

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÜZÜM POSASINDAN BİYOETANOL
ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba YAVUZ

Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KALENDER

ELAZIĞ – 2018

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜZÜM POSASINDAN BİYOETANOL ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YAVUZ

(152132102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 24.07.2018

Tezin Savunulduğu Tarih: 08.08.2018

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KALENDER (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN (F.Ü)

Dr. Öğr. Üyesi Hakan YOĞURTÇU (M.Ü)

ELAZIG-2018

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında değerli bilgi ve deneyimlerinin yanı sıra anlayışını ve sabrını benden esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KALENDER'e en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarım süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Nur Kevser DOĞAN ve Ayşegül ÇELİK'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babama, kardeşlerime, doğduğum günden beri dualarını benden eksik etmeyen anneannem Memduha ETA ve merhum dedem Tahir ETA'ya ve en çok da her türlü zorluğu aşmamda beni cesaretlendiren emeklerinin hakkını ödeyemeyeceğim biricik anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim çok değerli arkadaşlarım Kezban GENÇ ve Songül DOĞAN'a en samimi duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca gösterdiği sabır ve manevi desteklerinden ötürü sevgili nişanlım Yakup PINAR'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Tuğba YAVUZ
Elazığ-2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
EKLER LİSTESİ.....	XI
KISALTMALAR LİSTESİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enerji	3
2.2. Yenilenebilir Enerji.....	4
2.2.1. Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Oluşumu	5
2.3. Biyoyakıtlar ve Tarihçesi.....	6
2.4. Biyoetanol.....	7
2.4.1. Biyoetanolün Tarihi ve Günümüzdeki Yeri	10
2.4.2. Biyoetanolün Türkiye’deki Yeri.....	12
2.4.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	13
2.4.3.1. Şeker İçerikli Kaynaklar	13
2.4.3.2. Nişasta İçerikli Kaynaklar	14
2.4.3.3 Lignoselülozik Kaynaklar.....	15
2.5. Lignoselülozik Materyallerin Yapısı.....	16
2.6. Biyoetanol Üretiminde Hammaddelere Uygulanan Ön işlemler.....	17
2.6.1. Şeker İçerikli Hammaddelere Uygulanan Ön İşlemler	18
2.6.2. Nişasta Kaynaklı Hammaddelere Uygulanan Ön İşlemler	18
2.6.3. Lignoselüloz Kaynaklı Hammaddelere Uygulanan Ön İşlemler	18
2.6.3.1. Fiziksel ve Mekanik Ön İşlemler	19
2.6.3.2. Kimyasal Ön işlem.....	20
2.6.3.3. Fiziko-Kimyasal Ön İşlem.....	22
2.6.3.4. Biyolojik Ön İşlemler.....	24

2.7.	Lignoselülozik Materyallere Uygulanan Hidroliz Yöntemleri.....	25
2.7.1.	Kimyasal Hidroliz.....	25
2.7.2.	Enzimatik Hidroliz.....	26
2.8.	Fermantasyon Teknikleri	26
2.8.1.	Ayrı Enzimatik Hidroliz ve Fermantasyon (SHF)	27
2.8.2.	Eşzamanlı Sakarifikasyon ve Fermantasyon (SSF)	27
2.8.3.	Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-Fermantasyon (SSCF)	28
2.8.4.	Konsolide Biyoproses ile Fermantasyon (CBP)	28
2.9.	Ayrırma ve Saflaştırma.....	29
2.10.	Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	29
2.11.	Üzüm (Vitis vinifera)	32
2.11.1.	Türkiye’ de Üzümün Yeri.....	32
2.11.2.	Dünya’da Üzümün Yeri.....	33
2.11.3.	Üzümün Kullanım Alanları.....	34
2.12.	Literatür Özeti	35
3.	MATERYAL VE METOT	38
3.1.	Materyal.....	38
3.1.1.	Üzüm Posası.....	38
3.1.2.	Mikroorganizmalar	38
3.1.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632.....	38
3.1.2.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PAKMAYA®	39
3.2.	Metot	39
3.2.1.	Üzüm Atığının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	39
3.2.1.1.	Nem Tayini	39
3.2.1.2.	Lignin, Selüloz ve Hemiselüloz Oranının Belirlenmesi	40
3.2.2.	Üzüm Posasına Uygulanan Ön İşlemler	41
3.2.2.1.	Öğütme	41
3.2.2.2.	Asidik Hidroliz ve Optimizasyon	41
3.2.3.	Fermantasyon	43
3.2.4.	Analitik Yöntemler	44
3.2.4.1.	İndirgen Şeker Tayini.....	44
3.2.4.2.	Biyoetanol Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44

4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1.	Üzüm Atıklarının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	46
4.2.	Üzüm Atıklarına Uygulanan Ön İşlemleri Etkileyen Parametreler	47
4.2.1.	Seyreltik H ₂ SO ₄ ile Yapılan Ön İşlem İçin Optimizasyon Çalışması	47
4.2.1.1.	Sıcaklığın Etkisi.....	50
4.2.1.2.	Asit Konsantrasyonunun Etkisi	50
4.2.1.3.	Katı Konsantrasyonunun Etkisi	53
4.2.1.4.	Sürenin Etkisi	53
4.3.	Fermantasyonla Biyoetanol Üretim Deneyleri.....	55
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
	KAYNAKLAR.....	60
	EKLER.....	71
	ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÖZET

Bu çalışmada, üzüm posasından farklı maya suşları (*Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu ve *Saccharomyces cerevisiae*) kullanılarak kesikli sistemle biyoetanol üretimi incelenmiştir. Deneysel çalışmalar, üzüm atıklarının bazı özelliklerinin belirlenmesi, üzüm posasının hidrolizi ile indirgen şeker içeriği yüksek hidrolizat eldesi ve fermantasyonla biyoetanol üretimi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Üzüm posasının yaklaşık olarak % 46 oranında holoselüloz (selüloz+hemiselüloz) içerdiği belirlenmiştir.

Hidroliz yöntemi olarak lignoselülozik materyallerde yaygın olan asidik hidroliz metodu kullanılmıştır. Asidik hidroliz katı konsantrasyonu, asit konsantrasyonu, sıcaklık ve süre parametrelerinden oluşan bağımsız değişkenler için merkezi kompozit dizayn (MKD) ile optimizasyon yapılmıştır. Cevap değişkeni ise indirgen şeker konsantrasyonudur. Cevap yüzey metodu (RSM) deneyleri çalışma hacmi 50 ml olan 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirildi. Optimizasyon deneyleri sonucunda üzüm posasının asidik hidrolizi için elde optimum şartlar sıcaklık 92,5 °C, süre 45,35 dk., katı konsantrasyonu 80,9 g/L ve asit konsantrasyonu % 1,26 (v/v) olarak belirlenmiştir. Bu şartlarda üretilen indirgen şeker konsantrasyonu ise 36,07 g/L'dir.

Fermantasyon çalışmaları 250 ml'lik erlenlerde 50 ml çalışma hacminde, oksijensiz şartlarda, 30 °C'de, 150 rpm karıştırma hızında ve kesikli olarak yürütülmüştür. Çalışılan her iki maya türünün çoğaltım işlemleri yeast-peptone-dextrose (YPD) besi yerinde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon deneyleri toplam 72 saat süreyle yürütülmüş ve belirli zaman aralıklarında ortamdan örnekler alınarak şeker ve alkol analizleri yapılmıştır. Şeker konsantrasyonları dinitro salisilik asit (DNS) yöntemiyle, alkol konsantrasyonları ise gaz kromatografisi (GC) ile ölçülmüştür. Üzüm posasından *Saccharomyces cerevisiae* ile gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda tipik teorik verim değerleri bulunmuş olup en yüksek teorik verim değerinin % 69 olduğu belirlenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 ile fermantasyonla biyoetanol üretimi çalışmalarından ise % 87'lik gibi yüksek bir oranda teorik verim değerine ulaşılmıştır. Bu sonuç ile *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632'nin üzüm posasının asidik hidrolizi sonucu üretilen hidrolizat ortamındaki inhibe edici maddelere daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, fermantasyon, üzüm posası, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* NRRL Y-12632, Optimizasyon.

SUMMARY

Investigation of Bioethanol Production From Grape Pomace

In this study, bioethanol production from grape pomace has been studied by different yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 and *Saccharomyces cerevisiae*) in a batch system. The experimental studies consisted of three main stages: determination of some properties of grape pomace used, obtaining of hydrolysate with high reduced sugar by hydrolysis of grape pomace, and bioethanol production by fermentation. It has been determined that the grape pomace studied contains approximately 46 % holocellulose (cellulose+hemicellulose).

Acidic hydrolysis method which is common for hydrolysis of lignocellulosic materials has been used. The hydrolysis conditions have been optimized by central composite design (CCD). Independent variables were solid (grape pomace) concentration, acid concentration, temperature, and hydrolysis time. Response variable was also reduced sugar concentration. Response surface method (RSM) experiments have been carried out in 250 ml volume of flasks with 50 ml working volume. The optimum conditions obtained from results of hydrolysis experiments of grape pomace have been determined temperature of 92,5 °C, solid concentration of 80,9 g/L, acid concentration 1,25 % (v/v), and time of 45,35 minutes. In these conditions, reduced sugar concentration obtained was 36,07 g/L.

Fermentation studies have been performed in 250 ml volume of flasks with 50 ml working volume, under oxygen free media, at the temperature of 30 °C, 150 rpm, and in a batch reactor. Both yeast strains studied have been grown in yeast-peptone-dextrose (YPD) nutrition media. The fermentation experiments carried out during the 72 h and the samples for sugar and alcohol analyses have been taken at specific time interval. Sugar and alcohol concentrations have been measured by dinitro salicylic acid (DNS) and gas chromatography (GC) technique, respectively. In the result of the fermentation carried out by *Saccharomyces cerevisiae*, typical theoretical yield values have been determined. The heights value of bioethanol yield obtained from grape pomace by *Saccharomyces cerevisiae* is 69 %. The value of bioethanol yield obtained from grape pomace with *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 is also 87 %. This result shows that *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 is more resistant to the inhibitory agents in the hydrolysate medium obtained from grape pomace by acidic hydrolysis method.

Keywords: Bioethanol, Fermentation, Grape pomace, *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* NRRL Y-12632, Optimization.

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1: Biyoetanolün fiziksel özellikleri	8
Tablo 2.2: Biyoetanolün kimyasal özellikleri.....	9
Tablo 2.3: Biyoetanolün termal özellikleri.....	9
Tablo 2.4: Mezofilik bakterilerin esas fermentasyon ürünü olarak etanol üretimi.....	31
Tablo 2.5: Termofilik bakterilerin esas fermentasyon ürünü olarak etanol üretimi	31
Tablo 2.6: Dünyada ve ülkemizde üzüm üretim alanı, verim ve üretim miktarları.....	34
Tablo 3.1: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632 suşu için YPD ve YPD-Agar besi ortamlarının içerikleri.	38
Tablo 3.2: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PAKMAYA için YPD ve YPD-Agar besi ortamlarının içerikleri.	39
Tablo 3.3: Asidik hidroliz için optimizasyon işleminde incelenecek parametreler ve çalışma aralıkları.....	42
Tablo 3.4: Hidroliz Şartları için MKD ile Elde Edilen Deneysel Çalışma Şablonu ve Elde Edilen Sonuçlar.....	42
Tablo 3.5: Melin ve Shieh'ye göre fermantasyon ortam içerikleri ve miktarları	43
Tablo 3.6: Biyoetanol üretiminde hidrolizata eklenen besi ortamı içerikleri ve fiziksel koşullar.	43
Tablo 3.7: DNS çözeltilisinin içeriği	44
Tablo 3.8: PST (Rochelle Tuzu Çözeltilisi) çözeltilisinin içeriği	44
Tablo 4.1: Üzüm atığının bazı özellikleri	46
Tablo 4.2: Asidik hidroliz için önerilen kuadratik modelin uygunluğunu test etmek için elde edilen istatistiksel parametrelerin değerleri	48
Tablo 4.3: Kuadratik modelin RSM ile elde edilen ANOVA test sonuçları	48
Tablo 4.4: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD ile gerçekleştirilen RSM sonuç tablosu.....	55
Tablo 4.5: <i>S. cerevisiae</i> ve <i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632 suşu için 72 saat boyunca yapılan fermantasyonda 3 farklı inokülasyon hacminde ve ortam pH'ında elde edilen sonuçlar.....	56
Tablo 4.6: Üzüm atıklarının asidik hidroliz (A.H.) ortamlarında mikroorganizmalar ile fermantasyonu sonucunda elde edilen indirgen şeker ve alkol değerleri.	57

Tablo 4.7: <i>S. cerevisiae</i> / <i>S. cerevisiae</i> NRRLY-12632 ile optimum şartlarda fermantasyon parametre ve oranları.	58
Tablo E.1.1: İndirgen şeker konsantrasyonlarını analiz ederken kullanılan glikoz standart verileri ve absorbands değerleri	71
Tablo E.2.1: Alkol konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan standartlar ve pik alanları.	72



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: 2016 yılında enerji kaynaklarının dağılım oranları	5
Şekil 2.2: Yenilenebilir kaynaklara göre enerji tüketimleri oranı	5
Şekil 2.3: Biyoyakıtları türüne göre sınıflandırma.....	7
Şekil 2.4: Dünyadaki biyoetanol üretiminin dağılımı	11
Şekil 2.5: Türkiye'nin 2012 yılındaki birincil enerji talebi	12
Şekil 2.6: Lignoselülozik materyalin ön işlem sonucu yapısal değişimi	19
Şekil 2.7: Tipik bir rektifikasyon kolonu (1) kolon (2) ısı değiştirici (soğuk) (3) ısı değiştirici (sıcak) (4) yoğunlaştırıcı (5) kazan	29
Şekil 2.8: Türkiye' de üzüm tüketim alanları	33
Şekil 2.9: 15 önde gelen ülkenin küresel üzüm üretimi	34
Şekil 4.1: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD ile gerçekleştirilen analiz sonucu deneysel ve hesaplanan indirgen şeker konsantrasyonlarının değişimi	49
Şekil 4.2: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD tasarımı sonucu elde edilen etkileşim grafikleri (a) süre-sıcaklık ikili etkileşimi (b) sıcaklık-asit konsantrasyonu ikili etkileşimi (c) sıcaklık-katı konsantrasyonu ikili etkileşimi (d) sıcaklığın tek başına indirgen şeker üretimi üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.4: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD tasarımı sonucu elde edilen etkileşim grafikleri (a) süre -katı konsantrasyonu ikili etkileşimi (b) katı konsantrasyonunun tek başına indirgen şeker üretimi üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.5: Sürenin tek başına hidroliz verimi üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.6: Mikroorganizmaların ürettiği biyoetanol konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	57
Şekil E.1.1: İndirgen şeker konsantrasyonlarını hesaplarken kullanılan kalibrasyon grafiği	71
Şekil E.2.1: Biyoetanol konsantrasyonu analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eğrinin denklemi.....	72

EKLER LİSTESİ

Sayfa No

EK 1: İndirgen şeker analizlerinde kullanılan standart verileri	71
EK 2: Biyoetanol analizinde kullanılan standartlara ait veriler.	72



KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltma	Açıklama
ADH	: Doğal Alkol Dehidrogenaz
AFEX	: Amonyak fiber patlaması
CBP	: Katı üzerinde biyoproses
DDGS	: Damıtılmış Yem Taneleri
DNS	: Dinitro salisilik asit
EMP	: Embden-Mayerhof-Parnas
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
GC	: Gaz kromatografisi
GSMH	: Gayrı Safı Milli Hasıla
HMF	: Hidroksimetilfurfural
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
L	: Litre
M.O.	: Mikroorganizma
NaOH	: Sodyum Hirdoksit
PDC	: Piruvat Dekarboksilaz
PFL	: Piruvat Format Lipaz
pH	: Power of Hydrogen
ppm	: Milyonda kısım
PST	: Potasyum sodyum tartarat
S.cerevisiae	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SHF	: Ayrı hidroliz ve fermantasyon
SSCF	: Eşzamanlı sakarifikasyon ve kofermantasyon
SSF	: Eşzamanlı sakarifikasyon ve fermantasyon
YPD	: Yeast-Peptide-Dextrose
% v/v	: Hacimce yüzde

1. GİRİŞ

Enerji, insanlığın en önemli gereksinimlerinden biridir. Dünyada en çok kullanılan enerji kaynağı fosil yakıtlardır. Fosil yakıtlar geleneksel enerji kaynaklarıdır ve dünya nüfusunun artmasına bağlı olarak her geçen gün rezerv azalması meydana gelmektedir. Bunun yanında, fosil yakıtlar küresel ısınma başta olmak üzere birçok çevre sorununa yol açmaktadır. Geleneksel yakıt kaynaklarının gerek tükenmesi ve gerekse çevre sorunları oluşturması alternatif enerji kaynak arayışlarını zorunlu hale getirmiştir. Bu tür alternatif enerji kaynakları arasında yenilenebilir enerji kaynakları üzerine çalışmaların gerçekleştirildiği en önemli enerji kaynaklarının başında gelmektedir. Yenilenebilir enerji kaynakları arayışı, çağdaş toplumlarda hem sürdürülebilir kalkınma hem de çevresel açılardan son derece önemlidir.

Yenilenebilir enerji kaynakları güneş, rüzgâr, hidroelektrik, jeotermal ve biyokütle, hidrojen, gelgit gibi kaynaklar olarak sınıflandırılabilir. Biyoyakıtlar, biyokütleden üretilen ve geleneksel fosil yakıtlara göre alternatif olabilecek yenilenebilir enerji türlerinden önemli bir enerji kaynağıdır. En yaygın yenilenebilir enerji kaynağı olarak kullanılan biyoyakıtlardan biri biyoetanoldür. Ham petrol tüketiminin ve çevre kirliliğinin azalmasına önemli ölçüde katkıda bulunduğu için dünya genelinde en çok kullanılan biyoyakıt olarak tanımlanır. ABD ve Brezilya başta olmak üzere birçok ülkede yüksek miktarlarda biyoetanol üretilmektedir. Biyoetanolün yakıt olarak kullanılması ile enerji kaynaklarında çeşitliliğin ve enerji ihtiyacının sağlanması, diğer enerjilere oranla sera etkisi yapan gaz emisyon değerlerinin düşürülerek çevreye verilen zararın azaltılması, tarımsal açıdan bir pazar ve iş gücü oluşturulması gibi avantajlar sağlamaktadır. Sahip olduğu birçok avantajla biyoetanol son yıllarda üzerine olan yoğun ilgi ile birçok çalışmaya konu olmuştur. Biyoetanol genelde şeker, nişasta ve lignoselülozik esaslı kaynakların bir dizi ön işlemi takip eden fermentasyon prosesleri sonucu üretilmektedir.

Şeker ve nişasta içeren kaynakların çoğunun doğrudan gıda maddesi olarak kullanılması bu tür hammaddelerin biyoetanol üretiminde kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Lignoselülozik materyaller birçok endüstrinin atığı olması sebebiyle hammadde olarak bolca bulunma özelliğine sahiptir. Biyoetanol üretiminde lignoselülozik biyokütlenin kullanımı şeker ve nişasta esaslı hammaddelere göre daha avantajlıdır.

Tarımsal ürünlerin işlenmesi sonucu oluşan birçok fabrika artık ya da atığı lignoselülozik biyokütle olarak biyoetanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilir. Bu amaçla değerlendirilebilecek tarımsal sanayi ürünlerinden birisi de üzümdür. Üzüm (*Vitis vinifera*) dünyada ve ülkemizde geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılan en değerli geleneksel meyvelerden biridir. Üzüm direkt sofralık olarak tüketildiği gibi, şarap başta olmak üzere birçok endüstriyel işletmenin de hammaddesidir. Üzüm atıklarının biyoetanol üretiminde değerlendirilmesi şıranın uzaklaştırılarak geriye kalan posanın işlenmesi şeklindedir. Üzüm salkımlarının sapı, üzüm tanelerinin kabuk kısımları ve çekirdek kısmından oluşan ve bir lignoselülozik materyal olarak düşünülen üzüm posası diğer birçok lignoselülozik hammaddelere göre yüksek oranda şeker içermektedir.

Bu tez çalışmasında, ülkemizde üretim ve tüketimi oldukça yüksek olan üzüm meyvesi atığı olan üzüm posasının biyoetanol üretiminde substrat kaynağı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enerji

İnsanlık dünyada farklı türden enerji kaynaklarından yararlanmaktadır. Enerji bir formdan başka bir forma dönüştürülebilir ve bu dönüşüm genellikle ısıtma, soğutma ve hareket etme şeklinde değerlendirilebilir. Yeryüzünde yaşayan herhangi biri hayatta kalabilmek için enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Enerji insanların büyüme ve gelişmede ihtiyaç duydukları en önemli gereksinimlerden biridir. 20. yüzyılda enerji tüketimi yaklaşık 13 kat artmış, ancak bu artış nüfus artışından daha hızlı olmuştur (Karagöl vd., 2007).

Dünyada küresel ya da bölgesel ölçekte yaşanan enerji krizleri, bir üretim aracı olarak enerjinin öneminin göstergelerinden biridir. Ekonomik gelişmede en stratejik ölçülebilir parametredir. Enerji tüketimi ve ülkelerin enerji bağımlılığı her geçen gün artmaktadır (Karagöl vd., 2007). Örneğin, 1970'teki küresel ekonomik kriz ve petrol maliyetlerinin artması gelişmekte olan ülkelerin ekonomik açıdan büyümesini olumsuz yönde etkilemiştir. Bu durum, ekonomiyi güçlendirme ve enerji tüketimi arasındaki ilişkiyi analiz etmek için yapılan çalışmaların başlatılmasında etkili olmuştur (Aydın, 2010). Yapılan bu çalışmalar, gelişmiş ülkelerin kalkınabilmelerinin enerji kaynağı kullanma konusundaki deneyimleri sayesinde olduğunu göstermiştir (İlgınoğlu, 1991).

Gayri Safi Milli Hasıla (GSMH) artış oranının yükseltilmesi, enerji tüketimini artırmaktadır. Enerji tüketimi, enerji maliyeti ile ilişkidir. Aynı zamanda ülke ekonomisi, nüfus yoğunluğu, kırsal alan nüfus miktarı ve iklim koşulları gibi faktörler de enerji tüketimini etkilemektedir. Ancak enerji tüketimini belirleyen temel faktör, nüfusun gelir düzeyidir (Aydın, 2010). Gelir düzeyinin iyileştirilmesi, nüfus talebini, üretimi ve kullanımı arttırmaktadır. (Aydın, 2010).

Enerji, yapısındaki farklılıklara göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmaya dahil olan birincil enerji kaynakları doğrudan doğal kaynaklardan elde edilir. Herhangi bir işlem gerektirmeden doğrudan kullanılabilen bu enerji kaynakları, ikincil enerji formuna da dönüştürülebilmektedir. Birincil enerji kaynakları geleneksel ve yenilenebilir kaynaklar olarak iki sınıfa ayrılır. Geleneksel kaynakların petrol, kömür ve nükleer enerji gibi sınırlı rezervleri mevcuttur. Geleneksel enerji kaynaklarının tersine, yenilenebilir kaynakların sınırlı rezervleri yoktur ve her defasında yenilenebilirlik özelliğine sahiptirler. İkincil enerji

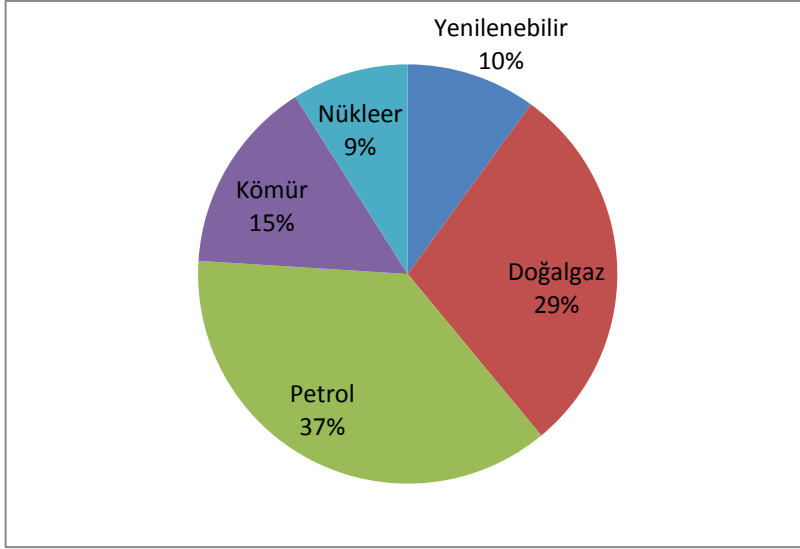
kaynakları ise primer enerji kaynaklarının fiziksel dönüşümünden elde edilir (Gülay, 2008).

2.2. Yenilenebilir Enerji

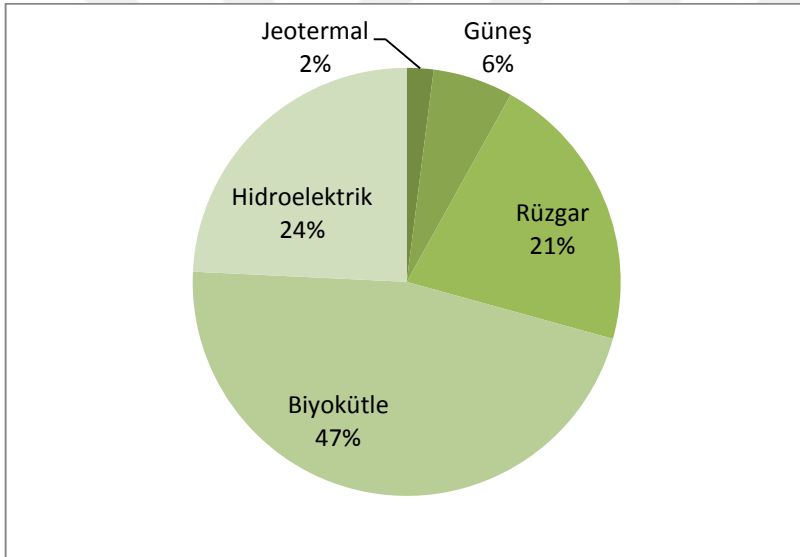
Gelişen teknoloji canlı yaşamını ve çevreyi tehdit eden bazı olumsuz etkileri de beraberinde getirmektedir. Dünyada artan insan nüfusu enerji gereksinimini artırmakta, bu da yeni enerji kaynağı arayışlarını zorunlu kılmaktadır. Enerji kaynakları yenilenebilir ve geleneksel kaynaklar olarak adlandırılan iki kısımda incelenebilir. Geleneksel kaynaklar bir kez kullanılabilen kaynaklardır. Bu kaynakların maliyeti ve dünyadaki rezervlerinin tükenme riskinin yanında çevreye olumsuz etkilerinden dolayı, farklı enerji kaynakları aramak zorunlu hale gelmiştir. Örneğin küresel ısınma çevre sorunlarından biridir. Günümüzde karşılaşılan çevre sorunlarına çözüm üretmek ve sürdürülebilir kalkınma için uzun vadeli potansiyel eylemler gerekmektedir. Bu bağlamda, yenilenebilir enerji kaynakları en etkili çözümlerin başında gelmektedir. Yenilenebilir kaynaklar art arda kullanılabilen kaynaklardır. Bu kaynaklar sınırsız, temiz, pratik, ekonomik ve çevre dostudur (Zeray, 2010).

Geleneksel enerji kaynaklarından kaynaklanan çevresel sorunlar ve petrol fiyatlarındaki artışa bağlı olarak, yenilenebilir kaynaklara olan ilgi önemli ölçüde artmış ve araştırmacılar bu konu üzerine çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Yenilenebilir enerji, güneş ışığı, rüzgâr, hidroelektrik, yağmur, gelgitler ve jeotermal ısı gibi yenilenebilir doğal kaynaklardan gelen enerjidir. Yenilenebilir kaynaklar (modern biyokütle, rüzgar, güneş, jeotermal ve biyoyakıtlar) %3'lük bir oran oluşturup çok hızlı büyümektedir (REN21, 2011). Şekil 2.1 2016 yılı sonunda enerji kaynaklarına göre enerji tüketimlerini ve Şekil 2.2 ise yenilenebilir kaynaklara göre enerji tüketimleri oranını göstermektedir (IEA 2016).

Yenilenebilir enerjiler, elde edilen yeni enerjinin kaynağına göre şu şekilde sınıflandırılabilir: Biyokütle enerjisi, güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, jeotermal enerji ve hidroelektrik enerjisidir.



Şekil 2.1: 2016 yılında enerji kaynaklarının dağılım oranları (IEA, 2016).



Şekil 2.2: Yenilenebilir kaynaklara göre enerji tüketimleri oranı (IEA, 2016).

2.2.1. Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Oluşumu

Hiçbir insanın katkısı olmadan gerçekleşen ve her geçen gün yenilenebilen enerji kaynakları olarak adlandırdığımız yenilenebilir kaynaklar doğal çevre üzerinde temiz ve ekonomik bir kaynak olmaya devam etmektedir. Kısacası, yenilenebilir enerji kaynakları yenilenerek, dünyada varlığını sürdürebilirken, tükenmez kaynaklar olarak tanımlanabilir.

İnsanlar, bitkiler ve hayvanlar varlıklarını sürdürebilmek için ihtiyaç duyduğu enerjinin tamamını güneş tarafından alırlar. Güneş, biyokütlelerde fotosentez yardımı ile

kimyasal enerji olarak bir enerji parçası depolar. Güneş, soğuk olan birçok varlığı ısıtır, bu da hava hareketine neden olur ve böylece güneş enerjisi rüzgar enerjisi olarak bilinen hava hareketiyle kinetik enerjiye dönüşür. Rüzgar enerjisi; hareket halindeki havanın enerjisini temsil eder. Rüzgar enerjisi güneş enerjisinin sadece %1'ini kullanır. Kullanılan teknolojiye bağlı olarak önümüzdeki yıllarda rüzgar gücünün daha da artması beklenmektedir (Gülay, 2008).

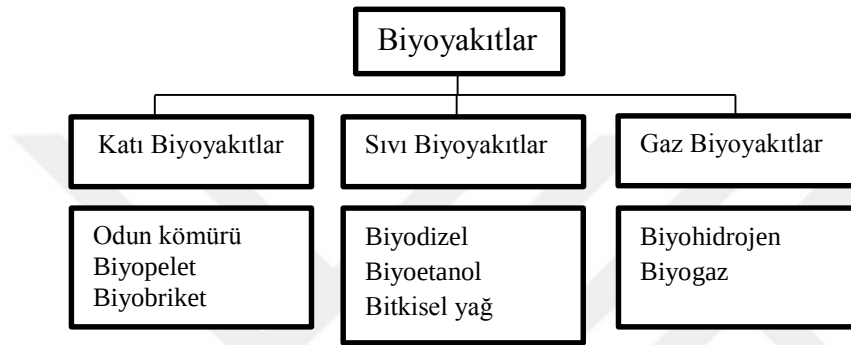
Yeraltı kaynakları olarak ifade edilen jeotermal kaynaklar, yer kabuğunun derinliklerindeki ısı enerjisinden ve çeşitli kimyasallar içeren sıcak su, buhar ve gazlardan oluşmaktadır. Jeotermal enerji olarak tanımlanan bu kaynaklardan doğrudan veya dolaylı olarak yararlanılması söz konusu olabilmektedir. Fosil yakıtlara kıyasla daha az hava kirliliğine yol açtığı için çevre dostu bir enerji kaynağıdır. Elektrik enerjisi üretimi ve enerji temini, doğrudan ısıtma uygulamaları için jeotermal kaynakların kullanılmasıyla sağlanmaktadır. Ayrıca binalarda jeotermal ısı pompalarının kullanımı ile endüstriyel elektrik ve doğal gaz tasarrufu sağlanmaktadır. Dünyanın enerji ihtiyacının büyük bir kısmını karşılayabilmek için dünyanın kabuğunda yeterli miktarda ısının varlığı mevcuttur (Erdoğan, 2014).

Biyoyakıtlardan biyoetanol, biyodizel ve biyogazın kullanımı hızla artmaya başlamıştır. Fosil yakıtların yerine kullanılabilmesi, ekonomik olması ve çevre üzerinde olumsuz etkilerinin neredeyse olmaması bu artışın en önemli sebeplerindendir. Biyoetanol doğrudan benzin ile karıştırılabilmektedir. Biyoetanolün üretilebileceği başlıca ürünler içerisinde buğday, şeker pancarı ve mısır gibi ürünler bulunmaktadır (Bulut, 2006).

2.3. Biyoyakıtlar ve Tarihçesi

Biyoyakıtlar, çeşitli biyokimyasal veya termokimyasal dönüşüm sürecini tamamlamış olan tarımsal ürünler ile çeşitli türden organik atıklardan elde edilen katı sıvı ve gaz halindeki ürünlerin genel adıdır. Biyoyakıtların bir başka tanımı ise, hacminin en az % 80'i, canlı organizmalardan elde edilmiş olan bir yakıt olmasıdır. Genel olarak, biyoyakıtlar biyokütle enerjisidir. Biyoyakıtlar, petrol, kömür veya nükleer yakıt gibi doğal yakıtlardan farklı olarak yenilenebilir enerji kaynaklarından oluşmaktadır. Biyoyakıtların kullanımı, insanlık tarihinin en eski dönemlerine kadar uzanır. İnsanlar, tarihin birçok döneminde odun ve odun parçalarını ısıtma ve pişirme amaçlı biyoyakıt olarak kullanmışlardır. 20. yüzyıla yakın dönemde kömürün yaygınlaşması nedeniyle, odunun pişirme ve ısıtma

amacıyla kullanımı azaltılmıştır. Aynı şekilde, yakın zamana kadar, gübre yakılarak biyoyakıt olarak kullanılmaktadır. Sıvı biyoyakıtlar ilk defa Mısırlılar tarafından kullanılmıştır. Mısırlılar, aydınlatma yakıtı olarak lambalar için kastor tohumu yağı kullanmıştır. Bir diğer sıvı biyoyakıt olan biyodizel 1893'lerde üretilmiştir (Adigüzel, 2011). Biyoetanol de sıvı biyoyakıtlardan olup 1930'lardan beri Brezilya'da üretilmektedir. Gaz biyoyakıtlara biyohidrojen, biyogaz ve sentez gazı örnek verilebilir. Biyoyakıtların türüne göre sınıflandırması Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Biyoyakıtları türüne göre sınıflandırma

2.4. Biyoetanol

Biyoetanol, karbonhidrat esaslı kaynaklardan fermantasyonla üretilen, fosil yakıtlara en umut verici alternatiflerden biridir (RFA,2016).

Biyoetanol benzinle karşılaştırıldığında; Biyoetanol daha yüksek oktan sayısına, daha yüksek yanma hızına, daha düşük buharlaşma sıcaklığına sahiptir. Bu nedenle biyoetanol motorlarda yakıt olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, biyoetanol yapısı nedeniyle, aynı zamanda, benzinden daha düşük bir enerji yoğunluğuna sahiptir. Biyoetanolün enerji yoğunluğu, benzinden %33 daha düşüktür. Ayrıca, yüksek korozyon olasılığı, düşük yanma lüminesansı ve su ile kolayca azeotropik bir karışım oluşturma eğilimi biyoetanolün dezavantajları arasındadır (Acaroğlu, 2013). Biyoetanol, araç motorunda yaklaşık % 35 oksijen içeriğiyle daha verimli yanma sağlar. Bu daha verimli yanmanın sonucu olarak NO_x, hidrokarbonlar ve partikül emisyon değerlerinin azaldığı gözlenmektedir. CO₂, bitkiler tarafından fotosentez reaksiyonlarında kullanılır. Böylece, atmosferdeki net CO₂ miktarında artış görülmez (Cardona ve Sánchez, 2007).

Karbonhidrat kaynağı olarak lignoselülozik biyokütle kullanarak üretilen biyoetanol (bu tür üretim ikinci nesil biyoetanol üretimi olarak da adlandırılır), sera gazı emisyonunu en az % 60 oranında azaltabilir. Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanol'e biyokimyasal dönüşümü çok adımlı bir işlemdir (Ladisich vd., 2010). Biyoetanol oluşumu aşamaları şunlardır:

Biyokütle hazırlanması: Hasat sonrası biyokütle toplanır, yıl boyunca sürekli olarak kullanılacak şekilde depolanır. Genellikle bu aşamada, öğütme yoluyla biyokütle tane boyutu azaltılır ve daha sonra kurutulur.

Ön işlem: Selüloz ve hemiselülozu fermente edilebilir şekerlere dönüştürebilmek için hammaddenin kristal yapısı zayıflatılır. Yüksek basınç, sıcaklık ve bazı yöntemlerde asit veya baz ile birlikte uygulama yapılır.

Hidroliz: Ön işlemler ile kristallığı ve lignin miktarı azaltılan malzemeye hidroliz işlemi uygulanır. Bu işlemde var olan karbonhidrat yapısına 1 molekül su eklenerek lignoselülozik malzeme parçalanır ve basit şekerlere ayrışır.

Fermentasyon: Hidrolizata mikroorganizmalar eklenir ve mikroorganizmalar metabolizmasında ön işlem ve hidrolizle elde edilen şekerleri tüketir; etanol bu mekanizmanın bir yan ürünüdür.

Eteranol ayrımı ve geri kazanımı: Fermantasyon ile üretilen etanolün geri kazanılması için rektifikasyon işlemi kullanılması yaygın bir uygulamadır. Biyoetanolün bazı fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri sırasıyla Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3'de verilmiştir

Tablo 2.1: Biyoetanolün fiziksel özellikleri (Acaroğlu vd., 2004)

Özgül Ağırlık (20°C)	0,79 kg/dm ³
Buhar Basıncı (38°C)	50 mmHg
Kaynama Noktası	78,5°C
Dielektrik Katsayısı	24,3
Suda Çözünme	Sonsuz

Tablo 2.2: Biyoetanolün kimyasal özellikleri (Acaroğlu vd., 2004)

Formül	C ₂ H ₅ OH
Moleküler Ağırlık	46,1
Karbon	%52,1
Hidrojen	%13,1
Oksijen	%34,8
C/H Oranı	4
Stokiyometrik Hava/Etanol	9,0

Tablo 2.3: Biyoetanolün termal özellikleri(Acaroğlu vd., 2004)

Alt Isıl Değeri (kJ/kg)	26.784
Kendi Kendine Tutuşma Sıcaklığı (°C)	35
Özgül Isı (kJ/kg°C)	2,5
Donma Noktası (°C)	-115

Biyoetanol üretim aşamasında yakıttan enerji sağlanırken aynı zamanda da, yan ürün olarak “damıtılmış yem taneleri” (DDGS) adı verilen ve protein açısından oldukça zengin, hayvan yemi olarak kullanılabilen bir ürün elde edilir (Lurgi, 2009). Biyoetanolün avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Biyoetanol, benzin için yenilenebilir bir alternatiftir ve benzinle her oranda karışabilir.
- Biyoetanol sera gazı emisyonunu azaltır.
- Biyoetanol tarımsal hammaddeler yoluyla kırsal kalkınma sağlar. Çevre kirliliğini azaltır.
- Ozonun tükenmesine neden olan hidrokarbon emisyonunu azaltır.
- Kanserojen olan benzen ve bütadien gibi kirleticileri içermez.
- Kükürt emisyonuna neden olmaz (Gülay, 2008).

2.4.1. Biyoetanolün Tarihi ve Günümüzdeki Yeri

Biyoetanol terimi, kimyasal yöntemlerden farklı olarak, biyolojik yöntemlerle biyokütleden üretilen etil alkol anlamına gelmektedir. Biyoetanolün yakıt olarak yaygın bir şekilde kullanımı 20. yüzyılda artmıştır. Ancak, motorlarda etanolün ilk kullanımı, modern dört silindirli içten yanmalı motorun bulunduğu ilk tarihlere dayanmaktadır. (Güner, 2016).

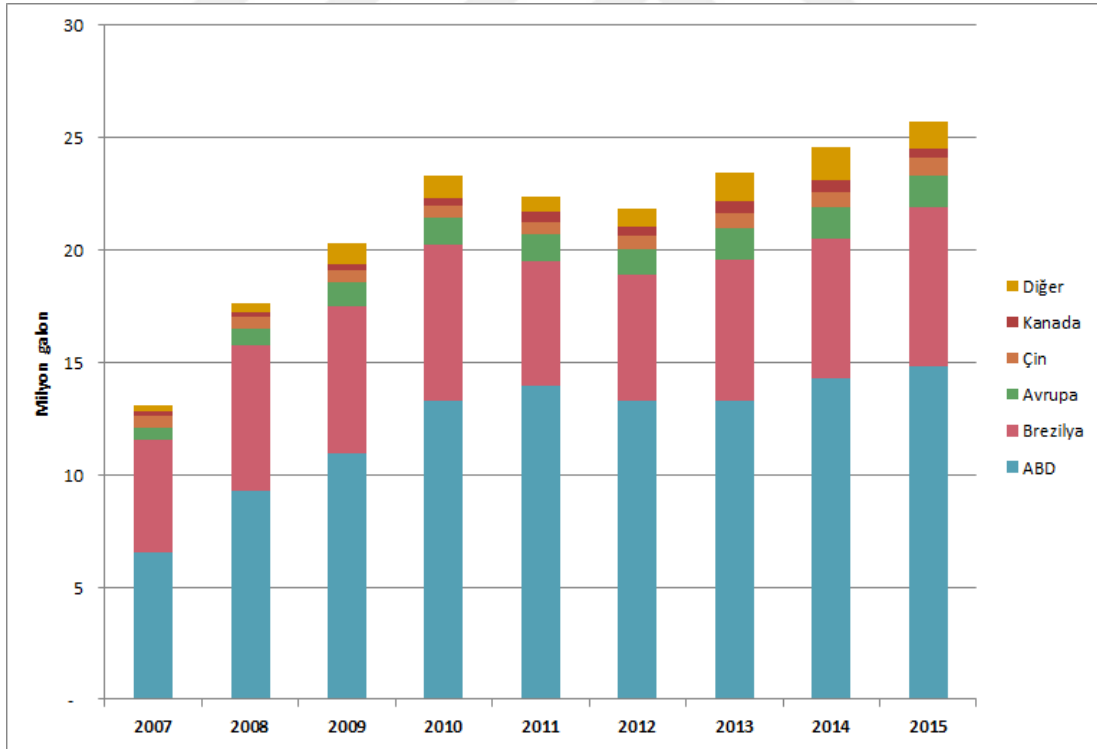
İkinci Dünya Savaşı sırasında, Japonlar yakıt ihtiyaçlarını karşılamak için savaş uçaklarında biyoetanol ve benzin karışımı kullanmışlardır. 1937-1944 yılları arasında biyoetanol üretiminin yılda yaklaşık 170 milyon litre olduğu bildirilmiştir. O tarihlerde, yakıt olarak etanolün kullanımı yaygınlaşmış ve biyoetanol üretiminin sıvı yakıtlar içindeki payı % 26,7' ye yükselmiştir. Bununla birlikte, II. Dünya Savaşı'ndan sonra biyoetanol üretiminin artması petrol fiyatlarında düşüşe neden olmuştur (Kouzumi, 2011).

1973-1979 yılları arasında yaşanan ciddi petrol krizi ve dolayısıyla benzinin birim fiyatındaki artış nedeniyle, yakıt olarak biyoetanol kullanılması gündeme gelmiştir. Günümüzde halen öncü olan Brezilya ve Amerika, 1975 ve 1978' de "Proalcool" adlı programla etanol üretim endüstrisini geliştirerek seri etanol üretimine geçmişlerdir (Solomon vd., 2007).

II. Dünya Savaşı sırasında, savaş koşulları ekonomileri ve öncelikleri değiştirmeye başladıkça lignoselülozik kaynakları kullanarak Almanya, Rusya, Çin, Kore, İsviçre ve ABD gibi bazı ülkelerde etanol üretim tesisleri inşa edilmiştir. Bu tesislerde üretilen etanolün diğer ülkelere yakıt olarak satılması ve bu şekilde yakıt ihtiyacının karşılanması amaçlanmaktadır. Lignoselülozik etanol üretimi sentetik etanol üretim tesislerinin kapanmasına neden olmuştur (Lin ve Tanaka, 2006). Nisan 2004'te Kanada'da ilk lignoselülozik hammaddeyi kullanan örnek bir üretim tesisi kurulmuştur (Tampier vd. 2004) . 2006 yılında Brezilya, yılda 15 milyon litre saf biyoetanol üretmek için 300'den fazla biyoetanol üretim tesisi kurmuştur. Amerika'da, aynı yıllarda 80'den fazla kuruluştaki 10 milyar litre biyoetanol üretilmiştir. Ancak, 2008'de ABD, küresel etanol üretiminde en üst seviyeye yükselmiştir. Avrupa, toplam etanol üretiminde, Almanya ve Fransa'ya göre en yüksek paya sahiptir (Wang vd., 2012). İkinci nesil biyoetanol üretimi için dünya çapında yeni araştırma, yatırım ve üretim tesislerindeki artışa ek olarak, şu anda Avrupa'da çoğunlukla tarım ürünleri ve şeker pancarı kullanılmaktadır (Demirbaş, 2009). Dünya lideri ABD'de etanol, mısırdan hidrolize edilmiş nişasta ile üretilir ve Brezilya'da ikinci sırada şeker kamışı türevlerinden etanol üretilir (Sarris ve Papanikolaou, 2016). Bu

çevresel sorun nedeniyle, birçok ülke toplam enerji tüketimindeki yenilenebilir enerjiyi dikkate almaktadır. Alternatif Yakıtlar Veri Merkezi raporlarına göre, ABD, 2015 yılında dünyadaki toplam biyoetanolün %58'ini üretirken, Brezilya % 28 oranında üretim yapmaktadır. Avrupa ve dünyanın geri kalanı sadece biyoetanol üretiminin % 14'ünü paylaşıyor (Demirbaş, 2017). 2015 küresel biyoetanol üretim raporuna göre, üretim 2014 yılına göre % 4 artarak 98,3 milyar litre artmıştır. Bu artışın nedeni, etanol üretiminde dünya lideri olan ülkelerin hammadde yetiştiriciliği için daha verimli tarımsal faaliyetler gerçekleştirebilmeleridir (RFA, 2016).

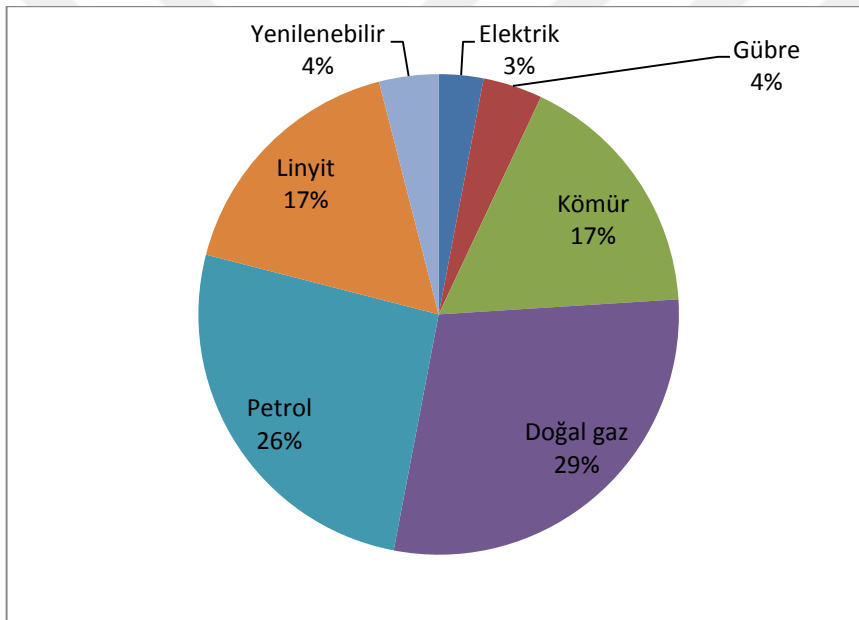
2006 yılında Brezilya, 300'den fazla biyoetanol tesisini aktifleştirdi ve 3 milyon otomobilde kullanılabilecek 15 milyar litrelik saf etanol üretirken, Amerika Birleşik Devletleri yalnızca 80'den fazla tesiste 10 milyar litrelik biyoetanol üretti. Bununla birlikte, 2008'de Birleşik Devletler, biyoetanol üretimini ve ulaştırmada kullanım oranını artırdı ve tüm dünyada 1 numaraya yerleştirildi (Wang vd., 2012). Mevcut talebe göre, küresel biyoetanol üretimi Şekil 2.4'de gösterildiği gibi zamanla artmıştır (RFA, 2016).



Şekil 2.4: Dünyadaki biyoetanol üretiminin dağılımı (RFA,2016).

Türkiye, Dünya Bankası sınıflandırmasına göre gelişmekte olan bir üst orta gelirli ülkedir. Sanayinin hızla büyümesinden dolayı daha fazla enerji gerekmektedir. Ayrıca,

refah seviyesinin ve satın alma gücünün iyileştirilmesinin bir sonucu olarak; ulaşım araçlarının sayısı da artmaktadır. Bu durum daha fazla yakıt gerektirir ve daha fazla emisyonu neden olur. Bugün, Türkiye'nin kullandığı ana enerji kaynakları fosil yakıtlardır: petrol, kömür ve doğal gaz gibi klasik enerji kaynakları üretimden çok hızlı bir şekilde tüketilmektedir. Türkiye'nin 2012 yılındaki birincil enerji talebi Şekil 2.5’de gösterilmiştir (Acaroğlu ve Aydoğan, 2012). Türkiye, OECD’de en çok artan enerji kullanımı ülkesidir ve özellikle petrol ve doğal gaz başta olmaz üzere enerji kaynaklarına yabancısıdır. Elektrik çoğunlukla termik santraller tarafından kömür, linyit, doğalgaz ve akaryakıt kullanılarak üretilmektedir. Yenilenebilir enerjiden elektrik üretimi azdır. Nükleer enerjiye gelince, yeni ve çok sınırlıdır (Kaya ve Kılıç, 2014).



Şekil 2.5: Türkiye'nin 2012 yılındaki birincil enerji talebi (ETKB).

2.4.2. Biyoetanolün Türkiye’deki Yeri

Petrol ve doğal gaz, Türkiye'nin en önemli tüketim kaynaklarıdır. Ulaştırma ve endüstri çoğunlukla bu fosil enerji kaynaklarına dayanmaktadır. Bununla birlikte, iyi bilindiği gibi, petrol kaynaklı emisyonlar, sera gazlarına ve iklim değişikliğine ilişkin durumlara neden olmaktadır. Enerjinin endüstride kritik bir öneme sahip olduğu ve uzun vadeli ekonomik büyümeye katkıda bulunduğu bilinmesine rağmen, fosil enerji kaynakları emisyonları da sürdürülebilirlik için bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenlerle, çoğu ülke sera gazı emisyonlarını azaltmaya karar vermiştir (Bayrakçı Özdingis ve Koçar, 2018).

Türkiye'de yüksek enerji talebinden dolayı petrol neredeyse tümüyle ihraç edilmekte ve CO₂, CO, CH₄ ve NO_x gibi sera gazı emisyonlarına neden olmaktadır. Alternatif bir yakıt olarak ve petrolün özelliklerinede uyması için biyoetanol düşünülmüş ve ikinci nesil biyoetanol (SGB) olarak bilinen bitki kalıntılarından üretimi iyileştirmek için geniş bir araştırma alanı haline gelmiştir. Türkiye, Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi (UNFCCC) protokolünü imzaladıktan sonra, Türkiye'de alternatif yakıtlar daha belirgin hale gelmiştir. Türkiye'nin biyokütle potansiyeli ve yabancı enerji kaynaklarına bağımlılığı dikkate alındığında, biyoetanol üretimi ve kullanımı ön plana çıkmaktadır (Bayrakçı Özdingis ve Koçar, 2018).

11 Aralık 1997'de Kyoto Protokolü Kyoto'da kabul edildi ve 16 Şubat 2005'te Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi Protokolü (UNFCCC) tarafından yürürlüğe girdi. Türkiye dahil, 192 ülke bu protokolü imzaladı (191 devlet ve 1 bölgesel ekonomik entegrasyon örgütü) ve küresel ısınmanın var olduğu ve insan kaynaklı CO₂ emisyonlarının neden olduğu öncülüne dayanarak sera gazı emisyonlarını azaltmaya başladı. Kyoto Protokolü, Türkiye'nin INDC raporu ve Türkiye'deki birincil enerji talebi dikkate alındığında, fosil enerji kaynakları yerine yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı ön plana çıkmıştır.

2.4.3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Biyoetanol üretmek için kullanılan yenilenebilir kaynaklar şekerler, nişasta ve lignoselülozik biyokütle olarak sınıflandırılabilir. Şeker esaslı hammaddeler fermente edilebilir şekerlerin elde edilmesi için yalnızca bir ekstraksiyon işlemine ihtiyaç duyarken, nişastalı ürünlerin nişastayı glikoza dönüştürmesi için hidrolize uğraması gerekir. Enzimatik hidroliz kullanılan proseslerde lignoselülozlu biyokütle enzimin erişilebileceği yüzey alanı için ve selüloz yapılarını değiştirmek için hidroliz öncesinde bazı ön işlemlere tabi tutulmalıdır. (Zabed vd., 2017).

2.4.3.1. Şeker İçerikli Kaynaklar

Şeker kamışı, şeker pancarı, üzüm, hurma, kavun, elma, gibi birçok meyve ve bu meyveleri işleyen fabrikaların atıkları (melas vb.) gibi materyallerden oluşan kaynaklardır (Nwufu vd., 2016). Şeker mahsullerinin etanol ham maddeleri olarak sağladığı başlıca

avantajlar, yüksek şeker verimi ve düşük dönüşüm maliyetidir. Fakat, bu ürünlerin mevsimsel üretimleri ve birçoğunun gıda ya da yem olmaları biyoetanol üretiminde kullanım açısından ana sınırlayıcı faktördür (Vohra vd., 2014). Şeker kamışı, güneş ışınlarını biyokütle haline dönüştürme yeteneğine sahip ve tropik ve alt tropikal ülkelerde yetiştirilen bir C4 bitkisidir (Sindhu vd., 2016). Şeker kamışı ve marmelat fabrikalarının yan ürünleri uzun yıllar boyunca biyoetanol üretimi için umut verici hammaddeler olarak kullanılmıştır. Şeker pancarı, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da önemli bir şeker kaynağıdır ve Fransa'daki biyoetanol üretimi için kullanılır (Vohra vd., 2014). Şeker pancarı, genellikle şekerlerin çoğunu içeren 0,5-2 kg'lık ortalama bir kök içerir. Şeker pancarı kökündeki şeker konsantrasyonu çeşitlilik ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişir (Marx ve Brandling., 2016).

Melas, şeker rafinerisi endüstrilerinin koyu, yapışkan ve şekerce zengin yan ürünüdür. İlgili rafineride şeker kamışı ve şeker pancarı ile üretilen kamış ve pancar melasları olmak üzere iki iyi bilinen yan ürün içerir. Melas biyoetanol üretimi için cazip bir hammadde olarak kullanılmaktadır. Şeker pancarı melası bileşim ve şeker içeriği, şeker ekstraksiyonu için kullanılan işlemlere ve başlangıç malzemelerinin bileşimine bağlı olarak değişebilir (Sindhu vd., 2016). Ülkemizde melastan biyoetanol üretimini gerçekleştiren bir tesis bulunmaktadır (URL-1, 2017). Üzüm işleyen fabrika artık ve atıkları da biyoetanol üretiminde kullanılabilecek materyaller arasında düşünülmektedir. Şarap, pekmez, marmelat fabrikaları bu alanda üretim gerçekleştiren tesislerden bazılarıdır.

2.4.3.2. Nişasta İçerikli Kaynaklar

Nişasta bitkileri, bol miktarda üretilibilmeleri, dönüşüm kolaylığı, uzun süre depolama kapasitesi gibi nedenlerle biyoetanol üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hammaddeler tahıllar (% 60-80 nişasta), yumrular ve kökler (% 60-90 nişasta), baklagiller (% 25-50 nişasta) yeşil ve olgunlaşmamış meyveler (% 70 nişasta kadar) içerir (Santana Ve Meireles., 2014). Mısır, buğday, arpa, manyok, patates ve tatlı patates çok bilinen biyoetanol kaynaklarıdır (Balat,2011).

Mısır, ticari ölçekte biyoetanol üretimi için yaygın olarak kullanılan önemli bir hububat ürünüdür ve son yıllarda kullanımı artmıştır. ABD, 2014 yılında bu hammaddeden 14.3 milyar galon etanol üretmiş ve 51 ülkeye kabaca 825 milyon galon etanol ihraç etmiştir (RFA, 2015). Son zamanlarda, bazı Avrupa ülkeleri mısırdan etanol üretmeye ilgi

göstermektedir. Bu nedenle, mısır etanolü kademeli olarak büyük bir ekonomik önemi olan küresel bir biyoyakıt hammaddesi haline gelmiştir. Ülkemizde de mısırdan biyoetanol üretimini gerçekleştiren bir fabrika mevcuttur (URL-2, 2017).

Patates, biyoetanol üretimi için potansiyele sahip ılıman iklim koşullarında yetiştirilen mevsimlik önemli bir yumru bitkidir. Büyük oranda kuzey yarım kürede yetişir. Dünyadaki dördüncü önemli gıda ürünlerinden biridir. Çin, dünya patateslerinin yaklaşık % 20' sini üreten büyük bir üreticidir. Dünyada patates üreten diğer önemli ülkeler Rusya % 12, Hindistan % 8 ve ABD % 8 şeklindedir (Thatoi vd., 2014). Tatlı patates, ılıman bölgede yıllık bir ürün olduğu halde, uzun ömürlü bir ürün olan tropik ve alt tropikal bölgelerde yetiştirilen bir kök mahsulüdür (Kays ve Vang., 2001). Bununla birlikte, şu anda Çin, dünya tatlı patates üretiminin yaklaşık %80' ini; Uganda ve Nijerya, küresel ürünün kabaca %3' ünü üretmektedir (Duvernay vd., 2013). Tatlı patateslerin nişasta içeriğine bağlı olarak beyazdan turuncuya ve hatta mor renge sahip çeşitleri bulunur. Genellikle, beyaza yayılmış çeşitler daha büyüktür ve diğer çeşitlerden daha yüksek nişasta miktarları (% 25-40) içerir (Thatoi vd., 2014).

Dünya gıda ihtiyacı düşünüldüğünde mısır, patates vb. materyallerin biyoetanol üretiminde kullanımları için alternatif tekniklerin geliştirilmesinin önemli olduğu söylenebilir.

2.4.3.3 Lignoselülozik Kaynaklar

Lignoselülozik biyokütle, enerji bitkileri (çok yıllık otlar ve diğer enerji bitkileri), su bitkileri (su sümbülü), orman malzemeleri (yumuşak ağaç, sert ağaç, talaş, budama ve kabuk inceltici kalıntıları), tarımsal kalıntılar (hububat samanları ve küspeler) ve belediye katı atıkların organik kısmını oluşturur. Genel olarak, lignoselülozik biyokütle, gıda ve yem bitkileri üretiminde fazladan toprak veya girişim gerektirmeden etanol üretmek için kullanılabilecek en büyük, umut verici ve bol miktarda bulunan bir kaynaktır (Saini vd., 2014). Bitkisel biyokütle, esas olarak selüloz, hemiselüloz ve lignin ile birlikte az miktarda pektin, protein, ve ekstraktlardan oluşmaktadır. Bu bileşenlerin bileşimleri bitki türüne göre değişebilir. Buna ek olarak, tek bir bitki içindeki çeşitli bileşenler arasındaki oranlar yaş, büyüme aşaması ve diğer koşullara göre değişim gösterir (Perez vd., 2002). Son zamanlarda yapılan araştırmalar lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretim kaynaklarının popüler bir konu halinde düşünülebileceğini göstermiştir.

2.5. Lignoselülozik Materyallerin Yapısı

Lignoselülozik materyaller genellikle üç ana bileşenden oluşur bunlar: selüloz (%30-50), hemiselüloz (%15-35) ve lignindir (%10-20) (Pettersen,1984; Girio vd., 2010). Selüloz ve hemiselülozlar, tüm biyokütlenin yaklaşık %70'ini oluşturur ve yapıya kovalent ve hidrojen bağlarıyla son derece sağlamlık kazandırır (Knauf ve Moniruzzaman, 2004).

Hemiselüloz: Hemiselüloz, heksozlar (D-glukoz, D-galaktoz ve D-mannoz) ve pentozlar (D-ksiloz ve L-arabinoz) dahil olmak üzere heteropolimerlerden oluşan amorf ve değişken bir yapıdadır. Şeker asitleri (üronik asitler), yani D glukuronik, D-galakturonik ve metilgalakturonik asitlerden oluşur (McMillan,1993; Saha, 2003). Ana zinciri temel olarak D-ksiloz (yaklaşık% 90) ve L arabinoz (yaklaşık% 10) içeren ksilan $\beta(1/4)$ bağlarından oluşur (Girio vd., 2010). Yumuşak ağaçların hemiselülozları tipik olarak glikozanlardır, sert ağaç hemiselülozu ise daha çok ksilanlardan oluşur (McMillan,1993). Şekerlerinin çeşitliliği nedeniyle, hemiselülozlar serbest monomerlere tamamen hidrolize edilebilecek çok çeşitli enzimler gerektirir.

Selüloz: Bitkilerde yaklaşık % 30 oranında bulunan organik polimerdir (U.S.,2009). Pamuk ve keten selülozun en saf kaynaklarıdır (sırasıyla % 80-95 ve % 60-80), (Demirbaş, 2005; Lugar 1999; Pettersen,1984). Uzun zincirli glikoz monomer zincirlerinden oluşan bir bitkinin hücre duvarının yapısal bir bileşenidir. Moleküller arasındaki yoğun hidrojen bağları, kristalli ve güçlü bir matris yapısı oluşturur (Ebringerova vd., 2005). Çok sayıda hidroksil grubunun çapraz bağlantısı, molekülü daha güçlü ve kompakt hale getiren mikrofibrilleri oluşturur. Selüloz yapısı, $\beta(1,4)$ glikoz bağları ile bağlanmış homopolimerdir. Selüloz molekülünün polimerizasyon derecesi bitki hücresi duvarında var olan her molekülde 500'den daha az sayıda glikoz molekülünün var olmasına bağlı olarak değişir (Ljungdal ve Eriksson, 1985). Bitki hücre duvarında selülozun oranı hücrenin evresine ve tipine göre değişiklik gösterir. Birincil hücre duvarının kuru ağırlığının yaklaşık %20-40'ı, ikincil hücre duvarın %40-60'ı selülozdan oluşmaktadır (Nugzar, 1997). Selüloz doğada tek başına bulunmayan, genellikle başka bitkisel maddelerle birlikte bulunan bir yapıdadır. Bu durum da selülozun doğal ortamda parçalanmasını zorlaştıran bir durumdur.

Lignin: Bitkinin kök ve gövdesindeki odunsu yapıyı oluşturan maddedir. Su geçirmez bir yapı özelliğine sahiptir. Yaşlanmış ve ölü hücrelerdeki selüloz çeperlerinde birikir ve bitkiyi uygun olmayan çevre koşullarından korur (Martinez vd., 2001). Lignin glikozit

koniferin olup kolayca glikoza ve aromatik alkole ayrıştırılabilir. Bu glikozit koniferinden türeyen alkole de koniferil alkol denir (Strayer vd., 2002). Lignin, karbonhidrat değildir ancak fonksiyon bakımından karbonhidratlara benzer bir maddedir. Bitki hücresinde sekonder çeperlerin yapısında büyük oranda bulunur. Hücre çeperindeki selüloz misellerinin arasında amorf lignin bulunarak dokularda odunlaşma meydana getirir. (Hirofimi vd., 1999). Ligninin asitlerle muamelesi ile yapılan hidroliz işlemi kolay değildir.

2.6. Biyoetanol Üretiminde Hammaddelere Uygulanan Ön işlemler

Biyokütleden fermantasyon yoluyla etanol üretiminde biyolojik dönüşümün genel süreci dört ana işlemde oluşur: ön işlem, hidroliz, fermantasyon ve etanol ayırımı veya saflaştırılması (Amin, 2009).

Biyokütleye uygulanan ön işlemler, geniş çapta üzerinde çalışılan önemli adımlardan biridir (Rabelo vd., 2009). Hemiselüloz ve lignin içeriği, selüloz kristallliği ve biyokütlenin mevcut yüzey alanı, selüloz ve ksilozun fermantasyon için hidrolizini etkileyen başlıca faktörlerden bazılarıdır. Biyokütlenin kristal yapısını bozmak ve mikroorganizma tarafından substrat tüketiminin artırılması amacıyla yapılan yüzey alanını arttırmada ön işlem adımı gereklidir. Ön işlemler, hücre duvarının yapısını bozarak hidroliz işleminin etkisini artırır. Bozulmadan sonra, karbonhidratlar, monosakkaritlerin elde edilmesi için daha fazla işlem gerektiren hücre içi ortamdan salınır (Hendriks ve Zeeman., 2009; Harun ve Danquah, 2011; Brennan ve Owende, 2010).

Ön işlemler, şu kriterleri karşılamalıdır: (a) Şekerin oluşmasını ya da daha sonra hidroliz ile şekerin oluşturulmasının sağlanması; (b) Karbonhidratın bozulmasının veya kaybının önlenmesi; (c) Sonraki hidroliz ve fermantasyon işlemlerine engel olan yan ürünlerin oluşumundan kaçınması; ve (d) Uygun maliyetli olmasıdır. Hücre duvarının bozulması için çeşitli yöntemler test edilmiştir bunlar; Fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik işlemlerdir (Brennan ve Owende, 2010; Harun ve Danquah, 2011; Sun ve Cheng, 2002).

2.6.1. Şeker İçerikli Hammaddelere Uygulanan Ön İşlemler

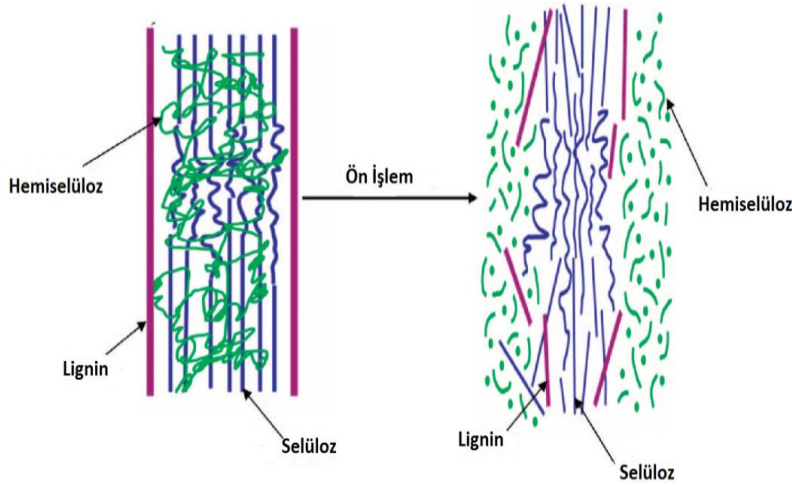
Şeker içerikli hammaddeler yüksek oranda glikoz içeren kaynaklardır ve hiç bir ön işlem yapma gereği duyulmaksızın fermantasyon ortamına eklenebilirler. Nişasta ve lignoselülozik materyaller gibi kompleks şeker kaynaklarına kıyasla 5-6 karbonlu bir şeker kaynağının etanol haline dönüştürülmesi, daha kolaydır. Bu materyaller maya hücreleri tarafından kolaylıkla parçalanabildiklerinden dolayı etanol üretimi için ön işleme tabi tutulmazlar (Balat, 2011).

2.6.2. Nişasta Kaynaklı Hammaddelere Uygulanan Ön İşlemler

Bu tür bir ön işlemde nişasta içindeki glikoz açığa çıkartılır. Bu dönüşüm nişasta zincirlerinin parçalanması suretiyle gerçekleştirilir. Nişasta sakkarifikasyonu için öncelikle yüksek sıcaklıkta (yaklaşık 450 K) ısıtıl işlem uygulanarak nişasta jelatinizasyonu sağlanmaktadır. Jelatinize nişasta α -amilaz tarafından parçalanarak sıvılaştırma sağlanmakta ve ardından glikoamilaz ile fermente edilebilir şekerler açığa çıkarılmaktadır. Nişastanın hidrolizi enzimatik yapılabildiği gibi asitle de yapılabilmektedir. Ancak asit hidrolizi sırasında istenmeyen bazı yan ürünler, örneğin toksik 5-hidroksimetilfurfural (HMF), oluştuğu için enzim hidrolizi daha çok tercih edilmektedir (Aggarwal vd., 2001). Enzimatik işlemlerin ise yavaş ve pahalı olması dezavantajdır.

2.6.3. Lignoselüloz Kaynaklı Hammaddelere Uygulanan Ön İşlemler

Lignoselülozik biyokütlenin ön işlemi, lignoselülozik yapıda mevcut selüloz ve hemiselüloz fraksiyonunu depolimerize ederek fermente edilebilir şekerlere dönüştürmektir (Sørensen vd., 2008). Bu tür bir dönüşümü şematize eden bir şekil Şekil 2.6' da gösterilmiştir. Bugüne kadar lignoselülozik materyaller için biyolojik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal olmak üzere dört kategoriye ayrılabilen basit veya teknolojik ve lojistik açıdan çok yoğun ön işlem yöntemleri araştırılmıştır. Bu ön işlem yöntemleri, etki şekli, reaksiyon koşulları ve genel sonuçlara göre birbirinden farklılıklar gösterir.



Şekil 2.6: Lignoselülozik materyalin ön işlem sonucu yapısal değişimi

2.6.3.1. Fiziksel ve Mekanik Ön İşlemler

Fiziksel ön işlemler, tane büyüklüğünün ve selüloz kristalinitesinin azaltılmasını sağlar. Tane büyüklüğündeki azalma yüzey alanında bir artışa yol açar. Fiziksel ön işlemler, genel olarak, biyokütle materyallerini öğütme, kırma, ultrasonik hücre bozulmaları ve diğer mekanik yöntemler kullanılarak parçalanmasıyla yapılır.

Mekanik ön işlem, öğütme ile parçacık boyutunu ve lignoselülozik materyalin kristalinitesini azaltmayı amaçlar. Bazı mekanik ön işlemler, kimyasal veya biyolojik ön-muameleden önce uygun partikül boyutu elde etmek için ön koşuldur. Bilyalı değirmende öğütme gibi bazı kapsamlı mekanik ön işlemler, selüloz kristalliğini parçalayarak biyolojik kütlenin parçalanabilirliğini artırmak için bir ön işlem yöntemi olarak tek başına kullanılabilir. Bununla birlikte, öğütme işleminin yüksek güç tüketimi bu işlemin en büyük dezavantajıdır. Lignoselülozik materyallerin enzimatik hidrolizini geliştirmek için farklı öğütme işlemleri (bilyalı değirmende öğütme, iki silindirli öğütme, çekiç frezeleme, koloid frezeleme ve vibro enerji frezelemesi) kullanılabilir (Taherzadeh ve Karimi, 2008).

Ekstrüzyon: Etanol üretiminde yeni ve umut verici bir ön işlem yöntemidir. Ekstrüzyonda, malzemeler ekstrüder boyunca geçiş esnasında fiziksel ve kimyasal değişiklikler ile sonuçlanan ısıtma, karıştırma ve kesme işlemlerine tabi tutulur. (Karunanithy vd., 2008). Proseste en yüksek verimliliği elde etmek için farklı biyoreaktör parametreleri dikkate alınmalıdır. Son çalışmalarda, ekstrüzyon işlemi sırasında enzimlerin uygulanması, etanol üretimi için umut verici bir teknoloji olarak düşünülmektedir.

Piroliz: Biyokütlenin 300°C'den yüksek sıcaklıklarda işlenerek ısıl bozundurulmasıyla parçalanması işlemidir (Shafizadeh ve Bradbury,1979). Bu işlem oksijensiz ortamda yapılır ve bozunma işlemi oldukça yavaş gerçekleşmektedir. Düşük sıcaklıklarda ayrışma çok daha yavaştır ve oluşan ürünler daha az uçucudur. Yapılan bir çalışmada piroliz ön-muamelesinden elde edilen ürünlerin hafif asit hidrolizinin %50-80 glikoz içeren indirgen şekerlere, %80-85 selüloza dönüşümünün sağlanmasıyla ileri bir işlem daha yapılabileceği gösterilmiştir (Shafizadeh ve Bradbury,1979). Biyokütle-FT-yakıt dönüşümü için ön işlemler olarak talaşlama, topaklaştırma, torrefekasyon ve piroliz incelenmiştir. Torrefekasyon ile ön işlemin pirolizden çok daha etkin olduğu bulunmuştur (Zwart vd., 2006).

2.6.3.2. Kimyasal Ön işlem

Kimyasal ön işlemler, biyokütlenin kendi moleküllerine hidrolize edilmesi için yapılan ve bir asit veya alkali kimyasal ajanlarının (örneğin hidroklorik veya sülfürik asit, sodyum hidroksit) eklenmesiyle yapılan farklı bir tekniktir (Lee vd., 2010). Asitler hemiselülozun çözündürülmesi, ligninin ayrıştırılması ve selülozun enzimatik hidrolize uğraması için kullanılır. Asit ön işlemi derişik, seyreltik ve zayıf organik asitlerle yapılır. Derişik ve seyreltik formlarında sülfürik asit ve hidroklorik asit gibi güçlü asitler, lignoselülozik biyokütlenin fraksiyonlanmasında kullanılmıştır (Mosier vd., 2005). Alkali ön işleminin çeşitli biyokütle besleme stoklarının artırılmasında iyi bir ön işlem olduğu bildirilmiştir. Bu ön işlem yöntemi, daha düşük sıcaklık ve basınç nedeniyle tercih edilir. Ek olarak, alkali ön işlemler, fermentasyon sırasında inhibisyon derecesini azaltır ve diğer ön işlem yöntemlerine kıyasla daha düşük bir üretim maliyeti sağlar.

Lignoselülozik biyokütlenin sodyum hidroksit (NaOH) ile ön işleminin, selülozik kristallikte ve polimerizasyon derecesinde bir azalmaya yol açan şişmeye neden olduğu bildirilmiştir. Biyokütlenin yüzey alanında bir artış, lignin ve karbonhidratlar arasındaki yapısal bağların kırılması ve lignin yapısının bozulması, seyreltik sodyum hidroksit ile yapılan ön işlem ile mümkün olur (Rabelo vd., 2009; Harun vd., 2011). Asit ön işlemleri, selülozik malzemelerin dönüştürülmesinde daha yüksek verimlilik sağladığı için daha çok tercih edilir. Bir asit ön işlemi sırasında, oluşan toplam fermentasyon şeker miktarını çeşitli parametreler (süre, sıcaklık, substrat miktarı ve asit konsantrasyonu) önemli ölçüde etkilemektedir (Harun ve Danqueh, 2011; Miranda vd.,2012).

Seyreltik Asit Ön İşlemi: Seyreltik asit ön işleminin amacı lignoselülozik yapıdaki selüloz yapısının kristalin özelliğini bozmaktır. Hemiselüloz da bu işlemle büyük oranda fermente edilebilir şekerlere parçalanmaktadır. Bu arada, fermantasyon basamağındaki mikroorganizma metabolizmasını etkileyebilecek, furfural, hidroksimetil furfural ve aromatik lignin bozunum bileşikleri gibi bozunma bileşikleri oluşabilir (Larsson vd., 1999). Seyreltik asit ön işlemi, gereken ön işlem şiddetine bağlı olarak bir süre boyunca geniş bir sıcaklık aralığında (120-200 ° C) gerçekleştirilebilir. Seyreltik asit ön işleme yüksek reaksiyon hızı ve hidroliz verimliliği sağlayabilmesine karşın, nötralizasyon ve atık su arıtımına ihtiyaç duyması nedeniyle ekipman korozyonu, yüksek miktarda bozunma ürünleri ve proses karmaşıklığı gibi bazı dezavantajlara sahiptir.

Alkali Ön İşlemi: Alkali ön işlemi tipik olarak NaOH, KOH, Ca(OH)₂, amonyak, vb. gibi çözeltiler kullanılarak daha uzun süre oda sıcaklığında veya daha kısa süre yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir. Alkali ön işleminin amacı, biyokütlenin şişmesine neden olmak, iç yüzey alanını arttırmak, selüloz kristalinitesini azaltarak yüzey alanına bağlı olarak parçalanma verimi artırmaktır (Agbor vd., 2011). Alkali ön işleminin, tarımsal kalıntılar gibi düşük lignin içerikli biyokütle ile daha etkili olduğu gösterilmiş ancak ağaç gibi yüksek lignin içerikli biyokütle üzerinde daha az etkili olmuştur (Agbor vd., 2011).

Oksidatif Ön İşlem: Oksidatif ön işlem, selülozu basit şekerlere dönüşümünü artırmak için başta lignin ve hemiselülozu oksijen, ozon ve hidrojen peroksit gibi oksidanlar kullanarak uzaklaştırmayı amaçlamaktadır. Bu işlemde ligninin bozunmasına yönelik mekanizmalar, kullanılan oksidanlara ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak değişir. Ozon ön arıtımı için, ozon konjuge çift bağlara ve yüksek elektron yoğunluğuna sahip fonksiyonel gruplara karşı oldukça reaktiftir. Dolayısıyla, doymamış bağlarla zenginleştirilmiş lignin, alifatik karboksilik asitler ve aromatik asitler de dahil olmak üzere, daha az molekül ağırlığına sahip çözünür asidik bileşikler oluşturmak üzere ozon ile okside olma ihtimali yüksektir. Bu işlemde geçirilen maddenin in vitro parçalanabilirliğinde artışa neden olur ve diğer kimyasal işlemlerin aksine zehirli artıklar üretmez. Ozon, lignin ve hemiselülozu buğday samanı, küspe, yeşil saman (Ben-Ghedalia ve Miron.,1981), yer fıstığı, çam, pamuk saman (Ben-Ghedalia ve Shefet.,1983) ve kavak testeresi gibi birçok lignoselülozik materyalde parçalamak için kullanılabilir. Parçalanma esas olarak lignin ile sınırlıdır. Hemiselüloz hafifçe etkilenir, ancak selüloz etkilenmez. Bir ozon ön işlemi kullanarak lignin'in %60 oranında uzaklaştırılmasının ardından enzimatik hidroliz oranı beş kat artmıştır. Enzimatik hidroliz verimi %57'ye kadar yükselmiştir, çünkü ozonoliz

kavak talaşının ön işleme tabi tutulmasından sonra lignin yüzdesi %29' dan %8' e düşmüştür. Ozonoliz ön-işlemi, reaksiyonların oda sıcaklığında ve normal basınçta gerçekleştirilmesinde bir avantaja sahiptir. Yüksek seçicilik ve ozon ön işleminin olumlu çevresel etkisine rağmen, ozonun maliyeti ve kütle transferi sorunları bu ön işlemin büyük ölçüde sınırlar (García-Cubero vd., 2009; Quesada vd.,1999).

Organik Çözücü Ön İşlemi: Organik çözücü ön işleminde lignin ve hemiselülozun geniş bir şekilde çıkarılması amacıyla lignoselülozik biyokütlenin ön işleminde, metanol, etanol, aseton, etilen glikol, vb. veya bunların katalizörlü ya da katalizörlü olmayan karışımlarını içeren organik çözücüler kullanılır. Böylece, selülozun yüzey alanı ve gözenek hacmi artar (Alvira vd., 2010). Nispeten saf bir lignin ve karbonhidratlar sırasıyla katılar ve şurup olarak izole edilebilir ve ayrıca yan ürünler olarak geri kazanılabilir. Fakat organik çözücünün uçuculuğundan dolayı, kimyasal geri kazanım sorunu bu teknolojinin endüstriyel ölçekte uygulanmasını engellemektedir (Zhao vd., 2009).

2.6.3.3. Fiziko-Kimyasal Ön İşlem

Buhar Patlaması (Otohidroliz): Buhar patlaması, lignoselülozik malzemelerin ön işlemden geçirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemdir (McMillan, 1994). Bu yöntemde, biyokütle yüksek basınçlı doymuş buharla işlemden geçirilir ve sonra basınç hızla azalır, bu da malzemelerin patlayıcı bir dekompresyona uğramasına neden olur. Buhar patlaması tipik olarak malzemenin atmosfer basıncına maruz kalmasından sonraki birkaç saniye ile birkaç dakika arasında 160–260 °C (karşılık gelen basınç 0.69-4.83 MPa) sıcaklıkta başlatılır. İşlem, yüksek sıcaklık sayesinde hemiselülozun bozunmasını ve ligninin dönüşümünü sağlar, böylece selülozun hidroliz olma potansiyelini artırır. Buhar patlaması yönteminde işlem prosesinin bağlı olduğu parametreler şunlardır; işlem süresi, sıcaklık, tane büyüklüğü ve nem içeriği (Duff ve Murray, 1996). Optimum hemiselüloz çözündürme ve hidroliz işlemleri, yüksek sıcaklıkta ve kısa işlem süresi (270 ° C, 1 dakika) veya daha düşük sıcaklıkta ve daha uzun işlem süresi (190 ° C, 10 dakika) ile elde edilebilir (Duff ve Murray, 1996). Son çalışmalar, daha düşük sıcaklık ve daha uzun işlem süresinin daha elverişli olduğunu göstermektedir.

Buhar patlaması, yüksek katı madde girişi, kimyasal içermeyen süreç ve daha düşük enerji girişi gibi pek çok avantaja sahiptir; ancak, bu teknoloji büyük ölçekli projelere

geçmeden önce, mayalara toksik bileşiklerin oluşması ve ölçeklendirme sırasında teknik risk oluşturmaları nedeniyle ele alınmalıdır.

Sıcak Su Ekstraksiyonu: Sıcak su, hızlı dekompresyon gerektirmeyen ve herhangi bir katalizör veya kimyasal kullanmayan başka bir hidrotermal ön işlem yöntemidir. Basınç, suyun yüksek sıcaklıklarda (160-240 ° C) sıvı halde tutulması ve lignoselülozun yapısında değişikliğe neden olması için uygulanır. Sıvı sıcak suyun amacı selülozun daha erişilebilir olmasını sağlamak ve inhibitörlerin oluşumunu önlemek için başta hemiselülozu çözündürmektir. Filtrelenebilir iki fraksiyon elde edebilmek için ön işlemden sonra üretilen bulamaç, katı selüloz bakımından zengin fraksiyon ve hemiselülozdan türetilmiş şekerlerden zengin bir sıvı fraksiyondur. İnhibitörlerin oluşumunu önlemek için, ön işlem pH 4 ila 7 arasında gerçekleştirilir (Mosier vd., 2005a).

Amonyak Fiber Patlaması (AFEX): Amonyak fiber patlaması (AFEX), lignoselülozik biyokütle 60 ve 100 ° C arasındaki düşük sıcaklık ve belirli bir süre yüksek basınçta sıvı amonyak ile muamele edildiği etkili bir fizikokimyasal ön işlemdir. Basıncın daha sonra düşürülmesiyle amonyak gazının hızlı bir şekilde genleşmesi sağlanır ve bu da biyokütle liflerinin şişmesine ve fiziksel bozulmasına ve selülozun kısmen kristalleşmesine neden olur (Alvira vd., 2010). AFEX'in, odun gibi yüksek lignin içerikli hammaddeye göre otsu bitkiler gibi düşük lignin içeriğine sahip biyokütle üzerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Wyman vd., 2005). Buhar patlaması gibi bazı diğer ön işlemler, katı ve sıvı fraksiyonlarda ayrılabilen bir karışım üretirken, AFEX sadece önceden muamele edilmiş bir katı madde üretir. Ön işlem esnasında katı maddenin az bir miktarı çözünür hale getirilir ve hemiselüloz ve lignin uzaklaştırılır (Wyman vd., 2005). Hemiselülozun deasetilasyonu da gözlemlenmiştir. AFEX ön işleminden sonra biyokütlenin parçalanabilirliği artar ve böylece enzimatik hidroliz daha yüksek verimle gerçekleştirilebilir. Yüksek uçuculuğu olmasına rağmen amonyak geri kazanımı mümkün olmakla birlikte karmaşık ve zor olması AFEX ön işleminin dezavantajlarından en önemlisidir (Eggeman ve Elander 2005).

CO₂ Muamelesi: Bu yöntem, CO₂' in gaz halindeki, ancak kritik noktanın üzerindeki sıcaklıklarda sıvıya benzer bir yoğunluğa kadar sıkıştırılan bir sıvıyı belirten süper kritik bir akışkan olarak kullanılması üzerine kuruludur. Süper kritik karbon dioksit (SC-CO₂)

çoğunlukla bir ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmaktadır ancak birçok avantajı nedeniyle ekstraksiyon amaçlı kullanılmadığı düşünülmektedir (Schacht vd., 2008). Sulu çözeltide CO₂ polimerler hidrolizi destekleyen karbonik asit oluşturur. CO₂ molekülleri, büyüklük bakımından su ve amonyak ile kıyaslanabilir ve lignoselülozik materyalin küçük gözeneklerine aynı şekilde nüfuz edebilir. Bu mekanizma yüksek basınç ile kolaylaştırılır. Bu işlem ile selüloz ve hemiselüloz yapısının bozulması gözlenir ve sonuç olarak fermente edilebilir şeker üretimi gerçekleştirilir ya da enzimatik ön işlem gibi diğer başka bir ön işleme uygun ortamlar sağlanır.

2.6.3.4. Biyolojik Ön İşlemler

Biyolojik ön işlem, mayalanabilir şekerlerin serbest bırakılması için biyokütleyi dönüştürecek mikroorganizma ve enzimlerin kullanılmasını içerir (Harun ve Danquah, 2011). Bazı mantar ve bakterilerin lignin ve bazı hemiselülozları lignoselülozik materyallerden ayırma yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu mikroorganizmaların selüloz üzerinde çok az etkisi vardır, çünkü selülozun biyolojik olarak ön işleme uğraması için lignoselülozik malzemenin diğer kısımlarına göre daha fazla direnç uygulanması gerekir. Biyokütle ön-muamelesinde çeşitli mantar türleri (örneğin kahverengi, beyaz ve yumuşak çürük mantarlar) kullanılmıştır (Kumar vd., 2009). Biyolojik ön işlemler, proses aşamasının tamamlanma süresini uzatan düşük hidroliz oranı verir (Balat vd., 2008; Harun ve Danquah,2011).

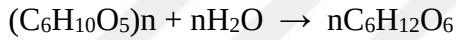
Bu ön işlemlerde, lignini bozabilen mikroorganizmaların biyokütle üzerinde büyümesine izin verilir ve bu da ligninin bozulmasına neden olur. Ana biyolojik ön işlemler mantarları ve bunların enzimlerini içerir. Lignin hidrolizi sırasında hemiselülozun ksilan ve mannan bileşenleri önemli ölçüde giderilmiş olur. Lignoselülozik materyale biyolojik ön işlem en umut verici ön işlem yöntemlerinden biridir.

Biyolojik ön işlem, ağırlıklı olarak kahverengi, beyaz ve çürükçül mantar mikroorganizmalarını kullanarak, lignin ve hemiselülozları seçici şekilde parçalayarak geri kalan katıların enzimatik sindirilebilirliğini artırır. Beyaz-çürük mantarların, peroksidazlar ve lakkazlar gibi lignin parçalayıcı enzimlerin üretimi yoluyla lignini indirmek için en etkili mantar olduğu rapor edilmiştir (Sun ve Cheng, 2002). Bu mantarların lignini parçalaması çok seçici ve etkilidir, ancak çoğu biyolojik ön-muamele sürecinde hidroliz oranı endüstriyel proses için çok düşüktür (Sun ve Cheng.,2002).

Genel olarak bu tür işlemler düşük maliyet, düşük enerji ve çevreye zararsız olması gibi avantajlar sunar. Bununla birlikte, biyolojik metodların geliştirilmesinde temel dezavantaj diğer biyolojik materyallerin çoğunda elde edilen düşük hidroliz verimidir (Sun ve Cheng, 2002).

2.7. Lignoselülozik Materyallere Uygulanan Hidroliz Yöntemleri

Hidroliz işlemleri, ön işlemlerden sonra besleme stoklarının biyoetanol üretmesi için fermente olabilen şekerlere dönüştürülmesinde gerçekleşen işlemlerdir. Bu işlemde aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi yapıdaki karbonhidratların yapısına 1 molekül su eklenmesiyle lignoselülozik malzeme parçalanarak basit şekerlere ayrışır. Hidroliz sonucunda selüloz ve hemiselüloz basit şekerlere (5 ve 6 karbonlu monosakkaritler) dönüştürülür. En yaygın kullanılan hidroliz metotları asidik ve enzimatik hidrolizdir. Asidik hidroliz en eski ve en sık kullanılan yöntem olarak kabul edilir (Jeffries ve Jin, 2000).



2.7.1. Kimyasal Hidroliz

Kimyasal hidroliz seyreltik ve derişik asit hidrolizi olarak iki şekilde gerçekleşebilir. Seyreltik asit hidrolizi: düşük asit konsantrasyonunu kullanarak daha yüksek sıcaklıkta yapılırken, derişik asit hidrolizi, yüksek asit konsantrasyonu kullanılarak daha düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir. Lignoselülozik biyokütlenin asit ile hidrolizi, pentoz şekerlerin heksoz şekerlere kıyasla daha hızlı bozunmasından dolayı bazı durumlarda iki aşamalı bir işlemde gerçekleştirilir. Hemiselüloz, ilk aşamada seyreltik asit kullanılarak hidrolize edilirken, selüloz derişik asit kullanılarak ikinci aşamada hidrolize edilir. Derişik asit prosesi, daha kısa sürede yüksek oranda (% 90) şekere ayrışır. Derişik asit ile hidrolizde lignini fenollere dönüştürme oranı ve karbonhidratların karbonize olma riskleri seyreltik asit hidrolizine göre daha yüksektir (Johsi vd., 2011; Balat vd., 2008).

2.7.2. Enzimatik Hidroliz

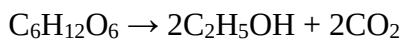
Bu yöntemde, selülozun hidrolizi için yüksek kompleks enzimler kullanılır. Enzimler, selülozun fermente edebilen şekerler haline gelmesine yardımcı olan ve doğal olarak meydana gelen bitki proteinleridir. Kullanılan enzimler dönüşüm verimliliğini ve üretim ekonomisini geliştirme potansiyeline sahiptir. Biyolojik yaklaşımlarda iki teknolojik gelişme mevcuttur bunlar: enzimatik ve doğrudan mikrobiyal dönüşüm yöntemleridir.

Endo-β-1,4-glukanaz, selobiohidrolaz ve β-glukozidazlar gibi selüloz yıkımı için yaygın olarak kullanılan üç tip enzimdir. Selülaz enziminin aktivitesi, enzim konsantrasyonu ve kaynağı tarafından belirlenir. Reaktörlerde yüksek şeker verimi ile sonuçlanabilecek korozyon problemi oluşturmaz. Enzimatik hidrolizin etkinliği, sıcaklık, süre, pH, enzim yükleme ve substrat konsantrasyonu gibi koşullara bağlıdır (Canilha vd., 2012). Hidrolizde enzimlerin kullanılmasının dezavantajı, biyokütleden etanol üretim maliyetinin yüksek olmasıdır.

2.8. Fermantasyon Teknikleri

Ön işlem ve hidroliz işlemleri ile elde edilen hidrolizat varsa bir seri inhibe edici materyalin uzaklaştırılması sonrasında fermantasyona tabi tutulur. Fermantasyon fermente edilebilir şekerleri mikroorganizmalar vasıtasıyla istenen son ürün olan biyoetanole dönüştürülmesidir. Organik asitler gibi muhtemel yan ürünlerin oluşumunu engellemek için en uygun mikroorganizmanın seçilmesi oldukça önemlidir (Gamage vd., 2010; Chandel vd., 2007; Wheals vd., 1999). *Saccharomyces cerevisiae* gibi sanayi mayaları, binlerce yıldır bira üretimi ve şarap endüstrisinde alkol üretiminde kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* aynı zamanda birincil fermentatif suş olarak mısır bazlı ve şeker bazlı biyoyakıt endüstrileri için de kullanılmıştır.

Reaksiyonlara göre teorik maksimum verim, kg başına ksiloz ve glikoz için 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg karbondioksittir (Vessia, 2005; Stewart ve Russell 1987):



Biyoeanol üretiminde yaygın olarak kullanılan fermantasyon teknikleri hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir:

2.8.1. Ayrı Enzimatik Hidroliz ve Fermantasyon (SHF)

Bu teknik, enzimatik hidroliz ve fermantasyon işlemlerinin ayrı olarak yürütüldüğü, yani ön işleme tabi tutulmuş lignoselülozik biyokütlenin enzimler yoluyla monomer birimlerine (glikoz ve ksiloz) indirgenmesi ve ardından bu şekerlerin fermantasyonu ile gerçekleşen iki aşamalı bir prosestir. SHF sürecinde, selülozik malzeme, önce optimum koşullarda selülaz ve hemiselülaz enzimleriyle indirgen şekerlere hidroliz edilir. İkinci aşamada, hidrolizatlarda bulunan şekerler, maya veya diğer fermantasyon bakterileri tarafından farklı çalışma koşulları altında biyoetanole dönüştürülür. Bu yöntemin en önemli avantajı hem enzimatik hidroliz hem de fermantasyonun kendi optimum koşullarında işlev görmesidir, dezavantajlar ise enzim aktivitesini inhibe eden şekerlerin birikimi sonucunda etanol veriminin etkilenmesidir (Vohra vd., 2014; Duff ve Murray,1996).

2.8.2. Eşzamanlı Sakarifikasyon ve Fermantasyon (SSF)

Bu teknik, lignoselülozik maddeye uygulanan enzimatik hidroliz ve fermantasyonun aynı anda yürütüldüğü bir tekniktir. SSF için optimum sıcaklık, fermantasyon için kullanılan mikroorganizmalara bağlı olarak hidroliz (45-50 °C) ve fermantasyon (20-40 °C) arasındadır. Bu işlemin en önemli özelliği, şekerlerin hızla etanole dönüştürülüp indirgenen şekerlerin birikiminin azalmasıdır. Selülozun hidrolizinden veya sakarifikasyonundan üretilen şekerler aynı anda etanolde fermente edildiği için hidrolizle ürün inhibisyonunu büyük ölçüde azaltır. En büyük dezavantaj ise, hem enzimler hem de mikroorganizmalar aynı anda göz önüne alındığında işlem parametrelerinin optimizasyonunda güçlük olmasıdır (Vohra vd., 2014). Örneğin, enzim hidrolizi için selülozik enzimler en çok 50 °C' de çalışırlar, ancak etanol fermantasyonu için mikroorganizmalara en uygun koşullar 28 °C ile 37 °C arasındadır. (Hasunuma ve Kondo, 2012). Bir diğer dezavantaj selülozu glikoza dönüştürmek için uzun süre gereksinimidir. Substrat türüne bağlı olarak SSF 3 ila 7 gün arasında sürebilir (Sun ve Cheng, 2002). Hidroliz genellikle SSF' de hız sınırlayıcı işlemidir. Sıcaklığı optimum hidroliz sıcaklığına

yakınlaştırmak için SSF' de termo dayanıklı mayalar ve bakteriler kullanılmıştır. Wu ve Lee, bir SSF işlemi sırasında 38 °C'de selülozün orijinal etkinliğinin %9, %36 ve %64'ünü, sırasıyla 9, 35 ve 60 g/l etanol konsantrasyonlarında kaybettiklerini bulmuşlardır (Wu ve Lee.,1997).

2.8.3. Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-Fermentasyon (SSCF)

Bu teknik, lignoselülozik biyokütlenin ön işlem ve hidrolitik süreçleri esnasında önceden salınan tüm şekerlerin metabolize edilebilmesi için tercih edilir. Yüksek dönüşüm ve etanol verimine izin vermek için hem heksozlar hem de pentozları en iyi şekilde metabolize edebilen aynı fiziksel şartlarda ve uyum içinde yaşayabilen tek bir mikroorganizma kullanılır (Sánchez ve Cardona, 2008). Düşük maliyet, daha kısa çalışma süresi, daha düşük kontaminasyon riski ve enzimatik hidroliz sırasında daha az sorun olması gibi avantajlar bu teknolojiye araştırmaların artmasına neden olmuştur (Koppram vd., 2013).

2.8.4. Konsolide Biyoproses ile Fermentasyon (CBP)

Bu işlem biyokütlenin etanolün dönüşümü için gerekli tüm reaksiyonları yani ön işlem, hidroliz, ayırma ve fermentasyonu tek bir biyoreaktörde bütünleştirir. Bu strateji diğerlerinden farklıdır, çünkü hem enzim üretimini hem de fermentasyonu gerçekleştirir, yani enzimlerin üretimi, enzimatik hidroliz ve fermentasyon tek bir adımda gerçekleştirilir. Bu işlem, enzim üretimi için herhangi bir sermaye veya işletme maliyeti gerektirmediğinden, şekerlerin serbest bırakılması için tüm substratın kullanıldığı birkaç avantaja sahiptir. Ayrıca, enzimatik ve fermentasyon işlemleri tamamen uyumludur. Termofilik mikroorganizmaların, geleneksel mayalara göre belirgin bir avantajı vardır, çünkü hammaddenin bir miktarını doğrudan kullanabilirler ve ayrıca yüksek sıcaklıklara dayanabilirler. Diğer önerilen yaklaşımlar, karışık kültürlerin kullanılmasıdır, böylece lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi ve fermentasyonu eşzamanlı yürütülür (Vohra vd., 2014).

mikroorganizmalar, anaerobik koşullarda Embden-Meyerhof yolağı (EMP) ile glikozu etanole dönüştürürler. *Zymomonas mobilis* türleri bir mmol glukoz başına 1,9 mmol etanol üretebilmektedir (Kosaric ve Vardar-Sukan, 2001).

Rekombinant olmayan *Escherichia coli* suşları ise birçok heksoz ve pentozu (glikoz, ksiloz vb.) karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Anaerobik koşullarda mutant olmayan *E. coli* bu şekerleri pirüvik asit, format, asetat, laktat, suksinat ve eser miktarda etanole metabolize edebilmektedir.

Z. mobilis ve *S. cerevisiae* suşlarına göre daha kısa sürede daha yüksek büyüme hızları, kompleks ortamda daha basit gereksinimleri nedeniyle, araştırmacılar rekombinant *E. coli* türleri ile daha yüksek verimde ürün eldesi çalışmalarına yönelmişlerdir. Biyoetanol üretimine yönelik son çalışmalar etanol verimini arttırmak için rekombinant teknolojilerle yeni suşlar geliştirilmeye yöneliktir. Bunun için 2 metot tercih edilebilir: (1) doğal etanol üreticisi bir mayaya pentoz metabolik yolağı eklemek, (2) heksoz ve pentozları parçalayabilen doğal bir mikroorganizmaya etanol verimini arttıracak genleri eklemek (Jeffries ve Jin, 2000). Ancak mayaların nispeten düşük üretim ve çoğalma hızlarından dolayı ikinci yöntem daha iyi görülmektedir.

Escherichia coli, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis* genel bir endüstriyel uygulama için en uygun türler olarak belirlenmiştir (Dien vd., 2003). Günümüzde yapılan araştırmalardan biri SSF için uygun gram pozitif ve termofilik bir rekombinant suş geliştirmektedir. Ancak bu konu çok yeni gündeme gelmiştir ve SSF için henüz uygun bir suş oluşturulamamıştır. Mezofilik ve termofilik bakteriler ile etanol üretiminde kullanılan bazı türler ve etanol üretim verimleri sırasıyla Tablo 2.4 ve 2.5’ de verilmiştir.

Etanol veriminin arttırılabilmesi için kullanılacak olan suşun yan reaksiyonları elimine edilmelidir. Bu suşlarda ise gen ekspresyonu için plazmidlere ihtiyaç duyulur ki bu plazmidler seçici olmayan ortamda büyüyen kültürlerde kaybolabilir. Bu nedenle uygun bir suş gelişimindeki önemli adımlardan birisi de optimal etanol üretimi için uygun ve kalıcı bir gen ekspresyonu ile entegre edilmiş rekombinant genlerin oluşturulabilmesidir. Bu durum araştırmacıları uygun ortam optimizasyonu ve uzun dönemli adaptasyon stratejilerinin belirlenmesine yönlendirmiştir.

Tablo 2.4: Mezofilik bakterilerin esas fermentasyon ürünü olarak etanol üretimi (Kosaric ve Vardar-Sukan, 2001).

Mezofilik Bakteri	mmol Glukoz başına üretilen mmol Etanol
<i>Clostridium sporogenes</i>	4.15 ^a
<i>Clostridium indolis</i> (patojen)	1.96 ^a
<i>Clostridium sphenoides</i>	1.8 ^a
<i>Clostridium sordelli</i> (patojen)	1.7
<i>Zymomonas mobilis</i> (syn. <i>anaerobica</i>)	1.9 (anaerob)
<i>Zymomonas mobilis</i> ssp. <i>Pomaceae</i>	1.7
<i>Spirochaeta aurantia</i>	1.5
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	1.46
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1.1
<i>Erwinia amylovora</i>	1.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.1
<i>Streptococcus lactis</i>	1.0
<i>Sarcina ventriculi</i> (syn. <i>Zymosarcina</i>)	1.0

Tablo 2.5: Termofilik bakterilerin esas fermentasyon ürünü olarak etanol üretimi (Kosaric ve Vardar-Sukan, 2001).

Termofilik Bakteri	Tmax (°C)	mmol Glukoz başına üretilen mmol Etanol
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	78	1.9
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	78	1.6
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	78	1
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	78	0.95
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	68	1.1
<i>Clostridium thermocellum</i>	68	1

Metabolik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle, ürün oluşum yolağı ya da hücresel özelliklerin geliştirilmesiyle verimi arttırmaya yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Gen ekspresyonunun rekombinant DNA teknolojisiyle modifikasyonu, spesifik verimliliği ve metabolik akıyı arttırarak daha iyi üretim yapabilen suşların doğmasına yol açmıştır. Etanol üretimi için rekombinant *E. coli* suşları geliştirilmeye başlanmış, böylece diğer ürünlerin üretimi baskılanarak etanol üretim titresi arttırılmaya çalışılmıştır (Ingram vd., 1998).

E. coli KO11 suşu, endüstriyel uygulamalar için geliştirilmiş bir rekombinant suştur (Ingram vd., 1998). Etanol üretimi için geliştirilmiş rekombinant *E. Coli* türlerinin bir biyokatalizör olarak kullanımı; geniş spektrumda çeşitli şekerleri fermente edebilme yeteneği, kompleks büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaması endüstriyel olarak kullanılabilirliğini ispatlaması (örneğin rekombinant protein üretimi) gibi birçok üstünlük sunar (Ingram vd., 1998). *E. coli* şekerleri fermente ederek etanol ve çeşitli organik asitleri

oluşturur. Etanol, pirüvat format liyaz (PFL) kullanılarak pirüvattan elde edilir. Bu fermentasyon yolağı dengede değildir, çünkü şekerlerden oluşturulan her bir pirüvat için bir tane NADH,H⁺ üretilirken, pirüvatı etanole dönüştürmek için iki NADH,H⁺ gerekmektedir. Bu dengenin sağlanabilmesi için *E. coli* asetik asit ve süksinik asit de üretir. *S. cerevisiae* ve *Z. mobilis* ise homoetanol fermentatiftirler, çünkü bunlar pirüvattan etanol üretmek için sadece bir tane NADH,H⁺ tüketen pirüvat dekarboksilazı (PDC) kullanırlar. Bu nedenle *pdc* eksprese eden *E. coli* suşu ile sadece etanol üretiminin sağlanabileceğı düşünölmüştür (Dien vd., 2003). Pirüvatı etanole çevirmek için mayalardakine benzer bir yolağın eklenmesiyle yapılan ilk denemeler, *E. coli* türündeki doğal alkol dehidrogenaz (ADH) aktivitesinin etanol üretimi açısından yetersiz olmasından dolayı başarısız olmuştur.

2.11. Üzüm (*Vitis vinifera*)

Üzüm (*Vitis vinifera*) dünyada geniş alanlarda yetiştiriciliğı yapılan en değerli meyvelerden biridir (García-Lomillo vd., 2017). Çiğ tüketilebilir veya şarap, reçel, meyve suyu, jöle, kuru üzüm, sirke ve tohum yağı gibi ürünlerin üretiminde kullanılabilir. Üzüm meyvesi, yılda 50 milyon tonun üzerinde üretilen dünyadaki geniş tarımsal ekonomik faaliyetlerden biridir. Bütün üzüm üretimi göz önüne alındığında, yaklaşık % 75' i şarap yapımında kullanılmaktadır ve yılda 27 milyar litre civarında küresel şarap üretimi yapılmaktadır (Amienyo vd., 2014).

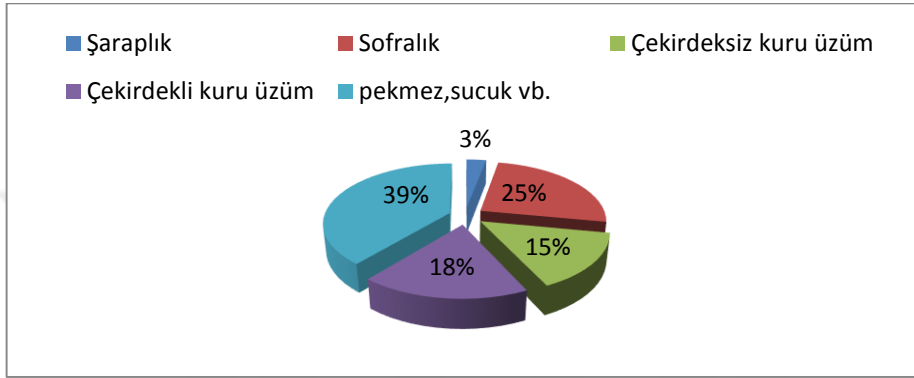
Son yıllarda çevresel kirliliğın önlenmesi ve atıkların değerlendirilmesi amacıyla bitkisel üretim sonucunda oluşan hasat atıklarının veya hammaddesi tarımsal ürün olan pek çok fabrikasyon atığının farklı alanlarda yeniden kullanılabilir hale getirilmesi yaygınlaşmıştır. Bu amaçla değerlendirilen tarımsal sanayi ürünlerinden birisi de üzümdür.

2.11.1. Türkiye' de Üzümün Yeri

Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2011 yılı verilerine göre, Türkiye üzüm üretiminde; İtalya, Amerika, Fransa, İspanya ve Çin'in ardından 6. sırada yer almaktadır (Anonymous, 2011). Ülkemizde bağlarda üretilen üzümün tüketim alanları bakımından ele alındığında (Şekil 2.8), % 40'ı pekmez, sucuk gibi mamullere, %17,5'i çekirdekli kuru üzüme, %15'i çekirdeksiz kuru üzüme, %25'i sofralık olarak ve % 2,5'i şaraplık olarak kullanılmaktadır (

Çelik vd., 1998). Ortalama 4 kg yaş üzümünden 1 kg kuru üzüm elde edilmektedir (Erkal ve Ergun, 1983).

Ülkemizin yaş üzüm üretimi her yıl ortalama 4 milyon ton civarındadır. Üretilen üzümlerin yaklaşık %3' ü şaraplık olarak değerlendirilmektedir. Şıralık olarak işlenen üzümünden %15-25 oranında posa elde edildiği dikkate alınacak olursa, üzüm posası üretimi küçümsenmeyecek boyuttadır.



Şekil 2.8: Türkiye'de üzüm tüketim alanları

Üzümün işlenmesi sonucu arta kalan posası olan cibrenin, %50' si kabuk, %25' i çekirdek ve %25' i üzüm sapından oluşur. İşleme sırasında açığa çıkan cibreden, yetiştiricilerin yeterince yararlanamaması sonucu, üretim noktalarında önemli miktarlarda birikmesine ve değerlendirilemediği için atılmasına, bu bağlamda da dikkate değer boyutlarda çevre kirliliğine neden olabilmektedir (Sarıçiçek ve Kılıç, 2002).

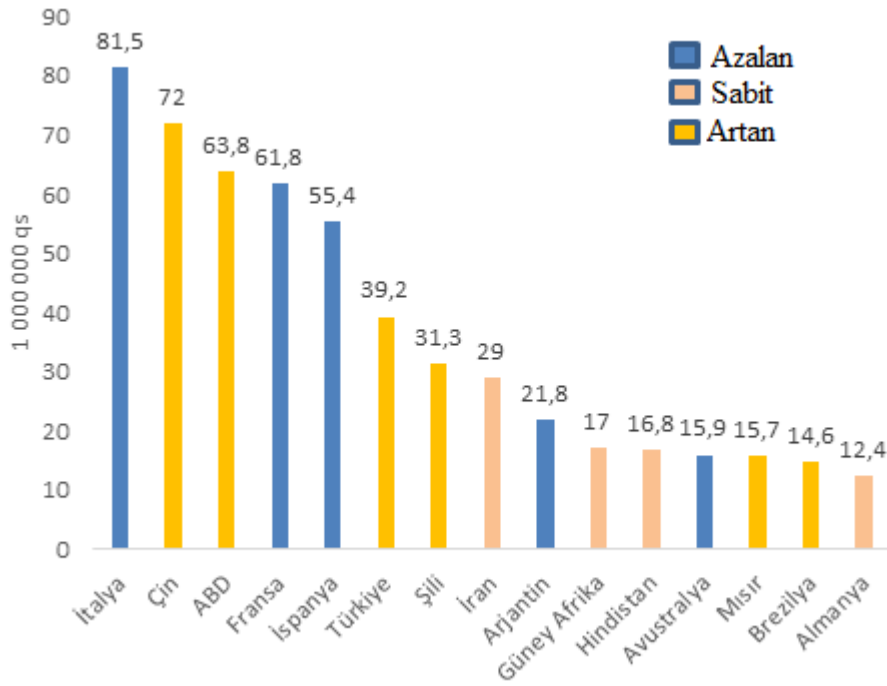
2.11.2. Dünya'da Üzümün Yeri

Üzüm dünyada, 7 155 187 ha alanda, 77 181 122 ton üretim miktarı ile en fazla üretilen meyvelerin başında gelmektedir (Anonymous, 2013). Türkiye, dünya ülkeleri arasında 467 092 ha alan ile 5. sırada, üzüm üretim miktarı bakımından ise, 4 175 356 ton ile 6. sırada yer almaktadır. Bu durum Tablo 2.6' da özetlenmiştir. Üretimin 2 166 749 tonu sofralık, 1 563 480 tonu kurutmalık ve 445 127 tonu şaraplık olarak değerlendirilmektedir (Anonymous, 2014).

2007'de dünya üzüm üretimi yaklaşık 67 milyon metrik tondur. Uluslararası Asma ve Şarap Örgütü 2007 istatistiklerine göre, Şekil 2.9'da görüldüğü gibi olumsuz küresel iklim koşulları nedeniyle bazı önde gelen ülkelerde üzüm üretimi azalmaktadır (OIV, 2007).

Tablo 2.6: Dünyada ve ülkemizde üzüm üretim alanı, verim ve üretim miktarları.

Üzüm	Üretim Alanı (ha)	Verim (kg ha-1)	Üretim (ton)
Dünya	7 155 211	10 786 70	77 181 122
Türkiye	467 092	8 939 04	4 175 356



Şekil 2.9: 15 önde gelen ülkenin küresel üzüm üretimi (OIV, 2007)

2.11.3. Üzümün Kullanım Alanları

Üzüm genel olarak sofralık, kurutmalık ve şaraplık olmak üzere başlıca üç şekilde değerlendirilmektedir. Ancak, ülkemizde geleneksel tüketim şekilleri de oldukça yaygın olup, üzümünden, pekmez, sirke, köfter, sucuk, pestil ve sirke gibi çok farklı ürünler de elde edilmektedir. Bu ürünler daha çok üzümün şırası kullanılarak yapılmaktadır. Son yıllarda doğal ürünlere karşı ilginin giderek artması sonucu, üzümün şırasından elde edilen bu ürünlerin gerek iç tüketimde, gerekse yurtdışı satışlarında önemli gelişmeler göstermesi beklenmektedir.

Ülkemizde üretilen üzümün değerlendirme şekilleri dikkate alındığında, yaklaşık olarak %40' ının çekirdekli ve çekirdeksiz kurutmalık, %30' unun sofralık, %28' inin

şıralık ve %2- 3' ünün de şaraplık olarak değerlendirildiği belirtilmektedir. Şarap payının düşük olmasına karşın, özellikle son yıllarda ülkemizde şarapçılığa olan ilginin günden güne arttığı görülmektedir. Bütün bu açıklamalar üzümün sadece taze tüketilen bir meyve olmayıp, değişik tüketim şekilleri ile tüketici isteklerini farklı şekillerde karşılayan çok yönlü bir meyve olduğunu göstermektedir.

Yapılan diğer araştırmalar, sadece eczacılık ve kozmetik amaçlı değerli ürünlerin elde edilmesine değil aynı zamanda değişik analiz tekniklerinin gelişmesine de neden olmuştur (Mumcu vd., 2003). Üzüm ürünleri üretim fabrikaları ve tarımsal atık ya da artıkların değerlendirilmesi üzerine yapılan araştırmalar yeni üretim teknolojilerinin hammadde oluşumuna yol açmıştır. Sahip olduğu özellikler nedeniyle bu atıkların enerji kaynağı, aktif karbon ve kimyasal madde üretimi için etkin bir şekilde kullanımı, temiz ve yenilenebilir enerji üretimi, atıkların uygun bir şekilde bertaraf edilmesi ve düşük maliyetli hammadde üretimi gibi birçok avantaja sahiptir (Mumcu vd.,2003).

2.12. Literatür Özeti

Farklı lignoselülozik maddelerden biyoetanol üretimi ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Keçiboynuzu katı atıkları (Bahry vd., 2017), şeker pancarı posası (Rodrı'guez vd., 2010), dallı darı bitkisi (Dolğun, 2016), yer fıstığı (Dönmez, 2014), kanola sapı (Karagöz, 2013), buğday sapı (Koçoğlu Soydan, 2012) gibi lignoselülozik maddelerin biyoetanol üretiminde kullanımı araştırılmıştır. Ancak üzüm posasından biyoetanol üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar az sayıdadır. Yapılan bu çalışmalar ile ilgili farklı biyokütle kaynaklarından biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir;

Yer fıstığı kabuğundan biyoetanol üretiminin incelendiği bir çalışmada yer fıstığı kabuğu katı öğütücüde fiziksel ön işlemden geçirilerek H₂SO₄ asit çözeltisinin %0,5-3 (v/v) oranları ile hidroliz edilmiş ve oluşan hidrolizatta *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile fermentasyonu yapılarak biyoetanol üretilmiştir. Fermentasyon ortamına CaO eklenmesi ile maya gelişimini etkileyecek toksik bileşiklerin olumsuz etkisi azaltılmıştır. %4 kabuk içeren hidrolizatta CaO ilavesi ile 7,384 g/L şeker tüketilerek 2,352 g/L biyoetanol elde edilmiştir. En uygun hidroliz koşulu %1 (v/v) asit derişimi olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında %8 (w/v) kabuk içeren besiyerine ilave katkılar ve CaO

müdahalesi sonrasında 8,632 g/L şeker harcanarak %16 – 18 aralığında değişen bir artışla 2,582 g/L biyoetanol elde edilmiştir (Dönmez, 2014).

Dallı darı bitkisinin (*Panicum virgatum* L.) substrat kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada biyoetanol üretimi için seyreltik asit ve kireç ön uygulamaları ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sırasında 3 farklı enzim (Novozymes Cellic CTec2) konsantrasyonu kullanılarak 7 gün süreyle hidroliz işlemi yapılmış ve optimum süre ve optimum enzim konsantrasyonu belirlenmiştir. Fermantasyon optimizasyon çalışmaları sonucunda *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile 2 farklı sıcaklık (25 ve 30 °C) ile 4 gL⁻¹ maya ekstraktı (YE) ilaveli ve ilavesiz olmak üzere toplamda 4 farklı koşul ile denemeler yapılmıştır. En yüksek etanol verimi 0.0966 g etanol/g dallı darı olarak bulunmuştur (Dolgun, 2016).

Buğday ve kanola sapsarından biyoetanol üretiminin incelendiğı bir çalışmada kesikli, sürekli ve serbest immobilize hücreleriyle gerçekleştirilen farklı fermantasyon prosesleri kullanılmıştır. Seyreltik asit ön artımı için en uygun şartlar altında arıtılan biyokütleden %12.95 (gr/gr atık) oranında etanol üretimi gerçekleşmiştir. Alkali peroksit arıtımına tabi tutulmuş buğday sapsarı için en yüksek etanol üretim verimi %18.23 olarak tespit edilmiştir. Alkali peroksit arıtım metodu ile arıtılan kanola sapsarının ko-fermentasyonu sonunda %11.66 oranında etanol üretimi gerçekleşmiştir (Karagöz, 2013).

Buğday sapsarının substrat kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada, buğday sapsarı ilk olarak yüksek sıcaklıkta buhar basıncı ve asidik ön hidrolize tabi tutulmuş, daha sonra enzimatik hidrolizle monomer şekerlere parçalanmıştır. Oluşan şeker içerikli sıvının içine *Saccharomyces cerevisiae* maya hücreleri ekilerek etanol fermentasyonu yapılmıştır. %1 asit konsantrasyonunun enzim aktivitesi ve etanol üretimi için optimum olduğu görülmüştür. Üretilen glikoz miktarı 4 g/l'den 16 g/l'ye çıkarılmıştır. Etanol üretim teorik veriminin % 20 civarında artırıldığı bulunmuştur (Koçoğlu Soydan, 2012).

Keçiboynuzu katı atıklarının substrat olarak tercih edildiğı bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile derin (SF) ve katı hal fermantasyonu (SSF) avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda keçiboynuzu katı atıklarının, ikinci nesil biyoetanol üretimi için önemli bir hammadde kaynağı oluşturduğunu göstermişlerdir. *S. cerevisiae* kullanılarak SF ve SSF işlemlerinin karşılaştırılması sonucunda, ile daha yüksek verime (0.458 g etanol / g tüketilen şeker) ulaşılmıştır (Bahry vd., 2017).

Üzüm ve şeker pancarı posasının substrat olarak kullanıldığı bir başka çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile SSF fermantasyon tekniğı kullanılarak biyoetanol üretimi

yapılmıştır. Çalışmada kullanılan kültür ortamının başlangıç pH'ı 4,5'dir. SSF ile en yüksek verimin alındığı sürenin 48 saat olduğu ve bu süre sonunda %82'den fazla teorik verim değerine ulaşıldığı belirtilmiştir (Rodrı'guez vd., 2010).

Üzüm posasının substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada kuru ağırlık bazında, üzüm posasının ağırlıkça % 31-54'ünün karbonhidrattan oluştuğu ve bunların % 47-80'inin sulu ortamda çözündüğü bildirilmiştir. 0,5 M sülfürik asit ön işlemleri, enzimatik sakarifikasyon sonrası serbest bırakılmış glikoz miktarında % 10'luk bir artış sağlanmıştır. Üzüm posasının fermentasyonu ile üretilebilecek teorik biyoetanol miktarı 400 L/ton'a kadar çıkarılmıştır (Corbin vd., 2015).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Üzüm Posası

Elazığ'ın Hoş köyü yöresinden toplanan ve daha sonra sırası çıkarılan üzümler, güneşte kurutuldu. Güneşte kurutma işleminden sonra etüvde 80°C'de üç gün boyunca kurutma işlemine devam edildi. Bu şekilde kuruma işlemi tamamlanan üzüm numuneleri daha sonra çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edildi. Kullanılan üzüm posası bileşenlerinde kabuk ve sap mevcuttur.

3.1.2. Mikroorganizmalar

3.1.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632

ARS kültür koleksiyonundan *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu temin edildi. İçeriği Tablo 3.1'de verilen YPD sıvı besi yeri ortamında ve YPD-Agar katı besi yeri ortamlarında hücrelerin çoğaltımı yapıldı. YPD (Yeast pepton dekstrozu) sıvı besi yeri ortamında 30 °C ve 150 rpm de çoğaltılan hücreler daha sonra kültür ortamına alındı. Biyoetanol üretim denemelerinde kullanılmak üzere stoklanan kültür, YPD-agar da 30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra +4 °C de saklanarak muhafaza edildi.

Tablo 3.1: *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu için YPD ve YPD-Agar besi ortamlarının içerikleri.

Besiyeri Bileşenleri	Miktar (g/l)
Glikoz	20
Bakteriyolojik pepton	20
Yeast ekstrakt	10
Agar(katı besiyeri ortamı için)	15

3.1.2.2. *Saccharomyces cerevisiae* PAKMAYA®

Diğer adı ekmek mayası olan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) hücresi yerel bir marketten satın alındı. Bileşimi Tablo 3.2’de verilen YPD (Yeast pepton dekstroz) sıvı besi yeri ortamında 30 °C ve 150 rpm karıştırma hızında ve YPD-Agar katı besi yerinde hücrelerin çoğaltımı yapıldı. Çoğaltılan hücreler daha sonra kültür ortamına alınarak biyoetanol üretim denemelerinde kullanılmak üzere YPD-agar da 30°C’de 24 saat inkübasyondan sonra +4 °C de saklanarak muhafaza edildi.

Tablo 3.2: *Saccharomyces cerevisiae* PAKMAYA için YPD ve YPD-Agar besi ortamlarının içerikleri.

Besiyeri Bileşenleri	Miktar (g/l)
Glikoz	20
Bakteriyolojik pepton	20
Yeast ekstrakt	10
Agar (katı besiyeri ortamı için)	15

3.2. Metot

3.2.1. Üzüm Atığının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Nem Tayini

Üzüm posasındaki nem miktarının belirlenmesi için, 10 g alınan numune 105 °C’de 24 saat kurutulduktan sonra desikatörde soğutulup tartıldı. Tartım işleminden sonra tekrar desikatöre koyulan örnek 30 dakika beklendikten sonra tekrar tartıldı. Bu işlem, her iki tartım arası farkın 0,005 g’ı geçmeyip sabit tartıma ulaşmasına kadar yapıldı. Daha sonra azalan ağırlığa bağlı olarak nem miktarları Eşit. 1’de verilen formül kullanılarak hesaplandı.

$$\%Nem = \frac{M_i - M_s}{M_s} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada M_i : kurutma işleminden önceki ağırlık, M_s : kurutma işleminden sonraki ağırlık

3.2.1.2. Lignin, Selüloz ve Hemiselüloz Oranının Belirlenmesi

Li ve ark.'larının yapmış olduğu çalışma metotlarından faydalanılarak üzüm posası bileşimlerinin analizleri yapıldı (Li, Xu, vd., 2004).

Ekstraktif madde analizi; analizlerde kullanılacak örnekten 12 gram alınarak (G_0) tartıldı ve 150 mL aseton üzerine ilave edildi ve daha sonra geri soğutucuda 3 saat süre ile karıştırılıp kaynatılarak ekstrakte edildi. Bu işlemin sonunda, ağırlığı belirlenen süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülerek elde edilen kalıntı (G_1) 80 °C'de ayarlanmış etüvde sabit tartıma ulaşana kadar kurutuldu, daha sonra ise soğutularak tekrar tartılıp ekstraktif madde miktarları hesaplandı.

$$M_1(\%) = \frac{G_0 - G_1}{G_1} \times 100 \quad (3.2)$$

Hemiselüloz analizi; ekstraksiyon madde analizi işleminden sonra geriye kalan kalıntıdan (G_1) 6 gram örnek alınarak üzerine 150 mL, 0,5 M NaOH çözeltisi hazırlanıp ilave edildi. Hazırlanan karışım geri soğutucu altına alınarak 3,5 saat süreyle karıştırıldı. İşlem sonunda arta kalan kalıntılar(G_2), süzgeç kâğıdıyla süzildikten sonra nötral pH'a gelene kadar su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra etüve bırakılarak sabit tartıma gelmesi için kuruması sağlandı, etüvden alınan örnek desikatörde soğutularak tartıldı ve hemiselüloz miktarları hesaplandı.

$$M_2(\%) = \frac{G_1 - G_2}{G_0} \times 100 \quad (3.3)$$

Lignin analizi; ekstraksiyon analizi işleminden sonra kalan kalıntı (G_3) sabit tartıma gelene kadar kurutuldu ve bu kurutulan örnekten 1 g tartılarak üzerine % 72 (v/v)'lik 30 mL H_2SO_4 çözeltisi eklendi. Hazırlanan bu karışım 14 °C sıcaklıkta 24 saat süreyle bekletildi. İşlem sonunda 300 mL saf su numune üzerine ilave edilip geri soğutucu altında 1 saat kaynatıldı. Kaynayan karışım süzgeç kâğıdında süzülüp sülfat iyonu bitene kadar saf su ile yıkandı. Geriye kalan kalıntı (G_4) etüvde kurutulup sabit tartıma geldikten sonra desikatörde soğutularak tartılıp lignin miktarı belirlendi.

$$M_3(\%) = \frac{G_4(1-M_1)}{G_3} \times 100 \quad (3.4)$$

Selüloz analizi: Selüloz miktarını belirlemek üzere analizleri yapılmış lignin, hemiselüloz ve ekstraktif madde yüzdeleri toplanıp yüzden çıkarılarak hesaplandı.

$$M_4(\%) = 100 - (M_1 + M_2 + M_3) \quad (3.5)$$

3.2.2. Üzüm Posasına Uygulanan Ön İşlemler

3.2.2.1. Öğütme

Daha önce kurutma prosedürü anlatılan üzüm posaları bir blender ile öğütüldü. Öğütülen örnekler, 100 meshlik eleklerde elendi. Elenmiş fraksiyonlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak için ağzı kapaklı ve sızdırmaz kaplarda muhafaza edildi.

3.2.2.2. Asidik Hidroliz ve Optimizasyon

Üzüm posasının asidik hidrolizi için seyreltik H_2SO_4 yöntemi kullanılmıştır. Üzüm posasından fermantasyonla alkol üretimi için hammaddenin indirgen şekere dönüştürülmesi için deneysel parametreler Design Expert programı ile Cevap Yüzey Metodu (RSM) kullanılarak optimize edildi.

Optimizasyon için sıcaklık (T), zaman (t), katı konsantrasyonu (g/L), asit konsantrasyonu (%) olmak üzere 4 tane bağımsız değişken belirlendi. Çalışmada kullanılan Design Expert 8 deneysel programı ile merkez noktalar yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Ön çalışmalar ışığında belirlenen deneysel parametre aralıkları Tablo 3.3’de verilmiştir. Merkezi Kompozit Design (MKD) için cevap değişkeni olarak ise hidroliz sonrası elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu (g/L) kullanılmıştır. MKD ile belirlenen noktalarla oluşturulmuş parametreler için program toplamda 30 deney önermiştir. Önerilen deneysel çalışma şartları Tablo 3.4’de verilmiştir.

Program tarafından belirlenen deneyler yapılarak bağımlı değişkene ait olan analiz sonuçları Design Expert programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Test sonuçlarının uygunluğu ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen model eşitlikleri

yardımla bağımlı ve bağımsız değişken için maksimizasyon kriteri ile önem ağırlıkları belirlenerek optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon işlemlerinden sonra elde edilmiş olan modelin uygun olup olmadığı ise doğrulama deneyleri ile değerlendirilmiştir.

Tablo 3.3: Asidik hidroliz için optimizasyon işleminde incelenecek parametreler ve çalışma aralıkları.

Faktör	Değişkenler	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	Katı konsantrasyonu (g/L)	10	32,50	55,00	77,50	100
B	Asit konsantrasyonu (% v/v)	0	1,25	2,50	3,75	5,00
C	Sıcaklık (°C)	80	92,50	105,00	117,50	130
D	Süre (dk.)	0	45,00	90	135,00	180

Tablo 3.4: Hidroliz Şartları için MKD ile Elde Edilen Deneysel Çalışma Şablonu ve Elde Edilen Sonuçlar

Deney No	Katı Kons. (g/L)	H ₂ SO ₄ Kons., (% v/v)	Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	İndirgen Şeker Kons. (g/L)
1	32.5	1.25	92.5	45	18.62
2	77.5	1.25	92.5	45	35.49
3	32.5	3.75	92.5	45	11.44
4	77.5	3.75	92.5	45	31.52
5	32.5	1.25	117.5	45	10.83
6	77.5	1.25	117.5	45	18.83
7	32.5	3.75	117.5	45	13.28
8	77.5	3.75	117.5	45	23.63
9	32.5	1.25	92.5	135	18.12
10	77.5	1.25	92.5	135	32.83
11	32.5	3.75	92.5	135	15.01
12	77.5	3.75	92.5	135	30.01
13	32.5	1.25	117.5	135	10.41
14	77.5	1.25	117.5	135	11.87
15	32.5	3.75	117.5	135	5.10
16	77.5	3.75	117.5	135	19.05
17	10	2.5	105	90	5.014
18	100	2.5	105	90	36.06
19	55	0	105	90	23.83
20	55	5	105	90	15.16
21	55	2.5	80	90	22.56
22	55	2.5	130	90	10.02
23	55	2.5	105	0	17.94
24	55	2.5	105	180	15.51
25	55	2.5	105	90	12.30
26	55	2.5	105	90	12.30
27	55	2.5	105	90	12.30
28	55	2.5	105	90	12.30
29	55	2.5	105	90	12.30
30	55	2.5	105	90	12.30

3.2.3. Fermantasyon

Fermantasyon işleminden önce hazırlanan fermantasyon ortam sıvısı, 50 ml hidrolizat örneği için Tablo 3.5’de verilen Melin ve Shieh içeriğine uygun olarak hazırlanmıştır (Melin ve Shieh,1992). Daha sonra oluşturulan bu karışım otoklavda 121 °C’de 15 dakikalık sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Steril hidrolizat ortamına ekmek mayası ya da NRRL Y-12632 suşundan hazırlanan besi ortamları glikoz eklenmeden hazırlanarak diğer besi ortamı bileşenleri ve fiziksel koşullar Tablo 3.5’de verildiği şekilde uygulanmıştır.

Tablo 3.5: Melin ve Shieh’ye göre fermantasyon ortam içerikleri ve miktarları (Melin ve Shieh,1992).

Fermantasyon Ortam İçerikleri	Miktar (g/l)
KH ₂ PO ₄	2
NH ₂ Cl	2
MgSO ₄	0,1
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,1

Fermantasyon oksijensiz ortamı ve CO₂ çıkışını sağlamak amacıyla kapiler boru ve bir hava kilit sistemine sahip erlenler kullanılarak çalkalamalı inkübatörde 250 mL’lik erlenlerde 50 mL deney hacminde ve Tablo 3.6’da gösterilen şartlara göre gerçekleştirilmiştir. Kültür boyunca belirli sürelerde alınan numuneler şeker ve alkol miktarlarını belirlemek üzere şeker ve alkol analizlerine tabi tutulmuştur.

Tablo 3.6: Biyoetanol üretiminde hidrolizata eklenen besi ortamı içerikleri ve fiziksel koşullar.

	<i>S. cerevisiae</i> PAKMAYA	<i>S. cerevisiae</i> NRRL- Y12632
Besi ortamı içeriği	YPD	YPD
Maya ekstraktı (g/L)	10	10
Pepton (g/L)	20	20
Sıcaklık (°C)	30	30
pH	5,5	5,5
Karıştırma hızı (rpm)	150	150
İnokülasyon hacmi (% v/v)	10	10

3.2.4. Analitik Yöntemler

3.2.4.1. İndirgen Şeker Tayini

Hidroliz işlemleri sonunda ve fermantasyon işlemi boyunca belirlenen sürelerde alınan numunelerin indirgen şeker içerikleri Miller'in (Miller, 1959) metoduyla ölçülmüştür. İndirgen şeker miktarları, DNS çözeltisi kullanılarak bu çözeltideki sarı rengin etkisiyle 575 nm'deki dalga boyunda verilen absorbans değerleri okunarak analiz sonuçları elde edilmiştir. DNS ve PST çözeltilerin içerikleri Tablo 3.7 ve 3.8'de verilmiştir. Bu yöntemle 3 mL alınmış örneklerin üzerine 3 mL DNS çözeltisi eklendi ve daha sonra vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra elde edilen bu karışım 90 °C'deki su banyosuna koyularak 15 dk. bekletildi. Bu işlemden sonra karışımların üzerine 1 mL sodyum potasyum tartarat (PST, 40 g/100 mL) çözeltisi ilave edilip soğuması için içi buz dolu bir su banyosuna bırakılmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için ise glikoz standartları hazırlanarak kullanıldı. Kalibrasyon eğrileri ve bu eğrilere ait denklemler EK 3'te verilmiştir.

Tablo 3.7: DNS çözeltisinin içeriği

Bileşenler	Miktar (g/L)
3,5-Dinitrosalisilik asit	20
Fenol	10
Sodyum sülfat (Na_2SO_3)	5
Sodyum hidroksit (NaOH)	5

Tablo 3.8: PST (Rochelle Tuzu Çözeltisi) çözeltisinin içeriği

Bileşenler	Miktar (g/L)
Rochelle Tuzu Çözeltisi	40

3.2.4.2. Biyoetanol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Fermantasyon süresi boyunca farklı sürelerde alınan numunelerde üretilen biyoetanol miktarları Gaz kromatografisi (GC) ile belirlendi. Biyoetanol analizleri GC cihazında (Schimadzu, GC2010 Plus) kapiler alkol kolonu (BP20, 30m, 0,25 mm, 0,25 μm , SGE) ve FID dedektör kullanılarak yapıldı. Çalışma koşulları; enjeksiyon bloğu sıcaklığı 320 °C,

kolon sıcaklığı 140 °C ve dedektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlandı. Enjeksiyon hacmi 1µl olarak ve azot gazı taşıyıcı gaz olarak kullanıldı. Örneklerdeki alkol miktarları farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış mutlak etanol solüsyonlarıyla elde edilen kalibrasyon grafiğı ile belirlendi (Tsuey vd., 2006). Alkol ölçümleri için kullanılan standart kalibrasyon doğrusu EK3’de grafik olarak gösterilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Üzüm Atıklarının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Üzüm atığı örneklerinin bazı özelliklerini belirlemek amacıyla selüloz, lignin, hemiselüloz ve yüzde nem oranı analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Kurutulan üzüm atıklarının yüzde nem oranı %10,9 (w/w) olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerin literatürle uyumlu olduğu söylenebilir (Payan, 2007). Kurutma işlemi için kullanılan etüvden çıkarılan üzüm higroskopik özelliklerinden dolayı her koşulda bir miktar nemi absorbe edebilmektedir. Etüvden çıkan üzümler soğumaya bırakıldığında bir miktar nem bulundurabilir. Üzüm örneklerinin bu şekilde bir miktar nem tutması, çevredeki nem miktarına ve üzüm türüne göre değişiklik göstermektedir.

Üzüm atıklarının içeriğindeki kuru madde bazında selüloz, lignin ve hemiselüloz analizlerinin sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Üzüm atıklarının biyoetanol üretiminde substrat olarak kullanılabilmesi için selüloz ve hemiselüloz toplamını temsil eden holoselüloz miktarını belirlemek önemlidir.

Tablo 4.1: Üzüm atığının bazı özellikleri

Analiz	Yöntem	Birim	Sonuç
Nem	TS 1562	% (w/w)	10,9
Lignin	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	32,77
Selüloz	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	26,33
Hemiselüloz	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	19,95
Ekstraktif madde	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	20,29

Yapılan analizde üzüm atığının holoselüloz miktarı kuru madde bazında yaklaşık olarak % 46,28 olarak bulunmuştur. Bu değerin literatürde yapılan bir çalışmayla elde edilen sonuca (%46,58) yakın olduğu söylenebilir (Çoban, 2016). Holoselüloz miktarı göz önünde bulundurulduğunda üzüm atıklarındaki hemiselüloz ve selüloz içeriğinin önemli oranda olduğu görülmektedir.

4.2. Üzüm Atıklarına Uygulanan Ön İşlemleri Etkileyen Parametreler

Lignoselülozik yapıdaki maddelerin hidrolizinde birçok parametre etkili olabilmektedir. Lignoselülozik bir madde için geçerli olan optimum koşulları başka bir madde için de optimum koşul olarak belirlemek doğru bir yaklaşım değildir. Çünkü lignoselülozik maddelerdeki hemiselüloz, selüloz ve lignin oranları maddenin yaşına, türüne, alındıkları döneme, alındıkları yere ve mevsimsel birçok faktöre göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle, atıkların ön arıtımında hidroliz bileşeni olarak kullanılacak yöntemin ne olacağının belirlenmesi önemli bir konudur.

4.2.1. Seyreltik H₂SO₄ ile Yapılan Ön İşlem İçin Optimizasyon Çalışması

Seyreltik sülfürik asit ile yapılan ön işlemin optimum şartlarının sağlanması ve hidroliz üzerine etkisinin belirlenmesi için cevap yüzey metodu (RSM) kullanılmıştır. Design Expert programı kullanılarak merkezi kompozit dizayn (MKD) ile katı konsantrasyonu (g/L), asit konsantrasyonu (% v/v), sıcaklık (°C) ve süre (dak.) bağımsız değişkenleri için RSM analizleri yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin incelenen aralıkları ve kodlu değişkenler tablosu Tablo 3.3'de verilmiştir. Tablo 3.3'e göre MKD ile 30 deney tasarlanmış ve yapılan her deneyin sonucunda elde edilen indirgen şeker konsantrasyonları (g/L) bağımlı değişken olarak belirlenmiştir. RSM lineer, kuadratik, 2FI, kübik gibi bazı modellere göre işlem yapmaktadır. Bu tezde yapılan RSM değerlendirmesinde kuadratik model ile yapılan değerlendirme en iyi sonucu vermiştir.

Üzüm posasının asidik hidrolizi için Kuadratik modele göre ANOVA test sonuçları için istatistiksel parametreler Tablo 4.2'de verilmiştir. Modelin uyum derecesini yorumlamada, çoklu korelasyon katsayısı (R^2) ve belirtme katsayısı (R) değerlerine bakılır. R^2 'nin değeri 1'e ne kadar yakın olursa, model ve deneysel değerler arasındaki korelasyonda o ölçüde iyi olur. Tablo 4.2'den görüldüğü üzere asidik hidroliz için öngörölmüş modelin R^2 değeri (0,96) deneysel veriler ile model tarafından belirlenen değerlerin uyumluluğunu ifade etmektedir. Tablo 4.2'de görüldüğü üzere Pred R^2 ve Adj R^2 değerleri arasındaki fark yaklaşık olarak 0.15'dir. Bu değer 0.2'den düşük olması RSM analizlerinde modelin uyumluluğu açısından uygunluğun göstergesidir. Yeterli kesinlik değeri sinyalin gürültü oranını ifade eder. Yeterli kesinliğin ise 4'ün üzerinde

olması beklenir. Bu çalışmada ise elde edilen yeterli kesinlik oranı (16,323) yeterli sinyali işaret etmektedir.

Tablo 4.2: Asidik hidroliz için önerilen kuadratik modelin uygunluğunu test etmek için elde edilen istatistiksel parametrelerin değerleri

Standart Sapma	2,35	R^2	0,9603
Ortalama	17,53	Adj R^2	0,9232
Varyans Katsayısı (C.V) %	13,43	Pred R^2	0,7712
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	478,48	Yeterli Kesinlik	16,323

RSM ile yapılan analiz ile modelin önemi, çoklu etkileşim analizleri gibi diğer bazı ANOVA test sonuçları Tablo 4.3’de verilmiştir. Tablo 4.3’de görüldüğü gibi p-değeri 0,05’den çok küçük (<0.0001) olduğundan model önemlidir. Yine Tablo 4.3’den görüldüğü gibi A, B, C, D, AC, BC, A^2 , B^2 , C^2 ve D^2 parametrelerinin p-değerleri de 0.05’den küçük olduğu için model üzerinde bu parametrelerin etkili olduğu söylenebilir. Bununla beraber AB ve CD etkileşimleri de sınır düzeyde modelde etkilidir denebilir.

Tablo 4.3: Kuadratik modelin RSM ile elde edilen ANOVA test sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	2008.43	14	143.46	25.90	<0.0001	<u>Önemli</u>
A- Katı Kons.	1101.07	1	1101.07	198.82	<0.0001	
B- Asit Kons.	27.37	1	27.37	4.94	0.0420	
C-T	460.38	1	460.38	83.13	<0.0001	
D-t	28.44	1	28.44	5.14	0.0387	
AB	21.07	1	21.07	3.80	0.0701	
AC	67.79	1	67.79	12.24	0.0032	
AD	6.47	1	6.47	1.17	0.2968	
BC	42.92	1	42.92	7.75	0.0139	
BD	1.914E-003	1	1.914E-003	3.456E-004	0.9854	
CD	22.61	1	22.61	4.08	0.0615	
A^2	133.46	1	133.46	24.10	0.0002	
B^2	101.79	1	101.79	18.38	0.0006	
C^2	36.01	1	36.01	6.50	0.0222	
D^2	43.22	1	43.22	7.80	0.0136	

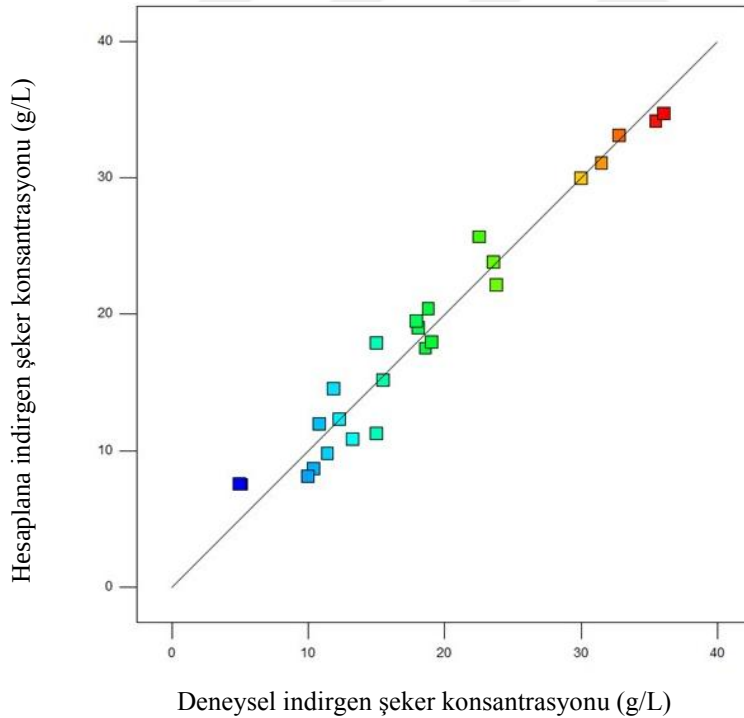
Yapılan RSM analizi sonucu cevap değişkeninin kodlu değerler cinsinden önerilen model denklemi:

$$\begin{aligned} \text{İndirgen Şeker Konsantrasyonu (g/L)} = & (12,30) - (6,77 \times A) - (1,07 \times B) - (4,38 \times C) - (1,09 \times D) + (1,15 \times AB) \\ & - (2,06 \times AC) - (0,64 \times AD) + (1,64 \times BC) - (0,011 \times BD) - (1,19 \times CD) + (2,21 \times A^2) + (1,93 \times B^2) \\ & + (1,15 \times C^2) + (1,26 \times D^2) \end{aligned} \quad (4.1)$$

Gerçek değerler cinsinden önerilen model denklemi:

$$\begin{aligned} \text{İndirgen Şeker Konsantrasyonu (g/L)} = & (11,338) + (0,545 \times C_K) - (20,251 \times C_A) - (1,559 \times T) + (0,121 \times t) \\ & + (0,041 \times C_K \times C_A) - (7,318 \times 10^{-3} \times C_K \times T) - (6,281 \times 10^{-3} \times C_K \times t) + (0,105 \times C_A \times T) - (1,944 \times 10^{-4} \times C_A \times t) \\ & - (2,113 \times 10^{-5} \times T \times t) + (4,357 \times 10^{-3} \times C_K^2) + (1,233 \times C_A^2) + (7,333 \times 10^{-3} \times T^2) + (6,198 \times 10^{-4} \times t^2) \end{aligned} \quad (4.2)$$

Burada, C_K katı konsantrasyonu (g/L), C_A asit konsantrasyonu (%v/v), T sıcaklık (°C) ve t ise süre (dk.) dir. Üzüm posasının asidik hidrolizi için deneysel cevap değişkeni ile model sonucu hesaplanan cevap değişkeni arasındaki ilişkiyi gösteren bir grafik Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Şekil 4.1’de görüldüğü üzere model ile gerçek cevap değişkenleri uyumludur.



Şekil 4.1: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD ile gerçekleştirilen analiz sonucu deneysel ve hesaplanan indirgen şeker konsantrasyonlarının değişimi

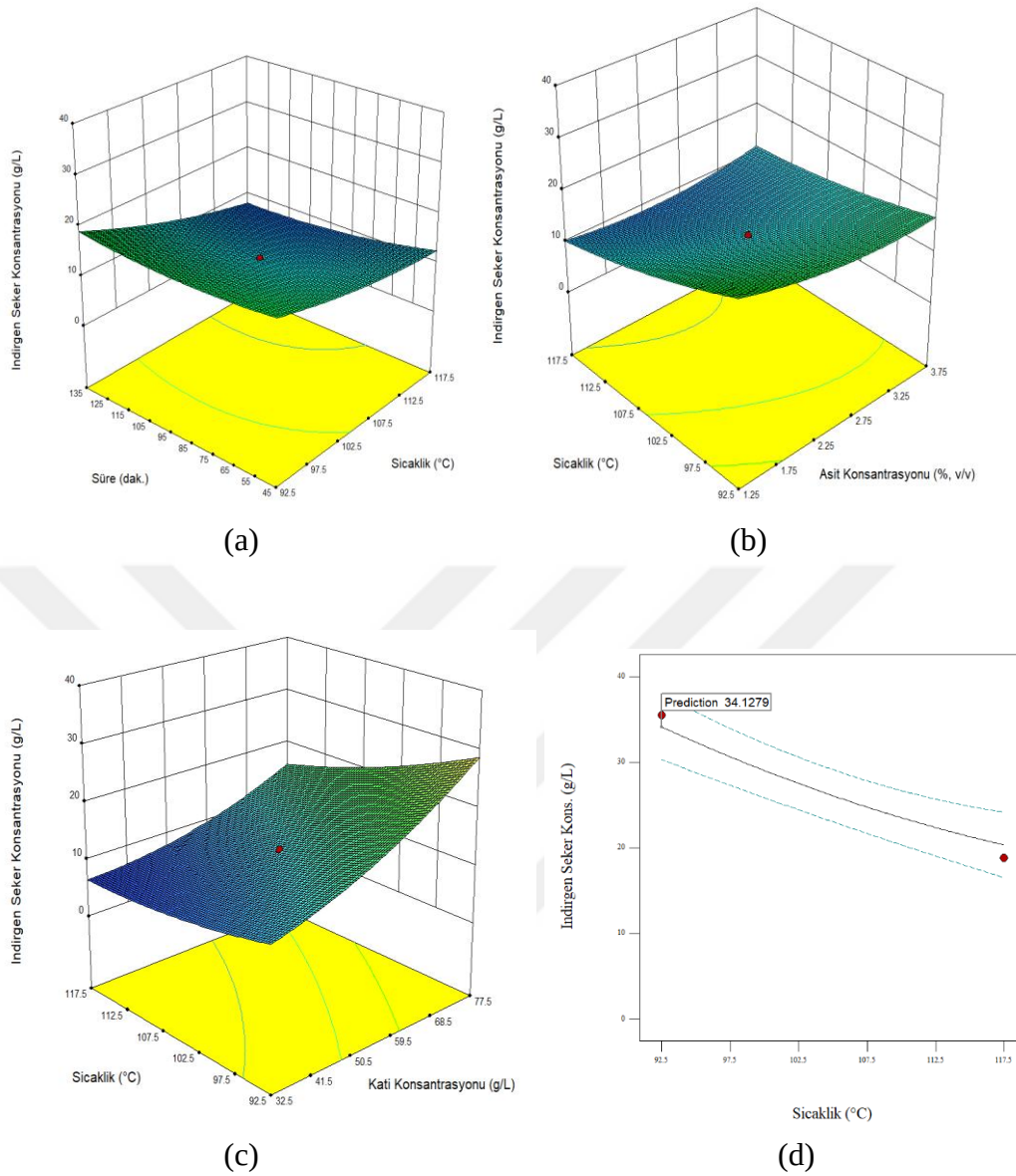
4.2.1.1. Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.2’de sıcaklığın incelenen diğer bağımsız değişkenler ile etkileşimini ve tek başına indirgen şeker üretimi üzerine etkisini gösteren grafikler verilmiştir. ANOVA tablosu dikkate alındığında sıcaklığın (C) p-değeri 0,0001’den küçük olarak elde edilmiş olduğu için hidroliz verimi üzerine etkisinin önemli olduğu görülmektedir.

Şekil 4.2(a)’da süre ile sıcaklık (CD) arasındaki etkileşim ile hidroliz verimi üzerindeki etkisini gösteren grafik verilmiştir. ANOVA tablosu dikkate alındığında CD değerine ait p değerinin $0,0615 > 0.05$ olduğu görülmektedir. Buna göre süre ve sıcaklığın etkileşiminin hidroliz verimi üzerinde pek fazla etkisinin olmadığı söylenebilir. Grafiğe bakıldığında sürenin sabit tutularak sıcaklığın düşürüldüğü durumlarda verim değerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.2b’de sıcaklık ile asit konsantrasyonu (BC) arasındaki etkileşim ile hidroliz verimi üzerindeki etkisini gösteren grafik verilmiştir. 0.013 p değeri ile model etkileşiminde önemli bir parametre olduğu Tablo 4.3’den görülmektedir. Buna göre asit konsantrasyonunun sabit tutulduğu ve sıcaklığın düşük olduğu noktalarda verim değerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.2b’den yüksek asit konsantrasyonu ve düşük sıcaklıklarda indirgen şeker üretiminin arttığı da görülmektedir. Şekil 4.2c’de sıcaklık ve katı konsantrasyonu (AC) arasındaki etkileşim ile hidroliz verimi üzerindeki etkisini gösteren grafik verilmiştir. Bu grafiğe göre sıcaklığın sabit tutularak katı konsantrasyonunun artırılması halinde verim değerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.2d’de verilen grafikte sıcaklığın tek başına hidroliz verimi üzerine etkisi görülmektedir. Sıcaklığın tek başına hidroliz verimi üzerindeki etkisine bakılırsa sıcaklığı arttırmanın verimi azalttığı görülmektedir.

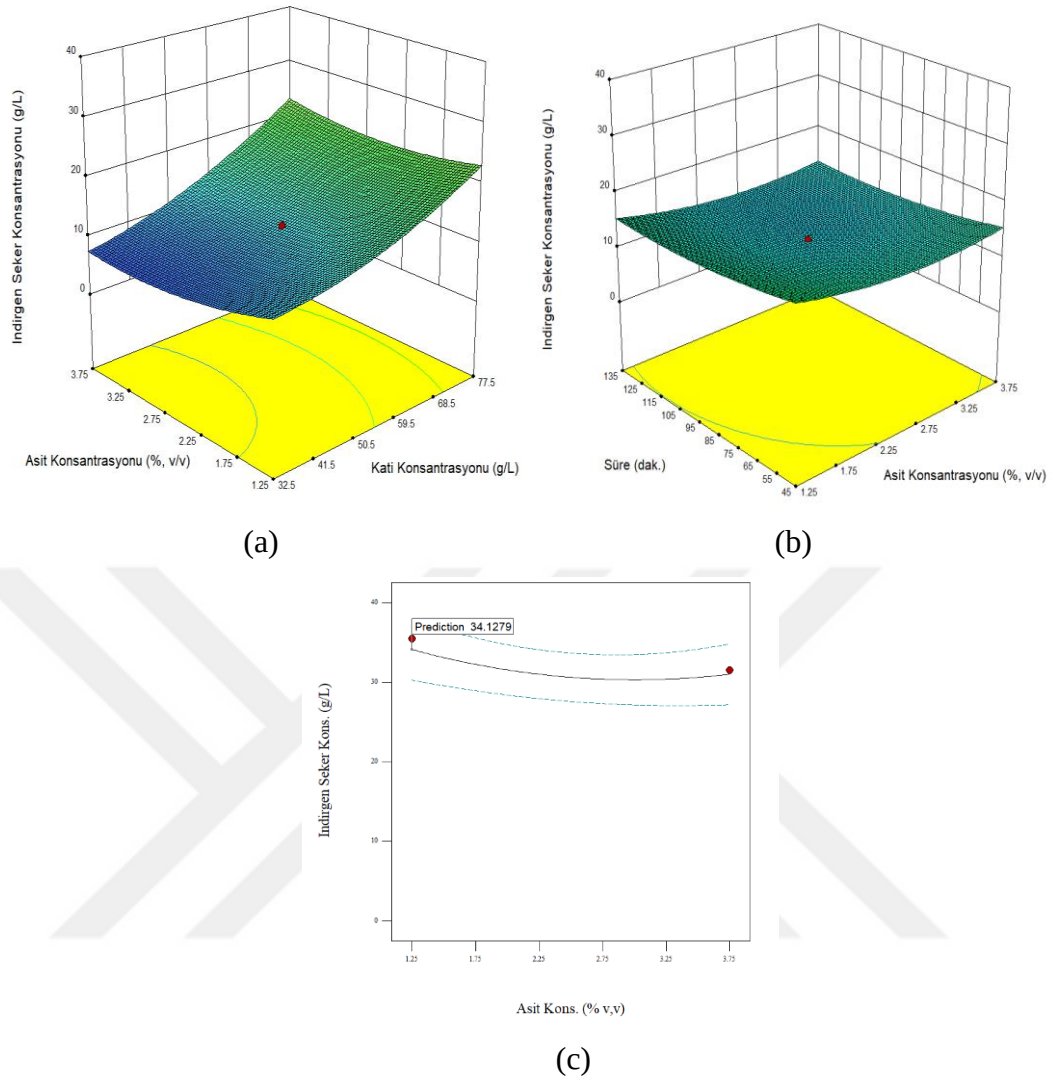
4.2.1.2. Asit Konsantrasyonunun Etkisi

Hidroliz verimi üzerine sıcaklık ve asit konsantrasyonunun (BC) etkisini gösteren grafik şekil 4.2 (b)’de verilmiştir. Modele ait olan ANOVA tablosuna bakıldığında BC değerine ait p değerinin 0,0139 olduğu görülmektedir. Bu değerin 0,05’den küçük bir değer olması istatistiksel açıdan etkisinin önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD tasarımı sonucu elde edilen etkileşim grafikleri **(a)** süre-sıcaklık ikili etkileşimi **(b)** sıcaklık-asit konsantrasyonu ikili etkileşimi **(c)** sıcaklık-katı konsantrasyonu ikili etkileşimi **(d)** sıcaklığın tek başına indirgen şeker üretimi üzerine etkisi

Şekil 4.3’de asit konsantrasyonunun diğer deneysel bağımsız değişken parametreleri ile etkileşimini ve asit konsantrasyonunun tek başına indirgen şeker miktarı üzerine etkisini göstermektedir. Şekil 4.3 (a) asit konsantrasyonu ve katı konsantrasyonu (AB) arasındaki etkileşim gösteren bir grafikdir. Grafiğe göre asit konsantrasyonunun sabit tutularak katı konsantrasyonunun artırılması halinde verim değerinin yüksek olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.3. Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD tasarımı sonucu elde edilen etkileşim grafikleri **(a)** asit konsantrasyonu-kati konsantrasyonu ikili etkileşimi **(b)** süre-asit konsantrasyonu ikili etkileşimi **(c)** sıcaklığın tek başına indirgen şeker üretimi üzerine etkisi.

Şekil 4.3(b)'de asit konsantrasyonu ve süre (BD) arasındaki etkileşim ile hidroliz verimi üzerindeki etkisini gösteren grafik verilmiştir. Modele ait olan ANOVA tablosuna bakıldığında BD değerine ait p değerinin 0,9854 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer 0,05'den büyük bir değer olması nedeniyle hidroliz verimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 4.3(c)'de verilen grafikte asit konsantrasyonunun tek başına hidroliz verimi üzerine etkisi görülmektedir. Asit konsantrasyonunun tek başına hidroliz verimi üzerindeki etkisine bakılırsa asit konsantrasyonu için optimum bir noktanın var olduğu görülmektedir.

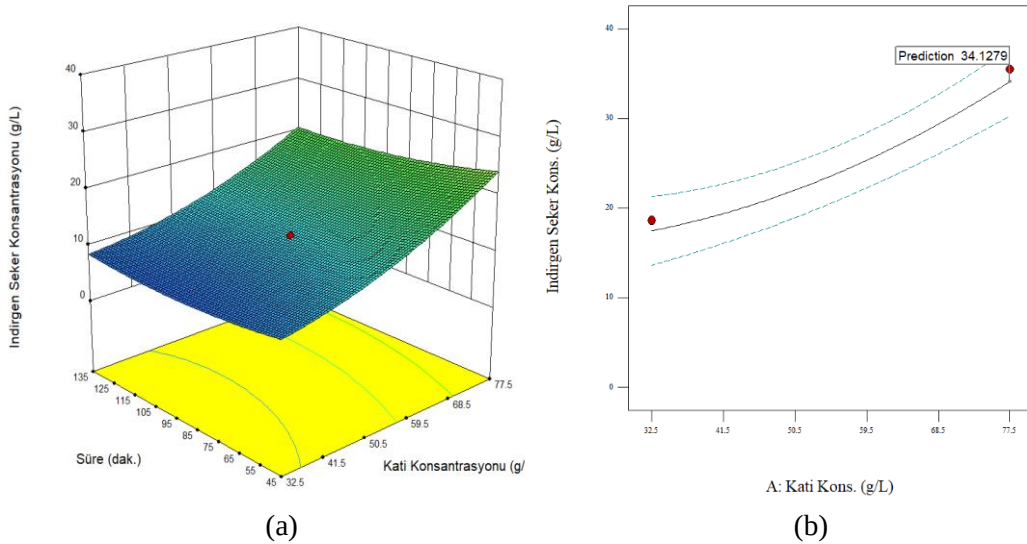
4.2.1.3. Katı Konsantrasyonunun Etkisi

Hidroliz verimi üzerine süre ve katı konsantrasyonunun (AD) etkisini gösteren grafik şekil 4.4(a)'da gösterilmiştir. Modele ait olan ANOVA tablosuna bakıldığında AD değerine ait p-değerinin 0,2968 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer 0,05'den büyük bir değer olması istatistiksel açıdan etkisinin önemli olmadığını göstermektedir.

Şekil 4.4b'de verilen grafikte katı konsantrasyonunun tek başına hidroliz verimi üzerine etkisi görülmektedir. Katı konsantrasyonunun tek başına hidroliz verimi üzerindeki etkisine bakılırsa katı konsantrasyonunun arttığı noktalarda verimin arttığı görülmektedir. ANOVA tablosu değerlerinde sıcaklığın tek başına etkisinin modelde etkin olduğu anlaşılmaktadır.

4.2.1.4. Sürenin Etkisi

Hidroliz verimi üzerine süre ve sıcaklığın (CD) etkisini gösteren grafik şekil 4.2 (a)'da verilmişti. Modele ait olan ANOVA tablosuna bakıldığında CD değerine ait p değerinin 0,0615 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer 0,05'den büyük bir değer olması istatistiksel açıdan hidroliz verimi üzerine pek fazla bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



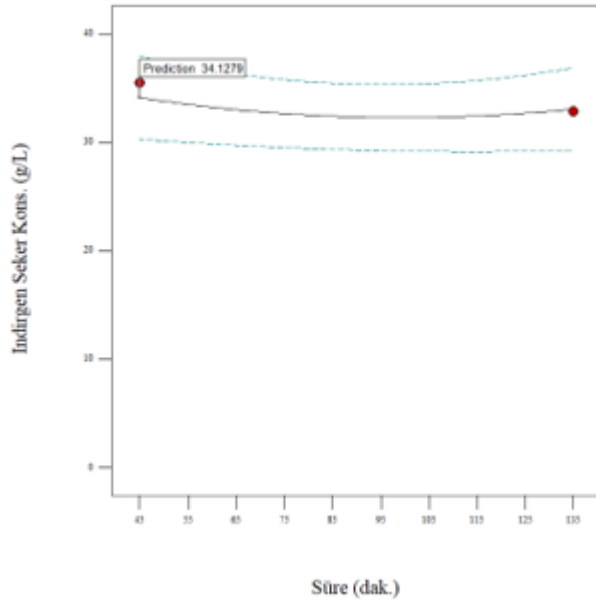
Şekil 4.4. Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD tasarımı sonucu elde edilen etkileşim grafikleri (a) süre -katı konsantrasyonu ikili etkileşimi (b) katı konsantrasyonunun tek başına indirgen şeker üretimi üzerine etkisi

Hidroliz verimi üzerine süre ve asit konsantrasyonu (BD) etkisini gösteren grafik Şekil 4.2(b)'de gösterilmiştir. Modele ait olan ANOVA tablosuna bakıldığında BD değerine ait p değerinin 0,9854 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer 0,05'den büyük bir değer olması istatistiksel açıdan etkisinin önemli olmadığını göstermektedir.

Hidroliz verimi üzerine süre ve katı konsantrasyonu (AD) etkisini gösteren grafik şekil 4.4(a)'da gösterilmiştir. Modele ait olan ANOVA tablosuna bakıldığında AD değerine ait p-değerinin 0,2968 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer 0,05'den büyük bir değer olması istatistiksel açıdan etkisinin önemli olmadığını göstermektedir.

Son olarak Şekil 4.5'de verilen grafikte sürenin tek başına hidroliz verimi üzerine etkisi görülmektedir. Verilen grafikte sürenin tek başına hidroliz verimi üzerindeki etkisine bakılırsa yaklaşık 90 dk.'dan sonra artırılması kısmen de olsa hidroliz verimini arttırmıştır.

Yukarıda ayrıntılı olarak verilen RSM optimizasyon analizleri sonucunda üzüm posasındaki mevcut yüksek moleküllü yapıların asidik hidroliz ile indirgen şekerlere dönüştürülmesinin Tablo 4.4'te verilen şartlarda gerçekleştirilebileceği söylenebilir.



Şekil 4.5. Sürenin tek başına hidroliz verimi üzerine etkisi.

Tablo 4.4: Üzüm posasının asidik hidrolizi için MKD ile gerçekleştirilen RSM sonuç tablosu

Sıcaklık (°C)	Süre (dak.)	Katı kons. (g/L)	Asit kons. (% v/v)	İndirgen şeker konsantrasyonu (g/L)
92,5	45,35	80,9	1,26	36,07

Tablo 4.4’de görüldüğü gibi RSM ile 92,5 °C, 45,35 dk., 80,9 g/L katı konsantrasyonu ve 1,26 asit konsantrasyonu şartlarında yapılan hidroliz işlemi sonucunda 36,07 g/L indirgen şeker üretilbileceği öngörülmektedir. Bu şartlarda gerçekleştirilen bir doğrulama deneyi ile 34,5 g/L indirgen şeker konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Böylece % 5’lik bir hata oranı ile modelin uygunluğunun iyi olduğu söylenebilir.

4.3. Fermantasyonla Biyoetanol Üretim Deneyleri

Üzüm posasına uygulanan hidroliz işleminden sonra optimum koşullarda elde edilen hidrolizatlar ile biyoetanol üretim deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla fermantasyonda *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşları kullanılmıştır. 72 saat gerçekleştirilen fermantasyonda farklı sürelerde ortamdan numuneler alınarak biyoetanol ve indirgen şeker analizleri yapılmıştır.

S. cerevisiae ve *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşlarının her ikisi için de deneysel çalışmalar % 5-10 arasında değişen inokülasyon hacimlerinde, pH’nın 4,5, 5 ve 5,5 olduğu ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.5 kullanılan suşlarla farklı inokülasyon hacim ve pH’larda üretilen biyoetanol konsantrasyon değerlerini göstermektedir. Çalışılan tüm şartlarda *S. cerevisiae* NRRL Y-12632’nin, *S. Cerevisiae*’dan daha fazla biyoetanol ürettiği Tablo 4.5’de görülmektedir. Azhar ve ark., yaptıkları bir çalışmada *S. Cerevisiae*’nın çeşitli suşları için belirli şeker kaynaklarından biyoetanol üretim verimlerini özetlemiştir (Azhar ve ark., 2017). Bu çalışmada *S. cerevisiae* için üretilen en yüksek biyoetanol konsantrasyonu pH 5,5 ve % 10 inokülasyon oranı için elde edilmiştir (Tablo 4.5). % 69 teorik verim değeri literatür sonuçları ile uyumludur. Tablo 4.5’den görüldüğü gibi en yüksek biyoetanol *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 ile 5,5 pH değeri ve % 10 inokülasyon hacmi şartlarında üretilmiştir. Bu suş ile üzüm posasından biyoetanol üretimine yönelik literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. % 87’luk biyoetanol üretim verimi değeri ile bu çalışmada, Azhar ve ark.’nın yaptığı çalışmadaki birçok üretim değerinden daha yüksek alkol üretim veriminin elde edildiği söylenebilir.

Tablo 4.6 çalışılan suşlar için en yüksek verimin elde edildiği durumlarda zamanla biyoetanol konsantrasyonu ve ortamda kalan şeker konsantrasyonu değerleri verilmiştir. Şekil 4.6’da ise zamanla bu değişimlerin grafiği gösterilmiştir. *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşunun maksimum biyoetanol konsantrasyonuna sırasıyla 24. ve 48. saatlerinde ulaştıkları görülmektedir.

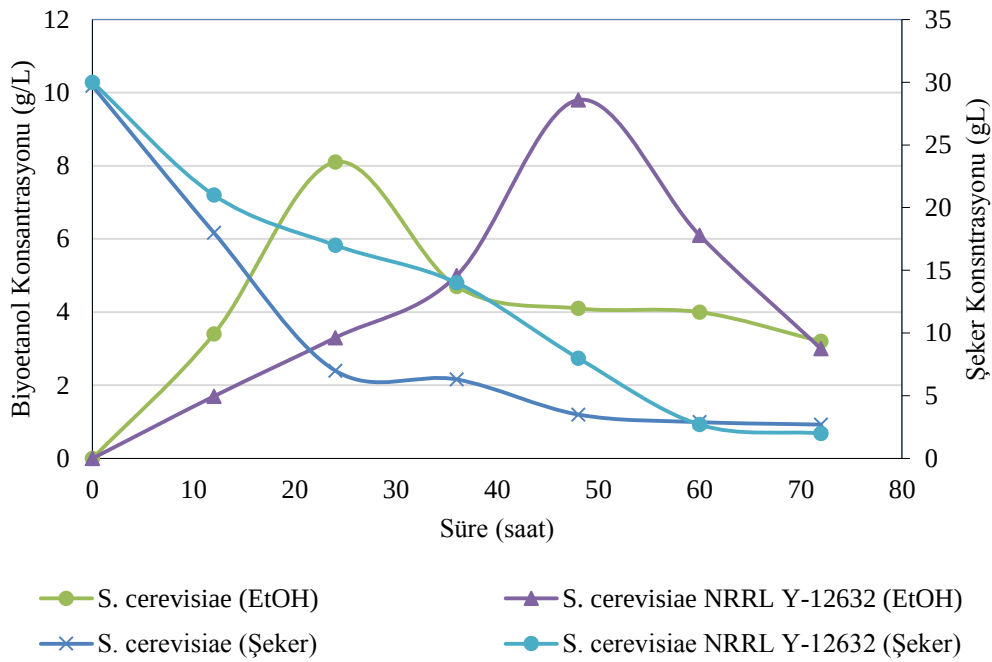
Tablo 4.5: *S. cerevisiae* ve *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu için 72 saat boyunca yapılan fermantasyonda 3 farklı inokülasyon hacminde ve ortam pH’ında elde edilen sonuçlar

Mikroorganizma türü	pH	İnokülasyon hacmi (%v/v)	Biyoetanol Üretim Verimi (%)
<i>S. cerevisiae</i>	4,5	%5	39
		%7,5	51
		%10	56
	5	%5	48
		%7,5	58
		%10	63
	5,5	%5	51
		%7,5	61
		%10	70
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-12632	4,5	%5	53
		%7,5	71
		%10	80
	5	%5	55
		%7,5	65
		%10	83
	5,5	%5	65
		%7,5	78
		%10	89

Belirlenen optimum şartlarda üzüm atıklarına uygulanan asidik hidroliz ile elde edilen hidrolizatta yapılan biyoetanol üretim deneme sonuçları ise Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.6: Üzüm atıklarının asidik hidroliz (A.H.) ortamlarında mikroorganizmalar ile fermantasyonu sonucunda elde edilen indirgen şeker ve alkol değerleri.

Mikroorganizma Türü	Parametre	Zaman (saat)						
		0	12	24	36	48	60	72
<i>S. cerevisiae</i>	İndirgen şeker (g/L)	30	18	7	6,3	3,5	2,9	2,7
	Biyöetanol (g/L)	0	3,4	8,1	4,7	4,1	4	3,2
<i>S.cerevisiae</i> NRRL Y-12632	İndirgen şeker (g/L)	30	21	17	14	8	2,7	2
	Biyöetanol (g/L)	0	1,7	3,3	5	9,8	6,1	3



Şekil 4.6: Mikroorganizmaların ürettiği biyoetanol konsantrasyonlarının zamanla değişimi

Asidik hidrolizat ortamlarında yapılmış olan fermantasyon işlemi Tablo 4.7’da belirtilen koşullarda 72 saat süresince takip edilmiştir. Buna göre *S. cerevisiae* suşu ile maksimum biyoetanol konsantrasyonuna 24. saat sonunda ulaşılmış olup 8,1 g/L biyoetanol üretilmiştir. *S.cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu ise 48. saat sonunda 9,8 g/L konsantrasyonda biyoetanol üretmiştir. Maya hücrelerinin metabolik hızları yavaş olduğundan dolayı ortamda bulunan 5 karbonlu şekerleri tüketememekte ve bundan dolayı etanol üretim verimi de düşük olmuştur. *S.cerevisiae* NRRL Y-12632 suşunun tercih edilmesinin nedeni hidroliz işleminden sonra oluşabilecek HMF ve furfural gibi toksik etki yaratan bileşenlere karşı toleranslı olup etanol üretebilir olmasıdır (Liu vd., 2004).

Tablo 4.7: *S. cerevisiae* / *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 ile optimum şartlarda fermentasyon parametre ve oranları.

Optimizasyon	Parametre	<i>S. cerevisiae</i> /NRRL Y-12632
Ön işlem şartları	Asit konst. (%v/v)	1,25
	Katı konst. (g/L)	77,5
	Zaman (dk.)	45
	Sıcaklık (°C)	92,5
Üretim Ortamı	Yeast ekstarkt (g/L)	10
	Pepton (g/L)	20
	NaCl (g/L)	0
Fiziksel Şartlar	Sıcaklık (°C)	30
	İnokülasyon hacmi(%v/v)	10
	Karıştırma hızı (rpm)	150
	pH	5,5

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

S. cerevisiae ve *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu kullanılarak üzüm atıklarından farklı inokülasyon ve pH değerleri denenerek optimum fermantasyon süresinin de belirlenmesiyle biyoetanol üretiminin araştırıldığı bu tez çalışmasının sonuçları ve öneriler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Üzüm atıkları % 46,28 ile kayda değer miktarda holoselüloz içerdiği ortaya konulmuştur.
- Tez çalışmasında asidik ön işlem ile optimum şartlarda işlem yapıldığında üzüm posasından yüksek oranda indirgen şeker elde edilmiştir.
- Yapılan fermantasyon işlemlerinden sonra elde edilen verilerden yola çıkılarak *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşundan *S. cerevisiae* (ekmek mayası)'na göre daha yüksek verimde biyoetanol üretildiği görülmüştür.
- Ön işlemlerden sonra açığa çıkan HMF ve furfural gibi toksik etki oluşturan bileşenlere olan toleransından dolayı *S. cerevisiae* NRRL Y-12632 suşu, ekmek mayasına göre daha yüksek verimle biyoetanol üretmiştir.
- Her iki mikroorganizma için de fermantasyon ortam pH'ının 5,5, inokülasyon hacminin %10 olduğu değerde daha yüksek biyoetanol üretim verimine ulaşılmıştır.
- Ön işlemlerden sonra açığa çıkabilecek HMF ve furfural gibi toksik etki oluşturan bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılması (örneğin aktif karbon kullanımı) ekmek mayasının biyoetanol üretim verimini artırabilir.
- Fermantasyon ortamının fiziksel parametrelerinden olan karıştırma hızı ve ortam sıcaklığı da optimize edilerek verim değeri artırılabilir.

KAYNAKLAR

- Acaroğlu, M.**, 2013. Alternatif Enerji Kaynakları (Alternative Energy Sources), Nobel Press, ISBN: 978-605-133-620-6.
- Acaroglu, M. and Aydogan, H.**, 2012. Biofuels energy sources and future of biofuels energy in Turkey, *Biomass- Bioenergy*, 36:69–76.
- Acaroğlu, M., Oğuz, H. ve Ünaldı, M.**, 2004, Türkiye için Alternatif Bir Yakıt: Biyoetanol, Yakıt Olarak Kullanımı ve Emisyon Değerleri, Biyoenerji Sempozyumu, Ege Üniversitesi.
- Adıgüzel, A. O.**, 2011. "Lignoselülozik Atıklardan Biyoetanol Üretimi." In *Lignoselülozik Atıklardan Biyoetanol Üretimi*, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B.**, 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685.
- Aggarwal, N.K., Nigam, P., Singh, D. and Yadav, B.S.**, 2001. Process optimization for the production of sugar for the bioethanol industry from sorghum, a non-conventional source of starch. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17: 411-415.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.**, 2010. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, 101(13), 4851-4861.
- Amienyo, D., Camilleri, C. and Azapagic, A.**, 2014. Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK. *J. Clean. Prod.* 72, 110–119.
- Amin, S.**, 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae, *Energy Conversion and Management*. 50(7): p. 1834-1840.
- Anonymous**, 2011. Web Sitesi: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Anonim**, 2013. FAOSTAT İnternet Tarım İstatistikleri. www.fao.org.
- Anonim**, 2014. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). www.tuik.gov.tr.

- Aydın, F. F.**, 2010. "Enerji Tüketimi ve Ekonomik Büyüme." Erciyes Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergis 35: 317-340.
- Azhar, S.H.M., Abdulla R., Jamboa S.A., Marbawia H., Gansaua J.A., Faika A.A.M. and Rodriguesc, K.F.**, 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, *Biochemistry and Biophysics Reports* 10; 52-61.
- Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., Taha, S. And Vial, C.**, 2017. Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process, *Bioresource Technology* 235; 25–34.
- Balat, M.**, 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manag*;52:858–75.
- H. Balat, M. Balat, and Öz, C.**, 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 34(5): p. 551-573.
- Bayrakçı Özdingis, A.G., Koçar, G.**, 2018. Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, pp.2196-2203.
- Ben-Ghedalia, D. and Miron, J.**, 1981. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 823–831.
- Ben-Ghedalia, D. and Shefet, G.**, 1983. Chemical treatments for increasing the digestibility of cotton straw. *J. Agric. Sci.* **100**, 393–400.
- Brennan, L. and P. Owende**, 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2): p. 557-577.
- Bulut, B.**, 2006. Tarıma Dayalı Alternatif Yakıt Kaynaklarından Biyoetanol Ve Türkiye İçin En Uygun Biyoetanol Hammaddesi Seçimi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Canilha, L., Chandel, A.K., Dos Santos Milessi, T.S., Antunes, F.A.F., Costa Freitas, W.L.D., Graças Almeida Felipe, M.D. and Silva, S.S.D.**, 2012. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* , pp. 1–15.

- Cardona, C., Sánchez, O.J.**, 2007. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol*; **98**, 2415–57.
- Corbin, K. R., Hsieh, Y. S.Y., Betts N.S., Byrt, C.S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G.B. and Burton, R.A.**, 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification, *Bioresource Technology* 193; 76–83.
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y. S., Fidan, Y., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G.**, 1998. Genel Bağcılık. SunFidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi:1, Ankara.
- Çoban, H.**, 2016. Keçboynuzu Küspesinin Pirolyzi İle Biyoyakıt Eldesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Demirbaş, A.**, 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Source*; **27**, 327-37
- Demirbaş, A.**, 2009. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Convers Manag*; **50**, 2239–49.
- Demirbaş, A.**, 2017. Utilization of date biomass waste and date seed as bio-fuels source. *Energy Sources Part-A - Recovery Util Environ Eff* , **39(8)**, 754–60.
- Dien, B., S., Cotta, M., A. ve Jeffries, T., W.**, 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 258–266.
- Dolgun, S.B.**, 2016. Dalı darı bitkisinden (*Panicum Virgatum* L.) biyoetanol üretiminde seyreltik asit ve kireç ön uygulamalarının optimizasyonu ve bazı genotiplerin biyoetanol verimliliklerinin belirlenmesi, yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı.
- Dönmez, M.**, 2014. Yer Fıstığı Kabuğundan Biyoetanol Eldesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı.
- Duff, S.J.B. and W.D. Murray**, 1996. *Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review*. *Bioresource Technology*, **55(1)**, p. 1-33.
- Duvernay, W.H., Chinn, M.S. And Yencho, G.C.**, 2013. Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. *Ind Crops Prod*, 42, 527–37.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z. ve Heinze T.**, 2005. Hemicellulose *Adv Polym Sci*; 186, 1-67.

- Eggeman, T. and Elander, R.T.,** 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* **96**, 2019–2025.
- Karagöl, E., Erbaykal, E. ve Ertuğrul, H.M.,** 2007. "Economic Growth And Electricity Consumption In Turkey: A Bound Test Approach." *Doğuş Üniversitesi Dergisi* 8(1): 72-80.
- Erdoğan, M.,** 2014. "Türkiye'nin Yenilenebilir Enerji Potansiyelinin Termodinamik Analiz Yöntemi İle İncelenerek, Yenilenebilir Enerji Kullanımının Gelecek Projeksiyonlarının Değerlendirilmesi" İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Erkal, S. ve Ergun, M.E.,** 1983. Nevşehir İli Ürgüp İlçesi Bağ İşletmelerinde Üzüm Üretimi, Değerlendirilmesi, Maliyeti ve Sorunlarına İlişkin Bir Çalışma, Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Gamage, J., Howard, L., Zisheng, Z.,** 2010. Bioethanol production from lignocellulosic biomass. *J.Biobased Mater. Bioenerg;* **4**, 3-11.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M. ve Bolado, S.,** 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresour. Technol.*, **100(4)**, 1608-1613.
- García-Lomillo, J. ve González-SanJosé, M.L.,** 2017. Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Compr. Rev. Food Sci. F* **16**, 3–22.
- Gülay, A.N.,** 2008. "Yenilenebilir Enerji Kaynakları Açısından Türkiye'nin Geleceği ve Avrupa Birliği ile Karşılaştırılması." Dokuz Eylül Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İzmir.
- Güner, C.,** 2016. Determination of bioethanol potential of agricultural waste and loses in Turkey, Master Thesis. Fatih University, Turkey.
- Girio, FM., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, LC., Marques, S., Bogel-Lukasic, R.,** 2010. Hemicellulose *Bioresour Technol*, **101**, 4775-800.
- Harun, R. and Danquah, M.K.,** 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production, *Process Biochemistry*, **46(1)**, p. 304-309.
- Hasunuma, T. And Kondo, A.,** 2012. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains, *Process Biochem*, **47(9)**, 1287–94.

- Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G.,** 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, **100(1)**, p. 10-18.
- Hirofimi, H., Takonori, I. And Ryuichiro, K.,** 1999. Intracellular ferrireductase involved in Mn(IV) reducing enzyme system to supply Mn(II) for lignin biodegradation by white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 467-473.
- IEA, 2016, International Energy Agency, www.iea.org.
- İlgınoglu, M. A.,** 1991. "Gelişmekte Olan Ülkelerde Enerji Sorunu ve Alternatif Enerji Politikaları." *Erciyes Üniversitesi İ.İ.B.F. Dergisi* **9**: 122-147.
- Ingram, L., O., Gomez, P., F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B., E., Yomano, L., P., York, S., W.,** 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, *Biotechnology and Bioengineering*, **58 (2-3)**, 204–214.
- Jeffries, T., W. and Jin, Y., S.,** 2000, Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts, *Adv. Appl. Microbiol.*, **47**, 221–268.
- Karagöz, P.,** 2013. Lignoselülozik Atıkların Ko-Fermantasyonla Biyoetanole Dönüştürülmesi: Ön Arıtım ve Fermantasyon Proseslerinin İncelenmesi ve İyileştirilmesi. Doktora Tezi, Gebze Yüksek teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Ana bilim Dalı.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. And Julson, J.L.,** 2008. Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008. ASABE 084114. ASABE, St. Joseph, Mich.
- Kaya, D. and Kılıç, F.C.,** 2015. New markets for renewable industries: developing countries – Turkey, its potential and policies. *J Energy South Afr*, **26(1)**, 25–35.
- Kays, S.J and Wang, Y.,** 2001. Sweetpotato quality: Its importance, assessment and selection in breeding programs. I International Conference on Sweetpotato Food and Health for the Future, **583**,187-193.
- Knauf, M. and Moniruzzaman, M.,** 2004. Lignocellulosic biomass processing. *Persp Int Sugar J*, 106,147-50.

- Koçoğlu Soydan, D.**, 2012. Buğday Saplarının Biyoetanol Üretimi: Asit Hidrolizi ve Enzimatik Hidrolizin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Ana bilim Dalı.
- Koppram, R., Nielsen, F., Albers, E., Lambert, A., Wännström, S., Welin, L., Zacchi, G. And Olsson, L.**, 2013. Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. *Biotechnol Biofuels*, **6(1)**, 2.
- Kosaric, N., Vardar-Sukan, F.**, 2001, Part II: Potential source of energy and chemical products, *The Biotechnology of Ethanol*, 87-227.
- Kouzumi, T.**, 2011. Biofuel Programs in East Asia: Developments, Perspectives, and Sustainability, Environmental Impact of Biofuel, Edited by: Marco Aurélio dos Santos Bernardes, p. 207–26.
- Kumar, P., Barret, D. M., Delwiche, M. J. and Stroeve, P.**, 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **48(8)**, p. 3713-3729.
- Ladisch, M.R., Mosier, N.S., Kim, Y., Ximenes, E. and Hogsett, D.**, 2010. Converting cellulose to biofuels. SBE special supplement biofuels, CEP, **106(3)**, 56-63.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.-O.**, 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.*, **24(3)**, 151-159.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y. and Oh, H.M.**, 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101(1, Supplement), p. S75-S77.
- Ljungdahl, L.G. and Erikson, K.E.**, 1985. Ecology of microbial Cellulose Degradation . *Adv. Microbiology Ecology*, **8**, 237-299.
- Li, S., Xu, S., Liu, S., Yang, C. and Lu, Q.**, 2004. 'Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas', *Fuel Processing Technology*, **85**, 1201-11.
- Lin, Y., Tanaka, S.**, 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biot*, **69**, 627–42.

- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., and Gorsich, S.W.,** 2004. 'Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-bis-hydroxymethylfuran', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **31**, 345-52.
- Lurgi, A.G.** Comp., 2009, www.lurgi.com.
- Lugar, R.G.,**1999. Woolsey RJ. The new petroleum. *Foreign Affairs*, 1, 88-102
- Martinez, A.T., Camerebo, S., Gutierrez, A.,** 2001. Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 59, 401-411.
- Marx, S., Brandling, J.,** 2016. van der Gryp P. Ethanol production from tropical sugar beet juice. *Afr J Biotechnol*, 11, 11709–20.
- McMillan, J.D.,** 1993. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel ME, Baker JO, Overend RP, editors. *Enzymatic conversion of biomass for fuel production*. Washington, D.C: American Chemical Society, p. 292-323.
- Melin, E., Shieh, W.K.,** 1992. Continuous Ethanol Production from Glucose using *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Fluidized Microcarriers, *The Chemical Engineering Journal*, 50, B17-B22.
- Miller, Gail Lorenz.** 1959. 'Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar', *Analytical chemistry*, 31: 426-28.
- Miranda, J.R., P.C. Passarinho, and L. Gouveia,** 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 104(0): p. 342-348.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y.,** 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6): p. 673-686.
- Mumcu, S., Doymaz, İ., Akgün, N.,** 2003. Şarap Fabrikası Atıklarının Değerlendirilmesi. *Kimya Teknolojileri Dergisi*, 32: 70-77.
- Nugzar, N., Nutsubidze. and Sarkanen, S.,** 1997. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *trametes cingulata*. *Phytochemistry*, **49**, 1203-1212.

- Nwufo, O., Nwafor, O. And Igbokwe, J.,** 2016. Effects of blends on the physical properties of bioethanol produced from selected Nigerian crops. *Int J Ambient Energy* ;37:10–5.
- OIV. (2007). Annual report. from <http://www.oiv.org>
- Payan, A.,** 2007. Üzüm Meyvesi ve Çekirdeğinden Antioksidan Eldesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Perez, J.; Dorado, J. M.; Rubia, T. D.; Martinez, J.,** 2002. Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int. Microbiol*, 5, 53–63.
- Pettersen, R.C.,** 1984. The chemical composition of wood. In: Rowell RM, editor. The chemistry of solid wood. Advances in chemistry series, vol. 207. Washington, DC: American Chemical Society, p. 115e6
- Quesada, J., Rubio, M., Gomez, D.,** 1999. Ozonation of Lignin Rich Solid Fractions from Corn Stalks. *J. Wood Chem. Technol*, 19, 115–137.
- Rabelo, S., Filho, R. and Costa, A.,** 2009. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 153(1-3): p. 139-150.
- REN21, "Renewables 2011 - Global Status Report," Renewable Energy policy Network for the 21st Century2011.
- RFA. Industry statistics, Renewable Fuels Association, Washington, DC., USA. (<http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099788442-e48b2782-ea53>); 2016.
- RFA. Ethanol industry outlook. Washington, DC., USA: Renewable Fuels Association; 2015.
- Rodríguez, L.A., Toro, M.E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M.L., Gouiric, S.C. and M.D. Vallejo, M.D.,** 2010. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation, *international journal of hydrogen energy* 35; 5914 – 5917
- Saha, B.D.,** 2003. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* ;30: 279e91
- Santana, Á.L., Meireles, M.A.A.,** 2014. New starches are the trend for industry applications: a review. *Food Public Health*;4:229–41.

- Saini, J.K., Saini, R. and Tewari, L.,** 2014. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*:1–17.
- Sánchez, Ó.J. and Cardona, C.A.,** 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, **99**, 5270–95.
- Sarıçiçek, B.Z. and Kılıç, U.,** 2002. Üzüm Cibresinin in situ Rumen Parçalanabilirliğinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Dergisi*, **33 (3)**, 289–292.
- Sarris, D. and Papanikolaou, S.,** 2016. Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and Technologies. *Eng Life Sci*, **16(4)**, 307–29.
- Schacht, C., Zetzl, C., Brunner, G.,** 2008. From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. *J. Supercrit. Fluids* **46**, 299–321.
- Shafizadeh, F. and Bradbury, A. G. W.,** 1979. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *J. Appl. Polym. Sci*, **23**, 1431– 1442.
- Solomon, D.B., Barnes, J.R. and Halvorsen, K.E.,** 2007. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass- Bioenergy*; **31**, 416–25.
- Stewart, G.G. and Russell, I.,**1987. Biochemistry and genetics of carbohydrate utilization by industrial yeast strains, *Pure Appl. Chem.*, **59 (11)** 1493-1500.
- Strayer, R.F., Finger, B.W., Alazrki, M.P., Cook, K., Garland, J.L.,** 2002. Recovery of resources for advanced life support space applications: effect of retention time on biodegradation of two crop residues in a fed-batch, continuous stirred tank reaktor, 119-127.
- Sun, Y. and Cheng, J.,** 2002. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. *Bioresource Technology*, **83(1)**, 1-11.
- Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P. and Pandey, A.,** 2016. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products–An overview. *Renewable Energy*; doi:http://dx. doi.org/10.1016/j.renene.
- Sørensen, A., Teller, P.J, Hilstrøm and T, Ahring, B.K.,** 2008. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresour Technol*, **99**, 6602–7.

- Tampier, M., Smith, D., Bibeau, E. and Beauchemin, P.,** 2004. Identifying environmentally preferable uses for biomass resources. Vancouver, Canada: Environmental Services Inc. 132.
- Thatoi, H., Dash, P.K, Mohapatra, S. and Swain, M.R.,** 2014. Bioethanol production from tuber crops using fermentation technology: a review. *Int J Sustain Energy*, 1–26.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi,K.,** 2008. Pretreatmentof lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, **9**, 1621-1651
- URL-1 (2017). <http://konyaseker.com.tr/tr/icerik/detay/2085/biyoetanol-uretim-tesisi>. Konya Şeker Biyoetanol Üretim Tesis. 5 Temmuz 2018.
- URL-2 (2017). <http://www.tezkim.com/>. Tezkim Tarımsal Kimya A.Ş. 5 Temmuz 2018.
- Vessia, O.,** 2005. Biofuels from lignocellulosic material: In the Norwegian context 2010-technology, potential and costs, department of electrical engineering, *Norwegian 124 University of Science and Technology Project report*, Trondheim-Norway.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S.,** 2014. Bioethanol production: feedstock and current technologies. *J Environ Chem Eng*, 2(1), 573–84.
- Wang, M., Han, J., Dunn, J.B., Cai, H.,** 2012. Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. *Environ Res Lett*, 7, 45.
- Wheals, A.E, Basso, L.C, Alves, D.M.G, Amorim, H.V.,** 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol*, 17,482-487.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y.,** 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 1959–1966.
- Wu, Z. and Lee, Y.Y.,** 1997. *Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol*. *Biotechnology Letters*, 19(10), 977-979.
- Zabed, H., Sahu, J., Suely, A., Boyce, A. and Faruq, G.,** 2017. Bioethanol Production from Renewable Sources: Current Perspectives and Technological Progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.

- Zeray C.**, 2010. Renewable energy sources, Master Thesis, Univesity Of Çukurova
Institute Of Natural And Applied Science , Turkey 2010
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D.**, 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(5), 815-827.
- Zwart, R. W. R., Boerrigter, H. and Van der Drift, A.**, 2006. The impact of biomass pretreatment on the feasibility of overseas biomass conversion to fischer-tropsch products. *Energy Fuels*, 20 (5), 2192–2197.

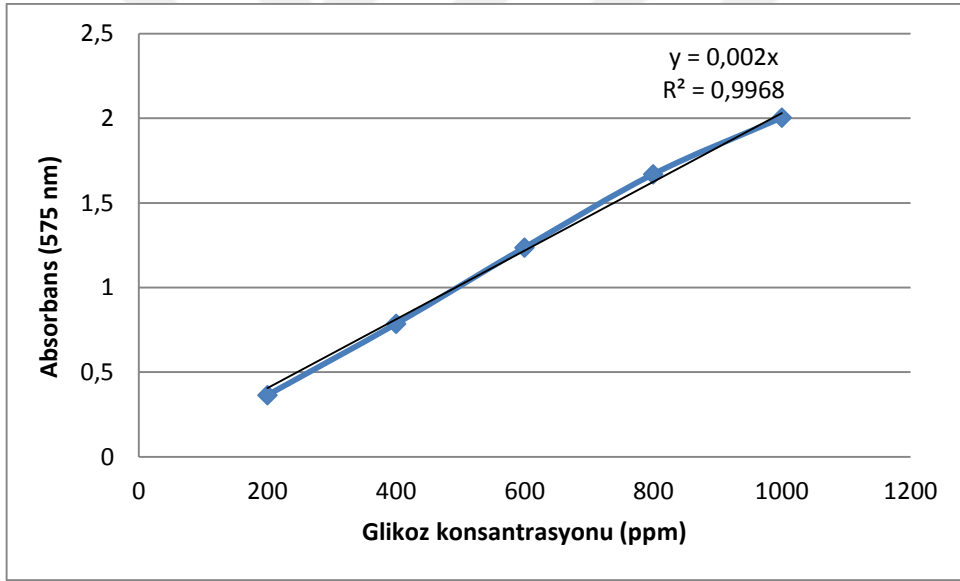


EKLER

EK 1: İndirgen şeker analizlerinde kullanılan standart verileri

Tablo E.1.1: İndirgen şeker konsantrasyonlarını analiz ederken kullanılan glikoz standart verileri ve absorbens değerleri

Standart (ppm)	Absorbans (575 nm)
200	0,365
400	0,786
600	1,237
800	1,67
1000	2,004

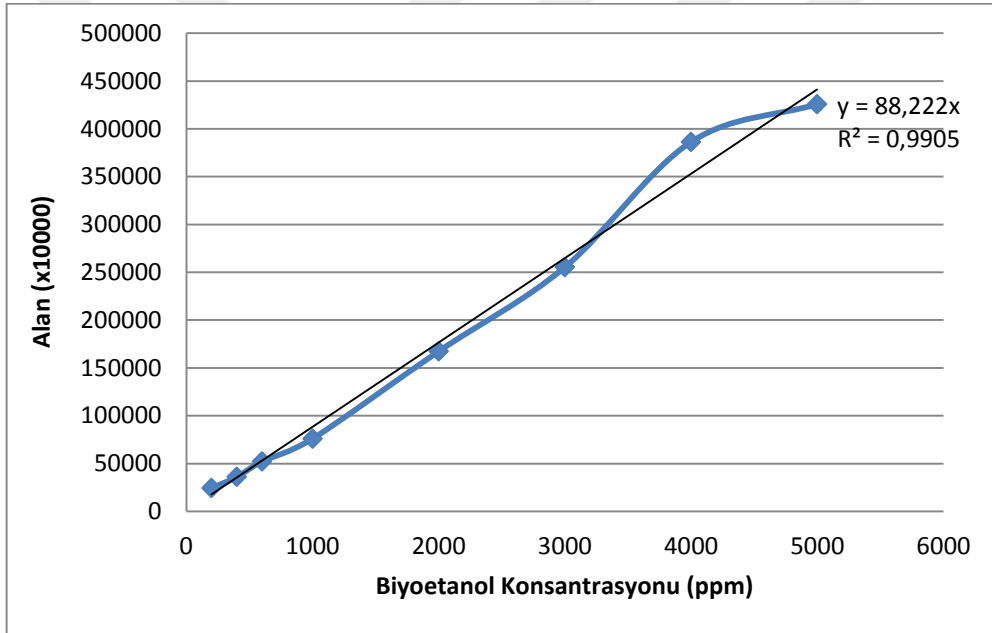


Şekil E.1.1: İndirgen şeker konsantrasyonlarını hesaplamak için kullanılan kalibrasyon grafiği

EK 2: Biyoetanol analizinde kullanılan standartlara ait veriler.

Tablo E.2.1: Alkol konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan standartlar ve pik alanları.

Standartlar (ppm)	Pik Alanları
200	24412,6
400	35985,8
600	52202,3
1000	75982,1
2000	167360,7
3000	255339,3
4000	386303,6
5000	425810,6



Şekil E.2.1: Biyoetanol konsantrasyonu analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eğrinin denklemi.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğba YAVUZ

Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
23200 ELAZIĞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 25.06.1991

Medeni Durum: Bekâr

Yabancı Dil: İngilizce

Elektronik posta: ty.yavuz1@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2015-2018: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

2016-2018: Fırat Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Fizyoterapi Bölümü

2011-2015: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü

2006-2010: Kocasinan Lisesi, Sayısal Bilimler

İŞ TECRÜBESİ

Staj, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, 2013

Staj, İZAYDAŞ, 2014