ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELMA POSASININ BİYOBÜTANOL ÜRETİMİNDE KULLANILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Seda YILMAZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2016

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12.02.2016

Seda YILMAZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELMA POSASININ BİYOBÜTANOL ÜRETİMİNDE KULLANILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Seda YILMAZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

Bu çalışmada, elma suyu atığı olan elma posasına uygulanan enzimatik hidrolizin, *C. beijerinckii* DSM 6422 ve *C. acetobutylicum* DSM 792 suşları ile gerçekleştirilen aseton, bütanol ve etanol (ABE) üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Sitrat tampon içerisinde değişen konsantrasyonlarda (% 2, 4, 6, 8 ve 10) hazırlanan elma posasına uygulanan iki enzim kullanılarak (Accelerase 1500 ve Pektinex UF) gerçekleştirilen enzimatik hidroliz sonrasında iki farklı *Clostridium* suşu ile bütanol ve toplam solvent üretimleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun, % 10 kurutulmuş elma posası ile hazırlanan ve süzme işlemi uygulamadan hazırlanan besiyerinde 4.24 g/L bütanol ve 5.15 g/L toplam solvent ürettiği saptanmıştır.

Şubat 2016, 42 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kurutulmuş elma posası, aseton, bütanol, etanol, ABE fermentasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

A STUDY ON BIOBUTANOL PRODUCTION FROM APPLE POMACE

Seda YILMAZ

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

Thesis Advisor: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

In the present study, enzymatic hydrolysis applied to the apple juice waste which is dried apple pulp, and its effect on the production of acetone, butanol and ethanol (ABE) by the *C. beijerinckii* DSM 6422 and *C. acetobutylicum* DSM 792 type strains, was investigated.

Butanol and total solvent production amounts of the two different *Clostridium* strains were determined within the medium prepared using two different enzymes (Accelerase 1500 and Pektinex UF) with varying concentrations of apple pomace (2 %, 4, 6, 8 and 10) in the citrate tampon. According to the obtained results, *C. beijerinckii* DSM 6422 strain produced 4.24 g/L butanol and 5.15 g/L total solvent within the medium prepared using 10 % dried apple pulp without filtering process.

February 2016, 42 pages

Key Words: Apple pomace, acetone, butanol, ethanol, ABE fermentation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, danışmanım Sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), Doç. Dr. Aslı İŞÇİ YAKAN'a (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), Dr. Simel BAĞDER ELMACI'ya (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen çalıştığım kurum UNTAŞ A.Ş'ye ve her zaman destekçim olan sevgili eşim ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

Seda YILMAZ
Ankara, Şubat 2016

İÇİNDEKİLER

ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGE DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 Bütanol ve Önemi **3**
2.2 Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) Fermentasyonu **5**
2.2.1 ABE fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmalar **5**
2.2.2 Fermentasyon inhibisyonu **6**
2.3 Bütanol Üretimi İçin Hammadde Seçimi **7**
2.4 Lignoselülozik Hammaddelerden Bütanol Üretimi **10**
2.4.1 Enzimatik sakkarifikasyon **10**
2.4.2 Aseton-Butanol-Etanol (ABE) fermentasyonunun biyokimyası **11**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **16**
3.1 Materyal **16**
3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar **16**
3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve hazırlanan çözeltiler **16**
3.1.2.1 Süt besiyeri **16**
3.1.2.2 Kullanılan çözeltiler **17**
3.1.2.3 Fermentasyon besiyeri **17**
3.1.3 Kullanılan enzimler **18**
3.2 Yöntem **18**
3.2.1 Örneklerin hidrolizi ve fermentasyonu **18**
3.2.2 Aseton-Butanol-Etanol (ABE) konsantrasyonlarının belirlenmesi **23**
3.2.3 Şeker tayini **23**
4. BULGULAR ve TARTIŞMA **25**
4.1 Farklı Enzimlerle Yapılan Hidrolizin ABE Oluşumuna Etkisi **25**
4.1.1 Birinci denemede elde edilen ABE miktarı **25**
4.1.2 İkinci denemede elde edilen ABE miktarları **26**
4.1.3 Üçüncü denemede elde edilen ABE miktarı **28**

4.1.4 Dördüncü denemede elde edilen ABE miktarı 29
4.1.5 Beşinci denemede elde edilen ABE miktarı 31
4.1.6 Altıncı deneme Şubat de elde edilen ABE miktarı 32
4.2 Enzimatik Hidroliz İle Oluşan Şeker Oranları 34
5. SONUÇLAR 36
KAYNAKLAR 38
ÖZGEÇMİŞ 42

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
^{o}C	Santigrat derece
$	Amerikan doları

Kısaltmalar

ABE	Aseton-bütanol-etanol
ATP	Adenozin trifosfat
CO_2	Karbondioksit
GC	Gaz kromatografisi
H_2	Hidrojen
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
KM	Kuru madde
N_2	Azot
Na_2S	Sodyum sülfür
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid hidrit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrit
NaOH	Sodyum hidroksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) fermentasyonunun metabolik yolu 13
Şekil 2.2 Substrat kullanımının şematik gösterimi 14
Şekil 4.1 Pektinaz enziminin *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı 25
Şekil 4.2 Accelerase 1500 enziminin *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı 27
Şekil 4.3 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatlara aynı miktarda saf su ilave edilerek oluşturulmuş besiyerin *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı 28
Şekil 4.4 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlara aynı oranda saf su ilave ederek oluşturulmuş besiyere indirgen ajan sodyum sülfür (0.1 mL) eklenen ve *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı 29
Şekil 4.5 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlara indirgen ajan sodyum sülfür (0.1 mL) eklenen ve *Clostridium beijerinckii* suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı 30
Şekil 4.6 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatlardan 50 mL kullanılarak *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı 31
Şekil 4.7 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu süzme işlemi yapmadan *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılan örneklerin ABE miktarı 32
Şekil 4.8 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu süzme işlemi yapmadan *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılan örneklerin ABE miktarı 33
Şekil 4.9 Accelerase 1500 enzimi ile hidroliz sonucu oluşan şeker (glikoz) miktarı 34

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1 Örneklerin hidrolizi ve fermentasyonu…….21

1. GİRİŞ

Son yıllarda petrole olan aşırı talep, üretim bölgelerindeki politik gerginlik vd. nedenlerle petrol fiyatları artmış ve fosil yakıt tüketimine paralel olarak, motorlu taşıtlardan salınan sera gazı emisyonları ve buna bağlı olarak küresel ısınma artış göstermiştir (Mahawar vd. 2012). Son 10 yılda daha etkili olan küresel ısınma, ülkeleri fosil yakıtlara alternatif enerji kaynakları arayışına yöneltmiş ve alternatif ve yenilenebilir enerji kaynakları kullanımına olan ilgi giderek artmıştır. Biyoetanol, biyobütanol, biyogaz ve hidrojen ilk akla gelen alternatif enerji kaynaklarıdır, ancak bunlar içerisinde biyobütanol, biyoetanole göre daha yüksek enerji içeriğine sahip olması, daha az higroskopik, daha az korozif olması ve daha az buharlaşması nedeni ile ilgi çekmektedir. Ayrıca, bütanol motorlu taşıtlarda motor modifikasyonlarına gerek kalmadan, doğrudan veya benzinle karıştırılarak da kullanılabilmektedir (Nejame 2010).

Petrol fiyatlarını belirleyen en önemli etken arz ve talep oranlarıdır, bunu üretim bölgesindeki ekonomik ve siyasi gelişmeler izler (Anonim 2014b). 2014 yılı itibariyle, Çin ve Avrupa'nın petrol talebinde kriz nedeniyle önemli düşüşler olmuş, bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletleri'nin petrol üretimi 4-5 yıl öncesine göre % 65 oranında artmış, buna bağlı olarak da petrol ithalatı 3.1 milyar varil/gün azalmıştır (Anonim 2014a).

Amerika Birleşik Devletleri'nin petrol üretimi 2008 yılından bu yana % 70 artmış, buna ek olarak 2014 yılında Irak ve Kanada'da da fazla petrol üretilmiştir. Yaz aylarında, Çin ve Birleşik Devletlerden gelen ekonomik toparlanma haberlerine rağmen, petrol fiyatları düşmeye başlamış, 2014 yılı Ağustos ayında varil fiyatı 103 $, Ekim ayında 80 $'a düşmüş, Aralık ayında ise fiyatlar 66 $'ı bulmuştur (Anonim 2014c).

Bir tarım ülkesi olan ve ekonomisi petrole bağlı olan ülkemizde de alternatif enerji kaynaklarının bulunması ve kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Elma, dünyada en çok üretilen meyvelerden birisidir ve yıllık ortalama üretimi yaklaşık 59 milyon tondur. Genel olarak üretilen elmanın % 71 kadarı meyve olarak tüketilmekte, % 20 kadarı ise,

yüksek katma değerli başka ürünlere dönüştürülebilmektedir. 2010 yılı verilerine göre, ülkemizde 2.600.000 ton elma üretilmiş, 376.100 ton elma, elma suyu üretiminde kullanılmış ve bundan 58.200 ton elma suyu konsantresi, % 12 kuru maddede 6800 ton elma püresi elde edilmiştir (Anonim 2010).

Dünyada üretilen elmanın % 65 kadarı elma suyu ve konsantresi, elma şarabı, elma püresi, reçel ve kurutulmuş elma ürünleri vb. şeklinde tüketilmekte ve üretim sonunda önemli oranda atık oluşmaktadır. Elma posası (cibresi), elmanın suyu alındıktan sonra kalan katı atıktır ve geleneksel işleme teknolojileri ile elma suyu üretiminde kullanılan elmanın % 25'lik kısmını posa oluşturmaktadır (Khamaiseh vd. 2013). Elmanın tamamının elma suyuna işlendiği düşünülürse, ülkemizde yılda ortalama 75.200 ton elma posası oluşmakta ve içerdiği kuru madde oranına bağlı olarak 1 ton kuru elma posası 800.000-1.600.000 kcal ısı içermektedir (Kumar vd. 2012).

Elma posasının zengin bir besin kaynağı olduğu ve bu zenginliğin bileşimindeki karbonhidratlar, ham lif, fermente olabilen şekerler, pektin, mineraller gibi bileşenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Kumar vd. 2012). Elma posası, ağırlık olarak % 66.4-78.2 su; % 9.5-22.0 karbonhidrat ve % 6.8 selüloz içermektedir. Elma posası günümüzde yüksek karbonhidrat içeriği nedeni ile çeşitli organik asitler, enzimler, tek hücre proteini, etanol, düşük alkollü içkiler ve pigmentler gibi birçok ürünün üretiminde kullanılmaktadır (Kumar vd. 2012).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bütanol ve Önemi

Bütanol; renksiz, molekül formülü C_4H_9OH ve moleküler ağırlığı 74.12 olan, yanıcı, viskozitesi düşük ve muz benzeri kokusu olan primer bir alkoldür (Thirmal ve Dahman 2012). Bütanol; kolay tutuşan bir sıvıdır ve su hariç tüm çözücülerle karışabilir özelliktedir. Doğrudan temas durumunda göz ve deriyi tahriş edebilir, solunduğunda narkotik etkisi vardır. Bütanolün akrilat ve metakrilat esterleri en çok kullanılan halidir, glikol esterleri, bütil asetat, bütilamin ve amino reçineler ise daha az kullanılan bütanol türevleridir. Esterler akrilik asit ile çift bağ yaparak homo- ve kopolimerlere dönüşürler ve bu bileşikler yapıştırıcı, elastomerler, yumuşatıcı ve plastik vd. üretiminde kullanılır, örneğin bütil metakrilat, reçine ve kağıt yapımında bütil glikol, endüstriyel boyalarda ve sentetik meyve tatlandırıcısı olarak dondurma, peynir, şekerleme ve fırın ürünlerinde kullanılır. Bütilamin, pestisit üretiminde, farmasötik ve emülgatör üretiminde kullanılır ayrıca naylon akışkanlaştırıcısı olan bütilbenzensulfonamit'in öncülüdür (Dürre 2008).

Bütanol ve türevleri boya inceltici, hidrolik sıvılar, parfümler, cam, deterjan, flotasyon yardımcıları (bütil ksantat), buz çözücü sıvılar, kozmetik (göz makyajı, dudak koruyucuları, tırnak koruyucuları, fondöten), ilaç üretiminde kullanılan ekstraksiyon sıvılarında, alkoloidler, antibiyotikler, hormonlar ve vitaminlerin üretiminde ve kağıt ve ince tabaka kromatografisinde mobil faz olarak kullanılır (Dürre 2008).

Bütanol, plastik, oto boyası ve diğer bazı endüstrilerde ve yakıt katkısı olarak kullanılabildiği gibi gıda endüstrisinde de kullanılabilmektedir. Bütanol, alkollü el dezenfektanlarında sinerjik etki elde etmek için ek olarak kullanılır (Anonim 2016). Biyobütanol, kanserojen madde içeriği nedeniyle petrokimyasal hammaddeden kimyasal yöntemlerle üretilen bütanole tercih edilmektedir (Khamaiseh 2013).

Bütanolün biyoyakıt olarak etanole göre bazı avantajları vardır. Bunlar:

- sıvı yakıtlarla iyi karışabilir özellikte olması,
- oktan sayısının yüksek olması,
- daha az korozif olması,
- daha yüksek enerji içeriğine sahip olması ve otomobil motorlarında modifikasyona gerek olmadan doğrudan veya benzine karıştırılarak kullanılabilmesidir (Yang vd. 2014).

Son zamanlarda fermentasyon yöntemi ile elde edilen biyobütanolün, biyoyakıt olarak kullanımı ilgi çekmekte ve bu alanda araştırmalar yapılmaktadır. Bununla birlikte etanol, günümüzde bazı ülkelerde petrole bağımlılığı azaltmak ve ekonomik gerekçelerle yakıt katkısı olarak kullanılmaktadır, örneğin benzine Brezilya'da % 23, Amerika ve Avrupa'nın bazı ülkelerinde ise, % 10 oranında etanol katılmaktadır. Bütanolün içten yanmalı motorlarda yakıt olarak kullanımının etanole göre pek çok avantajları vardır ve en önemlisi daha düşük buhar basıncına sahiptir. Suda absorbe edilemez, su ile faz ayrımı olmadan biyoyakıt ve benzinle karışabilir. Bir başka deyişle, bütanol rafineride yakıtlarla karıştırılabilir, taşınabilir ve var olan alt yapıya (boru hattı, depolama tankları, dolum istasyonları v.b) aktarılabilir. 2005 yılında 13 yaşındaki David Ramey, Amerika'da ilk olarak saf bütanol ile çalışan arabayı kullanmıştır. Benzine göre tüketim miktarı % 9 daha fazla olmasına rağmen CO_2 emisyonu daha azdır. David Ramey'in Çevresel Enerji Şirketi (EEI) Butilfuel^{TM} üretmeyi planlamıştır. 'BP' ve 'DuPont' şirketleri ise, yakıt olarak kullanılabilecek fermantatif bütanol üretimine 2007'de başlayacağını bildirmiştir bazı kaynaklara göre, 'Britisch Sugar' işbirliği ile Amerika'daki bir etanol fabrikası biyoteknolojik bütanol üretim tesisine dönüştürülmüştür (Dürre 2008).

Günümüzde ABD'de benzine belli oranda etanol karıştırılmaktadır ve 2001 yılından itibaren benzine % 15 oranında etanol karıştırılabilmesi için motorlarda düzenleme çalışmaları yapılmış ve bütanol kullanımı için 2016 yılına kadar bu çalışmaların devam etmesi planlanmıştır. Bu limitin aşılması durumunda, motor modifikasyonuna gerek

duyulmaktadır. Buna karşın, biyobütanol motorlarda hiçbir değişime gerek duymadan, benzine % 24 oranına kadar karıştırılabilmektedir. Brezilyada GEVO, Butamax (DuPont/BP), Cobalt Tecnolojies, Green Biologics/Butyl Fuel, Tetravitae/Eastman, Butalco ve Cathay gibi pek çok şirket biyobütanol üretimi için yeni teknolojiler geliştirmektedir (Natalense ve Zouain 2013).

2.2 Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) Fermentasyonu

Bütanol, uygun karbon kaynaklarından uygun mikroorganizmalar ile aseton-bütanol-etanol (ABE) fermentasyonu ile üretilir. Biyobütanol üretimi ilk kez 1862 yılında Pasteur tarafından saptanmış, 1912 yılında ilk olarak Weizmann; aseton, bütanol ve etanol üreten bir *Clostridium acetobutylicum* izole etmiş ve Strange ve Graham Ltd. isimli bir işletme kurarak endüstriyel boyutlarda biyobütanol üretimini gerçekleştirmiştir. Üretimin ilk yıllarında dumansız barut (Cordit) üretiminde kullanılmak için daha çok aseton kullanılmış, savaş sonrasında hızla gelişen otomobil endüstrisi için çabuk kuruyan oto boyaları üretiminde daha çok bütanol kullanılmıştır (Dürre 2008).

2. Dünya Savaşı'ndan sonrada fermentasyon yöntemi ile ABE üretimi devam etmiş ancak petrokimyasal kaynaklardan üretilen ABE ile rekabet edemeyerek üretim tesisleri kapanmıştır. Son yıllarda fosil yakıt kaynaklarının azalması, alternatif enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırmış ve ABE üretimi yeniden önem kazanmıştır (Dürre 2008).

2.2.1 ABE fermentasyonunda kullanılan mikroorganizmalar

ABE fermentasyonu yapan mikroorganizmalar doğada çok yaygın değildir ve sadece bazı *Clostridium* türlerinin bu özellikleri bulunmaktadır. *Clostridium* cinsi bakteriler Gram pozitif, çubuk şeklinde, zorunlu anaerobik mikroorganizmalardır. Fermentasyon ile glikoz ve bazı polissakkaritlerden aseton, bütanol ve etanol oluştururlar. ABE fermentasyonu yapan *Clostridium* türlerine solventojenik *Clostridium* adı verilir.

Doğada 5 çeşit solventojenik *Clostridium* türü bulunmaktadır, bunlar *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum* ve *C. ljungdahlii*'dir (Avcı ve Dönmez 2011).

Keis vd. (1995); *Clostridium* bakterilerini 16S rRNA özelliklerine göre 4 farklı taksonomik gruba ayırmıştır. Bunlar;

1. grup *Clostridium*'lar: Bu grubu nişasta içeren substratlardan solvent üreten *Clostridium*'lar oluşturur. *C. acetobutylicum* ATCC 824, ATCC 4259, ATCC 862, ATCC 43084, ATCC 39326; *C. acetobutylicum* DSM 1732 1. grup bakterileridir.

2. grup *Clostridium*'lar: Endüstriyel sakkarolitik solvent üreten *C. acetobutylicum*'lar bu grupta bulunur. C. *acetobutylicum* NRRL B643 bu grupta bulunur.

3. grup *Clostridium*'lar: Japonya'da izole edilen *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) ve mutantı N1-504 (ATCC 27022) bu grup içerisindedir.

4. grup *Clostridium*'lar: *C. acetobutylicum* (NCIMB 8052, NRLL B597, NCIMB 8049, ATCC 39058, *C. beijerinckii* (NRLL B593, NRLL B466, NRLL B592) bu grubun üyeleridir (Avcı ve Dönmez 2011).

2.2.2 Fermentasyon inhibisyonu

ABE fermentasyonu asidojenik ve solventojenik faz olmak üzere 2 aşamada gerçekleşir. ABE fermentasyon prosesinde, oluşan bütanol belli bir konsantrasyondan sonra asidojenik ve solventojenik fazda inhibisyona neden olur (Jones ve Woods 1986). *Clostridium* cinsi bakterilerin birçoğunun inhibisyonu için limit toplam solvent miktarı (aseton-bütanol-etanol) 20 g/L'dir. Bir başka deyişle, solvent konsantrasyonu limit düzeye ulaştığında fermentasyon prosesini inhibe eder. Buna ek olarak, substrat konsantrasyonunun artması da oluşacak bütanol konsantrasyonunu artıcağı için

fermentasyonun inhibe olmasına neden olur. Substrat konsantrasyonu belirli limitin altında olursa, bu problem ortadan kalkar. Solvent veya ürün inhibisyonu ile ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, fermentasyon sıvısından oluşan solvent alınırsa konsantrasyon inhibisyon seviyesine ulaşamadığı için inhibisyon etkisi giderilmektedir. Bu konuyla ilgili diğer bir yaklaşım ise, yüksek bütanol konsantrasyonuna dayanıklı genetiği değiştirilmiş *Clostridium* bakterilerinin kullanılmasıdır (Mayank vd. 2013).

2.3 Bütanol Üretimi İçin Hammadde Seçimi

Bütanol üretiminde, fermente edilebilir şekerler içeren bütün maddeler substrat olarak kullanılabilmektedir (Yang vd. 2014). Kullanılan hammaddelere örnek olarak;

- Atıklar
  - Tarımsal atıklar (mısır, buğday, arpa sapları)
  - Şehir atıkları
  - Gıda endüstrisi atıkları
  - Hayvansal atıklar

- Bitkisel kaynaklar
  - Tarım ürünleri (buğday, mısır, şeker pancarı, soya fasülyesi)
  - Bazı otlar (dallı darı)
  - Odunsu bitkiler verilebilir (Brown 2003).

Clostridium'lar amilolitik özellikleri ile bütanol üretimi için nişastalı ve şekerli hammaddeleri ön işlem uygulamasına gerek olmadan ancak selülozlu hammaddeleri fermente edilebilir şekerlere dönüşmesi için, ön işlem uyguladıktan sonra kullanabilirler. Enzimatik hidroliz, asit uygulaması, alkali uygulaması gibi ön işlemler, bitkisel örneklerdeki karbonhidrat-lignin tabakasını kırarak selülozun enzimler tarafından mikroorganizmaların kullanabileceği fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesini sağlamak için uygulanan ön işlemlerdir (Qureshi ve Blaschek 2006).

Bütanol, genellikle kesikli fermentasyon (batch) ile üretilmekte ve oluşan ürün damıtma yolu ile ayrılmaktadır. Tipik bir kesikli sistem, 60 g/L substrat konsantrasyonu ile başlatılmakta ve substrat olarak genellikle melas, mısır nişastası ve glikoz kullanılmaktadır. Uygun substrat ve diğer besin maddelerinin ilavesi ile hazırlanan besiyeri 121 °C'de sterilize edildikten sonra azot ve CO_2 gazı atmosferinde fermentasyon sıcaklığına kadar soğutulup, aktif kültür ile inoküle edilerek fermentasyon başlatılır (Avcı ve Dönmez 2011). Kesikli fermentasyonun tamamlanması, fermentasyon koşullarına ve kullanılan substratın çeşidine bağlı olarak, 2-6 gün sürmekte; fermentasyon sonunda 12-20 g/L solvent oluşmakta ve oluşan ürünler genellikle damıtma yolu ile alınmaktadır (Lee vd. 2008).

Fermentasyon endüstrisinde genellikle ucuz ve kolay bulunabilen ayrıca kısa sürede yenilenebilen nişastalı hammaddeler kullanılmaktadır. Güney Afrika Cumhuriyetinde ABE üretiminde 1980'lere kadar şeker kamışı melası, buna ilaveten mısır, darı, buğday, pirinç, tapyoka, soya melası ve patates de substrat olarak kullanılmıştır (Avcı ve Dönmez 2011).

ABE fermentasyonuda mikroorganizmalar için iyi bir N-kaynağı olan mısır ıslatma şurubu (MIS)'da kullanılmaktadır. Mısır ıslatma şurubu, mısırın yaş öğütülmesi sırasında açığa çıkan bir yan ürünüdür ve mısır nişastası üretimi işleminde yan ürün olarak oluşmaktadır. Mısır ıslatma şurubu, ABE fermentasyonu yanında mayalarla etanol üretiminde de mikroorganizmalar için azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Kadam 1997 ve Parekh 1999).

Kassava, özellikle Afrika, Asya ve Latin Amerika'nın tropik bölgelerinde yaygın olarak yetişen nişasta içeriği yüksek bir bitkidir. Kassava kalitesiz topraklarda ve zor iklim koşullarında yetişebilmekte, düşük maliyetli üretimi ve yüksek nişasta içeriğinden dolayı, ABE üretiminde kullanılabilecek potansiyel substratlardan biri olarak değerlendirilmektedir (Gu 2009).

Lignoselülozik tarımsal ürünler ve atıklar, yeryüzünde en çok bulunan maddelerden olup tarımsal atıklar (tahıl samanları, pirinç samanları, mısır koçanı, sapları ve kepeği) ve orman atıkları (odun atıkları, kağıt endüstrisi atıkları) gibi çeşitli hammadde gruplarını içermektedir. Lignoselülozik ürünler yaklaşık olarak % 40-50 selüloz, % 25-30 hemiselüloz, % 15-20 lignin içerirler. Ayrıca iz miktarlarda çeşitli mineraller, yağ, çözünür şekerler ve diğer maddeler de bulunmaktadır (Avcı ve Dönmez 2011).

Elma (*Malus domestica Borkh.*) bilinen en eski meyvelerden birisidir ve dünyada en fazla üretilen muz, portakal ve üzümden sonra 4. sırada yer alır. Dünyada üretilen elma miktarı yaklaşık 59 milyon tondur (Mahawar vd. 2012). Elma posası; elma suyu ekstraksiyonundan arta kalan katı atıktır, elma suyu üretim prosesinde taze elmanın % 75'inden meyve suyu, % 25'inden posa oluşmaktadır. Elma posası yüksek oranda su içerir ve yüksek kimyasal oksijen (250-300 g/kg) içeriğinden dolayı çevresel problemlere yol açar ve bu nedenle, elma posasının işlenmesi gerekmektedir. Yüksek karbonhidrat içeriği ile organik asit, etanol, bütanol, enzim, tek hücre proteini vd. mikrobiyal ürünlerin üretiminde substrat olarak kullanılır. Bu ürünler, fırıncılık ürünleri, çorbalar, reçel, sos vekabartma ajanı olarak kullanılabilir, ayrıca hayvan yemi ve enerji kaynağı olarak da biyogaz (Lane 1979), etanol (Hang vd. 1982), bütanol (Voget vd. 1985), sitrik asit (Hang vd. 1986) ve pektinaz (Hours 1988) üretimi için iyi bir substratdır (Anupama ve Manvika 2007). Kurutulmuş elma posası fabrikaların buhar üretiminde ve sterilizasyonda yakıt olarak kullanılır ve enerji bütçesine büyük katkı sağlar (Shalini 2010).

<u>Elma posasının bileşimi;</u>
% 66.4-78.2 su
% 9.5-22.0 karbonhidrat

Yaş elma posasının her 100 gramında; % 4 protein, % 3.6 şeker, % 6.8 selüloz, % 0.38 kül, % 0.42 asit ve 8.7 mg kalsiyum bulunur (Vasil'ev vd. 1976).

Elma posası kuru maddede; % 2.94-5.67 protein, % 48-62 karbonhidrat, % 4.7-51.1 lif, % 1.2-3.9 yağ, % 3.5-14.32 pektin ve % 0.5-6.1 kül içerir. Besinsel lif oranı ise, % 11.7 pektin, % 24.4 hemiselüloz, % 43.6 selüloz ve % 20.4 lignindir (Bhushan vd. 2008).

2.4 Lignoselülozik Hammaddelerden Bütanol Üretimi

2.4.1 Enzimatik sakkarifikasyon

Bazı hidrolitik enzimler, sakkarifikasyon işleminde polisakkaritleri şeker monomerlerine dönüştürmek için kullanılmaktadır. Enzimlerin birçoğu selüloz gibi tek çeşit polisakkaritleri basit şekerlere dönüştürür ve bunlar protein bazlı moleküllerdir ve aktiviteleri sıcaklık, pH ve zamana bağlıdır (Girio vd. 2010).

Selüloz; sellobiyoz ve 1-4 β-D-glikoz içeren linear polimerdir. Bitkilerde genellikle kristal halde bulunan selülozun sakkarifikasyonu için enzim kompleksleri kullanılmaktadır. Sellobiyoz, ekzoglukanaz enzimleri ile kolayca hidroliz edilir ve oluşan bileşikleri β-glukosidaz glikoza hidrolize eder. Bazen glikoz, endoglukanaz enzimi ile sellobiyozu β-1,4-glikozidik bağların kırılmasıyla da açığa çıkar (Girio vd. 2010).

Hemiselüloz; hücre duvarının yapısında bulunan heterojenik bir makromoleküldür. Bu polisakkaritin yapısında pentoz, heksoz ve üronik asitler bulunur. Hemiselüloz pentozları, β-D-ksiloz ve α-L-arabinoz, heksozları ise, β-D-mannoz, β-D-glikoz ve α-D-galaktozdur (Girio vd. 2010).

Ksilan; ksilozun β-1,4-glikozidik bağlarıyla bağlı polimeridir ve hemiselülozun en büyük bileşenidir. Pek çok enzim ksilanı hidroliz edebilir, örneğin β-1,4-endoksilinaz ksilandaki glikozidik bağlarını kırar. Arabinofuranozidaz enzimi, arabinoz yan bağları ve ksilozda bulunan α-glukoronidazdan ayrılmış glukoronik asit yan bağlarını bağlar. Ksilosidaz, ksilobiyozu ksiloza hidrolize eder ve bu aktivitelerin hepsi kendiliğinden gerçekleşir (Thirmal ve Dahman 2012).

Her enzimin çalıştığı optimum sıcaklık ve optimum çevre koşulları vardır, farklı enzimler farklı pH koşullarında aktiftir. Enzimlerin çoğunun optimum çalışma pH'sı 5 cıvarındadır, enzimler 45 ^{o}C'de sakkarifikasyon yapar ve enzimatik hidroliz saatlerce ve hatta bazen günlerce sürebilir (Quareshi vd. 2007). Qureshi vd. (2008a) tarafından yapılan bir çalışmada, buğday samanına uygulanan asit ön işleminden sonra, enzimatik sakkarifikasyon işlemi uygulanmıştır. Bu çalışmada selülozun şekerlere ayrışması için β-glikozidaz ve ksilinaz enzimi (pH = 6.5) kullanılmıştır. Diğer bir işlemde ise, farklı pH aralıklarında asitle ön işlemden sonra sakkarifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda her 2 enzim için de optimum pH aralığının 4.5-5.0 olduğu belirlenmiştir.

2.4.2 Aseton-Butanol-Etanol (ABE) fermentasyonunun biyokimyası

ABE fermentasyonu için optimum sıcaklık aralığı 30-40 ^{o}C'dir ve fermentasyon 2 temel aşamada gerçekleşir.

1. Asit üretim fazı (Asidojenik faz)
2. Solvent üretim fazı (Solventojenik faz)

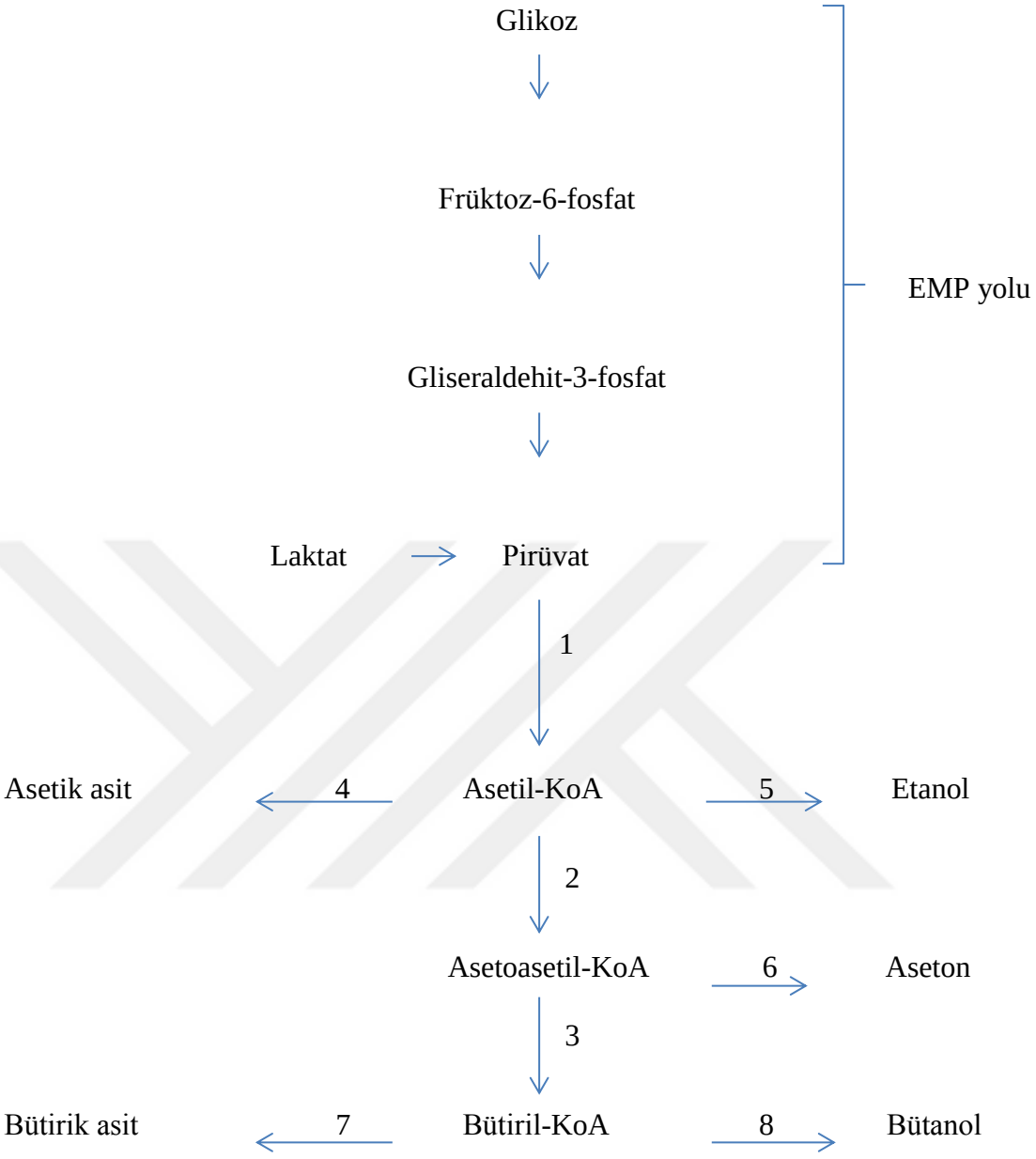
Başlangıçtaki fermentasyon pH'sı 6.8-7.0 aralığında olmalıdır ve asidojenik fazda oluşan asit nedeni ile pH 4.5-5 civarında olur. Bu fazda bakteri hücreleri hızla çoğalarak asetat ve bütirat gibi karboksilik asitler oluşturur. Asidik fazda, Asetil-KoA ve bütiril-KoA'dan asetat ve bütirat oluşur, Asetil-KoA ve bütiril-KoA'nın oluşumunda tiyolaz, β-hidroksibütiril-KoA dehidrogenaz, krotonaz ve bütiril-KoA dehidrogenaz enzimleri görev yapar. Bu fazdan solventojenik faza geçişte, pH düşmesi etkilidir (Ballongue vd. 1986). Solvent üretim fazına geçilmesi ile karboksilik asitlerden solventler oluşur, bu aşamada (asetat, bütirat) KoA-transferaz enzimleri etkilidir. Asetasetil-KoA'nın asetasetata dönüşümü sırasında, asetasetil-KoA transferaz enzimi KoA-alıcısı olarak asetat ve bütiratı kullanır, oluşan asetasetatın dekarboksilasyonu ile geri dönüşümsüz bir reaksiyonla aseton oluşur. Solvent üretimi sırasında etanol ve bütanol üretiminde asetil-KoA ve bütiril-KoA ara bileşenleri oluşmaktadır. Bütiril-KoA'dan bütanol üretimi için

gereken indirgenme, bütiraldehit dehidrogenaz ve bütanol dehidrogenaz enzimleri ile asetil-KoA'dan etanol üretimi ise asetaldehit dehidrogenaz ve etanol dehidrogenaz enzimleri ile gerçekleşmektedir (Jones ve Woods 1986).

Zorunlu anaerobik bakteriler, şekerleri fosfotransferaz sistemine (PTS) bağlı fosfoenol-pirüvatlar (PEP) aracılığı ile biriktirirler. Bakteriler Embden Meyerhof Parnas (EMP) yolu ile heksoz şekerlerini metabolize ederken, pentoz şekerler pentoz-fosfat metabolik yolu (PPP) ile pirüvat oluştururlar. NADPH, PPP enerji olarak depolanırken, glikolizis enerjisi ATP ve NADH (2 mol) olarak depolanır (Jones ve Woods 1986).

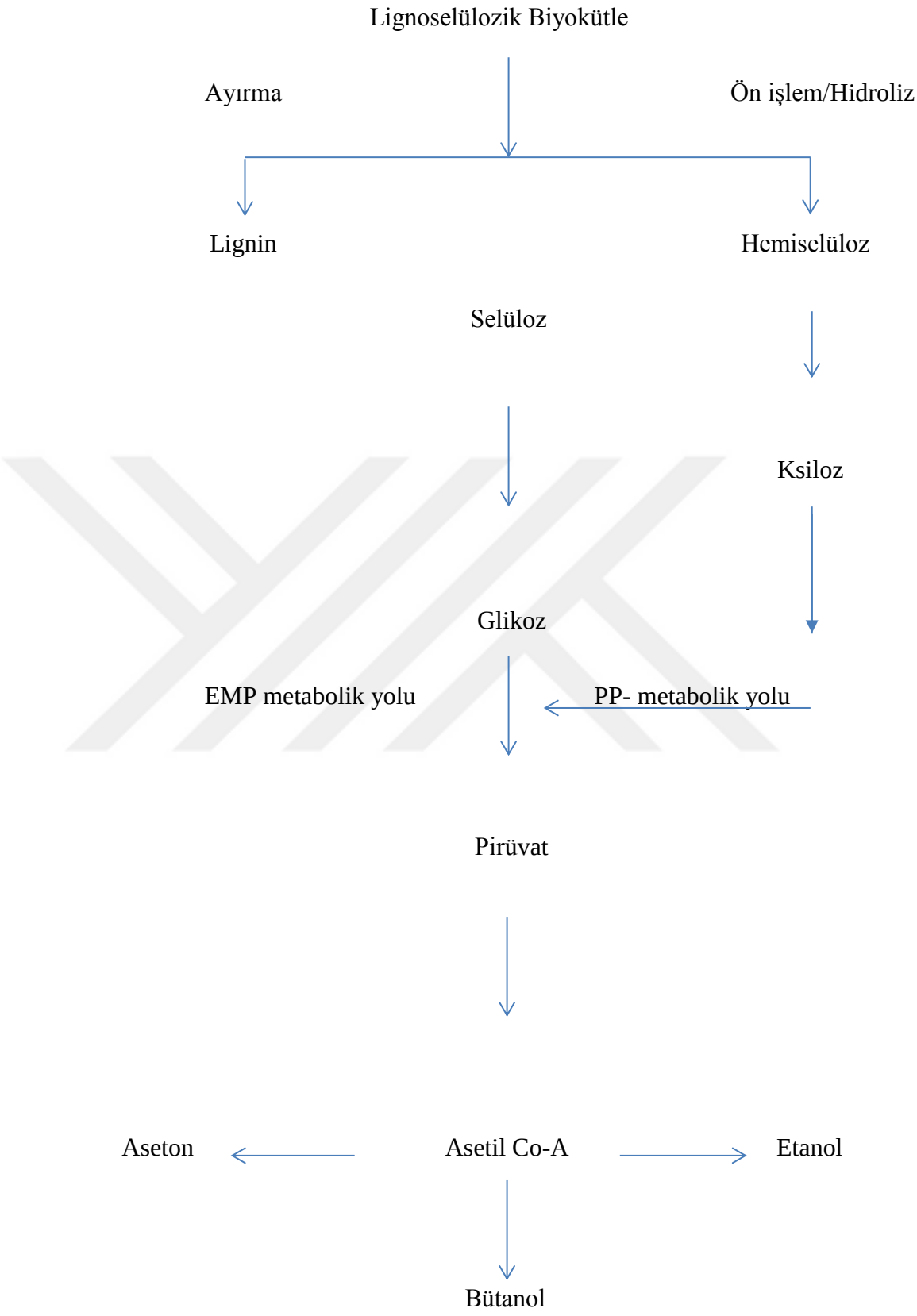
ABE fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan substrat nişastadır. Asit veya enzim hidrolizi ile nişasta glikoza dönüştürülmekte uygulanan ön işlem diğer fermentasyon substratlarını (hemiselüloz, selüloz, ksiloz) glikoza çevirmektedir. Glikoz, EMP metabolik yolu ile pirüvata ksiloz ise, gliseraldehit-3-fosfat ve fruktoz-6-fosfata dönüşerek EMP metabolik yoluna girer. Heksoz ve pentoz şekerleri, hücre çoğalması lag faza ulaştığında ATP üretmeye başlar (Jones ve Woods 1986).

Pirüvat, glikoliz (EMP) yolunda asetil-KoA'ya dönüşür. Asetil-KoA ortam pH'sı düştükçe kendiliğinden asetik asit ve bütirik asit üretir. Bu asitler, solventojenik fazı tetikleyerek asetoasetil-KoA sayesinde aseton, bütiril-KoA sayesinde ise bütanol ve etanol üretir (Jones ve Woods 1986). ABE fermentasyonunun metabolik yolu şekil 2.1'de, substrat kullanımının şematik gösterimi ise şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) fermentasyonunun metabolik yolu (Avcı ve Dönmez 2011 ve Mayank vd. 2013)

(enzimler: 1, pürivat ferrodoksin oksidoredüktaz; 2, tiyolaz; 3, 3-hidroksibütiril-KoA dehidrogenaz, krotonaz ve bütiril-KoA dehidrogenaz; 4, fosfat asetiltransferaz ve asetat kinaz; 5, asetaldehit dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz; 6, asetoasetil KoA:asetat/bütirat:KoA transferaz ve asetoasetat dekarboksilaz; 7, fosfat bütiltransferaz ve bütirat kinaz; 8, bütiraldehit dehidrogenaz ve bütanol dehidrogenaz)



Şekil 2.2 Substrat kullanımının şematik gösterimi (Mayank vd. 2013)

Bu çalışmanın amacı; elma posasından biyobütanol üretimi olanaklarının araştırılmasıdır. Biyobütanolün biyoetanole avantajlarından dolayı ve ülkemizde değişik bölgelere yayılmış 26 meyve suyu işletmesinde oluşan yıllık ortalama 75.200 ton posasının ABE fermentasyonu ile değerlendirilmesi ile meyve suyu işletmelerinde kullanılan enerjinin bir kısmının sağlanması olasıdır. Bu nedenle, tez çalışmasında A.Ü. Ziraat Fakültesi, Meyve Suyu İşletmesinden sağlanan elma posasından biyobütanol üretimi olanakları araştırılmıştır. Bu kapsamda, kurutulmuş elma posaları 2 çeşit enzim kullanılarak hidroliz edilmiş, değişik konsantrasyonlarda hazırlananan posa örneklerinden 2 çeşit *Clostridium* suşu ile ABE fermentasyonu ile solvent üretimi gerçekleştirilmiştir. Aseton, bütanol ve etanol konsantrasyonları gaz kromatografisinde, şeker miktarı ise HPLC'de belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırmada kullanılan elma posası Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Meyve Suyu İşletmesinden sağlanmıştır. Cam kavanozlara alınan örnekler -65 ^{o}C'de saklanmış ve kullanılmadan önce 45 ^{o}C'de kurutulmuş ve 2.5 mm partikül boyutuna sahip elekten (0.097 inç elek açıklığı) geçecek şekilde değirmende (Apex Mill 314 model) öğütüldükten sonra kullanılmıştır.

3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar

ABE fermentasyonu denemelerinde, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ve *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 suşları kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri ve hazırlanan çözeltiler

3.1.2.1 Süt besiyeri

Bakterileri aktifleştirmek amacıyla yağsız süt besiyeri kullanılmış ve 500 mL yağsız süte redoks indikatörü olarak 1 mg/L resazurin ilave edilerek, besiyeri rengi maviden pembeye dönünceye kadar kaynatılmıştır. Daha sonra, azot atmosferinde oda sıcaklığına soğutulan besiyeri, Hungate tüplerine alınmış ve butil septa ve vidalı kapakla kapatılarak, 121 ^{o}C'de, 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyere aşılanan bakteriler 30 ^{o}C'de inkübe edilmiş ve gelişen kültürler 70 ^{o}C'de 2 dakika ısı şoku uygulanarak geliştirilmiş ve taze besiyere aktarılıp aktifleştirildikten sonra, 18 saatlik kültürler fermentasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.2.2 Kullanılan çözeltiler

Sitrat Tampon (0,1 M, pH 4.8)

21 g sodyum mono hidrat ($Na_2CO_3H_2O$), 750 mL saf su içerisinde çözünmüş ve 1.5 M NaOH çözeltisi ile pH 4.5'e ayarlanmış ve damıtık su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.3 Fermentasyon besiyeri

KH_2PO_4	0.75 g/L
K_2HPO_4	0.75 g/L
$MgSO_4$	0.348 g/L
Maya özütü	5 g/L
$(NH_4)_2.SO_4$	2 g/L
Glikoz	50 g/L
Vitamin	1 mL
Mineral	1 mL
Resazurin	1 mL
pH	6.48

Fermentasyon besiyeri için, bileşimdeki maddeler saf suda çözdürülerek saf su ile 1 L'ye tamamlanıp renk maviden pembeye dönüşünceye kadar 2' kaynatılmış, N_2 atmosferinde soğutularak, cam şişelere 50 mL alınıp kapakları butil lastik tıpa ve aliminyum flakonla kapatılarak, 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Bakterileri aktifleştirmek için, daha önceden hazırlanan süt besiyerinde çoğalan 18 saatlik kültürler fermentasyon besiyerine aseptik koşullarda % 5 oranında inoküle edilmiş ve 35 ^{o}C'de 16-24 saat inkübe edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan enzimler

1. Accelerase 1500 (Lignoselülozik Biyokütle Hidrolizi için, kompleks selülaz enzimi, Genencor): Endoglükanaz aktivitesi: 2200 – 2800 CMC U/g, sıvı; β-Glikosidaz aktivitesi: 450 – 775 pNPG U/g.

2. Pectinex UF (*Aspergillus aculeatus*'dan elde edilen pologalaktronaz, Novozymes): sıvı, 3800 pNPG/mL.

3.2 Yöntem

3.2.1 Örneklerin hidrolizi ve fermentasyonu

Sitrat tampon içerisinde % 2, 4, 6, 8 ve 10, (ağ./hac.) oranlarında hazırlanan % 18 nem içeren kurutulmuş elma posası örneklerine, aşağıda belirtilen koşullarda enzimatik hidroliz uygulanmıştır:

1. Deneme: Farklı konsantrasyonlarda (% 2, 4, 6, 8 ve 10, ağ./hac.) örnek içerecek şekilde 50 mL sitrat tamponu içerisinde hazırlanan kurutulmuş elma posası süspansiyonlarına, 0.2 mL pektinaz (Pectinex UF) enzimi ilave edilmiştir. 50 ^{o}C'de 24 saat 150 rpm çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen enzimatik hidroliz sonrasında, örnekler filtre kağıdından süzülerek sıvı ve posa kısmı birbirinden ayrılmış, sıvı kısım saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak fermentasyona hazır hale getirilmiştir.

2. Deneme: 50 mL sitrat tampon içerisinde (% 2, 4, 6, 8 ve 10, ağ./hac.) örnek içerecek şekilde hazırlanan kurutulmuş elma posasına, 0.5 mL Accelerase 1500 enzimi ilave edilerek su banyosunda 50 ^{o}C'de 24 saat hidroliz edilmiş, süre sonunda filtre kağıdından süzülerek sıvı ve posa kısmı birbirinden ayrılmıştır. Posa kısmı atılırken, sıvı kısım saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak fermentasyonda kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3. Deneme: Bu denemede yukarıdaki gibi hazırlanan örneklere 0.5 mL Accelerase 1500 ilave edilip 50 ^{o}C'de 24 saat su banyosunda hidroliz edilmiştir. Hidroliz süresi sonunda filtre kağıdından süzülerek sıvı ve posa kısmı birbirinden ayrılmış, sıvı kısmından 25 mL alınıp 50 mL'ye saf su ile tamamlanarak fermentasyonda kullanılmıştır.

4. Deneme: Üçüncü denemedeki işlemler uygulanmış ve üçüncü denemede mikroorganizma çoğalması ve solvent oluşumu gözlenmediğinden tekrarlanmış ancak örneklere indirgen olarak bakteri inokülasyonundan hemen önce 0.1 mL Na_2S ilave edilmiştir.

5. Deneme: Bu çalışmada 100 mL sitrat tamponu içerisinde (% 2, 4, 6, 8 ve 10, ağ./hac.) posa içerecek şekilde hazırlanan örneklere 1 mL Accelerase 1500 ilave edilerek, 50 ^{o}C'de 24 saat su banyosunda hidroliz uygulanmış, hidroliz süresi sonunda filtre kağıdından süzülerek sıvı ve posa kısmı birbirinden ayrılmıştır. Posa kısmı atılırken, sıvı kısım fermentasyonda kullanılmıştır.

6. Deneme: Bu denemede 75 mL sitrat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda (% 2, 4, 6, 8 ve 10, ağ./hac.) posa içerecek şekilde hazırlanan örnek şişelerine 0.75 mL Accelerase 1500 ilave edilerek 50 ^{o}C'de 24 saat su banyosunda hidroliz işlemi uygulanmış, sıvı ve posa kısmı birbirinden ayrılmadan doğrudan fermentasyonda kullanılmıştır.

Enzimatik hidroliz denemelerinde, enzim yerine aynı miktarda sitrat tamponu ilave edilen örnekler tanık olarak değerlendirilmiştir. Tüm denemelerde 2 tekerrürlü çalışılmıştır, 4 ve 6 numaralı denemeler ise 2 takım halinde çalışılmış ve 2 farklı bakteri ile inoküle edilmiştir.

Bütün denemelerde fermentasyon için 100 mL hacimli cam şişelere alınan hidrolizatlara % 0.2 oranında maya özütü eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri azot atmosferinde soğutulduktan sonra butil lastik tıpa ve aliminyum flakonla kapatılarak 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Tüm hidrolizatlara (4. ve 6. denemelerin ikinci

takım örnekleri hariç) önceden süt besiyerinde aktifleştirilmiş ve fermentasyon besiyerinde geliştirilmiş *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu, 4. ve 6. denemelerin ikinci takım örneklerine ise önceden süt besiyerinde aktifleştirilmiş ve fermentasyon besiyerinde geliştirilmiş *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 suşu % 5 oranında steril ortamda aşılanmış, 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılmıştır. Örneklerin hidrolizi ve fermentasyonu çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Örneklerin hidrolizi ve fermentasyonu

Deneme adı	**Örnek konsantrasyonu**	**Kullanılan tampon çözeltisi**	**Hidrolizde kullanılan enzim çeşidi ve miktarı**	**Fermentasyonda kullanılmak üzere hazırlanan hidrolizat miktarı**	**Fermentasyonda kullanılan bakteri suşu, fermentasyon sıcaklığı ve süresi**
1. deneme	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 50 mL sitrat tampon çözeltisi	Pektinex UF (0.2 mL)	Hidroliz sonrası elde edilen süzüntü, saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.	*Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (35 ^{o}C'de 72 saat)
2. deneme	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 50 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (0.5 mL)	Hidroliz sonrası elde edilen süzüntü, saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.	*Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (35 ^{o}C'de 72 saat)
3. deneme	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 50 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (0.5 mL)	25 mL hidrolizat + 25 mL saf su	*Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (35 ^{o}C'de 72 saat)
4. deneme	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 50 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (0.5 mL)	25 mL hidrolizat + 25 mL saf su (Örneklere, 0.1 mL Na_2S ilave edilmiştir.)	*Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (35 ^{o}C'de 72 saat)

Çizelge 3.1 Örneklerin hidrolizi ve fermentasyonu (devam)

4. deneme 2. takım	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 50 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (0.5 mL)	Hidroliz sonrası elde edilen süzüntü (Örneklere, 0.1 mL Na_2S ilave edilmiştir.)	*Clostridium beijerinckii* DSM 6422 (35 ^oC'de 72 saat)
5. deneme	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 100 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (1 mL)	50 mL hidrolizat	*Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (35 ^oC'de 72 saat)
6. deneme	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 75 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (0.75 mL)	Süzme işlemi uygulamadan posa ve sıvı kısım bir arada kullanılır. (pH, örneklerde 0.8 mL 10 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.)	*Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (35 ^oC'de 72 saat)
6. deneme 2. takım	% 2, 4, 6, 8 ve 10 ağ./hac. kurutulmuş elma posası	0.1 M 75 mL sitrat tampon çözeltisi	Accelerase 1500 (0.75 mL)	Süzme işlemi uygulamadan posa ve sıvı kısım bir arada kullanılır. (pH, örneklerde 0.8 mL 10 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.)	*Clostridium beijerinckii* DSM 6422 (35 ^oC'de 72 saat)

3.2.2 Aseton-Butanol-Etanol (ABE) konsantrasyonlarının belirlenmesi

Fermentasyon süresi sonunda oluşan solventlerin konsantrasyonlarını saptamak için, oda sıcaklığına kadar soğutulmuş fermentasyon şişelerinin kapakları açıldıktan sonra oluşan gazın çıkması için beklenmiş ve Eppendorf tüplerine 1 mL alınarak -4 ^{o}C'de 10 dakika 10.000 xg'de santrifüj edilmiştir (Mikro 22R Hettic Zenrifugen, Germany). Oluşan berrak üst kısım GC analizinde kullanılmıştır. Hemen analiz edilmeyecekse -18 ^{o}C'de saklanmıştır.

Analizler Shimadzu 2B tip gaz kromatografisinde, 2 m uzunluğunda, 1/8 inç çapı olan Chromosorb 101 (80/100 mesh) ile doldurulmuş cam kolon kullanılarak yapılmıştır.

GC çalışma koşulları:

Kolon Sıcaklığı: 160 ^{o}C
Enjeksiyon Sıcaklığı: 220 ^{o}C
Dedektör Sıcaklığı: 250 ^{o}C
Taşıyıcı Gaz: Azot
Örnek miktarı: 1.0 µL

3.2.3 Şeker tayini

Altıncı deneme örneklerinin hidroliz sonrası oluşan glikoz miktarı HPLC'de belirlenmiştir. Hidroliz sonrası örneklerden 1 mL Eppendorf tüplerine alınıp analiz yapılana kadar -65 ^{o}C'de saklanmıştır. Şeker tayini yapılacağı zaman çözdürülüp 45 µm filtreden geçirildikten sonra HPLC'de oluşan glikoz miktarı ölçülmüştür.

<u>HPLC çalışma koşulları</u>

Enzimatik hidroliz ile açığa çıkan glikozun analizi için, Shimadzu HPLC sistemi kullanılmıştır. HPLC sistemi, pompa (LC-20AD), oto örnekleyici (SIL-20A HT), gaz giderici (DGU-20A$_3$), kolon fırını (CTO-10AS VP) ve refraktif indeks dedektörden

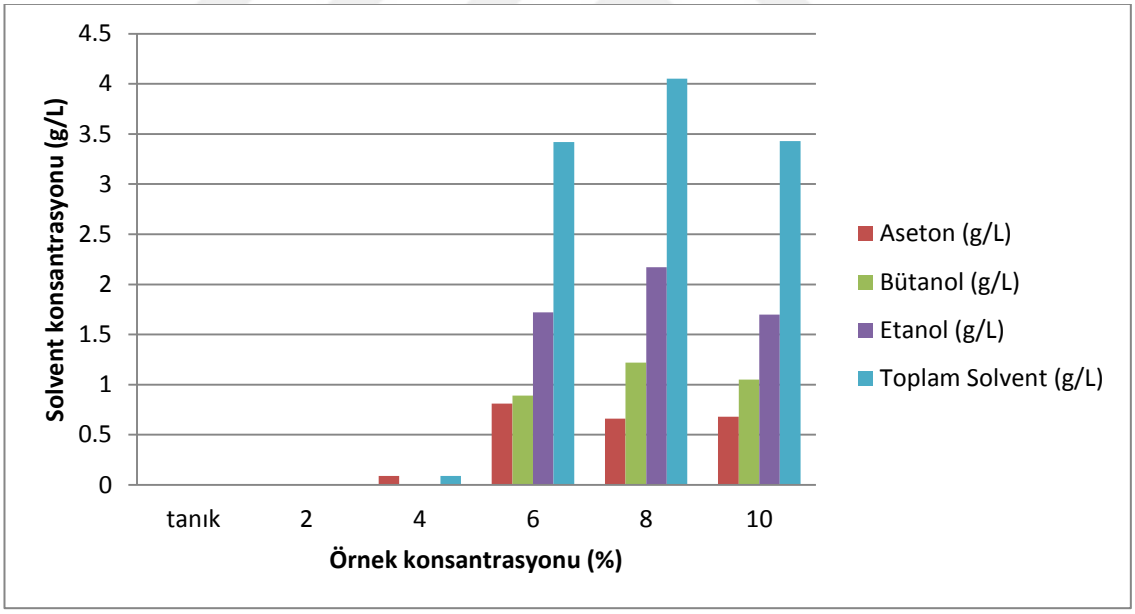
(RID-10A) oluşmaktadır. Glikoz, 80 °C'de Transgenomic CarboSep COREGEL-87P kolon kullanılarak ayrılmıştır. Mobil faz olarak, 0.5 mL/dakika akış hızında su kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi için, (4 g/L glikoz), (2 g/L glikoz), (1 g/L glikoz), (0.5 g/L glikoz), (0.25 g/L glikoz) şeklinde olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda glikoz kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Farklı Enzimlerle Yapılan Hidrolizin ABE Oluşumuna Etkisi

4.1.1 Birinci denemede elde edilen ABE miktarı

Kullanılan Pektinaz enziminin ABE miktarına etkisini saptamak için, 50 mL sitrat tamponu içerisinde 0.2 mL pektinaz enzimi ilave edilerek hazırlanan % 2, 4, 6, 8 ve 10, (ağ./hac.) de örnekler kullanılmıştır. Hidroliz sonunda elde edilen hidrolizatlara % 0.2 oranında maya özütü eklenmiştir. Hazırlanan fermentasyon besiyerleri aktif *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu ile % 5 oranında inoküle edilip, 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon süresi sonunda oluşan solvent oranları şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Pektinaz enziminin *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı

(tanık = 39 mL hidrolizat + 11 mL saf su, 1 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanan örnek = 42 mL hidrolizat + 8 mL saf su, 2 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanan örnek = 41 mL hidrolizat + 9 mL saf su, 3 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanan örnek = 41.5 mL hidrolizat + 8.5 mL saf su, 4 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanan örnek = 36 mL hidrolizat + 14 mL saf su, 5 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanan örnek = 28 mL hidrolizat + 22 mL saf su) olarak hazırlanmış örneklerde belirlenmiştir.

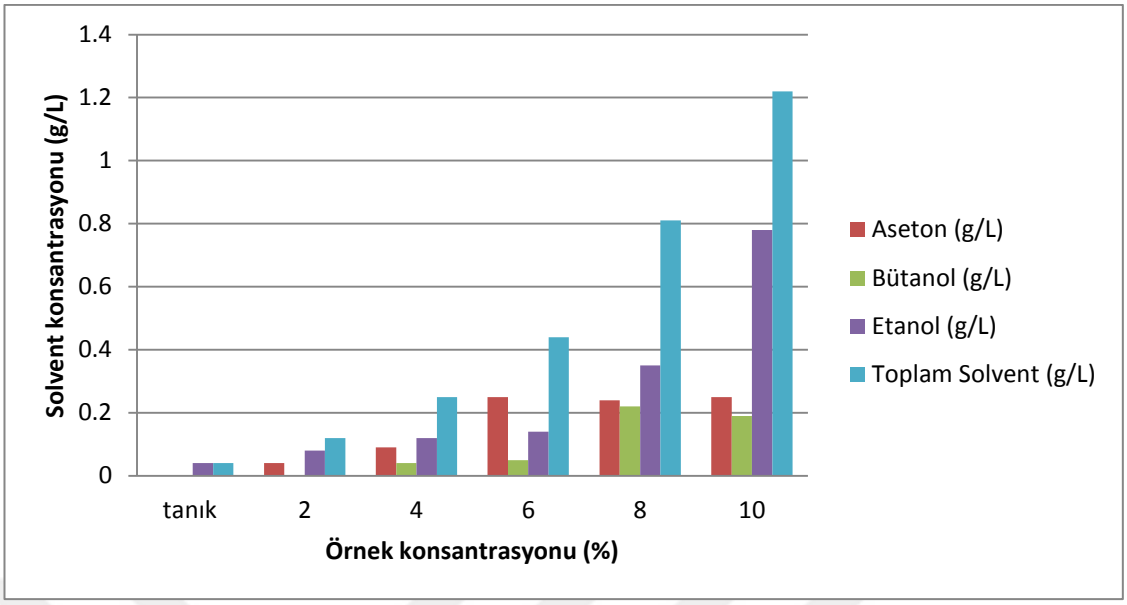
Yukarıda verilen grafikten (Şekil 4.1) anlaşılacağı gibi, en yüksek toplam solvent konsantrasyonuna % 8 posa içeren örnekte ulaşılmıştır. Görüldüğü gibi posa konsantrasyonu arttıkça toplam solvent konsantrasyonu da artmış ancak % 10 posa konsantrasyonunda önemli bir artış sağlanamamıştır.

Toplam solvent miktarı tanıkta saptanmazken, % 2 ve % 4 kurutulmuş elma posası kullanılan örneklerde sadece ara bileşikler oluşmuş, % 6 konsantrasyonda kurutulmuş elma posası kullanılan örrnekte; 0.81 g/L aseton, 0.89 g/L bütanol, 1.72 g/L etanol ve 3.42 g/L toplam solvent, % 8 konsantrasyonda kurutulmuş elma posası kullanılan örnekte; 0.66 g/L aseton, 1.22 g/L bütanol, 2.17g/L etanol ve 4.05 g/L toplam solvent, % 10 konsantrasyonda kurutulmuş elma posası kullanılarak hazırlanmış örnekte ise 0.68 g/L aseton, 1.05g/L bütanol, 1.7 g/L etanol ve 3.43 g/L toplam solvent oluştuğu gözlemlenmiştir.

% 2 ve % 4 konsantrasyonuna sahip kurutulmuş elma posası kullanılarak hazırlanmış örneklerde solvent oluşmamasının nedeninin, solvent üretimi için yeterli konsantrasyonun sağlanamadığı düşünülmektedir.

4.1.2 İkinci denemede elde edilen ABE miktarları

Kurutulmuş elma posası ile 50 mL sitrat tamponu içerisinde % 2, 4, 6, 8 ve 10, (ağ./hac.) konsantrasyonda hazırlanan örneklerden enzim hidrolizi sonunda elde edilen hidrolizatlara % 0.2 oranında maya özütü ilave edilerek fermentasyon çalışmalarında kullanılmış ve aktif *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 % 5 oranında inoküle edilip 35 ^{o}C'de 72 saat fermente edilmiştir. Fermentasyon sonrası elde edilen toplam solvent miktarları şekil 4.2'de verilen grafikte gösterilmiştir.



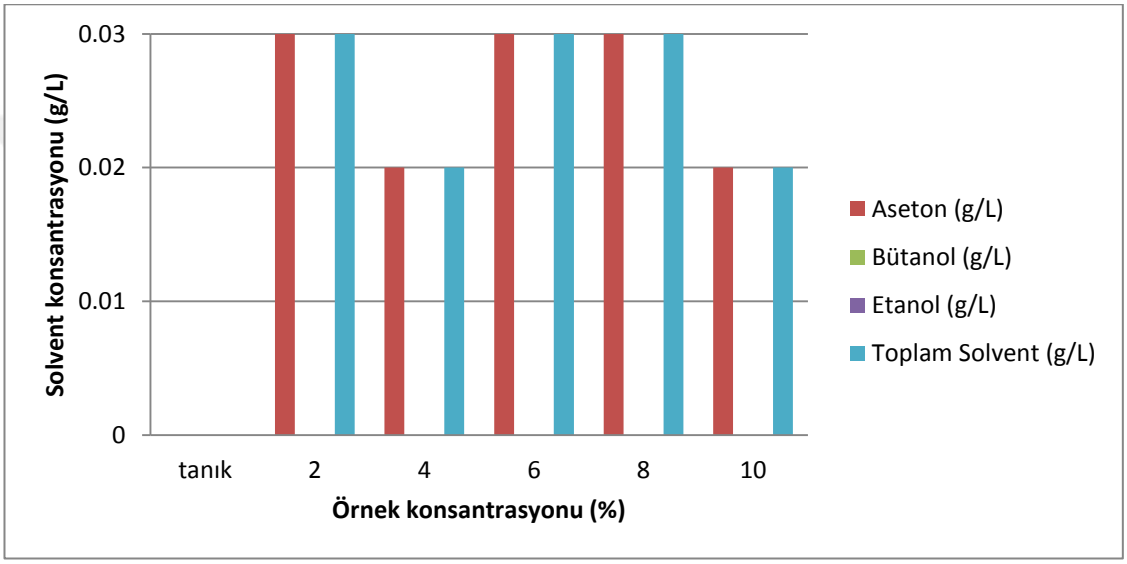
Şekil 4.2 Accelerase 1500 enziminin *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı

(tanık = 42 mL hidrolizat + 8 mL saf su, 1g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 41 mL hidrolizat + 9 mL saf su, 2 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 38 mL hidrolizat + 12 mL saf su, 3 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 29 mL hidrolizat + 21 mL saf su, 4 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 34 mL hidrolizat + 16 mL saf su, 5 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 35 mL hidrolizat + 15 mL saf su) olarak hazırlanmış örneklerde belirlenmiştir.

Saptanan toplam solvent miktarı incelendiğinde, en fazla toplam solventin % 10 posa içeren besiyerde oluştuğu görülmüştür. Bütanol miktarı ise, artan posa konsantrasyonuile birlikte artmış ve en fazla % 8 posa içeren besiyerde saptanmıştır. *Clostridium* DSM 792 ile fermentasyon sonunda oluşan toplam solvent miktarları; tanıkta; 0.04 g/L etanol, % 2 posa ile hazırlanmış 41 mL hidrolizatta; 0.04 g/L aseton, 0.08 g/L etanol ve 0.12 g/L toplam solvent, % 4 posa ile hazırlanmış 38 mL hidrolizatta; 0.09 g/L aseton, 0.04 g/L bütanol, 0.12 g/L etanol ve 0.25 g/L toplam solvent, % 6 posa ile hazırlanmış 29 mL hidrolizatta; 0.25 g/L aseton, 0.05g/L bütanol, 0.14 g/L etanol ve 0.44 g/L toplam solvent, % 8 posa ile hazırlanmış 34 mL hidrolizatta; 0.24 g/L aseton, 0.22 g/L bütanol, 0.35 g/L etanol ve 0.81 g/L toplam solvent, % 10 posa ile hazırlanmış 35 mL hidrolizatta ise; 0.25 g/L aseton, 0.19 g/L bütanol, 0.78 g/L etanol ve 1.22 g/L toplam solvent oluştuğu anlaşılmıştır.

4.1.3 Üçüncü denemede elde edilen ABE miktarı

Bu aşamada, 50 mL sitrat tamponu içerisinde % 2, 4, 6, 8 ve 10, (ağ./hac.) oranlarında hazırlanan posa örneklerinden enzimatik hidroliz sonunda elde edilen ve % 0.2 oranında maya özütü eklenmiş besiyere aktif *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu % 5 oranında inoküle edilip, 35 ^{o}C'de 72 saatfermentasyon sonunda oluşan solvent oranları belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen solventlerin miktarları şekil 4.3'de verilmiştir.



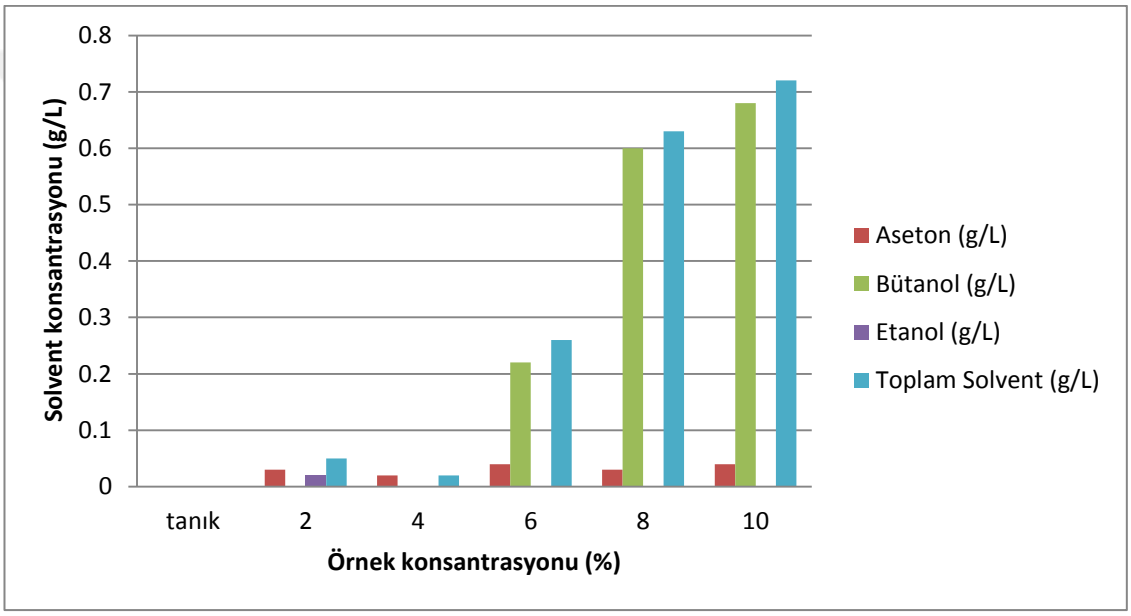
Şekil 4.3 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatlara aynı miktarda saf su ilave edilerek oluşturulmuş besiyerin *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı

(tüm örnekler = 25 mL hidrolizat + 25 mL saf su) olarak hazırlanmış örneklerde belirlenmiştir.

Bu aşamada hazırlanan örneklerde sadece aseton oluşmuş, etanol ve bütanol saptanamamıştır. Oluşan aseton miktarı ise, % 4 ve % 10 posa içeren örneklerde 0.02 g/L iken, % 2, % 6 ve % 8 posa içeren örneklerde ise 0.03 g/L olarak belirlemiştir. Bu çalışmada elde edilen bu sonuçlara göre, ortamda tam olarak anaerobik koşulun saptanamadığı düşünülmektedir.

4.1.4 Dördüncü denemede elde edilen ABE miktarı

Araştırmanın bu kısmında fermentasyondan önce besiyerlere, anaerobik koşulların tam olarak sağlanması için indirgen ajan olarak Na_2S ilave edilmiştir. Örnekler, aktif *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu ile % 5 oranında inoküle edilip, 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon sonrası süzülen örneklerden 25 mL alınıp 25 mL saf su eklenerek 50 mL'ye tamamlanmıştır. Örnekler GC'de analiz edilmiş ve saptanan sonuçlar şekil 4.4'de gösterilmiştir.



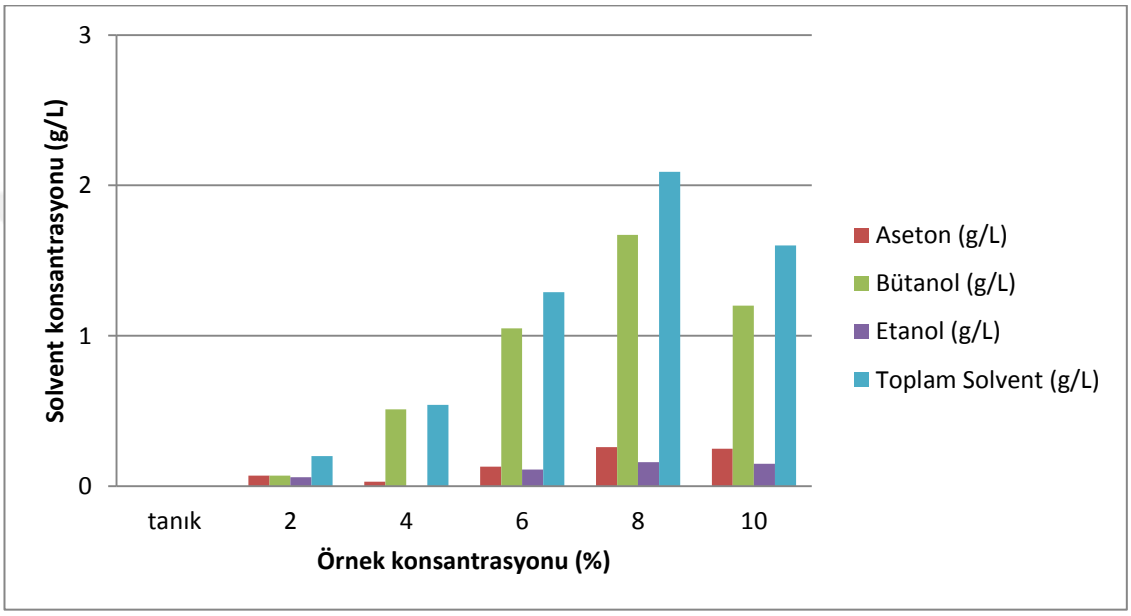
Şekil 4.4 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlara aynı oranda saf su ilave ederek oluşturulmuş besiyere indirgen ajan sodyum sülfür (0.1 mL) eklenen ve *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı

(tüm örnekler = 25 mL hidrolizat + 25 mL saf su olarak hazırlanmıştır.)

Bu denemede, fermentasyon ortamında çok az gaz oluşumu gözlenmiş ve bunun nedeninin *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 suşu için yeterli anaerobik koşulunun sağlanamamış olduğu sonucuna varılmıştır. Toplam solvent miktarları: % 2 posa içeren örnekte; 0.03 g/L aseton, 0.02 g/L etanol ve 0.05 g/L toplam solvent, % 4 posa içeren örnekte; 0.02 g/L aseton, % 6 posa içeren örnekte; 0.04 g/L aseton, 0.22 g/L bütanol, %

8 posa içeren örnekte; 0.03 g/L aseton, 0.6 g/L bütanol, % 10 posa içeren örnekte ise; 0.04 g/L aseton ve 0.68 g/L bütanol olarak belirlenmiştir.

Dördüncü denemede ayrıca hidrolizle elde edilen berrak filtrat (2. takım) doğrudan fermentasyonda kullanılmış, fermentasyon aktif *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat sürmüş ve bu süre sonunda oluşan solvent oranları şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatlara indirgen ajan sodyum sülfür (0.1 mL) eklenen ve *Clostridium beijerinckii* suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı

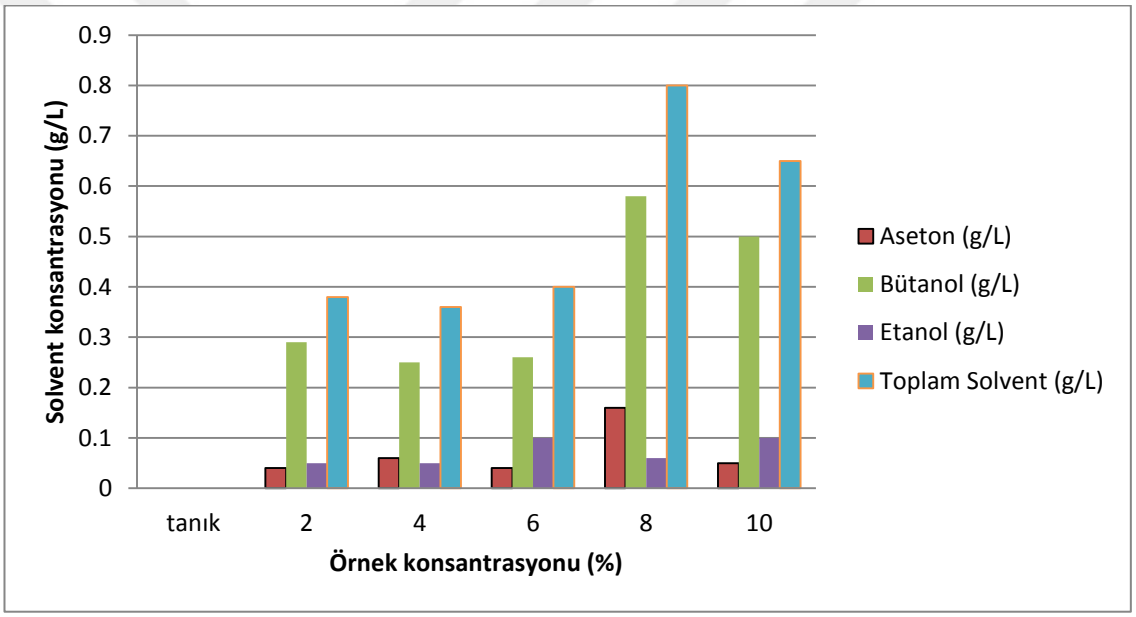
(tanık = 25 ml hidrolizat, 1 g kurutulmuş elmaposası ile hazırlanmış örnek = 35 mL hidrolizat, 2 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 39.5 mL hidrolizat, 3 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 33.5 mL hidrolizat, 4 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 36 mL hidrolizat, 5 g kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örnek = 36.5 mL hidrolizat) olarak hazırlanmış örneklerde belirlenmiştir.

% 2 posa içeren örnekte; 0.07 g/L aseton, 0.07 g/L bütanol, 0.06 g/L etanol ve 0.2 g/L toplam solvent oluştuğu anlaşılmıştır. % 4 posa içeren örnekte ise, 0.03 g/L aseton ve 0.51 g/L bütanol oluşurken, % 6 posa içeren örnekte; 0.13 g/L aseton, 1.05 g/L bütanol, 0.11 g/L etanol ve 1.29 g/L toplam solvent oluşumu gözlenmiştir. % 8 posa içeren örnekte; 0.26 g/L aseton, 1.67 g/L bütanol, 0.16 g/L etanol ve 2.09 g/L toplam solvent oluşmuştur. % 10 posa içeren örnekte ise, 0.25 g/L aseton ve 1.2 g/L bütanol, 0.15 g/L

etanol ve 1.6 g/L toplam solvent oluşmuştur. % 8 posa içeren örnek solvent oluşumunun en fazla saptandığı örnektir.

4.1.5 Beşinci denemede elde edilen ABE miktarı

Bu denemede, % 2, 4, 6, 8 ve 10, (ağ./hac.) posa içeren örnekler kullanılmıştır. Elde edilen hidrolizatlara % 0.2 maya özütü eklenmiş ve aktif *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile % 5 oranında inoküle edilmiş, 35 ^{o}C'de 72 saat fermente edilmiş, sonuçlar şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu oluşan hidrolizatlardan 50 mL kullanılarak *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyonunda oluşan ABE miktarı

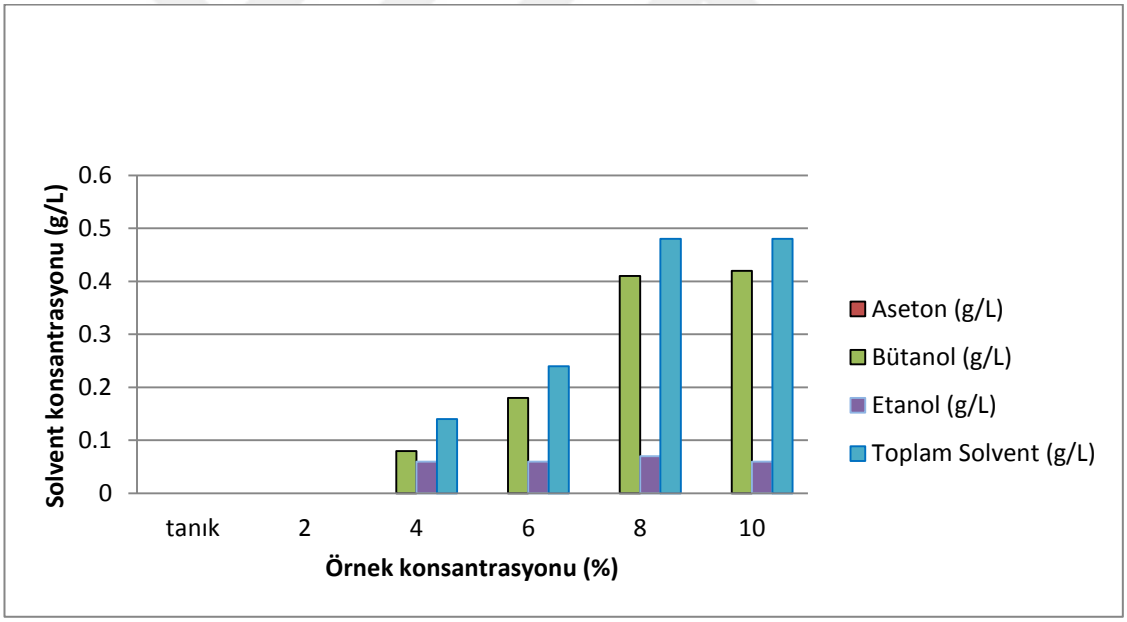
(tüm örnekler 50 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.)

Şekil 4.6'da verilen grafikten anlaşılacağı gibi % 2 posa içeren örnekte; 0.04 g/L aseton, 0.29 g/L bütanol, 0.05 g/L etanol ve toplamda 0.38 g/L solvent oluşumu gözlenmiştir. % 4 posa içeren örnekte; 0.06 g/L aseton, 0.25 g/L bütanol, 0.05 g/L etanol ve toplamda 0.36 g/L solvent oluşmuştur. % 6 posa içeren örnekte; 0.04 g/L aseton, 0.26 g/L bütanol, 0.1 g/L etanol ve 0.4 g/L toplam solvent oluşumu gözlenmiştir. % 8 posa içeren örnekte; 0.16 g/L aseton, 0.58 g/L bütanol, 0.06 g/L etanol ve 0.8 g/L toplam solvent

oluşmuştur. % 10 örnek konsantrasyonunda 0.05 g/L aseton, 0.5 g/L bütanol, 0.1 g/L etanol ve 0.65 g/L toplam solvent oluşumu gözlemlenmiştir. En fazla bütanol miktarı % 8 örnek konsantrasyonunda saptanmıştır.

4.1.6 Altıncı denemede elde edilen ABE miktarı

Bu denemede, 75 mL sitrat tamponu içerisinde % 2, 4, 6, 8 ve 10, (ağ./hac.) posa içerecek biçimde hazırlanmış örneklerin hidrolizi ile elde edilen hidrolizatlara % 0.2 maya özütü eklenmiştir. Ortam pH'sı 10 M NaOH ile pH 5.3 cıvarında tutulmuştur. Fermentasyon için *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu kullanılmıştır, örnekler, 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılmış ve sonuçlar aşağıdaki grafikte (Şekil 4.7) gösterilmiştir.

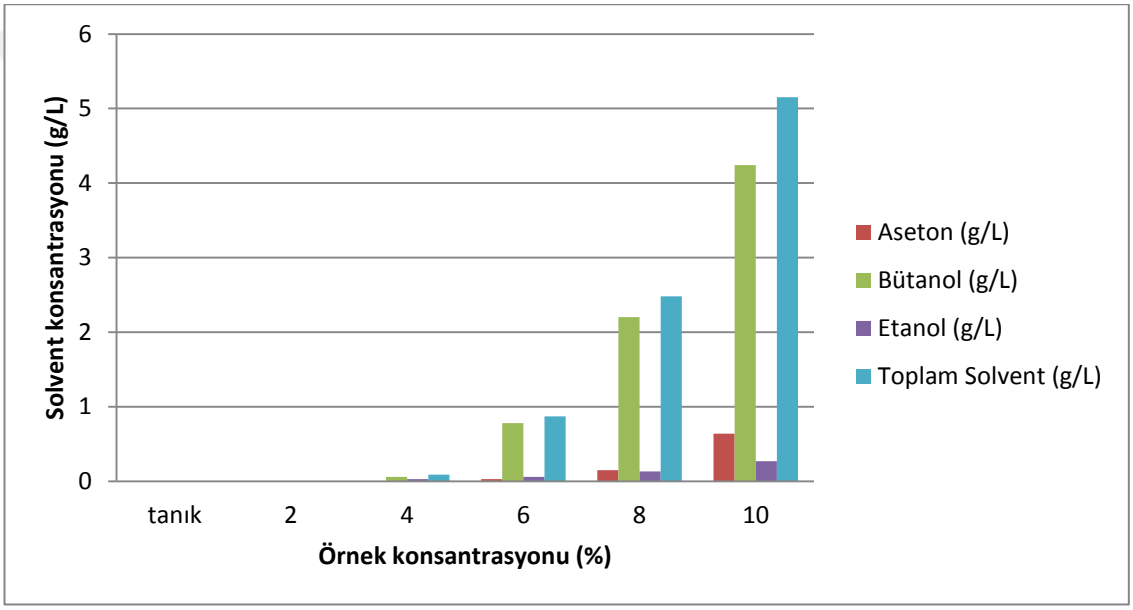


Şekil 4.7 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu süzme işlemi yapmadan *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılan örneklerin ABE miktarı

Grafikten anlaşılacağı gibi % 2 posa içeren örnekte solvent oluşumu gözlenmemiş, % 4 kurutulmuş elma posası içeren örnekte; 0.08 g/L bütanol, 0.06 g/L etanol ve 0.14 g/L toplam solvent oluşumu gözlenmiştir. % 6 kurutulmuş elma posası içeren örnekte; 0.18

g/L bütanol, 0.06 g/L etanol ve 0.24 g/L toplam solvent oluşmuştur. % 8 kurutulmuş elma posası içeren örnekte; 0.41 g/L bütanol, 0.07 g/L etanol ve 0.48 g/L toplam solvent oluşumu gözlenirken, % 10 kurutulmuş elma posası içeren örnekte ise, 0.42 g/L bütanol, 0.06 g/L etanol ve 0.48 g/L toplam solvent oluşumu gözlemlenmiştir. Posa oranı arttıkça toplam solvent oluşumunda da artış görülmüştür.

Altıncı denemenin ikinci takım örnekleri *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermente edilmiş ve hesaplanan solvent oranları şekil 4.8'de verilmiştir.



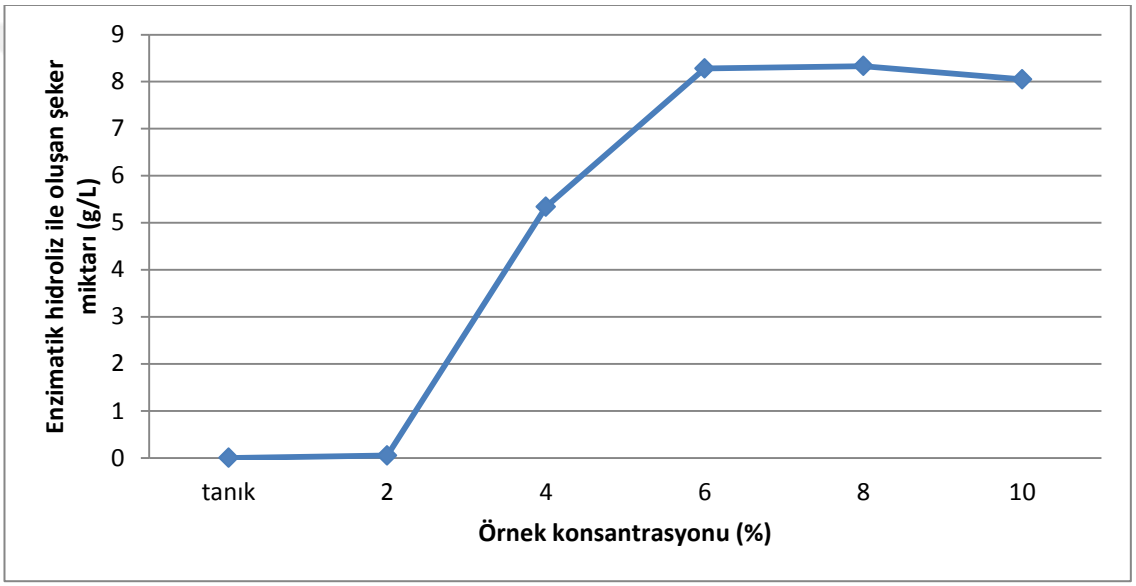
Şekil 4.8 Accelerase 1500 enziminin hidrolizi sonucu süzme işlemi yapmadan *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyona bırakılan örneklerin ABE miktarı.

Yukarıda verilen grafikten anlaşılacağı gibi, tanık ve % 2 kurutulmuş elma posası içeren örnekte solvent oluşmazken, % 4 posa içeren örnekte; 0.06 g/L bütanol, 0.03 g/L etanol ve 0.09 g/L toplam solvent, % 6 kurutulmuş elma posası içeren örnekte; 0.03 g/L aseton, 0.78 g/L bütanol, 0.06 g/L etanol ve 0.87 g/L toplam solvent, % 8 kurutulmuş elma posası içeren örnekte; 0.15 g/L aseton, 2.2 g/ L bütanol, 0.13 g/L etanol ve 2.48 g/L toplam solvent, % 10 kurutulmuş elma posası içeren örnekte ise, 0.64 g/L aseton, 4.24 g/L bütanol, 0.27 g/L etanol ve 5.15 g/L toplam solvent oluşumu gözlenmiştir.

Analiz sonuçları incelendiğinde en fazla bütanol ve solvent oluşumu % 10 kurutulmuş elma posası içeren örnekte saptanmış, konsantrasyon arttıkça solvent oluşumunun arttığı görülmüştür.

4.2 Enzimatik Hidroliz İle Oluşan Şeker Oranları

Tez çalışmasında enzimatik hidroliz işlemi uygulanan örneklerden şeker miktar çeşitleri belirlenmiş ve sonuçlar glikoz (g/L) olarak şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Accelerase 1500 enzimi ile hidroliz sonucu oluşan şeker (glikoz) miktarı

Şeker oranlarının verildiği grafikten anlaşılacağı gibi, tanıkta şeker miktarı saptanmamıştır. % 2 kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış örneklerin hidrolizi sonucu oluşan şeker miktarı 0.05 g/L'dir. % 4 kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış hidrolizatta oluşan şeker miktarı 5.34 g/L olarak bulunmuştur. % 6 kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış hidrolizatta oluşan şeker miktarı 8.28 g/L, % 8 kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış hidrolizatta oluşan şeker miktarı 8.33 g/L olarak belirlenmiş, % 10 kurutulmuş elma posası ile hazırlanan hidrolizatta ise, oluşan şeker miktarı 8.05 g/L'dir. En fazla şeker oluşumu, % 8 konsantrasyonda kurutulmuş elma posası ile hazırlanmış hidrolizatta saptanmıştır.

Kaynaklarda elma posası ile yapılan çalışmalarda biyobütanol üretimi ile ilgili yalnızca bir çalışmaya rastlanmıştır. Voget vd. (1985) yaş elma posasından *Clostridium acetobutylicum* NRLL B 596 ve *C. butylicum* NRLL B 592 ile NRLL B 593 suşları ile bütanol üretmişler ve % 1.9-2.2 bütanol konsantrasyonuna ulaştıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan 3 suştada toplam solvent miktarı ve bütanol verimliliği, sunulan yüksek lisans çalışmasında elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir fakat oranlar değişmektedir ve bütanol-aseton oranı (2:1), yapılan bazı çalışmalara göre (3.4:5.5) olarak verilmiştir. Başka bir çalışmada ise, Feng vd. (2010) elma posasından biyohidrojen üretimi üzerinde çalışmışlar, kurutulmuş elma posasına oda sıcaklığında 65 ^{o}C'de, % 6 amonyak ile ıslatılarak ön işlem uygulamışlar ve daha sonra pH 7.0'ye gelene kadar saf su ile yıkamışlardır. Bu yolla hazırlanan örnekler, 37 ^{o}C'de 24 saat fermente edilmiş ve 15 g/L substrat konsantrasyonunda 8.08 mL/g H_2 oluştuğunu bildirmişlerdir.

Parmar ve Rupasinghe (2013) ise elma posasından etanol ve asetik asit üretimini araştırmışlar, selülaz, β-glukosidaz ve pektinaz ile hidroliz edilen örneklere enzimatik hidrolizden sonra 91 ^{o}C'de 16 dakika 1.5 g/100 mL sülfirik asitle ön işlem uygulamışlardır. Bu yöntemle hazırlanan örneklerden *Saccharomyces cerevisiae* ile 40 ^{o}C ve 24 saat fermentasyonla 0.39 g/g etanol elde ettiklerini, ayrıca *A. aceti* ile pH 7'de, 28 ^{o}C'de 7 gün fermentasyonla 61 g/100g K.M'de asetik asit ürettiklerini belirtmişlerdir.

Khamaiseh vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada, hurma suyudan biyobütanol üretmiştir. Hurma suyu yüksek oranda basit şekerler içermektedir (% 65-75 K.M) ve hurma suyu *C. acetobutylicum* ile fermentasyona bırakılmıştır. Proses başlangıç pH'sı 5.6 veya 7.0, inkübasyon sıcaklığı 30-35-40 ^{o}C ve süre 72 saat olarak ayarlanmıştır. Hurma suyu konsantrasyonu 10, 20, 30 ve 40 g/L olarak alınıp, en yüksek bütanol 30 g/L hurma suyunda 35 ^{o}C inkübasyon sıcaklık ve başlangıç ortam pH'sı 7.0'de 0.32 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışmadan da anlaşıldığı üzere hurma suyuna göre kurutulmuş elma posasından daha çok bütanol elde edildiği söylenebilir.

5. SONUÇLAR

Dünyada hızlı nüfus artışıyla birlikte fosil yakıt rezervlerinin giderek azalması, alternatif enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırmıştır. Gıda endüstrisi atıkları ise bütün dünyada olduğu gibi ülkemiz için de alternatif enerji kaynakları içerisinde önemli bir yer tutmaktadır.

Bu çalışmada, önemli bir gıda endüstrisi atığı olan elma posasından enzimatik hidrolizle muamele ettikten sonra ABE üretimi gerçekleştirilmiştir. Hidrolizle elde edilen hidrolizattan *C. acetobutylicum* DSM 792 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşları kullanılarak oluşan solvent miktarları ölçülmüştür.

Pektinex UF (pektinaz) enziminin, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan elma posası örneklerini 50 ^{o}C'de çalkalamalı inkübatörde 24 saat hidrolizi sonucu oluşan besiyerlere maya özütü eklenerek DSM 792 bakteri suşunun fermentasyonu ile oluşan örneklerde en fazla bütanol % 8 posa içeren örneklerde oluşmuş (28 mL hidrolizat 22 mL saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır) maya özütü içeren besiyerinde oluşan bütanol miktarının 1.22 g/L olduğu belirlenmiştir.

Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan elma posasının Accelerase 1500 ile, su banyosunda 50 ^{o}C ve 24 saat hidrolize etmesi ile oluşan hidrolizattan maya özütü eklenerek *C. acetobutylicum* DSM 792 ile 35 ^{o}C'de 72 saat fermentasyon süresi sonunda % 8 örnek içeren örneklerde (35 mL hidrolizat 15 mL saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır) gözlemlenmiş ve artan konsantrasyonla birlikte en yüksek bütanol miktarı 0.22 g/L olmuştur.

Üçüncü denemede, Accelerase 1500 enzimi ile hidrolize olmuş ve maya özütü ilave edilerek hazırlanmış besiyerlerinde (25 mL hidrolizat aynı miktarda saf su ile tamamlanmıştır) *C. acetobutylicum* DSM 792 gelişmemiştir. Bunun nedeninin yeterli anaerobik ortamın oluşmadığı anlaşılmış ve bu nedenle aynı koşullarda hazırlanan fermentasyon şişelerindeki besiyerlerine Na_2S ilave edilmiştir. Bu koşulda sadece % 6,

8 ve 10 posa içeren örneklerde bütanol oluştuğu saptanmış ve en yüksek bütanol konsantrasyonu % 10 posa içeren örneklerde 0.68 g/L olarak belirlenmiştir. Benzer koşullarda yapılan bir denemede mikroorganizma olarak *C. beijerinckii* DSM 6422 kullanılmış ve bu koşulda en yüksek bütanol oranına % 8 posa içeren örneklerde (36 mL hidrolizatta) 1.67 g/L olarak ulaşılmıştır.

Beşinci denemede, Accelerase 1500 enzimi hidrolizi ile elde edilen 50 mL hidrolizata maya özütü eklenerek hazırlanan besiyerleri, *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon sonucunda % 8 posa içeren örneklerde 0.58 g/L bütanol konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

Kurutulmuş elma posası, Accelerase 1500 enzimi ile hidroliz edilerek örnekler süzme işlemi uygulamadan maya özütü kullanılarak *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile fermentasyona tabi tutulmuştur. Bu koşulda en yüksek bütanol oranı % 10 posa içeren örneklerde 0.42 g/L olmuştur. Aynı yöntemle hazırlanan besiyerlerde *C. beijerinckii* DSM 6422 ile posa konsantrasyonu arttıkça bütanol üretimi de artmıştır ve % 10 örnek konsantrasyonunda 4.24 g/L olarak ölçülmüştür. Buna göre elma posasından ABE fermentasyonunda *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun daha etkili olduğu anlaşılmıştır.

Elde edilen verilere göre yeterli olmamakla birlikte ticari ölçekli meyve suyu işletmelerinde elma posasının Accelerase 1500 ile hidroliz edilip doğrudan *C. beijerinckii* DSM 6422 ile fermente ettirilerek biyobütanol üretiminin hem daha pratik hem de elde edilen miktar açısından diğer denemelere göre daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Anonim. 2010. Meyve Suyu Endüstri Derneği. Web Sitesi: (http://myed.org.tr), Erişim Tarihi: 15.12.2013.

Anonim. 2014a. Komplo Teorisi: Petrol fiyatları neden düştü? Web Sitesi: (http://www.aksam.com.tr/yazarlar/komplo-teorisi-petrol-fiyatlari-neden-dustu/haber-346697), Erişim Tarihi: 07.12.2015.

Anonim. 2014b. Petrol fiyatları neden düştü? -1 Web Sitesi: (http://www.gazetebilkent.com/2014/12/18/petrol-fiyatlari-neden-dustu-1/), Erişim Tarihi: 07.12.2015.

Anonim. 2014c. Petrol fiyatları neden düştü? -2 Web Sitesi: (http://www.gazetebilkent.com/2014/12/18/petrol-fiyatlari-neden-dustu-2/), Erişim Tarihi: 07.12.2015.

Anonim. 2016. Gıda Endüstrisinde Hijyen ve Sanitasyon. Web Sitesi: (http://www.foodelphi.com/gida-endustrisinde-hijyen-ve-sanitasyon/), Erişim Tarihi: 16.02.2016.

Anupama, S. and Manvika, S. 2007. Apple Pomace: A Potential Source for Bio-Fuel. IAEC.

Avcı, A. ve Dönmez, S. 2011. Biyoyakıt olarak bütanol ve fermentasyonla üretimi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 09, Sayı: 2, s.1-12 (www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110201.pdf) Erişim tarihi: 20.01.2013

Ballongue J., Amine J., Mason E., Petitdemange H. and Gay R. 1986. Role of acetate and butyrate in the induction of NADH: rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum.* Biochimie 68:675-580.

Bhushan, S., Kalia, K., Sharma, M., Singh, B. and Ahuja, P.S. 2008. Processing of apple pomace for bioactive molecules. Crit. Rev. Biotechnol. 28(4), 285-296.

Brown, R.C. 2003. Biorenewable resources: engineering new products from agriculture, Iowa State Press, Ames, IA, USA.

Dürre, P. 2008. Fermentative Butanol Production. Bulk Chemical and Biofuel. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1125:353-362.

Feng, X., Wang, H., Wang, Y., Wang, X. and Huang, J. 2010. Biohydrogen production from apple pomace by anaerobic fermentation with river sludge. International Journal of Hydrogen Energy 35:3058-3064.

Girio, F.,Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L., Marques, S.and Bogel-Lukasik, R. 2010. "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review." Bioresour. Technol. 101, 4775-4800

Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, S. and Jiang, W. 2009. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as fermantation medium. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36:1225-1232.

Hang, Y.D., Lee, C.Y. and Woodams, E.E. 1982. A solid state fermentation system for production of ethanol from apple pomace. J Food Sci 47:1851-1852.

Hang, Y.D. and Woodams, E.E. 1986. Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production. Mircen. J Appl Microbial Biotechnol 2:283-287.

Hours, R.A., Voget, C.E. and Ertola, R.J. 1988. Apple pomace as a raw material for pectinase production in solid state culture. Biological Wastes 23:221-228.

Jones, D.T. and Woods, D.R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiol Rev. 50:484-524.

Kadam, K.L. and Newman, M.N. 1997. Development of a low-cost fermantation medium for ethanol production from biomass. Applied Microbiology and Biotechnology 47:625-629.

Kahamaiseh, E.I.S., Hamid, A.A., Yusoff, W.M.W. and Kalil, M.S. 2013. Effects of some Environmental Parameters on Biobutanol Production by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357 in Date Fruit Medium. Pakistan Journal of Biological Sciences. 16(20):1145-1151.

Keis, S.S., Bennett, C.F., Ward, V.K. and Jones D.T. 1995. Taxonomy and phylogency of industrial solvent-producing Clostria. International Journal of Systematic Bacteriology. 45(4)693-705.

Kumar, M., Goyal, L., Sarkar, A. and Gayen, K. 2012. Cooparative economic assesment of ABE fermentation based on cellulosic and non-cellulosic feedstock. Applied Energy, 93:193-204.

Lane, A.G. 1979. Methane from anaerobic digestion of fruit and vegetable processing wastes. Food Technol Aust 31:201-207.

Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J. and Jung, K.S. 2008. Fermentative Butanol Production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering. 101(2)209-228.

Mahawar, M., Sing, A. and Jalgaonkar, K. 2012. Utility of Apple Pomace for Various Products. A Review. Food and Bioproduct Processing. 90:597-605.

Mayank, R., Ranjan, A. and Moholkar, V.S. 2013. Mathematical Models of ABE Fermentation: review and analysis. Critical Reviews in Biotechnology. 33(4):419-447.

Natalense, J. and Zouain, D. 2013. Technology Roadmapping for Renewable Fuels: Case of Biobutanol in Brazil. Journal of Technology Management and Innovation. Volume 8, Issue 4.

Nejame, S. 2010. Butanol as a Fuel – View from the field. Promotum, presentation to NREL, March 11th.

Parekh, M., Formanek, J. and Blaschek, H.P. 1999. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermantation medium based on corn step water. Applied Microbiology and Biotechnology 51:152-157.

Parmar, I. and Rupasinghe, H.P.V. 2013. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. Biosource Technology 130:613-620.

Quareshi, N. and Blaschek, H.P. 2006. Butanol production from agricultural mass. Food Biotechnology, 2th edition; 526-549.

Qureshi, N., Saha, B. and Cotta, M. 2007. "Butanol Production From Wheat Straw Hydrolysate Using *Clostridium beijerinckii*." Bioprocess Biosyst. Eng. 30, 419-427.

Qureshi, N., Ebener, J., Ezeji, T., Dien, B. and Cotta, M. 2008a. "Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* BA101: Part 1 – Use of Acid and Enzyme Hydrolysed Corn Fiber." Bioresour Technol. 99, 5915-5922.

Shalini, R. and Gupta D.K. 2010. Utilization of pomace from apple processing industries: a review. J Food Sci Technol 47(4):365-371.

Thirmal, C. and Dahman, Y. 2012. Comparasion of existing pretreatment, Saccharification and Fermentation Processes for Butanol Production From Agricultural Residues. The Canadian Journal of Chemical Engineering. Volume 90:745-761.

Vasil' ev, Y., Morozov, A.N., Zaiko, G.M. and Moiseeva, V.G. 1976. The utilization of waste from vegetable and fruit canning plants. Konservnaya-i-Ovoshchesushil'naya-Promyshlennost 3:32-34.

Voget, C.E., Mignone, C.F. and Ertola, R.J. 1985. Butanol production from apple pomace. Biotechnol Lett 7:43-44.

Yang, M., Kuittinen, S., Keinänen M., Vepsäläinen, J., Romar, H., Tynjälä, P., Lassi, U. and Pappinen, A. 2014. The use of (green field) biomass pretreatment liquor for fermentative butanol production and the catalytic oxidation of biobutanol. Chemical Engineering Research and Design. 92:1531-1538.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seda YILMAZ
Doğum Yeri : Merzifon / AMASYA
Doğum Tarihi : 1990
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise :Merzifon Anadolu Lisesi (2008)
Lisans : Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2012)
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Şubat 2013-Şubat 2016)

Çalıştığı Kurum

Amasya Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği – Amesia Gıda San. veTic. Limited Şirketi (Ağustos 2012-Ağustos 2013)
UNTAŞ Gıda San. Tic. A.Ş (Ocak 2014-)

Sempozyum

Poster Sunumu "Amasya İlimize ait Geleneksel Lezzet 'Bakla Dolması' " 2.Geleneksel Gıdalar Sempozyumu 2012, KONYA