

AYÇİÇEĞİ KABUĞU HEMİSELÜLOZİK HİDROLİZATINA ADAPTE EDİLMİŞ *PICHIA STİPİTİS* MAYASI İLE ALKOL ÜRETİMİNE ZEHİR GİDERME ÖN İŞLEMLERİNİN ETKİSİ

Müjgan TELLİ OKUR

Kimya Mühendisliği Bölümü, Mühendislik ve Mimarlık Fak., Gazi Üniversitesi, 06570, Maltepe, Ankara,
mtelli@gazi.edu.tr

(Geliş/Received: 03.04.2006; Kabul/Accepted: 24.07.2006)

ÖZET

Bu çalışmada, ayçiçeği tohum kabuğu hemiselüloz hidrolizatına adapte edilmiş *Pichia stipitis* mayası ile ayçiçeği tohum kabuğu hemiselülozik hidrolizatının etil alkol üretimi için, kullanım olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla *P.stipitis* mayası hidrolizata adapte edilmiş ve daha sonra adapte edilmiş *P.stipitis*'in üç farklı ön işlem görmüş hidrolizat ile fermantasyon performansı çalkalamalı kaplarda yapılan deneyler ile incelenmiştir. En yüksek alkol konsantrasyonu (9,51 g/L), en iyi verim ($Y_{P/S}$ 0,32 g g⁻¹) ve en yüksek alkol üretim hızı (0,057 g /L saat), CaO ile aşırı titrasyon ön işlem görmüş hidrolizatın fermantasyonu ile elde edilmiştir. Benzer şekilde CaO ile aşırı titrasyon + sodyum sülfitle ön işlem görmüş hidrolizatın fermantasyonu ile de aynı alkol konsantrasyonuna (9,51 g/L) ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği tohum kabuğu, asit hidrolizi, adaptasyon, *Pichia stipitis*

THE EFFECT OF DETOXIFICATION PRETREATMENTS TO ALCOHOL PRODUCTION WITH ADAPTED *PICHIA STIPITIS* TO SUNFLOWER SEED HULL HEMICELLULOSIC HYDROLYSATE

ABSTRACT

In this study, the potential use of sunflower seed hull hemicellulosic hydrolysate for ethanol production with sunflower seed hull hemicellulosic hydrolysate adapted *Pichia stipitis* was investigated. For this purpose, *P. stipitis* was first adapted to hemicellulosic hydrolysate and then fermentation performance of *P. stipitis* with three hydrolysate which were subjected to different pretreatments was studied by fermentation experiments performed in shaking flasks. The highest concentration of alcohol (9.51g/L), best yield (0.32g/g) and maximum productivity (0.057 g/L h) were obtained with the fermentation of over-limed hydrolysate with CaO. Same alcohol concentration (9,51 g/L) was also achieved with the fermentation of hydrolysate treated with overlimed + sulfite addition.

Keywords: Sunflower seed hull; acid hydrolysis; adaptation, *Pichia stipitis*

1.GİRİŞ (INTRODUCTION)

Son yıllarda etanol alternatif bir yakıt olarak özellikle iki nedenden dolayı ilgi çekmektedir. Öncelikle 1970'lerdeki petrol krizi petrole olan ilgiyi azaltırken, lignoselülozik maddelerden etanol üretimi için yenilenebilir kaynaklara yönelmeyi hızlandırmıştır. Yenilenebilir enerji kaynaklarından etanol üretim prosesinin atmosfere net karbondioksit ilavesinin olmaması ile etanol'ün emisyonunun petrolünkünden

daha düşük olması gibi özellikler etanol'ü çevreye karşı yararlı bir enerji kaynağı yapmaktadır. Lignoselülozik maddeler bol ve ucuz hammadde kaynağı (1) oluşturmalarına rağmen etanol üretimi için mevcut prosesler son derece kapsamlı ve maliyetlidir (2). Lignoselülozik maddeler temel olarak selüloz, hemiselüloz, lignin, üronik asitler ve asetil gruplardan oluşmaktadır (3). Hemiselülozik ve selülozik kısımlar glukoz, mannoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan oluşan monosakkaritleri içerirler ve

bileşimleri tamamen hammaddenin doğasına bağlıdır (4). Lignoselülozik maddelerden etanol üretimi, hemiselüloz yapının seyreltik asit hidrolizi ile ksiloza bozunması ve daha sonra mayalar yardımıyla fermantasyon işlemi gerektirir (5). *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* ve *Candida shehatae* mayaları ksilozu oldukça iyi bir verimle etanole dönüştürürler (6). Bu mayalardan *Pichia stipitis* endüstriyel uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir, çünkü ksilozu oldukça kısa bir sürede, yüksek etanol verimiyle ksilitol üretmeden ve oldukça geniş bir aralıktaki şekerleri *Candida shehatae*'dan daha iyi bir şekilde etil alkole fermente edebilmektedir (1,2,5,7,8,9,10). Aynı zamanda glikozu da metabolize etme yeteneği, *Pichia stipitis*'in lignoselülozik kaynaklı ortamların değerlendirilmesinde iyi bir seçenek olmasını sağlamaktadır. Lignoselülozik yapının bozunması sırasında hidrolizat, sadece fermente edilebilir şekerleri içermez, bu arada geniş bir aralıktaki mikroorganizmayı inhibe edici bileşik de oluşur. Bu bileşikler seyreltik asitler, furfural, hidroksimetilfurfural ve fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler ortamdan uzaklaştırmak için, nötrleştirme, CaO ile muamele (over-liming), iyon değişimi, çözücü ekstraksiyonu, aktif karbonla muamele (2,5,11,12,13,14), mikroorganizmanın hidrolizata adaptasyonu (5,1), CaO ile muamele + sodyum sülfid ilavesi (2,12,15) gibi çeşitli zehir giderme metotları geliştirilmiştir.

Etanol üretimi için incelenen lignoselülozik maddeler buğday samanı, pirinç samanı, ayçiçeği sapları (16) ve mısır koçanı (5), su sümbülü (1) gibi bitkisel atıklardır. Lignoselülozik madde olarak ayçiçeği tohum kabuğu, fermantasyon yoluyla şeker üretiminde, bazı kimyasallara ve değerli bileşiklere dönüşümde oldukça ucuz bir kaynaktır (17). Ayçiçeği kabukları %39 oranında indirgen şeker içermesi nedeniyle lignoselülozik bir hammadde olarak kullanılması yeni bir alternatif oluşturmaktadır. Ayçiçeği tohum kabuğu yıllık bir bitkidir ve her yıl ülkemizde yaklaşık 950 000 ton ayçiçeği üretilmektedir. Bunun yaklaşık 550 000 tonu yağ fabrikası sıkım artığı olarak ayrılmakta ve bu sıkım artıkları yakıt olarak ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (18).

Yapılan bu çalışmada öncelikle ayçiçeği tohum kabuğunun seyreltik asit hidrolizi ile hemiselülozik hidrolizat hazırlanmış ve daha sonra elde edilen ayçiçeği tohum kabuğu hidrolizatına farklı zehir giderme ön işlemleri uygulanmıştır. Üç farklı ön işlem görmüş hemiselülozik hidrolizatının etil alkole fermantasyonu, ayçiçeği tohum kabuğu hidrolizatına adapte edilmiş *Pichia stipitis* mayası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Adaptasyon işleminin uygulandığı biyokütle büyümesi izlenmiş ve ön işlemlerin fermantasyon performansına etkisi incelenmiştir.

2. KULLANILAN MALZEMELER VE YÖNTEMLER (MATERIAL AND METHOD)

2.1. Mikroorganizma ve Büyüme Ortamı (Microorganism and Growth Medium)

Deneylerde kullanılan *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124)(CBS-5773) mayası liyofiliz halinde United States Department of Agriculture'dan temin edilmiştir. *Pichia stipitis* mayası, bileşimi ; yeast ekstrakt 3 g l⁻¹, malt ekstrakt 3 g l⁻¹, pepton 5 g l⁻¹, ksiloz 10 g l⁻¹ ve agar 20 g l⁻¹ olan eğik agar ortamında 30 °C'de 2-4 gün süre ile büyüme için bekletilmiştir. Daha sonra 100 mL hacmindeki büyüme ortamına eğik ağıardan mikroorganizma aşılması yapılmıştır. Büyüme ortamının bileşimi: 64 g l⁻¹ üre, 12 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1.18 g l⁻¹ Na₂HPO₄, 10 g l⁻¹ maya özütü, 50 g l⁻¹ D-ksiloz (pH=4.5) ve eser miktarda CaO, ZnO, FeCl₃.6H₂O, MgO, CuSO₄ . 5H₂O, CoCl₂ . 6H₂O, H₃BO₃ ve HCl'den oluşmuştur (19). Maya aerobik olarak 450 rpm magnetik karıştırıcıda, 30 °C sıcaklıkta büyütülmüş ve 27. saatte büyüme ortamından fermantasyon hacminin (135 mL) %20'si oranında fermantasyon ortamına aşılmalıdır.

2.2. Ayçiçeği Tohum Kabuğu Hidrolizatının Hazırlanması (Preparation of Sunflower Seed Hull Hydrolysate)

Antakya yöresindeki bir yağ fabrikasının sıkım artığı olan ayçiçeği tohum kabukları çekiçli bir değirmende öğütülüp elek analizine tabi tutularak 0,71-1 mm boyut aralığındaki bölümü hidrolizat deneyleri için kullanılmıştır. Hemiselüloz hidrolizatı su banyosunun içine daldırılmış 1 litre hacmindeki cam bir reaktörde 100 rpm karıştırma hızında hazırlanmıştır. Kullanılan cam reaktör, 12 cm çapında ve 20 cm yüksekliğinde olup kapaklıdır ve kapak kısmına bir geri soğutucu takılmıştır. Cam reaktör karıştırıcı bir motor yardımıyla cam bir karıştırıcı pervane tarafından karıştırılmıştır. 500mL hacminde 0,7 M H₂SO₄ çözeltisi cam reaktöre konmuş ve sıcaklık 90 °C 'ye gelince bu çözeltiye, 1/5 katı-sıvı oranında olacak şekilde 100 g öğütülüp elek analizi yapılmış ayçiçeği tohum kabukları ilave edilmiştir. Yaklaşık 3,5 saatlik hidroliz işlemi sonunda elde edilen hemiselüloz hidrolizatı önce patiska bezden süzülerek posasından ayrılmış daha sonra filtre kağıdından süzümüştür. Elde edilen ayçiçeği tohum kabuğu hemiselüloz hidrolizatına şeker analizi yapılarak 37 g/L konsantrasyonunda indirgen şekere sahip olduğu görülmüştür. Fermantasyon öncesi sentetik ksiloz ilavesi ile bu değer 48 g/L'ye tamamlanmıştır.

2.3. Zehir Giderme Yöntemleri (Detoxification Methods)

Ayçiçeği tohum kabuklarının asidik hidrolizi sırasında oluşan fermantasyon inhibitörlerini hidrolizat

ortamından uzaklaştırmak için üç farklı zehir giderme metodu uygulanmıştır.

CaO ile muamele: Hidrolizat 60°C'ye ısıtılarak bu sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiştir. CaO kademeli olarak eklenerek pH=10'a çıkarılmış ve patiska bezden süzülerek posasından ayrılmıştır. Daha sonra H₂SO₄ ile pH=6'ya düşürülmüştür. Hidrolizat önce santrifüj edilmiş bunu takiben birde mavi banttın süzümüştür.

CaO ile muamele ve sodyum sülfid ilavesi: CaO ile aşırı işlem görmüş olan hidrolizata 3 g/L konsantrasyonunda Na₂SO₃ ilave edilmiştir. Son olarak hidrolizat santrifüj edilmiş ve mavi banttın süzümüştür.

Nötürleştirme: Hidrolizat 60°C'ye ısıtılarak bu sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiştir. CaO kademeli olarak eklenerek pH=6'a çıkarılmıştır. Hidrolizat önce patiska bezden süzülerek posasından ayrılmış daha sonra santrifüj edilerek bunu takiben birde mavi banttın süzümüştür.

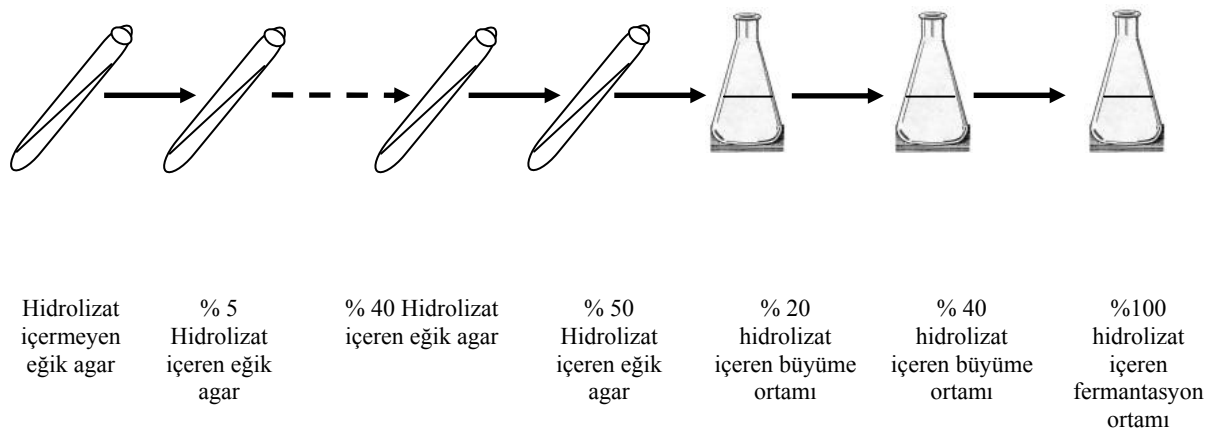
2.4. Mikroorganizmanın Hidrolizata Adaptasyonu (Microorganism Adaptation to Hydrolysate)

Mikroorganizmanın hidrolizat ortamındaki zehirlere karşı daha dirençli davranması ve daha etkin bir fermantasyon işlemi gerçekleştirebilmek için mikroorganizmaların hidrolizat ortamına adapte edilmesi bir alternatiftir. Eğik agarda depolanmış olan mikroorganizma ilk önce çözelti hacminin %5'i oranında hidrolizat içeren eğik agar ortamına steril koşullarda ekilerek adapte edilmiş, daha sonra çözelti hacminin %10 (v/v) oranında hidrolizat içeren eğik agar ortamına aktarılmıştır ve bu işlem her seferinde daha derişik (sırayla %20, %30, %40, %50) hidrolizat içeren ortamlara kademeli bir şekilde aktararak

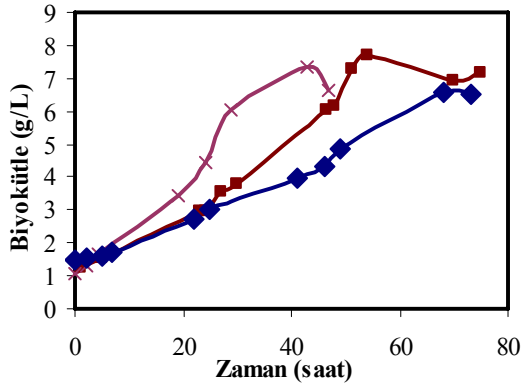
sürdürülmüştür (Şekil 1). Eğik agar ortamının bileşimi ; 3 gl⁻¹yeast ekstrakt, 3 gl⁻¹malt ekstrakt, 5 gl⁻¹pepton, 10 gl⁻¹ksiloz ve 20 gl⁻¹ agar içermektedir. % 50 oranında hidrolizat içeren eğik agar ortamına adapte edilmiş olan mikroorganizma, daha sonra hacminin %20'si kadar hidrolizat içeren büyüme ortamına geçirilmiştir. Söz konusu %20 oranında hidrolizat içeren büyüme ortamından, büyüme kültürünün 48. saatinde %40 hidrolizat içeren büyüme ortamına, büyüme hacminin %20'sini oluşturacak şekilde aşılama yapılmıştır. Bir sonraki aşamada ise %40 oranında hidrolizat içeren büyüme ortamından, büyüme kültürünün 55. saatinde, %100 hidrolizat içeren fermantasyon ortamına, büyüme hacminin %20'sini oluşturacak şekilde aşılama yapılmıştır.

2.5. Fermantasyon Deneyleri (Fermentation Experiments)

Yapılan çalışmada farklı zehir giderme metotları ayçiçeği tohum kabuğu hidrolizatına adapte edilmiş *Pichia stipitis*'le incelenmiştir. Bütün deneyler, 250 mL'lik erlenlere konulan 135 mL fermantasyon hacmindeki ortamların ağızları pamuk tıkaçla kapatılıp, sallamalı su banyosunda, 30°C sıcaklıkta, 70 rpm karıştırma hızında ve pH 6 iken gerçekleştirilmiştir. Ön işlem sonrası ortaya çıkan şeker kaybı nedeniyle, hidrolizat içine D-ksiloz ilave edilerek toplam indirgen şeker konsantrasyonu 48 g/L'ye tamamlanmıştır. Büyüme ortamından fermantasyon ortamına, fermantasyon hacminin %20'si kadar aşılama yapılmış olup başlangıçta biyokütle konsantrasyonu 3,5-3,7 g l⁻¹ aralığında değişmektedir. Ayrıca kontrol deneyi olarak hidrolizat ile aynı değerlerde sentetik D-ksiloz içeren ortam, *Pichia stipitis* mayası ile benzer koşullarda fermente edilmiştir. Deneyler süresince alınan örneklerde, biyokütle, indirgen şeker ve etil alkol konsantrasyonları zamana karşı takip edilmiştir.



Şekil 1. Ayçiçeği tohum kabuğu hidrolizatından etanol üretimi deney şeması (Ethanol production experiment scheme from sunflower seed hydrolysate)



Şekil 2. Kontrol (x), %20 (■) ve %40 (▲) oranında hidrolizat içeren ortamlara ait büyüme eğrileri (Biomass growth curves mediums containing different hydrolysate concentration; control (none) (x), %20 (■) and %40 (▲)).

2.6. Analitik Metod (Analytical Method)

Biyokütle konsantrasyonu, UV spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek belirlenmiştir.

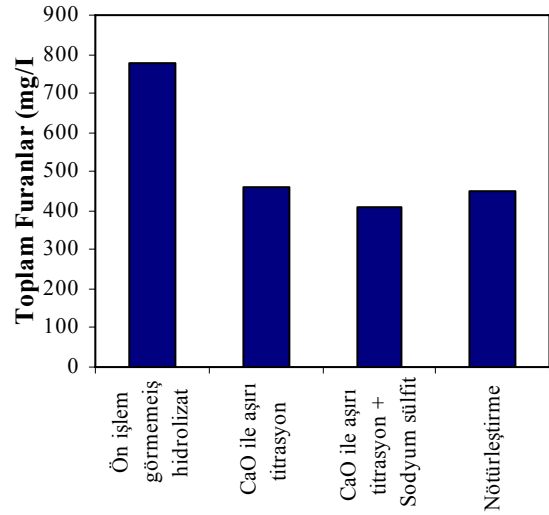
Etanol konsantrasyonu ise, dikromat oksidasyon yöntemiyle ölçülmüştür(21). Ayrıca ürün verimi $Y_{P/S}$ (maksimum etanol / toplam harcanmış substrat) (g etanol / g substrat) ve Q_p (g/Lsaat) üretim hızı (maksimum etanol / zaman) hesaplanmıştır.

3. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA (RESULTS and DISCUSSION)

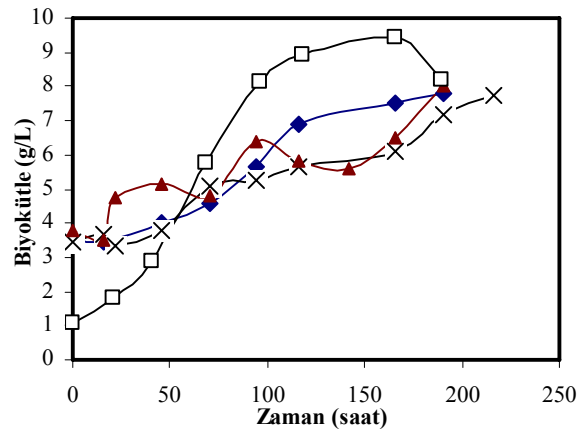
3.1. Adapte Mikroorganizma İle Fermantasyon (Fermentation with Adapted Microorganism)

Çalışmanın ilk bölümünde *P.stipitis* mayası ayçiçeği kabuğuna adapte edilerek fermantasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak *P.stipitis* mayası, CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon+Sodyum sülfid ön işlemi görmüş hidrolizata eğik agar ortamında kademeli olarak adapte edilmiştir. En son %50 oranında hidrolizat içeren eğik agar ortamına adapte olan mikroorganizma öncelikle %20 oranında hidrolizat içeren büyüme ortamına, oradanda %40 oranında hidrolizat içeren büyüme ortamına aşularak adapte edilmiştir. %40'luk ortamdan alınan aşı %100 hidrolizat içeren fermantasyon ortamına aktarılmıştır. *P.stipitis* mayasının %20 ve %40 oranında hidrolizat içeren büyüme ortamlarındaki büyüme eğrisi ve hidrolizata adapte edilmemiş *P.stipitis*'in sentetik D-ksiloz içeren büyüme ortamındaki büyüme eğrisi Şekil 1'de gösterilmiştir. Mikroorganizmanın, %20 oranında hidrolizat içeren ortamda, büyüme evresinin sentetik ortama göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde %40'luk ortamdaki gelişme ise %20'lik ortama göre daha yavaştır. Bunun nedeni büyüme ortamındaki hidrolizat konsantrasyonu arttıkça, hidrolizat

içerisindeki mikroorganizmaları zehirleyici etkiye sahip bileşiklerin konsantrasyonu da artmaktadır.



Şekil 3. Farklı zehir giderici ön işlemlerin toplam furan miktarına etkisi (The effect of different detoxification pretreatment to total furan amount)



Şekil 4. Ayçiçeği kabuğu hidrolizatının adapte edilmiş *P.stipitis* ile fermantasyonunda farklı ön işlemlerin biyokütle konsantrasyonuna etkisi; kontrol (□), CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon (◆), CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon +Na₂SO₃ (x), Nötürleştirme (▲). (The effect of the employed detoxification method on biomass growth during fermentation of sunflower seed hull hydrolysate with adapted *P.stipitis*; control (□), CaO with pH 10 over-liming(◆), CaO ile pH 10 over-liming +Na₂SO₃ (x), Neutralization (▲)).

3.2. Farklı Zehir Giderme Yöntemleri ve Fermantasyon (Different Detoxification Methods and Fermentation)

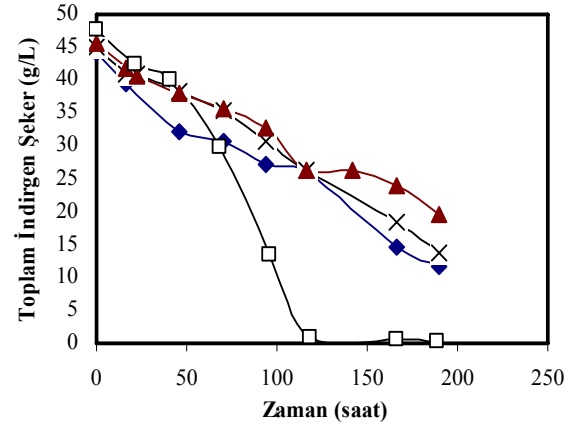
Çalışmanın ikinci bölümünde ayçiçeği tohum kabuğu hemiselülozik hidrolizatının etanol fermantasyonuna farklı zehir giderme ön işlemlerinin etkisi, ayçiçeği tohum kabuğu hidrolizatına adapte edilmiş *Pichia*

stipitis mayası kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla ayrıçığı tohum kabuğu hemiselülozik hidrolizatına, CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon, CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon + Na₂SO₃ ile muamele ve CaO ile pH 6'ya nötrleştirme ön işlemleri uygulanmıştır. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda 60°C sıcaklıkta, CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon ön işlemi için gerekli olan CaO miktarının oda sıcaklığındaki işlemlere oranla daha az olduğu, uçucu bileşiklerin tamamen giderildiği ve furfural ve hidroksimetilfurfural bileşiklerinin konsantrasyonlarının daha fazla düşürüldüğü belirtilmektedir (22, 23). Ön işlem sırasında hidrolizata eklenen CaO miktarındaki artma, şeker içeriğinin azalmasına neden olmaktadır. Pentoz şekerleri, heksoz şekerlerine oranla daha az kararlı olduğundan en çok ksilozda azalma meydana gelmektedir (9,22,23). Bu amaçla CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon ön işlemi (over-lime) için işlem sıcaklığı 60°C ve gerekli CaO miktarı yapılan ön denemeler sonucu seçilmiştir. Farklı ön işlem görmüş hidrolizat örneklerine yapılan analizler sonucunda, lignoselülozik hidrolizattaki toplam furanların % 41'inin CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon ön işlemi sırasında, % 47'sinin CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon + Na₂SO₃ ön işlemi sırasında ve % 42,3'ünün ise nötrleştirme işlemi sırasında giderildiği gözlemlenmiştir (Şekil 3).

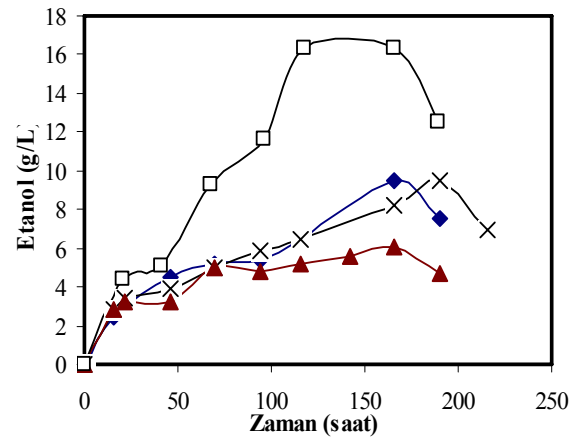
Benzer şekilde overlime işleminden önce hidrolizattaki toplam indirgen şeker konsantrasyonu 48g/L iken overlime işleminin sonunda 29 g/L'ye düşmüştür ve bu düşüşün hem zehir giderme ön işlemi sıcaklığına ve hemde eklenen CaO miktarına bağımlı olduğu yapılan deneysel çalışmalar sonucunda görülmüştür. Zehir giderme işlemlerinde 90 dakikalık ön işlem süresi sonunda kayıp olan şeker oranının % 42-50 arasında değiştiği gözlenmiştir. Adapte *P.stipitis* ile gerçekleştirilen fermantasyonlarda zamana karşı biyokütle büyümesi, toplam indirgen şeker konsantrasyonu ve etanol konsantrasyonu Şekil 4-6 da gösterilmektedir.

Ayrıca Tablo 1'de farklı zehir giderme ön işlemlerinin fermantasyon performansına olan etkilerini özetlemektedir. Burada E_{max} fermantasyonlar sırasında ulaşılan en yüksek alkol konsantrasyonunu, Y_{P/S} ürün verimini (maksimum alkol/toplam harcanan substrat) (g etanol / g substrat), Q_p (g/L saat) üretim hızını (maksimum etanol / zaman) ifade etmektedir. Elde edilen en yüksek alkol konsantrasyonu 9,51 g/L, en iyi verim Y_{P/S} 0,32 g g⁻¹ ve üretim hızı 0,057 g (L saat)⁻¹ CaO ile aşırı titrasyon ön işlem görmüş hidrolizatın fermantasyonu ile elde edilmiştir.

Aynı şekilde CaO ile aşırı titrasyon + sodyum sülfitle ön işlem görmüş hidrolizatın fermantasyonu ile de aynı alkol konsantrasyonuna (9,51 g/L) ulaşılmıştır, fakat verim ve üretim hızı değerleri daha düşüktür. Mikroorganizma adaptasyonu ile yapılan deneylerde en iyi elde edilen sonuca göre, kontrol deneyinin % 58'i kadar alkol elde edilmiştir.



Şekil 5 Ayrıçığı kabuğu hidrolizatının adapte edilmiş *P.stipitis* ile fermantasyonunda farklı ön işlemlerin toplam indirgen şeker konsantrasyonuna etkisi ; kontrol (□), CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon (♦), CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon +Na₂SO₃ (x), Nötrleştirme (▲). (The effect of the employed detoxification method on reducing sugar consumption during fermentation of sunflower seed hull hydrolysate with adapted *P.stipitis*; control (□), CaO with pH 10 over-liming(♦), CaO ile pH 10 over-liming +Na₂SO₃ (x), Neutralization (▲)).



Şekil 6. Ayrıçığı kabuğu hidrolizatının adapte edilmiş *P.stipitis* ile fermantasyonunda farklı ön işlemlerin etanol konsantrasyonuna etkisi; kontrol (□), CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon (♦), CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon +Na₂SO₃ (x), Nötrleştirme (▲). (The effect of the employed detoxification method on ethanol formation during fermentation of sunflower seed hull hydrolysate with adapted *P.stipitis*; control (□), CaO with pH 10 over-liming(♦), CaO ile pH 10 over-liming +Na₂SO₃ (x), Neutralization (▲)).

4. SONUÇ (CONCLUSION)

Bu çalışmada, ayrıçığı tohum kabuğu hemiselülozik hidrolizatının *P. stipitis* mayası kullanılarak etil alkol eldesi için kullanım olanakları araştırılmıştır. Üç farklı ön işlem görmüş hemiselülozik hidrolizat,

Tablo 1. Ayçiçeği kabuğu hemiselüloz hidrolizatının adapte *P.stipitis* ile fermantasyonuna, zehir giderme metotlarının etkisi. (Effect of detoxification methods on ethanol fermentation of sunflower seed hull hydrolysates by *P.stipitis*).

Kullanılan maya	Hidrolizat	Ön işlem	Substrat (g/L)	E _{max} (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _p (g/Lsaat)	Ref.No
P.stipitis NRRL Y-7124	Buğday sapı	Ca(OH) ₂ ile aşırı titrasyon	60	19,10	0,41	0,54	(9)
P.stipitis NRRL Y-7124	Sert ağaç	Ca(OH) ₂ ile aşırı titrasyon	39,4	14,5	0,4	0,21	(10)
P.stipitis CBS 6054	Mısır koçanı	Ca(OH) ₂ ile aşırı titrasyon	43,5	13,3	0,31	0,32	(24)
P.stipitis NRRL Y-7124	Ayçiçeği tohum kabuğu	Ca(OH) ₂ ile aşırı titrasyon	44,3	9,51	0,32	0,057	Bu çalışma

Tablo 2. Ayçiçeği kabuğu hidrolizatının, hidrolizata adapte edilmiş *P.stipitis* ile fermantasyon sonuçlarının literatürle karşılaştırılması. (Comparison of fermentation results of sunflower seed hull hydrolysate with adapted *P.stipitis* and literature).

Deneş No	Ön İşlem	Başlangıç D-Ksiloz veya İndirgen şeker (g/L)	E _{MAKS} (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _p (g/Lsaat)	% harcanan indirgen şeker
1	Kontrol	47,50	16,33	0,35	0,120	99
2	CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon	44,30	9,51	0,32	0,057	67
3	CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon + Na ₂ SO ₃	45,00	9,51	0,30	0,050	70
4	Nötürleştirme	45,70	6,70	0,26	0,035	48

ayçiçeği tohum kabuğu hidrolizatına adapte edilmiş *P. stipitis* mayası kullanılarak fermente edilmiş ve en uygun zehir giderme yönteminin CaO ile pH 10'a aşırı titrasyon ön işlemi olduğu görülmüştür. Ayrıca hidrolizata uygulanan zehir giderme ön işlemleri sırasında hidrolizatın içerisinde bir miktar şeker kaybı olduğu yapılan analizler sonucu belirlenmiştir. Hidrolizat içerisinde kayıp olan şeker miktarı, ayçiçeği tohum kabuğu hemiselülozik hidrolizatına uygulanan farklı zehir giderme metotları geliştirilerek azaltılabileceği öngörülmektedir.

Bunun yanı sıra, mikroorganizmanın büyüme ortamında hidrolizata adapte edilmesi durumunda, ortamın hidrolizat miktarının artması ile ekspanansiyel fazın kısaldığı, mikroorganizmanın hidrolizata alışma evresinin giderek uzadığı ve ortamdaki mikroorganizma büyümesinin daha az olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2). Sonuç olarak literatürde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda (Tablo 2), mikroorganizma adaptasyonun beklendiği ölçüde etkili olmadığı, bu çalışmada kullanılan çevresel faktörlerinde fermantasyon performansını önemli ölçüde etkilediği öngörülmektedir. Ayrıca, adaptasyon tekniğinin geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışmanın yapılması sırasında desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a (Misag-152 kodlu proje) teşekkür ederim.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Nigam, J.N., "Bioconversion of water-hyacinth (*Eichornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast", **J. Biotechnol.**, Cilt 97, 107-116, 2002.
2. Olsson, L., Hahn-Hagerdal, B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production", **Enzyme and Microb. Tech.**, Cilt 18, 312-331, 1996.
3. Beyatlı, Y., **Biyoteknoloji ve Biyoprotein Üretimi**, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara, 54-59, 1996.
4. Telli-Okur, M., **Ayçiçeği tohum kabuğu hemiselüloz hidrolizatının ikole fermantasyon koşullarının ve kinetiğinin incelenmesi**, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2003.
5. Saraçoğlu-Eken, N., Arslan, Y., "Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with

- Pichia stipitis* and *Candida shehatae*". **Biotechnol. Lett.** Cilt 22, No 10, 855-858, 2000.
6. Stanburry, P. F., Whitaker, A., Hall, S.J., "Principles of fermentation technology", 2nd ed., Elsevier Science Ltd., US, 1995.
 7. Saha, B.C., "Hemicellulose bioconversion", **J. of Industrial Microb., and Biotech.**, Cilt 30, No 5, :279-291, 2003.
 8. Van Zyl, C., Prior, B.A., Du Preez, J.C., "Production of ethanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cilt 17, 357-369, 1988.
 9. Nigam, J.N., Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **J. Biotechnol.** Cilt 87, 17-27, 2001.
 10. Nigam, J.N., "Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid hydrolysate", **Journal of Applied Microbiology**, Cilt 90, 208-215, 2001.
 11. Ranatunga, T.D., Jervis, J., Helm, R.F., McMillan, J.D., Wooley, R.J., "The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics : the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics", **Enzyme and Microbial Technology**, Cilt 27, 240-247, 2000.
 12. Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification", **Bioresource Technology**, Cilt 74, 17-24, 2000.
 13. Sene, L., Converti, A., Zilli, M., Felipe, M.G.A., Silva, S.S., "Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugarcane bagasse hydrolysate", **Applied Microbiology and Biotechnology**, Cilt 57, 738-743, 2001.
 14. Mussatto, S.I., Roberto, I.C., "Alternatives for detoxification of dilute acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes : a review", **Bioresource Technology**, Cilt 93, No 1, 1-10, 2004.
 15. Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., "Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cilt 77-79, 91-103, 1999.
 16. Sharma, S.K., Kalra, K.L., Grewal, H.S., "Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up", **Bioresource Technology**, Cilt 85, 31-33, 2002.
 17. Kaya, Y., "Ayrıçığı kabuğunun değerlendirilmesi ve içeriği. CİNE-TARIM Dergisi", <http://www.cine-tarim.com.tr/dergi/sektorel06.htm> (13.01.2003).
 18. Gerçel, H.F., "Production and characterization of pyrolysis liquids from sunflower-pressed bagasse", **Bioresource Technology**, Cilt 85, 113-117, 2002.
 19. Slininger, P.J., Bothast, R.J., Cauwenberge, J.E.V., Kurtzman, C.P., "Conversion of D-xylose to ethanol by yeast *Pachysolen tannophilus*", **Biotechnology and Bioengineering**, Cilt 24, 371-384, 1982.
 20. Miller G L () Use of dinitrosalicylic acid reagent for reducing sugar. **Anal. Chem.**, Cilt 31, 426-430, 1959.
 21. Horwitz, W (Ed.), **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists**, 12th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington:DC 1980.
 22. Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., "Effects of Ca(OH)₂ treatments ("Overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates", **Biotechnology and Bioengineering**, Cilt 69, 526-536, 2000.
 23. Purvadi, R., Niklasson C., Taherzadeh M.J., "Kinetic study of detoxification of dilute acid hydrolysates by Ca(OH)₂", **J. of Biotechnology**, Cilt 114, 187-198, 2004.
 24. Hahn-Hagerdal, B., Jeppsson, H., Olsson, L., Mohagheghi, A., "An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate", **Applied Microb. Biotechnol.**, Cilt 41, 62-72, 1994.