



YER FISTIĞI KABUĞUNDAN BİYOETANOL ÜRETİMİ

Cihan Bostancı, Sevgi Ertuğrul Karatay, Gönül Dönmez*
Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 31.08.2018; Kabul / Accepted: 03.03.2019; Online baskı / Published online: 19.03.2019

Bostancı, C., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. (2019). Yer fıstığı kabuğundan biyoetanol üretimi. GIDA (2019) 44 (2): 291-300 doi: 10.15237/gida.GD18091

Bostancı, C., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. (2019). Bioethanol production from peanut shell. GIDA (2019) 44 (2): 291-300 doi: 10.15237/gida.GD18091

ÖZ

İkinci nesil biyoyakıtların önemi her geçen gün artmaktadır. Yer fıstığı ülkemizde bol miktarda yetişen bir tarım ürünüdür. Lignoselülozik bir tarımsal atık olan yer fıstığı kabuğu ikinci nesil biyoyakıt üretiminde biyokütle olarak kullanılabilir. Yapılan deneylerde, üretilen biyoetanolü optimize etmek amacıyla farklı kabuk konsantrasyonları, hidroliz koşulları, Accellerase 1500 enzim kullanımı, inkübasyon koşulları, inokülasyon oranı ve farklı azot kaynakları denenmiştir. Denemeler sonucunda, enzimatik hidrolizle %10 kabuk ve 1 g/L soya unu ile hazırlanan besiyerlerinde, 12 saatte, aerobik koşullarda ve maya optik yoğunluğu 0.86 olduğunda etanol üretiminin 2.24 g/L olduğu belirlenmiştir. İnokülasyon oranı ve inkübasyon süresi arttığında maya gelişimi OD₆₀₀: 6.0'a kadar yükselmiş ancak etanol üretimi düşmüştür.

Anahtar kelimeler: Yer fıstığı kabuğu, biyoetanol, yenilenebilir enerji, biyokütle.

BIOETHANOL PRODUCTION FROM PEANUT SHELL

ABSTRACT

The importance of second generation biofuels is increasing day by day. Peanut is an agricultural product that is abundantly produced in Turkey. Peanut shell which is a lignocellulosic agricultural biomass may be used to produce biofuel. In experiments to optimise bioethanol production, different shell loading concentrations, pretreatment conditions, the usage of Accellerase 1500 enzyme, incubation conditions, inoculation ratios and different nitrogen source were studied. In the media preparing with peanut shell sugar, obtaining after enzymatic hydrolysis, the bioethanol concentration and yeast growth was obtained as 2.24 g/L and 0.86 (OD₆₀₀) in the presence of 10% shell loading and 1 g/L soy flour at the end of 12 hours incubation time in aerobic conditions. Higher yeast growth such as 6.0 (OD₆₀₀), lower bioethanol production were obtained when the inoculation ratio and incubation times were increased.

Keywords: Peanut shell, bioethanol, renewable energy, biomass.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gdonmez@ankara.edu.tr

☎ (+90) 312 212 6720/ 1137

☎ (+90) 312 223 2395

GİRİŞ

Fosil yakıtların tükenmeye başlaması ve artan karbon emisyonu biyoetanole olan ilgiyi arttırmıştır (Martín ve Thomsen, 2007). Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere birçok ülkede, etanol-yakıt karışımları araçlarda kullanılmaktadır. Karbon emisyonunu azaltmak amacıyla ülkemizin de imzaladığı Kyoto Protokolü gereğince ülkemizde de benzin-etanol karışımı kullanımının önü açılmıştır. Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu (EPDK) tarafından 07.07.2012 tarih ve 28346 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan tebliği uyarınca 01.01.2014 tarihinden itibaren benzine en az %3 (v/v) oranında yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanolün harmanlanması zorunlu kılınmıştır.

Dünyanın biyoetanol üretimindeki en büyük iki ismi olan Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya'da etanol üretmek için kullanılan temel kaynaklar şeker ve mısır nişastasındır (Rouhollah vd., 2007; Soccol vd., 2010). Birincil nesil olarak adlandırılan bu biyoyakıtların en büyük dezavantajları yiyeceklerle olan rekabetleridir. Artan dünya nüfusunun gıda kaynaklarına olan talebi arttırması, ikincil nesil biyoyakıtlar olarak adlandırılan lignoselülozik tarımsal atıkların biyoetanol eldesinde kullanımını cazip hale getirmiştir (Sarkar vd., 2012; Zayed vd., 2017).

İkinci nesil biyoyakıtlar ve özellikle lignoselülozik biyoetanol üretimi, fosil yakıtlardan türetilen kaynakların yerine geçebilecek potansiyele sahip olduklarından ilgi görmektedirler (Aguilar-Reynosa vd., 2017). Biyoetanolin yenilenebilir ve sürdürülebilir olması, depolamasının kolay olması, yüksek oksijen içeriği ve yüksek oktan numarası sebebiyle konvansiyonel yakıtlara karşı üstünlüğü vardır (Putra vd., 2015). Yer fıstığı kabuğu gibi lignoselülozik biyoküteller, biyoetanol üretiminde kullanılabilir.

Her yıl dünya genelinde yaklaşık 200 milyar ton saman, kabuk ve küspe gibi lignoselülozik tarımsal atık açığa çıkmaktadır (Tuck vd., 2012). Bu tarımsal atıklar yüksek miktarda lignoselülozik materyal (selüloz, hemiselüloz ve lignin), düşük miktarda ham protein, kül, yapısal olmayan karbonhidratlar ve sekonder metabolitler

içermektedir (Naz vd., 2017). Fıstık kabuğu çok bol bulunan bir tarımsal atıktır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün raporuna göre, dünya genelinde yer fıstığı üretimi 46 milyon tondur. Yer fıstığının ağırlığının %20'sini kabuğu oluşturmaktadır ki bu 9.2 milyon ton yapmaktadır (Carneiro vd., 2017).

Yer fıstığı kabuğu %37.1 selüloz, %33.4 hemiselüloz ve %15 lignin (Polachini vd., 2016) içermektedir (Demirbaş, 1999). Yer fıstığı kabuğu gibi lignoselülozik materyallerden biyoyakıt üretiminde fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik ön işlemlerle, biyokütlenin kompleks yapısı parçalanarak selüloz ve hemiselüloz açığa çıkarılmaktadır. Kullanılacak hammaddenin yapısı dikkate alınarak seçilen ön işlemlerde, düşük enerjinin harcanacağı, düşük inhibitör maddelerin oluşacağı ve yüksek basit şekerlerin oluşacağı yöntem tercih edilmektedir (Sun ve Cheng, 2002)

Lignoselülozik materyalin yapısında bulunan lignin bazı durumlarda istenen bazı durumlar da ise istenmeyen bir bileşendir. Lignoselülozik materyal termokimyasal yöntemler kullanılarak enerjiye dönüşümü sağlandığında lignin açığa çıkan enerji miktarını arttırmaktadır. Fermantasyon ile enerji dönüşümünde ise, ligninin yapısında bulunan fenolik bileşenlerin inhibisyon etkisi nedeniyle açığa çıkan enerjinin miktarında azalma olmaktadır (Frei, 2013).

Bu çalışmada ülkemizde birer atık olan ve doğrudan yakılmak suretiyle enerji kaynağı olarak kullanılan yer fıstığı kabuğunun ikinci nesil biyoyakıt üretiminde biyokütle olarak kullanılabilirliği ve verimi araştırılmıştır. Bu amaçla fermantasyon ortamı için uygun kabuk miktarı, uygun hidroliz sıcaklıkları, Accellerase 1500 enzim kullanımı, inkübasyon koşulları, inokülasyon oranı, azot kaynağı olarak farklı miktarlarda soya unu ve amonyum sülfat denenmiştir. Yer fıstığı kabuğu ile farklı çalışmalar olmasına rağmen, soya ununun azot kaynağı olarak kullanıldığı, enzimatik hidroliz aşamasında Accellerase 1500 enziminin kullanıldığı ve fermantasyonun oda sıcaklığında gerçekleştirilmesi açısından diğer çalışmalardan ayrılmaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Yer fıstığı kabuğu Adana/Çukurova'da bulunan Erdoğan Kuruyemiş'ten temin edilmiştir. Yer fıstığı kabuğu 0.097 µm por çapında APEX-MILL ile öğütülmüştür ve öğütme işleminin ardından 60°C'de 24 saat kurutulmuştur.

Mikroorganizmanın Hazırlanması

Denemelerde Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Potato Dextrose Agar (PDA; Merck) besiyerinde +4°C'de saklanan maya kültürü, 100 mL'lik erlendeki 20 mL Yeast Peptone Glucose (YPG) besiyerine öze ile ekilmiş ve 24±2°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üç kez yeni YPG besiyerlerine %1 oranında ekim yapılarak deneylerde kullanılacak aktif maya kültürü elde edilmiştir.

Besiyerlerinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kabuk, distile su ve %1 (v/v) oranında derişik sülfürik asit (Sigma-Aldrich; %95-98 H₂SO₄) ile karıştırılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulan karışım filtre kağıdı (Whatman No:1) ile süzölmüştür. Elde edilen süzöntünün pH'sı kalsiyum oksit (CaO) kullanılarak 10'a ayarlanmış ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Oluşan katı partiküllerin filtre kağıdı ile uzaklaştırılmasıyla elde edilen süzöntü, derişik H₂SO₄ kullanılarak pH 5'e ayarlanmış, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve deneylerde besiyerleri olarak kullanılmıştır.

Besiyerleri steril 100 mL'lik erlenlere 20 mL (aerobik) ve 12 mL'lik vidalı kapaklı tüpleri dolduracak şekilde (anaerobik) steril koşullarda aktarılmıştır. Üç kez aktifleştirilmiş mayalı YPG besiyerinden %1 oranında hazırlanan besiyerlerine ekim yapılmış ve set üstü çalkalayıcıda (GFL 3005, Almanya) 100 rpm'de 24±2°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Kabuk konsantrasyonu ve oksijenin etkisi

Denemelerde %2.5, %5 ve %10 (w/v) kabuk olacak şekilde distile su ile hazırlanan besiyerleri

aerobik koşullarda erlenlerde ve anaerobik koşullarda vidalı kapaklı tüplerde geliştirilmiştir.

Sıcaklığın hidroliz ortamına etkisi

Kabuk oranı %10 (w/v) olacak şekilde hazırlanan üç besiyerleri sırasıyla 24°C'de, 90°C'de ve 121°C 1.5 atm basınçta her biri 15 dakika süreyle hidrolize bırakılmıştır. Hidroliz sonrası elde edilen süzöntü, CaO ile muamele edilmiş, pH'ı 5'e ayarlanmış, otoklavlanmış ve erlenlerde aerobik şartlarda yapılan deneylerde kullanılmıştır.

Soya ununun etkisi

Erlenlerde aerobik şartlarda yapılan denemelerde, %10 (w/v) kabuk içeren besiyerleri, 1 ve 5 g/L soya unu (Doğalsan Marka) içerecek şekilde hazırlanarak kullanılmıştır.

Enzim uygulaması ve farklı azot kaynaklarının etkisi

Distile su, %10 (w/v) kabuk ve %1 (v/v) oranında derişik H₂SO₄ karıştırılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası elde edilen karışımın pH'ı steril koşullarda NaOH ile 5'e ayarlanmıştır. Karışıma Accellerase 1500 enzimi (%4 v/v) eklenerek 50°C'de 72 saat bekletilmiştir. Enzim uygulaması sonrası karışımlar steril koşullarda steril filtre kağıtları ile süzölmüş ve elde edilen süzöntüler besiyeri olarak deneylerde kullanılmıştır. Azot kaynaklarının etkisini izlemek amacıyla besiyerlerine 1 g/L amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), 0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L soya unu ilave edilmiştir. Deneyler erlenlerde aerobik şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Enzim uygulamasında inkübasyon süresi ve inokülasyon oranının etkisi

Besiyerleri 1 g/L soya unu ile hazırlanmış, %1 ve %10 oranında inokülasyon yapılarak aerobik şartlarda erlenlerde 6, 12 ve 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Araştırmada denenen her bir parametre için optik yoğunluk (OD) ve şeker analizi fotometrik olarak (Shimadzu UV 12001 V), etanol tayini ise gaz kromatografisi ile (Shimadzu 2010, restek kolon rtx-wax 60m 0.25 mm iç çap) yapılmıştır. Gaz kromatografisi çalışma koşulları yapılan

optimizasyon sonucu; enjeksiyon portu sıcaklığı 140°C, dedektör sıcaklığı 160°C, başlangıç kolon sıcaklığı 50°C ve 19 dakika içerisinde 150°C' ye yükseltilmiştir, kolon basıncı 200kPa, kolon akış hızı 1.86 mL/dk, toplam akış hızı 190.4 mL/dk ve taşıyıcı gaz olarak nitrojen kullanılmıştır (Takeda vd., 2011; Wistara vd., 2016).

Fermantasyon ortamlarından alınan örnekler (2 mL), 5000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant şeker ve alkol analizi için, pelet ise OD tayininde kullanılmıştır.

Optik Yoğunluk tayini

İki kez distile su ile yıkanan peletlerin 600 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları distile suya karşı okunmuştur.

Etanol tayini

Optik yoğunluk analizinde hazırlanan süpernatantlar 0.45µm por çapına sahip Millipore filtrelerden süzöldükten sonra Hamilton Enjektörü yardımıyla 1 µL alınarak gaz kromatografisinde analiz edilmiştir.

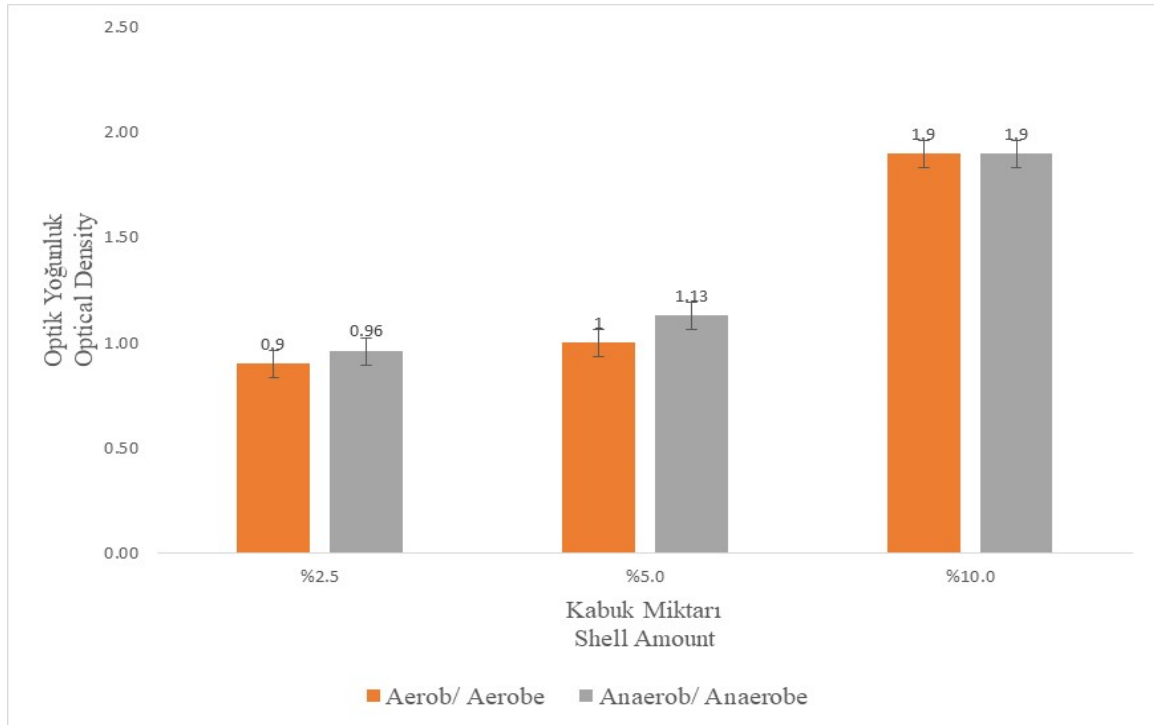
Toplam indirgen şeker tayini

Araştırma boyunca denenen her bir parametrenin şeker analizi Miller' ın (1959) önerdiği 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) yöntemi ile yapılmıştır. Örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kabuk konsantrasyonunun etkisi

Biyoetanol üretiminde kullanılacak uygun besiyerinin belirlenmesi amacıyla, %2.5, %5 ve %10 olmak üzere üç farklı kabuk konsantrasyonunda besiyerleri hazırlanmıştır. Denemelerde otoklav sonrası oluşan furan bileşiklerinin giderilmesi için CaO kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerinde aktifleştirilmiş maya kültürleri 100 mL'lik erlenlerde aerobik koşullarda ve 12 mL'lik vidalı kapaklı tüplerde anaerobik koşullarda 24 saatlik süre ile geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda maya optik yoğunlukları ölçülüp sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Farklı kabuk konsantrasyonlarının ve aerobik- anaerobik şartların maya gelişimine etkisi
Figure 1. Effect of different amount of shell and aerobic-anaerobic conditions on yeast growth

Yapılan denemelerde artan kabuk konsantrasyonlarının maya gelişimini olumlu yönde etkilediği ve en yüksek maya gelişimine %10 fıstık kabuğu içeren besiyerlerinde ulaşıldığı görülmüştür. Kullanılan tüm kabuk konsantrasyonlarında aerobik ve anaerobik koşulların maya gelişiminde belirgin bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır. Denenen en yüksek kabuk konsantrasyonu olan %10 kabuk içeren besiyerinde ise her iki koşulda da 1.9 olarak aynı maya gelişiminin olduğu bulunmuştur. Uygulama kolaylığı ve endüstriye uyumunun daha kolay olması nedeniyle sonraki deneylerde aerobik şartlar ve %10 fıstık kabuğu kullanılmıştır.

Mısır ve patates kabuğu kullanılarak yapılan bir çalışmada, araştırmacılar besiyeri hazırlarken %5 (w/v), %10 (w/v) ve %15 (w/v) olmak üzere üç farklı substrat yoğunluğu deneyerek etanol üretimi için en uygun konsantrasyonu araştırmışlardır. Yapılan çalışmada araştırmacılar en yüksek etanol verimine %10 (w/v) substrat konsantrasyonunda ulaşmışlardır (Meenakshi ve Kumaresan, 2014).

Sıcaklığın hidroliz ortamına etkisi

Lignoselülozik materyalden biyoetanol üretirken en önemli basamak hidroliz koşullarının optimize edilmesidir (Gu vd., 2013). Soya fasülyesi atığından biyoetanol üretilen bir çalışmada araştırmacılar biyokütleyi otoklavda 121°C' de 20 dakika hidrolize bırakmışlardır (Choi vd., 2015). Halofilik mikroalglerle yapılan çalışmada farklı hidroliz koşulları denenmiş ve en yüksek etanol verimine %1 (v/v) derişik H₂SO₄ ve 121°C' de 15 dk hidroliz edilerek ulaşılmıştır. Yine aynı çalışmada %0.5 (v/v), %1 (v/v) ve %2 (v/v) derişik sülfirik asit denenmiş ve en yüksek etanol üretimine %1 (v/v) sülfirik asit değerinde ulaşılmıştır (Karatay vd., 2016).

Maya gelişimine hidroliz sıcaklığının etkisinin araştırıldığı denemelerde, %10 fıstık kabuğu içeren besiyerleri sırasıyla oda sıcaklığında (24±2°C), 90°C'de ve 121°C 1.5 atm basınçlı otoklav ortamında hidrolize bırakılmış ve süre sonunda CaO ile muamele edilerek furan bileşikleri besiyerlerinden uzaklaştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Yapılan denemelerde en yüksek maya optik yoğunluklarına 90°C'de ve 121°C 1.5 atm basınçlı

otoklav ortamında ulaşılmış olup bu değerler sırasıyla 1.8 ve 1.9 olarak ölçülmüştür. Daha sonraki denemelerde hidroliz için otoklav koşulları tercih edilmiştir.

Çizelge 1. Farklı hidroliz sıcaklıkları ve maya optik yoğunluklarına etkileri.

Table 1. Effect of different hydrolysis temperatures on yeast absorbance

Koşullar <i>Conditions</i>	Optik Yoğunluk <i>Optical Density</i>
24°C	0.5
90°C	1.8
121°C + 1.5 atm	1.9

Soya ununun maya gelişimine etkisi

Soya unununun maya gelişimine etkisinin araştırılması amacıyla, hazırlanan besiyerlerine 1 g/L ve 5 g/L soya unu ilave edilmiş ve soya unu içermeyen kontrol grubuyla birlikte aerobik şartlarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucu besiyerlerindeki maya optik yoğunlukları Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Farklı miktarlardaki soya unununun maya gelişimine etkisi

Table 2. Effect of different amounts soy flours on yeast growth

Soya Unu (g/L) <i>Soy Floun (g/L)</i>	Optik Yoğunluk <i>Optical Density</i>
Kontrol/ <i>Control</i>	1.9
1	2.1
5	1.9

Yapılan denemeler sonucunda besi ortamına ilave edilen 1 g/L soya unununun maya gelişimini olumlu yönde etkileyerek maya optik yoğunluklarını 1.9'dan 2.1'e yükselttiği saptanmıştır. Besiyerine ilave edilen 5 g/L soya unununun ise maya gelişimi üzerinde herhangi bir etki göstermediği bulunmuştur. Deneylerin bu aşamasında fıstık kabuğu kullanılarak en yüksek maya gelişimi olan 2.1 optik yoğunluğuna 1 g/L soya unu içeren %10 kabuklu besiyerinde ulaşıldığı görülmüştür.

Enzim uygulaması ve diğer azot kaynaklarının maya gelişimine etkisi

Accellerase 1500 yüksek β-glukozidaz ve selülaz aktivitesi sayesinde selülozu parçalayarak onları 6

karbonlu şekerlere dönüştürür. Bu dönüşüm oranı %98'e kadar çıkabilmektedir (Dadi vd., 2006; Saha ve Cotta, 2006). Dönüşüm verimini etkileyen en önemli parametre ortamda bulunan selülozdur (Wang vd., 2011). Şeker kamışı küspesinden samana, katı atıklardan mısır koçanına kadar birçok farklı lignoselülozik materyalin hidrolizi için kullanılabilir. Leitner ve Lindorfer (2016) samanı Accellerase 1500 ile 50°C'de 72 saat inkübasyona bırakmıştır.

Fermantasyon ortamına maya gelişimini desteklemesi açısından amonyum sülfat, magnezyum sülfat, potasyum fosfat ve soya unu gibi katkıları ilave edilebilmektedir (Tuncay, 1999; Cho vd., 2011; Dussán vd., 2014; Trigueros vd., 2016). Azot ile yapılan çalışmalarda, azotun *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişimine, üretilen etanol miktarına ve kalitesine son derece olumlu bir etki yarattığı gösterilmiştir (García-Ríos vd., 2014; Bely vd., 1990).

Maya gelişimini arttırmak amacıyla planlanan bu çalışmalarda, derişik H₂SO₄ hidrolizi sonrası Accellerase 1500 ile sakkarifikasyon evresi tamamlandıktan sonra besiyerlerine farklı miktarlarda soya unu ve 1 g/L (NH₄)₂SO₄ eklenerek aerobik şartlarda erlenlerde maya gelişimi 24 saat süre ile izlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ölçülen maya optik yoğunlukları Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Farklı soya unu (SU) konsantrasyonları ve amonyum sülfatın (AS) maya gelişimine etkisi
Table 3. Effect of different amounts soy flours (SF) and ammonium sulphate (AS) on yeast growth

Azot Kaynağı (g/L) <i>Nitrogen Sources (g/L)</i>	Optik Yoğunluk <i>Optical Density</i>
Kontrol/Control	4.19
1 A.S.	3.88
0.5 S.U./S.F.	4.55
1 S.U./S.F.	4.85
2 S.U./S.F.	4.85

Enzim kullanılarak yapılan bu denemelerde kontrol olan sadece kabuk içeren besiyerlerinde maya gelişimi 4.19 olarak ölçülmüştür. Bu değer in önceki denemelerde 1.9 olması, enzim

uygulanmasının maya gelişimini yaklaşık iki kat daha fazla etkilediğini göstermektedir.

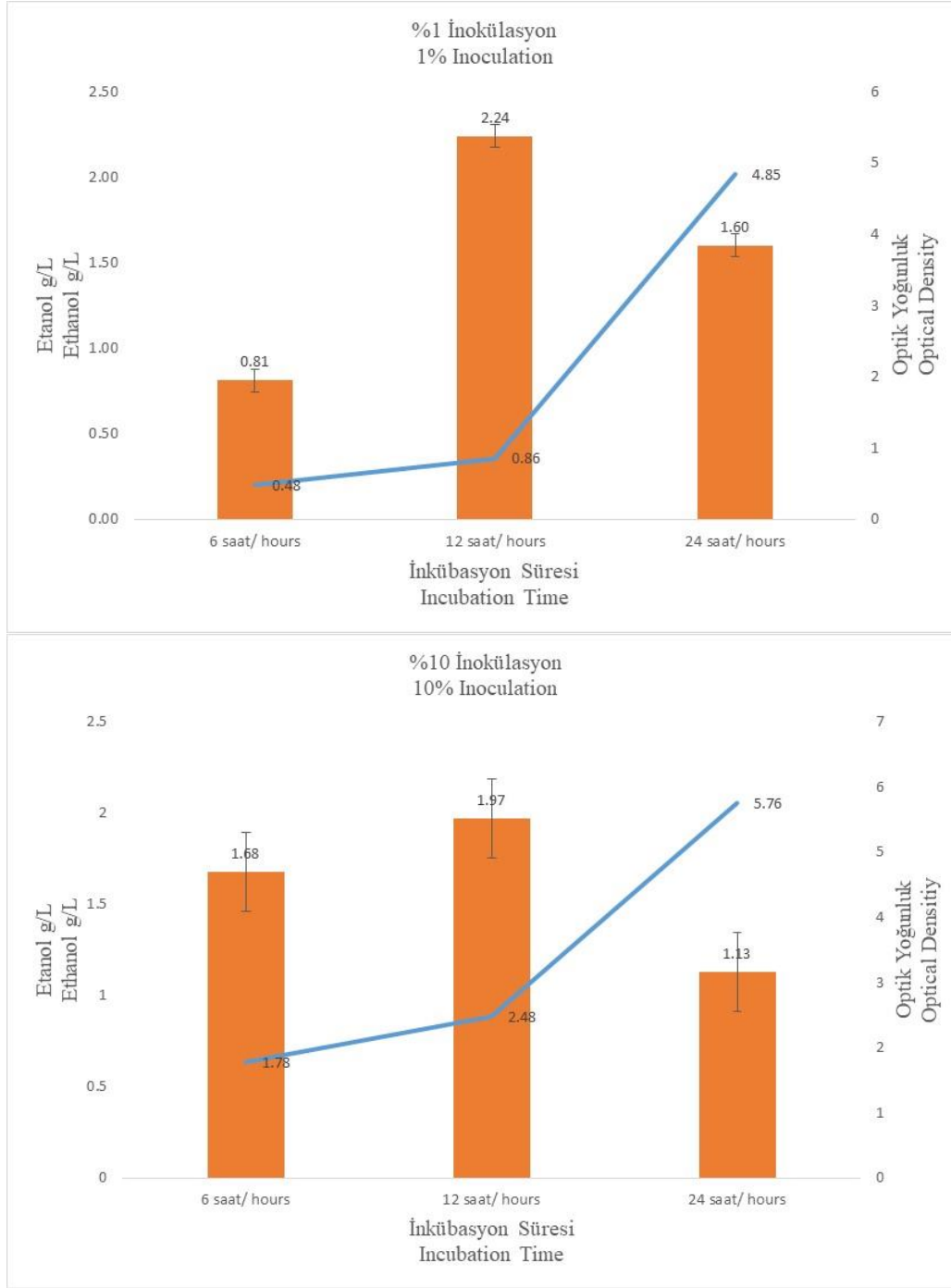
Daha önceki denemelerde soya ununun maya gelişimine olumlu katkısı gösterilmiştir. Enzim uygulanan bu deneyde de soya ununun farklı konsantrasyonları deneyerek maya gelişimi artırılmak istenmiştir. Yapılan deneylerde 0.5 g/L, 1 g/L ve 2 g/L olmak üzere üç farklı soya unu konsantrasyonu ve ayrıca 1 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerleri kullanılmıştır. Denemeler sonucu maya gelişiminin en yüksek olduğu soya unu konsantrasyonu 1 g/L olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda maya gelişimi kontrolden biraz daha artarak 4.85 olarak ölçülmüştür. Soya ununun maya gelişimine olumlu etkisi 2 g/L'ye kadar devam etmekle birlikte, 1 g/L ve 2 g/L konsantrasyonları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Besiyerine ilave edilen (NH₄)₂SO₄'ın maya gelişimine olumlu bir katkı sağlamadığı görülmüş ve sonraki deneylerde 1 g/L soya unu içeren besiyerleri kullanılmıştır.

Enzim uygulamasında inkübasyon süresi ve inokülasyon oranının etkisi

Enzimle hazırlanan besiyerlerine 1 g/L soya unu eklenip %1 ve %10 oranında ekim yapılarak 6, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. Deney aerobik şartlarda erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları Şekil 2 a ve b ve Çizelge 4'de gösterilmiştir.

Uygulanan %1 inokülasyon sonucunda ilk 6. saatte maya optik yoğunluğu 0.48 etanol miktarı ise 0.81 g/L olarak ölçülmüştür. İnkübasyon süresi 12. saate ulaştığında maya optik yoğunluğu 0.48'den 0.86'a yükselmiş etanol miktarı ise 0.88'den 2.24 g/L düzeyine yükselmiştir. İnkübasyon süresi 24. saate ulaştığında maya optik yoğunluğu 4.85'e ulaşmış ve etanol miktarı da 1.60 g/L olarak ölçülmüştür. Denemeler sonucu en yüksek etanol verimine inokülasyon oranı %1 olan besiyerinde 12. saatte ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 2 a).



Şekil 2a. %1 inokülasyon oranının saatlik maya optik yoğunluk ve etanol değerleri.

b. %10 inokülasyon oranının saatlik maya optik yoğunluk ve etanol değerleri

Figure 2a. Yeast optical density and ethanol values under 1% inoculation.

b. Yeast optical density and ethanol values under 10% inoculation

Çizelge 4. Farklı inokülasyon oranlarında inkübasyon süresi boyunca kullanılan şeker yüzdeleri
 Table 4. Different inoculation rates and consumed sugar percentages during the incubation

Saatler Hours	%1 İnokülasyon 1% Inoculation	%10 İnokülasyon 10% Inoculation
6	25%	66.60%
12	66.60%	66.60%
24	75%	76%

İnokülasyon oranı %1'den %10'a artırıldığında 6, 12 ve 24. saatlerde maya optik yoğunlukları sırasıyla 1.78, 2.48 ve 5.76 olarak ölçülmüştür. Buna bağlı olarak etanol miktarının 6. saatte 1.68 g/L, 12. saatte 1.97 g/L ve 24. saatte ise 1.13 g/L olduğu bulunmuştur. Denemelerde %1 inokülasyondan farklı olarak 6. ve 12. saatlerde yüksek etanol üretiminin olduğu görülmüştür. Sonuçlar Şekil 2 b'de gösterilmiştir. Her iki inokülasyon oranında da maya gelişimi inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak artmıştır. En yüksek etanol verimine %1 inokülasyonda 12. saatte, 0.86 optik yoğunlukta, 2.24 g/L olarak, %10 inokülasyonda ise 6. ve 12. saatlerde ulaşıldığı görülmüştür.

Deneylerde kullanılan mayanın primer metabolit olan etanolü logaritmik üreme evresinin başlangıcında olduğunda yüksek oranda ürettiği, artan inkübasyon süresinin maya gelişimini arttırdığı ancak etanol miktarını düşürdüğü ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4'de farklı inokülasyon oranlarında inkübasyon süresi boyunca kullanılan şeker yüzdeleri verilmiştir. En yüksek etanol üretiminin görüldüğü %1 inokülasyon oranında 12. saatte maya yoğunluğu birin altında olduğunda besiyerindeki şekerin %66'sı kullanılmıştır. Denemelerde birden yüksek optik yoğunluk değerlerinde mayanın besiyerindeki şekerin en fazla %10'unu kullandığı ve maksimum kullanılan şeker yüzdesinin %76'ya ulaştığı görülmüştür. Bu sonuçlar hazırlanan besiyerinde maya tarafından kullanılmayan %25 oranında şeker benzeri maddenin olduğunu göstermektedir. Şeker analizinde kullanılan DNS yöntemi ile mayanın kullanmadığı şekerler de ölçülmüştür.

SONUÇLAR

Yapılan çalışmada, her yıl dünyada ve ülkemizde bol miktarda açığa çıkan yer fıstığı kabuğunun biyoetanol üretim kapasitesi araştırılmış ve süreç optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda hazırlanan besiyerindeki uygun kabuk konsantrasyonları, uygun azot miktarı, fermantasyon süresi ve inokülasyon oranı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişebilmesi için gerekli altı karbonlu şekerler, ham madde olarak seçilen lignoselülozik atıklardaki selüloz ve hemiselülozun dönüşümünden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan Accellerase 1500 ile açığa çıkan basit şeker miktarı artırılmıştır ve buna paralel olarak üretilen etanol miktarı da artmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişimi ve etanol verimi için oldukça önemli bir yere sahip olan azot, soya unu gibi eldesi kolay bir maddeden sağlanmış ve amonyum sülfat ile karşılaştırıldığında daha ucuz ve etkili olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışma, Accellerase 1500 enzim uygulaması ve fermantasyonun oda sıcaklığında gerçekleşmesi bakımından ilk olma özelliği taşımaktadır. Azot kaynağı olarak ortama ilave edilen soya unu, mikroorganizma gelişimi ve etanol üretimine olumlu katkıda bulunmuştur. Böylece 12 saat gibi kısa bir sürede fıstık kabuğu ile hazırlanan besiyerinden %61.7'lik verimle 2.24 g/L etanol üretimi sağlanmıştır. Düşük maliyetle hazırlanan fıstık kabuğu besiyeri, biyoetanol üretiminde umut vericidir.

KAYNAKLAR

Aguilar-Reynosa, A., Romani, A., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguilar, C.N., Garrote, G., Ruiz, H.A., (2017). Comparison of microwave and conduction-convection heating autohydrolysis pretreatment for bioethanol production. *Biore Sour*

- Technol*, 243, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.096>
- Ari, T., Dönmez, S., (1999). Melastan Etil Alkol Üretiminde Soya Ununun Alkol ve Hücre Konsantrasyonuna Etkisi. *Turkish J Biol*, 24, 573–584.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng*, 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Carneiro, A.P., Rodriguez, O., Macedo, E.A., (2017). Dissolution and fractionation of nut shells in ionic liquids. *Bioresour Technol*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.112>
- Cho, D.H., Shin, S.J., Bae, Y., Park, C., Kim, Y.H., (2011). Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. *Bioresour Technol*, 102, 4439–4443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.094>
- Choi, I.S., Kim, Y.G., Jung, J.K., Bae, H.J., (2015). Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy*, <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.09.093>
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., (2006). Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol Bioeng*, 95, 904–910. <https://doi.org/10.1002/bit.21047>
- Demirbaş, A., (1999). Properties of charcoal derived from hazelnut shell and the production of briquettes using pyrolytic oil. *Energy*, 24, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0360-5442\(98\)00077-2](https://doi.org/10.1016/S0360-5442(98)00077-2)
- Dussán, K.J., Silva, D.D. V, Moraes, E.J.C., Priscila, V., Felipe, M.G. a, (2014). Dilute-acid Hydrolysis of Cellulose to Glucose from Sugarcane Bagasse. *Chem Eng Trans*, 38, 433–438. <https://doi.org/10.3303/CET1438073>
- Frei, M., (2013). Lignin: Characterization of a multifaceted crop component. *Sci World J*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/436517>
- García-Ríos, E., Gutiérrez, A., Salvadó, Z.Z., Arroyo-López, F.N., Guillamon, J.M., (2014). The Fitness Advantage of Commercial Wine Yeasts in Relation to the Nitrogen Concentration, Temperature, and Ethanol Content under Microvinification Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 80, 704–713. <https://doi.org/10.1128/AEM.03405-13>
- Gu, T., Held, M.A., Faik, A., (2013). Supercritical CO₂ and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. *Environ Technol*, (United Kingdom). <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.809777>
- Karatay, S.E., Erdoğan, M., Dönmez, S., Dönmez, G., (2016). Experimental investigations on bioethanol production from halophilic microalgal biomass. *Ecol Eng*, <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.058>
- Leitner, V., Lindorfer, J., (2016). Evaluation of technology structure based on energy yield from wheat straw for combined bioethanol and biomethane facility. *Renew Energy*, 87, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.037>
- Martín, C., Thomsen, A.B., (2007). Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol*, 82, 174–181. <https://doi.org/10.1002/jctb.1648>
- Meenakshi, A., Kumaresan, R., (2014). Ethanol production from corn, potato peel waste and its process development. *Int. J. ChemTech Res*,
- Miller, G.L., (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Naz, A.A., Reinert, S., Bostanci, C., Seperi, B., Leon, J., Böttger, C., Südekum, K.-H., Frei, M., (2017). Mining the global diversity for bioenergy traits of barley straw: Genomewide association study under varying plant water status. *GCB Bioenergy*, <https://doi.org/10.1111/gcbb.12433>
- Polachini, T.C., Sato, A.C.K., Cunha, R.L., Telis-Romero, J., (2016). Density and rheology of acid suspensions of peanut waste in different conditions: An engineering basis for bioethanol

- production. *Powder Technol*, 294, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.022>
- Putra, M.D., Abasaeed, A.E., Atiyeh, H.K., Al-Zahrani, S.M., Gaily, M.H., Sulieman, A.K., Zeinelabdeen, M.A., (2015). Kinetic Modeling and Enhanced Production of Fructose and Ethanol From Date Fruit Extract. *Chem Eng Commun*, 202, 1618–1627. <https://doi.org/10.1080/00986445.2014.968711>
- Rouhollah, H., Iraj, N., Giti, E., Sorah, A., (2007). Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. *African J Biotechnol*, 6, 1110–1114.
- Saha, B.C., Cotta, M.A., (2006). Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol Prog*, 22, 449–453. <https://doi.org/10.1021/bp050310r>
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy*, 37, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P. de S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Silva Bon, E.P. da, Moraes, L.M.P. de, Araújo, J. de A., Torres, F.A.G., (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol*, 101, 4820–4825. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>
- Sun, Y., Cheng, J., (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W., Murata, K., (2011). Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ Sci*, 4, 2575–2581. <https://doi.org/10.1039/c1ee01236c>
- Trigueros, D.E.G., Fiorese, M.L., Kroumov, A.D., Hinterholz, C.L., Nadai, B.L., Assunção, G.M., (2016). Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Biochem Eng J*, 110, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.02.014>
- Tuck, C.O., Pérez, E., Horváth, I.T., Sheldon, R.A., Poliakoff, M., (2012). Valorization of biomass: Deriving more value from waste. *Science* (80-.), <https://doi.org/10.1126/science.1218930>
- Wang, W., Kang, L., Wei, H., Arora, R., Lee, Y.Y., (2011). Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, 1139–1149. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9200-8>
- Wistara, N.J., Pelawi, R., Fatriasari, W., (2016). The Effect of Lignin Content and Freeness of Pulp on the Bioethanol Productivity of Jabon Wood. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 1141–1146. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9510-8>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev*, 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>