

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTI KULLANILARAK  
TEKRARLANAN-KESİKLİ FERMENTASYON YÖNTEMİYLE  
BİYOFİLM REAKTÖRDE ETANOL ÜRETİMİ**

**Mustafa GERMEÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDSİLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**2014**



**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTI KULLANILARAK  
TEKRARLANAN-KESİKLİ FERMENTASYON YÖNTEMİYLE  
BİYOFİLM REAKTÖRDE ETANOL ÜRETİMİ**

**Mustafa GERMEÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2014.02.0121.020 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel  
Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**2014**



**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTI KULLANILARAK  
TEKRARLANAN-KESİKLİ FERMENTASYON YÖNTEMİYLE  
BİYOFİLM REAKTÖRDE ETANOL ÜRETİMİ**

**Mustafa GERMEÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

Bu tez 17.07.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)  
Doç. Dr. İrfan TURHAN  
Yrd. Doç. Dr. Oğuz AYDEMİR



## ÖZET

### KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTI KULLANILARAK TEKRARLANAN-KESİKLİ FERMENTASYON YÖNTEMİYLE BİYOFİLM REAKTÖRDE ETANOL ÜRETİMİ

Mustafa GERMEÇ

**Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı**  
**Danışman: Prof. Dr. Mustafa KARHAN**  
**Temmuz 2014, 116 sayfa**

Lignoselülozik materyallerin ve tarımsal ürünlerin/atıkların biyoteknolojik proseslerde kullanımı, yüksek şeker içeriğine sahip olmaları nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. Dolayısıyla enzimler, organik asitler ve biyoyakıtlar gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretimi ekonomik açıdan önemli görülmektedir. Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile biyofilm reaktörde etanol üretmek amacıyla tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle biyofilm oluşumunda mayanın yüzeye tutunmasını sağlayan biyofilm materyali belirlenmiş ve sonrasında cevap yüzey metodunun belirlemiş olduğu koşullarda keçiboynuzu ekstraktından etanol üretimlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna ilaveten belirlenen optimum koşullarda besiyeri bileşiminde bulunan azot kaynaklarının farklı kombinasyonları kullanılarak fermentasyon üzerine etkisi belirlenmiştir. Ayrıca kontrol amaçlı en iyi şartlarda zenginleştirilmemiş besiyerinde etanol fermentasyonu yapılmıştır. Bununla beraber sterilizasyonun etkisini belirlemek amacıyla steril olmayan zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş besiyerinde etanol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir.

Biyofilm reaktörde mayaların yüzeye tutunmasını sağlayarak biyofilm oluşumuna neden olan Plastik Kompozit Destek (PKD) materyali kullanılmıştır. Bu amaçla etanol üretiminde en iyi olan biyofilm materyalini belirlemek için dört farklı PKD (SH-SF-YE-SALTS, SH-SF-YE-BA-SALTS, SH-SF-SALTS, SH-SF-YE-RBC-SALTS) kullanılmıştır. En yüksek etanol üretimi SH-SF-YE-BA-SALTS bileşenlerinden oluşan biyofilm materyali kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra biyoreaktörün şaftına belirlenen PKD materyali bağlanarak biyofilm oluşumu sağlanmış ve keçiboynuzundan etanol üretimlerinin optimizasyonu cevap yüzey metodunun belirlemiş olduğu koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar; başlangıç şeker içeriği (4, 7, 10°Bx), besiyerinde pH değeri (pH 5.0, 5.5, 6.0) ve karıştırma hızı (100, 150, 200 rpm) olarak seçilmiştir. Fermentasyon denemelerinden sonra optimum koşullar 7.71°Bx, 5.18 pH ve 120 rpm olarak bulunmuştur. Optimum koşullar belirlendikten sonra besiyeri bileşiminde bulunan azot kaynaklarının farklı kombinasyonları kullanılarak fermentasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen fermentasyon sonuçlarına göre besiyerinde azot kaynağı kullanımının verim, maksimum tüketim hızı ve maksimum üretim hızı gibi kinetik parametreler üzerine önemli etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca steril zenginleştirilmemiş, steril olmayan zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş

besiyerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonların sonucunda optimum koşullara göre daha dşuk verim ve üretim hızı elde edilmiştir.

Bu alışma sonucunda, *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak biyofilm reaktörde keçiboynuzu ekstraktından etanol üretimleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm reaktörde bulunan **yüksek hücre yoğunluğu** ve Plastik Kompozit Destek (PKD) materyali yüzeyine tutunan **biyofilmler** nedeniyle ürün verimi ve üretkenliği artırılmış ve fermentasyon süresi 12 saat olarak belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Keçiboynuzu ekstraktı, etanol, biyofilm reaktör, tekrarlanan-kesikli fermentasyon, cevap yüzey metodu

**JÜRİ:** Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)  
Doç. Dr. İrfan TURHAN  
Yrd. Doç. Dr. Oğuz AYDEMİR



## ABSTRACT

### ETHANOL PRODUCTION IN BIOFILM REACTOR VIA REPEATED-BATCH FERMENTATION USING CAROB POD EXTRACT

Mustafa GERMEC

MSc Thesis in Food Engineering  
Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KARHAN  
July 2014, 116 pages

Use of lignocellulosic materials and agricultural wastes/products in biotechnological processes has recently increased due to these resources have high sugar content. Accordingly, production of high value added products such as enzyme, organic acid, biofuel is important from the point of economy. In this study, repeated-batch fermentation was evaluated using a biofilm reactor for ethanol production from carob pod extract by *Saccharomyces cerevisiae*. Primarily, biofilm material was determined to provide for attachment on surface of yeast and then optimization of ethanol production from carob pod extract was performed at optimum conditions of response surface method. Thus, the effect of different combinations of nitrogen sources on fermentation was evaluated at optimum conditions determined. Besides, ethanol fermentation was carried out under optimum conditions in non-enrichment medium as control. Nevertheless, the ethanol fermentations were performed using non-sterile enrichment and non-enrichment medium and their effect on fermentation was investigated.

Plastic Composite Support (PCS) material that causing biofilm formation providing on surface attachment of yeast in biofilm reactor was used. In order to determine the best biofilm material, four different PCS materials were used as following SH-SF-YE-SALTS, SH-SF-YE-BA-SALTS, SH-SF-SALTS and SH-SF-YE-RBC-SALTS. The highest ethanol production was obtained from biofilm material including SH-SF-YE-BA-SALTS. Then, selected PCS material was bonded on shaft in bioreactor and biofilm formation was performed to establish on PCS material. After optimization of ethanol production from carob pod extract was performed at conditions of response surface method. These conditions were selected as initial sugar concentration (4, 7 and 10°Bx), pH (5.0, 5.5 and 6.0) and agitation (100, 150 and 200 rpm). Optimum conditions were found to be 7.71°Bx, 5.18 pH and 120 rpm after fermentations. At the end of the determination optimum conditions, the effect of different combinations of nitrogen sources on fermentation in optimum conditions was researched. Consequently, the kinetic parameters such as yield, maximum consumption rate and maximum production rate of nitrogen sources were determined to be significantly important impact. Besides, ethanol fermentations in biofilm reactor were carried out in sterile non-enrichment (control), non-sterile enrichment and non-enrichment medium. Results showed that obtained yields and production rates were lower than optimum conditions scored.

Overall, this study demonstrated that ethanol productions in a biofilm reactor from carob pod extract using *Saccharomyces cerevisiae* can be successfully implemented. Product yield and productivity were increased due to **high cell concentration** in biofilm reactor and **biofilms** attachment on PCS surface and fermentation time was determined as 12 hours.

**KEYWORDS:** Carob pod extract, ethanol, biofilm reactor, repeated-batch fermentation, response surface method

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Supervisor)  
Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN  
Asst. Prof. Dr. Oguz AYDEMIR

## ÖNSÖZ

Global dünyanın en temel problemlerinden birisi enerji sorunudur. Enerji ihtiyacı gelişen teknoloji ile birlikte her geçen gün artmakta ancak günümüzde enerjinin büyük bir kısmını karşıladığımız fosil yakıtlar gün geçtikçe azalmaktadır. Dolayısıyla bu durum, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri yeni enerji kaynakları aramaya itmiştir. Dünya’da birçok ülkede yeterince değerlendirilemeyen tarımsal ürünler, gıda işleyen fabrikaların atıkları ve yüksek karbonhidrat ve polisakkaritleri içeren tarımsal atıklar, fermentasyon yoluyla katma değeri yüksek ürünlerin ve biyoyakıtların üretiminde kullanılmaktadır. Bu durum hem gıda atıklarının çevreye ve canlılara zarar verme problemini çözmekte hem de bu atıkların değerlendirilmesi sonucunda elde edilen ürünler ülke ve dünya ekonomisine katkı sağlamaktadır. Bu amaçla birçok enzim, organik asit, vitamin, aminoasit, **alkol**, antibiyotik ve antibodi gibi katma değeri yüksek ürünler fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Bu ürünlerin üretiminde saf kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklar da kullanılmaktadır. Saf kimyasallarla üretimin çok pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin ve organik atıklarının değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar alternatif olarak doğal yetişen ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır. Bu amaçla şeker pancarı, melas, şeker kamışı ve mısır gibi birçok bitkisel ürün yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ürünlerden çok daha yüksek düzeyde şeker ve mineral madde içeren keçiboynuzu meyvesinin söz konusu biyoteknolojik üretim amacıyla endüstri hammaddesi olarak yeterince değerlendirilmediği anlaşılmaktadır. Ayrıca bu konuda yeterli bilimsel çalışmanın yapılmadığı da bilinmektedir.

Gıda atıklarından ve yüksek karbonhidrat içeriği taşıyan tarımsal ürünlerden katma değeri yüksek bir ürün olan **etanolün** üretilmesi, günümüzde petrol ürünlerinden elde edilen enerjiye alternatif olarak görülmektedir. 2013 yılında bu yolla 83.873 milyon litre etanol üretilmiş ve her geçen yıl etanol üretim miktarı artmıştır. Etanol, araç yakıtlarına farklı oranlarda karıştırılabilmekte, içecek endüstrisinde kullanılmakta ve laboratuvar çalışmalarında sterilizasyon ve çözücü amaçlı kullanılabilir. Etanolün

Bu çalışmada öncelikli olarak biyoteknolojik açıdan içeriğinin uygun olması, ülkemizin Akdeniz Bölgesinde çok yaygın olarak yetişmesi, endüstride yeterince değerlendirilememesi ve bu alanda yeni kullanılacak bir ürün olması nedeniyle keçiboynuzu ekstraktından tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemi ile biyofilm reaktörde *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak başlangıç şeker içeriğinin, besiyerinde pH değerinin ve karıştırma hızının etanol üretimleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Fermentasyonlar sonucunda elde edilen verilere göre etanol üretimlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve fermentasyon süresi, yüksek hücre yoğunluğu ve yüzeylere tutunan biyofilmler aracılığı ile 12 saat olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların sanayide kullanılabilir olduğu ve bu verilerin tesis kurulumunda yardımcı olacağı düşünülmektedir. Dünyada yüksek miktarlarda üretimi gerçekleştirilen ve pazarlanan etanol, ülkemizde yeterli miktarda üretilmemekte ve kullanılan etanolün büyük çoğunluğu yurt dışından ithal edilmektedir. Ülkemizde etanol üretiminin yeterli düzeyde yapılması durumunda dışa bağımlılık azalacak ve yeni iş alanları açılarak ülke sektöründe yeni bir pazar oluşturulacaktır.

Bana bu konuyu çalışma fırsatı veren, çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyen, fikirleri ile bana yol gösteren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa KARHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve Yrd. Doç. Dr. Oğuz AYDEMİR'e (Çankırı Karatekin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan materyali temin eden Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. ve Saimoğlu Ticaret A.Ş. yetkililerine, çalışmalarım sırasında bana yardım eden ve zorlandığım dönemlerde yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Hatice Reyhan ÖZİYCI'ye ve çok değerli arkadaşlarım Aysen Güher GÜNDEŞ'e, Atike Nur DURAK'a, Ercan KARAHALİL'e, Ercan YATMAZ'a, Ahmet Oktay KÜÇÜKÖZET'e, Emrah EROĞLU'na ve hayatımın geri kalanını birlikte geçireceğim, bana desteğini esirgemeyen ve bana güvenen sevgili eşim Hacer GERMEÇ'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmamı mali yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her evresinde beni destekleyen, üzüldüğümde teselli eden, her zaman maddi manevi yanımda olan, bana inanan, güvenen ve kayıtsız şartsız destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....	3
2.1. Keçiboynuzu.....	3
2.2. Biyofilmler .....	6
2.2.1. Biyofilm oluşumu ve yapısı .....	6
2.3. Biyofilm Reaktör Tipleri .....	9
2.3.1. Karıştırmalı tank reaktör .....	9
2.3.2. Sabit yataklı reaktör .....	10
2.3.3. Akışkan yatak reaktör.....	11
2.3.4. Dönen disk reaktör .....	11
2.3.5. Membran biyofilm reaktör .....	13
2.3.6. Biyofilm reaktörlerin avantajları .....	13
2.3.7. Biyofilm reaktörlerin kısıtlamaları.....	14
2.4. Biyokütle Destek Materyalleri .....	15
2.5. Biyofilm Reaktörlerin Uygulamaları.....	18
2.5.1. Biyoetanol üretimi.....	18
2.5.2. Organik asit üretimi.....	20
2.5.3. Enzim üretimi .....	22
2.5.4. Antibiyotik üretimi .....	23
2.5.5. Mikrobiyel ekzopolisakkarit üretimi .....	23
2.5.6. Biyokatalizörler .....	24
2.6. Fermentasyon Mikrobiyolojisi .....	24
2.7. Mikroorganizmaların Beslenmeleri.....	26
2.8. Fermentasyon Yöntemleri .....	29
2.8.1. Kesikli fermentasyon.....	29
2.8.2. Beslemeli-kesikli fermentasyon .....	30

2.8.3. Sürekli fermentasyon.....	31
2.8.4. Tekrarlanan-kesikli fermentasyon.....	31
2.9. Mikrobiyal Gelişme.....	32
2.9.1. Gelişme eğrisi (kurvesi) .....	33
2.10. Etanol.....	38
2.10.1. Etanolün özellikleri (fiziksel, kimyasal ve termal özellikler) .....	39
2.10.2. Etanol kullanımı .....	39
2.10.3. Etanol fermentasyonu.....	40
2.10.4. Etanol fermentasyonu teknolojisi.....	42
2.11. Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu.....	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Etanol üretiminde kullanılan keçiboynuzu meyvesi .....	46
3.1.2. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizma .....	46
3.1.3. Biyofilm oluşumunu gerçekleştirmek için kullanılan plastik kompozit destek materyali.....	46
3.1.4. Fermentasyonda kullanılan biyofilm reaktör .....	47
3.1.5. Etanol üretimi için deneme deseni oluşturma .....	47
3.1.6. Cevap yüzey metodu (responce surface method).....	48
3.2. Yöntem .....	50
3.2.1. Fermentasyon ortamı için gerekli ekstraktın elde edilmesi.....	50
3.2.2. Biyofilm destek materyalinin belirlenmesi .....	50
3.2.3. Şeker analizi .....	50
3.2.4. Etanol analizi.....	51
3.2.5. Biyokütle analizi .....	51
3.2.6. Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	51
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler .....	54
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	55
4.1. Etanol Fermentasyonunda Kullanılan Biyofilm Materyalinin Belirlenmesi.....	55
4.1.1. SH-SF-YE-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı .....	55
4.1.2. SH-SF-YE-BA-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı.....	56
4.1.3. SH-SF-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı .....	58
4.1.4. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı .....	59
4.1.5. PKD materyallerinin karşılaştırılması .....	61

4.2. Cevap Yüzey Metodunun Belirlemiş Olduğu Koşullarda Seçilen Biyofilm Materyali Kullanılarak Gerçekleştirilen Etanol Fermentasyonu.....	63
4.2.1. Başlangıç şeker içeriğinin fermentasyon üzerine etkisi .....	63
4.2.2. Besiyerinde pH değerinin fermentasyon üzerine etkisi.....	68
4.2.3. Karıştırma hızının fermentasyon üzerine etkisi.....	68
4.2.4. Etanol üretimlerinin optimizasyonu .....	69
4.2.5. Etanol verimi ve üretim hızı için optimum koşulların belirlenmesi ve optimizasyonu.....	77
4.3. Optimum Koşullarda Azot kaynağına Bağlı Olarak Gerçekleştirilen Etanol Fermentasyonunu .....	81
4.4. Optimum Koşullarda Zenginleştirilmemiş Keçiboynuzu Ekstraktı ile Biyofilm Reaktörde Etanol Üretimi.....	89
4.5. Optimum Koşullarda Steril Olmayan Zenginleştirilmiş ve Zenginleştirilmemiş Besiyeri ile Etanol Fermentasyonu .....	90
5. SONUÇ .....	95
6. KAYNAKLAR .....	99
7. EKLER.....	110
Ek-1. Kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiboynuzu meyvesi.....	110
Ek-2. Toplam indirgen şeker analizinde kullanılan sakaroz standart kurvesi ve verileri .....	111
Ek-3. Biyofilm materyali belirleme işlemi sırasında çekilen fotoğraflar .....	112
Ek-4. Fermentasyon çalışmalarında kullanılan biyofilm reaktör .....	113
Ek-5. Fermentasyon sırasında biyofilmlerin gelişim safhaları.....	114
Ek-6. Biyofilm reaktör içerisindeki hücre yoğunluğunu gösteren fotoğraflar .....	115
Ek-7. Fermentasyonların sonunda PKD materyallerinin yüzeyine tutunan mikroorganizmaların kontrol olarak kullanılan biyofilm materyaline karşı sterio mikroskopta çekilmiş fotoğrafları .....	116

## ÖZGEÇMİŞ

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\mu$ L: mikrolitre  
 $\mu$ m: mikrometre  
 $\mu$ M: mikromolar  
atm: atmosfer  
 $a_w$ : Su aktivitesi  
dk: dakika  
dm: desimetre  
g: gram  
h: saat  
Ha: Hektar  
Hg: Hektogram  
kcal: kilokalori  
kg: kilogram  
km: kilometre  
L: litre  
mg: miligram  
ml: mililitre  
mm: milimetre  
mmHg: milimetre civa  
nm: nanometre  
 $^{\circ}$ Bx: Briks (% Suda çözünür kuru madde)  
 $^{\circ}$ C: derece  
rpm: devir/dakika  
sn: saniye  
U: Uluslararası birim  
v/v: hacim/hacim  
w/v: ağırlık/hacim  
wt: ağırlık  
 $\alpha$ : Alfa  
 $\beta$ : Beta

### Kısaltmalar

$\mu$ : Mikroorganizma için spesifik gelişme hızı  
 $\mu_d$ : Spesifik ölüm hızı  
A.Ş: Anonim şirketi  
ABR: Hava kaldırmalı reaktör  
ADP: Adenozin difosfat  
ATCC: American Type Culture Collection  
ATP: Adenozin trifosfat  
B: Başlangıç örneği  
BA: Sığır albümini  
BC: Bakteriyel selüloz  
CSTR: Karıştırmalı tank reaktör



CYM: Cevap Yüzey Metodu  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
DNSA: Dinitro salisilik asit  
dx/dt: Birim zamanda biyokütle oluşumu  
EBR: Genişletilmiş yatak reaktör  
EPS: Ekzopolisakkarit  
ETS: Elektron taşıma sistemi  
FAO: Food and Agricultural Organization of the United Nations  
FBR: Akışkan yatak reaktör  
Fe-S: Demir sülfür  
KDPG: 2-keto, 3-deoksi, 6-fosfoglukonat  
M: Molar  
MABR: Havalandırılmış membran biyofilm reaktör  
NAD: Nikotinamid dinükleotit  
O: Yulaf kabukları  
OD: Optik dansite  
P: Ürün  
P<sub>0</sub>: Fermentasyon başlangıcındaki ürün miktarı  
P<sub>1</sub>: Fermentasyon sonundaki ürün miktarı  
PBR: Sabit yataklı reaktör  
PGAL: Fosfo geliseraldehit  
pH: Hidrojen iyonlarının eksi (-) logaritması  
PKD: Plastik kompozit destek  
pO<sub>2</sub>: Çözünmüş oksijen miktarı  
PP: Polipropilen  
PUF: Poliüretan köpük  
RBC: Kırmızı kan hücreleri  
RDC: Dönen-disk kondaktörü  
RuBP: Ribuloz-bi-fosfat  
S: Substrat  
S<sub>0</sub>: Fermentasyon başlangıcındaki substrat miktarı  
S<sub>1</sub>: Fermentasyon sonundaki substrat miktarı  
SF: Soya fasulyesi unu  
SH: Soya fasulyesi kabuğu  
t: zaman  
TBR: Damlatmalı yatak reaktör  
t<sub>d</sub>: İkiye katlanma süresi (doubling time)  
TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu  
UASB: Yukarı yatay akışlı anaerobik çamur yataklı reaktör  
UV: Ultraviyole  
x: Biyokütle miktarı  
x<sub>0</sub>: Fermentasyon başlangıcındaki biyokütle miktarı  
x<sub>max</sub>: Maksimum biyokütle miktarı  
YE: Yeast ekstrakt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyofilm oluşum basamakları .....	7
Şekil 2.2. Biyofilm partiküllerinin ve biyofilm reaktörlerinin çeşitli türlerinin şematik gösterimi. ....	12
Şekil 2.3. Karıştırıcı şaftın üzerine PKD materyallerinin bağlanması .....	15
Şekil 2.4. Fermentasyon yöntemlerinin şekilsel gösterimi .....	31
Şekil 2.5. Tekrarlanan-kesikli biyofilm reaktörün şematik gösterimi .....	32
Şekil 2.6. Mikroorganizmaların gelişme eğrisi .....	34
Şekil 2.7. Glukozdan etil alkol üretim reaksiyonu .....	41
Şekil 2.8. Cevap yüzey metodu kontur plot grafiği .....	44
Şekil 3.1. Sartorius stedim Biostat B Plus Biyoreaktör ve biyofilm materyali.....	47
Şekil 3.2. Karıştırıcı şaftın üzerine PKD materyallerinin bağlanması .....	49
Şekil 3.3. Maksimum şeker tüketim hızı, maksimum etanol üretim hızı ve maksimum biyokütle gelişim hızının hesaplanması.....	53
Şekil 4.1. SH-SF-YE-SALTS kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği .....	56
Şekil 4.2. SH-SF-YE-BA-SALTS kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği .....	58
Şekil 4.3. SH-SF-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği .....	59
Şekil 4.4. SH-SF-YE-RBC-SALTS materyal kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği .....	61
Şekil 4.5. Biyofilm materyallerine ait verim, şeker kullanım oranı, maksimum tüketim hızı ve maksimum üretim hızı grafiği .....	62
Şekil 4.6. Başlangıç şeker içeriği 4°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri .....	65
Şekil 4.7. Başlangıç şeker içeriği 7°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri .....	66

Şekil 4.8. Başlangıç şeker içeriği 10°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri .....	67
Şekil 4.9. Biyofilm reaktörde <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile gerçekleştirilen tekrarlanan-kesikli fermentasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen etanol verim değerleri .....	72
Şekil 4.10. Biyofilm reaktörde <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile gerçekleştirilen tekrarlanan-kesikli fermentasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen üretim hızı değerleri .....	72
Şekil 4.11. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık başlangıç şeker içeriği ve besiyerinde pH değerinin ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.....	73
Şekil 4.12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık başlangıç şeker içeriği ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği .....	74
Şekil 4.13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile üretilen etanolün verim değerine karşılık besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği .....	74
Şekil 4.14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile üretilen etanolün üretim hızına karşılık besiyerinde pH değeri ve başlangıç şeker içeriği ilişkisini veren cevap yüzey grafiği .....	75
Şekil 4.15. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile üretilen etanolün üretim hızına karşılık karıştırma hızı ve başlangıç şeker içeriği ilişkisini veren cevap yüzey grafiği .....	76
Şekil 4.16. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile üretilen etanolün üretim hızına karşılık karıştırma hızı ve besiyerinde pH değeri ilişkisini veren cevap yüzey grafiği .....	76
Şekil 4.17. Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi.....	80
Şekil 4.18. Optimum koşullarda azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu .....	83
Şekil 4.19. Amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu .....	85
Şekil 4.20. Besiyerinde maya ekstraktı kullanılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonu .....	87
Şekil 4.21. Optimum koşullarda azot kaynağına bağlı olarak gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda şeker kullanım oranı, verim, etanol	

üretimi, maksimum tüketim hızı ve maksimum üretim hızı değerleri.....	88
Şekil 4.22. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu.....	90
Şekil 4.23. Steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu .....	92
Şekil 4.24. Steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu .....	94
Şekil 5.1. Tüm fermentasyon sonuçlarından elde edilen kinetik parametrelerin optimum koşullara göre kıyaslanması .....	98

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin ülkeler bazında üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri .....	3
Çizelge 2.2. Keçiboynuzu meyvesinin kıtalar bazında üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri .....	4
Çizelge 2.3. TÜİK verilerine göre yıllık toplam keçiboynuzu üretim miktarları .....	4
Çizelge 2.4. Biyofilm tekniğinde kullanılan reaktörlerin karşılaştırılması .....	10
Çizelge 2.5. PKD materyallerinin bileşenleri .....	17
Çizelge 2.6. Endüstriyel olarak üretilen fermentasyon ürünleri .....	25
Çizelge 2.7. Fermentasyon işleminde kullanılan yan ürünler .....	27
Çizelge 2.8. Bazı mikro elementlerin biyolojik işlevleri .....	28
Çizelge 2.9. Yıllara göre etanol üretim miktarları .....	38
Çizelge 2.10. Etanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri .....	39
Çizelge 2.11. Etanol üretiminde kullanılan substratlar ve özellikleri .....	42
Çizelge 3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 36858) için gerekli besiyeri bileşimi ..	46
Çizelge 3.2. Plastik kompozit destek materyallerinin bileşenleri .....	47
Çizelge 3.3. Box-Behnken cevap yüzey metodu için etanol üretimi parametreleri .....	48
Çizelge 3.4. Etanol üretimine ait cevap yüzey metodunun oluşturduğu fermentasyon koşulları .....	49
Çizelge 3.5. YSI 2700 select cihazının çalışma koşulları .....	51
Çizelge 4.1. SH-SF-YE-SALTS materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi .....	55
Çizelge 4.2. SH-SF-YE-SALTS materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler .....	56
Çizelge 4.3. SH-SF-YE-BA-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi .....	57
Çizelge 4.4. SH-SF-YE-BA-SALTS kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler .....	57

Çizelge 4.5. SH-SF-SALTS PKD materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi .....	58
Çizelge 4.6. SH-SF-SALTS PKD materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler .....	59
Çizelge 4.7. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi .....	60
Çizelge 4.8. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimine ait kinetik parametreler .....	60
Çizelge 4.9. Biyofilm reaktörde etanol üretiminde verim, maksimum üretim hızı ve etanol konsantrasyonu açısından Cevap Yüzey Metodu sonuçları.....	64
Çizelge 4.10. Etanol verimleri için tahmin edilen regresyon katsayıları .....	70
Çizelge 4.11. Model denklemdeki verimin varyans analizi.....	70
Çizelge 4.12. Üretim hızı için tahmin edilen regresyon katsayıları.....	71
Çizelge 4.13. Model denklemdeki üretim hızının varyans analizi.....	71
Çizelge 4.14. Belirlenen optimum koşullarda beklenen ve fermentasyonlar sonucu elde edilen verim ve üretim hızı değerleri .....	77
Çizelge 4.15. 8.35-5.26-101 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	78
Çizelge 4.16. 7-5-100 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	79
Çizelge 4.17. 7.71-5.18-120 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi.....	79
Çizelge 4.18. 7.71-5.18-120 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	80
Çizelge 4.19. Optimum koşullarda azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi ....	82
Çizelge 4.20. Optimum koşullarda azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler .....	83
Çizelge 4.21. Optimum koşullarda amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi .....	84

Çizelge 4.22. Optimum koşullarda amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	84
Çizelge 4.23. Optimum koşullarda besiyerine maya ekstraktı eklemeyen gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi ....	86
Çizelge 4.24. Optimum koşullarda besiyerine maya ekstraktı ilave etmeden gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	86
Çizelge 4.25. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi ....	89
Çizelge 4.26. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler .....	89
Çizelge 4.27. Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi .....	91
Çizelge 4.28. Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	91
Çizelge 4.29. Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi .....	93
Çizelge 4.30. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş ve steril olmayan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler.....	93





## 1. GİRİŞ

*Fabeceae* familyasının *Ceasalpinaceae* alt familyasına dâhil olan keçiboynuzu, çok yıllık bir bitki ve Akdeniz ikliminin hâkim olduğu bölgelerde yetişmektedir (Seçmen 1974, Seçmen 1975). Akdeniz orjinli olan bitkinin meyvesi ülkemizde “harnup” veya “keçiboynuzu” olarak bilinmekte ve dünyadaki üretim alanlarına bakıldığında çoğunluğunu Akdeniz ülkelerinin oluşturduğu görülmektedir. Ülkemizde yıllık 12-14 bin ton keçiboynuzu üretilmekte ve elde edilen meyve keçiboynuzu gamı üretiminde ve geleneksel yöntemlerle keçiboynuzu pekmezi üretiminde kullanılmaktadır.

Keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında %90-91 kuru madde ve %62-67 toplam suda çözünür kuru madde içermektedir. Çözünür kuru maddenin önemli bir kısmını sakaroz (%34-42), fruktoz (%10-12) ve glukoz (%7-10) oluşturmaktadır (Karkacier ve Artık 1995). Ham selüloz ve toplam mineral madde miktarı sırasıyla %4.6-6.2 ve %2.23-2.42 arasında değişmekte ve mineral maddeler arasında en yüksek miktarı potasyum oluşturmaktadır. Ayrıca keçiboynuzunun meyvesi ve tohumu protein açısından da zengindir. Tohumda %15, meyve etinde ise %5 civarında protein içeren keçiboynuzu, valin, tirozin, lösin, prolin, fenilalanin, glutamik asit, alanin, aspartik asit ve glisin gibi aminoasitlerce de zengin olup A ve B kompleks vitaminleri ile beraber 9 değişik yağ asidi de içermektedir (Vardar vd 1980).

Keçiboynuzunun karbonhidrat içeriğinin yüksek olması biyoteknolojik açıdan değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Dünya’da birçok ülkede yeterince değerlendirilemeyen çoğu tarımsal ürün, gıda işleyen fabrikaların atıkları ve yüksek karbonhidrat ve polisakkaritleri içeren atıklar fermentasyon yoluyla yeni ve değerli ürün üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok organik asit, vitamin, aminoasit, alkol, antibiyotik ve antibodi gibi ekonomik değeri yüksek ürün fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Bu ürünlerin üretiminde saf kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklar da değerlendirilmektedir. Saf kimyasallarla üretimin çok pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin organik atıklarının değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar alternatif olarak doğal yetişen ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır.

Gıda endüstrisinde birçok kullanım alanına sahip keçiboynuzu meyvesi şeker içeriğinin yüksek olması nedeniyle son yıllarda biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Yatmaz 2012). Yapılan çalışmalarda keçiboynuzu ekstraktından *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol üretimleri de gerçekleştirilmiştir (Turhan vd 2010a, Sanchez vd 2010). Keçiboynuzu ekstraktından 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, Roukas 1993), enzim (Turhan vd 2012) ve biyokontrol ajanı (Manso vd 2010) üretiminde de başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Biyofilmler, katı yüzeylere düzenli veya düzensiz bir şekilde yerleşen mikrobiyal hücre duvarları olarak tanımlanmaktadır. İlk biyofilmler van Leeuwenhoek’ un dişlerin yüzeyini mikroskopla incelemesi sonucu keşfedilmiştir. Bu mikrobiyal tabakalar ekzopolisakkarit matriks içerisine yerleşmekte ve süspanse hücrelere göre farklı gelişim

ve biyoaktivite özellikleri göstermektedir (Demirci vd 2008). Biyofilmler işlenmiş materyallerde ve sistemlerde biyokirlenmelere sebep olduğu gibi (Wirtanen vd 2000, Geesey ve Bryers 2000, Chmielewski ve Frank 2003, Patching ve Fleming 2003) suyun saflaştırılmasında ve atık suyun arıtılmasında (O'flaherty 2003, Lazarova ve Manem 2000) çevresel iyileştirmede (Von Canstein vd 2002), toksik kirleticilerin uzaklaştırılmasında (Jin vd 2003, Ebihara ve Bishop 2002) ve katma değeri yüksek ürünlerin (Demirci vd 2008) üretilmesinde kullanılmaktadır.

Biyofilmlerin yüzeye tutunmalarını kolaylaştırmak, ürün verimini artırmak, mikroorganizmayı sürekli logaritmik fazda tutmak, fermentasyon süresini kısaltma, ön kültür hazırlamayı kısıtlama, toksik bileşiklere karşı direnç, uzun üretim süresi, ürün geri kazanımının kolay olması ve yüksek biyokütle gelişimi gibi avantajları sağlamak amacıyla çeşitli tarımsal bileşenleri içeren destek materyalleri ve karıştırmalı tank reaktör, akışkan yatak reaktör, sabit yataklı reaktör, dönen disk reaktör, membran biyofilm reaktör ve dolgulu yatak reaktör gibi çeşitli biyofilm reaktörler geliştirilmiştir.

Biyofilm reaktörlerin biyoetanol, organik asitler, enzimler, antibiyotikler ve polisakkaritler gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde yüksek biyokütle miktarı sağlayarak üretkenlik oranlarının artmasını sağlamış ve bu ürünlerin üretiminde kullanılabilirliği kanıtlanmıştır (Demirci vd 2008). Biyofilm reaktörler, üstün stabilite özelliği göstermekte, düşük besin ögelerine ihtiyaç duymakta, yüksek biyokütle yoğunluğuna sahip olmakta ve uzun süreli fermentasyonlarda kullanılabilir.

Tekrarlanan kesikli fermentasyon tekniğinde, belirli bir zaman sonra besiyerinin tamamı ortamdaki uzaklaştırılmakta daha sonra ortama yeniden steril besiyeri ilâve edilmektedir. Bu yöntemin diğer bir adı yarı sürekli fermentasyondur. Fermentasyon yönteminin özelliği, ortama herhangi bir bulaşma olmadığı ve besiyerinin fermentasyon bittikten sonra ortama sürekli eklendiği sürece devam etmesidir. Bu yöntemde besiyeri giriş ve ürün çıkış kanalları bulunmaktadır. Belirli bir süre fermentasyon gerçekleştirilmekte daha sonra ürün uzaklaştırılarak taze steril besiyeri ortama ilave edilmektedir.

Günden güne azalan fosil yakıtlarının üretimi, dünyada artan enerji ihtiyacı ile ters oranda gerçekleşmektedir. Bu durum, fosil yakıtlarının yerine alternatif ucuz enerji kaynaklarını üretmeye ve günlük yaşamda kullanmaya itmiştir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler bu duruma çözüm bulmak amacıyla doğal hammaddeleri kullanarak enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik çalışmalar yapmaya başlamıştır. Bu alanda etanol, biyodizel ve biyogaz, petrole ve petrolden elde edilen ürünlere alternatif olarak görülmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda basit şekerler bakımından zengin ve ucuz olan kaynaklar etanol üretiminde kullanılmakta ve etanol üretmek amacıyla farklı mikroorganizmalar ve fermentasyon teknikleri geliştirilmektedir. Yakıt olarak kullanılan etanol ayrıca, gıda katkı maddesi olarak, içecek üretiminde ve bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Keçiboynuzu

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*), *Fabeceae* familyasının *Ceasalpinaceae* alt familyasına dâhil çok yıllık bir bitkidir ve Akdeniz ikliminin hâkim olduğu bölgelerde yetişmektedir (Seçmen 1974, Seçmen 1975). Bugün dünya üzerinde Türkiye, Kıbrıs, Yunanistan, İtalya, İspanya, Portekiz, Fas, Tunus, Cezayir, Libya, Mısır, Suriye ve İsrail gibi Akdeniz ülkelerinde ve A.B.D, Avustralya ve Güney Afrika'da geniş ölçüde yetiştiriciliği yapılan keçiboynuzunun anavatanı Güney Anadolu, Suriye ve İsrail'dir (Vardar vd 1980). Ülkelerde ve genel olarak kıtalarda yetişen keçiboynuzu meyvesinin üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri sırasıyla Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin ülkeler bazında üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri (FAO 2014)

Yıl	Ülke	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Üretim Alanı (hektar)	Libya	982	911	921	868	827	821
	Kıbrıs	1.247	1.227	2.094	1.286	1.353	1.286
	Yunanistan	5.000	6.098	6.195	5.769	5.284	5.600
	İsrail	1.500	1.450	1.400	1.450	1.500	1.500
	İtalya	8.675	11.000	10.819	10.823	9.183	5.672
	Fas	10.447	9.692	9.798	9.700	9.750	9.750
	Portekiz	9.000	9.500	9.700	9.033	9.800	9.800
	İspanya	38.100	46.404	46.700	46.243	43.883	43.000
	Tunus	460	460	417	414	414	413
Türkiye	2.390	2.850	2.850	2.570	2.910	3.110	
Üretim (Ton)	Libya	4.138	3.216	3.384	2.829	2.865	3.136
	Kıbrıs	3.839	6.519	3.514	10.560	10.560	5.186
	Yunanistan	15.000	15.822	14.465	15.105	20.901	22.000
	İsrail	180	200	210	185	190	190
	İtalya	32.784	31.224	30.020	25.337	44.749	30.841
	Fas	25.055	19.472	20.489	20.000	20.500	20.500
	Portekiz	20.000	21.000	21.500	22.452	23.000	23.000
	İspanya	56.100	60.795	53.200	56.286	38.380	40.000
	Tunus	1.000	1.000	858	858	860	855
Türkiye	12.161	12.097	14.413	14.172	13.972	14.218	
Verim (hektogram/hektar)	Libya	42.138	35.301	36.742	32.592	34.643	38.197
	Kıbrıs	30.785	53.129	16.781	82.115	78.048	40.326
	Yunanistan	30.000	25.946	23.349	26.183	39.555	39.285
	İsrail	1.200	1.379	1.500	1.275	1.266	1.266
	İtalya	37.791	28.385	27.747	23.410	48.730	54.374
	Fas	23.982	20.090	20.911	20.618	21.025	21.025
	Portekiz	22.222	22.105	22.164	24.855	23.469	23.469
	İspanya	14.724	13.101	11.391	12.171	8.745	9.302
	Tunus	21.739	21.739	20.575	20.724	20.772	20.702
Türkiye	50.882	42.445	50.571	55.143	48.013	45.717	

Çizelge 2.1'e göre ülkemiz, keçiboynuzu üretiminde ve üretim alanında altıncı sırada bulunmaktadır. İspanya, keçiboynuzu üretiminde en fazla üretim alanına sahip olmanın yanı sıra üretim miktarı açısından da en fazla üreten ülke konumunda bulunmaktadır. Buna bağlı olarak dünya çapında en fazla üretim, 2011 yılında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.2. Keçiboynuzu meyvesinin kıtalar bazında üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri (FAO 2014)

Yıl	Kıta	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Üretim Alanı (Ha)	Afrika	11.889	11.063	11.136	10.982	10.991	10.984
	Amerika	56	56		76	76	30
	Asya	5.439	5.837	6.587	5.547	6.013	6.146
	Avrupa	61.363	73.697	74.119	72.568	68.800	64.672
Üretim (Ton)	Afrika	30.193	23.688	24.731	23.687	24.225	24.491
	Amerika	28	73		76	76	35
	Asya	18.980	20.992	20.337	27.117	27.022	21.894
	Avrupa	124.379	129.358	119.666	119.670	127.683	116.491
	Dünya	173.580	174.111	164.734	170.550	179.006	162.911
Verim (Hg/ha)	Afrika	25.395	21.411	22.208	21.568	22.040	22.296
	Amerika	5.000	13.035		10.000	10.000	11.666
	Asya	34.896	35.963	30.874	48.885	44.939	35.623
	Avrupa	20.269	17.552	16.145	16.490	18.558	18.012

Ülkemizde Urla'dan (İzmir) Samandağ'a (Hatay) kadar olan 1750 km'lik sahil şeridinde doğal olarak yetişmektedir. Keçiboynuzunun yetiştiği alan genellikle kıydan 1-2 km iç kısımlara kadar olan sahil şerididir. Bunun yanında Kozan'da (Çukurova) kıydan 90 km ve Mersin dolayında 25 km kadar iç kısımlarda da yetişme alanı bulunduğu bilinmektedir (Vardar vd 1980). Ülkemiz keçiboynuzunun anavatan bölgesi içerisinde yer alması nedeniyle gen kaynakları açısından büyük bir avantaja sahiptir. Bu durum, ülkemiz koşullarında yapılan seleksiyon çalışmaları ile ortaya konmuş ve ülkemizin özellikle yabancı tipler açısından çok zengin olduğu bildirilmiştir (Batlle ve Tous 1997, Pekmezci vd 2005). Ülkemizde yetişen keçiboynuzu meyvesi ile ilgili TÜİK verileri Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. TÜİK verilerine göre yıllık toplam keçiboynuzu üretim miktarları

Yıl	2009	2010	2011	2012	2013
Toplam meyveliklerin alanı (dekar)	2714	3323	4940	5449	5119
Üretim (Ton)	14003	14172	13978	14166	14261
Ağaç başına ortalama verim (kg)	49	55	48	45	48
Toplam ağaç sayısı	323647	305312	389156	389672	377749
Akdeniz Bölgesi üretimi (ton)	13677	13763	13544	13732	14019
% Akdeniz Bölgesi üretimi	97.672	97.114	96.895	96.936	98.303

Ülkemizde keçiboynuzunun değerlendirilmesinde meyvenin tohumu açısından herhangi bir sorun bulunmazken, meyvenin oransal olarak yaklaşık %90'ını oluşturan etli

kısım ise başlıca pekmez üretimi ve hayvan yemi üretiminde değerlendirilmektedir. Ancak tohum ile karşılaştırıldığında, meyve etinden elde edilen ürünlerin piyasa değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle meyvenin etli kısmının kullanım alanlarının genişletilmesi bu meyvenin piyasa değerini artırmakla birlikte üreticinin de bu bitkiye daha fazla değer vermesini sağlayacaktır (Turhan ve Karhan 2004, Turhan vd 2006).

Keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında %90-91 kuru madde ve %62-67 toplam suda çözünür kuru madde içermektedir. Çözünür kuru maddenin önemli bir kısmını sakaroz (%34-42), fruktoz (%10-12) ve glukoz (%7-10) oluşturmaktadır (Karkacier ve Artık 1995). Ham selüloz ve toplam mineral madde miktarı sırasıyla %4.6-6.2 ve %2.23-2.42 arasında değişmekte ve mineral maddeler arasında en yüksek miktarı potasyum oluşturmaktadır.

Ayrıca keçiboynuzunun meyvesi ve tohumu protein açısından da zengindir. Tohumda %15, meyve etinde ise %5 civarında protein içeren keçiboynuzu, valin, tirozin, lösin, prolin, fenilalanin, glutamik asit, alanin, aspartik asit ve glisin gibi aminoasitlerce de zengin olup A ve B kompleks vitaminleri ile beraber 9 değişik yağ asidi de içermektedir (Vardar vd 1980).

Keçiboynuzu kabuklarının nispeten düşük maliyetli olması ve yüksek şeker içermesi nedeniyle posası, bazı Akdeniz ülkelerinde fermentasyon ile endüstriyel alkol üretmek için kullanılan ilk bahçe ürünleri arasında yer almıştır (Merwin 1981). Mısır gibi bazı ülkelerde popüler bir içecek olan keçiboynuzu şurubu, kaba öğütülmüş keçiboynuzu hububatının su ile ekstraksiyonu sonucu elde edilmektedir. 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).

Tek hücre organizmaları zengin karbonhidrat ve azot kaynağına sahip meyve ve sebzeleri, gıda fabrikaları ve tarımsal ürünlerin atıklarını kullanabilme yeteneğine sahiptir. Keçiboynuzu da uygun bileşiklerle zenginleştirilip fermente edildiğinde yüksek proteinli gıdaların oluşturulmasında kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca *Aspergillus niger* ve *Fusarium moniliforme* gibi kültür mikroorganizmaları için zengin karbonhidrat ve ham protein içeriği ile mükemmel bir substrat niteliğindedir (Imre 1973, Sekeri-Pataryas vd 1973).

Biyolojik yolla etanol üretimi, daha çok tarımsal esaslı ürünlerden yapıldığı için, atmosferik karbon döngüsünü de artırmaktadır. Etanol fermentasyonunda Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı ülkeler hammadde olarak çoğunlukla nişastalı tarım ürünleri ve selülozlu artıklardan yararlanırken ülkemizde bu amaçla genellikle melas ve kuru üzüm kullanılmaktadır. Bunların dışında patates, pancar, odun şekeri, sülfat şurubu, çeşitli meyveler ve peynir altı suyu da alkol üretiminde kullanılabilen önemli hammaddeler arasında yer almaktadır. Endüstriyel etanol üretiminde pancar ve kamışı melasları, bol bulunması ve ucuz olmaları nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sentetik olarak etilenden etanol üretimi mümkün olmasına rağmen özellikle gıda ve ilaç sanayinde fermentasyon ürünü alkol kullanma zorunluluğu vardır. Çünkü sentetik alkolde insan

sağlığına zararlı yan ürünler ve reaksiyona girmemiş çıkış maddesi ve içerdiği safsızlıklar bulunabilir (Turhan 2009).

## 2.2. Biyofilmler

Biyofilmler, katı yüzeylere düzenli veya düzensiz bir şekilde yerleşen mikrobiyal hücre duvarları olarak tanımlanmaktadır. İlk biyofilmler van Leeuwenhoek tarafından dışlerin yüzeyinin mikroskopla incelenmesi sonucu keşfedilmiştir. Bu mikrobiyal tabakalar ekzopolisakkarit matriks içerisine yerleşmekte ve süspansiyon hücrelere göre farklı gelişim ve biyoaktivite özellikleri göstermektedir (Demirci vd 2008). Biyofilmler işlenmiş materyallerde ve sistemlerde biyokirlenmelere sebep olduğu gibi (Wirtanen vd 2000, Geesey ve Bryers 2000, Chmielewski ve Frank 2003, Patching ve Fleming 2003) suyun saflaştırılmasında ve atık suyun arıtılmasında (O'flaherty 2003, Lazarova ve Manem 2000), çevresel iyileştirmede (Von Canstein vd 2002), toksik kirleticilerin uzaklaştırılmasında (Jin vd 2003, Ebihara ve Bishop 2002) ve katma değeri yüksek ürünlerin (Demirci vd 2008) geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

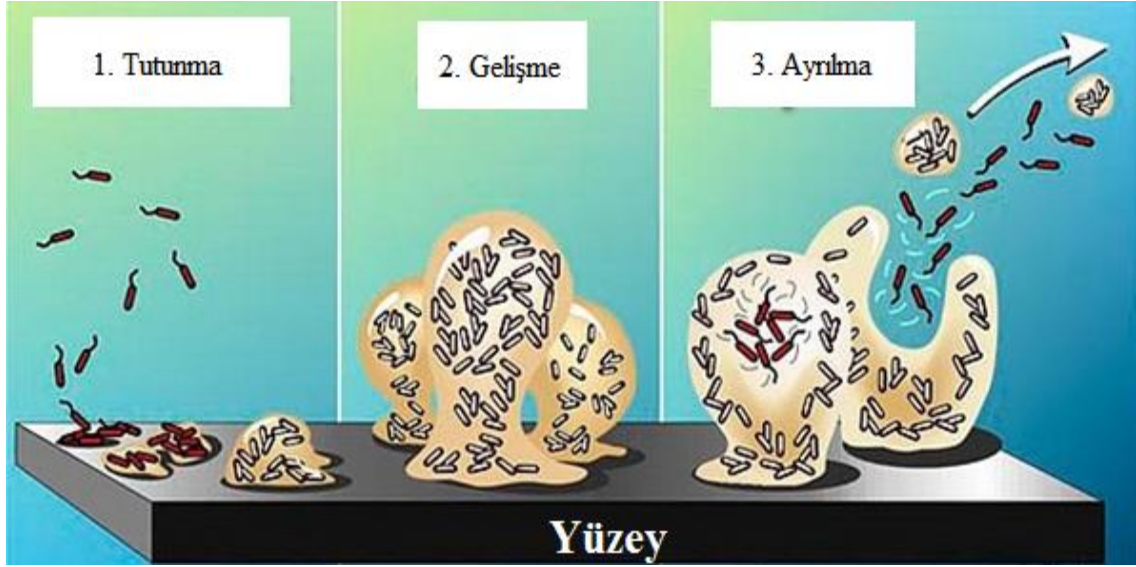
### 2.2.1. Biyofilm oluşumu ve yapısı

#### 2.2.1.1. Biyofilm oluşumu

Biyofilm, katı yüzeylere tutunarak bir araya gelen mikroorganizmaların ürettikleri bir organik polimer içerisine gömülmesidir (Characklis ve Marshall 1990). Bir başka tanıma göre biyofilm, mikrobiyal topluluk tarafından üretilen ekstraselüler bir matriks içerisine gömülen ve canlı veya cansız yüzeyler üzerine mikroorganizmaların tutunması ile oluşan mikrobiyal bir topluluktur (Burmölle vd 2006, Xu vd 2011). Islak biyofilm kütlesinin % 90'ından daha fazlası sudur. Ekstraselüler polimerik maddeleri içeren polisakkaritler ve glikoproteinler, kuru biyofilm kütlesinin % 70'inden daha fazlasını oluşturmaktadır (Melo ve Oliveira 2001). Biyofilm kalınlığı; mikroorganizma türüne, biyofilm yaşına, besin durumuna ve çevresel sıvı kayma gerilmesine bağlı olarak birkaç mikron ile birkaç santimetre arasında değişmektedir. Biyofilm oluşumu üç temel aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.1). Birinci aşama olan *tutunma*, daha çok yüzey özellikleri (sertlik, pürüzlülük, yük vb.) ve yüzeye taşınan mikroorganizmaların hızı ile etkilenmektedir. İkinci ve üçüncü aşama olan *gelişme* ve *ayırılma*, mikroorganizmanın gelişme hızı, yığın akışının kayma kuvveti, difüzyon ve besinlerin taşınmasını kapsayan faktörler tarafından etkilenmektedir (Cheng vd 2010).

*Tutunma* aşamasında, hem yığın sıvısı içerisindeki makromoleküller hem de yapay olarak kaplanmış materyal tarafından yüzey oluşturulmaktadır. Bu yüzden sıvı içerisindeki süspansiyon mikroorganizmalar, difüzyon ve konveksiyon ile veya kendi hareketi ile yüzeye taşınmakta ve katı yüzey ile zayıf tersinir adezyon oluşturmaktadır. *Gelişme* aşamasındaki tersinmez adezyon, ekzopolisakkaritler (EPS) ile yüzey arasında oluşan polimer köprülerinin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Cheng vd 2010). Diğer bir ifade ile dipol-dipol, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlarını kapsayan kısa mesafeli kuvvetler ve hidrofobik interaksiyonlar, tersinmez tutunmayı oluşturmaktadır. Bu kısa mesafeli kuvvetler, yüzey ile zayıf bir şekilde etkileşime neden olmaktadır. Matriks, yüzey ile güçlü bir şekilde bağlanmaya neden olmakta ve bakteriyel hücreleri çevre saran matriks, proteinleri ve ekstraselüler polisakkaritleri de içine alan üç

boyutlu bir biyofilm yapısı oluşturmaktadır ve genellikle organizmanın kendisi tarafından üretilmektedir (Ercan ve Demirci 2013).



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum basamakları (Anonim 2014)

Bu aşamalardan sonra mikroorganizmalar besin durumuna bağlı olarak *ayrılma* aşamasına girmektedir. Burada besin konsantrasyonu ve difüzyon, mikroorganizmaların katı yüzeye tutunmasından daha çok biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Cheng vd 2010). Bu proses sıvı kayma kuvvetine, zayıf içsel kohezyona, oksijenin ve/veya biyofilm içindeki besin tükenmesine bağlıdır. Ayrılma, aşınma ve dökülme aynı anda gerçekleşmektedir (Ercan ve Demirci 2013). Sıvı kayma kuvveti sonucunda oluşan aşınma, küçük biyofilm parçalarının uzaklaştırılması olarak tanımlanmaktadır. Dökülme ise besinlerin azalması ile büyük biyofilm parçalarının rastgele ayrılmasıdır. Gelişme ve ayrılma arasındaki denge ayarlandığı zaman sistem ortalama biyofilm kalınlığına ulaşmakta ve kararlı hale gelmektedir (Cheng vd 2010).

### 2.2.1.2. Biyofilm yapısı

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturmaktadır. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 ekzopolisakkarit (EPS), %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid, fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir. Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks, biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlamaktadır. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturmaktadır. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilm kütlelerinin %75–90'ını EPS oluşturmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009). Genellikle biyofilm yapısı; besin durumu, difüzyon, mikroorganizmalar ve yüzey arasındaki çekim kuvveti, EPS üretimi ve hücreler arası yapışkanlık, mikroorganizma gelişimi, kayma kuvveti, sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörlerin kombinasyonu tarafından etkilenmektedir (Demirci vd 2008, Acuña vd 2002,

Allan vd 2002). Ekstraselüler polisakkaritler spesifik ve spesifik olmayan olmak üzere ikiye bölünebilmektedir. Glukoz, galaktoz, mannoz, glukuronik asit, galakturonik asit gibi spesifik polimerler başlı başına bakteriyel suşlara özgüdür. Spesifik olmayan polisakkaritler ise çeşitli bakteriyel suşlardan salgılanabilmektedir. Spesifik olmayan polisakkaritlerin çoğu homopolisakkaritlerdir (Hutkins 2008). Homopolisakkaritler, monosakkaritlerin sadece bir çeşidinden oluşmaktadır. Heteropolisakkaritler ise iki veya daha fazla farklı monosakkaritin birleşmesiyle oluşmaktadır. Homopolisakkaritlere sırasıyla *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus surfanciscensis* ve *Lactococcus lactis* tarafından üretilen dekstranlar ( $\alpha$ -1,6 ve  $\alpha$ -1,3 bağları ile bağlanmış glukoz polimerleri), glukanlar ( $\beta$ -1,3-glukoz polimerleri), fruktanlar ( $\beta$ -2-6 bağları ile bağlanmış D-fruktoz polimerleri) ve poligalaktanlar örnek verilebilir. Heteropolisakkaritler daha çok glukoz, galaktoz ve ramnozdan oluşurken yapısında fruktoz, asetillenmiş amino şekerler, riboz, glukuronik asit, gliserol, fosfat, pirüvil ve asetil gruplarından daha az miktarlarda bulunmaktadır (Flemming ve Wingender 2010). Bakteriler tarafından üretilen heteropolisakkaritlerin bileşimi, yapısı ve fizikokimyasal özellikleri suşlar arasında değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca biyofilm oluşumunda polimerler (çoğunlukla polisakkaritler) biyofilmin fiziksel özelliklerine de etki etmektedir. Biyofilmin fiziksel özelliği üzerinde polimerlerin şekli etkilidir. Biyofilmin şekli primer yapıya, çözücü bileşimine, pH'ya sıcaklığa ve inorganik tuzlara bağlıdır (Hutkins 2008). Birçok bakteriyel polisakkaritin sulu solüsyonu viskoz ve newtonian olmayan özelliktedir. Genel olarak, biyofilm viskoelastik özellik göstermektedir. Biyofilmler, hem tersinir elastik hem de tersinmez deformasyon karşılığı ile ekzopolisakkarit matriks üzerindeki kuvvetlere tepki göstermektedir (Murga vd 1995). Biyofilmlerin termodinamik özellikleri biyofilm ağırlığına ve kalınlığına bağlıdır. Ayrıca biyofilmin difüzyon katsayısı suyun difüzyon katsayısının %80'i kadardır ve difüzyonal uzunluk biyofilm kalınlığı ile etkilenmektedir (Hutkins 2008). Örneğin *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin saf kültür biyofilm kalınlığı sırasıyla 29 ve 100  $\mu$ m iken *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* içeren bir karışık kültürün biyofilm kalınlığı 400  $\mu$ m olarak belirtilmiştir (Muffler vd 2014). Biyofilm yoğunluğu çevresel koşullara ve mikrobiyal türlere göre değişmektedir. Örneğin ipliksi gelişmeye yol açan oksijen sınırlaması, biyofilm yoğunluğuna etki etmektedir. Ayrıca artan kayma gerilimi biyofilm yoğunluğunu da artırmaktadır. Benzer şekilde artan kalsiyum konsantrasyonu ve düşük çözünürlüğe sahip inorganik tuzlar önemli ölçüde biyofilm yoğunluğunu artırmaktadır. Bunlara ek olarak biyofilm yoğunluğu, biyofilm yaşı ile beraber artmaktadır. Biyofilmin geometrik özelliği üzerine çevresel etkilerin yanı sıra yüzey morfolojisi de etki etmektedir. Biyofilmin pürüzlülüğü biyofilm yaşına ve ipliksi mikrobiyal gelişime bağlıdır (Hutkins 2008). Substrat tüketim hızı, maksimum kütle transfer hızının üzerine çıktığında gözenekli veya ipliksi bir biyofilm meydana gelerek difüzyonu sınırlamaktadır. Aksine, dönüşüm hızını sınırlayan bir aşama olduğunda daha homojen ve daha sıkı biyofilm oluşturulabilmektedir (Van Loosdrecht vd 2002).

### 2.2.1.3. Biyofilm yapısının özellikleri

Şimdiye kadar biyofilm yapısı hakkında üç model önerilmiştir. Bunlar heterojen model, heterojen mozaik (sözde homojen) model ve mantar (veya lâle) modeldir (Ercan ve Demirci 2013). Bu modeller farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen çeşitli biyofilmlerin görsel analizine dayanarak önerilmiştir. Ancak birden fazla organizma tarafından oluşturulan biyofilmler farklı bir yapı ve oluşum süreci sergileyebilmektedir



(Christensen ve Characklis 1990). Heterojen tipleri, akan sıvıya maruz kalan yoğun, düzlemsel, homojen bir biyofilmi içermektedir. Su kanalları ile ayrılan ekzopolisakkaritler ile ayrılmayan hücreleri içeren biyofilm, heterojen mozaik modeldir. Mantar tip biyofilm ise su kanalları ile çepeçevre sarılan bir mantar gibi görünmektedir (Ercan ve Demirci 2013).

Biyofilmlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, mikrobiyal türlere, morfolojilerine ve ekstraselüler polimerlerin bileşimine bağlıdır. Ekstraselüler polimerler, mikrobiyal hücrelerin fizyolojik evresi nedeniyle değişebilmektedir. Ayrıca, biyofilmin özellikleri çevresel faktörler ile de değişmektedir. Çevresel faktörlere; film içerisindeki popülasyon dağılımı, besin yükleme hızı, biyofilm birikimi ve hidrodinamik kayma gerilimi örnek olarak verilebilir. Bunlara ek olarak biyofilm özelliklerini, biyofilm bünyesindeki momentum, ısı ve kütle transfer hızı da etkilemektedir (Hutkins 2008).

### **2.3. Biyofilm Reaktör Tipleri**

Biyofilm reaktörler katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde biyofilmlerin veya immobilize hücrelerin geliştirilmesi amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu reaktörlere karıştırmalı tank reaktör (CSTR), sabit yataklı reaktör (PBR), damlatmalı yatak reaktör (TBR), akışkan yatak reaktör (FBR), hava kaldırmalı reaktör (ABR), yukarı yatay akışlı anaerobik çamur yataklı reaktör (UASB), genişletilmiş yatak reaktör (EBR) ve membran biyofilm reaktör örnek verilebilir. UASB ve EBR reaktörleri atık su arıtımında kullanılmaktadır (Muffler vd 2014). Bu reaktör tiplerinin avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.4'te verilmiştir. Biyofilm reaktörler çevresel iyileştirme, bitki ve hayvan hücresi geliştirmeleri gibi diğer alanlarda da kullanılabilir (Cheng vd 2010). Biyofilm partiküllerinin ve biyofilm reaktörlerinin çeşitli türleri şematik olarak Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

#### **2.3.1. Karıştırmalı tank reaktör**

Biyoteknolojik uygulamalara yönelik kullanılan karıştırmalı tank reaktör, kimya mühendisliğinde kullanılan klasik reaktörden elde edilmiştir. Bu reaktör tipi serbest süspansiyon hücrelere yönelik büyük ölçekli endüstriyel üretim prosesleri için kurulmuştur. Karıştırmalı tank reaktör, bazı analitik cihaz tiplerinin eklenmesine (pH, pO<sub>2</sub>, optik yoğunluk, in situ mikroskop) ve çözünmüş oksijenin konsantrasyonu ve pH gibi önemli proses parametrelerinin kontrolüne olanak sağlamaktadır. Biyofilm prosesine yönelik karıştırmalı tank reaktörlerinin kullanılmasında organizmanın gelişmesi için tutunacağı bir destek materyali gerekmektedir. Reaktörün içine ilave edilen parçalar, reaktörün spesifik yüzeyini artırmak için kullanılabilir (Muffler vd 2014).

Karıştırmalı tank reaktörde modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş yüzeyler ile bazı destek materyalleri kullanılabilir, fakat biyofilm destek materyalinin Reynold sayısı, güç girişi ve karıştırma süresi gibi reaktörün hidrodinamikleri üzerinde önemli etkisi vardır. Ayrıca biyofilm gelişimi için kullanılacak olan yüzey materyalinin çeşidi, karıştırıcının türü ve bunun lokal enerji girdisi, kullanılan partiküllere uygun olmak zorundadır. Özellikle altı-düz-bıçaklı disk türbini veya eğimli bıçak türbini yerine deniz pervanesinin kullanılması kırılğan biyofilm destek materyalinin parçalanmasına neden olan bir girdi sistemi sağlamaktadır (Muffler vd 2014).

Çizelge 2.4. Biyofilm tekniğinde kullanılan reaktörlerin karşılaştırılması (Cheng vd 2010)

<b>Reaktör</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
Karıştırmalı tank reaktör	Yüksek hücre yoğunluğu ve verimlilik, uzun süreli üretim	Hücrelerin kayma gerilimi, yüksek karıştırma gücü gerektirmesi
Sabit yataklı reaktör	Yüksek hücre yoğunluğu ve verimlilik, düşük güç gereksinimi	Hücre kirliliği, karıştırma problemleri nedeniyle gradyanlar, ürün geri kazanımının zor olması
Akışkan yataklı reaktör	Homojen partikül karışımı, uzun süreli üretim	Yüksek enerji gerektirmesi, kayma gerilimi, biyofilm oluşma süresinin uzun olması
Dönen disk reaktör	Yüksek hücre yoğunluğu	Yüksek kontaminasyon riski, yarı sürekli üretim
Membran biyofilm reaktör	Yüksek hücre yoğunluğu ve verimliliği, kolay ürün geri kazanımı	Hücre kirliliği, ölçek büyütme kısıtlamaları

Biyofilmin bulunduğu karıştırmalı tank reaktör, kesikli, beslemeli kesikli ve sürekli modda kullanılabilir. Reaktörün kurulma süresi çok uzun olduğundan dolayı mikroorganizmaların düzgün bir şekilde immobilizasyonu için birkaç gün gerekmektedir. Proses ekonomisine göre hazırlanan reaktör uzun bir çalışma süresine sahip olmalıdır. Bu özellik aslında sürekli karıştırmalı tank reaktörlerde uygulanabilir. Ancak beslemeli-kesikli ve kesikli prosesler de kısa çalışma sürelerine yönelik tasarlanmıştır. Tekrarlanan-kesikli yöntemin kullanılması ile çalışma süresi uzatılabilir. Sürekli moddan farklı olarak, geçici koşullar nedeniyle reaktör içerisinde gradientler oluşmaktadır (Muffler vd 2014).

### 2.3.2. Sabit yataklı reaktör

Sabit yataklı reaktör aynı zamanda dolgulu yatak reaktör olarak da adlandırılmaktadır ve biyofilmler sabit destekler üzerinde geliştirilmektedir. Bu reaktör immobilize hücrelerin ve biyofilmlerin geliştirilmesine yönelik muhtemelen en çok kullanılan reaktör tipidir (Fukuda 1994). Reaktör içindeki katı destekler biyofilm organizmaları tarafından yoğun bir şekilde kolonileştirilmiş ve paketlenmiştir. Bu nedenle bu reaktör biyokütle-sıvı teması ile yüksek ara yüzey alanı sağlamaktadır. Kütle transferi hacimsel akışın bir fonksiyonudur, çünkü daha yüksek akış hızı, daha yüksek kütle transferidir. Bununla birlikte akış, teknik araçlar ile sınırlandırılabilir fakat oluşan kayma kuvvetleri, biyofilme zarar vermektedir (Muffler vd 2014).

Birçok biyokatalitik proses, etkili bir gaz-sıvı temasını ve karbon dioksit uzaklaştırmayı gerektirmektedir. Durgun gaz ceplerinin bir sonucu gaz taşkınlığına neden olabilmekte ve dolayısıyla yatağın performansını düşürmektedir. Sabit yatağın önemli bir avantajı, ambalaj materyalinin boşluk hacmi ile ilgili olarak biyokütlenin çok yüksek yoğunlukta olmasıdır. Ancak biyokütle birikimi nedeniyle sabit yatak tıkanabilmektedir.

Bu gibi durumlarda akışkan yatak veya damlatmalı yatak reaktörü kullanılmalıdır (Muffler vd 2014).

Damlatmalı yatak reaktörü (TBR), sabit yataklı reaktörün özel bir türü olarak nitelendirilmektedir. TBR içerisindeki sıvı, paketlenmiş bir biyokatalizörün ince bir filmi üzerine düşen bir akış profiline sahiptir. Aynı zamanda gaz uzaklaştırmasının yanı sıra etkin oksijen temini de başarıyla gerçekleştirilmektedir (Muffler vd 2014).

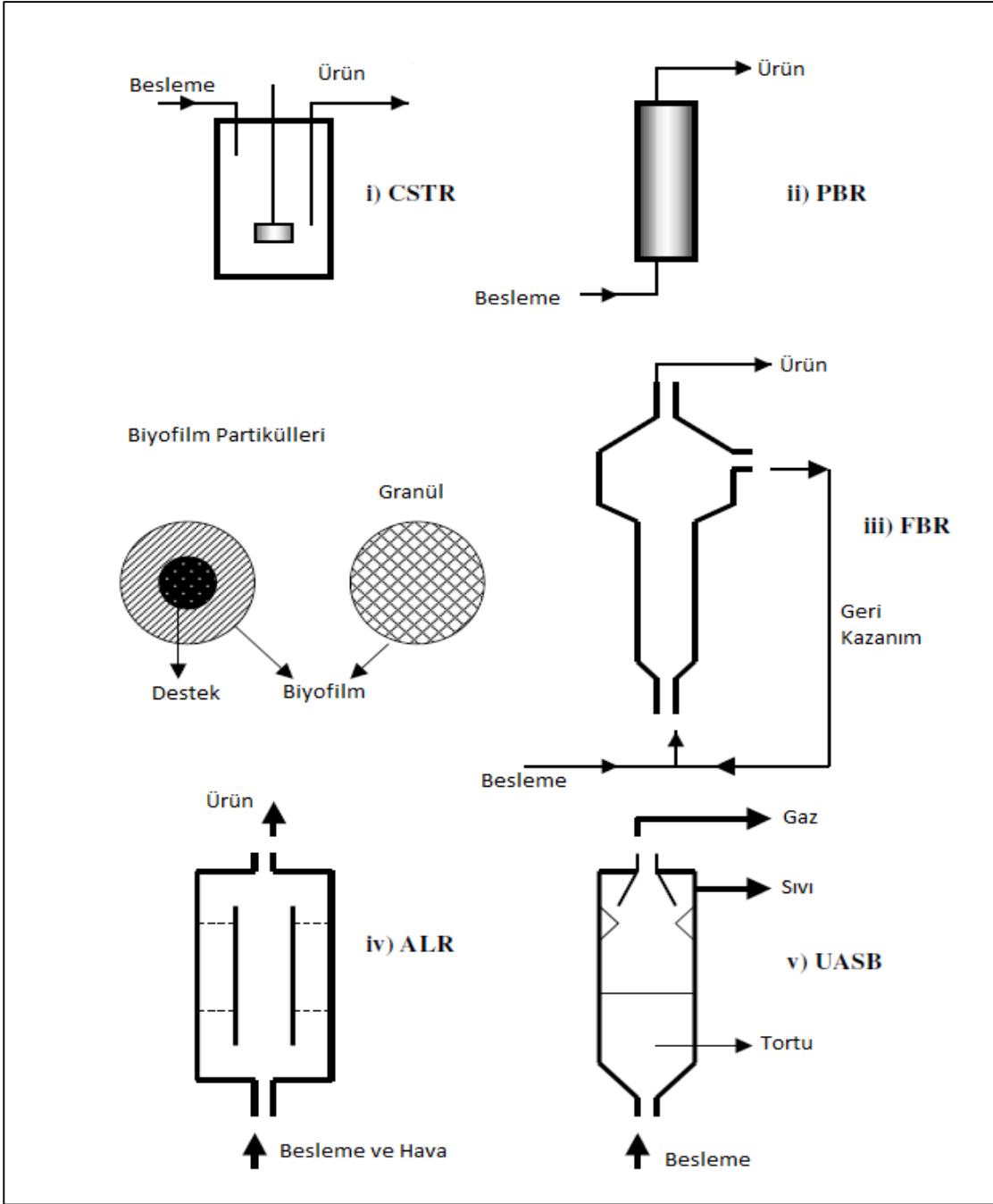
### **2.3.3. Akışkan yatak reaktör**

Akışkan yataklı bir reaktör, dolgulu yatak reaktörü ve sürekli karıştırmalı tank reaktörü arasında orta dereceli olarak kabul edilebilen bir karıştırma derecesi sağlamaktadır. Biyofilm parçalarının akışkanlaşması sıvı ve/veya gaz ile gerçekleştirilmektedir. Eğer gaz faz olarak hava kullanılırsa ve reaktör, partiküller için bir yükseltme ve çalkalama bölümü sağlarsa, reaktör hava kaldırmalı reaktör olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca bu kategori içerisine dâhil edilen bir diğer reaktör tipi kabarcıklı kolon reaktördür. Sonuç olarak yatağın yayılımı, yatağın genişlemesine imkân verecek kadar yüksek bir hız sergileyen sıvının yukarı doğru akmasını gerektirmektedir. Ancak yatak partiküllerinin yoğunluğu kullanılan sıvının yoğunluğundan daha büyük olmalıdır. Akışkan yatak reaktörler, iyi bir karışım, kütle ve ısı transfer özellikleri sağlamakta ve minimum basınç düşümü göstermektedir (Fukuda 1994). Ayrıca bazı avantajlara da sahiptir. Bunlar: kolay kontrol ve proses parametreleri ile ilgili ölçümler (özellikle pH değeri ve çözülmüş oksijen), çalışma sırasında kolaylıkla örnek alma ve gerekiyorsa aktif fraksiyonların değiştirilmesi ve dolgulu yatak reaktörlerde olduğu gibi basınç düşümü olmadan reaktör içerisinde yüksek spesifik yüzey alanı sağlayan küçük parçacıkların kullanılmasıdır. Akışkan yatak içerisinde iyi karışım sağlayan hidrodinamik sistem nedeniyle iyi bir gaz-sıvı teması ve gaz temininin yanı sıra gaz uzaklaştırma düzeni de kurulmuştur. Sonuçta oluşan kesme kuvvetlerine göre destek materyalleri üzerine biriken biyokütleden kurtulmak mümkün olmaktadır. Bu nedenle biyofilmler yaklaşık olarak sabit kütle transfer hızları ile neredeyse sabit bir kalınlığa sahip olabilmektedir (Muffler vd 2014). Bu değişik avantajlara ek olarak akışkan yatağın çalışması sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşabilmektedir. Biyoreaktör yüksek yatak genişliğinde ve düşük stabilite düzeylerinde çalıştırılırsa bu tür reaktörler optimum çalışma koşullarının az bir kısmına sahip olmaktadır (Converti vd 2006). Bu nedenle dalgalanmayan koşulları sağlamak zordur. Ayrıca akışkan yataklı reaktörün yükseltme özelliği engellenmektedir, çünkü üretim hızı üzerine geri karıştırmanın etkilerini tahmin etmek zor olmaktadır. Ayrıca etkili geri karıştırma, parçacık yoğunluğu ile sıvı yoğunluğunun arasındaki farka bağlıdır. Parçacıkların yoğunluk değeri sıvının yoğunluk değerine yakın değerde seçilirse, geri karıştırmanın etkinliği önemli ölçüde azaltılmaktadır. Akışkan yatak reaktörler, gaz halindeki bir fazın üretildiği fermentasyon prosesleri için de uygun olmaktadır (Muffler vd 2014).

### **2.3.4. Dönen disk reaktör**

Dönen disk reaktör kurulumunda temelde biyofilm desteği olarak diskler kullanılmaktadır. Diskler shaftın üzerine bağlanmakta ve tanımlanan bir frekansta döndürülmektedir. Bu durumda hidrodinamiklerin alıkonma süresi bağımsız bir şekilde ayarlanabilmektedir. Diskler yatay shaftın üzerinde kullanılırsa ve reaktör kısmen

doldurulmuş olarak çalıştırılırsa bu tür bir yaklaşım yaygın olarak dönen biyolojik kondaktör veya dönen biyofilm kondaktör olarak adlandırılmaktadır (Converti vd 2006, Cao vd 1997).



Şekil 2.2. Biyofilm partiküllerinin ve biyofilm reaktörlerinin çeşitli türlerinin şematik gösterimi (Qureshi vd 2005).

Disklerin dönmesi nedeniyle immobilize mikroorganizmalar besiyeri ile ve sıvı faz üzerindeki atmosfer ile temas etmektedir. Reaktöre pH'ı, çözülmüş oksijeni veya ekstraselüler ürün konsantrasyonunu ölçmek amacıyla çeşitli analitik cihazlar takılabilmekte ve reaktör, anaerobik fermentasyonun yanı sıra aerobik fermentasyon için

de kullanılabilir. Prensip olarak diskler doğrudan biyofilmin tutunmasına yönelik katı desteği olarak kullanılmaktadır fakat alternatif olarak başka materyallerde disklerin üzerine sabitlenebilir (Muffler vd 2014).

Bu reaktör konfigürasyonunun karıştırmalı kemostata göre önemli bir avantajı, sabit mikrobiyal filmlerin kombinasyonu ve süspanse gelişme özellikleridir (Del Borghi vd 1985). Bu durumda çalışma, dinamik bir damlatmalı filtre olarak tanımlanabilir. İyi bir karıştırma sistemi sağlayan ve hücrelere yeterli oksijeni temin eden diskler dakikada bir tur dönme ile çalışmaktadır (Muffler vd 2014).

### **2.3.5. Membran biyofilm reaktör**

Membran biyofilm reaktörün asıl parçası, özel bir membrandır. Bu membranın özelliği mikroorganizmalar için destek maddesi olarak davranması ve besinlerin taşınmasına izin veren seçici bir bariyer olmasıdır. Mikroorganizmaların ve organik bileşenlerin membranın üzerine tutunmasına rağmen, bu mikroorganizma kaynaklı biyolojik kirlilik olarak sınıflandırılmaktadır çünkü filtreleme performansı zararlı bir şekilde etkilenmektedir (tıkanma ve tahribat). Özellikle substratlardan ve toksik ürünlerden hücreleri korumak için bir bariyer olarak davranan membranlar, biyofilm üreten mikroorganizmalar ile membranların sistematik bir kolonizasyonu için yararlı olabilir. Ayrıca bu tür membranlar, mikroorganizmanın yeterli oksijen isteğini (hava kabarcığı vermeyen) karşılamak için kullanılmaktadır (Muffler vd 2014).

Membran biyofilm reaktörün özel bir çeşidi havalandırılmış-membran biyofilm reaktör olarak adlandırılmaktadır (MABR). Bu sayede biyokütle, oksijen aracılığı ile membranlar üzerine immobilize olmaktadır. Bu özel teknik atık su arıtmaya yönelik umut vermektedir (Qureshi vd 2005). Bir membran modülü uygulanmadan önce bazı kriterler göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar: basınç düşmesi minimum olmalı, gaz dağılımı membran boyunca homojen olmalı, membran mikrobiyal bozulmaya karşı dayanıklı olmalı ve membran gözenekleri mevcut çalışma koşulları altında ıslak olmamalıdır (Muffler vd 2014).

### **2.3.6. Biyofilm reaktörlerin avantajları**

Biyofilm reaktörler, hücre-geri dönüşüm reaktörleri ve oluklu-lif reaktörleri gibi yeni reaktörlere göre birçok üstün yanlara sahiptir. Katma değeri yüksek ürünleri üretmek amacıyla fermentasyon verimliliğini artırmanın bir yolu, biyoreaktörlerin içerisindeki biyokütleyi artırmaktır. Yüksek biyokütle yoğunluğuna ve çalışma stabilitesine sahip olan biyofilm reaktörlerin süspanse hücre reaktörlerine göre birçok avantajı vardır. Üretim hızını artıran, wash-out riskini azaltan ve tekrarlanan-kesikli fermentasyon boyunca tekrar inokülasyon ihtiyacını gideren biyofilm reaktörler, süspanse reaktörlere göre hacim başına 5-10 kat daha fazla biyokütleyi tutabilmektedir (Fukuda 1994). Ayrıca biyofilm matriksin yapısı toksik maddelerin, antibiyotiklerin, hidrolik darbelerin, kayma kuvvetinin, kontaminasyonların, sıcaklığın ve pH'nın ekstrem koşullarında mikroorganizmaların yüksek direncine katkıda bulunmaktadır. Aktif veya yapay immobilizasyon uygulandığında karşılaşılan problemlerin üstesinden pasif bir immobilizasyon yöntemi ile biyofilm oluşumu gerçekleştirilerek gelinebilir. Pasif immobilizasyon, katı destek materyalleri içerisinde veya mikroorganizmaların etrafında

topaklaşmaları veya filmlerin doğal adsorpsiyonu ve kolonizasyonu ile meydana gelmektedir. Adsorpsiyon daha çok destek materyali ve hücre yüzeyi arasındaki elektrostatik etkileşim sonucunda meydana gelmektedir. Biyofilm reaktörlere hücrelerin immobilizasyonu, besin ve oksijen transferinin artmasına ve besiyeri viskozitesinin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca biyofilm reaktörlerden elde edilen ürünler, verimli bir saflaştırma prosesi sonucunda süspansiyon hücre sistemindeki uygulamaya göre daha kolay bir şekilde geri kazanılmaktadır (Cheng vd 2010).

### **2.3.7. Biyofilm reaktörlerin kısıtlamaları**

Biyofilm reaktörlerin ve uygulamalarının birçok avantajı olmasına rağmen biyofilm reaktörler kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonda göz önünde bulundurulması gereken teknik problemleri, biyofilm oluşumunu, biyofilm aktivitesini ve taşıyıcı özelliğini içeren bazı kısıtlamalar vardır.

#### **2.3.7.1. Biyofilm yapısı ve aktivitesi**

Biyofilm kompozisyonu ve aktivitesi, çalışan biyofilm reaktörlerde başarılı olmak için iki önemli parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyofilmin kalınlığı, toplam hücre sayısı ve toplam kuru ağırlık gibi yaygın bir şekilde kullanılan parametreler, biyofilm aktivitesini tanımlamak için yeterli olmamaktadır. Biyofilm aktivitesi, destek materyali üzerindeki biyofilm miktarı ile orantılı değildir fakat biyofilm kalınlığı ile artmakta ve “aktif kalınlık” olarak adlandırılan optimal bir seviyeye ulaşmaktadır. Bu seviye üzerindeki besin difüzyonu, sınırlanan bir faktör olmaktadır. Doğrudan hücre hesaplama metodu, inert kütle, ekzopolisakkaritler ve adsorbe edilen organik materyaller gibi bileşenler arasındaki etkileşim yok sayılırsa, biyofilm gelişiminin her aşamasında kullanılmaktadır. Bu nedenle gelişmiş analitik metotlar şu üç unsuru içermelidir: biyofilm oluşumu ve yapısı, biyofilm kompozisyonu, biyokütle aktivitesidir (Cheng vd 2010).

#### **2.3.7.2. Kütle transferi ve substrat difüzyonu**

İmmobilizasyon; yüksek hücre yoğunluğu, yüksek stabilite, kayma kuvvetine ve kontaminasyona karşı dirençlilik, fazla biyokütle nedeniyle yüksek verimlilik, biyofilmin tekrar tekrar kullanımı, gelişen sürekli proses kolaylığı ve ürünleri saflaştırma kolaylığı gibi birçok avantaja sahiptir. Ancak kütle transfer dirençleri, immobilizasyon prosesi başlama süresinin uzun olması, immobilize ajanlar ve destek maddelerinin ek maliyeti gibi birçok dezavantajlara da sahiptir. Tutuklanmış hücreler için substratlar, reaksiyon göstermek için hücreler arasındaki matriks aracılığıyla taşınmak zorundadır. Ayrıca destek materyalinin bulunması ve biyokütle yüzeyinin azalması, daha düşük bir reaksiyon hızına yol açmakta ve kütle transferini engellemektedir (Cheng vd 2010).

#### **2.3.7.3. Taşıyıcı özellik**

Biyofilm reaktörlerin güvenilir bir şekilde çalışması için yüksek biyokütleyle sahip olmalı ve destek materyali üzerine biyofilm eşit bir şekilde kaplanmalıdır. Mikroorganizmaların taşıyıcı yüzeye tutunması kolay olmakta ancak biyofilm kalınlığının kontrolüne ve kayma kuvvetine karşı direnç zor olmaktadır. Ayrıca biyokütlenin aşırı derecede kolonizasyonu, artan bir kütle transfer direnci ile

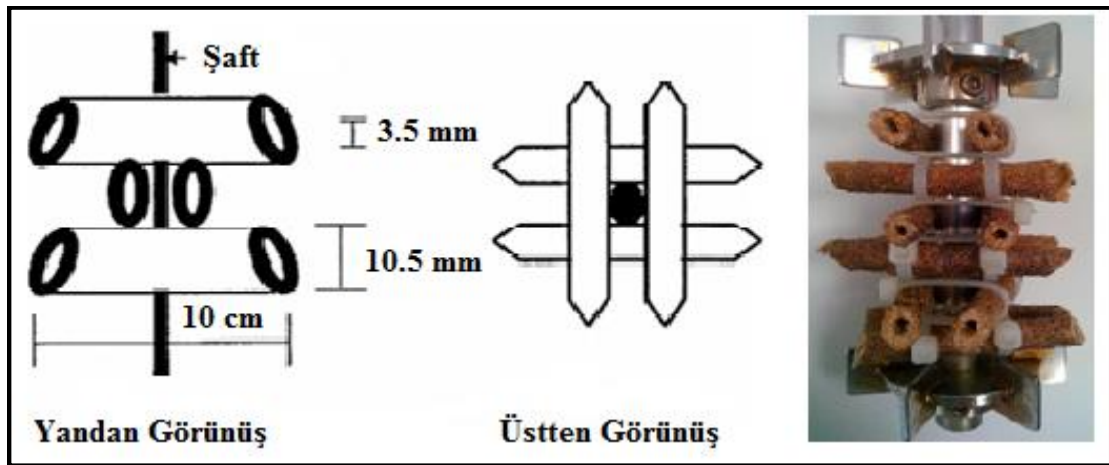
sonuçlanmaktadır. Bununla beraber destek materyali üzerinde artan biyofilm yığını, taşıyıcının yüzey pürüzlülüğünü artırmaktadır. Farklı taşıyıcılar ile değişen ayırma kuvvetleri ve yüzeye yüklenen substrat tarafından biyofilm morfolojisi etkilenmektedir. Örneğin; Celit taşıyıcı olarak daha çok ipliksi maya için kullanılmaktadır. Misel hem partikül yüzeyine tutunmakta hem de partikül içerisine nüfuz etmekte ve pellet gibi stabil bir biyofilm oluşmaktadır. Ancak aşırı gelişme daha çok tıkanmaya neden olmaktadır. Oluşan tüylü pelletler, süspanse kültürde filamentli misele benzeyen oldukça viskoz fermentasyon sıvısına neden olmaktadır (Cheng vd 2010).

#### 2.3.7.4. Biyofilmlerin aktivitesi

Bazı mikroorganizmalar farklı hücre tiplerine hatta fermentasyon sırasında farklı hücre morfolojisine sahip olmakta ve farklı ürün verimliliğine neden olmaktadır. Mesela *Clostridium acetobutylicum* hücrelerinin dört türü (gelişme, bütanol üretme, ölüm ve inaktif hale gelme) biyofilm reaktörlerde bütanol üretimine yönlendirilmektedir. Bütanol verimliliği eğer sporlanma engellenmişse geliştirilebilmektedir. Ayrıca *A. pullulans*'ın farklı fermentasyon koşulları altında hücre morfolojisinin değişeceği de örnek olarak verilebilmektedir. Bu nedenle, biyofilmlerin aktivitesini korumak için hem hücre morfolojisinin hem de hücre türlerinin kritik bir kontrolü gerekmektedir (Cheng vd 2010).

#### 2.4. Biyokütle Destek Materyalleri

Plastik Kompozit Destek (PKD) materyali, polipropilen ve birkaç zirai üründen yapılan bir ekstrüzyon katı destek materyalidir. Polipropilen, üzerinde hücre gelişimini gerçekleştirmek amacıyla gerekli besinleri sağlayan bileşenler ile zirai ürünlerin karışması için matriks olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle PKD, sadece biyofilm oluşumu için ideal bir fiziksel yapı sağlamakla kalmaz mikroorganizmalara yönelik kademeli olarak besinleri ortama bırakmaktadır. Ayrıca PKD'nin besin kompozisyonu, alışıldığı gibi hedeflenen mikroorganizmanın özel gereksinimini karşılamak için de ayarlanabilmektedir (Kundur ve Pometto III 1996a). Karıştırıcı şaftın üzerine PKD tüplerinin bağlanması Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Karıştırıcı şaftın üzerine PKD materyallerinin bağlanması (Muffler vd 2014)

Özellikle endüstriyel üretim için biyofilm reaktörlerde kullanılacak katı destek materyalinin seçilmesinde, bazı kriterler göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar; mikroorganizmanın tutunması için uygun olmalı, yüksek mekanik dirence sahip olmalı, ucuz olmalı, kolayca bulunabilir olmalıdır. Yüzeğe tutunabilme, hidrofobiklik, gözeneklilik, sertlik, partikül çapı ve yoğunluk gibi özellikler, mikroorganizmanın tutunmasını önemli ölçüde etkilemektedir. Katı destek materyallerinin birçok çeşidi, reaktörde yüksek verimlilik ve yoğunluk elde etmeye yönelik reaktörün birim hacmi başına özgül yüzey alanını artırmak amacıyla tasarlanmış ve geliştirilmiştir (Cheng vd 2010). Plastik Kompozit Destek (PKD) materyallerinin bileşenleri Çizelge 2.5'te verilmiştir.



Çizelge 2.5. PKD materyallerinin bileşenleri (Kunduru ve Pometto III 1996a).

Destek Materyali	PP <sup>a</sup>	Kabuk (S <sup>b</sup> veya O <sup>c</sup> )	Soya Fasulyesi Unu (F <sup>d</sup> )	Ekstrüzyon Karışımının İçeriği [% (wt/wt)]				Kurutulmuş Sığır Albumini (B <sup>e</sup> )	Mîneral Tuzlar (+ <sup>b</sup> )
				Soya Fasulyesi Unu (Y <sup>e</sup> )	Maya Ekstraktı (R <sup>f</sup> )	Kurutulmuş Sığır RBC (R <sup>g</sup> )	Kurutulmuş Sığır Albumini (B <sup>e</sup> )		
S	50	50, S							
OF	50	40, O	10						
OY	50	40, O		10					
SFY	50	40, S	5	5					
OR	50	40, O			10				
SFR	50	40, S	5	5	5				
SYR	50	40, S	5	5	5				
OFYR	50	35, O	5	5	5				
O+	50	50, O							+
SF+	50	40, S	10						+
SY+	50	40, S		10					+
OFY+	50	40, S	5	5	5				+
SR+	50	40, S			10				+
OFR+	50	40, O	5						+
OYR+	50	40, O		5	5				+
SFYR+	50	35, S	5	5	5				+
OB	50	40, O					10		
SFB	50	40, S	5				5		
SYB	50	40, S		5			5		
OFYB	50	35, O	5	5			5		
SB+	50	40, S					10		+
OFB+	50	40, O	5				5		+
OFYB+	50	40, O		5			5		+
SFYB+	50	35, S	5	5			5		+
PP <sup>Kontrol</sup>	100								

**a:** PP, Poli propilen reçineler, **b:** S, 20 mesh kalınlığında öğütülmüş ve vakum altında kurutulmuş soya fasulyesi kabukları, **c:** O, 20 mesh kalınlığında öğütülen yulaf kabukları, **d:** Yağı çıkarılmış soya fasulyesi unu, **e:** Y, Maya ekstraktı, **f:** R, Kurutulmuş kırmızı kan hücreleri (sığır) **g:** B, Sığır albümini, **h:** Kilogram başına 2 g sodyum asetat, 1.2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.06 g MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ilave edilmiştir.

Mikroorganizma hücreleri ve katı destek materyali arasındaki etkileşim, cisimlerin birbirini itme ve çekme gücü ile van der Waals kuvveti arasındaki bir dengenin sonucunda oluşmaktadır. PKD materyalinin yüksek derecede hidrofobik olması mikroorganizmaların tutunmasını artırmaktadır. Bununla beraber, hidrofilik olan mikroorganizmalar daha az hidrofobik olan destek materyallerine kolayca tutunmaktadır. Besinlerin ekstraksiyonu, katı destek materyallerinin hidrofobik doğası için dengelenmekte ve daha fazla biyokütle birikmesine neden olmaktadır. Aynı zamanda materyallerin gözenekli matriksi, hidrolik kayma kuvvetlerine karşı korunaklı uygun bir yere yerleştirilmesini sağlamaktadır (Cheng vd 2010). Gözenekli partiküllerde biyofilm, sadece yüzey üzerinde değil, gözenekler içerisinde de oluşmaktadır. Ayrıca, gözenekli taşıyıcıların içerisinde gaz gibi metabolitlerin birikmesi ve içerideki eksik kalan boşluğa besin difüzyonunun olmaması gibi problemler, geniş boşluklara sahip materyallerin kullanılması ile giderilebilmektedir (Melo ve Oliveira 2001).

PKD, besiyerinin azot gereksinimini azaltmak ve tekrarlanan-kesikli ve sürekli fermentasyonda çeşitli ürünlerin üretimini artırmak için kullanılmaktadır. Fermentasyonda PKD kullanımının diğer bir avantajı, PKD'nin sağlam olması ve yavaş besin bırakma özellikleri nedeniyle uzun süren fermentasyonlar için uzun ömürlü ve dayanıklı olmasıdır (Cheng vd 2010).

## 2.5. Biyofilm Reaktörlerin Uygulamaları

### 2.5.1. Biyoetanol üretimi

Biyofilm reaktörler alkol üretmek amacıyla kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada melastan etanol üretmek amacıyla dolgulu yatak sürekli reaktörde *S. cerevisiae*'nin yüzeye tutunan hücreleri kullanılmıştır. Hücreler doğal kökenli (şeker kamışı küspesi) bir destek üzerine immobilize edilmiştir. Hücreler adsorpsiyona benzer şekilde doğal yöntem ile immobilize edilmiştir. Bu destek materyalinin üzerine tutunan hücrelerin miktarı 0.13 g/g olarak bulunmuştur. Bu biyofilm reaktördeki verimlilik 28.6 g/L/h iken serbest hücre sürekli prosesinde 3.35 g/L/h olarak bulunmuştur. Biyofilm reaktördeki ve serbest hücre sürekli sistemdeki dilüsyon oranı sırasıyla 0.47 h<sup>-1</sup> ve 0.65 h<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur (Tyagi ve Ghose 1982).

Chung ve Park (1983) yapmış olduğu bir çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak sürekli etanol fermentasyonuna yönelik içerisine dikey olarak yerleştirilen seramik çubukların kullanıldığı sabit yataklı bir reaktör geliştirilmiştir ve dilüsyon hızının 1.5 h<sup>-1</sup> ve glukoz konsantrasyonunun 150 g/L olduğu bir ortamda 27.5 g<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> olan maksimum verimlilik elde edilmiştir.

Kunduru ve Pometto (1996a, 1996b), kesikli ve sürekli etanol fermentasyonunda dolgulu yatak reaktörünü, çeşitli tarımsal materyallerin ve besinlerin % 25 kadarını ve polipropileni içeren PKD parçacıklarını kullanmışlardır. PKD biyofilm reaktörleri, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Zymomanas mobilis*'in saf ve karışık kültürleri ve bu iki mikroorganizmadan herhangi birinin ve biyofilm oluşturan *Streptomyces viridosporus* (T7A)'ın karışık kültürleri kullanılarak çalıştırılmıştır. *Zymomanas mobilis*'in saf kültürünün kullanıldığı kesikli fermentasyonda 374 g<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (%44 verim) maksimum etanol verimi elde edilirken *S. viridosporus*'ın karışık kültüründen 148 g<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> etanol

verimi elde edilmiştir. Aksine *Saccharomyces cerevisiae* ve *Streptomyces viridosporus*'un karışık kültüründen  $190 \text{ g}^{-1}\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$  (%35 verim) etanol verimi elde edilirken saf *Saccharomyces cerevisiae*'dan  $40 \text{ g}^{-1}\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$  (%47 verim) ile maksimum verim elde edilmiştir. Genel olarak, *Z. mobilis* ve *S. cerevisiae* ile PKD biyofilm reaktörlerinin kesikli fermentasyonundan elde edilen etanol verimliliği süspanse kültürlerden elde edilen sonuçlardan 3-8 kat daha yüksek olmaktadır.

Kunduru ve Pometto (1996b), PKD üzerine tutunan *S. cerevisiae*'nin biyofilm reaktörünü kullanmış ve  $2.88 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında  $76 \text{ g/L/h}$  verimlilik elde etmiştir. Kontrol reaktöründeki reaktör verimliliği  $0.5 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında verimlilik  $5 \text{ g/L/h}$  olarak bulunmuştur. Yukarıdaki biyofilm reaktörden farklı olarak besleme alttan yapılırken ürün üstten elde edilmiştir. Uygun bir karşılaştırma yapmak amacıyla her iki reaktörün beslemesinin aynı doğrultuda yapılması önerilmiştir.

Demirci vd (1997) yapmış olduğu bir çalışmada, biyofilm reaktörde *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak %40 soya fasulyesi kabuğu, %5 soya fasulyesi unu, %5 maya ekstraktı-tuz ve %50 polipropilen karışımını en iyi kompozit bileşenleri olarak seçilmiştir. Tekrarlanan kesikli fermentasyonda düşük azot içeriğine sahip amonyum sülfat besiyeri seçilen PKD ile beraber kullanılarak  $30 \text{ g/L}$  etanol üretilmiştir. Bu üretim miktarı, sadece polipropilen desteğinin kullanıldığında elde edile üretim miktarından 2-10 kat daha yüksek olarak bulunmuştur.

Dumday vd (1997) akışkan yataklı bir reaktörü, *E. coli* KO11 ile etanol üretmek amacıyla kullanmışlardır. Reaktör, dikey cam bir kolondan oluşmaktadır. Ortalama etanol verimi ve üretkenliği sırasıyla  $0.4 \text{ g etanol/g şeker}$  ve  $0.06 \text{ h}^{-1}$  dilüsyon hızında  $1.12 \text{ g/L/h}$  olarak elde edilmiştir.

Qureshi vd (2004), genetiği değiştirilmiş *E. coli* kullanarak biyofilm reaktörde ksilozdan etanol üretmişlerdir. Biyofilm, kil tuğlası parçacıkları üzerinde oluşturulmuş ve reaktör 103 gün boyunca sürekli olarak çalıştırılmıştır. Reaktör çeşitli akış oranlarında çalıştırılmış ve reaktör verimliliği serbest hücre kesikli prosesine göre artırılmıştır.

Chen vd (2008), pişirilmemiş ham nişastadan etanol üretmek amacıyla sünger kabağını destek materyali olarak dolgulu yatak reaktörde kullanmıştır. Sirkülasyon hızına bakmadan %100 hücre immobilizasyonu 120 dakika içerisinde elde edilmiştir. Proseste glukoamilaz ve  $\alpha$ -amilaz enzimlerini üreten genetiği değiştirilmiş *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılmıştır. Üç gün içerisinde  $42 \text{ g/L}$  seviyesinde etanol konsantrasyonu elde edilmesine rağmen, biyoreaktör içerisindeki hücre konsantrasyonu ve hücre çeşitliliğindeki azalma nedeniyle 5 çevrimden sonra başlangıç etanol konsantrasyonunun %55'e düştüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle onlar, başlangıç etanol konsantrasyonunun %75'inin geri kazanılmasına neden olan biyoreaktöre hücrelerin eklenmesini önermişlerdir.

Ozmihci ve Kargi (2009), dolgulu kolon reaktörde peynir altı suyundan elde edilen etanol üretimini değerlendirmişlerdir. Biyofilm oluşumu için reaktör, *Kluveromyces marxianus*'un konsantre kültürü ile ve steril peynir altı suyu ile beslenmiştir. İçeriye aktarılan besiyerindeki şekerin %90' tüketilmiştir. Bu proses 3 kez

tekrarlamıştır. Sonuç olarak, 100 g/L şeker içeriğine sahip bir besiyerinden 22.5 g/L etanol elde edilmiştir.

Zhang vd (2009) *Colostridia beijerinckii* kullanımı ile aseton, bütanol ve etanol (ABE) üretmek amacıyla destek materyali olarak mısır sapını kullanmıştır. Onlar, hücre immobilizasyonu için geliştirme besiyerinin sirküle edildiği bir reaktörü kullanmıştır. Daha sonra besiyeri içeriye aktarılmış ve elde edilen ürün fermentasyondan sonra boşaltılmıştır. Süspanse hücre biyoreaktöründeki üretkenlik ve verim sırasıyla 0.22 g/L/h ve 0.24 g/g iken, kullanılan reaktörden elde edilen üretkenlik ve verim sırasıyla 0.6 g/L/h ve 0.32 g/g olarak bulunmuştur. Fermentasyon boyunca 6.29 g/L aseton-bütanol-etanol üretilmiştir.

Turhan vd (2010)'nin yapmış olduğu çalışmada keçiyoynuzu meyvesi için optimum ekstraksiyon koşulları Cevap Yüzey Metodu (CYM) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstrakt, *Saccharomycess cerevisiae* ile etanol üretmek amacıyla kullanılmıştır. Besiyeri içeriği, inokülasyon oranı, pH gibi çeşitli fermentasyon parametrelerinin etkisi keçiyoynuzu ekstraktında etanol fermentasyonu için kontrol edilmiştir. Diğer yandan 4 farklı azot kaynağı, ekonomik olarak uygun azot kaynağını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Keçiyoynuzu ekstraktının optimum ekstraksiyon koşulları 80°C, 2 saat ve 1:4 seyreltme oranı (meyve:su oranı) olarak belirlenmiştir. Fermentasyon, pH 5.5'te uygulandığında son etanol konsantrasyonu ve üretim hızı sırasıyla pH kontrolsüz gerçekleştirilen fermentasyona göre 42.6 g/L ve 3.37 g/L/h olarak bulunmuştur. % 1, %3 ve %5 inokülasyon miktarlarından en iyi inokülasyon oranı %3 olarak belirlenmiştir. Et-kemik unununun alternatif bir azot kaynağı ile maksimum üretim hızı ve son etanol konsantrasyonu sırasıyla 3.48 g/L/h ve % 44.51 olarak bulunmuştur.

Turhan vd (2012)'nin yapmış olduğu çalışmada, keçiyoynuzu ekstraktından immobilize *Saccharomycess cerevisiae* hücreleri ile etanol üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon şartlarının optimize edilmesinde, kalsiyum alginat konsantrasyonu, çalkalama hızı, immobilize edilen hücre miktarı ve pH değeri değişken parametreler olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Ca-aljinat konsantrasyonu ve immobilize edilen hücre miktarının verim üzerine önemli etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Etanol fermentasyonunun optimum koşulları %2 Ca-aljinat konsantrasyonu, 150 rpm karıştırma hızı, %5 immobilize edilen maya hücreleri ve pH 5.5 olarak belirlenmiştir. Doğrulama çalışmalarından sonra, etanol konsantrasyonu, verim, etanol üretim hızı ve şeker kullanım hızı sırasıyla 40.1 g/L, %46.32, 3.19 g/L/h ve %90.66 olmuştur. Bunların yanında fermentasyon süresi 24 saate kadar düşürülmüştür. Son olarak, zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktında en iyi şartlarda immobilize edilen hücrelerle pH kontrollü ve kontrolsüz olarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda keçiyoynuzu ekstraktının doğrudan etanol üretiminde kullanılabilme potansiyeli de görülmüştür.

### 2.5.2. Organik asit üretimi

Biyofilm reaktörlerde ayrıca organik asit üretimi de gerçekleştirilmektedir. Andrews ve Fonta (1989), *Streptococcus thermophilus* ile laktik asit üretmek için aktif karbonlu bir akışkan yatak biyofilm reaktörü geliştirmiştir. pH kontrolsüz çalışma koşulunda 12 g/L/h verimlilik elde edilmiştir.

*Acetobacter spp.* bakterileri ile gerçekleştirilen asetik asit üretim prosesinde tarih boyunca damlatmalı yatak reaktörü kullanılmıştır. Park ve Toda (1992) *Acetobacter aceti* M7'nin sıvı yüzey kültürü ile asetik asit üretmek için çok kademeli bir biyofilm reaktör geliştirmişlerdir. Bu reaktör, 10 adet laboratuvar ölçekli yüzeysel yatay reaktörlerden oluşmaktadır. Üretim sıcaklığı 30 derecede sabit tutulmuş ve bileşik yatay reaktörün üst kısmı ile kapakları arasındaki açıklık kullanılarak doğal havalandırma ile havalandırılmıştır. Etanol açısından zengin besiyerinin kademeli besleme uygulaması ile biyofilm reaktörde 4.3 g/L/h üretim hızı elde edilmiştir.

Demirci vd (1993a,b) laktik asit üretmek amacıyla PKD biyofilm reaktörü kullanmıştır. Diğer destek materyalleri (ufak çakıllar ve 3M-makrolit seramik küreler) ile karşılaştırıldığında en iyi hücre yoğunluğu PKD biyofilm reaktöründen elde edilmiştir. PKD biyofilm reaktörde laktik asit üreten *L. casei* ve biyofilm oluşturan *S. viridosporus* suşlarının karışık kültürü kullanılarak süspansiyon kültürden 5 kat daha fazla laktik asit (13 g/L) üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca PKD biyofilm reaktöründe tekrarlanan-kesikli fermentasyon metodu kullanılarak laktik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek laktik asit konsantrasyonu, süspansiyon ve PPS kültürlerine göre sırasıyla saf ve karışık kültür PKD biyofilm reaktörleri tarafından üretilmiştir (60 ve 55 g/L).

Cao vd (1996, 1997) fumarik asit üretmek amacıyla plastik diskler üzerine kendi kendine immobilize olan *Rhizopus* miseli ile dönen disk reaktörleri kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, biyofilm reaktörden elde edilen hacimsel verimliliğin (3.78 g/L/h) karıştırmalı tank reaktördeki hacimsel verimliliğe göre üç kat daha fazla olduğunu göstermiş ve fermentasyon süresi üç kat kısalmıştır. Ayrıca immobilize biyofilm, aktivitesini kaybetmeden tekrarlı kullanımı ile iki haftadan daha fazla aktif durmuştur.

Ho vd (1997a,b,c) farklı tarımsal bileşenlerin biyofilm oluşumu ve laktik asit üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. PKD materyalinin içine soya fasulyesi kabukları, maya ekstraktı ve mineral tuzların eklenmesi ile hücre bağlanmasını artırıcı etki ve daha az hidrofobik interaksiyon göstermektedir. Bununla beraber PKD içerisindeki besinlerin ekstraksiyon hızı ve PKD üzerinde laktik asit birikmesi üzerine çalışılmıştır. Kurutulmuş sığır albümini, kurutulmuş sığır eritrositleri ve/veya soya fasulyesi unu ile karıştırılan PKD materyali sadece maya ekstraktı ile karıştırılan PKD materyalinden daha az ekstraksiyon hızı göstermiştir ancak yirmi kez tekrarlanan-kesikli fermentasyon sonucunda maya ekstraktı ile karıştırılan PKD materyalinin üretim hızı korunmuştur. Ayrıca PKD biyofilm reaktörünün performansı, uzun süreli tekrarlanan-kesikli fermentasyon ve süspansiyon hücre reaktörleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre PKD biyofilm reaktörler çeşitli avantajlar sergilemektedir. Bunlar; biyofilm oluşumunu teşvik etmesi, tutunmuş ve serbest hücrelere besinlerin tedarik edilmesi, laktik asit üretimi için azalan besiyerini yönlendirme, adaptasyon fazının kısılması, laktik asit üretimini %40-70 oranında artırması ve fermentasyon süresini %28-61 oranında kısaltmasıdır.

Jianlong (2000), sitrik asit üretmek için hem RDC'yi hem de PUF'u birleştirerek kullanmıştır. Geleneksel karıştırmalı tank sistemin yerine kullanılan dönen-disk reaktörü ile üç kat daha yüksek bir verimlilik (0.896 g/L/h) elde edilmiştir. Burada, RDC içerisinde bulunan plastik disklerin şaftı üzerine PUF destek materyali bağlanarak biyofilm reaktör elde edilmiştir.

Horiuchu vd (2000), biyofilm reaktörde asetik asit üretimini araştırmıştır. Araştırmada sürekli asetik asit üretimine yönelik dolgulu yatak reaktör kullanılmıştır. Pelletler, termal karbonizasyon yoluyla atık mantar besiyerinden üretilmiştir. Çalışma pH kontrolsüz, 30°C sıcaklıkta ve %40 oksijenle zenginleştirilmiş hava verilerek gerçekleştirilmiştir. 120 gün süren fermentasyon prosesinin sonucunda 6.5 g/L/h verimlilik elde edilmiştir.

Cotton vd (2001), PKD biyofilm reaktörünün yeni bir tasarımını geliştirmiştir. PKD tüpleri, küçük PKD yüzüklerinin kullanıldığı dolgulu yatağın yerine karıştırıcı şaftın üzerine sabitlenmiştir. Bu yeni tasarım ile dolgulu, akışkan yatak ve hücre dönüşüm reaktörlerinde meydana gelen membran kirlenmesi ve akış azalması sorunları giderilmiştir. Ayrıca bu yeni tasarımın sürekli laktik asit fermentasyonunda kullanılmasıyla verim, üretim hızı ve hücre yoğunluğu artırılmıştır (9.0 g/L/h, %70 verim).

*Actinobacillus succinogenes* kullanarak süksinik asit üreten Urbance vd (2003, 2004), PKD biyofilm reaktörleri ile süspanse hücre fermentasyonuna göre daha fazla süksinik asit üretildiğini göstermiştir. PKD sürekli biyofilm reaktörleri kullanılarak üretilen en yüksek süksinik asit konsantrasyonu (10.4 g/L) ve yüzde verimi (%71.6), 0.2 h<sup>-1</sup> dilüsyon hızında elde edilmiştir. Oysa süspanse hücre kültüründen 1.0 h<sup>-1</sup> dilüsyon hızında, %76 verim ve 7.0 g/L süksinik asit konsantrasyonu elde edilmiştir.

Biyofilm reaktör kullanılarak sitrik asit üretiminde poliüretan köpük (PUF) üzerine immobilize *Aspergillus niger*'in kullanılması ile denenmiştir. Ancak biyofilm reaktörden elde edilen sonuçlarla süspanse hücre kültüründen elde edilen sonuçlar birbirine çok yakın elde edilmiştir. Ayrıca sitrik asit üretmek amacıyla dönen-disk kondaktörünün (RDC) kullanılması biyofilm reaktörlere yönelik daha yüksek bir potansiyel sergilemektedir (Cheng vd 2010).

### 2.5.3. Enzim üretimi

Webb vd (1986), paslanmaz çelik destek partiküllerini biyofilm reaktörde kullanmış ve *Tricoderma viride* (QM9123) tarafından selüloz enzimi sürekli üretilmiştir. Biyofilm reaktörde üretilen selüloz miktarı süspanse hücre reaktöründen elde edilen selüloz miktarından 3 kat daha fazla elde edilmiştir.

Oriell (1988), sıcaklığa dayanıklı amilaz enzimi üretiminde silikon köpük destek materyali üzerine immobilize rekombinant *Escherichia coli* (EC147) kullanarak amilaz miktarında 5 kat artış gerçekleştirmiştir.

Nakashiam vd (1988), biyokütle destek materyalleri ile sirkülasyonlu bir yatak reaktörünü *Rhizopus chinensis* ile hücre içi lipaz enzimini kesikli ve beslemeli-kesikli üretmek amacıyla kullanmıştır. Kübik poliüretan köpük, destek materyali olarak kullanılmıştır. Beslemeli-kesikli çalışmalardaki verimlilik, kesikli çalışmalardaki verimlilikten 1.3-1.5 kat daha fazla elde edilmiştir.

Hücre dışı peroksidaz enzimi çok sayıda tehlikeli bileşikleri dönüştürmek için kullanılmıştır. Bir biyofilm membran karıştırılmalı tank reaktörü, *Phanerochaete*

*chryso sporium* tarafından pentaklorofenolün arıtılmasını ve lignin peroksidazın üretimini geliştirmek amacıyla kullanılmıştır. Lignin peroksidaz üretimi, biyofilm gelişimine ve glukoz tüketimine yönelik yüzey alanı tarafından etkilenmektedir. Sonuç olarak, şişe ölçekli denemelerden 5 kat daha fazla pentaklorofenol (10.5 mg/L/gün) arıtılmış ve lignin peroksidaz üretimi ile biyofilm reaktör içerisinde yok olmuştur (Venkatadri vd 1992).

Kang vd (1995), Celit ve poliüretan köpüklerin üzerine immobilize olan *Aspergillus niger* KKS ile ksilanaz ve selülaz enzimlerinin üretimini geliştirmişlerdir. Immobilize hücreler ile enzimlerin verimliliği, çalkalamalı flask kültüründen 2 kat daha fazla elde edilmiştir.

Khiyami vd (2006), biyofilm reaktörleri kullanarak *Phanerochaete chryso sporium* tarafından üretilen mangan peroksidaz ve lignin peroksidazı üretmiştir. Hem mangan peroksidazı hem de lignin peroksidazı üretmek amacıyla biyofilm oluşturmak gerekmektedir. Sonuç olarak, biyofilm reaktörde 63 U/L mangan peroksidaz ve 50 U/L lignin peroksidaz üretilmiştir. Hui vd (2010), naylondan dokunmuş blokların biyofilm reaktörde kullanılması ile selülaz enziminin üretiminde 4,5 kat artış sağlamıştır.

#### **2.5.4. Antibiyotik üretimi**

Penisilin üretmek amacıyla üç kademeli akışkan yatak biyofilm reaktörler benimsenmiştir. Karbon kaynağının engelleyici etkisi, tamamen karışarak temas eden bir biyofilm reaktör kullanıldığında azaltılmıştır (Park ve Wallis 1984).

*Cephalosporium acremonium* ile sefalosporin üretmek amacıyla akışkan yataklı bir biyofilm reaktör kullanılmıştır. Destek materyali olarak celit partikülleri kullanılmıştır. Bu yöntemle sefalosporin üretimi, süspanse hücre kültüründen elde edilen sonuçlara göre 1.9 kat arttırılmıştır. Antibiyotik üretiminin verimliliği arttırılmış olmasına rağmen antibiyotik üretiminde biyofilm değişkenlik göstermektedir. Bunun muhtemel nedeni fermentasyon sırasında mikroorganizmanın morfolojik olarak farklılaşmasından kaynaklanmaktadır (Park vd 1989).

Bober ve Demirci (2004), bakteriyosin üretmek amacıyla PKD biyofilm reaktörlerinin etkisini çalışmıştır. Ancak reaktör içerisinde yetersiz bir karıştırma olması nedeniyle nisin üretim hızı önemli oranda arttırılamamıştır. Pongtharangkul ve Demirci (2006a,b,c) pH kontrolünün, karıştırmanın, besin kaynaklarının, kültür koşullarının ve PKD yapılandırmasının ayarlanması ile PKD biyofilm reaktörde nisin üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmasından sonra, ilk etapta yapılan fermentasyon sonucuna göre 7 kat daha fazla nisin üretilmiştir (4.314 g/L).

#### **2.5.5. Mikrobiyal ekzopolisakkarit üretimi**

Alkol, enzim, organik asit ve antibiyotik üretiminde olduğu gibi mikrobiyel ekzopolisakkaritlerin üretiminde de biyofilm reaktörler kullanılmaktadır. Mulchandani vd (1989), poliüretan köpüğe tutuna hücreler ve yüzeye immobilize olan hücreler tarafından pullulan üretmek amacıyla bir biyofilm reaktörü kullanmıştır. Her iki hücre tipi benzer fermentasyon özellikleri göstermiştir. Ayrıca PUF içerisinde tutuklanmış

hücreler kayma kuvvetine daha dirençlidirler ve bu nedenle pullulan üretiminde tekrar tekrar kullanılabilirlerdir.

Yang vd (1996) ksantan gam üretmek amacıyla santrifüj ile dolgulu yatak reaktörünü birleştirmiştir. 3 g/L/h civarına erişilen hacimsel ksantan verimliliği süspanse hücre kültüründen elde edilen sonuçtan 6 kat daha büyüktür.

Cheng vd (2009a, b), PKD biyofilm reaktör kullanarak başarılı bir şekilde bakteriyel selüloz (BC) üretmiştir. PKD biyofilm reaktör kullanılmasıyla üretilen bakteriyel selülozun miktarı (7.05 g/L), süspanse kültür kullanılarak elde edilen miktardan (2.82 g/L) 2.5 kat daha fazla elde edilmiştir. Ayrıca mekanik mukavemet analizinde de bakteriyel selülozun potansiyel uygulamalarını genişletebilmek amacıyla ince zar şekline benzeyen BC üretilmiştir. Suda çözünür BC ince zarı ancak PKD üzerine tutunmakta ve sürekli fermentasyon için kendi potansiyelini engellemektedir. Bu durumda, *Acetobacter xylinum*'dan üretilen pellet şeklindeki BC üretimini kolaylaştırmak amacıyla bazı katkı maddelerini (karboksimetil selüloz) eklemek olası bir çözümdür.

Cheng vd (2010a,b) pullulan üretmek amacıyla PKD biyofilm reaktörü kullanmıştır. Öncelikle PKD ve pH üzerinde besin kompozisyonu optimize edilerek pullulan konsantrasyonu süspanse hücre kültüründen elde edilen sonuçlardan 1.8 kat daha yüksek üretilmiştir (32.9 g/L). Sonra, amonyum sülfat, maya ekstraktı ve sakaroz konsantrasyonları cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiş ve % 95 saflıkta 60.7 g/L pullulan üretilmiştir. Geleneksel karıştırılmalı tank reaktörde ksantan gam üretimi enerji ağırlıklıdır. Ayrıca üretimi yüksek viskoziteye sahip olması ve yüksek çalışma maliyeti nedeniyle pahalı olmaktadır.

### 2.5.6. Biyokatalizörler

İmmobilize biyofilm sistemi yüksek enzimatik verimlilik sergilemektedir. Nakashiam vd (1988), PUF partiküllerinin içerisinde immobilize olan *Rhizopus chinensis* hücrelerini katı ve sıvı yağların endüstriyel interesterifikasyonunda lipaz katalizörü olarak kullanmıştır.

Liu vd (2010) izoflavonu dönüştürmek için *Rhizopus spp.*'nin silindirik bir lif kabağı fiber biyofilm reaktörünü kullanmıştır. *R. oligosporus* NTU-5'i 6 gün geliştirmeden sonra izoflavonları aglikonlarına yani sırasıyla 59.7 µM daidzeine ve 23.6 µM genisteine dönüştürmüştür. Daidzein ve genistin izoflavon aglikosilasyon hızı sırasıyla % 77.6 ve % 31.8'dir. β-glukozidazın 1.4 U/mL olan aktivitesi, süspanse hücre kültüründen elde edilen sonuçlardan yaklaşık 3 kat daha büyüktür.

### 2.6. Fermentasyon Mikrobiyolojisi

Genel bir ifade ile organik moleküllerin hem hidrojen donörü hem de hidrojen akseptörü olarak kullanıldığı, genelde oksijensiz ortamda süren ve sınırlı ATP üretiminin substrat fosforilasyonu ile kazanıldığı metabolizma fermentasyon olarak tanımlanabilir (Tunail 2009). Bir başka deyişle fermentasyon, yüksek moleküllü organik bileşiklerin (özellikle karbonhidratların) mikroorganizmalar tarafından daha küçük molekül yapısına sahip bileşiklere parçalanmasıdır (Ertugay ve Certel 1995). Ayrıca endüstriyel üretim



çerçevesinde birçok hammaddeden biyodönüşümle yeni bileşiklerin oluşturulmasında mikroorganizmaların biyokimyasal reaksiyonlarından faydalanma anlamına da gelen fermentasyon teknolojisi günümüzde çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadır (King ve Cheetham 1987). Fermentasyonun en önemli uygulama alanları (Çizelge 2.6); mikrobiyal hücre (biomass) üretimi, mikrobiyal enzim üretimi, mikrobiyel metabolit üretimi ve fermentasyona eklenen bileşiklerin değişimi olarak kabaca sınıflandırılabilir (Stanbury ve Whitaker 1984).

Çizelge 2.6. Endüstriyel olarak üretilen fermentasyon ürünleri

Sektör	Ürünler
Kimyasallar	
Organik (Dökme)	Etanol, Aseton, Bütanol, Organik asitler (sitrik asit, itakonik asit)
Organik (Saf)	Enzimler, Parfümler, Polimerler (çoğunlukla polisakkaritler)
İnorganik	Metallerle zenginleştirme, Ayrıştırma
Eczacılık	Antibiyotikler Tanımlayıcı kimyasallar (enzimler, antibodiler) Enzim inhibitörleri, Steroidler, Aşılar
Enerji	Etanol Metan (Biyogaz) Biyokütle
Gıda	Süt ürünleri (peynir, yoğurt) İçecekler (alkollü içecekler, çay ve kahve) Ekmek mayası Gıda katkıları (antioksidanlar, renklendiriciler, lezzet vericiler) Mantar ürünleri, Aminoasitler ve vitaminler Nişasta ürünleri, Glukoz ve yüksek-fruktozlu şuruplar Proteinlerin fonksiyonel modifikasyonları ve pektinler
Tarım	Hayvan yemleri Veterinerlik aşılar Silaj ve kompost işlemleri Mikrobiyal pestisitler

Fermentasyon tekniği yüzyıllardır kullanılmakta olan bir teknik olup genel olarak kullanım amaçları şu şekildedir (Ertugay ve Certel 1995, Simith 2004);

- a) Yeni ürün üretiminde mikroorganizmaların kullanılması,
- b) Tek hücre proteini olarak mikroorganizmalar tarafından enzim, vitamin ve antibiyotiklerin üretilmesi,
- c) Enerji eldesi,
- d) Bazı kimyasal maddelerin fermentasyon sırasında biyosentezi ve transformasyonu,
- e) Atıkların mikroorganizmalar aracılığıyla arıtılması ve değerlendirilmesi

Mikroorganizmaları kullanarak metabolit üretme veya hücre gelişimi için kullanılacak olan fermentasyon ortamı uygun yapıda ve miktardaki tüm bileşikleri içermelidir. Bu amaçla laboratuvarında mikroorganizmalar kullanılarak yapılan üretimlerde genellikle saf kimyasallar kullanılırken, ekonomik nedenlerden dolayı

endüstriyel fermentasyonlarda ise farklı kompozisyonlardaki gıda atık maddeleri kullanılmaktadır (Brock 1984, Madigan ve Martinko 2006). Bu amaçla buğday samanı, pirinç kavuzu, çay atığı, mısır koçanı, arpa samanı, pirinç samanı, şeker kamışı ve fındık kabuğu gibi çeşitli tarımsal atıkların hidrolizati (Menon vd 2012) ve keçiyoynuzu ekstraktı (Turhan vd 2010a) gibi kompleks karbon kaynakları ile beraber endüstriyel üretim esnasında açığa çıkan peynir altı suyu ve zeytin kara suyu gibi yan ürünler de kullanılabilir. Saf kimyasalların yerine yan ürünlerin kullanılması ile üretilen ürünün maliyetini azaltılmakta ve çevreye atık olarak bırakılan ürünlerin değerlendirilmesi sağlanmaktadır.

## **2.7. Mikroorganizmaların Beslenmeleri**

Fermentasyon işleminde kullanılan kültür ortamlarının hücre maddelerinin sentezi ve metabolik ürünlerin üretimine imkân verecek bütün elementleri içermesi gerekir. Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarında kültür ortamında kullanılan kimyasallar oldukça saf olmasına rağmen, endüstriyel ortamlarda ekonomik olması nedeniyle daha kompleks bileşikler içeren maliyeti düşük substratlar kullanılmaktadır (Çizelge 2.7). Ancak bu tip ortamlarda mikroorganizma gelişimi ve fermentasyon ortamının kontrol altında tutulabilmesi amacıyla kültür ortamına kritik mineral ve elementlerden katkı yapılmalı, ön denemeler yapılarak biyolojik uyumluluk sağlanmalı ve ortamda ürünün oluşabilmesi yanında ürünün fermentasyon ortamından ayrılması gibi işlemler de göz önünde bulundurulmalıdır (Tunail 2009).

Canlı birer varlık olan mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmeleri, istenilen biyodönüşümleri yapabilmeleri ve yeni ürünler oluşturabilmeleri için uygun yetiştirme şartlarına ihtiyaç vardır. Bu şartların başında mikroorganizmaların substrat istekleri gelir. Mikroorganizmalar kendilerini çevreleyen ortamdan besin maddelerini alabilmek ve metabolizma sonucu oluşturdukları primer veya sekonder metabolitlerini hücre dışına çıkarabilmek için de suya gereksinim duyarlar. Suda çözülmüş olarak aldıkları besin maddelerini hem enerji üretiminde hem de hücre organellerini (hücre duvarı, membran, ribozom, genom, sitoplazma) inşa etmek için makro moleküllerin (polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, fosfolipitler, enzim ve koenzimler) sentezinde kullanırlar (Waites vd 2001, Tunail 2009).

Çizelge 2.7. Fermentasyon işleminde kullanılan yan ürünler

<b>Tarımsal Yan Ürünler</b>	<b>Orman Yan Ürünleri</b>	<b>Endüstriyel Yan Ürünler</b>
Saman	Odun atıklarının hidrolizatları	Melas
Küspe	Sülfite pulpa likörü	İçki fabrikası atıkları
Mısır koçanı	Kabuk, talaş, dal ve saplar	Peynir altı suyu
Kahve, kakao ve hindistan cevizi kabukları	Kâğıt atıkları ve selüloz	Gıda endüstrisinin sıvı atıkları (zeytin, palm yağı, patates, turunçgiller)
Meyve kabuk ve yaprakları	Lifler	Yıkama suları (mandıra, konserve fabrikası, meyve suyu fabrikası, fırın, şeker fabrikası)
Çay yaprakları		Balık atık suları ve atıkları
Ayçiçeği tablası		Et yan ürünleri
Pamuk atıkları		Evsel çöpler ve atıklar
Buğday kepeği		Lağım suyu
Pulp (domates, kahve, muz, ananas, turunçgiller, zeytin vb.)		Mezbaha atıkları
Hayvansal atıklar		

Mikroorganizmalar, buldukları doğal ortam koşullarına göre hücresel donanımlarını ve kendi fizyolojilerini geliştirerek buldukları yerlere adapte olmuşlardır. Dolayısıyla değişik mikroorganizma gruplarının ortamdaki besinler ve koşullar farklıdır. Herhangi bir türün izole edilip kültüre alınmasında, türün beslenme tipine bağlı beslenme isteklerinin ve gelişme koşullarının bilinmesi büyük önem taşır. O nedenle öncelikle mikroorganizmalarda besin olarak alınan elementlerin hangi amaçlarla kullanıldığının, gelişme faktörlerinin hangi metabolizmalara hizmet ettiğinin ve temel beslenme tiplerinin incelenmesi gerekir (Tunail 2009).

Mikrobiyel beslenme, mikrobiyel psikoloji yönünden monomerlerin desteği veya sağlanması ile ilgilidir. Hücreler, makromoleküller, su ve makromolekülleri oluşturan monomer adı verilen küçük birimlerden oluşurlar. Tüm bu hücreler için gerekli olan maddeler besin olarak adlandırılmaktadır. Farklı mikroorganizmaların farklı besin gereksinimleri vardır ve birinden diğerine spesifik olarak değişiklik gösterir ve tüm gereksinimleri aynı değildir. Bazı besinler büyük miktarlarda kullanılırken (makromoleküller) bazıları daha az veya eser miktarlarda kullanılır ki bunlar da mikrobeyinler olarak adlandırılırlar (Çizelge 2.8) (Brock 1984, Madigan ve Martinko 2006).

Çizelge 2.8. Bazı mikro elementlerin biyolojik işlevleri (Tunail 2009)

Element	Biyolojik işlevler
Bakır (Cu)	Mitokondriyal <i>oksidaz</i> 'ın bileşenidir.
Kobalt (Co)	Kobalaminin (Vitamin B <sub>12</sub> 'nin) bileşenidir.
Molibden (Mo)	N <sub>2</sub> fiksasyonunu gerçekleştiren <i>Nitrogenaz</i> 'ın bileşenidir.
Selenyum (Se)	<i>Glutasyon peroksidaz</i> 'ın bileşenidir.
Çinko (Zn)	<i>Dehidrogenaz</i> 'ların kofaktörüdür.
Mangan (Mn)	<i>Arjinaz</i> 'ın, özellikle fosfat grubu taşıyan enzimlerin kofaktörüdür.
Magnezyum (Mg)	Fotosentezde <i>Su dehidrogenaz</i> enziminin, fotosentezin kofaktörüdür.
Vanadyum (V)	<i>Nitrat redüktaz</i> enziminin kofaktörüdür.
Nikel (Ni)	<i>Üreaz</i> enziminin kofaktörüdür.
Demir (Fe)	Sitokromlarda ve Fe-S proteinlerinde elektron taşıyıcısıdır.

Hücre yapısı analiz edildiğinde; hücre kuru ağırlığının % 95'in üzerinde az sayıda temel elementlerden oluştuğu görülmüştür. Bunlar; C, O, H, N, S, P, K, Na, Ca, Mg, Fe elementleridir ve bütün mikroorganizmalarda bulunur (Tunail 2009).

Besin maddeleri olarak karbonun, hidrojenin ve oksijenin bir arada bulunduğu, bir diğer deyiş ile karbonun indirgenmiş formda yer aldığı organik bileşikler (selüloz, nişasta, şekerler, organik asitler) birçok mikroorganizmanın tercih ettiği karbon kaynaklarıdır. Mikroorganizma karbonu, yapısındaki makro moleküllerin (murein, diğer polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler) iskeletlerinde kullanır.

Mikroorganizmaların en çok kullandıkları karbon kaynakları karbonhidratlardır. Ekonomik sebeplerden dolayı saf glukoz ve sakaroz, endüstriyel fermentasyonlarda kontrol örneği olarak kullanılması dışında tercih edilmez. Bu amaçla mısır veya patatesten elde edilen nişasta, şeker endüstrisinin yan ürünü melaslar, çeşitli gıda ve tarımsal ürünlerin atıkları karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.7) (Brown 2003).

Birçok maya, küf mantarı ve *Actinomyces* cinsi için malt ekstraktları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında sülfid likörleri, selüloz (saman, mısır sap ve koçanları, şekerpancari ve şeker kamışı küspeleri), bitkisel yağlar, metil alkol, etil alkol, alkanlar ve fermentasyon ürünlerinin ortamdan alınmasından sonra geriye kalan pentozlar, organik asitler ve ölü hücreleri içeren medya da karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Tunail 2009, Brown 2003).

Hücrelerdeki karbondan sonra en çok bulunan element azottur. Tipik bir bakteri hücresinin kuru ağırlığının yaklaşık %12'si azottan oluşur. Bütün mikroorganizmalarda hücre içindeki önemli moleküllerde N, S ve P bulunur. Bunlara genellikle, azot (nitrojen) ve kükürtte (sülfür) olduğu gibi, indirgenmiş formda rastlanır. Amino ve imino (- NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ve = NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) grupları ile sülfidril (- SH) grupları birçok molekülde yer alır. P ise genellikle fosfat formunda (HPO<sub>3</sub><sup>-</sup>) moleküle dâhil olur. Bu elementler, hücreyi çevreleyen ortamda birçok karbon bileşiği içinde yer alsa da hücre genellikle bu elementleri anorganik kaynaklardan sağlar, yalnızca azotu amonyum (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) halinde almayı tercih eder. Bunun yanında azot gazı (N<sub>2</sub>) sadece azot fiske edici bakteriler tarafından kullanılmaktadır

(Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009). Fermentasyon işlemlerinde azot (N) kaynağı olarak amonyum tuzları, üre ve gaz halindeki amonyak kullanılır. Yine bunun yanında mısır nişastasından elde edilen likör, maya ekstraktları, protein hidrolizatları ve soya unu azot kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Mikroorganizmalar tarafından kullanılan diğer makro besinler arasında potasyum, tüm organizmalar için gerekli bir elementtir. Protein sentezinde görev yapanlar da dâhil olmak üzere, çeşitli enzimler aktivite gösterebilmek için özgül olarak potasyuma gereksinim duyarlar (Madigan ve Martinko 2006). Kalsiyum birçok organizma için esansiyel değildir ancak hücre duvarının stabilize olmasına yardım eder ve endosporların sıcaklık stabilitesinde kilit rol oynar (Tunail 2009). Sodyum, tüm organizmalar için olmasa da bazı organizmalar için gereklidir ve sodyuma gereksinim duyulması tipik olarak organizmanın habitatını yansıtır. Örneğin, deniz suyu yüksek sodyum içeriğine sahiptir ve denize ait mikroorganizmalar genellikle gelişim için sodyumu kullanır. Aksine, bu mikroorganizmalarla yakın akraba olan tatlı su türleri sodyum yokluğunda yaşayabilir. Demir, elektron taşınmasında görev alan sitokromların ve Fe-S proteinlerinin önemli bileşeni olarak hücre solunumunda oldukça önemli bir rol oynar (Madigan ve Martinko 2006). Birçok mikroorganizmanın gelişimi için mineral madde, karbon ve enerji kaynaklarının dışında bazı tamamlayıcı maddeler veya gelişme faktörleri gerekir. Vitaminler, aminoasitler, pürin ve pirimidinler alınması zorunlu maddeler olabilir. Vitaminler, enzimlerin katalitik etkilerinde rol oynayan koenzim veya prostetik grupların yapılarında yer alır. Aminoasitler proteinlerin, pürin ve pirimidin bazıları ise nükleik asitlerin biyosentezinde kullanılır. Molekül büyüklükleri oldukça küçük olan vitaminlerin çok az miktarları mikroorganizmaların iyi bir gelişim göstermesi için yeterli olmaktadır. Vitamin çözeltileri de eser element çözeltileri gibi derişik ana çözelti halinde hazırlanır (Tunail 2009).

## **2.8. Fermentasyon Yöntemleri**

### **2.8.1. Kesikli fermentasyon**

Sisteme sonradan besin kaynağı eklenmediğinden dolayı kapalı kültür sistemi olarak da adlandırılan kesikli fermentasyon prosesi, stok kültürden ön kültür elde edilmesi ve biyoreaktöre aşılama yapıldıktan sonra üretimin sonlanmasına kadar bir dizi işlemde oluşmaktadır (Shety vd 2006). Kesikli fermentasyonda kültür ortamının kompozisyonu, biyokütle ve metabolit konsantrasyonu sürekli olarak değişim göstermektedir. Fermentasyon başlangıç basamağı olan inokülasyon safhasından sonra belli bir süre mikroorganizmanın büyümesinde bariz bir gelişme gözlenmezken sonraki zamanlarda en yüksek seviyelere ulaşmaktadır (Ertugay ve Certel 1995). Kesikli fermentasyonlarda substrat konsantrasyonundaki düşüğe karşın metabolitlerin ortamda birikmesi gelişmeyi sınırlamaktadır (Tunail 2009). Kesikli prosesin avantajları arasında, proses kontrolü için çok az emek gerektirmesi, proseslerin düşük yatırım maliyetinin olması ve yüksek substrat konsantrasyonlarının istenen biyolojik reaksiyon üzerine olumsuz etkisinin olmadığı durumlarda kullanılabilmesi sayılabilir. Ayrıca, üretilecek ürün miktarının az olması durumunda bu yöntem oldukça uygundur. Ancak bu sistemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar; sistem kesikli çalıştığından dolayı biyoreaktörün %80 verimlilikte çalışması, tekrar tekrar yapılan sterilizasyon işlemleri sonucunda ölçüm aygıtlarının yanlış ölçmesi, bazı patojenik mikroorganizmaların salgıladığı toksik

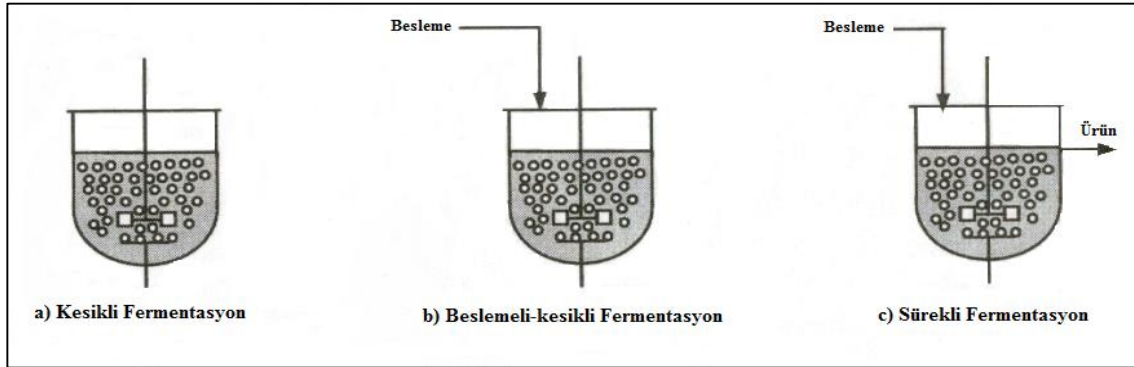
ürünlerin personel ile teması ve kesikli sistemde mikroorganizmalar lag fazda olduğundan dolayı reaktörün verimliliğini düşürmektedir. Günümüzde alkol fermentasyonu halen yaygın olarak klasik kesikli yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Karbonhidratlardan etanol üretimi bu amaçla en çok kullanılan metottur. Kesikli fermentasyon kullanılan endüstriyel çalışmalarda pH 4.5, sıcaklık 20-30°C arasındadır. Fermentasyon ortamında diğer mikroorganizmaların oluşumu, pH düşmesi ve en önemli olarak da etil alkolün oluşumuyla üretim engellenir (Doran 1995, Stanbury vd 1995, Türker 2005, Shuler ve Kargi 2008, Ahmed 2011).

### **2.8.2. Beslemeli-kesikli fermentasyon**

Klasik kapalı fermentasyonların geliştirilmiş şekli olan bu sistem de fermentasyon ilerledikçe substrat ortama aşamalı olarak eklenmektedir. Ayrıca bu yöntem, kesikli fermentasyon ile sürekli fermentasyon 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, fermentasyon ortamına öncül maddeler, karbon kaynakları ve oksijen ilavesi, hücreyi koruyacak ve ürün üretimini sağlayacak düzeyde eklenerek üretim sağlanmaktadır. Dolayısıyla beslemeli-kesikli fermentasyon, gelişim ve üretim fazı olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Beslemeli-kesikli fermentasyonlar daha çok penisilin gibi antibiyotiklerin üretiminde ve etanol endüstrisinde kullanılmaktadır. Kesikli besleme sisteminin en temel avantajı, substrat inhibisyonu ve katabolik represyon etkisi belirli zamanlarda substrat eklenmesi ile engellenmektedir. Substratın inhibitör etkisi varsa, başta substrat konsantrasyonu düşük tutularak ve belirli zaman aralıklarında substrat eklenerek giderilebilmekte ve buna bağlı olarak fermentasyon verimliliği artırılabilir. Beslemeli-kesikli prosesin başlangıcı, kesikli prosesin başlangıcına benzer. Daha sonra, prosesin başlangıcında verilen büyümeyi sınırlandırıcı substrat kullanıldığında, substrat belirli konsantrasyonda ve sürede reaktöre verilir. Besleme yapılırken reaktördeki substrat konsantrasyonu sabit tutulmalıdır. Bu sayede, beslemeli-kesikli proste substrat inhibisyonu minimum seviyede tutulabilir. Substrat konsantrasyonu ölçülmeli ve besleme, ölçülen konsantrasyona göre yapılmalıdır. Substrat konsantrasyonunun doğrudan ölçülemediği durumlarda, karbondioksit üretim hızı gibi ölçülmüş faktörlerden substrat tüketim hızı hesaplanır. Proses; ürün konsantrasyonunu veya diğer nütrientlerin sınırlandırıcı etkisi olduğu ana kadar devam eder. Kesikli-beslemeli fermentasyonun avantajlarını yüksek verim elde etme, yüksek toleranslı olması, çevresel koşulların optimizasyonunun mümkün olması ve kontaminasyon riskinin daha az olması şeklinde sıralayabiliriz. Ancak bu yöntemin avantajları olduğu kadar dezavantajları da vardır. Bunlar; personele ve bilgisayar gibi pahalı ekipmanlara ihtiyacın olması ve patojen mikroorganizmalar tarafından üretilen toksik metabolitlere temas olasılığının olması ve sistem beslemeli-kesikli çalıştığından dolayı doldurma, sterilizasyon, boşaltma ve temizleme gibi sistemin kendinde olmayan işlemlerin yapılması için zaman gereksiniminin olmasıdır. Yani bir sürekli sistem gibi değildir (Shetty vd 2006, Ahmed 2011).

### 2.8.3. Sürekli fermentasyon

Sürekli fermentasyon, kullanılmış besiyerine karşılık aynı oranda besin maddelerini içeren besiyerinin ortama ilave edilmesi ile mikroorganizmaların gelişiminin logaritmik fazda tutulmaya çalışıldığı açık bir sistemdir (Shetty vd 2006). Statik (durgun) kültürde besiyerinde; giderek daha fazla değişimlerin olduğu, substrat konsantrasyonunda düşüş meydana gelirken, mikrobiyal metabolitlerin de ortamda birikerek gelişmeyi sınırlandırdığı bilinmektedir. Oysa hem fizyolojik araştırmalarda hem de endüstriyel çalışmalarda, kültür popülasyonunun hep logaritmik gelişme döneminde tutularak sabit bir hız ile gelişme göstermesi arzulanır. Statik kültürde, kültür ortamına taze steril besiyeri ilave edilmediği gibi zararlı metabolik atıkların da ortamdaki uzaklaştırılması söz konusu değildir. Bu nedenle eksponensiyel gelişme fazı mikroorganizmanın jenerasyon süresine bağlı olarak birkaç jenerasyon devam ettikten sonra durma fazına geçer. Mikroorganizmanın durma fazına geçmesindeki temel iki etken; ortamda kullanılabilir substrat miktarının azalması ve ortamda metabolitlerin birikmesidir. Mikroorganizmanın durma fazına geçmemesi; ortama sürekli olarak taze besiyeri eklenerek 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 gelişen hücreler ile kültür kabından kullanılmış besiyeri içinde uzaklaştırılan hücrelerin (hücre kaybının) dengede tutulmasıdır (Tunail 2009). Fermentasyon yöntemlerinin şekilsel gösterimi Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

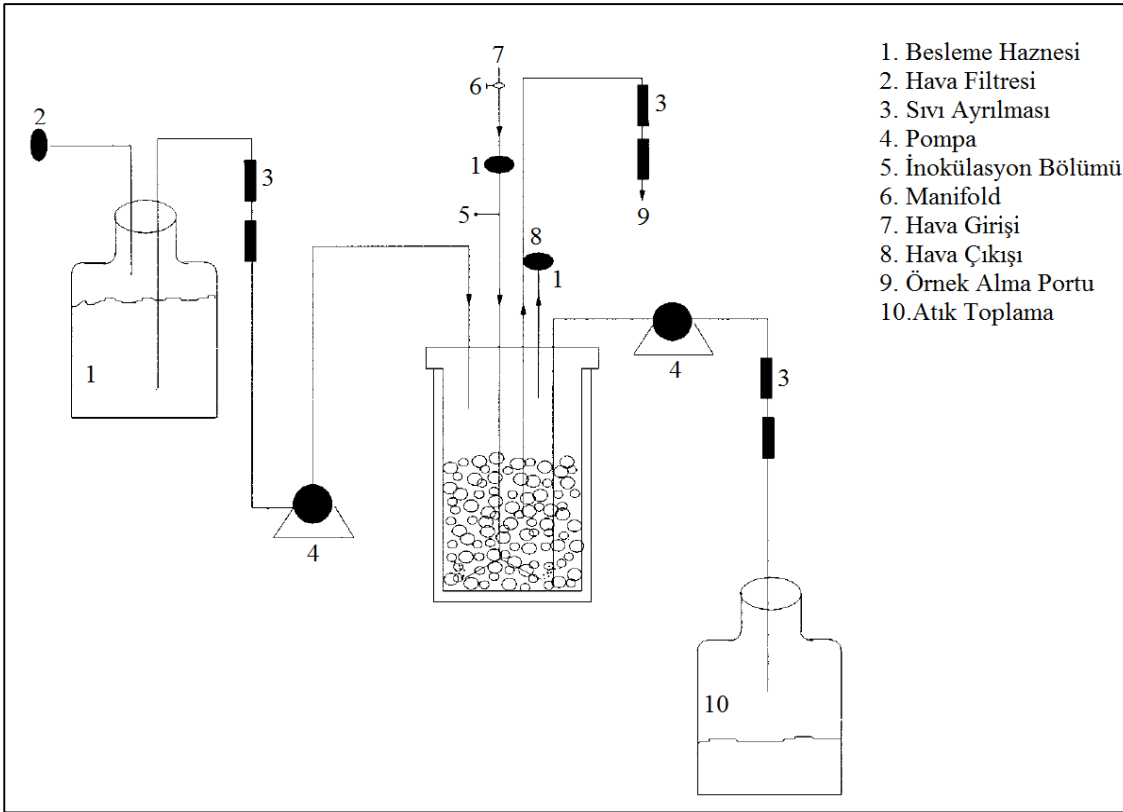


Şekil 2.4. Fermentasyon yöntemlerinin şekilsel gösterimi (Türker 2005)

### 2.8.4. Tekrarlanan-kesikli fermentasyon

Bu fermentasyon tekniğinde, belirli bir zaman sonra besiyerinin tamamı ortamdaki uzaklaştırılmakta daha sonra ortama yeniden taze steril besiyeri ilâve edilmektedir. Bu yöntemin diğer bir adı yarı sürekli fermentasyondur. Fermentasyon yönteminin özelliği, ortama herhangi bir bulaşma olmadığı ve besiyerinin fermentasyon bittikten sonra ortama sürekli eklendiği sürece devam etmesidir. Bu yöntemde besiyeri giriş ve ürün çıkış kanalları bulunmaktadır. Belirli bir süre fermentasyon gerçekleştirilmekte daha sonra ürün uzaklaştırılarak taze steril besiyeri ortama ilave edilmektedir. Bu fermentasyon yöntemi ile sirke, penisilin, maya ve etanol üretilebilmektedir. Tekrarlanan-kesikli fermentasyon yönteminin avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz: Başlangıçta yapılan

inokülasyondan sonra tekrar inokülasyona gerek duyulmaması (re-inoculation), çalışma esnekliğinin yüksek olması, daha az kontrol gerektirmesi ve temizlik ve sterilizasyon amacıyla üretimin olmadığı zamanda harcanan maddenin olmamasıdır. Ayrıca tekrarlanan-kesikli fermentasyon yönteminin kullanılması sonucunda ortamda aktivitesi yüksek ve konsantrasyonu fazla mayalar bulunmakta dolayısıyla fermentasyon süresi kısaltılabilmektedir. Yöntemin avantajları olduğu kadar dezavantajları da bulunabilmektedir. Bunlar; büyük hacimli reaktörler için maliyetli olması ve kontaminasyon riskinin bulunmasıdır (Ahmed 2011). Tekrarlanan-kesikli biyofilm reaktörün şematik görünümü Şekil 2.5’te verilmiştir.



Şekil 2.5. Tekrarlanan-kesikli biyofilm reaktörün şematik gösterimi (Demirci vd 1997)

## 2.9. Mikrobiyal Gelişme

Mikrobiyolojide kullanılan gelişme terimi, hücre sayısındaki artış anlamına gelmektedir. Gelişme hayat döngüsünün başlıca bileşenidir. Her hücre, sonu olan bir yaşam döngüsüne sahiptir ve türler sadece popülasyonun devamlı büyümesinin sonucu olarak varlıklarının sürdürürler. Tek bir mikroorganizmanın gelişmesi söz konusu olduğunda, canlı hücrenin kütle artışı anlaşılır. Bu kavram, tek bir mikroorganizma hücresi için büyüme ile de tanımlanabilir. Mikrobiyolojide gelişme denildiğinde ise kültürün (popülasyonun) sayıya ya da kütlece artışı anlaşılır. İkiye bölünerek çoğalan bakterilerde normal boyuttaki bir hücre ikiye bölünmeden önce kütlelerini iki katına çıkarır, bölünmenin ardından iki adet yaklaşık aynı büyüklükte iki genç kardeş hücre oluşur. Genç hücreler çok kısa bir süre sonra ata hücrenin bölünmeden önceki boyutu ile aynı



büyükluğe gelirler. Buradan anlaşılacağı üzere bir hücrede kütle artışı iki katına ulaştığında, bir anlamda hücre sayısı da ikiye katlanmıştır. Dolayısıyla, bakteriler gibi ikiye bölünerek çoğalan mikroorganizmalarda gelişmeyi hücre sayısının artışıyla ifade etmek, kütle artışıyla ifade etmekle aynı anlama gelmektedir. Maya ve küflerde ise tomurcuklanma, sporlanma gibi farklı çoğalma şekilleri vardır. Bu çoğalma şekillerinde kütle artışı ile sayısal artış orantılı değildir. Örneğin; funguslar gibi hücre veya hif sitoplazmalarında birden fazla çekirdek (nükleus) içeren senositik karakterli mikroorganizmalarda, tekrarlanan çekirdek bölünmelerine hücre bölünmeleri eşlik etmez. Dolayısıyla kütle artışı ile hücre sayısı artışını ilişkilendirmek olanaksızdır. Fungus gelişmesinden anlaşılan hücrelerin (misellerin) kütle artışıdır. Tek hücreli mikroorganizmaların boyutları çok küçük olduğundan tek bir hücrenin büyümesinin saptanması çok zordur. O nedenle gelişme (ölçülebilecek değer) olarak, populasyondaki sayısal veya kütle artışı dikkate alınır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

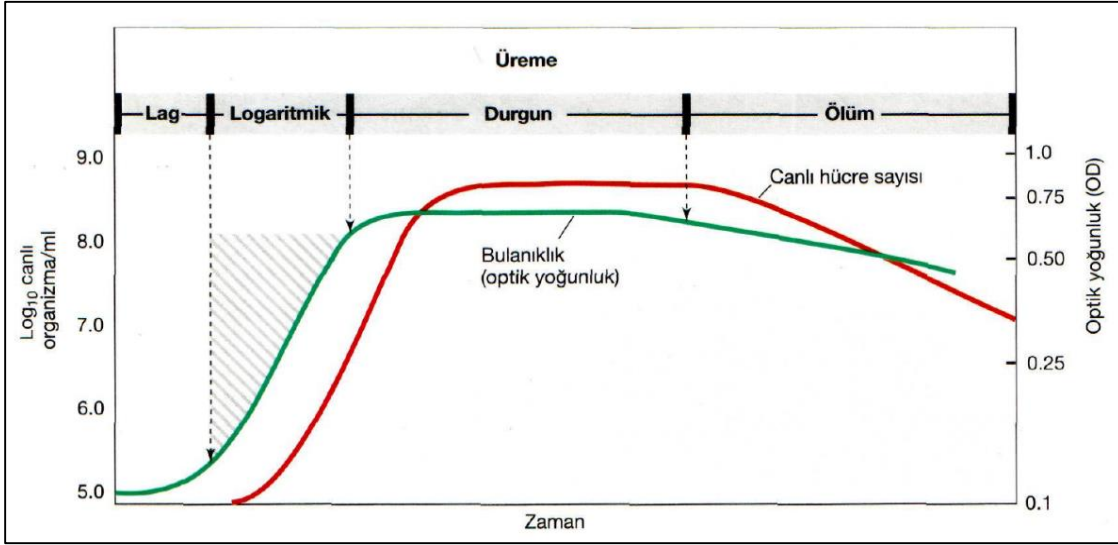
### 2.9.1. Gelişme eğrisi (kurvesi)

Kapalı bir sistemde; örneğin sıvı besiyeri içeren Erlenmayer kabına inoküle edilen bir bakteri kültüründe, yeterli koşullar sağlanması durumunda, hücreler gelişmelerini sürdürürler. Ortama yeni besin maddeleri verilmeksizin ve zamanla biriken bakteriyel metabolitler uzaklaştırılmaksızın gelişmesini sürdüren kültüre durgun (statik veya batch) kültür adı verilir. İlerleyen zamanla birlikte yukarıdaki nedenler başta olmak üzere birçok faktör gelişmeyi sınırlandırıp durma noktasına getirir. Koşullar giderek daha da kötüleştiğinde hücreler ölmeye başlar. Hepsisi ölmese de bakteri sayısı önemli düzeyde azalır. İkiye bölünerek üreyen bakteri popülasyonunda (statik kültürde) inkübasyon süresince belli saat aralıkları ile alınan örneklerde hücre sayıları belirlenir, bu sayıların logaritmaları alınır ve zamana karşı grafik haline getirilirse sigmoid forma yakın bir gelişme eğrisi (kurvesi) elde edilir. Eğri üzerinde sırasıyla, lag fazı (latent veya gizli dönem, adaptasyon dönemi), log fazı (logaritmik veya eksponensiyel üreme dönemi), durma fazı ve ölüm fazı olmak üzere dört farklı evre ayırt edilir (Şekil 2.6) (Tunail 2009).

Mikroorganizmaların üreme hızı genel olarak Monod eşitliği ile ifade edilir:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2.1)$$

- $\mu$  : Spesifik üreme hızı  
 $x$  : Mikroorganizma konsantrasyonu  
 $\frac{dx}{dt}$  : Üreme hızı



Şekil 2.6. Mikroorganizmaların gelişme eğrisi (Madigan ve Martinko 2006)

### 2.9.1.1. Latent veya gizli dönem (lag fazı) (adaptasyon fazı)

Mikrobiyel bir popülasyon taze besiyerine inoküle edildiği zaman, gelişme genellikle sadece lag fazı adı verilen bir zaman periyodundan sonra başlar. Diğer bir deyişle hücre kütlelerinin ve sayısının artışı belli bir dönemden sonra başlar. Hücrelerin ortama adaptasyonu için gerekli olan bu periyoda lag fazı denir. Lag fazının süresi gelişme şartları ve kültürün geçmişine, mikroorganizmanın fizyolojik kondisyonuna ve inoküle edildiği besiyerinin doğasına bağlı olarak değişir. Mikroorganizmanın yaşı, hasarlı olup olmaması, daha önce geliştirildiği ortam veya saklandığı sıcaklık derecesi (dondurulmuş kültür) lag fazı süresine etken faktörlerdir. Bakteri durgun metabolizmaya geçerken ATP'lerini tüketmiş, ribozomlarını kaybetmiş, gerekli enzimleri henüz sentezleyememiş durumda olabilir. Hücreler tüm eksikliklerini tamamlayıp DNA'larını replike edebilir duruma geldiklerinde lag fazı da sona erer. İnokülüm ısı, radyasyon ya da toksik kimyasallar ile muamele neticesinde zarar görmüş ama ölmemiş hücreleri içerdiğinde de lag fazı gözlenir, çünkü mikroorganizmaların bu hasarı tamir etmesi için de zaman gereklidir. Lag fazının süresini kısaltmak ve hatta tamamen ortadan kaldırmak araştırmacının elindedir. İnokülasyon öncesi, inokülüm olarak kullanılacak kültür birkaç kez aynı besiyerinde aktifleştirilir ve inokülasyon eksponensiyel fazdaki hücrelerle yapılırsa lag fazına ihtiyaç kalmadan veya kısa sürede logaritmik faza geçilir (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

Lag fazında üreme gerçekleşmediği için;

$$\mu = 0 ; dx/dt = 0 \quad (2.2)$$

### 2.9.1.2. Ekspansiyonel dönem (log fazı)

Bu dönemde hücreler maksimal hız ile çoğalır ve gelişirler. Toplam popülasyonda canlı hücrelerdeki maddeler hızla artış gösterdiğinden mikrobiyel gelişme çeşitli yöntemlerle izlenebilir. Mikrobiyel gelişme denilince bakteri hücre sayısının veya bakteri hücre kütlelerinin (bakteri sayısı + absorpsiyon) artışı anlaşılır. Ekspansiyonel 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, çok hızlı bölünen hücreler çok küçüktür ve de kültürün bölünme hızı, kütleleri iki katına çıkarma hızının önüne geçebilir. Ancak gelişmenin ilerleyen evrelerinde hücre kütle artışının hızı, hücre sayısındaki artışın önüne geçer. Bu anlamda hücre sayısı ile hücre kütlesi arasında fark olduğu söylenebilir. Ancak, gelişme fazı topluca incelendiğinde hücre sayısındaki artış ile kütledeki artışın ispatlanabilir şekilde aynı olduğu görülür. Ekspansiyonel dönemde; genelde kültürün “standart hücreler” den oluştuğu, popülasyonunun “dengeli gelişme” (bölünme ve kütleli artış) gösterdiği kabul edilir, dolayısıyla sayısal artış ile kütleli artışın aynı olduğu varsayılır. Denemeler ekspansiyonel fazda; hücre sayısında, hücredeki protein miktarında ve kuru maddedeki artışın aynı hızla olduğunu göstermiştir. O nedenle popülasyondaki gelişim, hücre sayısı belirlenerek veya protein miktarı ve kuru maddedeki artış tayin edilerek de izlenebilir. Ayrıca bu fazda gelişmenin takibi, artan bakteri yoğunluğunun (optik dansite, OD) fotometrede izlenmesi ve ekstinksiyon (absorbans) değerlerinin ölçülmesiyle de mümkündür (Tunail 2009).

Ekspansiyonel gelişme döneminde inkübasyon zamanına karşı taşınan hücre sayılarının logaritmik değerleri düz bir çizgi halinde yükseliş gösterir. Statik kültürde logaritmik fazda substrat konsantrasyonu giderek azalmakta, hücre yoğunluğu artmakta ve metabolik son ürünler yavaş yavaş birikmektedir. Bununla beraber gelişme nispeten sabit bir hızla seyredir. O nedenle hücrelerin fizyolojik ve kimyasal özelliklerinin aynı olduğu, jenerasyon süresinin görece sabit bulunduğu bu evre, kültürün gelişme hızının hesaplanması için en uygun evredir. Ayrıca pH, redoks potansiyeli, sıcaklık, havalandırma gibi ortam faktörlerinin incelenmesinde veya değişik substratların mikroorganizma tarafından kullanılabilirliğinin araştırılmasında, ya da metabolik yolların aydınlatılması ve enzim kinetiği çalışmalarında gerekli enzimlerin izolasyonları için ekspansiyonel evreden ve bu evre sonunda hasat edilen hücre miktarından yararlanılır (Tunail 2009).

Logaritmik evrede biyokütle artış hızı  $dx/dt$ , mikroorganizma konsantrasyonu  $x$  ile orantılıdır. Buna göre logaritmik üreme hızı;

$$dx/dt = \mu x \quad (2.3)$$

eşitliği ile gösterilirken birinci dereceden bir reaksiyon eşitliği oluşturur.  $\mu$ ; spesifik üreme hızı olup eşitlik 2.3’den çözülürse;

$$\mu = 1/x (dx/dt) \quad (2.4)$$

2.4 nolu eşitlikte görüldüğü gibi, birim konsantrasyondaki biyokütle fraksiyonel artış hızını verir. Birimi zaman<sup>-1</sup> dir. Eşitlik 2.1'in

t = 0 için x = x<sub>0</sub> ve t = t için x = x sınır şartları kullanılarak integrali alınır;

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \mu \int_0^t dt \quad (2.5)$$

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2.6)$$

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (2.7)$$

2.6 nolu eşitlik elde edilir. Burada x<sub>0</sub>, başlangıçta (t=0 anında) kültür ortamına aşılana mikroorganizma konsantrasyonu, x ise herhangi bir t (t=t) anındaki mikroorganizma konsantrasyonudur. 2.6 nolu eşitlik bir doğru denklemi olup ordinatı kesme noktası x<sub>0</sub>, eğim ise μ'yü verir. Logaritmik fazda besin maddeleri azalırken biyokütlede artış görülür, dolayısıyla ürün miktarında da artış olur.

### 2.9.1.3. Duraklama fazı

Ekspansiyel gelişme fazının sonunda bakteri kültürlerinin ulaştığı maksimal sayı genellikle 10<sup>9</sup> hücre/mL'dir. *Protozoa* ve algler ise bu sayıya ulaşamazlar ve genel olarak 10<sup>6</sup> hücre/mL düzeyine kadar gelişirler. Bu maksimal değerlerden sonra artık hücrelerin sayısal veya kütsel artışları durur. Mikrobiyel popülasyonun durma fazına girmesi ve durma fazının sürmesi gelişme eğrisinde yatay ve oldukça düz seyreden bir çizgi ile anlaşılır. Gelişmenin duraklamasına çeşitli faktörler etki eder. Öncelikle besiyerinde besin maddelerinin derişimi azalmıştır. Bu durum popülasyonun iyice yavaş gelişmesine neden olur. Aerobik mikroorganizmalar oksijen yetersizliği ile ağır ve sınırlı bir gelişme gösterirler. Çünkü çözünürlüğü fazla olmayan oksijenin besiyerinde hızla tükenmesi gelişmeyi yavaşlatır. Ayrıca organizmaya ait bazı atık ürünler de üremeyi engelleyecek şekilde besiyerinde birikir. Bu durumda logaritmik üreme sona erer ve popülasyon durgun faza ulaşır. Statik kültürde sadece besiyerinin yüzeyindeki oksijen miktarı hâlâ yüzeydeki mikroorganizmaların gelişmesine olanak sağlayacak düzeydedir. (Madigan ve Martinko 2006, Waites vd 2001, Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Diğer taraftan metabolitler gelişmeyi engeller. En bilinen örneklerden birisi; *Lactococcus*'ların karbonhidrat kaynaklarını fermente ederek laktik asit ve diğer organik asitleri oluşturmaları ve geliştirdikleri asitlikle kendi gelişimlerini inhibe etmeleridir. Diğer birçok fermentasyon yapan anaerob bakteri de çeşitli toksik maddeler oluşturur. Statik kültürlerde metabolitlerin uzaklaştırılması mümkün olmadığından duyarlı hücreler ölürler. Ancak durma fazında hâlâ popülasyonun bir kısmı tarafından depo maddeleri kullanılarak, ribozomların bir bölümü parçalanmış olsa da, enzimler sentezlenmeye devam eder. Bu fazda olumsuz koşullara duyarlı hücreler hızla ölürken, daha dayanıklı olanlar depo maddelerini, proteinleri kullanarak endojen solunum 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 sabit kalır. Bu olgu "kriptik üreme" olarak adlandırılır

(Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Mikroorganizmaların sentezlendiği sekonder metabolitler endüstriyel açıdan önem taşır. Bu metabolitler özellikle küflerde beslenme ve gelişme fazı olan tropofazın sonuna doğru veya metabolit üretim fazı (durma fazı) olan idiofaz'ın başlangıcında birikmektedir. Bu metabolitlerden antibiyotikler; gerek fungusların gerekse bakterilerin oluşturduğu, sağlık üzerinde olumlu etkiye sahip tıp ve veterinerlikte hastalıkların tedavisinde kullanılan çok önemli bir madde grubudur. İdiofazda mikroorganizmalar artık gelişmeler de ilave edilen substratları katabolize ederek, biyosentez yollarının ön kademelerinde sentezlemiş oldukları ara metabolitleri son ürüne çevirebilir. Biyoteknolojik çalışmalarda sekonder metabolitlerin araştırılmasında idiofaz gelişme fazından daha fazla önem taşımaktadır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Durma fazında ulaşılan toplam bakteri kütlesi mahsul (hasılat, ürün, randıman) olarak tanımlanır. Mahsul üretilen bakterinin türüne, kullanılan besin maddelerine ve kültür koşullarına bağlı olarak değişik miktarlarda olabilmektedir. Bu evrede;

$$dx/dt = 0$$

$$\ln(x/x_0) = \text{Sabit} \quad (2.8)$$

Durağan fazda çoğu zaman  $x = x_{\max}$  olmaktadır.

#### 2.9.1.4. Ölüm fazı

Mikroorganizmanın içinde bulunduğu ortam, artık besin maddelerini içermiyor ve metabolik atıklar da yüksek derişimlere ulaşıyorsa o takdirde besiyeri zararlı bir çevreye dönüşmüştür. Bu fazda canlı hücre sayısında oldukça belirgin bir azalma meydana gelir. Hücrelerin bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki denge hücre ölümünün lehine bozulur. Eksponensiyel fazdaki gibi ölüm fazında da hücre sayısında logaritmik bir azalma olur. Bu fazda saptanan canlı hücre sayılarının logaritmik değerleri grafiğe taşındığında daha az eğimli bir doğrunun ölüm fazının karakteristiği olarak ortaya çıktığı görülür. Çoğu mikroorganizma logaritmik ölüm gösterse de popülasyonda belirgin bir düşüşten sonra ölüm hızının biraz yavaşladığı dikkat çekmektedir. Bunun nedeni bütün kötü koşullara karşın hâlâ ölümden kurtulabilen dirençli hücrelerin varlığıdır. Ölme fazının sonunda bile buradan taze besiyerine inokülasyon yolu ile kültürü, bu dirençli bakteriler sayesinde canlandırmak mümkündür. Ancak hiçbir üreme (gelişme) görülüyorsa popülasyonun tamamı ölmüş demektir (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009, Shuler ve Kargi 2008).

Bu evrede ölüm hızı;

$$- dx/dt = \mu_d x_{\max} \quad (2.9)$$

$\mu_d$  = Spesifik ölüm hızı

$x_{\max}$  = Durağan faz biyokütle konsantrasyonu

Mikrobiyel gelişme; ozmotik basınç, su aktivitesi ( $a_w$ ), sıcaklık, hidrojen iyonları konsantrasyonu (pH), oksijen konsantrasyonu, CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, basınç ve radyasyon gibi faktörlerden etkilenmektedir.

## 2.10. Etanol

Şekerlerin, lignoselülozik hidrolizatların ve nişastanın fermentasyonda kullanımı sonucu üretilen etanolün, insanların mikrobiyal proses ile ürettikleri ilk ürünlerden birisi olduğu düşünülmektedir (Simith 2004). Derin kültür fermentasyonu ile üretilen ve uzun yıllardan beri gıda ve diğer birçok endüstri dalında kullanılan etanol günümüzde çeşitli araçlarda petrol ürünlerine alternatif olarak da kullanılmaktadır. Etanol mikrobiyolojik olarak elde edilebileceği gibi kimyasal yolla da elde edilebilir. Dünya’da azalan enerji kaynaklarına alternatif olarak fermentasyonla üretilen etanol önem kazanmıştır. Birçok ülkede sakaroz ve nişasta gibi karbonhidratlardan etanol eldesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların en genel amacı etanolü üreterek otomobil yakıtı, etilen ve diğer petrokimyasalları elde etmektir (Çizelge 2.9). Son zamanlarda otomobil üreticileri etanol-benzin karışımının (85:15 v/v) bazı araçlarda kullanıldığını bildirmişlerdir. Dünya çapında biyoetanol üretimi 2000 yılında 17.25 milyar litre iken 2007 yılında 46 milyar litrenin üzerinde olmuştur. (Sun ve Cheng 2002, Brown 2003, Pimentel ve Patzek 2005, Balat 2007). Biyoetanolün en büyük üreticisi olan ABD, 2005-2006 yılında dünyadaki biyoetanol üretiminin yaklaşık %47’sini üretmiştir (Balat ve Balat 2009). Brezilya da ABD’den sonra biyoetanolün ikinci en büyük üreticisi ve dünyanın en büyük ihracatçısıdır. Otomobil yakıtının %40’ını etanolden karşılayan Brezilya, şeker kamışından ürettiği etanolün yaklaşık %20’sini ABD’ye, Avrupa’ya ve diğer ülkelere ihraç etmektedir. Etanol üretiminde hammadde olarak Batı Kanada’da buğday kullanılırken Doğu Kanada ve ABD’de mısır kullanılmaktadır. Ayrıca Çin, Hindistan, Japonya ve Endonezya gibi birçok Asya ülkeleri de etanol üretim kapasitelerini geliştirmektedir (Yang ve Lu 2007). Günümüzde uluslararası ticaret birliği yılda 1,6 milyon varil biyoetanol üretmekte ve 2015 yılına kadar da litre başına fiyatı 0.437\$ olan biyoetanol üretmeyi planlamaktadır.

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 nedenle dikkatleri üzerine çekmiş olan etanolün üretim miktarı yıldan yıla artmıştır. Dünyada gerçekleşen etanol üretim miktarları Çizelge 2.9’da verilmiştir.

Çizelge 2.9. Yıllara göre etanol üretim miktarları (Anonim 2014)

Ülkeler	Üretim Miktarı (Milyon Litre)				
	2009	2010	2011	2012	2013
USA	40121	51934	54508	52112	50341
Brezilya	24898	26200	21094	21109	23721
Avrupa Birliği	4955	4572	4417	4311	5189
Çin	2051	2051	2097	2101	2634
Kanada	1101	1351	1749	1699	1980
Toplam	73126	86108	83865	81332	83865

### 2.10.1. Etanolün özellikleri (fiziksel, kimyasal ve termal özellikler)

Etil alkol en iyi bilinen alkol olup bütün alkollü içeceklerin esas maddesidir. Alkoller olarak adlandırılan organik bileşikler sınıfının en önemli üyesidir. Etil alkol aynı zamanda alkol, etanol, tane (hububat) alkolü, fermentasyon alkolü, etil hidroksit ve metil karbinol olarak da adlandırılır. Etanol, doymuş bir hidrokarbon olan etanın (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) altı hidrojeninden herhangi birinin yerine bir hidroksil grubunun (OH) geçmesiyle oluşan yanıcı kimyasal bir maddedir. Etanolün bazı fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri Çizelge 2.10'de verilmiştir.

Etanol, saf halde berrak, renksiz, uçucu bir sıvıdır. Alevlenebilir, toksiktir, karakteristik tat ve kokuya sahiptir. Suda ve eter gibi pek çok organik çözücüde çözünür. 78.4°C'de kaynar ve -114°C'de erir. Özgül ağırlığı 20°C'de 0.7851g/mL'dir. En önemli sanayi organik maddesidir (Shuler ve Kargi 2008).

### 2.10.2. Etanol kullanımı

Etil alkol çözücü, ekstrakte edici, antifriz ve pek çok sayıda organik maddenin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılır. Aynı zamanda alkollü içkilerin asıl bileşenidir. Etil alkol çözümler, ekstrantlar, boyalar, farmosatikler, lubrikantlar, deterjanlar, pestisitler, yüzey kaplama maddeleri, kozmetikler, patlayıcı maddeler, sentetik liflerin yapılmasında kullanılan reçineler gibi diğer organik maddelerin sentezinde bir substrat olarak da kullanılır (Gilson vd 1995).

Çizelge 2.10. Etanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri (Acaroğlu vd 2004)

Fiziksel	Özgül Ağırlık	0.79 kg/dm <sup>3</sup>
	Buhar Basıncı (38°)	50 mmHg
	Kaynama Sıcaklığı	78.5°C
	Dielektrik Katsayısı	24.3
	Suda Çözünme	∞
Kimyasal	Formül	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
	Moleküler Ağırlık	46.1
	Karbon (wt)	%52.1
	Hidrojen (wt)	%13
	Oksijen (wt)	%34.7
	C/H Oranı	4
Sitokimometrik (Hava/ETOH)	9	
Termal	Alt Isıl Değeri (kcal/kg)	6.400
	Tutuşma Sıcaklığı (°C)	35
	Özgül Isı (kcal/kg°C)	0.6
	Erime Noktası (°C)	-114

Çok büyük miktarlarda bütadien üretimi için kullanılmaktadır ki, bunun stiren ile kopolimerizasyonu sentetik lastiği oluşturur. Ekonomik olmamakla birlikte Avrupa ve Amerika'da etil alkol-benzin karışımı motor yakıtı olarak kullanılmaktadır. Almanya'da gıda, alkollü içki ve ilaç gibi insanlar tarafından doğrudan veya dolaylı olarak tüketim söz

konusu olan ürünlerin üretiminde sentetik etil alkolün kullanılmasına izin verilmemektedir (Gilson vd 1995).

### 2.10.3. Etanol fermentasyonu

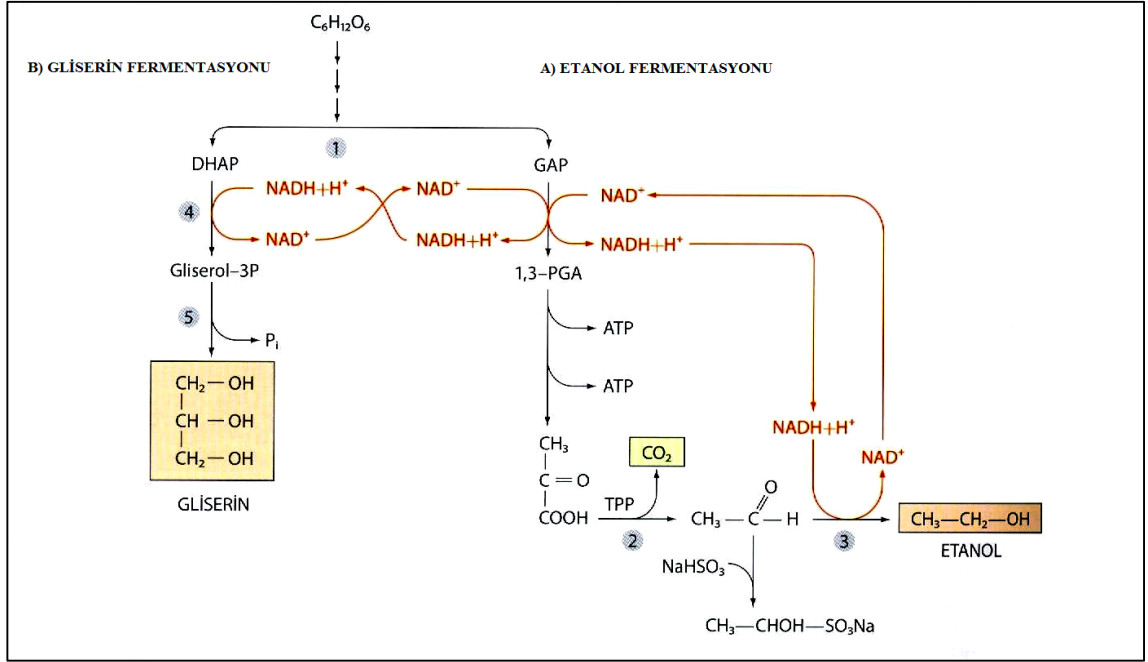
Birçok fungus, bakteri, alg ve *Protozoan* alkol fermentasyonu yapar. Mikroorganizmalar ile şekerler fermente edildiğinde en yaygın oluşan ürün etanoldür. Alkol fermentasyonu denildiğinde ilk akla gelen mikroorganizma grubu mayalar özellikle de *Saccharomyces cerevisiae*'dir (Tunail 2009). Hızlı ve etkili olarak şekerli alkol ve karbondioksit çevirebilme yeteneğine sahip olan bu mayanın süt, tahıl, meyve suyu gibi şekerli sıvıların fermentasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. *Saccharomyces* büyük miktarlardaki mevcudiyetinin yanında, çok yüksek bir metabolik hıza, daha hızlı büyüme oranına ve çok hızlı kimyasal değişiklikler meydana getirebilme yeteneğine sahiptir (Ejiofor 1994).

Mayalar da funguslar gibi aerob mikroorganizmalardır. Aerob koşulda oksijen ile aerob solunum yapan maya hücresi anaerobik koşulda fermentasyonla enerji kazanarak yaşamını sürdürür. Mayaların alkol fermentasyonu en kısa metabolik yollardan biridir. Heksozların glikoliz yolu ile pirüvata kadar parçalanmasından sonra iki reaksiyon basamağı ile CO<sub>2</sub> ve etanol meydana gelir (Şekil 2.7). Önce pirüvat, tiyamin pirofosfat (TPP) koenzimi ile birlikte çalışan pirüvat dekarboksilaz enzimi ile asetaldehit ve CO<sub>2</sub>'e parçalanır. Daha sonra alkoldehidrogenazın indirgemesi ile asetaldehitten etanol oluşur (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009). Mayalar diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında etil alkole oldukça dayanıklıdır. Fermentasyon hızı, şeker tüketimi, gelişme hızı ve hücre mevcudiyeti, etil alkolün maya yapısına zehirleyici etkisinde belirleyici olarak kullanılır (Ejiofor 1994). Teorik olarak, metabolize edilen glukozdan, verim açısından maksimum %51.1 etanol, %48.9 CO<sub>2</sub> üretilir.

Alkol üreten bakterilerin bir kısmı ana ürün olarak alkol oluştururken birçoğu da yan ürün olarak alkol üretmektedir. Ana ürün olarak etanol ve CO<sub>2</sub> oluşturan, yanında çok az miktarda laktat meydana getiren bakterilerden biri *Zymomonas mobilis*'tir. Bakteri alkol fermentasyonunda şekerleri 2-keto, 3-deoksi, 6-fosfoglukonat (KDPG) yolunu izleyerek katabolize eder. Pirüvatın etanole dönüşümü mayalardaki gibi pirüvat dekarboksilaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri ile katalize edilir (Tunail 2009).

Etanol üretimi için kesikli sistemler kullanıldığında maksimum miktarda biyokütle elde etmek için çalışma aerobik şartlarda başlar. Çünkü aneorobik şartlar sistemde erken oluşmakta bu da iyi dönüşüm oranı elde etmek için yeterli gelmemektedir. Bu nedenle verim kaybından kaçmak için kısa bir süre sisteme hava verilmesi gerekebilir. Sürekli proseslerde optimum küf gelişimi ve etanol üretimi belirli şeker konsantrasyonu sınırlarında gerçekleşmektedir (Brock 1984). Fermentasyon yoluyla etanol üretimi başlıca 3 yolla gerçekleştirilir. Bunlar; substratın hazırlanması, fermentasyon ve etanolün distilasyonudur.





Şekil 2.7. Glukozdan etil alkol üretim reaksiyonu (Tunail 2009)

Etanolün solvent olarak mayalarla üretimi de yaygındır. Etanol üretiminde substrat olarak; şeker sanayisi atığı melas veya patates kullanılabilir. Kâğıt fabrikalarında selüloz atığı olan sülfite likörü de alkol fermentasyonu için ideal bir substrattır. Ayrıca odun talaşlarından da hidrolize edilmeleri koşulu ile etanol üretilebilmektedir. Bununla beraber hidroliz sonucu oluşan şekerlerden yalnızca heksozlar, kültür mayalarının fermentasyonunda işe yarar. Pentozlar ise ikincil bir fermentasyonla *Endomyce lactis* ve yabancı *Torula* türleri kullanılarak tekrar fermente edilir (Tunail 2009).

Etanol üretiminde substratın hazırlanmasında nişasta içeren kökler, taneler, şeker kamışı, şeker pancarı, pirinç, işlenmiş ağaç ürünleri, atık kâğıtlar, ayçiçeği atık gıda ürünleri gibi (Çizelge 2.11) karbonhidrat kaynakları kullanılabilir (Sun ve Cheng 2002, Menon ve Rao 2012). Ayrıca peynir altı suyundan da etanol üretimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ancak endüstriyel kullanımı pek fazla yaygın değildir.

Fermentasyon; alkol, yoğurt, sirke, boza, turşu, ekmek, peynir gibi adı hemen akla gelen, gerçekte türü bunlarla sınırlı olmayan birçok gıda maddesi üretiminde uygulanan bir işlemdir. Genel anlamda fermentasyon; üretimi amaçlanan ürünün elde edilmesi için fermentasyonu gerçekleştirilecek, maya, bakteri veya mantar gibi mikroorganizmaların faaliyetine olanak sağlayan temel bir üretim aşamasıdır. Fermentasyon, üretilecek ürüne veya fermentasyonu yapan mikroorganizma türüne göre adlandırılır.

Çizelge 2.11. Etanol üretiminde kullanılan substratlar ve özellikleri

Karbonhidrat	Hammadde	Hidroliz ürünleri
Selüloz	Tarımsal atıklar	Glukoz
	Şehirsel atıklar	Mannoz
	Odun	Galaktoz
	Odun atıkları	Arabinoz, Ksiloz
Laktoz	Peynir altı suyu	Glukoz, Galaktoz
Nişasta	Kassava	Glukoz
	Mısır	Maltoz
	Patates	Dekstrin
	Sago	
Sakaroz	Şeker pancarı	Glukoz
	Şeker kamışı	Fruktoz
	Melas	

Biyolojik yolla etanol üretimi, daha çok tarımsal esaslı ürünlerden yapıldığı için, atmosferik karbon döngüsünü de arttırmaktadır. Etanol fermentasyonunda Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı ülkeler hammadde olarak çoğunlukla nişastalı tarım ürünleri ve selülozlu artıklardan yararlanırken ülkemizde bu amaçla genellikle melas ve kuru üzüm kullanılmaktadır. Bunların dışında patates, pancar, odun şekeri, sülfür şurubu, çeşitli meyveler ve peynir altı suyu da alkol üretiminde kullanılabilen önemli hammaddeler arasında yer almaktadır. Endüstriyel etanol üretimi açısından pancar ve kamış melaslarının bol bulunması ve ucuz hammaddeler olmaları nedeniyle daha avantajlı olduğu ve bu nedenle yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Sentetik olarak etilenden etanol üretimi mümkün olmasına rağmen özellikle gıda ve ilaç sanayinde fermentasyon ürünü alkol kullanma zorunluluğu vardır. Çünkü sentetik alkolde insan sağlığına zararlı yan ürünler, reaksiyona girmemiş çıkış maddesi ve safsızlıklar bulunabilir (Turhan 2009).

#### 2.10.4. Etanol fermentasyonu teknolojisi

Fermentasyon 1839 yılında da Alman kimyager Liebig tarafından mekanik bir parçalanma olarak tanımlanmıştır. Pasteur ise 1857 yılında fermentasyonun maya tarafından gerçekleştirilen fizyolojik ve biyolojik bir olay olduğunu ortaya koymuştur.



Yukarıdaki genel formüle göre 100 kg glukozdan 51.142 kg, 100 kg sakarozdan hidrolizle oluşan 2 molekül glukozdan 53.833 kg ( $\cong$ 67.834 litre) ve 100 kg nişastadan 56.824 kg ( $\cong$ 71.604 litre) %100' lük etanol olduğu teorik olarak hesaplanmıştır. Ancak kullanılan mikroorganizma, hammaddenin bileşimi ve fermentasyon koşullarının, fermentasyon sırasında oluşan yan ürünlerin çeşidi ve miktarı üzerinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Günümüzde bu teknoloji ile antibiyotik, vitamin, amino ve nükleik asitler ve biyogaz, etanol gibi yakıtlar üretilmektedir. Bunların dışında atık suların mikrobiyal yola arıtılması gibi işlemler de fermentasyon teknolojisinin başka uygulamalarındandır (Shuler ve Kargi 2008).

## 2.11. Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu

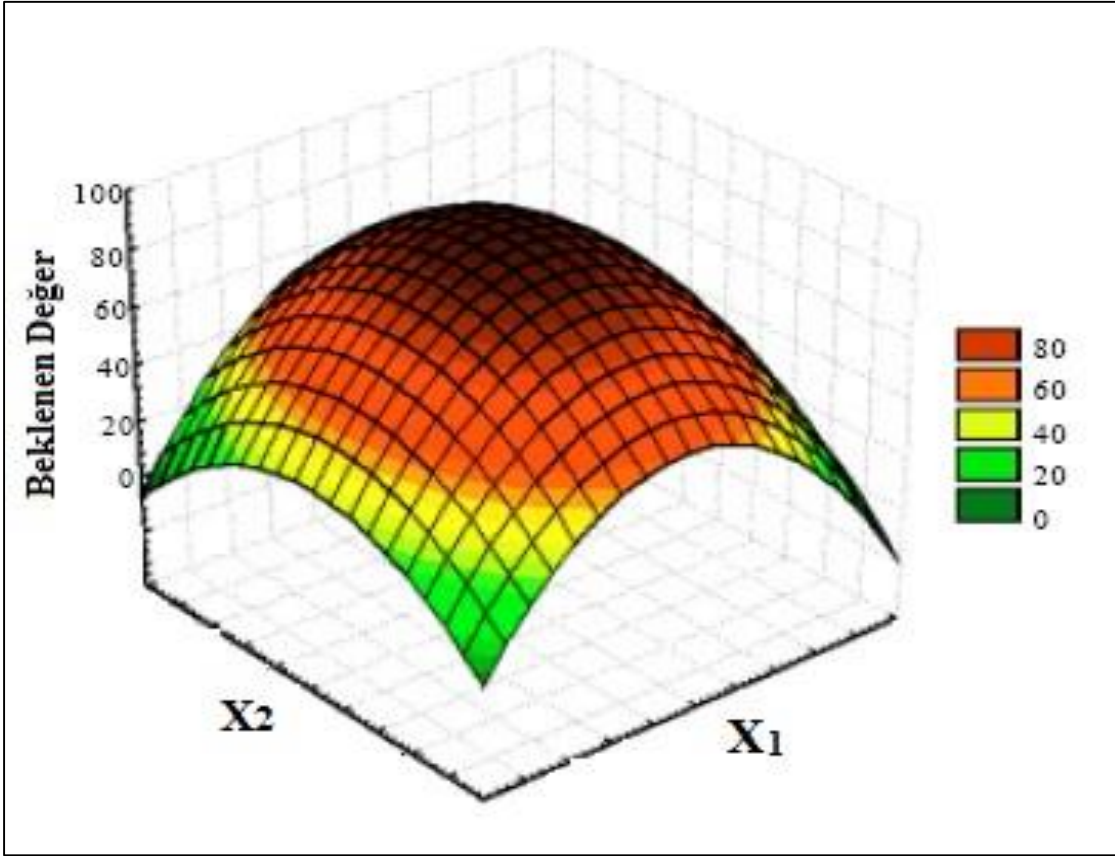
Deneysel çalışmaların sınırlı ya da imkânsız olduğu, pratik ve ekonomik olarak çok sayıda deneyin yapılamadığı durumlarda matematiksel modellemelerden büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Bir matematiksel modelin geliştirilmesinde sırasıyla şu işlemler gerçekleştirilmelidir (Devres ve Pala 1993).

- ✚ Problemin belirlenmesi
- ✚ Matematiksel modelin geliştirilmesi
- ✚ Modelin çözünebilirliğinin sağlanması
- ✚ Modelin çözümü
- ✚ Modelin kanıtlanması
- ✚ Çözümün uygulanması

Cevap Yüzey Metodu (CYM), proseslerin oluşturulmasında, geliştirilmesinde ve optimize edilmesinde istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı 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 (Myers vd 2009).

Bu metotta ilk olarak regresyon analizi yardımıyla bir model oluşturulur. Öncelikle sistemi karakterize edebilecek performans ölçütleri (cevaplar) ve bunlar üzerinde etkili olabilecek faktörlerin veya değişkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Oluşturulacak deneme düzenlerinde, regresyon modelleri meydana getirilirken bu iki kıstas baz alınarak oluşturulur. Önemli değişkenler ve deneme bölgesi belirlendikten sonra, bağımsız değişkenlerin deneme bölgesi içerisinde belirlenen seviyelerinin sisteminde, oluşan cevap değerlerinin optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlenmektedir. Optimum noktaya yaklaştıkça, oluşturulan cevap yüzeyindeki eğrilik doğal olarak daha belirgin hale gelmektedir (Myers vd 2009).

Cevap yüzey metodundan faydalanılarak az sayıda deneysel çalışma gerçekleştirilmekte ve gerçekte test edilmeyen faktör değerleri ve bunlardan sağlanan kombinasyon değerleri hakkında tahminler yapılabilmektedir. Cevap yüzey metodunu daha rahat görmek için sabit bağımlı değişkenin doğruları  $X_1$ ,  $X_2$  ekseninde çizilir ve kontur plot (contour plot) adı verilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Cevap yüzey metodu kontur plot grafiği

Böylelikle  $X_1$  ve  $X_2$ 'nin cevap yüzeyinde meydana getirdiği değişiklik kolaylıkla anlaşılabilir. Bir ya da daha fazla ölçülebilen değişkenle girdi değişkenleri arasındaki regresyon modelinin deneysel olarak tanımlanması ve bu modele göre bağımsız değişkenin maksimum ve minimum seviyeleri arasında bağımlı değişkenin cevap yüzey incelenmesine dayanır (Kuehl 2000).

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 3 faktörlü deneme deseninde öncelikle A faktörünün düzeyi sabitlenmiş B ve C faktörlerinin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanmış ve daha sonra aynı işlemler sırasıyla B ve C faktörlerinin düzeyleri merkezde sabitlenerek uygulanmıştır. Düzen matrisinin 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 3 faktörlü 3 parametrelili bir deneme deseni oluşturulduğunda 27 deneme (tekerrür ile beraber 54 deneme) gerçekleştirilmesi gerekirken Box-Behnken cevap yüzey metodunda 3 faktörlü 3 parametrelili bir deneme

deseni için merkez noktası 3 defa tekrarlandığında 15 deneme (tekerrürü ile beraber 30 deneme) yapılmaktadır. Box-Behnken deseninin kullanılması ile daha az deneme ile çalışma gerçekleştirildiğinden hem zaman açısından kazanım hem de maliyet açısından kâr elde edilmektedir.

Box-Behnken deneme deseni sonuçlarının değerlendirilmesinde regresyon analizi ve varyans analizinden yararlanılmaktadır. Ayrıca sonuçların sabit bağımlı değişkenlere karşı grafik edilmesi sonucunda kontur 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 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.

Görüldüğü gibi cevap yüzey metotları, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin cevabını ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin cevabında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir. Dolayısıyla denemelerin dizayn edilmesi, model geliştirilmesi (regresyon analizi), varyans analizi (Anova) ve optimizasyon, cevap yüzey metodunun başlıca kısımlarını oluşturmaktadır (Eren 2004). Bunların yanında cevap yüzey metotları; faktörlerin kurulumunda en iyi sonuçları belirlemek, faktör kurulumundaki memnun edici proses veya proses şartlarını bulmak, mevcut şartlardaki kalitenin üzerinde sonuçlar elde edebilmek için yeni proses şartları belirlemek ve kantitatif faktörler ve sonuçlar arasındaki ilişkili modeli ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır (Sablani vd 2006).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Etanol üretiminde kullanılan keçiyoynuzu meyvesi

Proje kapsamında kullanılacak kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiyoynuzu meyvesi (Ek-1), Antalya’da keçiyoynuzu meyvesini ve işlenmiş ürünleri ihraç eden Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. ve Saimoğlu Ticaret A.Ş.’den sağlanmıştır. Bu amaçla elde edilen keçiyoynuzu meyvesi analiz anına kadar +4°C’lik soğuk depolarda saklanmıştır.

##### 3.1.2. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizma

Bu çalışmada, biyofilm reaktörde etanol üretmek amacıyla *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36858) mayası kullanılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36858) mayasının besiyeri bileşenleri Çizelge 3.1’de verilmiştir (Turhan vd 2010a).

Çizelge 3.1. *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36858) için gerekli besiyeri bileşimi\* (Turhan vd 2010)

Medya İçeriği	Miktar (g/L)
Glukoz**	50
Yeast Ekstrakt	6
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,3
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	1
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5
Amonyum sülfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4

\*Besiyeri bileşiminin aynısı (glukoz hariç) keçiyoynuzu için de kullanılmıştır.

\*\* Karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu kullanılmıştır.

Çizelge 3.1’de verilen besiyeri içeriğinde *Saccharomyces cerevisiae* mayası 30°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra +4°C’de muhafaza edilmiştir. Stok kültürler her ay yenilenerek muhafaza edilmiş ve uzun süreli kullanmama durumunda %20’lik gliserol çözeltisi içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.3. Biyofilm oluşumunu gerçekleştirmek için kullanılan plastik kompozit destek materyali

Biyofilm oluşumunu gerçekleştirmek amacıyla farklı bileşenlerden oluşan dört farklı Plastik Kompozit Destek (PKD) materyali, tekrarlanan-kesikli fermentasyon (repeated-batch fermentation) yöntemiyle biyofilm reaktörde keçiyoynuzu ekstraktından etanol üretmek amacıyla kullanılmıştır. Biyofilm reaktörde kullanılan Plastik Kompozit Destek materyalleri (PKD) The Pennsylvania State University’de görev yapan Prof. Dr. Ali Demirci’nin laboratuvarından temin edilmiştir. PKD materyalinin bileşenleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Plastik kompozit destek materyallerinin bileşenleri (Demirci vd 1997).

PKD	Bileşenler (w/w)	Mineral Tuzlar
SH <sup>a</sup> -SF <sup>b</sup> -YE <sup>c</sup>	%5 soya fasulyesi unu <sup>b</sup> -%5 maya ekstraktı	+
SH-SF-YE-BA <sup>d</sup>	%5 soya fasulyesi unu-%5 maya ekstraktı- %5 sığır albümini	+
SH-SF	%10 soya fasulyesi unu	+
SH-SF-YE-RBC <sup>e</sup>	%5 soya fasulyesi unu-%5 maya ekstraktı- %5 kırmızı kan hücreleri	+

**a:** Soya fasulyesi kabuğu **b:** Vakum altında kurutulmuş soya fasulyesi unu, **c:** Maya ekstraktı, **d:** Sığır albümini, **e:** Kırmızı kan hücreleri

### 3.1.4. Fermentasyonda kullanılan biyofilm reaktör

Etanol üretimini gerçekleştirmek amacıyla laboratuvar tipi; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen kontrolü ve köpük kontrolü yapabilen, karıştırma özelliğine sahip biyofilm reaktör (Sartorius stedim Biostat B Plus, Germany) (Şekil 3.1) kullanılmıştır. Proje kapsamındaki bütün denemeler 3 L çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Sartorius stedim Biostat B Plus Biyoreaktör ve biyofilm materyali

### 3.1.5. Etanol üretimi için deneme deseni oluşturma

Bu tez kapsamında; keçiboynuzu ekstraktından biyofilm reaktörde etanol üretmek amacıyla gerçekleştirilen deneme deseni aşağıdaki gibidir.

- Dört farklı PKD materyali arasından uygun olanının seçilmesi
- Seçilen PKD materyali kullanılarak oluşturulan biyofilm reaktörde Cevap Yüzey Metodunun belirlemiş olduğu koşullarda optimizasyon
- Belirlenen optimum koşullarda azot kaynaklarının besiyerinde kullanımı; bu amaçla azot kaynaklarının kullanılmadığı (maya ekstraktı ve amonyum sülfat içermeyen), sadece maya ekstraktının kullanıldığı veya sadece amonyum sülfatın kullanıldığı

- d) Optimum koşullarda kontrol amaçlı zenginleştirilmemiş besiyeri kullanımı
- e) Optimum koşullarda sterilize edilmemiş zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş besiyeri kullanımı

### 3.1.6. Cevap yüzey metodu (response surface method)

Biyofilm reaktörde keçiyoynuzu ekstraktından etanol üretiminin optimum koşullarını belirlemek amacıyla kullanılan tekrarlanan-kesikli fermentasyon işleminin şartlarını optimize etmek ve değişken parametrelerden bir veya daha fazlasının aralarındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu kullanılmıştır. Bu metodun faktöriyel düzendeki deneme desenine karşı (3 faktör × 3 seviye × 3 Tekerrür = 27), örnek ve tekerrür sayısının azalması (3 faktörlü 3 seviye = 12 köşe ve 3 merkez nokta tekrarı olmak üzere toplam 15 fermentasyon) gibi avantajları vardır. Bu amaçla Minitab (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) istatistik programı ile literatürde minimum, orta ve maksimum noktaları verilen parametrelerin kullanılmasıyla biyofilm reaktörde tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemi kullanılarak optimum etanol üretim koşulları çalışılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Box-Behnken cevap yüzey metodu için etanol üretimi parametreleri

<b>Değişken</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
Başlangıç Şeker İçeriği (°Bx)	4	10
Besiyerinde pH Değeri	5.0	6.0
Karıştırma Hızı (rpm)	100	200

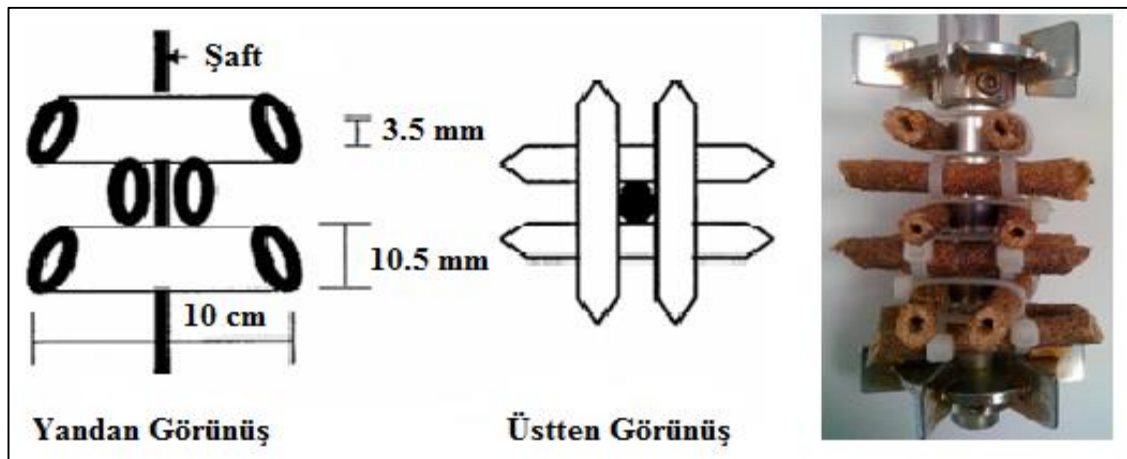
Yukarıdaki çizelgede etanol üretimi için belirlenmiş olan parametrelere göre Cevap Yüzey Metodunun belirlemiş olduğu şartlar Çizelge 3.4'te verilmiştir. Bu çizelgede belirlenmiş olan koşullara göre keçiyoynuzu ekstraktından tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemi ile biyofilm reaktörde etanol üretimleri gerçekleştirilmiştir.



Çizelge 3.4. Etanol üretimine ait cevap yüzey metodunun oluşturduğu fermentasyon koşulları

Başlangıç Şeker İçeriği (°Bx)	Besiyerinde pH Değeri	Karıştırma Hızı (rpm)
7	5.0	100
7	5.5	150
10	5.5	100
4	6.0	150
4	5.5	100
10	5.0	150
4	5.0	150
4	5.5	200
7	5.5	150
7	6.0	200
10	6.0	150
7	6.0	100
7	5.5	150
10	5.5	200
7	5.0	200

Biyofilm reaktörü oluşturmak amacıyla reaktörün şaftına belirlenmiş olan PKD materyali Şekil 3.2'deki gibi bağlanmıştır. Daha sonra PKD materyali su içerisinde 121°C'de 30 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra peristaltik pompa vasıtası ile su aseptik olarak boşaltılmış ve yine peristaltik pompa vasıtası ile taze steril besiyeri aseptik olarak eklenmiştir. 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyeri aseptik olarak boşaltılmış ve tekrar taze steril besiyeri eklenerek Çizelge 3.4'e göre fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonu başlatmadan önce alınan başlangıç örneğinin yanı sıra fermentasyon başladıktan sonra 0, 2, 4, 8, 12, 24, 30 ve 36. saatlerde örnek alınmıştır. Örneklere kalıntı şeker analizi, etanol analizi ve biyokütle analizi yapılmıştır (Bölüm 3.2).



Şekil 3.2. Karıştırıcı şaftın üzerine PKD materyallerinin bağlanması (Muffler vd 2014)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Fermentasyon ortamı için gerekli ekstraktın elde edilmesi

Keçiboynuzu meyvesinden tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretiminde fermentasyon 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 uzaklaştırıldıktan ve cevap yüzey metodunda belirtilen başlangıç şeker içeriğine (4, 7, 10°Bx) ayarlandıktan sonra doğrudan ve/veya zenginleştirilerek fermentasyonda kullanılmıştır.

### 3.2.2. Biyofilm destek materyalinin belirlenmesi

PKD halkaları (2.9 g) (Çizelge 3.2) 23 X 80 mm vida kapaklı kültür tüplerine yerleştirilmiş ve 121°C'de 30 dakika su içerisinde (yüzey sterilizasyonu sağlamak için) sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Soğuduktan sonra içerideki su aseptik olarak boşaltılmış ve üzerine yine aseptik koşullarda taze steril besiyeri eklenmiştir. Tüpler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve daha sonra PKD halkalarından kopan parçalar aseptik bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Tüplere 10 ml taze steril besiyeri ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılan *S. cerevisiae* mayasının süspanse kültüründen 0.1 ml (%1) inokülasyon yapılarak 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her gün kültür besiyeri aseptik olarak boşaltılmış ve yerine 10 ml taze steril besiyeri ilave edilmiştir. Bu işlem mikroorganizmaların yüzeye tutunması için 7 kez tekrarlanmıştır. 8. transfer ile birlikte 30°C'de 40 saat fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sırasında belirlenen saatlerde alınan örneklerde, harcanan kültür besiyerindeki etanol miktarı, biyokütle miktarı ve kalıntı şeker miktarı analiz edilmiştir (Demirci vd 1997). Biyofilm materyali belirleme işlemi sırasında çekilen fotoğraflar Ek-3'te gösterilmiştir.

### 3.2.3. Şeker analizi

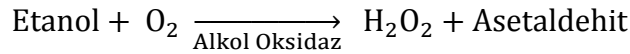
Reaktörden alınan tüm fermentasyon örneklerinin kalıntı şeker analizi, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) metoduna göre yapılmıştır (Miller, 1959). DNSA metodu ile şeker analizinde kullanılan DNSA çözeltisi; 10 g/L NaOH, 10 g/L 3,5-dinitrosalisilik asit ve 0,5 g/L sodyum sülfid saf suda çözülmüş ve üzeri 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Ayrıca Rachelle tuz çözeltisi (potasyum sodyum tartarat çözeltisi) de litreye 400 g potasyum sodyum tartarat tartılarak saf suda çözülmüş ve üzeri 1 L'ye tamamlanmıştır.

Kalıntı şeker analizinde, 0.1 ml örnek üzerine 3.9 ml saf su eklenmiş ve 0.08 ml 12M HCl eklenerek karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilmiş ve hidroliz edilmiştir. Bu noktada tüp içerisindeki örneklerin hidroliz sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir. Bu amaçla içerisinde saf su bulunan boş bir tüp ve termometre kullanılarak tüp içi sıcaklığın 90°C'ye kadar gelmesi beklenmiş ve 5 dakikalık süre başlatılmıştır. Daha sonra hidrolizat üzerine 0.2 ml 5N KOH eklenerek karıştırıldıktan sonra yeni bir tüpe 3 ml aktarılmış ve üzerine 3 ml DNSA solüsyonu eklenmiştir. Bu aşamada 3 ml saf su üzerine 3 ml DNSA eklenerek kör olarak kullanılmak üzere

hazırlanmıştır. Solüsyon karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilip üzerine renk stabilizasyonunu sağlamak için 1 ml %40'lık potasyum sodyum tartarat eklenerek soğutulmuş ve 575 nm dalga boyunda okutularak standart sakaroz çözeltisi ile hazırlanmış kurveden (Ek-2) şeker miktarı hesaplanmıştır.

### 3.2.4. Etanol analizi

Fermentasyon ortamından alınan örneklerde etanol miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (Yellow Springs, Ohio, USA) kullanılmıştır. Bu sistemin ana prensibi, örnek alındığında cihazdaki (analiz edilecek örneğe uygun seçilen) enzim, örnekle reaksiyona girerek elektrokimyasal probun platinyum anodunu okside eder. Bunun sonucunda hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) açığa çıkar ve oluşan sinyale göre etanol konsantrasyonunu belirlenmektedir.



Analiz kapsamında fermentasyondan alınan örnekler cihazın okuma aralığına göre seyreltildikten sonra kalibre edilmiş cihazda okumalar paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın çalışma koşulları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. YSI 2700 select cihazının çalışma koşulları

Enjeksiyon miktarı	25 µL
Kalibrasyon metodu	Tekli kalibrasyon
Kalibrasyon standardı konsantrasyonu	2.00 g/L
Analiz süresi	60 sn
Oto kalibrasyon süresi	20 örnek
Kalibrasyon istasyonu	2

### 3.2.5. Biyokütle analizi

Reaktörden belirtilen zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek amacıyla canlı hücre miktarı analiz edilmiştir. Bu amaçla örneklerden 0.5 ml alınarak üzerine 4.5 ml saf su eklenip 10 kat seyrelttikten sonra kör olarak inoküle edilmemiş örnek kullanılmış ve 620 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer; Şangay, Çin) ölçülen absorbans değerine göre *S. cerevisiae* canlı miktarı hesaplanmıştır (Turhan vd 2010a).

### 3.2.6. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Biyofilm reaktörden alınan örneklerde şeker, biyokütle miktarı, etanol miktarı analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- Şeker tüketimi (g/L)
- Etanol üretimi (g/L)
- Verim (%)
- Maksimum tüketim hızı (g/L/h)

- Maksimum üretim hızı (g/L/h)
- Maksimum gelişme hızı (g/L/h)
- Spesifik gelişim hızı (1/h)
- Canlı hücre sayısının ikiye katlanma süresi (Doubling time) (saat)
- Şeker kullanım oranı (%)

kinetik parametreleri hesaplanmıştır.

Hesaplamalar substrat (S) ve ürün (P) olmak üzere aşağıdaki denklemlerden yararlanılarak hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).

Gelişmenin sonunda şeker tüketimi;  $S = S_0 - S_1$  olup g/L olarak ifade edilmiştir.

Burada;

S = Mikroorganizma tarafından tüketilen şeker miktarı, g/L

$S_0$  = Başlangıç şeker miktarı, g/L

$S_1$  = Besiyerinde kalan minimum şeker miktarı, g/L

Gelişmenin sonunda ürün miktarı;  $P = P_1 - P_0$  olup g/L olarak hesaplanmıştır.

Burada;

P = Mikroorganizma tarafından üretilen etanol miktarı, g/L

$P_0$  = İnokülasyondan hemen sonra alınan fermentasyon sıvısındaki etanol miktarı, g/L

$P_1$  = Mikroorganizma tarafından üretilen maksimum etanol miktarı, g/L

Ürün verimi % olarak;

$$\text{Verim } (Y_{P/S}) = \frac{\text{Etanol Miktarı (g/L)}}{\text{Şeker Tüketimi (g/L)}} \times 100$$

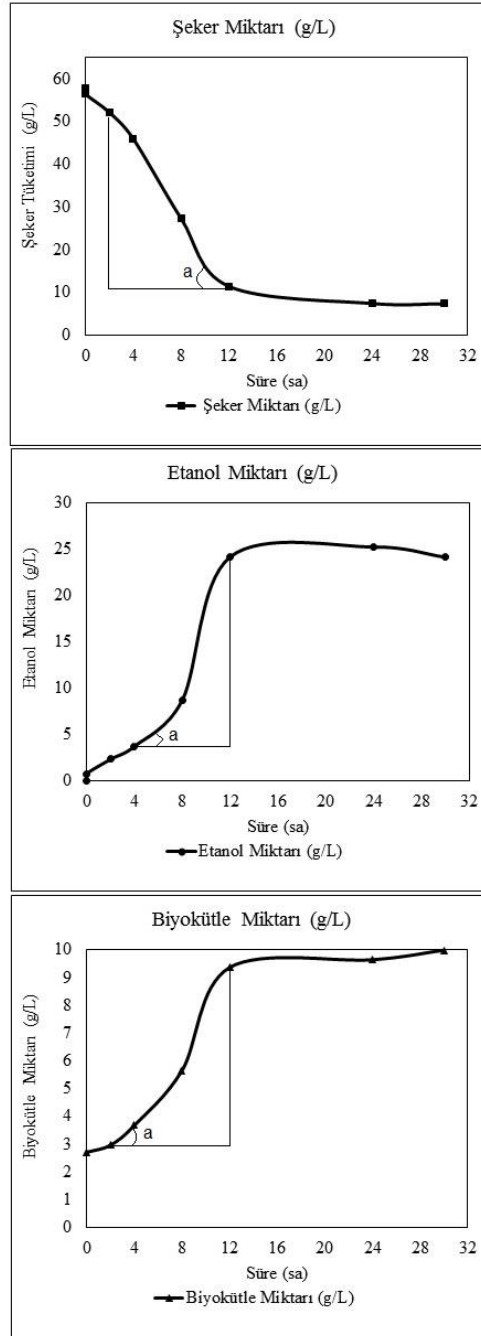
eşitliğinden faydalanılarak hesaplanmıştır.

Logaritmik fazda gerçekleşen şeker tüketimine, etanol üretimine ve biyokütle gelişimine ait grafikten maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve maksimum gelişim hızı hesaplamalarında grafiklerinin en dik kısmının eğimi alınmıştır.

3.3) Maksimum tüketim hızı (g/L/h) = Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi (Şekil 3.3)

3.3) Maksimum üretim hızı (g/L/h) = Etanol kurvesinin en dik kısmının eğimi (Şekil 3.3)

3.3) Maksimum gelişim hızı (g/L/h) = Gelişim kurvesinin en dik kısmının eğimi (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. Maksimum şeker tüketim hızı, maksimum etanol üretim hızı ve maksimum biyokütle gelişim hızının hesaplanması

Spesifik gelişim hızı ( $1/h$ ) = Gelişim kurvesi değerlerinin Ln'i alınmış ve kurvenin en dik kısmının eğimi olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı hücre sayısının ikiye katlanma süresi (h)} = \frac{\text{Ln (2)}}{\text{Spesifik Gelişim Hızı}}$$

$$\text{Şeker kullanım oranı (\%)} = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \times 100$$

### 3.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

Etanol üretiminde kullanılan deneme deseni ve istatistiksel analizinde Minitab İstatistiksel Yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) kullanılmıştır. Program tarafından oluşturulan modelin deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı varyans analizi ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güvenlik seviyesinde tespit edilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Etanol Fermentasyonunda Kullanılan Biyofilm Materyalinin Belirlenmesi

Keçiboynuzu ekstraktından tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretmek amacıyla biyofilm materyalinin belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla biyofilm oluşumunu veya *Saccharomyces cerevisiae* mayasının materyal yüzeyine tutunmasını sağlamak amacıyla farklı Plastik Kompozit Destek materyalleri (PKD) kullanılmıştır.

#### 4.1.1. SH-SF-YE-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı

Biyofilm materyali olarak SH-SF-YE-SALTS kullanılması ile fermentasyon ortamından alınan örneklerle ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği Çizelge 4.1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre şeker seviyesi 8. saatte 7.431 g/L’ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde de çok az farklılıklarla değişimler gerçekleşmiştir. Şeker miktarının çok kısa bir sürede tamamına yakınının kullanılmasının nedeninin ortamdaki hücre yoğunluğun fazla olması olduğu düşünülmüştür. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 27.11 g/L etanol üretimi gerçekleşmiş ve ilerleyen saatlerde fazla bir değişiklik olmadan fermentasyon devam etmiştir. En yüksek etanol üretimi fermentasyonun 39. saatinde 27.829 g/L olarak gerçekleşmiştir. Fermentasyonda 5.182 g/L şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. SH-SF-YE-SALTS materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)
B	57.180 <sup>a</sup> ±0.630	0.000 <sup>g</sup> ±0.000
0	51.608 <sup>b</sup> ±0.731	3.824 <sup>f</sup> ±0.070
2	35.565 <sup>c</sup> ±0.215	8.409 <sup>e</sup> ±0.265
4	19.578 <sup>d</sup> ±0.444	19.232 <sup>d</sup> ±0.205
8	7.431 <sup>e</sup> ±0.444	27.110 <sup>b</sup> ±0.050
15	7.044 <sup>e</sup> ±0.257	25.958 <sup>c</sup> ±0.150
27	5.182 <sup>f</sup> ±0.344	27.502 <sup>ab</sup> ±0.065
39	6.901 <sup>e</sup> ±0.573	27.829 <sup>a</sup> ±0.235

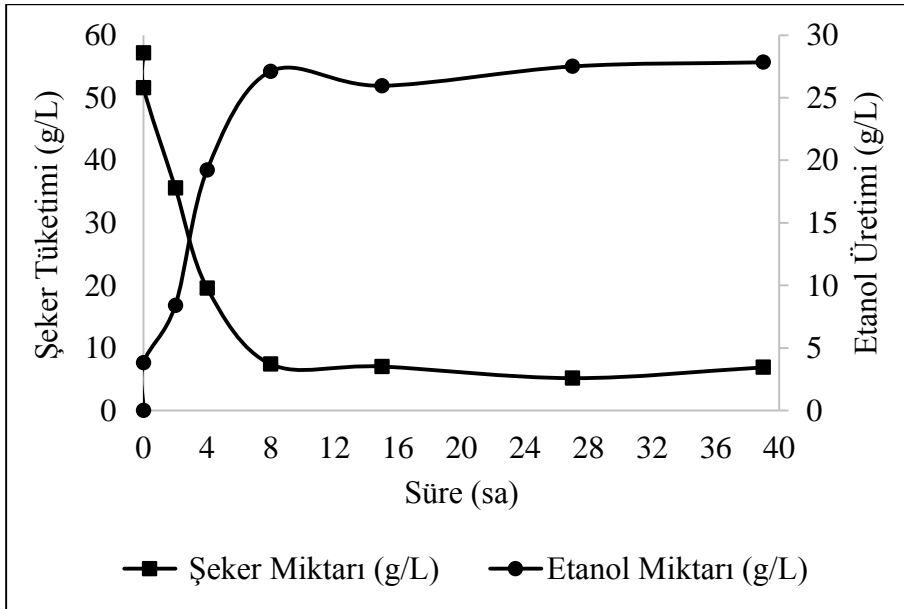
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

Bölüm 3.2.2’de belirlenen yöntemle göre gerçekleştirilen fermentasyon denemesine ait kinetik parametreler Çizelge 4.2’de verilmiştir. Kinetik parametrelerden verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %46.167, 5.450 g/L/h, 3.018 g/L/h ve %90.937 olarak belirlenmiştir. Ayrıca fermentasyon sırasında 51.998 g/L şeker kullanılmış ve şeker tüketimine bağlı olarak 24.006 g/L etanol üretilmiştir.

Çizelge 4.2. SH-SF-YE-SALTS materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	51.998	g/L
Etanol Üretimi	24.006	g/L
Verim	46.167	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt)max	5.450	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt)max	3.018	g/L/h
Şeker Kullanım Oranı	90.937	%

Fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker ve etanol miktarındaki değişim Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. SH-SF-YE-SALTS kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği

#### 4.1.2. SH-SF-YE-BA-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı

SH-SF-YE-BA-SALTS bileşenlerinden oluşan biyofilm materyalinin kullanılması ile gerçekleştirilen fermentasyon ortamından alınan örnekler için şeker tüketimi ve etanol üretimindeki zamana bağlı değişim Çizelge 4.3’te verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında şeker seviyesi 8. saatte 7.89 g/L’ye kadar düşmüştür, ilerleyen saatlerde 5.039 g/L’ye kadar düştüğü belirlenmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 26.019 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir ve ilerleyen saatlerde fazla bir değişiklik olmadan fermentasyon devam etmiştir. Fermentasyonda 5.039 g/L şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı belirlenmiştir. En yüksek etanol üretimi fermentasyonun 39. saatinde 28.191 g/L olarak gerçekleşmiştir.



Çizelge 4.3. SH-SF-YE-BA-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)
B	57.180 <sup>a</sup> ±1.125	0.000 <sup>g</sup> ±0.000
0	51.665 <sup>b</sup> ±0.759	3.846 <sup>f</sup> ±0.015
2	37.255 <sup>c</sup> ±0.358	7.294 <sup>e</sup> ±0.130
4	20.366 <sup>d</sup> ±0.057	18.607 <sup>d</sup> ±0.013
8	7.890 <sup>e</sup> ±0.329	26.019 <sup>c</sup> ±0.005
15	5.856 <sup>f</sup> ±0.187	27.524 <sup>b</sup> ±0.133
27	5.039 <sup>f</sup> ±0.172	27.452 <sup>b</sup> ±0.159
39	5.970 <sup>f</sup> ±0.272	28.191 <sup>a</sup> ±0.052

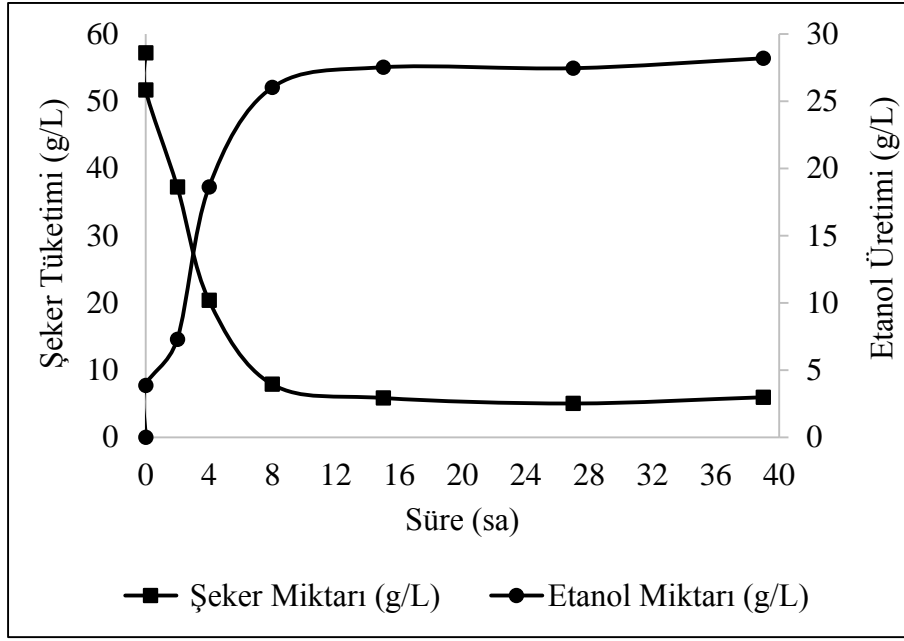
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

SH-SF-YE-BA-SALTS biyofilm materyali ile gerçekleştirilen etanol fermentasyonu denemesine ait kinetik parametreler Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Kinetik parametrelerden verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %46.69, 5.4578 g/L/h, 2.914 g/L/h ve %91.187 olarak belirlenmiştir. Ayrıca fermentasyon sırasında 52.141 g/L şeker tüketilmiş ve 24.345 g/L etanol üretilmiştir.

Çizelge 4.4. SH-SF-YE-BA-SALTS kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	52.141	g/L
Etanol Üretimi	24.345	g/L
Verim	46.690	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt)max	5.4578	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt)max	2.914	g/L/h
Şeker Kullanım Oranı	91.187	%

Fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker ve etanol miktarındaki değişimler Şekil 4.2'de verilmiştir. Şeker miktarının 8. saatte tamamına yakınının kullanılmasına neden olan etkenin ortamdaki hücre yoğunluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.2. SH-SF-YE-BA-SALTS kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği

#### 4.1.3. SH-SF-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı

Vida kapaklı kültür tüplerinde SH-SF-SALTS bileşenlerinden oluşan biyofilm materyalinin kullanılması ile gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimine ait elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Çizelge 4.5'e göre şeker seviyesi 8. saatte 8,821 g/L'ye kadar düşmüş, fermentasyonun 27. saatinde en düşük miktar olan 5.254 g/L'ye kadar düştüğü belirlenmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 26.37 g/L etanol üretimi gerçekleşmiş ve ilerleyen saatlerde bariz bir değişiklik olmadan fermentasyon sonlandırılmıştır. Fermentasyonda 5.254 g/L şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı saptanmıştır. En yüksek etanol üretimi, şeker seviyesinin minimum olduğu 27. saatte 27.234 g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. SH-SF-SALTS PKD materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)
B	57.180 <sup>a</sup> ±1.125	0.000 <sup>f</sup> ±0.000
0	51.293 <sup>b</sup> ±1.361	4.236 <sup>e</sup> ±0.075
2	36.023 <sup>c</sup> ±0.759	8.043 <sup>d</sup> ±0.149
4	21.498 <sup>d</sup> ±0.415	17.781 <sup>c</sup> ±0.076
8	8.821 <sup>e</sup> ±0.258	26.370 <sup>b</sup> ±0.251
15	6.099 <sup>f</sup> ±0.344	27.104 <sup>a</sup> ±0.287
27	5.254 <sup>f</sup> ±0.014	27.234 <sup>a</sup> ±0.367
39	6.042 <sup>f</sup> ±0.344	27.093 <sup>a</sup> ±0.106

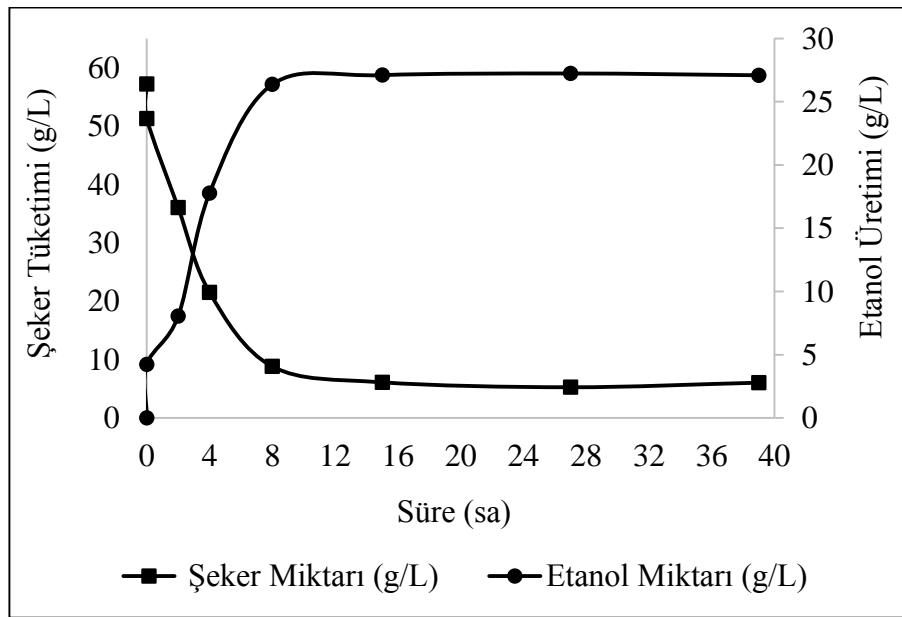
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ )

SH-SF-SALTS biyofilm materyali ile gerçekleştirilen fermentasyon denemesine ait kinetik parametreler Çizelge 4.6’da verilmiştir. Kinetik parametrelerden verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %44.291, 5.232 g/L/h, 2.876 g/L/h ve %90.811 olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber fermentasyonun sonunda 51.926 g/L şeker mayalar tarafından etanol üretiminde kullanılmış ve 22.999 g/L etanol üretilmiştir.

Çizelge 4.6. SH-SF-SALTS PKD materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

<b>Kinetik Parametreler</b>	<b>Değer</b>	<b>Birim</b>
Şeker Tüketimi	51.926	g/L
Etanol Üretimi	22.999	g/L
Verim	44.291	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt)max	5.232	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt)max	2.876	g/L/h
Şeker Kullanım Oranı	90.811	%

Fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker ve etanol miktarındaki değişimler Şekil 4.3’te sunulmuştur.



Şekil 4.3. SH-SF-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği

#### 4.1.4. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyalinin kullanımı

Biyofilm materyali belirlemede kullanılan bir diğer PKD materyali SH-SF-YE-RBC-SALTS bileşenlerinden oluşmaktadır. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimindeki zamana göre değişim Çizelge 4.7’de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre şeker seviyesi

8. saatte 9.394 g/L'ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde 5.068 g/L'ye kadar düştüğü belirlenmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak 8. saatte 24.829 g/L etanol üretimi gerçekleşmiş ve ilerleyen saatlerde bariz bir değişiklik olmadan fermentasyon sonlandırılmıştır. Fermentasyonda 5.068 g/L şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı belirlenmiştir. SH-SF-YE-RBC-SALTS destek materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonun sonucunda en yüksek etanol üretimi fermentasyonun 39. saatinde 27.686 g/L olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi ve etanol üretimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)
B	57.180 <sup>a</sup> ±1.125	0.000 <sup>b</sup> ±0.000
0	51.049 <sup>b</sup> ±0.343	4.394 <sup>g</sup> ±0.012
2	34.533 <sup>c</sup> ±0.071	8.448 <sup>f</sup> ±0.059
4	16.069 <sup>d</sup> ±0.344	21.163 <sup>e</sup> ±0.168
8	9.394 <sup>e</sup> ±0.229	24.829 <sup>d</sup> ±0.213
15	6.514 <sup>f</sup> ±0.014	26.084 <sup>c</sup> ±0.253
27	5.068 <sup>f</sup> ±0.058	27.054 <sup>b</sup> ±0.029
39	6.070 <sup>f</sup> ±0.173	27.686 <sup>a</sup> ±0.001

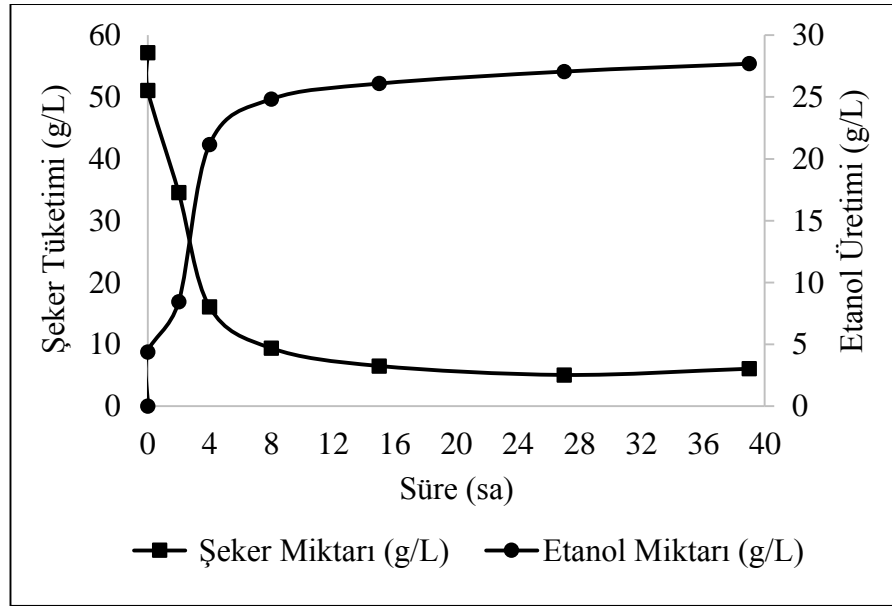
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyali ile gerçekleştirilen fermentasyon denemesine ait kinetik parametreler Çizelge 4.8'de verilmiştir. Kinetik parametrelerden verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %44.697, 5.148 g/L/h, 2.693 g/L/h ve %91.137 olarak saptanmıştır. Fermentasyonun sonunda 52.113 g/L şeker mayalar tarafından etanol üretiminde kullanılmış ve 23.293 g/L etanol üretilmiştir.

Çizelge 4.8. SH-SF-YE-RBC-SALTS biyofilm materyali kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretimine ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	52.113	g/L
Etanol Üretimi	23.293	g/L
Verim	44.697	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	5.148	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	2.693	g/L/h
Şeker Kullanım Oranı	91.137	%

Fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker ve etanol miktarındaki değişimler Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

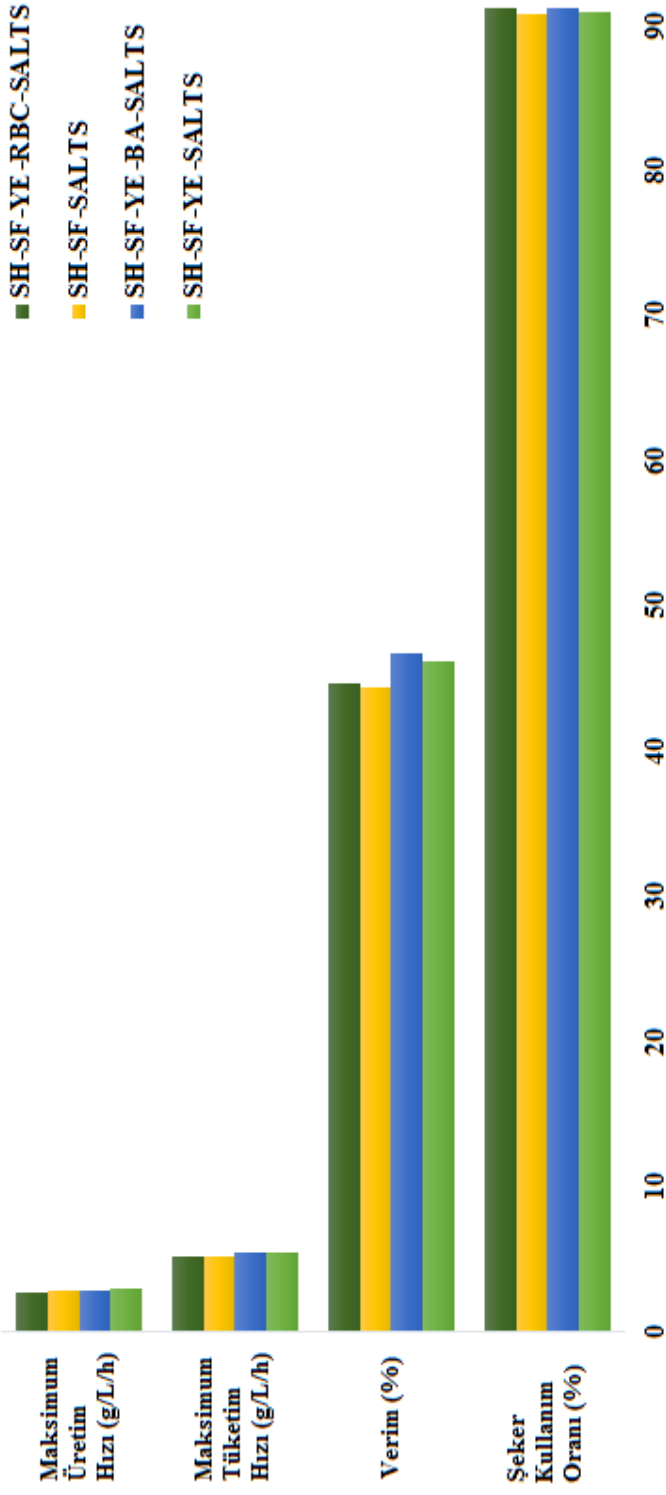


Şekil 4.4. SH-SF-YE-RBC-SALTS materyal kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketim ve etanol üretim grafiği

#### 4.1.5. PKD materyallerinin karşılaştırılması

En iyi biyofilm materyalini belirlemek amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara bağlı olarak biyofilm destek materyalleri arasındaki verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı açısından karşılaştırma sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Görüldüğü gibi verim açısından bariz bir fark olmamakla beraber üretim hızı, tüketim hızı ve şeker kullanım oranı açısından sonuçlar birbirine çok yakın çıkmıştır. Bu sonuçlara göre verim, maksimum tüketim hızı ve şeker kullanım oranı açısından en yüksek sonuçların elde edildiği biyofilm materyali SH-SF-YE-BA-SALTS olarak belirlenmiştir. Maksimum üretim hızı açısından en yüksek sonucun elde edildiği biyofilm materyalinin SH-SF-YE-SALTS olduğu tespit edilmiştir. Diğer materyallerden elde edilen sonuçlar, SH-SF-YE-BA-SALTS ve SH-SF-YE-SALTS materyallerine göre daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SH-SF-YE-BA-SALTS bileşenlerinden oluşan biyofilm destek materyalinin *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak keçiyoynuzu ekstraktından biyofilm reaktörde etanol üretiminde kullanılabileceği tespit edilmiştir.



Plastik Kompozit Destek Materyali	Verim (%)	Şeker Kullanım Oranı (%)	Maksimum Tüketim Hızı (g/L/h)	Maksimum Üretim Hızı (g/L/h)
SH-SF-YE-SALTS	46.171±1.191	90.943±0.709	5.450±0.027	3.018±0.001
SH-SF-YE-BA-SALTS	46.694±0.682	91.190±0.288	5.458±0.025	2.914±0.006
SH-SF-SALTS	44.404±0.297	90.811±0.107	5.232±0.183	2.876±0.045
SH-SF-YE-RBC-SALTS	44.704±0.799	91.135±0.280	5.148±0.004	2.693±0.030

Şekil 4.5. Biyofilm materyallerine ait verim, şeker kullanım oranı, maksimum tüketim hızı ve maksimum üretim hızı grafiği

## **4.2. Cevap Yüzey Metodunun Belirlemiş Olduğu Koşullarda Seçilen Biyofilm Materyali Kullanılarak Gerçekleştirilen Etanol Fermentasyonu**

Biyofilm reaktörde tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle keçiboynuzu ekstraktından *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile etanol üretim koşullarının Box-Behnken cevap yüzey metodu ile optimize edilmesi üzerine başlangıç şeker içeriği, besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla zenginleştirilmiş keçiboynuzu ekstraktı biyofilm reaktörde cevap yüzey metodunun belirlemiş olduğu koşullarda fermentasyona bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir.

### **4.2.1. Başlangıç şeker içeriğinin fermentasyon üzerine etkisi**

Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılarak keçiboynuzu ekstraktından tekrarlanan kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretimlerinin optimizasyonunda maksimum, orta nokta ve minimum (4, 7, 10°Bx) olmak üzere üç farklı başlangıç şeker içeriğinde fermentasyon denemeleri yapılmıştır (Çizelge 4.9).

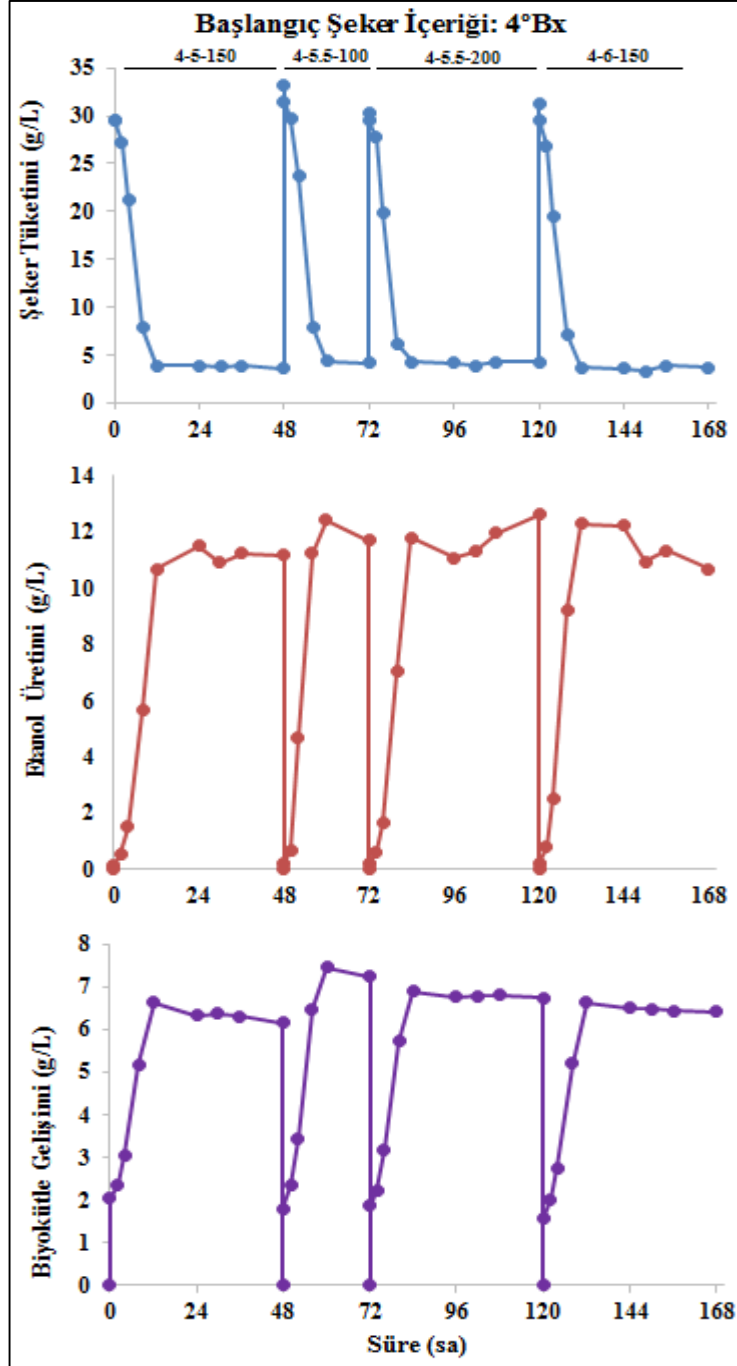
4, 7, 10°Bx değerlerinde hazırlanan keçiboynuzu ekstraktları ile yapılan fermentasyon denemelerinin sonucunda elde edilen verim değerleri sırasıyla %41.907-45.31, %34.86-47.08 ve %31.487-42.67 arasında değişmiştir. Ayrıca başlangıç şeker içeriğine bağlı olarak maksimum üretim hızları açısından değerlendirildiğinde değerler sırasıyla 0.905-1.209 g/L/h, 1.917-2.575 g/L/h ve 1.35-1.681 g/L/h arasında değişiklik göstermiştir. Bununla beraber, başlangıç şeker içeriği miktarı arttıkça üretilen etanol miktarı doğru orantılı olarak artmıştır. Etanol konsantrasyonları da başlangıç şeker içeriğine bağlı olarak sırasıyla 10.946-12.18 g/L, 20.89-24.575 g/L ve 27.628-37.633 g/L arasında değişim gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Biyofilm reaktörde etanol üretiminde verim, maksimum üretim hızı ve etanol konsantrasyonu açısından Cevap Yüzey Metodu sonuçları

Fermentasyon	Başlangıç Şeker İçeriği (°Bx)			Verim (%)	Maksimum Üretim Hızı (g/L/h)	Etanol Konsantrasyonu (g/L)
	Besiyerinde pH Değeri	Karıştırma Hızı (rpm)				
1	4	5.0	150	42.112±6.795	0.995±0.042	10.946±1.307
2	4	6.0	150	43.039±3.873	1.209±0.078	12.038±0.659
3	4	5.5	100	41.907±2.257	1.190±0.029	12.180±0.427
4	4	5.5	200	45.311±3.471	1.117±0.084	11.982±0.174
5	7	5.0	100	47.080±4.906	2.428±0.036	24.575±0.269
6	7	5.0	200	43.216±4.244	2.575±0.184	22.088±0.850
7	7	6.0	100	36.929±0.613	1.917±0.266	20.890±0.311
8	7	6.0	200	34.860±1.269	2.105±0.124	21.630±0.453
9	7	5.5	150	44.560±5.959	2.264±0.191	23.705±3.493
10	7	5.5	150	42.516±2.141	2.226±0.054	23.003±0.258
11	7	5.5	150	43.211±0.355	2.211±0.142	22.188±1.011
12	10	5.0	150	38.248±3.585	1.562±0.371	37.633±6.007
13	10	6.0	150	36.271±7.068	1.350±0.467	32.490±10.288
14	10	5.5	100	42.670±2.235	1.681±1.167	37.615±1.662
15	10	5.5	200	31.487±0.701	1.352±0.809	27.628±0.368

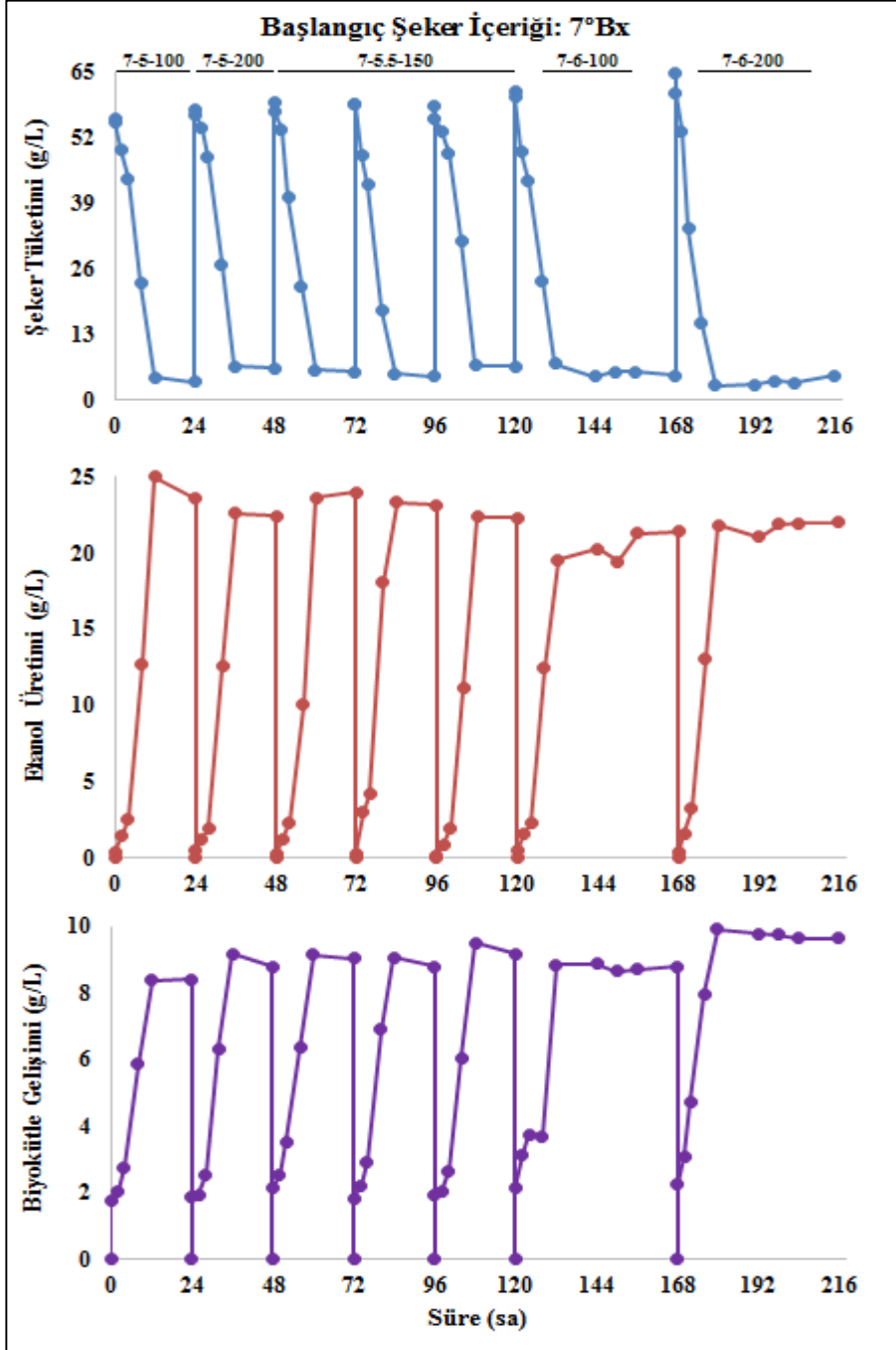


Başlangıç şeker içeriği 4°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



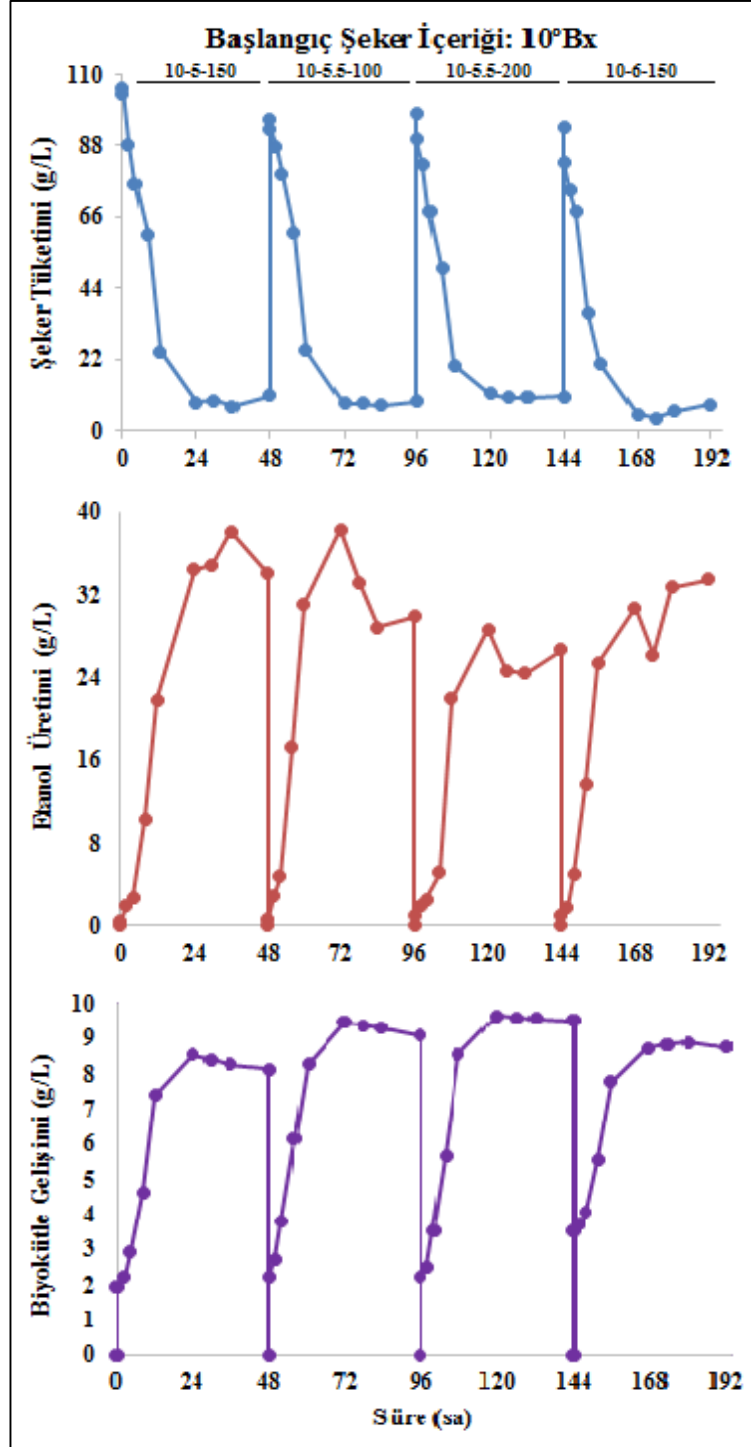
Şekil 4.6. Başlangıç şeker içeriği 4°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

Başlangıç şeker içeriği 7°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Başlangıç şeker içeriği 7°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

Başlangıç şeker içeriği 10°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Başlangıç şeker içeriği 10°Bx olan zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktı ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

Sonuç olarak verim değerleri başlangıç şeker içeriğine bağlı olarak değişiklik göstermekte, etanol konsantrasyonu başlangıç şeker içeriği arttıkça artmakta, üretim hızları ise orta nokta olan 7°Bx değerinde maksimum seviyeye çıkmaktadır. Bunun nedeni başlangıç şeker içeriği 4°Bx olduğunda, ortamdaki şeker mayalar tarafından hızlı bir şekilde ürüne dönüştürülmüş ve 12. saatten sonra ortamda çok düşük miktarda şeker kalmıştır. Dolayısıyla üretilen etanol konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum üretim hızları düşük çıkmıştır. Ortamdaki başlangıç şeker miktarı 10°Bx olduğunda ise şekerin mayaların metabolizmasında ürüne dönüşüm hızı daha yavaş gerçekleştiği düşünülmüştür. Ortamdaki şeker miktarı 24. saatten daha uzun sürede minimum seviyeye düştüğünden dolayı maksimum üretim hızları 7°Bx başlangıç şeker içeriğine göre daha düşük elde edilmiştir.

7°Bx başlangıç şeker içeriğine sahip fermentasyon denemelerinin tamamında 12. saatten sonra ortamda çok düşük miktarlarda kalıntı şeker tespit edilmiştir. Bununla beraber üretilen etanol miktarına bağlı olarak maksimum üretim hızları, başlangıç şeker içeriği 4 ve 10°Bx olan keçiyoynuzu ekstraktlarından elde edilen üretim hızlarına göre daha yüksek bulunmuştur. Tüm bu sonuçlara göre, başlangıç şeker içeriğinin verim ve maksimum üretim hızı açısından istatistiksel olarak önemli olduğu ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir.

#### **4.2.2. Besiyerinde pH değerinin fermentasyon üzerine etkisi**

Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılarak keçiyoynuzu ekstraktından tekrarlanan kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretimlerinin optimizasyonunda maksimum, orta nokta ve minimum (5.0, 5.5, 6.0) olmak üzere üç farklı besiyerinde pH değeri kullanılarak fermentasyon denemeleri yapılmıştır (Çizelge 4.9).

Besiyerinde pH değerinin 5.0 olduğu fermentasyon denemelerinin maksimum verim, üretim hızı ve etanol konsantrasyonu sırasıyla %47.08, 2.575 g/L/h ve 37.633 g/L olarak belirlenmiştir. Besiyerinde pH değerinin 5.5 olduğu fermentasyon denemelerinin maksimum verim, üretim hızı ve etanol konsantrasyonu değerleri sırasıyla %45.311, 2.264 g/L/h ve 37.615 g/L olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber besiyerinde pH değerinin 6.0 olduğu fermentasyon denemelerinde maksimum verim, üretim hızı ve etanol konsantrasyonu değerleri sırasıyla %43.039, 2.105 g/L/h ve 32.49 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek verim, üretim hızı ve etanol konsantrasyonu değerlerine pH 5.0'da ulaşılmasına rağmen besiyerinde pH değerinin verim ve üretim hızı açısından istatistiksel olarak farkın önemli olduğu ( $P>0.05$ ) tespit edilememiştir (Çizelge 4.9).

#### **4.2.3. Karıştırma hızının fermentasyon üzerine etkisi**

Tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle keçiyoynuzu ekstraktından biyofilm reaktörde etanol üretimlerinin gerçekleştiği fermentasyon denemelerinde karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla Box-Behnken cevap yüzey metodunda

maksimum, minimum ve orta noktalar sırasıyla 200 rpm, 100 rpm ve 150 rpm olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Karıştırma, fermentasyon ortamının homojenliğinin sağlanması ve mikroorganizmaların besinlere daha rahat ulaşabilmesini sağlamak amacıyla yapılmaktadır. Bundan dolayı, karıştırmanın fermentasyon sonucu elde edilen ürün miktarına, verim değerine ve maksimum üretim hızına etki etmesi beklenmektedir. 100 rpm, 150 rpm ve 200 rpm’de yapılan fermentasyon denemeleri sonucunda en yüksek verim değerleri sırasıyla %47.08, %44.56 ve %45.311 olarak elde edilmiş ve karıştırmanın istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir.

Fermentasyon sonucu hesaplanan maksimum üretim hızlarına karıştırma hızının etkisi değerlendirildiğinde 100 rpm, 150 rpm ve 200 rpm karıştırma hızları için maksimum etanol üretkenlik değerleri sırasıyla 2.428 g/L/h, 2.264 g/L/h ve 2.575 g/L/h olarak tespit edilmiştir. Fakat elde edilen sonuçlara göre, maksimum üretim hızı açısından karıştırma hızının istatistiksel açıdan önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) saptanmıştır.

#### 4.2.4. Etanol üretimlerinin optimizasyonu

Keçiboynuzu ekstraktından biyofilm reaktörde etanol üretimlerinin gerçekleştiği bu çalışmada “Full Quadratic” Box-Behnken cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Kullanılan modeldeki değişkenler; başlangıç şeker içeriği ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızı (rpm) olarak belirlenmiştir. Minitab programındaki Cevap Yüzey Metodu kullanılarak etanol verimi (Çizelge 4.10) ve üretim hızı (Çizelge 4.12) için geliştirilen regresyon eşitlikleri incelenmiştir.

Etanol verimi için model denklem ve regresyon eşitlikleri şöyledir:

$$\text{Etanol Verimi (\%)} = 43.429 - 2.678A - 2.445B - 1.998C - 0.726AB - 3.079AC + 0.449BC - 2.129A^2 - 1.383B^2 - 1.525C^2 + \epsilon \quad (4.1)$$

$\epsilon$ : Hata

A: Başlangıç şeker içeriği ( $^{\circ}\text{Bx}$ )

B: Besiyerinde pH değeri

C: Karıştırma Hızı (rpm)

Keçiboynuzu ekstraktından tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda verime ait  $R^2$  değeri 0.83 olarak saptanmıştır. Bu sonuca göre verim için elde edilen model, fermentasyon sonuçlarının %83’ünü tam temsil etmektedir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Etanol verimleri için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	Standart Hata Katsayıları	T	P
Sabit	43.429	1.681	25.838	0.000*
A	-2.678	1.029	-2.601	0.048*
B	-2.445	1.029	-2.375	0.064
C	-1.998	1.029	-1.941	0.110
A <sup>2</sup>	-2.129	1.515	-1.405	0.219
B <sup>2</sup>	-1.383	1.515	-0.913	0.403
C <sup>2</sup>	-1.525	1.515	-1.006	0.360
AB	-0.726	1.456	-0.499	0.639
AC	-3.079	1.456	-2.115	0.088
BC	0.449	1.456	0.308	0.770

R<sup>2</sup>: 0.83, \*P<0.05

Bunun yanı sıra keçiyoynuzu ekstraktından biyofilm reaktörde *S. cerevisiae* mayası kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonlarının verim değerleri için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Model denklemdaki verimin varyans analizi

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Düzeltilmiş Kareler Toplamı	Düzeltilmiş Kareler Ortalaması	F	P
Regresyon	9	206.240	206.240	22.916	2.70	0.143
Lineer	3	137.103	137.103	45.701	5.39	0.050
İkinci Derece	3	28.309	28.309	9.436	1.11	0.426
Etkileşim	3	40.829	40.829	13.610	1.61	0.300
Artık Hata	5	42.376	42.376	8.475		
Uyum Eksikliği	3	40.216	40.216	13.405	12.41	0.075
Saf Hata	2	2.160	2.160	1.080		
Toplam	14	248.617				

Çizelge 4.11 incelendiğinde uyum eksikliği değeri (lack of fit) verim için 0.075 olarak bulunmuş ve güvenlik derecesi olan 0.05 değerinden büyük olduğu için modelin uyum eksikliği önemsiz ( $P>0.05$ ) çıkmıştır.

Üretim hızı için model denklem ve regresyon eşitlikleri şöyledir:

$$\text{Üretim Hızı} = 2.2337 + 0.1678A - 0.1224B + 0.0031C - 0.9265A^2 - 0.0282B^2 + 0.0508C^2 - 0.1065AB - 0.087AC + 0.0102BC + \varepsilon \quad (4.2)$$

ε: Hata

A: Başlangıç şeker içeriği (°Bx)

B: Besiyerinde pH değeri

C: Karıştırma Hızı (rpm)

Keçiboynuzu ekstraktından biyofilm reaktörde *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda üretim hızına ait  $R^2$  değeri 0.954 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre verim için elde edilen model, fermentasyon sonuçlarının %95.4'ünü tam temsil etmektedir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Üretim hızı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	Standart Hata Katsayıları	T	P
Sabit	2.2337	0.10800	20.682	0.000*
A	0.1678	0.06614	2.536	0.052
B	-0.1224	0.06614	-1.850	0.123
C	0.0031	0.06614	0.047	0.964
A <sup>2</sup>	-0.9265	0.09735	-9.517	0.000*
B <sup>2</sup>	-0.0282	0.09735	-0.290	0.784
C <sup>2</sup>	0.0508	0.09735	0.522	0.624
AB	-0.1065	0.09353	-1.139	0.306
AC	-0.0870	0.09353	-0.930	0.395
BC	0.0102	0.09353	0.110	0.917

$R^2$ : 0.954, \* $P < 0.05$

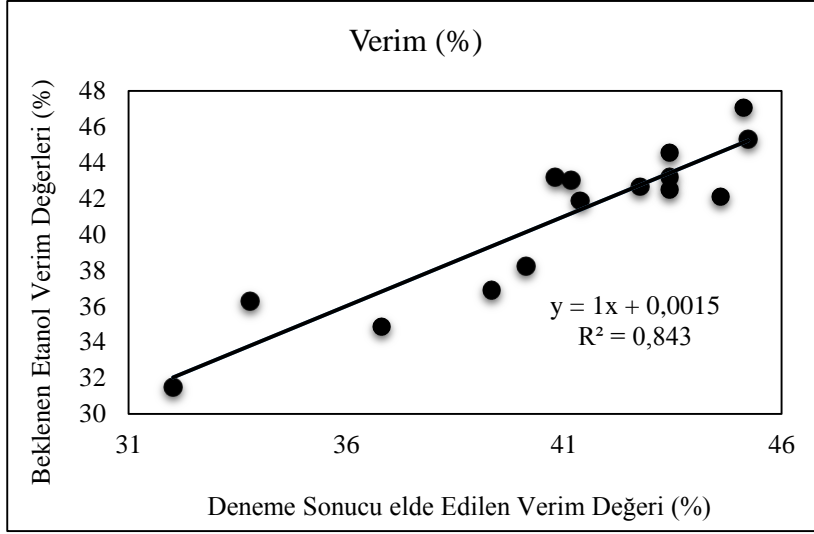
Ayrıca biyofilm reaktörde gerçekleştirilen etanol fermentasyonlarının üretim hızı için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Model denklemdaki üretim hızının varyans analizi

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Düzeltilmiş Kareler Toplamı	Düzeltilmiş Kareler Ortalaması	F	P
Regresyon	9	3.65001	3.65001	0.40556	11.59	0.007
Lineer	3	0.345	0.345	0.115	3.29	0.116
İkinci Derece	3	3.22894	3.22894	1.07631	30.76	0.001
Etkileşim	3	0.07607	0.07607	0.02536	0.72	0.579
Artık Hata	5	0.17497	0.17497	0.03499		
Uyum Eksikliği	3	0.17347	0.17347	0.05782	77.48	0.013
Saf Hata	2	0.00149	0.00149	0.00075		
Toplam	14	3.82497				

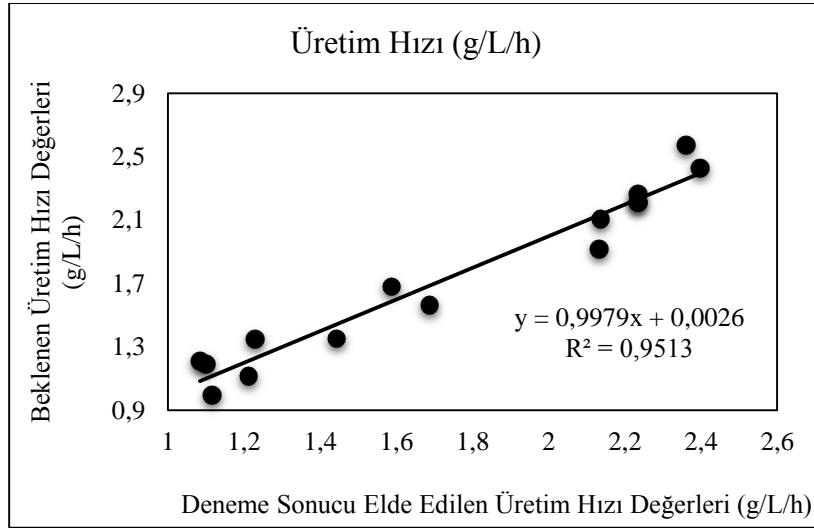
Çizelge 4.13 incelendiğinde üretim hızı için uyum eksikliği değeri üretim hızı için 0.013 olarak tespit edilmiştir. Uyum eksikliği değeri güvenlik derecesi olan 0.05 değerinden küçük olduğu için modelin uyum eksikliği önemli çıkmıştır.

Biyofilm reaktörde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu denemeleri sonucu cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilen çalışmada etanol verimi için regresyon analizi sonucunda ikinci dereceden polinomial model, kodlanmış değişkenler cinsinden Denklem 4.1'de verilmiştir. Bu eşitlikten elde edilen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.9'da verilmiş ve model tahminlerinin deneysel verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.9. Biyofilm reaktörde *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen tekrarlanan-kesikli fermentasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen etanol verim değerleri

Maksimum üretim hızı için elde edilen ikinci dereceden polinomial model ise, kodlanmış değişkenler cinsinden Denklem 4.2’de verilmiştir. Bu eşitlikten elde edilen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.10’da verilmiş ve model tahminlerinin deneysel verilerle uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Biyofilm reaktörde *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen tekrarlanan-kesikli fermentasyon denemeleri sonucuna karşılık beklenen üretim hızı değerleri

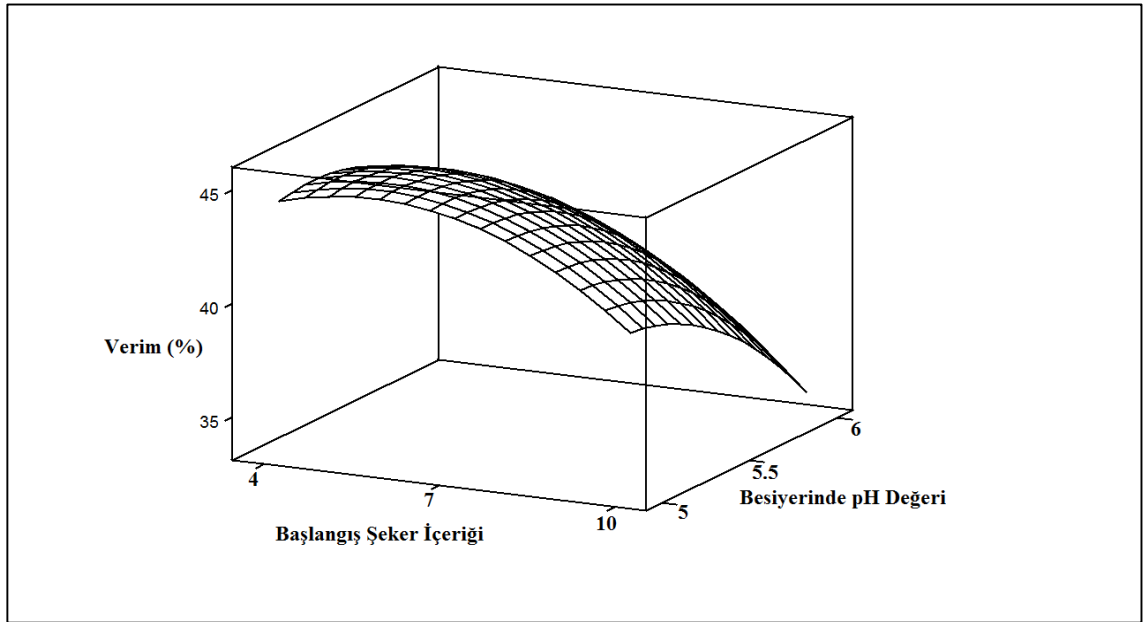
Başlangıç şeker konsantrasyonu, besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızı gibi işlem değişkenlerinin biyofilm reaktörde tekrarlanan-kesikli fermentasyon yoluyla etanol verimi ve üretim hızı üzerine etkilerinin görsel olarak daha kolay anlaşılabilmesi amacıyla elde edilen modeller kullanılarak cevap yüzey grafikleri oluşturulmuştur. Bu



grafikler, işlem değişkenlerinden herhangi birinin deneysel çizimin merkez noktasında sabit tutulup diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir.

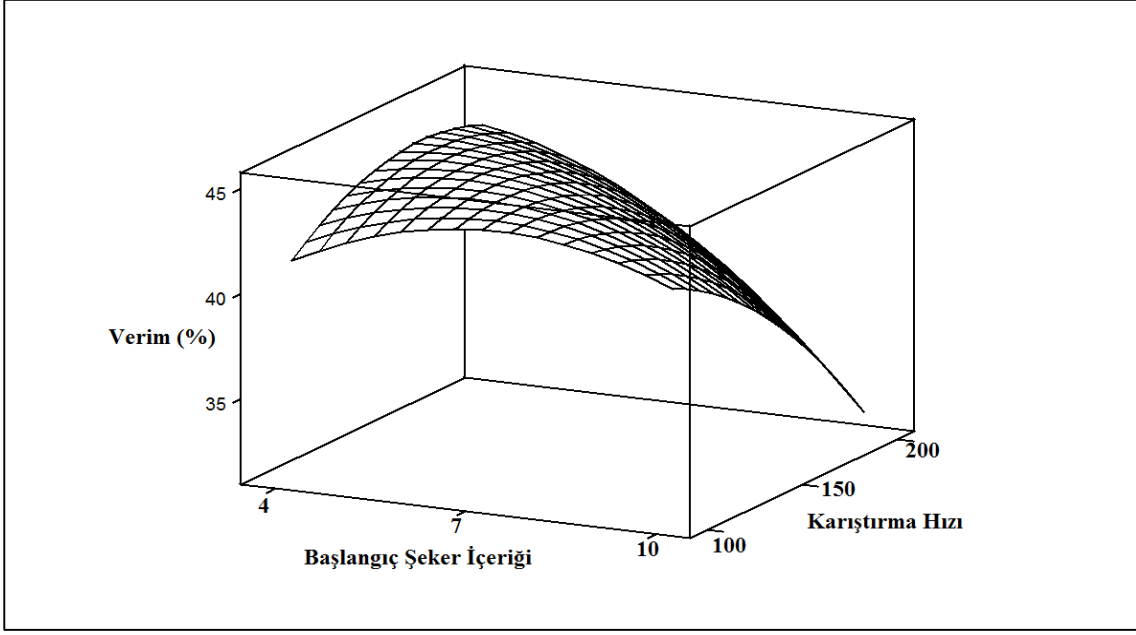
Merkez noktasındaki başlangıç şeker içeriği ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızının (rpm) fonksiyonu olarak *S. cerevisiae* mayası ile biyofilm reaktörde keçi boynuzu ekstraktından üretilen etanolün verim değerleri (%) için cevap yüzey grafikleri Şekil 4.11-4.13 arasında gösterilmiştir.

Merkez noktada sabit karıştırma hızı değerleri için başlangıç şeker içeriği ve besiyerinde pH değerinin etanol verimi üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.11), besiyerinde pH değeri azaldıkça ve başlangıç şeker içeriği orta noktaya yaklaştıkça verimin arttığı belirlenmiştir. Çizelge 4.10'a göre etanol verimi üzerine başlangıç şeker içeriğinin önemli ( $P<0.05$ ) olduğu ancak besiyerinde pH değerinin önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.



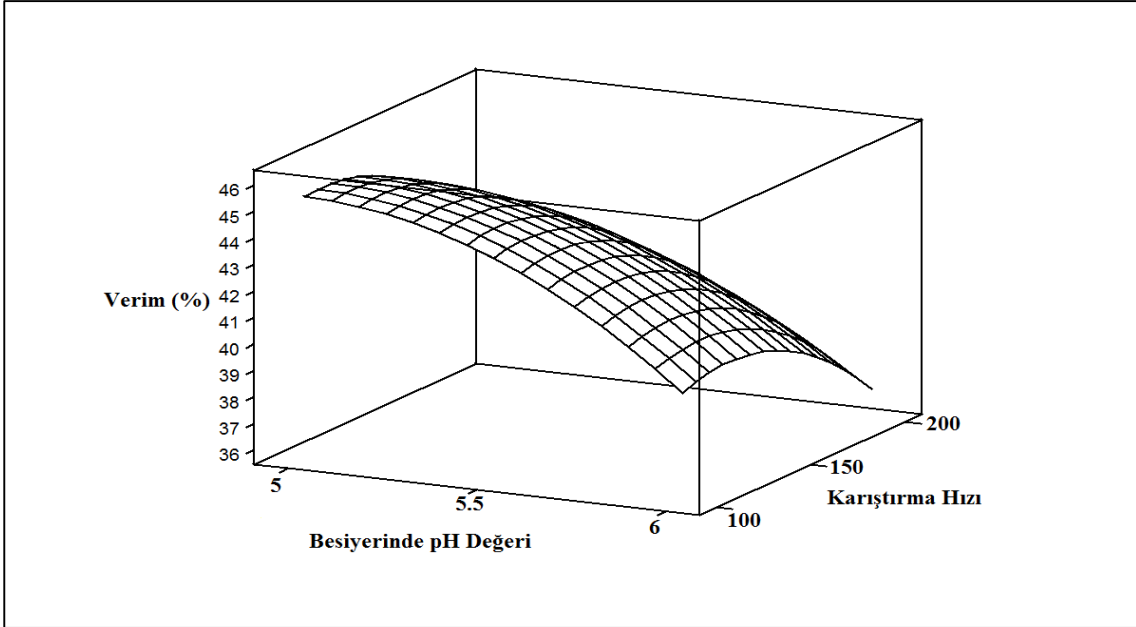
Şekil 4.11. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık başlangıç şeker içeriği ve besiyerinde pH değerinin ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Merkez noktada sabit besiyerinde pH değerleri için başlangıç şeker içeriğinin ve karıştırma hızının verim üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.12), karıştırma hızı maksimum noktada ve başlangıç şeker içeriği minimum noktada olduğunda verim artmaktadır. Aynı şekilde başlangıç şeker içeriği maksimum ve karıştırma hızı minimum noktada olduğunda verim değerinin arttığı belirlenmiştir. Bununla beraber başlangıç şeker içeriği ve karıştırma hızı maksimum noktaya doğru gittikçe verim değerinin düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca başlangıç şeker içeriği orta noktada ve karıştırma hızı maksimum noktada olduğunda verim düşmekte, minimum noktada ise verim çok az farklılıklarla değişmektedir. Çizelge 4.10'a göre etanol verimi üzerine başlangıç şeker içeriğinin önemli ( $P<0.05$ ) olduğu ancak karıştırma hızının önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık başlangıç şeker içeriği ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Besiyerinde pH değerinin ve karıştırma hızının etanol verimi üzerine etkileri incelendiğinde ise karıştırma hızı ve besiyerinde pH değeri azaldıkça artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). Ancak Çizelge 4.10'a göre etanol verimi üzerine besiyerinde pH değerinin ve karıştırma hızının önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir.

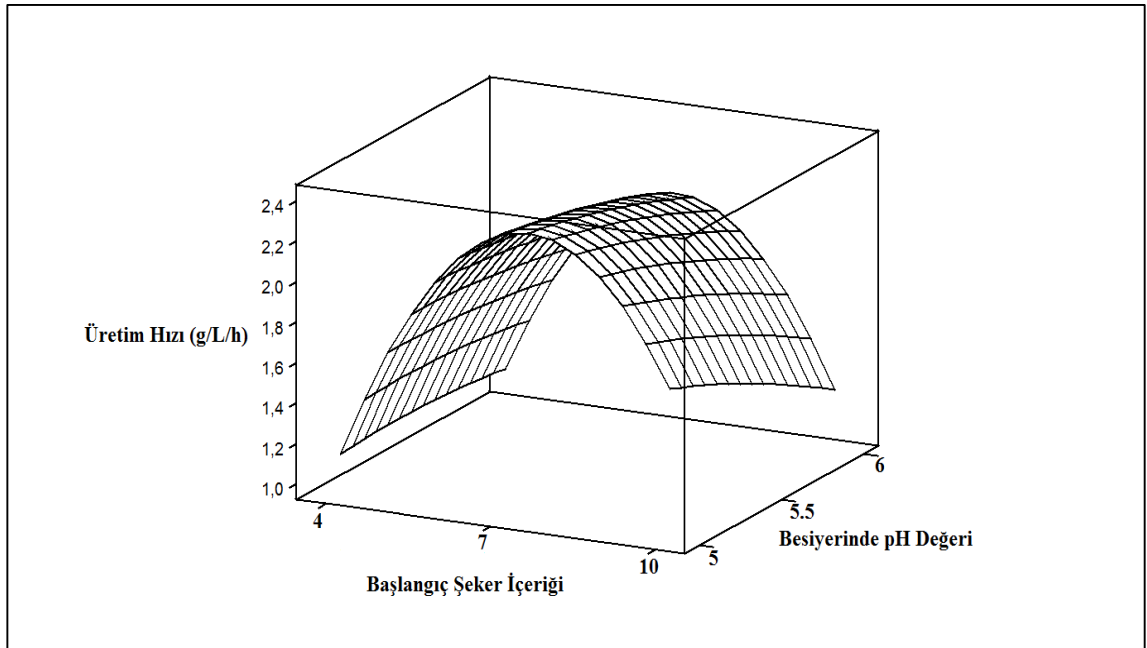


Şekil 4.13. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün verim değerine karşılık besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Elde edilen sonuçlara göre tüm cevap yüzey grafikleri bir bütün olarak ele alındığında başlangıç şeker içeriğinin verim değerine önemli ölçüde etkisinin olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.10'daki sonuçlar incelendiğinde, başlangıç şeker içeriğinin verim üzerine önemli bir etkisinin ( $P<0.05$ ) olduğu görülmektedir.

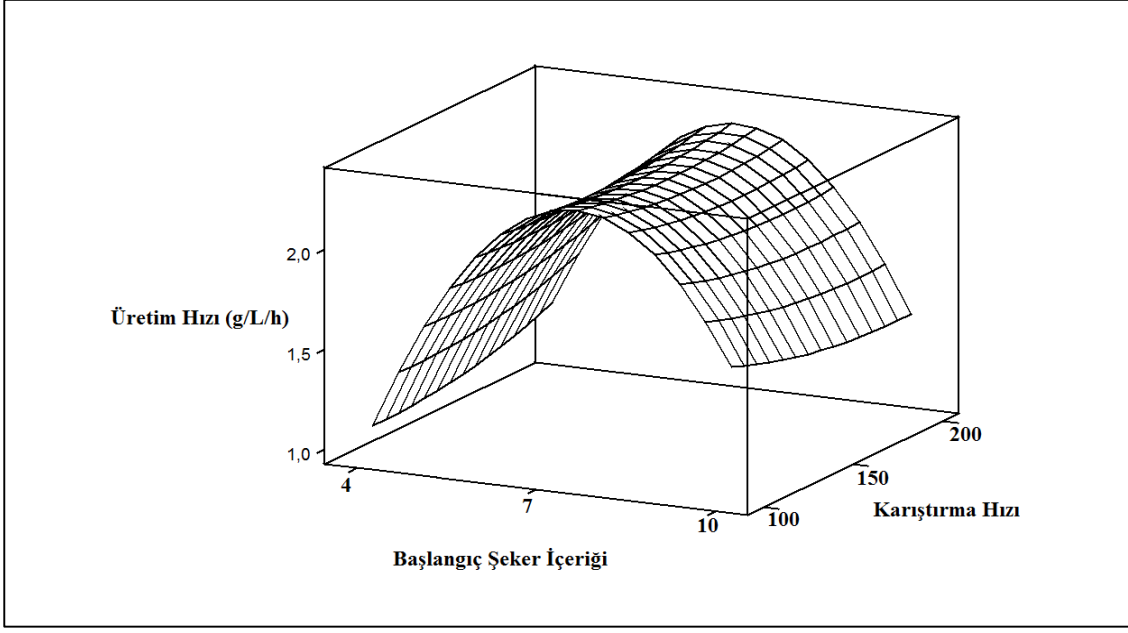
Merkez noktasındaki başlangıç şeker içeriği ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızının (rpm) bir fonksiyonu olarak *S. cerevisiae* mayası ile üretilen etanolün üretim hızı değerleri (g/L/h) için cevap yüzey grafikleri Şekil 4.14-4.16 arasında verilmiştir. Tüm cevap yüzey grafikleri incelendiğinde, başlangıç şeker içeriği istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir.

Merkez noktada sabit karıştırma hızı için besiyerinde pH değeri ve başlangıç şeker içeriğinin üretim hızı üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.14), başlangıç şeker içeriği orta noktaya doğru yaklaştıkça üretim hızı artmakta ancak besiyerinde pH değerinin üretim hızına önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) görülmektedir. Ancak başlangıç şeker içeriğinin üretim hızına etkisinin önemli olduğu ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir (Çizelge 4.12).



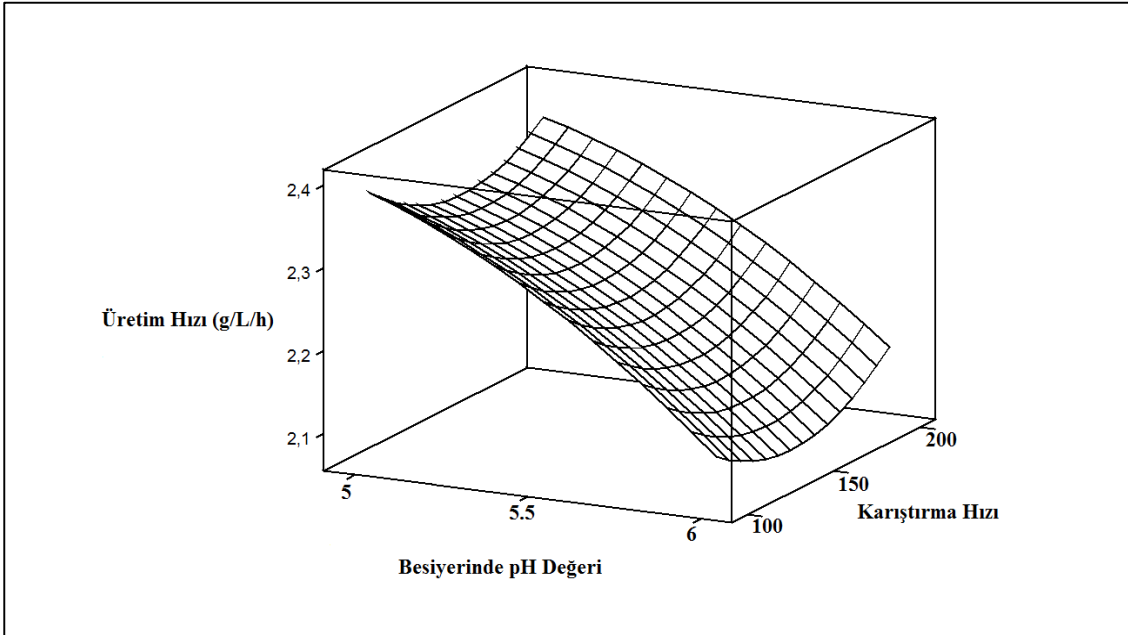
Şekil 4.14. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim hızına karşılık besiyerinde pH değeri ve başlangıç şeker içeriği ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Orta noktada sabit besiyerinde pH değeri için karıştırma hızı ve başlangıç şeker içeriğinin üretim hızı üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.15). Başlangıç şeker içeriği orta noktaya doğru ve karıştırma hızı maksimum ve minimum noktaya doğru yaklaştıkça üretim hızının arttığı belirlenmiş ancak karıştırma hızının üretim hızına önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir. Bununla beraber başlangıç şeker içeriğinin üretim hızına etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).



Şekil 4.15. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim hızına karşılık karıştırma hızı ve başlangıç şeker içeriği ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Orta noktada sabit başlangıç şeker içeriği için karıştırma hızı ve besiyerinde pH değerinin üretim hızı üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.16), besiyerinde pH değeri düştükçe ve karıştırma hızı minimum ve maksimum noktalara doğru yaklaştıkça üretim hızı artmaktadır. Ancak karıştırma hızının ve besiyerinde pH değerinin üretim hızına önemli bir etkisinin olmadığı ( $P>0.05$ ) tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).



Şekil 4.16. *Saccharomyces cerevisiae* ile üretilen etanolün üretim hızına karşılık karıştırma hızı ve besiyerinde pH değeri ilişkisini veren cevap yüzey grafiği

Tüm cevap yüzey grafikleri bir bütün olarak ele alındığında ve Çizelge 4.12'deki varyans analizi sonuçları incelendiğinde başlangıç şeker içeriğinin etanol üretim hızına etkisinin önemli olduğu ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir.

#### 4.2.5. Etanol verimi ve üretim hızı için optimum koşulların belirlenmesi ve optimizasyonu

Cevap yüzey metodu kullanılarak optimum koşulların belirlenmesinde verim (%) ve maksimum üretim hızı (g/L/h) kullanılmıştır. Bu amaçla modelin belirlediği şartlarda gerçekleştirilmiş fermentasyonlar sonucunda elde edilen değerler Cevap Yüzey Optimizasyonu uygulaması (Response Surface Optimizer) kullanılarak optimize edilmiştir.

Fermentasyon denemeleri sonucunda elde edilen sonuçlar kullanılarak hesaplanan verim (%) ve maksimum üretim hızı (g/L/h) kinetik parametrelerinin en düşük ve en yüksek değerleri Minitab 13.3 istatistik programında cevap yüzey optimizasyonu kısmına yazılarak etanol üretim koşulları optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre model birkaç optimum üretim koşulu belirlemiş ve bu koşullarda beklenen ve fermentasyonlar sonucunda gerçekleşen verim ve üretim hızı değerleri Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Belirlenen optimum koşullarda beklenen ve fermentasyonlar sonucu elde edilen verim ve üretim hızı değerleri

Koşullar	Koşullar			Beklenen Verim (%)	Beklenen Üretim Hızı (g/L/h)	Gerçekleşen Verim (%)	Gerçekleşen Üretim Hızı (g/L/h)	Açıklama
	Başlangıç Şeker İçeriği (°Bx)	Besiyerinde pH değeri	Karıştırma Hızı (rpm)					
1	8.35	5.26	101	44.461	2.149	42.767	1.759	Aşağıda yapılan açıklamalardan dolayı belirlenen bu üç koşul arasında biyofilm reaktörde optimum koşullar belirlenmiştir.
2	7.71	5.18	120		2.081	48.587	2.142	
3	7.00	5.00	100	47.080	2.428	42.959	1.798	
4	4.00	5.50	200	46.900	1.160			°Bx değeri düşük olduğundan dolayı üretim hızı ve etanol konsantrasyonu düşmektedir.
5	7.54	5.98	104	39.000	2.070			Beklenen verim değeri düşük olduğu için denenmemiştir.
6	7.97	5.01	176		2.170			Benzer çalışmalar, CYM'nin belirlemiş olduğu deneme deseninde olduğu ve üretim hızı açısından daha düşük sonuçlar elde edildiği için denenmemiştir.
7	7.59	5.06	157		2.080			
8	4.66	5.54	199	45.000				°Bx düşük olması nedeniyle üretim hızı ve etanol konsantrasyonu düşmektedir. Aynı şekilde °Bx değeri yüksek olduğunda da üretim hızı ve verim değeri düşmektedir.
9	4.88	5.36	174	44.000				

Başlangıç şeker içeriği 8.35°Bx, besiyerinde pH değeri 5.26 ve karıştırma hızı 101 rpm olan optimum koşullarda beklenen verim ve üretim hızı değerleri sırasıyla %44.461 ve 2.149 g/L/h olarak belirlenmiştir. Ancak yapılan fermentasyon denemeleri sonucunda verim ve üretim hızı değerleri sırasıyla %42.767 ve 1.759 g/L/h olarak hesaplanmıştır. Ayrıca fermentasyon sonucunda 22.975 g/L etanol üretilmiştir. Bununla beraber şeker kullanım oranı, maksimum tüketim hızı ve mayanın ikiye katlanma süresi (doubling time) sırasıyla %88.435, 2.122 g/L/h ve 17.985 h olarak tespit edilmiştir. Buna ilaveten fermentasyon denemelerinin 24. saatinde şeker seviyesi 7.446 g/L'ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde de çok az farklılıklarla değişimler gerçekleşmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 22.89 g/L etanol üretimi gerçekleşmiş ve ilerleyen saatlerde fazla bir değişiklik olmadan fermentasyon devam etmiştir. Fermentasyonda 7.025 g/L şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerler, beklenen değerleri karşılamadığından dolayı bu koşullar optimum koşul olarak belirlenmemiştir. (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. 8.35-5.26-101 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

<b>Kinetik Parametreler</b>	<b>Değer</b>	<b>Birim</b>
Şeker Tüketimi	53.722	g/L
Etanol Üretimi	22.975	g/L
Verim	42.767	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	2.122	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	1.759	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.194	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.039	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	17.985	h
Şeker Kullanım Oranı	88.435	%

Başlangıç şeker içeriği 7.0°Bx, besiyerinde pH değeri 5.0 ve karıştırma hızı 100 rpm olan optimum koşullar aynı zamanda optimum koşulları belirlemek amacıyla gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinden birisidir. Bu koşullarda beklenen verim ve üretim hızı değerleri dolayısıyla gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinin sonucu olmuştur ve bu değerler sırasıyla %47.08 ve 2.428 g/L/h olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Ancak yapılan fermentasyon denemeleri sonucunda verim, maksimum üretim hızı, maksimum tüketim hızı, etanol konsantrasyonu değerleri sırasıyla %42.959, 1.798 g/L/h ve 19.175 g/L olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber şeker kullanım oranı ve mayanın ikiye katlanma süresi de (doubling time) sırasıyla %89.546 ve 6.257 h olarak hesaplanmıştır. Ayrıca fermentasyon denemelerinin 12. saatinde şeker seviyesi 10.54 g/L'ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde de şeker seviyesinin 5.211 g/L'ye kadar düştüğü belirlenmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak 12. saatte 20.075 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlar beklenen değerleri karşılamadığından dolayı bu koşullar optimum koşul olarak belirlenmemiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. 7-5-100 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

<b>Kinetik Parametreler</b>	<b>Değer</b>	<b>Birim</b>
Şeker Tüketimi	44.635	g/L
Etanol Üretimi	19.175	g/L
Verim	42.959	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	3.405	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	1.798	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.604	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.111	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	6.257	h
Şeker Kullanım Oranı	89.546	(%)

Başlangıç şeker içeriği 7.71°Bx, besiyerinde pH değeri 5.18 ve karıştırma hızı 120 rpm olan optimum koşullarda beklenen üretim hızı değeri 2.081 g/L/h olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Bu koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinin 12. saatinde şeker seviyesi 11.406 g/L'ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde şeker seviyesi 7.321 g/L'ye kadar düştüğü ve mayalar tarafından kullanılmadığı saptanmıştır. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 24.18 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir. Maksimum üretilen etanol miktarı ve maksimum biyokütle gelişimi sırasıyla 24. saatte 25.25 g/L ve 30. saatte 9.982 g/L olarak bulunmuştur. (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. 7,71-5,18-120 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

<b>Süre (sa)</b>	<b>Şeker Miktarı (g/L)</b>	<b>Etanol Miktarı (g/L)</b>	<b>Biyokütle Miktarı (g/L)</b>
B	57.772 <sup>a</sup> ±0.152	0.000 <sup>e</sup> ±0.000	0.000 <sup>f</sup> ±0.000
0	56.407 <sup>a</sup> ±1.175	0.738 <sup>de</sup> ±0.233	2.705 <sup>e</sup> ±0.007
2	52.109 <sup>b</sup> ±1.003	2.313 <sup>cd</sup> ±0.217	2.960 <sup>e</sup> ±0.038
4	45.921 <sup>c</sup> ±1.461	3.713 <sup>c</sup> ±0.503	3.673 <sup>d</sup> ±0.085
8	27.271 <sup>d</sup> ±2.082	8.720 <sup>b</sup> ±0.120	5.647 <sup>c</sup> ±0.072
12	11.406 <sup>e</sup> ±2.170	24.180 <sup>a</sup> ±0.38	9.363 <sup>b</sup> ±0.257
24	7.393 <sup>e</sup> ±0.253	25.250 <sup>a</sup> ±0.300	9.639 <sup>ab</sup> ±0.246
30	7.321 <sup>e</sup> ±0.220	24.150 <sup>a</sup> ±1.300	9.982 <sup>a</sup> ±0.149

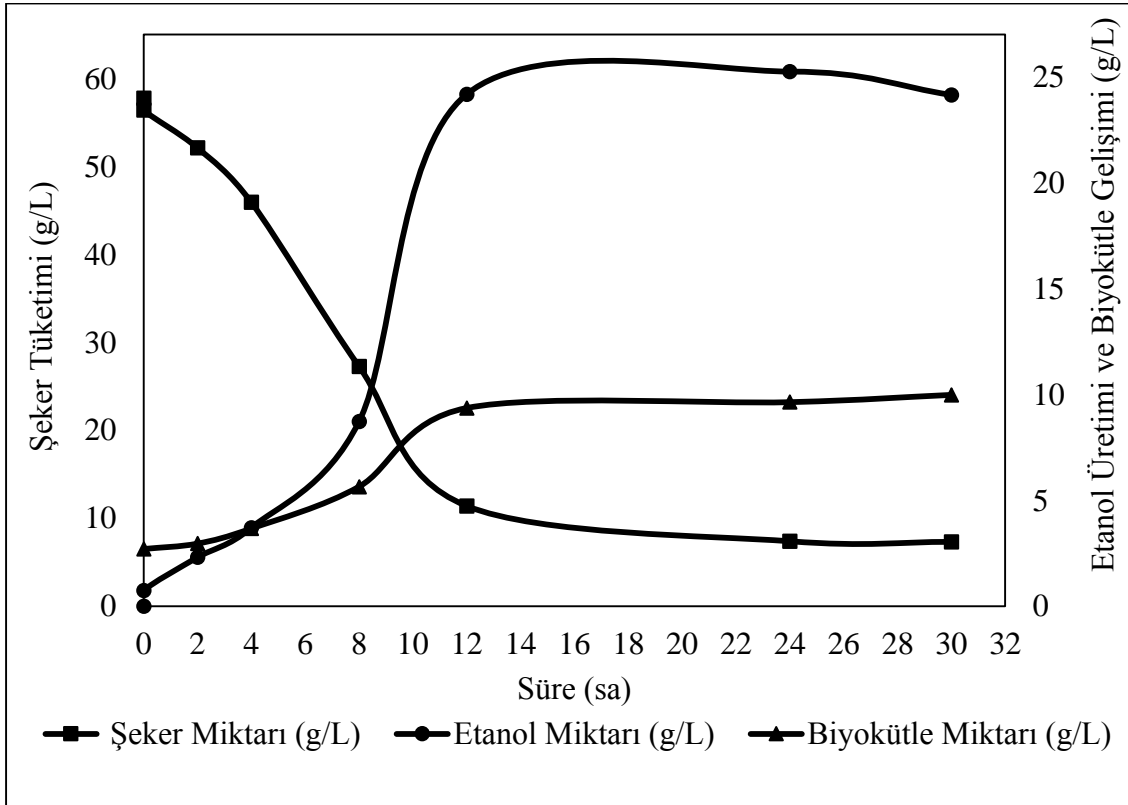
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ )

7.71°Bx, 5.18 pH ve 120 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.18'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre verim, üretim hızı ve etanol konsantrasyonu değerleri sırasıyla %48.587, 2.142 g/L/h ve 24.513 g/L olarak hesaplanmıştır. Ayrıca şeker kullanım oranı, tüketim hızı ve mayanın ikiye katlanma süresi (doubling time) sırasıyla %87.327, 4.164 ve 6.046 h olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla gerçekleşen değerler, beklenen değerden daha yüksek elde edildiği için bu koşullar optimum koşul olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. 7.71-5.18-120 koşullarında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	50.451	g/L
Etanol Üretimi	24.513	g/L
Verim	48.587	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	4.164	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	2.142	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.635	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.115	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	6.046	h
Şeker Kullanım Oranı	87.327	%

Elde edilen bu sonuçlar incelendiğinde en yüksek verim, üretim hızı ve etanol konsantrasyonu, başlangıç şeker içeriğinin 7.71°Bx, besiyerinde pH değerinin 5.18 ve karıştırma hızının 120 rpm olduğu fermentasyon koşullarından elde edilmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen etanol fermentasyonu süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim grafiği Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyona ait şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi



Belirlenen diğ er optimum koş ullar ve bu koş ulların neden denenmediğ i Ç izelge 4.14'te verilmiş tir. Baş langıç ř eker iç eriğ inin 7.71°Bx seç ilmesinin nedeni, ortanca değ ere yakın olması ve ortanca değ erde maksimum ü retim hız larının ve verim değ erlerinin elde edilmiş olmasıdır.

Karış tırma hız ının 120 rpm seç ilmesinin nedeni, bař langıç ř eker iç eriđ i 7°Bx ve karış tırma hız ı 100 rpm de gerç ekleş miř fermentasyon denemelerinde en yüksek verim ve maksimum ü retim hız ı deđ erlerinin elde edilmesi ve 120 rpm karış tırma hız ının bu deđ erlere yakın olmasıdır. Ayrıca biyofilmlerin destek materyali yüzeyine yüksek karış tırma hız larında tutunamayacağ ı dū ř ünülmüş tür.

Besiyerinde pH değ erinin 5.18 seç ilmesinin nedeni ise optimizasyon denemeleri sonucunda yüksek verim, ü retim hız ı ve etanol konsantrasyonu değ erlerinin pH 5'de gerç ekleş mesi ve optimum koş ullarda gerç ekleş tirilen fermentasyon denemelerinde en yüksek verim değ erinin elde edilmesi ayrıca seç ilen pH değ erinin pH 5'e yakın olmasıdır.

Optimum koř ullarda gerç ekleř tirilen fermentasyonun sü resi 12 saat olarak belirlenmiř tir. Fermentasyon sü resinin 12 saate dū ř mesinin nedeni ise biyofilm destek materyali yüzeyine tutunan mayaların biyofilm oluř turması ve mayaların kù ltür besiyerinde yüksek yođ unlukta bulunması olarak dū ř ünülmüř tür. Günümüzde gerç ekleř tirilen büt ün fermentasyon ç alıř malarında amaç , ç alıř manın büyük ölç ekli proseslere aktarılması ve ü retim miktarlarını artırmaya yönelik olduđu kadar maliyetlerinde minimum seviyeye dū ř ürlmesidir. Bu nedenle ü retici aç ısından fermentasyon sü resinin 12 saate dū ř mesi ile hem zamandan hem de enerjiden kazanım elde edilecektir.

### **4.3. Optimum Koş ullarda Azot kaynağ ına Bağ lı Olarak Gerç ekleş tirilen Etanol Fermentasyonu**

Besiyerine *S. cerevisiae* mayasının geliş imini ve çoğ almasını sağ lamak amacıyla azot kaynağ ı olarak maya ekstraktı ve amonyum sü lfat kullanılmaktadır. Optimum koş ullarda gerç ekleş tirilen fermentasyon denemelerinde azot kaynaklarının etkisini görmek amacıyla ü ç farklı besiyeri bileş imi hazırlanarak fermentasyonlar gerç ekleş tirilmiş tir. Bunlar;

- a) Ortama azot kaynağ ı eklenmemiş tir.
- b) Ortama azot kaynağ ı olarak sadece maya ekstraktı eklenmiş , amonyum sü lfat eklenmemiş tir.
- c) Ortama azot kaynağ ı olarak sadece amonyum sü lfat eklenmiş , maya ekstraktı eklenmemiş tir.

Bu koş ullarda gerç ekleş tirilen fermentasyon denemeleri sonucunda verim, maksimum tük etim hız ı ve maksimum ü retim hız ı aç ısından bir farkın olup olmadığ ı araç tırılmış tir.

Öncelikle besiyeri ortamına azot kaynağ ının eklenmediğ i durumda gerç ekleş tirilen fermentasyonun verim, ü retim hız ı ve etanol konsantrasyonu üzerine

etkisi incelenmiştir. Azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişimler Çizelge 4.19’da verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre şeker seviyesi 24. saatte 7.484 g/L’ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde 6.837 g/L kalıntı şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı tespit edilmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak 24. saatte 24.05 g/L olarak maksimum etanol üretimi gerçekleşmiş ve sonraki saatlerde etanol üretiminde azalma belirlenmiştir. Fermentasyon sonucunda maksimum biyokütle gelişimi fermentasyonun 30. saatinde 9.02 g/L olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.19. Optimum koşullarda azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)	Biyokütle Miktarı (g/L)
B	62.098 <sup>a</sup> ±0.697	0.000 <sup>f</sup> ±0.000	0.000 <sup>g</sup> ±0.000
0	57.276 <sup>a</sup> ±0.191	0.555 <sup>f</sup> ±0.120	1.546 <sup>f</sup> ±0.036
2	47.936 <sup>b</sup> ±3.839	1.525 <sup>ef</sup> ±0.115	2.186 <sup>e</sup> ±0.223
4	45.014 <sup>b</sup> ±2.101	2.963 <sup>e</sup> ±1.288	2.840 <sup>d</sup> ±0.015
8	28.207 <sup>c</sup> ±4.775	8.478 <sup>d</sup> ±0.603	4.670 <sup>c</sup> ±0.073
12	14.625 <sup>d</sup> ±4.105	18.130 <sup>c</sup> ±0.070	8.051 <sup>b</sup> ±0.137
24	7.484 <sup>d</sup> ±0.095	24.050 <sup>b</sup> ±0.350	8.857 <sup>a</sup> ±0.017
30	6.837 <sup>d</sup> ±0.136	20.488 <sup>a</sup> ±0.162	9.020 <sup>a</sup> ±0.200

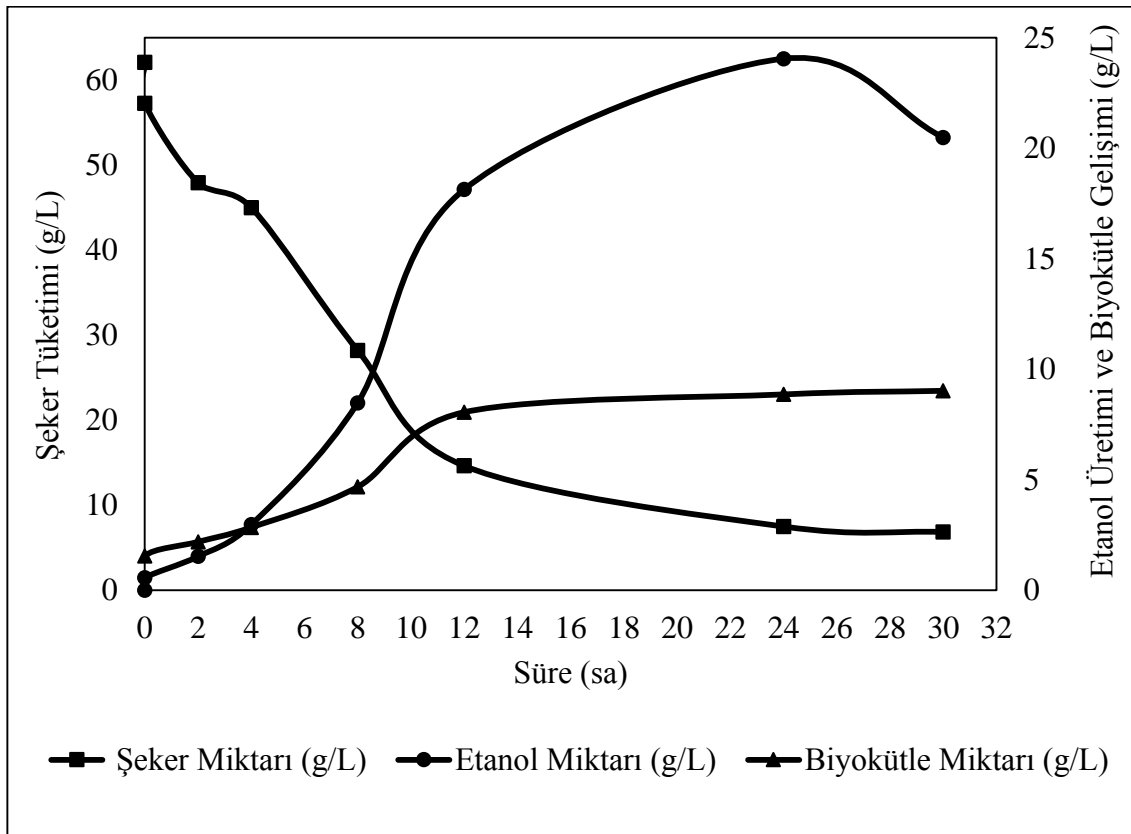
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

Optimum koşullarda azot kaynağı içermeyen besiyeri kullanılarak biyofilm reaktörde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.20’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı, etanol konsantrasyonu ve şeker kullanım oranı sırasıyla %42.516, 2.103 g/L/h, 1.031 g/L/h, 23.495g/L ve %88.99 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında; optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona göre daha düşük verim, üretim hızı, tüketim hızı ve etanol konsantrasyonu tespit edilmiştir. Ancak şeker kullanım oranının optimum besiyeri koşullarına göre yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca fermentasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla azot kaynağı, mikroorganizmanın üretme kabiliyetini artırmakta, eksikliğinde ise mikroorganizma verimli çalışmamaktadır.

Çizelge 4.20. Optimum koşullarda azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	55.262	g/L
Etanol Üretimi	23.495	g/L
Verim	42.516	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	2.103	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	1.031	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.582	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.130	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	5.342	h
Şeker Kullanım Oranı	88.99	(%)

Fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi maksimum etanol miktarına 24. saatte ulaşılmış ve fermentasyonun devamında etanol miktarında düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 4.18. Optimum koşullarda azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

İkinci olarak; besiyeri bileşimine maya ekstraktı ilave edilmiş ancak amonyum sülfat ilave edilmeden optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların verime,

üretim hızına ve etanol üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Amonyum sülfatsız besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişimler Çizelge 4.21’de verilmiştir. Fermentasyon süresinin 24. saatinde en düşük şeker miktarı olarak belirlenen 8.085 g/L kalıntı şeker *S. cerevisiae* mayası tarafından etanol üretiminde kullanılmamıştır. Maksimum etanol miktarı da fermentasyonun 24. saatinde 24.63 g/L olarak hesaplanmıştır. Ayrıca fermentasyon süresinin 30. saatinde biyokütle miktarı 9.726 g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.21. Optimum koşullarda amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)	Biyokütle Miktarı (g/L)
B	63.225 <sup>a</sup> ±0.487	0.000 <sup>c</sup> ±0.000	0.000 <sup>e</sup> ±0.000
0	61.592 <sup>a</sup> ±0.573	0.515 <sup>c</sup> ±0.145	1.711 <sup>d</sup> ±0.098
2	57.581 <sup>b</sup> ±1.261	1.300±0.030	1.948 <sup>d</sup> ±0.224
4	53.031 <sup>c</sup> ±0.683	3.120 <sup>c</sup> ±0.420	2.550 <sup>d</sup> ±0.232
8	34.442 <sup>d</sup> ±1.786	8.660 <sup>b</sup> ±1.620	4.612 <sup>c</sup> ±0.512
12	13.061 <sup>e</sup> ±0.358	20.640 <sup>a</sup> ±3.120	8.727 <sup>b</sup> ±0.406
24	8.085 <sup>f</sup> ±0.277	24.630 <sup>a</sup> ±2.010	9.440 <sup>ab</sup> ±0.340
30	8.503 <sup>f</sup> ±0.045	24.570 <sup>a</sup> ±1.710	9.726 <sup>a</sup> ±0.180

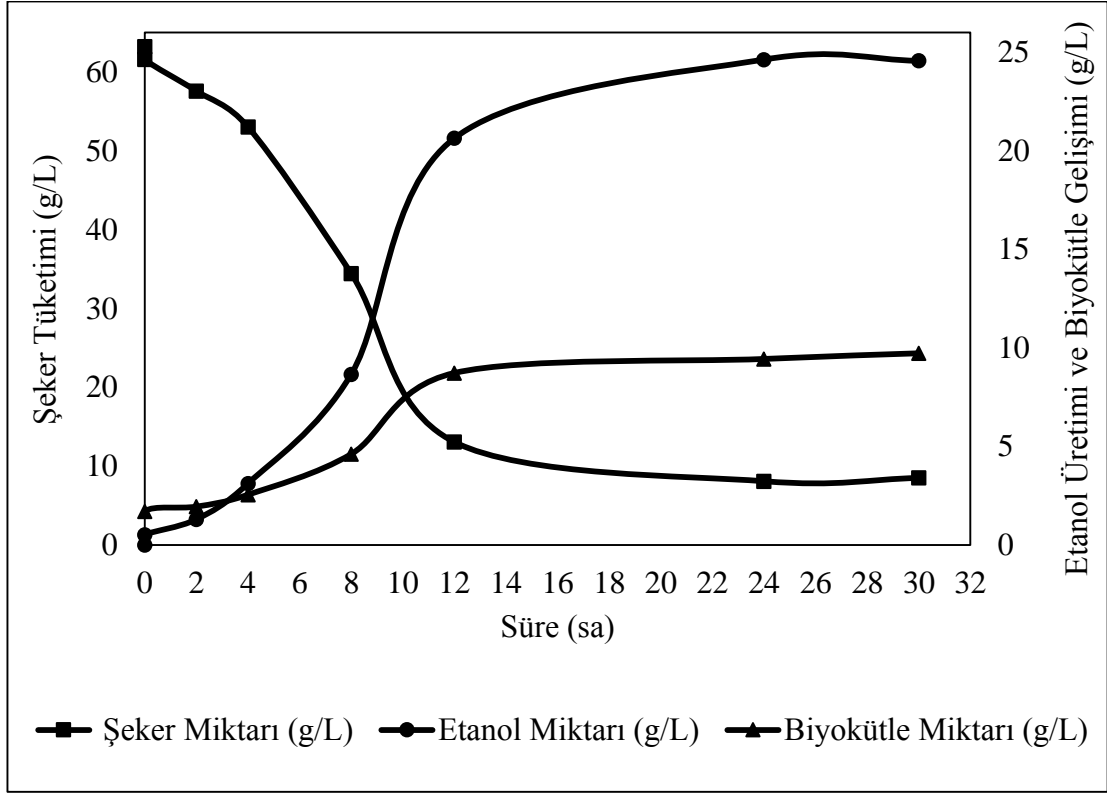
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

Optimum koşullarda amonyum sülfat içermeyen besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.22’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı, etanol konsantrasyonu ve şeker kullanım oranı sırasıyla %43.734, 2.33 g/L/h, 1.053 g/L/h, 24.115 g/L ve %87.211 olarak belirlenmiştir. Sonuçların optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sonuçlarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sonuçlarına göre verim, üretim hızı, tüketim hızı ve etanol konsantrasyonu açısından yüksek sonuçlar elde edilmişken şeker kullanım oranı açısından düşük sonuç elde edilmiştir.

Çizelge 4.22. Optimum koşullarda amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	55.140	g/L
Etanol Üretimi	24.115	g/L
Verim	43.734	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	2.330	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	1.053	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.674	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.150	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	4.612	h
Şeker Kullanım Oranı	87.211	%

Fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi maksimum etanol miktarına 24. saatte ulaşılmış ve fermentasyonun devamında etanol miktarında biraz düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 4.19. Amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Üçüncü olarak; besiyeri bileşimine amonyum sülfat eklenmekte ancak maya ekstraktı eklenmeden optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonun verime, tüketim hızına, üretim hızına ve etanol konsantrasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Besiyerine maya ekstraktı ilave edilmeden gerçekleştirilen fermentasyonda toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişimler Çizelge 4.23’te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre fermentasyonun 30. saatinde 8.513 g/L kalıntı şeker mayalar tarafından kullanılmamıştır. Fermentasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiş ve maksimum etanol üretimi de bu saatte gerçekleşmiştir (22.38 g/L). Ayrıca fermentasyonun 24. saatinde maksimum biyokütle gelişimi 9.726 g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.23. Optimum koşullarda besiyerine maya ekstraktı eklemeyen gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)	Biyokütle Miktarı (g/L)
B	59.501 <sup>a</sup> ±0.544	0.000 <sup>e</sup> ±0.000	0.000 <sup>e</sup> ±0.000
0	59.816 <sup>a</sup> ±1.089	0.585 <sup>e</sup> ±0.120	1.943 <sup>d</sup> ±0.020
2	56.999 <sup>ab</sup> ±1.442	1.230 <sup>e</sup> ±0.030	2.091 <sup>d</sup> ±0.165
4	52.267 <sup>b</sup> ±1.074	2.768 <sup>de</sup> ±0.758	2.555 <sup>d</sup> ±0.140
8	38.382 <sup>c</sup> ±2.659	5.668 <sup>d</sup> ±0.708	4.036 <sup>c</sup> ±0.422
12	22.739 <sup>d</sup> ±4.035	14.000 <sup>c</sup> ±0.100	7.701 <sup>b</sup> ±0.213
24	9.131 <sup>e</sup> ±0.224	22.380 <sup>b</sup> ±0.420	9.726 <sup>a</sup> ±0.120
30	8.513 <sup>e</sup> ±0.652	18.615 <sup>a</sup> ±2.265	9.543 <sup>a</sup> ±0.183

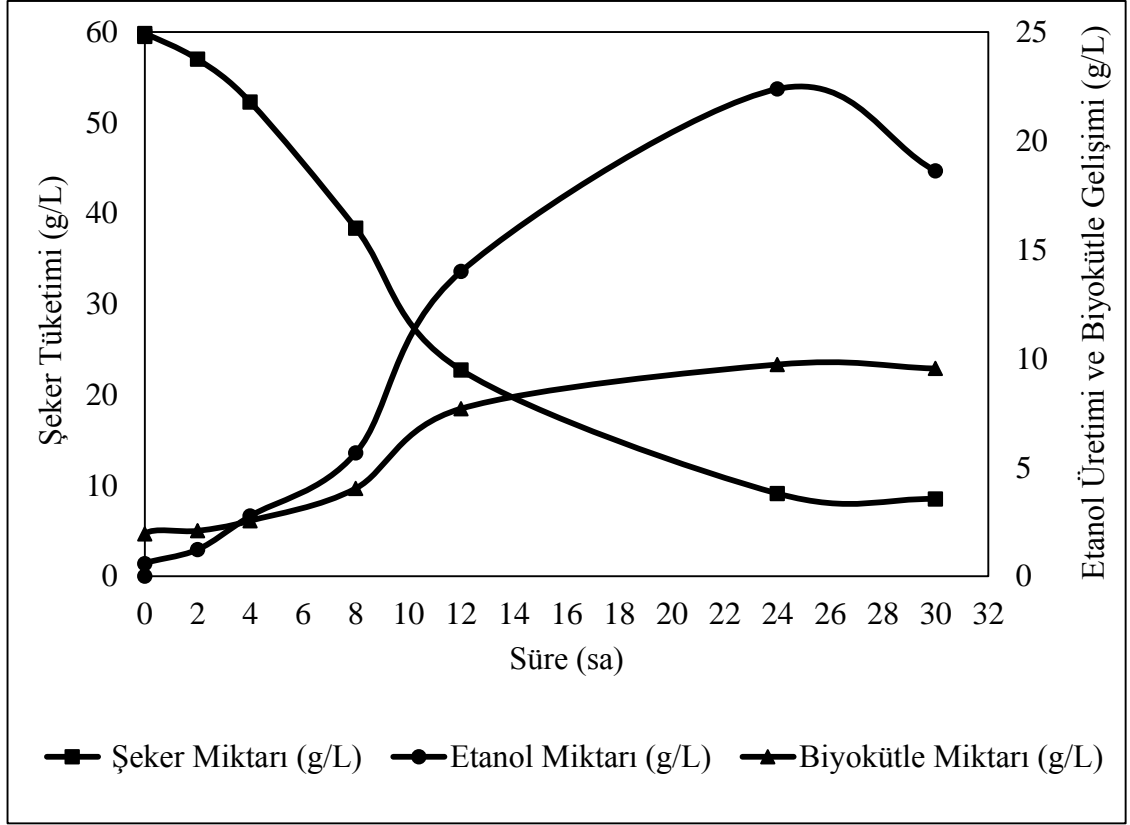
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

Optimum koşullarda besiyerine amonyum sülfat eklenip maya ekstraktı eklenmeden gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.24'te gösterilmiştir. Görüldüğü gibi verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı, etanol konsantrasyonu ve şeker kullanım oranı sırasıyla %42.483, 2.214 g/L/h, 0.999 g/L/h, 21.795 g/L ve %86.222 olarak belirlenmiştir. Bulgular değerlendirildiğinde optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona göre daha düşük verim, maksimum üretim hızı, maksimum tüketim hızı, etanol konsantrasyonu ve şeker kullanım oranı tespit edilmiştir. Azot içermeyen ve amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sonuçlarına göre maksimum tüketim hızı hariç diğer bütün kinetik parametre değerleri düşmüştür.

Çizelge 4.24. Optimum koşullarda besiyerine maya ekstraktı ilave etmeden gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	51.303	g/L
Etanol Üretimi	21.795	g/L
Verim	42.483	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	2.214	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	0.999	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.553	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.130	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	5.342	h
Şeker Kullanım Oranı	86.222	%

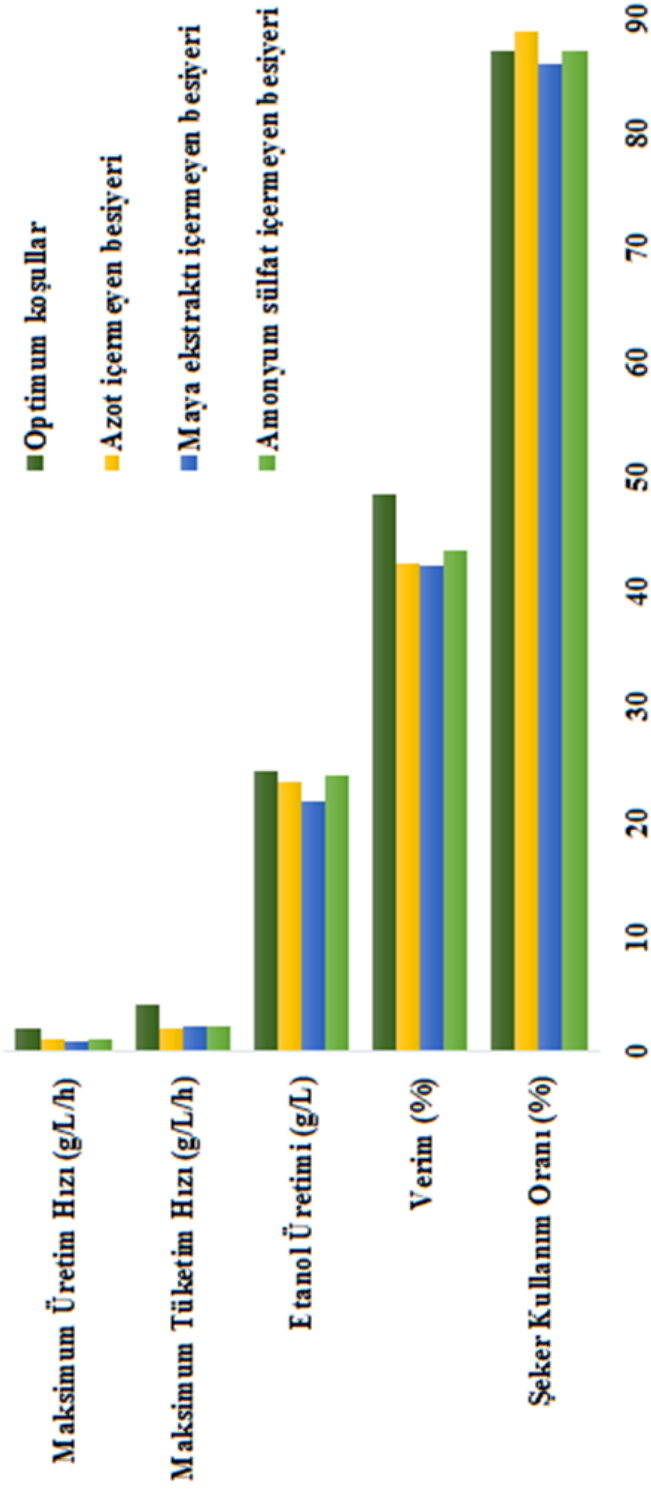
Besiyerinde maya ekstraktı kullanılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonuna ait fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi maksimum etanol miktarına 24. saatte ulaşılmış ve fermentasyonun devamında etanol miktarında düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 4.20. Besiyerinde maya ekstraktı kullanılmadan gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Azot kaynağına bağlı olarak optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda şeker kullanım oranı, verim, etanol üretimi, maksimum tüketim hızı ve maksimum üretim hızı değerleri kıyaslanmıştır (Şekil 4.21).

Bu sonuçlara göre verim, etanol üretimi, maksimum tüketim hızı ve üretim hızı açısından en yüksek değerler sırasıyla %43.704, 23.495 g/L, 2.33 g/L/h ve 1.053 g/L/h olarak amonyum sülfat içermeyen yani maya ekstraktının kullanıldığı besiyerinden elde edilmiştir. Ayrıca amonyum sülfat içermeyen besiyerinde şeker kullanım oranı %87.211 olarak belirlenmiştir. Yine verim, etanol üretimi, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı açısından en düşük değerler sırasıyla %42.483, 21.795 g/L, 0.999 g/L/h ve %86.222 olarak maya ekstraktının kullanılmadığı besiyerinden elde edilmiştir. Bununla beraber maya ekstraksız besiyerinde maksimum tüketim hızı 2.214 g/L/h olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları, azot kaynağının kullanılmasına bağlı olarak gerçekleştirilen fermentasyon sonuçlarına göre verim, maksimum üretim hızı ve maksimum tüketim hızı açısından yaklaşık olarak 2 kat daha yüksek elde edildiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlardan besiyeri bileşiminde kullanılan azot kaynaklarının mikroorganizmanın üretme ve tüketme kabiliyetini artırdığı ve fermentasyon sonuçları üzerinde ne kadar etkili olduğu tespit edilmiştir.



Fermentasyon Koşulları	Şeker Kullanım Oranı (%)	Verim (%)	Etanol Üretimi (g/L)	Maksimum Tüketim Hızı (g/L/h)	Maksimum Üretim Hızı (g/L/h)
Amonyum sülfat içermeyen besiyeri	87.211±0.480	43.734±4.983	24.115±2.878	2.330±0.026	1.053±0.132
Maya ekstraktı içermeyen besiyeri	86.222±1.865	42.483±3.384	21.795±0.764	2.214±0.105	0.999±0.052
Azot içermeyen besiyeri	88.990±0.484	42.516±2.109	23.495±0.665	2.103±1.358	1.031±0.110
Optimum koşullar	87.327±0.656	48.587±1.024	24.513±0.258	4.164±0.040	2.142±0.099

Şekil 4.21. Optimum koşullarda azot kaynağına bağlı olarak gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda şeker kullanım oranı, verim, etanol üretimi, maksimum tüketim hızı ve maksimum üretim hızı değerleri



#### 4.4. Optimum Koşullarda Zenginleştirilmemiş Keçiboynuzu Ekstraktı ile Biyofilm Reaktörde Etanol Üretimi

Keçiboynuzu meyvesi besin maddeleri bakımından zengin bir kaynak olduğundan dolayı çalışma kapsamında meyveden elde edilen ekstrakt içerisine herhangi bir mineral madde ve azot kaynağı ilave edilmeden optimum koşullarda etanol üretiminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla optimum koşullarda fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar süresince şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi takip edilmiştir (Çizelge 4.25). Sonuçlara bakıldığında fermentasyonun 30. saatinde 8.028 g/L kalıntı şeker mayalar tarafından kullanılmamıştır. Maksimum etanol üretimi ve biyokütle gelişimi sırasıyla fermentasyonun 24. saatinde 19.77 g/L ve 8.96 g/L olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca fermentasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.25. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)	Biyokütle Miktarı (g/L)
B	62.356 <sup>a</sup> ±0.268	0.000 <sup>e</sup> ±0.000	0.000 <sup>e</sup> ±0.000
0	57.935 <sup>ab</sup> ±0.506	0.533 <sup>e</sup> ±0.013	1.403 <sup>d</sup> ±0.153
2	53.064 <sup>ab</sup> ±2.970	0.910 <sup>de</sup> ±0.300	1.706 <sup>d</sup> ±0.193
4	49.603 <sup>b</sup> ±1.819	1.688 <sup>d</sup> ±0.083	2.086 <sup>d</sup> ±0.310
8	37.551 <sup>c</sup> ±5.553	6.363 <sup>c</sup> ±0.112	4.124 <sup>c</sup> ±0.556
12	21.808 <sup>d</sup> ±3.992	10.940 <sup>b</sup> ±0.660	7.235 <sup>b</sup> ±0.493
24	8.286 <sup>e</sup> ±0.611	19.770 <sup>a</sup> ±0.390	8.960 <sup>a</sup> ±0.180
30	8.028 <sup>e</sup> ±0.911	19.470 <sup>a</sup> ±0.330	8.920 <sup>a</sup> ±0.033

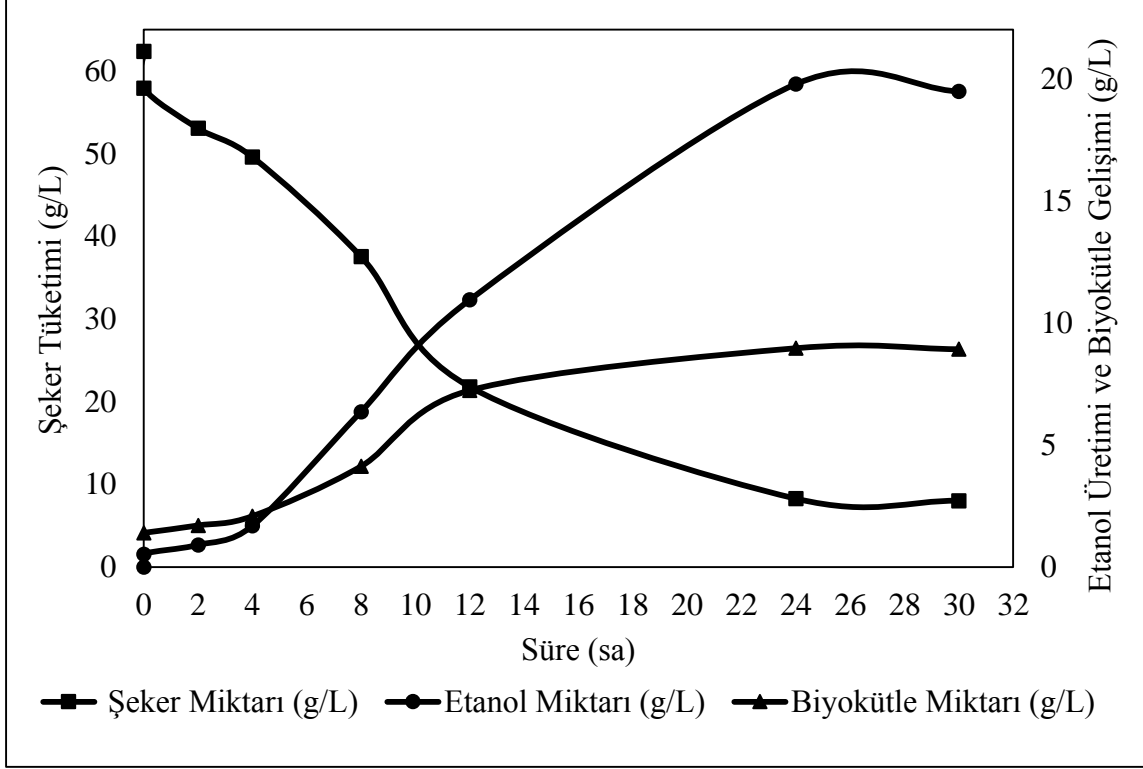
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.26'da verilmiştir. Şeker tüketimi, etanol üretimi, verim, tüketim hızı, üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla 54.328 g/L, 19.238 g/L, %35.41, 1.998 g/L/h, 0.885 g/L/h ve %86.753 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleşen fermentasyona göre çok daha düşük elde edilmiştir.

Çizelge 4.26. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	54.328	g/L
Etanol Üretimi	19.238	g/L
Verim	35.410	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	1.998	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	0.885	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.332	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.066	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	10.515	h
Şeker Kullanım Oranı	86.753	%

Zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonuna ait fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Maksimum etanol miktarına 24. saatte ulaşılmış ve fermentasyonun devamında etanol miktarında düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

#### 4.5. Optimum Koşullarda Steril Olmayan Zenginleştirilmiş ve Zenginleştirilmemiş Besiyeri ile Etanol Fermentasyonu

Optimum koşullarda keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak biyofilm reaktörde tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle steril olmayan zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş besiyerlerinden etanol fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi Çizelge 4.27’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, fermentasyonun 12. saatinde şeker seviyesi 7.961 g/L’ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde 5.684 g/L kalıntı şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı tespit edilmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 15 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir. Maksimum üretilen etanol miktarı ve maksimum biyokütle gelişimi sırasıyla 48. saatte 19.045 g/L ve 24. saatte 10.312 g/L olarak bulunmuştur. Ayrıca fermentasyon süresi 12-24 saat olarak belirlenmiştir.

Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.28’de verilmiştir. Şeker tüketimi, etanol üretimi, verim, tüketim hızı, üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla 54.677 g/L, 18.458 g/L, %33.758, 4.135 g/L/h, 1.507 g/L/h ve %90.584 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, verim, üretim hızı ve etanol üretimi açısından değerlendirildiğinde optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona göre düşük elde edilmesine rağmen tüketim hızı hemen hemen aynı, şeker kullanım oranı ise daha yüksek çıkmıştır (%90.584).

Çizelge 4.27. Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

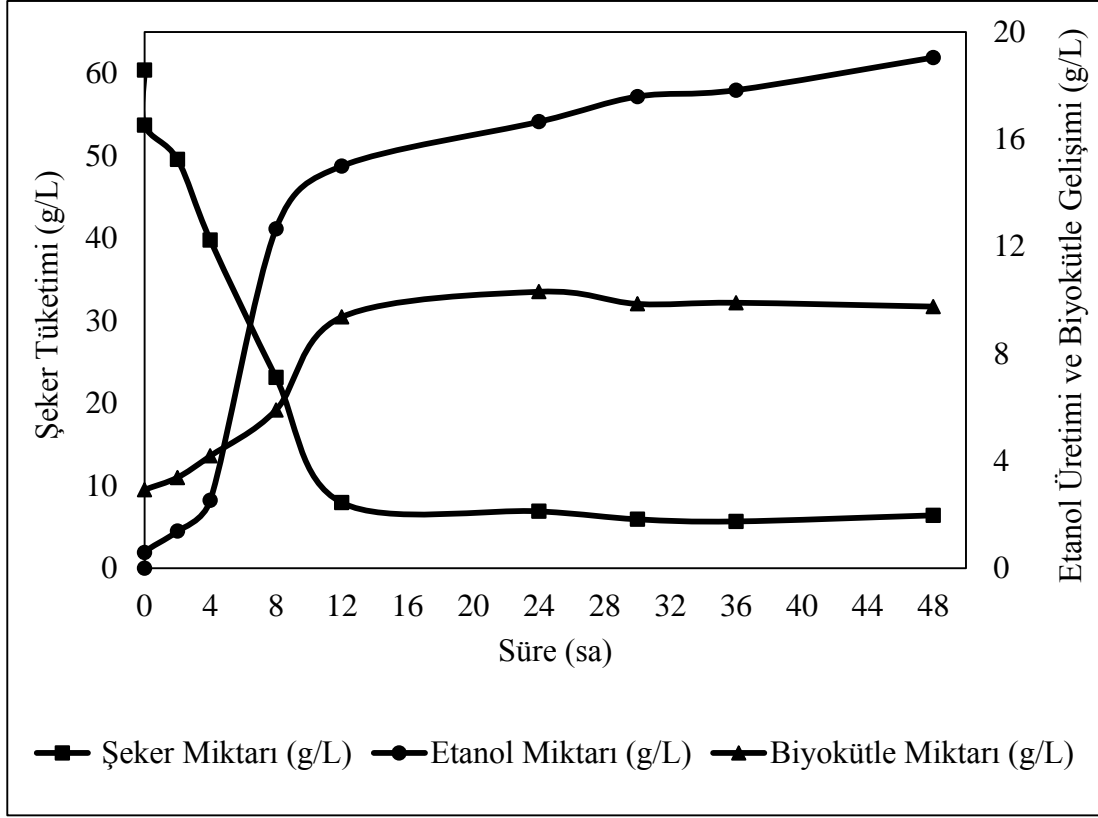
Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)	Biyokütle Miktarı (g/L)
B	60.360 <sup>a</sup> ±2.665	0.000 <sup>c</sup> ±0.000	0.000 <sup>d</sup> ±0.000
0	53.714 <sup>a</sup> ±3.122	0.588 <sup>c</sup> ±0.148	2.933 <sup>c</sup> ±0.535
2	49.555 <sup>ab</sup> ±2.211	1.385 <sup>c</sup> ±0.385	3.386 <sup>c</sup> ±0.451
4	39.771 <sup>b</sup> ±3.791	2.535 <sup>c</sup> ±0.315	4.189 <sup>bc</sup> ±0.491
8	23.121 <sup>c</sup> ±8.969	12.663 <sup>b</sup> ±0.588	5.905 <sup>b</sup> ±0.572
12	7.961 <sup>d</sup> ±0.401	15.000 <sup>a</sup> ±3.150	9.370 <sup>a</sup> ±0.923
24	6.911 <sup>d</sup> ±0.038	16.650 <sup>a</sup> ±2.850	10.312 <sup>a</sup> ±1.006
30	5.941 <sup>d</sup> ±0.071	17.590 <sup>a</sup> ±1.490	9.859 <sup>a</sup> ±0.952
36	5.684 <sup>d</sup> ±0.416	17.830 <sup>a</sup> ±1.430	9.903 <sup>a</sup> ±0.850
48	6.421 <sup>d</sup> ±0.810	19.045 <sup>a</sup> ±0.695	9.759 <sup>a</sup> ±0.999

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

Çizelge 4.28. Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	54.677	g/L
Etanol Üretimi	18.458	g/L
Verim	33.758	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	4.135	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	1.507	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.588	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.100	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	6.931	h
Şeker Kullanım Oranı	90.584	%

Steril olmayan zenginleştirilmiş besiyeri kullanılarak biyofilm reaktörde gerçekleştirilen etanol fermentasyonuna ait fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Şekil 4.23’te gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyeri kullanılarak biyofilm reaktörde etanol fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermentasyona ait toplan indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Çizelge 4.29’da gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, fermentasyonun 24. saatinde şeker seviyesi 7.897 g/L’ye kadar düşmüş, ilerleyen saatlerde 7.446 g/L kalıntı şekerin mayalar tarafından kullanılmadığı tespit edilmiştir. Şeker tüketimine bağlı olarak aynı saatte 17.125 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir. Maksimum üretilen etanol miktarı ve maksimum biyokütle gelişimi sırasıyla 48. saatte 20.1 g/L ve 36. saatte 8.684 g/L olarak bulunmuştur. Ayrıca fermentasyon süresi 24-30 saat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.29. Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonun şeker tüketimi, etanol üretimi ve biyokütle gelişimi

Süre (sa)	Şeker Miktarı (g/L)	Etanol Miktarı (g/L)	Biyokütle Miktarı (g/L)
B	58.756 <sup>a</sup> ±2.951	0.000 <sup>d</sup> ±0.000	0.000 <sup>f</sup> ±0.000
0	57.405 <sup>a</sup> ±2.555	0.533 <sup>d</sup> ±0.032	1.436 <sup>e</sup> ±0.033
2	55.072 <sup>a</sup> ±1.291	1.015 <sup>d</sup> ±0.275	1.689 <sup>e</sup> ±0.034
4	48.829 <sup>b</sup> ±0.673	3.180 <sup>d</sup> ±0.930	2.387 <sup>d</sup> ±0.081
8	38.014 <sup>c</sup> ±0.029	6.900 <sup>c</sup> ±0.800	4.145 <sup>c</sup> ±0.345
12	24.676 <sup>d</sup> ±2.695	12.750 <sup>b</sup> ±2.300	7.042 <sup>b</sup> ±0.147
24	7.897 <sup>e</sup> ±0.065	17.125 <sup>a</sup> ±0.225	8.674 <sup>a</sup> ±0.160
30	7.918 <sup>e</sup> ±0.101	19.950 <sup>a</sup> ±1.750	8.541 <sup>a</sup> ±0.060
36	7.446 <sup>e</sup> ±0.229	19.675 <sup>a</sup> ±1.625	8.684 <sup>a</sup> ±0.010
48	7.639 <sup>e</sup> ±0.308	20.100 <sup>a</sup> ±0.800	8.517 <sup>a</sup> ±0.063

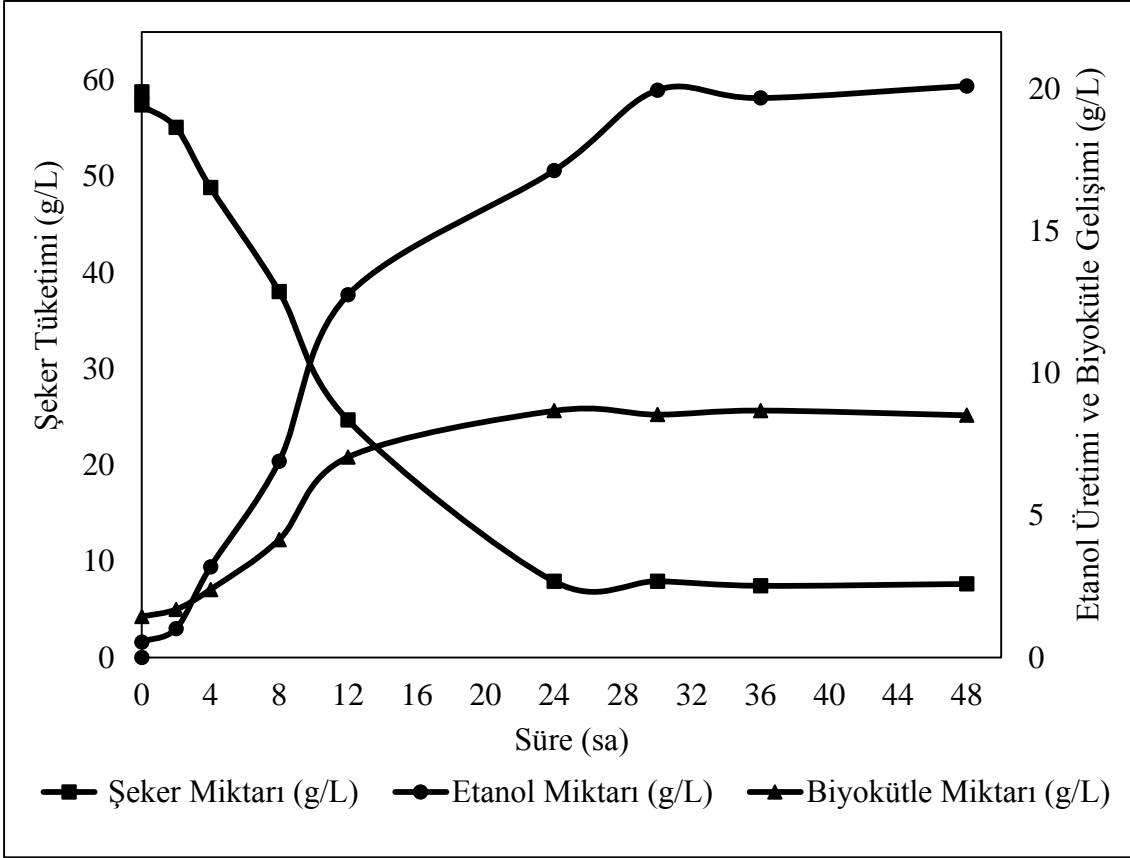
Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ( $P<0.05$ )

Optimum koşullarda steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler Çizelge 4.30'da verilmiştir. Şeker tüketimi, etanol üretimi, verim, tüketim hızı, üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla 51.31 g/L, 19.568 g/L, %38.136, 2.137 g/L/h, 0.659 g/L/h ve %87.328 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre verim, tüketim hızı, üretim hızı ve etanol üretimi açısından optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona göre daha düşük elde edilirken non-steril zenginleştirilmiş besiyerine göre verim açısından daha yüksek sonuç tespit edilmiştir. Ayrıca şeker kullanım oranı steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerine göre düşük elde edilirken optimum koşullarda zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona göre hemen hemen aynı sonuç elde edilmiştir.

Çizelge 4.30. Optimum koşullarda zenginleştirilmemiş ve steril olmayan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Değer	Birim
Şeker Tüketimi	51.310	g/L
Etanol Üretimi	19.568	g/L
Verim	38.136	%
Maksimum Tüketim Hızı (-ds/dt) <sub>max</sub>	2.137	g/L/h
Maksimum Üretim Hızı (dp/dt) <sub>max</sub>	0.659	g/L/h
Maksimum Gelişim Hızı (dx/dt) <sub>max</sub>	0.327	g/L/h
Spesifik Gelişim Hızı	0.072	h <sup>-1</sup>
İkiye Katlanma Süresi (t <sub>d</sub> )	9.627	h
Şeker Kullanım Oranı	87.328	%

Steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde tekrarlanan-kesikli fermentasyon yoluyla biyofilm reaktörde gerçekleştirilen etanol fermentasyonuna ait fermentasyon süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.24. Steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen etanol fermentasyonu

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak tekrarlanan-kesikli fermentasyon (repeated-batch fermentation or semi-continuous fermentation) yöntemiyle biyofilm reaktörde (Ek-4) etanol üretimleri üzerine keçiyoynuzu ekstraktının başlangıç şeker içeriği, besiyerinde pH değeri ve karıştırma hızının etkisi incelenmiştir. Öncelikle mayaların yüzeylere tutunarak biyofilm oluşumunu sağlamak ve hücre yoğunluğunu artırarak fermentasyon süresini kısaltmak amacıyla kullanılan plastik kompozit destek materyali belirlenmiştir. Bu amaçla 4 farklı biyofilm materyali kullanılmış ve aralarından SH-SF-YE-BA-SALTS bileşenlerinden oluşan Plastik Kompozit Destek (PKD) materyali seçilmiştir. Başlangıç şeker içeriği 8°Bx olan keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen biyofilm materyali belirleme işleminde, seçilen biyofilm destek materyalinin verim, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %46.69, 5.4578 g/L/h, 2.914 g/L/h ve %91.187 olarak belirlenmiştir. PKD materyali biyoreaktörün şaftına bağlandıktan (Şekil 3.1) ve biyoreaktör steril edildikten sonra 7 gün boyunca biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla taze steril besiyeri ilave edilmiştir (Bölüm 3.2.2). Bu aşamadan sonra Box-Behnken cevap yüzey metodunun belirlediği koşullarda fermentasyonlar gerçekleştirilerek etanol üretimlerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum koşulları belirlemek amacıyla yapılan fermentasyonlar sırasında biyofilmlerin tutunma, gelişme ve ayrılma safhaları da gözlemlenmiştir (Ek-5). Fermentasyon sonuçları analiz edilerek hesaplanan regresyon katsayıları incelendiğinde verim ve üretim hızı değerleri için başlangıç şeker içeriğinin önemli ( $P<0.05$ ) olduğu, karıştırma hızı ve besiyerinde pH değerinin önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar verim ve üretim hızı değerleri göz önüne alınarak Minitab 13.3 istatistik programında optimize edilmiştir. Sonuç olarak; 7.71 °Bx başlangıç şeker içeriği, 5.18 besiyerinde pH değeri ve 120 rpm karıştırma hızı keçiyoynuzu ekstraktından tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde etanol üretimlerin optimum koşulları olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen doğrulama denemeleri sonucunda verim, etanol üretimi, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %48.587, 24.513 g/L, 4.164 g/L/h, 2.142 g/L/h ve %87.327 olarak saptanmıştır. Ayrıca yüksek biyokütle yoğunluğu ve biyofilm destek materyali yüzeyine tutunan biyofilmler nedeniyle fermentasyon süresi 12 saat olarak belirlenmiş ve bu saatte ortamda bulunan biyokütle miktarı 9.363 g/L olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda maksimum biyokütle gelişimi, fermentasyonun 30. saatinde 9.982 g/L olarak belirlenmiştir.

Optimum koşullarda azot kaynağı olarak sadece maya ekstraktının kullanıldığı, sadece amonyum sülfatın kullanıldığı ve besiyeri bileşiminde herhangi bir azot kaynağının kullanılmadığı durumlarda da fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Azot içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda verim, etanol üretimi, maksimum şeker tüketim hızı maksimum etanol üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %42.516, 23.495g/L, 2.103 g/L/h, 1.031 g/L/h ve %88.99 olarak belirlenmiştir. Besiyerinde maya ekstraktı kullanılmadan en iyi koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonda verim, etanol üretimi, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla %42.483, 21.795 g/L, 2.214 g/L/h, 0.999 g/L/h ve %86.222 olarak tespit edilmişken bu değerler optimum koşullarda amonyum sülfat içermeyen

besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlar için sırasıyla %43.734, 24.115 g/L, 2.33 g/L/h, 1.053 g/L/h ve %87.211 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak; besiyerine maya ekstraktı ilave edilmeden gerçekleştirilen fermentasyonlar, azotsuz ve amonyum sülfatsız besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlara göre daha düşük verim, etanol üretimi, üretim hızı ve şeker kullanım oranı elde edilmiştir. Şeker kullanım oranı en fazla azotsuz besiyerinde gerçekleşirken verim, etanol üretimi, maksimum tüketim ve üretim hızı değerleri en yüksek amonyum sülfat içermeyen besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilmiştir. Dolayısıyla maya ekstraktının besiyeri bileşimine ilave edilmesiyle fermentasyon sonuçlarında önemli değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilen sonuçların azot kaynaklarına bağlı olarak gerçekleştirilen sonuçlardan yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumdan, besiyerinde azot kaynaklarının kullanılmasının mikroorganizmalar açısından önemi anlaşılmıştır.

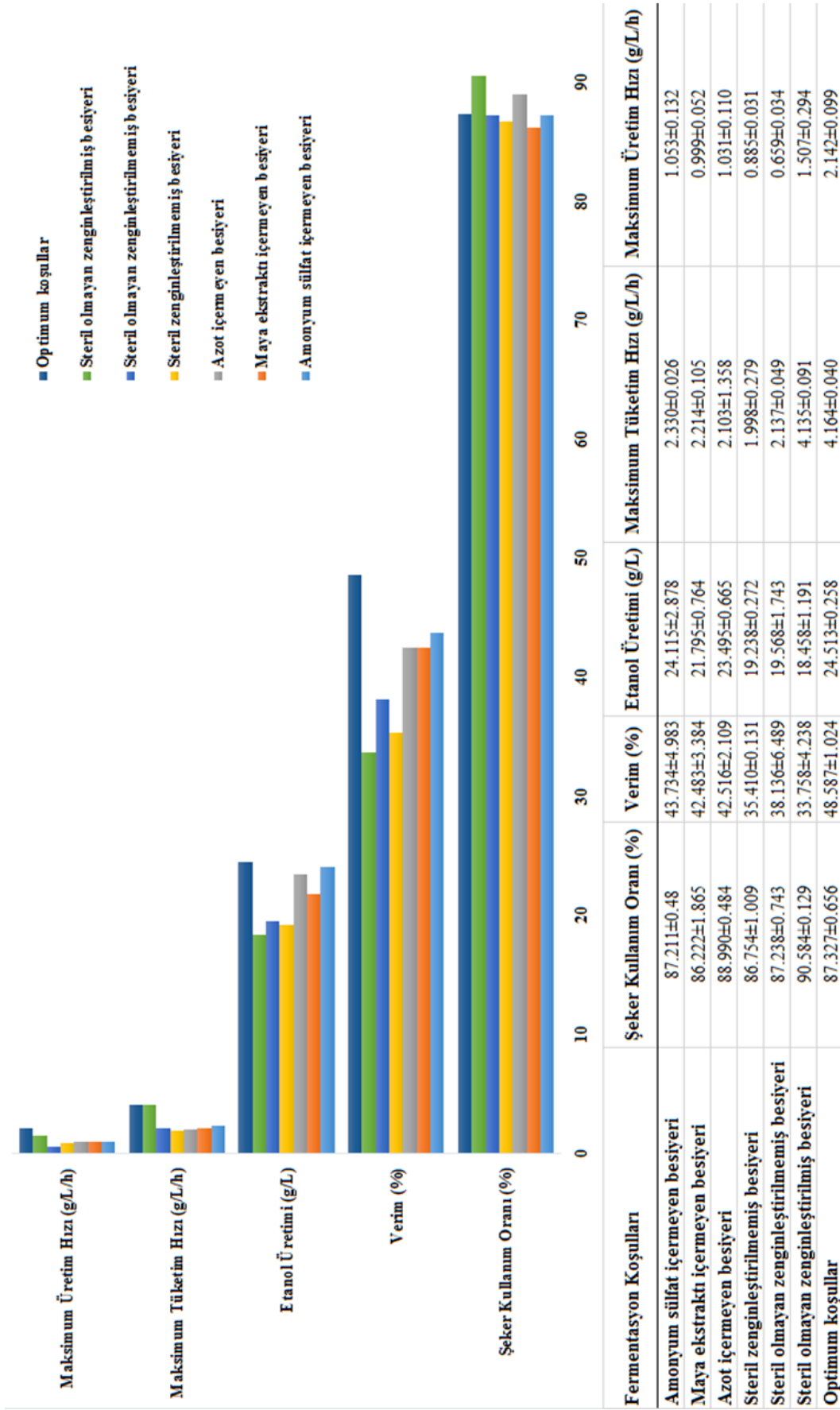
Biyofilm reaktörde zenginleştirilmemiş keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda şeker tüketimi, verim, etanol üretimi, maksimum şeker tüketim hızı, maksimum etanol üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla 54.328 g/L, %35.41, 19.238 g/L, 1.998 g/L/h, 0.885 g/L/h ve %86.753 olarak belirlenmiştir. Ayrıca fermentasyon süresi 24 saate düşerken en yüksek biyokütle miktarı 24. saatte 8.96 g/L olarak tespit edilmiştir. Besiyeri bileşimine mineral maddelerin ve azot kaynaklarının ilave edilmemesi durumunda verim, üretim hızı, tüketim hızı ve etanol üretiminin optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon sonuçlarına göre önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir.

En iyi şartlarda steril olmayan zenginleştirilmiş ve zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen denemelerde daha yüksek etanol üretim hızı, şeker tüketim hızı ve şeker kullanım oranı belirlenirken verim ve etanol üretim miktarı, steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerine göre düşük elde edilmiştir. Steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda elde edilen şeker tüketimi, verim, etanol üretimi, şeker tüketim hızı, etanol üretim hızı ve şeker kullanım oranı sırasıyla 54.677 g/L, %33.758, 18.458 g/L, 4.135 g/L/h, 1.507 g/L/h ve %90.584 olarak saptanırken steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda bu değerler sırasıyla 51.31 g/L, %38.136, 19.568 g/L, 2.137 g/L/h, 0.659 g/L/h ve %87.328 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca fermentasyon süresi steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde 12-24 saat arasında belirlenirken steril olmayan zenginleştirilmemiş besiyerinde 24-30 saat olarak belirlenmiştir. Bununla beraber steril olmayan zenginleştirilmiş besiyerinde daha fazla biyokütle miktarı belirlenmiş ve maksimum biyokütle gelişimi fermentasyonun 24. saatinde 10.312 g/L olarak belirlenmiştir. Tüm fermentasyon sonuçlarında elde edilen kinetik parametrelerin optimum koşullardan elde edilen sonuçlara göre kıyaslanması Şekil 5.1'de verilmiştir. Fermentasyonların sonunda biyofilm destek materyallerinin yüzeyine tutunan mikroorganizmaların sterio mikroskopta fotoğrafları çekilmiş ve Ek-7'de gösterilmiştir.

Elde edilen tüm bulgulara göre; farklı °Bx değerindeki keçiyoynuzu ekstraktı, tekrarlanan-kesikli fermentasyon metodu ile biyofilm reaktörde *Saccharomyces*



*cerevisiae* mayası kullanılarak etanol üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabildiğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışma sonucunda *S. cerevisiae* mayaları ile biyofilm reaktörde gerçekleştirilen etanol fermentasyonunda, fermentasyon süresinin 12 saat olarak belirlendiği ve mayalardan oluşan biyofilmlerin 160 (5 ay 10 gün) gün boyunca başarılı bir şekilde kontamine olmadan etanol fermentasyonunda kullanılabildiği belirlenmiştir. Bunun da biyofilm reaktörün üstün stabilite özelliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Fermentasyon süresinin 12 saate düşmesine neden olan etkenlerin; ortamda bulunan yüksek hücre yoğunluğu (Ek-6) ve biyofilm destek materyali yüzeyine tutunan mayaların oluşturduğu biyofilmler olarak belirlenmiştir. Ayrıca ortamda yüzeylere tutunan biyofilmlerin bulunması nedeniyle tekrar inokülasyon ihtiyacı ortadan kalkmıştır. Bununla beraber elde edilen sonuçlar, keçiboynuzu meyvesinin biyoteknolojik proseslerde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Yine sonuçların endüstriye aktarılabilir özellikte ve ölçek büyütme çalışmalarında kullanılabilecek ve gelecek çalışmalara da temel oluşturabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir. Tüm bunların yanı sıra *S. cerevisiae* mayası kullanılarak tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle biyofilm reaktörde yapılan çalışmanın biyofilm reaktörde sürekli fermentasyon (continuous fermentation) yöntemiyle de yapılabileceği öngörülmektedir.



Şekil 5.1. Tüm fermentasyon sonuçlarından elde edilen kinetik parametrelerin optimum koşullara göre kıyaslanması

## 6. KAYNAKLAR

- ACAROĞLU, M., OĞUZ, H. ve ÜNALDI, M., 2004, Türkiye için Alternatif Bir Yakıt: Biyoetanol, Yakıt Olarak Kullanımı ve Emisyon Değerleri, Biyoenerji Sempozyumu, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
- ACUÑA, M.E., VILLANUEVA, C., CARDENAS, B., CHRISTEN, P. and REVAH, S. 2002. The effect of nutrient concentration on biofilm formation on peat and gas phase toluene biodegradation under biofiltration conditions. *Process Biochemistry*, 38 (1): 7-13.
- AHMED, A.M. 20011. Çeşitli dallı darı türlerinin biyoetanol üretimi için kullanılabilirliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye, 101 s.
- ALLAN, V.J., CALLOW, M.E., MACASKİE, L.E. and PATERSON-BEEDLE, M. 2002. Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology*, 148 (1): 277-288.
- ANDREWS, G.F. and FONTA, J.P. 1989. A fluidized-bed continuous bioreactor for lactic acid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 20 (1): 375-390.
- ANONİM 2014. <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Erişim Tarihi: 22.05.2014
- ANONİM 2014. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>; Erişim Tarihi: 17.06.2014
- ANONİM 2014. <http://www.tuik.gov.tr/> Erişim Tarihi: 25.05.2014
- ANONİM 2014. <http://www.biofilm.montana.edu>. Erişim Tarihi: 16.03.2014
- ATASOY, A.F. 2009. The effects of carob juice concentrates on the properties of yoghurt. *International journal of dairy technology*, 62 (2): 228-233.
- BALAT, M. and BALAT, H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 86: 2273-2282.
- BALAT, M. 2007. Global bio-fuel processing and production trends. *Energy, Exploration and Exploitation*, 25: 195-218.
- BATTLE, I. and TOUS, J. 1997. Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.). International Plant Genetic Resources Institute. Via delle Sette Chiese 142 00145 Rome, Italy, 97 p.
- BİNER, B., GUBBUK, H., KARHAN, M., AKSU, M., and PEKMEZCİ, M. 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food chemistry*, 100 (4): 1453-1455.
- BOBER, J. and DEMİRCİ, A. 2004. Nisin fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using plastic composite supports in biofilm reactors.

- BROCK, T.D. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer Associates Incorporated, Sunderland, England, 308 p.
- BROWN, R.C. 2003. *Biorenewable Resources: engineering new products from agriculture*. Blackwell Publishing, Ames, 269 p.
- BULUT, S., ELİBOL, M., and OZER, D. 2004. Effect of different carbon sources on L (+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21 (1): 33-37.
- BURMØLLE, M., WEBB, J.S., RAO, D., HANSEN, L.H., SØRENSEN, S.J. and KJELLEBERG, S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 72 (6): 3916-3923.
- CAO, N., DU, J., CHEN, C., GONG, C.S. and TSAO, G.T. 1997. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using rotary biofilm contactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 63 (1): 387-394.
- CAO, N., DU, J., GONG, C.S. and TSAO, G.T. 1996. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column. *Applied and environmental microbiology*, 62 (8): 2926-2931.
- CARVALHEIRO, F., MONÍZ, P., DUARTE, L.C., ESTEVES, M.P., and GÍRIO, F.M. 2011. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 38 (1): 221-227.
- CELİK, S. (2010). Production and evaluation of set-type yogurts with carob bean molasses. *Milchwissenschaft*, 65 (4): 400-403.
- CHARACKLIS, W.G. and MARSHALL, K.C. 1990. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. *Biofilms*, 3-15.
- CHEN, J.P., WU, K.W. and FUKUDA, H. 2008. Bioethanol production from uncooked raw starch by immobilized surface-engineered yeast cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, 145 (1-3): 59-67.
- CHENG, K.C., CATCHMARK, J.M. and DEMİRCİ, A. 2009. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose*, 16 (6): 1033-1045.
- CHENG, K.C., CATCHMARK, J.M. and DEMİRCİ, A. 2009. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis. *Journal of Biological Engineering*, 3: 12.
- CHENG, K.C., DEMİRCİ, A. and CATCHMARK, J.M. 2010. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Applied microbiology and biotechnology*, 87 (2): 445-456.

- CHENG, K.C., DEMİRCİ, A. and CATCHMARK, J.M. 2010. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 86 (3): 853-861.
- CHENG, K.C., DEMİRCİ, A. and CATCHMARK, J.M. 2010. Enhanced pullulan production in a biofilm reactor by using response surface methodology. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 37 (6): 587-594.
- CHENG, K.C., LİN, J.T., WU, J.Y. and LIU, W.H. 2010. Isoflavone conversion of black soybean by immobilized *Rhizopus spp.* *Food Biotechnology*, 24 (4): 312-331.
- CHMIELEWSKI, R.A.N. and FRANK, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2 (1): 22-32.
- CHRISTENSEN, B.E. and CHARACKLIS, W.G. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. *Biofilms*, 93-130.
- CHUNG, I.J. and PARK, Y.S. 1983. Ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in a bioreactor packed vertically with ceramic rods. *Proc. Pac Chem Eng Congr, 3rd edn. Korean Institute of Chemical Engineering, Seoul, Korean*, 4: 174-179
- CONVERTI, A., DE FAVERI, D., PEREGO, P., DOMINIGUEZ, J.M., CARVALHO, J.C. M., PALMA, M.S.A. and DEL BORGHI, M. 2006. Investigation on the transient conditions of a rotating biological contactor for bioethanol production. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 20 (4): 401-406.
- COTTON, J., POMETTO, A. and GVOZDENOVIC-JEREMIC, J. 2001. Continuous lactic acid fermentation using a plastic composite support biofilm reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 57 (5-6): 626-630.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K.L. and FENNEMA, O.R. 2008. Fennema's Food Chemistry. CRC Pres, New York, 1119 p.
- DEL BORGHI, M., CONVERTI, A., PARISI, F. and FERRAILOLO, G. 1985. Continuous alcohol fermentation in an immobilized cell rotating disk reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 27 (6): 761-768.
- DEMİRBAS, M.F., and BALAT, M. 2006. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective. *Energy Conversion and Management*, 47 (15): 2371-2381.
- DEMİRCİ, A., POMETTO III, A.L. and HO, K.G. 1997. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19 (4): 299-304.
- DEMİRCİ, A., POMETTO III, A.L. and JOHNSON, K.E. 1993. Evaluation of biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. *Applied microbiology and biotechnology*, 38 (6): 728-733.

- DEMİRCİ, A., POMETTO, A.L. and JOHNSON, K.E. 1993. Lactic acid production in a mixed-culture biofilm reactor. *Applied and environmental microbiology*, 59 (1): 203-207.
- DEMİRCİ, A., PONGTHARANGKUL, T. and POMETTO III, A.L. 2008. Applications of biofilm reactors for production of value-added products by microbial fermentation. *Biofilms in the Food Environment*, 167-190.
- DEVRES, Y.O., ve PALA, M. 1993. Gıda sanayisinde matematiksel modellemelerin önemi ve uygulama alanları. *Gıda*, 18 (3): 173-181.
- DORAN, P. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, San Diego, 497 p.
- DUMSDAY, G.J., ZHOU, B., BUHMANN, S., STANLEY, G.A. and PAMMENT, N.B. 1997. Continuous ethanol production by *Escherichia coli* KO11 in continuous stirred tank and fluidized bed fermenters. *Australasian Biotechnology*, 7 (5): 300-303.
- EBİHARA, T. and BİSHOP, P.L. 2002. Effect of acetate on biofilms utilized in PAH bioremediation. *Environmental engineering science*, 19 (5): 305-319.
- EJIOFOR, A.O., SOLOMON, B.O., POSTEN, C. and DECKWER, W.D. 1994. Analysis of the Respiro-Fermentative Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Glucose in a Fed-Batch Fermentation Strategy for Accurate Parameter Estimation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 664-669.
- ERCAN, D. and DEMİRCİ, A. 2013. Current and future trends for biofilm reactors for fermentation processes. *Critical reviews in biotechnology*, (0): 1-14.
- EREN, İ. 2004. Patateslerin osmotik dehidrasyonunun “Response Surface” metodu kullanılarak optimizasyonu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 120 s.
- ERTUGAY, Z. ve CERTEL, M. 1995. *Biyoteknoloji I*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın No: 135, Erzurum.
- FLEMMİNG, H. C. and WİNGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (9): 623-633.
- FUKUDA, H. 1994. Immobilized microorganism bioreactors. *ASENJO, JA; MERCHUK, JC Bioreactor system design*, 339-375.
- GEESEY, G.G. and BRYERS, J.D. 2000. Biofouling of engineered materials and systems. *Biofilms II: process analysis and applications*, 237-279.
- GILSON, C.D. and THOMAS, A. 1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62: 38-45.

- GÜN, İ. ve EKİNCİ, F.Y. 2009. Biyofilmler: Yüzeylelerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34 (3): 165-173
- HO, K.G., POMETTO, A.I., HİNZ, P.N. and DEMİRCİ, A. 1997a. Nutrient leaching and end product accumulation in plastic composite supports for L-(+)-Lactic Acid biofilm fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 63 (7): 2524-2532.
- HO, K.L., POMETTO, A.L. and HİNZ, P.N. 1997b. Optimization of L-(+)-lactic acid production by ring and disc plastic composite supports through repeated-batch biofilm fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 63 (7): 2533-2542.
- HO, K.L., POMETTO, A.L., HİNZ, P.N., DİCKSON, J.S. and DEMİRCİ, A. 1997c. Ingredient selection for plastic composite supports for L-(+)-Lactic acid biofilm fermentation by *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*. *Applied and environmental microbiology*, 63 (7): 2516-2523.
- HORIUCHİ, J.I., TABATA, K., KANNO, T. and KOBAYASHİ, M. 2000. Continuous acetic acid production by a packed bed bioreactor employing charcoal pellets derived from waste mushroom medium. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89 (2): 126-130.
- HUI, Y.S., AMİRUL, A.A., YAHYA, A.R. and AZİZAN, M.N.M. 2010. Cellulase production by free and immobilized *Aspergillus terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (1): 79-84.
- HUTKİNS, R.W. (2008). Microbiology and technology of fermented foods (Vol. 22), John Wiley and Sons.
- İMRE, F. 1973. The production of fungal protein from Carob in Cyprus. *J.Sci. Food Agric.*, 24: 639.
- JİANLONG, W. 2000. Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC). *Bioresource technology*, 75 (3): 245-247.
- JİN, G., ENGLANDE J.R., A.J. and QİU, Y.L. 2003. An integrated treatability protocol for biotreatment/bioremediation of toxic pollutants generated by chemical industries. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 38 (4): 597-607.
- KANG, S.W., KİM, S.W. and LEE, J.S. 1995. Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. *Applied biochemistry and biotechnology*, 53 (2): 101-106.
- KARKACIER, M. ve ARTIK, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) Fiziksel Özellikleri, Kimyasal Bileşimi ve Ekstraksiyon Koşulları, *Gıda*, 20 (3): 131-136.
- KHİYAMİ, M.A., POMETTO, A.L. and KENNEDY, W.J. 2006. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in plastic composite support biofilm

- stirred tank bioreactors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (5): 1693-1698.
- KING, R.D. and CHEETHAM, P.S.J. 1987. Food Biotechnology 1. Elsevier Applied Science, London, 321 p.
- KUEHL, R.O. 2000. Design of experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. Duxbury Press, California, 661 p.
- KUL, S. 2004. Cevap Yüzey Yöntemleri, Yüksek Lisans Tezi, Mersin, Türkiye, 89 s.
- KUNDURU, M.R. and POMETTO III, A.L. 1996. Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Journal of industrial microbiology*, 16 (4): 249-256.
- KUNDURU, M.R. and POMETTO III, A.L. 1996. Evaluation of plastic composite-supports for enhanced ethanol production in biofilm reactors. *Journal of industrial microbiology*, 16 (4): 241-248.
- LAZAROVA, V. and MANEM, J. 2000. Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment. *Chem. Inform*, 31 (32).
- 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 and Industrial Research*, 66 (8): 618.
- MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall PTR, New Jersey, 989 p.
- MANSO, T., NUNES, C., RAPOSO, S., and LIMA-COSTA, M.E. 2010. Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 37 (11): 1145-1155.
- MELO, L.F. and OLIVEIRA, R. 2001. Biofilm reactors. In: Cabral JMS, Mota MM, Tramper J (eds) Multiphase bioreactor design. Taylor and Francis Inc., New York, 271–308 p.
- 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (9): 1209-1215.
- MENON, V. and RAO, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38: 522-550.
- MERWIN, M.L. 1981. The culture of Carob (*Ceratonia siliqua*) for food, fooder and fuel in semiarid environments. International Tree Crops Institute USA Inc., CA.



- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3): 426-428.
- MUFFLER, K., LAKATOS, M., SCHLEGEL, C., STRIETH, D., KUHNE, S. and ULBER, R. 2014. Application of biofilm bioreactors in white biotechnology. DOI: 10.1007/10\_2013\_267.
- MULCHANDANI, A., LUONG, J.H. and LEDUY, A. 1989. Biosynthesis of pullulan using immobilized *Aureobasidium pullulans* cells. *Biotechnology and bioengineering*, 33 (3): 306-312.
- MURGA, R., STEWART, P.S. and DALY, D. (1995). Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnology and bioengineering*, 45 (6): 503-510.
- 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 p.
- NAKASHIMA, T., FUKUDA, H., KYOTANI, S. and MORIKAWA, H. 1988. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *Journal of fermentation technology*, 66 (4): 441-448.
- NAKASHIMA, T., FUKUDA, H., KYOTANI, S. and MORIKAWA, H. 1988. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *Journal of fermentation technology*, 66 (4): 441-448.
- O'FLAHERTY, V. 2003. Biofilm in wastewater treatment. In: Lens P (ed) Biofilms in medicine, industry and environmental biotechnology: characteristics, analysis and control. IWA Publishing, pp. 132–159, London.
- ORIEL, P. 1988. Immobilization of recombinant *Escherichia coli* in silicone polymer beads. *Enzyme and microbial technology*, 10 (9): 518-523.
- OZMIHCI, S. and KARGI, F. 2009. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 84 (1): 106-111.
- PARK, Y.H., KIM, E.Y., SEO, W.T., JUNG, K.H. and YOO, Y.J. 1989. Production of cephalosporin C in a fluidized-bed bioreactor. *Journal of fermentation and bioengineering*, 67 (6): 409-414.
- PARK, Y.H. and WALLIS, D.A. 1984. Steady-state performance of a continuous biofilm fermentor system for penicillin production. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 1 (2): 119-128.
- PARK, Y.S. and TODA, K. 1992. Multi-stage biofilm reactor for acetic acid production at high concentration. *Biotechnology letters*, 14 (7): 609-612.

- PATCHING, J.W. and FLEMING, G.T.A. 2003. Industrial biofilms: formation, problems and control. *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology*, IWA Publishing, UK, 568-572.
- PIMENTEL, D. and PATZEK, T.W. 2005. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*. 14 (1): 55-67.
- PONGTHARANGKUL, T. and DEMİRCİ, A. 2006a. Effects of fed-batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 73 (1): 73-79.
- PONGTHARANGKUL, T. and DEMİRCİ, A. 2006b. Effects of pH profiles on nisin production in biofilm reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 71 (6): 804-811.
- PONGTHARANGKUL, T. and DEMİRCİ, A. 2006c. Evaluation of Culture Medium for Nisin Production in a Repeated-Batch Biofilm Reactor. *Biotechnology progress*, 22 (1): 217-224.
- QURESHI, N., ANNOUS, B.A., EZEJI, T.C., KARCHER, P. and MADDOX, I.S. 2005. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories*, 4 (1): 24.
- QURESHI, N., BRİNING, H., İTEN, L., DİEN, B., NİCHOLS, N., SAHA, B. and COTTA, M.A. 2004, October. Adsorbed cell dynamic biofilm reactor for ethanol production from xylose and corn fiber hydrolysate. In *The 36th Great Lakes Regional Meeting of the American Chemical Society, Peoria, IL, October 17–20*.
- SABLANI, S.S., RAHMAN, M.S., DATTA, A.K. and MUJUMDAR, A.S. 2006. Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques. CRC Press, New York, USA.
- 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 (11): 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.
- SEÇMEN, Ö. 1974. *Ceratonia siliqua* L.' nin Ekolojisi. *Bitki*, 1 (4): 533-543. İzmir
- SEÇMEN, Ö. 1975. Studies In The Biosystematics of *Ceratonia siliqua* L. Proceedings of The Third MPP Meeting. Izmir, Turkey.
- SEKERI-PATARYAS, K.H., MITRAKOS, K.A. and GEORGI, M.K. 1973. Yields of fungal protein from Carob sugars. *Econ. Bot.* 27: 311-319.

- SHETTY, K., PALIYATH, G., POMETTO, A., and LEVIN, R.E. 2006. Food Biotechnology Second Edition. CRC Press, Broken Sound Parkway NW, USA, 1982 p.
- SHULER, M.L. and KARGI, F. 2008. Bioprocess Engineering, Basic Concepts.. Prentice Hall PTR, New Jersey, 535 p.
- SMITH J.E. 2004. Biotechnology. Cambridge University Pres, New York, 284 p.
- STANBURY, P.F., WHITAKER, A. and HALL, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. Butterworth-Heinemann Press, Burlington, MA, 351 p.
- STANBURY, P.F. and WHITAKER, A. 1984. Principles of Fermentation Technology. Academic Press. 247 p.
- SUN, Y. and CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83: 1-11.
- TUNAIL, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 448 s.
- TURHAN, I. 2009. Keçiboynuzu meyvesinden fermentasyon yoluyla laktik asit ve etanol üretimi. Doktora Tezi, Antalya, Türkiye, 200 s.
- TURHAN, I. 2012. Keçiboynuzu Ekstraktında *Aspergillus sojae*'den Mannanaz Üretimi ve Optimizasyonu. Proje No: 110 O 932, Antalya, Türkiye.
- TURHAN, I. ve KARHAN, M. 2004. Doğal bir ürün; Keçiboynuzu. *Dünya Gıda*, 12: 76-79.
- TURHAN, I., BIALKA, K.L., DEMİRCİ, A., and KARHAN, M. 2010a. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 101: 5290-5296.
- TURHAN, I., BIALKA, K.L., DEMİRCİ, A., and KARHAN, M. 2010b. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using Invertase pretreatment. *Food biotechnology*, 24 (4): 364-374.
- TURHAN, I., TETİK, N., AKSU, M., KARHAN, M. and CERTEL M. 2006. Liquid-solid extraction of soluble solids and total phenolic compounds of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Food Process Engineering*, 29: 498-507.
- TÜRKER, M. 2005. Biyoreaksiyon Mühendisliği. Özener Matbaacılık, Kocaeli, 479 s.
- TYAGİ, R.D. and GHOSE, T.K. 1982. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 24 (4): 781-795.
- URBANCE, S.E., POMETTO III, A.L., DİSPİRİTO, A.A. and DEMİRCİ, A. 2003. Medium evaluation and plastic composite support ingredient selection for biofilm

- formation and succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Food biotechnology*, 17 (1): 53-65.
- URBANCE, S.E., POMETTO III, A.L., DÍSPİRİTO, A.A. and DENLİ, Y. (2004). Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 65 (6): 664-670.
- 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.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., HEIJNEN, J.J., EBERL, H., KREFT, J. and PÍCIÖREANU, C. 2002. Mathematical modelling of biofilm structures. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81 (1-4): 245-256.
- VARDAR, Y., SEÇMEN, Ö. and ÖZTÜRK, M. 1980. Some Distributional Problems and Biological Characteristic of *Ceratonia* In Turkey. *Portuc. Acta Biol.*, (A) XVI (1-4): 75-86.
- VENKATADRİ, R., TSAİ, S.P., VUKANIC, N. and HEIN, L.B. 1992. Use of a biofilm membrane reactor for the production of lignin peroxidase and treatment of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Hazardous waste and hazardous materials*, 9 (3): 231-243.
- VON CANSTEİN, H., Lİ, Y., LEONHÄUSER, J., HAASE, E., FELSKE, A., DECKWER, W.D. and WAGNER-DÖBLER, I. 2002. Spatially oscillating activity and microbial succession of mercury-reducing biofilms in a technical-scale bioremediation system. *Applied and environmental microbiology*, 68 (4): 1938-1946.
- WAITES, M.J., MORGAN, N.L., ROCKEY, J.S. and HİGTON, G. 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science, Madlen, MA, 265 p.
- WEBB, C., FUKUDA, H. and ATKİNSON, B. 1986. The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. *Biotechnology and bioengineering*, 28 (1): 41-50.
- WİRTANEN, G., SAARELA, M. and MATTİLA-SANDHOLM, T. 2000. Biofilm-impact on hygiene in food industries. In: Bryers JD (ed) *Biofilm II: process analysis and applications*. Wiley-Liss Inc, pp. 327-372, New York.
- XU, H., LEE, H.Y. and AHN, J. 2011. Characteristics of biofilm formation by selected foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 31 (1): 91-97.
- YANG, B. and LU, Y. 2007. The promise of cellulosic ethanol production in China. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 6-10.

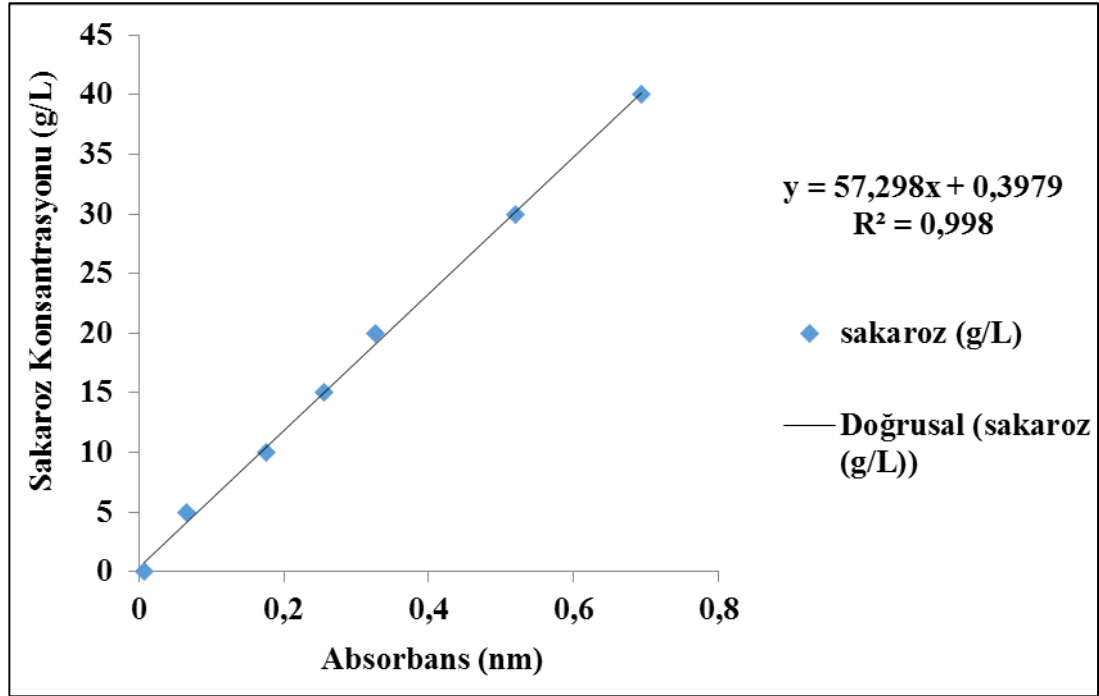
- YANG, S.T., LO, Y.M. and MİN, D.B. 1996. Xanthan Gum Fermentation by *Xanthomonas campestris* Immobilized in a Novel Centrifugal Fibrous-Bed Bioreactor. *Biotechnology progress*, 12 (5): 630-637.
- YATMAZ. E. 2012. Kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile keçiyoynuzu ekstraktında etanol üretimi şartlarının optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, Türkiye, 76 s.
- YOUSIF, A.K. and ALGHZAWI, H.M. 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*. 69: 283–287.
- ZHANG, Y., MA, Y., YANG, F. and ZHANG, C. 2009. Continuous acetone–butanol–ethanol production by corn stalk immobilized cells. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36 (8): 1117-1121.

## 7. EKLER

Ek-1. Kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiboynuzu meyvesi



Ek-2. Toplam indirgen şeker analizinde kullanılan sakaroz standart kurvesi ve verileri



Sakaroz standart kurvesinin verileri

Absorbans (575 nm)	Sakaroz Konsantrasyonu (g/L)
0,694	40
0,521	30
0,326	20
0,256	15
0,175	10
0,065	5
0,007	0

Ek-3. Biyofilm materyali belirleme işlemi sırasında çekilen fotoğraflar

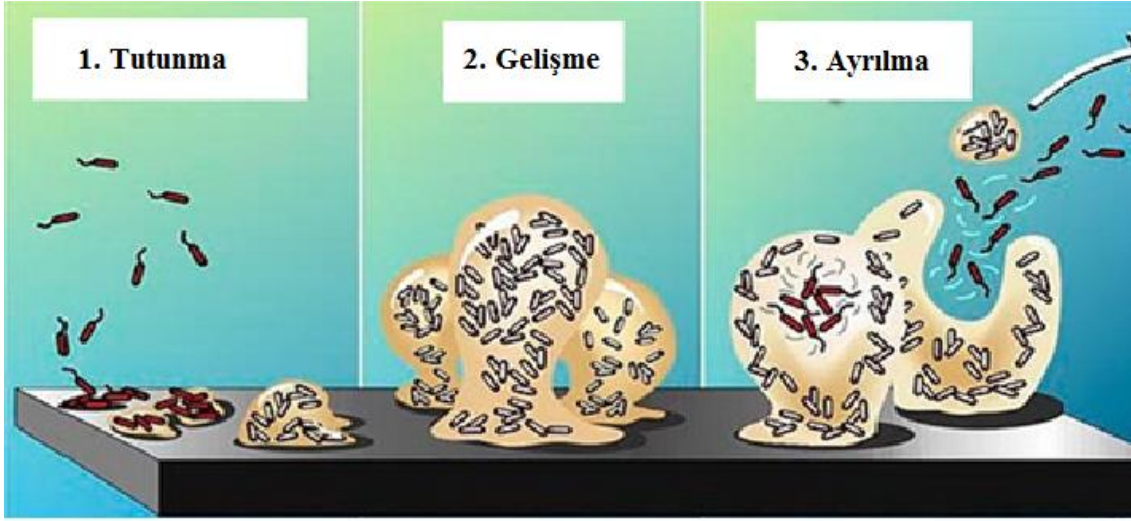




Ek-4. Fermentasyon çalışmalarında kullanılan biyofilm reaktör



Ek-5. Fermentasyon sırasında biyofilmlerin gelişim safhaları



**Tutunma**

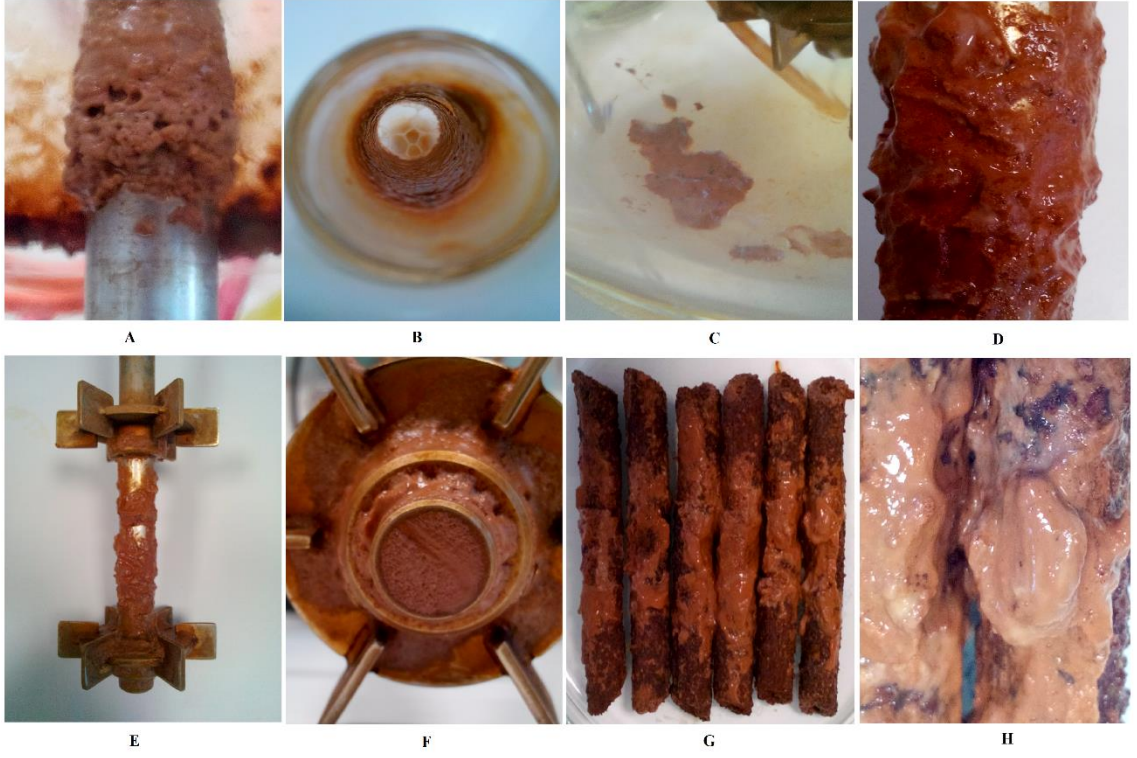


**Gelişme**



**Ayrılma**

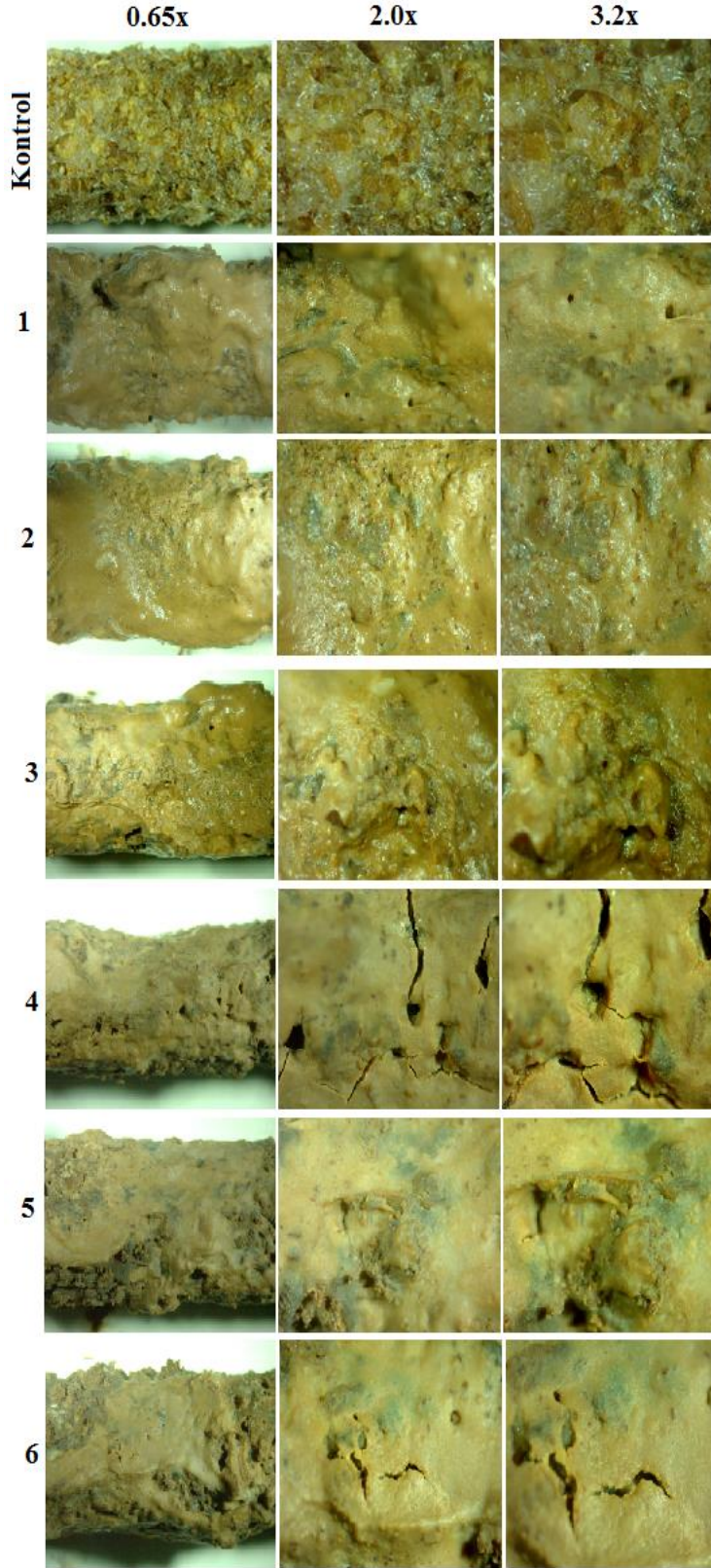
Ek-6. Biyofilm reaktör içerisindeki hücre yoğunluğunu gösteren fotoğraflar



**A, D, E:** Biyofilm reaktörün şaftı, **B:** Örnek alma kabı **C:** Biyofilm reaktörün cidarı **F:** Pervane (impeller) **G, H:** Plastik kompozit destek materyalleri



Ek-7. Fermentasyonların sonunda PKD materyallerinin yüzeyine tutunan mikroorganizmaların kontrol olarak kullanılan biyofilm materyaline karşı sterio mikroskopta çekilmiş fotoğrafları



## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Amasya'nın Merzifon ilçesinde doğmuştur. İlköğrenimini Yeni Danişment Köyü İlk Öğretim Okulu'nda, orta öğrenimini de Prof. Dr. Bahri Savcı İlk Öğretim Okulu'nda tamamlamıştır. 2007 yılında Osmancık YDA Lisesini bitirdikten sonra Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazanmış ve 2012 yılında mezun olmuştur. Eylül 2012'de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başlamıştır. 2013 yılı Aralık ayında ÖYP kapsamında Çankırı Karatekin Üniversitesine Araştırma Görevlisi olarak atanmış ve 2014 yılı Nisan ayında Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesine görevlendirilmiştir.