

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ANANAS KABUĞU HİDROLİZATINDAN ETKİN BİYOETANOL
ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

MERT CAN AYKAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

MAYIS 2025

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ANANAS KABUĞU HİDROLİZATINDAN ETKİN
BİYOETANOL ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

MERT CAN AYKAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

MAYIS 2025

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

INVESTIGATION OF EFFICIENT BIOETHANOL
PRODUCTION FROM PINEAPPLE PEEL
HYDROLYSATE

MERT CAN AYKAÇ

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

ADVISOR: PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

MAY 2025

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 16/05/2025 tarih ve 2025/27 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 29/05/2025 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Mert Can AYKAÇ'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ÜYE

: Prof. Dr. Hatice BAŞ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Dünyadaki nüfusun son yıllarda artmasıyla beraber artan enerji ihtiyacı ve fosil yakıtların kullanımının çevreye zararlı etkilerinden dolayı alternatif çevre dostu yakıtlara olan ihtiyaç artmıştır. Biyoetanol, yenilenebilir, doğa dostu ve tarımsal ve gıda atıklarından üretilmesi sayesinde bu alternatif yakıt için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Çeşitli tarımsal ve gıda atıklarını içeren lignoselülozik hammadde kaynakları, mikroorganizmalara aracılığıyla biyoetanol üretiminde kullanılarak çevre dostu alternatif bir kaynak üretimi ve atıkların değerlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, lignoselülozik bir hammadde kaynağı olarak ananas kabuğu atığından etkin biyoetanol üretimi potansiyeli incelenmiştir. Bu kapsamda, ananas kabuğu atıklarının, mikroorganizmanın kullanabileceği şekerleri açığa çıkarmak için asit ile hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ilk kez asit hidroliz yöntemiyle hazırlanmış ananas kabuğu atıklarının yeni bir *Klebsiella oxytoca* izolatu aracılığıyla biyoetanol üretim potansiyeli incelenmiştir. Biyoetanol üretiminin arttırılması amacıyla, sıcaklık, başlangıç hücre yoğunluğu, pH, inkübasyon süresi gibi fermentasyon etkinliğini etkileyebilecek faktörler incelenmiştir ve yine bu kapsamda suşun adaptif laboratuvar evrimi çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında küçük ölçekte (100mL) yapılan çalışmaların devamında, çalışmanın ölçeklenebilirliğini ve endüstriyel çalışmalara uygunluğunu test edebilmek amacıyla fermentasyon büyük ölçekte (1L) denenmiştir. En yüksek biyoetanol üretimi (33.80 g/L), %1 HCl konsantrasyonuyla, 30°C sıcaklıkta, 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 48.saatlik inkübasyon sonucunda, pH değeri 8 koşullarında elde edilmiştir. Böylece yeni bir *Klebsiella oxytoca* izolatu aracılığı, kullanılan asit hidrolizi yöntemi ve fermentasyon koşullarının optimize edilmesi ile ananas kabuğu atığının, atıkların değerlendirilmesinde ve düşük maliyetli biyoetanol üretimini amaçlayan endüstriyel çalışmalarda kullanılabileceğini görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Fermentasyon, Biyoetanol, Ananas Kabuğu Atığı, *Klebsiella oxytoca*

ABSTRACT

With the increase in the world population in recent years, the need for alternative environmentally friendly fuels has increased due to the increasing energy demand and the harmful effects of fossil fuel use on the environment. Bioethanol has a great potential for this alternative fuel due to its renewable, nature-friendly nature and ability to be produced from agricultural and food wastes. Lignocellulosic raw material sources including various agricultural and food wastes are used in bioethanol production through microorganisms and are of great importance in terms of an environmentally friendly alternative source production and waste utilization.

In this thesis study, the potential for effective bioethanol production from pineapple peel waste as a lignocellulosic raw material source was investigated. In this context, acid hydrolysis process was carried out on pineapple peel wastes to release sugars that microorganisms can use. In this study, the bioethanol production potential of pineapple peel wastes prepared by acid hydrolysis method was investigated for the first time through a new *Klebsiella oxytoca* isolate. In order to increase bioethanol production, factors that may affect fermentation efficiency such as temperature, initial cell density, pH, incubation time were investigated and in this context, adaptive laboratory evolution of the strain was studied. In this thesis study, in continuation of the studies conducted on a small scale (100mL), fermentation was tried on a large scale (1L) in order to test the scalability of the study and its suitability for industrial studies. The highest bioethanol production (33.80 g/L) was obtained with 1% HCl concentration, 30°C temperature, 0.1 initial cell density (OD600nm), 48 hours of incubation and pH value 8 conditions. Thus, it shows that pineapple peel waste can be used in the evaluation of waste and industrial studies aiming at low-cost bioethanol production by using the acid hydrolysis method and optimizing fermentation conditions through a new *Klebsiella oxytoca* isolate.

Keywords: Fermentation, Bioethanol, Pineapple Peel Waste, *Klebsiella oxytoca*

TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, yol gösterici yaklaşımıyla her aşamada destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan, bana koşulsuz sevgi ve destek veren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim. Varlıklarıyla bana güç verdikleri, motivasyonumu korumama yardımcı oldukları ve her zaman yanımda oldukları için minnettarım.

Ayrıca tez sürecinde birlikte çalıştığım, deney aşamalarında bana destek olan, bilgi paylaşımı ve moral motivasyon konusunda her zaman yanımda hissettiğim değerli laboratuvar arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme ve Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A YURT İÇİ GENEL YÜKSEK LİSANS BURS PROGRAMI kapsamında beni destekledikleri için teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyoetanol	4
2.1.1. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ham Madde Kaynakları	5
2.1.2. Biyoetanol Üretim Aşamaları	6
2.1.3. Lignoselülozik Hammaddeden Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ön Muamele ve Hidroliz Yöntemleri	7
2.1.3.1. Fiziksel Yöntemler	8
2.1.3.1. Kimyasal Yöntemler	8
2.1.3.1. Biyolojik Yöntemler	9
2.1.3.1. Fizikokimyasal Yöntemler	9
2.1.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	10
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	11
3.1. Gereçler	11
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	11
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	11
3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşu	12
3.2. Yöntemler	12
3.2.1. Ananas Kabuğu Atıklarının Çalışmada Kullanılmak Üzere Hazırlanması	12
3.2.2. Ön Kültürlerin Hazırlanması	12
3.2.3. Ananas Kabuğu Atığı Kullanılarak Hidrolizat ve Besiyerlerinin Hazırlanması	12
3.2.3.1. M3 Besiyerinin Hazırlanması	13
3.2.3.2. M4 Besiyerinin Hazırlanması	13
3.2.4. Sıcaklığın ve Başlangıç Hücre Yoğunluğunun Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	14
3.2.5. İnkübasyon Süresinin Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	14
3.2.6. Besiyerinin pH Değerinin Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	15
3.2.7. <i>Klebsiella oxytoca</i> Suşunun Adaptif Laboratuvar Evriminin Gerçekleştirilmesi	15
3.2.8. Büyük Ölçekte Biyoetanol Üretimi	
3.2.9. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi	15
3.2.10. Etanol ve Şeker Miktarlarının Belirlenmesi	16

3.2.11. Verim Hesaplamaları	16
3.2.12. İstatiksel Analizler	16
	17
4. BULGULAR	18
4.1. Hidroliz Yönteminin Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi	18
4.1.1. M3 Besiyerinde Biyoetanol Üretimi	18
4.1.2. M4 Besiyerinde Biyoetanol Üretimi	19
4.2. Fermentasyon Ortam Sıcaklığının ve Başlangıç Hücre Yoğunluğunun Biyoetanol Üretimine Etkisi	20
4.3. İnkübasyon Süresinin Biyoetanol Üretimine Etkisi	24
4.4. Fermentasyon Ortamının pH Değerlerinin Biyoetanol Üretimine Etkisi	27
4.5. Küçük Ölçekte Adaptif Laboratuvar Evrimi Gerçekleştirilen <i>K. oxytoca</i> suşunun (KO-A) Biyoetanol Üretimi	31
4.6. Büyük Ölçekte Biyoetanol Üretimi	34
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	46
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ca	: Kalsiyum
C ₂ H ₅ OH	: Etanol
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KO	: <i>Klebsiella oxytoca</i> suşu
KO-A	: Adaptif <i>Klebsiella oxytoca</i> suşu
LB	: Luria-Bertani Besiyeri
L	: litre
Mg	: Magnezyum
mL	: Mililitre
NaOH	: Sodyumhidroksit
OD	: Optik Densite
Rpm	: Revolutions per minute
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Lignoselülozik biyokütlelerden biyoetanol üretim aşamaları.	7
Şekil 4.1: <i>K. oxytoca</i> suşunun farklı besiyerlerinde (M3, M4) inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarları (g/L).	20
Şekil 4.2: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD600nm, 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C, 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler)inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarları (g/L).	21
Şekil 4.3: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD600nm, 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında 48 saatlik inkübasyonları sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanolx100mL-1/OD).	22
Şekil 4.4: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD600nm, 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C, ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen substrat tüketim değerleri (%).	23
Şekil 4.5: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD600nm, 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen alkol verim değerleri (%).	24
Şekil 4.6: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saatler) inkübasyonu sonucunda üretilen etanol miktarları (g/L).	25
Şekil 4.7: M4 besiyerinde <i>K. oxytoca</i> suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72. saatler) inkübasyonları sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanolx100mL-1/OD).	26
Şekil 4.8: M4 besiyerinde <i>K. oxytoca</i> suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72. saatler) inkübasyonları sonrası elde edilen substrat tüketim ve alkol verim değerleri (%).	26
Şekil 4.9: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 48 saatlik inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarları (g/L).	29
Şekil 4.10: M4 besiyerinde <i>K. oxytoca</i> suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 48 saatlik inkübasyonları sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanolx100 mL-1/OD).	29

Şekil 4.11: M4 besiyerinde <i>K. oxytoca</i> suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen substrat tüketim değerleri (%).	30
Şekil 4.12: M4 besiyerinde <i>K. oxytoca</i> suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonunda elde edilen alkol verim değerleri (%).	31
Şekil 4.13: <i>K. oxytoca</i> suşları (normal ve adaptif) ile M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 48 saatlik inkübasyonları sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanolx100mL-1/OD).	33
Şekil 4.14: <i>K. oxytoca</i> suşları (KO ve KO-A) ile M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda substrat tüketim değerleri (%).	33
Şekil 4.15: <i>K. oxytoca</i> suşları (KO ve KO-A) ile M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda alkol verim değerleri (%).	34
Şekil 4.16: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 48 saatlik inkübasyonları sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanolx100mL-1/OD).	35
Şekil 4.17: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda substrat tüketim değerleri (%).	36
Şekil 4.18: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda alkol verim değerleri (%).	36

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: 2019-2023 yılları arasındaki dünyada üretilen etanol miktarı (milyon galon).	5
Tablo 4.1: Ananas kabuğu atıklarının farklı konsantrasyonlardaki asit hidrolizi ile hazırlanan besiyerlerinin (M3-M4) içerdiği şeker miktarları (%).	18
Tablo 4.2: <i>K. oxytoca</i> suşunun farklı besiyerlerinde (M3, M4) 37°C sıcaklıkta, 0.5 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonu sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD600nm) ve üretilen etanol miktarları (%).	19
Tablo 4.3: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD600nm , 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD600nm), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K. Şeker, %) miktarları.	21
Tablo 4.4: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde (Toplam şeker : %3.42) 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD600nm), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları.	24
Tablo 4.5: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 24 saatlik inkübasyonlar sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD600nm), üretilen etanol (%) ve kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları.	27
Tablo 4.6: <i>K. oxytoca</i> suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 48 saatlik inkübasyonlar sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD600nm), üretilen etanol (%) ve kalan şeker (K.Şeker,%) miktarları.	28
Tablo 4.7: <i>K. oxytoca</i> suşları (KO ve KO-A) ile M4 besiyerinde, 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 48 saatlik 90 seri inkübasyon sonunda elde edilen toplam hücre yoğunluğu değerleri (OD600nm), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları.	32
Tablo 4.8: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekle 24 ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD600nm), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları.	35

1. GİRİŞ

Günümüzde dünya nüfusunun artması, yaşam standartlarının gelişmesiyle birlikte, enerjiye ve gıdaya olan talep insanlık için oldukça artmış olup, bu kaynakların sürekliliği insanlık için önemli bir sorun olmuştur. Enerji talebindeki bu artış dünya genelinde fosil yakıtlar tarafından karşılanmaktadır. Fosil yakıtların kullanımının iklim değişikliği, küresel ısınma ve çevre kirliliği gibi olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Bu noktada insanlık, çevre dostu, yenilenebilir alternatif enerji kaynakları bulunmasının arayışına girmiştir [Roukas and Kotzekidou, 2022].

Diğer bir tarafta, gıdaya olan talebin sürekliliği, tarımsal, market ve evsel gibi çeşitli gıda atıklarının yüksek miktarda ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu sorun, bu atıkların doğru şekilde işlenememesi, doğaya bırakılması veya yakılması, çevre kirliliği ve ciddi seviyelerde sera gazı emisyonuyla sonuçlanmaktadır. Küresel ölçekte nüfusun büyümesi, özellikle ulaşım sektöründe bir fosil yakıt türevi olan petrolün kullanımını fazlaca arttırmakta olup, çevreye verilen zararın büyük ölçüde artmasına sebep olmaktadır. Benzine alternatif olabilecek yakıtlar arasında, bir sıvı biyoyakıt türü olan biyoetanol başta gelmektedir. Biyoetanolün fosil yakıtlara kıyasla yenilenebilir ve çevre dostu olmasından dolayı önemli bir alternatif enerji kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Mikroorganizmaların çeşitli karbonhidrat kaynaklarının fermantasyonu ile seri bir biyolojik süreçle biyoetanol elde edilir [Shukla et al., 2023].

Biyoetanol üretiminde kullanılan pek çok çeşitli kaynak bulunmaktadır. Biyoetanol genel olarak ticari ölçekte şeker kaynaklı şeker kamışı, şeker pancarı ve nişasta kaynaklı mısır buğday pirinç gibi ham maddelerden üretilir. Bu ham maddelerden biyoetanol üretimi enerji temini ve gıda güvenliği arasında önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu yüzden doğada bolca bulunan, düşük maliyetli ham madde kaynağı olan lignoselülözik hammadde biyoetanol üretimi büyük önem kazanmıştır. Gıda atıkları gibi hammadde kaynakları, doğru gıda atığı yönetimi stratejileri sağlanarak, biyoetanol üretiminde kullanılarak, hem çevre kirliliğinin azaltılması hem de sera gazı emisyonlarını azaltmaya yarayacak alternatif bir yakıt üretiminde kullanılma potansiyeline sahiptir.

Gıda atıklarının değerlendirilmesi özellikle son yıllarda önem kazanmıştır. Tropikal bir meyve olan ananas dünya genelinde en çok üretilen üçüncü tropikal meyve olup, özellikle taze biçimde veya meyve suyu şeklinde işlenilerek tüketildiğinden, kabuk gibi tüketilmeyen kısımları yüksek miktarda atık oluşturur. Ananas kabukları, hemiselülöz, selülöz ve lignin içerdiği için bir lignoselülözik ham madde olup, uygun ön muamele ve hidroliz yöntemleriyle işlenip, mikroorganizmaların fermantasyonu yoluyla biyoetanol üretiminde kullanılabilmektedir [Chen et al., 2021; Panahi et al., 2022].

1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Gelişmeye ve büyümeye devam eden insan popülasyonunda enerjiye ve gıdaya olan ihtiyaç da beraberinde büyümektedir. Bu ihtiyaç temel olarak kömür, petrol ve doğalgaz gibi çeşitli fosil yakıtlar tarafından karşılanır ve ulaşım, ısınma ve enerji üretiminde kullanılır. Fosil yakıtlarının kullanımının küresel ısınma, iklim değişikliği gibi çevreye ve insan sağlığına zararlı etkileri bulunmaktadır. Çevreye zararlı ve yenilenemeyen bir kaynak olan fosil yakıt yerine temiz ve sürdürülebilir bir yakıt arayışı önemli bir mesele haline gelmiştir [Halder and Purkait, 2021].

Biyoetanol çeşitli ham madde kaynaklarından mikroorganizmalar aracılığıyla fermantasyon yoluyla hızlıca üretilen, doğa dostu, sürdürülebilir bir kaynak olmasından dolayı fosil yakıtların yerine alabilecek önemli bir alternatif yakıt olmakla beraber fosil yakıtlarla karıştırılıp kullanılarak bu fosil yakıtların çevreye zararlı etkilerinin indirgenebilmesi açısından önemlidir. Biyoetanol üretiminde kullanılan ham madde kaynaklarından mısır, buğday, pirinç gibi önemli ham madde kaynakları enerji ve gıda endüstrilerinde bir çelişkiye sebep olur ve bu yüzden ham madde olarak kullanılabilecek bolca açığa çıkan ve çevreye zararlı etkileri bulunan gıda atıklarının değerlendirilmesi büyük önem kazanmıştır [Vohra et al., 2014].

Bu tez çalışmasında yenilenebilir ve doğa dostu bir alternatif enerji kaynağı olan biyoetanol üretimi için, çevreye zararlı etkileri bulunan ananas kabuğu atıkları değerlendirilmek üzere asit hidrolizi işlemi ile kullanıma hazır hale getirilmiş olup, *Klebsiella oxytoca* suşu aracılığıyla fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, ananas kabuğu atıklarının, yeni bir izolat olan *Klebsiella oxytoca* suşunun fermantasyonu yoluyla biyoetanol üretim kapasitesinin fermantasyon verimini etkileyecek hidroliz yöntemi, sıcaklık, pH, başlangıç hücre yoğunluğu, inkübasyon

süresi gibi faktörlerin optimize edilmesi ve adaptif evrim yaklaşımı ile arttırılması amaçlanmıştır. Böylelikle bir meyve işleme atığı olan ananas kabuklarından etkin bir şekilde etanol eldesinin sağlanmasına çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoetanol

Dünyadaki insan nüfusu 2024 yılında yaklaşık olarak 8 milyar olup, bu sayının 2050 yılında neredeyse 12 milyara yaklaşması beklenmektedir [Dibazar et al., 2024]. Fosil yakıt kaynaklarının günümüz tüketim miktarıyla bile, yaklaşık 50 yıl içinde tükenebileceği ön görülmektedir [Manikandan et al., 2022]. Dünyanın nüfusunun tahmin edilen bu hızlı artışıyla beraber, fosil yakıt tüketimi beraberinde artmakta olup doğaya salınan CO₂ miktarı artacak olup küresel ısınmaya neden olacaktır [Demirbaş vd., 2004]. Ön görülen bu veriler ışığında, fosil yakıtların sürekliliği ve çevreye olan negatif etkileri yüzünden uzun vadede doğa dostu, sürdürülebilir enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyoyakıtlar, fosil yakıtlara kıyasla zararsız, biyolojik olarak parçalanabilen ve çevreye zararlı olan etkileri azaltmak hedefiyle fosil yakıtlarla beraber kullanabilmekte ya da uzun vadede yerini alabilme potansiyeli taşımaktadır [Toor et al., 2020]. Biyoyakıtlar arasında biyoetanol, diğerlerine kıyasla günümüzde en çok bulunan biyoyakıttır.

Biyoetanol (etil alkol, C₂H₅OH, CH₃-CH₂-OH, EtOH), fosil yakıtlara kıyasla daha düşük toksisiteye sahip, çevre dostu, yenilenebilir bir sıvı biyoyakıttır. Global markette yaygın olarak bulunan biyoetanol, fosil yakıtların çevresel zararlarını azaltmak amacıyla, dizel ve benzin gibi yakıtlarla belirli oranlarda karıştırılarak kullanılmaktadır. Ayrıca, biyoetanolün oksijen içeriğinin, oktan sayısının yüksek olması sayesinde bu yakıtlarla karıştırıldığında açığa çıkan kirliliğin azalmasına sebep olarak daha temiz bir yakıt elde edilmesine katkıda bulunur. Özellikle ABD’ de E10 koduyla, %10 etanol ve %90 benzin karıştırılarak birçok otomobilde yakıt olarak kullanılabilir. E85 ise genellikle ABD ve çeşitli Avrupa ülkelerde %85 etanol ve %15 benzin karıştırılarak birçok otomobilde kullanılan bir yakıttır. Brezilya’da ise E100 saf etanolden oluşan yakıt da kimi araçlarda kullanılmaktadır [Adıgüzel, 2013; Balat vd., 2008; Aditiya et al., 2016;].

Tablo 2.1’e göre dünyada 2023 yılında üretilen etanol miktarı 29,550 milyon galon yani yaklaşık 111 milyar litredir. Dünyada biyoetanol üretiminin neredeyse yarısını

Amerika Birleşik Devleti gerçekleştirmekte olup, sırasıyla Brezilya ve Avrupa Birliği takip etmektedir. 2007 yılında bu miktarın yaklaşık 50 milyar litre olduğu bilinmekte olup son 17 senede ciddi artış göstermiştir. Türkiye’de 2021 yılında etanol üretim miktarı 112,39 milyon litre olup etanol üreticileri,

- Tezkim Tarımsal Kimya San. ve Tic. A.Ş.
- Konya Şeker San. ve Tic. A.Ş. Çumra Biyoetanol Tesisi Şubesi
- Tarımsal Kimya Teknolojileri San. ve Tic. A.Ş
- Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Eskişehir Şeker Fabrikası’dır.

Tablo 2.1: 2019-2023 yılları arasındaki dünyada üretilen etanol miktarı (milyon galon) (Web 1).

Bölge	2019	2020	2021	2022	2023	Dünya Üretim Payı (%)
ABD	15.778	13.941	15.016	15.361	15.580	53%
Brezilya	8.860	8.100	7.320	7.400	8.260	28%
Avrupa Birliği	1.380	1.330	1.410	1.460	1.440	5%
Hindistan	500	520	870	1.230	1.430	5%
Çin	1.020	940	900	920	950	3%
Kanada	497	429	434	447	460	2%
Tayland	430	390	350	370	370	1%
Arjantin	290	210	270	310	300	1%
Diğer Ülkeler	645	620	680	722	760	3%
Toplam	29.400	26.480	27.250	28.220	29.550	100%

2.1.1. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammadde Kaynakları

Biyoetanol üretiminde şeker kaynaklı; şeker kamışı, şeker pancarı, nişasta kaynaklı; mısır, buğday ve patates ve tarımsal atıklar, orman atıkları, endüstriyel atıklar gibi lignoselülozik biyokütleler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan şeker ve nişasta kaynaklı hammaddeler, biyoetanol üretiminde temel olarak kullanılmakta olup birinci nesil hammaddeler olarak adlandırılmaktadır. Biyoetanol üretiminde birinci nesil kaynaklarının kullanılması süreci lignoselülozik kaynaklara göre daha basit ve daha ucuz maliyetli olmasına rağmen mısır, şeker kamışı ve buğday gibi birinci nesil

hammadelerin kullanımının gıda güvenliğine ve bu kaynakların çokça kullanımının ekonomiye olumsuz etkileri bulunmaktadır. Birinci nesil kaynakların ortaya çıkardığı bu soruların çözülmesi için biyoetanol üretiminde tarımsal, gıda ve orman atıkları gibi lignoselülozik hammaddelerin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

İkinci nesil biyoyakıtların üretiminde, insanlar tarafından tüketilemeyen, çeşitli gıda, meyve işleme atıklarından elde edilen lignoselülozik biyokütleler kullanılır. Bu atıklarda şeker, nişasta, protein, lipitler, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi bileşikler bulunabilir [Akbaş and Stark, 2016]. Lignoselülozik biyokütleler,

- Dünya genelinde bol miktarda bulunması,
- Gıda sektörü için bir risk durumu oluşturmaması,
- Atıklardan elde edildiği için düşük maliyetli olması,
- Atıkların değerlendirilmesi ile çevresel kirliliğin azaltılması,

gibi avantajları sayesinde biyoetanol üretiminde büyük bir potansiyel taşımaktadır.

Lignoselülozik biyokütleler içinde mikroorganizmaların fermente edebileceği ve edemeyeceği şekerler bulundurulur. Lignoselülozik biyokütlenin temelde büyük bir kısmını selülöz ve kalan kısımlarını hemiselüloz ve lignin oluşturur. Lignin, fermente edilebilen şekerlerin açığa çıkmasını engelleyerek fermentasyon verimini düşürür ve ön işlemlerle ayrılması gerekmektedir.

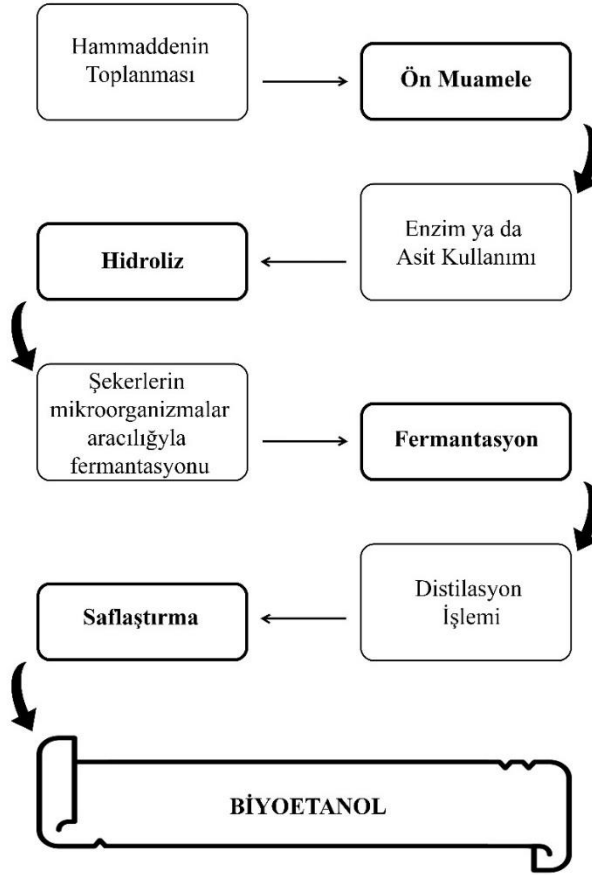
2.1.2. Biyoetanol Üretim Aşamaları

Biyoetanol üretimi genel olarak,

- Hammaddenin toplanıp öğütme ya da mekanik parçalama ile kullanıma hazır hale getirilmesi
- Ön muamele ve asit ya da enzim hidroliz yöntemleriyle fermente edilebilecek basit şekelerin açığa çıkarılması
- Bu şekerlerin farklı mikroorganizmalar aracılığıyla fermentasyonu
- Elde edilen biyoetanolün distilasyonu

aşamalarından oluşmaktadır.

Devi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [2022] bu aşamalar şekildeki gibi ifade edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Lignoselülozik biyokütlelerden biyoetanol üretim aşamaları.

2.1.3. Lignoselülozik Hammaddeden Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ön Muamele ve Hidroliz Yöntemleri

Lignoselülozik hammaddelerin, kullanılacak kaynağa bağlı olarak genellikle yapısında %10-25 arasında lignin bulunmaktadır. Bu oran odunsu bitkilerde %30'lara varmaktayken ananas gibi meyve atıklarında %5-10 civarı arasında değişmektedir. Biyoetanol üretiminin veriminin artırılması ve asit ya enzim hidroliziyle fermente edilebilen basit şekerlerin açığa çıkarılması için ön muameleme işlemi gerekli olabilmektedir. Lignin, selüloz ve hemiselüloz için bir bariyer görevi görerek, hidroliz yöntemleri ile basit şekerlerin oluşumunu zorlaştırır [Rezania et al., 2020]. Bu bariyeri

aşmak için çeşitli fiziksel, kimyasal, biyolojik ve fizikokimyasal yöntemler bulunmaktadır. Ön muamele yöntemi seçerken;

- Ucuz maliyetli olması
- Şeker veriminin yüksek olması
- Doğa dostu olması
- İnhibitor gibi yan ürünleri az miktarda oluşturması

gibi özellikler tercih edilmektedir.

2.1.3.1. Fiziksel Yöntemler

Lignoselülozik biyokütlelerin ön muamelesi için kullanılan fiziksel yöntemler, lignin bariyerinin kaldırılıp komplike yapının bozulması ya da kullanılacak hammaddenin boyutunu küçültürken yüzey alanını çoğaltma amacıyla kullanılmaktadır. Bunlardan yaygın olanları,

- Öğütme
- Mikrodalga uygulaması
- Sonifikasyon uygulamasıdır.

2.1.3.2. Kimyasal Yöntemler

Lignoselülozik biyokütlelerin ön muamelesi için kullanılan kimyasal yöntemler, yapısında bulunan selüloz, hemiselüloz ve lignin arasındaki bağları bozarak, enzim hidrolizinde şekerlere ulaşımı kolaylaştırarak fermantasyon verimini artırma amacıyla kullanılmaktadır. Bunlardan yaygın olanları,

- Asit
- Alkali
- Organosolv uygulamalarıdır.

2.1.3.3. Biyolojik Yöntemler

Lignoselülozik biyokütlelerin ön muamelesi için kullanılan biyolojik yöntemler, hidroliz işleminde şekerlere ulaşımı kolaylaştırmak amacıyla herhangi bir fiziksel ya da kimyasal yöntem kullanmadan bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar ve enzimler aracılığıyla fermentasyon verimini arttırma amacıyla kullanılmaktadır.

2.1.3.4. Fizikokimyasal Yöntemler

Lignoselülozik biyokütlelerin ön muamelesi için kullanılan fizikokimyasal yöntemler, kimyasal ve fiziksel yöntemleri bir arada kullanarak, lignin bariyerini kaldırarak şeker verimini arttırma amacı taşımaktadırlar. Bunlardan en yaygını buhar patlatma uygulamasıdır [Mankar et al, 2021; Niphadkar et al., 2018].

Hidroliz kısmında, fermentasyonda mikroorganizmalar tarafından kullanılmak üzere polisakkaritler asit ya da enzim hidroliziyle monosakkaritlere indirgenirler. Asit hidrolizi kullanımında, ön muamele işlemlerine gerek kalmadan lignin uzaklaştırılabilmektedir. Enzim hidrolizine kıyasla oldukça ucuz maliyetlidir. Genellikle bu işlem için hidroklorik asit veya sülfirik asit tercih edilmektedir.

Abidin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [2014], manyok kabukları farklı konantrasyonlardaki (0.1, 0.5 ve 1 M) sülfirik asit ile farklı sürelerde (30 ve 60 dakika) 100°C sıcaklıkta hidroliz edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* aracılığıyla 6 gün fermentasyon gerçekleştirilmiş olup 4. günün sonunda maksimum biyoetanol eldesi (28.24 g/L) ve maksimum şeker eldesi (57.5 g/L) 0.5M asit konantrasyonunda 60 dakika uygulama sonucunda gerçekleşmiştir.

Thangavelu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [2019], mikrodalga ön muamele yöntemi ve asit hidrolizi beraber kullanılmıştır. Bu çalışmada sago palmyesi atıkları, farklı konantrasyonlardaki (0.5, 1, 1.5 M) sülfirik asit ve mikrodalgada farklı güçlerde (550, 700, 900 W) ve farklı sürelerde (1, 2, 3 dakika) hidroliz edilmiştir. Fermentasyon *Saccharomyces cerevisiae* aracılığıyla 30°C sıcaklıkta 200 rpm çalkalama hızında bir çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. 1M asit konantrasyonunda, 900 W gücünde ve 1 dakika süreyle hazırlanan hidrolizatın şeker miktarı 72 g/L olup maksimum biyoetanol eldesi (30.8 g/L) bu hidrolizat kullanılıp hazırlanan besiyerinde 36. saatin sonunda gerçekleşmiştir.

2.1.4. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyoetanol üretiminde hidroliz sonucu açığa çıkan şekerleri kullanıp etanol üretebilme yeteneği olan çeşitli maya ve bakteri türleri kullanılmaktadır. Bunlardan bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Clostridium spp.* ve *Klebsiella oxytoca* gibi farklı bakteri türleri biyoetanol üretiminde çokça kullanılmaktadır. Kullanılan bu mikroorganizmaların endüstriyel kullanımda,

- Teorik veriminin %90'dan fazla olması
- Etanole karşı toleransının 40 g/L'den fazla olması
- Etanol üretim hızının 1 g/L/saatten fazla olması,

gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir [Zabed et al., 2014].

Klebsiella oxytoca bağırsaklarda yaşayan, Gram negatif, hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda büyüeyebilen, hem heksoz hem de pentozları tüketebildiği için çeşitli hammadde kaynaklarından etanol üretebilen bir bakteridir. Etanol verimini arttırmak için P2 ve M5A1 gibi rekombinant suşları oluşturulmuştur [Sutton and Peterson, 2001; Ohta et al., 1991].

Tran ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada [2011], lignoselüloz indirgeyebilen bir mikrofloradan izole edilmiş *Klebsiella oxytoca* THLC0409 suşunun farklı lignoselülozik kaynaklardan (Napier çimi, mısır koçanı, bambu) farklı koşullarda (pH, sıcaklık) etanol üretim verimi incelenmesi amacıyla hammaddeler sülfirik asit ile hidroliz edilip fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Maksimum etanol verimi ve hücre gelişimi 30°C sıcaklıkta pH değeri 7'de elde edilmiştir.

Bir başka çalışmada, Tiwari ve arkadaşları [2022] *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182 suşunun etanol üretimini arttırmak amacıyla pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi parametreleri optimize etmek istemiştir. Bu amaçla, ham madde olarak pirinç kabuğu kullanılmış olup en yüksek biyoetanol eldesi (32.61 g/L) 36°C sıcaklıkta, pH değeri 7'de ve 48 saatlik inkübasyon sonunda görülmüştür.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan taze ananas kabuğu atıkları Dijital Platform Gıda Hizmetleri A.Ş. (Türkiye)’den temin edildi. Hidrolizat hazırlanırken ananas kabuğu atıkları farklı konsantrasyonlardaki HCl (Merck, Almanya) ile karıştırıldı. Elde edilen karışıma maya özütü (AppliChem, İspanya), CaCl₂ (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri), MgSO₄ (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri), (NH₄)₂SO₄ (Merck, Almanya) eklenerek fermantasyon besiyeri hazırlandı. Besiyerinin pH değeri 10 N NaOH (Merck, Almanya) kullanılarak ayarlandı. HPLC analizi kalibrasyonu için glukoz (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri), fruktoz (Merck, Almanya) ve etanol (%96, Alkomed, Bulgaristan) kullanıldı. HPLC analizi için numune hazırlarken 0.22 µm şırınga ucu selüloz filtreler (Göttingen, Almanya) kullanıldı. HPLC analizinde mobil faz olarak asetronitril (Merck, Almanya) kullanıldı ve kolon olarak NH₂ kolon (GL Sciences, Tokyo, Japonya) tercih edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Belirli ölçüde kesilip kullanıma hazır hale getirilen taze ananas kabuğu atıkları KERN hassas terazi (Balingen, Almanya) ile tartıldı. Farklı konsantrasyonlardaki ve farklı hacimlerdeki HCl (Merck, Almanya) ile karıştırılarak bir blender (Arzum, Ironmix, İstanbul, Türkiye), aracılığıyla püre haline getirildi. Besiyerinin pH değeri bir pH metre ile (Hanna Instruments, HI 2211pH/ORP, İngiltere) belirlendi. Besiyerinin homojen karışımı için bir manyetik karıştırıcı (IKA, RH basic 2 model, Almanya) kullanıldı. Çalışma boyunca santrifüj işlemleri için (Gyrozen, 1248R model, Daejeon, Kore ve Eppendorf Centrifuge, 5420 model) santrifüj cihazları kullanıldı. Ön kültürlerin ve fermantasyon besiyerlerinin inkübasyonu bir çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24, Hamburg, Almanya) gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 600 nm’deki toplam hücre yoğunlukları bir spektrometre ile (Shimadzu UV 1800, ABD) ölçüldü. Fermantasyon deneyleri sonucundaki üretilen

etanol ve kalan şeker miktarları (glukoz ve fruktoz) bir HPLC cihazı (Shimadzu, LC-20AD, Autosampler SIL-20AC, RID Dedektör RID-10A, Fırın CTD-10AS, Japonya) ile ölçüldü.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşu

Bu tez çalışmasında, ananas kabuğu atığının optimize edilen hidroliz yöntemiyle birlikte etanol üretim kapasitesini belirlemek amacıyla, Gebze Teknik Üniversitesi Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda izole edilmiş ve tanımlanmış olan yeni bir *Klebsiella oxytoca* suşu kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ananas Kabuğu Atıklarının Çalışmada Kullanılmak Üzere Hazırlanması

Dijital Platform Gıda Hizmetleri A.Ş. (Türkiye)'den temin edilen taze ananas kabuğu atıkları, bir bıçak aracılığıyla yaklaşık 2x2x2 cm boyutundaki küçük parçalara ayrıldı. Elde edilen küçük ananas parçaları sonrasında besiyeri için kullanılmak üzere -20°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

3.2.2. Ön Kültürlerin Hazırlanması

K. oxytoca suşunun ön kültürü için, bakteri suşu %5 (katı/sıvı) glukoz ve 30 mL LB sıvı besiyeri içeren 50 mL erlene inokülasyonu ile hazırlandı. Ön kültür 180 rpm çalkalama hızında 37°C sıcaklıkta büyütüldü.

3.2.3. Ananas Kabuğu Atığı Kullanılarak Hidrolizat ve Besiyerlerinin Hazırlanması

Daha önceden kullanıma hazır hale getirilen farklı miktardaki ananas kabuğu parçaları, 200 mL hacminde ve konsantrasyonlardaki (%0.5-1 (s/s)) HCl ile seyreltilerek bir blender yardımıyla 2 L hacimli beher kapları içinde 2 dakika süre ile parçalanarak püre haline gelene kadar karıştırıldı ve mikrodalga fırın yardımı ile 120W güç seviyesinde 3 dakika süreyle ısıtılarak farklı hidrolizatlar oluşturuldu. İşlemler sonrasında elde edilen homojen karışım, 1 L hacmindeki erlenlere alınıp 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edildi.

3.2.3.1. M3 Besiyerinin Hazırlanması

Daha öncesinde kullanıma hazır hale getirilen 200 g ananas kabuğu atığı, 200 mL HCl çözeltisi (%0.5, s/s) ile bir blender aracılığıyla 2L hacimli beher kabı içerisinde 2 dakika süre ile parçalandıktan ve püre hale getirildikten sonra, mikrodalga fırında 120W güç seviyesinde 3 dakika süreyle ısıtıldı. Bu işlemden sonra, homojen karışım sterilize edilmesi için 1 L hacmindeki erlene alınıp 121°C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize edildi.

60 mL ananas kabuğu hidrolizatı, 8 mL maya özütü, 4 mL CaCl₂, 4 mL MgSO₄, ve 4 mL (NH₄)₂SO₄ mineralleri ilave edilerek M3 besiyeri hazırlandı. Besiyerinin pH değerini 10 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH değeri 7.0 olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında, hazırlanan besiyeri 50 mL hacimli santifüj tüplerine aktarılıp 4100 rpm dönme hızında 15 dakika boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüj edildi. Fermantasyonda kullanmak amacıyla, 80 mL hacimde süpernatant 100 mL hacmindeki 100 mL erlene aktarıldı.

3.2.3.2. M4 Besiyerinin Hazırlanması

Daha öncesinde kullanıma hazır hale getirilen 200 g ananas kabuğu atığı, 200 mL HCl çözeltisi (%1, s/s) ile bir blender aracılığıyla 2L hacimli beher kabı içerisinde 2 dakika süre ile parçalandıktan ve püre hale getirildikten sonra, mikrodalga fırında 120W güç seviyesinde 3 dakika süreyle ısıtıldı. Bu işlemden sonra, homojen karışımın sterilize edilmesi için 1 L hacmindeki erlene alınıp 121°C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Hazırlanan hidrolizat ile M3 besiyerinin hazırlanmasında anlatıldığı gibi besiyeri bileşenleri ilave edilerek M4 besiyeri hazırlandı.

Farklı yöntemlerle hazırlanan fermantasyon besiyerlerine (M3 ve M4) 37°C sıcaklıkta ve 180 rpm çalkama hızında ön kültürü bir gün önceden başlatılan *K. oxytoca* suşunun başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 0.5 olacak şekilde inokülasyonu gerçekleştirildi. Tez çalışmasında, en yüksek biyoetanol eldesinin M4 besiyerinde elde edildiği belirlendiğinden tezin devam eden çalışmalarında bu besiyeri kullanıldı.

3.2.4. Sıcaklığın ve Başlangıç Hücre Yoğunluğunun Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Tezin ön çalışmalarında belirlenen hidroliz yöntemi kullanılarak pH değeri 7.0 olacak şekilde M4 besiyeri hazırlandı. Sıcaklığın ve başlangıç hücre yoğunluğunun biyoetanol üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla, ön kültür hazırlığı için, bir gün önceden iki farklı sıcaklıkta (30°C-37°C) ön kültür %5 (k/s) glukoz içeren katı LB besiyerinden 1-2 bakteri kolonisi alınarak LB sıvı besiyerinde 30°C 180 rpm çalkalama hızında 18 saat süre ile inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda kültürlerin toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) Shimadzu UV 1800 Spektrofotometre (ABD) cihazında ölçüldü.

Hazırlanan besiyerlerine, başlangıç hücre yoğunlukları (OD_{600nm}) 0.5 ve 0.1 olacak şekilde, iki farklı sıcaklık için, 100 mL'lik erlenlerde 80mL hacimde inokülasyonlar yapılarak fermantasyon 30°C ve 37°C sıcaklıklarda ve farklı sürelerde inkübasyonlar gerçekleştirildi (24 ve 48 saat).

3.2.5. İnkübasyon Süresinin Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin biyoetanol üretimindeki etkisi belirlenmesi amacıyla, pH değeri 7.0 olacak şekilde M4 besiyeri hazırlandı. Daha önceden belirlenen sıcaklıkta (30°C), %5 (k/s) glukoz içeren katı LB besiyerinden 1-2 bakteri kolonisi alınarak LB sıvı besiyerinde 180 rpm çalkalama hızında 18 saat süre ile inkübasyon yapılarak ön kültür hazırlandı.

Hazırlanan besiyerlerine, ön kültürlerden alınan bakteri suşunun başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 0.1 olacak şekilde 100 mL erlende 80 mL besiyerine inokülasyonu yapıldı. Fermantasyonlar 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72) gerçekleştirildi.

3.2.6. Besiyerinin pH Değerinin Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Besiyerinin pH değerinin biyoetanol üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla bir gün önceden %5 (k/s) glukoz içeren katı LB besiyerinden 1-2 bakteri kolonisi alınarak LB sıvı besiyerinde 180 rpm çalkalama hızında 30°C sıcaklıkta 18 saat süre ile inkübasyon yapılarak ön kültür hazırlandı.

M4 besiyerlerinin pH değerleri (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) ayarlandı. Başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 0.1 olacak şekilde pH değerleri ayarlanmış besiyerlerine inokülasyonlar yapıldı. Fermantasyonlar 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saat) gerçekleştirildi

3.2.7. *Klebsiella oxytoca* Suşunun Adaptif Laboratuvar Evrimi Deneyinin Biyoetanol Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Adaptif laboratuvar evrimi gerçekleştirmek amacıyla, %5 (k/s) glukoz içeren katı LB besiyerinden 1-2 bakteri kolonisi alınarak LB sıvı besiyerinde 180 rpm çalkalama hızında 30°C sıcaklıkta 18 saat süre ile inkübasyon yapılarak ön kültür hazırlandı. Sonrasında, %5 (k/s) glukoz içeren besiyerine başlangıç hücre yoğunluğu 0.1 (OD_{600nm}) olacak şekilde 30°C sıcaklıkta 24 saat süreli ilk 15 gün boyunca 30 seri transfer gerçekleştirildi. Devamında %6.5 (k/s) glukoz içeren besiyerine aynı koşullarda 30 gün boyunca 60 seri transfer gerçekleştirildi. Biyoetanol üretimine adaptif evrimin etkisinin belirlenmesi amacıyla, adaptasyon laboratuvar deneyi yapılan *K. oxytoca* suşu (KO-A) ile yapılmayan izolatin (KO), pH değeri 8.0 olacak şekilde hazırlanan M4 besiyerine başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 0.1 olacak şekilde 100 mL erlenlerde 80 mL olacak şekilde inokülasyonları yapıldı. Fermantasyonlar 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde gerçekleştirildi (24 ve 48 saatlerde).

3.2.8. Büyük Ölçekte Biyoetanol Üretimi

Büyük ölçekte biyoetanol üretimi gerçekleştirmek amacıyla, bir gün önceden *K. oxytoca* suşları (KO ve KO-A) için 30°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında ön kültürler başlatıldı. pH değeri 8.0 olan 1L hacmindeki erlen içindeki 800mL M4 besiyerine başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 0.1 olacak şekilde KO ve KO-A suşlarının inokülasyonları yapıldı. Fermantasyonlar 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saat) gerçekleştirildi.

3.2.9. Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi

Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla, farklı saatlerde inkübe edilen kültürlerin yoğunlukları UV spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Kültürler, optik

yoğunluk (OD_{600nm}) değeri 0.6 değerini geçmeyecek şekilde, steril özgün besiyeri ile seyreltildi. Kontrol olarak, inkübasyon öncesinde hazırlanan özgün besiyeri kullanıldı.

3.2.10. Etanol ve Şeker Miktarlarının Belirlenmesi

Fermantasyon sonucundaki etanol miktarı ve şeker miktarları HPLC analizi ile belirlendi. Etanol miktarı belirlenirken farklı konsantrasyonlarda (%0.5, %1, %2, %4, %5 (s/s)) etanol standardı besiyerindeki şeker miktarı belirlenirken farklı konsantrasyonlarda (%0.5, %1, %2, %4, %5 (s/s)) glukoz ve fruktoz standardı hazırlandı ve farklı saatlerde (24 ve 48 saat) inkübasyon sonrası alınan hücreler, 10000 rpm çalkalama hızında ve 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Sonrasında, üst sıvı 0.22 µm por çaplı selüloz filtreden (Göttingen, Almanya) geçirildi. Etanol ve şeker miktar tayinleri (glukoz ve fruktoz) için Inertsil NH₂ kolon (5 µm, 4.6x250 mm, GL Sciences Inc.) kullanıldı. Etanol miktar tayini, mobil faz olarak asetonitril:ultra saf su (60:40) kullanılmasıyla 25°C sıcaklıkta, 1 ml/dakika akış hızında 20 µL injeksiyon hacmiyle gerçekleştirildi. Şeker miktar tayini ise, mobil faz olarak asetonitril:ultra saf su (75:25) kullanılmasıyla 40°C sıcaklıkta, 1.00 ml/dakika akış hızında 20µL injeksiyon hacmiyle gerçekleştirildi.

3.2.11. Verim Hesaplamaları

Fermantasyon sonunda üretilen etanol miktarını g/L cinsine çevirmek için, % v/v olarak belirlenen etanol değerleri 7,8924 ile çarpılarak hesaplama yapıldı.

Substrat tüketimini belirlemede ilk adım, ne kadar şekerin tüketildiğini saptamaktır. Bu, başlangıçtaki şeker miktarından (glukoz ve fruktoz) fermantasyon sonrası kalan şekerin çıkarılmasıyla belirlendi. Ardından, başlangıç şeker miktarına göre tüketilen şeker oranı hesaplanarak, substratın yüzde kaçının tüketildiği tespit edildi.

Litre başına üretilen etanol miktarının litrede tüketilen substrat miktarına oranlanmasının ardından, bu oran 100 ile çarpılarak alkol verimi yüzdesi elde edildi.

$$Etanol\ Miktarı\ (g/L) = Etanol\ Miktarı\ (\%s/s) * 7,8945 \quad (3.1)$$

$$Substrat\ Tüketimi\ (\%) = \frac{Tüketilen\ Şeker\ Miktarı\ (g/L)}{Toplam\ Şeker\ Miktarı\ (g/L)} * 100 \quad (3.2)$$

$$Alkol Verimi (\%) = \frac{Etanol Miktarı (g/L)}{Tüketilen Şeker Miktarı (g/L)} * 100 \quad (3.3)$$

3.2.12. İstatiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde P değerleri, Excel 2016 (Microsoft Office) programı kullanılarak hesaplandı. P değerleri, biyoetanol üretim etkinliğinin farklı parametreler altında (hidroliz yöntemi, inkübasyon süresi, başlangıç hücre yoğunluğu, sıcaklık ve pH gibi) *K. oxytoca* suşunun adaptif laboratuvar evrimi deneyleri yoluyla artırılabilceği hipotezine dayalı olarak tek yönlü t-testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hidroliz Yönteminin Biyoetanol Üretimine Etkisi

Etkin bir hidroliz yönteminin belirlenmesi için farklı miktardaki ananas kabuğu atıkları ve farklı konsantrasyondaki asit miktarlarıyla karıştırılarak 2 farklı yöntemle hidrolizler gerçekleştirilerek hidrolizatlı besiyerlerinin şeker miktarları belirlendi (Tablo 4.1). Ön kültür olarak 37°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızında başlatılan kültür, farklı yöntemlerle hazırlanan hidrolizatları içeren besiyerlerine (M3 ve M4 besiyerleri, pH 7.0) başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 0.5 olacak şekilde ekildi. Fermantasyonlar 37°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında 48 saat süresince yapıldı ve hücre yoğunlukları (OD_{600nm}) ile üretilen etanol miktarları(%s/s) belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Ananas kabuğu atıklarının farklı konsantrasyonlardaki asit hidrolizi ile hazırlanan besiyerlerinin (M3-M4) içerdiği şeker miktarları (%).

Besiyeri	Şeker İçerikleri(%k/s)	
	Fruktoz	Glukoz
M3	1,08(0.00)	2,22(0.00)
M4	1,13(0.06)	2,29(0.06)

4.1.1. M3 Besiyerinde Biyoetanol Üretimi

Daha önceden hazırlanan 200 g ananas kabuğu atığı 200 mL HCl çözeltisi (%0.5, s/s) ile karıştırılıp hidrolizat elde edildikten sonra maya özütü ve mineral takviyesi eklenen besiyerine ekilen *K. oxytoca* suşunun 24. ve 48. saatlik fermentasyonlar sonunda toplam hücre yoğunluğunun (OD_{600nm}) sırasıyla 1.49 ve 2.34 olduğu saptandı. Üretilen biyoetanol miktarlarının ise, 24. ve 48. saatler sırasıyla %1.55 (12.2 g/L) ve %2.24 (17.6 g/L) olduğu görüldü (Tablo 4.2.) (Şekil 4.1).

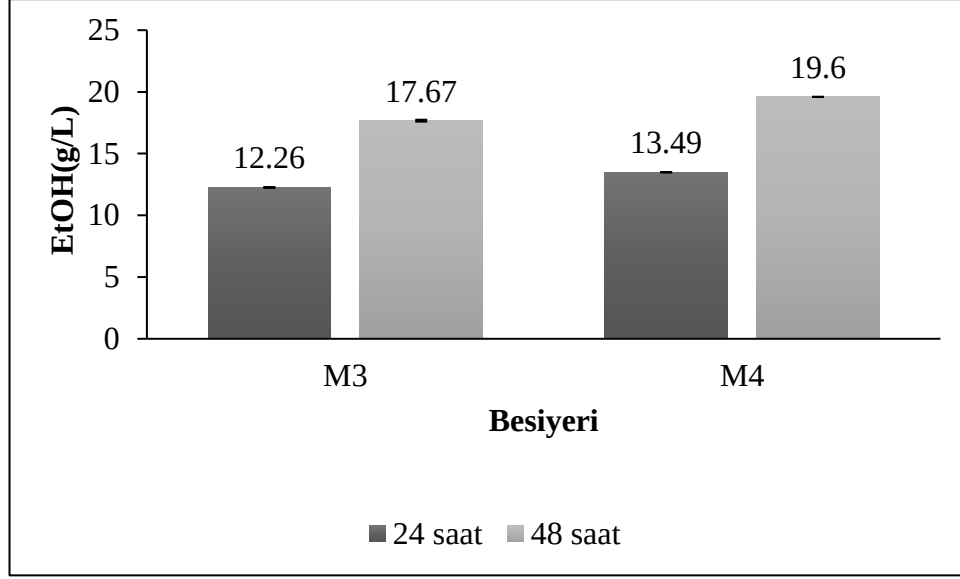
4.1.2. M4 Besiyerinde Biyoetanol Üretimi

Hazırlanan 200 g ananas kabuğu atığı 200 mL HCl çözeltisi (%1.0, s/s) ile karıştırılıp hidrolizat elde edildikten sonra maya özütü ve mineral takviyesi eklenen besiyerine ekilen *K. oxytoca* suşunun 24. ve 48. saatlik fermentasyonlar sonunda toplam hücre yoğunluğunun (OD_{600nm}) sırasıyla 1.53 ve 2.37 olduğu saptandı. 24. ve 48. saatlerdeki *K. oxytoca* suşunun ürettiği biyoetanol miktarlarının ise, sırasıyla %1.58 (12.5 g/L) ve %2.36 (18.6 g/L) olduğu görüldü (Tablo 4.2.) (Şekil 4.1).

Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek biyoetanol eldesinin (%2.36) M4 besiyerinde elde edildiği görüldü ve tezin devam eden çalışmalarında bu besiyeri kullanıldı.

Tablo 4.2: *K. oxytoca* suşunun farklı besiyerlerinde (M3, M4) 37°C sıcaklıkta, 0.5 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonu sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}) ve üretilen etanol miktarları (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Hidrolizat	Ferm. Süresi(sa)	OD(600nm)	EtOH(%k/s)
M3	24	1.49(0.04)	1.55(0.02)
	48	2.34(0.01)	2.24(0.02)
M4	24	1.53(0.08)	1.58(0.12)
	48	2.37(0.07)	2.36(0.10)



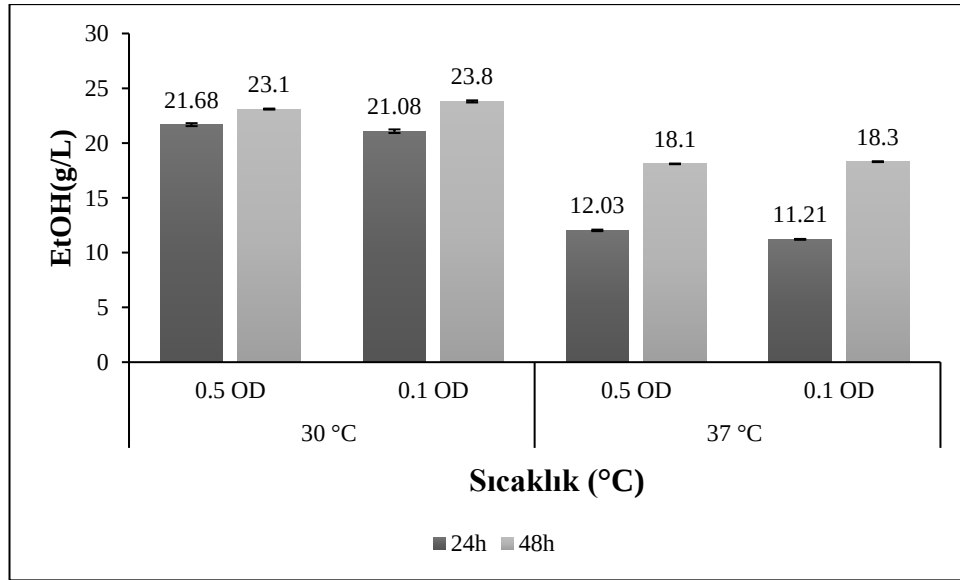
Şekil 4.1: *K. oxytoca* suşunun farklı besiyerlerinde (M3, M4) 37°C sıcaklıkta, 0.5 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarları (g/L). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.2. Fermentasyon Ortam Sıcaklığının ve Başlangıç Hücre Yoğunluğunun Biyoetanol Üretimine Etkisi

Biyoetanol eldesinin artırılması ve fermentasyon ortamının sıcaklığının optimizasyonu için, M4 besiyeriyle, fermentasyon ortamının sıcaklığının iki koşulunda (30 °C ve 37 °C) *K. oxytoca* suşu ile fermentasyonlar gerçekleştirildi. Bunun yanında, *K. oxytoca* suşu için iki farklı başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) belirlendi (0.1 ve 0.5). Ön kültür için farklı sıcaklıkta pasajlanan suşlar %5 (k/s) glukoz içeren LB sıvı besiyerinde 180 rpm çalkalama hızında, farklı sıcaklıklarda (30 °C ve 37 °C) bir gece boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Ön kültürlerden alınan hücreler, M4 besiyerinde inkübasyonu yapıldı ve 24 ve 48. saatlerdeki toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve kalan şeker (%) miktarları belirlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD_{600nm} , 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K. Şeker, %) miktarları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Süre (Saat)	Sıcaklık (°C)	Başlangıç OD_{600nm}	Fermentasyon sonrası OD_{600nm}	EtOH (%)	K. Şeker (%)
24	30	0.5	3.50(0.22)	2.67(0.16)	0.69(0.03)
		0.1	3.33(0.27)	2.74(0.20)	0.71(0.13)
	37	0.5	1.53(0.08)	1.58(0.12)	1.65(0.21)
		0.1	1.37(0.04)	1.29(0.05)	1.80(0.07)
48	30	0.5	4.28(0.30)	2.93(0.05)	0.23(0.02)
		0.1	4.45(0.28)	3.02(0.12)	0.22(0.03)
	37	0.5	2.37(0.07)	2.36(0.10)	0.78(0.06)
		0.1	2.60(0.03)	2.39(0.03)	0.78(0.03)

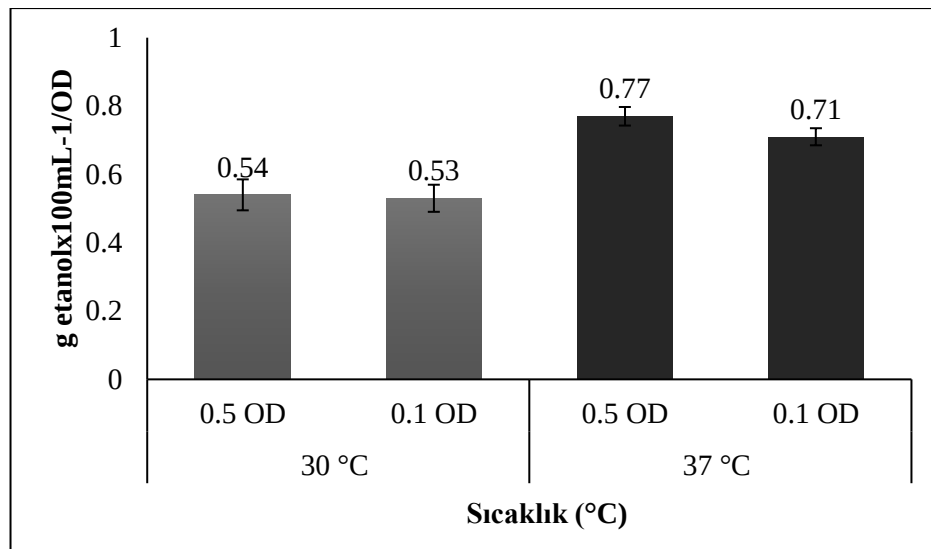


Şekil 4.2: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD_{600nm} , 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C, 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarları (g/L). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

M4 besiyerinde, düşük havalandırılmalı koşullarda, 48 saatlik inkübasyon sonunda, 30°C sıcaklıkta, *K. oxytoca* suşunun daha yüksek seviyede üreme gösterdiği görüldü. En yüksek hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 30 °C sıcaklıkta 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile gerçekleştirilen deney sonucunda elde edildi. Başlangıç OD_{600nm} 0.5

olan hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile 30°C ve 37°C sıcaklıklarında *K. oxytoca* suşunun 48 saatlik inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarlarının sırasıyla %2.93 (23.10 g/L) ve %2,36 (18.65 g/L) olduğu saptandı (Tablo 4.3) (Şekil 4.2). 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilen fermentasyon sonunda üretilen etanol miktarının 37°C sıcaklığındakine göre %23 daha fazla ($p<0.05$) olduğu görüldü. *K. oxytoca* suşunun 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) 30°C ve 37°C sıcaklıklarında ürettiği etanol miktarlarının ise sırasıyla %3.02 (23.84 g/L) ve %2.39 (18.90 g/L) olduğu saptandı (Tablo 4.3) (Şekil 4.2). 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), üretilen etanol miktarının 30°C sıcaklıkta 37°C'e göre %26 daha fazla ($p<0.05$) olduğu görüldü. 30 °C sıcaklıkta 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile 0.5 başlangıç hücre yoğunluğuna (OD_{600nm}) göre %1.27 daha fazla ($p<0.05$) etanol eldesi görüldü. Fermentasyonlar sonucunda elde edilen verilere göre, küçük ölçekte farklı sıcaklıklarda ve farklı başlangıç hücre yoğunluğunda gerçekleştirilen fermentasyon işlemi sonunda en fazla etanol eldesi 30 °C sıcaklıkta ve 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile olduğu ve bu değerin %3.02 (23.84 g/L)'a ulaştığı saptandı (Tablo 4.3) (Şekil 4.2).

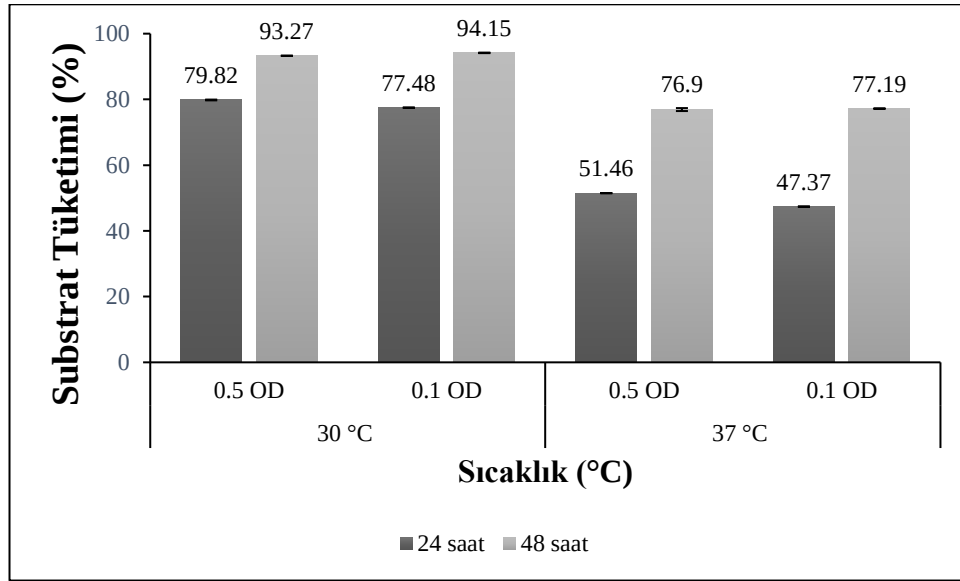
48 saatlik inkübasyon sonunda, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının ($g\ etanol \times 100mL^{-1}/OD$) en yüksek 37°C sıcaklıkta ve 0.5 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile olduğu ve bu değerin 0,77 olduğu görüldü (Şekil 4.3).



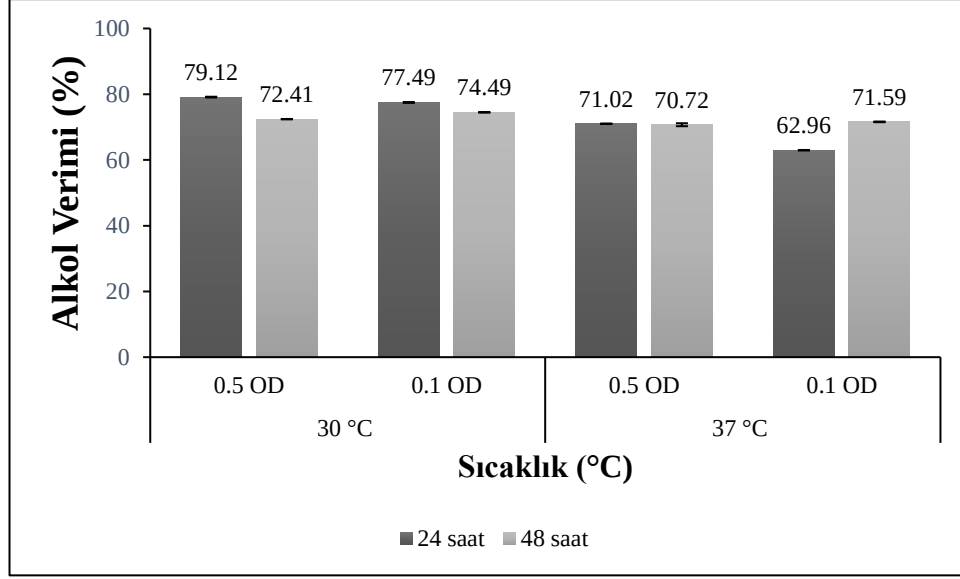
Şekil 4.3: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD_{600nm} , 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında 48 saatlik inkübasyonları sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($g\ etanol \times 100mL^{-1}/OD$).

48 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek substrat tüketiminin 30°C sıcaklıkta ve 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile olduğu ve bu değer %94.15 oranında olduğu görüldü (Şekil 4.4). Alkol veriminin ise yine 48 saatlik inkübasyon sonunda 30°C sıcaklıkta ve 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile olduğu ve bu değer %74.49 oranında olduğu görüldü (Şekil 4.5).

Elde edilen veriler doğrultusunda, tezin ilerleyen çalışmalarına 30°C sıcaklıkta ve 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) devam edildi.



Şekil 4.4: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD_{600nm}, 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C, ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen substrat tüketim değerleri (%).



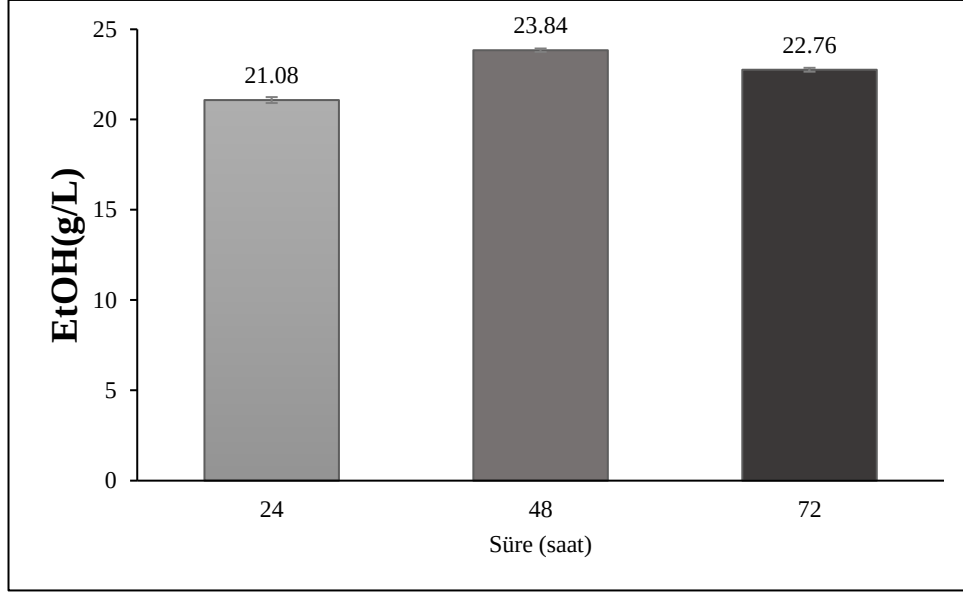
Şekil 4.5: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde farklı başlangıç hücre yoğunluklarında (OD_{600nm}, 0.1 ve 0.5) ve farklı sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24 ve 48 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen alkol verim değerleri (%).

4.3. İnkübasyon Süresinin Biyoetanol Üretimine Etkisi

Substratın en verimli şekilde kullanılması ve etkin biyoetanol eldesi için *K. oxytoca* suşu, %5 (k/s) glukoz içeren LB sıvı besiyerine ekilerek bir gece boyunca 180 rpm çalkalama hızında 30°C sıcaklıkta inkübe edilerek ön kültür hazırlandı. M4 besiyerinde, 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile 30°C sıcaklıkta, 24, 48 ve 72. saatlerde inkübasyonlar sonunda toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve kalan şeker miktarları(%) ve belirlendi (Tablo 4.4).

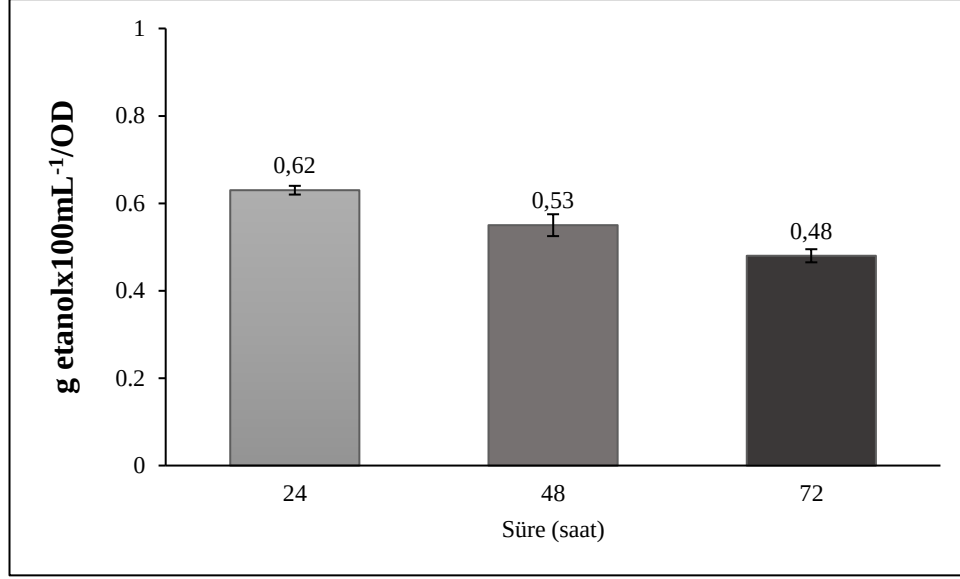
Tablo 4.4: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde (Toplam şeker : %3.42) 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saatler) inkübasyonları sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları.

Süre	OD (600nm)	EtOH (%)	K. Şeker (%)
24. saat	3.33(0.27)	2.67(0.20)	0.71(0.13)
48. saat	4.45(0.28)	3.02(0.12)	0.22(0.03)
72. saat	4.73(0.12)	2.88(0.13)	0.00(0.00)

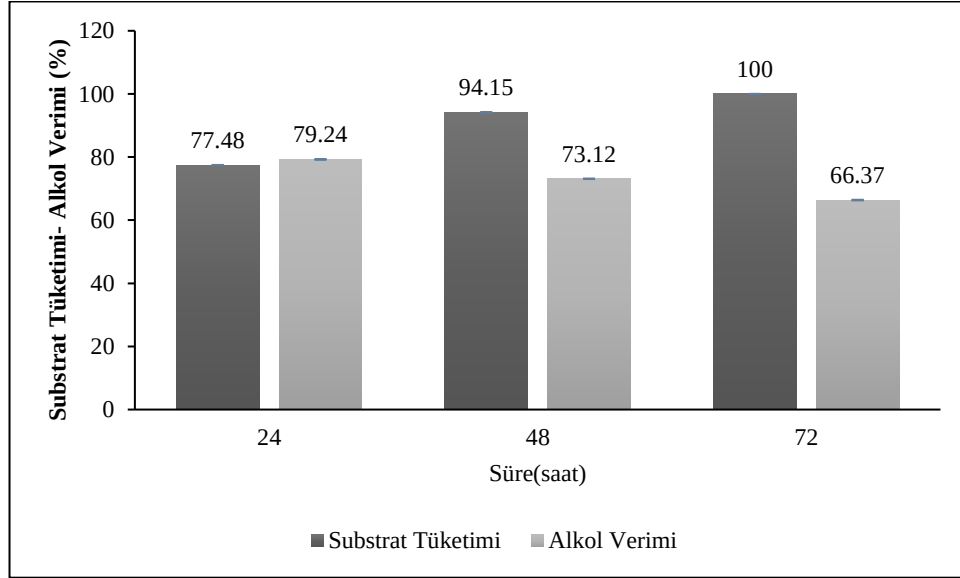


Şekil 4.6: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saatler) inkübasyonu sonucunda üretilen etanol miktarları (g/L). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Maksimum etanol eldesi 48. saatte %3.02 (23.84 g/L) olarak saptandı (Tablo 4.4) (Şekil 4.6). İnkübasyonun 24. saatinde etanol üretiminin %2.67 (21.08 g/L) olduğu ve şekerin bir kısmının tükendiği gözlemlendi. 48. saatten sonra ortamda biyoetanol üretiminin gerçekleşmediği, 72. saatte substrat tüketiminin %100 olduğu ve 48. saatten itibaren az miktarda üremenin olduğu görüldü (Tablo 4.4) (Şekil 4.8). 72 saatlik inkübasyon süresi boyunca, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının en yüksek 24. saatte olduğu ve ilerleyen saatlerde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: M4 besiyerinde *K. oxytoca* suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72. saatler) inkübasyonları sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanolx100mL⁻¹/OD). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.8: M4 besiyerinde *K. oxytoca* suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı sürelerde (24, 48 ve 72. saatler) inkübasyonları sonrası elde edilen substrat tüketim ve alkol verim değerleri (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.4. Fermantasyon Ortamının pH Değerlerinin Biyoetanol Üretimine Etkisi

K. oxytoca suşu tarafından belirlenen en etkin etanol üretiminin olduğu 0.1 başlangıç hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) ile 30°C sıcaklıkta M4 besiyerinde farklı pH değerlerinde 48 saatlik fermentasyonlar (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) yapıldı ve 24. ve 48. saatlerde toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker miktarları (%) belirlendi. (Tablo 4.5) (Tablo 4.6).

Tablo 4.5: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 24 saatlik inkübasyonlar sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

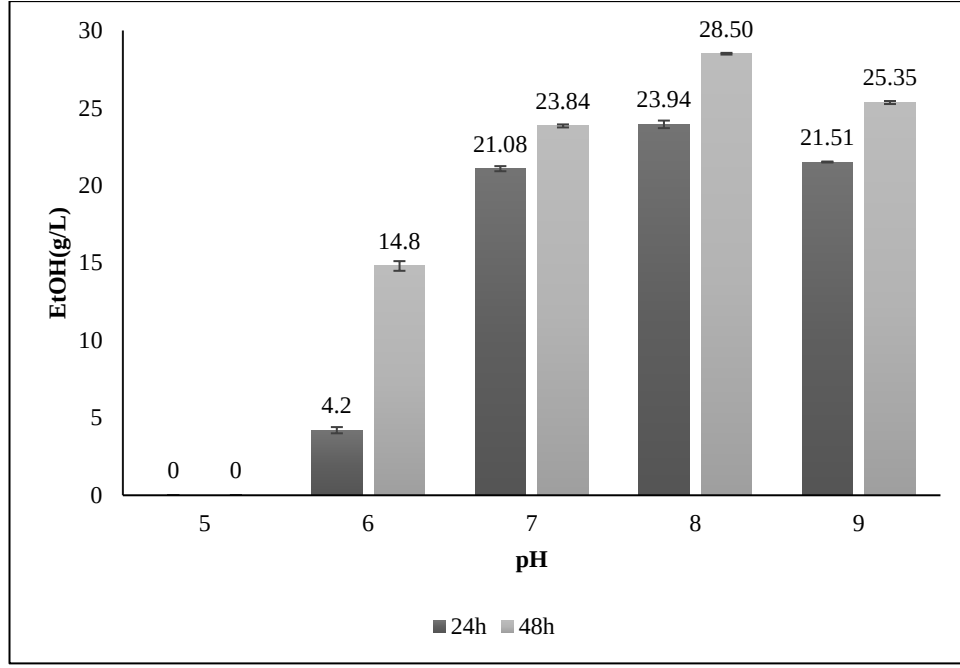
pH	OD (600nm)	EtOH (%)	K. Şeker (%)
5	0.46 (0.05)	0.00(0.00)	2.90(0.02)
6	1.18(0.13)	0.54(0.25)	2.17(0.21)
7	3.33(0.27)	2.67(0.20)	0.71(0.13)
8	4.59(0.18)	3.03(0.31)	0.58(0.05)
9	4.85(0.40)	2.72(0.04)	0.61(0.03)

Fermentasyon sonunda pH 5.0 değerinde etanol üretimi gözlemlenmedi ve diğer pH değerlerine kıyasla toplam hücre yoğunluğunun çok az olduğu tespit edildi. Etanol miktarının pH değeri artması ile genel olarak olarak arttığı gözlemlendi. En yüksek etanol üretiminin 24 saat sonunda besiyeri pH değerinin 8.0 olduğu durumda elde edildiği (% 3.03) saptandı (Tablo 4.5).

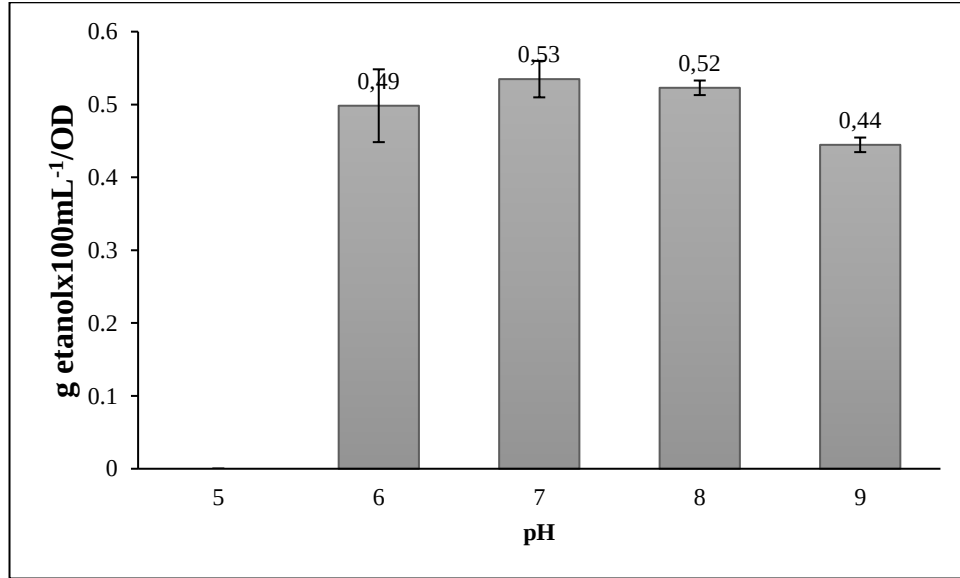
Tablo 4.6: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 48 saatlik inkübasyonlar sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve kalan şeker (K.Şeker,%) miktarları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

pH	OD (600nm)	EtOH (%)	K. Şeker (%)
5	0.77(0.17)	0.00 (0.00)	2.55(0.07)
6	2.97(0.08)	1.88 (0.25)	0.83(0.01)
7	4.45(0.28)	3,02(0.12)	0.22(0.03)
8	5.45(0.22)	3.61(0.06)	0.00(0.00)
9	5.69(0.30)	3,21(0.12)	0.00(0.00)

Fermentasyon sonunda pH 5.0 değerinde 48 saat sonunda da etanol üretimi gözlemlenmedi ve diğer pH değerlerine kıyasla toplam hücre yoğunluğunun düşük olduğu tespit edildi. pH değeri arttıkça artan bir etanol miktarı görülürken 48. saat sonunda maksimum etanol eldesi pH 8.0 değerinde % 3.61 (28.5 g/L) olarak saptandı (Tablo 4.6, Şekil 4.9).



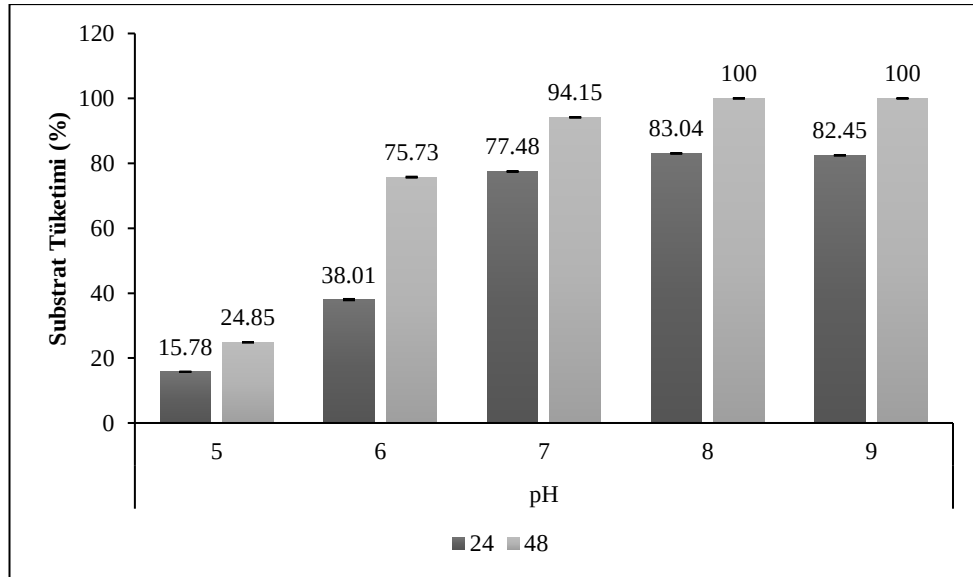
Şekil 4.9: *K. oxytoca* suşunun M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 48 saatlik inkübasyonları sonunda üretilen etanol miktarları (g/L). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



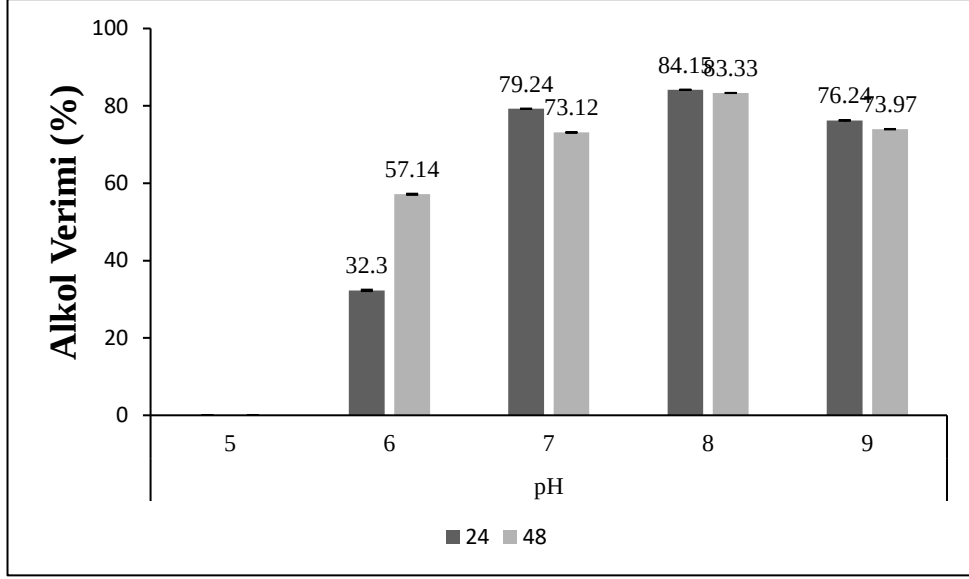
Şekil 4.10: M4 besiyerinde *K. oxytoca* suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 48 saatlik inkübasyonları sonrası birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 mL⁻¹ / OD). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Fermentasyon işlemi sonucunda, birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarı (g etanolx100mL⁻¹/OD) en düşük olarak pH değerinin 5.0 olduğu ve en fazla olarak da pH değerinin 7.0 olduğu ortamda görüldü. Etanol miktarının daha yüksek olduğu pH 8.0 değerindeki ortamda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının pH 7.0 değerinde elde edilene göre daha az olduğu saptandı (Şekil 4.10). Ayrıca en yüksek substrat tüketiminin pH 8.0 değerindeki M4 besiyeri ile olduğu belirlendi (Şekil 4.11). 48 saatlik inkübasyon sonucunda en yüksek alkol verimi pH 8.0 değerinde %83 oranında olduğu belirlendi (Şekil 4.12).

Elde edilen veriler sonucunda, tezin devam eden çalışmalarında fermentasyon besiyerinin pH değeri 8.0'a ayarlandı.



Şekil 4.11: M4 besiyerinde *K. oxytoca* suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen substrat tüketim değerleri (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.12: M4 besiyerinde *K. oxytoca* suşunun 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonunda elde edilen alkol verim değerleri (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

4.5. Küçük Ölçekte Adaptif Laboratuvar Evrimi Gerçekleştirilen *K.oxytoca* Suşunun (KO-A) Biyoetanol Üretimi

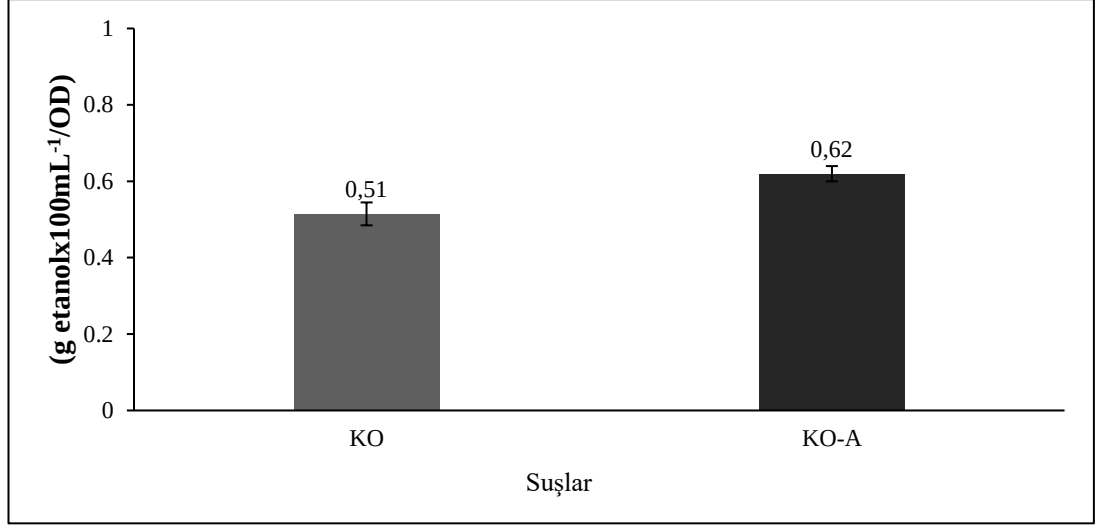
K.oxytoca suşu ile başlangıçta %5 (k/s) glukoz içeren LB sıvı besiyerinde hazırlanan bir gecelik ön kültürden alınarak 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) %5 (k/s) glukoz içeren LB sıvı besiyerinde 50 rpm çalkalama hızında 30°C sıcaklıkta 18 saatlik inkübasyonlar ile sürekli olarak taze besiyerine aynı kültürün aktarılmasıyla seri fermentasyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra, 15. seri fermentasyon sonunda, adaptif laboratuvar evrimi deneyi gerçekleştirilmiş suş (KO-A) ile *K. oxytoca* suşu, M4 besiyerinin pH değeri 8.0'a ayarlanarak 30°C sıcaklıkta 50 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. Ancak iki suş arasında etanol üretimi, şeker tüketimi ve OD_{600nm} değerlerinde istatistiksel açıdan ($p>0.05$) bir fark olmadığı belirlendi. Bu nedenle, %6.5 (k/s) glukoz içeren LB sıvı besiyerinde seri transferlere devam edilip 30 günlük periyot sonrasında 90 seri aktarım sonucunda M4 besiyerinde 30°C sıcaklıkta 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}) pH 8.0 değerinde deney başlatılarak yapılan fermentasyon denemelerinde 48. saatte *K. oxytoca*'nın ürettiği etanol değerlerinin %3.61 (28.80) g/L, KO-A için ise %3.63 (29.10) g/L olduğu saptandı ($p>0.05$).

Suşların 48 saatlik inkübasyonu sonucunda KO için toplam hücre yoğunluğu değeri (OD_{600nm}) 5.45 olarak, KO-A için 4.57 olarak saptandı ve KO suşu için bu değerin %19 daha fazla ($p<0.05$) olduğu görüldü (Tablo 4.7).

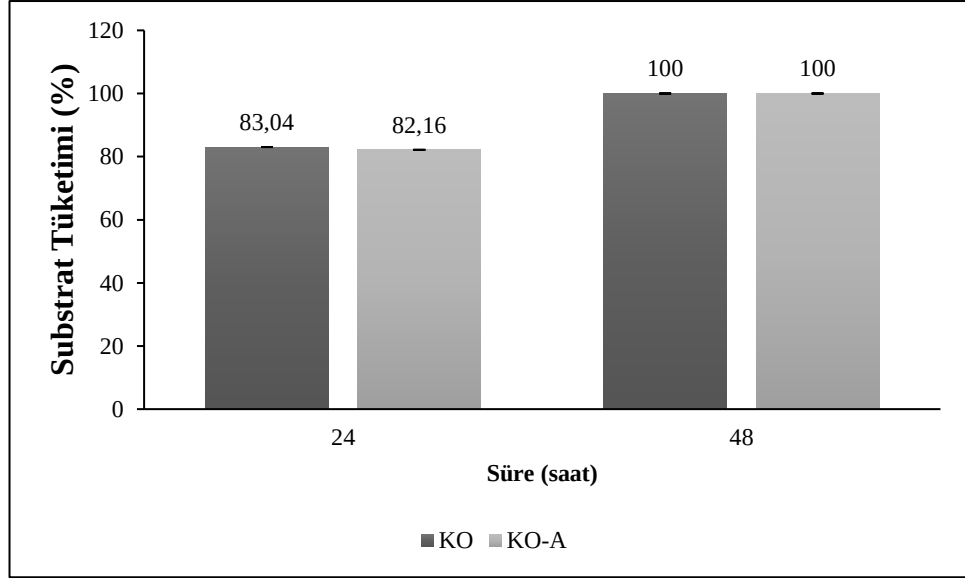
Tablo 4.7: *K. oxytoca* suşları (KO ve KO-A) ile M4 besiyerinde, 0.1 başlangıç hücre yoğunluğuunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 48 saatlik 90 seri inkübasyon sonunda elde edilen toplam hücre yoğunluğu değerleri (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K.şeker, %) miktarları. Her değeri en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değeri her ortalama değeri için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Süre (Saat)	Suşlar	OD (600nm)	EtOH (%)	K. şeker (%)
24	KO	4.59(0.18)	2.93(0.43)	0.58(0.05)
	KO-A	3.75(0.09)	2.85(0.40)	0.61(0.01)
48	KO	5.45(0.22)	3.61(0.06)	0.00(0.00)
	KO-A	4.57(0.07)	3.63(0.07)	0.00(0.00)

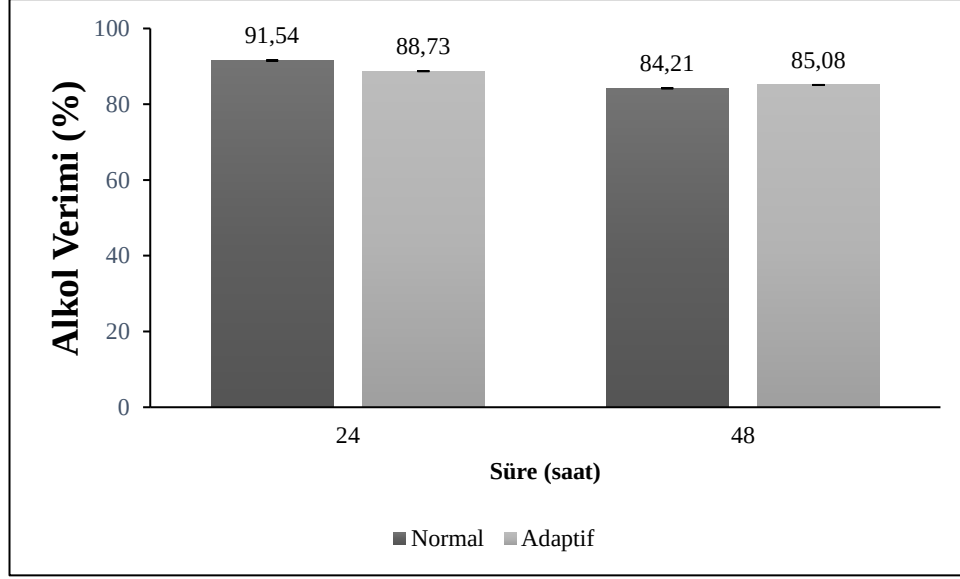
48. saatin sonunda etanol değeriilerine bakıldığında *K. oxytoca* suşları arasında önemli ($p>0.05$) bir fark görülmeydi. Ancak birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının adaptif suş ile normal suşa kıyasla %21 fazla ($p<0.05$) olduğu belirlendi (şekil 4.13). 48 saatlik inkübasyon sonucunda, KO suşu için substrat tüketim-alkol verim değeriileri sırasıyla %100 ve %84 olarak, KO-A suşu için sırasıyla %100 ve %85 olarak belirlendi ($p>0.05$) (şekil 4.14) (şekil 4.15).



Şekil 4.13: *K. oxytoca* suşları (normal ve adaptif) ile M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 48 saatlik inkübasyonları sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları (g etanol x 100 mL⁻¹ / OD). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.14: *K. oxytoca* suşları (KO ve KO-A) ile M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda substrat tüketim değerleri (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.15: *K. oxytoca* suşları (KO ve KO-A) ile M4 besiyerinde 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda alkol verim değerleri (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

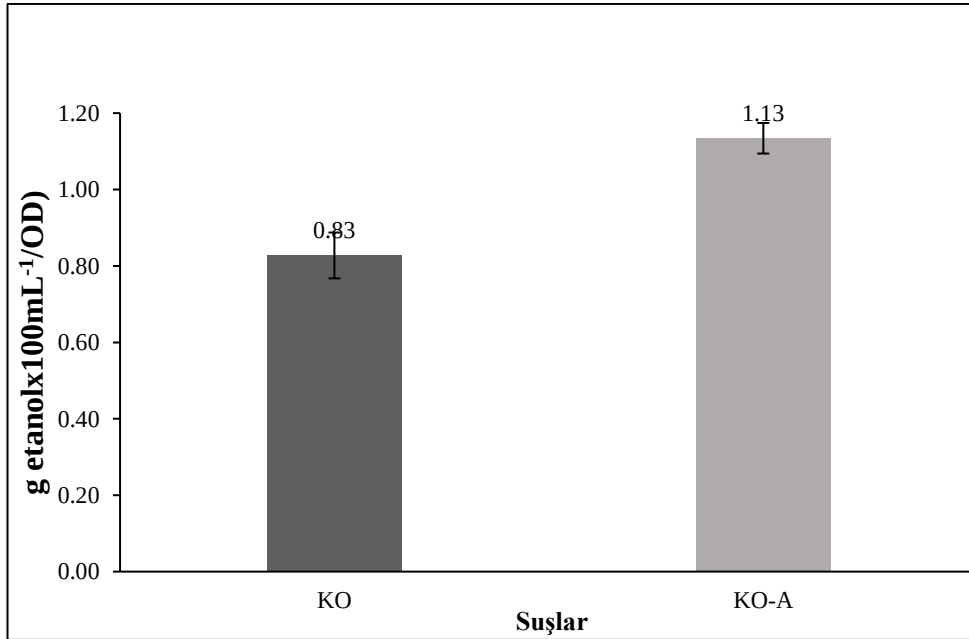
4.6. Büyük Ölçekte Biyoetanol Üretimi

KO ve KO-A suşları için M4 besiyerinde (pH 8.0) 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta ve 50 rpm çalkalama hızında 1 L hacmindeki erlenlerde fermentasyonlar gerçekleştirildi. Suşların, 24. ve 48. saatlerde toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}) ve etanol üretimleri (g/L, %) belirlendi. 48. saat sonunda KO suşu için etanol değeri %4.20 (33.10 g/L), KO-A suşu için ise bu değer %4.28 (33.80) g/L olarak saptandı ($p>0.05$, Tablo 4.8). Suşların 48 saatlik inkübasyonu sonucunda KO suşu için toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) 4.00 olarak, KO-A suşu için toplam hücre yoğunluğu (OD_{600nm}) %34 daha az ($p>0.05$) ve 2.98 olarak saptandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 24 ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda elde edilen toplam hücre yoğunlukları (OD_{600nm}), üretilen etanol (%) ve besiyerinde kalan şeker (K.Şeker, %) miktarları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır. Parantez içindeki değerler her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

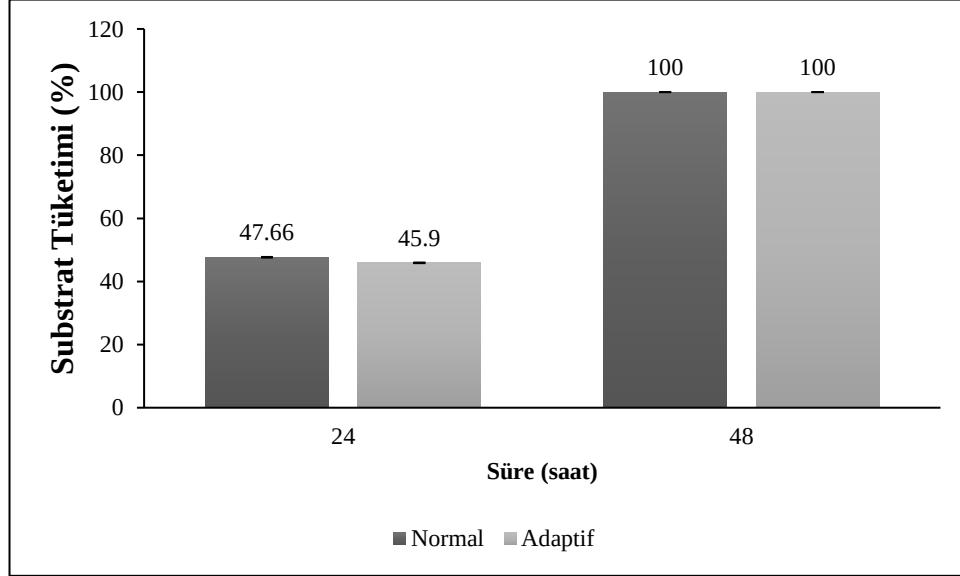
Süre (Saat)	Suşlar	OD (600nm)	EtOH (% s/s)	K. Şeker (%k/s)
24	KO	2.58(0.15)	1.66(0.06)	1.79(0.01)
	KO-A	1.64(0.05)	1.78(0.14)	1.85(0.01)
48	KO	4.00(0.06)	4.20(0.08)	0.00(0.00)
	KO-A	2.98(0.17)	4.28(0.04)	0.00(0.00)

48. saatin sonunda etanol değerlerine bakıldığında önemli bir fark görülmedi fakat birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarının KO-A suşu ile KO suşuna kıyasla %36 daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.16).

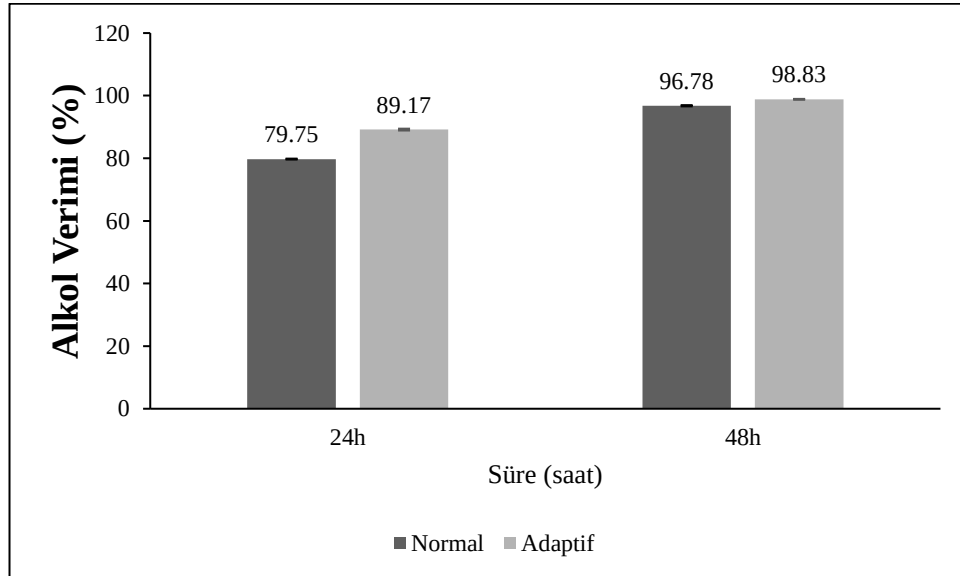


Şekil 4.16: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 48 saatlik inkübasyonları sonunda birim hücre biyokütlesi başına üretilen etanol miktarları ($g\ etanol \times 100 mL^{-1} / OD$). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

Fermentasyon deneyi sonucunda, KO suşu için substrat tüketim-alkol verim değerleri sırasıyla %100 ve %96.78 olarak, KO-A suşu için sırasıyla %100 ve %98.83 olarak belirlendi (Şekil 4.17) (Şekil 4.18).



Şekil 4.17: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda substrat tüketim değerleri (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.



Şekil 4.18: M4 besiyerinde (pH 8.0), 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD_{600nm}), 30°C sıcaklıkta, 50 rpm çalkalama hızında, iki suşun (KO ve KO-A) büyük ölçekte 24. ve 48. saatlik inkübasyonları sonunda alkol verim değerleri (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları her ortalama değer için hesaplanan standart sapmaları göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Fosil yakıtların tüketimi, dünyadaki insan popülasyonunun giderek çoğalmasıyla beraber artmakta olup gelecekte enerji talebini karşılamakta zorluk çekmekle beraber, tüketildiğinde çevreye saldıgı zararlı gazlar yüzünden insan sağlığını da tehlikeye sokmaktadır. İnsanoğlu yaşamın sürdürülebilirliği ve yaşam kalitesi açısından alternatif bir yakıt ihtiyacı duymaktadır. Bu bağlamda, biyoetanol doğa dostu ve sürdürülebilir bir yakıt olması bakımından fosil yakıtlara büyük bir alternatif yakıt olabilme potansiyeli taşımaktadır.

Biyoetanol mikroorganizmaların yardımıyla farklı hammadde kaynakları kullanılarak üretilmektedir. Bu hammadde kaynaklarından mısır, buğday gibi birinci nesil yakıtlar çokça kullanılmakta olup gıda sektörü ile enerji sektörü arasında bir rekabete yol açar. Bunun önüne geçmek için ikinci nesil kaynaklar olarak adlandırılan tarımsal ve gıda atıkları kullanılmaktadır. Literatüre bakıldığında bu lignoselülozik kaynaklardan buğday sapı, mısır koçanı, pirinç kabuğu, ananas kabuğu ve muz kabuğu gibi çeşitli tarımsal ve gıda atıkları kullanılmaktadır. Ananas dünya genelinde çokça tüketilen bir meyve olup, ananas kabuğu atıklarının yapısında selüloz, hemiselüloz ve lignin bulunmaktadır. Bu bağlamda, uygun bir hidroliz yöntemi kullanılarak içerisindeki kompleks karbonhidrat kaynakları basit şekerlere dönüştürölüp biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, ananas kabuğu atıklarının biyoetanol üretiminde potansiyel bir hammadde kaynağı olması ve ananas kabuğu atıklarının çevreye zararlı etkilerinin kaldırılması ve değerlendirilmesi amacıyla hammadde kaynağı olarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, bir hammadde kaynağı olarak ananas kabuğu atığından etkin biyoetanol üretimi potansiyeli incelenmiştir. Bu kapsamda, ananas kabuğu atıklarının, mikroorganizmanın kullanabileceğı şekerleri açığa çıkarmak için asit ile hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ilk kez asit hidroliz yöntemiyle hazırlanmış ananas kabuğu atıklarının yeni bir *Klebsiella oxytoca* izolatu aracılığıyla biyoetanol üretim potansiyeli incelenmiştir. Biyoetanol üretiminin arttırılması amacıyla, sıcaklık, başlangıç hücre yoğunluğu, pH, inkübasyon süresi gibi fermentasyon etkinliğini etkileyebilecek faktörler incelenmiştir ve yine bu kapsamda suşun adaptif laboratuvar

evrimi çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında küçük ölçekte yapılan çalışmaların devamında, çalışmanın ölçeklenebilirliğini ve endüstriyel çalışmalara uygunluğunu test edebilmek amacıyla fermantasyon büyük ölçekte denenmiştir.

Lignoselülozik atıkların hidrolizi aşamasında asit veya enzimatik hidroliz tercih edilmektedir. Asit hidroliz yönteminin enzim hidroliz yönteminin aksine ön muamele işlemi olmadan gerçekleştirilebilme, daha az maliyetli olması ve daha hızlı bir şekilde uygulanması açısından tercih edilmektedir. Asit hidrolizinde, enzimatik hidrolizinden farklı olarak inhibe edici yan ürünler meydana gelebilir [Alvira et al., 2010; Lenihan et al., 2009].

Bu tez çalışmasında, ananas kabuğu atıklarının asit hidrolizi işlemi için 200mL hacmindeki ve farklı konsantrasyonlardaki (%0.5-%1) HCl kullanılarak 2 farklı besiyeri hazırlanmıştır. Bu çalışmada en yüksek şeker içeren (34,2 g/L) besiyerinin M4 olduğu belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında, asit konsantrasyonu arttıkça ortaya çıkan şeker miktarının artabileceği fakat aynı zamanda oluşan inhibe edici yan ürünlerin de miktarı artacağından biyoetanol üretiminin negatif yönde etkilendiği görülmüştür [Bustos et al., 2003; Dominguez et al., 1997]. Bu besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde elde edilen şeker miktarları ve üretilen etanol konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu bağlamda, maksimum biyoetanol eldesinin belirlenmesi için 4 farklı hidroliz yöntemiyle oluşturulan besiyerlerinde fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Maksimum biyoetanol eldesi (18.6 g/L) M4 besiyerinde tespit edilmiş olup, toplam hücre yoğunluğu (OD600nm) 48.saatin sonunda 2.37 olarak tespit edilmiş ve arttırılan asit konsantrasyonun biyoetanol üretimi üzerinde olumsuz bir etkiye sebep olmadığı görülmüştür. Soydan [2012] tarafından yapılan bir çalışmada, buğday sapının farklı konsantrasyonlardaki (%1, %2 ve %5) sülfirik asit hidrolizinin ardından en yüksek elde edilen şeker miktarı %5 konsantrasyonunda elde edilmiş olup devam eden fermantasyon deneylerinde en yüksek biyoetanol eldesi bu tez çalışmasında da M4 besiyerinde kullanılan %1 sülfirik asit ile hazırlanan hidrolizatla olduğu gibi %1 sülfirik asit ile hazırlanan besiyeri ile sağlanmıştır. Yüksek asit konsantrasyonlarında etanol üretiminin artmadığı tespit edilmiştir. Literatürde başka bir çalışmada bu tez çalışması ile benzer şekilde, taze patates yumruları 4 farklı konsantrasyonlardaki (%0.5-%2), hidroklorik asit ve sülfirik asit ile hidroliz işlemine tabi tutulmuş olup *S.cerevisiae* aracılı 18 saatlik fermantasyon sonucunda en yüksek

biyoetanol eldesi (31.0 g/L) %1 konstrasyonundaki hidroklorik asit ile hazırlanan besiyerinde elde edilmiştir. [Tasić et al., 2009].

Sıcaklık ve başlangıç hücre yoğunluğu, fermentasyon etkinliğine farklı ölçülerde etki sağlamaktadır [Munro et al., 2009; Azhar et al., 2017]. Sıcaklık mikroorganizmanın gelişimi ve metabolik aktivitesi için kritik bir role sahiptir. Başlangıç hücre yoğunluğu literatüre bakıldığında biyoetanol üretiminde az miktarda etki ettiği daha çok şeker tüketim hızı gibi faktörlere etki ettiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında, literatürde *Klebsiella* suşu için çokça tercih edilen iki farklı sıcaklıkta (30°C -37°C) ve iki farklı başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) (0.1-0.5) fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, maksimum biyoetanol eldesi (23.84 g/L) 30°C sıcaklık ve başlangıç hücre yoğunluğu (OD600nm) 0.1 olan koşullarda elde edilmiştir. Tiwari et al. (2022) biyoetanol üretimi için pirinç kabuğu kullandıkları çalışmasında, *Klebsiella oxyoca* suşu aracılığıyla pH değeri 7’de ve 4 farklı sıcaklıkta (26, 30, 36 ve 40°C) fermentasyon deneyi gerçekleştirmiş olup maksimum biyoetanol eldesini (32.26 g/L) 36°C’de elde etmiştir [Tiwari et al., 2022]. Tran et al. [2011] biyoetanol üretimi için mısır koçanı kullandıkları çalışmasında, *K. oxyoca* suşu aracılığıyla pH değeri 7’de ve 4 farklı sıcaklıkta (25, 30, 35 ve 40°C) fermentasyon deneyi gerçekleştirmiş olup maksimum biyoetanol eldesini 30°C’de elde etmiştir. Farklı sıcaklıklarda elde edilen farklı biyoetanol miktarlarını, suşların genetik farklılıkları, kullanılan hammadde kaynaklarının farklılığı ve besiyerinin içerdiği çeşitli azot kaynakları ve mineraller etkiliyor olabilir. Bu çalışmada, 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm) 0.5’e göre az miktarda daha fazla biyoetanol elde edildiği tespit edilmiştir. Chauhan et al. [2020] biyoetanol üretimi için sülfirik asit ile hidroliz edilmiş tatlı sorgum kullandıkları bir çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* suşu aracılığıyla 30°C’de farklı inokulum büyüklüklerinde (%5, %10, %15) fermentasyon deneyi gerçekleştirmiş olup, maksimum biyoetanol eldesi %5’lik inokulum büyüklüğünde elde edilmiştir. Maya miktarı arttıkça biyoetanol veriminin düştüğü tespit edilmiştir. Bunun nedeninin yüksek hücre yoğunluğunun fermentasyon kinetiklerini olumsuz etkilediği ve hücrelerin farklı yan ürünler ürettiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnkübasyon süresi, kullanılan suşun verimli çalışabilmesi için önemli bir faktördür. İnkübasyon süresi fermentasyon çalışmalarında ne çok kısa ne de çok uzun tutulmamalıdır. Bu süre çok kısa tutulursa mikroorganizma şekerin tamamını

tüketemez, biyoetanol üretimi maksimum seviyede olamaz ve fermantasyon işlemi verimsiz olur. Bu süre çok uzun tutulduğu vakit ise, mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoetanol, toksik etki yaratıp mikrobiyal büyümeyi engelleyebilmektedir [Zabed et al., 2014]. Bu tez çalışmasında daha önce optimize edilen koşullarda ve pH değeri 7’de farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72.saat) fermantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. 48.saatte maksimum biyoetanol eldesi (23.84 g/L) gözlemlenmiş olup *K. oxytoca* suşu pH 7’de neredeyse tüm şekeri tüketmiştir. 48. saatten sonra, 72.saatte şekerin tamamı tükenmiş olup biyoetanol miktarında azalma gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, biyoetanolün uçucu bir bileşik olmasından ve mikroorganizmanın daha fazla biyoetanol üretimi gerçekleştirmemesinden kaynaklanıyor olmasıdır.

Üretilen biyoetanol miktarının artmasında, fermantasyon ortamının pH’sı mikroorganizmanın büyümesine ve metabolik faaliyetlerini etkilemekte olup, önemli bir yere sahiptir. Bu tez çalışmasında, daha önce optimize edilen şartlarda 5 farklı pH değeriyle (5, 6, 7, 8 ve 9) hazırlanan besiyerlerinde fermantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. 48. saat sonunda maksimum biyoetanol eldesi pH değeri 8 olan besiyerinde elde edilmiştir. *K.oxytoca* suşu aracılığıyla pirinç kabuğunun fermantasyonu gerçekleştirilen bir çalışmada, 37°C’de ve pH değeri 7’de maksimum biyoetanol üretimi (g/L) gerçekleştirilmiştir (Tiwari et al., 2022). Suzuki et al. [2014] hammadde kaynağı olarak gliserol kullandıkları çalışmada, bir *Klebsiella* suşu aracılığıyla 6 farklı pH değeri aralığında (5-10) fermantasyon gerçekleştirmiş olup maksimum biyoetanol eldesi (9.8 g/L) pH 8 değerinde elde edilmiştir. Fermantasyon ortamı için optimum pH değerinin suşlara ve hammadde kaynağına bağlı olarak değişebileceği görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, *K. oxytoca* suşunun mikrobiyal büyüme, şeker verimi ve alkol verimi gibi fermantasyon etkinliğini değiştirecek faktörleri şekillendirmek amacıyla suşun adaptif laboratuvar evrimi deneyi gerçekleştirilmiştir. *K. oxytoca* suşu aracılığıyla 45 gün boyunca günde 2 kez, glukoz içeren besiyeri ortamında fermantasyon gerçekleştirilmiştir. 45 gün sonunda KO-A suşu benzer üretilen biyoetanol miktarını KO suşuna kıyasla daha az toplam hücre yoğunluğu (OD600nm) ile gerçekleştirmiştir. KO-A suşunun birim hücre biyokütlesi başına üretilen biyoetanol miktarının %21 daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Birim hücre biyokütlesi başına üretilen biyoetanol miktarındaki bu değişim suşun büyüme için

kullandığı karbon kaynağını üremekten çok ürün sentezine kaydırmasından kaynaklanıyor olabilmektedir [Dragosits and Mattanovich, 2013].

Bu tez çalışmasında, gerçekleştirilen optimizasyon deneyleri sonrasında bu çalışmanın büyük ölçekte sanayiye uygunluğunu test etmek amacıyla KO ve KO-A suşlarıyla 1L hacmindeki erlen içindeki M4 besiyeriyle fermantasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. 48.saat sonunda KO-A suşunun 33.80 g/L biyoetanol ürettiği tespit edilmiştir. Sarkar et al. [2022] yaptıkları çalışmada, *Klebsiella sp.* SWET4 suşu aracılığıyla muz kabuğu kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda 5.48 g/L biyoetanol üretimi gerçekleştirmiştir. Braide et al. [2018], yaptıkları çalışmada, *Zymomonas mobilis* suşu aracılığıyla HCl hidrolizi işlem görmüş ananas kabuğu atıklarından oluşturulan besiyerinde 72. saat sonunda 7.97 g/L etanol üretimi gerçekleştirmiştir. Literatürle karşılaştırıldığında, büyük ölçekte elde edilen sonuçların ananas kabuğu atıklarının *K.oxytoca* suşu aracılığıyla kullanımının biyoetanol üretiminde önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Büyük ölçekte yapılan deney sonucunda, üretilen biyoetanol miktarının artması da suşun büyük ölçekte sanayiye uygunluğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, asit hidrolizi yöntemiyle hazırlanan ananas kabuğu atığının *K.oxytoca* suşu ile etkin biyoetanol üretimi araştırılmıştır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda, en yüksek biyoetanol üretimi M4 besiyerinde, 30°C sıcaklıkta ve 0.1 başlangıç hücre yoğunluğunda (OD600nm), 48.saatte ve pH değeri 8’de, KO-A suşuyla büyük ölçekte 33.80 g/L (% 4.28)olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda, ananas kabuğu atıklarının *K. oxytoca* suşu aracılığıyla atıkların değerlendirilmesinde ve düşük maliyetli biyoetanol üretimini amaçlayan endüstriyel çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Gelecekteki süreçlerde, metabolik mühendislik çalışmalarıyla bu suşun hedeflenen ürün verimine daha da optimize edilmesi, üretim verimliliğini daha da artırabilir. Bu çalışmada, laboratuvar ölçekli fermentasyonun ardından endüstriyel ölçekli denemelerin yapılması, bu deneylerin uygulanabilirliğini test etmek açısından önemlidir. Bu sonuçlar doğrultusunda, hem sürdürülebilir biyoetanol üretimi hem de tarımsal atıkların değerlendirilmesi açısından geleceğe yönelik umut verici bir temel sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abidin Z., Saraswati E., & Naid T., (2014). Bioethanol production from waste of the cassava peel (*Manihot esculenta*) by acid hydrolysis and fermentation process. *International Journal of PharmTech Research*, 6(4), 1209–1212.
- Adıgüzel A. O., (2013). Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Sakarya University Journal of Science*, 17(3), 381–397.
- Aditiya H. B., Mahlia T. M. I., Chong W. T., Nur H., & Sebayang, A. H., (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653.
- Akbas M. Y., & Stark B. C., (2016). Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(11), 1593–1609.
- Alvira P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., & Negro M. J., (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861.
- Azhar S. H. M., Abdulla R., Jambo S. A., Marbawi H., Gansau J. A., Faik A. A. M., & Rodrigues K. F., (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61.
- Balat M., Balat H., & Öz C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551–573.
- Bustos G., Ramírez J. A., Garrote G., & Vázquez M., (2003). Modeling of the hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104, 51–68.
- Chauhan N. M., Hajare, S. T., Mamo B., & Madebo A. A., (2021). Bioethanol production from stalk residues of chiquere and gebabe varieties of sweet sorghum. *International Journal of Microbiology*, 2021(1), 6696254.
- Chen J., Zhang B., Luo L., Zhang F., Yi, Y., Shan Y., ... & Lü X., (2021). A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111370.
- Demirbas M. F., Bozbas K., & Balat M., (2004). Carbon dioxide emission trends and environmental problems in Turkey. *Energy Exploration & Exploitation*, 22(5), 355–365.
- Devi A., Bajar S., Kour H., Kothari R., Pant D., & Singh A., (2022). Lignocellulosic biomass valorization for bioethanol production: A circular bioeconomy approach. *Bioenergy Research*, 15(4), 1820–1841.

Dibazar A. S., Aliasghar A., Behzadnezhad A., et al., (2024). Energy cycle assessment of bioethanol production from sugarcane bagasse by life cycle approach using the fermentation conversion process. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 20679–20698.

Dominguez J. M., Cao N., Gong C. S., & Tsao G. T., (1997). Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technology*, 61(1), 85–90.

Dragosits M., & Mattanovich D., (2013). Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology. *Microbial cell factories*, 12, 1-17.

Haldar D., & Purkait M. K. (2021). A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, 264, 128523.

Koçoğlu Soydan D., (2012). "Buğday saplarından biyoetanol üretimi: Asit hidrolizi ve enzimatik hidrolizin etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M. N. M., Rooney D. W., & Walker G. M., (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 395-403.

Manikandan S., Subbaiya R., Biruntha M., Krishnan R. Y., Muthusamy G., & Karmegam N., (2022). Recent development patterns, utilization and prospective of biofuel production: Emerging nanotechnological intervention for environmental sustainability—A review. *Fuel*, 314, 122757.

Mankar A. R., Pandey A., Modak A., & Pant K. K., (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 125235.

Munro S. A., Zinder S. H., & Walker L. P., (2009). The fermentation stoichiometry of *Thermotoga neapolitana* and influence of temperature, oxygen, and pH on hydrogen production. *Biotechnology Progress*, 25(4), 1035–1042.

Niphadkar S., Bagade P., & Ahmed S., (2018). Bioethanol production: Insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229–238.

Ohta K., Beall D. S., Mejia J. P., Shanmugam K. T., & Ingram L. O., (1991). Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2810–2815.

Panahi H. K. S., Dehghani M., Guillemain G. J., Gupta V. K., Lam S. S., Aghbashlo M., & Tabatabaei M., (2022). Bioethanol production from food wastes rich in carbohydrates. *Current Opinion in Food Science*, 43, 71–81.

Rezania S., Oryani B., Cho J., Talaiekhosani A., Sabbagh F., Hashemi B., ... & Mohammadi A. A., (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 117457.

Roukas T., & Kotzekidou P., (2022). From food industry wastes to second generation bioethanol: A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 21(1), 299–329.

Sarkar N., Ghosh S. K., Bannerjee S., & Aikat K., (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27.

Shukla A., Kumar D., Girdhar M., Kumar A., Goyal A., Malik T., & Mohan A., (2023). Strategies of pretreatment of feedstocks for optimized bioethanol production: Distinct and integrated approaches. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 44.

Suzuki T., Nishikawa C., Seta K., Shigeno T., & Nakajima-Kambe T., (2014). Ethanol production from glycerol-containing biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows maximum productivity under alkaline conditions. *New Biotechnology*, 31(3), 246–253.

Sutton M. D., & Peterson J. D., (2001). Fermentation of sugarbeet pulp for ethanol production using bioengineered *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Journal of sugar beet research*, 38(1), 19-34.

Tasić M. B., Konstantinović B. V., Lazić M. L., & Veljković V. B., (2009). The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochemical engineering journal*, 43(2), 208-211.

Thangavelu S. K., Rajkumar T., Pandi D. K., Ahmed A. S., & Ani F. N., (2019). Microwave assisted acid hydrolysis for bioethanol fuel production from sago pith waste. *Waste management*, 86, 80-86.

Tiwari S., Beliya E., Vaswani M., Khawase K., Verma D., Gupta N., ... & Jadhav S. K., (2022). Rice husk: a potent lignocellulosic biomass for second generation bioethanol production from *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182. *Waste and Biomass Valorization*, 1-19.

Toor M., Kumar S. S., Malyan S. K., Bishnoi N. R., Mathimani T., Rajendran K., & Pugazhendhi A., (2020). An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Chemosphere*, 242, 125080.

Tran D. T., Lin C. W., Lai C. Y., & Wu C. H., (2011). Ethanol production from lignocelluloses by native strain *Klebsiella oxytoca* THLC0409. *Waste and Biomass Valorization*, 2, 389–396.

Vohra M., Manwar J., Manmode R., Padgilwar S., & Patil S., (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584.

Web 1. (2024). Annual ethanol production. Renewable Fuels Association. <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production> (Erişim Tarihi: 22.11.2024).

Zabed H., Faruq G., Sahu J. N., Azirun M. S., Hashim R., & Nasrulhaq Boyce A., (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*, 2014, 957102.

ÖZGEÇMİŞ

Mert Can AYKAÇ, 2017 yılında başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü lisans eğitiminden 2022 yılında mezun oldu. 2022 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı.

TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Aykac, M. C., Yesilcimen-Akbas, M., (2024), “Ananas Kabuğu Hidrolizatından Etkin Biyoetanol Üretiminin Araştırılması”, 8. Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu 2024, Kocaeli, TR, 30-31 Mayıs 2024