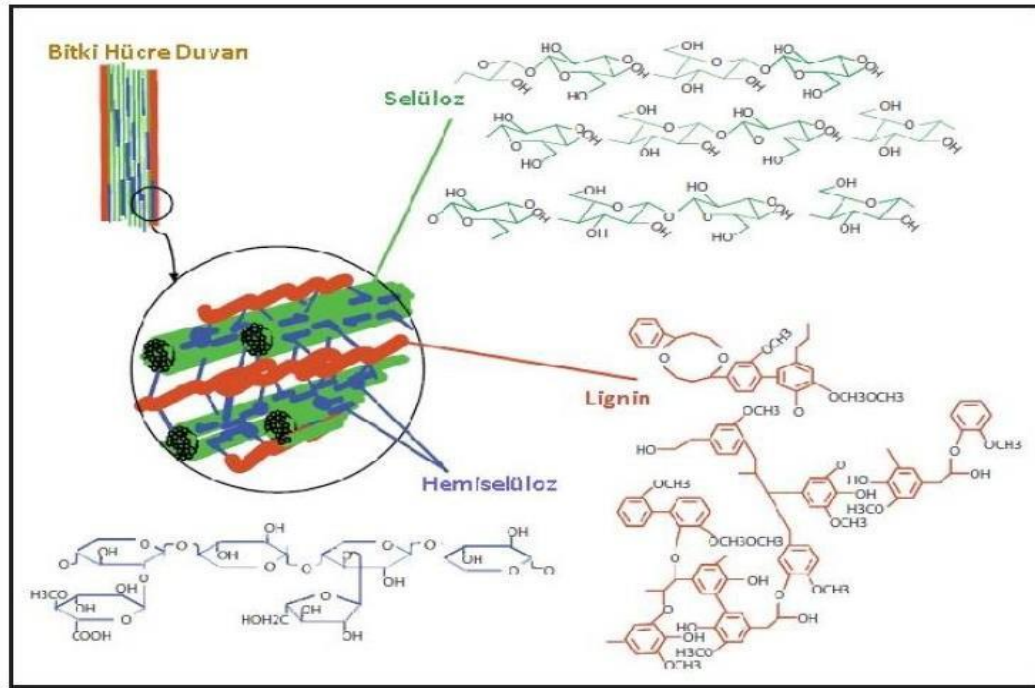
Şekil 2.2. Yenilenebilir enerji kaynaklarının dünya genelinde kullanım oranları.

Güneşten aldığı enerjiyi yapraklarında ve köklerinde depolayan biyokütle daha sonra bu enerjiyi değişik işlemlerle dönüşüme uğratılabilir [19]. Bitkiler fotosentez yoluyla güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürürler. Bunun sonucunda meydana gelen enerji biyokütle enerjisi olarak tanımlanır [20]. Biyokütle içinde yer alan basit şekerlerin biyoetanol ve karbondioksit'e dönüştürülmesi aşağıdaki tepkime yolunda gösterilmiştir [21].



Biyoetanol üretiminde karbonhidrat kaynakları kullanılabilir. Biyoetanol üretimi için primer kaynaklar olan şeker, nişasta, selüloz ve hemiselülozun kullanımı bugün daha çok tercih edilmektedir [22].

Biyoetanol olarak değerlendirilen biyokütlenin elde edildiği odunsu dokulardaki tüm bitki hücre duvarlarında bulunan kompleks olarak adlandırılan lignoselülozik materyal bitkiye sertlik kazandıran, bozunmaya dirençli kimyasal olarak 3 temel parçadan meydana gelir: selüloz (%30-50), hemiselüloz (15-35) ve lignin (%10-20) Şekil 2.3.'de de gösterilen selüloz ve hemiselüloz tüm biyokütlenin %70'ini meydana getirirken, lignin kovalent ve hidrojenik bağlarla selüloz ve hemiselüloza bağlanarak yapıya sertlik ve direnç katar. Yumuşak odunlardaki lignin oranı diğer lignoselülozik kaynaklara göre oldukça fazladır [23].



Şekil 2.3. Lignoselülozik biyokütle bileşenleri [24].

Biyoetanol üretimi için kullanılan hammaddeler genel olarak üç grupta incelenir; [25].

- Sukroz içeren hammaddeler (şeker pancarı, şeker kamışı, meyveler vs.),
- Nişasta içeren hammaddeler (mısır, arpa, buğday, patates vs.),
- Lignoselülozik hammaddeler (odun, saman, çimen).

Tablo 2.2. Farklı kaynaklar kullanılarak üretilen biyoetanolün üretim potansiyellerinin karşılaştırılması [26].

Kaynak	Biyoetanol Üretim Potansiyeli (L/ton)
Şeker Kamışı	70
Şeker Pancarı	110
Taze Patates	125
Patates	110
Manyok	180
Mısır	360

Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340
Tatlı Sorgum	60
Selülozik Biyokütle	280

Tablo 2.2.'de gösterildiği gibi bütün karbonhidrat molekülleri biyoetanol üretimi için kullanılabilir. Bugün lignoselülozik hammaddelerden biyoetanol üretim süreci tam olarak yerine oturmamıştır [3]. Lignoselülozik atıklar yüksek karbohidrat içeriğiyle etanol üretiminde önemli bir hammaddedir. Biyokütle atıklarının etanol fermantasyonunda hammadde olarak kullanımı üretim maliyetini de önemli ölçüde düşürmektedir. Biyoetanol üretimindeki başlıca problem üretim için hammaddenin varlığıdır [27].

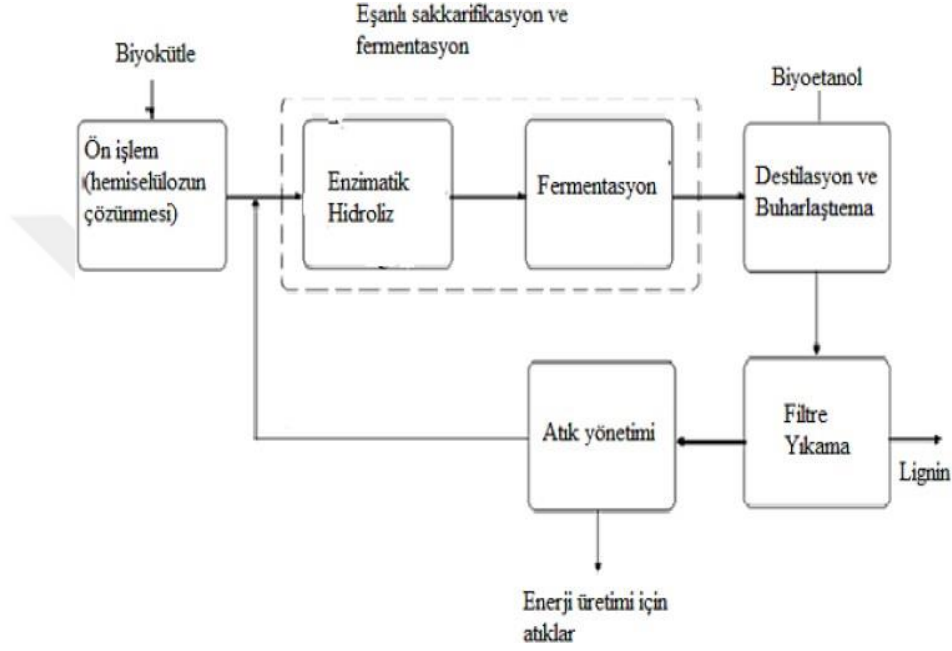
Lignoselülozik biyokütleden etanol eldesi yenilenebilir enerjinin üretimi için önemli bir teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır. Bu biyokütlenin bolluğu onu ilgi çekici bir kaynak kılmaktadır. Odun ve saman gibi ürünlerden ya da mısır sapı ve buğday çöpü gibi tarımsal atıklar lignoselülozik materyal olarak adlandırılabilir. Hammaddenin maliyeti biyokütleden etanol üretim sürecini etkileyen önemli bir etmendir ve ucuz, dayanıklı biyokütle kaynaklarının bulunabilirliği evrensel bir sorundur. Lignoselülozik materyaller yenilenebilir, geniş bir kullanım alanına sahiptir ve bol miktarda elde edilebilirler. Lignoselülozik materyal orman atıkları, kentsel katı atıklar, atık kâğıt ve bitkisel atıklardan ucuz şekilde elde edilebilirler [28].

Lignoselülozik biyokütle sağlam yapıya sahiptir. Bu nedenle biyoetanol üretiminde kullanılabilmesi için yapının parçalanması gerekir. Bu yapının parçalanmasında seçilen kaynağa göre en uygun yöntem olarak fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik yöntemler belirlenip kullanılabilir. Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretilmesi için çeşitli dönüştürme teknolojisi mevcuttur. Biyokütle türüne göre biyoetanol üretim aşamaları Tablo 2.3.'de gösterilmiştir. Lignoselülozik temelli biyokütle hammaddelerin etanole dönüştürülmesi için gerekli biyokimyasal yol 5 basamak ile özetlenebilir:

- Hammadde yetiştirme

- Hücre duvarının degradasyonu ve ligninin ayrıştırılması için ön-işlem
- Hemiselülozun pentoz şekerlerine hidrolizi
- Şekerlerin etanole fermantasyonu
- Etanolün ayrıştırılmasıdır [25].

Tablo 2.3. Biyokütlenin biyoetanole dönüşümünde örnek bir akış şeması [26].



Ön işlemin amacı karbonhidratların fermente edilebilir hidrolizinin daha hızlı ve daha fazla yapılması için biyokütlenin kimyasal içeriği ve yapısının değiştirilmesiyle birlikte, makroskopik ve mikroskopik boyutu ve yapısı da değiştirilir. Hidroliz işleminde karbonhidrat polimerleri monomerik şekerlere dönüştürülür [29]. Başarılı bir ön işlem için şeker oluşumunun geliştirilmesi veya hidrolizle şeker oluşturma yeteneği degradasyondan kaçınma veya karbohidrat kaybı hidroliz ve fermantasyon prosesi için inhibitör olabilecek yan ürünlerin oluşumundan kaçınma, ucuz olması önemlidir [30].

2.3. Biyoetanol

Biyoetanol hammadde olarak şeker pancarı, mısır, buğday, yumuşak odun sert odunsular gibi karbonhidrat içeren hammaddelerden elde edilen alternatif ve sürdürülebilir bir maddedir. Ulaştırma sektörünün yanı sıra, küçük ev aletlerinin kullanımında, birtakım kimyasal ürünlerin üretiminde de biyoetanol kullanılmaktadır. Biyoetanolün sahip olduğu bazı özellikler aşağıdaki gibi sıralanır [31]:

- Berrak renksiz ve karakteristik bir yapıya sahip olan biyoetanol yüksek oktanlı bir yakıttır.
- Biyolojik olarak bozunur ve çevre için olumsuzluk teşkil etmezler,
- Biyoetanol 20 °C de 0,789 gr/ml yoğunluğa sahiptir,
- Biyoetanolün kaynama noktası 78,5°C, donma noktası -114,1°C dir,
- Fosil yakıtlardan %80 oranında daha düşük miktarda sera gazı oluştururlar,
- Biyoetanol, sülfür dioksit ve partikül emisyonlarında belirgin düşüş sağlar,
- Biyoetanol karsenogen etkisi bulunan benzen ve butadin emisyonlarını 50% oranında azaltır,
- Biyoetanolün en yaygın iki kullanım şekli E-10 (% 10 Biyoetanol+%90 Benzin) ve E-85 (% 85 Biyoetanol+%15 Benzin) 'dir.

Biyolojik kaynaklardan mayalanma yolu ile üretilen biyoetanol geleneksel yöntemde geçerli hammaddenin maya ile fermantasyonuyla yapılmakla birlikte son yıllarda genetik olarak tasarlanmış bakterilerle de fermantasyonu gerçekleştirilmektedir [32]. Tablo 2.4. ve Tablo 2.5.'de biyoetanolün fiziksel, kimyasal özellikleri belirtilmiştir [9].

Tablo 2.4. Biyoetanolün kimyasal özellikleri

Biyoetanolün Kimyasal Özellikleri	
Formül	C ₂ H ₅ OH
Moleküler Ağırlık	46,1
Karbon	%52,1
Hidrojen	%13,1
Oksijen	%34,7
C/H Oranı	4
Steimerik (hava/ETOH)	9

Tablo 2.5. Biyoetanolün fiziksel özellikleri

Biyoetanolün Fiziksel Özellikleri

Özgül Ağırlık	0.79 kg/dm ³
Buhar Basıncı (38°C)	50 mmHg
Kaynama Sıcaklığı	78.5 oC
Dielektrik Katsayısı	24.3
Suda Çözünme	∞

2.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyoetanol üretimi için kullanılan bakteri, maya ve mantar gibi pek çok çeşitli mikroorganizma vardır. Geçmişten bugüne, alkolik fermantasyonda en büyük rolü ve bu alanda en çok kullanılan mikroorganizmalar ise mayalar olmuştur. Mayalar doğada çok yaygındır. Özellikle şeker ve karbonhidrat bakımından zengin olan besin maddelerinde bulunurlar. Bunlar arasında önemli bir yere sahip olan başlıca tür *Saccharomyces cerevisiae* türüdür. *S. cerevisiae*, fermantasyon besiyerini kullanarak yüksek konsantrasyonda etanol üretebildiği ve hem basit şekerlerin bulunduğu besiyerinde hem de sakkaroz disakaritinin bulunduğu besiyerinde gelişebildiği için diğer mayalara göre daha çok tercih edilmektedir. Bununla birlikte uzun yıllardır üzerinde çalışılan ve etanol üretiminde *S. cerevisiae* ile yer değiştirmesi için bazı araştırmacılar tarafından defalarca öne atılan bir diğer tür ise *Zymomonas mobilis* dir. *Zymomonas mobilis* araştırmacılar tarafından öne sürülmesinin nedeni *S. cerevisiae* türüne göre daha iyi özellik ve avantajlar göstermektedir [33].

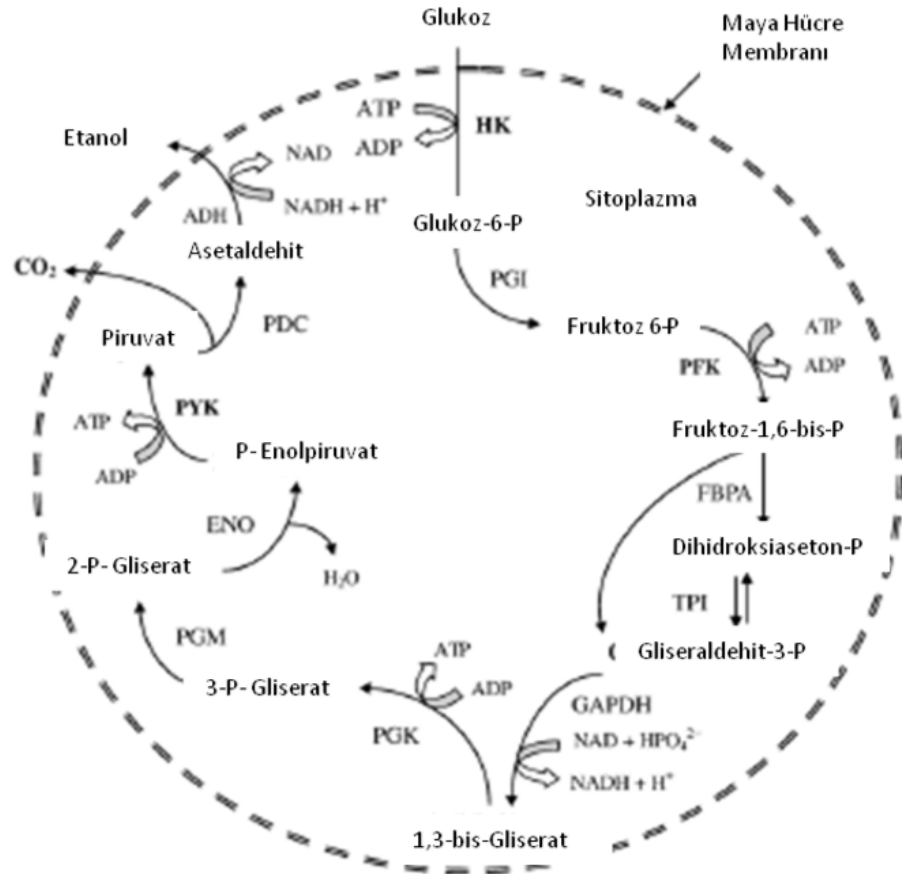
2.4.1. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae insanlar için güvenli bir mikroorganizmadır. Ayrıca *S. cerevisiae* nin ökaryotik ve kararlı bir yapıya sahip olması aerobik koşullarda yüksek çoğalma hızı yüksek etanol fermantasyon hızı güçlü invertaz üretimi, geniş inhibitör toleranslıkları, onları etanol üretimi için ilgi çekici kılmaktadır.

Etanol fermantasyonunda yer alan temel metabolik yolak, bir glikoz molekülünün metabolize edildiği ve iki molekül piruvatın üretildiği glikolizdir (Embden-Meyerhof-Parnas veya EMP yolağı) ve Şekil 2.4.'de şematize edilmektedir [34].

Anaerobik koşullar altında, piruvat CO₂'nin salınmasıyla etanole indirgenir. Teorik olarak, metabolize edilen glikoz kütlesi başına verim etanol için 0.511, CO₂ için

0.489'dur. Glikolizde üretilen iki ATP çeşitli enerji-gerektiren biyoreaksiyonların gerektirdiği maya hücrelerinin biyosentezini sürdürmek için kullanılmaktadır. Bu nedenle, etanol üretimi maya hücre büyümesi ile sıkı bir şekilde birbirine bağlıdır ki mayanın bir yan ürün olarak üretilmesi anlamına gelmektedir. Maya hücrelerinin büyümesi ile ATP'lerin sürekli tüketimi olmaksızın, glikozun glikolitik metabolizması, glikolizde en önemli regülasyon enzimlerinden biri olan fosfofruktokinazı (PFK) inhibe eden intraselüler ATP birikimi nedeniyle çok hızlı bir şekilde durdurulmaktadır. Bu çok temel ilke, özellikle jelde tutuklama gibi destekleyici materyal ile immobilize edilen maya hücreleri tarafından gerçekleştirilen etanol fermantasyonuyla çelişmektedir [26].

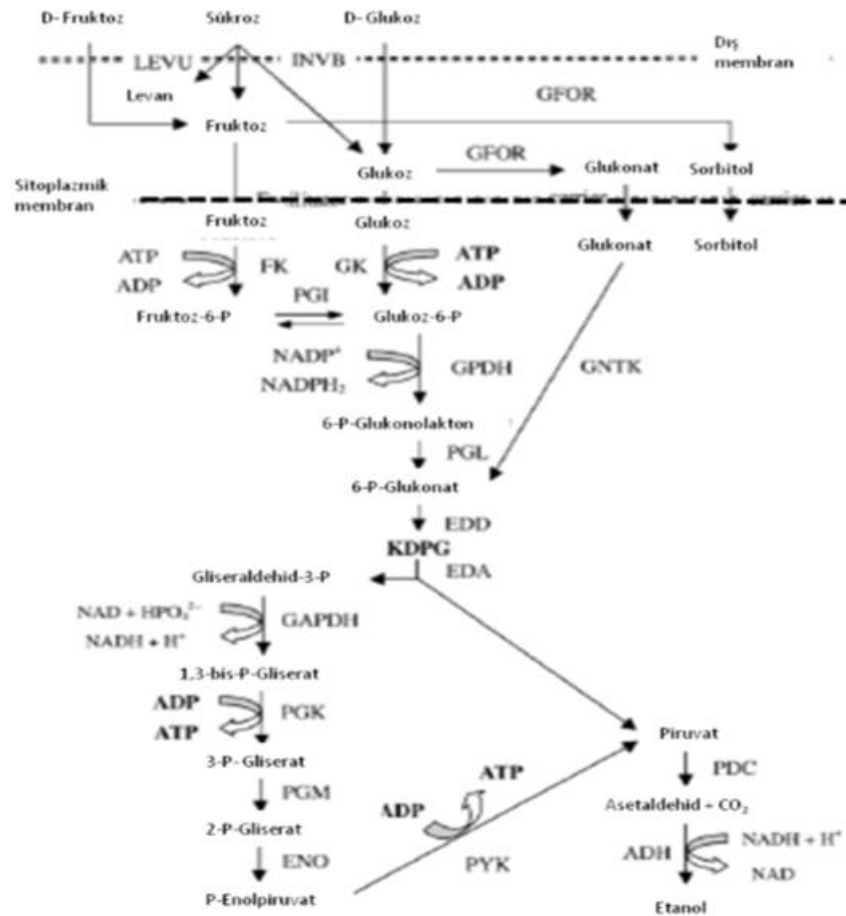


Şekil 2.4 *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonu'nun metabolik yolağı. HK: heksokinaz, PGI: fosfoglukoizomeraz, PFK: fosfofruktokinaz, FBPA: fruktoz

bisfosfat aldolaz, TPI: triyoz fosfat izomeraz, GAPDH: gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz, PGK: fosfogliserat kinaz, PGM: fosfogliseromutaz, ENO: enolaz, PYK: piruvat kinaz, PDC: piruvat dekarboksilaz, ADH: alkol dehidrogenaz.

2.4.2. *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis in fermantasyon koşullarındaki pH değeri 5,0 iken sıcaklığı 30-40°C arasında değişmektedir. *Z. mobilis*, glikozun yıkımı için piruvat dekarboksilaz (PDC) ve alkol dehidrogenaz (ADH) enzimleri ile Entner-Doudoroff (ED) yolu üzerinden glikozdan etanol üretir [64]. Bu bakterinin dezavantajlarından bir tanesi yalnızca glikoz, fruktoz ve sukrozu fermente edebilmesidir. Sükrozdaki gelişimi, fruktoz oligomerlerinin ve sorbitolün ekstraselüler oluşumu ile birlikte olmaktadır. Bu durum etanol veriminde önemli bir düşüşe neden olmaktadır. Bu bakterilerin diğer dezavantajı ise saf glikozu kullanamamalarıdır. Diğer önemli bir dezavantaj ise *Z. mobilis* türünün sürekli etanol üretimi dalgalanma eğilimi göstermektedir [35]. Şekil 2.5.'de *Z. mobilis* teki karbohidrat metabolik yolu gösterilmektedir.



Şekil 2.5. *Z. mobilis* teki karbohidrat metabolik yolu. LEVU: levansukraz, INVB:

invertaz, GFOR: glukoz-fruktoz oksidoredüktaz, FK: fruktokinaz, GK: glukokinaz, GPDH: glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, PGL: fosfoglukonalaktonaz, EDD: 6-fosfoglukonat dehidrataz, KDPG: 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat, EDA: 2-keto-3-deoksiglukonat alkolaz, GNTK: glukonat kinaz.

2.4.3. Pentoz Fermente Edici Diğer Mayalar

Geçmişten bugüne, alkolik fermantasyonda en büyük role sahip ve bu alanda en çok kullanılan mikroorganizmalar ise mayalar olmuştur. Mayalar doğada çok yaygındır. Özellikle şeker ve karbonhidrat bakımından zengin olan besin maddelerinde bulunurlar. Ancak birkaç tür/strain pentozları kullanabilme yeteneğine sahiptir. Ksiloz fermentasyonu için geniş çapta çalışılmış olan türler *P. tannophilus*, *C. shehatae*, *P. stipitis* ve *Kluyveromyces marxianus*'tur. Ksiloz fermente edebilme kapasitesine sahip olduğu bildirilen birçok tür de *Brettanomyces*, *Clavispora*, *Schizosachharomyces*, *Candida* genuslarındandır.

2.4.4. Etanol Üretebilen Bakteriler

Mayalar dışındaki etanol üreten bakteriler, substratları ve etanol verimleri Tablo 2.6.'da , ksilozu doğal olarak fermente edebilen ve üzerinde çalışılan bakteri türleri Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Tablo 2.6. Etanol üreten bakteriler, substratları ve verimleri [37].

Organizma	°C	Etanol Toleransı	Heksozlar	Disakkaritler	Selüloz	Nişasta	Hemiselulozlar (polimer pentozlar)	Y ETOH	Özel Substratlar
Mezofilik (20-40°C)									
<i>Erwinia amylovorans</i>	27-30	?	*	*	-	*	*	60	-
<i>Sarcina ventricul</i>	30-37	?	*	*	-	*	*	50	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20-30	?	*	*	-	*	*	55	Laktöz
<i>Zymomonas mobilis</i>	30	?	*	*	-	*	*	97	-
Termofilik (40-65°C)									
<i>Clostridium thermo-saccharolyticum</i>	60	?	*	*	-	*	*	50	Ksilan
<i>Clostridium Thermocellum</i>	65	?	*	*	*	-	-	50	-
Aşırı termofilik (65°C)									
<i>Thermoaerobacter ethanolicus</i>	60	?	*	*	-	*	*	90	Ksiloz
<i>Clostridium thermos-hydrosulfuricu</i>	60	?	*	*	-	*	*	80	Sellobiyoz Ksiloz Pektin
<i>Thermoanaerobium brockli</i>	65-70	?	*	*	-	*	*	48	Sellobiyoz Laktöz Sellobiyoz

Tablo 2.7. Ksilozu fermente etme kapasitesine doğal olarak sahip olan ve üzerinde çalışılan bakteri türleri [76].

TÜRLER	ÖZELLİKLERİ
<i>Clostridium acetobutilicum</i>	Ksilozun aseton ve bütanole fermantasyonunda başarılıdır, biyoetanol verimi düşüktür.
<i>Clostridium thermocellum</i>	Selülozu direkt olarak etanole ve asetik asite dönüştürme kapasitesine sahip, biyoetanol konsantrasyonları genellikle 5 g/l'den daha azdır.
<i>Escherichia coli</i>	Ksilozu doğal olarak biyoetanol, sukkinik ve asetik asite fermente etme kapasitesine sahip ancak etanol toleransı düşüktür, genetik olarak çalışılmış türleri genel olarak biyoetanol üretmektedir.
<i>Klebsiella</i>	Ksiloz ve sellobiozu doğal olarak hızlı bir şekilde fermente

<i>oxytoca</i>	edebilirler, selülozun fermantasyonu ve biyoetanol üretimi geniş bir şekilde çalışılmaktadır.
<i>Lactobacillus pentoaceticus</i>	Ksiloz ve arabinozu tüketir, glikoz ve sellobiozu yavaş yavaş kullanır, asetik asit ve laktik asit 1/1 oranında üretilir.
<i>Lactobacillus casei</i>	Laktozu çok iyi bir şekilde fermente edebilir.
<i>Lactobacillus xylosus</i>	Besin kaynağı gerekli olduğu durumda sellobiozu kullanır: n-glikoz, D-ksiloz ve L-arabinozu kullanmaktadır.
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Homokatalitik fermantasyon sağlar, bazı alt türleri sülfid atık çözeltilisinden laktik asit üretebilir.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sellobiozu glikoz, ksiloz ve arabinozdan daha hızlı bir şekilde tüketir, pektinleri depolimerize etmiş gibi görünür, tarımsal atıklardan laktik asit üretir.
<i>Zymomonas mobilis</i>	Normal olarak glikoz ve fruktozu fermente eder, ksiloz fermantasyonu üzerine araştırmalar devam etmektedir.

2.5. Lignoselülozik Hammaddeler

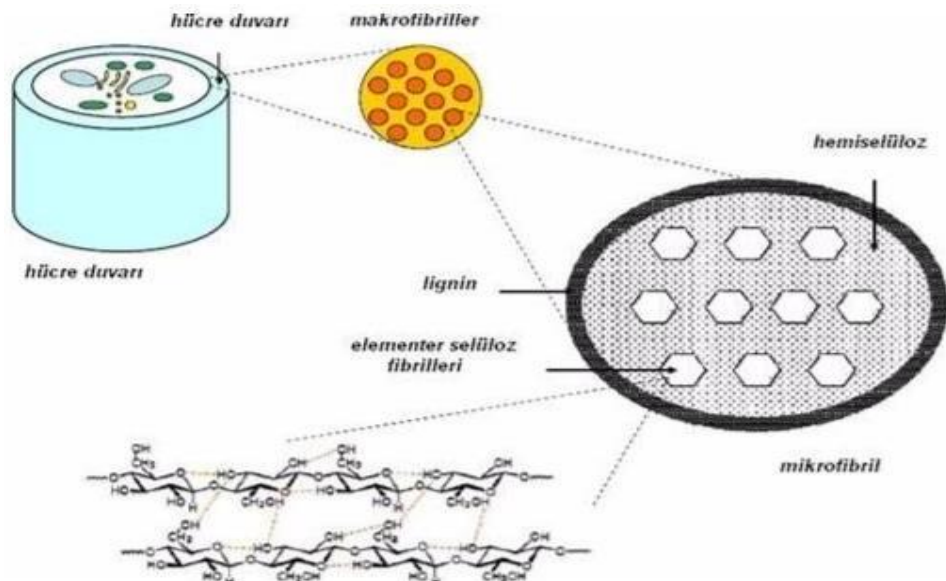
Tarımsal işlemler sırasında elde edilen ürünlerin direk kullanımından önce uygulanan hasat, kurutma, öğütme, gibi işlemler sırasında geride kalan sap, saman, çekirdek, kabuk gibi kısımlar tarımsal atık olarak adlandırılmaktadır. Pentoz karbon kaynakları için önemli doğal bir kaynak olan lignoselülozik materyaller bu tarımsal atıklardan ucuz bir şekilde elde edilmektedir. Lignoselülozik materyal altı-karbonlu bir şeker olan glikozun bir polimeri olan selülozdan, ksiloz ve diğer beş-karbonlu şekerlerden oluşan dallanmış bir polimer olan hemiselülozdan ve fenil propan birimlerinden oluşan ligninden meydana gelmektedir [38]. Bu bileşenler yapının % 90'ını oluştururken geri kalan kısım çözünenler ve külden meydana gelir [39]. Çeşitli lignoselülozik biyokütle materyalleri'nin içerikleri Tablo 2.8.'de verilmiştir.

Tablo 2.8. Çeşitli lignoselülozik biyokütle materyalleri'nin içerikleri (% kuru ağırlık) [40].

Ham Materyal	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin
<u>Sert Odunlar</u>			
Huş Ağacı	41	36,2	18,9
Ak Kavak	50,8-53,3	26,2- 28,7	15,5-16,3
Kızıl Acağaç	44,1	29,2	24
Melez Kavak	41,7	20,2	29,3
<i>Eucalyptus viminalis</i>	41,7	14,1	31
<u>Yumuşak Odunlar</u>			
<i>Pinus banksiana</i>	41,6	25,6	28,6
<i>Pinus pinaster</i>	42,9	17,6	30,2
Köknar	43,9	26,5	28,4
<u>Tarımsal Atıklar</u>			
Mısır Koçanı	33,7-41,2	31,9-36	6,1-15,9
Şeker Kamışı	40-41,3	27-37,5	10-20
Buğday Samanı	32,9-50	24-35,5	8,9-17,3
Pirinç Samanı	36,2-47	19-24,5	9,9-24
Mısır Sapı	35-39,6	16,8-35	7-18,4
Arpa Samanı	33,8-37,5	21,9-24,7	13,8-15,5

Soya Sapı	34,5	24,8	19,8
Pamuk Sapı	38,4-42,6	20,9-34,4	21,45
Muz Atığı	13	15	14
Kahve Hamuru	33,7-36,9	44,2-47,5	15,6-19,1
Fındık Kabuğu	25-30	22-28	30-40
Sorgum Samanı	32-35	24-27	15-21
Yulaf Samanı	31-35	20-26	10-15
<u>Diğer</u>			
Bambu	40-50	18-20	23
Okaliptus	45-51	11-18	29
Çim	25-40	25-50	10-30

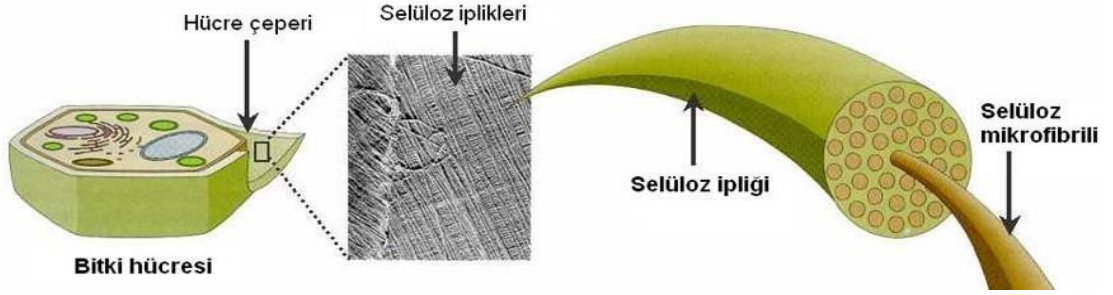
Selülozun, hemiselülozun ve lignin özelliğine göre lignoselülozik maddeler farklılık gösterirler [27]. Lignoselülozda %40-60 selüloz, %20-40 hemiselüloz ve %10-25 lignin, %10 ekstrap ve mineraller oluşturmaktadır. Akçağaç, kavak, okaliptus, meşe ağacı, kara kavak gibi sert odunlu materyallerde selüloz %39-54, hemiselüloz %14-37 ve lignin %17-30 oranında bulunmaktadır. Köknar, çam gibi yumuşak odunlu materyallerde ise selüloz %41-50, hemiselüloz %11-27, lignin %20-30 oranında bulunmaktadır. Genel olarak biyokütle kaynaklarında selüloz %32-47, hemiselüloz %19-27, lignin ise %5-24 oranında bulunmaktadır [41]. Bitki hücre duvarı bileşenleri Şekil 2.6.'da verilmiştir.



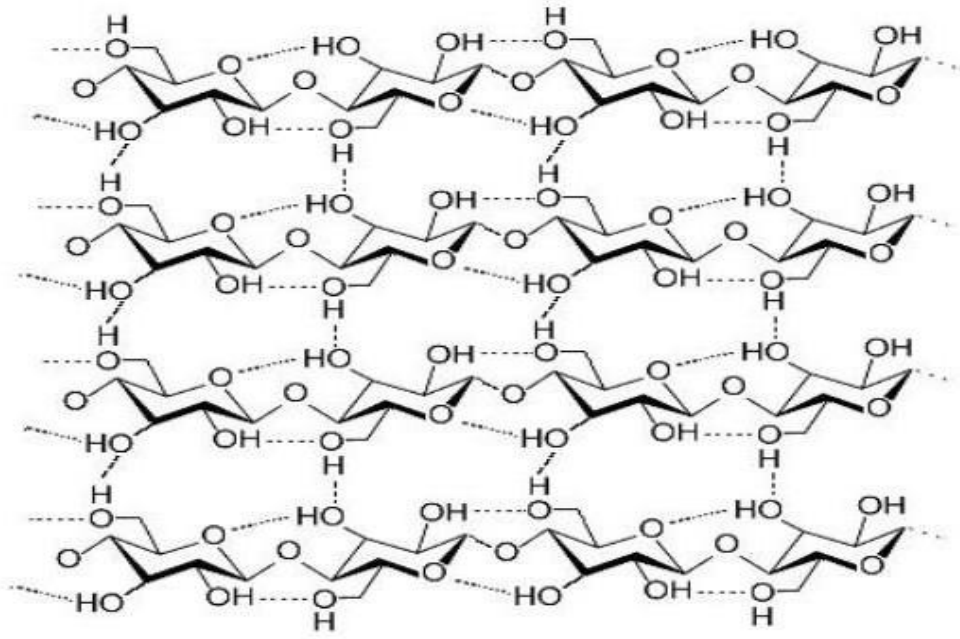
Şekil 2.6. Bitki hücre duvarı bileşenleri [9].

2.5.1. Selüloz

Bitki hücre duvarında yer alan yapısal polisakkaritlerden birisi de selülozdur [42]. Glikoz birimlerinin β -1-4 bağlarıyla birbirine bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir. Selüloz molekülünün büyüklüğü bitki hücresinin duvarında bulunan ikincil duvarda her molekülde 500'den daha az glikoz biriminin bulunmasına bağlı olarak değişir [43]. Odunun ağırlıkça %40'ını, ketenin %60-85'ini pamuk liflerinin %85-90'ını selüloz oluşturur [44]. Genellikle selülozun bitki hücre duvarındaki oranı hücre tipine ve evresine göre değişmektedir. Örneğin; birincil duvarın kuru ağırlığının %20-40'ı selülozdan oluşurken ikincil duvarın %40-60'ı selülozdan meydana gelmektedir [34]. Şekil 2.7.'de bitki hücresinde selülozun yeri ve Şekil 2.8.'de selülozun genel yapısı gösterilmiştir [25].



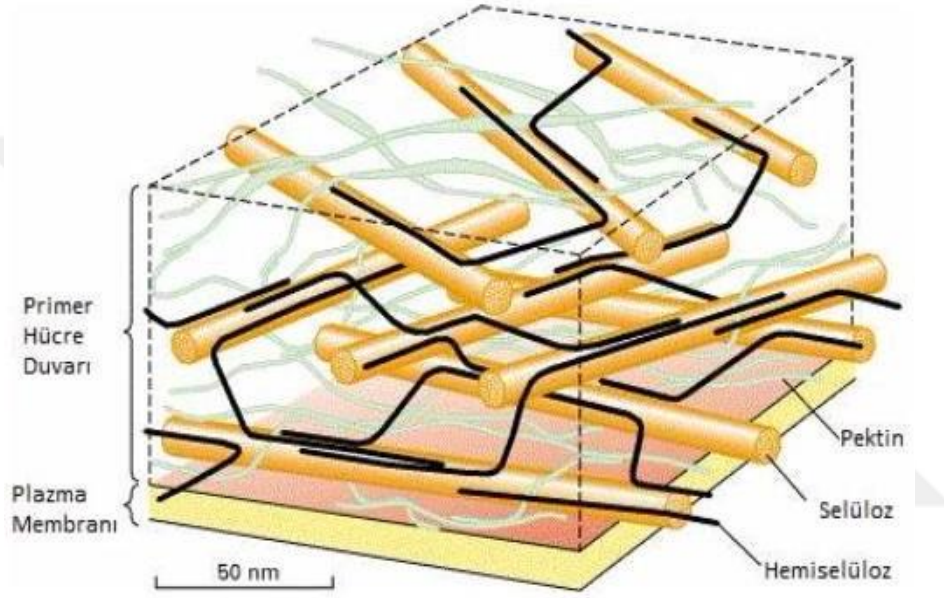
Şekil 2.7. Bitki hücresinde selülozun yeri



Şekil 2.8. Selülozun genel yapısı

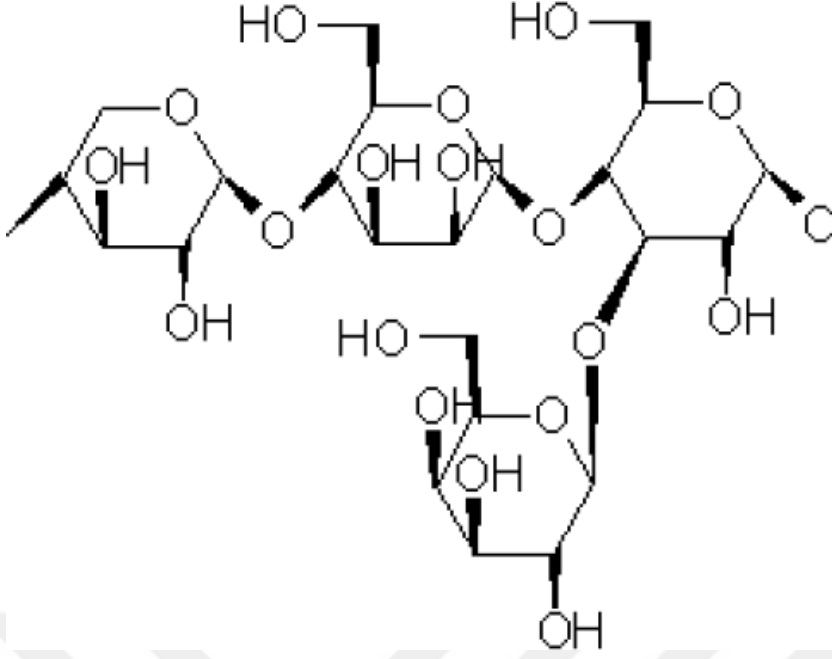
2.5.2. Hemiselüloz

Hücre çeperindeki polisakkaritlerin %20-35 'ini oluşturan hemiselülozlar odunun üç ana bileşeni arasında ısıya en duyarlı olan ve ancak 200-260°C gibi yüksek sıcaklık aralıklarında bozunabilen bileşiklerdir. Hemiselülozlar, selülozdan bazı özellikleri ile ayrılmaktadır [46]. Odunun diğer elemanlarından ayrıldıktan sonra seyreltik alkali çözeltisinde ve kaynayan suda çözünebilirler. Hemiselülozların kimyasal yapısı hakkında bugün çok az şey bilinmektedir.



Şekil 2.9. Lignoselülozik materyalde hemiselülozun konumu [9].

Hemiselülozlar selülozdan daha heterojendir [47]. Hemiselülozlar ksilanlar, mannanlar, arabinoksanlar, glikomannanlar ve glikoksilanlar şeklinde isimlendirilirler [49]. Olgunlaşmış odunların % 20-25'i, otların % 15-20'si ve yumuşak odunların büyük bir kısmı ksilanlar ve glikomannanlardan oluşur. Tahıl sapları ile tohum kabuklarında ise ksilan % 20-30 oranındadır [39]. Hemiselülozun genel yapısı Şekil 2.10.'da verilmiştir [26]. Lignoselülozik materyalde hemiselülozun konumu Şekil 2.9.'da verilmiştir.



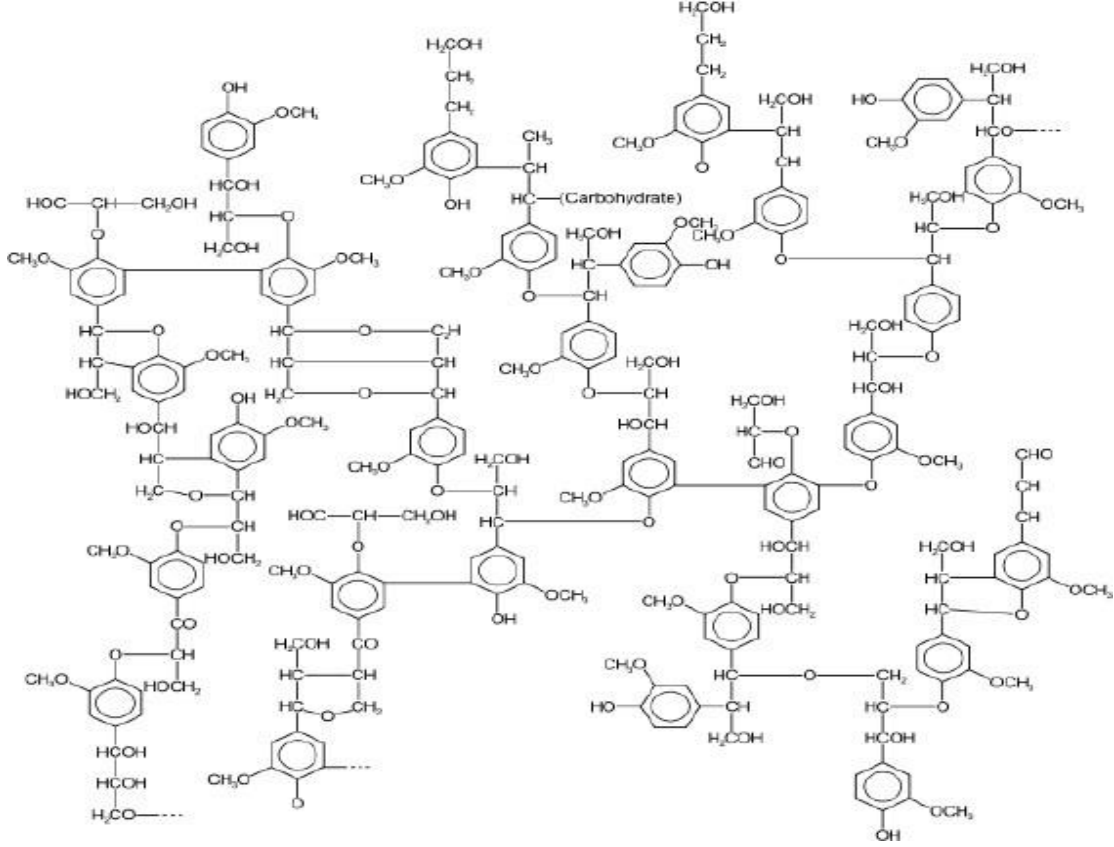
Şekil 2.10. Hemiselülozün genel yapısı

2.5.3. Lignin

Damarlı bitkilerde hücre duvarlarına dayanıklılık sağlayan suda çözünmeyen kompleks bir bileşik olan lignin bitkide kök ve gövdenin odunsu yapısını oluşturan maddedir [51]. Lignin aynı zamanda yaşlanmış ölü hücrelerin selüloz çeperleri üzerinde birikir ve bitkiyi uygun olmayan çevre şartlarına karşı korur [52]. Lignin biyokütle'nin % 15-20'sini oluşturan fenilpropanoid birimlerinden oluşturmaktadır. Bir glikozit olan lignin kolayca glikoz ve aromatik bir alkole ayrıştırılabilmektedir. Bu bileşikten türeyen alkole de buna uygun olarak koniferil alkol denilmektedir [53].

Lignin hücre çeperini oluşturan selüloz misellerin arasını amorf lignin doldurur ve böylece dokuda odunlaşma meydana gelerek bitkiye dayanıklılık sağlar [54]. biyoetanol üretiminde lignoselülozik biyokütlenin kullanılmasındaki zararlardan biri ligninin lignoselülozik materyalin yapısını kimyasal ve biyolojik parçalamaya dirençli hale getirmesidir [55]. Yumuşak odunlar genellikle sert odunlardan daha fazla lignin içermektedirler. Her iki türde de lignin içeriği genellikle % 20-40 aralığında değişmektedir. Mısır koçanı, fıstık kabuğu gibi otsu türlerde bu oran % 10-40 arasında değişkenlik göstermektedir [56]. Lignin çam ağaçlarının iğnelerinde yoğun olarak birikmiştir.

Bu yapraklar ligninin kompleksli içeriğinden dolayı çürüyüp toprağa karışması uzun bir zaman aldığından dolayı çam ağaçlarının altında birikmektedir. Bu biriken maddeler zamanla çözünür ve toprakta asit birikmesine neden olmaktadır. [57].



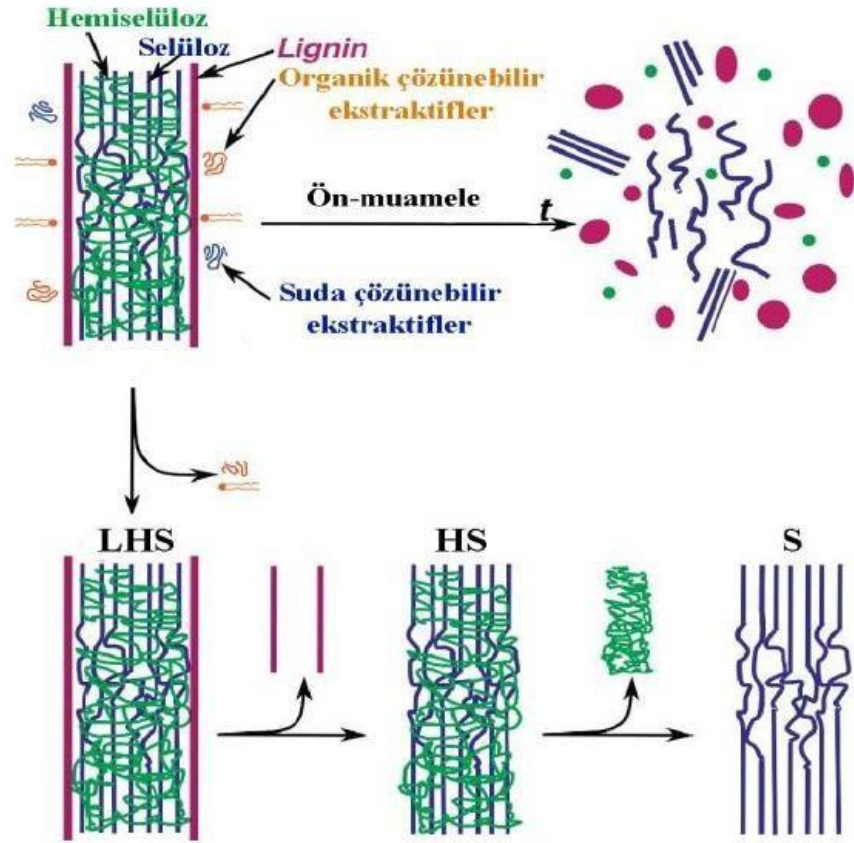
Şekil 2.11. Ligninin genel yapısı [29].

Lignin lignoselülozik yapıyı kimyasal ve biyolojik parçalamaya dirençli kıldığı için etanol üretiminde lignoselülozik biyokütlenin kullanılmasındaki sakıncalardan biridir [56]. Ligninin genel yapısı Şekil 2.11 de verilmiştir.

2.6. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ön İşlemler

2.6.1. Ön-işlem

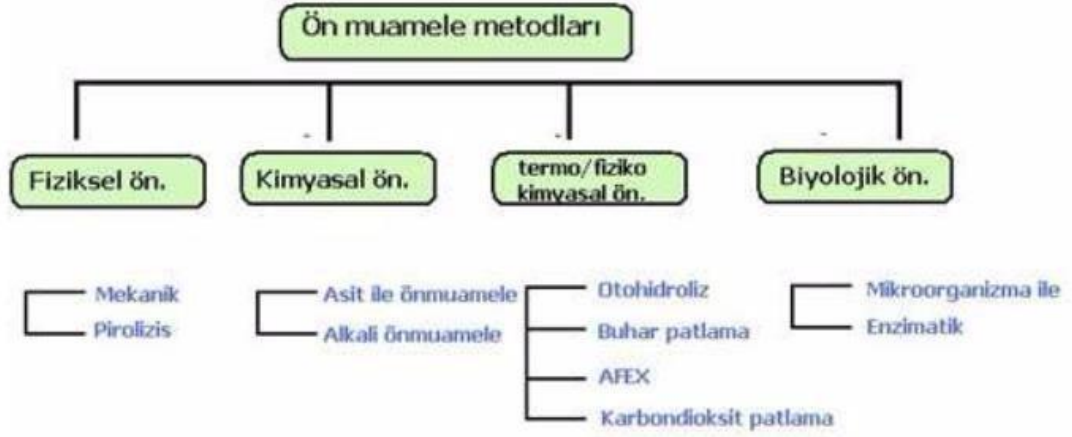
Ön-işlem, elde edilen ürün miktarının artırılması için önemli bir basamaktır. Organik asitler, fermentatif yakıtlar ya da ürünlerin üretimi için kullanılan biyokütle, sıcak hava ile kurutma, güneşte kurutma, vakumla kurutma gibi işlemlerden geçirilerek depolanmasından sonra ön-işleme geçilir [58]. Bu metodlar ile bitki biyokütlesinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler gerçekleştirilir [59].



Şekil 2.12. Ön-işlemin lignoselülozik yapı üzerine etkisi [59].

Ön işlem ile hidroliz yapısal ve içeriksel engelleyicileri biyokütleden ayırmak ve böylece hemiselülozdan fermente edilebilir şeker oluşumu miktarını arttırmaktır [62]. Şekil 2.12.'de ön- işleminin lignoselülozik yapı üzerine etkisi gösterilmiştir. Ön- işlem sırasında dikkat edilmesi gerekenler:

- Biyokütlenin kullanılabilirliğini arttırmak
- Selülozların enzimatik hidroliz için selüloz yüzey alanına ulaşılabilirliğinin artırılması
- Karbonhidrat kaybının en düşük seviyede tutulması
- Hidroliz ve fermantasyon işlemi sırasında mikroorganizmalara ya da enzimlere karşı inhibitör etki yaratan yan-ürünlerin oluşumundan kaçınmak maliyeti düşürmektir [60]



Şekil 2.13. Ön-işlem metodları [9]

Ön-işlem metodları ise fiziksel, kimyasal, biyolojik ve termo/fiziko kimyasal olarak 4 sınıfa ayrılır [61]. Tercihen, bu ön-işlem yöntemlerinden herhangi biri ya da birkaç tanesi beraberce kullanılabilir. Şekil 2.13. de ön işlem metodları basamaklandırılmıştır.

Biyokütlenin ön-işleme uğramadan önce sıcak hava ile kurutma, güneşte kurutma, vakumla kurutma gibi bazı işlemlerden geçmesi gerekir [59]. Tablo 2.9'da ön işlem metodlarından bahsedilmiştir.

Tablo 2.9. Ön İşlem Metodları [63].

Metod	Süreçler	Biyokütle Değişiklikleri Mekanizması
Fiziksel Ön işlemler	Bilyalı freze İki silindirli freze Çekiç frezeleme Kolloid frezeleme Vibro enerji freze Hidrotermal Yüksek basınç buharı Sıkma Genişleme Piroliz Gama ışını ışınlaması Elektron ışını ışınlaması Mikrodalga ışınlaması	Ulaşılabilir yüzey alanındaki ve gözeneklerin büyüklüğündeki artış. Selüloz kristalinitesinin azalması ve polimerizasyon derecesi. Hemiselülozun kısmi hidrolizi. Lignin kısmi depolimerizasyonu.

<p>Fizikokimyasal ve Kimyasal Önışlemler</p>	<p>Patlama: Buhar patlaması Amonyak lifi patlaması CO₂ patlaması SO₂ patmalası Alkali Sodyum hidroksit Amonyak Amanyum sulfat Gaz: Klor dioksit Nitrojen dioksit Asit: Sulfirik asit Hidroklorik asit Sulfir dioksit Oksitleyici ajanlar: Hidrojen peroksit Yaş oksidasyon Ozon Seluloz cozuculeri: Cadoxen CMCS Lignin'in çözücü ekstraksiyonu : Etanol-su ekstrasyonu Benzen-su ekstrasyonu Etilen-glukol ekstrasyon Butanol-su ekstrasyonu Şişme ajanları</p>	<p>Delignifikasyon Selüloz kristalinitesinin azalması ve polimerizasyon derecesi.</p>
<p>Biyolojik önışlemler</p>	<p>Aktinomisetler Mantar</p>	<p>Delignifikasyon Hemiselüloz ve selülozun polimerizasyon derecesinde azalma.</p>

2.7 Hidroliz

Ön-işlem bittikten sonraki aşama hidroliz prosesinde lignoselülozik materyal içerisindeki karbonhidrat polimerleri fermantasyon işleminden öncesinde basit şekerlere dönüştürülmelidir. Lignin reaksiyondan sonra yan ürün olarak kalır. Hidroliz sonucu selüloz ve hemiselüloz fermantasyon ile biyoetanole dönüştürülebilir [65].

2.7.1 Hidroliz Teknikleri

Hidroliz metodlarını kimyasal hidroliz ve biyolojik hidroliz olarak ikiye ayırılır. Gama ya da elektron ışına ve mikrodalga ışına gibi bazı hidroliz proseslerinin ticari açıdan uygulaması olmamaktadır. Yumuşak odunlu materyallerdeki hemiselülozlar

temel olarak mannoz içerir. Bunun yanında sert odunlularda bu bileşen beş karbonlu ksilozdur [53].

Lignoselülozik materyalin hidrolizi ile birçok ürün meydana gelebilir [33]. Lignoselülozik materyal içindeki hemiselüloz hidrolizlendiğinde ksiloz, mannoz, asetik asit, galaktoz ve glikoz gibi şekerler oluşmaktadır. Hemiselülozların degradasyonu ile su, metanol, formik asit, asetik asit, propiyonik asit, hidroksi-1-propanon, hidroksi-1-bütanon ve 2-furfuraldehid gibi sekiz ana ürün meydana gelmektedir [65].

- **Kimyasal Hidroliz**

Bu yöntemle lignoselülozik materyal belirli bir süre uygun sıcaklıkta kimyasala maruz bırakılır. Bunun sonucunda hemiselülozdan şeker monomerleri meydana gelmektedir. Bu prosesde genellikle asitler kullanılmaktadır [27]. Yoğunluğa bağlı olarak asitlerin hemiselülozu hidrolize etmesi yoğunluğa bağlı olarak derişik asit ile hidroliz ve seyreltik asit ile hidroliz olarak ikiye ayrılır.

Kimyasal hidroliz yöntemlerinden biri olan seyreltik asit hidroliz yöntemi yüksek sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilir. Bu prosesde yüksek sıcaklıkta sürekli akış reaktöründe yaklaşık % 1 konsantrasyonda H_2SO_4 çözeltisi kullanılır. İyi bir seyreltik asit yönteminde yaklaşık % 50 şeker dönüşüm etkinliği ile sınırlanmaktadır. Yüksek sıcaklık ve basınç ile asidin kombinasyonu özel reaktör materyalleri gerektirmektedir. Ancak bu da reaktörü pahalı hale getirir. İlk reaksiyon aşaması selülozik materyalin şekere dönüşümü ve ikinci reaksiyon aşaması ise şekerlerin diğer bileşiklere dönüşümüdür [26].

Seyreltik asit hidroliz yönteminin ilk adımı hemiselüloz verimini maksimuma ulaştırmak için düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir. Prosesin diğer adımı ise yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilir [66]. Bu aşamada daha dirençli olan selüloz ile arta kalan maddeler, altı-karbonlu şekerlerin kazanılması için daha sert koşullara maruz kalmaktadır ($488^\circ K$, fakat % 0.4 H_2SO_4) [67]. Bu iki proses için deneysel sonuçlar mannoz için % 89, galaktoz için % 82 ve glikoz için % 50'dir [68]. Seyreltik asit hidrolizi ile karşılaştırıldığında, derişik asit hidrolizi daha az oranda şeker degradasyonu ile sonuçlanır. Bunun yanında derişik asit prosesi maliyetin düşürülmesi açısından seyreltik asit prosesinden daha etkindir.

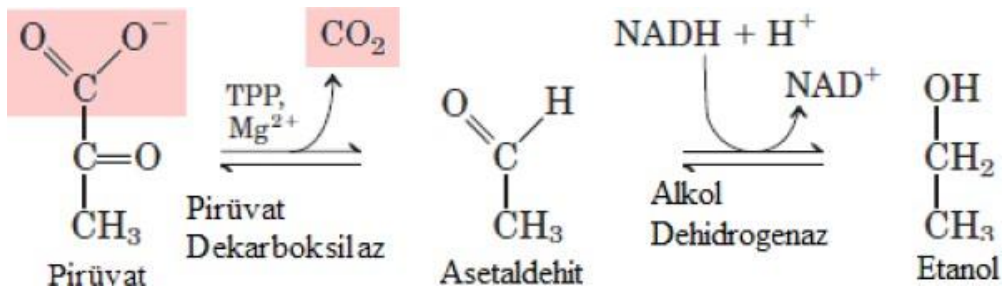
Derişik asit ile hidroliz prosesi, hemiselülozik şekerleri meydana getirmek için asit ön işlemleri içerirken, daha sonraki aşama derişik sülfirik asidin eklenmesini takiben biyokütlenin kurutulmasını gerektirmektedir [69]. Diğer yöntemlere göre daha pahalı olan derişik asit hidrolizi yönteminde dilisyon ve ısıtmadan kaynaklı ekipman gerekleri seyreltik asit hidrolizi yönteminden fazladır. Reaksiyon süreleri seyreltik asit hidrolizinden biraz daha uzun olan derişik asit hidrolizi prosesinde kullanılan asit konsantrasyonu % 10-30 aralığındadır [70].

2.8. Etanol Fermantasyonu

Maya ve diğer mikroorganizmaların glikozu etanol ve CO₂'e fermantasyonu Şekil 2.14.'de gösterilmektedir. Mayalar glikozu, etanol ve CO₂'e fermente ederler. Glikoz, pirüvata glikoliz ile çevrilir ve pirüvat; etanol ve CO₂'e iki adımla dönüştürülür:

İlk olarak pirüvat, pirüvat dekarboksilaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonda dekarboksillenir. Pirüvat dekarboksilaz, Mg²⁺ ve sıkıca bağlı koenzim olan tiamin pirofosfat'a gereksinim duyar. İkinci adımda ise; asetaldehit, gliseraldehit-3-fosfatın dehidrojenasyonundan türetilen NADH tarafından sağlanan indirgeyici güç ile alkol dehidrojenaz aktivitesi ile etanole indirgenmektedir [71].

Maya hücreleri metabolik olarak enerji üretmek için etanolü de kullanmaya başladıkları için fermantasyon sırasında etanol yoğunluğu azalmaya başlar. Ortamda oksijenin varlığında asetil koenzim A'yı meydana getirecek enzimler vardır ve sitrik asit çevrimi meydana gelir. Maya hücreleri etanolü kullanıp ATP sentezlemektedir.



Şekil 2.14. Pirüvatın etanole dönüşmesi [26].

2.8.1. Fermantasyonla İlgili Zorluklar

Mikroorganizmalara veya enzimlere karşı hidroliz ve fermantasyon esnasında inhibitör etki yaratan bazı yan ürünlerin oluşmasını engellemek gerekmektedir. Bu yan ürünler furfural ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF), karboksilik asitler gibi inhibitor maddeler olabilirler. Bu maddelerin ortaya çıkmasını sağlayan etmenlerden ikisi yüksek sıcaklık ve yüksek asit konsantrasyonlarıdır. Bu maddelerin toksik etkisini yok etmek için kimyasal ilaveler enzimatik işlemler, ısıtma ve buharlaştırma, sıvı- sıvı ekstraksiyon sıvı-katı ekstraksiyon gibi ilave işlemler gerçekleştirilmelidir [72].

Ortamın pH'sı, sıcaklığı, ortamda bulunan ilavelerin tümü organizmanın enzimlerinin açığa çıkmasında etkili olmaktadır. Ortaya çıkacak etanol de mikroorganizma açısından önemlidir.

Etanol fermantasyonları sırasında, nutrient eksikliği, yüksek sıcaklık ve kontaminasyon gibi çeşitli çevresel streslere maya hücreleri maruz kalmaktadır. Bunun yanında etanol birikimi ve buna bağlı olarak maya hücre büyümesinin inhibisyonu, etanol üretimi gibi maya hücresi metabolizmasıyla ilişkilidir. Bunun yanında fermantasyon sırasında ortaya çıkan yan ürün inhibitörleri düşük etanol üretimine neden olmaktadır [26].

2.8.2. İnhibitor Maddelerin Fermantasyona Etkisi

Hidrolizat lignoselülozik yapının bozunması sırasında, sadece fermente edilebilir şekerleri içermez. Bunun yanında mikroorganizmayı inhibe edici bileşiklerde oluşur. İnhibe edici fenolik/aromatik bileşiklerin çoğu seyreltik asit hidrolizatları arasında bulunmuştur [73]. Hidroliz esnasında bu bileşiklerin ligninin parçalanma ürünü olduğu ya da aromatik bileşiklerin şeker yıkımının bir sonucu olarak da oluşabileceği düşünülmektedir. Fenolik bileşikler arasından vanilin ve şiringaldezin en önemli inhibitör maddelerdendir [74]. Bunların yanında seyreltik asitler, furfural, hidroksimetilfurfural ve fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikleri ortamdan uzaklaştırmak için, nötrleştirme, CaO ile muamele, iyon değişimi, çözücü ekstraksiyonu, aktif karbonla muamele gibi yöntemler kullanılmaktadır [75].

2.9. Ön işlem görmüş lignoselülozik substrattan hidroliz ve fermantasyon stratejileri

2.9.1. Ayırık Hidroliz ve Fermantasyon (Separate Hydrolysis and Fermentation=

SHF)

Bu prosesde ön işleme uğramış lignoselülozlar glikoza hidrolizlenir ve ardından farklı ünitelerde etanole fermente edilirler. SHF yönteminin avantajı hidroliz ve fermantasyonun kendi optimum koşullarında gerçekleşiyor olmasıdır. Etanol üreten mikroorganizmalar için bu değer 30-37°C civarında iken selüloz için bu oran optimum sıcaklık değeri kaynağına bağlı olarak 45-50°C dir. SHF yönteminde meydana gelen bir sorun açığa çıkan şekerler tarafından selüloz aktivitesinin inhibisyonudur. SHF'de karşılaşılan diğer bir sorun ise, olası kontaminasyondur. Yapılacak olan hidroliz işlemi 1-4 gün gibi uzun bir süre almaktadır. Seyreltik şeker çözeltileri 45-50°C'de kontaminasyon riskine sahiptir. Enzim kontaminasyonu olası engellerden biridir. Büyük ölçekte selülozu sterilize etmek güçtür. Enzim aktivitesini yitireceğinden filtre edilmesi gerekir [76].

2.9.2. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve fermantasyon (Simultaneous Saccharification and Fermentation=SSF)

Lignoselülozlardan etanol üretimi için en çok kullanılan yöntemlerden birisi eşanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon yöntemidir. Bu yöntemin amacı lignoselülozların enzimatik hidrolizi ile fermantasyonu bir adımda birleştirmektir. Bu proseste, enzimatik hidroliz ile açığa çıkan sellobiyoz ve glikoz, kültürde mevcut olan fermentatif organizmalar tarafından hemen tüketilerek ortamda inhibisyona sebep vermeyecek konsantrasyonlarda bulunur. Sonuç olarak az miktarda enzimle fazla etanol üretilecektir. Eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon yönteminde kontaminasyon riski oluşan etanolün kontaminasyon olasılığını azaltmasından dolayı SHF 'ye kıyasla daha azdır. Bunun yanında SSF için gerekli olan reaksiyon kapları SHF için gerekli olandan azdır ve bu da yatırım maliyetini düşürecektir.

SSF yönteminde önemli bir koşul enzimatik hidroliz ile fermantasyon için gerekli optimum koşulların birbirine olduğunca yakın olması gerekmektedir. Bir diğer sorun, ortaya çıkan etanolün selülozu inhibe etmesi de SSF'de karşılaşılabilecek olmasıdır. Bazı araştırmacılar 30g/l etanolün enzim aktivitesinde % 25'lik bir düşüşe yol açtığını bildirmiştir. [76].

2.9.3. Non- izotermal eşanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (Non-isothermaal Simultaneous Saccharification and Fermentation=NSSF)

Enzimatik hidroliz reaksiyonu, SSF prosesinde enzimatik hidrolizin optimum değerinden daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Bu enzim aktivitesini potansiyelinin altına iterek enzim gereksinimini artırır. Bu nedenle izotermal olmayan eşanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon prosesi (NSSF) yoluna başvurulur. NSSF işleminde sakkarifikasyon ve fermantasyon eşanlı fakat ayrı tanklarda farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Prosesde, enzim kullanımını SSF 'ye göre % 30-40 kadar azaltmıştır. Bu da alfa- glukozidaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin diğer selüloz enzimlerinden daha fazla olmasının rolünün olduğunu göstermektedir [76].

2.9.4. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Kofermantasyon (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation SSCF)

SSCF prosesi, SSFnin geliştirilmiş versiyonudur. Çalışmalarda kullanılan bir başka operasyon olan (SSCF), beş ve altı karbonlu şekerlerin etanole fermantasyonun gerçekleştiği eşzamanlı sakkarifikasyon ve kofermentasyondur (SSCF). Ön işlemler sırasında hidrolizlenen hemiselüloz bu işlemler sonrası ayrılmaz ve hemiselüloz şekerlerinin etanole dönüştürmesine imkân verilir. SSF biyoreaktörde, sadece heksozlar etanole dönüştürülürken pentozlar bir diğer reaktörde farklı organizmalar ile fermente edildiği için SSF 'de iki biyoreaktör ve iki biyokütle ayrılması gereklidir. SSCF'de hem selülozlar hem pentozlar tek reaktörde tek organizma ile fermente edilmektedirler. Bu nedenle ön işlem görmüş lignoselüloziklerin hidrolizlenmiş ve katı fraksiyonlarını işlemek için tek bir fermantasyon adımı gereklidir [76].

2.9.5. Birleştirilmiş biyoproses (Consolidated Bioprocess=CBP)

Bu prosesinde, etanol gerekli enzimlerle birlikte tek bir mikroorganizma topluluğu tarafından tek bir reaktörde üretilir. Aynı zamanda birleştirilmiş biyoproses işlemi direk mikrobiyal dönüşüm olarak da bilinir.

Lignosellülozik materyallerden etanol üretiminin geliştirilmesinde ortaya konulan son nokta konsolide biyoprosesdir. Bu prosesin uygulamaları enzim satın alma veya üretme için işletme masrafları ve sermaye yatırımları gerektirmemektedir. birleştirilmiş biyoproses' de kullanılacak olan mikroorganizmaların seçiminin iki yolu vardır;

İlk olarak mükemmel etanol üretici yeterli selüloz üretici mikroorganizmaların, ikincisinde ise yeterli etanol mükemmel selüloz üretici mikroorganizmaların

modifikasyonu yer almaktadır. Enzimin üretimi, etanol toleransı ve etanol seçiciliği her iki yolun mikroorganizmaları için göz önüne alınır [76].

Etanol üretimi kesikli, sürekli, kesikli beslemeli, yarı sürekli olmak üzere dört şekildedir. Bu işlemlerin herhangi biriyle hücre sirkülasyonu, avantaj sağlayacak şekilde kullanılabilir. Ancak santrifüj sırasında substrat, hücrelerle kümeleşebilen ve sistemde kabul edilemeyecek miktarlarda oluşan çözünmeyen materyallerden bağımsız olması gerekir. Kullanılacak olan işlemin çeşidi hammaddenin özelliklerine veya operasyon maliyetlerine göre seçilmelidir. Endüstriyel fermantasyonda minimum maliyet ve maksimum ürün verimi için birleştirilmiş biyoproses tercih edilir [76].

2.10. Strain geliştirme ve adaptasyon çalışmaları

Maya suşlarının gelişimleri belirli etkenlere bağlıdır ve bu etkenler içeriklerine ve devam sürelerine göre mayaların yaşamı üzerine teşvik edici, durdurucu yada öldürücü etki yapabilirler. Bu etkenleri bilmek mayalardaki reaksiyonları kontrol etmeye ve istenen iyi özelliklere teşvik etmeye yaramaktadır. Mayaları geliştirmek için gerekli olan etmenler aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

Su etkeni: Maya mikroorganizması hücresinde suyun gerekliliği ile beraber hücrede bulunan gerekli besin maddelerinin erimesi için de su önemli bir etmenddir. Çünkü besin maddeleri ancak suda erimiş bir halde hücre içine geçebilirler.

Oksijen ve redoks potansiyel etkeni: Mayalar aerob karakterdeki türler hariç tutulacak olursa, anoksidatif metabolizma biçimine özel bir eğilim gösterirler. Mayanın fermantasyon ve solunum yollarıyla enerji sağlaması birçok hallerde yan yana giden iki olay olarak gözlenirse de havalandırma ile birini diğerine göre daha çok teşvik etmek olanaklıdır.

Sıcaklık etkeni: Sıcaklık mayaların gelişmesini ve çoğalmasını sınırlandıran bir etkendir. Mayalar 0-45 °C arasında optimum büyüme sağlamaktadır. Ancak bazı mayalar için alt sınır + 8 °C'den, bir çok mayalar için de 0.5 °C'den başlarken üst sınır ise çoğunlukla 34-42 °C arasındadır. Bununla beraber bazı mayalar için bu dereceler tehlikeli olabildiği halde, bazıları için bu sınır 47 °C'ye kadar çıkabilmektedir. Optimal sınıra gelince, bu sınır kural olarak üst sınıra daha yakın olmak üzere, bundan 5-7 °C daha düşük bir düzeyde bulunur. Çoğunlukla 25-30 °C arasında bulunan optimal

sıcaklık derecesi 35-37 °C'ye kadar çıkabildiği gibi, bazı mayalar için 20 °C'ye kadar düşebilmektedir.

Işık ve ışınlama etkeni: Maya üzerine etki yapan dış etkenlerden birisi de ışıktır. Güneş ışığı dolaylı olarak geldiğinde mayaya herhangi bir etkide bulunmaz. Fakat aynı ışık direkt geldiğinde gelişme durur. Yapılan bir çalışmada maya güneş veya elektrik ışığı altında karanlıktakine göre yarı yarıya daha az bir gelişme göstermiştir. Kırmızı ışık da karanlık gibi olumlu bir etki yapmıştır.

Metabolizma ürünleri etkeni: Her ne kadar mayanın kendisi etil alkol ve karbondioksit üretsede mayalar bu ürünlerin konsantrasyona sınırlı dayanabilirler ve her maya için durum farklı seyreder [77].

İnhibitör toleransı, etanol toleransı ve ksiloz kullanımını içeren lignoselülozdan etanol'e dönüşüm sürecinde bazı engeller bulunmaktadır. Endüstride kullanılan mayalarda istenilen özelliklerden en önemlileri yüksek alkol konsantrasyonlarına, yüksek şeker konsantrasyonlarına ve yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı olmalarıdır. Lignoselülozik hidrolizatın fermantasyonu sırasında mayaya etki eden inhibisyon mekanizmaları metabolit analizi, enzim aktivitesi analizi, metabolik akış analizi ve kinetik analiz gibi geleneksel yöntemlerle incelenmiştir. Lignoselülozik hidrolizatların başlıca inhibitörlerinden biri Furfuraldır. Lignoselülozik hidrolizatlarda pentoz fermente edici mayaların performanslarını artırabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Lignoselülozik hidrolizatlarda karışım halindeki toksik bileşiklerin kompleks ve değişken doğası bunların her birinin hücrel toksisitesini arttırıp tanılamamızda güçlükler yaratmaktadır. Ayrıca çeşitli inhibitörler sinerjik olarak da toksik etki göstermektedir. Önceki çalışmalarda görülen çoğu vakada, furfuralın maya tarafından furfural alkole dönüştürülebileceği görülmüştür. Ayrıca alkol üretim süresince maya hücreleri, ozmotik basıncın artması etanol birikimi veya karbondioksitin artışı gibi bazı çevresel değişikliklere maruz kalmaktadırlar. Etanol, endüstriyel üretim sürecindeki ana stres faktörlerinden biri olduğu için, maya suşu için yüksek düzeyde etanol toleransı, fermantasyonun yüksek verimliliği için bunun yanında yüksek etanol üretimi için bir ön şarttır. Yüksek konsantrasyonlarda şeker substratlarında fermantasyon esnasında yükselen etanol seviyesi hücre canlılığını olumsuz etkileyerek suşların büyüme oranlarını ve fermantasyon hızlarını azaltır [78]. Çeşitli lignoselülozik substratlardaki beş karbonlu

pentoz şekerlerini fermente edebilen bazı maya türleri ve bu substratlardan elde edilen etanol miktarı ve verimi Tablo 2.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.10. Adaptasyon ve geri dönüşüm ile geliştirilmiş yerli pentoz fermantatif mayalar.

Maya	Suş	Substrat	pH	Uyumlu veya Geri Dönüşümlü	Kullanılan İlk Şeker (%)	Max [EtOH] (g/L)	Verim (g EtOH/g seker)
<i>S. stipitis</i>	BCRC21777	Pirinç saman hidrolizati	5.0	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	ND ND	9.39 10.27	0.40 0.44
<i>Pichia stipitis</i>	CBS 6054	Mısır sapı hidrolizati	5.0	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	ND ND	0 43.42	0 0.47
<i>Pichia stipitis</i>	CBS 6054	Mısır koçanı hemiselüloz asit hidrolizati	ND	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	18 90	1.5 13.3	0.21 0.41
<i>Pichia stipitis</i>	NBRC 1687	Etanol (50-70 g/L)	ND	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	ND ND	38 44	ND ND
<i>Pichia stipitis</i>	NRRL-Y-7124	Kırmızı meşe hidrolizati (30 % v/v)	5.0	WT Artan Yoğunlaşmaya uyarlanmış	80 93.5	9.8 14.5	0.25 0.40
<i>Pichia stipitis</i>	NRRL-Y-7124	Kırmızı meşe hidrolizati (60 % v/v)	5.0	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	0 66.94	0 8.3	0 0.31
<i>Pichia stipitis</i>	NRRL-Y-7124	Sentetik on hidrolizat 95 g/L asetik asit ile)	5.0	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	15.6 90	0.8 13.3	0.002 0.35
<i>Pichia stipitis</i>	NRRL-Y-7124	HMF	ND	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	ND ND	0 10	ND ND
<i>Pichia stipitis</i>	NRRL-Y-7124	Şeker akağaç hemiselüloz hidrolizati (75 % v/v)	5.5	WT Artan yoğunlaşmaya uyarlanmış	ND ND	0 9.6	ND ND

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan bütün genel laboratuvar cihazları aşağıda listelenmiştir.

Otoklav (Nüve OT 03)

Çalkalamalı inkübatör

Spektrofotometre (Varian Cary® 50 UV-Vis Spectrophotometer)

pH metre (Hanna HI 221)

Isıtıcı (Stuart scientific magnetic stirrer hotplate)

Etüv (Heraeus function line hot air sterilizer)

Sirkülatörlü su banyosu (Memmert wnb 10)

Vorteks (Nüve NM110)

Blender (Waring Commercial blender)

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmadaki deneylerde kullanılacak olan ortam kompozisyonları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan ortam kompozisyonları

Besiyeri (g/L)	Bileşenler
YPD	Maya (Özütü Merck)
	Pepton (Merck)
	Agar (Merck)
	Glikoz (J.T. Baker)
YPX	KH ₂ PO ₄ (Merck)
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)
	Ksiloz (Merck)
	Arabinoz (Merck)
YPC	Sellobiyoz (Sigma)
	Glikoz
	Maya Özütü
	Pepton
pH ayarlama	NaOH (Merck)

YNB	Yeast Nitrogen Base (Becton, Dickinson and Company)
İndirgenmiş şeker tayini	Dinitrosalisilik asit (Fluka Chemika)
	Fenol
	Sodyum sülfid (Merck)
	Sodyum hidroksit (Merck)
	Sodyum potasyum tartarat (Merck)
Hidrolizasyon	H ₂ SO ₄ (Carlo Erba)

3.1.3. Mikroorganizmalar

Maya türleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü araştırma grubu izolatlarından temin edilmiştir.

3.1.4. Asma Çubuğu Lignoselülozik Atık

Bu çalışmada kullanılan asma çubuğu bitkileri Manisa bağ bahçelerinden temin edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ortam ve Kültür Koşulları

Deneyleerde kullanılan mayaların izolasyonu çeşitli gıda örneklerinden ve atıklardan yapılmıştır. Bu aşamada Ege Üni. Fen. Fak. Biyoloji bölümü ile ortak çalışılmıştır. Tanımlanan maya izolatları YPD/YPX agar slantlere alınmıştır.

Fermantasyon aşamasında kullanılacak farklı suşların seleksiyonunda öncelikle ksiloz kullanım yetenekleri tanımlı besiyeri koşulları incelenmiştir. Stok halindeki mayaların aktiveleştirilmesi YPX ortamında yapıldıktan sonra, gelişen kolonilerden alınan örnekler YNB Broth lara aktarılarak 30°C de bir gece bekletilmiş ve YPX ortamına mayalar inoküle edilmiştir. En fazla pentoz şekeri kullanabilen suşlar belirlenerek fermantasyon aşamasına geçilmiştir.

Fermantasyon aşamasında kullanılacak strainlerin seleksiyonunda öncelikle farklı pentoz kaynaklarının (ksiloz, arabinoz) kullanım yetenekleri tanımlı besiyeri koşullarında incelenmiştir. Pentoz şekeri kullanabilen strainler ile fermantasyon aşamasına geçilmiştir.

3.2.2. Maya Türlerinin Pentoz Şeker Kullanımının Araştırılması

Ortamının bileşimi D-ksiloz/arabinoz 12,5 g/L, maya özütü 0.75 g/L, pepton 0.75 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L olarak oluşturulmuştur (Tablo 3.2). Ksiloz şekeri ve tuz bileşimi kristalleşmeyi önlemek amacıyla ayrı iki erlende steril edilmiştir. Birinci erlenin içine 300 mL saf su içinde maya özütü pepton $\text{KH}_2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bileşikleri bulunurken ikinci erlenin içinde 200 mL saf su içine ksiloz şekeri ilave edilmiştir. Steril edilen iki erlen içindeki tuz ve şeker sonradan karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 30 mL olarak erlenlere paylaştırılmıştır.

Tablo 3.2. Pentoz kullanım tarama besiyeri bileşenleri

Kimyasallar	Konsantrasyon (g/L)
D-ksiloz / Arabinoz	12,5
Maya özütü	0,75
Pepton	0,75
KH_2PO_4	2,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1

3.2.3. Asma Çubuğunun Substrat Olarak Hazırlanması ve Hidrolizasyon Basamakları

Asma odun atıkları öncelikle bağ makası yardımıyla küçük parçalara ayrılmış daha sonra fermente edilebilirliğini ortaya çıkarmak amacıyla blendırdan geçirilip daha küçük parçalar halinde hidrolizat deneylerinde kullanılmıştır (Şekil 3.1).



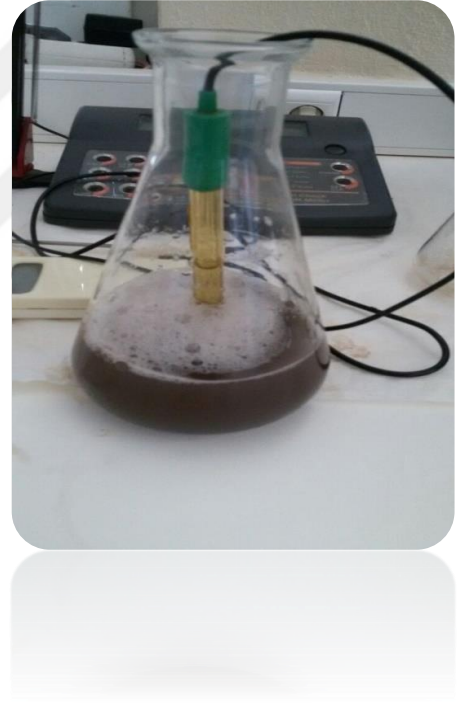
Şekil 3.1. Farklı boyutlara ayrılmış asma çubuğu

Asit ile hidrolizasyonda kullanılacak substratın hidrolizi seyreltik asit çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir.

0,7 M H₂SO₄ çözeltisi, öğütülmüş asma çubuğu ile 4:1 (katı:sıvı) oranında süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan karışım 30°C ayarlanmış su banyosunun içine daldırılmış cam bir beherde 40 dakika bekletilmiştir. Daha sonra erlenin içine 150 mL kaynar saf su eklenerek ısıtıcıda bekletilmiştir. Erlenin içine konulan magnetik balık yardımıyla hidrolizat 100 rpm de karıştırılmıştır. Hidroliz işlemi sonucu elde edilen hemiselüloz hidrolizatı önce filtre kâğıdından süzülerek posasından ayrılmıştır. Elde edilen oldukça asidik asma hemiselüloz hidrolizatının pH metre yardımıyla pH değeri 6,5-7 arasında bir değer alacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.3). 1M'lık NaOH çözeltisi hazırlanarak hidrolizatın pH değeri ayarlanmıştır. Çözelti, 1000 µl'ye ayarlanan mikropipet yardımıyla asidik hidrolizata ortamın istenilen optimum pH aralığında (6,5-7) oluncaya kadar çözeltiden eklenmiştir [79]



Şekil 3.2. Asma çubuğunun tartımı



Şekil 3.3. Asma odun hidrolizatının pH değerinin ayarlanması

3.2.4. Fermantasyon Denemeleri

3.2.4.1. İnokulum Hazırlanması

YPX petriplerinde 1 gün inkübe edilmiş kolonilerden alınan bir öze dolusu örnek, 50 mL YPD Broth içeren 150 mL'lik erlenlerde 24 saat 200 rpm' de 30°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra YNB ortamına (250 mL H₂O - 16,75 gr yeast nitrogen

base) inokule edilen mayaların karbon kaynağını kullanıp kullanmadıklarına bakılmıştır.

3.2.4.2. Tanımlı Ortamda Fermantasyon

50 ml'lik fermantasyon ortamlarına (maya özütü 7 g/L; pepton 2 g/L; KH_2PO_4 2,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L; Na_2HPO_4 0,25 g/L, 25 g/L ksiloz/arabinoz) inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon koşulları aerobik kesikli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Hidrolizat İçeren Besiyerinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hidrolizat ortamı fermaantasyon denemelerine önce %10- 20- 30-40 konsantrasyonlarında hazırlanmış ve öncelikle bu ortamda uyumlandırma sağlanmıştır. Bunun için hidrolizat ortamına ilave edilmek üzere yeast ekstrakt (1g/L) + pepton (2g/L) karışımı elde edilmiştir. Oluşturulan çözeltilerden; 1. erlene 45 ml, 2. erlene 40 ml, 3. erlene 35 ml, 4. erlene ise 30 ml konulup üzerine 50 ml ye tamamlanacak şekilde hazırlanan hidrolizattan ilave edilmiştir. Böylece ksiloz ve tuz ortamında en iyi üreyen mayalarımız için farklı 4 konsantrasyonda hidrolizat içeren ortam oluşturulmuş, hazırlanan besi yeri ortamlarına ortamın % 3'ü kadar aşılacaktır. Süreç şeker ölçümü, hücre büyümesi takibi şeklinde izlenmiştir.



Şekil 3.4. Fermantasyon ortamı

3.2.5. Katı Hidrolizat Ortamında Ön Tarama

Çalışmada ilk olarak hidrolizat ortamına suşlar adapte edilmiştir. Daha sonra ek karbon kaynağı olmayan katı hidrolizat ortamı oluşturulmuş (Tablo 3.3). Daha sonra ortam petri kablalarına dökülmüştür. Katı hidrolizat ortamına daha sonra stoktaki mayalar inokule edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası hücre canlılığı ön tarama

yapılmıştır.

Tablo 3.3. Katı hidrolizat ortamı bileşenleri

YNB (g/L)	Agar (g/L)	Hidrolizat (ml)
16,75	2,5	250

3.2.6. Adaptasyon İçin Fermantasyon

- Hidrolizat İçeren Ortamda Fermantasyon

Yapılan fermantasyon ortamına adaptasyon işlemi denemeleri karşılaştırıldığında şeker kullanımının en belirgin olduğu suş seçilmiştir. Bu suş ile yüksek konsantrasyonlu saf hidrolizat ortamı fermantasyon denemelerine geçilmiştir. Hidrolizat ortamına adaptasyonu sağlanmış ve stokları yapılmış mayalar bir gün öncesinde YPX büyüme ortamına alınmıştır. 50 mL saf asma hidrolizat ayrı erlenlere konulmuş ve bu erlenlere ortamın %3 ü kadar YPX büyüme ortamından ilave edilmiştir. Birbirini takip eden 4 gün boyunca mayaların DNS indirgen şeker tayinleri yapılmıştır.

En yüksek üremenin olduğu gözlenen D12 kodlu *P. kudriavzevii* ile saf hidrolizat (H-UD) ortamında ardışık fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

- Ardışık Fermantasyon

Saf hidrolizat ortamında (%100 hidrolizat, YP ile supplement edilmiş olarak) 5 suşla yapılan denemelerde, büyüme ve alkol üretimlerinin birbirine yakın oldukları gözlenmiştir. Bundan sonra, seçilen D12 suşu (*Pichia kudriavzevii*) ile hidrolizat ortamında dört günlük periyodlar halinde 10 ardışık fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Ardışık inokülasyonlarda bir önceki fermantasyonda gelişen mayadan inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon aşamaları dörder günlük periyotlarla ardışık olarak inokulumlar yapılmıştır. YPX ortamında 1 gün aktiveleştirilen maya suşu 50 mL lik saf hidrolizat ortamına inokule edilmiştir. Inokülasyonu izleyen 4 gün sonrası ortamdaki indirgen şeker tayini yapılmıştır. Fermantasyon ortamının %3 ü oranında alınan örnek yeni saf hidrolizat ortamına aktarılmıştır. Yapılan inokulumlar sonucunda indirgen şeker oranı ve etanol üretim değeri belirlenmiştir.

3.2.7. Fermantasyon Sürecinin İzlenmesi Sırasında Yapılan İşlemler

3.2.7.1. Hücre Sayımı ve Canlılığın Ölçümü

Dilüsyon hazırlama ile incelenecek orijinal hidrolizat örneği içindeki maya sayısının belli oranlarda sulandırılıp seri seyreltmeler yaparak kademeli bir şekilde hücre yoğunluğunu daha aza indirilmiştir. Böylece petri kabında fazla koloni oluşturulmadan mikroorganizma sayımı kolaylıkla gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon ortamından 1 mL alınıp, 9 mL steril saf su içine aktarılmış ve tüp vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Bu şekilde 10^{-1} seyrelti elde edilmiştir. Buradan bir başka steril pipet ile 1 mL alınıp diğer tüpe aktarılmıştır ve 10^{-2} seyreltik solüsyon elde edilmiştir. Daha sonra karıştırma işlemi tekrarlandı. Tüpten alınan 1 mL'lik örnek 4. tüpe aktararak 10^{-4} seyreltik solüsyon elde edilerek işlem tamamlanmıştır.

Petriye YPD agar olarak hazırlanan büyüme ortamlarına seyreltme plaka yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle steril petri kabına 10^{-3} seyreltisinden 1 mL diğer bir steril petri kabına 10^{-4} seyreltisinden aktarılıp üzerine donma sıcaklığının biraz üzerinde agarlı besiyeri dökülmüş ve karıştırılmıştır. Agar donunca petri kutusu 27°C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda koloniler sayılmıştır.

3.2.7.2. İndirgen Şeker Ölçümü

İndirgen şeker tayininde 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır. DNS metoduyla, indirgen şeker de denilen serbest karbonil grupların ($\text{C}=\text{O}$) varlığı test edilir. Bu şekerler bir aldehid ve keton grubuyla açık zincir içerirler. Aldehid grubu içeren monosakkaritlere aldoz, keton grubu içerenlere ise ketoz denir. 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS), alkalın koşullarda 3-amino,5-nitrosalicylic acid'e indirgenir. Analiz dinitrosalisilik asit solüsyonu (Tablo 3.4) ve %40'lık potasyum sodyum tartarat solüsyonu kullanılarak yapılır [80]. İndirgen şeker tayini ile saf asma hidrolizat ortamındaki toplam şeker ile fermantasyon ortamındaki şeker oranı kıyaslanmıştır ve inokule edilmiş mayaların şekeri kullanıp kullanmadıklarına spektrofotometrede bakılmıştır

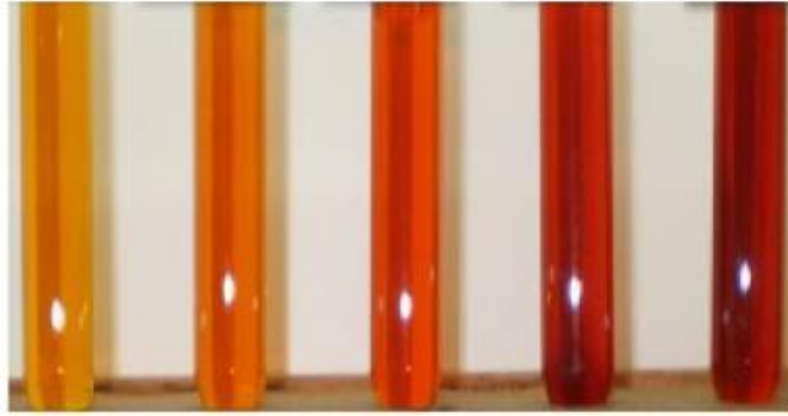
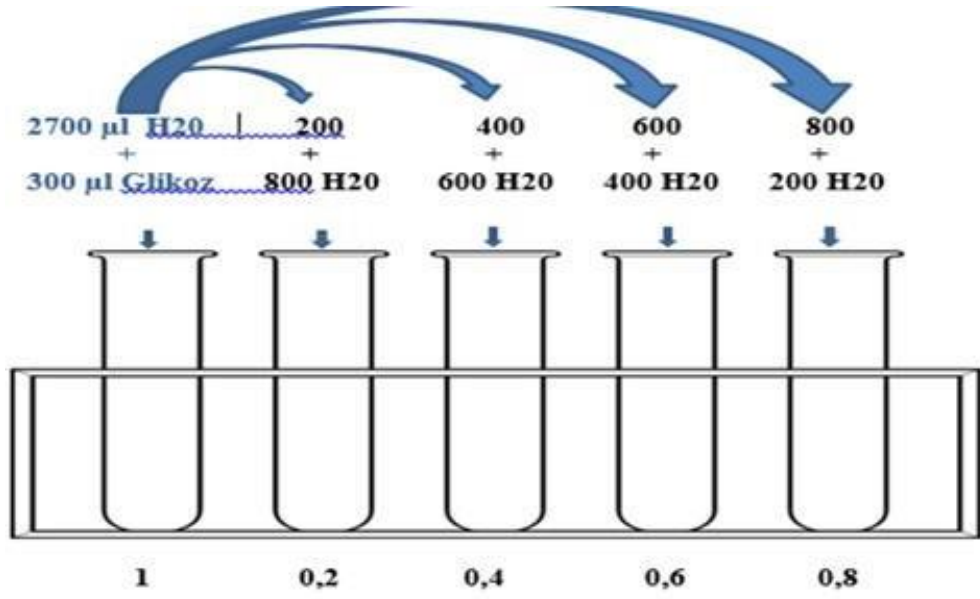
Tablo 3.4. DNS solüsyonunun hazırlanışı [80].

Kimyasal Adı	Miktar (g/L)
Dinitrosalisilik asit	10
Fenol	2
Sodyum sülfid	0,5
Sodyum hidroksit	10
Sodyum potasyum tartarat	40

Seçilen mayalar ortamın %3 ü kadar 50 ml olarak hazırlanan saf hidrolizat ortamına inokule edilmiştir. 50 ml saf asma hidrolizata inokulum yapıldıktan sonra 27°C de bekletilen fermantasyon ortamından 4 gün art arda örnekler alınarak DNS metodu ile indirgen şeker analizleri yapılmıştır.

Her fermantasyon ortamı için 1:1 ve 1:9 seyreltik iki ortam tüplerde hazırlanmıştır. 1:1 ortamı için tüpe 500 µl saf su 500 µl fermantasyon ortamı 1000 µl DNS çözeltisi 5000 µl saf su eklenmiş ve çözelti 7000 ml ye tamamlanmıştır. 1:9 ortamı için tüpe 900 µl saf su 100 µl fermantasyon ortamı 1000 µl DNS çözeltisi 5000 µl saf su eklenmiş ve bu ortamda 7000 ml ye tamamlanmıştır. Bu işlem her fermantasyon ortamı için tekrarlanmıştır. Hazırlanan tüpler ısıtıcıda ısıtıldıktan sonra spektrofotometrede öncelikle standartlar ölçüldü daha sonra hidrolizat körleri ve fermantasyon çözeltileri seri şekilde ölçülmüştür. Körler ile fermantasyon ortamı arasında kıyaslama yapılarak indirgen şeker tayinine bakılmıştır.

DNS yönteminde başlangıçta standart çözelti hazırlanmıştır. Standart çözelti bir maddenin bilinen konsantrasyonundaki çözeltisidir. Diğer bir ifadeyle bir maddenin içindeki miktarı tam olarak bilinen çözeltisine standart çözelti denir. Stok standart çözeltisi 1,0 mg/ml 0,2 mg/ml 0,4 mg/ml 0,6 mg/ml 0,8 mg/ml olarak 5 tüpe hazırlanmıştır. Glikoz standartları Şekil 3.5.'de olduğu gibi hazırlanmıştır.



Şekil 3.5. DNS glikoz standart



Şekil 3.6. Glikoz referans eğrisi

3.2.7.3. Etanol Ölçümü

Fermantasyon sırasında oluşan etanolün ölçümü 2. 3. ve 4. günlerde Ethanol Assay Kit (Sigma-Aldrich, MAK076) ile yapılmıştır (Şekil 3.7.) Etanol konsantrasyonu oluşan ürünün kolorimetrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbansının ölçümü ile hesaplanmıştır. Kit içeriğinde yer alan bileşenler aşağıda belirtilmiştir:

- Ethanol Assay Buffer,
- Ethanol Probe,
- Ethanol Enzyme Mix

Kolorimetrik prosedür kısaca şu şekildedir:

1- Etanol Standartlarının Hazırlanması:

17.15 N'lik Etanol standardı 808,7 µl Etanol Assay Buffer ile 1 µmol/µl standart oluşturmak üzere seyreltilmiştir. Bu standardın 10 µmol'ü 990 µl Etanol assay buffer ile seyreltilerek 10 nmol/µl lik solüsyon hazırlanmıştır. Bu solüsyondan 1 nmol/µl'lik etanol standardı hazırlanır. 96 kuyucuklu platalere sırasıyla 0,2,4,6,8 ve 10 µl 1 nmol/µl'lik standarttan konulmuştur. Her kuyunun üzerine hacmi 50 µl'ye tamamlayacak şekilde Etanol Assay Buffer ilave edilmiştir.

2- Örnek Hazırlanması: Örneklerin dilüsyonu da Ethanol Assay Buffer ile yapılmıştır. Son hacim 50 µl olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır.

3- Reaksiyon Karışımının Hazırlanması: Master reaksiyon karışımı Tablo 3.5.'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır:

Tablo 3.5. Master reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim (µl)
Etanol Assay Buffer	46
Etanol Prob	2
Etanol Enzyme Mix	2

4- Her kuyucuğa 50 µl Reaksiyon Karışımı konulmuştur. Pipetleme ile karışımın homojen olması sağlanmıştır. Karışım 30 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında gün ışığından korunmuştur.

5- Kolorimetrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri TECAN Infinite M200 Pro'da yapılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.7. Etanol Assay platelerinin spektrofotometre absorbans değerlerinin ölçümü



Şekil 3.8. Absorbans ölçümleri için kullanılan plate okuyucu

3.2.7.4. Ksiloz Ölçümü

Hidrolizat içerisindeki ksiloz miktarının ölçümü için D-Xylose Assay Kit (Elabscience, BC0018) kullanılmıştır (Şekil 3.10). Ölçüm yöntemi, D-Ksiloz dehidrasyonu sonucu oluşan furfuralin, Phloroglucinol ile reaksiyona girip pembe renkli bileşikler oluşturmasına ve oluşan ürünlerin 554 nm’de kolorimetrik olarak saptanmasına dayanmaktadır. Ksiloz içeriğinin belirlenmesinde kullanılan assay kiti 32 Kit bileşenleri Tablo 3.6.’da gösterilmiştir.

- Reaktif 1: Phloroglucinol
- Reaktif 2: Konsantre edilmiş 13,3 mmol/L (2g/L) D- Ksiloz standardı
- Reaktif 3: Standart Diluent

1.33 mol/L Ksiloz standardının hazırlanması için standart diluent kullanılmıştır. Kitin uygulaması aşağıda belirtilmiştir:

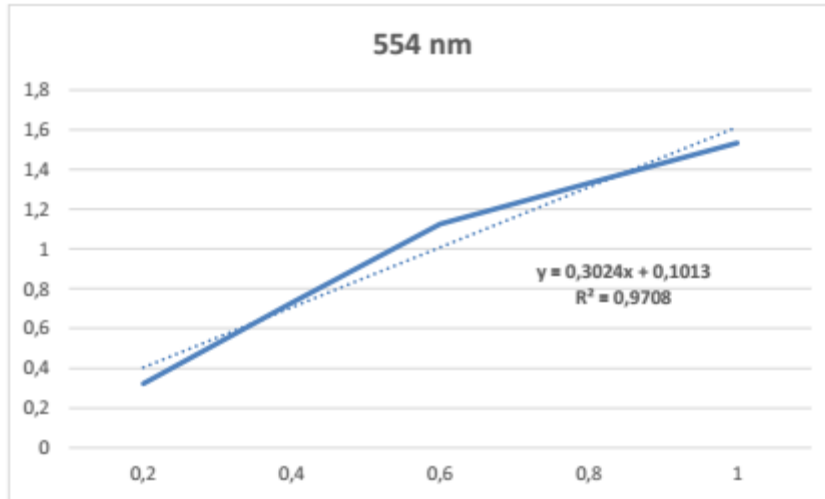
Tablo 3.6. Ksiloz ölçümü

Tablo 3.6. Ksiloz ölçümü

Bileşen (ml)	Kör	Örnek Kör	Standard	Örnek
Phloroglucinol	3	3	3	3
Distile Su	0,03			
Örnek körü	0,03			
1,33 mmol/D Ksiloz Standart solüsyonu	0,03			
Test örneği	0,03			

Bütün tüpler 4 dk süre ile 100 °C’de (kaynar suda) inkübe edilmiştir. Hemen buz üzerine alınarak soğutulmuşlardır. Didistile suya karşı bütün tüpler 554 nm dalga boyunda ölçülmüşlerdir. Standart ksiloz çözelti konsantrasyon eğrisi aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.9).

Konsantrasyon hesaplamada aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır. Konsantrasyon (D-Ksiloz mmol/L) = $\frac{OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{örnek blank}}}{OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{blank}}} \times \text{Standart konsantrasyonu (1,33 mmol/L)}$.



Şekil 3.9. Standart ksiloz çözeltisi konsantrasyonlarına (mg/ml) okunan absorbanans değerleri



Şekil 3.10. Ksiloz içeriğinin belirlenmesinde kullanılan assay kit

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Moleküler Karakterize Edilmiş Maya Türleri

Çalışmada kullanılan 26 rDNA bölgesinin D1/D2 domainine göre uygun primerler kullanılarak moleküler tanılanmış türler Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. 26S r DNA bölgesi D1/D2 Domainin Sekans Analizine göre tanımlanan türler

İzolot No.	26s rDND Bölgesi D1 D2 Domaininin Sekans Analizi		
	26s rDNA PCR Ürünü bp	Homoloji %	Tanı Sonucu
D3	533	99	<i>Candida parapsilosis</i>
D12	556	99	<i>Pichia kudriavzevii</i>
D22	489	98	<i>Candida sinolaborantium</i>
D24	571	99	<i>Cryptococcus albidus</i>
D27	569	99	<i>Cryptococcus albidus</i>
D44	571	99	<i>Cryptococcus diffluens</i>
D45	561	98	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
D46	562	99	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
D54	563	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
D69	533	99	<i>Candida parapsilosis</i>
D79	579	99	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>
D85	563	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
D87	566	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
D88	563	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
D93	562	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
D100	565	99	<i>Candida davisiana</i>

4.2. Maya Türlerinin Pentoz Şeker Kullanımının Araştırılması

İzole edilerek tanılanan maya türlerinin pentoz (ksiloz ve arabinoz) kullanımları sonucunda, 33 izolatın 16'sının her iki karbon kaynağını kullanabildikleri belirlenmiştir. Buna göre aktivitesi olan türler ve suş adetleri şu şekildedir: *Candida parapsilosis* (2), *Pichia kudriavzeii* (1), *C. sinolaborantium* (1), *C. albidus* (2), *Cryptococcus diffuens* (1), *Rhodotorula mucilaginosa* (6), *W. anomalus* (1), *C. uzbekistaniensis* (1), *Candida davisiana* (1). Aktivitesi olan tanımlı türler ve kod numaraları Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Tanımlı besiyerinde pentoz kullanım aktivitesine sahip oldukları belirlenen suşlar



İzolot No.	26s rDNA-PCR Tamı Sonucu Tür Adı	Ksiloz-Arabinoz Kullanımı
D3	<i>Candida parapsilosis</i>	+
D12	<i>Pichia kudriavzevii</i>	+
D22	<i>Candida sinolaborantium</i>	+
D24	<i>Cryptococcus albidus</i>	+
D27	<i>Cryptococcus albidus</i>	+
D44	<i>Cryptococcus diffluens</i>	+
D45	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
D46	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+
D54	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
D69	<i>Candida parapsilosis</i>	+
D79	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	+
D85	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
D87	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
D88	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
D93	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+
D100	<i>Candida davisiana</i>	+

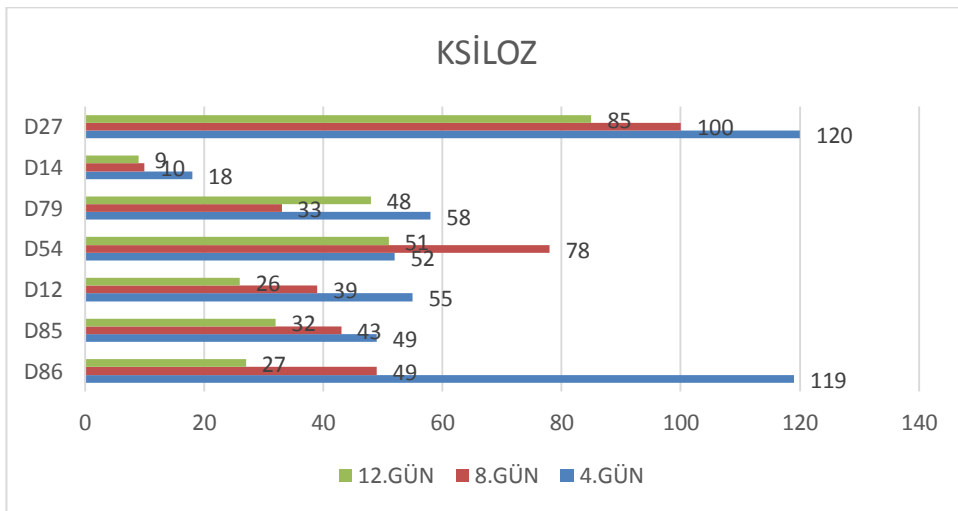
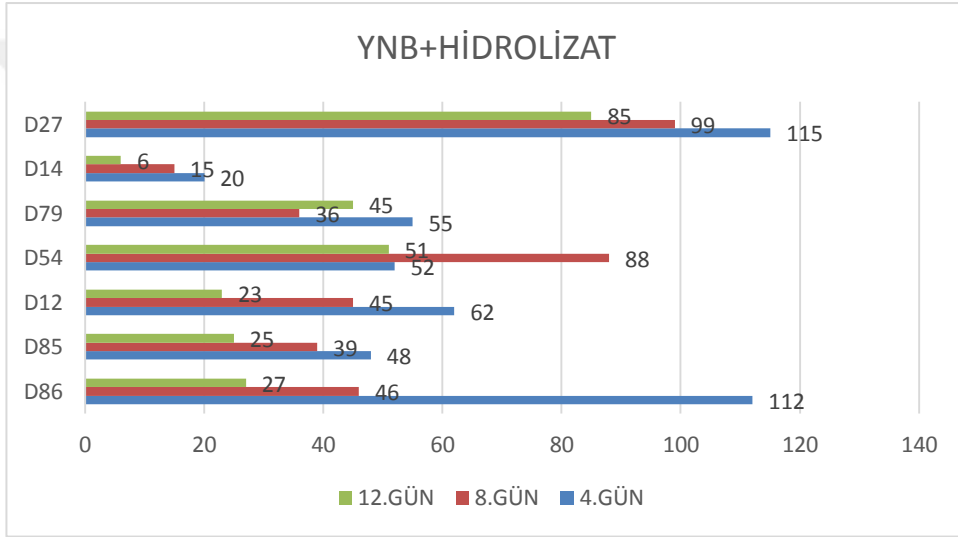
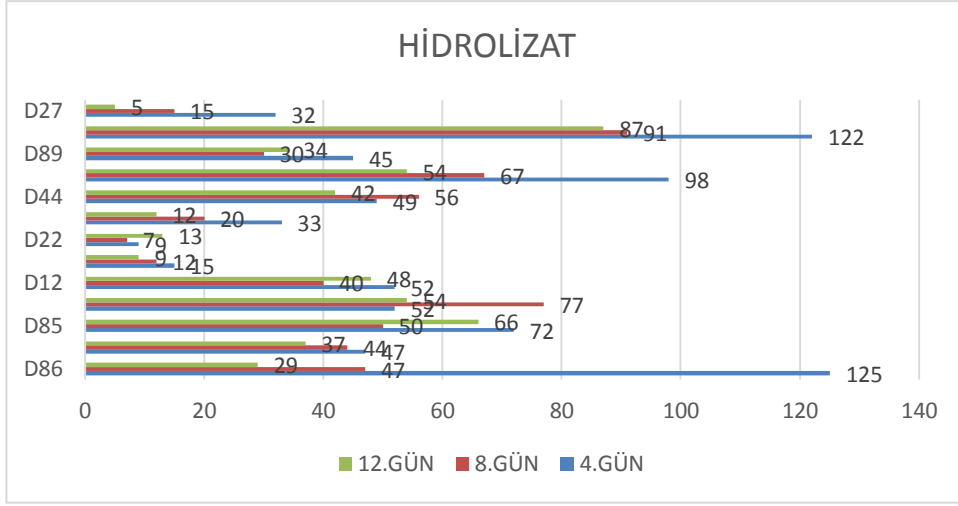
4.3. Fermantasyon Denemeleri

4.3.1. Tanımlı Ortamda Fermantasyon

Tanımlı ortamda yapılan fermantasyon denemelerinin (25 g/L ksiloz/arabinoz içeren) sonuçları Tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Lignoselülozik substrat olarak kullanılan asma çubuğundaki pentoz şekerlerini fermente edebilen bazı maya türlerinin bu şekerleri kullanım yüzdesi ve buna bağlı olarak elde edilen etanol verimi ve miktarı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Ayrıca petriyer üzerindeki hücre sayımları Şekil 4.1'de olduğu gibi grafiklendirilmiştir.

Tablo 4.3. Tanımlı besiyerinde 13 adet tanımlı suş ile yapılan denemelerde elde edilen ölçümler

İzolatin kodu	Tanımlı tür adı	Kullanılan şeker-Ksiloz (%)	Etanol kon. (g/l)	Etanol verimi (g/g)	Hücre Sayımı
D3	<i>Candida parapsilosis</i>	44	4,6	0,41	YOĞUN
D12	<i>Pichia kudriavzeii</i>	50	5,2	0,52	YOĞUN
D22	<i>Candida sinolaborantium</i>	40	4,6	0,46	YOĞUN
D24	<i>Cryptococcus albidus</i>	50	4,2	0,33	54
D27	<i>Cryptococcus albidus</i>	42	4,2	0,4	12
D44	<i>Cryptococcus diffluens</i>	40	4,8	0,53	YOĞUN
D45	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	46	3,5	0,30	YOĞUN
D46	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	42	4,3	0,40	63
D54	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	44	4,3	0,39	87
D69	<i>Candida parapsilosis</i>	50	4,2	0,33	YOĞUN
D79	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	42	4,2	0,46	54
D85	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	48	3,4	0,37	66
D87	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	40	4,4	0,44	YOĞUN
D88	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	44	4,9	0,44	94
D93	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	40	4,9	0,49	YOĞUN



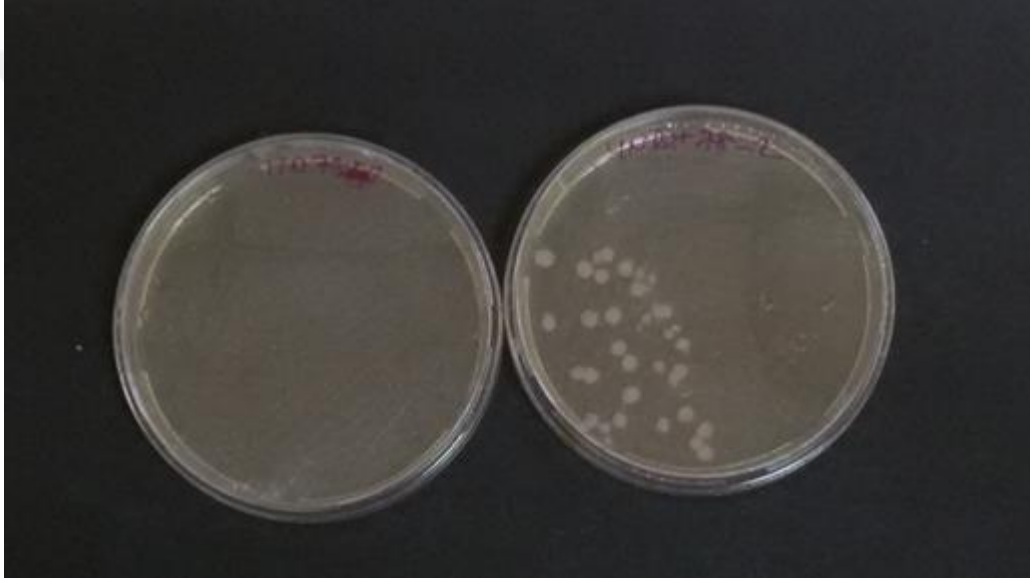
Şekil 4.1. Hücre sayım grafikleri

Tanımlı besiyerinde yapılan şeker ölçümlerinde 48 saatte ksilozun çok büyük bir

kısının tüketildiği gözlenmiştir. Etanol ölçümlerinin ise 48 saat içinde D12, D44 için en yüksek daha sonraki gün için de (72 saat) D88, D93, D22 suşlarında olduğu gözlenmiştir. 72 saatte yapılan ölçümlerde şekerin tamamına yakınının kullanıldığı gözlenmiştir.

4.3.2. Hidrolizat Ortamında Ön-Tarama

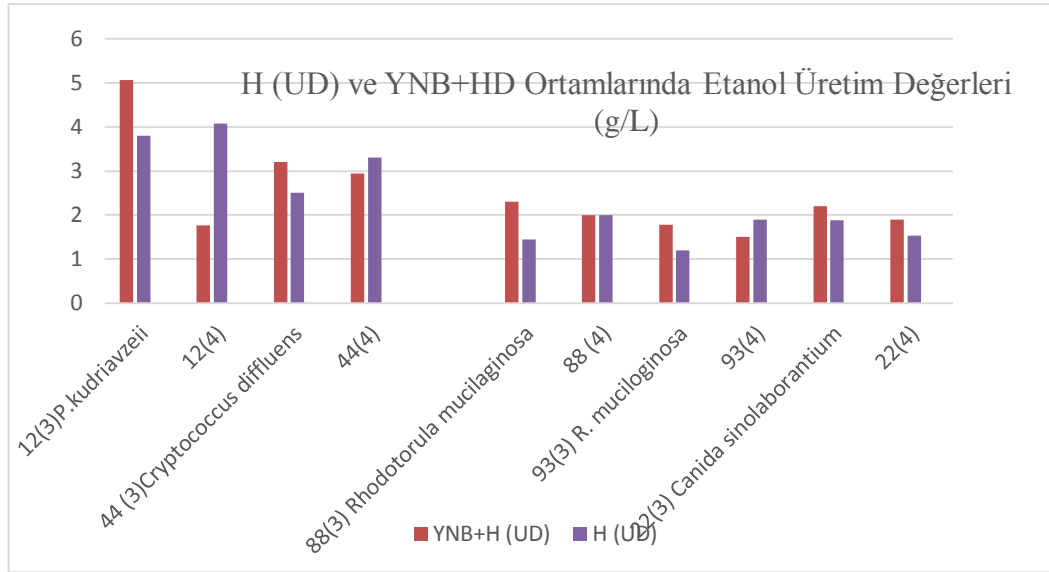
3.2.9’da anlatıldığı gibi uygulanan katı tarama besiyerinde gelişen koloniler aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.2.). Gelişim gösteren suşlardan aynı türe ait olanların bir tanesi seçilerek, ileriki fermantasyon denemeleri için kullanılmıştır.



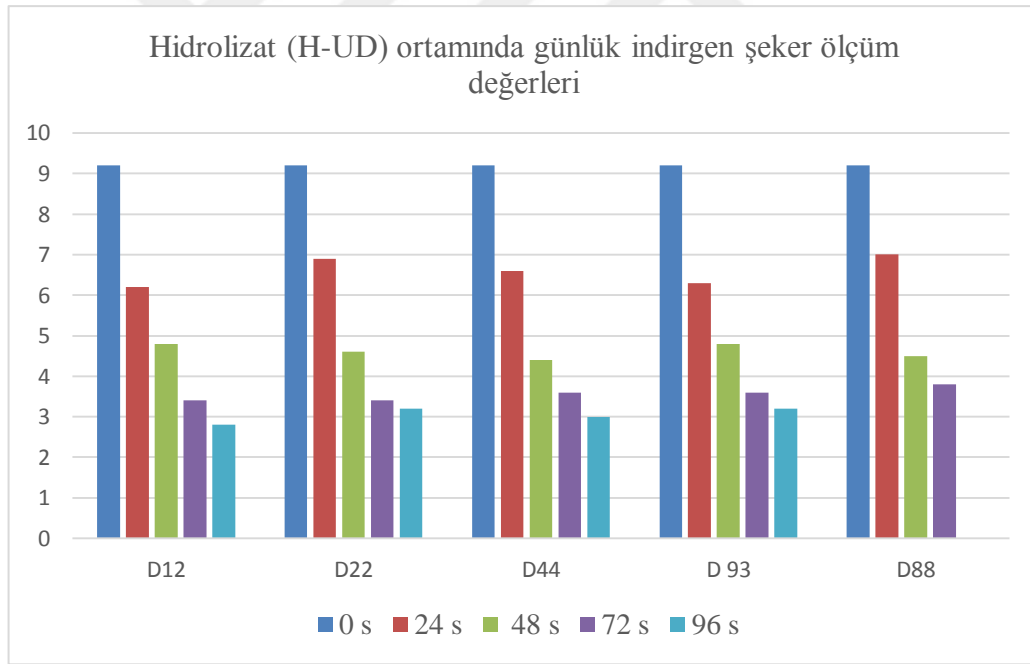
Şekil 4.2. Katı tarama besiyerinde (YNB+H) gelişen koloniler

4.3.3. Hidrolizat Ortamında Fermantasyon

Yöntemde belirtildiği gibi öncelikle katı hidrolizat ortamında tarama yöntemine göre belirlenen 5 suş ile (*P. kudriavzeii*, *Cryptococcus diffluens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. mucilaginosa*, *Canida sinolaborantium*), Hidrolizat (UD) ve YNB+Hidrolizat fermantasyon denemelerine geçilmiştir. Dört günlük fermantasyon sürelerinde yapılan ölçümler Etanol üretimleri Şekil 4.3’de, şeker ölçümleri Şekil 4.4.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Beş suşun hazırlanan hidrolizat (H-UD) ve YNB+ Hidrolizat (YNB+H) ortamlarında 3. ve 4. günlerdeki etanol ölçüm değerleri



Şekil 4.4. Beş suşun hazırlanan hidrolizat (H-UD) günlük indirgen şeker ölçüm değerleri

Elde edilen değerlere göre H (UD) ortamındaki etanol verim değerleri Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. H (UD) ortamındaki fermantasyon süresince yapılan ölçümlere göre etanol verim değerleri

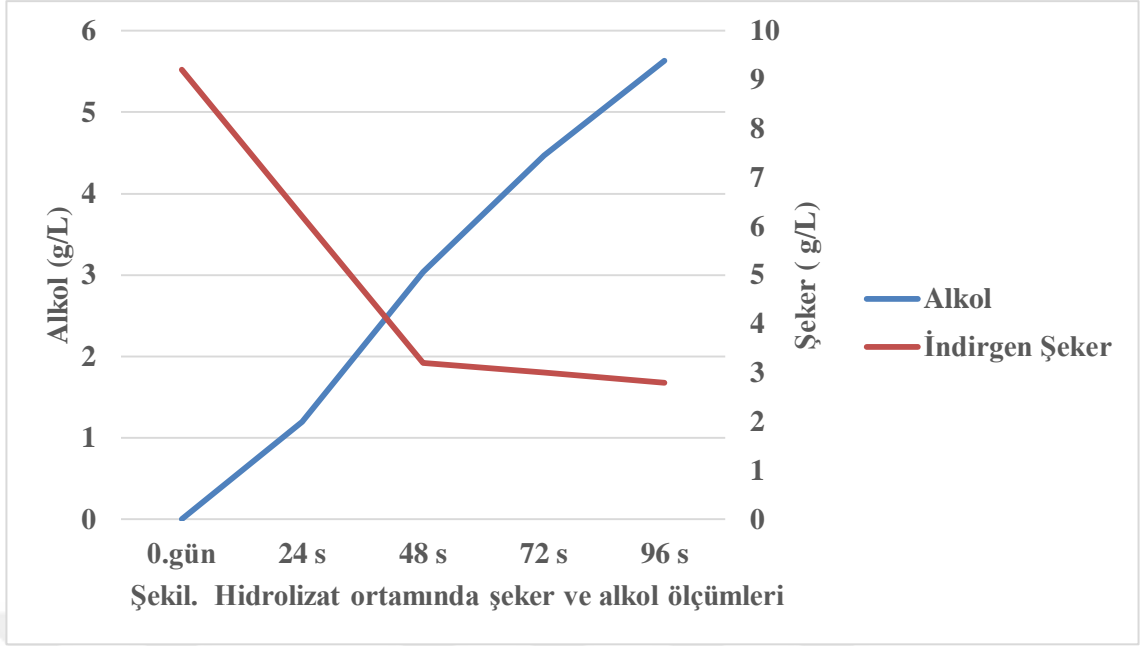
İzolatin kodu	Tanımlı tür adı	Kullanılan şeker (%)	Etanol kon. (g/l)	Etanol verimi (g/g)
D12	<i>Pichia kudriavzevii</i>	32,8	3,6	0,58
D22	<i>Candida sinolaborantium</i>	28,7	1,9	0,31
D44	<i>Cryptococcus diffuens</i>	30,6	3,31	0,55
D88	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	30,6	2,0	0,30
D93	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	28,7	1,88	0,31

4.3.4. Ardışık Fermantasyon

Etanol üretim değerlerine göre, üretim değeri açısından en yüksek olduğu belirlenen 12 kodlu *P. kudriavzevii* ile saf hidrolizat (H-UD) ortamında ardışık fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Dörder günlük periyotlarla ardışık olarak yapılan inokulumlar (10 periyot) sonucunda etanol üretim değeri 4.günde 5,63 g/L olarak ölçülmüş, adaptasyon öncesi değere göre %13,8'lik artış elde edilmiştir.

Son periyot ardışık fermantasyon aşamasında elde edilen alkol verimlerine ve şeker kullanımı ile alkol üretimi arasındaki ilişki şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.5). Şeker kullanım oranı ve alkol verimi –ardışık fermantasyon öncesi ve sonrası Tablo 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. 12 kodlu *P. kudriavzevii* suşuna ait etanol ve şeker ölçüm değerleri (son periyot)

Tablo 4.5. Ardışık fermantasyon öncesi ve sonrası *P. kudriavzeii* suşu tarafından üretilen etanol ve verim değerleri

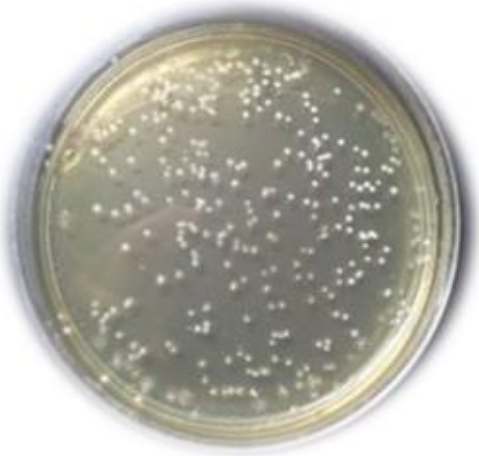
<i>P. kudriavzevii</i>	Kullanılan şeker (%)		Etanol kon. (g/l)		Etanol verimi (g/g)	
	İlk	son	İlk	son	İlk	son
	32,8	69	3,6	5,63	0,58	0,87

Tablo 4.6. Asma çubuğu hidrolizatının kullanıldığı etanol fermantasyonu sonuçları

İzolatin kodu	Ortamdaki toplam şeker (g/L)	Son şeker (Son gün) (g/L)	Kullanılan şeker %	Maya sayısı (Adet) (10^{-4})
D44	30	8,5	71,66	YOĞUN
D27	30	10	66,66	12
D79	32	9	71,87	54
D89	32	11	65,62	34
D54	32	11,5	64,06	87

D12	39	11	71,79	YOĞUN
D24	39	12,5	67,94	54
D85	39	11,5	70,51	66





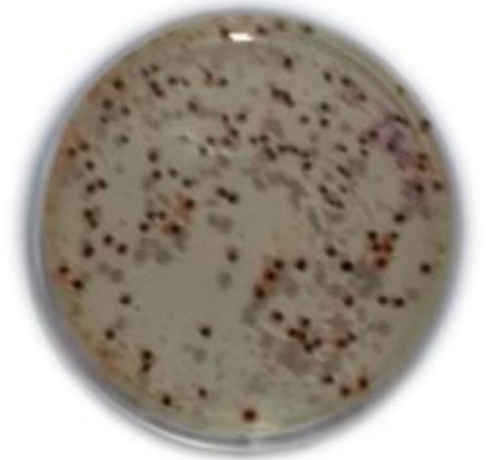
Şekil 4.6. D44 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler



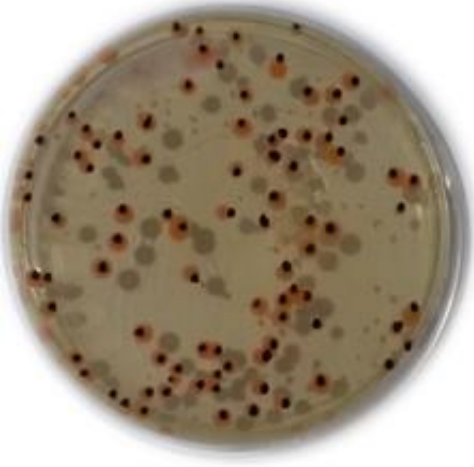
Şekil 4.7. D27 Fermantasyon sırasında hücre sayımı amaçlı gelişen koloniler



Şekil 4.8. D12 Şekil Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler



Şekil 4.9. D54 Fermantasyon Sırasında Hücre Sayımı Amaçlı Gelişen Koloniler



Şekil 4.10. D88 Fermantasyon sırasında hücre sayımı amaçlı gelişen koloniler



Şekil 4.11. D24 Fermantasyon sırasında hücre sayımı amaçlı gelişen koloniler



Şekil 4.12. D79 Fermantasyon sırasında hücre sayımı amaçlı gelişen koloniler



Şekil 4.13. D85 Fermantasyon sırasında hücre sayımı amaçlı gelişen koloniler

Çalışma kapsamında asma odun hemiselüozik hidrolizatından etil alkol üretimi öncesi hidrolizata uygulanan ön işlem olarak seyreltik asit hidrolizi işleminin uygun olduğu görülmüştür. Böylece lignoselüozik materyalden istediğimiz şekerlerin eldesi, düşük asit tüketimi ve kısa direnç zamanında gerçekleştirilmiştir. Liu ve arkadaşları benzer bir çalışmada Akçaağaç hidrolizatında *P.stipitis* ve *C.shehatae* my suşlarının etanol verimini araştırmıştır. *P.stipitis* NRRL Y-11543 suşu fermentasyondan 7 gün sonra 13,51 g/L etanol ürettiği gözlenmiştir. Seyreltik asit ile hidrolize edilmiş polisakkaritler mayalar tarafından kullanılabilir monasakkaritlere dönüştürülmüştür. Hidrolizatları seyrettikten sonra çalkalama şişesinde fermentasyon dan 7 gün sonra NRRL Y-11543 etanol konsantrasyonu 18,4 g/L olduğunu belirtmişlerdir. Seyreltik asit ile muamele edilmiş hidrolizattan 76 saat sonra elde edilen etanol konsantrasyonu ise 35,3 g/L olarak gözlemlenmiştir.

Nigam'ın yaptığı başka bir çalışmada [81] *Pichia stipitis* suşunun kırmızı meşe ağacından elde ettikleri hemiselüoz hidrolizatına fermentasyonu ve adaptasyonu incelenmiştir. Asetik asit içeren ortamda elde edilen etanol derişimi 0,8g/l olarak bulunmuştur. *P. stipitis* hidrolizata önce eğişik ağar ortamında daha sonra sıvı hidrolizata ortamına kademeli olarak adapte edilmiştir. %30 hidrolizata içeren ortama *P.stipitis* adapte edildiği kültürle adapte edilmediği ortamın fermentasyon üremelerini gözlemlenmiştir. Adaptasyon yapılmamış ortamda 9,8g/l etanol de edilirken adaptasyon yapılmış ortamda 14,5g/l etanol elde ettiklerini saptamışlardır

Çalışmada indirgen şeker tayini ile elde ettiğimiz verilere göre, pH değer aralığının 6,5 ile 7, inkübasyon sıcaklığının 27°C olduğu ve başta 32 g/L pentoz şeker konsantrasyonunun olduğu daha sonra bu oranın 11,5 g/L ye düştüğü saf hemiselülozik asma çubuğu hidrolizatının içeriğinde açığa çıkarılmış pentoz şekerini en düşük kullanan %64,06 verim gösteren D54'nolu türe ait olduğu tespit edilmiştir. En yüksek pentoz kullanan ise ortamındaki şeker miktarının 39 g/L olduğu bilinen hidrolizat ortamındaki şekerin 11 g/L ye düşmesi ile % 71,79 oranında verim gösteren D12'nolu türün olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca bakılarak D12 kodlu mayanın fermantasyon için en uygun olduğu yani şeker kullanımının gerçekleştiği saptanmış ve fermantasyon için uygun olduğu belirlenmiştir. Saf hidrolizat ve YNB+hidrolizat olmak üzere iki ortamda devam ettirilen D12 ile yapılan fermantasyon çalışmalarında 1.gün saf hidrolizat ortamında şeker % 55,13 2.gün %58,98 , 3.gün %67,95, 4.gün % 71,98 oranında azalma göstermiştir. Tanımlı besiyerinde yapılan indirgen şeker ölçümlerinde 48 saatte ksilozun büyük bir kısmının tüketildiği gözlenmiştir. 72 saat içinde ise D88, D93, D22 suşlarının şeker kullanımının tamamına yakın olduğu gözlenmiştir. 72. Saatte yapılan ölçümlerde şekerin tamamına yakınının kullandığı gözlemlenmiştir. Hidrolizat ortamında fermantasyon süresince yapılan sonuçlara göre 32,8 g/L ile en iyi şeker kullanımına paralel olarak en iyi etanol konsantrasyonu 3,6 ile D12 suşuna ait olduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak D12 suşunun etanol verimi 0,58 olarak gözlenmiştir. Ardışık fermentasyon aşamasında 4 er günlük periyotlar ile ardışık olarak yapılan inokulumlar sonucu etanol üretim değeri 4. Günde 5,63 g/L olarak ölçülmüş ve adaptasyon öncesi değere göre bu değer % 13,8 artış göstermiştir.

Çalışmada YPX mayaları katı hidrolizat ortamına inoküle edilmiş ve bu hidrolizat ortamında bulunan kolonilere ön tarama yapılmıştır. Ard arda yapılan seyreltik dölüsyon yöntemi ile D12 mayasının asma katı hidrolizat ortamında yoğun ürettiği gözlenmiştir. Ayrıca 2 gün inkübasyon süresinden sonra ki 4. gün DNS metodu ile eş zamanlı olarak biyokütle artışı seyreltik dilüsyon yöntemi ile koloni sayımına bağımlı olarak yoğun üremenin olduğu gözlemlenmiştir. Mikroorganizmanın büyüme ortamında hidrolizata adapte edilmesi durumunda, ortamın hidrolizat miktarının artması ile mikroorganizmanın hidrolizata alışma evresinin zor olduğu ve ortamdaki mikroorganizma büyümesinin daha az olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca adaptasyon ile

mayanın şeker tüketim hızı arasında paralellik olduğu gözlenmiş. Çalışmanın daha iyi sonuç verebilmesi için kullanılan çevresel faktörlerinde fermantasyon performansını önemli ölçüde etkilediği görülmüş ve bununla birlikte adaptasyon tekniğinin geliştirilmesiyle daha iyi sonuçlar elde edilebileceği ön görülmüştür. Hidrolizat içerisinde hidrolizasyon ile kaybolabilecek şeker miktarı, asma çubuğu hemiselülozik hidrolizatına uygulanan farklı zehir giderme metotları geliştirilerek yada hidrolizasyon sırasında açığa çıkan inhibitör bileşenlere karşı alınacak önlemler biyoetanol üretimine olumlu etki edeceği düşünülmektedir. Lignoselülozik biyokütle ile pentoz fermantasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalar Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Lignoselülozik biyokütle kullanarak pentoz fermantasyonu üzerine yapılan araştırma çalışmalarının özeti [82]

Substratlar	Organizma	Şeker (g/l)	Etanol (g/l)	Etanol Verimi (g/g)
Mısır Kalıntıları	<i>P. stipitis</i>	40	15,92	0,4
Prosopis juliflora	<i>P. stipitis</i>	18	7,1	0,39
Pirinç Samanı	<i>P. stipitis</i>	33	14,9	0,45
Ayçiçeği Tohumu	<i>P. stipitis</i>	34	11	0,32
Şeker Kamışı Küspesi	<i>Pachysolen tannophilus</i>	63,5	19	0,34
Akçaağaç	<i>P. stipitis</i>	35	12,4	0,35
Mısır Kalıntıları	<i>P. stipitis</i>	40	15	0,37
Şeker Kamışı Küspesi	<i>Candida shehatae</i>	30	8,67	0,29
Mısır Kalıntıları	<i>P. stipitis</i>	60	25	0,42
Kırmızı Meşe Ahşap Yongaları	<i>P. stipitis</i>	36	14,5	0,4
	<i>P. stipitis</i>	49	20,2	0,41
Buğday Samanı	<i>P. stipitis</i>	52	22,3	0,43

Mısır Koçanı	<i>P. stipitis</i>	30	10,4	0,34
Kavak	<i>P. stipitis</i>	39	12	0,31
Dalı Darı	<i>P. stipitis</i>	39	14	0,36
Pirinç Samanı	<i>Candida shehatae</i>	20	9	0,45
Pirinç Samanı	<i>P. stipitis</i>	15	6	0,4
<i>L. camara</i>	<i>P. stipitis</i>	16,8	5,16	0,33



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Denemelerde asma çubuğu bitkisi, Ege bölgesi tarımında oldukça fazla ve verimli olarak yetişmesi nedeniyle seçilmiştir. Gelişmekte olan teknikler ile bu ürünle birlikte tarımsal atıkların da, farklı dönüşüm yöntemleri ile kullanılabilir karbon kaynağı olarak elde edilmesi ve etanol üretiminde de kullanılması, ülkemiz ekonomisine önemli ölçüde katkı sağlayabilecektir.

Pentoz kaynaklarının kullanımı her ne kadar mayalar için ilk tercih olmasada, doğal substratlar içerisinde hidroliz sonucu açığa çıkan bol olarak bulunan pentozların kullanımı için mayaların geliştirilmesi, önemli katma değere sahip ürünlerin eldesi için geçerli ve öncelikli bir stratejidir.

Bu çalışmada, asma çubuğu hemiselülozik hidrolizatının 13 maya türü kullanılarak biyoetanol eldesi için kullanım olanakları araştırılmıştır. 26S rDNA bölgesi sekans analizine göre tanılanan maya türleri ile çalışılmıştır. İzole edilerek tanılanan maya türlerinin pentoz kullanımları sonucu 33 izolatın 16 sının ksiloz ve arabinoz karbon kaynaklarını kullandıkları belirlenmiştir.

Stefan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmalarının [83] öncelikle topraktan ve şeker pancarı gibi şekerce zengin habitatlardan mayaları izole etmiş daha sonra suşların karakteristik yönden incelemişlerdir. İlk olarak maya türlerinin identifikasyon larını sağlayarak fermentasyon çalışmalarında mayaların inhibitörlere toleransı ve etanol üretimlerini gözlemlemişlerdir. İdentifikasyonda büyük rDNA bölgeleri kullanılarak ve NL1 ve NL4 primerleri kullanılarak D1/D2 bölgelerinin sekans analizlerinde PCR ile yapmışlarır. İdentifikasyon sonunda mayaların etanol toleransı 5-10% v/v gözlemlenmiş istenilen uygun suşlar çalışılmak üzere ayrılmıştır.

Fosil yakıtlara alternatif yakıtlardan en çok umut vaad eden alternatif enerji kaynağı olan biyoetanolün üretimi için son yıllarda çok önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda en çok lignoselülozik atıkları da içeren agro-endüstriyel atıkların değerlendirilebilmesi üzerinde yapılmaktadır. Türkiye’de kullanılan enerji kaynaklarının tükenmesiyle son yıllarda enerji çeşitliliğini artırmak, yaygınlaştırmak ve belli enerji kaynağı türlerine büyük oranlarda bağımlı olmamak amacıyla alternatif yakıt arayışına girilmiştir. Ege Bölgesinde yetiştirilen üzümlerden

elde edilen asma çubukları yakın zamana kadar sadece yakılarak uzaklaştırılırken, bunun toz hale getirilerek toprağa karıştırılması ile gübre olarak kullanımına da başlanmıştır. Bu durumun aksine Alaşehir Ziraat Odası Ziraat Danışmanı Ziraat Mühendisi Dünder Yalçın, asma çubuklarının dayanıksız bir ağaç türü olduğu için sanayi alanında kullanılmadığına dikkati çekerek, topraktaki potasyum miktarının artırılması için kırılıp, öğütülerek, toprağa karıştırılmasını önerdiklerini ancak asma çubuklarında ölü kol ve külleme hastalıkları var ise öğütülüp, gübre yapılmasını tavsiye etmemektedir. Bu tür hastalıklı çubuklar, tespit edildiğinde hemen kesilip, bağdan uzaklaştırılmasını, bağ içerisinde bırakılmamasını belirtmektedir.

Dünyada biyoetanol üretimi ve kullanımı ile, tarım sektörünün ürünleri daha iyi değerlendirilme imkânı bulacak, bunun da çiftçiye olumlu yansıması kaçınılmaz olacaktır. Biyoetanol karışım oranına gelecek düzenlemelere bağlı olarak, ülkemizdeki tüketim miktarının artacağı beklenmektedir. Tüm bu beklentiler doğrultusunda; çeşitli maya türleriyle biyoetanol üretimi için asma çubuğu bitkisinin kullanılabilirliğini göstermesi, büyük çapta üretim için en uygun parametrenin belirlenmesi ve pervaporasyonla üretilen etanolün konsantre edilmesi, bu çalışmanın literatürde çalışılan diğer konulara göre özgün değerini oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Sun, Y., Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2002, 83, 1-11 s.
2. Ma L., Wang T., Liu Q., Zhang X., Ma W., Zhang Q. A review of thermachemical conversion of lignocellulosic biomass in China. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(4), 859-873.
3. Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52, 858-875.
4. Horn, G.M. *Biofuels*. Energy Today's. Chelsea Club House, USA, 2010, Ltd.ISBN: 978 - 1 - 4381 - 3219 – 8 s.
5. Melikoğlu M., Albostan A. Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. *J. Fac. Eng. Arch. Gazi Univ.* 2011, 26(1), 151-160.
6. Karaosmanoğlu, F. *Biyoyakıt Teknolojisi ve İTÜ Araştırmaları*. ENKÜS, İTÜ Enerji Çalıştay ve Sergisi, Bildiri Kitabı. İstanbul, Türkiye, 2006, 110-146 s.
7. Koç, E., Kaplan, E. Dünyada ve Türkiye’de Genel Enerji Durumu-II Türkiye Değerlendirmesi. *Termodinamik Dergisi*. 2008, 188, 106-118, 32-44.
8. Şenel, M. C. Rüzgar Türbinlerinde Güç İletim Mekanizmalarının Tasarım Esasları-Dinamik Davranış. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Makina Mühendisliği Anabilim Dalı, Samsun*, 2012, 183 s. (Yüksek Lisans Tezi).
9. Adıgüzel, A.O. *Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammadde Kaynakları*. Derleme / Review. *Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2013, 2(2), 204-220 s.
10. Kumbur, H., Özer, Z., Özsoy, H.D., Avcı, E.D. Türkiye’de geleneksel ve yenilenebilir enerji kaynaklarının potansiyeli ve çevresel etkilerinin karşılaştırılması. III. Ulusal Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, 2005, Mersin7 s.
11. Haskök, A.Ş. Türkiye’nin Mevcut Enerji Kaynaklarının Durum Değerlendirilmesi. *Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir*, 2005, 91 s. (Yüksek Lisans Tezi).
12. Uğurlu, Ö. Türkiye’ de Çevresel Güvenlik Bağlamında Sürdürülebilir Enerji Politikaları. *Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Sosyal Çevre Bilimler Anabilim Dalı, Ankara*, 2006, 385 s. (Doktora Tezi).
13. www.tubitak.gov.tr/btpd/btspd/platform/enerji/altgrup/cevre/bolum5.pdf
01.09.2004
14. Akgül, M. *Biyokütenin Yakıt Potansiyeli Olarak Değerlendirilmesi*. Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB, 3-4 Ekim, 2003, Kayseri, 277-288 s.
15. Berg, C. *World Fuel Ethanol Analysis and Outlook*. F.O. Licht, Ratzeburg, Almanya, 2004.
16. Yıldırım, R. G. Dünyada ve Türkiye’de Biyokütle Enerji. Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB, 3-4 Ekim 2003, Kayseri, 357-360 s.
17. Karaosmanoğlu, F. Türkiye'nin enerji sorunları ve çözüm önerileri. TÜGAD, Yenilenebilir Enerji Kaynakları ve Türkiye. *Görüş Dergisi Ajans-Türk Basın ve Basım A. Batıkent*. Ankara, 2003, 30 – 34 s.
18. Çetinkaya, M., Karaosmanoğlu, F. Türkiye Enerji Profili ve Hidrojen. İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul. www.hidrojenenerji.blogspot.com

19. Overend, R. P. Biomass for Energy. *Energy Studies Reviews*. 1989, 1(1), 16-27.
20. Karabulut, Yalçın. *Türkiye Enerji Kaynakları*, A.Ü Basımevi, Ankara, Türkiye, 2000.
21. Ditl, P., Skrivanek, K. The Limits of Renewable Energy Sources in The Czech Republic. *Czasopismo Techniczne*. 2008, 5, 57-66.
22. Adigüzel, A.O. Lignoselülozik Biyokütleden Biyoetanol Üretimi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Semineri, Mersin, 2011, 72 s.
23. Galbe, V., Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 59, 618-628.
24. Adigüzel, A. O. Kimyasal Ön-İşlemlerden Geçirilmiş Lignoselülozik Atıkların *Streptomyces Sp. AOA40* Enzimleriyle Şeker Şurubuna Dönüştürülmesi. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin, 2012, 176 s. (Yüksek Lisans Tezi).
25. Balat, M., Balat, H., Öz, C. Progress in bioethanol processing, *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, 34, 551-573.
26. Ahmed, A.M. Çeşitli dallıdırı (*Panicum virgatum*) türlerinin biyoetanol üretimi için kullanılabilirliğinin araştırılması. Ege üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, 2011, 80 s.
27. Taherzadeh, M.J., Karimi, K. Acid Based Hydrolysis Processes for Ethanol From Lignocellulosic Materials: A Review. *Bioresources*. 2007, 2(3), 472-499.
28. Gupta, R., Sharma, K.K., Kuhad, R.C. Seperate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the fermentation of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichiastipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 1214-1220.
29. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. Features Of Promising Technologies For Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96, 673-686.
30. Silverstein, R. A. Comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol. *Biological and Agricultural Engineering*, North Carolina State University, 2004. (Master's Thesis)
31. Ma, H., Wang, Q., Qian, D., Gong, L., Zhang, W. The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage. *Renewable Energy*. 2009, 34, 1466-1470.
32. Demirbaş, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*. 2008, 49, 2106-2116s. Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 2008, 26, 89-105.
33. Madigan, M.T., Martingo, J.M., Parker, J. Nutrition and metabolism. *Brock biology of microbiology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2000, 3, 992 s.
34. Daugulis, A.J., McLellan, P.J., Li, J. Experimental investigation and modelling of oscillatory behaviour in the continous culture of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997, 56, 99-105 s.
35. Sprenger, G.A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *Microbiology Letters*. 1996, 301-307 s.
36. Esser, K. T. Karsch. Bacterial Ethanol Production: Advantages and Disadvantages *Process Biochemistry*. 1984, 19, 3, 116-121.

37. Adıgüzel, A.O. Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammadde Kaynakları: Derleme / Review. BEÜ. Fen Bilimleri Dergisi. 2013, 2(2), 204-220 s.
38. Dehkoda, A. Concentrating lignocellulosic hydrolysate by evaporation and its fermentation by repeated fedbatch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae*. Industrial Biotechnology Boras University and SEKAB E-Technology. Sweden, 2008, 67 s. (Master thesis).
39. Demirbas, A. Bioethanol from cellulosic materials: an renewable motor fuel from biomass. Energy Source. 2005, 27, 327-337.
40. Adıgüzel, A.O. Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammadde Kaynakları. Journal of Science Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çiftlikköy, 2013, 2(2), 204-220 s.
41. Erikson, K. E., Blanchette, R. A., Ander P. Biodegradation of lignin. In Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag KG. Berlin, 1990, 225-333 s.
42. Ljungdahl, L.G., Erikson, K.E. Ecology of microbial Cellulose Degradation, Microbiology Ecology. 1985, 8, 237-299.
43. Johansson, E., Krantz-Rultcker U C., Zhang, B. X. Chlorination and biodegradation of lignin. Soil Biology & Biochemistry. 1999, 1029-1032.
44. Nugzar, N., Nutsbidze, Sarkanen, S. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *trametes cingulata*. Phytochemistry. 1997, 49, 1203-1212 s.
45. Yoon, J.J., Kim, YL. Degradation of crystalline cellulose by Brown-Rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*. J. Microbial. 2005, 43(6), 487-492 s.
46. Robert, F.H., Dekker, Aneli M., Barbosa. The effect of lignin- related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete. *Botryosphaeria sp.* Enzyme and Microbial Technology. 2001, 30, 374-380 s.
47. Gunnar M. 2000. Early adversity and the development of stress reactivity and regulation. In The Effects of Adversity on Neurobehavioral Development. The Minnesota Symposia on Child Psychology, ed. CA Nelson, 163–200 s.
48. Mutlu, S.F. Ayçiçeği Bitkisinin Sap ve Tohum Kabuklarının Enzimatik Yöntemlerle Şekere Dönüşümü. Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 1990, 1-30 s. (Doktora Tezi).
49. Aspinal, G. O. Polysaccharides, Pergamon Press Headington Hill Hall, Oxford, 1970, 431-438 s.
50. Cosgrove D.J. Growth of the plant cell wall. Nature Reviews/ Molecular Cell Biology. 2005, 6, 850-861 s.
51. Martinez, A.T., Camerero, S., Gutierrez, A. Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 2001, 59, 401-411.
52. Strayer, R.F., Finger, B.W., Alazrki, M.P., Cook, K., Garland, J.L. Recovery of resources for advanced life support space applications: effect of retention time on biodegradation of two crop residues in a fed-batch, continuous stirred tank reactor. Bioresource Technology. 2002, 119-127.
53. Hirofimi, H., Takonori, I., Ryuichiro, K. Intracellular ferrereductase involved in Mn(IV) reducing enzyme system to supply Mn(II) for lignin biodegradation by white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Enzyme and Microbial Technology. 1999, 30, 467-473.
54. Taherzadeh, M.J., and Karimi, K. Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production. International Journal of Molecular Sciences.

2008, 157, 220-229.

55. Yaman, S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. *Energy Conversion and Management*. 2004, 45, 651-671 s.
56. Breen, A., Sigleton, F.L. Fungi in lignocellulose and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999, 10, 252-258.
57. Üçgül, İ., Akgül, G. Biomass technolog. *Journal of Yekarum*. 2010, 1(1), 3-11 s.
58. Pingali, S. V., Urban, V. S., Heller, W. T., McGaughey, J., O'Neill, H., Foston, M., Myles D. A., Ragauskas, A. and Evans, B. R. Breakdown of cell wall nanostructure in dilute acid pretreated biomass. *Biomacromolecules*. 2010, 11, 2329-2335 s.
59. Sanchez, O. J. and Cardona, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2008, 99, 5270-5295.
60. Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. and Aikat, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*. 2012, 37, 19-27.
61. Adıgüzel A.O. Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön- muamele ve hidroliz yöntemleri. *SAÜ. Fen Bil. Der.* 2013, 17, 381-397 s.
62. Taherzadeh, J.M. Enzyme-based ethanol, bioresources Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. *Bioresources*. 2007, 2(4), 707-738.
63. Karimia, K., Kheradmandiniaa, S. and Taherzadeh, M.J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*. 2006, 30, 247- 253.
64. Gullu, D.E. Effect of catalyst on yield of liquid products from biomass via pyrolysis. *Energy Source*. 2003, 25, 753-765
65. Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. *Energy Conversion and Management*. 2010, 52 (2), 858- 875.
66. Hamelinck, C.N., Van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*. 2005, 28, 384-410.
67. Yu, Y., and Lou, X., and Wu, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy Fuels*. 2008, 22, 46-60 s.
68. Hayes, D.J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catalysis Today*. 2009, 145, 138-151.
69. Iranmahboob, J., Nadim, F., Monemi, S. Optimizing acid- hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass Bioenergy*. 2002, 22, 401-404.
70. Temp, U., and Eggert, C. Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 389- 395 s.
71. Jönsson, L.J., Alriksson, B. Nilvebrant, N. O. Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification. *Biotechnology Biofuels*. 2013, 6, 16, 2-10.
72. Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P. and Singh, A. Bioethanol Production from *Lantana camara* (Red Sage): Pretreatment, Saccharification and Fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 8348- 8354.
73. Adıgüzel, O. A. Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mersin*, 381-397, 2013, 18 s.
74. Olsson, L., Hahn-Hagerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microb. Tech.* 1996, 18, 312-331 s.

75. Kaşıkara Pazarlıoğlu, N. Lignoselülozik Atıklardan Biyoetanol Üretimi, Biyoyakıtlar ve Biyoyakıt Teknolojileri Sempozyumu, 2007, Ankara, Türkiye. (Bildiriler Kitabı).
76. Pamir, H. Fermantasyon Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Türkiye, 1985, 336 s.
77. Keskin, H. Besin Kimyası. İstanbul Üniversitesi Kimya Fak. İstanbul, Türkiye, 1982, 2, 558 s.
78. Pamir, M.H. Fermantasyon Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Basım Evi, Ankara, Türkiye, 1985, 336s.
79. Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill E., Ahmad M.N.M., Rooney, D.W., Walker, G.M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Chemical Engineering Journal. 2010, 156, 395-403.
80. Miller, G., L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 1959, 31-426.
81. J.N, Nigam. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for etanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysat. Journal of Applied Microbiology. 2001, 90,208-215.
82. Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh A., Y.-H., Percival Zhang. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2011, 15, 4950-4962.
83. Ruyters, S., Mukherjee V., Verstrepen, K., Thevelein, J., Willems, K. Assessing the potential of wild yeast for bioethanol production. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology. 2015, 42, 39-48

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasemin DOĞAN
Doğum Yeri ve Yılı: Manisa, 1989
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : yaseminnyasar@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Salihli Lisesi, 2003
Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2009
Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2014

Mesleki Deneyim

İzmir Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi
(Tüberküloz, bakteriyoloji, moleküler mikrobiyoloji, immunoloji ve seroloji Lab.)
STAJ) 2013-2014

Pamukkale Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Sistemik Botanik
Lab. (STAJ) 2014-2015

Pamukkale Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herpetoloji Lab.
(STAJ) 2014-2015

Pamukkale Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Lab.
(STAJ) 2014-2015

Manisa Salihli Odak Patoloji Lab. (STAJ) 2015-2016

Kula Sistem Dershanesi Biyoloji Öğretmenliği 2015-2016

Salihli Açı Temel Lisesi Biyoloji Öğretmenliği 2016-2017

Manisa Kula Sistem Dershanesi Biyoloji Öğretmenliği Manisa Salihli Özel Açık Temel Lisesi Biyoloji Öğretmenliği

Yayımları

Doğan, N.M., Doğanlı, G., Ülger, G., Habeşoğlu, D., Güzel, S., Yaşar, Y., Arar, D., Şensoy, T., Bozbeyoğlu N. Türkiye'den İki Propolis Örneğinin Antibiofilm Etkisi. Journal of Applied Biological Sciences. 2014, 8 (2), 27-31.

Yaşar, Y. Çeşitli Gıda Atık Ürünlerinden İzole Edilen Mayaların Tanılanması Pentozca Zengin Lignoselülozik Hidrolizata Adaptasyonu ile Etanol Üretimi. Gaziantep Üniversitesi 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, 05-09 Eylül, 2016, Gaziantep.

