

## Şeker Pancarı Melasından *Escherichia coli* KO11 Suşu ile Biyoetanol Üretimi: Enzimatik Hidroliz ve Kesikli Fermantasyon

Nur Kevser DOĞAN<sup>1</sup>, Mehmet KALENDER<sup>2\*</sup>

<sup>1,2</sup> Biyomühendislik, Mühendislik Fakültesi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye

<sup>1</sup> nurkevserd@gmail.com, <sup>2\*</sup> mkalender@firat.edu.tr

(Geliş/Received: 12/08/2022;

Kabul/Accepted: 08/11/2022)

**Öz:** Bu çalışmada, şeker pancarı melasından fermantasyonla biyoetanol üretimi incelenmiştir. Bu amaçla, iki aşamalı deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir: Melasın enzimatik hidrolizi ile basit şekerlerin üretilmesi ve hidrolizattan *E.coli* KO11 ile biyoetanol üretilmesi. Enzimatik hidroliz deney parametreleri (melas konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve süre) cevap yüzey metodu (RSM) ile optimize edilmiştir. Cevap değişkeni olarak indirgen şeker konsantrasyonu seçilmiştir. Fermantasyon deneyleri aneorobik kesikli sistemde yürütülmüştür. RSM-ANOVA testleri ile enzimatik hidroliz için kuadratik modelin en uygun model olduğu belirlenmiştir. İncelenen tüm bağımsız değişkenlerin model üzerinde etkili olduğu, ikili etkileşimlerden sadece konsantrasyon-süre ikili etkileşiminin model üzerinde etkili olmadığı ve süre kuadratik etkisinin önemli olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır. Enzimatik hidroliz için optimum deneysel parametre değerleri 87,7 g/L melas konsantrasyonu, %0,45 (v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saat olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda melastaki sakarozun yaklaşık %96'sı enzimatik hidrolizle basit şekerlere dönüştürülmüştür. Fermantasyon deneyleri sonucunda, 24. Saat sonunda maksimum biyoetanolün 0,489 g/g verimle üretildiği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyoetanol, şeker pancarı melası, enzimatik hidroliz, optimizasyon, kesikli fermantasyon.

## Bioethanol Production from Sugar Beet Molasses using *E. coli* KO11 Strain: Enzymatic Hydrolysis and Batch Fermentation

**Abstract:** In this study, bioethanol production from sugar beet molasses was investigated. For this purpose, Experiments consisting of two stages were carried out: Production of simple sugars by enzymatic hydrolysis of molasses and production of bioethanol from the hydrolysate with *E.coli* KO11. The enzymatic hydrolysis experimental parameters (molasses concentration, enzyme concentration, and time) were optimized using response surface method (RSM). The response variable was reducing sugar concentration. The fermentation experiments were conducted in anaerobic batch system. RSM-ANOVA tests showed that the quadratic model is the best model. It was concluded that all the independent variables examined were effective on the model, only the concentration-time binary interaction was not effective on the model, and the time quadratic effect was important. Optimum experimental parameter values for enzymatic hydrolysis were determined as 87,7 g/L molasses concentration, %0,45 (v/v) enzyme concentration, and 15,93 hours. At optimum conditions, sucrose in the molasses was converted to simple sugars with yield as approximately 96%. As a result of the fermentation experiments, it was determined that the maximum bioethanol was produced with a yield of 0.489 g/g at the end of the 24th hour.

**Key words:** Bioethanol, sugar beet molasses, enzymatic hydrolysis, optimization, batch fermentation.

### 1. Giriş

Son yıllarda küresel ısınma ve iklim değişikliği dünyada yoğun olarak tartışılmaktadır. Araç ve fabrikalardan salınan gazlardan dolayı hava kirliliği bu tür problemlere yol açan nedenlerdendir. Fosil yakıt kullanılarak çalışan araçlar ve sanayi faaliyetlerindeki artış hava kirliliğine doğrudan katkıda bulunmaktadır. Önemli oranda nüfus artışı ile birlikte kentsel hareketliliği artacağından dolayı ulaşım araçlarının sayısında bir azalış zor gözükmemektedir. Fosil yakıtların bu zararlı etkilerinin yanında, kullanım sonucu kaynak tükenmesi ve fiyat dalgalanmaları da karşılaşılan önemli başka sorunlardır [1]. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, küresel ısınma ve iklim değişikliği ile mücadelede çeşitli protokollere katılma ve uygulama zorunlulukları getirilmiş ve getirilmeye devam etmektedir. Bu tür bir uygulamaya son zamanlarda verilebilecek bir örneği, Avrupa Yeşil Mutabakatına göre 2050 yılına kadar sera gazı salınımının sıfıra indirgenmesidir [2]. Çevre açısından fosil yakıtlara alternatif yeni enerji kaynağı geliştirme zorunluluğunun, farkındalık oluşması seviyesinde olduğu düşünülmektedir. Yenilenebilir olarak da adlandırılan bu tür enerji türleri başlıca biyokütle, güneş, rüzgâr, jeotermal ve hidroelektrik olmak üzere sınıflandırılabilir. Dünyada mevcut yenilenebilir enerji kaynaklarının yaklaşık %73'lük gibi büyük bir kısmını

\* Sorumlu yazar: [mkalender@firat.edu.tr](mailto:mkalender@firat.edu.tr). Yazarların ORCID Numarası: <sup>1</sup> 0000-0003-0155-207X, <sup>2</sup> 0000-0002-8932-8840

biyoyakıtlar oluşturmaktadır [3]. İktisadi İşbirliği ve Gelişme Teşkilatı (OECD) raporuna göre, 2050'ye kadar, küresel taşımacılıkta biyoyakıtların kullanım payının %15-23 arasında olacağı öngörülmektedir [4]. Biyoyakıtlar son ürünün özelliğine göre katı, sıvı ve gaz halde bulunabilir.

Günümüzde, petrol ürünlerine alternatif olabilecek biyoyakıtlar çoğunlukla biyoetanol, biyodizel ve biyohidrojenlerdir [4]. Biyoetanol basit şeker ya da belirli yöntemlerle basit şeker elde edilebilecek hammaddeden mikrobiyal fermantasyon ile üretilen etil alkol olarak tanımlanabilir. Kimyasal yöntemlerle elde edilen etil alkolden farkı olmayan biyoetanolün kimyasal formülü de aynıdır [5]. Benzinde sınırsız çözünürlük, oksijenli yakıt, yüksek oktan, düşük setan sayıları ve elverişli otomatik ateşleme sıcaklığı gibi birçok avantajıyla biyoetanol, benzinli ve dizel araçlarda kullanılabilir [1, 6]. Bu özellikleri ile gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, yasal düzenlemelerle, biyoetanolün petrol türevli yakıtlara belirli oranlarda karıştırılarak kullanılması gün geçtikçe artmaktadır [7]. Elektrikli araçlar da dahil yakıt performanslarının karşılaştırıldığı bir çalışmada en avantajlı aracın biyoetanol kullanılan araç olduğu sonucuna ulaşılmıştır [8]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Brezilya, Çin ve Avrupa Birliği (AB) gibi ana üretici ülkeleri tarafından küresel biyoetanol üretiminin 2019 yılında yaklaşık 30 milyar galona ulaştığı rapor edilmiştir [9].

Öte taraftan, etil alkol sağlık başta olmak üzere birçok alanda dezenfektan olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir [10]. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de, 2019 yılındaki COVID-19 pandemik şartlarda sterilizasyon ve dezenfeksiyonda kullanılan en önemli ajanlardan bir olan etil alkol tedarik zincirinde büyük problemler ortaya çıkmıştır. Bu kapsamda, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu (EPDK)'nın 13 Mart 2020'de alınan kararı gereği benzine %3 oranında Biyoetanol Harmanlanması Düzenlemesi 3 aylığına askıya alınmıştır [11]. Görüldüğü üzere biyoetanol birçok alanda kullanımı olan değerli bir maddedir.

Biyoetanol, hammadde kaynağına bağlı olarak 4 kategoride üretilmektedir: birinci nesil (şeker kamışı, şeker pancarı, mısır, pirinç, buğday gibi yenilebilir materyaller), ikinci nesil (lignoselülozik materyaller) ve üçüncü nesil (algal biyokütle) [12, 13]. Şeker pancarı melası yaklaşık olarak %50 oranında sakaroz içerir ve ikinci ve üçüncü nesil biyoetanol üretim kaynaklarına göre ön işlem aşamalarına gerek duyulmadan direkt olarak fermantasyonda kullanılabilir. Fakat, sakarozu direkt olarak fermente edemeyen mikroorganizmalar için sakarozu glikoz ve früktoza dönüştüren bir hidroliz işlemine ihtiyaç duyulabilir [14]. Hidroliz işleminde yaygın olan yöntemler asidik ve enzimatik hidrolizlerdir [1, 15].

Biyoetanol üretiminde hidroliz sonrası gerçekleştirilen fermantasyon aşamasında en çok kullanılan mikroorganizmalar *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, ve rekombinant *Escherichia coli* dir. Maya sadece 6 karbonlu şekerleri fermente edebilir. *Z. mobilis* ise fermantasyon ortamlarında çok dayanıklı bir mikroorganizma değildir. Rekombinant *E. coli* KO11 hem ortam dayanıklılığı hem de 5 ve 6 karbonlu şekerleri aynı anda metabolize edebilme özellikleri ile biyoetanol üretiminde tercih edilebilecek bir suştur [16, 17].

Bu çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, şeker pancarı melasının enzimatik hidroliz şartları Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) ile optimize edilmiştir. İkinci aşamada optimum şartlardaki hidrolizattan rekombinant *E. coli* KO11 kullanarak kesikli sistemde biyoetanol üretimi incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Deneyel çalışmalarda kullanılan *E. coli* KO11 suşu Bölümümüzde mevcut olup American Type Culture Collection ATCC hücre kültür koleksiyonundan satın alınmıştır. Fermantasyon çalışmalarında kullanılan şeker pancarı melası Elazığ Şeker fabrikasından temin edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında 2000 U/g aktiviteye sahip invertaz enzimi (Tito NT91) 20 kat seyreltilerek kullanılmıştır.

### 2.2. Mikroorganizma suşunun canlandırılması ve saklanması

Deneyel çalışmalarda kullanılan suşun canlandırılması ve muhafazasında, satın alımın yapıldığı ATCC şirketinin web sayfasında tavsiye edilen ortamlardan yararlanılmıştır [18]. Liyofilize haldeki suş aseptik koşullarda %0,9'luk NaCl çözeltisi içerisine alınmıştır. Suş ortamı 20 g/L glikoz, 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar ve 40 mg/L kloramfenikol içeriğindeki modifiye katı Luria-Bertani (LB) bulunduran petri kaplarına ekilmiştir. Çoğalan rekombinant bakteri, 250 ml'lik erlen de 50 ml çalışma hacminde olan sıvı LB ortamına aktarılmıştır. 37 °C'de 100 rpm ve 16 saat süreyle İnkübasyon işlemi sonrasında çoğalan mikroorganizmalar %60'lık gliserol içeren mikrosantrifüj tüplerine alınarak -80 °C'de stok olarak muhafaza edilmiştir.

### 2.3. Enzimatik hidroliz ve optimizasyon çalışmaları

Enzimatik hidrolizle şeker pancarı melasındaki sakarozun glikoz ve früktoza parçalanması deneysel şartları RSM ile merkezi kompozit dizayn (MKD) kullanılarak optimize edilmiştir. Bu amaçla, melas konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve hidroliz süresi bağımsız değişkenler; hidrolizattaki indirgen şeker ve dönüşmeyen sakaroz konsantrasyonları ise cevap değişkeni olarak kullanılmıştır. RSM ile oluşturulan kodlu değerler tablosu Tablo 1’de, MKD ile tasarlanan deneysel parametreler ve deney şartları ise Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Şeker pancarı melasının enzimatik hidrolizi için RSM ile oluşturulan bağımsız değişkenlere ait kodlu değerler tablosu

Faktör	Değişkenler	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
A	Melas konsantrasyonu (g/L)	50	70,27	100	129,73	150
B	Enzim konsantrasyonu (% v/v)	0,1	0,282	0,55	0,817	1
C	Süre (saat)	2	4,46	13	19,54	24

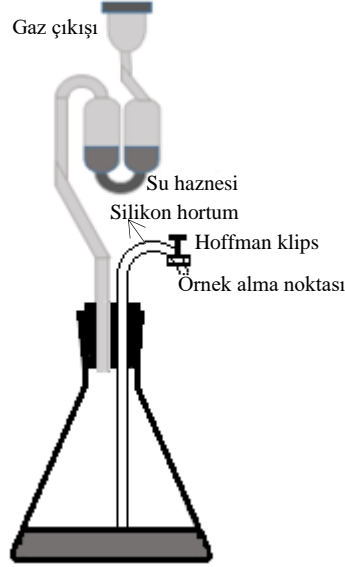
**Tablo 2.** MKD ile tasarlanan deney tablosu

Deney No	A: Melas Konsantrasyonu (g/L)	B: Enzim Konsantrasyonu (% v/v)	C: Süre (saat)
1	70,27	0,28	6,46
2	129,73	0,28	6,46
3	70,27	0,82	6,46
4	129,73	0,82	6,46
5	70,27	0,28	19,54
6	129,73	0,28	19,54
7	70,27	0,82	19,54
8	129,73	0,82	19,54
9	50,00	0,55	13,00
10	150,00	0,55	13,00
11	100,00	0,10	13,00
12	100,00	1,00	13,00
13	100,00	0,55	2,00
14	100,00	0,55	24,00
15	100,00	0,55	13,00
16	100,00	0,55	13,00
17	100,00	0,55	13,00
18	100,00	0,55	13,00
19	100,00	0,55	13,00
20	100,00	0,55	13,00

### 2.4. Fermantasyon deneyleri

Enzimatik hidrolizle optimum şartlarda elde edilen hidrolizat 20,24 g/L indirgen şeker içerecek şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilen hidrolizat ortamı steril edilmek üzere 121 °C’de 15 dak. otoklavlanmıştır. Hidrolizatların pH’ı 5 M NaOH çözeltisi ile 6’ya ayarlanmıştır. Rekombinant suşun uygun şartlarının sağlanması için hidrolizatlara antibiyotik olarak kloramfenikol, 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L pepton ve 5 g/L NaCl ilave edilmiştir. Fermantasyon çalışmalarında bakteri gelişim ortamı için de suşun satın alındığı şirketin web sayfasında tavsiye edilen şartlardan yararlanılmıştır [18]. Steril hidrolizat kullanarak rekombinant E. Coli KO11 ile fermantasyonla biyoetanol üretim çalışmaları kesikli sistemde anaerobik şartlarda yürütülmüştür. Kesikli fermantasyon deneyleri

temsili bir şekli Şekil 1’de gösterilen deney setinde, CO<sub>2</sub> çıkışına izin veren ağızı kapalı anaerobik şartların sağlandığı 250 ml’lik erlenlerde 50 ml’lik çalışma hacminde, 37°C’de çalkalamalı inkübatörde 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon deneylerinde, belirli sürelerde, steril şartlar sağlanarak alınan örneklerde GC ile alkol analizleri yapılmıştır.



Şekil 1. Fermantasyon çalışmalarının gerçekleştirildiği temsili bir şekil.

## 2.5. Şeker analizleri

Şeker analizleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. HPLC kolonu ICE-COREGEL-87H3 (300 mm uzunluk, 7.8 mm çap, 20.0 ul hacim) idi. Kolon sıcaklığı 45 °C olup, kolonda taşıyıcı sıvı olarak 0,6 mL/dak. akış hızındaki 5 mM’lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Şeker analizi yapılacak olan hidrolizat ve fermantasyon ortamları, analizlerden önce 0,45 µm’lik filtrelerden geçirilmiştir. Analizlerde örnek hacmi 1 µL’dir.

## 2.6. Alkol analizleri

Alkol analizleri gaz kromatografisinde (GC) BP20 kolon ( 25 m uzunluk, 0,32 mm çap, 0,25 µm film kalınlığı) kullanılarak, kolon sıcaklığı 140 °C ‘de 6 mL/dak. taşıyıcı gaz (azot) akış hızıyla gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 1 µL’dir. Alkol analizi yapılacak örnekler de 0,45 µm’lik filtrelerden geçirilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Enzimatik hidroliz için optimizasyon sonuçları

Design Expert ile lineer, iki faktöriyel etkileşim, kuadratik ve kübik eşitlikleri kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucu, program tarafından cevap değişkenlerini incelenen bağımsız değişkenlere bağlayan bir model eşitliği önerilmiştir. En önemli modelin kuadratik etkileşim eşitliği olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kuadratik etkileşim için ANOVA test sonucu Tablo 3’te verilmiştir. Tablo 3’ten görüldüğü gibi önerilen model için p değeri (<0,0001) 0,05’ten küçüktür. Bu, program tarafından önerilen modelin önemli olduğunun göstergesidir. RSM ile gürültü nedeniyle 96,70 kadar büyük bir F değerinin ortaya çıkma olasılığının yalnızca %0.01 olduğu sonucu da elde edilmiştir. Tablo 3’ten model üzerinde etkili olan parametre ve etkileşimlerin p-değeri 0,05’ten küçük olan A, B, C, AB, AC ve C<sup>2</sup> olduğu anlaşılmaktadır. Görüldüğü gibi incelenen tüm bağımsız değişkenler model üzerinde etkilidir. İkili etkileşimlerden ise enzim konsantrasyonu-süre etkileşimi hariç diğer ikili etkileşimin model üzerinde etkili olduğu Tablo 3’ten açıkça görülmektedir. Ayrıca, kuadratik etkinin model denkleminde önemli

olduğu tek parametre süredir. Modelde önemi olmayan parametreler çıkarılarak yapılan RSM-MKD analizi sonucu elde edilen model uyumluluğuna ait istatistiksel parametreler Tablo 4'te verilmiştir. Tablo 3.2'den görüldüğü üzere  $R^2$  değeri 0,9859 olup, bu model uyumluluğunun iyi olduğunu gösterir. Adj  $R^2$  ve Pred  $R^2$  arasındaki fark (0,028) 0,2'den küçük olduğundan, bu iki parametre uyumludur. Kesinlik oranı değeri sinyal-gürültü oranını ölçer ve bu değer 4'ten büyük olması istenir. Tablo 4'ten görüldüğü üzere bu oran 41,531 dir ve 4'ten büyüktür. Bu ise, RSM ile önerilen modelin tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir olduğunun göstergesidir [19]. Tablo 4'te 4,42 olarak elde edilen CV% değeri %10'dan düşük olduğundan, önerilen model tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu söylenebilir [20].

**Tablo 3.** RSM ile elde edilen ANOVA test sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	3820,13	424,46	96,70	<0,0001	<u>Önemli</u>
A- Melas Kons.	2856,90	2856,90	650,86	<0,0001	
B-Enzim Kons.	97,54	97,54	22,22	0,0008	
C-Süre	347,28	347,28	79,12	<0,0001	
AB	149,45	149,45	34,05	0,0002	
AC	108,34	108,34	24,68	0,0006	
BC	9,93	9,93	2,26	0,1635	
A <sup>2</sup>	0,81	0,81	0,18	0,6769	
B <sup>2</sup>	0,0045	0,0045	0,00102	0,9751	
C <sup>2</sup>	247,74	247,74	96,70	<0,0001	

**Tablo 4.** RSM ile uygunluk testine ait istatistiksel parametre değerleri

Standart Sapma	2,05	$R^2$	0,9859
Ortalama	46,34	Adj $R^2$	0,9793
Varyans Katsayısı (C.V) %	4,42	Pred $R^2$	0,9512
PRESS	188,46	Kesinlik oranı	41,531

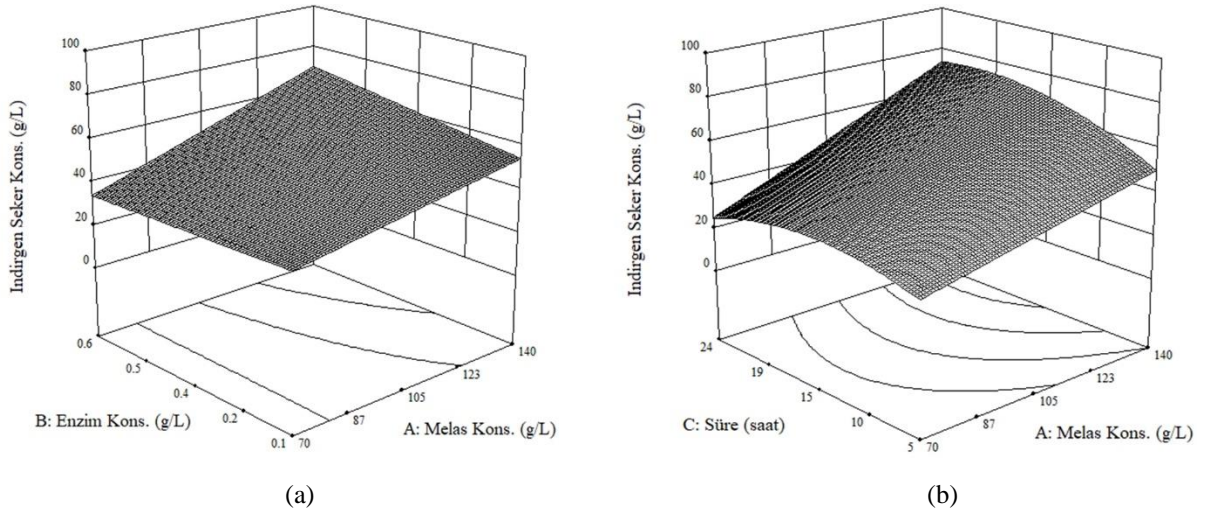
RSM-MKD analizleri sonucunda cevap değişkeninin bağımsız değişkenlerle değişimini gösteren eşitlik gerçek değerler cinsinden aşağıda verilmiştir:

$$\text{İŞK} = 23,173 - 0,0583c_M - 44,344c_E + 1,386t + 0,543c_Mc_E + 0,019c_Mt - 0,096t^2 \quad (1)$$

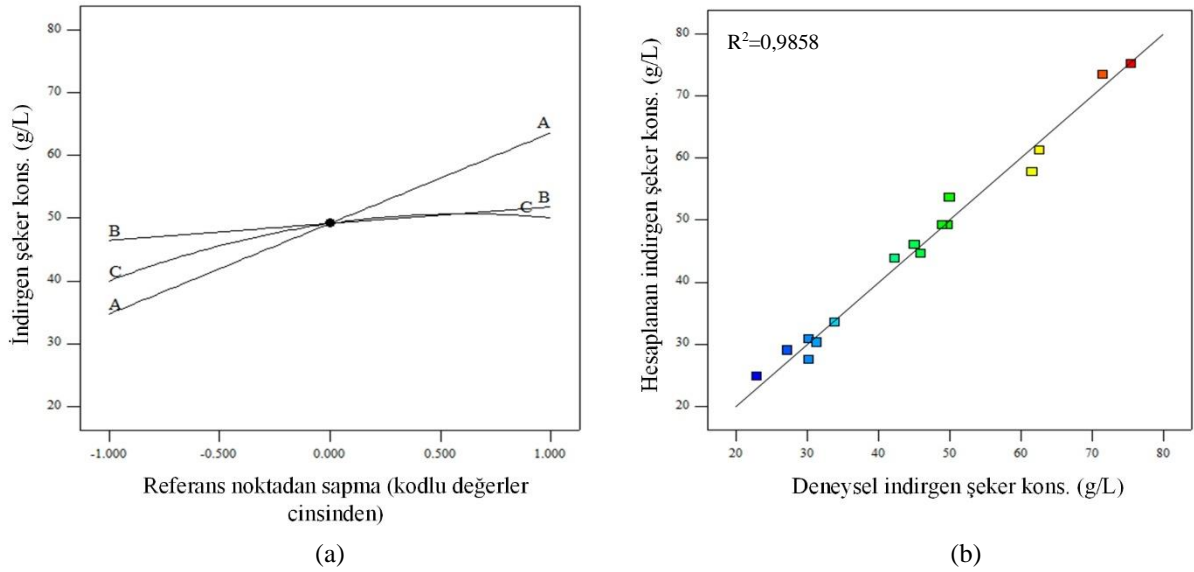
Burada, İŞK indirgen şeker konsantrasyonu (g/L),  $c_M$  melas konsantrasyonu (g/L),  $c_E$  enzim konsantrasyonu (%v/v) ve t süre (saat) dir.

Desing Expert programı ile bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerindeki etkilerini gösteren 3D grafikler de oluşturulabilir. Bu şekilde model üzerinde önemli olan parametreler için oluşturulan 3D grafikleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekil 2a'da gösterilen enzim konsantrasyonu-melas konsantrasyonu ikili etkileşim grafiğinden görüldüğü gibi, indirgen şeker konsantrasyonu melas konsantrasyonu arttıkça belirgin bir şekilde artmaktadır. Ayrıca, düşük melas konsantrasyonu değerlerinde ortamda bulunan sakarozun indirgen şekerlere dönüşümü içi en düşük enzim konsantrasyonun dahi yeterli olduğu, buna karşılık yüksek melas konsantrasyonlarında indirgen şekerlere dönüşümün enzim konsantrasyonu artışıyla arttığı gözlenmiştir. Tablo 3'te verildiği gibi, melas konsantrasyonu ve süre için <0,0001 gibi düşük p-değerleri elde edilirken, enzim konsantrasyonu için p-değerinin 0,0008 olması bu sonucu desteklemektedir. Süre-melas konsantrasyonu ikili etkileşiminin indirgen şeker üretimi üzerine etkisinin gösterildiği Şekil 2b'de melas konsantrasyonu artışının indirgen şeker verimini belirgin olarak arttırdığı burada da gözlenmektedir. Düşük melas konsantrasyonu değerlerinde, artan süre ile indirgen şeker konsantrasyonunun yaklaşık 18. saate kadar arttığı, bu süreden sonra sabit kaldığı Şekil 2b'den gözlenen bir diğer sonuçtur. Benzer bir değişimin, daha belirgin bir şekilde, yüksek melas konsantrasyonları için de elde edildiği söylenebilir. RSM ile oluşturulan pertürbasyon grafiği ve cevap

değişkeninin deneysel değerlerine karşılık model denkleminde hesaplanmış değer değişimini gösteren grafik Şekil 3'te gösterilmiştir. Şekil 3a'da gösterilen pertürbasyon grafiğinden, melasın enzimatik hidrolizi ile elde edilen indirgen şeker konsantrasyonunun, bağımsız değişkenlerin çalışılan aralıklarında, melas konsantrasyonu ile lineer olarak arttığı anlaşılmaktadır. Benzer bir değişim enzim konsantrasyonu için çok daha düşük bir artış oranıyla gerçekleşmektedir. Sürenin indirgen şeker üretimi üzerindeki etkisini gösteren pertürbasyon eğrisinden yüksek enzimatik muamele sürelerinde indirgen şeker konsantrasyonunun sabit değer aldığı görülmektedir. Kuadratik etkinin sadece süre (C) parametresinde önemli olduğu belirlenen ANOVA tablosu (bkz. Tablo 3 p değerleri) bu sonucu desteklemektedir. Deneysel indirgen şeker konsantrasyonu ile model kullanılarak hesaplanan indirgen şeker konsantrasyonu değişimi, Şekil 3b'de gösterildiği gibi, diagonal üzerindedir. Bu durum, deneysel ve hesaplanmış cevap değişkeni değerlerinin uyumlu olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 2. Şeker pancarı melasının enzimatik hidrolizi için RSM ile oluşturulan 3D grafikleri: (a) enzim konsantrasyonu-melas konsantrasyonu, (b) süre-melas konsantrasyonu etkileşimleri



Şekil 3. Şeker pancarı melasının enzimatik hidrolizi için RSM ile oluşturulan pertürbasyon (a) ve deneysel-hesaplanan indirgen şeker konsantrasyonu (b) grafikleri

RSM analizleri sonucu program tarafından önerilen deneysel çalışma şartları 87,7 g/L melas konsantrasyonu, %0,45 (v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saattir. Bu şartlarda elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu 43,936 g/L ve sakaroz konsantrasyonu 1,879 g/L'dir. Önerilen şartlarda gerçekleştirilen doğrulama deneyi ile elde edilen sonuçlar ise 41,88 g/L indirgen şeker ve yaklaşık 2 g/L sakarozdur. Görüldüğü gibi doğrulama deneyi ile model sonucu oldukça uyumludur. Enzimatik hidroliz ile melas içeriğindeki sakarozu enzimatik hidrolizle basit şekerlere dönüştürülmesine yönelik yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlarla, bu çalışmadaki sonuçlar uyum içerisindedir [21].

### 3.2. Biyoetanol üretim sonuçları

Şeker pancarı melasının enzimatik hidrolizi sonrası, aneorobik ortamda rekombinant *E. Coli* KO11 ile yürütülen fermentasyon deneyleri ile biyoetanol üretilmiştir. Zamanla üretilen alkol konsantrasyonu ölçüm deneylerinden maksimum biyoetanol konsantrasyonuna (9,9 g/L) 24. Saatte ulaşılmıştır. Bu süreden sonra biyoetanol üretiminde az da olsa bir düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüşün sebebinin, fermentasyon sonucunda şekerin glukonik asit gibi asit yan ürünlere dönüşmesi olduğu düşünülmektedir [22]. Biyoetanol üretim verimi g/g olarak aşağıdaki formülle hesaplanabilir [23, 24]:

$$\text{Biyoetanol üretim verimi} = \frac{\text{Maksimum üretilen biyoetanol konsantrasyonu} \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Tüketilen şeker konsantrasyonu} \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (2)$$

Denklem (2) kullanılarak hesaplanan biyoetanol üretim verimi 0,489 (g/g) olarak hesaplanmıştır. Tablo 5'te *E.coli* KO11 ile daha önce yapılan bazı çalışmalarda farklı karbon kaynaklarından üretilen ve bu çalışmada üretilen biyoetanol verim değerleri verilmiştir. Tablo 5 incelendiğinde, *E. coli* KO11 kullanılarak farklı karbon kaynaklarından üretilen biyoetanol verimleri içerisinde bu çalışmadaki değer en yüksek olduğu açıkça görülmektedir.

**Tablo 5.** Daha önce yapılmış bazı çalışmalarda ve bu çalışmada *E. coli* KO11 kullanılarak farklı karbon kaynaklarından elde edilen biyoetanol verim değerleri

Karbon kaynağı	Hidroliz türü	Optimum fermentasyon süresi (saat)	Verim (g EtOH/g indirgen şeker)	Referans
Pirinç kabuğu ve pamuk	Asidik	72	0,413-0,440	[23]
LB besi yeri (glikoz ve ksiloz)	-	Glikoz için 48 Ksiloz için 72	0,372-0,425	[25]
Atık evsel ahşap	Buhar patlatma ve asidik	40	0,420	[26]
Arabinoz, glikoz ve ksiloz	-	57	0,46-0,47	[27]
Şeker pancarı küspesi	Asidik+Enzimatik	48	0,4	[28]
Sükroz ilave edilen şeker kamışı melası	-	96	Çok düşük*	[29]
Şeker pancarı melası	Enzimatik	24	0,489	Bu çalışma

\* Bu çalışmada elde edilen sonuç alkol konsantrasyonu olarak verilmiştir. Tüketilen şeker konsantrasyonu bilinmediğinden g/g olarak verim hesaplanamamıştır. Fakat, etanol üretiminin çok düşük olduğu ve daha çok laktik asit üretildiği bildirilmiştir.

### 4. Genel Sonuçlar ve Öneriler

Şeker pancarı melasının enzimatik hidrolizi ile elde edilen hidrolizattan rekombinant *E. coli* KO11 kullanılarak biyoetanol üretiminin incelendiği bu çalışmada, enzimatik hidroliz için optimum deneysel çalışma şartları 87,7 g/L melas konsantrasyonu, %0,45 (v/v) enzim konsantrasyonu ve 15,93 saat olarak belirlenmiştir. Bu şartlarda, melastaki sakaroz ağırlıkça yaklaşık %96'lık bir verim değeri ile fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmüştür. Hidrolizattan çalışılan suş ile 0,489 g/g verim değeri ile maksimum biyoetanol üretilmiştir. Bu

konuda çalışan araştırmacılara bundan sonraki süreçlerde, biyoetanol üretim deneyleri için şeker konsantrasyonu, fermantasyon süresi, pH, sıcaklık vb. parametrelerin optimizasyonunu incelemeleri önerilmektedir.

## Teşekkür

Yazarlar bu çalışmaya MF.17.13 proje numarası ile maddi desteğinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) birimine teşekkür eder.

## Kaynaklar

- [1] Balat M, Balat H, Öz C. Progress in bioethanol processing. Progress in energy and combustion science 2008; 34(5): 551-573.
- [2] Anonim-1,A European Green Deal. 2019-2024; [https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal\\_en](https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en); Erişim Tarihi: 10.10.2021.
- [3] Celebi A, Alparslan U. Biyoyakıtlara Yönelik Mali Teşvikler: Türkiye Açısından Bir değerlendirme. Hacettepe Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi 2015; 33(2): 24-45.
- [4] Piwowar A, Dzikúć M. Bioethanol Production in Poland in the Context of Sustainable Development- Current Status and Future Prospects. Energies 2022; 15(7): 2582.
- [5] Walker G M, Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol, Bookboon, 2010.
- [6] Slathia P S, Raina N, Kiran A, Kour R, Bhagat D, Sharma P. Dilute acid pretreatment of pine needles of *Pinus roxburghii* by response surface methodology for bioethanol production by separate hydrolysis and fermentation. Biomass Conversion and Biorefinery 2020; 10(1): 95-106.
- [7] Rodríguez-Antón L M, Legrand M, Gutiérrez-Martín F, Serrano-Corroto Á. Theoretical determination of distillation curves of gasoline, ethanol and ethyl tert-butyl ether ternary blends from the experimental distillation curve of gasoline. Fuel 2022; 308(122030).
- [8] Verger T, Azimov U, Adeniyi O. Biomass-based fuel blends as an alternative for the future heavy-duty transport: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2022; 161(112391).
- [9] Letti L A J, Sydney E B, de Carvalho J C, de Souza Vandenberghe L P, Karp S G, Woiciechowski A L, ve diğerleri Burgos W J M, Roles and impacts of bioethanol and biodiesel on climate change mitigation, in: Biomass, Biofuels, Biochemicals, Elsevier, 2022, pp. 373-400.
- [10] Reynolds K A, Sexton J D, Pivo T, Humphrey K, Leslie R A, Gerba C P. Microbial transmission in an outpatient clinic and impact of an intervention with an ethanol-based disinfectant. American journal of infection control 2019; 47(2): 128-132.
- [11] Anonim-2,COVID-19 ile Mücadele Kapsamında Atılan Adımlar. 2022; <https://sanayi.gov.tr/covid-19/etil-alkol-maske-kolonya#etil-alkol-kullanimi>; Erişim tarihi: 27.06.2022
- [12] Tavva S M D, Deshpande A, Durbha S R, Palakollu V A R, Goparaju A U, Yechuri V R, ve diğerleri Muktinutalapati V S R. Bioethanol production through separate hydrolysis and fermentation of *Parthenium hysterophorus* biomass. Renewable Energy 2016; 86(1317-1323).
- [13] Zhu Z S, Zhu M J, Xu W X, Liang L. Production of bioethanol from sugarcane bagasse using  $\text{NH}_4\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  pretreatment and simultaneous saccharification and co-fermentation. Biotechnology and bioprocess engineering 2012; 17(2): 316-325.
- [14] Ghorbani F, Younesi H, Sari A E, Najafpour G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. Renewable Energy 2011; 36(2): 503-509.
- [15] Sindhu R, Binod P, Gnansounou E, Prabisha T P, Thomas L, Mathew A K, ve diğerleri Faraco V. Enzymatic hydrolysis of microwave assisted acid pretreated chili postharvest residue for production of value added products. 2018; 56(479-483).
- [16] Nigam J. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. Journal of biotechnology 2001; 87(1): 17-27.
- [17] Jarboe L, Grabar T, Yomano L, Shanmugan K, Ingram L, Development of ethanologenic bacteria, in: In: Biofuels, Olsson, L. (Series Editor), Scheper, T. (Volume Editor), Springer, New York, 2007, pp. 237-261.
- [18] Anonim-3,ATCC: *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (*Escherichia coli* strain K011). 2022; <https://www.atcc.org/products/55124>; Erişim tarihi: 11.10.2022
- [19] Erkan Türkmen K. Bakteriyorodopsin Üretimi, Saflaştırılması ve Biyo optoelektronik Cihazlarda Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. 2020.



- [20] Alslaibi T M, Abustan I, Ahmad M A, Foul A A. Cadmium removal from aqueous solution using microwaved olive stone activated carbon. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2013; 1(3): 589-599.
- [21] Najafpour G D, Shan C P. Enzymatic hydrolysis of molasses. *Bioresource Technology* 2003; 86(1): 91-94.
- [22] Obeta J C, Ossai E C, Njoku O U. Optimization and characterization of bioethanol production from Abrus seed flour. *International Journal of Energy Research* 2021; 45(3883-3898).
- [23] Imamoglu E, Sukan F V. The effects of single and combined cellulosic agrowaste substrates on bioethanol production. *Fuel* 2014; 134(477-484).
- [24] Li X, Kim T H, Nghiem N P. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource technology* 2010; 101(15): 5910-5916.
- [25] Yomano L, York S, Ingram L. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998; 20(2): 132-138.
- [26] Okuda N, Ninomiya K, Takao M, Katakura Y, Shioya S. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. *Journal of bioscience and bioengineering* 2007; 103(4): 350-357.
- [27] Dien B S, Hespell R B, Wyckoff H A, Bothast R J. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme and microbial technology* 1998; 23(6): 366-371.
- [28] Zheng Y, Lee C, Yu C, Cheng Y-S, Zhang R, Jenkins B M, VanderGheynst J S. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied Energy* 2013; 105(1-7).
- [29] Silva G P d, Araújo E F d, Silva D O, Guimarães W V. Ethanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology* 2005; 36(395-404).