

Biyometanol Üretimi İçin Gıda İşleme Atıklarının Asit Hidrolizi

Taner Şar, Meltem Yeşilçimen Akbaş ✉

Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 41400 Kocaeli

Geliş Tarihi (Received): 02.02.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 26.03.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): akbas@gtu.edu.tr (M.Yeşilçimen Akbaş)

☎ 0 262 605 25 30 📠 0 262 653 84 90

ÖZ

Bu çalışmada, etanol üreticisi *E. coli* FBR5 suşunun üretilmesinde, gıda işleme atıklarının (şeker pancarı melasının ve patates-mısır) hidrolizatlarının karbon kaynakları olarak potansiyel kullanımları araştırılmıştır. Bu amaçla, bu gıda işleme atıkları farklı oranlarda asit uygulamaları ile (HCl veya H₂SO₄) farklı metotlarla hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidrolizatların şeker içeriklerinin, kullanılan asitin konsantrasyonuna, gıda işleme atıklarının oranına veya Ca(OH)₂ uygulamasına (melas hidrolizati için) bağlı olduğu bulunmuştur. Melas hidrolizatları arasında, en yüksek değerlerdeki şeker oranları ve FBR5 suşunun üremesi, kullanılan melasın %10 (v/v) konsantrasyonda sulandırılarak H₂SO₄ ile hidrolize edildiğinde ve Ca(OH)₂ uygulandığında elde edilmiştir. Patates-mısır işleme atığı ile ise en fazla şeker konsantrasyonları ve üreme değerleri, patates işleme atık suyu ile mısır işleme atığı karışımının 1:4 oranında kullanıldığında ve HCl ile hidrolize edildiğinde belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Melas, Patates işleme atığı, Mısır işleme atığı, Asit hidrolizi, Biyometanol

Acid Hydrolysis of Food Processing Wastes for Bioethanol Production

ABSTRACT

In this study, the potential use of food processing (sugar beet molasses and potatoes-corn) wastes hydrolysates as carbon sources was investigated for the growth of ethanologenic *E. coli* strain FBR5. For this purpose, different hydrolysis methods were performed by using acid (HCl or H₂SO₄) treatments with different ratios of these food processing wastes (FPW). The final sugar concentrations obtained from the hydrolysates were dependent on the concentrations of acid, ratio of FPW or Ca(OH)₂ treatment (for molasses hydrolysate). The highest levels of sugars (glucose and fructose) and the growth of FBR5 strain were obtained when 10% (v/v) concentration of molasses was hydrolyzed with H₂SO₄ and after Ca(OH)₂ treatment. For the potatoes-corn wastes, the highest sugar concentrations (glucose and xylose) and the highest growth were obtained by using the ratio of potato waste water to corn waste of 1:4 (w/v) and HCl treatment.

Keywords: Molasses, Potato processing waste, Corn processing waste, Acid hydrolysis, Bioethanol

GİRİŞ

Günümüzde dünya nüfusunun hızla artmasıyla fosil kökenli yakıtlar tükenmeye başlamıştır. Artan enerji ihtiyacını karşılayabilmek için yenilenebilir enerji kaynaklarına acilen ihtiyaç vardır. Bunlar arasında biyometanol, mikrobiyal fermentasyonla birçok ham madde ile gıda sanayi işleme atıklarından üretilebilen ve

sıvı yakıtlara alternatif olarak en çok kullanılan yakıt çeşididir [1]. Biyometanol, benzinle hatta son yıllarda motorinle karıştırılarak kullanılabilen bir biyoyakıt türüdür. Biyometanol benzin ile karıştırıldığında; donmayı engeller. Ayrıca motorun ısısının artmasını, enjektörlerin kirlenmesini engelleyerek yakıtlarda oktan sayısını arttırmak amacı ile kullanılabilir. Çevreyle dost bir yakıttır. Günümüzde etanol, ulaştırma, ısı ve elektrik

üretim tesislerinde ve birçok kimyasal madde üretiminde de kullanılmaktadır [2]. Dünyada Amerika Birleşik Devletleri (mısırdan) ve Brezilya (şeker pancarından) etanol üreten ülkelerin başında gelmektedir [3]. 2014 yılında Dünyada üretilen etanolün %60'ı Amerika'da ve %40'ı ise Brezilya'da üretilmiştir [4].

Biyoeanol, sukroz içeren materyaller (şeker pancarı, şeker kamışı, sorgum vb.), nişastalı ürünler (buğday, mısır, arpa vb.) veya lignoselülozik biyokütlerden (odun, saman, vb.) ve tarımsal atıklardan üretilmektedir. Bu materyallerdeki basit şekerlerden veya şekerlere dönüşebilecek nişasta ve selüloz benzeri polisakkaritlerden direkt fermantasyon yoluyla etanol elde edilmektedir [5]. Dünyadaki biyoeanol üretiminin yaklaşık %95'i tarımsal ürünlerden sağlanmaktadır [6]. Biyoeanol üretiminin %40'ı şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şeker içeren ürünlerden üretilirken, %60'ı nişasta içeren ürünlerden kaynaklanmaktadır [7]. Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri dışında Kanada, Japonya, Hindistan, Çin ve Avrupa ülkeleri gibi dünya çapındaki birçok ülke kendi biyoyakıtlarını üretmektedir [8]. Etanol üretimi için sıklıkla kullanılan melas ve mısır ek olarak; laktoz içeren peynir altı suyu ve lignoselülozik biyokütler de kullanılmaktadır [5, 9-11].

Biyoeanol üretimi için hammadde kaynağı temelde şeker kamışı ve şeker pancarıdır. Şeker fabrikalarında, şeker üretimi sırasında şeker pancarı ve şeker kamışı işlenerek yan ürün olarak melas atığı oluşmaktadır. Melas, hayvan yemi, *Saccharomyces cerevisiae* (ekmek mayası) üretiminde veya etanol üretiminde kullanılmaktadır [12]. Türkiye'de de üretilen biyoeanolün büyük bir kısmı şeker pancarı melasından üretilmektedir. Patates ve mısır işleme atıkları ise, patates işleme endüstrisi atığı olarak hayvan yemi olarak kullanılmaktadır [13].

Etanol üretimi, fermente edilebilir şekerleri içeren besiyerinin hazırlanması, şekerlerin fermantasyonu ile alkol eldesi ve üretilen alkolün ayrılarak saflaştırılması [14] aşamalarından oluşmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilir basit şekerlerin elde edilebilmesi ise ucuz bir yöntem olan asit hidrolizi veya maliyetli bir yöntem olan enzimler yolu ile mümkün olmaktadır. Lignoselülozik kaynaklar en çok selüloz, hemiselüloz ve lignin içermektedir. Asit hidrolizi ile lignoselülozik materyalin şekerlere hidrolizi koşullara göre değişmektedir. Uygun olmayan koşullarda asit hidrolizi ile 5 karbonlu ve 6 karbonlu şekerler parçalanmakta, toksik etkili furfural ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF) oluşmaktadır. Bu nedenle lignoselülozik kaynakların yüksek şeker konsantrasyonuna ve düşük inhibitörlere sahip hidrolizatlarının eldesi önemlidir [15].

S. cerevisiae biyoeanol üretimi için yaygın olarak kullanılan bir mikroorganizmadır. *S. cerevisiae* hızlı üreyebilir, etanolün yüksek konsantrasyonlarına ve inhibitörlere dayanıklıdır. Ancak yalnızca altı karbonlu şekerleri kullanabilir [16]. Mikroorganizmalar içerisinde *Escherichia coli*, etanol üretimi için ümit verici bir alternatiftir. Çünkü *E. coli*, birçok şekeri etanole fermente edebilir. Metabolik mühendisliği kapsamındaki

uygulamalarda, *E.coli*'nin etanol üretimi için karbon kaybına neden olan doğal fermantasyon yolları susturulmuş, *Zymomonas mobilis*'in etanol fermantasyon yolundaki iki enzimi kodlayan genleri (piruvat dekarboksilaz, *pdh*, ve alkol dehidrogenaz II, *adh*) bir plazmid üzerinde [17,18] *E. coli* ye aktarılmış ve bu yeni *E. coli* suşu (FBR5) ile daha etkili bir etanol yol izi sağlanmıştır [19].

Ülkemizde de tarımsal ve gıda işleme atıklarının fermantasyonu ile etanol üretimi için uygun ucuz karbon kaynaklarının belirlenmesi önemlidir. Ucuz karbon kaynaklarının etanol üreticisi mikroorganizmalar için substrat olarak kullanılması ve etanolün üretiminin artırılması ile birlikte, çevre kirliliğinin önlenmesi de mümkün olacaktır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, ucuz ve bol bulunan lignoselülozik bir atık olan melas ile hem lignoselüloz hem de nişasta içeren patates mısır işleme atıklarının karşılaştırılması olarak farklı metotlar ile hidroliz edilerek etanol üreticisi *E.coli* FBR5 suşu ile biyoeanol üretiminde kullanılabilirlikleri üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, melas ve patates-mısır işleme atığının farklı koşullarda hidrolizi ve farklı konsantrasyonlarda farklı şekerleri içeren bu hidrolizatlarla hazırlanan besiyerlerinde etanol üreticisi *E.coli* FBR5 suşunun üreyebilme potansiyeli araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bakteri Suşları

Bu çalışmada, etanol üretebilen rekombinant *E.coli* FBR5 suşu kullanılmıştır [19].

Şeker Pancarı Melası Hidrolizatlarının (MH) Hazırlanması

Şeker pancarı işleme atığı olan melas (%50 sukroz içeren) Kocaeli Pakmaya Fabrikası'ndan (Kocaeli, Türkiye) temin edilmiştir. Farklı oranlarda distile su ile sulandırılan şeker pancarı melası +4°C sıcaklıkta 6000 g hızında 20 dakika süre ile santrifüj (Beckman Coulter, Allegra™ 25R, Krefeld, Almanya) edilmiştir. Üst sıvının pH değeri 4M H₂SO₄ (%96 saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya) ile 3.0'e ayarlanarak bir gece oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrası, melas 121°C'de 20 dakika süre ile bir otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ısıtılarak hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatların pH değeri 7.0'a ayarlanarak ince tabaka kromatografisi (TLC) ile şeker miktarı tayin edilmiş ve +4°C sıcaklıkta 6000 g hızda 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Üst sıvıya besiyeri bileşenleri ilave edilmiş ve 0.2 µm por çaplı vakum filtreden (Nalgene, Supor MarchV, Rochester, New York, ABD) geçirilerek steril hale getirilmiştir ([20]'den değiştirilerek uygulanmıştır).

Şeker Pancarı Hidrolizatlarını İçeren Besiyerlerinin Hazırlanması

MH1 Besiyeri: Şeker pancarı melası %10 (v/v) konsantrasyonda distile su ile sulandırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi besiyeri bileşenleri olarak LB (Luria Broth) besiyeri içeriği (Merck, Darmstadt, Almanya'dan temin edilen 10g/L pepton ve 5g/L maya özütü) ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri filtre edilerek steril edilmiştir.

MH2 Besiyeri: Şeker pancarı melası %33 (v/v) konsantrasyonda distile su ile sulandırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi hidrolize edilmiştir. Elde edilen hidrolizata LB besiyeri içeriği ve 0.2 g/L MgSO₄, 0.7 g/L KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya), 0.3 g/L NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya), ilave edilmiştir ([23]'ten değiştirilerek uygulanmıştır). Hazırlanan besiyeri filtre edilerek steril edilmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerine 5 mL/L iz element solüsyonu ve 1 mL/L tiamin (Merck, Darmstadt, Almanya, % 0.1, w/v) ilave edilmiştir.

MH3 Besiyeri: Şeker pancarı melası %6.6 (v/v) konsantrasyonda sulandırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi hidrolize edilmiştir. Elde edilen hidrolizata LB besiyeri içeriği, 0.2 g/L MgSO₄, 0.7 g/L KH₂PO₄ ve 0.3 g/L NaH₂PO₄ ilave edilmiş ve hazırlanan besiyeri filtre edilerek steril edilmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerine steril 5 mL/L iz element solüsyonu ve 1 mL tiamin (%0.1, w/v) ilave edilmiştir.

MH4 Besiyeri: Şeker pancarı melası %10 (v/v) konsantrasyonda sulandırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi hidrolize edilmiştir. Elde edilen hidrolizata LB besiyeri içeriği ilave edilmiş ve hazırlanan besiyeri filtre edilerek steril edilmiştir.

MH5 Besiyeri: Şeker pancarı melası %10 (v/v) konsantrasyonda sulandırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi hidrolize edilmiştir. Daha sonra hidrolizata yukarıda anlatıldığı gibi Ca(OH)₂ uygulaması yapılmış ve elde edilen hidrolizata LB besiyeri içeriği ilave edilerek filtre ile steril edilmiştir.

MH6 Besiyeri: Şeker pancarı melası %20 (v/v) konsantrasyonda sulandırılmış ve hidrolize edilmiştir. Daha sonra hidrolizata Ca(OH)₂ uygulaması yapılmış ve elde edilen hidrolizata LB besiyeri içeriği ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri filtre edilerek steril edilmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerine 5 mL/L iz element solüsyonu ve 1 mL/L tiamin (% 0.1, w/v) ilave edilmiştir.

İz Element Solüsyonu Hazırlanması: Disodyum EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O, 5g/L), ZnSO₄.7H₂O (0.22g/L), CaCl₂, (0.5g/L), FeSO₄ (0.5g/L), CuCl₂ (0.16g/L), CoCl₂ (0.16g/L), MnCl₂ (0.5g/L) [21].

Ca(OH)₂ Uygulaması: Hazırlanan hidrolizatların pH değerleri Ca(OH)₂ (Merck, Darmstadt, Almanya) ilavesi ile 9.6'ya ayarlanarak 60°C sıcaklıkta 30 dakika süre ile ısıtılmıştır. 6000 g hızda 15 dakika ile santrifüj işlemi ile katı partiküllerin çöktürülmesi sağlanmış ve elde edilen üst sıvının pH değeri 4M H₂SO₄ ile yeniden 7.0'a ayarlanmıştır [22].

Patates-Mısır İşleme Atığı Hidrolizatlarının (PMH) Hazırlanması

Patates ve mısır işleme atığı karışımı Kraft Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

PMH1: 500 mL patates işleme atığı suyunun pH değeri 3M H₂SO₄ kullanılarak 3.0'e ayarlanmış ve 24 saat süresince oda sıcaklığında bekletildikten sonra 60 dakika süre ile 121°C sıcaklıkta otoklavlanmıştır.

PMH2: 200 mL patates işleme atığı suyu %7 (v/v) oranında 3M H₂SO₄ ile karıştırılmış ve 15 g mısır işleme atığı ilave edilerek 5.5 saat süresince at 85°C sıcaklıkta bir inkübatörde bekletilmiştir.

PMH3: 200 mL patates işleme atığı suyu, 50 g mısır işleme atığı ile karıştırılmış ve karışımın pH değeri 3M H₂SO₄ ile 2.0'e ayarlanmıştır. Hidrolizat 180 dakika süre ile 115°C sıcaklıkta otoklavlanmış ve daha sonra 85°C sıcaklıkta 24 saat süre ile bekletilmiştir.

PMH4: 200 mL patates işleme atığı suyu, 50 g mısır işleme atığı ve 28 mL 6M HCl (%37 saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya) ile karıştırılmış ve 180 dakika süre ile 115°C sıcaklıkta otoklavlanmıştır.

PMH5: 50 mL patates işleme atığı suyu, 10 g mısır işleme atığı ve 50 mL 0.5M HCl ile karıştırılmış 60 dakika süre ile 115°C sıcaklıkta otoklavlanmıştır. Elde edilen hidrolizat 48 saat süre ile 85°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

Farklı Patates-Mısır İşleme Atığı Hidrolizatlarını İçeren Besiyerinin Hazırlanması

Hazırlanan hidrolizatların pH değeri 7.0'ye ayarlanarak 121°C sıcaklıkta 20 dakika süre ile otoklavlanmış, 4000 g hızda 20 dakika süresince oda sıcaklığında santrifüjlenerek üst sıvılar toplanmış ve PMH1, PMH2, PMH3, PMH4, PMH5 besiyerleri hazırlanmıştır. Bunun için, elde edilen hidrolizatlara LB besiyeri içeriği, 0.2 g/L MgSO₄, 0.7 g/L KH₂PO₄ ve 0.3 g/L NaH₂PO₄ ilave edilmiş ve hazırlanan besiyerleri membran filtre ile (0.45 µm, Millipore) sterilize edilmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerlerine steril 5 mL/L iz element solüsyonu ve 1 mL tiamin (%0.1, w/v) ilave edilmiştir ([23]'ten değiştirilerek uygulanmıştır).

Farklı Hidrolizatları İçeren Besiyerlerinde Üremenin Belirlenmesi

Farklı hidrolizatları içeren besiyerlerinin 5 mL'sine *E.coli* FBR5 suşunun bir veya iki kolonisi, 50 mL'lik erlenlere inoküle edilerek çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) 180 devir/dakika hızda 37°C sıcaklıkta bir gece boyunca (18 saat) inkübe edilmiştir.

Hazırlanan bir gecelik ön kültürden, son yoğunluğu OD_{600nm} 0.06 olacak şekilde, 80 mL uygun besiyerini içeren 100 mL'lik erlenlere inokülasyon yapılmış ve çalkalamalı bir inkübatörde 180 devir/dakika hızda 37°C

sıcaklıkta 48 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan Hidrolizatlardaki Şekerlerin ve Miktarlarının Belirlenmesi

Hazırlanan hidrolizatların ve besiyerlerinin şeker miktarlarının tayini ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) ile belirlenmiştir.

TLC kullanımı için, D(+) glukoz, D(+) sukroz, D(+) ksiloz, D(+) fruktoz, D(+) maltoz, D(+) arabinoz (Merck, Darmstadt, Almanya) şekerlerinin 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ve 8.0 mg/mL (w/v) olacak şekilde ayrı ayrı standart çözeltileri hazırlanmıştır. Örnekler standartların dışına çıkmayacak şekilde, uygun oranlarda distile su ile seyreltilmiştir.

TLC plakaları (Whatman, TLC Plates Partisi® K5, Maidstone, İngiltere) üzerine standartlar ve seyreltilmiş örnekler mikro şırınga ile 1 µL olacak şekilde damlatılmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra %85'lik (v/v) asetonitril çözeltisi (%99 saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya) içerisine hafif bir açı ile yerleştirilerek şekerlerin yürütülmesi için bekletilmiştir. Yürütülen plakalar kurutulmuş, yürütme işlemi tekrarlanmıştır. Tekrar kurutulmuş plakalar %0.5 (v/v) alfa naftol (%99 saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisine daldırılarak boyanmıştır. Şeker noktalarının görünür hale gelmesi için, TLC plaka ısıtıcısında 120°C'de 10 dakika süre ile yakılmıştır.

Şekerlerin miktar tayini, TLC görüntüleme densitometresinden (Bio-Rad, GS 670, Filadelfia, ABD) yararlanılarak yapılmıştır. Standart grafiği üzerinde, R² değeri 0.950 üzerinde bulunan sonuçlar kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Farklı koşullarda hidrolize edilen melaslar ile hazırlanan besiyerlerinin şeker konsantrasyonları Tablo 1'de gösterilmiştir. Hidrolize edilmemiş melasın %50 oranında sukroz içerdiği tespit edilmiştir (MH1 besiyerinde kullanılmıştır). Melas içeriğindeki en fazla glukoz ve fruktoz miktarı, melasın %33 (v/v) konsantrasyonda sulandırıldıktan sonra hidroliziyle elde edilmiş ve bu hidrolizat MH2 besiyerinde kullanılmıştır. Ancak bu hidrolizatla hazırlanan MH2 besiyerinde FBR5 suşu ile üreme tespit edilememiştir. Bunun nedeninin hidroliz ile elde edilen toplam şeker miktarının ozmotik bir engel oluşturarak üremeyi engellemesi olduğu

düşünülmektedir. MH3 besiyerinde kullanılan hidrolizatta ise çok daha düşük oranda sulandırılan melas konsantrasyonu ile en düşük glukoz ve fruktoz miktarları elde edilmiştir. MH4 besiyeri ve MH5 besiyeri için ise, kullanılan melaslar aynı konsantrasyonda (%10, v/v) sulandırılmış, aynı koşulda hidroliz edilmiş olmasına ve hazırlanan besiyerleri aynı bileşenleri içermesine rağmen, MH5 besiyeri ile üremenin daha yüksek değerde olduğu görülmektedir. Buna dayanarak, MH5 besiyerine ilave edilen melas hidrolizatına Ca(OH)₂ uygulamasının, üremeyi engelleyen ve hidroliz ile oluşmuş muhtemel inhibitörleri nötralize etmiş olabileceği buna bağlı olarak da üremenin daha yüksek değerde olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle melasın hidroliz işleminden sonra Ca(OH)₂ uygulamasının mikroorganizmaların üremesi için önemli olduğu görülmüştür. En fazla şeker miktarlarının MH6 besiyerinde kullanılan melasın hidrolizi (%5.4 glukoz ve %5.4 fruktoz içeren) ile elde edildiği görülmüştür. Ancak bu besiyeri için daha fazla konsantrasyonda melasın (%20) hidrolize edilmesinden dolayı daha fazla glukoz ve fruktoz miktarı elde edilmiş ve toplam şeker miktarının ve/veya inhibitörlerin oluşmuş olabileceği ve üremeyi azalttığı görülmüştür.

Tablo 1. Şeker pancarı melas hidrolizatlarını içeren besiyerlerindeki şeker oranları (%) ve *E. coli* FBR5 suşunun bu besiyerlerinde 48 saat sonundaki üreme değerleri (OD_{600nm})*

Besiyeri	Şekerler (%)			OD _{600nm}
	Sukroz	Glukoz	Fruktoz	
MH1	5 (0.01)	-	-	-
MH2	-	9 (0.00)	9 (0.01)	-
MH3	-	1.8 (0.02)	1.8 (0.01)	1.9 (0.01)
MH4	-	2.7 (0.12)	2.7 (0.12)	5.9 (0.04)
MH5	-	2.7 (0.12)	2.7 (0.12)	8.0 (0.19)
MH6	-	5.4 (0.01)	5.4 (0.01)	5.5 (0.67)

*: Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Farklı koşullarda hidrolize edilen patates-mısır işleme atıklarını içeren besiyerlerindeki şeker konsantrasyonları Tablo 2'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan *E. coli* FBR5 suşu, patates-mısır işleme atığındaki bir polimer olan nişastayı ve lignoselülozik materyali karbon kaynağı olarak doğrudan kullanılmamaktadır. Yapılan farklı hidrolizatlar içerisinde en fazla glukoz ve ksiloz oranının 4:1 oranında patates ve mısır atığını içeren PMH4 hidrolizatında olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Patates-mısır işleme atığı hidrolizatlarını içeren besiyerlerindeki şeker oranları (%) ve *E. coli* FBR5 suşunun bu besiyerlerinde 48 saat sonundaki üreme değerleri (OD_{600nm})*

Besiyeri	Şekerler (%)					
	Glukoz	Ksiloz	Arabinoz	Maltoz	Fruktoz	OD _{600nm}
PMH1	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<1 (0.00)
PMH2	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<1 (0.00)
PMH3	0.35 (0.01)	0.23 (0.01)	<0.05 (0.00)	0.11 (0.01)	<0.05 (0.00)	<1 (0.01)
PMH4	3.65 (0.02)	0.9 (0.02)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.00)	3.3 (0.25)
PMH5	2.62 (0.01)	0.6 (0.01)	<0.05 (0.00)	<0.05 (0.01)	<0.05 (0.00)	2.5 (0.12)

*: Her değer iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisindeki değerler standart sapmaları göstermektedir.

Yapılan denemelerde, PMH1 hidrolizati hazırlanmasında sadece patates suyu kullanılmış ancak hidroliz işlemi ile şeker eldesi sağlanamadığından bu hidrolizat ile hazırlanan besiyerinde üreme görülmemiştir. Patates-mısır işleme atığının birlikte kullanılarak hazırlanan diğer hidrolizatlarda glukoz ve ksiloz eldesinin gerçekleştiği, bu şekerlerin miktarlarının mısır işleme atığının artırılması ve asit olarak 6M HCl kullanılması ile sağlanabildiği belirlenmiştir.

En fazla üremenin, PMH4 hidrolizati ile hazırlanan besiyeri ile (%3.6 glukoz ve %0.9 ksiloz içeren) ile gerçekleştiği görülmüştür. PMH5 besiyerinde patates işleme atık suyu ve mısır atığının 5:1 oranında karıştırılmış ancak daha düşük konsantrasyonda daha fazla miktarda asit kullanılması nedeni ile daha az şeker oranları ve buna bağlı olarak daha az üreme belirlenmiştir. PMH4 ve PMH5 hidrolizatları ile $\text{Ca}(\text{OH})_2$ uygulaması yapılmış ancak şeker oranlarında ve üremede herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir (veri gösterilmemiştir).

Önceki çalışmalarda düşük HCl konsantrasyonlarının ($\leq 0.3\text{M}$), saf patates nişastasının hidrolizinde H_2SO_4 uygulamasından daha etkili olduğu gösterilmiştir [24]. Ayrıca hidrojen iyonlarının katalitik aktivitelerinin HCl uygulamasında H_2SO_4 uygulamasından daha fazla olduğu gösterilmiştir [25, 26]. Bu çalışmada da HCl uygulaması ile elde edilen hidrolizatlarda çok daha fazla konsantrasyonlarda şekerler elde edilmiştir. Ayrıca, H_2SO_4 uygulamasının bazı karbonhidrat olmayan bileşiklerle inhibitör tuzlar oluşturabildiği ancak HCl uygulamasının böyle engelleyici etkilerinin olmadığı görülmüştür [27].

Elde edilen sonuçlarda $\text{Ca}(\text{OH})_2$ uygulamasının melas hidrolizati için üremeyi engellediği düşünülen inhibitörlerin etkisini azalttığı ancak patates mısır işleme atığı hidrolizatında etkili olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, bu fark kullanılan asitlerin farkından ileri gelebilir. Melas hidrolizi için kullanılan H_2SO_4 'in toksik inhibitörlerin oluşumuna neden olabildiği ancak 6M HCl'in toksik inhibitörlerin oluşumuna neden olmadığı düşünülmektedir.

Patates-mısır işleme atığı hidrolizatları ile hazırlanan besiyerlerine LB besiyeri içeriği, MH2 ve MH3 besiyerlerine ise ayrıca MgSO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 tuzları ve iz element solüsyonu ile tiamin de ilave edilmiştir. Melas hidrolizatlarına üremeyi teşvik edebileceği düşünülen bu ilavelerin üremeyi belirgin bir biçimde artırıcı etkisi görülmemiştir. Buna karşın, önceki bir çalışmada da *E. coli* KO11 fermantasyon ortamına sadece peynir altı suyu tozu ilavesi ile birlikte LB besiyeri bileşenlerinin veya yalnızca maya özütü (%0.5) ve Fe^{++} , Mn^{++} ve Zn^{++} ilavelerinin verimi arttığı görülmüştür [28].

Çalışmada, melas hidrolizatları arasında, en yüksek değerlerdeki şeker oranları ve FBR5 suşunun üretmesi, melasın %10 konsantrasyonda sulandırılarak H_2SO_4 ile hidrolize edildiğinde ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ uygulandığında elde edilmiştir. Patates-mısır işleme atığı ile ise en fazla şeker konsantrasyonları ve üreme değerleri, patates

işleme suyu ile mısır atığı karışımının 1:4 oranında kullanıldığında ve 6M HCl ile hidrolize edildiğinde belirlenmiştir.

Bugüne kadar biyoetanol üretimi öncesinde kullanılan hidroliz yöntemleri oldukça farklılık göstermektedir [29-31]. Bunun nedeni farklı yapı ve içeriğe sahip karbon kaynaklarının kullanılmasıdır. Bu nedenle farklı hidroliz yöntemleri ve koşulları, kullanılacak olan karbon kaynağı çeşidi ve organizmaya bağlı olarak gereken deneysel yöntemlerin tespit edilmesi önemlidir.

SONUÇ

Elde edilen sonuçlar, şeker pancarı melasının ve patates-mısır işleme atıklarının farklı yöntemlerle hidrolize edilerek, etanol üretme yeteneğine sahip mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılacak ucuz ve çevreyle dost karbon kaynakları olabileceklerini göstermektedir. Bu çalışma, endüstride büyük hacimlerde farklı hidrolizasyon koşullarının da deneyerek etanol üreticisi mikroorganizmalar için daha uygun üreme ortamları hazırlanabilmesinde temel oluşturabilecek veriler sunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gebze Teknik Üniversitesi tarafından desteklenmiştir. Deneyler sırasında verdiği teknik destekten dolayı Fatma Sümer'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Ghorbani, F., Younesi, H., Sari, A.E., Najafpour, G., 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy* 36: 503-509.
- [2] Grassi, G., 2000. Bioethanol – Industrial world perspectives. *Renewable Energy World*.
- [3] Chum, H.L., Zhang, Y., Hill, J., Tiffany, D.G., Morey, R.V., Goss Eng, A., Haq, Z., 2014. Understanding the evolution of environmental and energy performance of the U.S. corn ethanol industry: evaluation of selected metrics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8(2): 224–240.
- [4] RFA, Renewable Fuels Association. World Fuel Ethanol Production. Available online: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production> (accessed on 24 August 2015).
- [5] Balat, M., Balat, H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 551–573.
- [6] Rosillo-Calle, F., Walter, A., 2006. A global market for Bioethanol: Historical trends and future prospects. *Energy Sustainable Development* 10(1): 20-32.
- [7] Biofuels Platform. ENERS Energy Concept. Production of biofuels in the world; 2010. (available online <http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/production.php?id=bio-ethanol>).
- [8] Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimaraes, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente,

- A., Domingues, L., Teixeira, J.A., 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances* 28(6): 1873-1899.
- [9] Izmirlioglu, G., Demirci, A., 2015. Enhanced bio-ethanol production from industrial potato waste by statistical medium optimization. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 24490-24505.
- [10] Abanoz, K., Stark, B.C., Akbas, M.Y. 2012. Enhancement of ethanol production from potato-processing wastewater by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* haemoglobin. *Letters in Applied Microbiology* 55:436–443.
- [11] Akbas, M.Y., Sar, T., Ozcelik, B., 2014. Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by *Vitreoscilla* hemoglobin expressing'. *Escherichia coli. Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 78(4): 687-694.
- [12] Razmovski, R., Vučurović, V., 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology* 48(4-5): 378–385.
- [13] Radunz, A.E., Lardy, G.P., Bauer, M.L., Marchello, M.J., Loe, E.R., Berg, P.T., 2003. Influence of steam-peeled potato-processing waste inclusion level in beef finishing diets: effects on digestion, feedlot performance, and meat quality. *Journal of Animal Sciences* 81: 2675-2685.
- [14] Demirbaş, A., 2009. Biofuels from agricultural biomass. *Energy Sources, Part A*, 31: 1573-1582.
- [15] Moon, H.C., Jeong, H.R., Kim, D.H., 2012. Bioethanol production from acid-pretreated rice hull, *Asia Pacific Journal of Chemical Engineering* 7: 206-211.
- [16] Stambuk, B.U., Eleutherio, E.C.A., Marina, L., Maria, F.A., Bon, E.P.S., 2008. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67:918–926.
- [17] Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G. W., Preston, J.F., 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2420–2425.
- [18] Ingram, L.O. Conway, T. 1988. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(2): 397-404.
- [19] Dien, B.S., Nichols, N.N., O'Bryan, P.J., Rodney, B.J., 2000. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86:181-196.
- [20] Karaalp, T., 2007. Bakteriyel selüloz üretiminde farklı karbon kaynaklarının değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [21] Guimarães, W.V., Dudey, G.L., Ingram, L.O., 1992. Fermentation of sweet whey by ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 40: 41-42.
- [22] Mohagheghi, A., Ruth, M., Schell, D.J., 2006. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry* 41(8): 1806–1811.
- [23] Davis, L., Rogers, P., Pearce, J., Peiris P., 2006. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolyzed waste starch stream. *Biomass and Bioenergy* 30(8-9): 809-814.
- [24] Khanam, J., Nanda, A., 1990. Batch acid hydrolysis of potato starch, *Journal of Industrial Engineering* 71: 5–8.
- [25] Azhar, A., 1989. Alcohol fermentation of sweet potato. Acid hydrolysis and factors involved, *Biotechnology and Bioengineering* 23: 879–886.
- [26] Tasic, M.B., Konstantinovic, B.V., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., 2009. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal* 43: 208–211.
- [27] Konstantinovic, B.V., 2000. Ethanol production from potato tuber starch using *Saccharomyces cerevisiae*, M.Sc. Thesis, Faculty of Technology, Leskovac, University of Nis, Nis, Serbia.
- [28] Leite, A.R., Guimarães, W.V., Araújo, E.F., Silva, D.O.2000 Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Brazilian Journal of Microbiology* 31(3): 212-215.
- [29] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R, Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M.I., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96 (6): 673–686.
- [30] Kumar R., Wyman C.E., 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress* 25 (2): 302–314.
- [31] Zhang, Z., Donaldson, A.A, Ma, X. 2012. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion, *Biotechnology Advances* 30 (4): 913–919.