

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSİYUM ALJİNATTA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ
Saccharomyces cerevisiae **HÜCRELERİ İLE KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTINDA**
ETANOL ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

ERCAN YATMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2012

KALSİYUM ALJİNATTA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ
Saccharomyces cerevisiae HÜCRELERİ İLE KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTINDA
ETANOL ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

ERCAN YATMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**Bu tez 2012.02.0121.012 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2012

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSİYUM ALJİNATA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ
Saccharomyces cerevisiae HÜCRELERİ İLE KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTINDA
ETANOL ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

ERCAN YATMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 19/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100.) not takdir edilerek
Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. M. Soner BALCIOĞLU



ÖZET

KALSİYUM ALJİNATTA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ *Saccharomyces cerevisiae* HÜCRELERİ İLE KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTINDA ETANOL ÜRETİM ŞARTLARININ OPTİMİZASYONU

Ercan YATMAZ

Yüksek lisans tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İrfan TURHAN

Temmuz, 76 Sayfa

Gıda atıklarının ve şeker içeriği yüksek ancak değerlendirilme olanakları kısıtlı olan tarım ürünlerinin biyoteknolojik proseslerde kullanımı son yıllarda artış göstermiştir. Bunun en temel nedeni bu tip kaynakların değerlendirilerek katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesi sonucunda ekonomiye önemli düzeylerde katkı sağlanmasıdır. Bu çalışma kapsamında da ülkemizde yeterince kullanım alanına sahip olmayan keçiyoynuzu ekstraktında immobilize *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile etanol üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla dört faktörlü Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu kullanılmıştır. Denemeler sonucunda verim değerleri göz önüne alındığında Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının, üretkenlik oranları göz önüne alındığında ise Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma ve immobilize edilen hücre miktarının etanol fermantasyonunda istatistiksel olarak ($P<0.05$) önemli olduğu bulunmuştur. Optimum şartlar ise %2 Ca-aljinat konsantrasyonu, 150 d/d karıştırma hızı, %5 immobilize edilen hücre miktarı ve pH 5.5 olarak belirlenmiş ve gerçekleştirilen doğrulama çalışmaları sonucunda verim, üretkenlik oranı ve şeker kullanım oranları sırasıyla %46.32, 3.19 g/L/sa ve %90.66 olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında immobilize hücrelerin çevrim sayısı belirlenmiş olup verimde azalma olmasına karşın 5 çevrim boyunca boncuklar başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Son olarak zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında optimum şartlarda immobilize hücrelerle pH kontrollü ve kontrolsüz olarak

gerçekleştirilen denemeler sonucunda keçiyoynuzu ekstraktının doğrudan etanol üretiminde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Keçiyoynuzu ekstraktı, etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, immobilizasyon, Cevap Yüzey Metodu

JÜRİ : Yrd. Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)
Prof. Dr. Mustafa KARHAN
Prof. M. Soner BALCIOĞLU

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF ETHANOL PRODUCTION FROM CAROB POD EXTRACT BY USING *Saccharomyces cerevisiae* CELLS IMMOBILIZED IN CA-ALGINATE

Ercan YATMAZ

M. Sc. Thesis in Food Engineering

Adviser: Asst. Prof. Dr. İrfan TURHAN

July, 76 pages

Usage of food wastes and agricultural products with their high sugar content in biotechnological processes has increased recently because the production of value added products by using these resources provide a positive contribution to the economy. In this study, optimization of ethanol production from carob pod extract was carried out by using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Consequently, four-factor Box-Behnken Response Surface Method design was used for optimization. Results showed that Ca-alginate concentration and the amount of cells that entrapped in beads were significant for yield values and Ca-alginate concentration, agitation rate and the amount of cells that entrapped in beads were significant for production rates. Optimum conditions for ethanol fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* cells were determined to be %2 Ca-alginate concentration, 150 rpm agitation rate, %5 amount of cells that entrapped in beads and pH 5.5. After validation experiments yield, production rate and sugar utilization rate were 46.23%, 3.19 g/L/h and 90.66% respectively as well as the fermentation time was decreased to 24 hours. And also cycle number of the immobilized cells was determined and the immobilized cells could be used for five cycles successfully although it had been a decrease to yield. Finally, carob pod extract was used for ethanol fermentation by controlled and uncontrolled pH without any enrichment and the results show that carob pod extract can be used without any enrichment.

KEYWORDS: Carob pod extract, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, immobilization,
Response Surface Method

COMMITTEE : Asst. Prof. Dr. İrfan TURHAN (Adviser)
Prof. Dr. Mustafa KARHAN
Prof. Dr. M. Soner BALCIOĞLU

ÖNSÖZ

Biyoteknoloji alanında gelişmiş ülkelerin öncülüğünde yeni teknolojilerin ortaya konmasının en temel sonucu gıda atıklarının ve şekerce zengin ancak değerlendirilme olanakları kısıtlı olan tarım ürünlerinin katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılabilirliğinin sağlanmış olmasıdır. Bu durum hem gıda atıklarının imha problemini çözmekte hem de tarımda önemi düşük olan ürünlerin yeni alanlarda değerlendirilmesini sağlayarak ülke ekonomilerine katkı sağlamaktadır.

Gelişmekte olan dünyamızın enerji ihtiyacı her geçen gün artmakta iken enerjimizin büyük bir kısmını karşıladığımız fosil yakıtlar her geçen gün azalmaktadır. Bu durum gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri yeni enerji kaynakları aramaya yöneltmiştir. Bu bağlamda gıda atıklarından ve değerlendirilme olanakları kısıtlı olan maddelerden katma değeri yüksek ürünlerin elde edilmesi denilince akla ilk gelen ürün olan **etanol** petrol ürünlerine bağımlı olan dünyamızda yeni yakıt kaynakları arayışında en temel ürün olarak tüm dikkatleri üzerine çekmiştir. Günümüzde dünyada 23000 milyon litre üretilmekte ve yeni yapılan tesislerle de üretimi her geçen yıl artmaktadır. Son yıllarda benzine farklı oranlarda eklenerek araç yakıtı olarak da kullanılabilen etanol, tıpta sterilizasyon amaçlı, kimya alanında hammadde olarak, laboratuvar çalışmalarında çözücü ve sterilizasyon amaçlı yıllardır kullanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilme olanakları kısıtlı olan keçiboynuzu meyvesinin, yüksek şeker içeriğinden ötürü biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilir olması nedeniyle etanol üretimlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında immobilize hücrelerle üretilen etanolün optimum üretim şartları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların sanayide kullanılabilir olduğu ve büyük ölçekli tesis kurulduğunda bu verilerden yararlanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmanın bundan sonra gerçekleştirilecek olan üretim ve saflaştırma çalışmalarına da ışık tutacak nitelikler içerdiği düşünülmektedir. Dünyada yüksek miktarlarda üretimi gerçekleştirilen ve azımsanmayacak fiyatlarla pazarlanan bu katma değeri yüksek ürünün ülkemizde de yeterli düzeylerde üretiminin sağlanması ile yeni iş konuları açılacak ve bu konudaki dışa bağımlılığımız da azalabilecektir.

Bana bu konuyu araştırma fırsatı veren, çalışmalarım sırasında bana olan güveni ile beni cesaretlendiren, fikirleri ile her zaman yol gösterici olan, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmaya materyal desteği sağlayan Yenigün A.Ş. yetkililerine, çalışmanın analiz kısmında yardımlarından dolayı Kimyager Taner ERKAYMAZ (Akdeniz Üni. Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi) ve Uzman H. Aydan BÜYÜKBENLİ'ye (Akdeniz Üni. Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi), tezimin hazırlanması sırasında bana her konuda destek olan Araş. Gör. Cüneyt DİNÇER'e (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), ayrıca çalışmamı mali yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her evresinde bana inanan, güvenen ve kayıtsız şartsız destekleyen aileme teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Keçiboynuzu Meyvesi, Bileşimi ve Değerlendirilme Yöntemleri.....	3
2.2. Fermantasyon Mikrobiyolojisi.....	5
2.3. Mikroorganizmaların Gelişmeleri İçin Gerekli Maddeler.....	6
2.4. Mikroorganizmalarda Beslenme Tipleri.....	7
2.5. Fermantasyon Yöntemleri.....	8
2.5.1. Kesikli fermantasyon.....	8
2.5.2. Sürekli fermantasyon.....	9
2.5.3. Yarı-kesikli fermantasyon.....	9
2.6. Mikroorganizmaların Üreme Kinetiği ve Gelişim Eğrisi.....	10
2.6.1. Lag fazı.....	11
2.6.2. Logaritmik faz.....	12
2.6.3. Durma fazı.....	14
2.6.4. Ölme fazı.....	15
2.7. Mikrobiyel Gelişmeye Etki Eden Faktörler.....	15
2.8. İmmobilizasyon.....	18
2.8.1. Taşıyıcı bağlama metodu.....	19
2.8.2. Çapraz bağlama metodu.....	20

2.8.3. Tutuklama metodu	21
2.9. Etanol.....	21
2.10. Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal.....	29
3.2. Fermantasyonlarda Kullanılan Biyoreaktör	29
3.3. Fermantasyon Ortamı İçin Gerekli Ekstraktın Eldesi	30
3.4. Fermantasyonla Etanol Üretimi.....	30
3.4.1. Kullanılan mikroorganizma	30
3.4.2. İmmobilizasyon	30
3.4.3. Fermantasyon.....	32
3.5. Analiz metotları	34
3.5.1. Toplam hücre kütle (biyokütle) miktarı.....	34
3.5.2. Etanol analizi	34
3.5.3. Şeker analizi.....	35
3.5.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi	36
3.5.5. İstatistiksel değerlendirmeler	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	38
4.1. Ca-aljinatta İmmobilize Edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kullanılarak Gerçekleştirilen Etanol Üretiminin Cevap Yüzey Metodu İle Optimizasyonu... 38	
4.1.1. Ca-aljinat konsantrasyonunun fermantasyon üzerine etkisi	38
4.1.2. Karıştırma hızının fermantasyon üzerine etkisi	42
4.1.3. İmmobilize edilen hücre konsantrasyonunun fermantasyon üzerine etkisi ...	43
4.1.4. pH'nın fermantasyon üzerine etkisi	44
4.1.5. Etanol üretimlerinin optimizasyonu.....	45
4.1.6. Etanol verimi ve üretim oranı için optimum şartların belirlenmesi.....	58
4.1.7. Optimize edilen modelin doğrulama denemeleri.....	59
4.1.8. Optimize edilen modelin çevrim sayısının belirlenmesi.....	62

4.1.9. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktı ile pH kontrollü ve kontrolsüz etanol üretimleri.....	65
5. SONUÇ	69
6. KAYNAKLAR	71
7. EKLER.....	76
Ek 1. İndirgen şeker analizinde kullanılan sakkaroz standart kurvesi ve verileri	76
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	: mikrogram
μL	: mikrolitre
atm	: Atmosfer basıncı
a_w	: Su aktivitesi
cm	: santimetre
dk	: dakika
g	: gram
kg	: kilogram
L	: litre
m	: metre
M	: Molar
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
N	: Normal
nm	: nanometre
sa	: saat
sn	: saniye
v	: hacim

Kısaltmalar

μ	: Mikroorganizma için spesifik gelişme hızı
μ_d	: Spesifik ölüm hızı sabiti
A.Ş.	: Anonim Şirketi
ATCC	: American Type Culture Collection
Ca-aljinat	: Kalsiyum aljinat
d/d	: devir/dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNSA	: Dinitro salisilik asit
dx/dt	: Birim zamanda biyokütle oluşumu

FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü- Food and Agricultural Organization of the United Nations
Fe-S	: demir sülfür
KA	: kuru ağırlık
OD	: Optik dansite
PEG	: Polietilen glikol
pH	: Hidrojen iyonlarınıneksi (-) logaritması
t	: zaman
TUİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
x	: Biyokütle miktarı
x_0	: Fermantasyonun başlangıcındaki biyokütle miktarı
x_{max}	: Maksimum biyokütle miktarı
S	: Substrat
P	: Ürün
S_1	: Fermantasyon sonundaki substrat miktarı
S_0	: Fermantasyon başlangıcındaki substrat miktarı
P_1	: Fermantasyon sonundaki ürün miktarı
P_0	: Fermantasyon başlangıcındaki ürün miktarı
$Y_{P/S}$: Birim substrat için üretilen ürün miktarı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikroorganizmaların sıvı besiyerinde gösterdiği tipik bir gelişim eğrisi	11
Şekil 2.2. Çeşitli mikroorganizmaların üreme hızları ve sıcaklık arasındaki ilişki	16
Şekil 2.3. Değişik tuz seviyelerine karşılık mikroorganizmaların sınıflandırılması	16
Şekil 2.4. Oksijen konsantrasyonunun üreme üzerine etkisi (a: obligat aerob, b: kuvvetli anaerob, c: fakültatif anaerob, d: mikroaerofil, e: aerotolerant anaerob)	18
Şekil 2.5. Taşıyıcı bağlama metotları	20
Şekil 2.6. Çapraz bağlanmış enzim kümesi oluşumunun şematik gösterimi, PEG: Polietilen glikol	20
Şekil 2.7. Farklı tutuklama metotları	21
Şekil 2.8. Glukozdan etanol üretim reaksiyonu	23
Şekil 3.1. Biostat B Plus Biyoreaktör	29
Şekil 3.2. İmmobilizasyon işlem basamakları	31
Şekil 3.3. İndirgen şeker analizinde ölçüme hazır örnekler	36
Şekil 4.1. İmmobilize edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen etanol verim değerleri	50
Şekil 4.2. İmmobilize edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen üretim oranı değerleri	50
Şekil 4.3. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık Ca- aljinat konsantrasyonu ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafığı	51
Şekil 4.4. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık Ca- aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafığı	52
Şekil 4.5. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık Ca- aljinat konsantrasyonu ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafığı	52
Şekil 4.6. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık karıştırma hızı ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafığı	53

Şekil 4.7. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık karıştırma hızı ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.....	54
Şekil 4.8. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık immobilize edilen hücre miktarı ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği	54
Şekil 4.9. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.....	55
Şekil 4.10. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.....	56
Şekil 4.11. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği	56
Şekil 4.12. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık karıştırma hızı ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği	57
Şekil 4.13. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık karıştırma hızı ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği	57
Şekil 4.14. <i>Saccharomyces cerevisia</i> ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık pH ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.....	58
Şekil 4.15. İmmobilize edilmiş <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tarafından optimum koşullarda gerçekleştirilen fermantasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretim grafiği.....	61
Şekil 4.16. Çevrim boyunca şeker tüketimi	63
Şekil 4.17. Çevrim boyunca etanol üretimi.....	64
Şekil 4.18. Çevrim boyunca verim değerleri	64
Şekil 4.19. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında pH kontrollü etanol fermantasyonu	66

Şekil 4.20. Zenginleştirilmemiş keçiboynuzu ekstraktında pH kontrolsüz etanol fermantasyonu	68
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. TUIK verilerine göre yıllık toplam keçiboynuzu üretim miktarları	3
Çizelge 2.2. Mikroorganizmaların gelişim gösterdiği a_w değerleri	17
Çizelge 2.3. Yıllara göre etanol üretim oranları	22
Çizelge 2.4. Etanol üretiminde potansiyel karbon kaynakları	23
Çizelge 3.1. Fermantasyon için cevap yüzey metodunda kullanılacak parametreler	32
Çizelge 3.2. Cevap yüzey metodunun oluşturduğu fermantasyon şartları	33
Çizelge 4.1. Etanol üretiminde verim için Cevap Yüzey Metodu sonuçları	39
Çizelge 4.2. Etanol üretiminde maksimum tüketim oranı ve üretim oranı açısından Cevap Yüzey Metodu sonuçları	41
Çizelge 4.3. Etanol verimleri için tahmin edilen regresyon katsayıları	46
Çizelge 4.4. Model denklemdaki verimin varyans analizi	47
Çizelge 4.5. Etanol üretim oranları için tahmin edilen regresyon katsayıları	48
Çizelge 4.6. Model denklemdaki üretim oranının varyans analizi	49
Çizelge 4.7. Keçiboynuzu ekstraktında optimum şartlarda gerçekleştirilen etanol fermantasyonu	60
Çizelge 4.8. Optimum şartlarda <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile gerçekleştirilen fermantasyon denemesine ait kinetik parametreler	61
Çizelge 4.9. Optimum şartlarda gerçekleştirilen çevrimlerin kinetik parametreleri	62
Çizelge 4.10. Zenginleştirilmemiş keçiboynuzu ekstraktında optimum şartlarda gerçekleştirilen pH kontrollü etanol fermantasyonu	65
Çizelge 4.11. Zenginleştirilmemiş keçiboynuzu ekstraktında optimum şartlarda gerçekleştirilen pH kontrolsüz etanol fermantasyonu	67

1. GİRİŞ

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) dört mevsim yaprağını dökmeyen, yüksekliği 10 m'ye kadar ulaşabilen, kalın gövdeye ve sağlam dallara sahip bir bitkidir (Battle ve Tous 1997). Akdeniz orjinli olan bitkinin meyvesi ülkemizde “keçiboynuzu” veya “harnup” olarak bilinmekte olup dünyadaki üretim alanlarına bakıldığında büyük çoğunluğunu Akdeniz ülkelerinin oluşturduğu görülmektedir. Üretim miktarı yıllık 110000-130000 ton arasında değişmekte olup bu üretimin %43'ü İspanya, %19'u Fas, %18'i Portekiz, %12'si Yunanistan ve %11'i Türkiye tarafından gerçekleştirilmektedir (FAO 2012). Ülkemizde yıllık 12000-14400 ton keçiboynuzu üretilmekte (TUİK 2012) ve elde edilen meyve keçiboynuzu gamı üretiminde ve geleneksel yöntemlerle keçiboynuzu pekmezi üretiminde kullanılmaktadır.

Keçiboynuzu meyvesinin bileşimine bakıldığında toplam şeker içeriğinin %28.2-82.3 arasında değiştiği görülmektedir. Şeker içeriğindeki bu geniş aralığın nedeni keçiboynuzunun yabani ve aşılı olmak üzere iki farklı tipten oluşması ve aşılı tiplerin yabaniye göre daha fazla oranda şeker içermesi olarak gösterilmektedir (Biner vd 2007). Keçiboynuzu meyvesinin %90'ını meyvenin etli kısmı, geri kalanını ise çekirdek oluşturmaktadır. Genellikle aşılı tiplerden üretilmekte olan keçiboynuzu pekmezi yoğun aroması nedeniyle tüketici tarafından yüksek bir talep görememektedir. Bu nedenle keçiboynuzunun değerlendirilmesi amacıyla farklı çalışmalar gerçekleştirilmiş olup bu çalışmalar kapsamında keçiboynuzunun fermantasyon proseslerinde karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda üretilen ürünler arasında laktik asit (Bulut vd 2004, Turhan vd 2010b), mannitol (Carvalho vd 2011), dokosaheksaenoik asit (Mendes vd 2007), yoğurt (Atasoy 2009, Celik 2010), sitrik asit (Lingappa vd 2007) ve biyokontrol ajanı (fungusit: *Pantoea agglomerans* PBC-1) (Manso vd 2010) yer almaktadır.

İmmobilizasyon, biyolojik olarak aktif bir materyalin tutuklanmasını ifade etmektedir. Burada taşıyıcı materyale tutuklanan biyokatalizör tek bir enzim, enzim karışımı veya canlı bir hücre olabilmektedir. Son yıllarda dikkatleri üzerine çeken immobilizasyon prosesi sayesinde aynı hücrenin birden fazla fermantasyon prosesinde

rahatça kullanılabilirliği sağlanmış ve biyokatalizör kaybı en düşük seviyelere indirgenmiştir.

Dünyanın enerji ihtiyacı her geçen gün artmakla beraber fosil yakıtlar da günden güne hızla azalmaktadır. Bu durum alışlagelmiş fosil yakıtların yerine kullanılacak alternatif ürünler ve bunların üretim yöntemlerinin belirlenmesini zorunlu kılmıştır. Gelişmiş ülkeler bu yeni teknolojilerin ortaya konmasında öncül olmuşlar ve bu alanda **etanol** petrole alternatif bir ürün olarak tüm dikkatleri üzerine çekmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda basit şekerler bakımından zengin ve ucuz olan kaynaklar kullanılarak etanol üretimlerinde farklı mikroorganizmalar ve farklı fermantasyon yöntemleri geliştirilmiş ve geliştirilmeye de devam etmektedir. Yakıt olarak kullanımının yanı sıra etanol, gıda katkı maddesi, içecek üretimi ve bilimsel çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Keçiboynuzu Meyvesi, Bileşimi ve Değerlendirilme Yöntemleri

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) dört mevsim yaprağını dökmeyen, yüksekliği 10 m'ye kadar ulaşabilen, kalın gövdeye ve sağlam dallara sahip bir bitkidir (Battle ve Tous 1997). Akdeniz orjinli olan bitkinin meyvesi ülkemizde “keçiboynuzu” veya “harnup” olarak bilinmektedir. Dünyadaki üretim alanlarına bakıldığında büyük çoğunluğunu Akdeniz ülkelerinin oluşturduğu görülmektedir. Üretim miktarı yıllık 110000-130000 ton arasında değişmekte olup bu üretimin %43'ü İspanya, %19'u Fas, %18'i Portekiz, %12'si Yunanistan ve %11'i Türkiye tarafından gerçekleştirilmektedir (FAO 2012). Dünyada ilk beşte yer alan ülkemizde %97'lik kısmı Akdeniz bölgesinde olmak üzere yıllık 12000-14400 ton arasında keçiboynuzu üretilmektedir (TUİK 2012) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. TUİK verilerine göre yıllık toplam keçiboynuzu üretim miktarları

Yıl	Toplu meyveliklerin alanı (Dekar)	Toplam Üretim (Ton)	Akdeniz Bölgesi Üretim (Ton)	Ağaç başına ortalama verim (kg)	Meyve veren yaşta ağaç sayısı	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı
2001	2150	13500	13133	44	304000	50000
2002	2150	13500	13058	44	306000	48000
2003	2150	14000	13711	44	315000	48000
2004	2170	14000	13716	44	316000	48000
2005	3040	12000	11724	43	282000	58000
2006	3280	12388	12104	44	282685	53346
2007	2720	12097	11785	51	238570	36645
2008	2732	14413	14100	51	284789	41440
2009	2714	14003	13677	49	284933	38714
2010	3323	14172	13763	55	256855	48457

Keçiboynuzu meyvesi çekirdek ve meyve eti olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Genel olarak keçiboynuzunun %90'ını meyve eti, %10'unu çekirdek oluştururken (Biner vd 2007, Naghmouchi vd 2009) bazı farklı kökene sahip tiplerde ise %80'ini meyve eti ve %20'sini çekirdek oluşturmaktadır (El Batal vd 2011). Keçiboynuzu meyvesinin bileşimi ağaçtan ağaca ve yetiştiği yöreye göre değişmekle beraber asıl farklılık yabani veya aşılı olmasından ileri gelmektedir (Tetik vd 2011, Biner vd 2007). Yabani tiplerde meyve ağırlığı 29.16-120.28 g arasında değişmekte, ortalama boyut ölçüleri 18.16 mm, 16.18 cm ve 6.42 mm (en, boy ve kalınlık) ve çözünebilir kuru madde miktarı %59.42 iken aşılı tiplerde meyve ağırlığı 71.71-147.91 g arasında, ortalama boyut ölçüleri 21.79 mm, 16.91 cm ve 8.79 mm (en, boy ve kalınlık) ve çözünebilir kuru madde miktarı %64.06 olarak karşımıza çıkmaktadır. Toplam asitlik ise her iki tipte aynı olup ortalama %0.78 civarındadır (Tetik vd 2011). Toplam şeker içeriği ise yabani tiplerde %28.2-56.48 arasında değiştirmekte ve bu şekerin %23'ünü fruktoz, %8'ini glukoz ve %68'ini sakkaroz oluşturmaktadır. Aşılı tiplerde ise toplam şeker içeriği %39.6-82.3 arasında değişmekte ve bu şekerin %22'sini fruktoz, %6'sını glukoz ve %72'sini sakkaroz oluşturmaktadır (Biner vd 2007). Bunların yanı sıra en fazla bulunan amino asitler sırasıyla aspartik asit (18.25 g/100 g kuru ağırlık-KA), alanin (10.55 g/100 g KA), glutamik asit (9.65 g/100 g KA), lösin (9.30 g/100 g KA) ve valinden (9.05 g/100 g KA); fenolik asitler ise sırasıyla benzoik asit türevleri (3276.8 µg/g KA) ve sinamik asit türevlerinden (4.5 µg/g KA) oluşmaktadır (Ayaz vd 2007). Keçiboynuzun başlıca mineral içeriğini potasyum (970 mg/100 g KA), kalsiyum (300 mg/100 g KA), fosfor (71 mg/100 g KA) ve magnezyum (60 mg/100 g KA) oluştururken iz elementler ise demir (1.88 mg/100 g KA), mangan (1.29 mg/100 g KA), bakır (0.85 mg/100 g KA) ve çinkodan (0.75 mg/100 g KA) oluşmaktadır (Ayaz vd 2007).

Keçiboynuzu meyvesi üretildiği ülkelerde öncelikli olarak keçiboynuzu gamı üretiminde kullanılmasının yanı sıra hayvan rasyonlarında ve insan beslenmesinde de kullanılmaktadır (Battle ve Tous 1997). Keçiboynuzu çekirdeğinin endosperminden elde edilen keçiboynuzu gamının kimyasal bileşimi bir polisakkarit olan galaktomannandır. Elde edilen gam gıda endüstrisinde dondurma, çorbalar, peynir, meyve turtaları, konserve etler, şekerleme, fırıncılık ürünleri ve hayvan gıdaları başta

olmak üzere birçok gıdada kullanım alanına sahiptir (Battle ve Tous 1997). Keçiboynuzu meyvesi ülkemizde ve dünyada geleneksel yöntemlerle (su ile ekstraksiyon) pekmez üretiminde de kullanılmaktadır. Bir diğer kullanım şekli kavrulup öğütülerek elde edilen keçiboynuzu unu olup, ürün %38.7 toplam şeker, %7.24 lif ve %3.75 tanenleri içermekte ve su aktivitesi değeri 0.33 olarak bildirilmektedir (Yousif ve Alghzawi 2000).

Gıda endüstrisinde birçok kullanım alanına sahip keçiboynuzu meyvesi şeker içeriğinin yüksek olması nedeniyle son yıllarda biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Santos vd (2005) yapmış oldukları bir çalışmada, keçiboynuzu ekstraktının dekstran ve fruktoz üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabilceğini belirlemişlerdir. Keçiboynuzu ekstraktında etanol üretimi üzerine gerçekleştirilen flask denemelerinde ise *Zymomonas mobilis*'in başarılı bir şekilde çalıştığı gözlenmiştir (Vaheed vd 2011). Benzer çalışmalarda ise keçiboynuzu ekstraktında *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol üretimleri de gerçekleştirilmiştir (Turhan vd 2010a, Sánchez vd 2010). Keçiboynuzu ekstraktı etanol üretiminin yanı sıra laktik asit (Bulut vd 2004, Turhan vd 2010b), mannitol (Carvalho vd 2011), dokosaheksaenoik asit (Mendes vd 2007), yoğurt (Atasoy 2009, Celik 2010), sitrik asit (Lingappa vd 2007) ve biyokontrol ajanı (fungusit: *Pantoea agglomerans* PBC-1) (Manso vd 2010) üretiminde de başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

2.2. Fermantasyon Mikrobiyolojisi

Fermantasyon en genel ifade ile organik maddelerin hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak görev yaptığı ve ATP'nin substrat seviyesinde fosforilasyon aracılığı ile üretildiği anaerobik katabolizma olarak tanımlanabilmektedir. Fermantasyon tekniği yüzyıllardır kullanılmakta olan bir teknik olup genel olarak kullanım amaçları şu şekildedir (Ertugay ve Certel 1995, Smith 2004);

- ❖ Yeni ürün üretiminde mikroorganizmaların kullanılması.
- ❖ Tek hücre proteini olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen enzim, vitamin ve antibiyotiklerin üretilmesi.

- ❖ Atıkların mikroorganizmalar yardımıyla arıtılması veya değerlendirilmesi.
- ❖ Enerji eldesi (biyoetanol üretimi).
- ❖ Bazı kimyasal maddelerin fermantasyon esnasında biyosentezi veya transformasyonu.

Fermantasyonla yeni ürünlerin elde edilmesinde saf kimyasalların kullanılabilmesinin yanı sıra keçiboynuzu ekstraktı (Turhan vd 2010a), şeker kamışı melası (Ghorbani vd 2010), mısır unu hidrolizatı (Nicolíć vd 2009) gibi kompleks karbon kaynakları ve endüstride üretim esnasında elde edilen atık sular (zeytinyağı, patates cipsi, mısır vs. üretiminde elde edilen atık sular) gibi yan ürünler de kullanılabilir (Smith 2004). Saf kimyasalların yerine yan ürünlerin kullanılması elde edilen ürünün maliyetini azaltmasının yanı sıra doğaya atık olarak bırakılacak ürünlerin de değerlendirilmesini sağlamaktadır.

2.3. Mikroorganizmaların Gelişmeleri İçin Gerekli Maddeler

Mikroorganizmaların gelişmelerini sağlayabilmeleri için gerekli olan maddelerin tümü besin olarak adlandırılmakla beraber mikroorganizmaların gelişebilmeleri için gerekli tüm besin öğelerinin ortamda bulunması gerekmektedir. Gereksinim duyulan miktarlarına göre besinler majör elementler (g/L düzeyinde gereksinim duyulanlar) ve minör elementler (mg/L veya µg/L düzeyinde gereksinim duyulanlar) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır (Tunail 2009).

Majör besinlerin başında karbon ve azot kaynakları gelmektedir. Mikroorganizmalar gelişimlerini sağlamak için karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar ve farklı karbon kaynaklarında gelişim gösterebilirler (Madigan ve Martinko 2006). Mikroorganizmalar saf kimyasallarda gelişebildikleri gibi gıda atık ve yan ürünlerinde bulunan kompleks şeker kaynaklarını da kullanarak gelişimlerini sağlayabilirler. Karbon kaynağı olarak saf kimyasalların yerine değerlendirilme olanağı kısıtlı veya atık olan ürünlerin kullanılması hem ürünlerin ve/veya atıkların değerlendirilmesini sağlamakta hem de üretim maliyetini azaltmaktadır. İkincil majör besin olarak ihtiyaç duyulan

madde azot kaynağıdır. Mikroorganizmalar molekül halindeki azotu kullanma yeteğine sahip olmalarının yanı sıra amonyum tuzları, nitrat ve nitriti amonyuma dönüştürerek de azot kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Tunail 2009). Diğer majör besinler ise hücrede nükleik asit ve fosfolipitlerin sentezi için gerekli olan fosfor, sülfid (HS^-) ya da sülfat (SO_4^{2-}) halinde inorganik kaynaklardan sağlanan kükürt, enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan potasyum ve magnezyum, hücre duvarını stabilize etmeye yardımcı olan kalsiyumdur (Madigan ve Martinko 2006).

Minör elementler hücrelerde eser miktarlarda gereksinim duyulmalarına rağmen hücrelerde enzimlerin bileşiminde rol almalarından dolayı hayati önem taşımaktadırlar. Minör elementler arasında demir, bor, krom, kobalt, bakır, manganez, molibden, nikel, selenyum, tungsten ve çinko sayılabilmektedir (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009). Minör elementlerden bazılarının işlevi şu şekildedir: demir sitokromlarda ve Fe-S proteinlerinde elektron taşıyıcısı, nikel üreaz enziminin kofaktörü, magnezyum su dehidrogenaz enziminin kofaktörü, bakır mitokondriyal oksidazın bileşeni, çinko dehidrogenazların kofaktörüdür (Tunail 2009).

Tüm bu besin öğelerinin yanı sıra gelişme faktörleri olarak isimlendirilen bazı vitaminler, aminoasitler, pürin ve primidinlerin alınmasına gereksinim duyan mikroorganizmalar da olabilir (Tunail 2009). Bu maddeler genellikle hücre içerisinde kofaktör olarak görev yapmaktadırlar ve bazı mikroorganizmalar gelişim gösterebilmek için bu maddelere gereksinim duyarlar.

2.4. Mikroorganizmalarda Beslenme Tipleri

Mikroorganizmalar gelişmelerini sağlamak için enerjiye ihtiyaç duyarlar ve enerji ihtiyaçlarını farklı yollardan karşılarlar. Mikroorganizmalar enerji gereksinimlerini sağlama yollarına göre güneş ışığını kullanarak enerji sağlayan “fototrof mikroorganizmalar” ve kimyasal maddelerin oksidasyonu ile enerji sağlayan “kemotrof mikroorganizmalar” olmak üzere ikiye ayrılırlar (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

Fototrof mikroorganizmalar karbon kaynağı olarak CO₂ kullanıyorlarsa “fotolitotrof-ototrof”, organik bileşikleri kullanıyorlarsa da “fotoorganotrof-heterotrof” olarak isimlendirilirler. Kemotrof mikroorganizmalar ise karbon kaynağı olarak CO₂ kullanıyorlarsa “kemolitotrof-ototrof”, organik bileşikleri kullanıyorlarsa “kemoorganotrof-heterotrof” olarak isimlendirilirler (Madigan ve Martinko 2006). Bu beslenme tiplerinin yanı sıra “mikrostrof” beslenme tipi de mevcuttur. Bu beslenme tipinde mikroorganizma karbon kaynağı olarak CO₂ ve organik bileşikleri metabolizmalarında kombine olarak kullanabilen veya inorganik ve organik enerji kaynaklarını bir arada kullanabilen mikroorganizmalardır (Tunail 2009). Ayrıca bazı mikroorganizmalar yalnızca tek tip beslenme özelliği göstermelerine rağmen bazı mikroorganizmalar ise olumsuz koşullarla karşılaştığında farklı bir beslenme tipine geçme kabiliyeti gösterebilmektedirler (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

2.5. Fermantasyon Yöntemleri

Kesikli, yarı-kesikli ve sürekli fermantasyon olmak üzere üç farklı yöntemle gerçekleştirilebilmekte olan fermantasyon prosesinde hangi yöntemin seçileceği biyokütlenin substratı kullanma özelliğine ve elde edilecek ürüne göre değişmektedir (Shetty vd 2006).

2.5.1. Kesikli fermantasyon

Sisteme sonradan besin kaynağı eklenmediğinden kapalı kültür sistemi olarak da adlandırılan kesikli fermantasyon prosesi, stok kültürden ön kültür elde edilmesi ve fermentöre aşılama yapıldıktan sonra üretimin sonlanmasına kadar bir dizi işlemden oluşmaktadır (Shetty vd 2006). Kesikli fermantasyonlarda kültür ortamının kompozisyonu, biyokütle ve metabolit konsantrasyonu sürekli olarak değişim göstermektedir ve mikroorganizma gelişim hızı da fermantasyonun başlangıcında yavaş, sonraki süreçte ise en yüksek seviyelerinde seyretmektedir (Ertugay ve Certel 1995). Kesikli fermantasyonlarda substrat konsantrasyonundaki düşüğe karşın metabolitlerin ortamda birikmesi gelişmeyi sınırlamaktadır (Tunail 2009). Kesikli fermantasyon prosesinin hazırlık aşamalarının (sterilizasyon, besiyeri, inokülasyon vs.) kolaylıkla

standardize edilebilişi, cihazın kontrol edilebilirliğinin kolay oluşu ve bulaşma riskinin azlığı hem bilimsel çalışmalarda hem de endüstride kullanımını kolaylaştıran avantajlarından (Ertugay ve Certel 1995). Etanol üretiminde de yaygın olarak kullanılan kesikli fermantasyonun süresi kullanılan mikroorganizma, elde edilecek ürün ve çalışma koşullarına bağlı olarak saatler veya haftalar sürebilmektedir (Shetty vd 2006).

2.5.2. Sürekli fermantasyon

Sürekli fermantasyon, kullanılmış besiyerine karşılık aynı oranda besin maddelerini içeren besiyerinin ortama beslenmesi ile mikroorganizmaların gelişiminin logaritmik fazda tutulmaya çalışıldığı açık bir sistemdir (Shetty vd 2006). Sürekli fermantasyonun tercih edilmesinin temel nedeni statik kültür sistemlerinde ortama herhangi bir besin ilavesi veya ortamdaki metabolitlerin uzaklaştırılması söz konusu olmadığından logaritmik fazda seyreden mikroorganizma gelişiminin birkaç generasyon sonrasında durma fazına geçmesidir (Tunail 2009). Mikroorganizmanın durma fazına geçmesinde temel iki etken; ortamda kullanılabilir substrat miktarının azalması ve ortamda metabolitlerin birikmesidir. Mikroorganizmanın durma fazına geçmemesi; ortama sürekli olarak taze besiyeri beslenerek substrat azalımının ve ortamdaki sürekli olarak fermente sıvı alınarak metabolit birikiminin kontrol altına alınması ile sağlanmış olmaktadır. Sürekli sistemlerde dikkat edilecek en önemli durum, kültür kabında belli bir hızla logaritmik fazda gelişen hücreler ile kültür kabından kullanılmış besiyeri içinde uzaklaştırılan hücrelerin (hücre kaybının) dengede tutulmasıdır (Tunail 2009).

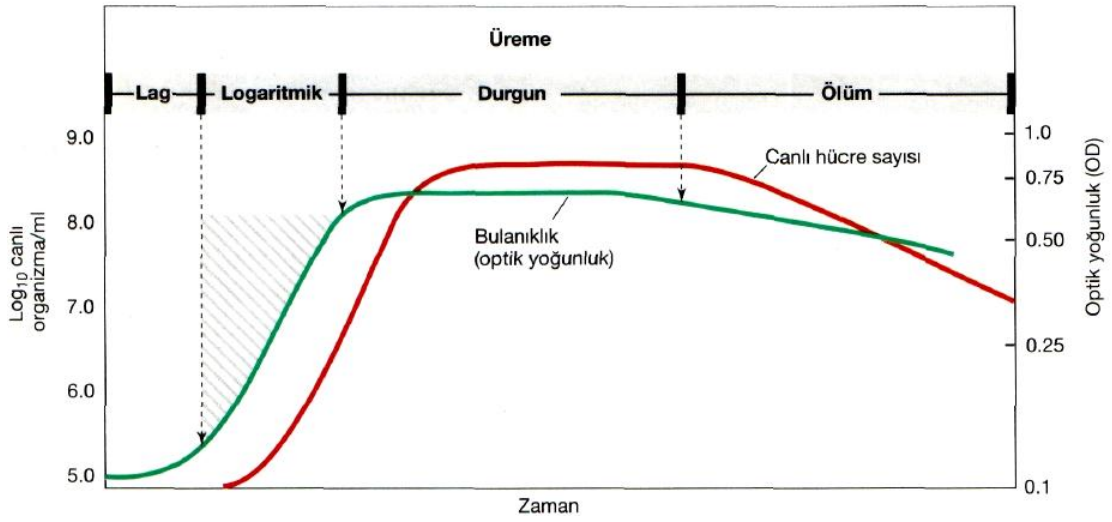
2.5.3. Yarı-kesikli fermantasyon

Yarı-kesikli fermantasyon yöntemi, kesikli fermantasyon ile sürekli fermantasyon tekniklerinin her ikisini de içeren bir sistemdir. Mikroorganizma gelişiminden bağımsız olarak üretilen ürünlerde kesikli ve sürekli sistemler uygun değildir. Bu tip sistemler kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde öncelikli olarak yüksek yoğunlukta mikroorganizma gelişiminin sağlanması hedeflenmektedir. Ardından fermantasyon ortamına öncül maddeler, karbon kaynakları ve oksijen ilavesi, hücreyi

koruyacak ve ürün üretimini sağlayacak düzeyde eklenerek üretim sağlanmaktadır. Buradan da anlaşılacağı üzere yarı-kesikli fermantasyon gelişim ve üretim fazı olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Yarı-kesikli fermantasyon sistemleri kesikli sistemlerin basit bir şekilde modifiye edilerek oluşturulmasının yanı sıra sürekli sistemlerdeki kontaminasyon riskinin bu sistemde daha az oluşuyla üstündür. Yarı-kesikli fermantasyon sistemleri hücre gelişiminde substrat miktarının gelişimi inhibe ettiği durumlarda ve ürün veya hücre veriminin düşük substrat konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu durumlarda (fırıncılık ürünleri, antibiyotik üretimi vs.) tercih edilmektedir (Shetty vd 2006).

2.6. Mikroorganizmaların Üreme Kinetiği ve Gelişim Eğrisi

Tek bir mikroorganizmanın gelişmesi denildiğinde, canlı hücrenin kütle artışı anlaşılmakta ve büyüme olarak tanımlanabilmektedir. Mikrobiyolojide ise bu durum kültürün sayıca veya kütlece artması anlamına gelmektedir. Bakteriler gibi ikiye bölünerek çoğalma gerçekleştiren mikroorganizmalarda kütle artışı ifadesi ile sayı artışı ifadesi aynı anlama gelmektedir. Maya ve küflerde ise gelişim tomurcuklanma veya sporlanma şeklinde gerçekleştiğinden kütle artışı sayısal artış ile orantılı değildir. Örneğin; funguslar gibi hücre veya hif sitoplazmalarında birden fazla çekirdek içeren mikroorganizmalarda, tekrarlanan çekirdek bölünmelerine hücre bölünmeleri eşlik etmez ve bu nedenle de kütle artışı ile hücre sayısı artışını ilişkilendirmek olanaksızdır. Fungus gelişmelerinden anlaşılan hücrelerin (misellerin) kütle artışıdır. Kesikli fermantasyon prosesinde hücre gelişimi izlendiğinde logaritmik faz bir süre devam eder ve hücre popülasyonuna ait tipik bir büyüme eğrisi ile karşılaşılır. Gelişme (Büyüme) eğrisi lag fazı, logaritmik faz, durgun faz ve ölüm fazını içeren tüm üreme döngüsünü ifade etmekte olup tipik bir gelişim eğrisi Şekil 2.1'de görülmektedir (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).



Şekil 2.1. Mikroorganizmaların sıvı besiyerinde gösterdiği tipik bir gelişim eğrisi (Madigan ve Martinko 2006)

Mikroorganizmaların üreme hızı genel olarak Monod eşitliği ile ifade edilir.

$$dx/dt = \mu x \quad (2.6.1)$$

μ : Spesifik üreme hızı

x : Mikroorganizma konsantrasyonu

dx/dt : Üreme hızı

2.6.1. Lag fazı

Hücreler taze bir besiyerine inoküle edildiğinde, yeterli besin ve ortam koşullarına rağmen derhal gelişip çoğalamazlar. Hücrelerin ortama adapte olabilmeleri için gerekli olan bu zaman dilimi lag fazı olarak isimlendirilir ve bu fazın ardından hücre kütlelerinin ve sayısının artışı başlar. Mikroorganizmaların yaşı, hasarlı olup olmaması, daha önce geliştirildiği ortam veya saklandığı sıcaklık derecesi (dondurulmuş kültür) lag fazı süresine etki eden faktörlerdir. İnokülasyon miktarı, ısı, radyasyon ya da toksik kimyasallar ile muamele neticesinde zarar görmüş (ancak ölmemiş) hücreleri içermesi de lag fazı süresini etkilemektedir. Lag fazı hücrelerin zengin kültür ortamından zayıf bir kültür ortamına aktarılması durumunda ortaya çıkar. Belirli bir

kültür ortamında üreme olabilmesi için, hücrelerin bu kültür ortamında bulunmayan zorunlu metabolitleri sentezleyebilecek özellikteki tüm enzim setini yeniden oluşturabilmesi gerekmektedir. Hücreler tüm eksikliklerini tamamlayıp DNA'larını replike edebilir duruma geldiklerinde lag fazı sona erer. Eğer inokülasyonda kullanılacak kültür birkaç kez aynı besiyerinde aktif edilip logaritmik fazdaki hücreler aşılama kullanılırsa kısa sürede logaritmik faza geçilebilir (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

Durağan fazda hücre gelişimi gerçekleşmediğinden Eşitlik 2.6.1 düzenlendiğinde;

$$\mu = 0; dx/dt = 0 \quad (2.6.2)$$

olarak ifade edilir.

2.6.2. Logaritmik faz

Mikroorganizmalar logaritmik fazda mevcut kaynaklara ve diğer faktörlere bağlı olarak her bir hücre iki hücre oluşturmak için bölünür ve oluşan bu yeni hücreler de iki yeni hücre daha oluşturmak için bölünür ve süreç böyle devam eder. Logaritmik gelişme döneminde bakterilerin bölünme (hücre sayısını ikiye katlama) hızı ve gelişme (hücre kütlelerini ikiye katlama) hızı sabittir. Aslında inokülasyondan sonra bazı bakteriler çok hızlı bölünürler ve kültürün bölünme hızı, kütleleri iki katına çıkarma hızının önüne geçebilir. Gelişmenin ilerleyen evrelerinde ise hücre kütle artışının hızı, hücre sayısındaki artışın önüne geçer. Ancak, gelişme fazı topluca incelendiğinde hücre sayısındaki artış ile kütledeki artışın ispatlanabilir şekilde aynı olduğu görülür. Logaritmik dönemde; genelde kültürün “standart hücreler” den oluştuğu, hücrelerin “dengeli gelişme” (bölünme ve kütleli artış) gösterdiği kabul edilir, dolayısıyla sayısal artış ile kütle artışının aynı olduğu varsayılır. Hücre gelişimi, hücre sayısı belirlenerek veya protein miktarı ve kuru maddedeki artış tayin edilerek izlenebilir. Ayrıca bu fazda gelişmenin takibi, artan bakteri yoğunluğunun (optik dansite, OD) spektrofotometrede izlenmesi ve absorbans değerlerinin ölçülmesiyle de mümkündür (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

Logaritmik evrede biyokütle artış hızı ile mikroorganizma konsantrasyonu doğru orantılı olup;

$$dx/dt = \mu x \quad (2.6.1)$$

eşitliği ile gösterilir. Bu denklem birinci dereceden reaksiyon eşitliği oluşturur ve denklem çözülürse

$$\mu = 1/x (dx/dt) \quad (2.6.3)$$

Burada μ ; biyokütlenin fraksiyonel artış hızını verir ve birimi zaman⁻¹ dir. Eşitlik 2.6.1'in integrali alınır;

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \mu \int_0^t dt \quad (2.6.4)$$

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2.6.5)$$

2.6.5 nolu eşitlik elde edilir. Burada x_0 , başlangıçta ($t = 0$ anında) kültür ortamına inoküle edilen mikroorganizma konsantrasyonunu, x ise herhangi bir t anındaki mikroorganizma konsantrasyonunu temsil eder.

Gelişme fazında inkübasyon zamanına karşı hücre sayılarının logaritmik değerleri düz bir çizgi halinde yükseliş gösterir. Hücrelerin fizyolojik ve kimyasal özelliklerinin aynı olduğu, generasyon süresinin görece sabit bulunduğu bu evre, kültürün gelişme hızının hesaplanması için en uygun evredir (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

2.6.3. Durma fazı

Tipik olarak üremenin kısıtlanması için ya kültür ortamındaki zorunlu besinlerin tüketilmiş olması ya da organizmaya ait bazı atık ürünlerin üremeyi engelleyecek düzeyde besiyerinde birikmiş olması gerekir. Her iki durumda da logaritmik üreme sona erer, durağan faza ulaşılır ve bu fazda bakteri kültürlerinin ulaştığı en yüksek miktar genellikle 10^9 hücre/ml'dir. *Protozoa* ve algler ise genellikle bu sayıya ulaşamazlar ve genel olarak 10^6 hücre/ml düzeyine kadar gelişirler. Durgun fazda hücre sayısında net bir artış ya da azalma yoktur. Bu fazda her ne kadar üreme olmasa da, enerji metabolizması ve bazı biyosentetik işlevler gibi birçok hücre fonksiyonu devam eder. Ayrıca olumsuz koşullara dayanıksız hücreler hızla ölürken, daha dayanıklı olanlar depo maddelerini, proteinleri kullanarak endojen solunum (Hücrede depolanmış yedek maddelerin ayrıştırılması, tüketilmesi) yaparlar ve yaşamlarını sürdürebilecek kadar az bir enerji sağlayıp canlı kalırlar. Bu fazda hücrelerin bölünmesi ile hücre ölümü arasında öyle bir denge kurulmuştur ki toplam mikroorganizma sayısı uzunca bir süre değişmeden kalır. Bu olgu kriptomatik üreme olarak adlandırılır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

Mikroorganizmaların sentezlediği ikincil metabolitler endüstriyel açıdan önem taşırlar ve bu metabolitler özellikle küflerde beslenme ve gelişim fazının sonuna doğru veya metabolit üretim fazı (durma fazı) başlangıcında birikmektedir. Durma fazında mikroorganizmalar gelişmeseler bile ilave edilen substratları katabolize ederek, biyosentez yollarının ön kademelerinde sentezlemiş oldukları ara metabolitleri antibiyotik gibi son ürünlere çevirebilirler (Tunail 2009).

Bu evrede;

$$dx/dt = 0$$

$\ln(x/x_0) = \text{sabittir}$ ve durağan fazda çoğu zaman $x = x_{\max}$ olarak kabul edilir.

2.6.4. Ölme fazı

Popülasyon durgun faza ulaştıktan sonra inkübasyon devam ederse, hücreler canlı kalıp metabolik işlemlerine devam etmekle birlikte sonuçta ölürlür. Bu durumda popülasyon üremenin ölüm fazına girer ve bazı durumlarda ölüm hücre parçalanması ile gerçekleşir. Ölüm fazı da logaritmiktir ancak hücre ölüm hızı, logaritmik üreme evresinde gerçekleşenden çok daha yavaştır (Madigan ve Martinko 2006).

Bu evrede;

$$-dx/dt = \mu_d x_{\max} \quad (2.6.6)$$

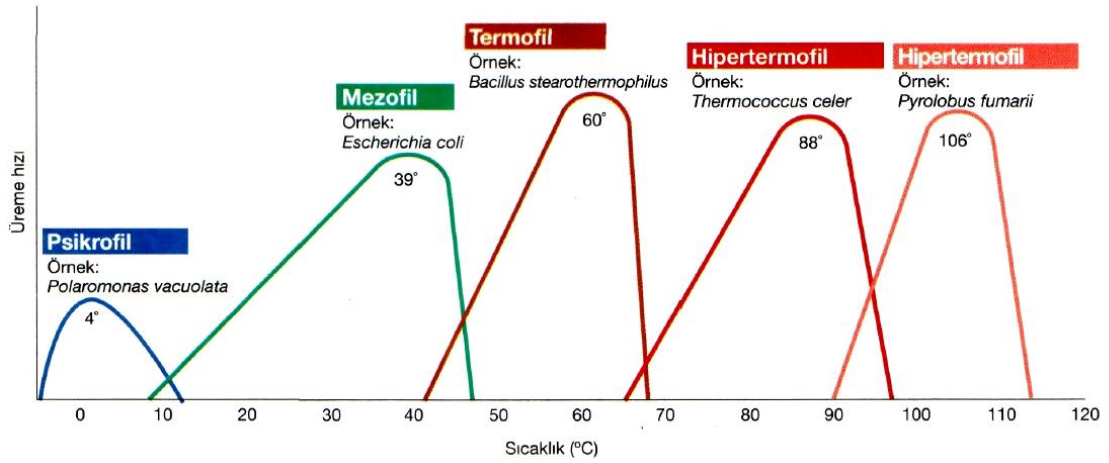
μ_d = Spesifik ölüm hızı sabiti

x_{\max} = Durağan faz biyokütle konsantrasyonu şeklinde tanımlanmaktadır.

2.7. Mikrobiyel Gelişmeye Etki Eden Faktörler

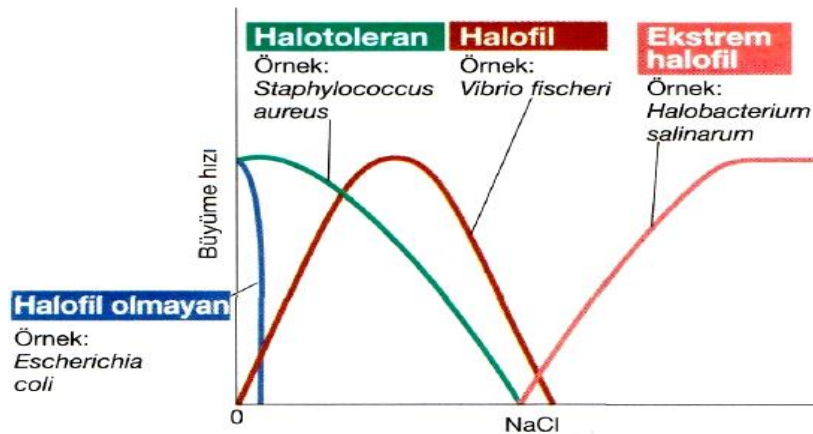
Mikrobiyel gelişmeyi etkileyen en önemli unsurlar; sıcaklık, ozmotik basınç, su aktivitesi, pH, oksijen konsantrasyonu, CO₂ konsantrasyonu ve basınçtır.

Sıcaklık canlı organizmaları iki şekilde etkiler. Sıcaklık arttıkça, hücredeki kimyasal ve enzimatik tepkimeler daha hızlı cereyan eder ve üreme hızlanır. Bununla birlikte, belirli bir sıcaklığın üstünde, belirli proteinler geri dönüşümsüz olarak denatüre olurlar. Dolayısıyla verilen bir aralık içerisinde sıcaklık arttıkça, üreme ve metabolik işlemler denatürasyon reaksiyonlarının başladığı noktaya kadar artar. Bu noktanın üstünde, hücre fonksiyonları hızla sıfıra düşer. Sıcaklık optimumlarına göre mikroorganizmalar psikrofiller, mezofiller, termofiller ve hipertermofiller olmak üzere dört grup altında toplanmaktadır (Şekil 2.2) (Madigan ve Martinko 2006).



Şekil 2.2. Çeşitli mikroorganizmaların üreme hızları ve sıcaklık arasındaki ilişki (Madigan ve Martinko 2006)

Bir bileşik ya da çözelti ile denge halinde olan havadaki buhar basıncının saf suyun buhar basıncına oranı su aktivitesi (a_w) değerini vermektedir. Su aktivitesi değeri 0 ile 1 arasında değişim göstermekte olup ozmotik basınç ile arasında ters bir ilişki vardır. Materyal yüksek ozmotik basınca sahipse, diğer bir ifade ile materyalde kuru madde oranı yüksek ise a_w değeri düşüktür. Mikroorganizmalar ozmotik basınca dayanımlarına göre (Şekil 2.3) ve gelişim gösterdikleri a_w değerlerine göre (Çizelge 2.2) farklılık göstermektedirler (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).



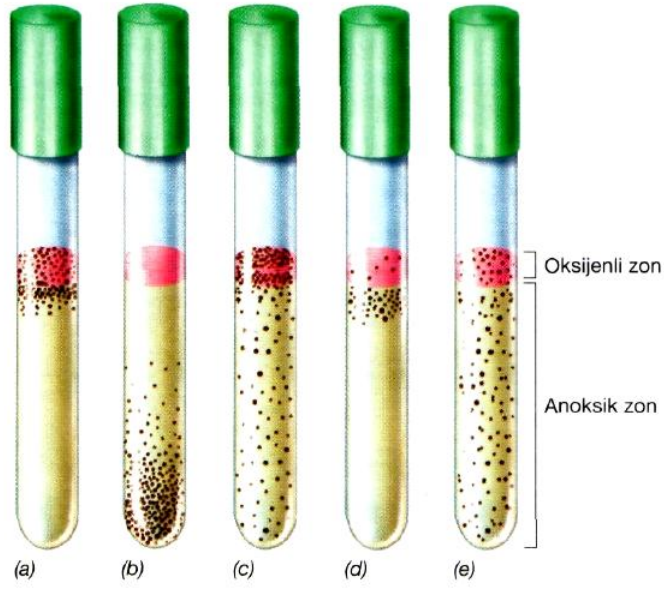
Şekil 2.3. Değişik tuz seviyelerine karşılık mikroorganizmaların sınıflandırılması (Madigan ve Martinko 2006)

Çizelge 2.2. Mikroorganizmaların gelişim gösterdiği a_w değerleri (Madigan ve Martinko 2006)

Bakteriler	0.97-0.90
Tatlı su siyanobakterileri	0.98
Deniz siyanobakterileri	0.92
Tuz gölü siyanobakterileri	0.90-0.75
Halofilik bakteriler	0.90-0.75
Kserofilik maya	0.83-0.62
Kserofilik filamentli funguslar	0.72-0.61

Mikroorganizmaların gelişim gösterdikleri pH değerleri birbirinden farklılık göstermekte olup dört grup altında toplanırlar. Optimum gelişmelerini 1.0-5.5 pH arasında gerçekleştirenler asidofiller, pH 5.5-8.0 arasında sürdürenler nütrofiller, yüksek pH derecelerini (pH 8.5-10.0) tercih edenler alkalofiller, gelişmeleri için daha da yüksek pH derecelerini (pH 10.0-11.5) talep edenler ise ekstrem alkalofiller olarak tanımlanırlar (Tunail 2009).

Bazı mikroorganizmalar gelişebilmeleri için havanın oksijenine ihtiyaç duyarken (aerob mikroorganizmalar), bir kısmı da ortamda oksijenin bulunmamasını isterler (anaerob mikroorganizmalar). Aerob olanların bir bölümü mutlak olarak oksijene gereksinir. Obligat veya zorunlu aerob olarak tanımlanan bu mikroorganizmalar oksijenin bulunmaması durumunda yaşamlarını sürdüremezler. Bazı aeroblar ise oksijensiz ortamda üreyebilseler de oksijen varlığında daha iyi bir gelişme gösterirler ve fakültatif anaerob olarak tanımlanırlar (Şekil 2.4) (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).



Şekil 2.4. Oksijen konsantrasyonunun üreme üzerine etkisi (a: obligat aerob, b: kuvvetli anaerob, c: fakültatif anaerob, d: mikroaerofil, e: aerotolerant anaerob) (Madigan ve Martinko 2006)

Bütün mikroorganizmaların az veya çok CO₂'e gereksinimleri vardır. Kültürün bulunduğu faz atmosferindeki CO₂, potasyum hidroksit ile tutularak ortamdan çekildiği zaman hemen hemen bütün bakterilerin gelişiminde inhibisyon görülür. Ototrof mikroorganizmalar yalnızca havanın CO₂'ini kullanabildiklerinden CO₂'e diğer mikroorganizmalara göre daha çok ihtiyaç duyarlar. Basınca dayanımlarına göre ise atmosferik basınçta gelişen ve barofilik bakteriler olmak üzere ikiye ayrılan mikroorganizmalardan barofilik olanlar 600-1100 atm basınçta gelişimlerini sürdürebilmektedirler. Bunların yanı sıra 600-1100 atm basınca dayanan ancak daha düşük basınçlarda da gelişim gösterebilen bakterilerde barotolerant olarak adlandırılmaktadırlar (Tunail 2009).

2.8. İmmobilizasyon

Biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan hücrelerin yeniden kullanılabilir hale getirilmesi veya sürekli sistemde daha kolay kullanılabilirliğinin sağlanması için immobilizasyon tekniğine başvurulmaktadır (Illanes 2008). İmmobilizasyon işlemi

hücrelerin aktivitesini kaybetmeden belirlenmiş olan tutuklama materyalinde hedeflenen boşluğa tutturulması veya hapsedilmesidir. Bu işlem enzimlere, hücrel organellere, mikrobiyel hücrelere ve diğer tüm biyokatalizörlere uygulanabilmektedir (Aehle 2004). Bazı durumlarda, biyokatalizörler çözünmeyen destek (taşıyıcı) materyaline fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanırken, diğer durumlarda ise destek materyalindeki boşluklarda serbest halde hapsedilmektedir (Aehle 2004).

İmmobilizasyon işleminin avantajları (Dervakos ve Webb 1991);

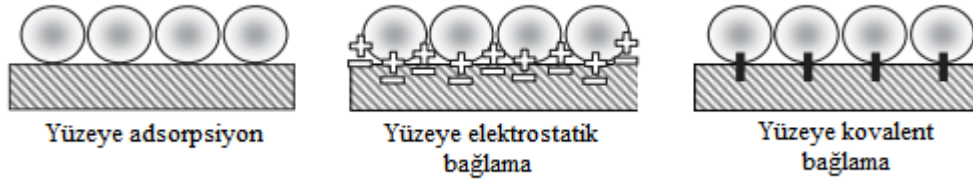
- ❖ Biyolojik stabiliteyi arttırmak
- ❖ Yüksek hücre konsantrasyonunda çalışma imkânı sağlamak
- ❖ Kütle transferini geliştirmek
- ❖ Ürün verimini yükseltmek
- ❖ Ürün stabilitesini arttırmak
- ❖ Ürünün ortamdan ayrılmasını kolaylaştırmak
- ❖ Reaksiyon seçiciliğini arttırmak
- ❖ Hücre yakınlığı sağlamak
- ❖ Reaktör seçiminde alternatifler sağlamak olarak sıralanabilir.

İmmobilizasyon yöntemleri taşıyıcı bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama metodu olmak üzere üç ana başlıkta sınıflandırılabilir.

2.8.1. Taşıyıcı bağlama metodu

Taşıyıcı bağlama metodunda enzim molekülleri kovalent veya kovalent olmayan bağlarla kimyasal olarak inert bir taşıyıcı materyale bağlanmaktadır (Şekil 2.5). Taşıyıcı bağlama metodunda organik ve inorganik birçok taşıyıcı materyal (poliakrilamid, selüloz, manyetik parçacıklar, glioksil, agaroz vs.) kullanılabilir. Kullanılacak olan taşıyıcı materyalde aranılan özellikler; yüksek yüzey alanı sağlaması, yüksek protein bağlama kapasitesi, çalışılacak besiyeri bileşimine uygunluk ve besiyerinde çözünmeme, yüksek mekanik ve kimyasal dayanıklılık, kullanım sonrası geri

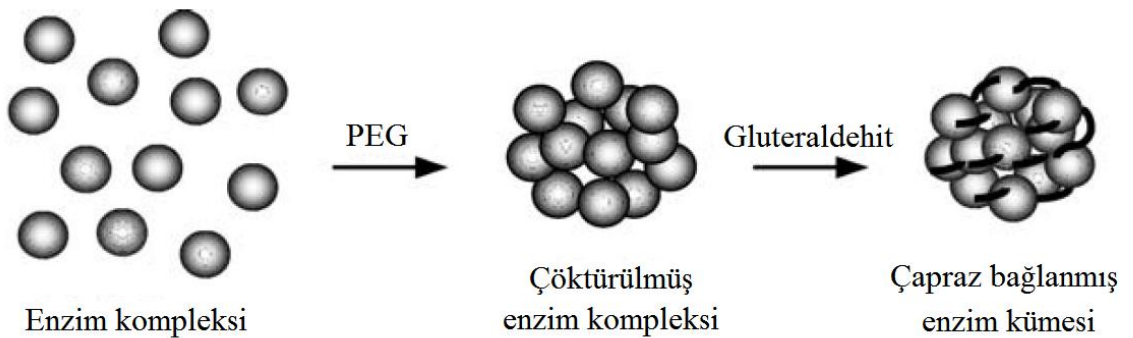
kazanılabilir olması şeklinde sıralamak mümkün olup tüm özelliklere sahip taşıyıcı materyal bulunmamaktadır (Aehle 2004, Illanes 2008).



Şekil 2.5. Taşıyıcı bağlama metotları (Kourkoutas vd 2004)

2.8.2. Çapraz bağlama metodu

Çapraz bağlama metodunda taşıyıcı bir materyal olmaksızın enzim molekülleri birbirine bağlanarak immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.6). Enzimlerin çapraz bağlanmasında gluteraldehit gibi biyofonksiyonel reaktifler kullanılmakta ve elde edilen kompleks suda çözünmemektedir. Çapraz bağlama işlemi çözünebilen enzimlerde, kristalize edilmiş enzimlerde veya topak haline getirilmiş enzimlerde yapılabilmektedir. Bu sistemin en büyük avantajları; taşıyıcı materyal kullanılmadığından biyolojik katalizörün spesifik aktivitesinin oldukça yüksek olması ve immobilize hale getirilen enzimin konsantrasyonunun teorik olarak hesaplanan değere oldukça yakın olmasıdır (Aehle 2004, Illanes 2008).



Şekil 2.6. Çapraz bağlanmış enzim kümesi oluşumunun şematik gösterimi, PEG: Polietilen glikol (Illanes 2008)

2.8.3. Tutuklama metodu

Bu yöntemin esası polimerik jellerle elde edilen immobilize destek materyalindeki boşluklara biyokatalizörlerin yerleştirilmesidir (Şekil 2.7). Burada elde edilen immobilize materyalin yüzeyi substrat ve son ürün geçişine izin verecek açıklıklara sahip olup madde alışverişine olanak sağlayarak biyokatalizörün çalışmasına izin vermektedir. Bu yöntemin avantajı tek bir biyokatalizör yerine farklı biyokatalizörlerin ve hücrelerin aynı yolla immobilize edilebilmesidir. Dezavantajları ise destek materyalinin yenilenebilir olmaması ve yüksek substrat seviyelerinde hapsedilmiş biyokatalizöre ulaşmasının sınırlanmasıdır. Tutuklama metodunda kullanılan destek materyallerine poliakrilamid jel, aljinat ve K-karagenan örnek olarak verilebilir (Aehle 2004, Illanes 2008).



Şekil 2.7. Farklı tutuklama metotları (Kourkoutas vd 2004)

2.9. Etanol

Şekerlerin veya nişastanın fermantasyonda kullanımı sonucu üretilen etanolün, insanların mikrobiyel proses ile ürettikleri ilk ürünlerden birisi olduğu düşünülmektedir (Smith 2004). Etanolün ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) diğer isimleri metil karbinol, tahol alkolü, melas alkolü, kolonya ispiertosu veya şarap ispiertosu şeklinde olup renksiz, nötr, yanıcı ve keskin yakıcı tada sahip bir sıvıdır. Ayrıca moleküler ağırlığı 46.47 g, kaynama noktası $78.3\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir (Okafor 2007). Etanolün kullanım alanları aşağıdaki gibidir (Okafor 2007):

- ❖ Kimya endüstrisinde, çeşitli tepkimelerin (alkilasyon, halojenasyon vs.) gerçekleştirilmesinde hammadde olarak kullanılmaktadır.

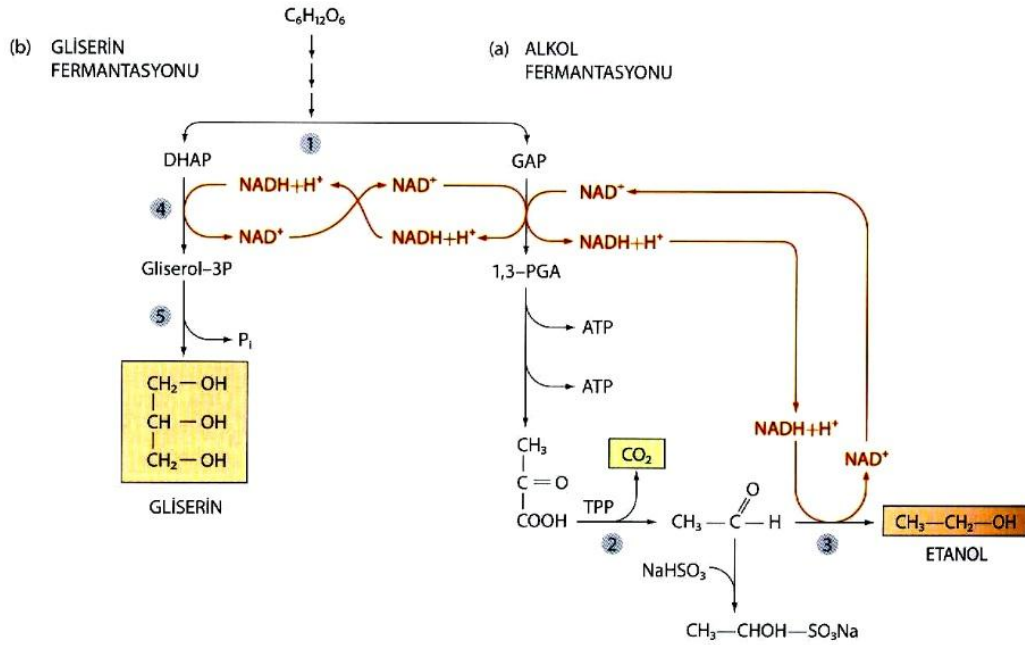
- ❖ Yağlarda, kozmetikte, mumlarda, patlayıcılarda, boyalarda vs. çözücü olarak kullanılmaktadır.
- ❖ Hastanelerde dezenfeksiyon işlemlerinde, temizlik işlemlerinde ve laboratuvar çalışmalarında kullanılmaktadır.
- ❖ Benzinle %10 oranında karıştırılarak otomobillerde yakıt olarak kullanılmaktadır.

Etanol üretimi son yıllarda gittikçe artmakta olup bunun başlıca sebebi araçlarda yakıt olarak kullanılabilirliğinin ön plana çıkmış olmasıdır. Bilindiği üzere dünyanın gelecek 50 yıl içerisinde petrol stoklarının bitebilecek olması nedeniyle tüm gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler yeni enerji kaynakları arayışına girmişlerdir. Bu bağlamda dikkatleri üzerine çekmiş olan etanolün üretim miktarları yıldan yıla artmıştır. Son 5 yılda dünyada gerçekleşen etanol üretim miktarları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Yıllara göre etanol üretim oranları (Anonim 2012)

Ülkeler	Üretim miktarı (Milyon litre)				
	2007	2008	2009	2010	2011
Kuzey ve Orta Amerika	6498.6	9000.0	10600.0	13720.9	14401.3
Brezilya	5019.2	6472.2	6577.9	6921.5	5573.2
Avrupa Birliği	570.3	733.6	1039.5	1176.9	1167.6
Çin	486.0	501.9	541.6	541.6	554.8
Kanada	211.3	237.7	435.2	356.53	462.30
Toplam	13096.4	17335.2	1953.9	23012.9	23373.2

Birçok fungus, bakteri, alg ve *Protozoan* alkol fermantasyonu yapabilmektedir. Ancak alkol fermantasyonu denildiğinde akla ilk gelen mikroorganizma grubu mayalar özellikle de *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Mayaların alkol fermantasyonu en kısa metabolik yollardan biridir. Heksozların glikoliz yolu ile pirüvata kadar parçalanmasından sonra iki reaksiyon basamağı ile CO₂ ve etanol meydana gelir (Tunail 2009) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Glukozdan etanol üretim reaksiyonu (Tunail 2009)

Saf kimyasallarla etanol üretimi maliyeti arttırdığından etanol üretiminde farklı karbon kaynaklarının kullanılabilirliği üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Etanol üretiminde kullanılabilen karbon kaynakları Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Etanol üretiminde potansiyel karbon kaynakları (Smith 2004)

Nişasta içerenler	Selülozik olanlar	Şeker içerenler	Diğer
Mısır	Odun	Melas	Yer elması
Buğday	Kâğıt atıkları	Şeker pancarı	Muz
Sorgum	Orman kalıntıları	Şeker kamışı	Kuru üzüm
Arpa	Tarımsal atıklar	Laktoz	
Buğday unu	Talaş	Peynir altı suyu	
Kaba mısır unu		Glukoz	
Patates			

Roukas (1993) tarafından erlenmayerlerde gerçekleştirilen çalışmada keçiboynuzu meyvesinin sadece ekstraktından *S.cerevisiae* kullanarak etanol üretiminde farklı inokülasyon miktarı, başlangıç şeker oranı ve pH gibi parametrelerin etanol

üretimlerine etkisini izlemiştir. Bir başka çalışmada ise sterilize edilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında immobilize enzim kullanılarak etanol üretimleri gerçekleştirilmiş ve 200 g/L başlangıç şeker oranında en yüksek 64 g/L etanol üretilebilmiştir (Roukas 1996). Benzer bir çalışmada keçiyoynuzu ekstraktında *S. cerevisiae* hücreleri ile etanol üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda maksimum üretim oranı ve etanol konsantrasyonu sırasıyla 3.48 g/L/sa ve %44.52 olarak pH kontrollü şartlarda belirlenmiştir (Turhan vd 2010a).

Keçiyoynuzu ekstraktında gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise immobilize *S. cerevisiae* kullanılmış ve en yüksek etanol miktarı 50 g/L olarak bulunmuştur (Roukas 1994a). Benzer bir çalışmada dolgulu yatak reaktör kullanılarak immobilize *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucunda 48-52 g/L etanol üretilebilmiştir (Roukas 1994b).

Roukas vd (1991) peynir altı suyunda Ca-aljinat üzerinde immobilize edilen *S.cerevisiae* hücreleri ile fermantasyon işleminde 150 g/L şekerden 61 g/L etanol üretmişlerdir. Benzer bir çalışmada ise keçiyoynuzu ekstraktında 250 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda immobilize *S. cerevisiae* kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucunda 64.5 g/L etanol üretilerek verim %28.3 olarak bulunmuştur (Roukas 1995).

Lee vd (2011) aljinatta immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile yapmış oldukları bir çalışmada fermantasyon şartlarını optimize etmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda optimum fermantasyon koşullarını 30 °C, pH 5.0 ve %10 başlangıç glukoz konsantrasyonu olarak belirlemişlerdir. Ayrıca fermantasyon süresinin serbest hücre kullanılması halinde 36 saat iken immobilize edilmiş hücre kullanıldığında bu sürenin 24 saate indiğini ve immobilize hücrelerin tekrar kullanılmasıyla 10-14 saatte fermantasyonun tamamlandığını belirlemişlerdir. İmmobilize hücrelerle gerçekleştirilen tüm fermantasyon denemelerinde şekerin tamamı kullanılırken serbest hücreler kullanıldığında bu oran %88'de kalmıştır.

Bir başka çalışmada manyetik olarak stabilize edilmiş akışkan yataklı reaktörde immobilize *S. cerevisiae* ile etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda %95.3 teorik etanol verimi, 26.7 g/L/sa verimlilik ve 66 g/L etanol konsantrasyonuna; 150 g/L glukoz konsantrasyonu, %41 partikül yükleme oranı ve 0.4 sa⁻¹ dilüsyon besleme oranında ulaşılmıştır. Ayrıca karbon kaynağı olarak melasla gerçekleştirilen denemelerde glukoz ile kıyaslanabilir sonuçlar elde edilmiştir (Liu vd 2008).

Ca-aljinatta immobilize edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise kesikli ve sürekli sistemler karşılaştırılmıştır. 50 g/L başlangıç glukoz konsantrasyonunda kesikli fermantasyonda üretkenlik 0.29 g/L/sa iken sürekli fermantasyonda bu değer 2.8 g/L/sa olarak belirlenmiştir. Ayrıca sürekli sistemde yüksek glukoz konsantrasyonunda (150 g/L) da başarılı bir şekilde etanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Najafpour vd 2004).

Behera vd (2010), mahula çiçeklerini immobilize (agar ve Ca-aljinat) ve serbest *S. cerevisiae* hücreleri ile etanol üretimlerinde kullanmışlardır. Çalışma kapsamında etanol verimleri agarda immobilize edilmiş, Ca-aljinatta immobilize edilmiş ve serbest hücrelerle gerçekleştirilen fermantasyonlar için sırasıyla 151.2 g etanol/ kg çiçek, 154.5 g etanol/kg çiçek ve 149.1 g etanol/kg çiçek olarak belirlenmiştir. Ayrıca immobilize edilen hücrelerin 3 çevrim boyunca çok belirgin bir verim azalması olmadan kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada öğütülmüş mısır gövdesi dokusunun Ca-aljinatla kombine edilmesi sonucu yeni bir immobilizasyon materyali elde edilmiş ve şeker pancarı melasından etanol üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışma kapsamında serbest hücreler öğütülmüş mısır gövdesi dokusu ile karıştırılarak, Ca-aljinatta ve yeni immobilizasyon matriksinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak yeni taşıyıcı matrikste etanol konsantrasyonu 60.36 g/L, yüzdesel teorik etanol verimi %96.56, etanol verimi 0.493 g/g ve hacimsel etanol üretkenliği 2.51 g/L/sa olarak elde edilmiştir (Razmovski ve Vučurović 2011).

Ghorbani vd (2011) yapmış oldukları çalışmada, %3'lük sodyum aljinatta immobilize ettikleri *S. cerevisiae* hücrelerinin sürekli sistemde şeker kamışı melasından etanol üretme kapasitesini araştırmışlardır. Etanol üretiminin şeker melası konsantrasyonundan (50, 100 ve 150 g/L), dilüsyon oranından (0.064, 0.096, 0.144 ve 0.192 sa⁻¹) ve zamandan (5.21, 6.94, 10.42 ve 15.63 sa) etkilendiğini belirlemişlerdir. En yüksek etanol üretim oranı, teorik verim, hacimsel etanol üretkenliği ve toplam şeker tüketimi sırasıyla 19.15 g/L, %46.23, 2.39 g/L/sa ve %96 olarak bulunmuştur.

Benzer bir çalışmada tatlı sorgum suyunda etanol veriminin artırılması için cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Çalışma kapsamında immobilize *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinde fosfor, azot ve pH için optimum koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Optimum koşullar 0.77 g/L fosfor, 2.15 g/L azot ve pH 6.39 olarak belirlenmiş ve en uygun şartlarda etanol üretim oranı 122.85 g/L/sa olarak hesaplanmıştır (Yu vd 2009).

2.10. Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu

DeneySEL çalışmaların sınırlı ya da imkânsız olduğu, pratik ve ekonomik olarak çok sayıda deneyin yapılamadığı durumlarda matematiksel modellemelerden büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Bir matematiksel modelin geliştirilmesinde şu basamaklar sırayla gerçekleştirilmektedir (Devres ve Pala 1993):

- ❖ Problemin belirlenmesi
- ❖ Matematiksel modelin geliştirilmesi
- ❖ Modelin çözülebilirliğinin sağlanması
- ❖ Modelin çözümü
- ❖ Modelin kanıtlanması
- ❖ Çözümün uygulanması

Cevap yüzey metodu, proseslerin oluşturulmasında, geliştirilmesinde ve optimize edilmesinde istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem yeni ürünlerin geliştirilmesinde kullanıldığı gibi var olan

proseslerin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır. Cevap yüzey metodu birçok değişkenin bulunduğu proseslerde seçilmiş kalite karakterinin bu değişkenlerden nasıl etkilendiğinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Buradaki kalite unsuru cevap (response) olarak isimlendirilmektedir (Myers vd 2009).

Box ve Behnken tarafından 1980 yılında ortaya konan Box-Behnken deneme deseni ise ikinci dereceden cevap yüzeylerinde model oluşturmak için etkili bir yöntemdir. Modelde yer alacak faktörlerin en az üç düzeyli olması gerekir ve metot dengeli tamamlanmamış blok denemelerinin üzerine kurulmuştur. Box-Behnken deneme düzeninde faktörlerden birinin değeri merkez değerinde sabitlenirken diğer faktörlerin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanır. Örneğin dört faktörlü deneme deseninde ilk önce C ve D faktörünün düzeyi sabitlenmiş A ve B faktörlerinin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanmış daha sonra aynı işlemler sırasıyla C ve B, C ve A, B ve D, B ve A, son olarak da D ve A faktörlerinin düzeyleri merkezde sabitlenerek uygulanmıştır. Düzen matrislerinin en son sütunlarında ise merkez nokta değerleri yer almaktadır (Kul 2004).

Bu metodun en büyük avantajlarından birisi de örnek ve tekerrür sayısını azaltmasıdır. Örneğin faktöriyel tasarımda 4 faktörlü 3 parametrelili bir deneme deseni oluşturulduğunda 81 deneme (tekerrürü ile birlikte 162 deneme) gerçekleştirilmesi tavsiye edilirken Box-Behnken cevap yüzey metodunda 4 faktörlü 3 parametrelili bir deneme deseni için merkez noktası 3 defa tekrarlandığında 27 deneme (tekerrürü ile birlikte 54 deneme) yapılması tavsiye edilmektedir. Box-Behnken deneme deseninin kullanılması ile daha az deneme ile çalışma gerçekleştirilebildiğinden hem zaman açısından hem de maliyet açısından kâr elde edilmektedir.

Box-Behnken deneme deseninde sonuçların değerlendirilmesinde regresyon analizi ve varyans analizinden yararlanılmaktadır. Ayrıca sonuçların sabit bağımlı değişkenlere karşı grafik edilmesi sonucunda kontur plot (contour plot) grafiği elde edilir ve bu grafikler sonuçların değerlendirilmesini kolaylaştırır (Myers vd 2009). Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan doğruluk parametrelerinden birisi model sistemin gerçek cevaba uygun olup olmadığıdır. Bu duruma uyum eksikliğinden (lack

of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz olup olmadığına bakılarak karar verilmektedir. Bunun yanı sıra R^2 değeri ve ayarlanmış R^2 değerleri karşılaştırılmakta, değerlerin birbirine ve 1'e yakın olması çalışmanın da modele uygunluğunun derecesini göstermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Proje kapsamında kullanılan kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiyoynuzu meyvesi, Antalya'da keçiyoynuzu meyvesini ve işlenmiş ürünlerini ihraç eden Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den sağlanmıştır. Temin edilen keçiyoynuzu meyvesi analiz anına kadar 4°C'lik soğuk depolarda saklanmıştır.

3.2. Fermantasyonlarda Kullanılan Biyoreaktör

Etanol üretiminde öncelikli olarak Ca-aljinat konsantrasyonu, immobilize edilen hücre miktarı, pH ve karıştırma hızı optimize edilmiştir. Bu amaçla laboratuvar tipi; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen kontrolü ve köpük kontrolü yapabilen, karıştırma özelliğine sahip olan biyoreaktör (Sartorius Biostat B Plus, Germany) (Şekil 3.1) kullanılmış ve tüm fermantasyon denemeleri 3 L hacimde, 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Reaktör 121.1°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, pH kontrolü 4 N NaOH kullanılarak sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Sartorius Biostat B Plus Biyoreaktör

3.3. Fermantasyon Ortamı İçin Gerekli Ekstraktın Eldesi

Keçiboynuzu meyvesinden etanol üretiminde fermantasyon ortamında kullanılacak ekstraktın üretimi için 5-7 mm kalınlığındaki keçiboynuzu parçaları 80°C’de 1:4 meyve:su oranında ve 2 saat süre ile ekstraksiyona bırakılmıştır (Turhan vd 2010a). Elde edilen ekstrakt filtrasyon yoluyla katı partiküllerinden ayrıldıktan sonra doğrudan ve/veya zenginleştirilerek fermantasyonda kullanılmıştır. Cevap yüzey metodunun belirlediği şartlarda gerçekleştirilecek olan fermantasyon denemeleri için taze olarak hazırlanan keçiboynuzu ekstraktı kullanım anına kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.4. Fermantasyonla Etanol Üretimi

3.4.1. Kullanılan mikroorganizma

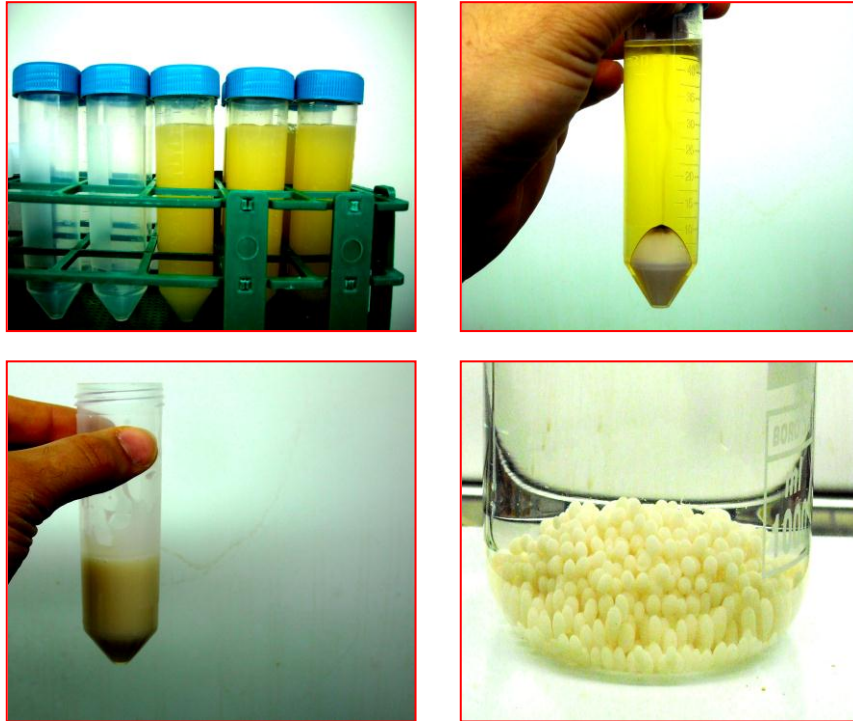
Bu çalışmada keçiboynuzu meyvesinden etanol üretiminde *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36858) kullanılmıştır. Mikroorganizma 50 g/L glukoz, 6 g/L maya ekstraktı, 0.3 g/L CaCl₂.2H₂O, 4 g/L (NH₄)₂SO₄, 1g/L MgSO₄.7H₂O ve 1.5 g/L KH₂PO₄ içeren besiyerinde 30 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Stok kültürler her ay yenilenerek muhafaza edilmiştir. Uzun süreli kullanılmama durumunda %20’lik gliserol içerisinde -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.4.2. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon işlemine başlamadan önce kullanılacak kimyasallar hazırlanmıştır. Bu kimyasallar sırasıyla aljinat çözeltisi (%2, %2.5 ve %3), %0.85’lik NaCl çözeltisi, 0.1 M ve 0.05 M’lık CaCl₂.2H₂O çözeltileridir. Gerekli çözeltiler hazırlandıktan sonra 121.1 °C’de 15 dk sterilize edilmiştir.

Kullanıma hazır hale gelen çözeltiler ile immobilizasyon işleminde; öncelikle 250 ml’lik erlenlerde 100 ml hacimde %1 inokülasyonla 150 d/d 30 °C’de 16-24 saat fermantasyonla hazırlanmış olan ön kültür (12.17 ± 0.84 g biyokütle/L) steril şartlarda

50 ml'lik santrifüj tüplerine eşit miktarda doldurularak 3800 d/d, 20 dk ve 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Ardından katı kısmın üzerinde kalan sıvı kısım süzülüş ve steril kabinde her santrifüj tüpündeki mikroorganizmalara 20 ml aljinat çözeltisi (Cevap yüzey metodunun belirlediği konsantrasyonda) ilave edilerek steril bir kaşık ve girdap karıştırıcı yardımı ile iyice karışması sağlanmıştır. Aynı zamanda 0.1 M'lık $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi 1 L'lik behere boşaltılmıştır. Homojen hale getirilen aljinat-mikroorganizma karışımı 5 ml'lik şırınga (3P 21G 0.80x38 mm) yardımı ile 0.1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine damlatılarak boncukların oluşumu sağlanmıştır. İmmobilize hücrelerin (boncukların) oluşumu esnasında birbirlerine yapışmaması için manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırma sağlanmıştır. Boncukların oluşum aşamasından sonra sıvı kısım atılmış ve behere 0.05 M'lık $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi (boncukların stabilizasyonunun sağlanması için) ilave edilerek en fazla 12 saat bekletilmiştir (Şekil 3.2). Daha sonra sıvı kısmı süzülen boncuklar 3 defa %0.85'lik NaCl çözeltisi (ortamdaki ve hücrelerin yüzeyindeki Ca^{2+} iyonlarının uzaklaştırılması için) ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirilmiş ve keçiboynuzu ekstraktının bulunduğu reaktöre steril olarak aşılama yapılarak fermantasyon başlatılmıştır.



Şekil 3.2. İmmobilizasyon işlem basamakları

3.4.3. Fermantasyon

Etanol üretiminde keçiyoynuzundan elde edilen ekstrakt immobilize *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36858) hücreleri kullanılarak 30 °C’de fermantasyona bırakılmıştır. Bu amaçla etanol üretimi üzerine Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma hızı, immobilize edilen hücre miktarı ve pH’nın etkileri incelenmiştir. Bu 4 parametre cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiş olup Box-Behnken Cevap Yüzey modelinde kullanılmış olan maksimum ve minimum parametreler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Fermantasyon için cevap yüzey metodunda kullanılacak parametreler

Değişken	Minimum	Orta Nokta	Maksimum
Ca-aljinat kons. (%)	2	2.5	3
Karıştırma (d/d)	100	150	200
İmmobilize edilen hücre miktarı (%)	1	3	5
pH	5	5.5	6

Cevap yüzey metodunun oluşturduğu şartlarda fermantasyon işlemleri iki tekerrürlü olarak (toplam 54 fermantasyon) gerçekleştirildikten sonra etanol verimi ve etanol üretkenlik oranı değerlerine göre optimum fermantasyon şartları belirlenmiştir. Tüm fermantasyon denemeleri için 3 L fermantasyon ortamı hazırlanmış ve fermantasyon ortamının zenginleştirildiği denemelerde aşağıdaki miktarlar kullanılmıştır.

Medya İçeriği	Miktar (g/L)
Keçiyoynuzu ekstraktı	1 L (8-10 °Bx)
Maya ekstraktı	6
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.3
(NH ₄) ₂ .SO ₄	4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	1.5

Reaktöre 3 L besiyeri içeriği ilave edildikten sonra pH probu kalibre edilmiş ve ardından 121°C’de 15 dakika sterilize edilerek soğuduktan sonra başlangıç şeker içeriği tespit edilmek üzere ilk örnek alınmıştır. İmmobilizasyonu tamamlanmış maya stoğundan steril şartlarda reaktöre aşılama yapılmış ve “0” zamanı örneği de alınarak fermantasyon başlatılmıştır. Optimum etanol üretim şartlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilecek fermantasyon denemeleri için deneme deseni Çizelge 3.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.2. Cevap yüzey metodunun oluşturduğu fermantasyon şartları

Sıra	Ca-Aljinat Konsantrasyonu (%)	Karıştırma (d/d)	İmmobilize edilen hücre miktarı (%)	pH
1	3	150	1	5.5
2	2.5	150	1	6
3	2.5	150	1	5
4	2.5	200	1	5.5
5	2.5	100	1	5.5
6	2	150	1	5.5
7	2.5	150	3	5.5
8	2	150	3	5
9	2	150	3	6
10	2.5	150	3	5.5
11	2.5	200	3	6
12	3	150	3	5
13	2.5	200	3	5
14	3	100	3	5.5
15	3	200	3	5.5
16	3	150	3	6
17	2	100	3	5.5
18	2	200	3	5.5
19	2.5	100	3	6
20	2.5	150	3	5.5
21	2.5	100	3	5
22	2.5	150	5	6
23	2.5	150	5	5
24	2.5	200	5	5.5
25	2	150	5	5.5
26	2.5	100	5	5.5
27	3	150	5	5.5

Fermantasyon başladıktan sonra başlangıç ve sıfır zamanı örneklerine ek olarak 2, 4, 8, 11, 14, 24 ve 30. saatlerde de örnekler alınarak biyokütle, etanol ve indirgen şeker analizleri yapılmıştır. Tüm örnekler analiz anına kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Optimum fermantasyon koşulları belirlendikten sonra doğrulama amacıyla optimum şartlarda tekerrürlü denemeler gerçekleştirilmiştir. Doğrulama çalışmasının ardından immobilize hücrelerin çevrim sayısının (tekrar kullanılabilirlik süresinin) belirlenmesi amacıyla da fermantasyon süresi 24 saate sabitlenerek her 24 saatte bir fermente sıvı boşaltılarak yerine taze besiyeri ilave edilmiş ve 5 çevrim boyunca etanol ve verim değerleri takip edilmiştir. Son olarak da optimum şartlarda zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında pH kontrollü ve kontrolsüz olarak gerçekleştirilen denemeler sonucunda keçiyoynuzunun immobilize hücrelerle etanol üretiminde doğrudan kullanılabilirliği araştırılmıştır.

3.5. Analiz metotları

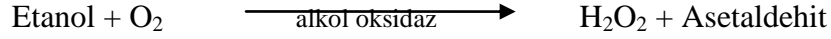
3.5.1. Toplam hücre kütle (biyokütle) miktarı

Çalkalamalı inkübatörlerde hazırlanan ön kültürlerden ve fermantasyonun gerçekleştirildiği reaktörden belirtilen zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek için canlı hücre miktarı analiz edilmiştir. Bu amaçla örneklerden 1 ml alınarak üzerine 9 ml saf su eklenip 10 kat seyrelttikten sonra kör olarak inoküle edilmemiş örnek kullanılarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-160A, JAPAN) 620 nm’de elde edilen absorbans değerine göre *S. cerevisiae* canlı miktarı hesaplanmıştır (Turhan vd 2010a).

3.5.2. Etanol analizi

Fermantasyon ortamından alınan örneklerde etanol üretimini görmek amacıyla etanol miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla indirgen şekerlerin belirlenmesinde kullanılan YSI 2700 Biyoanalitik Sistem (Yellow Springs, OH) kullanılmıştır. Bu

sistemin ana prensibi, örnek alındığında cihazdaki (analiz edilecek örneğe uygun seçilen) enzim içeren membranın örnekle reaksiyona girerek elektrokimyasal probun platinyum anodunu okside etmesi sonucunda hidrojen peroksit açığa çıkması ve elde edilen sinyale göre etanol konsantrasyonunun belirlenmesine dayanmaktadır.



Analiz kapsamında fermantasyon ortamından alınan örneklerden 1 ml alınarak üzerine 19 ml saf su eklenip 20 kat seyrelttikten sonra kalibre edilmiş cihazda okumalar paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın çalışma koşulları ise aşağıda verilmiştir.

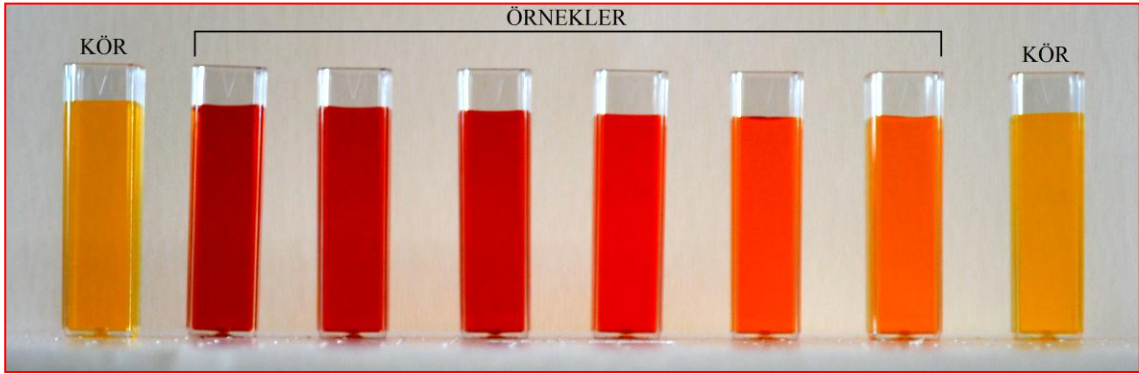
- ❖ Enjeksiyon miktarı : 25 µL
- ❖ Kalibrasyon metodu : Tekli kalibrasyon
- ❖ Kalibrasyon standardı kons. : 2.00 g/L
- ❖ Analiz süresi : 60 sn
- ❖ Oto kalibrasyon süresi : 10 örnek veya 30 dk
- ❖ Kalibrasyon istasyonu : 2

3.5.3. Şeker analizi

Reaktörden alınan örneklerdeki şeker miktarı 3,5 dinitrosalisilik asit kullanılarak DNSA metodu ile belirlenmiştir (Miller 1959). DNSA metodu ile şeker analizinde kullanılan DNSA çözeltisi; 10 g NaOH, 10 g DNSA ve 0.5 g sodyum sülfid saf suda çözülüp 1 litreye tamamlanarak, Rachele tuz çözeltisi (potasyum-sodyum tartarat çözeltisi) ise 400 g potasyum-sodyum tartarat 1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

İndirgen şeker analizinde 0.1 ml örnek üzerine 3.9 ml saf su eklenmiş ve 0.08 ml 12 M HCl asit ile karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 5 dk bekletilerek örnek hidroliz edilmiştir. Bu noktada tüp içerisindeki örneklerin hidroliz sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir. Sıcaklığı kontrol etmek amacıyla termometre yerleştirilmiş bir tüp kontrol olarak kullanılmıştır. Metotta belirtilen sıcaklığa ulaştıktan sonra süre başlatılmıştır. Daha sonra hidrolizat üzerine 0.2 ml 5 N KOH eklenerek karıştırıldıktan

sonra, karışımdan yeni bir tüpe 3 ml alınarak üzerine 3 ml DNSA solüsyonu eklenmiştir. Bu aşamada 3 ml saf su üzerine 3 ml DNSA eklenerek kör olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Solüsyon karıştırılarak 90°C'lik su banyosunda 15 dk bekletilip üzerine renk stabilizasyonunu sağlamak için 1 ml %40'lık potasyum sodyum tartarat eklenerek soğutulmuş (Şekil 3.3) ve 575 nm dalga boyunda okuma yapıp standart sakkaroz çözeltisi ile hazırlanmış kurveden (Ek 1) şeker miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. İndirgen şeker analizinde ölçüme hazır örnekler

3.5.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Reaktörden alınan örneklerde indirgen şeker, biyokütle miktarı ve etanol analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- ❖ Şeker tüketimi (g/L)
- ❖ Etanol üretimi (g/L)
- ❖ Verim (%)
- ❖ Maksimum tüketim oranı (g/L/saat)
- ❖ Maksimum üretim oranı (g/L/saat) kinetik parametreleri belirlenmiştir.

Hesaplamalar S (substrat) ve P (ürün) olmak üzere aşağıdaki denklemlerden yararlanılarak hesaplanmıştır.

Gelişmenin sonunda şeker tüketimi;

$S = S_1 - S_0$ olup g/L olarak ifade edilmiştir.

Gelişmenin sonunda ürün miktarı;

$P = P_1 - P_0$ olup g/L olarak hesaplanmıştır.

Ürün verimi;

Verim ($Y_{P/S}$) (%) = [Etanol miktarı (g/L) / Şeker tüketimi (g/L)] * 100 eşitliğinden faydalanılarak hesaplanmıştır.

Bunların yanı sıra maksimum üretim ve tüketim oranları da;

Üretim oranı (g/L/sa) = Etanol kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Tüketim oranı (g/L/sa) = Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi
kullanılarak hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).

3.5.5. İstatistiksel değerlendirmeler

Etanol üretiminde kullanılan deneme deseni ve istatistiksel analizinde Minitab İstatistiksel Yazılımı (Minitab 15.1.1.0, State College, PA) kullanılmıştır. Program tarafından oluşturulan modelin deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı varyans analizi ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, quadratik ve interaksiyon etkilerinin cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güvenlik seviyesinde Fischer testi (F testi) uygulanarak bulunmuştur. Model sistemin gerçek cevaba uygun olup olmadığına uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz olması koşulu ile karar verilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ca-aljinatta İmmobilize Edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* Kullanılarak Gerçekleştirilen Etanol Üretimine Cevap Yüzey Metodu İle Optimizasyonu

Keçiboynuzu ekstraktında *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak etanol üretim şartlarının Box-Behnken cevap yüzey metodu ile optimize edilmesi üzerine Ca-aljinat konsantrasyonu, immobilize edilen hücre miktarı, karıştırma ve pH'nın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla zenginleştirilmiş keçiboynuzu ekstraktı cevap yüzey metodunun belirlediği şartlarda etanol fermantasyonuna bırakılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

4.1.1. Ca-aljinat konsantrasyonunun fermantasyon üzerine etkisi

Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılarak keçiboynuzu ekstraktından fermantasyon yoluyla etanol üretimlerinin optimizasyonunda maksimum, minimum ve orta nokta (%2, %3 ve %2.5) olmak üzere üç farklı Ca-aljinat konsantrasyonunda denemeler yapılmıştır (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2).

%2'lik Ca-aljinatta hazırlanmış immobilize hücrelerle gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için etanol verimi değerleri %45.06-49.24 arasında değişim göstermiştir. %2.5'lük Ca-aljinatta hazırlanmış immobilize hücrelerle gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için etanol verimi değerlerinin %42.45-48.71 arasında olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten %3'lük Ca-aljinatta hazırlanmış immobilize hücrelerle gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için ise etanol verimi değerleri %40.97-48.79 arasında değişim olmuştur (Çizelge 4.1).

Sonuç olarak etanol verim değerleri göz önüne alındığında, %2'lik Ca-aljinat kullanılan tüm denemelerde %45'in üzerinde verim elde edildiği ve Ca-aljinat konsantrasyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Etanol üretiminde verim için Cevap Yüzey Metodu sonuçları

Fermantasyon	Ca-aljinat konsantrasyonu (%)	Karıştırma (d/d)	İmmobilize edilen hücre miktarı (%)	pH	Tüketilen şeker miktarı (g/L)	Üretilen etanol miktarı (g/L)	Verim ($Y_{p/s}$) %
1	3	150	1	5.5	84.42±4.07	34.59±0.01	40.97±1.97
2	2.5	150	1	6	72.95±2.39	32.11±0.83	44.01±0.15
3	2.5	150	1	5	84.97±1.33	36.07±0.37	42.45±1.10
4	2.5	200	1	5.5	75.55±0.97	35.16±0.83	46.53±0.49
5	2.5	100	1	5.5	75.43±0.91	33.76±0.88	44.75±1.70
6	2	150	1	5.5	76.37±0.53	36.96±0.43	48.39±0.22
7	2.5	150	3	5.5	77.65±2.86	37.01±0.72	47.66±0.78
8	2	150	3	5	73.65±5.44	35.36±0.82	48.00±2.41
9	2	150	3	6	77.64±0.47	35.79±0.88	46.09±1.49
10	2.5	150	3	5.5	81.10±1.31	38.85±1.00	47.90±0.67
11	2.5	200	3	6	73.27±0.51	33.62±0.62	45.88±1.50
12	3	150	3	5	66.03±1.47	29.05±1.15	43.98±0.76
13	2.5	200	3	5	73.64±0.51	35.86±0.30	48.69±0.33
14	3	100	3	5.5	83.50±1.05	37.14±1.04	44.48±1.52
15	3	200	3	5.5	76.80±1.37	35.25±0.51	45.89±0.86
16	3	150	3	6	79.13±2.81	33.72±2.35	42.61±2.46
17	2	100	3	5.5	74.41±1.69	33.53±0.72	45.06±0.34
18	2	200	3	5.5	70.40±2.00	34.67±1.67	49.24±1.10
19	2.5	100	3	6	78.97±0.22	36.46±0.15	46.17±0.06
20	2.5	150	3	5.5	76.19±1.23	35.04±1.17	45.98±1.12
21	2.5	100	3	5	80.53±0.75	39.23±1.28	48.71±1.32
22	2.5	150	5	6	85.70±1.86	38.71±2.20	45.16±1.93
23	2.5	150	5	5	84.69±0.41	39.39±2.29	46.51±2.48
24	2.5	200	5	5.5	87.28±1.42	39.89±0.86	45.70±0.53
25	2	150	5	5.5	85.49±0.19	39.85±2.84	46.61±0.92
26	2.5	100	5	5.5	90.08±1.04	38.67±0.75	42.92±0.33
27	3	150	5	5.5	78.98±0.48	38.54±1.84	48.79±2.63

Etanol üretkenlik değerleri göz önüne alındığında ise %2, %2.5 ve %3'lük Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için üretkenlik değerleri sırasıyla 1.97-3.37 g/L/sa, 1.82-3.41 g/L/sa ve 1.91-2.80 g/L/sa arasında değişim göstermiştir. Üretim oranları göz önüne alındığında da Ca-aljinat konsantrasyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Roukas (1994a), keçiyoynuzu ekstraktında yapmış olduğu çalışmada %2.5'lük Ca-aljinatta 200 d/d'da gerçekleştirdiği fermantasyon sonucunda etanol üretimini 65 g/L, üretim oranını 5.4 g/L/sa ve verim değerini de %34 olarak belirlemiştir. Benzer bir çalışmada %2 ve %2.5'lük Ca-aljinatta immobilize edilmiş ve serbest *S. cerevisiae* ile saf kimyasallarla etanol fermantasyonu denemeleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda %2'lik aljinat konsantrasyonunun etanol üretiminde, esnek yapıya sahip olması ve düşük yoğunluktaki matriks nedeniyle daha fazla madde alışverişine izin vermesi dolayısıyla, daha uygun olduğu belirtilmiştir (Lee vd 2011).

Bir başka çalışmada ise farklı konsantrasyonlardaki (%1, %2, %3 ve %6) Ca-aljinatta immobilize edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri ile kesikli fermantasyon denemeleri yapılarak immobilize hücrelerden en uygunu belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda %2'lik Ca-aljinatta immobilizasyonun esneklik, yeterli düzeyde sertlik ve yeterli stabiliteye sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen 27 saatlik fermantasyon denemesi sonucunda şekerin %99.6'sı kullanılırken etanol üretim miktarının %12.5 (v/v) olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Najafpour vd 2004).

Behera vd (2010), mahula çiçeklerinde yapmış oldukları çalışmada serbest hücrelerle ve %2'lik Ca-aljinatta immobilize ettikleri *S. cerevisiae* ile fermantasyon denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda etanol miktarı, verim, üretkenlik oranları ve şeker kullanım oranlarını serbest ve immobilize hücreler için sırasıyla 24.83 g/L, %44.5, 0.258 g/L/sa, %89.02 ve 25.75 g/L, %48.3, 0.268 g/L/sa, %96.75 olarak belirlemişlerdir. Son olarak Razmovski ve Vučurović (2011), %2'lik Ca-aljinatta

Çizelge 4.2. Etanol üretiminde maksimum tüketim oranı ve üretim oranı açısından Cevap Yüzey Metodu sonuçları

Fermantasyon	Ca-aljinat konsantrasyonu (%)	Karıştırma (d/d)	İmmobilize edilen hücre miktarı (%)	pH	Maksimum tüketim oranı, $(-ds/dt)_{max}$ g/L/sa	Maksimum üretim oranı, $(dp/dt)_{max}$ g/L/sa
1	3	150	1	5.5	4.71±1.41	1.91±0.17
2	2.5	150	1	6	3.66±0.52	1.82±0.26
3	2.5	150	1	5	4.71±1.29	2.03±0.11
4	2.5	200	1	5.5	5.41±0.29	2.60±0.28
5	2.5	100	1	5.5	4.54±1.30	2.10±0.54
6	2	150	1	5.5	4.11±1.54	2.16±0.55
7	2.5	150	3	5.5	5.75±0.81	2.65±0.43
8	2	150	3	5	5.80±0.38	2.70±0.18
9	2	150	3	6	5.54±0.25	2.61±0.30
10	2.5	150	3	5.5	5.84±0.40	2.79±0.12
11	2.5	200	3	6	5.42±0.82	2.99±0.57
12	3	150	3	5	4.97±1.00	1.96±0.16
13	2.5	200	3	5	5.26±0.53	2.63±0.42
14	3	100	3	5.5	5.07±0.11	2.26±0.39
15	3	200	3	5.5	6.91±0.81	2.39±0.62
16	3	150	3	6	5.81±1.53	2.57±0.79
17	2	100	3	5.5	5.61±1.30	1.97±0.33
18	2	200	3	5.5	5.68±0.17	3.37±1.02
19	2.5	100	3	6	6.13±1.79	2.73±0.34
20	2.5	150	3	5.5	5.08±1.46	2.45±0.53
21	2.5	100	3	5	5.14±1.26	2.59±0.19
22	2.5	150	5	6	6.34±1.05	3.02±0.26
23	2.5	150	5	5	5.88±0.38	3.11±0.14
24	2.5	200	5	5.5	6.74±0.48	3.41±0.24
25	2	150	5	5.5	6.34±0.75	3.17±0.18
26	2.5	100	5	5.5	5.39±0.30	2.76±0.16
27	3	150	5	5.5	4.67±0.62	2.80±0.18

immobilize ettikleri *S. cerevisiae* hücreleri ile gerçekleştirdikleri denemeler sonucunda etanol miktarını 57.12 g/L, verim değerini %48 (g/g), üretkenlik oranını 2.38 g/L/sa ve şeker tüketimini %91.82 olarak belirlemişlerdir.

4.1.2. Karıştırma hızının fermantasyon üzerine etkisi

Fermantasyon denemelerinde karıştırmanın etkisinin belirlenmesi amacıyla Box-Behnken cevap yüzey metodunda maksimum, minimum ve orta noktalar sırasıyla 200 d/d, 100 d/d ve 150 d/d olarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 verilmiştir.

Anaerobik bir çalışmada karıştırmanın amacı fermantasyon ortamında homojenlik ve mikroorganizmaların besin öğelerine daha rahat ulaşabilmesinin sağlanmasıdır. Dolayısıyla karıştırmanın belirli bir düzeye kadar artması ile verimin de artması beklenmektedir. Ancak yapılan denemeler sonucunda 100 d/d, 150 d/d ve 200 d/d'da gerçekleştirilen denemelerde maksimum verimler sırasıyla %48.71, %48.79 ve %49.24 olarak gerçekleşmiş ve karıştırmanın önemli olmadığı ($P>0.05$) saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Etanol üretkenlik oranları değerlendirildiğinde 100 d/d, 150 d/d ve 200 d/d için maksimum etanol üretkenlik değerleri sırasıyla 2.76 g/L/sa, 3.17 g/L/sa ve 3.41 g/L/sa olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2). Karıştırma seviyesi arttıkça etanol üretkenlik oranı (birim zaman başına üretilen etanol miktarı) artış göstermektedir. Bunun sonucunda karıştırmanın istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.05$) bulunmuştur. Çalışma kapsamında verimde karıştırma önemli çıkmazken üretim oranında karıştırmanın önemli çıkmasının nedeni karıştırma hızı arttıkça homojenliğin daha iyi sağlanmasıdır. Ayrıca homojen bir fermantasyon ortamı sağlanmasının bir sonucu olarak üretim zamanı da kısalmıştır ve bu nedenle de üretkenlik değerlerinde karıştırma hızı istatistiksel olarak önemli çıkmıştır.

Roukas (1994a), statik ve 200 d/d'da keçiyoynuzu ekstraktında gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada, fermantasyonlarda çalkalamanın üretim hızını arttırdığını

belirtmiştir. Oziyici vd (2011), keçi boynuzu ekstraktında immobilize *S. cerevisiae* ile erlenmayerlerde farklı karıştırma hızlarında yapmış oldukları denemeler sonucunda 150 d/d karıştırma hızının optimum olduğunu belirlemişlerdir.

4.1.3. İmmobilize edilen hücre konsantrasyonunun fermantasyon üzerine etkisi

Fermantasyona yüksek hücre konsantrasyonu ile başlamanın fermantasyon süresini kısaltması ve yüksek hücre gelişimi ile verimin ve etanol üretkenlik oranının artması hedeflenmektedir. Bu amaçla Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılarak keçi boynuzu ekstraktından fermantasyon yoluyla etanol üretimlerinin optimizasyonunda %1, %3 ve %5 olmak üzere üç farklı hücre konsantrasyonunda denemeler yapılmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

%1'lik hücre konsantrasyonunda gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için etanol verimi değerleri %40.97-48.39 ve etanol üretim oranları 1.82-2.60 g/L/sa arasında değişim göstermiştir. %3'lük immobilize edilmiş hücre konsantrasyonunda gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için etanol verimi değerlerinin %42.61-49.24 ve etanol üretim oranlarının ise 1.96-3.37 g/L/sa arasında olduğu belirlenmiştir. %5'lik hücre konsantrasyonunun immobilizasyonu ile gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri için ise etanol verimi değerleri %42.92-48.79 arasında olduğu ve etanol üretim oranlarının 2.76-3.41 g/L/sa arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Denemeler sonucunda immobilize edilen hücre konsantrasyonunun verim ve üretim oranı için istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Uncu ve Cekmecelioglu (2011), mutfak atıklarında immobilize olmayan *S. cerevisiae* hücreleri ile flasklarda gerçekleştirmiş oldukları çalışmada inokülasyon oranının belirli bir seviyeye kadar artışının etanol üretim miktarını da arttırdığını belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada ise serbest hücrelerle %1, %3 ve %5 inokülasyon oranlarında gerçekleştirilen denemeler sonucunda inokülasyon oranının istatistiksel olarak önemli olduğunu ve optimum değerinin %3.3 olduğunu saptamışlardır (Singh ve Bishnoi 2013).

Sorgum sapı parçalarında farklı oranlarda (0.5×10^8 , 1×10^8 ve 2×10^8 hücre/ml) immobilize edilen *S. cerevisiae* hücreleri ile gerçekleştirilen denemeler sonucunda hücre miktarı arttıkça etanol üretim miktarının da arttığını ancak 48 saat sonunda 1×10^8 ve 2×10^8 hücre/ml arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı belirlenmiştir (Ariyajaroenwong vd 2012).

Keçiboynuzu ekstraktında serbest hücrelerle gerçekleştirilmiş bir çalışmada ise, %3 inokülasyon düzeyinin maksimum etanol verimi (%45.90) ve üretim oranını verdiğini (5.91 g/L/sa) ancak şeker tüketim oranının (7.10 g/L/sa) en yüksek düzeyinin %5 inokülasyon düzeyinde gerçekleştiği belirlenmiştir (Turhan vd 2010a).

4.1.4. pH'nın fermantasyon üzerine etkisi

Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılarak keçiboynuzu ekstraktından fermantasyon yoluyla etanol üretimlerinin optimizasyonunda üç farklı pH değerinde yapılan denemelere ait sonuçlar Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Fermantasyon denemelerinde pH 5, pH 5.5 ve pH 6'da gerçekleştirilen denemelerde maksimum verim değerleri sırasıyla %48.71, %49.24 ve %46.17 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Maksimum etanol üretim oranları ise sırasıyla %3.11, %3.41 ve %3.02 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek verim ve üretim oranı değerlerine pH 5.5'de ulaşılmasına rağmen çalışmada seçilmiş olan pH değerleri (5, 5.5 ve 6) arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır.

Roukas (1994a), keçiboynuzu ekstraktını zenginleştirmeden %2.5'lük Ca-aljinatta immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile yapmış olduğu flask denemelerinde 3.5-6.5 pH aralığında mikroorganizmanın çalışabildiğini ve optimum başlangıç pH değerinin ise 5.5 olduğunu belirlemiştir. Singh ve Bishnoi (2013), buğday samanında serbest hücrelerle yapmış olduğu denemeler sonucunda optimum pH değerini 5.5 olarak belirlemiştir. Turhan vd (2010), serbest hücrelerle keçiboynuzu ekstraktında yapmış olduğu pH kontrollü ve kontrolsüz denemeler sonucunda pH 5.5'de kontrollü olarak

gerçekleştirilen fermantasyon denemesinde verim ve üretim oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

4.1.5. Etanol üretimlerinin optimizasyonu

Bu çalışmada “Full Quadratic” Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Kullanılan modeldeki değişkenler Ca-aljinat konsantrasyonu (%), karıştırma (d/d), immobilize edilen hücre miktarı (%) ve pH olarak belirlenmiştir. Minitab programındaki Cevap Yüzey Metodu kullanılarak geliştirilen regresyon eşitlikleri etanol verimi (Çizelge 4.3) ve üretim oranı (Çizelge 4.4) için aşağıdaki gibidir;

$$\begin{aligned} \text{➤ Etanol verimi (\%)} = & 47.18 - 1.39A + 0.82B + 0.72C - 0.70D - 0.56A^2 - \\ & 0.071B^2 - 1.47C^2 - 0.79D^2 - 0.69AB + 2.40AC + 0.135AD + 0.25BC - \\ & 0.068BD - 0.73CD + \varepsilon \end{aligned} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

ε : Hata

A: Ca-aljinat konsantrasyonu

B: Karıştırma

C: Immobilize edilen hücre oranı

D: pH

Çizelge 4.3. Etanol verimleri için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH kat.	T	P
Sabit	47.1787	1.0227	46.130	0.000*
Aljinat kons. (A)	-1.3887	0.5114	-2.716	0.019*
Karıştırma (B)	0.8204	0.5114	1.604	0.135
İmmobilize edilen hücre miktarı (C)	0.7169	0.5114	1.402	0.186
pH (D)	-0.7022	0.5114	-1.373	0.195
A*A	-0.5576	0.7670	-0.727	0.481
B*B	-0.0709	0.7670	-0.092	0.928
C*C	-1.4729	0.7670	-1.920	0.079
D*D	-0.7888	0.7670	-1.028	0.324
A*B	-0.6942	0.8857	-0.784	0.448
A*C	2.4005	0.8857	2.710	0.019*
A*D	0.1348	0.8857	0.152	0.882
B*C	0.2481	0.8857	0.280	0.784
B*D	-0.0684	0.8857	-0.077	0.940
C*D	-0.7279	0.8857	-0.822	0.427

SH kat.: Standart hata katsayıları, R²: 0.692, *P<0.05

İmmobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonlarında verime ait modelin R² değeri 0.692 olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre verim için elde edilen model, fermantasyon sonuçlarının %69.2'sini tam temsil etmektedir (Çizelge 4.3). Bunun yanı sıra Cevap Yüzey Metodu tasarımı ve her bir terimin varyans analizi ile incelenmiş ve immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonlarının verim değerleri için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Model denklemdaki verimin varyans analizi

Kaynak	SD	KT	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Regresyon	14	84.460	84.460	6.033	1.92	0.132
Lineer	4	43.302	43.302	10.825	3.45	0.043
İkinci derece	4	13.724	13.724	3.431	1.09	0.403
Etkileşim	6	27.434	27.434	4.572	1.46	0.272
Artık hata	12	37.655	37.655	3.138		
Uyum eksikliği	10	35.480	35.480	3.548	3.26	0.257
Saf hata	2	2.175	2.175	1.087		
Toplam	26	122.115				

SD: Serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: Düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: Düzeltilmiş kareler ortalaması

Çizelge 4.4 incelendiğinde uyum eksikliği değeri (lack of fit) verim için 0.257 olarak bulunmuş ve güvenlik derecesi olan 0.05 değerinden büyük olduğu için modelin uyum eksikliği önemsiz ($P > 0.05$) çıkmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Üretim oranı (g/L/sa)} = & 2.63 - 0.175A + 0.25B + 0.471C + 0.060D - 0.149A^2 + \\ & 0.093B^2 - 0.024C^2 - 0.039D^2 - 0.32AB - 0.029AC + 0.18AD + 0.039BC + \\ & 0.056BD + 0.029CD + \varepsilon \end{aligned} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

ε : Hata

A: Ca-aljinat konsantrasyonu

B: Karıştırma

C: İmmobilize edilen hücre oranı

D: pH

Çizelge 4.5. Etanol üretim oranları için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	SH kat.	T	P
Sabit	2.62874	0.11994	21.918	0.000*
Aljinat kons. (A)	-0.17533	0.05997	-2.924	0.013*
Karıştırma (B)	0.24928	0.05997	4.157	0.001*
İmmobilize edilen hücre miktarı (C)	0.47066	0.05997	7.849	0.000*
pH (D)	0.06015	0.05997	1.003	0.336
A*A	-0.14854	0.08995	-1.651	0.125
B*B	0.09318	0.08995	1.036	0.321
C*C	-0.02422	0.08995	-0.269	0.792
D*D	-0.03898	0.08995	-0.433	0.672
A*B	-0.31703	0.10387	-3.052	0.010*
A*C	-0.02936	0.10387	-0.283	0.782
A*D	0.17863	0.10387	1.720	0.111
B*C	0.03855	0.10387	0.371	0.717
B*D	0.05638	0.10387	0.543	0.597
C*D	0.02932	0.10387	0.282	0.783

SH kat.: Standart hata katsayıları; R²: 0.899, *P<0.05

İmmobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonlarında üretim oranına ait modelin R² değeri 0.899 olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre üretim oranı için elde edilen model, fermantasyon sonuçlarının %89.9'unu tam olarak temsil etmektedir (Çizelge 4.5). Bunun yanı sıra Cevap Yüzey Metodu tasarımı ve her bir terimin varyans analizi ile incelenmiş ve immobilize edilmiş *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonlarının üretim oranları için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.6'da verilmiştir.

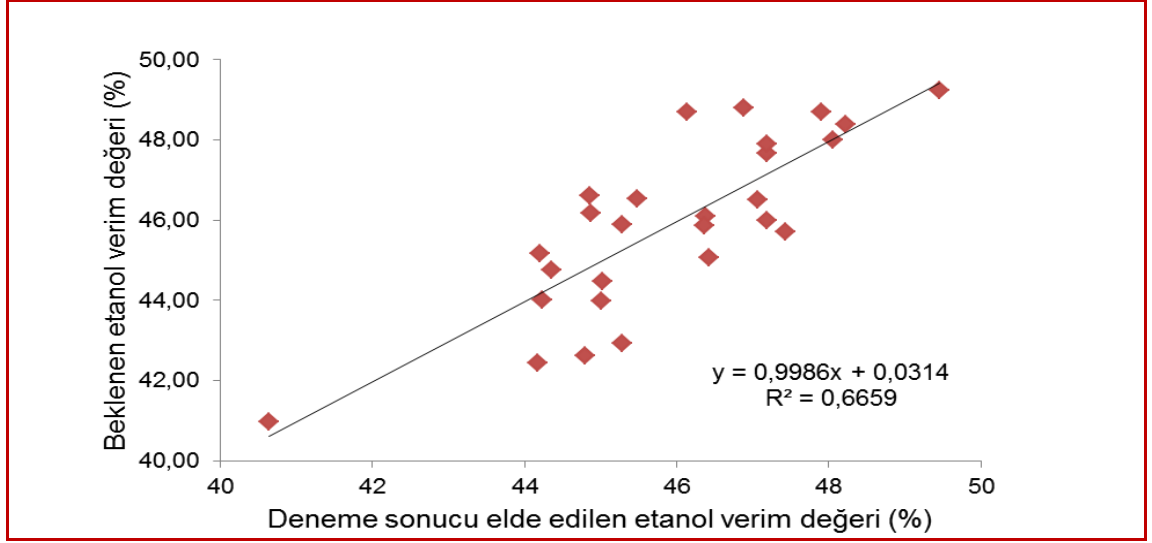
Çizelge 4.6. Model denklemdaki üretim oranının varyans analizi

Kaynak	SD	KT	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Regresyon	14	4.61556	4.61556	0.32968	7.64	0.001
Lineer	4	3.81627	3.81627	0.95407	22.11	0.000
İkinci derece	4	0.24408	0.24408	0.06102	1.41	0.288
Etkileşim	6	0.55522	0.55522	0.09254	2.14	0.123
Artık hata	12	0.51786	0.51786	0.04315		
Uyum eksikliği	10	0.45730	0.45730	0.04573	1.51	0.463
Saf hata	2	0.06055	0.06055	0.03028		
Toplam	26	5.13342				

SD: Serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: Düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: Düzeltilmiş kareler ortalaması

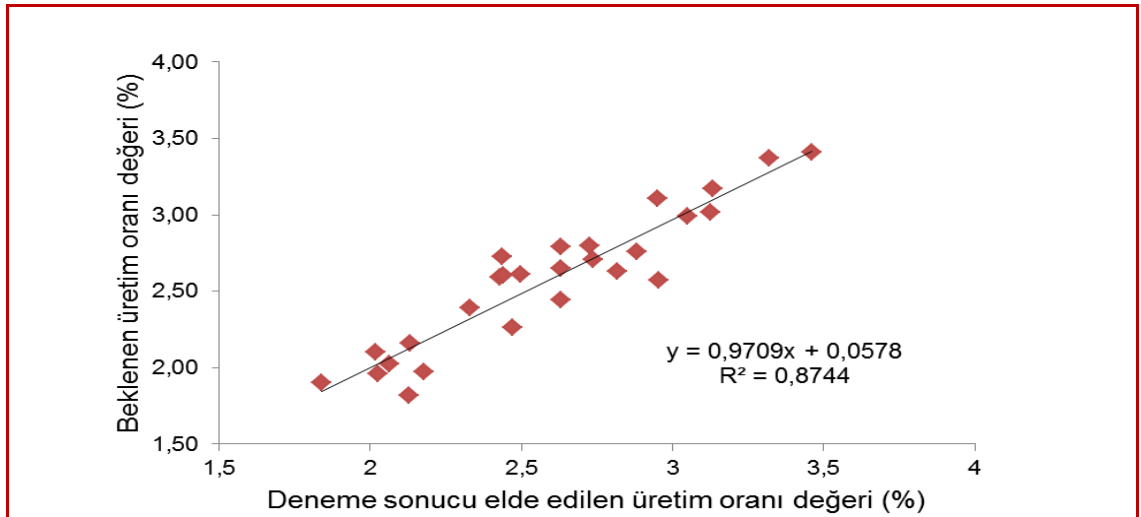
Çizelge 4.6 incelendiğinde üretim oranı için uyum eksikliği değeri (lack of fit) 0.463 olarak bulunmuştur. Uyum eksikliği değeri güvenlik derecesi olan 0.05 değerinden büyük olduğu için modelin uyum eksikliği önemsiz çıkmıştır.

Keçiboynuzu ekstraktında gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucu cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilen çalışmada etanol verimi için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomial model, kodlanmış değişkenler cinsinden Eşitlik 1'de verilmiştir. Eşitlik 1'den elde edilen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.1'de gösterilmiş ve model tahminlerinin deneysel verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.1. İmmobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen etanol verim değerleri

Etanol üretim oranı için elde edilen ikinci dereceden polinomiyal model ise, kodlanmış değişkenler cinsinden sırasıyla Eşitlik 2’de verilmiştir. Eşitlik 2’den elde edilen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.2’de gösterilmiş ve model tahminlerinin deneysel verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır.

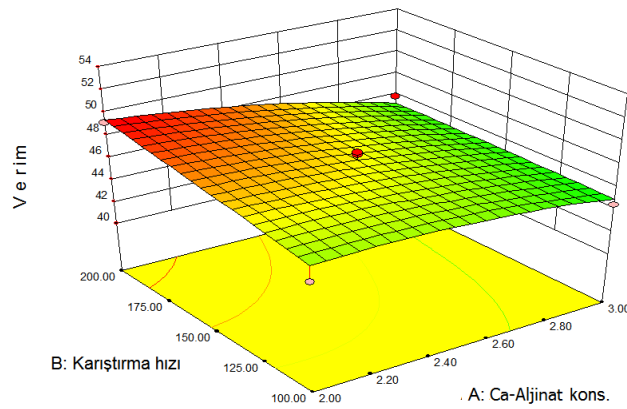


Şekil 4.2. İmmobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen üretim oranı değerleri

Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma, immobilize edilen hücre miktarı ve pH gibi işlem değişkenlerinin fermantasyon yoluyla etanol verimi ve üretim oranı üzerine etkilerinin görsel olarak daha kolay belirlenebilmesi için, elde edilen modeller kullanılarak cevap yüzey grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafikler, işlem değişkenlerinden herhangi birinin deneysel çizimin merkez noktasında (0) sabit tutulup, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir.

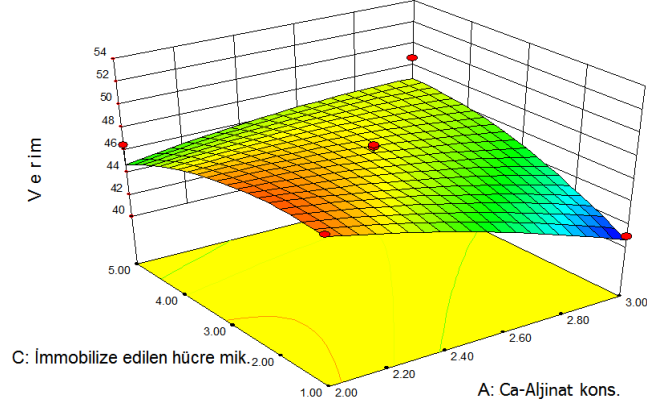
Merkez noktasındaki Ca-aljinat konsantrasyonu (%), karıştırma (d/d), immobilize edilen hücre miktarı (%) ve pH'nın fonksiyonu olarak *S. cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerleri (%) için cevap yüzey grafikleri Şekil 4.3-4.8 arasında gösterilmiştir. Tüm cevap yüzey grafikleri incelendiğinde verim açısından en önemli parametrelerin Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre konsantrasyonu ($P < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Merkez noktasında sabit hücre konsantrasyonu ve pH değerleri için Ca-aljinat konsantrasyonunun ve karıştırma hızının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.3), Ca-aljinat konsantrasyonu azaldıkça ve karıştırma hızı arttıkça verimin arttığı belirlenmiştir. Yüksek karıştırma hızının verimi arttırmasının sebebi immobilize boncukları parçalaması ve boncukların yüzey alanının artması olarak yorumlanmıştır.



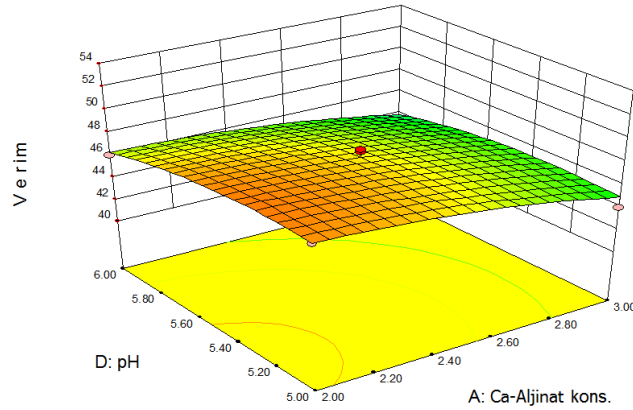
Şekil 4.3. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Ca-aljinat konsantrasyonu ve hücre konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde (Şekil 4.4), Ca-aljinat konsantrasyonu azaldıkça ve hücre konsantrasyonu arttıkça verimin de arttığı belirlenmiştir.



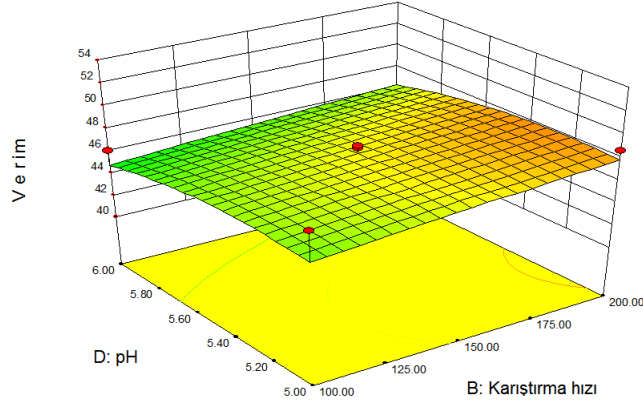
Şekil 4.4. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Farklı pH değerlerinde Ca-aljinat konsantrasyonlarının etkileri incelendiğinde ise bu iki unsurun kombinasyonunun verim üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).



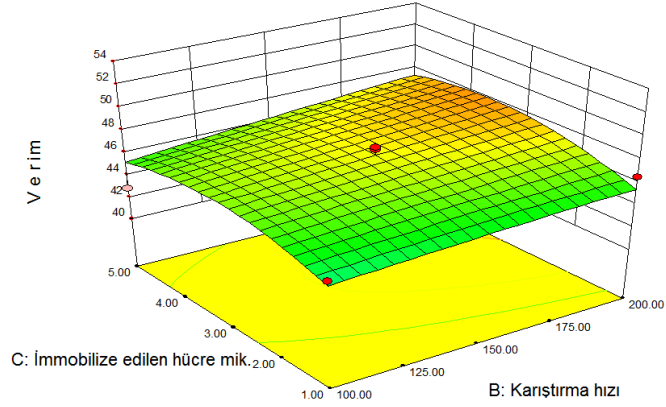
Şekil 4.5. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Farklı karıştırma hızlarına karşılık farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen denemelere ait verim değerleri grafik edildiğinde (Şekil 4.6), pH'nın verim üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı ve karıştırma hızının artması ile de verimde önemsiz bir artış olduğu belirlenmiştir.



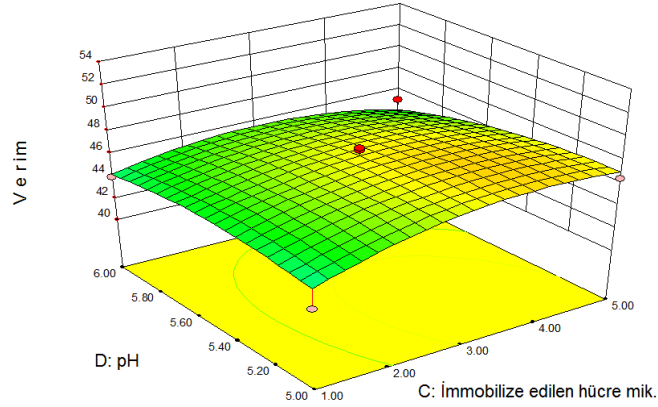
Şekil 4.6. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık karıştırma hızı ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Sabit Ca-aljinat konsantrasyonu ve pH değerinde karıştırmanın ve hücre konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde (Şekil 4.7), hücre konsantrasyonu arttıkça veriminde arttığı buna karşın karıştırma hızının verime herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.7. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık karıştırma hızı ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Son olarak da hücre konsantrasyonunun ve pH'nın verim üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.8) hücre konsantrasyonu arttıkça verimin de arttığı buna karşın pH'nın verime herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.



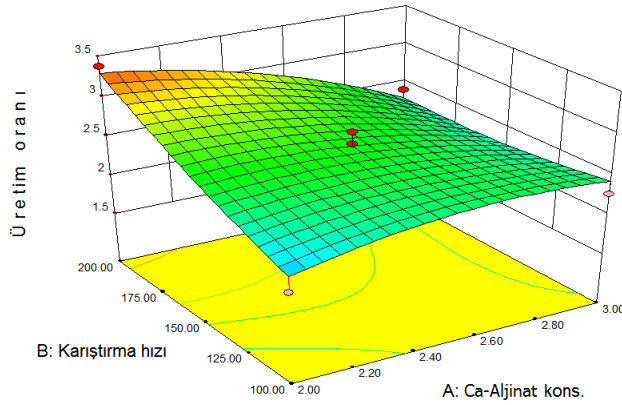
Şekil 4.8. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık immobilize edilen hücre miktarı ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Tüm cevap yüzey grafikleri bir bütün olarak ele alındığında Ca-aljinat konsantrasyonunun ve hücre konsantrasyonunun verim değerine önemli düzeyde

etkisinin olduğu görülmektedir. Çizelge 4.3’de incelendiğinde, varyans analizi sonuçları Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının verim üzerine önemli bir etkisinin ($P<0.05$) olduğunu göstermektedir. Bu durum verim değerleri için çizdirilen kontur plot grafiklerinden elde edilen sonuçları da doğrular niteliktedir.

Merkez noktasındaki Ca-aljinat konsantrasyonu (%), karıştırma (d/d), immobilize edilen hücre miktarı (%) ve pH’nın fonksiyonu olarak *S. cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerleri (g/L/sa) için cevap yüzey grafikleri Şekil 4.9-4.14’de gösterilmiştir. Tüm cevap yüzey grafikleri incelendiğinde, Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma ve immobilize edilen hücre konsantrasyonunun istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

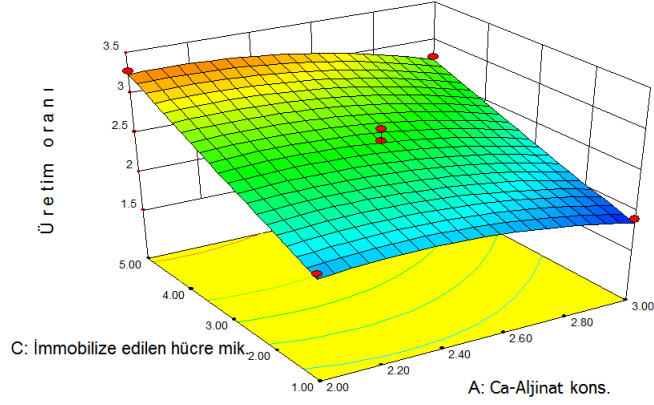
Merkez noktada sabit hücre konsantrasyonu ve pH değerleri için Ca-aljinat konsantrasyonunun ve karıştırma hızının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.9), Ca-aljinat konsantrasyonu azaldıkça ve karıştırma hızı arttıkça etanol üretim oranının da arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.9. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık Ca-aljinat konsantrasyonu ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

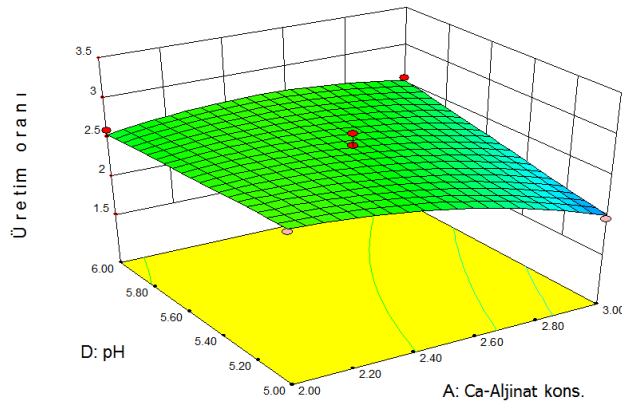
Orta noktada Ca-aljinat konsantrasyonu ve hücre konsantrasyonunun verim üzerine etkisine ait grafik Şekil 4.10’da verilmiştir. Buradan Ca-aljinat konsantrasyonu

azaldıkça ve hücre konsantrasyonu arttıkça etanol üretim oranının da arttığı görülmektedir.



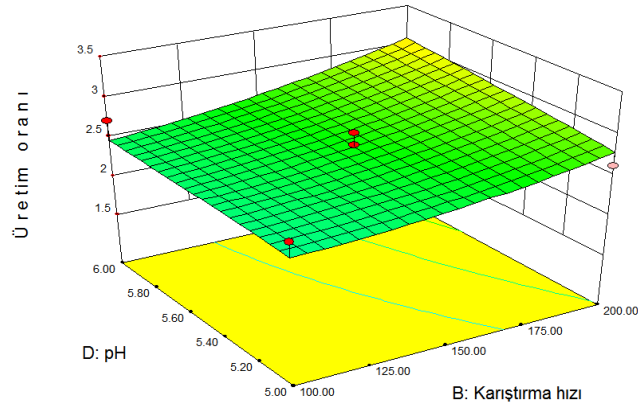
Şekil 4.10. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık Ca-aljinate konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Verim değerlerinde olduğu gibi etanol üretim oranları içinde Ca-aljinate konsantrasyonu ve pH'nın etkilerini veren grafik (Şekil 4.11) incelendiğinde, Ca-aljinate konsantrasyonunun ve pH'nın etanol üretim oranı üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.



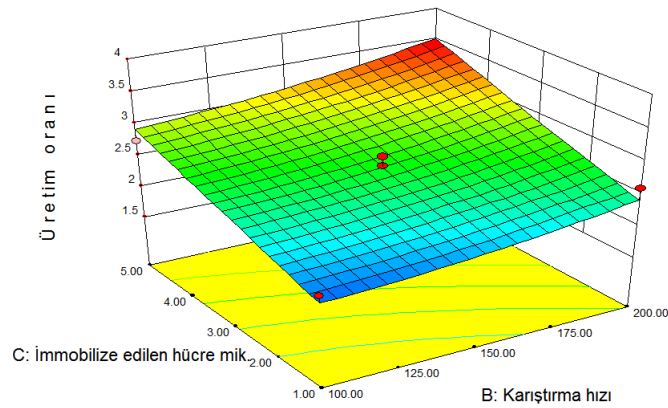
Şekil 4.11. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık Ca-aljinate konsantrasyonu ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Sabit Ca-aljinat ve hücre konsantrasyonunda karıştırmanın ve pH'nın etkisi incelendiğinde ise (Şekil 4.12), pH'nın etanol üretim oranı üzerine belirgin bir etkisi olmamasına karşın karıştırma hızının artması ile de etanol üretim oranının arttığı belirlenmiştir.



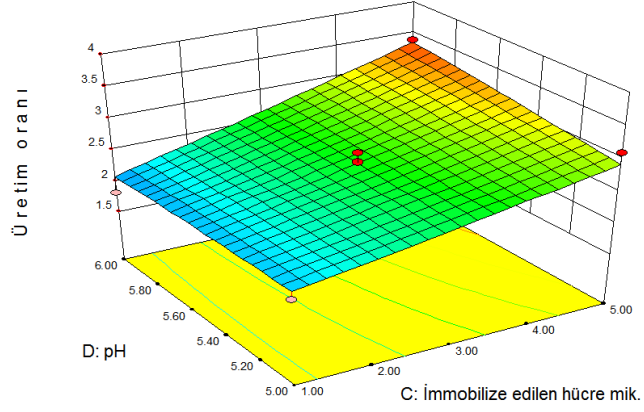
Şekil 4.12. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık karıştırma hızı ve pH'nın ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Karıştırmanın ve hücre konsantrasyonunun etanol üretim oranı üzerine etkisini veren grafik (Şekil 4.13) incelendiğinde ise, hücre konsantrasyonu arttıkça etanol üretim oranının da arttığı buna karşın karıştırma hızının etanol üretim oranına herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık karıştırma hızı ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Son olarak hücre konsantrasyonunun ve pH'nın etkisi incelendiğinde (Şekil 4.14) hücre konsantrasyonu arttıkça etanol üretim oranının da arttığı buna karşın pH'nın etanol üretim oranına herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim oranı değerine karşılık pH ve immobilize edilen hücre miktarının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Tüm cevap yüzey grafikleri bir bütün olarak ele alındığında Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma ve hücre konsantrasyonunun etanol üretim oranına etkisinin önemli olduğu görülmektedir. Çizelge 4.4 varyans analizi sonuçlarının Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma ve immobilize edilen hücre miktarının etanol üretim oranına etkisinin istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) olduğunu göstermektedir.

4.1.6. Etanol verimi ve üretim oranı için optimum şartların belirlenmesi

Cevap yüzey metodu kullanılarak optimum şartların belirlenmesinde etanol verim (%) ve üretim oranı değerleri (g/L/sa) kullanılmıştır. Bu amaçla modelin belirlediği şartlarda gerçekleştirilmiş fermantasyonlar sonucunda elde edilen değerler Cevap Yüzey Optimizasyon uygulaması (Response Surface Optimizer) kullanılarak optimize edilmiştir.

Fermantasyon denemeleri sonucu elde edilen veriler kullanılarak hesaplanan verim (%) ve üretim oranı (g/L/sa) kinetik parametrelerinin en düşük ve en yüksek değerleri Minitab 15.1.1.0 istatistik programında cevap yüzey optimizasyonu kısmına yazılarak etanol üretim şartları optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre model birbirine yakın birkaç optimum üretim şartı belirlemiştir. Belirlenen şartlardan %2 Ca-aljinat konsantrasyonu, 150 d/d karıştırma hızı, %5 immobilize edilen hücre miktarı ve pH 5.5 değerleri optimum şartlar olarak seçilmiştir. Optimum şartlarda gerçekleştirilecek fermantasyonda beklenen verim ve etanol üretim oranı değerleri sırasıyla sırasıyla %44.86 ve 3.13 g/L/sa olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilmiş fermantasyonlar incelendiğinde verim ve üretim oranı daha yüksek değerler elde edilmiş olmasına rağmen optimum şartların daha düşük değerler hedeflenerek seçilmiş olmasının temel nedeni bu şartlarda gerçekleştirilecek olan fermantasyonlarda maksimum değerlere en fazla 24 saat sonra ulaşılmasıdır. Çünkü günümüzde gerçekleştirilen tüm fermantasyon çalışmalarında amaç maksimum üretim miktarlarının elde edilmesinin yanı sıra maliyetlerin de minimuma indirilmesinin sağlanmasıdır. Ayrıca Ca-aljinat konsantrasyonunda %2 değerinin seçilmesi düşük Ca-aljinat konsantrasyonunda substrat ve ürün geçişinin daha kolay ve hızlı gerçekleşebilmesidir. Karıştırma hızı olarak 150 d/d'nın seçilme nedeni ise, 100 d/d karıştırma hızının etanol üretkenlik oranları bakımından yeterli olmayışı, 200 d/d karıştırma hızının verim ve etanol üretkenlik oranları bakımından yeterli olmasına karşın immobilize boncukları parçalaması ve yeniden kullanılabilirliğini kısıtlamasıdır. Immobilize edilen hücre miktarının %5 seçilmesi ise yüksek hücre konsantrasyonunda fermantasyon süresinin kısılması (24 saatin altına inmesi ve hatta 14 saatte maksimum etanol miktarına ve verimine ulaşılması) ve en yüksek verimin bu konsantrasyonda elde edilmiş olmasıdır. pH değeri ise en yüksek verim ve etanol üretim oranının elde edildiği değer olan ortanca değer olarak alınmıştır.

4.1.7. Optimize edilen modelin doğrulama denemeleri

Cevap Yüzey Metodu kullanılarak immobilize *S. cerevisiae* ile keçiyoynuzu ekstraktından etanol üretim şartlarının optimizasyonunda %2 Ca-aljinat konsantrasyonu, 150 d/d karıştırma hızı, %5 immobilize edilen hücre miktarı ve pH 5.5 optimum şartlar

olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda gerçekleştirilen paralelli fermantasyon denemelerinde fermantasyon süresi boyunca şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişimler Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Keçiboynuzu ekstraktında optimum şartlarda gerçekleştirilen etanol fermantasyonu

Süre (saat)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol miktarı (g/L)	Fermantasyon sıvısındaki biyokütle gelişimi (g/L)
B	94.43 ^a ±0.39	0.12 ^d ±0.12	0.00 ^b ±0.00
0	95.49 ^a ±2.66	0.30 ^d ±0.21	0.00 ^b ±0.00
2	92.69 ^a ±1.08	1.75 ^d ±0.23	0.09 ^b ±0.08
4	87.29 ^a ±0.77	4.66 ^d ±0.02	0.33 ^b ±0.31
8	66.71 ^b ±3.17	16.74 ^c ±0.73	0.73 ^b ±0.59
11	44.03 ^c ±8.47	27.85 ^b ±2.15	1.45 ^b ±0.89
14	23.06 ^d ±8.86	36.10 ^a ±0.50	3.55 ^a ±0.21
24	9.06 ^e ±0.16	39.60 ^a ±3.60	4.87 ^a ±0.98
30	8.91 ^e ±0.23	40.40 ^a ±3.00	5.13 ^a ±0.94

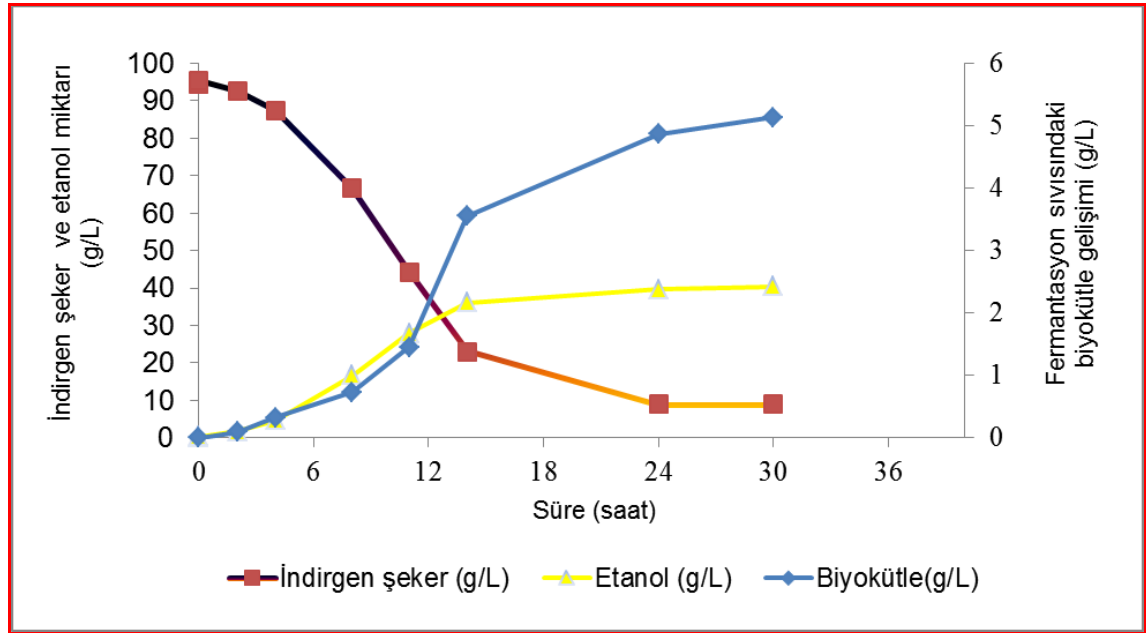
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

Optimum şartlarda gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinin kinetik parametreleri Çizelge 4.8’de verilmiştir. Kinetik parametrelerden verim ve üretim oranı değerleri sırasıyla %46.32 ve 3.19 g/L/sa olarak belirlenmiştir. Optimum şartlar modelden elde edilen denkleme konulduğunda beklenen değerler verim ve üretim oranları için sırasıyla %44.86 ve 3.13 g/L/sa olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar model kapsamında belirlenecek olan etanol verim ve üretim oranı değerlerine ulaşılabilirdiğini ve üzerine çıkılabildiğini doğrulamıştır.

Çizelge 4.8. Optimum şartlarda *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyon denemesine ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	Etanol fermantasyonu
Şeker tüketimi (g/L)	86.57
Etanol üretimi (g/L)	40.10
Verim (%)	46.32
Maks. tük. mik. oranı $(-ds/dt)_{max}$ (g/L/sa)	6.49
Maks. üretim mik. oranı $(-ds/dt)_{max}$ (g/L/sa)	3.19
Şeker kullanım oranı (%)	90.66

Model tarafından belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen etanol üretimlerinde şekerin %90'ından fazlası immobilize edilmiş *S. cerevisiae* hücreleri tarafından tüketilmiştir (Çizelge 4.7). Ayrıca fermantasyon süresi boyunca indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişimler Şekil 4.15'de görülmektedir.



Şekil 4.15. İmmobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* tarafından optimum koşullarda gerçekleştirilen fermantasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretim grafiği

4.1.8. Optimize edilen modelin çevrim sayısının belirlenmesi

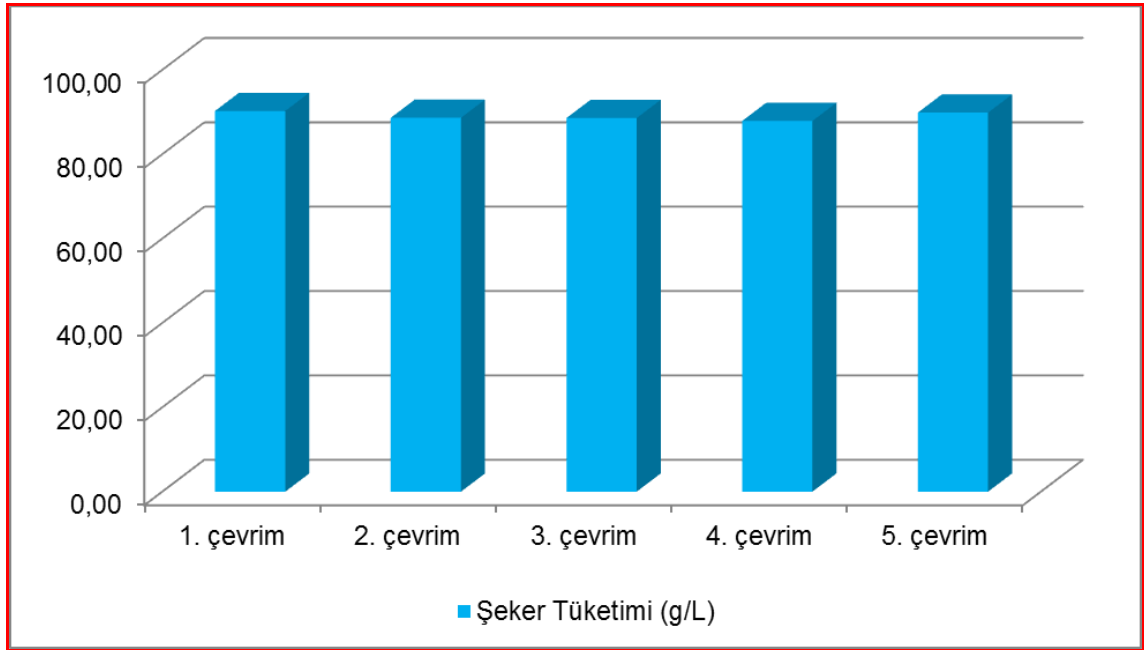
İmmobilize edilen enzim veya hücrenin tekrar kullanılabilirliği immobilizasyonun temel amaçlarındadır. Bu nedenle çalışma kapsamında optimum şartların belirlenmesinden sonra çevrim sayısının belirlenmesi için denemeler yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle reaktörden immobilize hücre çıkışının önlenmesi sağlanmıştır. Ardından inoküle edilen immobilize hücrelerle başlatılan fermantasyon prosesi optimum şartlarda 24 saat boyunca sürdürülmüştür. Burada fermantasyon süresinin 24 saat seçilmesinin nedeni optimum şartların doğrulanmasında gerçekleştirilen etanol denemelerine ait sonuçlar incelendiğinde maksimum etanol verim ve üretim oranı değerlerine 24 saatte ulaşıyor olmasıdır. 24. saat sonunda reaktörün içerisindeki kullanılmış besiyeri steril koşullarda alınarak yerine taze sterilize edilmiş besiyeri ilave edilmiş ve 24 saat daha fermantasyona bırakılmıştır. Bu işlem beş defa tekrarlanmış ve şeker tüketimi, etanol üretimi, verim ve kullanılan şeker oranları 10. ve 24. saatlere göre ayrı ayrı incelenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Optimum şartlarda gerçekleştirilen çevrimlerin kinetik parametreleri

		1.	2.	3.	4.	5.
	Süre (sa)	Çevrim	Çevrim	Çevrim	Çevrim	çevrim
Şeker Tüketimi (g/L)	10	50.33	81.91	79.35	79.36	63.34
	24	90.25	88.63	88.56	87.87	89.85
Etanol Üretimi (g/L)	10	19.66	31.54	25.80	33.28	29.78
	24	41.63	36.85	37.10	35.18	36.11
Verim (%)	10	39.05	38.51	32.51	33.28	29.78
	24	46.13	41.58	41.89	40.03	40.19
Şeker Kullanım Oranı (%)	10	50.33	81.91	79.35	79.36	63.33
	24	90.25	88.63	88.56	87.87	89.85

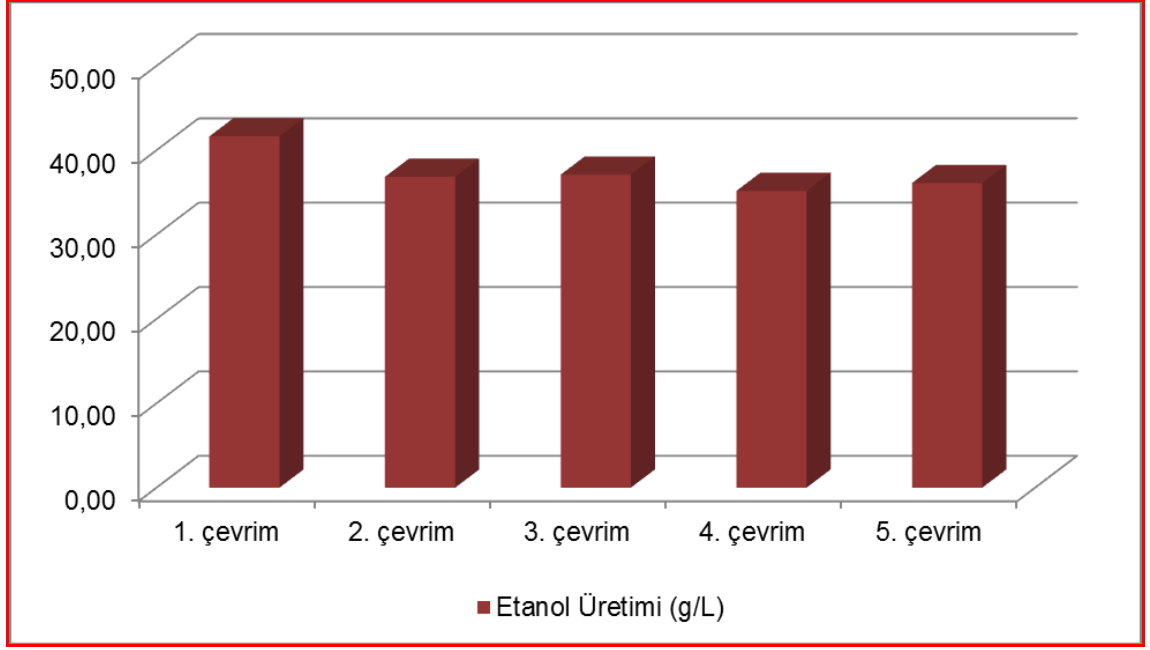
Çizelge 4.9 incelendiğinde birinci çevrimde optimum şartlarda gerçekleştirilen kesikli çalışma ile aynı düzeyde bir verimin elde edildiği görülmektedir. Birinci

çevrimde maksimum etanol miktarı ve verim değerleri incelendiğinde immobilize hücrelerin ortama adaptasyon sürecinden ötürü fermantasyonun 24. saatte maksimum düzeye ulaştığı görülmektedir. İkinci çevrim incelendiğinde çalışmanın 10. saatinde hemen hemen fermantasyonun maksimum düzeylere yaklaştığı ve %81.91'lik bir şeker kullanım oranının gerçekleştiği görülmektedir. Üçüncü çevrimden sonra fermantasyon süresi yine 24 saat düzeylerine gerilemektedir. Bunun yanı sıra şeker kullanım miktarları aynı düzeylerde seyretmesine rağmen etanol üretim miktarlarında meydana gelen azalımdan ötürü verim değerleri düşmektedir. Sonuç olarak en düşük verim değerleri son iki çevrimde elde edilmiş olup son çevrimde 10. saatte şekerin yalnızca %63.33'lük kısmının kullanılabilirdiği tespit edilmiştir. Tüm çevrimler göz önüne alındığında maksimum etanol verim değerine birinci çevrimde ulaşılmış olup bundan sonraki çevrimlerde verim değerlerinde düşüş belirlenmiştir. Ayrıca şeker kullanım oranlarına bakıldığında ise hemen hemen tüm çevrimlerde eşit düzeyde şeker kullanım oranları gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.16).



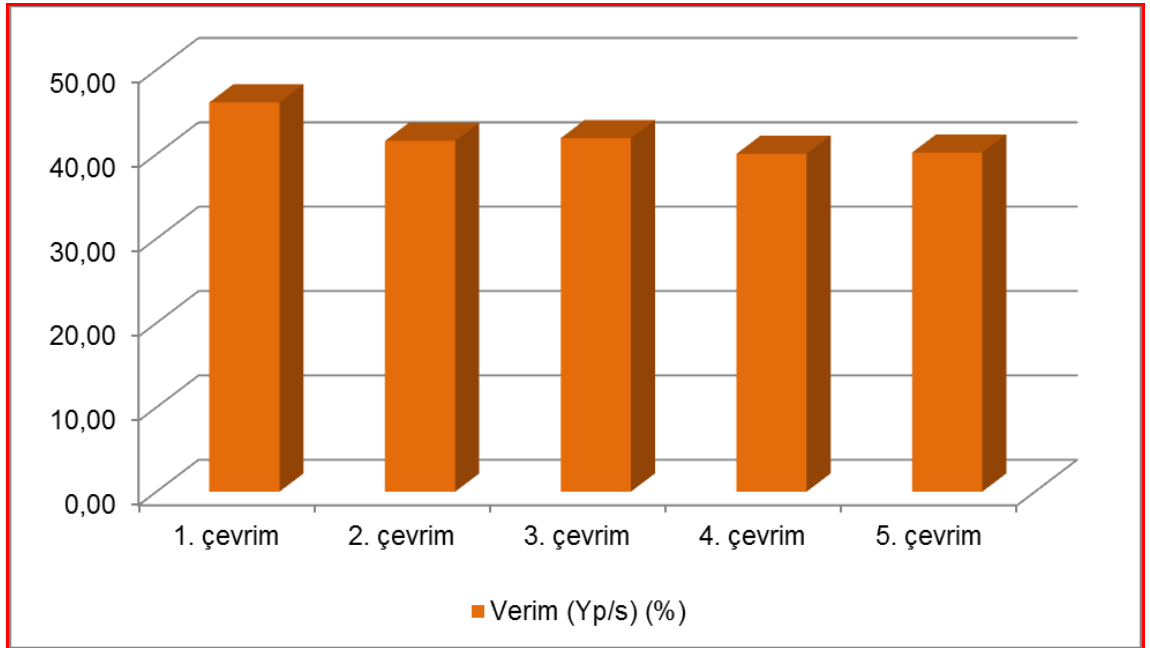
Şekil 4.16. Çevrim boyunca şeker tüketimi

Etanol üretim miktarlarına bakıldığında ise en yüksek etanol üretim miktarının ilk çevrimde gerçekleştiği ve bundan sonraki çevrimlerde üretim miktarının azaldığı ve son çevrimde 36 g/L seviyelerinde kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.17)



Şekil 4.17. Çevrim boyunca etanol üretimi

Çevrim süresince etanol üretim miktarına karşılık şeker tüketimi oranlandığında elde edilen verim değerleri incelendiğinde ise yine en yüksek verim değerinin birinci çevrimde elde edildiği ve bundan sonraki çalışmalarda verim değerinin düştüğü ve beşinci çevrimde %40 düzeylerinde gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Çevrim boyunca verim değerleri

4.1.9. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktı ile pH kontrollü ve kontrolsüz etanol üretimleri

Keçiyoynuzu meyvesi besin maddeleri bakımından zengin bir kaynak olduğundan çalışma kapsamında meyveden elde edilen ekstrakta herhangi bir mineral madde ve azot kaynağı eklenmeksizin etanol üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla optimum şartlarda pH kontrollü ve kontrolsüz fermantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermantasyonlar süresince şeker tüketimi, etanol üretimi ve fermantasyon ortamındaki biyokütle gelişimi takip edilmiştir.

pH kontrollü fermantasyon süresince gerçekleşen şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi Çizelge 4.10'da verilmiştir.

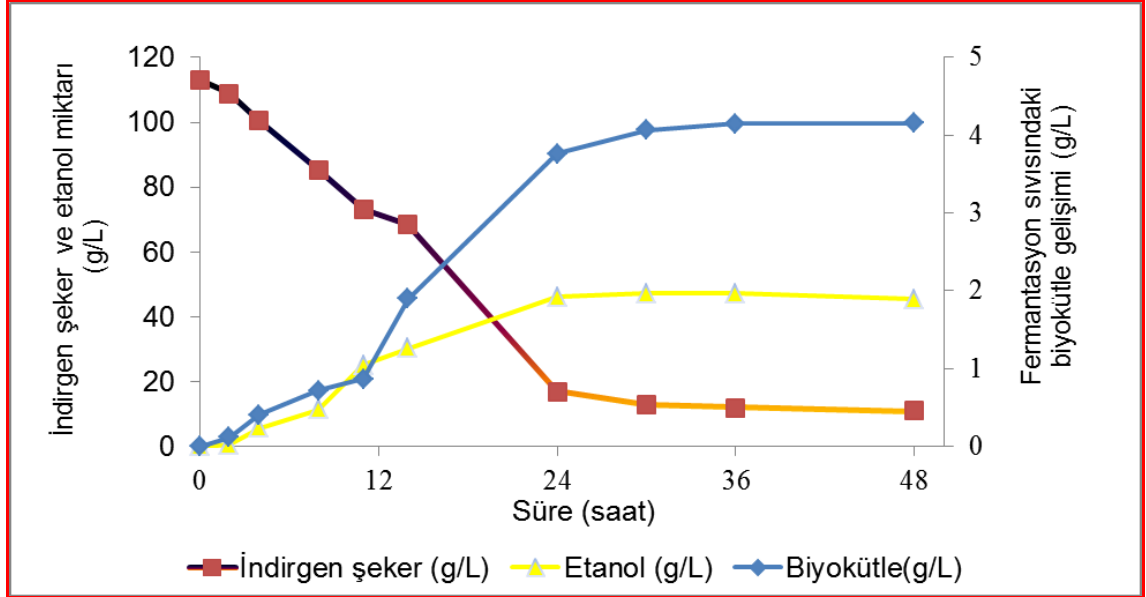
Çizelge 4.10. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında optimum şartlarda gerçekleştirilen pH kontrollü etanol fermantasyonu

Süre (saat)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol miktarı (g/L)	Fermantasyon sıvısındaki biyokütle gelişimi (g/L)
B	115.45 ^a ±0.22	0.00 ^g ±0.00	0.00 ^g ±0.00
0	113.09 ^a ±0.22	0.00 ^g ±0.00	0.00 ^g ±0.00
2	108.87 ^a ±0.59	0.49 ^g ±0.04	0.12 ^g ±0.10
4	100.55 ^b ±2.11	5.60 ^f ±0.14	0.41 ^f ±0.01
8	85.06 ^c ±2.59	11.36 ^e ±1.02	0.72 ^e ±0.06
11	73.05 ^d ±6.84	25.06 ^d ±0.24	0.87 ^d ±0.02
14	68.50 ^d ±1.33	30.31 ^c ±0.37	1.90 ^c ±0.02
24	16.96 ^e ±0.89	46.18 ^{ab} ±0.56	3.76 ^b ±0.04
30	12.88 ^e ±0.00	47.15 ^a ±0.05	4.07 ^a ±0.01
36	11.99 ^e ±0.37	47.11 ^a ±0.05	4.15 ^a ±0.02
48	11.07 ^e ±0.07	45.46 ^b ±0.25	4.16 ^a ±0.05

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

pH kontrollü fermantasyon denemeleri için kinetik parametrelerden şeker tüketimi, etanol üretimi, verim, maksimum şeker tüketim oranı ve maksimum etanol üretim oranı sırasıyla 104.39 g/L, 47.15 g/L, %45.17, 4.13 g/L/sa ve 2.63 g/L/sa olarak

belirlenmiştir. Şekil 4.19’da da görüldüğü gibi maksimum etanol miktarına 30. saatte ulaşılmış ve fermantasyonun devamında etanol miktarında bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.19. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında pH kontrollü etanol fermantasyonu

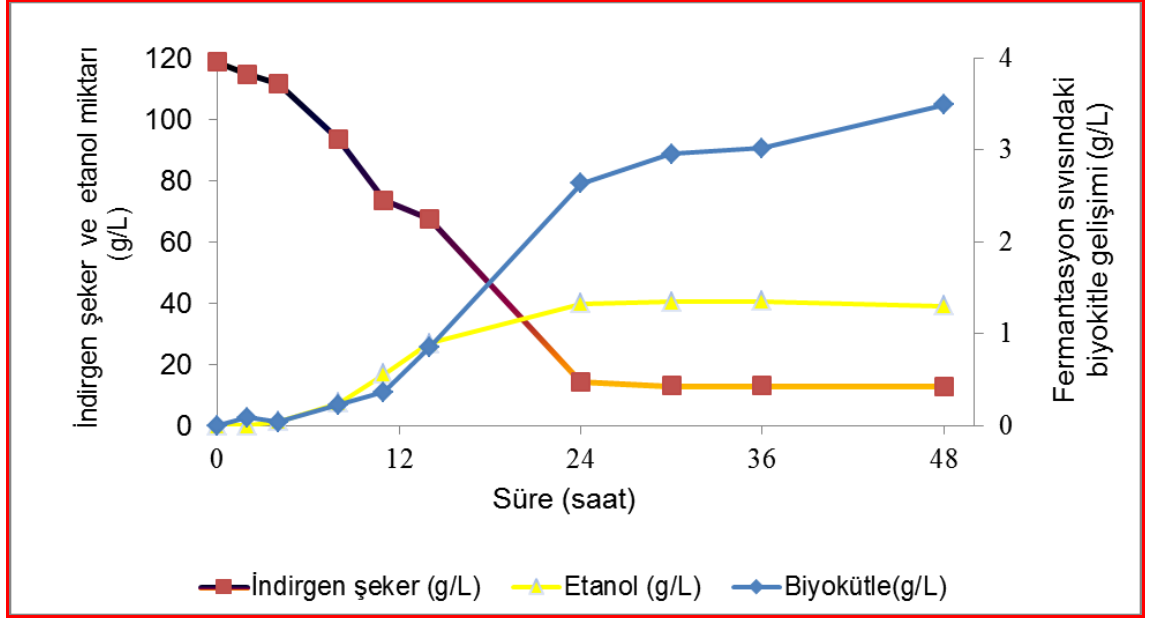
pH kontrolsüz denemelerde gerçekleşen şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi ise Çizelge 4.11’de verilmiştir. pH kontrolsüz gerçekleştirilen denemelerde başlangıç pH değeri 4.95 iken fermantasyon süresince gerçekleşen değişimlerin ardından 48. saat sonunda pH değeri en alt seviyeye (pH 4.50) ulaşmıştır.

Çizelge 4.11. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında optimum şartlarda gerçekleştirilen pH kontrolsüz etanol fermantasyonu

Süre (saat)	Şeker miktarı (g/L)	Etanol miktarı (g/L)	Fermantasyon sıvısındaki biyokütle gelişimi (g/L)
B	118.04 ^a ±0.37	0.00 ^e ±0.00	0.00 ^d ±0.00
0	118.73 ^{ab} ±0.61	0.00 ^e ±0.00	0.00 ^d ±0.00
2	114.59 ^{bc} ±1.87	0.08 ^e ±0.01	0.09 ^d ±0.02
4	111.68 ^c ±0.37	1.27 ^e ±0.47	0.04 ^d ±0.00
8	93.57 ^d ±1.85	7.31 ^d ±1.07	0.23 ^d ±0.06
11	73.63 ^e ±1.21	16.76 ^c ±1.12	0.36 ^d ±0.04
14	67.50 ^f ±2.85	26.79 ^b ±0.97	0.85 ^c ±0.02
24	14.43 ^g ±0.09	39.84 ^a ±1.93	2.63 ^b ±0.01
30	13.21 ^g ±0.27	40.48 ^a ±0.98	2.96 ^b ±0.24
36	13.10 ^g ±0.31	40.64 ^a ±0.92	3.02 ^b ±0.01
48	12.92 ^g ±0.44	39.01 ^a ±1.45	3.49 ^a ±0.38

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

pH kontrolsüz denemelerde şeker tüketimi, etanol üretimi, verim, maksimum tüketim oranı ve maksimum etanol üretim oranı sırasıyla 105.81 g/L, 40.64 g/L, %38.41, 4.83 g/L/sa ve 2.57 g/L/sa olarak belirlenmiştir. Maksimum etanol üretim miktarına ise fermantasyonun 36. saatinde ulaşılmıştır. Ayrıca pH kontrolsüz denemelerde biyokütle gelişimi daha düşük düzeylerde kalmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında pH kontrolsüz etanol fermantasyonu

Zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında gerçekleştirilen pH kontrollü ve kontrolsüz denemeler kıyaslandığında pH kontrolünün etanol üretim miktarını ve dolayısıyla da verimi ve etanol üretim oranını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca pH kontrollü denemelerde fermantasyon sıvısında daha yüksek miktarlarda biyokütle gelişiminin gerçekleştiği ve şeker kullanım oranları kıyaslandığında da pH kontrollü fermantasyonda şekerin %90.42'si başarılı bir şekilde kullanılmışken pH kontrolsüz denemede bu değer %89.12'de kaldığı belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında immobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kullanılarak keçiyoynuzu ekstraktında gerçekleştirilen etanol üretimleri üzerine Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma hızı, immobilize edilen hücre miktarı ve pH'nın etkisi araştırılmış ve etanol üretiminin Box-Behnken cevap yüzey metodu ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonuçları analiz edilerek hesaplanan regresyon katsayıları incelendiğinde verim değerleri için Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının, üretim oranı değerleri göz önüne alındığında ise Ca-aljinat konsantrasyonu, karıştırma hızı ve immobilize edilen hücre miktarının istatistiksel olarak ($P<0.05$) önemli olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar verim ve üretim oranı değerleri göz önüne alınarak Minitab programında optimize edilmeye çalışılmıştır. Buna göre; %2 Ca-aljinat konsantrasyonu, 150 d/d karıştırma hızı, %5 immobilize edilen hücre miktarı ve pH 5.5 değerleri keçiyoynuzu ekstraktında immobilize hücrelerle etanol fermantasyonunda en iyi şartlar olarak belirlenmiştir.

95 g/L başlangıç şeker içeriğinde optimum şartlarda gerçekleştirilen doğrulama denemeleri sonucunda şekerin %90.66'sının kullanıldığı ve 40.10 g/L düzeyinde etanol üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Etanol verim değerinin %46.32 olarak belirlenmesinin yanı sıra şeker kullanım oranı ve etanol üretim oranı sırasıyla 6.49 g/L/sa ve 3.19 g/L/sa olarak tespit edilmiştir.

İmmobilize hücrelerin kullanılabilirlik süresinin (çevrim sayısının) belirlenmesi için de denemeler yapılmıştır. Bu amaçla optimum koşullarda 24 saat (optimum şartlarda gerçekleştirilen kesikli çalışmada maksimum etanol miktarına 24 saatte ulaşıldığından) ara ile kullanılmış fermente sıvı yerine taze sıvı ilave edilecek şekilde 5 çevrim boyunca immobilize hücrelerin etanol üretimleri ve verim değerleri incelenmiştir. Denemeler sonucunda hücrelerin beş çevrim boyunca başarılı bir şekilde kullanıldığı ancak immobilize hücrelerden kayıp meydana geldiği için şeker kullanım

oranı yaklaşık olarak aynı olmasına karşın etanol üretim ve verim değerlerinde düşüş olduğu tespit edilmiştir.

Zenginleştirilmemiş keçiboynuzu ekstraktında gerçekleştirilen pH kontrollü ve pH kontrolsüz denemeler sonucunda pH kontrollü denemelerde daha yüksek etanol verim ve üretim değerlerine ulaşılmıştır. pH kontrollü gerçekleştirilen fermantasyonda şeker tüketimi, etanol üretimi, verim, maksimum şeker tüketim oranı ve maksimum etanol üretim oranı sırasıyla 104.39 g/L, 47.15 g/L, %45.17, 4.13 g/L/sa ve 2.63 g/L/sa olarak gerçekleşmişken bu değerler pH kontrolsüz fermantasyon için sırasıyla 105.81 g/L, 40.64 g/L, %38.41, 4.83 g/L/sa ve 2.57 g/L/sa olarak gerçekleşmiştir. pH kontrolsüz denemelerde etanol üretim miktarının ve oranının daha düşük düzeylerde gerçekleşmiş olmasının nedeni başlangıç pH değerinin 4.95 olması ve fermantasyon süresi boyunca gerçekleşen değişimler sonucunda pH'nın düşmesi ve 48 saat sonunda 4.50 değerine ulaşmasıdır.

Zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş keçiboynuzu ekstraktlarında immobilize *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonlarından elde edilen veriler keçiboynuzu meyvesinin immobilize hücrelerle etanol üretiminde de başarılı bir şekilde kullanılabilirdiğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışma sonucunda immobilize hücrelerle gerçekleştirilen etanol fermantasyonunda sürenin 24 saatin altına indirilebildiği ve immobilize hücrelerin beş çevrim boyunca başarılı bir şekilde kullanılabilirdiği belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen veriler keçiboynuzu meyvesinin biyoteknolojik proseslerde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Bunun yanı sıra elde edilen verilerin endüstriye aktarılabilir özellikte, ölçek büyütme çalışmalarında kullanılacak ve gelecek çalışmalara da temel oluşturabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ANONİM 2012. <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Erişim tarihi: 21.05.2012
- AEHLE, W. 2004. Enzymes in industry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 484 pp. ISBN: 3-527-29592-5.
- ARIYAJAROENWONG, P., LAOPAIBOON, P., JAISIL, P., and LAOPAIBOON, L. 2012. Repeated-Batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks. *Energies*, 5: 1215-1228.
- ATASOY, A.F. 2009. The effects of carob juice concentrates on the properties of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (2): 228-233.
- AYAZ, F. A., TORUN, H., AYAZ, S., CORREIA, P. J., ALAIZ, M., SANZ, C., GRÚZ, J. and STRNAD, M. 2007. Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30: 1040-1055.
- BATTLE, I., and TOUS, J. 1997. Carob tree *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Via delle Sette Chiese 142 00145 Rome, Italy, pp 92.
- BEHERA, S., KAR, S., MOHANTY, R.C., and RAY, R.C. 2010. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy*, 87: 96-100.
- BINER, B., GUBBUK, H., KARHAN, M., AKSU, M. and PEKMEZCI, M. 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry* 100: 1453-1455.
- BULUT, S., ELIBOL, M., and OZER, D. 2004. Effect of different carbon source on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21: 33-37.
- CARVALHEIRO, F., MONIZ, P., DUARTE, L.C., ESTEVES, M.P., and GÍRIO, M. 2011. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38: 221-227.
- CELIK, S. 2010. Production and evaluation of set-type yogurts with carob bean molasses. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 65 (4): 400-403.
- DERVAKOS, G.A., WEBB, C. 1991. On the merits of viable-cell immobilization. *Biotech Adv.*, 9: 559-612.

DEVRES, Y.O. ve PALA, M., 1993. Gıda sanayinde matematiksel modellemenin önemi ve uygulama alanları. *Gıda*, 18 (3):173-181.

EL BATAL, H., HASIB, A., OUTMANE, A., DEHBI, F., JAOUAD, A., and BOULLI A. 2011. Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Arabian Journal of Chemistry*, Article in press, doi: 10.1016/j.arabjc.2011.10.012.

ERTUGAY, C. ve CERTEL, M. 1995. *Biyoteknoloji 1*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın No: 135, Erzurum, 178 sf.

FAO 2012. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>. Erişim tarihi: 20.05.2012

GHORBANI, F., YOUNESI, H., SARI, A.E., and NAJAFPOUR, G. 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36: 503-509.

HUANG, H.-J., RAMASWAMY, S., TSCHIRNER, U.W., and RAMARO, B.V. 2008. A review of separation Technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62: 1-21.

ILLANES, A. 2008. *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications*. 391 pp. ISBN 978-1-4020-8360-0.

KUL, S. 2004. *Cevap Yüzey Yöntemleri*. Mersin Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. (Yüksek Lisans Tezi), 89 sayfa.

KUMAR, S., SINGH, N., and PRASAD, R. 2010. Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1830-1844.

KOURKOUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I.M., MARCHANT, R., KOUTINAS, A.A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21: 377-397.

LEE, K.H., CHOI, I.S., KIM, Y.-G., YANG, D.-J., and BAE, H.-J. 2011. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology*, 102: 8191-8198.

LINGAPPA, K., PRAMOD, T., and ALI, S.I., 2007. Influence of pH on citric acid production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation in carob pod extract. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 66 (8): 618-620.

LIU, C.-Z., WANG, F., and OU-YANG, F. 2008. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresource Technology*, 100: 878-882.

MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall PTR, New Jersey, pp 989.

MANSO, T., NUNES, C., RAPOSO, S., LIMA-COSTA, M.E. 2010. Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. Agglomerans* PBC-1. J Ind Microbiol Biotechnol, 37: 1145-1155.

MENDES, A., GUERRA, P., MADEIRA, V., RUANO, F., da SILVA, T.L., and REIS, A. 2007. Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. World J Microbiol Biotechnol, 23: 1209-1215.

MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C., and ANDERSON-COOK, C.M. 2009. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments Third Edition, NY, Wiley, 680 pp.

NAGHMOUCHI, S., KHOUJA, M. L., ROMERO, A., TOUS, J., AND BOUSSAID, M. 2009. Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. Scientia Horticulturae, 121: 125-130.

NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H., and ISMAIL K. S. K. 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology, 92: 251-260.

NICOLIĆ, S., MOJOVIĆ, L., RAKIN, M., PEJIN, D., and NEDOVIĆ, V. 2009. Effect of different parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. J Chem Technol Biotechnol, 84: 497-503.

OKAFOR, N. 2007. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. Science publishers, United States of America, 530 pp.

OZIYCI, H.R., YATMAZ, E. and TURHAN, I. 2011. Effect of agitation on ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in carob pod extract. European Biotechnology Congress 2011, Current Opinion in Biotechnology, Istanbul, Turkey, Volume 22, Supplement 1, pp 147.

RAZMOVSKI, R., and VUČUROVIĆ, V. 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. Enzyme and Microbial Technology, 48: 378-385.

ROUKAS, T., LAZARIDES, H. and KOTZEKIDEU, P. 1991. Ethanol production from deproteinized whey by *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in different immobilization matrices. Milchwissenschaft. 46(7): 438-441.

- ROUKAS, T. 1993. Ethanol production from Carob pods by *Saccharomyces cerevisiae*. Food Biotechnology, 7(2), 159-176.
- ROUKAS, T. 1994a. Kinetics of Ethanol Production from Carob Pods Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol 44, 49-64.
- ROUKAS, T. 1994b. Continuous Ethanol Production from Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a Packed-Bed Reactor. J.Chem. Tech. Biotechnol. 59, 387-393.
- ROUKAS, T. 1995. Ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on the mineral kissiris. Food Biotechnology. 9(3): 175-188.
- ROUKAS, T. 1996. Continuous Ethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissiris using a Two-Reactor System. Applied Biochemistry and Biotechnology. 59, 299-307.190
- SÁNCHEZ, S., LOZANO, L. J., GODÍNEZ, C., JUAN, D., PÉREZ, A., and HERNÁNDEZ, F. J. 2010. Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. Applied Energy, 87: 3417-3424.
- SANTOS, M., RODRIGUES, A., and TEIXEIRA J. A. 2005. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). Biochemical Engineering Journal, 25: 1-6.
- SHETTY, K., PALIYATH, G., POMETTO, A., and LEVIN, R.E. 2006. Food Biotechnology Second Edition. CRC Press, Broken Sound Parkway NW, USA, 1982 pp.
- SHULER, M.L. and KARGI, F. 2008. Bioprocess Engineering, Basic Concepts.. Prentice Hall PTR, New Jersey, pp 535.
- SINGH, A., and BISHNOI, N.R., 2013. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. Industrial Crops and Products, 41: 221-226.
- SMITH, J. E. 2004. Biotechnology Fourth Edition. Cambridge University Press, Cambridge CB2 8RU, UK, 271 pp.
- STANBURY, P. F., WHITAKER, A. and HALL, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. Butterworth-Heinemann Press, Burlington, MA, pp 351.
- TETIK, N., TURHAN, I., OZIYICI, H. R., GUBBUK, H., KARHAN, M., and ERCISLI, S. 2011. Physical and chemical characterization of *Ceratonia siliqua* L. Germplasm in Turkey. Scientia Horticulturae, 129: 583-589.

TUİK, 2012. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. Erişim tarihi 27.03.2012.

TUNAIL, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 448 S.

TURHAN, I., BIALKA, K. L., DEMIRCI, A., and KARHAN, M. 2010a. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101: 5290-5296.

TURHAN, I., BIALKA, K.L., DEMIRCI, A., and KARHAN, M. 2010b. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*, 24 (4): 364-374.

UNCU, O.N., and CEKMECELIOGLU, D. 2011. Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Management*, 31: 636-643.

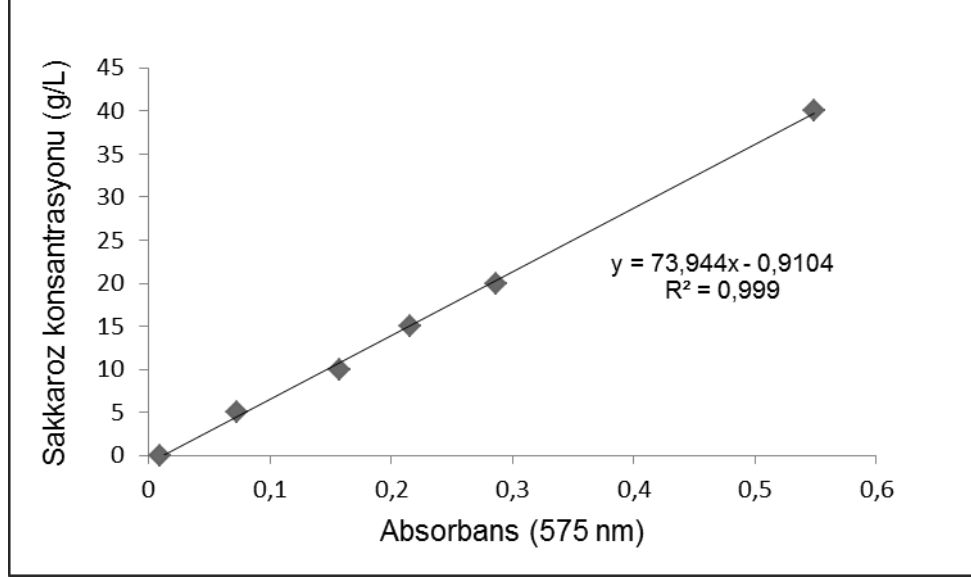
VAHEED, H., SHOJAOSADATI, S. A., and GALIP, H. 2011. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *J. Ind Microbial Biotechnol*, 38: 101-111.

YOUSIF, A. K., and ALGHZAWI, H. M. 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry* 69: 283-287.

YU, J., ZHANG, X., and TAN, T. 2009. Optimization of media conditions for the production of ethanol from sweet sorghum juice by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 33: 521-526.

7. EKLER

Ek 1. İndirgen şeker analizinde kullanılan sakkaroz standart kurvesi ve verileri



Sakkaroz standart kurvesi verileri

Sakkaroz konsantrasyonu (g/L)	Absorbans (575 nm)
0	0,009
5	0,073
10	0,157
15	0,216
20	0,287
40	0,549

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Gaziantep'te doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Mersin'de tamamlamıştır. 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden mezun olmuştur. Eylül 2010'da Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.