

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

POLİ(N-VİNİL-2-PIROLİDON) AŞILANMIŞ
SODYUM KARBOKSİMETİLSELÜLOZUN BAZI MAYA TÜRLERİNİN
TUTUKLANMASINDA MATRİKS OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Murat GÖKGÖZ

ARALIK 2011

ÖZET

POLİ(N-VİNİL-2-PIROLİDON) AŞILANMIŞ SODYUM
KARBOKSİMETİLSELÜLOZUN BAZI MAYA TÜRLERİNİN
TUTUKLANMASINDA MATRİKS OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

GÖKGÖZ, Murat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Aralık 2011, 113 sayfa

Bu çalışmada modifiye edilmiş karboksimetilselüloz etanol üretimi için yeni bir destek materyali olarak kullanıldı. Yeni destek materyali olarak karboksimetilselüloz (CMC) ile N-vinil-2-pirolidonun (NVP) farklı aşılama yüzdelerinde aşı kopolimerleri hazırlandı. Bu kopolimerlerden çapraz bağlanarak oluşturulan küreler element analizi, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve şişme deneyleri ile karakterize edildi.

Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces bayanus* ve *Kluyveromyces marxianus* mayaları etanol fermantasyonu için, karboksimetilselüloz-aşı-poli(N-vinil-2-pirolidon) (CMC-aşı-PVP) aşı kopolimerlerine hapsedme yoluyla tutuklandı. Etanol üretimi üzerine aşılama yüzdesinin, başlangıç glikoz derişiminin ve çapraz

bağlayıcı derişiminin etkisi araştırıldı. Ayrıca *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları tutuklanmış kürelerin tekrar kullanılabilirlikleri araştırıldı ve *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerin 4 kez, *S. bayanus* tutuklanmış kürelerin 7 kez ve *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin 6 kez aktifliklerini kaybetmeden tekrar kullanılacakları bulundu. Etanol üretim miktarları *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* için sırasıyla 59,3, 46,88 ve 42,54 g/L olduğu tespit edildi. En yüksek etanol üretim hızı ise *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* için sırasıyla 2,25, 8,23 ve 2,89 g/Lsaat olarak bulundu. Bu sonuçlar, maya tutuklanması için önerilen bu metodun endüstriyel uygulamalardaki etanol üretim proseslerinde kullanılma potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Etanol üretimi, fermantasyon, tutuklanma, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Kluyveromyces marxianus*, karboksimetilselüloz, N-vinil-2-pirolidon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF USABILITY OF POLY(N-VINYL-2-PYRROLIDONE)
GRAFTED SODIUM CARBOXYMETHYLCELLULOSE
ON IMMOBILIZATION OF SOME YEAST SPECIES AS MATRIX

GÖKGÖZ, Murat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

December 2011, 113 pages

In this work, modified carboxymethylcellulose (CMC) was used as a new support material for production of ethanol. Crosslinked graft copolymers of CMC with N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) were prepared in different grafting yields as new support material. The beads which formed by crosslinked of these copolymers were characterized by means of elemental analysis, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscope (SEM) and swelling experiment.

Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces bayanus* and *Kluyveromyces marxianus* were immobilized using entrapment method in the graft copolymers of carboxymethylcellulose-g-poly-vinyl-2-pyrrolidone (CMC-g-PVP) for ethanol fermentation. The effects of grafting yield, initial glucose concentration and crosslinker concentration on the yield of ethanol process was investigated. In

addition, reusability of the immobilized yeasts was investigated and found that the materials can be used four times for *S. cerevisiae*, seven times for *S. bayanus* and six times for *K. marxianus* without losing their activity. Ethanol production was found 59.3, 46.88 and 42.54 g/L for *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *K. marxianus*, respectively. The highest ethanol productivity was found 2.25, 8.23 and 2.89 g/Lh for *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *K. marxianus*, respectively. The results pointed out that the proposed method for immobilization of yeast has potential in industrial applications for ethanol process.

Key Words: Ethanol production, fermentation, immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Kluyveromyces marxianus*, carboxymethylcellulose, N-vinyl-2-pyrrolidone

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım ve bana her türlü desteği veren çok değerli hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım boyunca bana destek olan ve yönlendiren hocam Sayın Prof.Dr. Bekir SARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerinden dolayı değerli hocalarım Prof.Dr. Gülsu Akın ÖKTEM ve Prof.Dr. Zeki ÖKTEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca laboratuvarımızı, bilgilerimizi ve daha bir çok şeyi paylaştığım Murat İNAL'a teşekkür ederim.

Analizlerdeki yardımlarından dolayı Ogün BOZKAYA ve Ömer SONKAYA'ya da teşekkür ederim.

Ayrıca mayaların temini konusunda bizden yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Gıda Müh. öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Filiz ÖZÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün çalışmalarım boyunca, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, beni sabırla anlayan ve beni destekleyen biricik kızım ve sevgili eşime sonsuz teşekkürler. İyi ki varsınız.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Biyoyakıtlar.....	3
1.2. Biyoetanol.....	9
1.2.1. Etanolün Üretim Yolları.....	10
1.2.1.1. Etilenin Hidrasyonu.....	10
1.2.1.2. Asetaldehitin İndirgenmesi.....	11
1.2.1.3. Fermantasyon Yolu ile Üretim.....	11
1.2.2. Biyoetanolün Elde Edilebildiği Ham madde Kaynakları.....	15
1.2.3. Etanolün Kullanım Alanları.....	17
1.2.3.1. Endüstriyel Etanol.....	17
1.2.3.2. İçecek Etanol	18
1.2.3.3. Yakıt Etanolü.....	18
1.3. Mayalar.....	21
1.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24

1.3.2. <i>Saccharomyces bayanus</i>	25
1.3.3. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	26
1.4. Tutuklanma.....	29
1.4.1. Mikroorganizma Destek Materyali.....	31
1.4.2. Hücre Tutuklanma Yöntemleri.....	34
1.4.2.1. Taşıyıcı Yüzeyine Tutunma (adsorpsiyon).....	35
1.4.2.2. Gözenekli Bir Matriks İçine Hapsetme.....	36
1.4.2.3. Hücre Topaklanması (Flokülasyon).....	37
1.4.2.4. Bir Bariyerin Arkasında Çevreleme (Kapsülasyon).....	38
1.5. Aşı Kopolimerler.....	39
1.6. Karboksimetilselüloz.....	40
1.7. N-Vinil-2-Pirolidon	43
1.8. Etanol Üretimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	45
1.9. Çalışmanın Amacı.....	47
2. MATERYAL VE YÖNTEM	49
2.1. Materyal.....	49
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	49
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	50
2.2. Deneysel Yöntem.....	51
2.2.1. CMC-aşı-PVP Aşı Kopolimerinin Sentezi.....	51
2.2.2. Aşılama Yüzdesine Monomer Derişiminin Etkisi.....	52
2.2.3. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerin Hazırlanması.....	53
2.2.4. Kürelerin Şişme Derecesinin Belirlenmesi.....	53
2.2.5. Mayalar İçin Kültür Ortamları.....	54

2.2.5.1. Katı Besi Ortamı.....	54
2.2.5.2. Büyüme Ortamı.....	54
2.2.5.3. Fermantasyon Ortamı.....	55
2.2.6. Maya Üremesinin Takibi	55
2.2.7. Maya Kuru Kütlesini Belirlenmesi.....	55
2.2.8. Mayaların Polimerik Desteklere Tutuklanması.....	56
2.2.9. Fermantasyon Deneyleri.....	56
2.2.10. Glikoz Analizi.....	57
2.2.11. Gaz Kromatografisi ile Etanol Tayini.....	58
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	59
3.1. CMC-aşı-PVP kopolimerlerinin Kürelerinin Karakterizasyonu.....	59
3.1.1. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin FTIR Analizleri.....	60
3.1.2. Aşı Kopolimerin Termogravimetrik Analiz Sonuçları.....	61
3.1.3. CMC, CMC-aşı-PVP ₁ , CMC-aşı-PVP ₂ ve CMC-aşı-PVP ₃ Kürelerin Şişme Derecelerinin Belirlenmesi.....	66
3.1.4. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri.....	68
3.1.5. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin Gözenek Analizleri.....	69
3.2. Fermantasyon Deneyleri.....	70
3.2.1. Kürelere Maya Tutuklanması.....	70
3.2.2. Maya Tutuklanmış Kürelerin Fiziksel Özellikleri.....	73
3.2.3. Mayaların Çoğalma Eğrileri.....	76
3.2.4. Tutuklanmış Mayaların Etanol Üretimlerinin Başlangıç Glikoz Değişimi İle Değişimi.....	77

3.2.5. Tutuklanmış Mayaların Etanol Üretimlerine Çapraz Bağlayıcı Derişiminin Etkisi.....	88
3.2.6. Maya Tutuklanmış Kürelerin Tekrar Kullanılabilirlikleri.....	90
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünyadaki ülkelerin biyoyakıt üretme oranları.....	7
1.2. Glikozdan etanol oluşum mekanizması.....	14
1.3. Dünya’da 2000-2010 yılları arasında biyoetanol ve biyodizel üretimi...	20
1.4. Mayaların çoğalma eğrisi.....	22
1.5. Mayaların biyoteknolojik uygulama alanları.....	24
1.6. <i>S. cerevisiae</i> ’nın elektron mikroskop görüntüsü.....	25
1.7. <i>S. bayanus</i> ’un elektron mikroskop görüntüsü.....	26
1.8. <i>K. marxianus</i> ’un elektron mikroskop görüntüsü.....	27
1.9. <i>K. marxianus</i> ’un diğer bazı <i>Kluyveromyces</i> türleri ve <i>S. cerevisiae</i> ile ilişkisi.....	29
1.10. Hücre tutuklanma yöntemleri.....	34
1.11. Selülozun kimyasal yapısı.....	41
1.12. CMC’nin kimyasal yapısı.....	42
1.13. NVP ve PVP’nin molekül yapısı.....	44
2.1. CMC üzerine NVP aşılama şeması.....	52
3.1. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin FTIR Analizleri.....	61
3.2. CMC, PVP ve CMC-aşı-PVP’nin TGA termogramları.....	62
3.3. CMC-aşı-PVP ₁ , CMC-aşı-PVP ₂ ve CMC-aşı-PVP ₃ kopolimerlerinin karşılaştırılmalı TGA ve DTGA termogramları.....	65

3.4.	CMC, CMC-aşı-PVP ₁ , CMC-aşı-PVP ₂ ve CMC-aşı-PVP ₃ kürelerinin % şişme derecelerinin zamanla değişimi.....	67
3.5.	CMC-aşı-PVP ₃ kürelerinin % şişme derecelerinin çapraz bağlayıcı derişimiyle değişimi.....	68
3.6.	A) CMC kürelerinin SEM görüntüleri B) CMC-aşı-PVP kürelerinin SEM görüntüleri.....	69
3.7.	Maya tutuklanmış kürelerin SEM fotoğrafları.....	72
3.8.	Mayaların çoğalma eğrileri.....	77
3.9.	<i>S. cerevisiae</i> tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları.....	91
3.10.	<i>S. bayanus</i> tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları.....	92
3.11.	<i>K. marxianus</i> tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyoetanolün bazı özellikleri.....	9
1.2. Fermantasyon prosesleri ile üretilen bazı ürünler.....	12
1.3. Hücre tutuklanmasında kullanılan bazı destek materyalleri.....	32
3.1. CMC-aşı-PVP kopolimerlerinin elementel analiz sonuçları ve aşılama yüzdeleri.....	60
3.2. Kürelerin gözenek boyutu ve gözenek hacmi.....	70
3.3. <i>S. cerevisiae</i> tutuklanmış kürelerin çapları ve tutuklanma yüzdeleri.....	74
3.4. <i>S. bayanus</i> tutuklanmış kürelerin çapları ve tutuklanma yüzdeleri.....	74
3.5. <i>K. marxianus</i> tutuklanmış kürelerin çapları ve tutuklanma yüzdeleri.....	75
3.6. <i>S. cerevisiae</i> tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretimin değişimi.....	79
3.7. <i>S. bayanus</i> tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretimin değişimi.....	80
3.8. <i>K. marxianus</i> tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretimin değişimi.....	81
3.9. <i>S. cerevisiae</i> tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile etanol üretim parametrelerinin değişimi.....	83
3.10. <i>S. bayanus</i> tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile etanol üretim parametrelerinin değişimi.....	84

3.11. <i>K. marxianus</i> tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile etanol üretim parametrelerinin değişimi.....	85
3.12. Tutuklanmış mayaların aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretiminin değişiminin karşılaştırılması	86
3.13. Tutuklanmış mayaların etanol üretimine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi.....	90

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışı ve teknolojinin gelişimi ile insanların enerji ihtiyaçları her gün artmaktadır [1]. Bu artışa zıt olarak petrol ve doğalgaz gibi oluşması çok uzun zaman alan fosil yakıtlar da gün geçtikçe tükenmektedir. Fosil yakıt kaynaklarının tükenmesi, fiyatlarının artması ve çevreye olan zararlı etkileri, insanları yenilenebilir ve daha temiz enerji kaynakları aramaya yönlendirmiştir [2].

İnsanların enerji taleplerine, yenilenebilir ve temiz enerji kaynakları olarak rüzgar, güneş, hidrolik enerji ve biyogaz, biyodizel, biyobenzin gibi biyoyakıtlar cevap vermiştir. Biyoyakıtların çevreyle dost olmaları ve egzoz emisyon değerlerinin çok düşük olması, artan hava kirliliğinin azaltılmasında önemlidir [3].

Biyometanol, mikroorganizmalar (maya, bakteri, mantar) tarafından şekerin fermantasyonuyla elde edilen yüksek oktan sayısına sahip, çevre dostu bir yakıttır. Benzinle çeşitli oranlarda karıştırılarak oktan sayısını artırır ve CO emisyonlarını azaltarak sera etkisini azaltıcı etki yapar. Ayrıca çeşitli kimyasal maddelerin üretiminde çözücü ve ham madde olarak da kullanılır [4].

Fermantasyon, tek mikroorganizma ile belirli optimum koşullarda gerçekleştirilen biyolojik değişimler yoluyla üretim teknolojisi olarak tanımlanır. Fermantasyon işlemleri ile mikroorganizmalardan, organik çözücüler, organik asitler, alkoller, aminoasitler, antibiyotikler, enzimler, vitaminler, biyoyakıtlar ve biyogazlar gibi ürünler elde edilebilir [5].

Fermantasyonda esas amaç mümkün olan en kısa sürede, en az ham madde kullanarak en fazla ürün alınmasıdır. Uygulanan işlem ve kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak gerek besi yeri yapısı ve derişimleri, gerekse süreler farklılık gösterir [6].

Fermantasyon işlemlerinde ana bileşen mikroorganizmadır. Biyoetanol üretiminde biyokatalizör olarak *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Saccharomyces bayanus* (*S. bayanus*), *Zymomonas mobilis* (*Z. mobilis*) ve *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) en çok kullanılan mikroorganizmalardandır. Bu mikroorganizmalar yüksek etanol üretimi, yüksek etanol ve inhibitör toleransı gibi avantajlarından dolayı endüstride yaygın kullanım alanı bulmuştur [7].

Hücrelerin fiziksel olarak katı bir destek içine hapsedilmesi veya katı yüzeyinin belirli yerlerine tutuklanmasına mikroorganizma tutuklanması denir. Bir desteğe tutuklanmış kültürde yürütülen fermantasyonun, serbest kültür ortamında yapılan fermantasyona göre ürün verimini daha çok arttırdığı bilinmektedir [8-11].

Mikroorganizmaların tutuklanması için uygun bir destek materyaline ihtiyaç vardır. Bu destek materyali ortam koşullarında etkilenmemeli, toksik olmamalı, dayanıklı olmalı, mikroorganizmanın özelliklerini iyileştirici rol oynamalıdır. Tutuklanma işlemlerinde kullanılan destek maddeleri organik veya anorganik materyallerden oluşabilir. Bu materyaller selüloz, nişasta, aljinat, kitosan gibi doğal polimerler, stiren, akrilamit ve vinil polimerleri gibi sentetik polimerler ve kil, cam, silikajel ve metal oksitler gibi anorganik materyaller olabilir [9, 11-13].

Karboksimetilselüloz ucuz, yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu ve bitkisel oluşu, toksik olmamasından dolayı en önemli suda çözünebilen selüloz türevlerinden biridir. Serbest asit, sodyum tuzu veya ikisinin karışımı şeklinde bulunabilir. Sodyum karboksimetilselüloz (CMC) üretimi alkali selüloz ile monokloroasetik asit veya Na-monokloroasetat'ın reaksiyonu sonucu üretilmektedir. Deterjan, kozmetik, gıda, tekstil ve kâğıt endüstrilerinde yaygın kullanım alanı vardır [14].

N-vinil-2-pirolidon (NVP) hidrofilik ve iyonik olmayan bir monomerdur, radikalik, termal ve foto başlatıcılarla kolaylıkla polimerleşebilir. Poli(N-vinil-2-pirolidon) (PVP) suda ve diğer polar çözücülerde çözünebilen, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen hidrofilik bir polimerdir [15]. Monomer haliyle toksik olmasına rağmen, polimer haliyle insanlar tarafından yenilebilecek kadar güvenli bir maddedir. PVP yalnız başına kullanılabildiği gibi bir polimer üzerine aşlanarak da çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır.

1.1. Biyoyakıtlar

Enerji kaynakları genel olarak yenilenebilir ve yenilenemeyen enerji kaynakları olarak iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Oluşması çok uzun yıllar alan petrol, kömür, doğal gaz gibi klasik enerji kaynakları ile radyoaktif atomların oluşturduğu nükleer kaynaklar yenilenemez enerji kaynaklarıdır. Oluşmaları ve yenilenmeleri çok uzun bir süre aldığı için yenilenemez denilen bu enerji kaynakları kendi içinde fosil yakıtlar ve radyoaktif elementler olarak sınıflandırılabilir. Yenilenebilir enerji kaynakları ise, oluşumları fosil ve radyoaktif kökenli enerji kaynaklarına göre çok daha kısa zaman alan kaynaklardır. Bu enerji kaynakları da su, rüzgâr, güneş, jeotermal ve biyolojik kütle (biyokütle) alt sınıflarından oluşmaktadır [16].

Dünyada nüfus artışı, sanayileşme ve kentleşme olguları, küreselleşme sonucu artan ticaret olanakları, doğal kaynaklara ve enerjiye olan talebi giderek arttırmaktadır. Uluslararası Enerji Ajansı (IEA) tarafından yapılan tahminlere göre dünya enerji talebinin 2030 yılında 2007 yılındakine göre %40 oranında artacağı belirtilmektedir. Bu senaryoya göre yıllık ortalama %1,5 düzeyinde talep artışına

karşılık gelen bu enerji talebi 2007 yılındaki 12 milyar ton eşdeğeri petrol (tep) düzeyinden 2030 yılında 16,8 milyar tep düzeyine ulaşacaktır [17].

Dünyadaki enerji ihtiyacının yaklaşık %70'ini karşılayan fosil kökenli yakıtların, özellikle petrol kaynaklarının gelecek 40-50 yıl içerisinde tükeneceğinin tahmin edilmesi ve fosil kökenli yakıtların çevre üzerine olumsuz etkilerinin olması dünya genelinde alternatif, yenilenebilir enerji kaynakları kullanmaya doğru bir eğilime sebep olmuştur.

Alternatif ve yenilenebilir enerji kaynaklarının içinde biyokütleden elde edilen biyokütle enerjisi büyük pay sahibidir. Yenilenebilir enerji kaynaklarından birisi olan biyokütle, 100 yıllık periyottan daha kısa sürede yenilenebilen, karada ve suda yetişen bitkiler, hayvan artıkları, besin endüstrisi ve orman ürünleri ile kentsel atıkları içeren tüm organik maddeler olarak tanımlanmaktadır [18].

Fosilleşmemiş bitkisel ve hayvansal organik maddelerden oluşan biyokütle enerji kaynakları, enerjiye dönüştürülürken buldukları fiziksel hale göre katı biyokütle, sıvı biyokütle ve gaz biyokütle olarak üç temel kısma ayrılmaktadır. Katı biyokütle enerji kaynaklarından odun, bitki artıkları ve tezek gibi maddeler zaten çok eski zamanlardan beri enerji kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Sıvı ve gaz biyokütle enerjilerinin ise 21. yüzyılın başlarından beri kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Gaz biyokütle enerjileri ise biyohidrojen, biyogaz (metan), singaz denilen gazlardan oluşmaktadır. Sıvı biyokütleler genellikle taşıt motorlarında yakıt ham maddesi olarak kullanıldıkları için “biyoyakıt” olarak isimlendirilirler ve biyoetanol, biyodizel, biyometanol, biyodimetileter, biyoiltersiyerbutileter ve bitkisel yağlardan oluşmaktadır [19].

Tarihte kullanılan ilk biyoyakıt hint tohumu yağı (castorbean oil) olup, Mısırlılar lambalarda aydınlatma amacıyla kullanılmıştır. 10 Ağustos 1893'te Rudolf

Diesel ilk dizel motorun denemesini yapmış ve 1898'de yer fıstığı yağını dizel yakıtı olarak kullanmıştır [19].

Biyodizel gelişimindeki ikinci adım ise Belçikalı bilim adamı G. Chavanne tarafından atılmıştır. Brüksel Üniversitesi'nde bitkisel yağlardan esterleşme yöntemiyle elde ettiği ve "biyodizel" olarak adlandırdığı yakıt için ilk patenti "Bitkisel Yağların Yakıt Olarak Kullanımındaki Dönüşüm İşlemi Patenti" ismiyle 1937 yılında almıştır [20]. Ancak o dönem petrol ürünlerin kullanımlarının yaygınlaşması ve fiyatlarının düşük olması sebebiyle biyodizelin gelişmesi gecikmiştir.

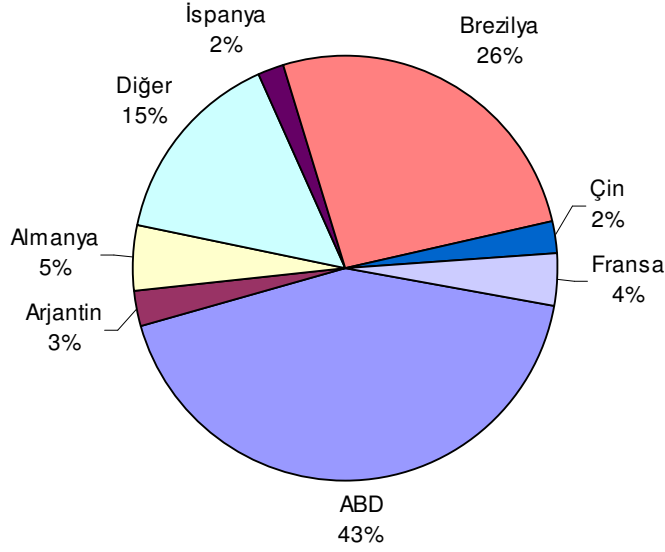
19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren aydınlatma lambalarında yaygın bir enerji kaynağı olarak kullanılan etil alkolün motorlarda da kullanılabileceği fikri, biyoetanolün ortaya çıkışına ilham kaynağı olmuştur. Biyoetanol otomobil motorlarında yakıt olarak ilk defa ABD'de Henry Ford tarafından üretilen araçlarda kullanılmaya başlamıştır. 1908 yılında Model T adındaki araçların biyoetanolü yakıt olarak kullanması motor sanayinde büyük bir gelişmedir. Ancak bu gelişmeye rağmen biyoetanolün o dönemlerde kullanımı vergilerden, yasaklamalardan ve tarımsal ham madde fiyatlarının yüksek olmasından dolayı ciddi bir ilerleme kaydedememiştir [21].

Petrol İhraç Eden Ülkeler Teşkilatı (OPEC) 1973 yılında Viyana'da düzenlediği konferansta aldığı kararlarla petrolün varil fiyatının 3 dolardan 12 dolara yükseltmesi tüm dünyada şok etkisi yaratmıştır. Bu kriz özellikle sanayileşmiş ülkeler olmak üzere bütün dünyadaki petrol ithal eden bütün ülkeleri etkilemiştir. Bu olay literatüre 1973 petrol krizi olarak yerini kaydedilmiştir ve o zamana kadar henüz ilerlemelerini sağlayamamış biyoyakıtlar için dönüm noktası olmuştur. Bu krizin

yükünden kurtulmak isteyen birçok ülke çareyi alternatif ve yenilenebilir biyoyakıtlara yönlenmekte bulmuştur [21].

Petrol krizinden kurtulma yolundaki en büyük adımı 1970'li yıllarda Brezilya ve ABD atmıştır. Bu ülkeler uygulamış oldukları biyoyakıt programlarına ek olarak, vergi indirimleri çeşitli teşvik ve desteklerle biyoyakıtların gelişmesine ve yaygınlaşmasına öncülük etmişlerdir. 1990'lı yılların başından itibaren Avrupa Birliği ülkelerinden Almanya ve Fransa'nın başlattığı biyodizel üretimi ile Avrupa'da da biyoyakıtı yöneliş başlamıştır [21]. Daha sonraki yıllarda yaşanan petroldeki fiyat artışları, petrol kökenli yakıtların çevreye zararlı etkilerini insanların dikkate alması ve biyokütle kaynaklarının artması, biyoyakıt sektörüne olan ilgiyi daha da arttırmıştır. 21. yüzyılın başlarında ise biyoyakıt sektörü tarihinin en parlak dönemine girmiştir. Artık dünya enerji gündeminin en önemli konusu olan biyoyakıtlar, dünyadaki diğer birçok ülkenin de gündemine girmiştir.

2010 yılında dünya genelinde üretilen biyoyakıt (biyoetanol+biyodizel) miktarı 59,261 milyon ton eşdeğeri petroldür (mtep)(Şekil 1.1.). Bu üretimde en büyük pay 25,351 mtep üretimle Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nindir. Toplam üretimin % 43'ünü tek başına karşılayan ABD'den sonraki en büyük üretici % 26 ile Brezilya'dır. Avrupa'da ise Almanya, Fransa ve İspanya en büyük biyoyakıt üreticileri konumundadırlar [22].



Şekil 1.1. Dünyadaki ülkelerin biyoyakıt üretme oranları [22]

Ülkemizde biyoyakıtlar ilgili çalışmalar 2000’li yıllardan sonra hızlanmıştır. 2001 yılında Sanayi ve Ticaret Bakanlığı’nda “Biyodizel Çalışma Grubu” oluşturulmuş ve ilk kez biyodizel ismi 4.12.2003 tarihinde 5015 Sayılı Petrol Piyasası Kanunu’nda harmanlanan ürünler arasında yer almıştır.

Ülkemiz açısından biyoyakıtlarla ilgili en sevindirici haber içinde bulunduğumuz yıl içinde alınmıştır. Enerji piyasası Düzenleme Kurumu’nun (EPDK) 19 Eylül 2011 tarihinde aldığı bir karar ile 2013 yılından itibaren akaryakıtta her yıl artan oranlarda yerli tarım ürünlerinden üretilen etanol ve biyodizel katılması zorunlu hale getirilmektedir. Bu alınan karar ile biyoetanol ve biyodizel tesis sayısı artırılacak, biyoyakıtların üretimi daha istikrarlı bir şekilde devam edebilecek, ayrıca petrol ithalatına ödenen döviz miktarı azalacaktır [23].

Ülkemizde hali hazırda Tütün ve Alkol Piyasası Düzenleme Kurumu’ndan (TAPDK) etanol üretim izni alıp üretim yapan firma sayısı onikidir. Bu firmalardan

dokuz tanesi endüstriyel kullanım için etanol üretirken 3 tanesi yakıt alkolü yani biyoetanol üretmektedirler. Bu firmalar sırasıyla; Tarımsal Kimya Teknolojileri San. ve Tic. A.Ş. (Tarkim), Tezkim Tarımsal Kimya İnş. San. ve Tic. A.Ş. (Tezkim) ve Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş.'dir. Söz konusu bu firmalar aynı zamanda üretmiş oldukları biyoetanolü piyasaya sürmek için TAPDK'dan dağıtım yetki belgesi de almışlardır [24].

Ülkemizde ilk biyoetanol üretimi Bursa'da kurulu olan Tarkim tarafından, 2004 yılında gerçekleştirilmiştir. Tarkim biyoetanol üretiminde ham madde olarak buğday ve mısırı kullanmaktadır ve yıllık üretim kapasitesi yaklaşık 40 milyon litre civarındadır [25].

Türkiye'nin ikinci biyoetanol tesisi ise 2007 yılında Adana'da Tezkim firması tarafında faaliyete geçirilmiştir. Biyoetanol üretimini mısır kullanarak gerçekleştiren Tezkim günde 100 bin litre üretimiyle yıllık yaklaşık 35 milyon litre biyoetanol üretmektedir. Biyoetanol üretirken günlük 75 ton da yem sanayi için önemli bir ürün olan mısır küspesi elde edilmektedir [26].

Ülkemizdeki üçüncü tesis ise yine 2007 yılında faaliyete geçen Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş.'nin Konya'da kurduğu Çumra Şeker Fabrikası'dır. Bu tesis şu an için ülkemizdeki en büyük biyoetanol üretim tesisidir ve yıllık 84 milyon litre üretim ile Türkiye ihtiyacının yarısından çoğunu karşılamaktadır. Çumra Şeker Fabrikası ham madde olarak diğer biyoetanol fabrikalarından farklı olarak şeker pancarı kullanmaktadır. Ayrıca biyoetanol üretim sürecinde yan ürün olarak elde edilen koyu şilempenin hayvan yemi ve gübre olarak kullanılması da sağlanmıştır [27].

1.1. Biyoetanol

Etanol kimyasal formülü C_2H_5OH olan, renksiz ve yanıcı bir bileşiktir. Genellikle kimyasal tepkimeler yoluyla elde ediliyorsa “etanol”, mikroorganizmalar tarafından fermantasyon yoluyla elde ediliyorsa “biyoetanol” olarak isimlendirilmektedir. Ancak etanol çoğunlukla 2 türün yerine de kullanılmaktadır.

Biyoetanol, şeker, nişasta veya selüloz içeren, şeker pancarı, mısır, buğday ve odunsu bitkiler gibi tarımsal ürünlerin fermantasyonu ile elde edilen ve benzinle belirli oranlarda harmanlanarak kullanılan yenilenebilir bir yakıttır. Biyoetanolün bazı fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri Çizelge 1.1.’de özetlenmiştir [28-30].

Çizelge 1.1. Biyoetanolün bazı özellikleri

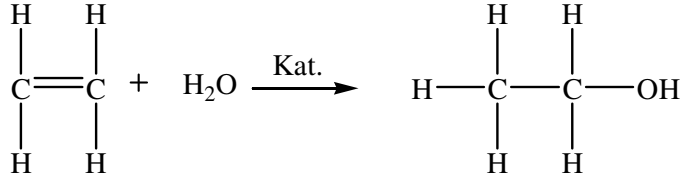
Özellik	Değer
Mol Kütle (g/mol)	46,07
% C	52,2
% H	13,1
% O	34,7
Yoğunluğu (20°C’de, g/mL)	0,792
Suda Çözünme	Sonsuz
Kaynama Noktası (1 atm’de, °C)	78,4
Donma Noktası (1 atm’de, °C)	-115
Alevlenme Sıcaklığı (°C)	425
Özgül Isı (kJ/kg °C)	2,5
CO ₂ Emisyonu (kg / kg etanol)	1,9

1.2.1. Etanolün Üretim Yolları

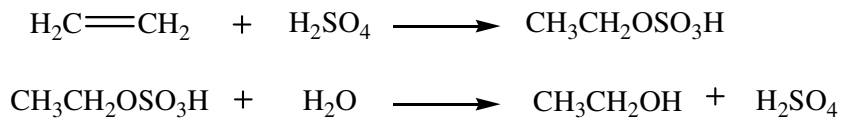
Etanolün üç önemli üretim şekli vardır; sentetik olarak etilenin hidrasyonu ve asetaldehitin indirgenmesi ile ve biyolojik olarak da mikroorganizmalar aracılığıyla şekerlerin fermantasyonu sonucu üretilebilir.

1.2.1.1. Etilenin Hidrasyonu

Endüstriyel üretimde kullanılan bir metottur. Bir petrol ürünü olan etilenin hidrasyonu, katalizör varlığında, 300 °C'de ve yüksek basınç altında su buharı etkisiyle etanol sentezi gerçekleştirilen bir işlemdir. Katı katalizör olarak çoğunlukla metal oksitler kullanılır.

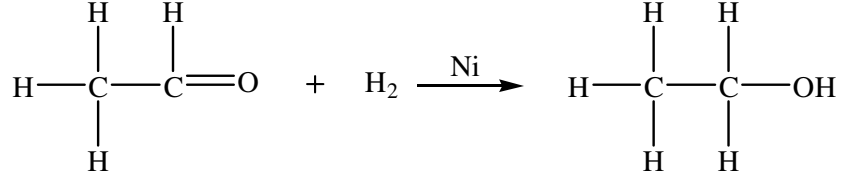


Daha önceki yıllarda katalizör olarak fosforik asit kullanılmaktaydı. Etilen 100 °C'de derişik sülfürik asitle tepkimeye sokulduğunda ara basamakta etil hidrojen sülfat meydana gelir ve reaksiyon karışımı sıcak su ile hidroliz edilirse etanol elde edilir. Bu yöntem günümüzde çok fazla kullanılmamaktadır [31].



1.2.1.2. Asetaldehitin İndirgenmesi

Asetaldehit, 100-130 °C'de nikel katalizörlüğünde hidrojenlenerek indirgendiğinde etanol elde edilir.



1.2.1.3. Fermantasyon Yolu ile Üretim

Fermantasyon bir substratı ürünlere dönüştürmek için mikroorganizmaların kullanıldığı süreçlerdir [32]. Fermantasyonda esas amaç mümkün olan en kısa sürede, en az ham madde kullanarak en fazla ürün alınmasıdır. Uygulanan işlem ve kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak gerek besi yeri yapısı ve derişimleri, gerekse süreler farklılık gösterir [6].

Fermantasyon prosesleri ile pek çok farklı türde ürünler elde edilebilmektedir. Ekmek, peynir, bira, kahve, tıbbi ve endüstriyel enzimler, amino asitler, antibiyotikler, soya sosu, biyopolimerler, mikrobiyal yağlar, tatlandırıcılar, renklendiriciler, özel kimyasallar, aşular, terapötik proteinler vb. türler bunlardan bazılarıdır [33]. Çizelge 1.2.'de fermantasyon prosesleri ile üretilen bazı ürünler verilmektedir.

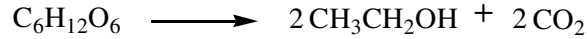
Fermantasyon işlemleri ile en yaygın olarak üretilen ürünlerden bir tanesi de etanoldür. Fermantasyon ile etanol üretimi, bilinen en eski fermantasyon proseslerindedir. Etanol tarih öncesinden beri insanlar tarafından sarhoş eden olarak bilinir. Kuzey Çin de bulunan 9000 yıllık çömleklerde neolitik çağda insanların

alkolik karışımlar yaptığı görülmüştür. 6000 yıl öncesinde, Sümerler ve Mısırlıların meyve ve tahıllardaki şekerden etanol elde ettikleri bulunmuştur [34].

Çizelge 1.2. Fermantasyon prosesleri ile üretilen bazı ürünler

Gıda maddeleri	Endüstriyel ürünler	Tıbbi ürünler	Enzimler	Vitaminler
Ekmek	Biyoetanol	Penisilin	Lakkaz	B12
Peynir	Biyodizel	Parasetamol	Amilaz	B2
Yoğurt	Metan gazı	Nistatin	İnvertaz	A
Kakao	Asetik asit	Streptomisin	Maltaz	Riboflavin
Kahve	Aspartik asit	Vankomisin	Selülaz	
Sirke	İtakonik asit	Polimisin	Proteaz	
Turşu	Laktik asit	Eritromisin	Lipaz	
	Sitrik asit			

Etanol fermantasyonu, şekerin mayalar tarafından etanol ve karbondioksite parçalanmasıdır. Gay-Lussac tarafından 1810 yılında, ilk defa tanımlanan glikozdan etanolün oluşma reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir [34].



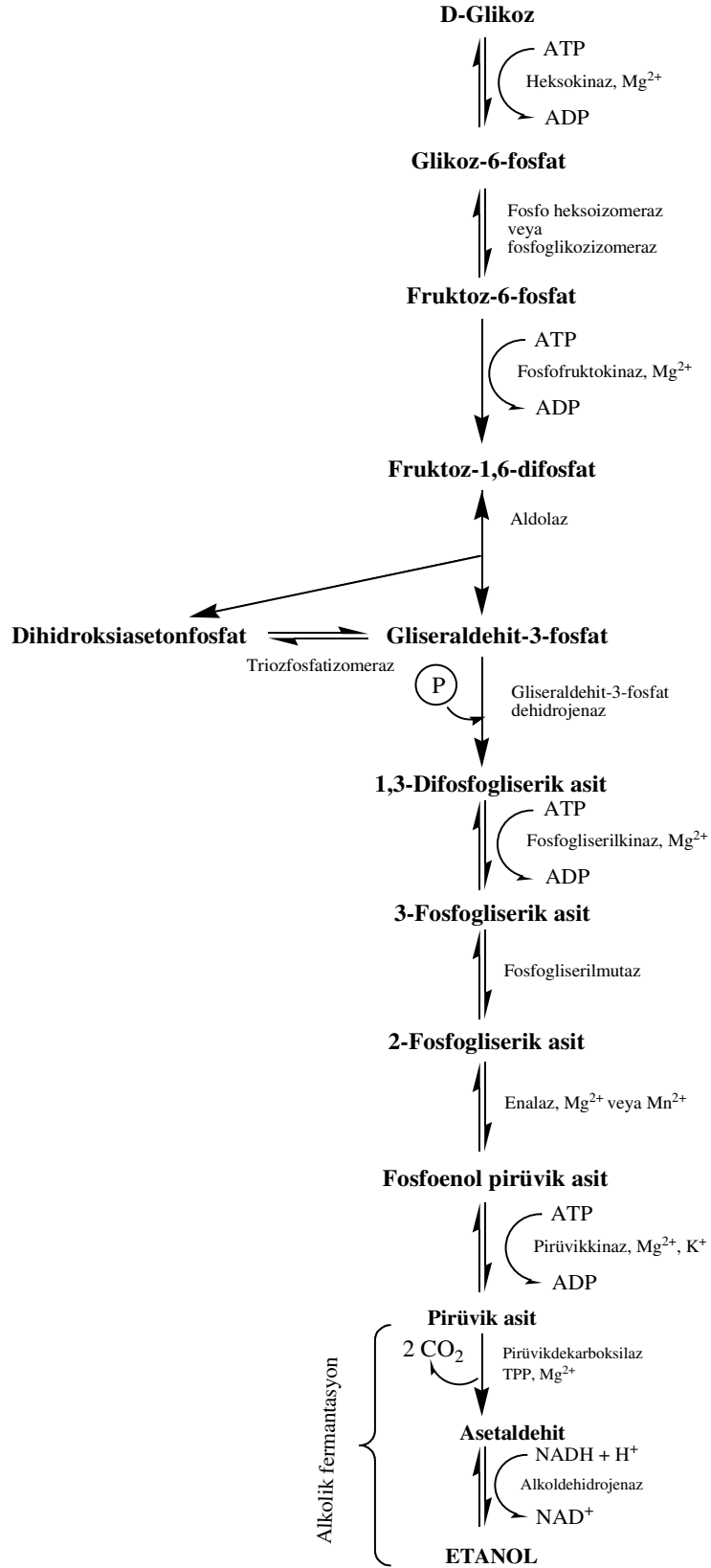
Bu reaksiyona göre 1 kg glikozdan 0,51 kg etanol ve 0,49 kg karbon dioksit oluşmaktadır [35]. Bu teorik verim olarak da adlandırılabilir. Bununla birlikte mikroorganizmalar glikozun bir kısmını büyüme ve hayati faaliyetlerini sürdürmek için de kullandıklarından gerçekte bu verim % 51'den daha küçüktür [36]. Ancak yapılan çalışmalarda mikroorganizma türü, ortam şartları, karbon kaynağının

bileşimi gibi pek çok unsurun etanol üretim verimi üzerinde etkili olduğu görülmüştür [37].

Fermantasyon işlemlerinde ana bileşen mikroorganizmadır. Etanol üretimi için en çok kullanılan mikroorganizmalar mayalardır. Biyoetanol üretiminde biyokatalizör olarak *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* ve *K. marxianus* en çok kullanılan mikroorganizmalardandır. *S. cerevisiae*, yüksek etanol üretimi, yüksek etanol ve inhibitör toleransı gibi avantajlarından dolayı endüstride yaygın kullanım alanı bulmuştur [38].

Bütün canlılar hayati faaliyetlerini sürdürebilmek için enerji elde etmek zorundadırlar. Enerjiyi de besin maddelerini yakarak yani daha küçük moleküllere parçalayarak elde edebilirler. Canlıların besin maddelerinden enerji elde olayına solunum denir. Bazı canlılar ortamda da oksijen varsa besinleri CO₂ ve H₂O'ya kadar yakabilirlerken, oksijen kullanmayan bazı canlılar ise 1 mol glikoz molekülünü ancak 2 mol pürivata kadar parçalayabilirler [39]. Pürivat molekülünü tam olarak yakamayan canlılar pürivatı tamamen parçalayabilenlere göre daha az enerji elde ederler.

Glikoz maya hücrelerine girdiğinde stoplazmada bir seri tepkimeye girerek pürivata dönüşür. Maya hücreleri oksijensiz solunum yapabildikleri için, pürivik asit kademesinden daha ileri bir parçalanmayı gerçekleştirebilirler. Fermantasyonda son elektron alıcısı, mayalarda etanol hayvanlarda laktik asit, bazı bakterilerde gliserol ya da sirke bakterilerinde asetik asittir. Mayalardaki glikoliz olayında, pürivik asit önce CO₂ gazı çıkararak asetaldehite dönüşür. Daha sonra da asetaldehit etanole indirgenir. Hayvanlarda ve insanlarda gerekli enzimler olmadığı için asetaldehit ve etanol meydana gelmez [35]. Şekil 1.2.'de görülen bu oksijensiz solunuma "Etanol Fermantasyonu" denir.



Şekil 1.2. Glikozdan etanol oluşum mekanizması

Etanol endüstriyel olarak kesikli, sürekli, beslemeli sürekli ve yarı sürekli olmak üzere dört tip fermantasyon yöntemiyle üretilebilir. Kesikli fermantasyonda maya kültürü ve substrat diğer besinlerle birlikte bir reaktör içinde bulundurulur. Yatırım maliyetinin düşük ve çok fazla kontrol gerektirmemesinden dolayı günümüzde etanol üretimlerinin çoğu kesikli sistemlerle yapılmaktadır [40]. Sistemin tamamen sterilizasyonu diğer proseslerden daha kolaydır. Kesikli sistemin başka bir avantajı da esnek ürün çeşitliliği yani çok çeşitli özellikteki ürünlerin elde edilmesinde kullanılabilmesidir [36].

Optimum mayalanma şartları maya hücrelerinin yasama şartları ile belirlenir. Besiyerindeki belirli protein ve mineral madde miktarı maya gelişmesini teşvik eder. Optimum mayalanma sıcaklığı maya çeşidine göre, 20°C ile 30°C arasında bulunur. Etanol fermantasyonunda, etil alkol miktarı 100-180 g/L arasında olduğu zaman etanol mikroorganizmaların hayati faaliyetlerini engellemektedir. Endüstride alkolik fermantasyonda başlama maddesi olarak glikoz ve glikoz içeren ürünler (melas, mısır, şeker pancarı, buğday, patates, vb) kullanılmaktadır. Nişasta içeren ürünler önce bir ön işleme tabi tutularak glikoza dönüştürülür, arkasından fermantasyonda kullanılır. Fermantasyon neticesinde etanol çözeltisi elde edilir. Etanol daha sonra damıtma ile fermantasyon ortamından ayrılır.

1.2.2. Biyoetanolün Elde Edilebildiği Ham Madde Kaynakları

Biyoetanol mikroorganizmalar tarafından bir fermantasyon prosesi sonucunda oluşturulduğu için bu işlemden mikroorganizmaların kullanacağı ham maddeye ihtiyaç vardır. Biyoetanol üretimi için kullanılacak ham maddeler şeker

pancarı, şeker kamışı, mısır, patates, buğday, odunsu bitkiler ve tarımsal atıklar gibi şeker, nişasta veya selüloz özlü ürünlerdir.

Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde biyoetanol ağırlıklı olarak ithal edilen şeker kamışı ile mısır, buğday, arpa ve şeker pancarından üretilmektedir. Ancak şeker pancarından daha fazla biyoetanol verimi elde edildiği için şeker pancarının buğdaya göre daha verimli ve sera gazlarının artmasında daha az etkin olduğu bilinmektedir [41]. AB, yeni şeker rejimi ile gündeme gelen şeker üretiminin daraltılması konusunda biyoetanol üretimini teşvik ederek şeker pancarı üretiminin sürekliliğini sağlamaktadır. Çünkü şeker pancarı sosyal ve ekonomik katma değeri yüksek bir bitkidir. Çiftçiye daha fazla gelir sağladığı gibi her türlü atığı ve yan ürünü de kıymetli mali değere sahiptir. Aynı alanda çam ormanına nazaran 3 kat daha fazla oksijen üretir. Geniş yaprakları nedeniyle etkili fotosentez sağlamakla birlikte topraktaki buharlaşmayı engellemektedir. 1 hektar şeker pancarı, 30 ton CO₂ emerken, 19 ton O₂ açığa çıkarmaktadır [19].

Dünyada 2. nesil biyoetanol üretimi için lignoselülozik maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Lignoselülozik maddeler, doğada bol bulunan odun ve bitkisel kaynaklı maddeler veya atıklar gibi ucuz ham madde kaynaklarıdır. Lignoselülozik maddeler temel olarak selüloz, hemiselüloz, lignin, üronik asitler ve asetil gruplardan oluşmaktadırlar. Hemiselülozik ve selülozik kısımlar glikoz, mannoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan oluşan monosakkaritleri içerirler ve bileşimleri tamamen ham maddenin doğasına bağlıdır. Lignoselülozik maddeler, biyoetanol üretimi için parçalama, asidik veya enzimatik hidroliz gibi ön işlemlere tabi tutulmalıdırlar. Bundan sonra diğer şeker içeren biyokütle kaynakları gibi mayalar yardımıyla fermantasyon işlemi gerekmektedir [42].

Dünyanın en büyük biyoetanol üreticisi konumundaki Amerika'da toplam biyoetanol üretiminin büyük bir çoğunluğu mısırdan sağlanırken, Brezilyada şeker kamışı ana ürün olarak kullanılmaktadır. Tayland'da şeker kamışı kullanımı daha yaygınken, Çin etanolün % 80'ini mısır ve buğdaydan üretmektedir [43].

1.2.3. Etanolün Kullanım Alanları

Etanolün yakıt olarak kullanımının ötesinde, içecek ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda da yaygın kullanım alanı vardır. Etanolün kullanım amaçları farklı olsa da üretim süreçleri birbirlerine benzerlik göstermektedir.

1.2.3.1. Endüstriyel Etanol

Etanolün endüstriyel uygulamalarda en çok kullanılan alanlardan biri kişisel bakım ürünleri sanayisidir. Saç spreyi, diş macunu, tıraş losyonları, kolonya, parfüm, vb. birçok ürün büyük hacimlerde etanol içermektedir. Aynı zamanda, deodorantlar, losyonlar, el dezenfektanları, sabunlar ve şampuanların üretimlerinde de etanol kullanılmaktadır.

Endüstriyel alkoller ilaç endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Etanolün karakteristik özelliklerinden dolayı öksürük ilaçları, burun açıcılar, iyot çözeltisi vb. birçok ilaçta taşıyıcı olarak ve çözücü olarak da antibiyotik, aşı, tablet, hap ve vitamin üretiminde kullanılmaktadır. Yüksek dereceli alkol mikroplar için kuvvetli zehir tesiri yaptığından antiseptik ve dezenfekte edici olarak kullanılır. Ayrıca ağrı kesici olarak da kullanımı vardır.

Pek çok temizlik ürünü de yüksek miktarlarda alkol içermektedir. Örneğin bir şişe sprey ev dezenfektanı % 80 oranında alkol içerebilmektedir.

Etanolün laboratuvarlarda çözücü olarak, ilaç ve kozmetik sanayisinde, ayrıca sterilizasyon ajanı olarak uygulama alanları vardır.

Etanol, boyalar, vernik ve patlayıcılar da dâhil olmak üzere pek çok diğer maddelerin üretiminde çözücü olarak kullanılmaktadır [44].

1.2.3.2. İçecek Etanol

İçecek etanol üretimi saf etanol ürünle karıştırılmasıyla ya da içecek üretilirken ortamda aynı zamanda etanolün de oluşmasıyla elde edilir. Glikoz içeren ham maddelerin mikroorganizmalar aracılığıyla fermantasyonları sonucunda alkollü içecekler üretilmektedir. Bu içecekler kullanılan ham maddenin türüne ve üretilen alkol miktarına göre farklı şekillerde isimlendirilmektedirler.

1.1.3.3. Yakıt Etanolü

Biyometanol, şimdiye kadar dünya çapında ulaşım için en yaygın olarak kullanılan ve alternatif yakıt olarak uzun bir geçmişi olan bir biyoyakıttır. Biyometanol sadece ulaştırma sektöründe değil elektrik üretiminde, kojenerasyon uygulamalarında ve kimyasal maddelerin üretiminde de kullanılabilen bir biyoyakıttır.

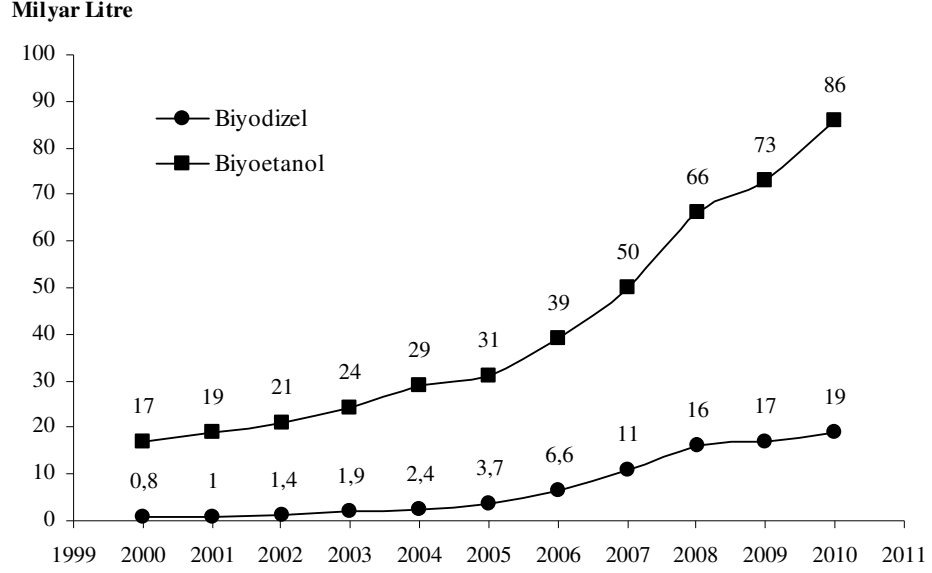
Etanol doğrudan bir ulaşım yakıtı olarak kullanılabilirdiği gibi benzin ile belirli oranlarda karıştırılarak da kullanılabilir. Biyometanol içeren yakıtlar “E” simgesi ile gösterilmektedir ve yanında da biyometanolün benzine karıştırılma yüzdesi

sayısal olarak verilmektedir. Bu karışımlar % 2 (E2) ile % 100 (E100) arasında değişmektedir [44-46].

Biyoetanol, üretim yöntemi, yanlış depolama ve kazara bir bulaşmadan veya açık bir kaptaki saklandığı zaman bile atmosferdeki suyu absorbe ettiğinden dolayı genellikle küçük bir miktar su içerir. Biyoetanol su içeriğine göre genellikle iki safılıkta üretilmektedir. Genellikle su içeriği % 5 ile 10 arasındaysa sulu biyoetanol, su içeriği, yüzde 1'den az ise susuz biyoetanol denir. Kütlece % 95,6'dan daha yüksek bir safılıkta biyoetanol geleneksel damıtma yöntemleri ile elde edilemez. Biyoetanolün içindeki su iki yöntemle uzaklaştırılabilir. Birinci yöntemde karışım benzen karıştırılarak tekrar damıtma yapılır. İkinci yöntemde ise su ve etil alkol moleküllerinin büyüklüklerinin birbirinden farklı olmasından yararlanılarak karışım moleküller membran filtrelerden süzülerek etil alkolün suyu uzaklaştırılabilir. Ancak bu işlemler saflaştırma maliyetini arttıracığından biyoetanolün de fiyatını arttırmış olur.

Biyoetanolün sadece benzinli motorlarda kullanılmamaktadır. Dizel motorlarda da % 15 oranında etanol içeren motorin karışımı, motorda herhangi bir değişime gerek duyulmadan kullanılabilir. Biyoetanol ve dizel yakıtın beraber kullanıldığı ve % 15 etanol, % 84,5 motorin ve % 0,5 katkı maddesi içeren bu karışıma "Diesohol" denir. Ancak daha yüksek oranlarda etanol kullanılan dizel karışımlar teknik bazı problemlerden ötürü oldukça zor bir yöntemdir [47].

Küresel olarak, biyoetanol taşımacılıkta kullanılan yakıtın sadece küçük bir yüzdesini (yaklaşık %2) oluşturmasına rağmen bu rakam çok hızlı büyümektedir. Uluslararası Enerji Ajansı tarafından biyoyakıtların, 2013 yılında dünyadaki benzinin %5,4'ünü karşılayacağı tahmin edilmektedir. Küresel biyoetanol satışları, benzin satışlarından çok daha hızlı büyümektedir [48].



Şekil 1.3. Dünya’da 2000-2010 yılları arasında biyoetanol ve biyodizel üretimi [49]

2010 yılında dünyada üretilen biyoetanol miktarı 86 milyar litre biyodizel miktarı ise 19 milyar litredir. 2000 yılında üretilen miktarlar ile kıyaslandığında biyoetanolün biyodizele göre çok daha hızlı ve büyük bir gelişim gösterdiği görülmektedir.

Biyoetanolün üstün yönleri [50-53];

- ✓ Yerli kaynaklardan üretilen, yenilenebilir bir yakıt kaynağıdır.
- ✓ İthal edilen petrole bağımlılığı azaltır.
- ✓ Motorlardan daha iyi verim almayı sağlar.
- ✓ Araçlarda modifikasyona gerek olmadan kullanılabilir.
- ✓ Tarımsal ürünlere olan talebi artırarak, kırsal alanda istihdam sağlar.
- ✓ Üretimi ve muhafaza edilmesi kolay ve güvenlidir.
- ✓ Daha az su kirliliği ve atık oluşturur.

- ✓ Çevre ile ilgili sorun oluşturan, hava kirliliğini ve sera etkisi yapan gaz emisyonlarını azaltır.

Biyoetanolün zayıf yönleri [54]

- ✓ Benzine kıyasla enerjisi biraz daha düşüktür.
- ✓ Korozyona neden olabilir.
- ✓ Alev parlaklığı düşüktür.
- ✓ Buhar basıncı düşüktür.

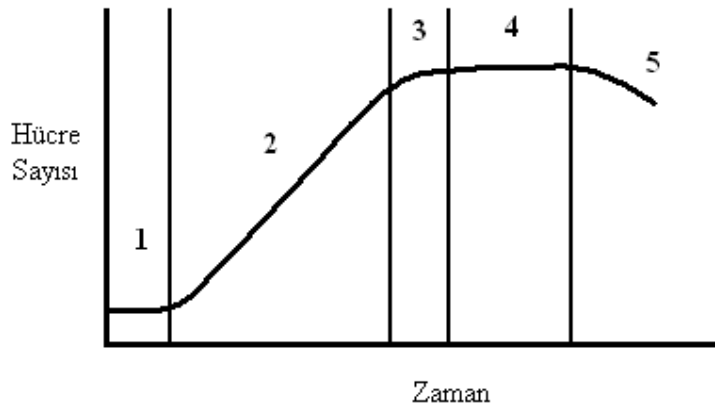
1.3. Mayalar

Mayalar, tomurcuklanarak ya da bölünerek çoğalan ve mantar ailesinin geniş bir bölümünü oluşturan bitkisel kökenli tek hücreli mikroskopik canlılardır. Mantarlar alemi, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Deuteromycota*, *Glomeromycota* ve *Zygomycota* bölümlerine ayrılmaktadır. Çoğu maya türü *Ascomycota* bölümüne ait olmakla beraber, *Basidiomycota* bölümüne ait olan mayalar da vardır. Mayaların hücresel yapıları temelde proteinler, lipidler, aminoasitler ve polisakkaritlerden oluşmaktadır. Mayaların hücreleri, boyutları, şekilleri ve renkleri yaşadıkları yerlere göre farklılık göstermekle birlikte bazı maya gruplarının boyları 2-3 µm iken bazı gurupların 20-50 µm aralığında değişmektedir. Mayaların hücre çapları ise 1-10 µm aralığında değişmektedir [55].

Mayalar doğada çok yaygındır. Toprakta özellikle de şeker ve karbonhidrat bakımından zengin olan besin maddelerinde bulunurlar. Üzüm ve meyve üzerinde

yabani olarak yaşarlar, meyvelerin sıkılması ile öz suya geçerler, uygun şartlarda çoğalırlar, ısıtmakla (kaynatmak, pastörize etmek) ölürlür.

Mayalar, buldukları ortamdaki besin maddelerini alarak hücrel bileşiklere dönüştürürler ve çoğalırlar. Çoğalma mikroorganizmaların sayısal artışı veya kütleli artışı şeklinde olur. Mikroorganizmaların kesikli sistemde üremesinde 5 dönem gözlenir (Şekil 1.4.) [56, 57].



Şekil 1.4. Mayaların çoğalma eğrisi

1. Gecikme dönemi: Mayaların buldukları ortamda sayıları sabit olup, bölünmenin olmadığı ve kendilerini üremeye hazırladıkları, metabolik faaliyetlerini arttırdıkları safhadır. Ekonomik açıdan bu sürenin kısa olması istenir. Bu dönemin uzunluk ve kısalığı mikroorganizma cinsine ve substrat, pH, sıcaklık vb. diğer faktörlere bağlıdır

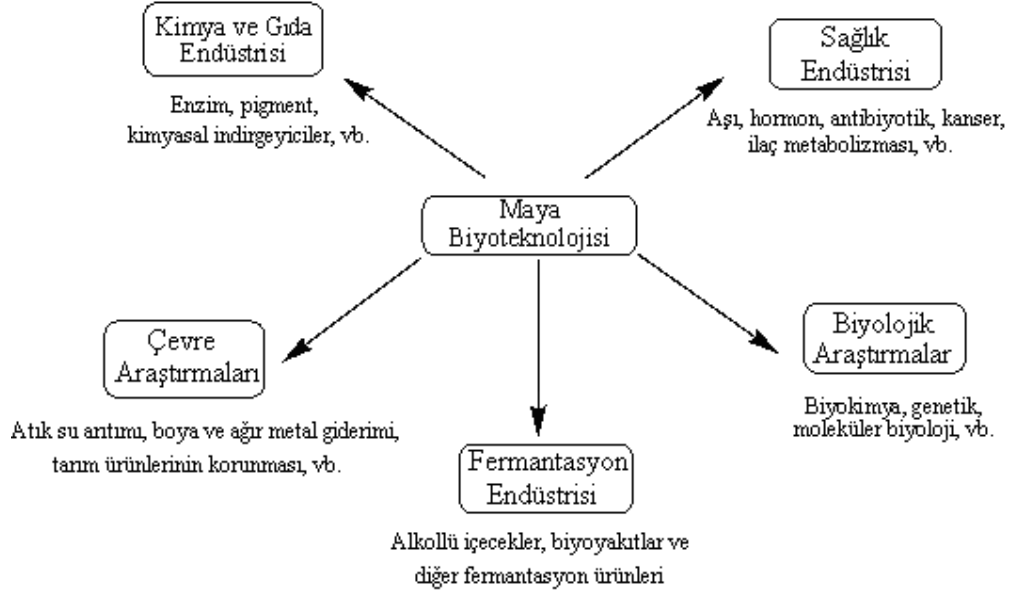
2. Üstel çoğalma dönemi: Bu dönemde hücreler hızlı bir bölünme durumuna girdiklerinden, kısa süreler içinde bölünerek hızlı bir büyüme ve çoğalma durumu görülür. Bu dönemde mikroorganizmaların canlı ve genç olduğu kabul edilir ve ölüm oranı önemsenmez.

3. Yavaşlama dönemi: Bu evrede mikroorganizmanın yaşlanması ve ölüm olayının artması nedeni ile logaritmik evreye kıyasla üreme hızında azalma olur.

4. Durma (Sabit) dönemi: Bu duruma ulaşıncaya mikroorganizma bulunduğu ortamda bazı değişiklikler meydana getirmiş olmaktadır. Hızlı büyüme sonucu ortamdaki besin maddeleri azalmış ve hücrelerin metabolik faaliyetleri sonucu ortama verilen metabolitler artmıştır. Bu dönemde toplam hücre kütlesi sabit kalmakla birlikte canlı ve aktif hücre derişimi genelde düşer. Dış ortamda yeteri kadar besin maddesi kalmadığından mikroorganizmalar hücre içi kaynakları tüketirler.

5. Ölüm dönemi: Ölüm dolayısıyla, ölenlerin hücrelerin sayısının yeniden meydana gelenlerin sayısından fazla olmaya başladığı dönemdir. Bu dönemde ortam şartları mayaların çoğalmalarını elverişsiz hale geldiğinden hücreler hızla ölmekte ve bu ölüm olayı logaritmik olarak meydana gelmektedir. Ölüm evresi başlamadan önce hücreler yeni besin ortamına aktarılsa yeniden büyüyebilirler.

Mayalar birçok ürünlerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanıldıkları için ekonomik olarak çok önemlidirler. Mayaların biyoteknolojik olarak uygulama alanları Şekil 1.5.'te gösterilmiştir [58]. Şüphesiz *S. cerevisiae* tüm yönleri ile endüstriyel kullanımda mikroorganizmaların en baskın temsilcisi olmuştur. Ancak mayalar arasındaki büyük çeşitlilik, modern mikrobiyolojik ve moleküler yaklaşımlar, diğer mayaların biyoloji ve endüstriyel potansiyellerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır [59].



Şekil 1.5. Mayaların biyoteknolojik uygulama alanları

1.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae tomurcuklanarak çoğalan, yuvarlak biçimli, hücre çapları yaklaşık 5-10 µm olan ökaryotik bir maya türüdür (Şekil 1.6.). Doğada her yerde bulunabilir. Çok eski zamanlardan beri ekmek ve alkollü içecek yapımında kullanıldığı bilinmektedir. Taksonomisine bakıldığında mantarlar âleminin *Ascomycota* bölümünde bulunmaktadır. Ökaryotik mikroorganizmaların hücre biyolojisi ve genetik bilgilerine ait çalışmalarda önemli bir rol oynamıştır ve model mikroorganizma olarak kullanılmıştır [60].



Şekil 1.6. *S. cerevisiae*'nin elektron mikroskop görüntüsü [61]

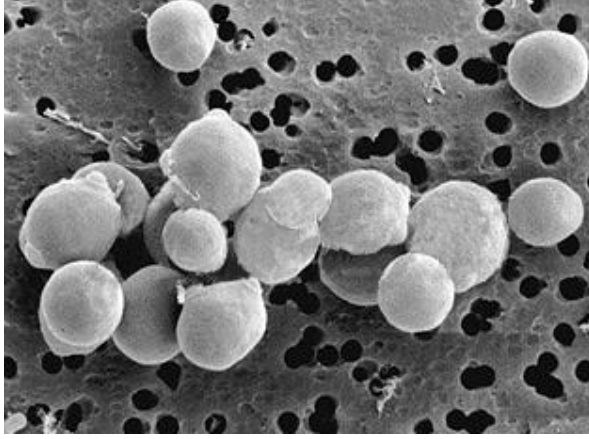
S. cerevisiae hücre döngüsünün araştırılmasında çok kullanışlıdır, çünkü hem kültürlenmesi kolaydır, hem de, bir ökaryot olduğundan dolayı hayvan ve bitkilerin karmaşık hücre içi yapılarına sahiptir. Ekmek mayası (*S. cerevisiae*)'nın yapısında kuru madde, protein, glisidler, lipidler ve mineral maddeler mevcuttur.

En yaygın olarak kullanılan etanol üreticisi maya *S. cerevisiae*'dir. Yüksek etanol üretimi ve yüksek etanol derişimlerine karşı daha dayanıklı olması en önemli özelliklerindedir. Ayrıca iyi spesifik büyüme oranı ve yüksek ozmotik faaliyetleri ve yüksek etanol üretim hızı *S. cerevisiae*'nin çok tercih edilmesinin sebeplerindedir [62].

1.3.2. *Saccharomyces bayanus*

Etanol fermantasyonunda çok geniş bir aralıkta maya ve bakteri kullanılabilir. *Saccharomyces* genli mayalar yüksek etanol verimi ve çeşitli şekerleri dönüştürebilme yeteneği olduklarından etanol fermantasyonunda çok

kullanılırlar [63, 64]. *S. cerevisiae* ve *S. bayanus* interspesifik hibritlerdir. Bu hibritlerin mitokondrial DNA'ları farklıdır [65]. Şekil 1.7.'de *S. Bayanus* hücrelerinin elektron mikroskop resimleri görülmektedir.



Şekil 1.7. *S. bayanus*'un elektron mikroskop görüntüsü [66]

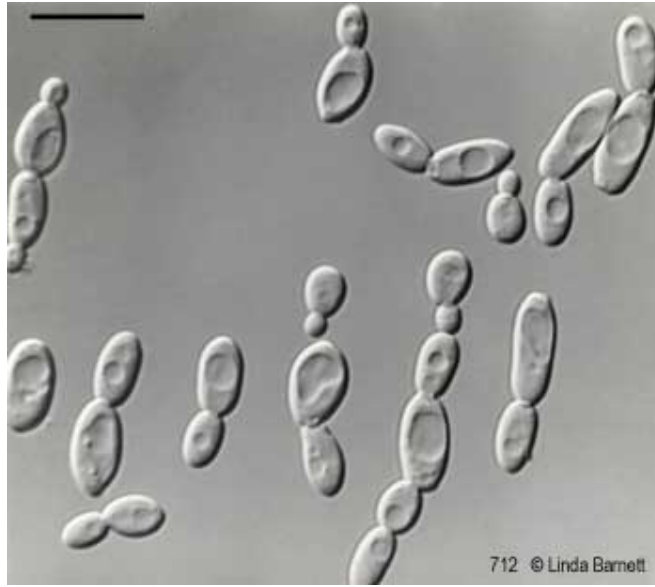
S. cerevisiae, *S. bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* özellikle alkollü içecek sanayisi olmak üzere endüstriyel üretimde yaygın olarak kullanılan mayalardır [67-70]. *S. bayanus*'un genetik ve moleküler analizine dayalı olarak 2 alt gruba farklılaştırılmıştır [71]. *S. bayanus* suşları hibrid olarak gösterilmiş ve ayrı bir grup olarak tarif edilmiştir [72, 73].

1.3.3. *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces cinsine ait mayalar taksonomide *Ascomycetes* sınıfında yer almaktadır. *Saccharomyces* sınıfının *Saccharomycetaceae* familyasına dahildir. *Kluyveromyces* cinsi oldukça heterojen olup, bugüne kadar 16 türü tanımlanmıştır.

Bu türlerin 10 tanesi filogenetik olarak *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Arxiozyma* ve *Candida* cinslerine ait olan türlerle karışmışlardır [74]. *Kluyveromyces* cinsinde bulunan birçok maya türü 1900'lü yılların başlarında tanımlanmıştır [75].

Bu maya türleri oval, küresel veya uzamış hücre fenotiplerine sahip olabilirler (Şekil 1.8.). *Kluyveromyces* sınıfında bulunan mayalar vejetatif olarak tomurcuklanma ile ürerler. Diploid olan türler ise spor oluşturabilir [76, 77].



Şekil 1.8. *K. marxianus*'un elektron mikroskop görüntüsü [78]

Kluyveromyces ve *Saccharomyces* mayaları genetik olarak güçlü benzerlikler göstermektedirler. *Saccharomyces* hücrelerinden daha küçük yapıda olabilirler. Doğal yaşam alanları çeşitli olabilir, meyvelerde ve süt ürünlerinde bulunabilirler. Karbon kaynağı olarak galaktozu asimile yeteneği ortak bir gen seti olduğunun bir belirtisidir [79]. *K. marxianus*'ta ise türe göre değişen 6-12 arasında kromozom bulunmaktadır. *K. marxianus* var. *marxianus*'un 10 kromozomu vardır ve

genom büyüklüğü 14 Mb'dir [80]. Kromozomal DNA'sı *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında % 40 oranında GC içerir. Genom büyüklüğünün 14 Mb olması *S. cerevisiae* ile arasında anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Büyük genom ve az kromozom sayısı tipik non-*Saccharomyces* mayalarının bir özelliğidir [76, 81].

Endüstriyel amaçlar için yaygın olarak kullanılan *Kluyveromyces* türleri *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilarum*, *K. marxianus*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ve *Kluyveromyces thermotolerans* olarak sıralanabilir.

K. marxianus mayasının biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlayan birçok özellikleri vardır. Bunlar hızlı büyüme oranı, sıcaklığa dayanıklı olması, geniş bir yelpazedeki şeker türlerini asimile etme kapasitesi, çok az ek besine ihtiyaç duyması, enzim (b-galaktosidaz, b-glukozidaz inülinaz ve poligalakturonaz, vb.), tek hücre proteini, aroma maddeleri üretimi, biyoremediasyon ve tıp uygulamalarında kullanılması yanı sıra, parçalayıcı enzimleri bulundurması ve fermantasyon ile etanol üretiminde kullanılabilmesidir [59, 82-85].

Bazı mayalar yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini koruyabilmektedirler. Yüksek sıcaklıklarda yapılan işlemlerde kontaminasyon riski azalacağı için sıcaklık bu mayalar için bir avantajdır. *K. marxianus* türleri 52°C'ye kadar olan yüksek sıcaklıklarda bile büyüyebilirler. *K. marxianus* 37 °C'de zenginleştirilmiş kültür ortamında 1 saatte yaklaşık 2 katı kadar büyümektedir [86, 87]. *K. marxianus* karbon kaynağı olarak glikoz, mannoz, galaktoz, ksiloz, laktoz ve arabinoz gibi çeşitli şekerleri kullanabilmektedir [88]. *K. marxianus*'un diğer bazı *Kluyveromyces* türleri ve *S. cerevisiae* ile kullanabildikleri karbon kaynağı ve aktif oldukları maksimum sıcaklıklar Şekil 1.9.'da verilmektedir [59].

	Laktoz	Glikoz	Sıcaklık
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	35 °C
<i>Kluyveromyces aestaurri</i>	-	+	35 °C
<i>Kluyveromyces nonfermentans</i>	-	-	42 °C
<i>Kluyveromyces wikerhamii</i>	-	+	37 °C
<i>Kluyveromyces lactics</i>	+	+	37 °C
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	+	52 °C

Şekil 1.9. *K. marxianus*'un diğer bazı *Kluyveromyces* türleri ve *S. cerevisiae* ile ilişkisi [59]

1.4. Tutuklanma

Tutuklanma (immobilizasyon), enzim veya mikroorganizmaların katalitik aktivitelerini kaybetmeden fiziksel veya kimyasal olarak bir katı destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır. Genel olarak tutuklanma uygulamaları enzim veya mikroorganizma sistemleri haricinde, uygun destek materyallerine ilaç, protein, bitki ve hayvan hücreleri, biyosensör ve biyoreaktör uygulamaları ve kontrollü ilaç salım sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [89].

Mikroorganizmalar bir desteğe tutturulduklarında tekrar tekrar kullanılabilirler ve desteğin içinde biriktikleri için normal bir süspanse kültürde olduğundan daha yoğun bir hücre derişimine sahip olurlar. Bu sayede de hücre miktarının artmasıyla reaktörün verimini arttırlar. Ayrıca tutuklanmış hücrelerin kullanılması genellikle katalizör aktivitesini de arttıran bir işlemdir. Mikroorganizma tutuklanmış sistemlerde ortamın heterojen olması elde edilen ürünün ve

biyokatalizörün kolayca ortamdan uzaklaştırılmasını, biyokatalizörün tekrar kullanılmasını, sürekli üretim sistemlerinde kullanılmasını ve çok geniş bir yelpazede biyoreaktör hazırlanmasını sağlar. Bunların yanı sıra tutuklanma biyokatalizör için koruyucu bir mikro çevre sağlar. Tutuklanmış sistemlerin bazı bazı üstünlükleri ve zayıf yönleri şöyle özetlenebilir [90, 91].

Üstünlükleri:

- İmmobilize sistemlerin deneysel kararlılığı yüksektir.
- Yüksek hücre yoğunluğu sağlanabilir.
- Sürekli proseslere uygulanabilir.
- Ürünün ve hücrelerin mikrobiyal kontaminasyon riski azalır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüj vb).
- Ürünler, tutuklanmış hücrelerden kolaylıkla yeniden elde edilebilir.
- Hücreler tutuklanmış sistemlerden geri alınabilir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb) karşı daha dayanıklıdır.
- Yüksek reaksiyon hızları ve yüksek verimlilik sağlar.
- Biyokatalizörün ortamdan uzaklaştırılması sonucu reaksiyon hızlı bir şekilde durdurulabilmektedir.

Zayıf yönleri:

- Ek materyal, donanım ve zaman gerektirdiğinden dolayı maliyeti arttırır.
- İmmobilizasyon süresince biyokatalizör aktifliğini kaybedebilir.

- Hücreslerin aşırı büyümesi nedeniyle destek materyalinden sızmalar ve parçalanmalar olabilir.
- Destek materyalinden olabilecek sızıntılar kontaminasyona neden olabilir,
- Destek materyalinden substart ve ürün geçişi sınırlanabilir.

Bu sınırlamalara rağmen tutuklanmış hücre sistemleri birçok üstün özelliği ve potansiyel uygulamaları nedeniyle yaygın kullanım alanına sahiptir.

1.4.1. Mikroorganizma Destek Materyali

Bir tutuklanma işlemi için destek malzemesi seçimine karar verirken, biyokatalizörün ve amaçlanan uygulamanın özelliklerini dikkatli değerlendirmek gerekir. Hemen hemen her türlü inorganik, organik, biyolojik ya da kullanım için modifiye edilmiş materyaller mikroorganizmaların tutuklanması için destek olarak kullanılabilir. Çizelge 1.3'de hücre tutuklanmasında kullanılan bazı destek materyalleri verilmiştir [90-92].

Çizelge 1.3. Hücre tutuklanmasında kullanılan bazı destek materyalleri

Anorganik	Organik	Biyolojik	Nanopartikül
Alümina	Poliyeten	Selüloz	Altın nano partiküller
Nikel oksit	Polistren	Niştasta	Quantum dots
Paslanmaz çelik	Poliakrilat	Aljinat	Nanobodies
Poröz cam	Nylon	Karragenan	Nanofiber
Silika	Poliakrilamit	Kollagen	Nanoporöz silica
Kil	Polipirol	Jelatin	Nanoprizma
Bentonit	Polianilin	Albümin	Nanotüpler
Kizelgur	Poliester	Dekstran	Nanoparçacıklar
Demir oksit	Poli(vinil alkol)	Agar	
Titanyum oksit	Polisiloksan	Kitosan	
Zirkonyum oksit	Polipropilen		
Ponza taşı	Poliüretan		
Aktif karbon			

Destek maddelerinin seçiminde dikkat edilmesi gereken bazı özellikler şu şekilde verilebilir [91]:

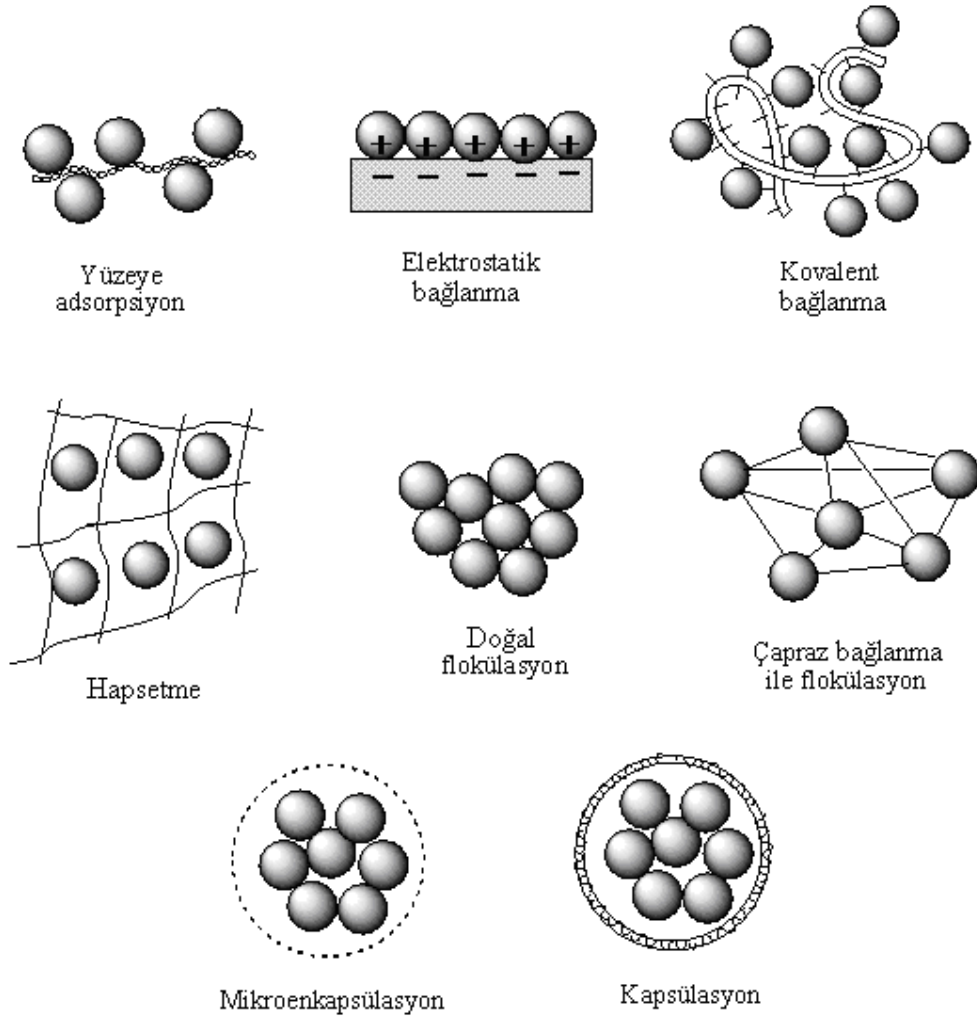
- Desteğin, dayanıklılık, sıkıştırılma, yüzey alanı, şekil, form, gözeneklilik derecesi, gözenek hacmi, su geçirgenliği, yoğunluğu gibi çeşitli fiziksel özellikleri kullanımına uygun olmalıdır.
- Desteğin reaksiyon ortamında çözünmeme, hidrofilik karakter, biyokatalizöre karşı inert olma ve modifiye edilebilmesi için uygun fonksiyonel gruplara sahip olma, yenilenme ve tekrar kullanım gibi uygun kimyasal özellikleri olmalıdır.

- Desteğin depolama dayanıklılığı, hücre verimliliği, biyokatalizörün aktivitesinin yenilenmesi, hücre canlılığının ve mekanik bütünlüğün korunması gibi özellikleri olmalıdır.
- Biyokatalizör gerektiğinde bakteri ve mantar saldırılarına, kimyasal madde, pH, sıcaklık ve organik çözücü tarafından bozunmaya ve hücre sel savunma mekanizmalarına (antikorlar, öldürücü hücreler) karşı dirençli olmalı.
- Destek, gıda, biyolojik sıvılar, vb ile doğrudan veya dolaylı temas edecek olursa, biyouyumluluk, bileşen veya artık kimyasalların toksisitesi gibi konularda deneysel güvenliği olmalıdır.
- Desteğin kendisinin ya da modifikasyon sürecinin, araştırmacılar ve son ürünü kullananlar için sağlık ve güvenlik kaygıları yaratabileceğinden, biyokatalizör tutuklanmış desteğin FDA (gıda, ilaç ve tıbbi uygulamalar için) onayı için GRAS (genel olarak güvenli kabul edilir) şartlarını taşıması gerekir.
- Destek malzemesi, kimyasallar, özel donanım ve reaktifler, ayrıca gerekli teknik beceri, kullanılanların çevre üzerindeki etkileri, endüstriyel ölçekli kimyasal hazırlama, sürekli kullanım prosesleri, desteğin yeniden kullanılması ve kontaminasyon maliyetleri gibi temel karşılaşılabilecek ekonomik sorunlar karşılanabilecek durumda olmalıdır.
- Akış hızı, hücre yoğunluğu, katalitik verimlilik, reaksiyon kinetiği, yan reaksiyonlar, birden fazla enzim ve hücre sistemleri, kesikli ya da sürekli sistemler, reaktör tipi, kütle transferi, ürün ve substratın difüzyon sınırlamaları gibi destek tarafından etkilenebilecek genel reaksiyon özelliklerine dikkat edilmelidir.

1.4.2. Hücre Tutuklanma Yöntemleri

Hücreler tutuklandıklarında, katalitik aktivitelerini koruyarak uzayda fiziksel olarak hapsedilmiş olurlar ve genellikle doğal olarak büyüdükleri şekilde büyümeye devam ederler. Zaten birçok mikroorganizmanın doğada farklı yüzeylere kendiliğinden tutunma yeteneği vardır.

Hücre tutuklanma yöntemlerinin şematik gösterimi Şekil 1.10.'da verilmektedir.



Şekil 1.10. Hücre tutuklanma yöntemleri

Genel olarak hücre tutuklanma teknikleri taşıyıcının yapısına ve hücre yerleştirmenin fiziksel mekanizmasına göre 4 ana başlık altında toplanmaktadır:

- a) Katı bir taşıyıcı yüzeyine tutunma veya adsorpsiyon
- b) Gözenekli bir matriks içine hapsetme
- c) Kendi kendine veya çapraz bağlayıcı ajanlar ile topaklanma ya da koagülasyon
- d) Bir bariyerin arkasında çevreleme ya da kapsülasyon [11, 91, 93].

1.4.2.1. Taşıyıcı Yüzeyine Tutunma (Adsorpsiyon)

Adsorpsiyon yöntemiyle hücre tutuklanması basit bir yöntemdir ve biyokatalizör ve destek malzemesi arasındaki elektrostatik kuvvetler nedeniyle geri dönüşümlü fiziksel adsorpsiyon veya hücre zarı ve taşıyıcı arasındaki kovalent bağlama tarafından yürütülmektedir. Adsorpsiyon yönteminde tutuklanacak hücre ve taşıyıcı materyal uygun koşullarda (pH, iyonik güç, vb) belirli inkübasyon süresinde etkileştirilerek hücre büyümesinin destek üzerinde gerçekleşmesi sağlanır ve bağlanmayan hücreler yıkanarak uzaklaştırılırlar. İmmobilize hücreler tek tabakalı ve genellikle film kalınlığı 1mm veya biraz daha fazla olabilir. Fiziksel adsorpsiyonda tutuklanmayı sağlayan kuvvetler; elektrostatik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, iyonik bağ ve hidrojen bağı etkileşimleridir. Bu kuvvetler ayrı ayrı zayıf olmalarına rağmen, sayıları fazla olduğunda yeterli tutunma gücüne sahip olurlar. Örneğin maya hücrelerinin yüzeyi negatif yüklü olduklarından pozitif yüklü taşıyıcılarla tutuklanma gerçekleştirebilir. Bazen hücrelerin taşıyıcıya bağlanması için bağlayıcı ajanlar (metal oksitler, glutaraldehit veya aminosilanlar vb) kullanmak gerekebilir. Adsorpsiyon yönteminde en çok kullanılan taşıyıcı destek materyalleri;

anyon ve katyon deęiřtiricili rećineler, aktif karbon, sentetik ve doęal polimerler, selüloz (odun, talař) silikajel, niřasta, killer, alümina, bentonit, gözenekli seramikler ve gözenekli camlardır. Adsorpsiyon yönteminin üstünlüklerini ve zayıf yönlerini řöyle özetleyebiliriz.

Üstünlükleri:

- İmmobilizasyon süresince hücreler hiç zarar görmezler ve aktivite kaybı olmaz;
- Diğer tutuklanma yöntemlerine göre hızlı, kolay ve ucuzdur;
- Destek veya hücre kimyasal değişmeye uğramaz;
- Hücreler bağlı oldukları taşıyıcıdan kolaylıkla geri alınabilir.

Zayıf yönleri:

- İmmobilize hücrelerde kayıp ve ürün kirlenmesi söz konusu olabilir.
- Hücre taşıyıcı üzerinde koagüle olarak aşırı yüklenebilir.
- Taşıyıcı üzerindeki grupların sterik etkisi bağlanmayı zorlaştırabilir.

1.4.2.2. Gözenekli Bir Matriks İçine Hapsetme

Bu yöntemle tutuklanma, hücrenin bir polimer matriksin örgü yapısı içinde alıkonulması esasına dayanır. Bu yöntemde polimerik matriksin yapısı, substrat ve ürün çıkısına izin verdiği halde hücrelerin dışarıya kaçmasını engelleyecek yapıdadır. Bu yöntemin kovalent ve çapraz bağlanma yöntemlerinden farkı hücre ile jel matriks arasında bir kimyasal bağ olmamasıdır. Bu yöntem her tür enzimi, biyokatalizörleri, bazı canlı hücreleri ve farklı büyüklükteki mikroorganizmaları hapsetmek için

kullanılabilen genel bir yöntemdir. Bu yöntem çok kolay uygulanabilen fiziksel bir yöntemdir. Kimyasal bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcılara ihtiyaç yoktur [94].

Bu yöntemde ilk olarak, hücreler, önceden oluşturulmuş gözenekli bir matriks içine hapsedilir. İmmobilize hücreler uygun besiyerinde büyümeye başladıktan sonra, hücrelerin hareketliliği diğer hücrelerin varlığı ve matriksin kafes yapısı tarafından engellendiği için etkili bir şekilde hapsetme işlemi yapılmış olur.

Hücrelerin hapsedilmesi için taşıyıcı destek maddesi seçilirken çeşitli faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bunlar; taşıyıcının fiziksel yapısı, sertliği ve dayanıklılığı gibi mekanik özellikleri, kimyasal ve mikrobiyal etkilere karşı direnç, hidrofilik ya da hidrofobik özelliği, geçirgenlik, yüzey alanı, maliyet ve kolay bulunabilirliktir.

Hapsetme yönteminde en çok kullanılan taşıyıcı destek materyalleri selüloz, aljinat, karregenat gibi doğal polisakkarit kökenli polimerler ve poliüretan, polistiren, poliakrilatlar, vinil ve allil polimerler ve poliamitler gibi sentetik polimerlerdir.

Hapsetme yönteminde matriks içinde yüksek biyokütle değeri elde edilebilmesine rağmen, jel ya da küre şeklinde olan matriksten besin ürünün ve oksijen geçişinde difüzyon sınırlamaları olabilir.

1.4.2.3. Hücre Topaklanması (Flokülasyon)

Hücre topaklanması, hücrelerin özelliklerini koruyarak daha büyük birimler oluşturmak üzere bir süspansiyonun içinde hızla kümelenmeleri veya bir araya gelmeleri olarak tanımlanmaktadır [95]. Topaklanmış hücrelerin büyüklüğü, bu hücrelerin çeşitli türlerdeki reaktörlerde kullanılmasına olanak sağlar. Bu tutuklanma

tekniki dolgu yatak, akışkan yataklı ve sürekli karıştırılmalı tank tipi reaktörlerde kullanılabilir. Topaklanma yeteneği özellikle küf, maya, mantar ve bitki hücrelerinde görülmektedir. Hücrelerin topaklanma miktarlarını arttırmak için yapay topaklaştırıcı ajanlar veya çapraz bağlayıcılar kullanılabilir [96]. Topaklanma için poliaminler, polietilenimin, polistiren sülfonat ve çeşitli fosfatlar gibi pıhtılaştırma ajanları yaygın olarak kullanılmaktadır. Topaklanmış hücrelerin mekanik özelliklerinin zayıf ve dayanıklılığının düşük olması dezavantajları olmasına rağmen yüksek hücre yoğunluğuna yol açması en büyük avantajıdır. Çapraz bağlanarak topaklanma, daha çok diğer tutuklanma sistemlerindeki hücre veya enzim kaçakların azaltmada yardımcı olarak ve diğer tutuklanma yöntemlerini geliştirmek için kullanılır.

Maya topaklanması, fermantasyon verimliliğini, ürün kalitesini ve mayanın ortamdan uzaklaştırılmasını etkilediği için özellikle alkollü içecek endüstrisi için büyük öneme sahiptir. Ayrıca topaklanma hücre duvarı kompozisyonu, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve besiyeri bileşimi de dahil olmak üzere pek çok faktör tarafından etkilenir [95-97]. Maya hücrelerinin birbirlerine yapışarak topaklanma gibi doğal bir yeteneği vardır. Binlerce hücrenin bir araya gelerek topaklanması geri dönüşümlü ve kalsiyum bağımlı bir süreçtir [98]. Maya hücre duvarı bitişik hücre duvarlarındaki mannoz kalıntılarını bağlayabilen lektin benzeri proteinler içerir. Maya flokülasyon FLO1, FLO5, FLO8 ve Lg-FLO1 gibi spesifik genlere bağlı karmaşık bir süreçtir [99].

1.4.2.4. Bir Bariyerin Arkasında Çevreleme (Kapsülasyon)

Canlı hücrelerin mikro kapsüller veya mikro gözenekli bir membran ile çevrelenerek tutuklanmasına kapsülleme denir. Bu tür tutuklanma, hücrenin ürünle

karışmaması istendiğinde ya da yüksek mol kütleli ürünler elde edildiğinde kullanılabilecek en uygun yöntemlerdendir. Bu tür tutuklanma verimlilik açısından caziptir, ama kütle transferi sınırlamaları, hücre büyümesi nedeniyle membranın kirlenmesi ve yüksek performanslı membranların maliyetinin de yüksek olması gibi dezavantajları vardır [99-101]. Bu tür tutuklanmış sistemler hücrelerin tekrar tekrar kullanılmasına imkan sağladığı gibi sürekli fermantasyon süreçlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır [102, 103].

1.5. Aşı Kopolimerler

Çok sayıda monomerin kovalent bağlarla bağlanarak bir araya gelmesi sonucu oluşan büyük moleküllere polimer denir. Tek tür monomer biriminin tekrarlanması ile oluşan polimerlere homopolimer denir. Eğer polimer birden fazla türde monomer biriminin tekrarlanmasıyla oluşuyorsa kopolimer adını alır. Kopolimerler zincirindeki monomerlerin dizilişine göre ardışık, blok ve rastgele olabilirler [104].

Bir polimerin ana zincirinin sonunda değil de zincir boyunca herhangi bir yerden ikinci bir polimerin katılması ile elde edilen kopolimerler, aşı (graft) kopolimerler şeklinde tanımlanır. Ana zincirde ve yan zincirlerde yer alan monomer türlerinin sayısına bağlı olarak çok değişik yapılarda aşı kopolimerler elde etmek mümkündür. Ana zincirin tek tür monomerden, yan zincirlerin başka bir monomer türünden oluşması, ana zinciri ve yan dalları homopolimerik olan bir aşı kopolimer verir.

Aşı kopolimerlerin eldesi genellikle iki şekilde gerçekleştirilir. Bunlar tek bir monomerle aşılama ve iki veya daha fazla tür monomer karışımı ile aşılama.

Tek bir monomerle aşılama tek basamakta gerçekleşirken, iki tür monomer olduğunda birlikte veya ayrı ayrı aşılınmaları mümkündür [105].

Aşılama polimerlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin modifiye edilmesi için kullanılan önemli bir yöntemdir. Bir aşı kopolimer genellikle kendini oluşturan homopolimerler arasında bir davranış gösterir. Bu sayede aşı kopolimerleşme işlemiyle polimerlerin özellikleri iyileştirilebilir veya istenilen özellikte aşı kopolimerler elde edilebilir [106, 107].

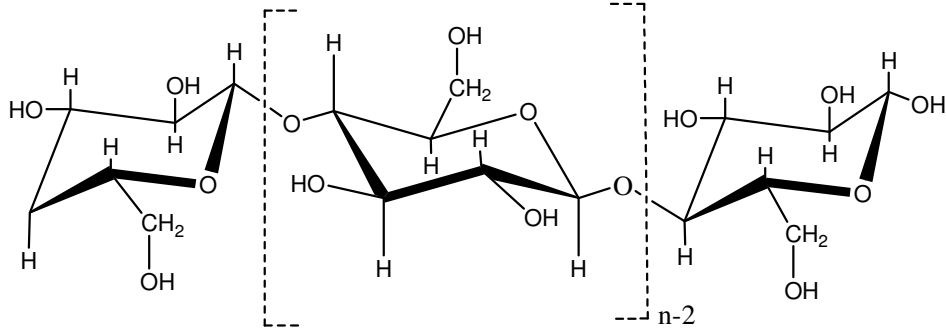
Aşı kopolimerleşme işleminde başlatıcı çok büyük önem taşımaktadır. Başlatıcının oluşturduğu aktif merkezler bir serbest radikal olabildiği gibi, anyonik veya katyonik ayrıca kondensasyon polimerizasyonunu başlatabilecek bir kimyasal grup da olabilir. Aşılama için polimer zincirinde aktif merkezlerin oluşturulmasında ana polimere radikal etkisi, ana polimerin hidroperoksidasyonu, redoks tepkimeleri, fotokimyasal yöntemler ve iyonlaştırıcı ışınlar kullanılabilir.

Aşı kopolimerleşme tepkimelerinde genellikle kimyasal başlatıcı olarak; 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN), benzoil peroksit (BPO), amonyum persülfat (APS), potasyum persülfat (PPS), seryum amonyum nitrat (CAN), gibi maddeler kullanılmaktadır [15, 108-111].

1.6. Karboksimetilselüloz

Selüloz doğada en bol bulunan yenilenebilir kaynaklardan bir tanesidir. Selüloz, β -1,4 bağlarıyla bağlanmış D-glukopiranoz birimlerinin lineer yapıdaki polimer (poli(β -1,4-D-glikoz)) bileşikleridir (Şekil 1.11.). Selülozun ortalama mol kütlesi ve moleküler büyüklüğü selülozun kaynağına göre değişim göstermektedir.

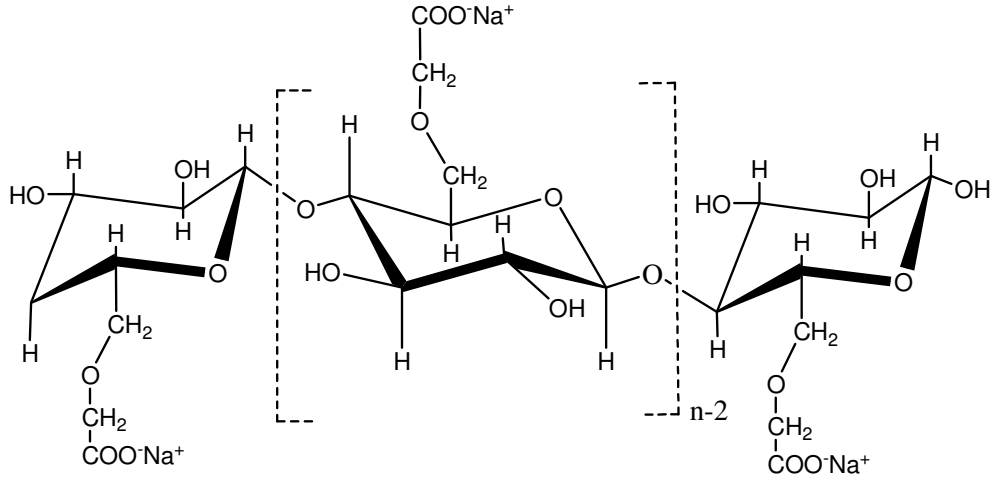
Selüloz molekülünde hidroksil grupları zincirden dışarıya doğru yönelerek birbiriyle hidrojen bağları oluşturmaktadır. Moleküller kolaylıkla yan yana dizilebilmekte ve bu yapı çok sayıda güçlü hidrojen bağları içerdiğinden oldukça kararlı olmaktadır.



Şekil 1.11. Selülozun kimyasal yapısı

Selüloz kimyasal olarak modifiye edildiğinde selüloz türevleri elde edilir. Modifikasyon sayesinde selülozun kuru ve ıslak sağlamlığı, yüzey özellikleri, kimyasal direnç vb özellikleri iyileştirilebilmektedir. En çok kullanılan selüloz türevlerinden biri de karboksimetilselülozdur [112-114].

Karboksimetilselüloz (CMC) (Şekil 1.12.), anyonik, doğrusal, ucuz, yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu ve bitkisel bir polimer olması ve toksik olmamasından dolayı ticari değeri olan en önemli suda çözünebilir selüloz türevlerinden biridir. Serbest asit, sodyum tuzu veya ikisinin karışımı şeklinde bulunabilir. Serbest asit formunda suda çözünmez. Gıdalarda kullanımı için en yaygın türü ise sodyum tuzu olanıdır [115]. CMC, 3 değerli katyonlarla etkileştirildiğinde suda çözünmeyen, şeffaf, dayanıklı ve organik maddelerden etkilenmeyen jel veya küre formunda yapılar oluşturur.



Şekil 1.12. CMC'nin kimyasal yapısı

CMC, sıcak ve soğuk suda çözünebilir, organik çözücülerde çözünmez. CMC'nin fonksiyonel özellikleri selülozun yapısal özelliklerine (örneğin; içerdiği hidroksil gruplarına) bağlıdır. Kullanıldığı ürünlerde viskoziteyi jelleştirmeden artırır. CMC'nin doğal pH'ı 8,25 iken ticari olarak daha iyi çözünmesi amacıyla 7-7,5 pH'ta üretilir. Ürünün pH'ı düşürüldükçe, çözünürlüğü de azalır, 4 ve altındaki pH'larda suda çözünmez hale gelir.

Sodyum karboksimetilselüloz (CMC) alkali selüloz ile monokloroasetik asit veya Na-monokloroasetat'ın reaksiyonu ile üretilmektedir. Hidroksil grubunun reaksiyona girme dereceleri, polimer zincirinin uzunluğu gibi faktörlerle değişik tipte CMC'ler elde edilebilir.

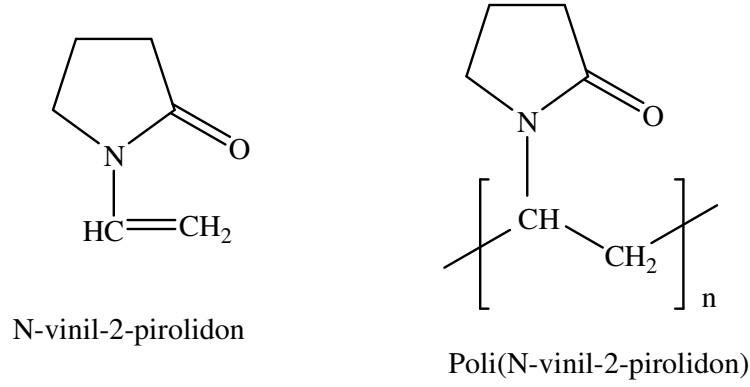
CMC başlangıçta jelatinin yerine kullanılmak üzere Almanya'da üretilmiştir. 1935 yılında çamaşır deterjanlarının etkinliğini arttırdığı bulunmuş ve bu amaçla

ticari kullanımını artmıştır. Gıdalarda ilk defa kullanımını ise 1946 yılında Hercules firması tarafından uygun saflıktaki CMC üretilerek olmuştur [116].

CMC koyulaştırıcı, su tutucu, sabitleyici, koloit engelleyici, süspansiyon halini koruyucu, akıcılığı kontrol edici özelliklerinden dolayı deterjan, kozmetik, gıda, tekstil ve kâğıt endüstrilerinde yaygın kullanım alanı vardır [14, 117].

1.7. N-Vinil-2-Pirolidon

N-vinil-2-pirolidon (NVP), asetilen ve 2-pirolidonun reaksiyonu sonucu elde edilen, hafif sarımsı renkte, kendine has bir kokusu olan, hidrofilik ve iyonik olmayan bir vinil monomeridir. Suda ya da alkol içinde uygun bir başlatıcı ile serbest radikalik polimerizasyon yöntemiyle polimerleştiğinde poli(N-vinil-2-pirolidon) (PVP) polimeri elde edilir. Monomer haliyle çok toksik ve kanserojen olmasına rağmen, polimer haliyle kişisel bakım ürünlerinde kullanılabilir kadar güvenli bir maddedir. IUPAC isimlendirmesine göre 1-etilen-2-pirolidon homopolimeri ve poli[1-(2-okso-1-pirolidinil)etilen] yaygın isimlendirmelere göre ise polividon, poli(N-vinil-2-pirolidon), 1-vinil-2-pirolidon polimeri veya polivinilpirolidon şeklinde kullanılmaktadır ve PVP kısaltmasıyla gösterilmektedir. Şekil 1.13.'de NVP ve PVP'nin molekül yapıları gösterilmektedir.



Şekil 1.13. NVP ve PVP'nin molekül yapısı

PVP, beyaz, nem çekici ve kendine has zayıf bir kokusu olan bir polimerdir. Bir çok polimerin aksine suda ve alkoller, aminler, asitler, klorlu hidrokarbonlar, vb. birçok polar organik çözücünde çözünebilir. Toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu, yüksek jelleşme özelliğine ve ayrıca iyi kompleks oluşturma yeteneğine sahip hidrofilik bir polimerdir. PVP çapraz bağlandığında mekanik dayanıklılığı düşük ancak yüksek su absorplama kapasitesine sahip bir hidrojel oluşturur. [118-121].

PVP yalnız başına kullanılabildiği gibi, bir polimer üzerine aşılansak veya polimerlerle kopolimeri oluşturularak da çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Çapraz bağlanmış şekliyle metal iyonlarının zenginleştirilmesi, ayrılması ve fabrika atık sularından metal iyonlarının uzaklaştırılmasında, gıda endüstrisinde stabilizatör olarak, emülsiyon katkı maddesi ve renk algılayıcı olarak fotoğrafçılıkta, antistatik ajan olarak boyama işlemlerinde, tekstil ve fiber endüstrisinde ve bunların yanında yapıştırıcı, kâğıt, seramik ve metal endüstrilerinde de geniş kullanım alanları vardır [118, 119].

Ayrıca günümüzde eczacılıkta tentürdiyodun yerine antiseptik olarak kullanılan batticon ; % 10 serbest iyot içeren 10g PVP-iyot kompleksi içermektedir.

1.8. Etanol Üretimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Son yıllarda serbest veya tutuklanmış mayaların etanol üretiminde kullanılması giderek yaygınlaşmıştır. Literatürde mayalar kullanılarak farklı ham maddelerden etanol üretilmesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.

Chendel ve arkadaşları ısıya dayanıklı *S. cerevisiae*'yı şeker kamışı saplarına tutuklamışlar ve maksimum etanol üretimini 22,85 g/L, etanol verimini ise 0,45 olarak bulmuşlardır [122].

Liu ve arkadaşları aljinata tutuklanmış *S. Cerevisiae* ile tatlı sorgum suyundan etanol üretmişlerdir. 100g/L glikoz ve sükroz karışımından akışkan yatak reaktör kullanarak 5 saatte hacimce %6,2 etanol üretmişlerdir [123].

Nigam ve arkadaşları agara *S. cerevisiae* tutuklayarak yaptıkları fermantasyonda 255 g/L glikoz kullandıklarında 94.4 g etanol ürettiklerini belirtmişler ve etanol verimini 0,37 g/g olarak bulmuşlardır [124].

Öztop ve arkadaşları HEMA/AAM hidrojellerine *S. cerevisiae* tutuklayarak yaptıkları fermantasyonda, hidrojeldeki hidrofilik karakteri arttıran AAM yüzdesi arttıkça etanol üretiminin arttığını ve 3-6 g/L/g jel aralığında olduğunu bulmuşlardır [125].

Caceres-Farfan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada serbest iki maya karışımı kullandıklarında 48 saatte 20-52 g/L aralığında etanol üretmişlerdir [6].

Yine Nigam yaptığı başka bir çalışmada *S. cerevisiae*'yı κ -karregenana tutladıktan sonra sürekli fermantasyonda kullanmış ve yaklaşık olarak 48 g/L etanol ürettiğini bildirmiştir [126].

Yu ve arkadaşları doğal süpürge darısına *S. cerevisiae* hücrelerini adsorpsiyon yoluyla tutuklamışlardır. Kesikli fermantasyon deneylerinde başlangıç şeker derişimi 200g/L olduğunda fermantasyonun 16 saatte tamamlandığını ve etanol verimi ve etanol üretim hızını sırasıyla 4,9 g/g ve 5,72 g/Lsaat olduğunu bulmuşlardır. İmmobilize hücrelerin etanol üretim hızının serbest hücrelerden 2,24 kat daha büyük olduğunu belirtmişlerdir [9].

Guimaraes ve arkadaşları 150g/L laktoz dan *S. cerevisiae* ile % 8 (v/v) etanol üretmişler ve etanol üretim hızını 1,5-2 g/Lsaat olarak bulmuşlardır [127].

Nabais ve arkadaşları serbest haldeki *S. bayanus*'un etanol üretimi üzerine ortamdaki kalsiyum iyonlarının etkisini incelemişlerdir. 320 g/L glikoz kullandıklarında % 13-17 (v/v) aralığında etanol üretmişler ve optimum kalsiyum derişimini 0,75 M olarak bulmuşlardır [128].

Castellar ve arkadaşları da karbon kaynağı olarak glikoz kullanarak *S. bayanus* ile etanol üretimine ortama eklenen zeolit miktarının etkisini incelemişlerdir. 220-350 g/L aralığında glikoz kullandıkları fermantasyonun sonunda 90-120 g/L etanol üretimine ulaşmışlardır. Ayrıca etanol verimi 0,39-0,43 ve etanol üretim hızı da 1,5 -3,0 g/Lsaat aralığında değişmektedir [129].

Kilonzo ve arkadaşları farklı bir *S.* türü olan *S. diastaticus* mayasını poliüretan köpüğe tutuklayarak, hem kesikli hem de sürekli sistemde tutuklanmış mayadan etanol üretmişlerdir [130]. Karbon kaynağı olarak 240 g/L dekstrin kullandıklarında kesikli sistemde 92 g/L etanol üretirlerken, sürekli sistemde 83 g/L etanol üretmişlerdir.

Brady ve arkadaşları Fe₃O₄ ile magnetik özellik kazandırdıkları kalsiyum aljinat kürelerine *K. marxianus* tutuklamışlar ve bu tutuklanmış sistemin etanol üretimine Mn⁺² iyonları etkisini araştırmışlardır [131]. Karbon kaynağı olarak 40 g/L laktoz kullandıklarında aljinat kürelerde 16 g/L, manyetik aljinat kürelerde 18 g/L ve ortamda Mn⁺² iyonları varlığında 20 g/L etanol üretmişlerdir.

Limtong ve arkadaşları, 37 °C'de %22 şeker içeren şeker kamışı suyunda serbest haldeki *K. marxianus* mayasını fermante ettiklerinde elde ettikleri etanol miktarını % 8,7 (w/v) ve etanol üretim hızını 1,45 g/Lsaat olarak bulmuşlardır [132].

Yine Brady ve arkadaşları % 40'lık laktoz kullanarak serbest haldeki *K. marxianus* ile 5 g/L etanol üretirken, manyetik aljinat kürelerine tutukladıklarında etanol üretimini 12 g/L'ye yükseltmişlerdir [133].

Christensen ve arkadaşları aljinata tutuklanmış *K. marxianus* kullanarak peynir altı suyundan etanol üretmişlerdir [134]. Kesikli sistemde 47 g laktoz kullanarak 20 g/L etanol elde etmişler ve etanol verimini 0,47 g/g olarak bulmuşlardır. Sürekli sistemde yaptıkları deneylerde ise en yüksek etanol verimini 0,50 g/g ve etanol üretim hızını 2,5-4,5 g/Lsaat aralığında bulmuşlardır.

Guo ve arkadaşları *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* kültür karışımını aljinata tutuklamış ve 100 g/L toplam şekerden serbest *K. Marxianus* % 3,8 (v/v) etanol üretirken, tutuklanmış karışık kültürün % 5,3 (v/v) etanol ürettiğini belirlemişlerdir[135].

1.9. Çalışmanın Amacı

CMC üzerine PVP aşılama literatürde çalışılmıştır [15]. Ancak literatürde bu aşılama işlemi ile elde edilen CMC-aşı-PVP kopolimerinin kullanımına yönelik

alışmalar yer almamaktadır. Bu çalışmada, farklı aşılama yüzdelerinde CMC-aşı-PVP aşı kopolimerlerinin, etanol üretimi için yeni bir destek materyali olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu kopolimerler çapraz bağlanarak küre haline getirilip, elde edilen kürelerin element analizi, Fourier transform infrared spektroskopi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskop (SEM) ve şişme deneyleri ile karakterize edilmiştir.

Sonraki basamakta *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları etanol fermantasyonu için, CMC-aşı-PVP aşı kopolimerlerine hapsetme yoluyla tutuklanmıştır. Maya tutuklanmış bu sistemlerin etanol üretimi üzerine aşılama yüzdesinin, başlangıç glikoz derişiminin ve çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi ve maya tutuklanmış kürelerin tekrar kullanılabilirliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum karboksimetilselüloz (25°C’de %2’lik sulu çözeltisinin viskozitesi 400-800 cps) Sigma (Amerika) firmasından temin edildi.

N-vinil-2-pirolidon (Mol Kütlesi: 111,14 g/mol ve d: 1,040 g/mL) Merck (Almanya) firmasından temin edildi ve 2 mmHg vakum altında ve 65 °C’de distilasyon ile saflaştırıldı.

Alüminyum klorür (AlCl₃, Saflık > %98, Mol Kütlesi: 133,34 g/mol) aseton ve dinitrosalisilik asit Fluka (İsviçre) firmasından ve D-glikoz monohidrat (C₆H₁₂O₆ . H₂O, Mol Kütlesi: 198,17 g/mol), asetik asit, aseton, etanol, hidroklorik asit ve sodyum klorür Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Sodyum potasyum tartarat, azobisisobütironitril (AIBN), hidrokinon ve sodyum hidroksit Merck (Almanya) firmasından temin edildi. AIBN asetondan kristallendirilerek kullanıldı.

S. cerevisiae Pakmaya (Türkiye) firmasından ve *S. bayanus* (IA) ve *K. Marxianus* (NCYL 587) suşları Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Kültür Koleksiyonu’ndan elde edildi.

Maya özütü, malt özütü, pepton Difco (Amerika) firmasından ve agar Lab M (İngiltere) firmasından temin edildi.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Element Analizi: Elde edilen CMC-aşı-PVP aşı kopolimerinin %C, %H ve %N miktarlarının tayini LECO CHNS-932 marka (Amerika) elementel analiz cihazı ile gerçekleştirildi.

UV spektrofotometresi: Bu çalışmada, çözeltilerin renk yoğunluğu Shimadzu UV 1800 marka (Japonya) UV/görünür bölge spektrofotometre kullanılarak belirlendi.

TGA: CMC, NVP, CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃'nin termogravimetrik analizini yapmak için TA Q500 marka cihaz kullanıldı. Sıcaklık artışına karşı örneğin kütlesindeki değişim ölçülerek elde edilen termogramlardan analiz yapıldı.

SEM: Hazırlanan kürelerin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri JEOL JSM 5600 marka (Japonya) cihaz ile elde edildi.

BET Analizi: Kuru kürelerin gözenek boyutlarını belirlemek için Brunauer, Emmett ve Teller (BET) analizi ASAP 2020M (A) marka cihaz ile gerçekleştirildi.

GC: Mayaların ürettikleri etanol miktarlarının tayini, HP 6890 marka (ABD) gaz kromatografi cihazı ile yapıldı. DB-FFAP (30m x 0,32mm, 0,5µm film, 40-250°C) kolon (Agilent Technologies, ABD) ve alev iyonlaştırma detektörü (FID) kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak 1,2 mL/dak akış hızında azot gazı kullanıldı.

Yukarıdaki temel cihazların yanında aşağıdaki cihazlar da kullanılmıştır;

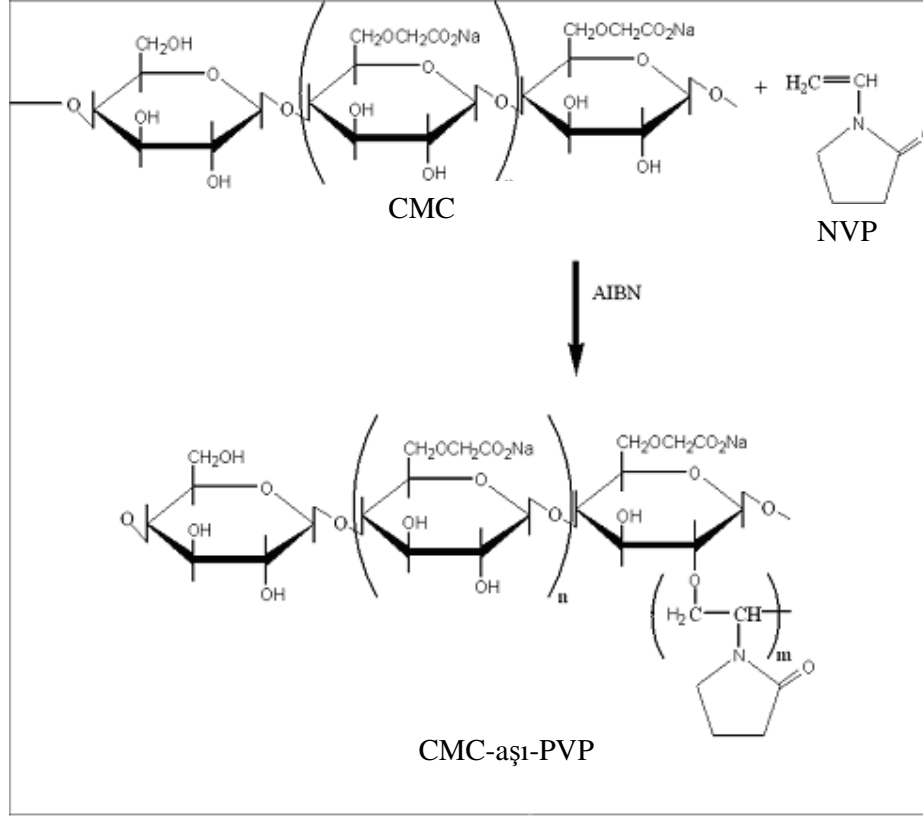
- Çalkalamalı su banyosu (Medline BS-21, Kore)
- Manyetik karıştırıcı (Corning PC-420, Amerika)
- Etüv (Nüve FN-120, Türkiye)
- pH metre (Hanna instruments HI 221, Romanya)
- Analitik terazi (Sartorius CP224 S, Almanya)

- Santrifüj (Nüve NF 1215, Türkiye)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)

2.2. Deneysel Yöntem

2.2.1. CMC-aşı-PVP Aşı Kopolimerinin Sentezi

Aşılama işlemi azot gazı atmosferinde, 250 mL'lik üç boyunlu balonda, geri soğutucu altında su banyosunda gerçekleştirildi. 1g CMC saf su ile 50 mL'lik balon jode, oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırılarak çözüldü. Oluşan çözelti bir miktar saf su ile üç boyunlu balona aktarıldı. Çözeltiye gerekli miktarda NVP ilave edilerek 70 °C'deki su banyosunda karışımdan 30 dakika azot gazı geçirildi. Sonra karışıma 2 mL asetonda çözülmüş olan AIBN başlatıcısı ilave edilerek toplam çözelti hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Reaksiyon boyunca ortamdaki sürekli azot gazı geçirilmeye devam edildi. Aşılama reaksiyonu süresi 2 saatte sabitlendi. Bu süre bitiminde ortama 5 mL doymuş hidrokinon çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Oluşan ürün asetonda çöktürüldü. Ürün süzülme ve çöken homopolimerin uzaklaştırılması için etil alkolle soksletde 48 saat yıkandı. Homopolimeri uzaklaştırılan aşı kopolimer 40 °C'de etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutuldu. CMC-aşı-PVP'nin sentezi şematik olarak Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. CMC üzerine NVP aşılama şeması [15]

2.2.2. Aşılama Yüzdesine Monomer Derişiminin Etkisi

CMC-aşı-PVP kopolimerindeki PVP miktarını dolayısıyla aşılama yüzdesini değiştirmek için aşılama işleminde 3 farklı NVP monomer derişimi (0,27 M, 0,46 M ve 0,65 M) kullanıldı. Aşılama işlemi bölüm 2.2.1.'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Elde edilen aşı kopolimerlerdeki C, H ve N yüzdeleri elementel analiz cihazı ile belirlendi. Aşılama deneylerinde elde edilen 3 farklı aşılama yüzdesindeki kopolimerlere aşılama yüzdesi değerlerine göre CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kısaltmalarıyla gösterileceklerdir.

2.2.3. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılacak CMC ve CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin boş küreleri sıvıda olgunlaştırma yöntemi ile oluşturuldu. CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin %3 (m/v)'lik, CMC'nin ise %2 (m/v)'lik sulu çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin, 0,1 M, 0,3 M ve 0,5 M AlCl₃ çözeltilerinin üzerine pipetle damlatılması ile aşı kopolimer Al³⁺ iyonları ile çapraz bağlandı ve küreleri oluşturuldu. Küreler 30 dakika çapraz bağlandıkları çözeltilerde bekletildikten sonra 15 dakika da saf su içinde bekletildi ve yıkandıktan sonra kurutuldu.

2.2.4. Kürelerin Şişme Derecesinin Belirlenmesi

Bölüm 2.2.3.'de anlatılan yöntemle hazırlanan CMC ve CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ boş kürelerinin % şişme dereceleri etanol üretiminde kullanılacak besiyerinde belirlendi. Besiyer 10 g glikoz, 0,5 g maya özütü ve 0,5 g malt özütünün 100 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı ve çözeltinin pH'sı 5,0 değerine ayarlanarak 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Besiyere farklı aşılama yüzdelerindeki kürelerden belirli miktarlarda atıldı. Değişik zaman aralıklarında küreler besiyerden çıkarılarak yüzeysel olarak kurulanıp tartıldı ve tekrar buldukları ortamlara atılarak şişme deneylerine devam edildi. Besiyerdeki kürelerin kütleleri değişmediği zaman deney sonlandırıldı. Şişme derecesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Şişme derecesi} = \frac{\text{Şişmiş küre kütlesi} - \text{Kuru küre kütlesi}}{\text{Kuru küre kütlesi}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.2.5. Mayalar İçin Kültür Ortamları

2.2.5.1. Katı Besi Ortamı

Katı besi ortamı için 0,3 g maya özütü, 0,3 g malt özütü, 0,5 g pepton, 1,5 g agar ve 1 g glikoz 100 mL saf suda çözüldü ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilerek steril petri kabına döküldü. *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayası platin tel ile agar ortamına ekildi. Katı ortam 30°C'de 48 saat inkübatörde mayaların gelişmesi için bekletildi ve daha sonra +4°C'de depolandı. Mayalar katı ortamda her ay yeniden üretilerek saklandı.

2.2.5.2. Büyüme Ortamı

Katı ortamda depolanan mayalar fermantasyonda kullanılmadan önce bir ön büyüme ortamına ekilerek büyütülürler. Büyüme ortamı için 5 g glikoz, 1 g maya özütü, 1 g pepton ve 0,1 g MgSO₄ · 7 H₂O 100 mL saf suda çözüldü ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilerek hazırlandı. Katı ortamdaki platin tel ile alınan mayalar büyüme ortamına ekildi ve 30°C'de 125 rpm hızla karıştırılarak belirli sürelerde inkübatörde büyütüldü. Mayaların büyüme ortamında büyütülme süreleri onların büyüme eğrilerinden logaritmik evrenin sonu olarak belirlendi. Buna göre büyüme ortamına ekilen mayalardan *S. cerevisiae* 12 saat, *S. bayanus* 16 saat ve *K. marxianus* 15 saat büyütüldü.

2.2.5.3. Fermantasyon Ortamı

Fermantasyon ortamı büyüme ortamı ile aynı bileşime sahip olmasına rağmen madde miktarları değiştirilmiştir. Belirli miktarda glikoz, 0,5 g maya özütü, 0,5 g pepton ve 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 100 mL saf suda çözülerek pH'ı 5,0 değerine ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra maya tutuklanmış kürelerin fermantasyonlarında kullanıldı.

2.2.6. Maya Üremesinin Takibi

S. cerevisiae, *S. bayanus* ve *K. marxianus* serbest hücrelerinin büyüme ortamlarında, miktarındaki zamana bağlı artış UV-görünür bölge spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Mayalar büyüme ortamlarına ekildikten sonra belirli zaman aralıklarında ortamdaki alınan örneklerin 620 nm'de verdiği absorbans değerleri ölçülerek zamana karşı grafiğe geçirilmiştir [8].

2.2.7. Maya Kuru Kütlesinin Belirlenmesi

Fermantasyon sırasında kullanılacak aşı mikroorganizma miktarını g/L olarak belirlemek amacıyla büyüme ortamı hazırlandı ve sterilize edildikten sonra mikroorganizma aşlanarak 30°C'de 125 rpm hızla karıştırılarak inkübatörde mikroorganizmalar büyütüldü. Önceden boş ağırlıkları tartılmış olan santrifüj tüplerine belirli zaman aralıklarında belirli hacimlerde örnekler alındı. Maya bulunan tüpler 3000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Üstteki sulu kısım atıldı ve üzerlerine % 0,9'luk NaCl'den 5 mL ilave edilip tekrar 3000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.

Üstteki kısım yine atıldı ve tüpler mikrodalga fırında kurutuldu. Kurutulan tüplerin ağırlıkları sabit tartıma gelene kadar tartıldı [122]. Aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak kuru hücre ağırlığı g/L olarak belirlendi.

$$\text{Kuru Kütle (g/L)} = \frac{\text{Dolu tüp kütlesi} - \text{Boş tüp kütlesi}}{\text{Alınan örnek hacmi}} \times 1000 \quad (2.2)$$

2.2.8. Mayaların Polimerik Desteklere Tutuklanması

CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinden % 3 (m/v)'lük, CMC den ise % 2 (m/v)'lik çözeltiler hacimleri gerekli miktardan 5 mL az olmak koşulu ile hazırlandı. Büyüme ortamında gerekli süre boyunca üretilen mayalar santrifüjlenerek sıvı kısım ayrıldıktan sonra %0,9'luk NaCl ile yıkandı. Mayaların üzerlerine tekrar 5 mL %0,9'luk NaCl çözeltisi eklenerek daha önce hazırlanan kopolimer çözeltilerine eklenmiştir. Polimerlerin çapraz bağlanması için 0,5 M AlCl₃.6H₂O çözeltilerine, maya ile karıştırılmış 4 farklı polimer pipetle ayrı ayrı damlatılarak küreleri oluşturuldu. Küreler 30 dakika çapraz bağlandıkları çözeltilerde bekletildikten sonra 15 dakika da saf su içinde bekletilip yıkandı ve kurutuldu.

2.2.9. Fermantasyon Deneyleri

Maya tutuklanmış CMC, CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ küreleri, hazırlanan fermantasyon ortamlarına eklendi. Çalkalamalı su banyosunda 30°C'de 125 rpm hızlı karıştırılarak inkübe edildi. Fermantasyon ortamından belirli sürelerde örnekler alındı ve bu örneklerden tutuklanmış mayaların zamanla glikoz

tüketim ve etanol üretim miktarları ile fermantasyon verimi ile etanol üretim hızları tayin edildi.

Tutuklanmış mayaların etanol üretimleri üzerine başlangıç glikoz miktarlarının etkisini araştırmak için bölüm 2.2.5.3.'de anlatılan fermantasyon ortamlarındaki glikoz miktarları 50, 100, 150 ve 200 g/L olacak şekilde hazırlandı ve yukarıda anlatılan işlemler bu dört farklı derişimde glikoz içeren fermantasyon ortamı kullanılarak yürütüldü.

Tutuklanmış mayaların etanol üretimleri üzerine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisini araştırmak için bölüm 2.2.7.'de anlatılan çözeltiler hazırlandı. Gerekli miktarlarda maya süspansiyonları ile karıştırılan bu çözeltilerin farklı derişimlerdeki (0,1, 0,3 ve 0,5 M) Al^{3+} çözeltileriyle küreleri oluşturuldu. Maya tutuklanmış bu küreler 10 g glikoz, 0,5 g maya özütü, 0,5 g malt özütü ve 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (100 mL, pH= 5,0) içeren fermantasyon ortamında etanol üretiminde kullanıldı.

Kürelerin tekrar kullanılabilirliklerini belirlemek amacıyla 0,5 M Al^{3+} ile çapraz bağlanarak hazırlanmış küreler 10 g glikoz, 0,5 g maya özütü, 0,5 g malt özütü ve 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (100 mL, pH= 5,0) içeren fermantasyon ortamında inkübe edildi. Fermantasyonun bitiminde küreler ortamdan çıkarılarak 0,9'luk NaCl çözeltisi ile yıkandı ve yeni fermantasyon ortamına atılarak tekrar inkübe edildi. Tekrar kullanım işlemine küreler mekanik dayanıklılıklarını veya mayalar aktifliklerini kaybedinceye kadar devam edildi.

2.2.10. Glikoz Analizi

Fermantasyon ortamlarındaki glikoz miktarları, dinitro salisilik asit reaktifi ile glikozun oluşturduğu kahverengi çözeltinin 540 nm'deki renk yoğunluğunun UV

spektrofotometresinde ölçülmesiyle belirlendi [136]. Glikoz içeren çözeltilerden 0,5 mL deney tüpüne alındı ve üzerine 1,5 mL DNS reaktifi (1 g dinitro salisilik asit, 2 g NaOH ve 30 g sodyum potasyum tartarat saf suda çözülerek toplam hacim 100 mL ye seyreltildi) eklenerek 5 dakika kaynayan su içerisinde bekletildi. Oda sıcaklığına soğuyan kahverengi çözeltilere 5 mL saf su eklendi. Çözeltinin renk yoğunluğu 540 nm dalga boyunda 1 cm ışık yollu küvetler kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon grafiği için 0,5-2,5 mg/L derişim aralığında glikoz çözeltileri hazırlanarak DNS reaktifi ile verdikleri renklerin absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Derişimi bilinmeyen glikoz çözeltilerinin 540 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve kalibrasyon grafiği yardımıyla bu çözeltilerin derişimleri bulundu.

2.2.11. Gaz Kromatografisi ile Etanol Tayini

Gaz kromatografisinde detektör tarafından algılanan veriler elektrik sinyaline çevrilerek pik olarak kaydedilir. Piklerin büyüklüğü her zaman detektörden geçen madde miktarıyla doğru orantılıdır.

Fermantasyon ortamlarında üretilen etanol miktarlarının tayini kalibrasyon grafiği yöntemiyle belirlendi. Bu işlem için belirli derişimlerdeki etanol çözeltileri gaz kromatografi cihazına enjekte edildi ve elde edilen piklerin alanlarına göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Derişimi bilinmeyen etanol çözeltileri GC cihazına enjekte edildikten sonra cihazdan elde edilen pik alanlarına göre kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak etanol çözeltilerinin derişimleri belirlendi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. CMC-aşı-PVP kopolimerlerinin Kürelerinin Karakterizasyonu

CMC-aşı-PVP kopolimerlerinin kullandığımız yöntemle sentezi ve genel karakterizasyonu laboratuvarımızda yapılmıştır [15]. Bu çalışmada ise farklı miktarlarda monomer kullanılarak farklı aşılama yüzdelerinde kopolimerler elde edilmiş ve elde edilen aşı kopolimerlerin küreleri oluşturularak bu küreler element analizi, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskop (SEM) ve şişme deneyleri ile karakterize edildi.

Aşılama deneylerinde üç farklı derişimde monomer kullanılarak üç farklı aşılama yüzdesinde kopolimer elde edildi. Çizelge 3.1.'de aşılama sırasında kullanılan monomer (NVP) derişimleri ile bu aşılama deneylerinde elde edilen CMC-aşı-PVP kopolimerlerinin element analizi sonuçları ve aşılama yüzdeleri (GY) görölmektedir. Bu kopolimerlerin aşılama yüzdeleri 20% (CMC-aşı-PVP₁), 24% (CMC-aşı-PVP₂), ve 32% (CMC-aşı-PVP₃) olarak hesaplanmıştır. Aşılama işleminde kullanılan monomer derişimi dolayısıyla azot yüzdesi arttıkça aşılama yüzdesinin arttığı görölmektedir. Bütün maya tutuklanma deneylerinde bu kopolimerler ve karşılaştırmak için aşılammamış CMC kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. CMC-aşı-PVP kopolimerlerinin elementel analiz sonuçları ve aşılama yüzdeleri

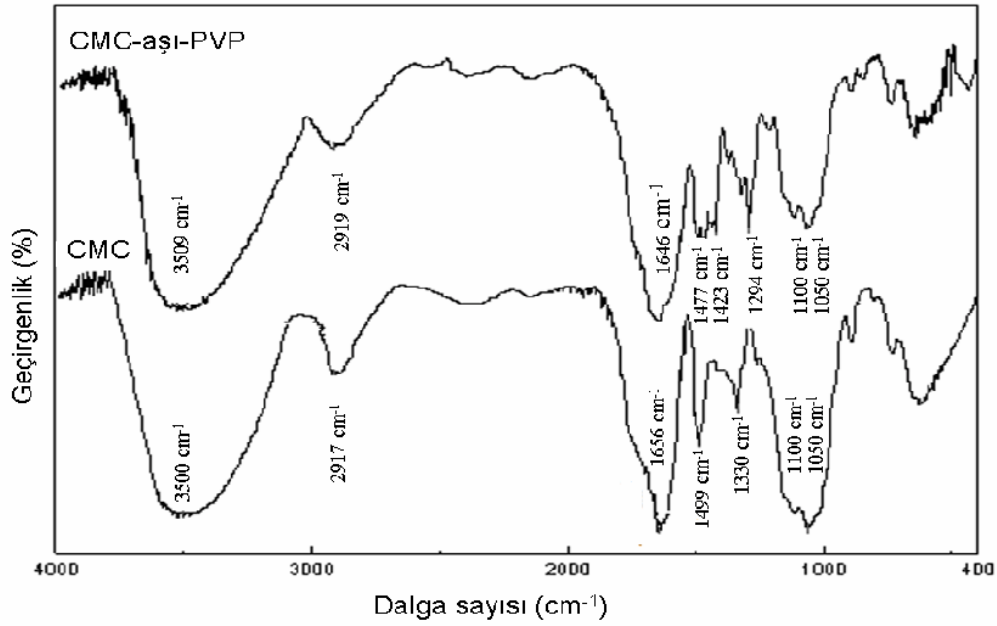
Kopolimer	Monomer Derişimi (M)	GY (%)	C (%)	H (%)	N (%)
CMC-aşı-PVP ₁	0,27	20	40.85	5.95	2.78
CMC-aşı-PVP ₂	0,46	24	42.16	6.30	3.36
CMC-aşı-PVP ₃	0,65	32	44.35	6.49	4.50

3.1.1. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin FTIR Analizleri

Şekil 3.1’de CMC ve CMC-aşı-PVP (%32 aşı yüzdesine sahip kopolimer için) FTIR spektrumları görülmektedir. CMC’nin FTIR spektrumunda, 3500 cm⁻¹’de gözlenen geniş band (O-H) gerilmesine ve 2917 cm⁻¹’de gözlenen düşük şiddetteki bandın alifatik (C-H) gerilmesine ait olduğu düşünülmektedir. 1656 ve 1499 cm⁻¹’deki keskin ve şiddetli bantların (-COO⁻) grubuna ait simetrik ve asimetrik gerilmelere, 1330 cm⁻¹’deki bandın (O-H) eğilmesine ve 1050 ile 1100 cm⁻¹’de gözlenen geniş bantların glikozit bağlarının (C-O-C) gerilmelerine ve alkol gruplarının (C-O) gerilmelerine ait olduğu belirlenmiştir [121, 137].

CMC-aşı-PVP’nin FTIR spektrumunda 3509 cm⁻¹’de gözlenen geniş bandın CMC üzerindeki (-OH) gruplarından kaynaklanan (O-H) gerilmesine, 2919 cm⁻¹’de gözlenen bandın PVP ve CMC üzerindeki alifatik (C-H) gerilmelerine, 1646 cm⁻¹’de görülen geniş bandın PVP ve CMC üzerindeki (C=O) gerilmelerine, 1477 cm⁻¹’de gözlenen bantların CMC üzerindeki (-COO⁻) grubuna ait asimetrik gerilmelere,

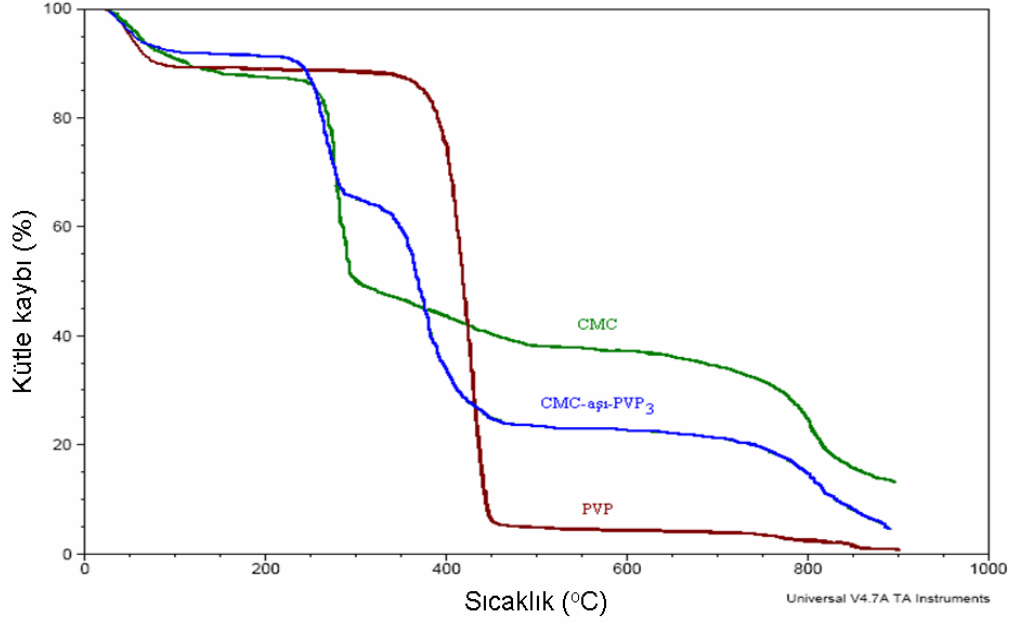
1423 ve 1294 cm^{-1} 'deki 2 pik aşılansmış CMC'deki PVP'nin yapısında olan alifatik (C-N) gerilme ve eğilmelerine aittir. Ayrıca 1050 ile 1100 cm^{-1} 'de gözlenen geniş bantların CMC üzerindeki (C-O) gerilmelerine ait olduğu belirlenmiştir. CMC-aşı-PVP kopolimerinin FTIR spektrumunda PVP'nin karakteristik gerilme bantları aşılamanın gerçekleştiğini göstermektedir [119,138].



Şekil 3.1. CMC ve CMC-aşı-PVP kürelerinin FTIR spektrumları

3.1.2. Aşı Kopolimerin Termogravimetrik Analiz Sonuçları

CMC, PVP homopolimerleri ile CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin termal bozunmalarıyla, kütle kayıpları arasındaki ilişkiyi belirlemek için termogravimetrik analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.2. CMC, PVP ve CMC-aşı-PVP'nin TGA termogramları

CMC, PVP ve CMC-aşı-PVP₃ (%32 aşı yüzdesine sahip kopolimer için) termogravimetrik analiz sonuçları Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. CMC'nin termogramı incelendiğinde üç aşamalı bozunma piki gözlenmiştir. Sıcaklık 30°C'den 150°C'ye yükseldiğinde CMC'nin kütesinin %12,42'sini kaybettiği görülmüş ve bu kaybın yapısındaki suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. 275°C'de gözlenen bozunmada ise polimer kütesinin %52,29'unu ve 500 ile 900°C arasında da kütesinin %24,82'sini kaybetmiştir. Bu bozunma pikleri CMC polimerindeki zincirlerin kopmasından ve yapının tamamen bozunmasından kaynaklanmaktadır.

PVP'nin termogramında 20-110°C ve 300-450°C sıcaklık aralıklarında iki aşamalı bozunma piki gözlenmiştir. 20-110°C sıcaklık aralığında PVP polimeri kütesinin %10,84'ünü kaybetmiş ve bu kaybın polimerin yapısındaki suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. 400°C'de gözlenen bozunmada ise

polimerin kütlesinin %88,07'sini kaybetmiş ve polimer termal olarak tamamen bozunmuştur.

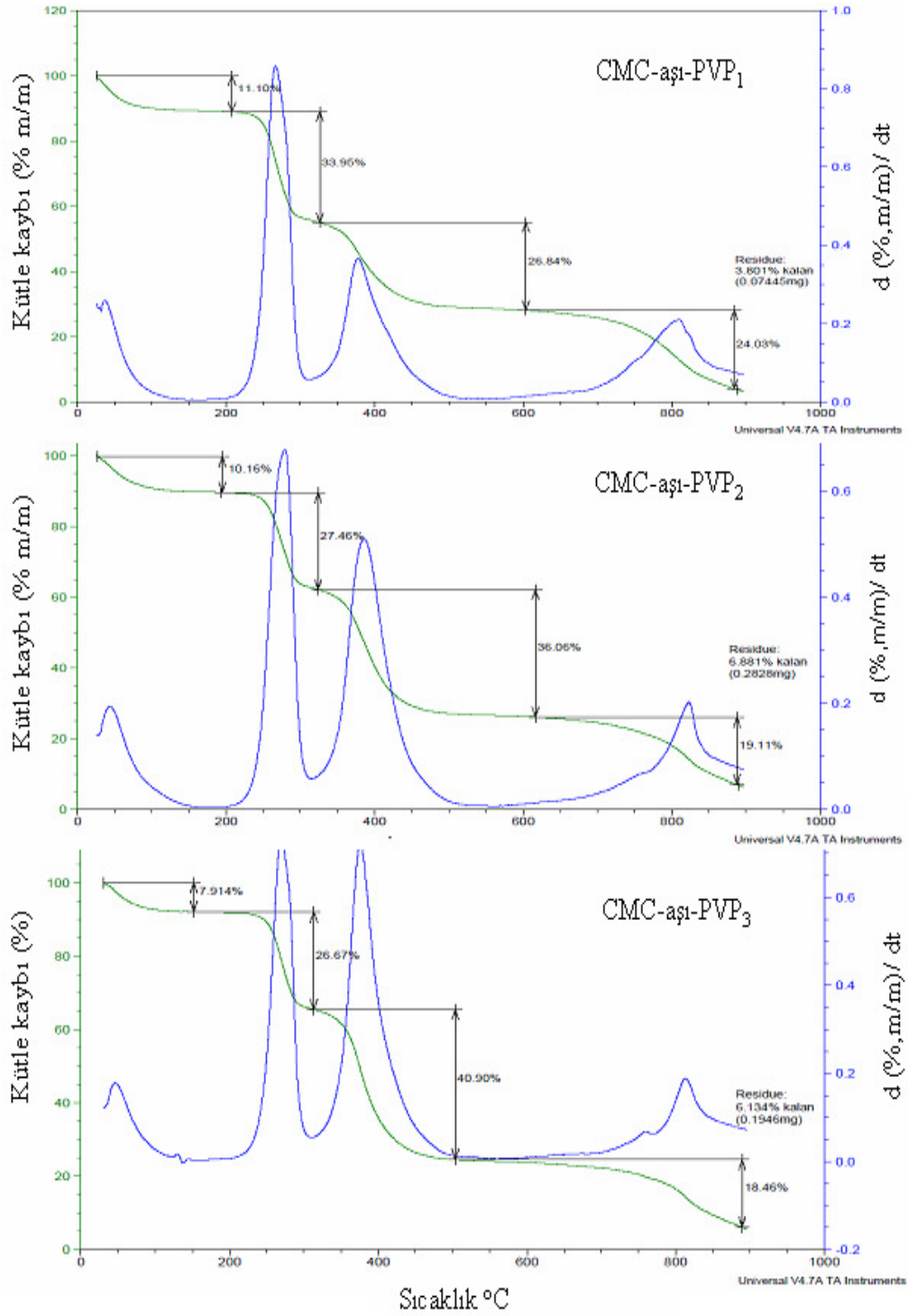
CMC-aşı-PVP₃'ün termogramında dört temel bozunma piki görülmektedir. Bu piklerden 30-120°C arasındaki pik kopolimerin yapısındaki suyun uzaklaşmasından kaynaklanmakta olup polimerin kütlesinin %7,91'ine karşılık gelmektedir. 250°C'de gözlenen bozunmanın kopolimerdeki CMC zincirlerinin kopmasından kaynaklandığı düşünülmüş olup bu pike karşılık gelen kütle azalması %26,67'dir. 325-600°C sıcaklık aralığında kopolimerin kütlesinde %40,90'lık bir azalma olup bu azalmanın kopolimerdeki PVP'nin bozunmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Termogramdaki son pik ise kalan CMC'nin tamamen bozunduğunu düşündüren ve %18,46'lık kütle artışına karşılık gelen piktir.

CMC, PVP ve CMC-aşı-PVP₃ polimerleri kütlelerinin %50'sini yaklaşık olarak sırasıyla 300, 420 ve 375°C'de kaybetmişlerdir. Başlangıç bozunma sıcaklıklarına göre ısıl kararlılığı en yüksek olan 400°C ile PVP, en düşük olan ise yaklaşık 250°C ile CMC-aşı-PVP₃'tür. CMC'nin başlangıç bozunma sıcaklığı ise 275°C'dir.

Aşılama ile elde edilen CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin termal kararlılıkları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise kopolimerlerin tamamında aynı sıcaklık aralıklarında dört tür bozunma piki gözlenmektedir (Şekil 3.3.). Farklı olan değer, aşılama yüzdesine bağlı olarak aynı sıcaklık aralıklarında farklı miktarda kütle kayıplarının olmasıdır. Burada dikkat çeken pikler 200-325°C sıcaklık aralığında ve kopolimerdeki CMC'nin bozunmasından kaynaklanan pikler ile 325-600°C sıcaklık aralığındaki PVP'nin bozunmasından kaynaklanan piklerdir. Kopolimerler CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ sırasına göre incelendiğinde aşılama yüzdesi dolayısıyla

kopolimerdeki PVP miktarı artmaktadır. Buna paralel olarak da CMC miktarı düşmektedir. Dolayısıyla PVP'nin kopolimerdeki miktarının artması veya düşmesine paralel olarak kopolimerdeki kütle kayıplarının değişmesi gerekir. CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin 200-325°C sıcaklık aralığında kütle ayıpları sırasıyla %33,95, %27,66 ve %26,67'dir. Bu pik CMC'ye ait olduğundan aşılama yüzdesinin artmasıyla kopolimerdeki CMC kütlesinin düşmesi gerçeğini doğrulamış olur. Benzer şekilde kopolimerlerin 325-600°C sıcaklık aralığında kütle kayıpları sırasıyla %24,03, %36,06 ve %40,46'dır. Bu sıcaklık aralığındaki pik de kopolimerdeki PVP'nin bozunmasından kaynaklandığından aşılama yüzdesi arttıkça daha fazla PVP bozunmuştur. Bu sonuç aynı zamanda kopolimerdeki PVP miktarının artmasıyla aşılama yüzdesinin arttığı bir kanıt olarak da düşünülebilir.

Literatürde de benzer sonuçlar bulunmaktadır. De Britto ve Assis [139] karboksimetilselülozun farklı tuzlarının ısıl degradasyonlarını incelediklerinde sodyum karboksimetilselülozun başlangıç bozunma sıcaklığını bizim çalışmamıza benzer şekilde yaklaşık 250°C, kalsiyum tuzununkini ise yaklaşık 270°C olarak bulmuşlardır. Patel ve arkadaşları [140], sodyum karboksimetilaljinata, metil akrilat aşılama yapmışlardır. Bu kopolimerin termogramı incelendiğinde, 75-215°C'de yapıdaki suyun çıkmasını gösteren ve 250-630°C'de aljinatın depolimerizasyonu gösteren iki tane ısıl bozunma piki gözlemlendiğini ve aljinatın kütlesinin %50'sini kaybettiği sıcaklığın 340°C olduğunu rapor etmişlerdir.

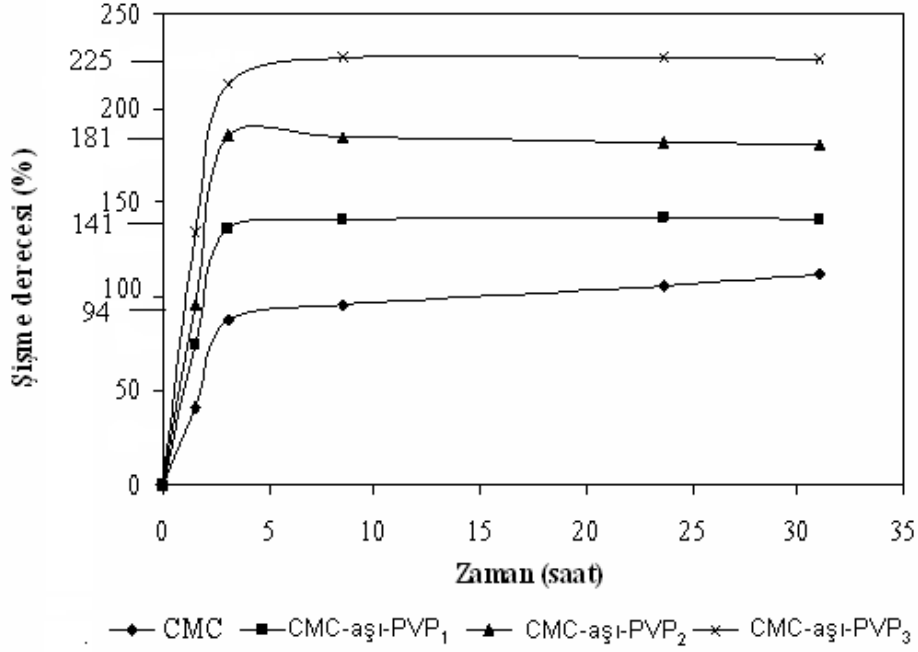


Şekil 3.3. CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin karşılaştırılmalı TGA ve DTGA termogramları

3.1.3. CMC, CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ Kürelerin Şişme Derecelerinin Belirlenmesi

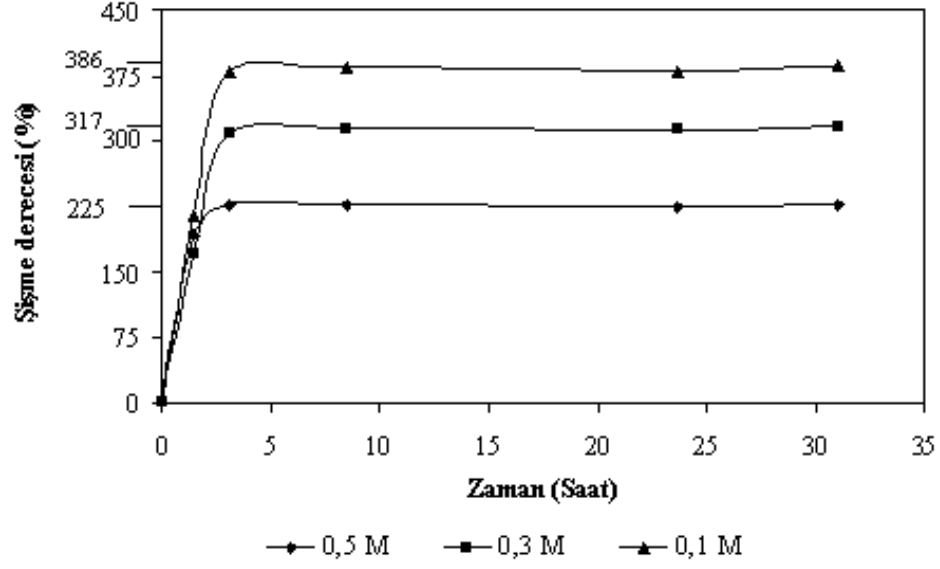
Şişme deneylerinin ilk kısmında CMC ile CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin 0,5 M Al³⁺ çözeltisinde, çözeltide olgunlaştırma yöntemiyle küreleri oluşturuldu. Çapraz bağlanmış boş kürelerin şişme dereceleri 30°C'deki su banyosunda gravimetrik olarak belirlendi. Bu amaçla fermantasyon ortamına atılan küreler belirli sürelerde çıkarılarak tartıldı ve kürelerin kütlelerinin artışına göre eşitlik 2.1 kullanılarak % şişme dereceleri hesaplandı. % Şişme derecesinin zamanla değişimini içeren grafikler Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.'de verilmektedir. Şekillerdeki ortak nokta ise bütün küreler için denge şişme derecesine yaklaşık 3 saatte ulaşılmış olmasıdır.

Çapraz bağlayıcı derişimi sabit tutulduğunda (Şekil 3.4.), CMC'nin % şişme derecesi %94 iken, %20 PVP aşılandığında %141, %24 PVP aşılandığında %181 ve %32 PVP aşılandığında %225'e yükselmiştir. Bu sonuçlara göre şişme derecesi aşılama yüzdesinin artmasıyla artmaktadır. Bu artışın nedeni CMC'ye aşılamanın PVP'nin hidrofilik karakterde bir polimer olması ve aynı zamanda aşılamanın dallanma şeklinde olup, dallanmanın da kopolimerdeki serbest hacimleri arttırmasıdır. Bu sayede kopolimerin daha fazla su tutması sağlanmaktadır.



Şekil 3.4. CMC, CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kürelerinin % şişme derecelerinin zamanla değişimi

Model olarak seçilen CMC-aşı-PVP₃ kopolimerinin farklı derişimlerdeki çapraz bağlayıcılarla oluşturulan kürelerinin % şişme derecelerinin zamanla değişimi ise Şekil 3.5.'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde çapraz bağlayıcı derişiminin 0,5 M'dan 0,3 ve 0,1 M'a düşmesiyle, % şişme derecesi de %225'ten %317 ve %386'ya artmıştır. Çapraz bağlayıcı ne kadar az olursa küreler o kadar fazla şişmektedirler. Çapraz bağlanma CMC'nin yapısında bulunan –OH grupları üzerinden olmaktadır. Dolayısıyla ortamda çapraz bağlayıcı ne kadar çok olursa o kadar çok –OH grubu bağlanacak ve kopolimerin serbest hacmi azalarak daha az şişecektir.



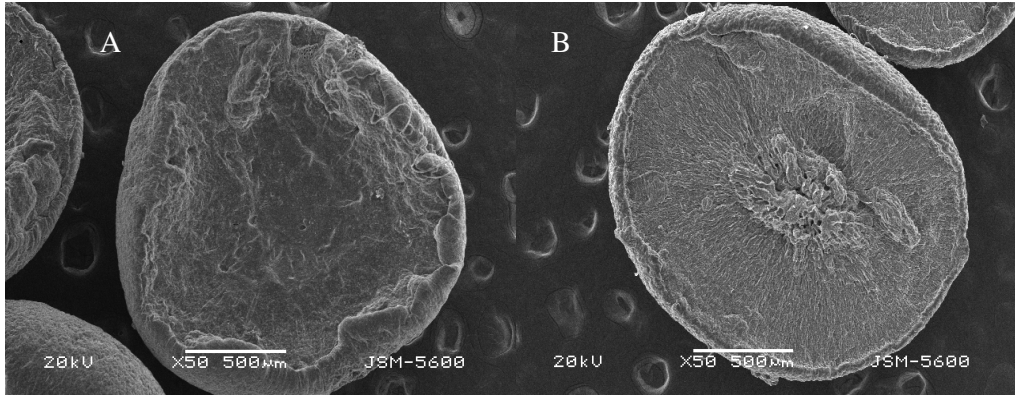
Şekil 3.5. CMC-aşı-PVP₃ kürelerinin % şişme derecelerinin çapraz bağlayıcı derişimiyle değişimi

Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçlar görülmektedir [141-143]. Işıklan ve arkadaşları [141] yaptıkları çalışmada CMC gibi doğal polisakarit kökenli bir polimer olan aljinata PVP aşıladıklarında, aşılama ile % şişme derecesinin % 142'den % 227'ye yükseldiğini belirtmişlerdir.

3.1.4. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleri

CMC ve aşılansmış CMC'den elde edilen kürelerin yüzey özelliklerinin gözlenmesi için SEM fotoğrafları çekilmiştir. Ancak fotoğraflar çekilmeden önce kürelerin iç yapısının da gözlenebilmesi küreler ortadan ikiye kesilmiş ve kurutularak fotoğraflanmıştır (Şekil 3.6.). Şekil 3.6. A ve B'de kürelerin ortadan ikiye kesilmiş

resimleri görülmektedir. Bu resimler incelendiğinde, CMC'den elde edilen kürenin içinin, düz homopolimer zincirlerinden oluştuğu için boşluksuz, dolgulu bir şekilde olduğu görülmektedir. CMC-aşı-PVP kopolimerinin iç yapısına bakıldığında ise, kenarlardan merkeze doğru kanalların olduğu pürüzlü, girintili bir şekil görülmektedir. Aşı kopolimerdeki bu girintili yapının sebebi ise PVP'nin dallanma şeklinde aşılması ve bu yüzden kopolimer içinde serbest hacimlerin artmasıdır.



Şekil 3.6. A) CMC kürelerinin SEM görüntüleri B) CMC-aşı-PVP kürelerinin SEM görüntüleri

3.1.5. CMC ve CMC-aşı-PVP Kürelerinin Gözenek Analizleri

Kürelerin gözenek boyutu Brunauer, Emmett ve Teller (BET) analizi ile belirlendi. Bu analiz için kürelerin kuru olması gerektiği için küreler kurutulmuş ancak küreler kurutulduğunda yapısındaki su tamamen uzaklaştığı için küreler büzülmuş ve gözenek boyutları normalden daha küçük çıkmıştır. Çizelge 3.3. incelendiğinde, CMC'nin gözenek boyutu 3,589 nm iken aşılama ile gözenek boyutu

artmış ve 5,876 nm'ye kadar yükselmiştir. Aşılamanın gözenek boyutunu arttırması kürelerin SEM fotoğraflarındaki girintileri açıklamak için de yeterlidir.

Kürelerin gözenek hacmi ise şişmiş kürelerin adsorpladıkları su miktarına göre hesaplanarak bulundu. bu sonuçlar incelendiğinde CMC polimerine PVP'nin (%32) aşılmasıyla gözenek hacmi %63'lük bir artış göstermiştir.

Çizelge 3.2. Kürelerin gözenek boyutu ve gözenek hacmi

	CMC	CMC-aşı- PVP ₁	CMC-aşı- PVP ₂	CMC-aşı- PVP ₃
Gözenek boyutu (nm)	3,589	4,431	5,153	5,876
Gözenek hacmi (cm ³ /g küre)	1,390	1,426	1,820	2,266

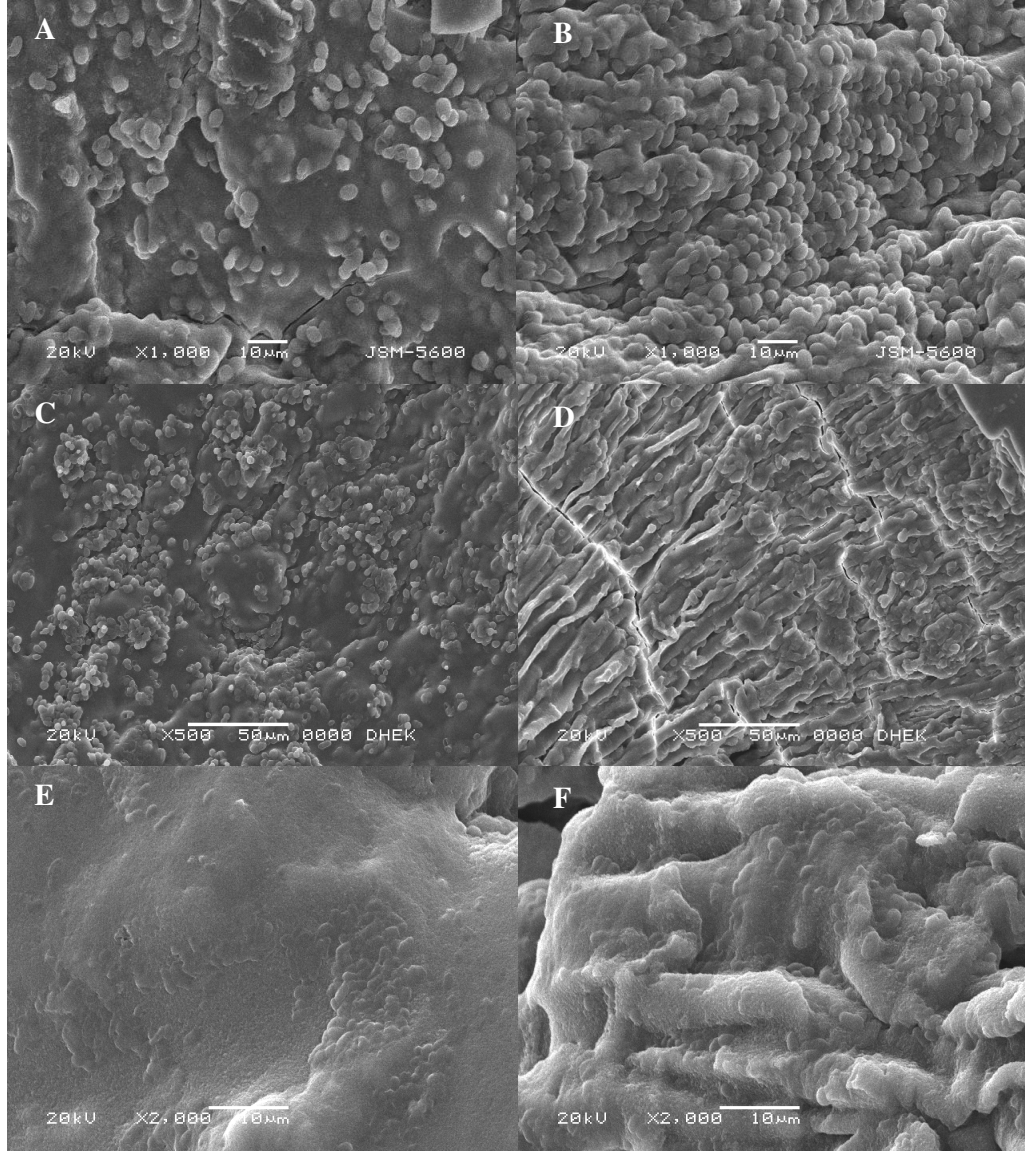
3.2. Fermantasyon Deneyleleri

3.2.1. Kürelere Maya Tutuklanması

Maya tutuklanmasında CMC ile CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerleri destek materyali olarak kullanılmışlardır. Bu materyallere *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları tutuklanmıştır. İmmobilizasyonun gerçekleşmesinin ispatlamak için maya tutuklanmış kürelerin yine iç kesitleri alındıktan sonra SEM fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 3.7. A, C ve E sırasıyla *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış CMC ile Şekil 3.7. B, D ve F ise

sırasıyla *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış CMC-aşı-PVP kürelerine ait resimleri göstermektedir.

S. cerevisiae (Şekil 3.7. A ve B) ve *S. bayanus* (Şekil 3.7. C ve D) mayası resimlerde kolayca seçilebilirken *K. marxianus* (Şekil 3.7. E ve F) hücreleri yüzeye yakın bölgelerde koloniler şeklinde ve üzerleri polimer kaplı, kabartılar şeklinde görülmektedirler. Ayrıca *K. marxianus*' un boyutlarının diğer mayalara göre çok daha küçük olması Şekil 3.7. E ve F resimlerinin 2000 büyütmeyle çekilmesine neden olmuştur. Yine CMC kürelerine ait resimler (Şekil 3.7. A, C, E) ile CMC-aşı-PVP kürelerine ait resimler (Şekil 3.7. B, D, F) karşılaştırıldığında daha önce bahsedilen aşılamanın yüzeyi girintili-çıkıntılı yaptığı tezi burada da doğrulanmıştır. CMC-aşı-PVP kürelerinin yüzeyleri diğerlerine göre daha girintili ve pürüzlüdür. Bunun nedeni düzgün bir şekilde sıralanan CMC polimerlerine PVP'nin dallanma şeklinde aşılama ve dallanmanın da yüzeyi pürüzleştirmesidir.



Şekil 3.7. Maya tutuklanmış kürelerin SEM fotoğrafları A) *S. cerevisiae* tutuklanmış CMC B) *S. cerevisiae* tutuklanmış CMC-aşı-PVP C) *S. bayanus* tutuklanmış CMC D) *S. bayanus* tutuklanmış CMC-aşı-PVP E) *K. marxianus* tutuklanmış CMC F) *K. marxianus* tutuklanmış CMC-aşı-PVP

3.2.2. Maya Tutuklanmış Kürelerin Fiziksel Özellikleri

S. cerevisiae, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları tutuklanmış CMC ile CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerlerinin kürelerinin karakterizasyonu için fermantasyondan önce ve sonra kürelerin çapları ölçülmüştür. Bu işlem için fermantasyondan önce ve fermantasyondan sonra ortamlardan 10'ar adet küre rastgele alınarak elektronik bir mikrometre (Mitutoyo IP.65) ile çapları ölçüldü ve bu değerlerin ortalamaları alınarak kürelerin çapları hesaplandı.

Ayrıca kürelerin içine tutuklanan mayaların fermantasyon süresince, küre içinde ve fermantasyon ortamındaki miktarlarının bulunması için tutuklanma yüzdesi eşitlik 3.1.'e göre hesaplandı.

$$\text{Tutuklanma yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Tutuklanan kuru kütle}}{\text{Toplam kuru kütle}} \times 100 \quad (3.1)$$

Elde edilen veriler her maya için ayrı ayrı hesaplanarak Çizelge 3.3., 3.4. ve 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerin çapları ve tutuklanma yüzdeleri

	CMC	CMC-aşı- PVP ₁	CMC-aşı- PVP ₂	CMC-aşı- PVP ₃
Fermantasyondan önce küre çapları (mm)	2,655	2,859	3,064	3,206
Fermantasyondan sonra küre çapları (mm)	3,862	4,123	4,393	4,667
Serbest kuru kütle (g/L)	0,448	0,45	0,5154	0,525
Tutuklanmış kuru kütle (g/L)	3	3,792	4,728	5,988
Tutuklanma yüzdesi (%)	87	89	90	92

Çizelge 3.4. *S. bayanus* tutuklanmış kürelerin çapları ve tutuklanma yüzdeleri

	CMC	CMC-aşı- PVP ₁	CMC-aşı- PVP ₂	CMC-aşı- PVP ₃
Fermantasyondan önce küre çapları (mm)	2,941	3,216	3,304	3,563
Fermantasyondan sonra küre çapları (mm)	4,134	4,327	4,682	4,875
Serbest kuru kütle (g/L)	0,621	0,708	0,815	0,891
Tutuklanmış kuru kütle (g/L)	3,163	4,244	5,392	6,943
Tutuklanma yüzdesi (%)	84	86	87	89

Çizelge 3.5. *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin çapları ve tutuklanma yüzdeleri

	CMC	CMC-aşı- PVP ₁	CMC-aşı- PVP ₂	CMC-aşı- PVP ₃
Fermantasyondan önce küre çapları (mm)	3,153	3,267	3,459	3,784
Fermantasyondan sonra küre çapları (mm)	4,255	4,538	4,798	4,940
Serbest kuru kütle (g/L)	0,768	0,817	0,864	0,901
Tutuklanmış kuru kütle (g/L)	3,099	4,198	4,695	5,851
Tutuklanma yüzdesi (%)	80	83	84	86

S. cerevisiae, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin fermantasyondan önceki çapları karşılaştırıldığında, çap en büyük olan *K. marxianus*, sonraki *S. bayanus* ve en küçük olan da *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerdir. Kürelerin hazırlanış biçimleri aynı olduğuna göre bu farklılık ön büyütme sırasında çapı büyük olan küredeki mayanın daha fazla çoğaldığını gösterir. Küre çapları incelendiğinde mayaların çoğalma miktarlarının fermantasyondan sonra da aynı oranda değiştiği görülmektedir.

Ayrıca tutuklanma yüzdeleri incelendiğinde ise bu defa durum yukarıda anlatılanın tersi şekilde gelişmiştir. İmmobilizasyon yüzdesi en büyük olan *S. cerevisiae* tutuklanmış küreler sonra *S. bayanus* ve sonra da *K. marxianus* tutuklanmış küreler gelmektedir. *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış kürelerde daha fazla miktarda maya üremesine rağmen kürelerin büyüklükleri arttığı için kürelerden dışarıya maya hücreleri sızmış ve dışarıdaki serbest maya hücrelerinin de

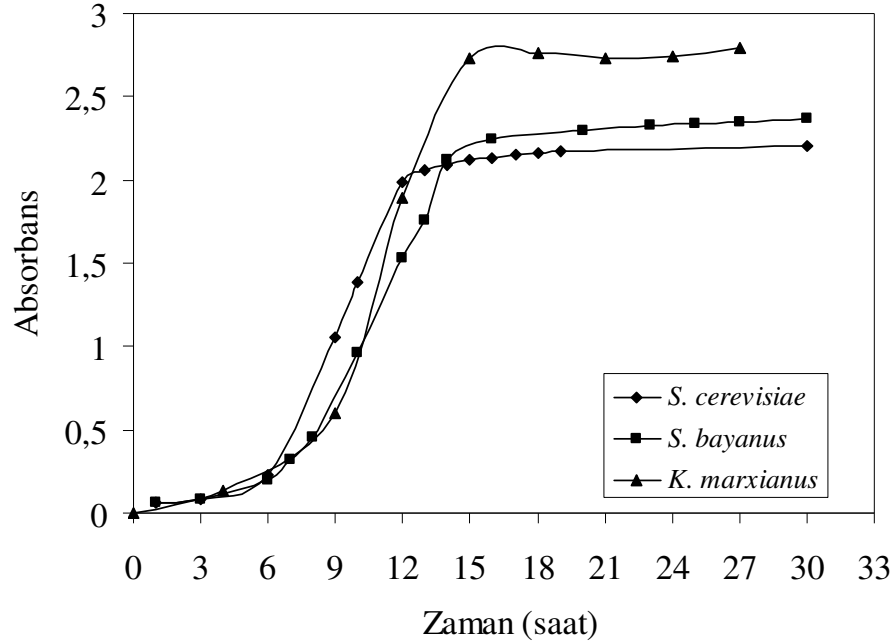
çok üremesi sonucu, tutuklanma yüzdeleri *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelere göre daha düşük çıkmıştır. *K. marxianus* tutuklanmış kürelerden dışarıya maya hücrelerinin sızmasının başka bir nedeni ise *K. marxianus* hücrelerinin boyutlarının diğer maya hücrelerine göre daha küçük olması ve bu yüzden kürelerdeki gözeneklerden daha kolay bir şekilde ve daha fazla miktarda dışarıya sızmış olmalarıdır.

Maya tutuklanmış küreler kendi aralarında karşılaştırıldığında CMC'ye aşılana PVP miktarı arttıkça kürelerin büyüklükleri, hücre miktarları ve tutuklanma yüzdeleri artmıştır. Kürelerin büyüklüklerinin artmasının temel nedeni şişme özellikleriyle ilgilidir. Aşılama ile şişme derecesi artar ve küre daha çok şişeceği için içinde daha fazla maya üreyebilir. Bu sayede de aşılama yüzdesi ile hem maya miktarı hem de tutuklanma yüzdesi artmış olur.

3.2.3. Mayaların Çoğalma Eğrileri

Mayaların polimerlerle karıştırılıp tutuklanmadan önce ne kadar büyütülmesi gerektiğini belirlemek için zamanla mayaların üremeleri takip edildi. Serbest mayaların büyüme ortamlarında zamanla kütlelerindeki artış hem UV-görünür bölge spektroskopisi ile hem de ortamdan alınan örneklerdeki maya kütlelerinin ölçülmesi yoluyla belirlendi. Mayalar büyüme ortamında, büyüme eğrisinde logaritmik evrenin sonlarına kadar olan süre büyütülüp ortamdan alındılar ve tutuklanma işlemlerinde kullanıldılar. Şekil 3.8.'de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayalarının büyüme eğrileri görülmektedir. Çoğalma eğrilerinde logaritmik fazın sonu *S. cerevisiae* için 12 saat, *S. bayanus* için 16 saat ve *K. marxianus* için 15 saat olarak belirlenmiştir. Ayrıca çoğalma eğrileri incelendiğinde

büyüme ortamında en fazla hücre artışı *K. marxianus*'ta sonra *S. bayanus*'ta ve en az da *S. cerevisiae*'dadır.



Şekil 3.8. Mayaların çoğalma eğrileri

3.2.4. Tutuklanmış Mayaların Etanol Üretimlerinin Başlangıç Glikoz Derişimi İle Değişimi

CMC ile PVP aşılınmış CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerin kürelerine tutuklanmış *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları aynı fermantasyon ortamlarında, 30°C sıcaklıkta, pH 5,0'te ve 125 rpm çalkalama hızında inkübe edilmişlerdir. Fermantasyon boyunca belirli sürelerde ortamdan sıvı örnek alınarak bu örneklerde mayaların zamanla glikoz tüketim miktarları ve etanol üretim miktarları tayin edilmiştir. Çizelge 3.6.'de *S. cerevisiae*

tutuklanmış kopolimerlerin, çizelge 3.7.'de *S. bayanus* tutuklanmış kopolimerlerin ve çizelge 3.8.'da da *K. marxianus* tutuklanmış kopolimerlerin farklı glikoz derişimleri kullanıldığındaki fermantasyon sonuçları gösterilmiştir. Bu sonuçlarda başlangıç glikoz derişimine karşı fermantasyonun süresi ve o fermantasyonda ne kadar etanol üretildiği verilmektedir.

Çizelge 3.6. incelendiğinde tutuklanmış *S. cerevisiae*'nın 50, 100, 150 ve 200 g/L glikozu sırasıyla 18, 27, 42 ve 48 saatte tükettiği ve maksimum etanol üretiminin ise sırasıyla 27,4, 59,3, 82,0 ve 108,1 g/L olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. incelendiğinde tutuklanmış *S. bayanus*'un 50, 100, 150 ve 200 g/L glikozu sırasıyla 3, 6, 9 ve 12 saatte tükettiği ve maksimum etanol üretimlerinin ise sırasıyla 22,80, 46,88, 64,61 ve 98,78 g/L olarak bulunduğu görülmektedir.

Çizelge 3.8.'dan ise tutuklanmış *K. marxianus*'un 50, 100, 150 ve 200 g/L glikozu sırasıyla 10, 18, 24 ve 33 saatte tükettiği ve maksimum etanol üretimlerinin ise sırasıyla 22,32, 42,54, 69,58 ve 94,33 g/L olarak bulunduğu görülmektedir.

Başlangıç glikoz derişimi arttıkça doğal olarak üretilen etanol miktarı da artmaktadır. İmmobilize mayaların etanol üretimleri karşılaştırıldığında en fazla miktarda etanolü *S. cerevisiae* ve en az miktarda etanolü ise *K. marxianus*'un ürettiği görülmektedir. Ancak fermantasyon sürelerine bakıldığında en kısa sürede glikozu tüketen maya dolayısıyla en hızlı etanol üreten maya *S. bayanus*'tur.

Çizelge 3.6. *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretiminin değişimi

Polimerlerin ismi	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Fermantasyon Süresi (saat)	Etanol Üretimi (g/L)
CMC	50	18	22,8
CMC-aşı-PVP ₁	50	18	23,7
CMC-aşı-PVP ₂	50	18	24,9
CMC-aşı-PVP ₃	50	18	27,4
CMC	100	27	46,4
CMC-aşı-PVP ₁	100	27	50,7
CMC-aşı-PVP ₂	100	27	54,4
CMC-aşı-PVP ₃	100	27	59,3
CMC	150	42	67,0
CMC-aşı-PVP ₁	150	42	71,1
CMC-aşı-PVP ₂	150	42	75,8
CMC-aşı-PVP ₃	150	42	82,0
CMC	200	48	84,4
CMC-aşı-PVP ₁	200	48	90,0
CMC-aşı-PVP ₂	200	48	95,7
CMC-aşı-PVP ₃	200	48	108,1

Çizelge 3.7. *S. bayanus* tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretiminin değişimi

Polimerlerin ismi	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Fermantasyon Süresi (saat)	Etanol Üretimi (g/L)
CMC	50	3	21,81
CMC-aşı-PVP ₁	50	3	22,11
CMC-aşı-PVP ₂	50	3	22,35
CMC-aşı-PVP ₃	50	3	22,80
CMC	100	6	43,72
CMC-aşı-PVP ₁	100	6	44,91
CMC-aşı-PVP ₂	100	6	45,22
CMC-aşı-PVP ₃	100	6	46,88
CMC	150	9	60,80
CMC-aşı-PVP ₁	150	9	61,56
CMC-aşı-PVP ₂	150	9	63,77
CMC-aşı-PVP ₃	150	9	64,61
CMC	200	12	92,12
CMC-aşı-PVP ₁	200	12	94,43
CMC-aşı-PVP ₂	200	12	96,11
CMC-aşı-PVP ₃	200	12	98,78

Çizelge 3.8. *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretiminin değişimi

Polimerler	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Fermantasyon Süresi (saat)	Etanol Üretimi (g/L)
CMC	50	10	20,05
CMC-aşı-PVP ₁	50	10	21,14
CMC-aşı-PVP ₂	50	10	21,96
CMC-aşı-PVP ₃	50	10	22,32
CMC	100	18	37,95
CMC-aşı-PVP ₁	100	18	40,15
CMC-aşı-PVP ₂	100	18	41,51
CMC-aşı-PVP ₃	100	18	42,54
CMC	150	24	61,52
CMC-aşı-PVP ₁	150	24	65,25
CMC-aşı-PVP ₂	150	24	68,54
CMC-aşı-PVP ₃	150	24	69,38
CMC	200	33	85,34
CMC-aşı-PVP ₁	200	33	90,41
CMC-aşı-PVP ₂	200	33	92,14
CMC-aşı-PVP ₃	200	33	94,33

Etanol verimi ($Y_{P/S}$) ve etanol üretim hızı (Q_P) fermantasyon proseslerindeki en önemli etanol üretim parametrelerindedir. Bu çalışmada da *S.*

cerevisiae, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin fermantasyonunda elde edilen sonuçlardan etanol üretim parametreleri ($Y_{P/S}$ ve Q_P) eşitlik 3.2 ve eşitlik 3.3'e göre hesaplanmış ve sonuçlar sırasıyla Çizelge 3.9., 3.10. ve 3.11'de gösterilmiştir.

$$\text{Etanol verimi } (Y_{P/S}) = \frac{\text{Üretilen etanol miktarı (g/L)}}{\text{Tüketilen glikoz miktarı (g/L)}} \quad (3.2)$$

$$\text{Etanol üretim hızı } (Q_P) = \frac{\text{Üretilen etanol miktarı (g/L)}}{\text{Fermantasyon süresi (saat)}} \quad (3.3)$$

$Y_{P/S}$ fermantasyon sonunda kaç gram glikozdan, kaç gram etanol üretildiğini belirten bir değerdir. Fermantasyon deneylerinde $Y_{P/S}$ değerleri genellikle 0,4 ile 0,6 g etanol/g glikoz aralığında bulunmuştur. Bu teorik verim ve literatürdeki değerlerle uyum içindedir. $Y_{P/S}$ değerleri en yüksek olan maya *S. cerevisiae*'dir. Ancak bu mayanın da dezavantajı fermantasyon süresinin uzun olmasıdır.

Q_P ise mayanın ne kadar sürede ne kadar etanol ürettiğinin bir ölçüsüdür. Q_P 'nin büyük olması o mayanın daha verimli olduğunu yani daha kısa sürede daha çok etanol üretebildiğini göstermektedir. Aşağıdaki çizelgeler incelendiğinde en yüksek Q_P değerleri *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları için sırasıyla 2,25, 8,23 ve 2,85 g/L.saate olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en hızlı etanol üreten maya *S. bayanus*'tur ve Q_P değerleri 6,75 ile 8,23 g/L.saate aralığında değişmektedir.

Küreler aşılama yüzdelerine göre karşılaştırıldığında ise CMC'ye göre aşılansın CMC'lerin $Y_{P/S}$ ve Q_P değerlerinin daha yüksek oldukları görülmektedir. Aşı kopolimerler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise aşılama yüzdesi arttıkça $Y_{P/S}$ ve Q_P değerlerinin arttığı gözlenmektedir. Ayrıca Çizelge 3.9., 3.10. ve 3.11

incelendiğinde model olarak seçtiğimiz CMC-aşı-PVP₃ kopolimerinin tüm mayalar için ve bütün glikoz derişimlerinde en verimli ve en hızlı etanol üretilmesini sağlayan destek materyali olduğu görülmektedir. Aşılama ile kürelerin serbest hacmi, dolayısıyla büyüklükleri ve şişme dereceleri arttığı için küreler için daha konforlu ve daha fazla hücrenin üreyebileceği bir ortam oluşturulmuştur. Bu sayede de aşılama $Y_{P/S}$ ve Q_p değerlerini arttırmıştır.

Çizelge 3.9. *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile etanol üretim parametrelerinin değişimi

Polimerlerin ismi	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Etanol Verimi ($Y_{P/S}$)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)
CMC	50	0,466	1,266
CMC-aşı-PVP ₁	50	0,487	1,316
CMC-aşı-PVP ₂	50	0,510	1,383
CMC-aşı-PVP ₃	50	0,559	1,522
CMC	100	0,471	1,718
CMC-aşı-PVP ₁	100	0,516	1,877
CMC-aşı-PVP ₂	100	0,552	2,014
CMC-aşı-PVP ₃	100	0,602	2,196
CMC	150	0,453	1,595
CMC-aşı-PVP ₁	150	0,479	1,690
CMC-aşı-PVP ₂	150	0,510	1,804
CMC-aşı-PVP ₃	150	0,434	1,952
CMC	200	0,426	1,758
CMC-aşı-PVP ₁	200	0,454	1,875
CMC-aşı-PVP ₂	200	0,551	1,990
CMC-aşı-PVP ₃	200	0,543	2,250

Çizelge 3.10. *S. bayanus* tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile etanol üretim parametrelerinin değişimi

Polimerlerin ismi	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Etanol Verimi ($Y_{P/S}$)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)
CMC	50	0,436	7,27
CMC-aşı-PVP ₁	50	0,442	7,37
CMC-aşı-PVP ₂	50	0,447	7,45
CMC-aşı-PVP ₃	50	0,456	7,6
CMC	100	0,437	7,287
CMC-aşı-PVP ₁	100	0,449	7,485
CMC-aşı-PVP ₂	100	0,452	7,537
CMC-aşı-PVP ₃	100	0,459	7,647
CMC	150	0,405	6,756
CMC-aşı-PVP ₁	150	0,410	6,84
CMC-aşı-PVP ₂	150	0,425	7,086
CMC-aşı-PVP ₃	150	0,431	7,179
CMC	200	0,461	7,68
CMC-aşı-PVP ₁	200	0,472	7,87
CMC-aşı-PVP ₂	200	0,481	8,01
CMC-aşı-PVP ₃	200	0,494	8,23

Çizelge 3.11. *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin başlangıç glikoz derişimi ve aşılama yüzdesi ile etanol üretim parametrelerinin değişimi

Polimerlerin ismi	Başlangıç glikoz derişimi (g/L)	Etanol Verimi ($Y_{P/S}$)	Etanol Üretim Hızı (g/Lsaat)
CMC	50	0,401	2,005
CMC-aşı-PVP ₁	50	0,423	2,114
CMC-aşı-PVP ₂	50	0,439	2,196
CMC-aşı-PVP ₃	50	0,446	2,232
CMC	100	0,38	2,108
CMC-aşı-PVP ₁	100	0,402	2,231
CMC-aşı-PVP ₂	100	0,415	2,306
CMC-aşı-PVP ₃	100	0,425	2,363
CMC	150	0,41	2,563
CMC-aşı-PVP ₁	150	0,435	2,719
CMC-aşı-PVP ₂	150	0,457	2,856
CMC-aşı-PVP ₃	150	0,463	2,891
CMC	200	0,427	2,586
CMC-aşı-PVP ₁	200	0,452	2,74
CMC-aşı-PVP ₂	200	0,461	2,792
CMC-aşı-PVP ₃	200	0,472	2,858

Kullanılan tutuklanmış mayaların 100 g/L glikoz içeren fermantasyon ortamında etanol üretim miktarları ve etanol üretim hızları çizelge 3.12.'de

karşılaştırılmıştır. Fermantasyonu en kısa sürede tamamlaya ve en hızlı etanol üreten maya *S. bayanus*, ancak en yüksek miktarda etanol üreten maya ise *S. cerevisiae*'dir.

Çizelge 3.12. Tutuklanmış mayaların aşılama yüzdesi ile fermantasyon süresi ve etanol üretiminin değişiminin karşılaştırılması

Kullanılan maya	Polimerlerin ismi	Fermantasyon süresi (saat)	Etanol derişimi (g/L)	Etanol üretim hızı (g/Lsaat)
<i>S. cerevisiae</i>	CMC	27	46,4	1,718
	CMC-aşı-PVP ₁	27	50,7	1,877
	CMC-aşı-PVP ₂	27	54,4	2,014
	CMC-aşı-PVP ₃	27	59,3	2,196
<i>S. bayanus</i>	CMC	6	43,72	7,287
	CMC-aşı-PVP ₁	6	44,91	7,485
	CMC-aşı-PVP ₂	6	45,22	7,537
	CMC-aşı-PVP ₃	6	46,88	7,647
<i>K. marxianus</i>	CMC	18	37,95	2,108
	CMC-aşı-PVP ₁	18	40,15	2,231
	CMC-aşı-PVP ₂	18	41,51	2,306
	CMC-aşı-PVP ₃	18	42,54	2,363

Literatürdeki *S. cerevisiae* ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bizim çalışmamızda bulduğumuz etanol üretim miktarları ve etanol verimleri literatürdekilerden daha yüksek olmasına rağmen, fermantasyon süresinin uzun

olmasından dolayı bulduğumuz etanol üretim hızları literatürdekilere yakın veya düşük çıkmıştır. Agara tutuklanmış *S. cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada 255 g/L glikozdan 94.4 g etanol üretilirken ve etanol verimi 0,37 g/g olarak bulunmuştur [124]. Başka bir çalışmada *S. cerevisiae* κ-karregenana tuktuklandıktan sonra sürekli fermantasyonda yaklaşık 48 g/L etanol üretilmiştir [126]. Başka bir çalışmada ısıya dayanıklı *S. cerevisiae* şeker kamışı saplarına tutuklandıktan sonra maksimum etanol üretimi 22,85 g/L, etanol verimi ise 0,45 olarak bulunmuştur. [122]. Yu ve arkadaşları doğal süpürge darısına tutukladıkları *S. cerevisiae* ile 200g/L şeker kullanarak yürüttükleri fermantasyon 16 saatte tamamlanmış ve etanol verimi ve etanol üretim hızının sırasıyla 4,9 g/g ve 5,72 g/Lsaat olarak bulunmuştur [9]. Diğer bir çalışmada da 150g/L laktoz dan *S. cerevisiae* ile % 8 (v/v) etanol üretilmiş ve etanol üretim hızını 1,5-2 g/Lsaat olarak bulunmuştur [127].

S. bayanus ile yapılan fermantasyonlardan elde edilen veriler literatürdeki verilerle kıyaslandığında etanol verimleri çok farklılık göstermemekle birlikte, etanol üretim hızlarının literatürdeki değerlere göre oldukça yüksek oldukları görülmektedir. Literatürde etanol üretim hızları 0,4 ile 3 g/Lsaat aralığında değişmekteyken, bizim çalışmamızda 6,7-8,2 g/Lsaat aralığına kadar yükselmiştir. Buda kullanılan *S. bayanus* tutuklanmış destek materyallerinin etanol üretiminde literatürdekilere göre çok daha verimli olduğunu göstermektedir.

Nabais ve arkadaşları serbest haldeki *S. bayanus*'un fermantasyonunda 320 g/L glikoz kullandıklarında % 13-17 (v/v) aralığında etanol üretmişlerdir [128]. Başka bir çalışmada 220-350 g/L aralığında *S. bayanus* ile yürütülen fermantasyonda etanol veriminin 0,39-0,43 ve etanol üretim hızının da 1,5-3,0 g/Lsaat aralığında bulunduğu bildirilmiştir [129].

Literatürdeki *K. marxianus* ile yapılan çalışmalara bakıldığında bizim çalışmamızdakilerle benzer sonuçlara rastlanmaktadır. Brady ve arkadaşları manyetik aljinat kürelerine *K. marxianus* tutuklamışlar ve 40 g/L laktozdan 18 g/L etanol üretmişlerdir [131].

Diğer bir çalışmada ise 37 °C'de %22 şeker içeren şeker kamışı suyunda serbest haldeki *K. marxianus* mayasını fermante edildiğinde % 8,7 (w/v) etanol üretilmiş ve etanol üretim hızı 1,45 g/Lsaat olarak bulunmuştur [132].

Aljinata tutuklanmış *K. marxianus* kullanarak peynir altı suyunun kesikli fermantasyonunda 47 g laktoz içeren peynir altı suyundan 20 g/L etanol elde edilmiş ve etanol verimi 0,47 g/g olarak bulunmuştur. Sürekli sistemde yapılan deneylerde ise en yüksek etanol verimi 0,50 g/g ve etanol üretim hızı 2,5-4,5 g/Lsaat aralığında bulunmuştur [134].

3.2.5. Tutuklanmış Mayaların Etanol Üretimlerine Çapraz Bağlayıcı Derişiminin Etkisi

Çapraz bağlayıcı derişiminin etanol üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 0,1, 0,3 ve 0,5 M Al³⁺ çözeltileriyle, model olarak seçilen CMC-aşı-PVP₃ kopolimerinin küreleri oluşturularak bu kürelere *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* mayaları tutuklanmış ve 100 g/L glikoz içeren fermantasyon ortamında fermante edilmiştir. Fermantasyon boyunca ortamdan alınan örneklerden etanol derişimleri ölçülmüş ve etanol üretim hızları hesaplanmıştır. Çizelge 3.13.'de mayaların çapraz bağlayıcı derişimine karşı etanol üretim hızları ve etanol derişimlerindeki derişimler verilmektedir.

S. cerevisiae tutuklanmış kürelerin çapraz bağlayıcı derişimi 0,5 M'dan 0,3 ve 0,1 M'a azaldığında fermantasyon süreleri 27 saatten sırasıyla 24 ve 20 saate düşmüştür. Etanol üretim hızı ise 2,19 g/Lsaat'ten 2,21 ve 2,51 g/Lsaate yükselmiştir. Ancak diğer maya hücrelerinde fermantasyon süresinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

S. bayanus tutuklanmış kürelerin çapraz bağlayıcı derişiminin 0,5 M'dan 0,3 ve 0,1 M' azalmasıyla 9 saatlik fermantasyon süresinde etanol üretimleri 45,88 g/L'den 46,86 g/L ve 47,32 g/L'ye çok küçük artışlarla yükselmiştir. Benzer şekilde etanol üretim hızları da 7,64 g/Lsaatten 7,81 ve 7,88 g/Lsaate yükselmiştir.

K. marxianus tutuklanmış küreler incelendiğinde ise 18 saatlik fermantasyon süresinde çapraz bağlayıcı derişiminin 0,5 M'dan 0,3 ve 0,1 M değerine azalmasıyla etanol üretimleri sırasıyla 42,54, 44,86 ve 47,75 g/L'ye yükselmiş ve yaklaşık olarak %5,17 ve %10,91 artmıştır.

Çapraz bağlayıcı derişimi azaldığında kürelerin büyüklükleri ve şişme dereceleri artmaktadır. Dolayısıyla bu da kürelerdeki gözenek büyüklüklerinin artmasına ve bu sayede kürelerin içine substratın daha kolay difüzlenip, ürününde daha kolay dışarıya çıkmasına neden olur. Bu sayede maya tutuklanmış kürelerin çapraz bağlayıcı derişimleri azaldıkça etanol üretim hızları artmıştır. Ancak çapraz bağlayıcı derişiminin düşük olmasının dezavantajı kürelerin dayanıklılıklarının azalmasıdır. Bu yüzden fermantasyon deneylerinde daha dayanıklı küreler için yüksek derişimde çapraz bağlayıcı kullanılmıştır.

Çizelge 3.13. Tutuklanmış mayaların etanol üretimine çapraz bağlayıcı derişiminin etkisi

Kullanılan maya	Çapraz bağlayıcı derişimi (M)	Etanol derişimi (g/L)	Etanol üretim hızı (g/Lsaat)
<i>S. cerevisiae</i>	0,5	59,30	2,19
	0,3	53,04	2,21
	0,1	50,20	2,51
<i>S. bayanus</i>	0,5	45,88	7,64
	0,3	46,86	7,81
	0,1	47,32	7,88
<i>K. marxianus</i>	0,5	42,54	2,36
	0,3	44,86	2,49
	0,1	47,75	2,65

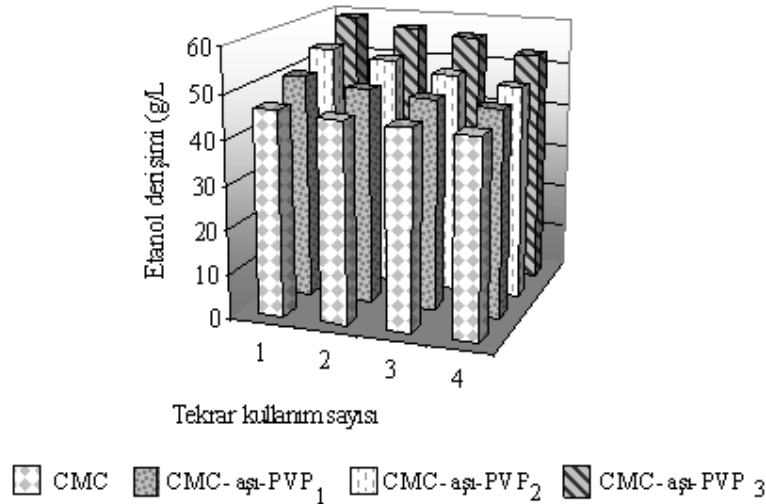
3.2.6. Maya Tutuklanmış Kürelerin Tekrar Kullanılabilirlikleri

S. cerevisiae, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış CMC ile CMC-aşı-PVP₁, CMC-aşı-PVP₂ ve CMC-aşı-PVP₃ kopolimerinin küreleri 100 g/L glikoz içeren fermantasyon ortamında fermante edilmiştir. Fermantasyon süreleri *S. cerevisiae* için 27 saat, *S. bayanus* için 6 saat ve *K. marxianus* için 18 saat olarak sınırlandırılmıştır. Fermantasyon süresinin sonunda küreler ortamdan alınarak steril izotonik su ile yıkandıktan sonra yeni fermantasyon ortamlarına koyularak fermantasyona devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.9., 3.10. ve 3.11.'de gösterilmektedir.

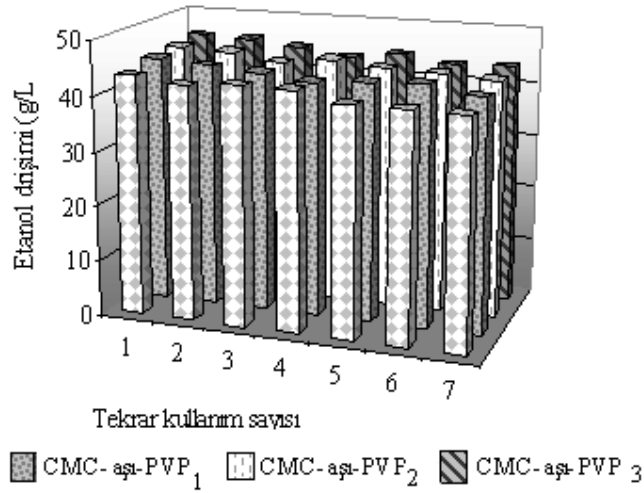
Şekil 3.9. *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayılarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre bütün küreler aktivitelerini kaybetmeden 4 kez tekrar kullanılabilirler. 4. kullanımda kürelerin etanol üretimleri, ilk kullanımdaki değerlerden yaklaşık %4-11 oranında düşmüştür.

S. bayanus tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları Şekil 3.10.'da göstermektedir. Bu sonuçlara göre *S. bayanus* tutuklanmış bütün küreler aktivitelerini kaybetmeden 7 kez tekrar kullanılabilirler. 7. kullanımda ise kürelerin etanol üretimleri, ilk kullanımdaki değerlerden yaklaşık olarak % 4-6 oranında düşmüştür.

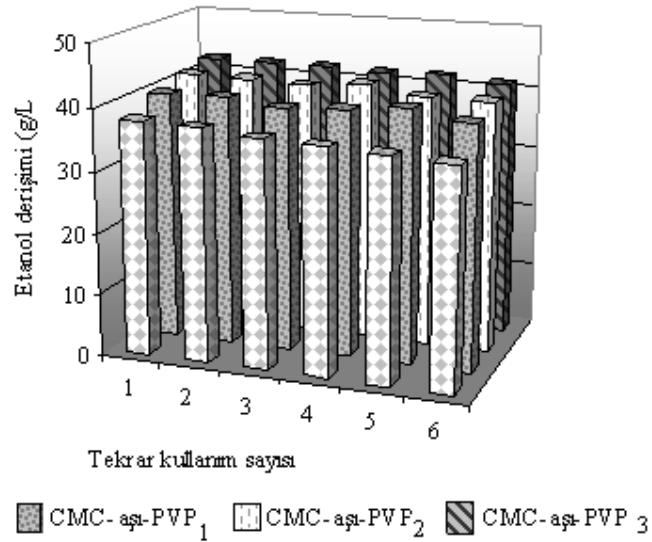
Şekil 3.11.'de ise *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları gösterilmektedir. *K. marxianus* tutuklanmış küreler aktivitelerini kaybetmeden 6 kez tekrar kullanılabilirler. 6. kullanımda kürelerin etanol üretimleri, ilk kullanımdaki değerlerden yaklaşık olarak % 2-7 oranında düşmüştür.



Şekil 3.9. *S. cerevisiae* tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları



Şekil 3.10. *S. bayanus* tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları



Şekil 3.11. *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin tekrar kullanım sayıları

Kürelerin şekillerde verilen tekrar kullanım sayılarından daha fazla kullanılmamasının nedeni ise kürelerin mekanik dayanıklılıklarını kaybetmeleridir. Kürelerin içindeki maya hücrelerinin arka arkaya yapılan fermantasyonlarda

üremeleri devam etmiş ve çoğalarak kürelerin mekanik dayanıklılığını azaltmıştır. Bu kullanımların sonunda küreler yavaş yavaş parçalanmaya başlamışlardır. Ama bu deneylerde elde edilen tekrar kullanım sayılarına ulaşmak bile bu kürelerin endüstriyel uygulamalarda kullanılması için yeterli sebep teşkil etmektedir. Literatür incelendiğinde benzer sonuçlar ve uygulamalar mevcuttur [144, 145].

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, karboksimetilselüloz üzerine N-vinil-2-pirolidon monomeri aşılandı ve elde edilen kopolimerin ve karboksimetilselülozun, çapraz bağlanma yöntemiyle küreleri oluşturuldu ve bu kürelere hapsetme yoluyla çeşitli mayalar tutuklandı. Sonrasında maya tutuklanmış küreler etanol fermantasyonunda kullanıldı. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. CMC'ye PVP aşılandığında oluşan kopolimerlerin şişme dereceleri aşılama yüzdesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır.
2. Maya tutuklanmış aşı kopolimer kürelerinin, CMC kürelerine göre daha büyük olması ve iç yapısının da daha girintili ve dalgalı olması fermantasyon işleminde substratın ve ürünün taşınması için önemli bir özelliktir.
3. Maya tutuklanmış kürelerden tutuklanma özellikleri ve etanol üretimi açısından en verimli olan küre aşılama yüzdesi % 32 olan CMC-aşı-PVP₃ küresidir.
4. *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış kürelerin maksimum etanol üretimleri sırasıyla 108,1, 98,78 ve 94,33 g/L olarak bulunmuştur.
5. *S. cerevisiae*, *S. bayanus* ve *K. marxianus* tutuklanmış kürelerde en yüksek etanol üretim hızı sırasıyla 2,25, 8,23 ve 2,89 g/Lsaat olarak bulunmuştur.

6. Küreler oluşturulurken kullanılan çapraz bağlayıcı derişiminin azalması etanol üretimini arttırmasına rağmen kürelerin mekanik dayanıklılıklarını düşürmektedir.
7. Arka arkaya yapılan fermantasyonlarda *S. cerevisiae* tutuklanmış küreler 4 kez, *S. bayanus* tutuklanmış küreler 7 kez ve *K. marxianus* tutuklanmış küreler de 6 kez tekrar kullanılabilir.
8. Kürelerin tekrar kullanım sayılarına ve etanol üretim hızlarına bakıldığında en verimli maya türünün *S. bayanus* olduğu görülmektedir.
9. Bu sonuçlar, farklı aşılama yüzdelerinde hazırlanan kopolimerlerin maya tutuklanması için destek metaryali olarak, etanol fermantasyonlarında başarıyla kullanılabilirliğini göstermektedir.
10. Ayrıca bu tutuklanmış sistemlerin endüstriyel etanol üretiminde verimli olarak kullanılabilir özelliklerinin olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Saxena, R.C., Adhikari, D.K., Goyal, H.B., Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. *Renew. Sust. Eneg. Rev.* 13: 167-178, 2009.
- [2] Lal R., Soil quality impacts of residue removal for bioethanol production. *Soil Till. Res.* 102: 233–241, 2009.
- [3] Antizar-Ladislao, B., Turrion-Gomez, J.L., Second-generation biofuels and local bioenergy systems. *Biofuels. Bioprod. Bioref.* 2: 455–469, 2008.
- [4] Chiaramonti, D., Bioethanol: Role and Production Technologies. 209–251, In: *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*. Ed. By P. Ranalli, Springer, 2007.
- [5] E. Tali Çetin, *Endüstriyel Mikrobiyoloji*. Bayda Yayınlar, İstanbul, 1983.
- [6] Caceres-Farfan, M., Lappe, P., Larque-Saavedra, A., Magdub-Mendez, A., Barahona-Perez, L., Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technol.* 99: 9036-9039, 2008.
- [7] Matsushika A., Inoue H., Murakami K., Takimura O., Sawayama S., Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.* 100: 2392–2398, 2009
- [8] Najafpour, G., Younesi, H., İsmail, K., Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technol.* 92: 251-260, 2004.

- [9] Yu J., Zhang X., Tan T., An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. J. Biotechnol. 129: 415-420, 2007.
- [10] Mallouchos A., Komaitis M., Koutinas A., Kanellaki M., Effect of immobilization and temperature on volatile by products Food Chem. 80: 109-113, 2003.
- [11] Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A., Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiol. 21: 377–397,2004.
- [12] Alegre R.M., Rigo M., Joekes I., Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysotile. Braz. Arch. Biol. Techn. 46: 751-757, 2003.
- [13] Verbelen, P.J., De Schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. Biotechnol. Lett. 28: 1515–1525, 2006.
- [14] Kırcı H., Ateş S., Akgül M., Selüloz Türevleri ve Kullanım Yerleri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 4:119-130, 2001.
- [15] Yiğitoğlu, M., Işıklan, N., Özmen, R., Graft copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone onto sodium carboxymethylcellulose with azobisisobutyronitrile as the initiator. J. Appl. Polym. Sci. 104: 936-943, 2007.
- [16] Anonim, EIA (U.S. Energy Information Administration), What is Energy?, <http://www.eia.doe.gov/kids/energyfacts/sources/whatsenergy.html> (Erişim tarihi: 06.11.2011)

- [17] Anonim, T.C. Enerji ve Tabii Kaynaklar bakanlığı, Enerji, <http://www.enerji.gov.tr/index.php?dil=tr&sf=webpages&b=enerji&bn=215&hn=12&nm=384&id=384> (Erişim tarihi: 06.11.2011)
- [18] Acaroglu, M., Biyomotorin Yakıtı, Alternatif Enerji Kaynakları, Atlas Yayın Dağıtım, İstanbul, 75-78, 229-256, 2003.
- [19] Ar, F.F., Biyoyakıtlar Tehdit mi-Fırsat mı?, Mühendis ve Makina, 49: 3-9, 2008.
- [20] Anastasov, A., Biodiesel-Basic Characteristics, Technology and Perspectives. Biotechnol Biotec. Eq., 23: 755-759, 2009.
- [21] E.E. Hatunoğlu, Biyoyakıt Politikalarının Tarım Sektörüne Etkileri. DPT Uzmanlık Tezi, Devlet Planlama Teşkilatı, Ankara, 2010.
- [22] Anonim, BP Statistical Review of World Energy, June 2011 <http://www.bp.com/statisticalreview> (Erişim tarihi: 22.11.2011).
- [23] Bayraktar, Ş., Türkiye Ziraat Odaları Birliği basın bülteni, www.tzob.org.tr/tzob_web/basin_bulten/2011/21_09_2011.htm (Erişim tarihi: 24.10.2011)
- [24] Anonim, Etil alkol üreticisi firmaların listesi, TAPDK, http://www.tapdk.gov.tr/alkol/1_EA_uretici.xls (Erişim tarihi: 18.10.2011).
- [25] Anonim, www.tarkim.com.tr (Erişim tarihi: 18.10.2011).
- [26] Anonim, www.tezkim.com.tr (Erişim tarihi: 18.10.2011).
- [27] Anonim, Konya Şeker (Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş.). Biyoetanol Tesisleri. Biyoetanol ve Biyoetanol Üretimi. Biyoetanol Kataloğu. http://www.konyaseker.com.tr/imagesold/stories/Etanol_ufak.pdf (Erişim tarihi: 18.10.2011).

- [28] Acaroğlu, M., Oğuz, H., Ünaldı, M., Türkiye İçin Alternatif Bir Yakıt: Biyoetanol, Yakıt Olarak Kullanımı ve Emisyon Değerleri. Biyoenerji 2004 Sempozyumu, İzmir, 2004.
- [29] Anonim, Properties of fuels, <http://www.afdc.energy.gov/afdc/pdfs/fueltable.pdf>. (Erişim tarihi: 11.10.2011).
- [30] Anonim, Fuel Property Comparison for Ethanol Gasoline No2Diesel, <http://www.scribd.com/doc/61556315/Fuel-Property-Comparison-for-Ethanol-Gasoline-No2Diesel>. (Erişim tarihi: 12.10.2011)
- [31] Lodgson, J.E., Ethanol. In the Encyclopedia of Chemical Technology Ed by J.I. Kroschwitz, John Wiley & Sons New York, 1994.
- [32] Walker, J.M., Rapley, R., Molecular Biology and Biotechnology, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2009.
- [33] Chisti, Y., Fermentation Technology in: Edited by Wim Soetaert and Erick J. Vandamme Industrial Biotechnology, Wiley-Vch Verlag Weinheim, 149-170, 2010.
- [34] Demain, A.L., History of Industrial Biotechnology in: Edited by Wim Soetaert and Erick J. Vandamme Industrial Biotechnology, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 43-45, 2010.
- [35] Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M., Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnol. Adv. 26: 89–105, 2008.
- [36] Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resour. Conserv. Recy. 50: 1–39, 2007.

- [37] A. Avcı, Bazı Thermoanaerobacter Suşlarının Etanol Üretim Oranlarının Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
- [38] Matsushika A., Inoue H., Murakami K., Takimura O., Sawayama S., Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.* 100: 2392–2398, 2009.
- [39] Madigan, MT, Martinko JM, Parker J. Nutrition and metabolism. Brock biology of microbiology. NJ: Prentice-Hall; 2000.
- [40] Caylak, B., Sukan, F.V., Comparison of different production processes for bioethanol. *Turk. J. Chem.* 22: 351–359, 1998.
- [41] GAIN Report, E36081, (Erişim tarihi: 16.10.2011)
<http://www.fas.usda.gov/gainfiles/200605/146187771.pdf>
- [42] Okur, M.T., Ayçiçeği kabuğu hemiselülozik hidrolizatına adapte edilmiş *pichia stipitis* mayası ile alkol üretimine zehir giderme ön işlemlerinin etkisi. *Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der.* 22: 385-391,2007.
- [43] Tao, J., Yu, S., Wu, T., Review of China's bioethanol development and a case study of fuel supply, demand and distribution of bioethanol expansion by national application of E10. *Biomass Bioenerg.* 35: 3810-3829, 2011.
- [44] Anonim, <http://www.ethanol.org/index.php?id=39&parentid=8> (Erişim tarihi: 12.10.2011)
- [45] Balat, M., Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52: 858–875, 2011.

- [46] Balat, M., Global status of biomass energy use. *Energy Source A*. 31: 1160–1173, 2009.
- [47] Anonim, www.alternatürk.com (Erişim tarihi: 22.11.2011)
- [48] Anonim, http://www.biofuelsassociation.com.au/index.php?option=com_content&view=article&id=69&Itemid=86 (Erişim tarihi: 14.10.2011)
- [49] Renewables 2011 Global Status Report, www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21_GSR2011.pdf (Erişim tarihi: 11.10.2011)
- [50] Eie. Biyoetanölün çevresel ve toplumsal etkileri, Elektrik İşleri Etüd İdaresi Gen. Müd., http://www.eie.gov.tr/turkce/YEK/biyoenerji/03-biyoetanol/be_cevre_toplum.html (Erişim tarihi: 16.10.2011).
- [51] Brammer, J.G., Lauer, M., Bridgwater, A.V., Opportunities for biomass-derived ‘bio-oil’ in European heat and power markets. *Energy Policy* 34: 2871–2880, 2006.
- [52] Balat, M., Global bio-fuel processing and production trends. *Energy. Explor. Exploit.* 25: 195–218, 2007.
- [53] Balat, M., Bioethanol as a vehicular fuel: a critical review. *Energy Sources A*. 31: 1242–1255, 2009
- [54] Saidur, R., Energy, economics and environmental analysis for chillers in office buildings. *Energy Educ. Sci. Technol. A*. 25: 1–16, 2010.
- [55] Walker, G.M., , *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley and Sons, New York, 2000.
- [56] Stanbury P.F., Whitaker, A., *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Pres, 1984.

- [57] Bailey, J.E. and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 373-454 1986.
- [58] O. Okur, *Peynir Altı Atık Suyundan Etil Alkol Üretilmesinin Modellenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
- [59] Lane, M.M., Morrissey, J.P., *Kluyveromyces marxianus: A yeast emerging from its sister's shadow*. *Fungal biology reviews*. 24: 17–26, 2010.
- [60] P. Karagöz, *Tutuklanmış maya hücreleri (Saccharomyces cerevisiae) kullanılarak sürekli sistemde etanol üretimi*. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 2007.
- [61] Anonim, (Erişim tarihi: 16.11.2011)
http://www.visualphotos.com/image/1x3740051/saccharomyces_cerevisiae_scanning_electron
- [62] Rakin, M., Mojovic, L., Nikolic, S., Vukasinovic, M., Nedovic, V., *Bioethanol production by immobilized Sacharomyces cerevisiae var. ellipsoideus cells*. *African Journal of Biotechnology*. 8: 464-471, 2009.
- [63] Fukuda, H., Kondo, A., Tamalampudi, S., *Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell Biocatalysts*. *Biochem Eng J* 44: 2–12, 2009.
- [64] Rojey, A., Monot, F., *Biofuels: Production and Applications*. In: Soetaert W, Vandamme E (eds) *Industrial Biotechnology*, Wiley, New York, pp 413-432, 2010.
- [65] Serra, A., Strehaiano, P., Taillandier, P., *Influence of temperature and pH on Saccharomyces bayanus var. uvarum growth; impact of a wine yeast*

interspecific hybridization on these parameters. *Int. J. Food. Microbiol.* 104: 257-265, 2005.

- [66] Anonim, (Erişim tarihi: 16.11.201)
http://www.diark.org/diark/species_list/Saccharomyces_bayanus_623-6C
- [67] Dellaglio, F., Zapparoli, G., Malacrinò, P., Suzzi, G., Torriani, S., *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines. *Ann. Microbiol.* 53: 411-425, 2003.
- [68] Horn, S.J., Aasen, I.M., Ostgaard, K., Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbil. Biot.* 25: 249-254, 2000.
- [69] Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarède I., Aigle M., Dubourdiou D., Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast.* 22: 1099–1115. 2005.
- [70] Kurtzman, C.P., Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygoturulaspora*, *FEMS Yeast Res.* 4: 233–245, 2003.
- [71] Nguyen, H.V., Gaillardin, C., Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 286–294 1997.
- [72] Nguyen, H.V., Lepingle, A., Gaillardin, C., Molecular typing demonstrate homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*,

- including the *Saccharomyces bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 71–85, 2000.
- [73] Masneuf-Pomarede, I., Le Jeune, C., Durrens, P., Lollier, M., Aigle, M., Dubourdieu, D., Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. *Systematic and Applied Microbiology*, 30: 75–82, 2007.
- [74] Naumov, G.I., Naumova, E.S., Five new combinations in the yeast genus *Zygodospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data. *FEMS Yeast Research*, 2: 39- 46, 2002.
- [75] Barnett, J. A., Lichtenthaler, F.W., A history of research on yeast 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880- 1900. *Yeast* 18: 363- 388, 2001.
- [76] Wesolowski-Louvel, M., Breunig, K.D., Fukuhara H., *Kluyveromyces lactis*. 139- 201. In: Ed by K. Wolf, *Non-conventional yeast in biotechnology*. Springer- Verlag, Heidelberg, 1996.
- [77] Kurtzman, C.P., Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Research*. 4: 233- 245, 2003.
- [78] Anonim, <http://www.ncyc.co.uk/print-photo-ncyc-CBS712A.html> (Erişim tarihi: 16.11.2011)
- [79] Rubio-Teixeira, M., Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnology Advances*. 24: 212– 225, 2006.

- [80] Llorente, B., Malpertuy, A., Blandin, G., Artiguenave, F., Wincker P., Dujon, B., Genomic exploration of the Hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. FEBS Letters, 487: 71- 75, 2000.
- [81] Schaffrath, R., Breuning, K.D., Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Fungal Genetics and Biology, 30: 173- 190, 2000.
- [82] Bartkeviciute, D., Siekstele, R., Sasnauskas, K., Heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (*EPGI*) using versatile autonomously replicating vector for a wide range of host. Enzyme Microb. Technol. 26: 653–656, 2000.
- [83] Boyle, M., Baron, N., McHale, A.P., Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Biotechnol. Lett. 19: 48–51, 1997.
- [84] Wilkins, M.R., Mueller, M., Eichling, S., Banat, I.M., Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IBM2, IBM4 and IBM5 under anaerobic conditions. Process. Biochem. 43: 346–350, 2008.
- [85] Fonseca, G.G., Heinlze, E., Wittmann, C., Gombert, A.K., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 339–354, 2008.
- [86] Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., McHale, A.P., Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part I. Yeast in general. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 809–821, 1998.

- [87] Pecota, D.C., Vineet Rajgarhia, V., Da Silva, N.A., Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. J. Biotechnol. 127: 408–416, 2007.
- [88] Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Limtong, S.S., Kosaka, T., Yamada, M., Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1573–1586, 2011.
- [89] M. Gökgöz, Lakkazın Poliakrilamit ve Poliakrilamit- κ -Karragenan Jellerine İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2006.
- [90] Fernandes, P., Cabral, J.M.S., Applied Biocatalysis: An Overview. 227-247 In the Industrial Biotechnology. Ed by W. Soetaert and E.J. Vandamme. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010.
- [91] Bickerstaff, G.F., Immobilisation of Enzymes and Cells. 454-489 In the Molecular Biology and Biotechnology, Ed by J.M Walker and R. Rapley. Royal Society of Chemistry, chembridge, 2009.
- [92] Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S., Immobilized Enzymes and Cells. Oxford Press, U.K., 1985.
- [93] Verbelen, P.J., De Schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. Biotechnol. Lett. 28: 1515–1525, 2006.
- [94] Dumitriu, S., Popa, M., Dumitriu, M., Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers. J. Bioact. Compat. Poly., 3: 243-312, 1988.

- [95] Jin, Y.L., Speers, R.A., Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Res. Int. 31: 421–440, 1998.
- [96] Zhao X.Q., Bai F.W., Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production. Biotechnol. Adv. 27: 849–856, 2009.
- [97] Sampermans, S., Mortier, J., Soares, E.V., Flocculation on set in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. J. Appl. Microbiol. 98: 525–531, 2005.
- [98] Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P., Blondin, B., Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. J. Bacteriol. 179: 4929–4936, 1997.
- [99] Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A., Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. Enzyme Microb. Technol. 22: 434–438, 1998.
- [100] Gryta, M., The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. Desalination. 142: 79–88, 2002.
- [101] Park, J.K., Chang, H.N., Microencapsulation of microbial cells. Biotechnol. Adv. 18: 303–319, 2000.
- [102] Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A., Simultaneous fermentation of glucose and xylose by pure and mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* immobilized in a two-chambered bioreactor. Enzyme Microb. Technol. 21: 265–272 1997.
- [103] Kargupta, K., Siddhartha, D., Sanyal, S.K., Analysis of the performance of a continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation. Biochem. Eng. J. 1: 31–37 1998..
- [104] Saçak, M., Polimer Kimyası. Gazi Kitabevi, Ankara, 2010.

- [105] Bhattacharya, A., Misra, B.N., Grafting: a versatile means to modify polymers Techniques, factors and applications, Progress in Polymer Science, 29: 767-814, 2004.
- [106] M. Arslan, Cu(II) iyonlarının 4-vinil piridin asılanmış poli (etilen teraftalat) lifler üzerine adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2000.
- [107] R. Coskun, Benzoyl peroksit yardımıyla poli(etilen teraftalat) (PET) lifler üzerine akril amid/itakonik asit monomer karışımının ası kopolimerizasyonu, Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2003.
- [108] Işıklan, N., Kurşun, F., İnal, M., Graft copolymerization of itaconic acid onto sodium alginate using benzoyl peroxide, Carbohydr. Polym. 79, 665-672 (2010).
- [109] Özkahraman, B., Acar, I., Emik, S., Removal of Cu²⁺ and Pb²⁺ Ions Using CMC Based Thermoresponsive Nanocomposite Hydrogel. Clean-Soil Air Water. 39: 658-664, 2011.
- [110] Javaherian, N.H., Farhad, H., Synthesis and Characterization of a Novel Silicone Containing Vinylic Macromonomer and Its Uses in the Preparation of Poly (silicone-co-styrene-co-butylacrylate) with Montmorillonite Nanocomposite Emulsion. J. Appl. Polym. Sci. 123: 1227-1237, 2012.
- [111] Işıklan, N., Kurşun, F., İnal, M., Graft Copolymerization of Itaconic Acid onto Sodium Alginate Using Ceric Ammonium Nitrate as Initiator, J. Appl. Polym. Sci. 114: 40-48, 2009. .
- [112] Köksel, H., Karbonhidratlar, Gıda Kimyası, İ. Saldamlı (eds), HÜ Yayınları, Ankara, 2005.
- [113] Rogovin, Z.A., Tappi 57: 65-68, 1974.

- [114] Fengel, D., Wegener, G., Wood: Chemistry, Ultrastructure Reactions, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1989.
- [115] Coffey, D.G., Bell, D.A., Henderson, A., Cellulose and Cellulose Derivatives 148-174, In:the Food Polysaccharides and Their Applications.ed. by A.M. Stephen G.O. Phillips; P.A. Williams. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, 2006
- [116] Blanos Cellulose Gum Handbook, Hercules Incorporated (undated).
- [117] Hatakeyama, T., Hatakeyama, H., Thermal Properties of Green Polymers and Biocomposites Kluwer Academic Publishers New York Springer, 2005.
- [118] Bojanic, V. Joranovic, S. Tobakovic, R. J. Synthesis and Electrochemistry of Grafted Copolymers of Cellulose with 4-Vinylpyridine, 1-Vinylimidazole, 1-Vinyl-2-pyrrolidinone, and 9-Vinylcarbazole. J. Appl. Polym. Sci., 60: 1719–1725, 1996.
- [119] Chauhan, G.S., Singh, B., Kumar, S., Synthesis and characterization of N-vinyl pyrrolidone and cellulose based functional graft copolymers for use as metal ions and iodine sorbents. J. Appl. Polym. Sci. 98: 373-382, 2005.
- [120] E. Biçer, Poli(vinil pirolidon)/sodyum aljinat ve (sodyum aljinat)-ası-(N-vinil-2-pirolidon) mikrokürelerden diltiazemin kontrollü salımı, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2005.
- [121] Liu, Z.M.; Xu, Z.K.; Wang, J.Q.; Wu, J.; Fu, J.J., Surface modification of polypropylene microfiltration membranes by graft polymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone. Eur. Polym. J., 40: 2077-2087, 2004.
- [122] Chandel, A.K, Narasu, M.L., Chandrasekhar, G., Manikyam, A., Venkateswar Rao, L., Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by

- thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3. *Bioresource Technol.* 100: 2404-2410, 2009.
- [123] Liu, R., Li, J., Shen, F., Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation. *Renew. Energ.*, 33: 1130–1135, 2008.
- [124] Nigam J.N., Gogoi B.K., Bezbaruah R.L., Alcoholic fermentation by agar immobilized yeast cells. *World J. Microb. Biot.* 14: 457-459, 1998.
- [125] Öztop, H.N., Öztop, A.Y., Işıkver, Y., Saraydın, D., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to radiation crosslinked HEMA/AAm hydrogels for production of ethyl alcohol. *Process Biochem.* 37: 651-657, 2002.
- [126] Nigam, J.N., Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *J. Biotechnol.* 80: 189-193, 2000
- [127] Guimaraes, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L., Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 30: 1953-1958, 2008
- [128] Nabais, R.C., Correia, I., Viegas, C.A., Novais, J.M., Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. *Appl. Environ. Microb.* 54: 2439-2446, 1988.
- [129] Castellar, R., Barros, M.R., Cabral, J.M.S., Iborra, J.L., Effect of Zeolite Addition on Ethanol Production from Glucose by *Saccharomyces bayanus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 377-384, 1998.
- [130] Kilonzo, P.M., Margaritis, A., Yu, J., Ye, Q., Bioethanol Production from Starchy Biomass by Direct Fermentation Using *Saccharomyces Diastaticus*

- in Batch Free and Immobilized Cell Systems. *Int. J. Gren. Energ.* 4: 1-14, 2007.
- [131] Brady, D., Nigam, P., Marchant, R., Singh, D., McHale, A.P., The effect of Mn^{2+} on ethanol production from lactose using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in magnetically responsive matrices. *Bioprocess Engineering*. 17: 31–34, 1997.
- [132] Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour. Technol.* 98: 3367-3374, 2007.
- [133] Brady, D., Nigam, P., Marchant, R., Singh, D., McHale, L., McHale, A.P., Ethanol Production At 45°C By *Kluyveromyces Marxianus* Imb3 Immobilized In Magnetically Responsive Alginate Matrices. *Biotechnol. Lett.* 18: 1213-1216, 1996.
- [134] Christensen, A.D., Kadar, Z., Oleskowicz-Popiel, P., Thomsen, M.H., Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 283–289, 2011.
- [135] Guo, X., Zhou, J., Xiao, D., Improved Ethanol Production by Mixed Immobilized Cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from Cheese Whey Powder Solution Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 160:532–538, 2010.
- [136] Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428, 1959.
- [137] Al Sagheer, F.A.; El-Sawy, N.M., Investigation of radiation-grafted and radiation-modified *N*-vinyl-2-pyrrolidone onto polypropylene film. *J. Appl. Polym. Sci.* 76: 282-289, 2000.

- [138] Can, H.K., Synthesis of persulfate containing poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) hydrogels in aqueous solutions by γ -induced radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 72: 703-710, 2005.
- [139] De Britto, D., Assis, O.B.G., Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty form. *Thermochimica Acta.* 494: 115-122, 2009.
- [140] Patel, G.M., Patel, C.P., Trivedi, H.C., Ceric-induced grafting of methyl acrylate onto sodium salt of partially carboxymethylated sodium alginate. *Eur. Polym. J.*, 35: 201-208, 1999.
- [141] Işıklan, N., İnal, M., Yiğitoğlu, M., Synthesis and characterization of poly(N-vinyl-2- pyrrolidone) grafted sodium alginate hydrogel beads for the controlled release of indomethacin. *J. Appl. Polym. Sci.* 110: 481-493, 2008.
- [142] Şen, M., Güven, O., Radiation Synthesis of Poly(N-Vinyl 2-Pyrrolidone/ Itaconic Acid) Hydrogels and Their Controlled Release Behaviours. *Radiat. Phys. Chem.* 55: 113-120, 1999.
- [143] Akdemir, Z.S., Apohan, N.K., Preparation and diffusion studies of poly (N-isopropylacrylamide)/ Poly (N-vinylpyrrolidone) full-IPN hydrogels. *Polym. Avdan. Technol.* 18: 932-939, 2007.
- [144] Zhao, J., Xia, L., Ethanol production from corn stover hemicellulosic using immobilized recombinant yeast cells. *Biochem. Eng. J.* 49: 28-32, 2010
- [145] Behera, S., Kar, S., Mohanty, R.C., Ray, R.C., Comparative of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized agar agar and Ca-alginate matrices. *Appl. Energ.* 87: 96-100, 2010.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Murat GÖKGÖZ

Doğum Tarihi : 03.06.1979

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans : Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi

Kimya Bölümü, 2001

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, 2006