

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FARKLI MİKROORGANİZMALAR
KULLANILARAK ÇAY ATIKLARINDAN
BİYOETANOL ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Ahmet YAZICIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER

ELAZIĞ -2016

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI MİKROORGANİZMALAR KULLANILARAK ÇAY ATIKLARINDAN
BİYOETANOL ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet YAZICIOĞLU

(131132101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 12 Temmuz 2016

Tezin Savunulduğu Tarih: 28 Temmuz 2016

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER (F.Ü.) 
Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI (F.Ü.) 
Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL (Kırıkkale Ü.) 

TEMMUZ-2016

ÖNSÖZ

Bu tez konusu TUBİTAK tarafından 2210-C programı ile desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar FÜBAP M.F.14.35 nolu proje çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmalarım boyunca değerli fikirleri, sağladığı bilimsel katkı, titizlik, sıra dışı sabır ve anlayışı için danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER'e en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımın istatistiksel analizlerinde yol gösteren Sayın Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI'na ve laboratuvar kısmında yardımını hiç esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Serhat ELÇİÇEK teşekkürü ödenemeyecek bir borç bilirim. Deneysel çalışmalarım süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. M. Ali UYGUT ve Arş. Gör. Ahmet DÜZEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi gölgesini hep hissettiğim Babam ve bana bilimi henüz çocukken aşılayan sevgili Annem'e çok teşekkür ederim.

**Ahmet YAZICIOĞLU
ELAZIĞ-2016**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
EKLER LİSTESİ.....	XII
KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Dünya Enerji İhtiyacı	2
2.2. Yenilenebilir Enerji Kaynakları	3
2.2.1. Güneş Enerjisi	3
2.2.2. Rüzgâr Enerjisi.....	3
2.2.3. Jeotermal Enerji	3
2.2.4. Hidroelektrik Enerji	3
2.2.5. Biyokütle Enerjisi	4
2.3. Biyoyakıtlar ve Tarihçesi	4
2.4. Biyoetanol	5
2.4.1. Biyoetanolün Tarihi ve Günümüzdeki Durumu	7
2.4.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammadde Kaynakları.....	8
2.4.2.1. Sakkaroz İçerikli Kaynaklar.....	8
2.4.2.2. Nişasta İçerikli Kaynaklar.....	8
2.4.2.3. Lignoselülozik Kaynaklar	9
2.5. Lignoselülozik Materyallerin Yapısı	9
2.5.1. Lignoselülozik Materyallere Uygulanan Ön İşlemler.....	11
2.5.1.1. Fiziksel Ön İşlemler	12
2.5.1.1.1. Mekanik Öğütme	12
2.5.1.1.2. Piroлиз	12
2.5.1.1.3. Mikrodalga ve Elektron Demeti	13
2.5.1.1.4. Ultrasonik Uygulama.....	13

2.5.1.2.	Fizikokimyasal Ön İşlemler	13
2.5.1.2.1.	Buhar Patlaması (Oto-hidroliz)	13
2.5.1.2.2.	Sıcak Su Ekstraksiyon	14
2.5.1.2.3.	Amonyak Fiber Patlaması (AFEX)	14
2.5.1.3.	Kimyasal Ön İşlemler	15
2.5.1.3.1.	Asidik Ön İşlem	15
2.5.1.3.2.	Alkali Ön İşlem	15
2.5.1.3.3.	Organik Çözücü Kullanımı	16
2.5.1.3.4.	Ozonoliz	16
2.5.1.4.	Biyolojik Ön İşlemler	16
2.6.	Lignoselülozik Materyallere Uygulanan Hidroliz Yöntemleri	17
2.6.1.	Kimyasal Hidroliz	17
2.6.2.	Enzimatik Hidroliz	18
2.7.	Fermantasyon Teknikleri	19
2.7.1.	Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon (SHF)	19
2.7.2.	Eşzamanlı Sakkarafikasyon ve Fermantasyon (SSF)	20
2.7.3.	Eşzamanlı Sakkarafikasyon ve Ko-Fermantasyon (SSCF)	20
2.7.4.	Katı Üzerinde Proses (CBP)	21
2.8.	Biyoetanolün Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri	21
2.9.	Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	21
2.10.	Çay Bitkisi (<i>Camellia sinensis</i>)	22
2.11.	Literatür Özeti	23
3.	MATERYAL VE METOT	26
3.1.	Materyal	26
3.1.1.	Çay Atıkları	26
3.1.2.	Mikroorganizmalar	26
3.2.	Metot	28
3.2.1.	Çay Atığının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi	28
3.2.2.	Çay Atığına Uygulanan İşlemler	29
3.2.3.	Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu	31
3.2.4.	Enzimatik Hidroliz	32
3.2.5.	Fermantasyon	32
3.2.6.	<i>E.coli</i> KO11 ile Optimum Koşullarda Fermantasyon	33

4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1.	Çay Örneklerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36
4.2.	Çay Atığına Uygulanan Ön İşlemleri Etkileyen Parametreler.....	37
4.2.1.	Asidik ve Alkali Hidroliz Sonuçları.....	37
4.2.2.	Seyreltik H ₂ SO ₄ Ön İşlemi İçin Optimizasyonu Çalışması	39
4.2.2.1.	Sıcaklığın Etkisi	41
4.2.2.2.	Sürenin Etkisi.....	43
4.2.2.3.	Çay Konsantrasyonunun Etkisi.....	44
4.2.2.4.	Asit Konsantrasyonunun Etkisi.....	45
4.2.2.5.	Partikül Boyutunun Etkisi.....	46
4.2.2.6.	Seyreltik H ₂ SO ₄ ile Optimizasyon ve Doğrulama Deneyi Sonuçları	48
4.2.3.	Farklı Çay Örneklerinin Seyreltik H ₂ SO ₄ ile Hidrolizi.....	49
4.2.4.	Farklı Çay Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi	50
4.2.5.	Kimyasal Detoksifikasyon	51
4.3.	Fermantasyonla Biyoetanol Üretim Deneyleri	52
4.3.1.	Farklı Mikroorganizmaların Biyoetanol Üretim Performansı	52
4.3.2.	Detoksifiye Hidrolizatta <i>S. cerevisiae</i> ile Fermantasyon	55
4.3.3.	Asidik+Enzimatik Hidroliz Sonrası <i>E.coli</i> KO11 ile Fermantasyon	57
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
	KAYNAKLAR	62
	EKLER.....	71
	ÖZGEÇMİŞ.....	79

ÖZET

Bu çalışmada, substrat kaynağı olarak çay atıkları kullanılarak farklı mikroorganizmalar ile biyoetanol üretimi incelenmiştir. Çay atıklarına asidik, bazik ve enzimatik ön işlem teknikleri uygulanarak holoselüloz (selüloz+hemiselüloz) yapıdan indirgen şekerler elde edilmiştir. Seyreltik asit hidroliz deneylerinde sıcaklık, süre, katı konsantrasyonu, asit konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çay atığının seyreltik sülfürik asit ile hidroliz edilmesinde optimum koşullar sıcaklık 120 °C, süre 130 dk., çay konsantrasyonu 55 g/L, asit konsantrasyonu % 1,15 (v/v) ve geometrik ortalama partikül boyutu 840 µ olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen hidrolizde holoselüloz yapıda bulunan şekerlerin % 38'i hidrolizat ortamına alınmıştır. Fermantasyon çalışmaları 250 mL'lik erlenlerde 100 mL çalışma hacminde oksijensiz koşullar sağlanarak kesikli olarak yürütülmüştür. Bu koşullarda farklı mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonda hidrolizat ortamında bulunan 20 g/L indirgen şekerden *E.coli* KO11 ile 5,1 g/L ve *S. cerevisiae* ile 3 g/L biyoetanol üretim verimi elde edilmiştir. Ayrıca tez çalışmalarında fabrika atığı, yeşil çay ve paket çay olmak üzere farklı çayların da hidroliz ve biyoetanol üretim verimleri incelenerek atık çay ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyoetanol, Çay atıkları, *E.coli* KO11, *S. cerevisiae*, Optimizasyon

SUMMARY

INVESTIGATION OF BIOETHANOL PRODUCTION FROM TEA WASTES BY USING DIFFERENT MICROORGANISMS

In this study, bioethanol production using tea wastes as a substrate source has been investigated by different microorganisms. The reducing sugars in holocelulose structure were obtained by applying acidic, basic and enzymatic pre-treatment techniques to the tea wastes. In dilute acid hydrolysis experiments, the parameters of temperature, time, solid concentration, acid concentration, and particle size have been optimized. According to the results obtained from the hydrolysis experiments by dilute sulphuric acid, the optimum conditions were determined as the pre-treatment time of 130 min., tea concentration of 55 g / L, acid concentration of 1,15 % (v / v), the geometric mean particle size of 840 μ and at the temperature of 120 °C. In the hydrolysis carried out at the optimum conditions, % 35 of the sugar with holocelulose (cellulose+hemicellulose) structure was passed to the hydrolysate media. The fermentation experiments were performed as batch and by supplying anaerobic conditions. The working volume was 100 mL in the 250 mL volumetric flasks. As a result of the fermentation experiments, production yields values for *E. coli* KO11 and *S. cerevisiae* were obtained as 5,1 g/L and 3 g/L from 20 g/L reducing sugar, respectively. Furthermore, in this thesis, the hydrolysis and bioethanol production yields of another tea samples such as factory waste, green tea and packets were also investigated and compared with the tea waste used.

Key words: Bioethanol, Tea wastes, *E.coli* KO11, *S. cerevisiae*, Optimization

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1: Biyoetanol ve benzinin kimyasal, fiziksel ve termal bazı özellikleri.....	6
Tablo 2.2: Çay yapraklarının elementel içeriği	22
Tablo 3.1: LB ve LB-Agar besi ortamlarının içerikleri.	26
Tablo 3.2: YPD ve YPD-Agar besi ortamlarının içerikleri.	27
Tablo 3.3: Elemede kullanılan eleklerin gözenek boyutları, mesh numaraları ve G.O.P.B değerleri.....	29
Tablo 3.4: Ön işlem optimizasyonunda incelenen parametreler ve çalışma aralıkları.	32
Tablo 3.5: Biyoetanol üretiminde hidrolizata eklenen besi ortamı içerikleri ve fiziksel koşullar.....	33
Tablo 3.7: DNS çözeltisinin içeriği.	34
Tablo 4.1: Çay atığının bazı özellikleri.	36
Tablo 4.2: Farklı kimyasalların hidroliz performanslarının karşılaştırılması.	39
Tablo 4.3: Model uygunluğunun test edilmesinde kullanılan istatistik değerleri.....	39
Tablo 4.4: İkinci dereceden (kuadratik) cevap yüzey modelin ANOVA sonuçları.	40
Tablo 4.5: Hidroliz veriminin bağımsız değişkenlere göre oluşturulmuş optimizasyon sonuçları.	48
Tablo 4.6: Doğrulama deneyi sonuçları.....	48
Tablo 4.7: Farklı çay örneklerinin belirlenen optimum koşullarda asidik hidrolizi sonucu elde edilen indirgen şeker miktarları.	49
Tablo 4.8: Asidik hidroliz sonrası yıkanmamış örneklerin enzimatik hidrolizi sonrası elde edilen toplam hidrolizatın indirgen şeker miktarları.	50
Tablo 4.9: Atık çay örneğinin farklı konsantrasyondaki asit çözeltilerinde hidroliz edilmesi sonucunda elde edilen detoksifikasyon değerleri.	51
Tablo 4.10: Mikroorganizmaların kendi besi ortamlarında fermantasyon sonucu elde edilen İŞ ve alkol değerleri.	52
Tablo 4.11: Mikroorganizmaların atık çay hidrolizat (A.H.) ortamlarında fermantasyon sonucu elde edilen İŞ ve alkol değerleri.	53
Tablo 4.12: <i>E.coli</i> KO11 ile optimum koşullarda fermantasyon için parametreler ve oranları.	54
Tablo 4.13: Fermantasyon sonu bazı üretim verimliliği parametreleri	56

Tablo 4.14: <i>E.coli</i> KO11 ile evsel ve fabrika atığı ortamlarında fermantasyon sonucu elde edilen İŞ ve alkol ve mikroorganizma sayısı değerleri.	57
Tablo 4.15: Farklı mikroorganizmaların farklı besi ortamlarında fermantasyonu sonucunda elde edilen verim değerleri.	59
Tablo 4.16: <i>E.coli</i> KO11 ile biyoetanol üretimi yapılan bazı çalışmalar.	60
Tablo 4.17: Bazı hammaddelerin kimyasal bileşimi ile teorik ve deneysel verim değerleri (Chan ve ark., 2007).	60
Tablo E1: Design Expert® 8.0 programı tarafından önerilen cevap yüzey tasarımı deney setleri	71
Tablo E2.1: Atık çay örneklerinin detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.	73
Tablo E2.2: Yeşil çay örneklerinin detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.	74
Tablo E2.3: Paket çay örneklerinin detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.	75
Tablo E3.1: Farklı çay örneklerinin evsel atık için belirlenen optimum koşullarda uygulanan Asidik Hidroliz (A.H.) işlemi sonucu elde edilen veriler.	76
Tablo E3.2: Farklı çay örneklerinin A.H. sonrası yıkanmadan uygulanan Enzimatik Hidroliz (E.H.) işlemi sonucu elde edilen veriler.	76
Tablo E3.3: Farklı çay örneklerinin asidik ve enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen Toplam Hidrolizat (T.H.) verileri.	76
Tablo E3.4: Farklı çay örneklerinin T.H. sonunda filtre kâğıdına konularak kurutulması sonucu elde edilen ağırlık verileri.	76
Tablo E.4.18: İndirgen şeker konsantrasyonunu analiz etmede kullanılan glikoz standartları ve absorbanları.	77
Tablo E.5.19: Biyoetanol konsantrasyonunu analiz etmede kullanılan standartlar ve pik alanları.	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: 2013 yılında enerji kaynaklarının dağılım oranları	2
Şekil 2.2: Biyoyakıtların kullanım şekline ve türüne göre sınıflandırılması	5
Şekil 2.3: Dünya geneli biyoetanol üretiminde ülkelerin yıllara göre dağılımı.....	7
Şekil 2.4: Lignoselülozik yapının bileşenleri.....	10
Şekil 2.5: Selüloz ve hemiselüloz hidrolizi.....	18
Şekil 3.1: Oksijensiz fermantasyonun gerçekleştirildiği erlen sistemi.	33
Şekil 4.1: Farklı asit ve baz çözeltileriyle gerçekleştirilen ön işlemler için çay konsantrasyonu-yüzde verim grafiği.....	38
Şekil 4.2. a) Optimum deney şartlarında sıcaklık ve asit konsantrasyonunun etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Optimum deney şartlarında sıcaklık ve partikül büyüklüğü etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., c) Optimum deney şartlarında sıcaklık ve süre etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., d) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla sıcaklığın hidroliz verimine tek başına etkisi.	42
Şekil 4.3. a) Optimum deney şartlarında süre ve çay miktarı etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Optimum deney şartlarında süre ve asit konsantrasyonu etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., c) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla sürenin hidroliz verimine tek başına etkisi.	43
Şekil 4.4 a) Optimum deney şartlarında çay miktarı ve sıcaklık etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla katı miktarının hidroliz verimine tek başına etkisi.	44
Şekil 4.5. a) Optimum deney şartlarında asit konsantrasyonu ve çay konsantrasyonu etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla asit konsantrasyonunun hidroliz verimine tek başına etkisi.	45
Şekil 4.6 a) Optimum deney şartlarında partikül boyutu ve çay konsantrasyonu etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Optimum deney şartlarında partikül boyutu ve süre etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., c) Optimum deney şartlarında partikül boyutu ve sıcaklık etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., d) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla partikül boyutunun hidroliz verimine tek başına etkisi.	47

Şekil 4.7: Mikroorganizmaların yapay besi ortamında ürettiği biyoetanol konsantrasyonunun zamanla dağılımı.	53
Şekil 4.8: Mikroorganizmaların hidrolizat ortamında ürettiği biyoetanol konsantrasyonunun zamanla değişimi.	54
Şekil 4.9: Biyoetanol konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	55
Şekil 4.10: Evsel ve fabrika atığı çayda mL'ye düşen <i>E.coli</i> KO11 konsantrasyonları.	58
Şekil E.4.1.6: İndirgen şeker konsantrasyonu hesaplamada kullanılan kalibrasyon grafiği ve eğrinin denklemi.....	77
Şekil E.5.1.7: Biyoetanol konsantrasyonu analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eğrinin denklemi.	78



EKLER LİSTESİ

Sayfa No

EK 1: DesignExpert® 8 programı tarafından önerilen cevap yüzey tasarımı deney setleri	71
EK 2: Çay örneklerinin kimyasal detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.	73
EK 3: Çay örneklerinin asidik ve enzimatik olarak hidroliz edilmesi sonucu elde edilen deneysel veriler.	76
EK 4: İndirgen şeker analizinde kullanılan standartlara ait veriler.....	77
EK 5: Biyoetanol analizinde kullanılan standartlara ait veriler.	78



KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltma	Açıklama
MTEP	Milyar Ton Eşdeğer Petrol
MPa	Mega paskal
AFEX	Amonyak fiber patlaması
SHF	Ayrı hidroliz ve fermantasyon
SSF	Eşzamanlı sakarifikasyon ve fermantasyon
SSCF	Eşzamanlı sakarifikasyon ve kofermantasyon
CBP	Katı üzerinde biyoproses
EMP	Emden-Mayerhof-Parnas
ED	Entner-Doudorof
YPD	Yeast-Peptide-Dextrose
LB	Luria-Bertani
pH	Power of Hydrogen
ppm	Milyonda kısım
% v/v	Hacimce yüzde
l	litre
PST	Potasyum sodyum tartarat
DNS	Dinitro salisilik asit
TK	Toplam karbohidrat
İŞ	İndirgen şeker
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
M.o.	Mikroorganizma
A.H.	Asidik hidrolizat
E.H.	Enzimatik hidrolizat
T.H.	Toplam hidrolizat
$Y_{p/s}$	Verim (elde edilen ürün/harcanan substrat)
G.O.P.B	Geometrik ortalama partikül boyutu

1.GİRİŞ

İnsan nüfusunun her geçen gün artmasıyla enerjiye olan bağımlılık da artmaktadır. Enerjinin büyük bir kısmı ise yenilenebilir olmayan fosil kaynaklı yakıtlardan sağlanmaktadır. Ancak fosil kaynaklı yakıtların gelecekte tükeneceği yönündeki görüşler herkes tarafından kabul edilmektedir. Diğer taraftan, fosil kaynaklı yakıtların kullanılmasıyla doğaya karbondioksit ve metan gibi çeşitli sera gazları salınmaktadır. Bu gazlar dünya üzerinde birikerek hem ozon tabakasına zarar vermekte hem de küresel ısınmayı tetikleyerek dünyamızı tehdit etmektedir.

Fosil kaynaklı yakıtların kritik durumu araştırmacıları çeşitli yenilenebilir enerji kaynakları aramaya yönlendirmiştir. Biyoetanol iyi bir alternatif yenilenebilir enerji kaynağı olarak görülmektedir. Biyoetanol üretiminde Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya ilk sıralarda yer almaktadır ve genellikle sakkaroz ve nişasta bazlı materyaller kullanılmaktadır. Bu materyaller, birincil gıda kaynakları olduklarından dolayı, biyoetanol üretiminde kullanımı sınırlıdır. Örneğin yaygınlaşan biyoetanol üretim tesislerinin birçok tarımsal alanda yalnız biyoetanol üretimi için kullanılması, mısır fiyatlarını zaman zaman iki katına çıkarmıştır. Son zamanlarda araştırmacılar, direkt gıda olarak tüketilemeyen, selüloz ve hemiselüloz içeren lignoselülozik materyalleri kullanarak biyoetanol üretimi üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Doğada çok miktarda ve sürekli olarak bulunması buna ek olarak oldukça ucuz olması bu materyalleri cazip kılmıştır.

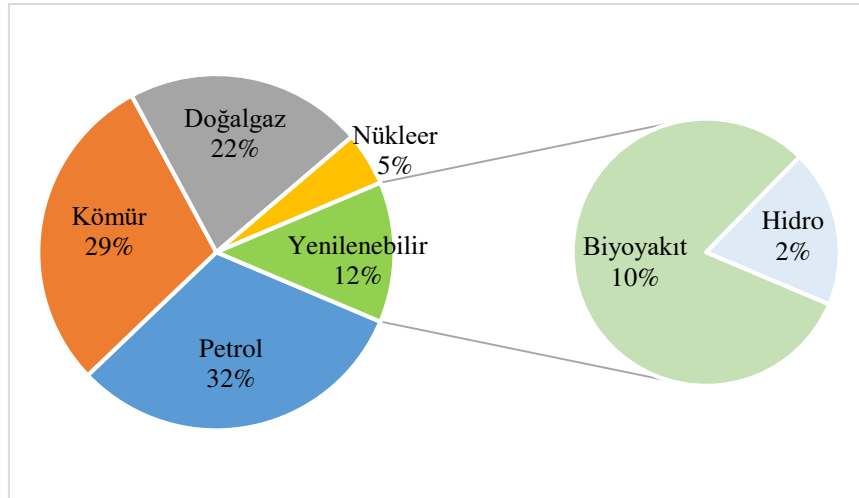
Bu tez çalışmasında ülkemizde oldukça önemli bir miktarda üretim ve tüketimi olan çay bitkisinin atıklarından biyoetanol üretiminde substrat olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dünya Enerji İhtiyacı

Dünya enerji ihtiyacı 2013 yılında yaklaşık 13,5 Milyar Ton Eşdeğer Petrol (MTEP) seviyesindeyken 2035 yılında 17,2 MTEP'ye ulaşması beklenmektedir (IEA 2015). Enerji ihtiyacını karşılamada petrol, kömür ve doğal gaz gibi çeşitli kaynaklardan faydalanılmaktadır. Bu kaynakların dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir. Petrol, başta ulaştırma sektörü olmak üzere dünya enerji tüketimi içinde en büyük paya sahip enerji kaynağıdır. 2013 yılı sonu itibarı ile dünya enerji talebinin yaklaşık % 31'ini petrol, % 29'unu kömür ve % 21'ini doğal gaz karşılamıştır (IEA, 2015). Bu veriler göz önüne alındığında dünya enerji ihtiyacının yaklaşık % 81'ini fosil kaynaklı yakıtlardan sağlandığı görülmektedir. Ancak her geçen yıl fosil kaynaklar tükenmektedir. Buna karşılık enerjiye olan ihtiyaç ve petrol tüketimi ise artmaktadır. Önümüzdeki yıllarda petrol fiyatlarının artacağı gerçeği artık rahatlıkla tahmin edilebilmektedir (Chiaramonti ve ark., 2012; Sarkar ve ark., 2012).

Fosil kaynaklı yakıtların azalması ve buna bağlı olarak fiyatlarının artması diğer taraftan doğaya verdiği zarar da göz önüne alındığında alternatif enerji arayışlarına duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bu amaçla insanlar güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, biyokütle enerjisi ve hidrotermal enerjiler gibi çeşitli alternatif, yenilenebilir ve zararsız enerji kaynaklarına yönelmektedir ve bu konuda yapılan çalışma sayısı da kayda değer bir biçimde artmaktadır. Enerji kaynakları bazında talep artış oranlarının 2035 yılına kadar petrolde % 13, kömürde % 17, doğal gazda % 48, nükleerde % 66, yenilenebilir kaynaklarda ise % 77 olacağı öngörülmektedir (Limayem ve Ricke, 2012).



Şekil 2.1: 2013 yılında enerji kaynaklarının dağılım oranları, (IEA, 2015)

2.2. Yenilenebilir Enerji Kaynakları

Yenilenebilir enerji kaynakları temelde güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, jeotermal enerji, hidroelektrik enerji ve biyokütle enerjisi gibi doğal kaynaklardan elde edilen enerji türleridir. Bu kaynaklar fosil yakıtlara göre atmosfere sera gazları vermezler ve çevreye çok daha az zarar verirler (Johansson, 1993; Twidell ve Weir, 2015).

2.2.1. Güneş Enerjisi

Güneş çekirdeğinde füzyon süreci sonucunda oluşan yüksek enerjili ışınların yeryüzüne ulaşması ile yeryüzü ısınmakta ve ışık ile bitkiler fotosentez yapmaktadır. Bu ışınlardan faydalanmak için ise güneş enerjisi panelleri geliştirilmiştir. Güneş enerjisi panelleri içlerinde yer alan koyu renkli yüzeyleri yardımıyla enerjiyi soğururlar. Daha sonra elde edilen bu ısı, güneş enerjisi paneli tarafından suya aktarılarak kullanılabilir sıcak su elde edilmiş olur. Ayrıca panellerde kullanılan fotovoltaik hücreler ile elektrik de üretilmektedir (Twidell ve Weir, 2015).

2.2.2. Rüzgâr Enerjisi

Rüzgâr; birbirine komşu bulunan iki basınç bölgesi arasındaki basınç farklarından dolayı meydana gelen ve yüksek basınç merkezinden alçak basınç merkezine doğru hareket eden hava akımıdır. Bu hareketi sağlayan enerji, rüzgâr türbinleri sayesinde mekanik veya elektrik enerjisine dönüştürülebilmektedir (Johansson, 1993; Twidell ve Weir, 2015).

2.2.3. Jeotermal Enerji

Jeotermal enerji yer kabuğunun derinliklerinde sıcak bölgelerde birikmiş sıcak su, buhar ve gazların yeryüzüne ulaşmasıyla elde edilir. Geleneksel olarak sera, ısıtma, sağlık ve pişirme alanında kullanılsa da artık elektrik üretiminde de çeşitli türbin sistemleri kullanılarak buhar ya da sıvının taşıdığı enerji depolanabilmektedir (Fridleifsson, 2001; Armstead, 1978).

2.2.4. Hidroelektrik Enerji

Deniz, göl veya nehirlerdeki sular güneş ısıısıyla buharlaşarak dağ yamaçları veya yükseklerle çıkmaktadır ve sonra yoğunlaşarak yağmur veya kar halinde yeryüzüne dönmektedir. Bu çevrim sırasında akan su yüksek bir noktadan düşürüldüğünde potansiyel

enerjisi kinetik enerjiye dönüştürülerek enerjisi depolanabilmektedir. Suyun akış veya düşüş hızı su gücünü etkilemektedir (Johansson, 1993; Twidell ve Weir, 2015).

2.2.5. Biyokütle Enerjisi

Biyokütle kelime anlamı olarak canlı organizma ya da yakın bir zamana kadar yaşamış olan organizma demektir. Biyokütle için ağaçlar ve orman ürünleri, mısır, buğday gibi özel olarak yetiştirilen tarla ürünleri, otlar, yosunlar, denizdeki algler, hayvan dışkıları, gübre ve sanayi atıkları, evlerden atılan tüm organik çöpler (meyve ve sebze artıkları) kaynak oluşturmaktadır. Bitkisel kaynaklı biyokütlenin var olan enerjisinin kaynağı temelde güneşten gelen ışınlardaki enerjiyi fotosentez yaparak depolamasıdır. İnsan ve hayvanlar ise bu enerjiden faydalanmak amacıyla bitkileri gıda olarak tüketerek, yakıp ısınarak ve farklı işlemlere tabi tutarak çeşitli yakıtlar elde ederek biyokütleleri kullanmaktadır. Biyokütle üretilirken metabolik süreçte meydana gelen $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ tepkimesi ile havada serbest halde bulunan atmosferik karbon biyokütledeki karbohidrat yapıya katılır. Biyokütlenin içerisindeki karbon havadan fotosentez ile elde edildiği için biyokütlenin yakılması ya da parçalanması havada net karbondioksit artışına neden olmaz. Bununla beraber enerji ihtiyacının artması, fosil yakıtlar yüzünden atmosferde CO_2 birikmesi, ekonomik kalkınma, yerli enerji üretimi ve fosil yakıtların tükenmesi gibi birçok faktör biyokütle esaslı enerjilerin tercih edilmesinin sebepleri arasındadır (Khesghi, Prince, ve Marland, 2000).

2.3. Biyoyakıtlar ve Tarihçesi

Tanım olarak; içeriğinin hacimce % 80'ini son on yıl içerisinde toplayan canlı organizmalardan elde edilmiş her türlü yakıtı biyoyakıt denmektedir. Biyokütle materyalleri çeşitli çevrim teknikleriyle işlenerek katı, sıvı ve gaz yakıtlara dönüştürülebilmektedir. Çevrim sonunda biyodizel, biyogaz, biyoetanol, pirolitik gaz gibi ana ürün olan yakıtların yanı sıra, gübre, hidrojen gibi yan ürünler de elde edilebilmektedir (Khesghi, Prince, ve Marland, 2000). Biyoyakıtların kullanımı esasen oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. İnsanoğlu odun ve odun ürünlerini tarihin pek çok devrinde ısınma, pişirme ve sağlık amacıyla kullanmıştır (Junginger, Goh, ve Faaij, 2013). Mısırlılar hint tohumu yağını aydınlatma yakıtı olarak kullanmışlardır. Çam ormanlarının bol olduğu Norveç, Finlandiya gibi kuzey ülkelerinde çam odunundan çırallar yakın zamanlara kadar kullanılmıştır (Larousse, 1986). İnce dalların zift ya da balmumuna batırılmasıyla hazırlanan meşaleler de

çok kullanılan ilkel aydınlatma araçlarıydı. Meşalelerden sonra insanlar ateşe damlayan yağların alev aldığından hareketle daha kullanışlı bir ışık kaynağı olan kandili kullanmışlardır. 1928 yılında Fransa’da en az 50 bin yıllık bir taş kandil, Irak’ta da 10 bin yıllık pişmiş topraktan kandiller bulunmuştur (Songstad ve ark., 2009; Britannica, 1992). Ülkemizde halen kırsal kesimlerde tezek yakmak suretiyle ısınma sağlanabilmektedir.

Günümüzde kullanım alanı bulan biyoyakıtları çeşitli şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Biyokütle kaynağından alınıp direkt olarak kullanılıyorsa birincil biyoyakıt, çeşitli dönüşüm teknolojileri kullanılarak katı, sıvı ya da gaz yakıtlar elde ediliyor ise ikincil biyoyakıt olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca biyoyakıtları türüne göre de katı, sıvı ve gaz yakıtlar olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2).

Birincil Biyoyakıtlar	İkincil Biyoyakıtlar	Katı Yakıtlar	Sıvı Yakıtlar	Gaz Yakıtlar
Odun	Odun kömürü	Odun kömürü	Biyoetanol	Biyohidrojen
Odun talaşı	Biyoetanol	Biyopellet	Biyodizel	Biyogaz
Hasat artıkları	Biyodizel	Biyobiriket	Bitkisel yağ	
	Biyogaz		Biometanol	

Şekil 2.2: Biyoyakıtların kullanım şekline ve türüne göre sınıflandırılması (Bengisu, 2014).

2.4. Biyoetanol

Biyoetanol bitkisel kaynaklı maddelerde var olan şekerin kullanılarak çeşitli mikroorganizmaların fermantasyonla ürettiği bir çeşit alkoldür. Kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından biyoetanol ile sentetik etil alkol arasında bir fark bulunmamaktadır. Sentetik etil alkol, ham petrol, doğal gaz veya kömürden petrokimyasal olarak etilenin hidrasyonu yoluyla elde edilmektedir (Melikoğlu ve Albostan, 2011). Biyoetanol fosil yakıtlardan farklı olarak şeker kamışı, melas, mısır, buğday, sorgum vb. tahıllar ve lignoselülozik yapıli hammaddelerden de fermantasyon yoluyla üretilen ve tek başına kullanılabildiği gibi benzine farklı oranlarda karıştırılarak da kullanılabilen alternatif bir biyoyakıttır. İlk olarak 1897 yılında Nikolas Otto tarafından icat edilen yanmalı motorda kullanılmaya başlanan etanol, sonraları "etanol içeren yakıt" karışımları şeklinde benzine ihtiyaç duyan araçlar ve motorlarda başarıyla kullanılmıştır. İçten yanmalı motorlarda herhangi bir modifikasyon olmadan benzine hacimce % 10 (E10) karıştırılarak

kullanılabilmektedir. Ayrıca motorda çeşitli modifikasyonlar yaparak daha yüksek oranlarda (E50, E85) biyoetanol karışımları da yakıt olarak kullanılabilmektedir. Biyoetanol ve benzinin kimyasal, fiziksel ve termal bazı özellikleri Tablo 2.1’de verilmiştir.

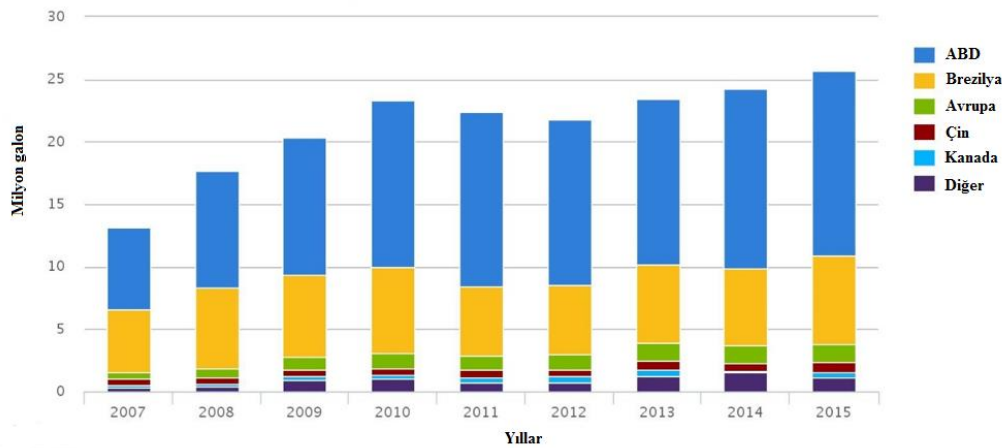
Biyoetanolün yakıtlara katılmasına neden olarak bir takım avantajları mevcuttur. Biyoetanol, mükemmel bir benzin karışım bileşeni olarak yüksek oktan sayısına, yüksek alevlenme hızına ve yüksek buharlaşma ısısına sahiptir. Bu özellikleri, daha kısa yanma süreleri sağlayarak, bu sayede içten yanmalı motorlarda benzine göre daha yüksek verim alınmasını ve bir aracın en iyi performansla yakıt sistemini temiz tutarak çalışmasına yardımcı olur. Ayrıca, % 35 oksijen içeren bir yakıt olduğu için benzinin aksine yanmak için daha az havaya ihtiyaç duymaktadır (Adıgüzel, 2013).

Tablo 2.1: Biyoetanol ve benzinin kimyasal, fiziksel ve termal bazı özellikleri (Ma ve ark., 2009; Torres-Jimenez ve ark., 2011).

Kimyasal özellik	Biyoetanol	Benzin
Kimyasal formül	C ₂ H ₅ OH	(C ₄ -C ₁₂) _n
Moleküler ağırlığı (g/gmol)	46,1	114
Karbon (% ağırlık), C	52	85-88
Hidrojen (% ağırlık), H	13	15-12
Oksijen (% ağırlık), O	35	0
Fiziksel özellik		
Yoğunluk (kg/m ³)	0,789	0,739
Kaynama noktası (°C)	78,37	27-225
Suda çözünürlük (%)	100	<0,01
Viskozite (cp)	1,20	0,56
Termal özellik		
Özgül ısı (kcal/kg°C)	0,6	0,5
Tutuşma sıcaklığı (°C)	422	257
Yanma ısısı (j/g, 25 °C’de)	29676,7	47000
Donma noktası (°C)	-113	-40
Parlama noktası (°C)	14	-45

2.4.1. Biyoetanolün Tarihi ve Günümüzdeki Durumu

Biyoetanol, daha önceleri de kısmen kullanılsa da İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra patlak veren petrol krizinde kendini göstermiştir (Heinberg, 2005). 1975'te Brezilya hükümeti desteğinde şeker kamışından biyoetanol üretim programı başlamıştır. Brezilya'nın biyoetanol üretiminde ilk sıralarda olmasının temelinde bu durum yatmaktadır. Diğer taraftan Amerika Birleşik Devletleri ise 1978'de mısırdan biyoetanol üretimine büyük ölçekli olarak başlamıştır. Bu ülkelerin ardından Kanada, Çin, Fransa, İspanya ve İsveç de biyoetanol üretimine başlamıştır. Dünya genelinde ise 2010 yılında biyoetanolün % 44'ü Kuzey ve Orta Amerika, % 36'sı Güney Amerika, % 14'ü Avrupa, % 5'i Asya ve % 1'i Afrika ve Orta Asya ülkelerinde üretilmektedir. Toplam üretimin % 43' ünü tek başına karşılayan ABD'den sonraki en büyük üretici % 26 ile Brezilya'dır (Şekil 3). Avrupa'da ise Almanya, Fransa ve İspanya en büyük biyoyakıt üreticileri konumundadırlar (Cardona ve Sánchez, 2007; Prasad, Singh, ve Joshi, 2007; Soccol ve ark., 2010). Brezilya yılda yaklaşık 500 milyar ton şeker kamışı üretimi ile dünya genelinde % 30'luk paya sahiptir. Bu üretim rekoltesi şeker kamışı ürünlerini ve artıklarını biyoetanol üretiminde kullanmak için oldukça ekonomik kılmaktadır. Brezilya'da yılda yaklaşık 185 milyon ton şeker kamışı küspesi elde edilmektedir. Avrupa ülkelerinde ise şeker sanayi atığı ve artığı olan pancar melası ve küspe en çok kullanılan hammaddelerdir. Şeker pancarı hemen hemen tüm Avrupa ülkelerinde yetiştirilebilmektedir. Ayrıca buğday samanı da Avrupa'da yılda yaklaşık 130 milyon ton civarında üretilmektedir. ABD ise yılda yaklaşık 4 milyar kilogram mısır ürünleri biyoetanol endüstrisinde kullanmaktadır (Soccol ve ark., 2010; Chiaramonti ve ark., 2012).



Şekil 2.3: Dünya geneli biyoetanol üretiminde ülkelerin yıllara göre dağılımı (RFA, 2016)

2.4.2. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammadde Kaynakları

Biyoetanol üretiminde mikroorganizmaların temel ihtiyacı başta karbon kaynağıdır. Bu amaçla yapısında kayda değer miktarda fermente edilebilir şeker (C) barındıran sakkaroz, nişasta ve selüloz yapıda biyokütleler kullanılmaktadır. Kullanılan hammadde kaynaklarını üç sınıfta toplamak mümkündür (Adıgüzel, 2013; Meral ve Saydan, 2012) :

- i. Sakkaroz içerikli kaynaklar (şeker pancarı, şeker kamışı, sorgum vb.)
- ii. Nişasta içerikli kaynaklar (buğday, mısır, arpa vb.)
- iii. Lignoselülozik kaynaklar (odun, saman, ot vb.)

2.4.2.1. Sakkaroz İçerikli Kaynaklar

Biyoetanol üretiminde hâlihazırda en fazla şeker pancarı ve şeker kamışı ürünleri kullanılmaktadır. Dünya şeker üretiminin 2/3'ünü şeker kamışı, 1/3'ünü ise şeker pancarı oluşturmaktadır (Linoj ve ark., 2006). Şeker kamışının % 27'sini Brezilya, % 18'ini ise Peru üretmekte olup bu iki ülke şeker kamışı üretiminde başı çekmektedir. Üretimde açığa çıkan şeker kamışı küspesinin yaklaşık olarak % 22'si lignin, % 30'u hemiselüloz ve % 38'i ise selülozdan oluşmaktadır (Kim ve Dale, 2004). Dolayısıyla bu ülkeler için şeker kamışı küspesinden biyoetanol üretmek oldukça verimli ve ekonomik olmaktadır. Avrupa ülkelerinde ise daha ılıman coğrafyada olduklarından şeker pancarı ürünleri kullanılmaktadır. Özellikle şeker fabrikası atığı melas, içerdiği yüksek oranda sakkaroz sayesinde biyoetanol üretiminde oldukça uygun bir hammaddedir (Prasad, Singh, ve Joshi, 2007; Balat, Balat, ve Öz, 2008).

2.4.2.2. Nişasta İçerikli Kaynaklar

Kuzey Amerika ve Avrupa'da yetiştirilen mısır ve pirinç ürünleri biyoetanol üretiminde en çok kullanılan hammaddelerdir. Özellikle Amerika'da üretilen biyoetanolün yaklaşık % 90'ı mısır ürünlerinden olmaktadır (Cardona ve Sánchez, 2007). Nişasta D-glikoz birimlerinden oluşmuş karmaşık bir şekerdir dolayısıyla biyoetanol üretiminde kullanılabilmesi için bu karmaşık yapının bozulması gerekmektedir. Nişasta bazlı maddeler fermentasyondan önce enzimatik ya da kimyasal hidroliz işlemine tabi tutularak fermente edilebilir şekerler içeren glikoz şurubu elde edilir. Glikoz içeren bu ortam etanol üreten mikroorganizmalar kullanarak biyoetanol üretiminde kullanılmaktadır.

2.4.2.3. Lignoselülozik Kaynaklar

Lignoselülozik kaynaklar yapısında lignin, selüloz ve hemiselüloz bulunduran, buğday ve mısır çöpü gibi tarımsal atıklar, odun ürünleri ve enerji bitkilerinden oluşan yeryüzünde en çok bulunan materyallerdir. Hemiselülozik ve selülozik kısımlar glikoz, mannoz, galaktoz, ksiloz ve arabinoz gibi monosakkaritlerden oluşmaktadır. Ancak bunların oranı bitki türleri arasında farklı olmakla birlikte ayrıca bitkinin yaşı, hücre tipi ve tek bir bitkinin farklı kısımlarına bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir. Pirinç sapı dünyada en bol bulunan lignoselülozik atıktır. 667,6 milyon ton Asya'da, 37,2 milyon tonu Amerika'da, 20,9 milyon tonu Afrika'da, 3,9 milyon tonu Avrupa'da ve 1,7 milyon tonu ise okyanus ülkelerinde olmak üzere yılda yaklaşık 731 milyon ton atık oluşmaktadır. Pirinç sapının bu miktarı yılda yaklaşık 205 milyar litre biyoetanol üretme potansiyelindedir (Balat, Balat, ve Öz, 2008; Zhang, 2008; Adıgüzel, 2011).

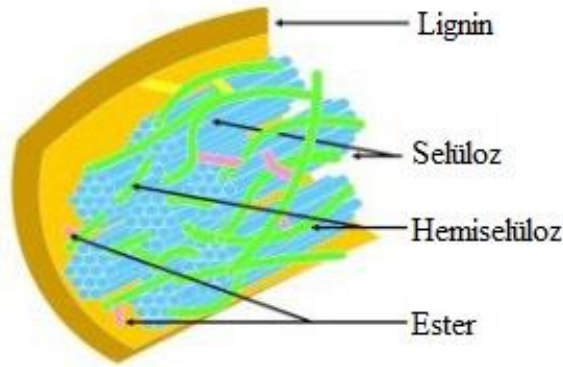
2.5. Lignoselülozik Materyallerin Yapısı

Lignoselülozik maddelerin yapısını lignin, selüloz, hemiselüloz üronik asitler ve asetil gruplar oluşturmaktadır.

Lignin: Polisakkaritlerden sonra hücre çeperinde en fazla miktarda bulunan dallanmış yapıdaki amorf fenolik polimerdir. Bitkilerde, hücre duvarının yapısını oluşturan selüloz ve diğer karbonhidratlarla birlikte güçlü direnç ve dayanıklılığa sahip bir doku meydana getirmektedir. Lignin aromatik yapıda olup, bilinen çözücülerde monomerlerine ayrılması mümkün olmamaktadır. Delignifikasyon olarak bilinen ligninin uzaklaştırılması işlemi sonucunda holoselüloz elde edilmektedir. İdeal bir delignifikasyon ile ligninin tamamen uzaklaştırılması ve polisakkaritler üzerine herhangi bir kimyasal etkinin olmaması sağlanmaktadır. Fizikokimyasal, termokimyasal ve biyolojik olarak kısmi delignifikasyon işlemleri yapılabilirken ligninin tamamen uzaklaştırılmasına yönelik bir yöntem henüz geliştirilememiştir (Fengel ve Wegener, 1984; Financie, Moniruzzaman, ve Uemura, 2016). Mevcut delignifikasyon işlemlerinde holoselüloz yapıda kalan lignin miktarını en az seviyede tutarak, fermente edilebilir şeker kaybının mümkün olan en düşük miktarda olması hedeflenmektedir. (Ayla ve Nimz, 1984).

Selüloz: Kimyasal olarak selüloz β -(1,4) glikoz bağları ile bağlanmış doğal bir polimerdir. İki glikoz molekülünün yan yana ve zıt yönde bir araya gelmesiyle bu yapı oluşmaktadır. Selüloz elementel olarak % 44 C, % 6,2 H ve % 49 O içermektedir. Saf selüloz hidroliz ile yaklaşık % 95 verimle D-glikoza dönüşür. Bu anhidro-glikoz monomerleri, defalarca tekrarlanarak bir zincir molekül meydana getirmekte ve bu birimlerin tekrarlanma sayısı hammaddeye göre değişmektedir. Örneğin odunda 600'den 1000'e, pamuk ipliklerinde ise 3500'e kadar değer alır. Her bir anhidro-glikoz biriminin üç tane hidroksil (OH) grubu bulunmaktadır. Selüloz su ve benzen, alkol, aseton, kloroform gibi organik çözücülerde çözünmezken, bazik bir çözelti olan schweitzer reaktifinde (bakır-II-hidroksit ve derişik amonyum hidroksit karışımı) çözünür (Schweizer ve Würsch, 1991).

Hemiselüloz: Hemiselüloz selülozdan farklı olarak, farklı şeker birimlerinin (pentozlar, heksozlar ve şeker asitleri) farklı şekillerde birleşmesi sonucunda oluşmuş dallı bir heteropolisakkarittir. Selülozda 3500 kadar glikoz molekülü düz zincir şeklinde birleşebilirken hemiselülozda yaklaşık olarak 200 farklı şeker birimi kısa zincirler halinde birleşmektedir. Doğada toplam biyokütlenin % 30-35'ini hemiselülozlar oluşturmaktadır. Hemiselülozun başlıca bileşeni ksiloz olup, iskelet yapısının yaklaşık % 80'i ksiloz ünitelerine bağlı arabinoz veya glukuronik asitten oluşmaktadır. Hemiselüloz hidrolizi ile hammaddenin türüne göre hidrolizat içinde ksiloz, glikoz, arabinoz, galaktoz, ramnoz ve mannoz gibi pentoz ve heksozlar yer alabilmektedir (Carvalho, Duarte, ve Gírio, 2008).



Şekil 2.4: Lignoselülozik yapının bileşenleri, (McIntosh, 2016)

2.5.1. Lignoselülozik Materyallere Uygulanan Ön İşlemler

Lignoselülozik biyokütlenin, lignin içermesi ve kristal yapıda olması hidrolizini engelleyen iki önemli faktördür. Bu nedenle üretimde kullanılacak olan materyallerin fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve/veya biyolojik çeşitli yöntemler kullanılarak kristal yapısının bozulması ve ligninin uzaklaştırılması gerekmektedir. Böylece yapısı bozulan materyalden fermente edilebilir şekerlerin hidrolizi kolaylaşmaktadır (Balat, Balat, ve Öz, 2008; Taherzadeh ve Karimi, 2008; Chiaramonti ve ark., 2012).

Etkili ve ekonomik bir ön işlemden aşağıdaki özellikler olmalıdır;

- ✓ Enzimatik hidroliz için selülozun fermente edilebilir şekerlerden başka bileşiklere dönüşmesine imkân vermemelidir.
- ✓ Hemiselüloz ve selülozun bozunmasına neden olmamalıdır.
- ✓ Hidrolitik enzim ve fermantasyon mikroorganizmaları için oluşması muhtemel inhibitör karakterli bileşiklerin oluşumu minimum yada hiç olamamalıdır.
- ✓ Hammadde için fazla boyut küçültme gerektirmemelidir.
- ✓ Pahalı ya da özel ekipmanlar gerektirmemelidir.
- ✓ Minimum kimyasal madde gereksinimi ve ucuz kimyasallarla yapılmalıdır.

Lignoselülozik maddenin ön işlemine etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunları kristallik derecesi, yüzey alanı, lignin ve hemiselüloz oranları olarak sıralamak mümkündür (Taherzadeh ve Karimi, 2008).

Kristallik: Selüloz mikrofibrillerinin yaklaşık 2/3'ü kristalize (düzenli) haldedir. Bu kristalize bölgeler enzimin temas etmesi gereken bölgeleri azaltmaktadır. Ön işlemler ile bu kararlı yapı bozulmaya çalışılır.

Ulaşılabilir Yüzey Alanı: Gerek ön işlemde gerekse de hidroliz işleminde yüzey alanının fazla olması yapılan işlemin etkinliğini büyük ölçüde artırmaktadır. Lignoselülozik materyaller iç ve dış olmak üzere iki tip yüzey alanına sahiptir. Dış yüzey alanı materyalin partikül büyüklüğü ve doğal gözenekliliğinden kaynaklı alandır. Örneğin 15-40 µm'lik materyalin yüzey alanı 0,6-1,6 m²/g olabilmektedir. İç yüzey alanı ise selülozik fibriller ve kapiler yapıdan kaynaklı yüzey alanıdır. İç yüzey alanı genellikle dış yüzey alanından büyük olmaktadır. Özellikle materyal su veya başka bir çözücü ile muamele edildiğinde şişerek genişliyor ise iç yüzey alanı çok daha fazla olmaktadır. Enzimatik hidroliz esnasında iç yüzey alanı enzimin aktivitesinden dolayı sürekli değişir.

Lignin etkisi: Hemiselüloz ve selüloz lignin ile birbirine bağlanmış durumdadır. Lignin burada yapısal sertlik ve genişlemeye karşı direnç de sağlayarak çimento işlevi görmektedir. Bu yüzden ön işlem esnasında direnç göstermektedir. Lignin içeriği yüksek yumuşak odunlar lignin içeriği düşük sert odunlara göre daha dirençli olabilmektedir (Taherzadeh ve Karimi, 2008).

Hemiselüloz etkisi: Hemiselüloz selülozu çevreleyerek kuşattığı için enzimlerin selüloza ulaşmasında ligninden sonra ikinci engeldir. Dolayısıyla hemiselülozun tek başına yapıdan uzaklaştırılmasıyla direkt olarak enzimatik hidrolizin arttığını söylemek pek mümkün değildir.

2.5.1.1. Fiziksel Ön İşlemler

2.5.1.1.1. Mekanik Öğütme

Lignoselülozik materyallerdeki selülozun kristallliği kesme, parçalama, kırma ve öğütme gibi işlemlerle azaltılabilir. Mekanik öğütme işlemleriyle kristallğin azalması yüzey alanını arttırdığı için bir sonraki proses olan selüloz ve hemiselüloz hidrolizasyonunda verimlilik genellikle artmaktadır. Materyalin başlangıç ve istenilen son partikül büyüklüğü, nem içeriği ve materyalin yapısı (sert-yumuşak odun, fibrin içermesi vb.) mekanik öğütmeye harcanan enerjinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Kabaca 10-30 mm büyüklükteki lignoselülozik materyaller yaklaşık olarak 0,2-2 mm partikül büyüklüklerine öğütülmektedir. Mekanik öğütme işlemleri esnasında enerji tüketimi oldukça fazladır ve proses ekonomisini önemli oranda etkilemektedir (Taherzadeh ve Karimi, 2008; Adıgüzel, 2011).

2.5.1.1.2. Piroliz

Bu proste lignoselülozik materyaller oksijensiz ortamda 300 °C'den yüksek bir sıcaklıkta muamele edildiğinde, selüloz hızla H₂ ve CO gibi gaz ürünleri ile aktif karbon gibi katı ürünlere dönüşmek üzere parçalanır. Bozunma işlemi oldukça yavaş gerçekleşir ve düşük sıcaklıklarda uçucu bileşenler meydana gelir. Piroliz işleminden sonra elde edilen aktif karbona su ya da hafif asit hidrolizi ile ileri bir ön işlem daha yapılır. Böylece elde edilen hidrolizat ile biyoetanol üretiminde kullanılabilecek başta glikoz (% 55) olmak üzere karbon kaynağı elde edilir (Das, Ganesh, ve Wangikar, 2004; Sarkar ve ark., 2012).

2.5.1.1.3. Mikrodalga ve Elektron Demeti

Mikrodalga ön işlemleri sıcak (termal, mikrodalga) ve soğuk (non-termal, elektron demeti) olmak üzere iki şekilde uygulanabilmektedir. Termal metotta lignoselülozik materyalin yapısındaki polar bağların ve çevresindeki sulu çözeltinin iç enerjisi mikrodalga ışın göndermek suretiyle artırılır. Böylece materyal içerisinde oluşan farklı sıcak noktalar lignin yapısına etki eder, lignin tamamen uzaklaştırılmaz ancak direnci kırılır. Soğuk metotta ise sürekli olarak manyetik alan değiştirilerek materyalin polar bağlarının titreşimleri artırılır ve yapılarının bozunması sağlanır, bu işlem sonraki fiziksel, kimyasal ya da biyolojik ön işlemin prosesini hızlandırmakla birlikte endüstriyel boyutta bu işlemlerin uygulaması pahalı ve fizibilite açısından uygun değildir (Sarkar ve ark., 2012).

2.5.1.1.4. Ultrasonik Uygulama

Bu işlemde materyalin de içinde bulunduğu sıvıda yüksek frekansta oluşturulan (25-170 kHz) milyonlarca mikroskobik hava kabarcığının lignoselülozik maddenin yüzeyinde meydana getirdiği tahribatla kimyasal bağların kırılması sağlanır. Ultrasonik uygulamanın laboratuvar ölçeğinde uygulamaları bulunurken özel ekipmanlar gerektirmesi ve çalışma koşullarının zor olmasından dolayı endüstriyel ölçekte kullanılabilirliği mümkün olmamaktadır (Germec ve ark., 2016; Balat, Balat, ve Öz, 2008).

2.5.1.2. Fizikokimyasal Ön İşlemler

2.5.1.2.1. Buhar Patlaması (Oto-hidroliz)

Bu yöntemde sadece su buharı kullanılarak materyal yüksek sıcaklık (160-290 °C) ve basınçta (20-50 bar) birkaç dakika bekletilir ve aniden atmosferik şartlara dönülerek basınçlı buharla patlatılır. Bunun sonucu olarak lignoselülozik yapı parçalanır, hemiselüloz fraksiyonları hidrolize, lignin bileşenleri ise depolimerize ve defibrilize olur. Bu yöntem özellikle hemiselüloz içeriği yüksek materyallerde daha etkin olmaktadır. Çünkü lignin ve hemiselüloz yapısının bozulması avantaj iken buhar patlaması yöntemi selülozun amorf kısımlarında kristallliği artırmaktadır ki bu da dezavantajdır. Diğer taraftan bu yöntem düşük enerji gereksinimi, çevreye zararlı olabilecek solüsyonlar gerektirmemesi, geri dönüşüm kolaylığı açısından oldukça caziptir. Bu yöntem yumuşak odunlara kıyasla sert odunlar açısından uygun olmaktadır. Ekonomik ve etkili olduğu için pilot ve büyük ölçekli tesislerde uygulama alanı bulmuştur (Balat, Balat, ve Öz, 2008; Sarkar ve ark., 2012).

2.5.1.2.2. Sıcak Su Ekstraksiyon

Sıcak su ekstraksiyonu, kaynama noktasında sıcak su ile hemiselüloz hidrolizinde kullanılmaktadır. Ön işlem koşulları genellikle 170-230 °C, 5 MPa ve 20 dk. civarında olmaktadır. Bu yöntemde, buhar patlamasına kıyasla daha az olmak üzere, muamele sonrasında furfural ve karboksilik asit gibi bir takım mikrobiyal büyümeyi inhibe edici özellikteki bileşikler oluşabilmektedir. Bununla beraber, proses yürütülürken baz eklenerek bahsedilen inhibitör maddeler nötralize edilebilmektedir. Yöntemin avantajı ise pentozlarda yüksek oranda dönüşü (% 88-98) ile herhangi bir asit ya da başka kimyasal gerektirmemesidir. Özellikle kâğıt endüstrisinde kullanılan hidrotermal bir önışlemdir (Sun ve Cheng, 2002; Taherzadeh ve Karimi, 2008).

2.5.1.2.3. Amonyak Fiber Patlaması (AFEX)

Amonyak fiber patlaması alkali bir fizikokimyasal proses olup materyal yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı amonyak ve buhar patlaması prosesine tabi tutulur. Ön işlem koşulları genellikle 60-100 °C, 2 atm. ve 20 dk. civarında olmaktadır. Bu metot alkali bir ön işlem olarak gerçekleştiğinden proses sonunda inhibitör madde oluşmaz. AFEX herhangi bir fermente edilebilir şeker formu açığa çıkarmaz, ancak selüloz ve hemiselülozun enzimatik hidrolizde yüzey erişebilirliğine katkı sağlayarak şekerlere indirgenmesine olanak sağlar. AFEX işlemi var olan lignin ve bazı hücre duvarı bileşenlerini materyal yüzeyine taşıyarak kısmi şeker kaybına neden olan ikinci bir yıkama prosesi gerektirebilmektedir. Dolayısıyla yüksek lignin içeriğine sahip materyallerde bu metodun kullanılması etkin olmamaktadır. Bu metot uygulaması kolay ve kısa sürmekle beraber amonyağın pahalı olması ve geri kazanım gerektirmesi, toksik olması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir (Balat, Balat, ve Öz, 2008; Sarkar ve ark., 2012) .

2.5.1.2.4. CO₂ Muamelesi

CO₂ muamelesi, buhar patlaması ve AFEX uygulamasına benzerdir. Ön işlem koşulları 16 MPa basınçta 90 dk. ve 50 °C de süperkritik CO₂ ile gerçekleştirilir ve verim % 99 civarına ulaşabilmektedir. Burada kullanılan CO₂, karboksilik asit oluşumuna neden olur ve asidik etki sağlayarak materyalin dönüşümünü kolaylaştırır ve inhibitör oluşumu görülmez. Bu yöntem etkin olmasına rağmen endüstriyel uygulamalar için oldukça pahalıdır (Hamelinck, Van Hooijdonk, ve Faaij, 2005; Prasad, Singh, ve Joshi, 2007).

2.5.1.3. Kimyasal Ön İşlemler

2.5.1.3.1. Asidik Ön İşlem

Lignoselülozik atıklara yapılan ön işlemler içerisinde oldukça önemli bir yere sahip olan asidik ön işlem; sülfürik asit, hidroklorik asit, nitrik asit ve fosforik asit çözeltileriyle yapılmaktadır. Asidik ön işlem seyreltik asitle yüksek sıcaklıkta ya da derişik asitle düşük sıcaklık şartları uygulama olmak üzere iki türlü yapılmaktadır. Derişik asitle yapılan işlemle dönüşüm verimi oldukça iyi olmakla beraber proses oldukça korozyif ve tehlikeli olmaktadır. Ayrıca derişik asit proseslerinde metalik yapıda olmayan korozyona dayanıklı özel malzemeler gerekmede ve kullanılan asit proses ekonomisi açısından geri kazanılmalıdır. Bu dezavantajlar endüstride tercih edilmemesinde önemli faktörlerdir. Kimyasal ön işlem metotları arasında en yaygın olan seyreltik asit yöntemi; gerek kompleks şekerlerin enzimatik hidrolizasyonu için bir ön işlem olarak gerekse de direkt indirgen şeker elde edilmek amacıyla kullanılabilir. Ön işlem koşulları olarak seyreltik sülfürik ya da hidroklorik asit (% 1-5, v/v) çözeltileri ile yüksek sıcaklıkta (160-210 °C) materyal ile muamele edilir. Seyreltik asit muamelesinden sonra % 100'e yakın hemiselüloz yıkımı elde edilebilir, diğer taraftan etkin bir lignin parçalanması görülememekle beraber lignin direnci kırılarak selüloza enzimlerin ulaşılacağı yüzey alanı artar. Bu yöntemin temel problemlerinden biri düşük pH aralığında işlemler gerçekleştiğinden karboksilik asit, furanlar ve bazı fenolik bileşenlerin oluşma potansiyelinin olmasıdır. Bu bileşenler enzimatik hidrolize etki etmese bile verim ya da mikrobiyal aktiviteyi düşürmektedir. Bu yüzden asidik ön işlem yapılan örneklere detoksifikasyon işlemi gerekmektedir (Balat, Balat, ve Öz, 2008; Taherzadeh ve Karimi, 2008; Sarkar ve ark., 2012).

2.5.1.3.2. Alkali Ön İşlem

Alkali ön işlem NaOH, Ca(OH)₂ ve NH₃ çözeltileri kullanarak lignin ve hemiselülozun bir kısmını uzaklaştırarak enzimatik hidroliz için selüloza ulaşılabilir alanları artırmak amacıyla yapılmaktadır. Alkali hidrolizin etki mekanizması lignin ve hemiselüloz molekülleri arasındaki ester bağlarının kırılması esasına dayanmaktadır. Bu bağlar kırıldığında materyal gözenekliliği artmakla birlikte şişmektedir böylece selülozun kristallliği azalarak enzimatik hidrolizde yüzey alanına bağlı olarak verim artırmaktadır. Ön işlem süresi uzun tutularak düşük konsantrasyonlu baz kullanılabilir ya da yüksek konsantrasyonlu baz ile daha kısa sürede ön işlem yapılabilir (Zhang ve ark., 2007).

2.5.1.3.3. Organik Çözücü Kullanımı

Bu metotta materyal metanol, etanol, asetik asit, aseton, performik asit ve salisilik asit gibi organik çözücü içeren çözeltielerde delignifikasyon işlemine tabi tutulurlar. Çözeltiye materyal eklendikten sonra 150-200 °C sıcaklık aralığında bekletilir ancak çözücünün kimyasal özelliklerinin değişme riski yüksek sıcaklıkta çalışmayı kısıtlamaktadır. Çözücü kullanılan sistemlerde genellikle çözünün geri kazanılması hem ekonomi açısından hem de fermantasyon ortamı için inhibitör etkisinden dolayı önemlidir. Çözücünün geri kazanılması veya uzaklaştırılması amacıyla genellikle distilasyon düzeneği gibi ek proses ekipmanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntem daha çok asidik hidroliz gibi ek bir ön işlemle birlikte kullanılmaktadır (Taherzadeh ve Karimi, 2008; Sarkar ve ark., 2012)

2.5.1.3.4. Ozonoliz

Ozon, oksijen moleküllerinden elektrik akımı geçirilerek elde edilen oldukça güçlü bir oksitleyici ajandır. Nemsiz katı materyallere uygulandığında olefinik ve aktif aromatik bölgelere etki ederek parçalamaktadır. Nemli materyallere uygulandığında ise lignin gibi fenolik bileşenlere etki etmektedir. Ancak bu metotta fazla miktarda ozona ihtiyaç duyulduğundan ekonomik olamamaktadır. Ozonoliz işleminin verimine materyalin nem içeriği, partikül büyüklüğü ve gaz akımındaki ozon konsantrasyonu etki etmektedir (Sun ve Cheng, 2002; Taherzadeh ve Karimi, 2008).

2.5.1.4. Biyolojik Ön İşlemler

Mikroorganizmalar kullanılarak da lignoselülozik materyaller parçalanabilmektedir. Lignin, hemiselüloz ve selülozun bir kısmını parçalamak amacıyla kahverengi, beyaz ve yumuşak çürükçül mantarlar kullanılır. Bu amaçla en sık kullanılan mantarlar *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*'dır. Ayrıca bazı *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleri de katı hal fermantasyonu uygulamalarında kullanılabilmektedir. Burada özellikle beyaz mantarların diğer mantarlara nispeten daha etkin ve verimli olduğu bilinmektedir. Bu yöntemin avantajlarının başında düşük enerji gereksinimi gelmektedir ayrıca ılıman şartlarda çalışma ve aşırı kimyasal gerektirmeme gibi avantajlara sahiptir. Ancak endüstriyel kullanımda kısıtlı olmasının temel

nedeni dönüşüm oranının düşük olması (% 20-30) ve hidrolizin uzun (2-3 hafta) sürmesidir (Amore ve Faraco, 2012; Adıgüzel, 2011)

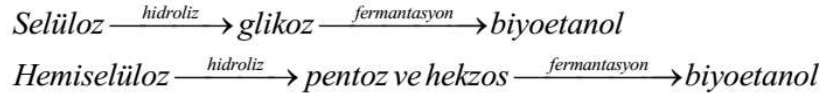
2.6. Lignoselülozik Materyallere Uygulanan Hidroliz Yöntemleri

Ön işlemler ile kristallliği ve lignin miktarı azaltılan lignoselülozik materyale hidroliz işlemi yapılır. Bu işlemde yapıda var olan karbonhidrat yapısına bir molekül su eklenerek lignoselülozik madde parçalanır ve basit şekerlere ayrışır. Hidroliz ile lignin fonksiyonel olmayan yan ürün olarak kalırken hemiselüloz ve selüloz şekerleri çeşitli fermantasyon prosesleriyle biyoetanole dönüştürülmektedir. Selülozun hidroliz edilmesi ile glikoz elde edilirken hemiselülozun hidrolizinden çeşitli pentoz ve heksos şekerler elde edilir. Hidroliz işlemi ise kimyasal ve biyolojik olarak gerçekleştirilebilmektedir. Şekil 4.1 selüloz ve hemiselülozun hidrolizini göstermektedir (Sun ve Cheng, 2002).

2.6.1. Kimyasal Hidroliz

Kimyasal hidroliz, derişik ve seyreltik asit uygulaması olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Asidik işlemler, genellikle enzimatik hidrolizi destekleyen bir ön işlem ya da direkt fermente edilebilir şeker elde etmek için hidroliz amacıyla yapılabilmektedir. Proseste enzimatik hidroliz de yapılacak ise seyreltik asit uygulaması tercih edilmektedir. Enzimatik hidroliz yapılmayacak ise istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellemek için iki aşamalı asit hidroliz yöntemi tercih edilir. Selüloz ve hemiselülozun parçalanma koşullarının farklı olmasından dolayı iki aşamalı yapılmaktadır. İlk aşamada seyreltik asit kullanarak hemiselüloz şekerleri parçalanır, ikinci aşamada ise derişik asit kullanarak selüloz şekerleri parçalanır. Bu işlem sürekli akış reaktöründe gerçekleştirilebilmektedir. Ancak kullanılan reaktörlerin yüksek basınca ve aside dayanıklı kurşun ya da tuğla ile kaplanması gerekmektedir ki bu maliyeti arttırmaktadır.

Asit hidrolizi sonrasında hidrolizat fermantasyonu önleyici veya engelleyici çeşitli maddeler içerebilmektedir. Bu maddelerin oluşumuna lignoselülozik maddenin doğası, içeriği, ön işlem ve hidroliz yöntemleri etki etmektedir. Enzim ve mikroorganizmaların etkilenmesini engellemek için hidroliz ve fermantasyondan önce çeşitli nötralizasyon ya da detoksifikasyon yöntemleri kullanmak gerekmektedir (Balat, Balat, ve Öz, 2008; Chiaramonti ve ark., 2012).



Şekil 2.5: Selüloz ve hemiselüloz hidrolizi

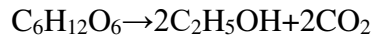
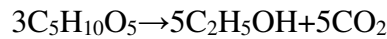
2.6.2. Enzimatik Hidroliz

Selüloz sahip olduğu yüksek kristalize yapı sayesinde lignin ve hemiselüloza göre ön işlemlerden en az etkilenen bileşendir. Selülozun yapısının bozulması aktivitesi yüksek kompleks enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir. Kullanılan farklı enzimler selülozun farklı bölgelerine etki ederek hidroliz gerçekleşir. Enzimin endoglukanaz kısmı selüloz fibrillerinin düşük kristalize bölgelerine etki eder, eksoglukanaz kısmı daha kristalize haldeki sellobiyoz birimlerine etki eder, β -galatosidaz ise son ürün olan glikoza indirgemeyi sağlar. Lignoselülozik materyalin özelliğine bağlı olarak uygun bir ön işlemten sonra yapılan enzimatik hidroliz ile % 99'lara varan glikoz verimlerine ulaşılabilir. Ayrıca hemiselülozun enzimatik hidrolizasyonunda da ksilanaz, β -ksilosidaz, galaktomannaz ve glukronidaz gibi enzimler kullanılabilir.

Enzimatik hidroliz, kimyasal hidrolize göre daha masraflı olmakla beraber yan ürün oluşum azlığı, daha yüksek verim, ılıman şartlarda çalışma ve daha çevreci olma gibi bir takım avantajlara sahiptir. Selülozun enzimatik hidrolizine lignoselülozik maddenin yapısı (kristallığı, polimerizasyon derecesi, yüzey alanı), kullanılan enzimin aktivite ve saflığı, reaksiyon koşulları (pH, sıcaklık) ve substrat konsantrasyonu etki etmektedir. Enzimatik hidroliz işlemi üç basamakta gerçekleştirilmektedir. İlk olarak selülaz enziminin ön işlemlerle ulaşılabilirliği artan selüloza tutunması, sonra yapıyı fermente edilebilir şekerlere dönüştürmesi ve son olarak da enzimin ayrıştırılması. Enzimin etkinliğini artırmak için çeşitli aktivatörler ya da öncü enzimler kullanılabilir.

2.7. Fermantasyon Teknikleri

Lignoselülozik kaynağın türüne göre kullanılan hidroliz işlemi sonucunda glikoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz gibi şekerleri içeren hidrolizat elde edilmektedir. Uygun ön işlem ve enzimatik hidrolize tabi tutulmuş hidrolizatlarda çeşitli mikroorganizmalar kullanarak fermantasyon ile biyoetanol üretilmektedir. Fermantasyon işleminde 5 ve 6 C'lu şekerler aşağıda verilen stokiometrik denklemlere göre biyoetanol dönüşmektedir (Hamelinck, Van Hooijdonk, ve Faaij, 2005; Yasuda ve ark., 2012).



Bu reaksiyonlar göz önüne alındığında herhangi bir mikroorganizmanın 1 kg (5 veya 6) C kaynağı ile teorik olarak ulaşabileceği maksimum verim 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg karbondioksit olmaktadır.

Fermantasyon işlemi büyük, iç ortamı kontrol edilebilen ve etkin homojenizasyonun sağlandığı biyoreaktörlerde gerçekleştirilmektedir. Fermantasyonda maya, bakteri ve mantar gibi birçok mikroorganizma kullanılabilir. Fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmanın ideal şartlarda; 5 ve 6 karbonlu şekerleri metabolize edebilme, etanol toleransı, hidrolizattaki inhibitörlere dirençli ve sıcaklık toleransı gibi istenen özellikleri taşıması beklenir. Fermantasyon işlemi aşı kültürün elde edilip reaktöre inokülasyonu ile başlar, mikroorganizmaların ortamdaki şekerleri değerli ticari ürünlere dönüştürmesiyle devam eder ve nihayet atıkların birikmesi, C kaynağının son bulması ve yan ürünler nedeniyle mikroorganizmanın ölmesiyle sonlanır (Taherzadeh ve Karimi, 2008; Meral ve Saydan, 2012).

2.7.1. Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon (SHF)

Enzimatik hidrolizin fermantasyondan önce bağımsız olarak yapıldığı ve sonra fermantasyona geçildiği bu teknik SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) olarak adlandırılmaktadır. Burada hidrolizat ile önce glikoz fermantasyonu yapılır, karışım distile edilerek biyoetanol kazanılır ve ardından ksiloz fermantasyonu yapılarak ikinci distilasyonla biyoetanol tekrar kazanılır. Bu yöntemin en önemli avantajı hidroliz ve fermantasyonun belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmesidir. Dezavantajlar ise hidroliz hızı düşmeye başladığında glikoz ve sellobiyozun ortamda birikmesidir (Cardona ve Sánchez, 2007; Sarkar ve ark., 2012).

2.7.2. Eşzamanlı Sakkarafikasyon ve Fermantasyon (SSF)

Lignoselülozik maddeye uygulanan ön işlemlerden sonra enzimatik hidroliz ve fermantasyonun aynı anda yürütüldüğü bu teknik ise SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) olarak adlandırılmaktadır. Seyreltik asit ve yüksek sıcaklıkta yapılan ön işlem etkin olduğu için daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemin temel avantajları; şekerlerin dönüşümü sürekli olarak gerçekleştiği ve indirgenen şekerin de tüketilmesi söz konusu olduğundan daha az miktarda enzim ile işlem gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca küçük hacimli reaktörlerde proses daha kısa sürmektedir. Temel dezavantaj ise sakkarifikasyon ve fermantasyon için optimum sıcaklıkların genellikle farklı olmasıdır (Hamelinck, Van Hooijdonk, ve Faaij, 2005; Buaban ve ark., 2010).

2.7.3. Eşzamanlı Sakkarafikasyon ve Ko-Fermantasyon (SSCF)

SSF'nin bir modifikasyonu olan bu yöntem ise SSCF (Simultaneous Saccharification and Co Fermentation) olarak adlandırılmaktadır. Bu metotta birbiri ile aynı fiziksel şartlarda ve uyum içerisinde yaşayabilen mikroorganizmalar fermantasyon basamağında 5 ve 6 karbonlu şekerleri metabolize edilebilmesi için tercih edilir. Bu amaçla *Candida shehatae* ve *Saccharomyces cerevisiae* kombinasyonu tercih edilmektedir. Uygulanan ardışık fermantasyonda önce *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile 6 C'lu şekerler tüketilir sonrasında ise *Candida shehatae* hücreleri ile 5 C'lu şekerler metabolize edilir. *S.cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* gibi bazı doğal ve yabancı mikroorganizma türleri biyoetanol üretiminde kullanılabilmektedir. Bunlar arasında endüstriyel üretimde en çok tercih edilen türler *S.cerevisiae* ve *Z.mobilis* olmaktadır ancak bu türler de 5C'lu şekerleri metabolize edememektedirler. Genetik mühendisliğinde kaydedilen gelişmeler sayesinde bazı türleri modifiye edilerek 5 ve 6 C'lu şekerleri tüketmesinin yanı sıra sıcaklık ve stres gibi ekstrem şartlara toleranslı mikroorganizmalar geliştirilebilmektedir. Bunlardan bazılarına örnek olarak rekombinant *E.coli* KO11, *S.cerevisiae* ATCC 26603 ve *P.stipitis* NRRL Y-7124 verilebilir (Hamelinck, Van Hooijdonk, ve Faaij, 2005; Chiaramonti ve ark., 2012).

2.7.4. Katı Üzerinde Proses (CBP)

Diğer bir adı CBP (Consolidated Bio Processing) olan bu yöntemde dört biyolojik olay da (ön-işlem, hidroliz, fermentasyon ve ayırma) tek bir biyoreaktörde gerçekleştirilir. Bu yöntem direkt mikrobiyal dönüşüm olarak da bilinmektedir. Çünkü, burada tek bir mikroorganizma kullanılarak enzimleriyle sakkarifikasyon ve fermentasyon yapması sağlanmaktadır. *Clostridium thermocellum* gibi bakteri ya da *Neurospora crassa* gibi mantar hücreleri bu amaçla kullanılabilir (Amore ve Faraco, 2012; Sarkar ve ark., 2012).

2.8. Biyoetanolün Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

Yakıt ya da yakıt katkı maddesi olarak kullanılacak biyoetanolün % 95 saflıkta olması genellikle tercih edilmektedir. Birçok tesiste arka arkaya kurulan iki rektifikasyon kolonuyla % 96'nın üzerinde saflıkta biyoetanol elde edilebilmektedir. Su-etanol karışımı azotropik karışım oluşturduğundan dolayı etanol saflığı en fazla % 95-97 civarında olabilmektedir. İkili distilasyon kolonunun ardından moleküler elek gibi çeşitli dehidratasyon üniteleri ile su uzaklaştırılır. Biyokütle kalıntıları ve partiküller ise büyük ölçekli santrifüj ya da döner filtreler ile uzaklaştırılmaktadır. Biyoetanol üretiminde alt akım işlemlerinin maliyeti genellikle üst akım işlemlerine kıyasla daha az olmaktadır. Maliyetin büyük kısmını ön işlemler oluşturmaktadır.

2.9. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Endüstriyel biyoetanol üretiminde yaygın olarak *Saccharomyces cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* suşları kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalardan *Saccharomyces cerevisiae*, oksijensiz ortamda Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolağını kullanarak 6 C'lu şekerleri $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ stokiometrik denklemine göre biyoetanole dönüştürür. Teorik olarak metabolize edilen glikozun gramı başına elde edilen biyoetanol 0,511 ve karbondioksit 0,489 gramdır. Bu yolak kullanıldığında 2 ATP üretilerek maya hücrelerinin temel yaşam faktörlerine harcanır. Bu nedenle biyoetanol üretilirken aslında maya kendisini de çoğaltarak endüstriyel verim açısından bakıldığında bir yan ürün oluşturmaktadır.

Zymomonas mobilis ise Entner-Doudoroff (ED) yolağını da kullanır ve teorik olarak metabolize edilen biyoetanol verimi 0,485'dir. Ancak *Z. mobilis* bu yolağı kullandığında

glikoz başına 1 ATP üreterek maya hücresine göre daha az biyokütle üretir ve daha fazla C'u biyoetanol üretimine aktarır.

2.10. Çay Bitkisi (*Camellia sinensis*)

Botanikte çay (*Camellia sinensis*), *Angiospermea* çiçek açanlar bölümünden, *Dicotyledonea* sınıfından, çaygiller (*Theaceae* ya da *Camellia*) familyasındadır. Çay, nemli iklimlerde yetişen, yaprak ve tomurcukları içecek maddesi üretmekte, tohumu ise yağ üretmek için kullanılan bir tarım bitkisidir. Bitkisel yağ elde etmek amacıyla üretilen bazı çay türlerinin tohumu % 60'lara varan oranda yağ içerirken içecek amacıyla üretilen çayı tohumu % 30'un üzerinde yağ içermektedir. Hasat edilen yaş çay yaprağı miktarı genellikle yıllık ürün olarak kabul edilmektedir (Kacar, 2010).

Çay bitkisi yaprağı oldukça karmaşık olmakla beraber içeriğinde polifenoller, polisakkaritler (selüloz ve hemiselüloz), enzimler, vitaminler, mineraller, lignin, lipit ve protein yapılı farklı bileşikler bulunmaktadır. Yaş çay yaprağında toplam karbonhidrat miktarı % 40 civarında iken (Kacar, 2010), kuru çay da % 48-50 arasında olmaktadır (Demirbas, 1999). Çay bitkisinin farklı türlerinde glikoz, ramnoz, arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz ve rafinoz gibi basit ve kompleks yapılı şekerler bulunmaktadır (Chen ve ark., 2009). Ayrıca çay yaprağında % 3,5-7,1 arasında bulunan azotun % 75'i proteinlere % 25'i ise kafeine bağlıdır (Taban, Okay, ve Kunter, 2001). Çay yapraklarında bulunan makro ve mikro elementler 1 kg kuru ağırlık başına sürgün dönemi ve çayın cinsi dikkate alınmadan Tablo 2.2'de verilmiştir (Kacar ve ark., 1979).

Dünya çay üretiminin yaklaşık % 36'sı Çin, % 22'si Hindistan, % 8'i Kenya, % 6 Sri Lanka, % 4'ü Vietnam ve % 5'i ise ülkemiz tarafından karşılanmaktadır. Ülkemizde yaş çay rekoltesi iklim ve tarımsal koşullara bağlı olarak 1.000.000 – 1.260.000 ton arasında değişebilmektedir. Yıllık kuru çay üretimi ise yaklaşık 250.000 ton civarındadır (RTB, 2015; ÇAYKUR, 2015).

Tablo 2.2: Çay yapraklarının elementel içeriği (Kacar 2010).

Element	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Cl	Al
ppm	91	1225	40	17	18	593	645

Siyah çay üretimi ve işlenmesi sırasında çayın yaklaşık % 4-5'i atık olarak fabrikalarda açığa çıkmaktadır (Demirbas, 1999). Yıllık fabrika atığı çay miktarı ise 45.000-50.000 ton arasında değişmektedir.

Çay tüketimine bakıldığında ise ülkemiz kişi başına yıllık 7.54 kg çay tüketimi ile ilk sırada yer almaktadır. Çay tüketiminde ülkemizi 4,34 kg ile Fas, 3,22 kg ile İrlanda ve 2,74 kg ile İngiltere takip etmektedir. Çay üretiminde dünyada ilk sırada yer alan Çin ise yıllık kişi başına ortalama 0,82 kg ile dünya ortalaması olan 0,52 kg'ın biraz üzerindedir. Bu veriler göz önüne alındığında Türkiye çay tüketiminde açık ara farkla ilk sırada yer almaktadır.

2.11. Literatür Özeti

Değişik lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimine ilişkin literatürde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Arpa sapı ve söğüt ağacı atıkları (Gaykawad ve ark., 2013), şeker pancarı küspesi (Pattra ve ark., 2008), soya kabuğu (Schirmer-Michel ve ark., 2008), pirinç kabuğu (Imamoglu ve Sukan, 2013), portakal kabuğu (Plessas ve ark., 2007), mahula bitkisi (Mohanty ve ark., 2009), şeker kamışı (Dawson ve Boopathy, 2007) gibi lignoselülozik materyallerin biyoetanol üretiminde kullanımı araştırılmıştır. Fakat bir lignoselülozik atık olan çay ve çay atığından biyoetanol üretimi üzerine yapılan çalışma sayısı çok azdır. Farklı biyokütle kaynaklarından fermente edilebilir şekerler içeren hidrolizat elde edilmesi üzerine yapılan çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir;

Pirinç samanının substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada 5-6 mm aralığına kadar öğütülmüş numuneler % 4,4 (v/v) H_2SO_4 ile kaynama sıcaklığındaki suda 1 saat bekletilerek hidrolizat elde edilmiştir. 100 g/L konsantrasyonunda kullanılan pirinç samanından 20 g/L indirgen şeker elde edilmiştir. Aynı örnekler 170 °C ve 7,6 kg/cm²'de 30 dakika bekletildikten sonra soğutulularak elde edilen hidrolizatta ise 23 g/L konsantrasyonunda indirgen şeker tespit edilmiştir (Abbi, Kuhad, ve Singh, 1996).

Buğday samanının kullanıldığı bir başka çalışmada ise bıçaklı parçalayıcı ile öğütülen numuneler % 1,85 (v/v) H_2SO_4 ile 90 °C'de 18 saat bekletilerek hidrolizat elde edilmiştir. 50 g/L konsantrasyonunda kullanılan buğday samanından elde edilen indirgen şekerler toplamda 14,5 g/L konsantrasyonunda olmuştur (Nigam, 2001).

Cao ve arkadaşları mısır koçanı kullanarak yaptıkları bir çalışmada optimum ön işlem koşulları olarak % 2,13 (v/v) H₂SO₄, 121 °C ve 105 dakika hidroliz süresi uyguladıkları durumda 100 g/L konsantrasyonundaki mısır koçanından hidrolizatta elde edilen toplam şeker konsantrasyonunu 12,23 g/L olarak tespit etmişlerdir (Cao ve ark., 2009).

Çay atığının değerlendirilmesi üzerine yapılan çalışmaların bir kısmı şu şekilde sıralanabilir;

Çay atıklarından ultrasonik destekli seyreltik asit hidroliz metoduyla indirgen şeker eldesinin araştırıldığı bir çalışmada optimum hidroliz koşulları; sıcaklık 50 °C, katı sıvı oranı 166 g/L ve asit oranı % 1 olarak bulunmuştur. Bu şartlarda gerçekleştirilen hidroliz sonunda 166 g/L çay atığından 20,34 g/L indirgen şeker elde etmişlerdir. Sadece asidik hidrolizin optimize edildiği çalışmada ise indirgen şeker konsantrasyonu 25,3 g/L olarak bulunmuştur (Germec ve ark., 2016).

Evsel çay atıklarının biyoetanol üretimi amacıyla substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada Yücel ve Göycincik asidik ön arıtma ve enzimatik hidroliz atıklara uygulanmış olup 50 g/L çay atığından 28,9 g/L indirgen şeker elde etmişlerdir. Elde edilen hidrolizatta ticari maya hücreleri kullanarak 12,72 g/L etanol üretilmiştir. Ayrıca etanol üretiminde optimum koşulları NH₄Cl 2,7 g/L, maya ekstraktı 11,7 g/L ve sıcaklığı 42,8 °C olarak bulmuşlardır (Yücel ve Göycincik, 2015).

Ozmak ve ark. yaptıkları bir çalışmada çay atığını aktif karbon başlangıç maddesi olarak değerlendirilmişlerdir. Çay atığından üretilmiş olan aktif karbonun sularda kirliliğe neden olan metilen mavisi ve fenolün uzaklaştırılmasında adsorbent olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Ozmak ve ark., 2010).

Çay fabrikası atığının kümes ve çiftlik hayvanı yemi olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada kafeinsizleştirilen ve tannik asit oranı % 5'in altına düşürülen çay atıklarının piliç ve domuz yemi olarak kullanılabildiği gösterilmiştir. *Hampshire* domuzlarının büyüme ve olgunlaşması üzerine uzun süreli besleme denemeleri, çay fabrikası atıklarına su uygulandığında (1:50) hiçbir ters etki olmaksızın % 15 düzeyine kadar güvenle domuz rasyonlarına dâhil edilebileceğini gösterilmiştir (Konwar ve Das, 2006).

Çay ile yapılan diğer çalışmalara bakıldığında, çay atıklarından mikrodalga enerji varlığında kimyasal aktivasyonla (HNO₃ kullanarak) aktif karbon elde edildiği belirlenmiştir

(Yagmur, Ozmak, ve Aktas, 2008). Sulu çözeltilerden Cu ve Pb'un siyah çay atıklarıyla uzaklaştırılma performansları araştırılmıştır (Amarasinghe ve Williams, 2007). Siyah çay atıklarının organik bir molekül olan metilen mavisinin sulu çözeltiden uzaklaştırılmasında kullanılmıştır (Uddin ve ark., 2009). Yapılan bir başka çalışmada ise çay fabrika artıklarının kompostlaştırılarak orman fidanlıklarında organik gübre olarak değerlendirilmesi araştırılmıştır (Yalınkılıç, Altun, ve Kalay, 1996). Diğer bir çalışmada endüstriyel çay lifi atık materyalleri ses absorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Ersoy, 2007). Yapılan bir diğer çalışmada yaş çay yapraklarının fabrikalarda siyah çaya işlenmesi sırasında açığa çıkan kaba ve ince atık ile birlikte, çay atığından hazırlanan kompost ve zenginleştirilmiş kompostun topraktaki enzim aktivitesi ve nitrifikasyon üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır (Arcak ve ark., 2011). Kızılkaya ve Ekberli yaptıkları bir çalışmada fındık zurufu ve çay atığının toprakta üreaz aktivitesi ve kinetiği üzerine etkisini araştırmışlardır (Kızılkaya ve Ekberli, 2008).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çay Atıkları

Eysel çay atığı: Çalışmalarda Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde faal olan çay ocağından sürekli olarak açığa çıkan ÇAYKUR marka çay posası kullanıldı. Demlenmiş posalar günlük olarak toplanarak 3 kez saf su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutmaya bırakıldı. Kurutulan numuneler daha sonra kullanılmak üzere ağzı kapaklı şişelerde muhafaza edildi.

Fabrika atığı çay: Artvin, Kemalpaşa ÇAYKUR fabrikasından açığa çıkan ve ağırlıklı olarak sap kısımlarından oluşan örnekler ise 'fabrika atığı çay' olarak temin edildi

Yeşil çay: Yeşil çay örneği Trabzon'da tarladan toplanan ve herhangi işleme tabi tutulmayan çay yapraklarının kurutulmasıyla elde edildi.

3.1.2. Mikroorganizmalar

3.1.2.1. *Escherichiae coli* KO11 ATCC® 55124™

Escherichiae coli (*E.coli*) KO11 (pLOI 1910) rekombinant suşu ATTC Kültür koleksiyonundan temin edildi. Liyofilize halde temin edilen suş Luria-Bertani (LB) sıvı ortamında 37 °C ve 100 rpm de çoğaltılarak kültüre alındı. Rekombinant suşun biyoetanol denemelerinde kullanılacak stok kültürü modifiye (LB)-agar da 37 °C'de 24 saat bekletildikten sonra +4 °C'ye kaldırılarak muhafaza edildi. Ayrıca mikroorganizmalar daha sonra kullanılmak üzere kryotüplerde % 20 gliserol içerisinde -86 °C'de dondurularak saklandı.

Tablo 3.1:LB ve LB-Agar besi ortamlarının içerikleri.

Bileşen	Miktar (g/L)
Glikoz	20
Bakteriyolojik pepton	10
Maya ekstraktı	5
Sodyum klorür (NaCl)	5
Kloroamfenikol (CHL)	0,6
Agar*	15

*: Agar yalnızca katı besi ortamı için kullanılmıştır.

3.1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae* PAKMAYA®

Ekmek mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) hücresi yerel bir marketten yaş pellet halde satın alındı. Hücrelerin çoğaltılması YPD (Yeast pepton dekstroz) ve YPD-Agar besi ortamlarında yapıldı. Hücreler YPDA'da çoğaltıldıktan sonra +4 °C de saklandı.

Tablo 3.2: YPD ve YPD-Agar besi ortamlarının içerikleri.

Bileşen	Miktar (g/L)
Glikoz	20
Bakteriyolojik pepton	20
Maya ekstraktı	10
Agar*	15

*: Agar yalnızca katı besi ortamı için kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Çay Atığının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Nem Tayini

Çay atığındaki nem içeriğinin belirlenmesi amacıyla, 10 g örnek 105 °C'de 24 saat kurutuldu ve desikatörde soğutulduktan sonra tartıldı. Tartım sonrası tekrar desikatöre yerleştirilen örnek 30 dakika sonra tekrar tartıldı. İki tartım arasındaki fark, 0,005 g'ı geçmeyinceye kadar işleme devam edilerek sabit tartım elde edildi. Daha sonra ağırlık azalmasına bağlı olarak nem içerikleri Eşit. 1'de verilen eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Nem} = \frac{M_I - M_S}{M_S} \times 100 \quad (1)$$

Burada M_I : kurutma öncesi ağırlık, M_S : kurutma sonrası ağırlık

3.2.1.2. Lignin, Selüloz ve Hemiselüloz Oranının Belirlenmesi

Çay atıklarının kimyasal bileşimi Li ve ark.'larının çalışmasında yer alan analitik metotlardan faydalanılarak yapıldı (Li, Xu, ve ark., 2004).

Ekstraktif madde analizi; analizi yapılacak numuneden 12 gram (G_0) tartılarak, üzerine 150 mL aseton ilave edildikten sonra geri soğutucu altında 3 saat süre ile karıştırılarak ekstrakte edildi. İşlem sonunda, süzgeç kâğıdında süzülerek toplanan kalıntı (G_I) bir süre oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 80 °C'de tutulan etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutuldu, son olarak soğutulup tartılarak ekstraktif madde miktarı hesaplandı.

$$M_1(\%) = \frac{G_0 - G_I}{G_I} \times 100 \quad (2)$$

Hemiselüloz analizi; ekstraksiyon analizi sonucunda kalan kalıntıdan (G_I) 6 gram numune balona konularak üzerine 150 mL, 0,5 M NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 3,5 saat karıştırıldı. Kalıntı (G_2), süzgeç kâğıdında süzildükten sonra su ile yıkanarak nötral pH'a getirildi. Sabit tartıma gelene kadar etüvde kurutulup, desikatörde soğutulup, tartılarak hemiselüloz miktarı belirlendi.

$$M_2(\%) = \frac{G_I - G_2}{G_0} \times 100 \quad (3)$$

Lignin analizi; lignin analizi için ekstraksiyon analizi sonucunda kalan kalıntıdan (G_3) 1 g alınarak sabit tartıma kadar kurutuldu. Balona konulan örnek üzerine daha sonra yavaşça % 72 (v/v)'lik 30 mL H_2SO_4 çözeltisi eklendi ve bu karışım 14 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildi. Daha sonra 300 mL saf su ilave edilip geri soğutucu altında 1 saat kaynatıldı. Karışım soğuduktan sonra süzgeç kâğıdında süzülerek saf su ile sülfat iyonu kalmayana kadar yıkandı. Kalıntı (G_4) etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulduktan sonra desikatörde soğutulup, tartılarak lignin miktarı hesaplandı.

$$M_3(\%) = \frac{G_4(1 - M_1)}{G_3} \times 100 \quad (4)$$

Selüloz analizi: Selüloz miktarı ise deneysel olarak belirlenen lignin, hemiselüloz ve ekstraktif madde yüzdeleri toplanıp, yüzden çıkarılması ile hesaplandı.

$$M_4(\%) = 100 - (M_1 + M_2 + M_3) \quad (5)$$

3.2.2 Çay Atığına Uygulanan İşlemler

3.2.2.1 Öğütme

Çay atıkları normal oda şartlarında kurutulduktan sonra 70 °C'deki etüvde de 24 saat bekletildi. Kurutulmuş olan çay, bıçaklı parçalayıcı ile öğütüldü. Öğütülen numuneler bir seri elek setinde elenerek farklı partikül büyüklüğünde fraksiyonlar elde edildi. Öğütülen çay atıkları daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hava geçirmez ağzı kapaklı kaplarda saklandı. Çalışmada kullanılan eleklerin gözenek boyutları Tablo 3.2'de verilmiştir. Numunelerin geometrik ortalama partikül boyutunu (G.O.P.B) ifade etmek için Eşit. (6) kullanıldı.

$$G.O.P.B = \sqrt{1.\text{eleğin açıklığı} (\mu_1) \times 2.\text{eleğin açıklığı} (\mu_2)} \quad (6)$$

Tablo 3.3: Elemede kullanılan eleklerin gözenek boyutları, mesh numaraları ve G.O.P.B değerleri.

Elek No	Elek açıklığı (μm)	Mesh No	G.O.P.B. (μ)
1	2000 ve üstü	10	3669
2	1000	18	1414
3	707	25	840
4	500	35	595
5	250	60	353
6	0-250	Elek altı	115

3.2.2.2 Alkali İşlemler

Çay atıklarına bazik ön işlemlerin etkisinin gözlemlenmesi amacıyla $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ve NaOH olmak üzere 2 farklı baz çözeltisi % 2,75 (v/v)'lik konsantrasyonda kullanıldı. 10, 50 ve 100 g/L'lik çay konsantrasyonuna sahip çözeltiler hazırlandı. Hazırlanmış olan çözeltiler otoklavda 121 °C'de 60 dakikalık bir ısıtma işlemine tabi tutuldu (Saha ve ark., 2005; Sun ve Cheng, 2005). Numuneler soğuduktan sonra katı kısım uzaklaştırılarak sıvı hidrolizat elde edildi. Sıvı hidrolizatta indirgen şeker analizi yapıldı.

3.2.2.3. Asidik İşlemler

Lignoselülozik atıkların hidrolizinde seyreltik asit metodu ve farklı asitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Çay atıklarının asidik hidrolizi için H_2SO_4 , HCl ve HNO_3 olmak üzere 3 farklı asit denendi. Asit konsantrasyonu % 2,75 (v/v) olacak şekilde asit çözeltileri hazırlanarak 10, 50 ve 100 g/L farklı katı oranlarında çay atığı eklendi. Hazırlanmış olan çözeltiler 121 °C'de 60 dakikalık bir ısıtma işlemine tabi tutuldu (Saha ve ark., 2005; Sun ve Cheng, 2005). Otoklavdan alınan örnekler vakum filtrasyon ile katı kısım uzaklaştırılarak sıvı hidrolizat elde edildi. Hidroliz işlemlerinde takip edilen değerler aşağıda verildiği gibidir;

$$\text{Verim yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Elde edilen indirgen şeker miktarı (g)}}{\underbrace{\text{Elde edilebilecek maksimum indirgen şeker miktarı (g)}}_{\text{Selüloz+Hemiselüloz toplamı(atık çay için \%44,5 w/w)}} \times 100$$

3.2.2.4. Kimyasal Detoksifikasyon Uygulaması

Lignoselülozik biyokütlenin ön işlem ve hidroliz aşamalarında indirgen şekerlerin suya geçmesinin yanı sıra fermentasyon işlemini inhibe eden bazı bileşikler de meydana gelmektedir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal, 2000). Çalışmaya hazır hale getirilen çay örnekleri 200 g/L olacak şekilde 80 g alınarak 0,40 M H_2SO_4 içerisinde 121 °C de 60 dakika otoklavda muamele edildi (Imamoglu ve Sukan, 2014). Süre sonunda süspansiyon haldeki çözeltinin sıvı kısmı aseptik koşullarda süzülerek alınıp eşit iki erlene bölündü. Asidik işlemle sona eren ortamı olarak kullanılacak detoksifiye edilmemiş örnek pH'ı 2 M NaOH ile 5,5'e ayarlandı. Diğer örnek ise detoksifikasyon işlemine tabi tutuldu. Detoksifikasyon işlemi ise karışım son NaOH konsantrasyonu 340 mM olacak şekilde bilinen konsantrasyonda NaOH çözeltisi ilavesi ile 60 °C'de 30 dakika 400 rpm'de manyetik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirildi (Larsson ve ark., 1999). Son olarak örneklerin pH'ı 1

M H₂SO₄ çözeltisi kullanılarak 5,5 olacak şekilde ayarlandı (Imamoglu ve Sukan, 2013). Biyoetanol verimi aşağıdaki denklem ile hesaplandı,

$$\text{Biyoetanol verimi} = \frac{C_{e,\max}}{C_{s0}} \quad (7)$$

Burada C_{e,max} (g/L) maksimum biyoetanol konsantrasyonu ve C_{s0} (g/L) ise başlangıç toplam şeker konsantrasyonudur. Biyoetanol üretim hızı ise aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı,

$$\text{Biyoetanol üretim hızı} = \frac{C_{e,\max}}{t_{\max}} \quad (8)$$

Burada; C_{e,max} : maksimum etanol miktarı (ppm), t_{max} : maksimum etanolün üretildiği süre.

3.2.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Bu çalışmada ön işlem parametrelerinin optimizasyonunun yapılması hedeflendi. Bu amaçla sıcaklık (T), zaman (t), katı konsantrasyonu (g/L), asit konsantrasyonu (%) ve parçacık boyutu (μ) parametreleri incelenerek optimum değerler belirlendi. Çalışmada Design Expert 8 deneysel programı kullanılarak merkez noktaların dizaynı ön çalışma sonucunda belirlendi. Belirlenen deney aralıkları ve tasarım tablosu Tablo 3.3’de verilmiştir. Merkez noktalara göre belirlenen parametreler için toplamda 50 deney yapılarak her deneyde elde edilen hidrolizatlarda indirgen şeker analizi yapıldı. Elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu ve kullanılan çay miktarından verim değerleri hesaplandı. Verim değeri bağımlı değişken olarak değerlendirildi. Cevap Yüzey Metodu’na göre oluşturulan deney tablosu ve sonuçlar Ek 1’de Tablo E1’de verilmiştir.

Program tarafından önerilen deneylerin yapılmasıyla bağımlı değişkenlere ait elde edilen veriler kullanılarak önerilen modelin istatistiksel olarak uygunluğu ANOVA testi ile tespit edildi. Modelin uygunluğu R² ile ifade edilerek istatistiksel önemi F testi ile incelendi. Elde edilen model eşitlikleri yardımıyla bağımsız ve bağımlı değişkenler için maksimizasyon ve minimizasyon kriterleri ile önem ağırlıkları belirlenerek optimizasyon yapıldı. Optimizasyon işleminden sonra elde edilen model uygunluğu doğrulama deneyleri yapılarak değerlendirildi.

3.2.4. Enzimatik Hidroliz

Optimum koşullarda gerçekleştirilen asidik hidrolizi takiben çay atıkları yıkanmadan enzimatik hidroliz işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla asidik hidroliz sonrası çay posaları nüçe filtresi ile vakum altında ayrıldıktan sonra sıvı kısım asidik hidrolizat (AH) olarak alındı. Kalan çay posası ise 500 mL'lik erlene aktararak 250 mL pH'ı 4,8 olan sodyum sitrat tamponuna eklendi. Ticari enzim (Cellic® CTec3, Novozymes) karışımının dozu 5 mL enzim solüsyonu/ g atık olacak şekilde ayarlandı. Örnekler 50 °C ve 150 rpm de 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra darası alınmış süzgeç kâğıdından süzülerek sıvı enzimatik hidrolizat (EH) elde edildi. Fermantasyon denemelerinde kullanılmak üzere asidik hidrolizat ve enzimatik hidrolizat birleştirilerek toplam hidrolizat (TH) elde edildi. AH, EH ve TH numunelerinde indirgen şeker analizleri yapıldı. Analizlerden sonra örnekler sabit tartıma kadar etüvde kurutularak posanın kalan ağırlığı hesaplandı.

3.2.5. Fermantasyon

Fermantasyon işlemi ilk olarak sadece ön işlem optimizasyonu yapılmış hidrolizatta gerçekleştirildi. Hidrolizat ortamına üç farklı mikroorganizmanın besi ortamları glikoz eklemeyen hazırlanmış olup diğer besi ortamı bileşenleri ve fiziksel koşullar Tablo 3.4'de verildiği gibi uygulandı. Ekimi yapılan erlenlerde oksijensiz ortam ve CO₂ çıkışı sağlamak amacıyla bir hava kilidi sistemi eklenerek çalkalamalı inkübatörde fermantasyon yapıldı. Kültür süresince belirli saatlerde alınan numunelerde; mikroorganizma sayısı belirlendikten sonra şeker ve alkol miktarını belirlemek üzere analiz gününe kadar -20 °C'de donduruldu.

Tablo 3.4: Ön işlem optimizasyonunda incelenen parametreler ve çalışma aralıkları.

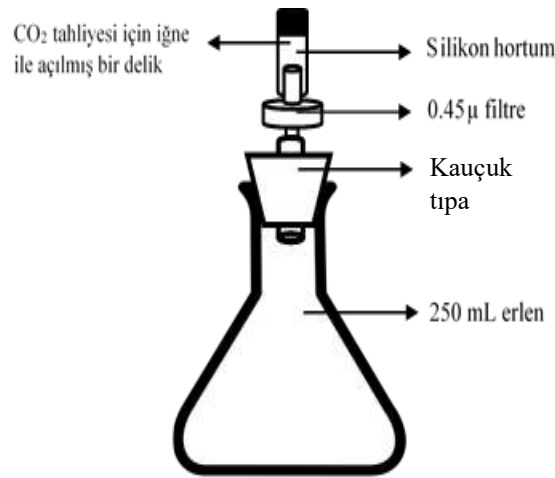
Faktör	Adı	-α	-1	+1	+
A	Sıcaklık (°C)	99	120	150	170
B	Zaman (dk.)	11	60	130	178
C	Katı konst. (g/L)	9,3	30	60	80
D	Asit konst. (% v/v)	0,06	0,65	1,50	2,09
E	G.O.P.B (μ)	3669	840	354	115

3.2.6. *E.coli* KO11 ile Optimum Koşullarda Fermantasyon

Biyoetanol verimi diğer iki mikroorganizmaya göre yüksek olan *E.coli* KO11 ile üretim ortamı ve fiziksel koşullarının optimizasyonu da yapılarak verim artırılması hedeflendi. Bu amaçla; ön işlem, üretim ortamı ve fiziksel koşulların optimize edildiği durumda fermantasyon gerçekleştirildi. Fermantasyon işlemi 250 mL'lik erlen 50 mL çalışma hacminde Tablo 3.5'te verilen koşullara göre gerçekleştirildi. Kültür süresince belirli saatlerde alınan numuneler, mikroorganizma sayısı belirlendikten sonra şeker ve alkol miktarını belirlemek üzere analiz gününe kadar -20 °C'de donduruldu.

Tablo 3.5: Biyoetanol üretiminde hidrolizata eklenen besi ortamı içerikleri ve fiziksel koşullar.

	<i>E.coli</i> KO11	<i>S. cerevisiae</i> PAKMAYA
Besi Ortamı	LB	YPD
Glikoz (g/L)	0	0
Maya ekstraktı (g/L)	5	10
Pepton (g/L)	10	20
NaCl (g/L)	5	0
Sıcaklık (°C)	37	30
pH	6.5	5.5
Karıştırma hızı (rpm)	100	100
İnokülasyon hacmi (% v/v)	10	10



Şekil 3.1: Oksijensiz fermantasyonun gerçekleştirildiği erlen sistemi.

3.2.4. Analitik Yöntemler

3.2.4.1. İndirgen Şeker Tayini

Ön işlemler ve fermantasyon süresi boyunca farklı zaman aralıklarında alınan numunelerin indirgen şeker içerikleri Miller'in (Miller, 1959) metoduyla tayin edilmiştir. Burada indirgen şekerler, DNS çözeltisiyle verdiği sarı renkli kompleksin 575 nm. dalga boyunda verdiği absorbans değeri okunarak analiz edildi. Yöntemde 3 mL örnek üzerine 3 mL içeriği Tablo 3.6'da verilen DNS çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Karışım 90 °C'deki su banyosunda 15 dk. bekletildikten sonra numunelerin üzerine 1 mL sodyum potasyum tartarat (PST, 40 g/100 mL) çözeltisi ilave edilerek buzlu suda soğutuldu. Kalibrasyon eğrisi için glikoz standartları kullanıldı. Kalibrasyon eğrileri ve eğrilere ait denklem EK 5'te verilmiştir.

Tablo 3.7: DNS çözeltisinin içeriği.

Bileşen	Miktar (g/L)
3,5-Dinitrosalisilik asit	20
Fenol	10
Sodyum sülfid (Na_2SO_3)	5
Sodyum hidroksit (NaOH)	5
Rochelle Tuzu Çözeltisi (PST)	
Sodyum Potasyum Tartarat	40

3.2.4.2. Toplam Furan Bileşikleri Derişimi Tayini

Ön işlemler sonrasında elde edilen hidrolizatlarda toplam furfural ve Hidroksimetilfurfural (HMF) bileşiklerinin derişimini ifade eden furan konsantrasyonu Martinez ve ark.(Martinez ve ark., 2000)'larının belirlemiş olduğu metoda göre yapıldı. Örneklerin spektrofotometrik olarak iki farklı dalga boyunda okunduğu bu yöntemde, toplam furan miktarı ile dalga boyları arasındaki korelasyon kullanıldı.

$$Abs_{284} - Abs_{320} = 0,127 \times \text{toplam furan (mg/L)} + 0,056 \quad (9)$$

3.2.4.3. Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi

S. cerevisiae hücrelerinin mL'deki sayısı Thoma Lam'ında sayım yöntemi kullanılarak belirlendi. Maya hücrelerinin sayılması için kullanılan Thoma lamı, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel bir mikroskop lamıdır. Lam üzerinde 16 büyük kare, her büyük karede ise 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılarak seyreltme faktörü ve Thoma Lamı sabitiyle çarpılarak mL'deki hücre sayısına geçilmiştir (Gürgün ve Halkman, 2005).

$$X_{\text{hücre/ml}} = X_{\text{ortalama}} \times Q_{\text{seyrelme oranı}} \times 10000 \quad (10)$$

E.coli KO11 hücreleri için ise spektrofotometrede 600 nm. (OD600) dalga boyunda okunarak hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayısı *E.coli*'nin LB besisi ortamında absorbans değerine karşılık gelen kuru hücre ağırlığı ve ml başına hücre sayısı korelasyonu kullanılarak hesaplandı (Widdel, 2007; Sezonov, Joseleau-Petit, ve D'Ari, 2007; Agilent, 2016). Kör olarak inokülasyon yapılmamış hidrolizat kullanıldı. Fermantasyon ortamından farklı zaman aralıklarıyla alınan numuneler önce köre karşı 600 nm. de okunduktan sonra santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı.

$$X_{\text{hücre/ml}} = \text{Abs}_{\lambda_{600\text{nm}}} \times Q_{\text{seyrelme oranı}} \times 8.0 \times 10^8 \quad (11)$$

3.2.4.3. Biyoetanol Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Fermantasyon süresince ortamda üretilen biyoetanol miktarı farklı zaman aralıklarında alınan numunelerde Gaz kromatografisi (GC) ile belirlendi. Biyoetanol analizi GC'de (Schimadzu, GC2010 Plus) kapiler alkol kolonu (BP20, 30m, 0,25 mm, 0,25µm, SGE) ve FID dedektör kullanılarak yapıldı. Çalışma koşulları ise; enjeksiyon bloğu sıcaklığı 320 °C, kolon sıcaklığı 140 °C ve dedektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlandı. Enjeksiyon hacmi 1µl ve taşıyıcı gaz olarak azot kullanıldı. Numunelerdeki alkol miktarı mutlak etanol solüsyonunun farklı konsantrasyonlarda hazırlanmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiği ile belirlendi (Tsuey ve ark., 2006).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çay Örneklerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Çay atığı numunelerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yüzde nem oranı, partikül dağılımı, tane ve gözenek boyut dağılımı, lignin, selüloz ve hemiselüloz analizleri yapılmıştır. Elde edilen analiz verileri Tablo 4.1’de verilmiştir. Kurutulan çay atıklarının yüzde nem oranı % 3,73 (w/w) olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değerin literatürle uyum içindedir (Kacar, 2010). Kurutma etüvünden çıkan çay higroskopik özelliğinden dolayı her koşul altında bir miktar nem absorbe etmektedir. Kurutma etüvünden çıkan çay ise soğumaya bırakıldığında % 3-4 arasında bir neme sahip olmaktadır (Kacar, 1991). Çay numunelerinin nem tutmasını başta çevrenin nem miktarı olmak üzere, çayın türü ve paketlenme koşullarına göre değişmektedir.

Kullanım sonrası öğütülmeden analizi yapılan çay atığının ortalama partikül büyüklüğü 956 µm ve spesifik yüzey alanı ise 0.00817 m²/g olarak elde edilmiştir. Asitte çözünmeyen kül oranı % 0,18 olarak elde edilmiştir, bu değerin literatürde belirtilen aralığa yakın (% 0,1-0,58) olduğu tespit edilmiştir (Kacar, 2010). Çay atığının içerdiği kuru madde bazında lignin, selüloz ve hemiselüloz analizi sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Çay atıklarının biyoetanol üretiminde substrat olarak kullanılması için hemiselüloz ve selüloz toplamını temsil eden holoselüloz miktarı önemlidir.

Tablo 4.1: Çay atığının bazı özellikleri.

Analiz	Yöntem	Birim	Sonuç
Nem	TS 1562	% (w/w)	3,73
Ortalama Partikül Büyüklüğü	Mastersizer	Mikron (µ)	956
Spesifik yüzey alanı	Mastersizer	m ² /gr	0,00817
Ham lif (selüloz)	Fiber Tech. Man	% (w/w)	21,00
%10 HCl’de çözünmeyen kül	TS 1566	% (w/w)	0,180
Suda çözünen kül	TS 1565	% (w/w)	27,18
Lignin	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	37,22
Selüloz	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	21,15
Hemiselüloz	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	23,31
Ekstraktif Madde	(Li, Xu, ve ark., 2004)	% (w/w)	18,32

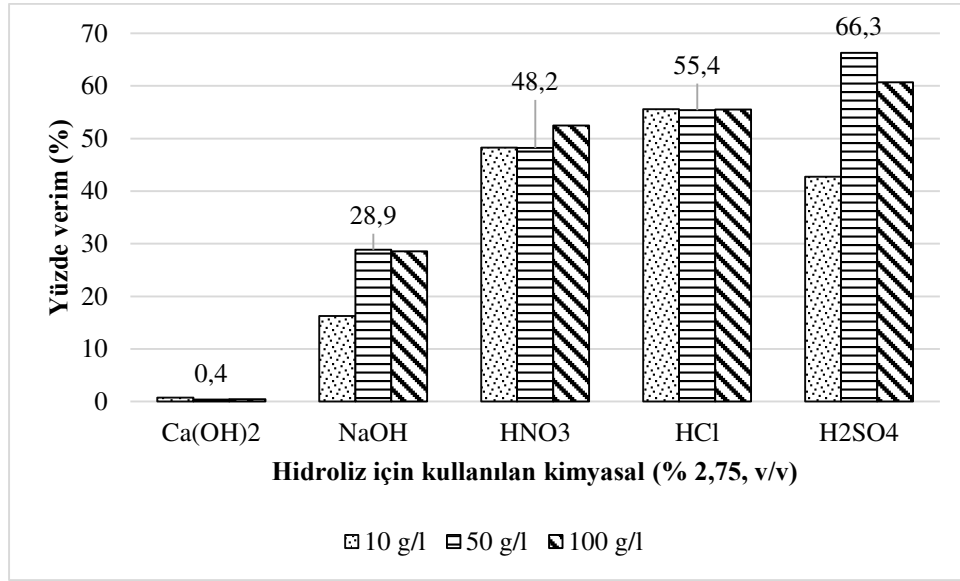
Yapılan analizde çay atığının holoselüloz miktarı kuru madde bazında yaklaşık % 44,5 olarak bulunmuştur. Bu değeri literatürde çay yaprağı ile yapılan bir çalışmada elde edilen sonuca (% 47,7) yakındır (Demirbas, 1999). Holoselüloz miktarı göz önüne alındığında çay atığının önemli oranda hemiselüloz ve selüloz içerdiği görölmektedir.

4.2. ay Atığına Uygulanan Ön İşlemleri Etkileyen Parametreler

Lignoselülozik yapının hidrolizine birçok parametre etki edebilmektedir. Bir lignoselülozik materyal için bulunan optimum koşulları bir diğeri materyal için de optimum koşul olarak değeriendirmek doğru bir yaklaşım olmamaktadır. Çünkü lignoselülozik maddenin selüloz, hemiselüloz ve lignin oranı materyalin türüne, yaşına, alındığı döneme, alındığı yere ve mevsimsel birçok faktöre bağılı olarak değerişiklik gösterebilmektedir. Bu yüzden atığın ön arıtımında hangi yöntemin hidroliz bileşeni olarak kullanılacağına karar verilmesi önemlidir.

4.2.1. Asidik ve Alkali Hidroliz Sonuçları

Bu çalışmada çay atıklarının kimyasal hidrolizinde kullanılacak olan en verimli ön işlemin seçilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarındaki çay atıkları farklı asit ve baz çözeltileriyle otoklavda 121 °C’de 15 dakika muamele edilmiştir. Kullanılan çözeltilere bağılı olarak elde edilen fermente edilebilir şeker verimi değeri (elde edilen indirgen şeker/kullanılan çay atığı) Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Buna göre genel olarak bazik çözeltilerle yapılan ön işlemden hidroliz verimi düşük olurken asidik çözeltilerde elde edilen indirgen şeker miktarları daha fazla olmuştur. ay miktarının artırılmasıyla kalsiyum hidroksit çözeltilerinin hidroliz verim değeriinde herhangi bir artış olmadığı görölmektedir. Sodyum hidroksit için ise çay miktarını 10 g/L den 50 g/L’ye yükseltildiğinde verim değeriinin iki kat arttığı gözlenmiştir. ay miktarının 50 g/L’den 100 g/L’ye çıkarıldığı durumda ise sodyum hidroksit veriminde önemli bir artış görölmemiştir. Nitrik asit çözeltisinin kullanıldığı ön işlemden çay konsantrasyonu 100 g/L’ye çıkarıldığı durumda en yüksek verim değeriine ulaşılmıştır. ay miktarının 10 g/L olduğu koşullarda en verimli hidroliz, hidroklorik asit kullanıldığı durumda elde edilirken çay miktarının artırılmasıyla hidroklorik asit veriminin değerişmediği görölmüştür.



Şekil 4.1: Farklı asit ve baz çözeltileriyle gerçekleştirilen ön işlemler için çay konsantrasyonu-yüzde verim grafiği.

Şekil 4.1'e göre elde edilen en yüksek yüzde verim değerleri Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Çay miktarının 50 g/L ve 100 g/L olduğu durumlarda en verimli asidin sülfürik asit olduğu Şekil 4.1'de görülmektedir. Ancak çay miktarı 50 g/L den 100 g/L ye artırıldığında hidroliz verimi % 66,3 den % 60,7 ye düşmektedir. Çay konsantrasyonunun artırılmasıyla sülfürik asidin hidroliz performansı diğer asitlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Literatür incelendiğinde liginoselülozik atıkların kimyasal hidrolizinde asidik çözeltiler yaygın olarak kullanılmıştır. Hidroklorik asit mısır küspesinde (Kurakake ve ark., 2005), nitrik asit kereste atıklarında (Brink, 1994) ve sülfürik asit ise mısır, buğday ve çeşitli enerji bitkilerinde kullanılmıştır (Balat, Balat, ve Öz, 2008). Kullanılacak asidin seçiminde liginoselülozik hammaddenin yapısı, daha az korozif olması, besi ortamında besin olarak da faydalanılması ve ucuz olması gibi kriterler göz önüne alınmaktadır. Bazik çözeltilerle yapılan çalışmalarda ise yaygın olarak NaOH ve CaOH₂ kullanılırken bir enzimatik hidroliz basamağının da olduğu görülmüştür (Li, Ruan, ve ark., 2004). Bazik ön işlemlerde temel amaç şekerlerin hidrolizi olmayıp materyalin şişmesi ve gözeneklerinin açılarak enzim için yüzey alanını artırması olmaktadır. Yapılan çalışma sonucunda en verimli asidin sülfürik asit olduğu belirlenmesine rağmen optimum hidroliz koşullarının sağlandığını söylemek mümkün değildir. Hidroliz verimine materyalin türü, sıcaklık, süre, partikül boyutu, katı miktarı ve asit konsantrasyonu gibi birçok parametre etki edebilmektedir.

Tablo 4.2: Farklı kimyasalların hidroliz performanslarının karşılaştırılması.

Kimyasal (% 2,75 v/v)	Çay Miktarı (g/L)	Elde edilen indirgen şeker (g/L)	% verim
Ca(OH) ₂	50	0,09	0,4
NaOH	50	6,4	28,9
HNO ₃	50	10,73	48,2
HCl	50	12,73	55,4
H ₂ SO ₄	50	14,74	66,3

4.2.2. Seyreltik H₂SO₄ Ön İşlemi İçin Optimizasyonu Çalışması

Seyreltik sülfürik asidin kullanıldığı ön işlemde optimum koşulların sağlanması ve hidroliz verimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla istatistiksel deney tasarımı metotlarından cevap yüzey metodu (RSM) kullanılmıştır. Merkez noktalara göre belirlenen parametreler için toplamda 50 deney yapılarak her deneyde elde edilen indirgen şeker indirgen şeker konsantrasyonu bağımlı değişken olarak takip edilmiştir. Hidrolizatta var olan indirgen şeker konsantrasyonunu bağımsız değişkenlerin fonksiyonu olarak ifade etmek için kuadratik eşitlik kullanılmıştır.

Modelin uyum derecesi, belirtme katsayısı (R) ve çoklu korelasyon katsayısı (R²) değerlerine bakılarak yorumlanır. R² değeri 1'e ne kadar yakınsa, deneysel ve model değerler arasındaki korelasyon o ölçüde iyidir. Hidroliz verimi için öngörülen modelin R² değeri (0,93) deneysel verilerle model tarafından öngörülen değerlerin uyumunu ifade etmektedir. Başka bir ifadeyle hidroliz veriminin değişiminin % 93'ü bağımsız değişkenlerin etkisiyle olurken, % 7'si ise modelle ifade edilmemektedir.

Regresyon modeline eklenen her bağımsız değişken, bağımlı değişkeni açıklama yeteneği olmasa bile R² değerinin büyümesine neden olabilir. Bu durumda ise modelin açıklayıcılığının artması gibi yorumlanabilir. Bu yüzden modele katkısı olmayan değişkenler dikkate alarak daha gerçekçi bir R² değeri hesaplanmakta ve bu değer ayarlanmış/düzeltilmiş R² (Adj. R²) olarak ifade edilmektedir. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi modelin R² değeri % 93 iken, düzeltilmiş R² değeri % 89'a düşmüştür.

Tablo 4.3: Model uygunluğunun test edilmesinde kullanılan istatistik değerleri.

Standart sapma	3,35	R ²	0,93
Ortalama	23,42	Adj R ²	0,89
C.V. %	14,28	Pred R ²	0,75
Press	1240,37	Adeq Precision	14,53

Düzeltilmiş R^2 (Adj R^2) değeri modelin belirleyiciliğinin yorumlanmasında ilk başvurulacak büyüklüktür. Yeterli kesinlik (Adeq. precision), sinyal gürültü oranını gösterir. Sinyal gürültü oranının ise 4' ün üstünde olması beklenir. Bu çalışmada elde edilen sinyal gürültü oranı (14,53) yeterli sinyale işaret etmektedir.

Kodlu değerler cinsinden önerilen kuadratik model denklemi aşağıda verilmiştir. Denklemden bağımsız değişkenlerin katsayısı ve işareti, hidroliz verimini etkileme ölçüsü olarak kabul edildiğinde, sıcaklık ve sürenin etkileşimi (AB) kuadratik denklemi en fazla değiştirmektedir.

$$\text{Hidroliz verimi (\%)} = (77,12) + (0,58 \times A) + (5,25 \times B) + (5,09 \times C) + (2,49 \times D) + (1,27 \times E) - (18,99 \times A \times B) + (0,99 \times A \times C) - (1,59 \times A \times D) + (1,23 \times A \times E) + (2,05 \times B \times C) - (3,55 \times B \times D) - (1,45 \times B \times E) + (1,00 \times C \times D) - (0,64 \times C \times E) - (9,15 \times A^2) - (8,25 \times B^2) - (4,95 \times C^2) - (4,94 \times D^2) - (0,97 \times E^2).$$

Tablo 4.4'te incelenen bağımsız değişkenler ve birbiri ile etkileşiminin hidroliz verimine etkileri verilmiştir.

Tablo 4.4: İkinci dereceden (kuadratik) cevap yüzey modelin ANOVA sonuçları.

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri	p-değeri Prob > F
Model	23532,29	1238,5	21,92	< 0,0001
A-Sıcaklık (°C)	14,36	14,3	0,25	0,6179
B-Süre (dk.)	1197,4	1197,4	21,18	< 0,0001
C-Katı konsantrasyonu (g/L)	1123,7	1123,7	19,88	0,0001
D-Asit konsantrasyonu (% v/v)	268,9	268,9	4,75	0,0371
E- G.O.B.P (μ)	70,8	70,8	1,25	0,2716
AB	11545,1	11545,1	204,29	< 0,0001
AC	31,4	31,4	0,55	0,4614
AD	80,8	80,8	1,43	0,2409
AE	48,4	48,4	0,85	0,3619
BC	134,0	134,0	2,37	0,1341
BD	403,7	403,7	7,14	0,0120
BE	68,1	68,1	1,20	0,2809
CD	32,0	32,0	0,56	0,4570
CE	13,1	13,1	0,23	0,6326
A ²	4653,2	4653,2	82,34	< 0,0001
B ²	3785,0	3785,0	66,97	< 0,0001
C ²	1362,6	1362,6	24,11	< 0,0001
D ²	1359,3	1359,3	24,05	< 0,0001
E ²	52,6	52,6	0,93	0,3421

Modelin F değerinin 21.92 olması modelin önemli olduğunu göstermektedir. Burada incelenen parametreler için Prob>F değeri 0,05 den küçük olanlar bağımlı değişken olan hidroliz verimi üzerine etkisi önemlidir. F değeri 0.1'den büyük olan parametreler ise model için önemsiz olarak değerlendirilir. Buna göre; süre (B), katı konsantrasyonu (C), asit konsantrasyonu (D), sıcaklık-süre (AB), süre-asit konsantrasyonu (BD), A^2 , B^2 , C^2 ve D^2 önemli parametrelerdir. Bununla birlikte sıcaklık, katı konsantrasyonu, asit konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü parametrelerinin birbiri ile etkileşiminin hidroliz verimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

4.2.2.1. Sıcaklığın Etkisi

Şekil 4.2'de sıcaklığın hidroliz verimi üzerine etkisini gösteren grafikler verilmiştir. ANOVA tablosu göz önüne alındığında sıcaklığın (A) Prob>F değeri 0,6179 olarak elde edilmiş olup hidroliz verimi üzerine etkisinin önemli olmadığı görülmektedir.

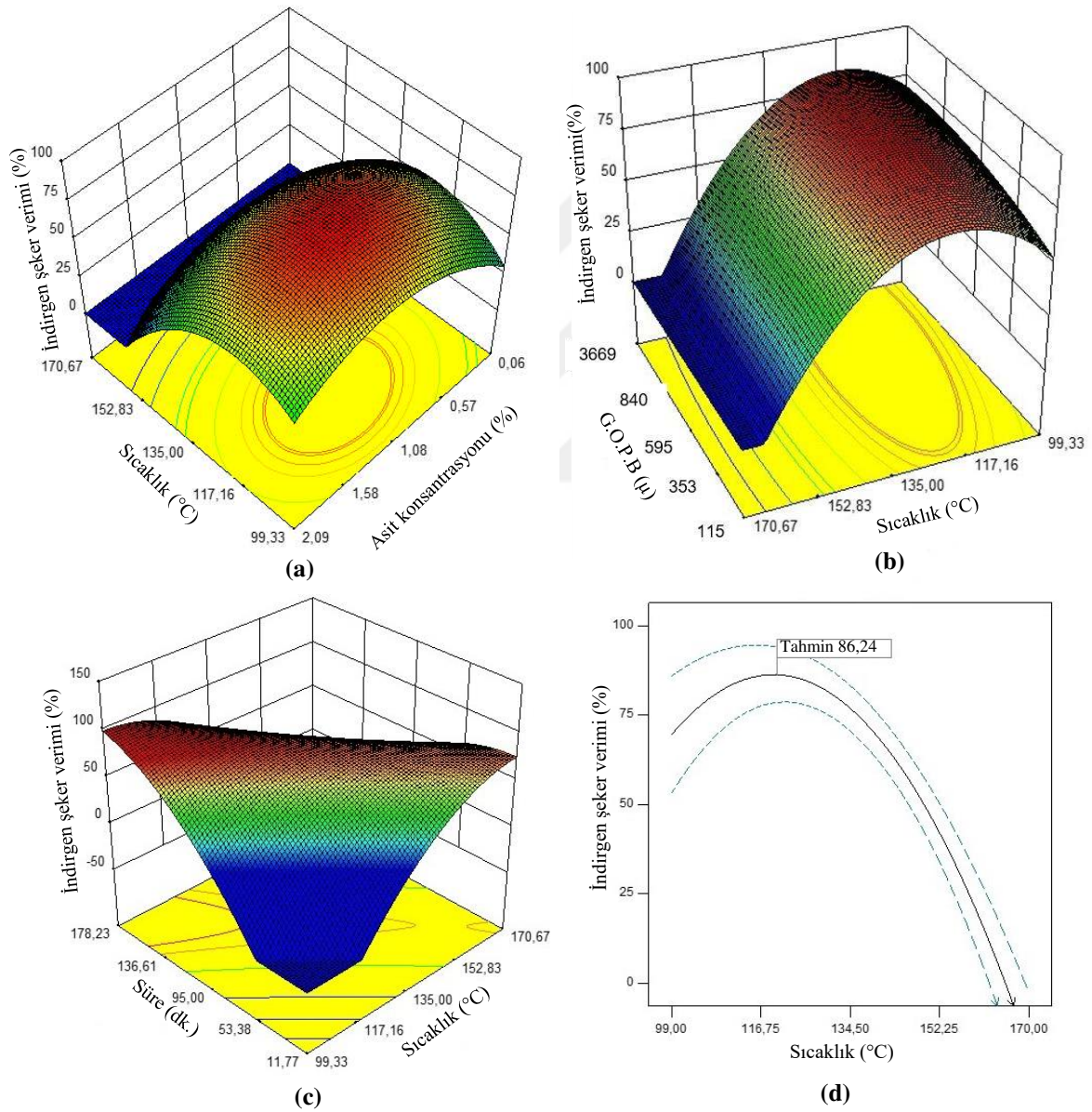
Şekil 4.2. (a)'de asit konsantrasyonu ile sıcaklık (AD) arasındaki etkileşim ve hidroliz verimi üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Buna göre asit konsantrasyonu ve sıcaklığın düşük olduğu noktalarda verim değeri oldukça düşük gözlenirken, yüksek asit konsantrasyonlarında sıcaklık 130 civarına ulaştığında verim maksimum değerine yaklaşmaktadır. Bu sıcaklık değerinin üzerine çıkıldığında, indirgen şekerlerin bozunarak fenolik bileşenleri meydana getirdiği ve bunun sonucunda hidroliz veriminin azaldığı düşünülmektedir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal, 2000). Sıcaklık ve asit konsantrasyonu arasındaki ikili etkileşimin hidroliz verimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı (Prob>F değeri 0,2409) görülmektedir.

Şekil 4.2. (b)'de sıcaklık ve partikül boyutu (AE) arasındaki etkileşimin hidroliz verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik verilmiştir. Grafik göz önüne alındığında sıcaklık sabit tutulmak suretiyle partikül büyüklüğü değişmesi durumunda hidroliz veriminde önemli bir değişim gözlenmemektedir. Partikül boyutunun sabit tutularak sıcaklığın artırıldığı durumda ise hidroliz verimi 117-135 °C aralığına kadar artmakta ve bu değer üzerine çıkıldığında ise azalmaya başlamaktadır.

Şekil 4.2. (c)'de sıcaklık ve süre (AB) arasındaki etkileşimin hidroliz verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik verilmiştir. ANOVA tablosu göz önüne alındığında AB kaynağına ait Prob>F değerinin < 0,0001 olarak elde edildiği görülmektedir. Buna göre sıcaklık ve sürenin ikili etkileşiminin hidroliz verimi üzerine etkisinin önemli olduğu söylenebilir. Grafik göz önüne alındığında ise sıcaklık ve sürenin her ikisinin de düşük olduğu noktalarda

verim oldukça düşük gözlenmektedir. Ancak yüksek sıcaklık-düşük süre ve düşük sıcaklık-yüksek süre değerlerinde verim değerinin yükseldiği görülmektedir.

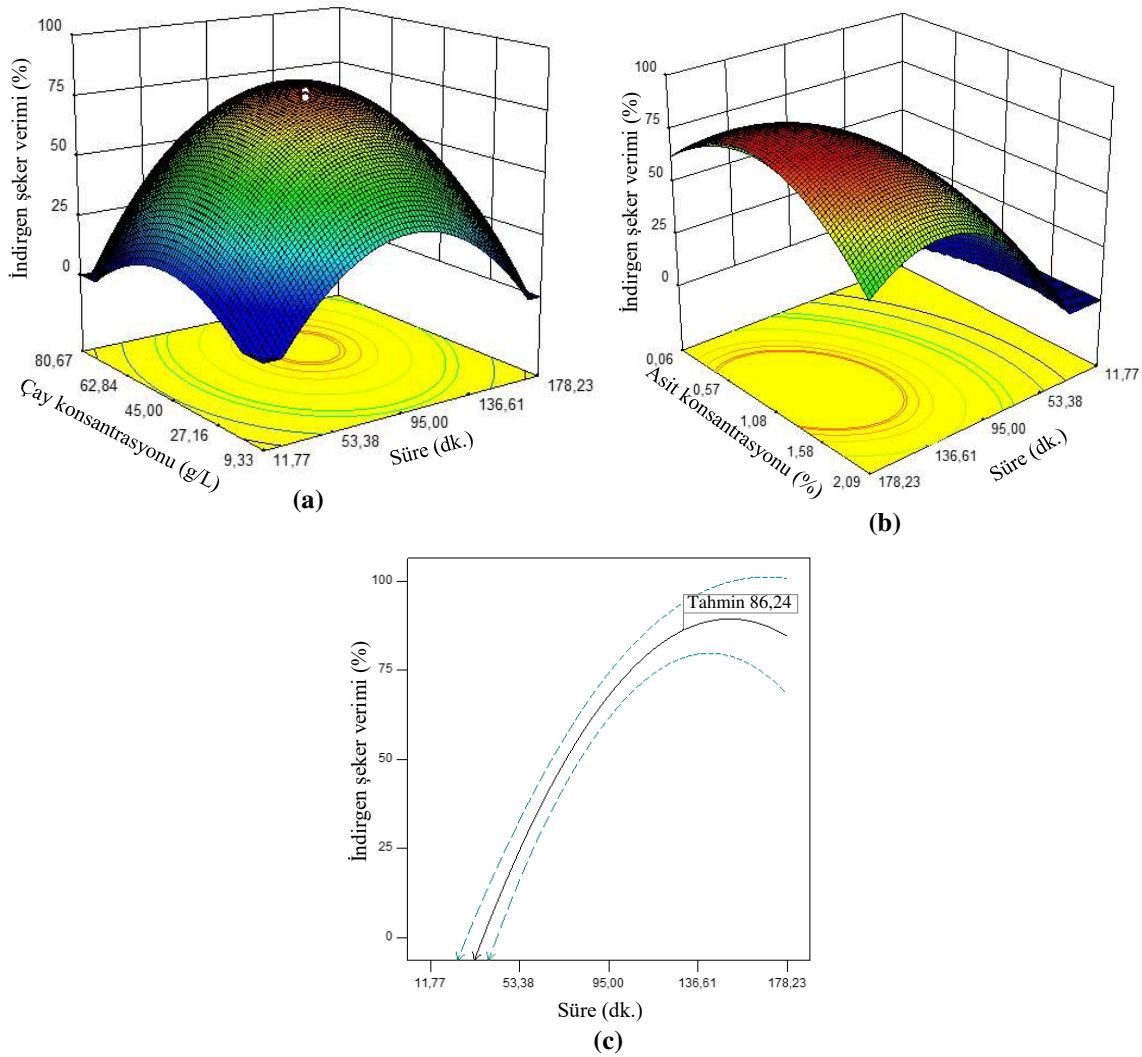
DeneySEL sonuçlara göre sıcaklığın 120-130 °C aralığında optimum değerine ulaştığı grafiklerde görülmektedir. Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla sıcaklığın tek başına hidroliz verimine olan etkisine bakıldığında Şekil 4.2. (d)'de sıcaklığı 135 °C'nin üzerine çıkarmanın verimi etkin bir şekilde düşürdüğü görülmektedir.



Şekil 4.2. a) Optimum deney şartlarında sıcaklık ve asit konsantrasyonunun etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Optimum deney şartlarında sıcaklık ve partikül büyüklüğü etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., c) Optimum deney şartlarında sıcaklık ve süre etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., d) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla sıcaklığın hidroliz verimine tek başına etkisi.

4.2.2.2. Sürenin Etkisi

Sürenin hidroliz verimine etkisini gösteren grafikler Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Şekil 4.3. (a)’da görüldüğü üzere süre yaklaşık 95-136 dakika aralığında optimum değerine ulaşmaktadır. Şekil 4.3. (b)’de ise süre-asit konsantrasyonu (BD) etkileşimini gösteren cevap yüzey grafiği verilmiştir. Süre ve asit konsantrasyonu arasındaki etkileşimin önemli ($\text{Prob}>F$ değeri 0,012) olduğu görülmüştür, en yüksek hidroliz verimine ise % 1,1 (v/v) asit ve 135-140 dk. zaman aralığında ulaşılmıştır. Şekil 4.3 (c)’de ise diğer parametreler optimum koşullarda kabul edilmek üzere sürenin hidroliz verimine tek başına etkisi görülmektedir. Buna göre süre artırıldığında hidroliz verimi belirgin bir şekilde artmaktadır. Hidroliz süresinin 150 dk. üzerine çıkarıldığı durumlarda ise fermente edilebilir hale gelen şekerlerin ikincil bir bozunma ile çeşitli fenolik bileşenlere dönüştüğü söylenebilir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal, 2000).

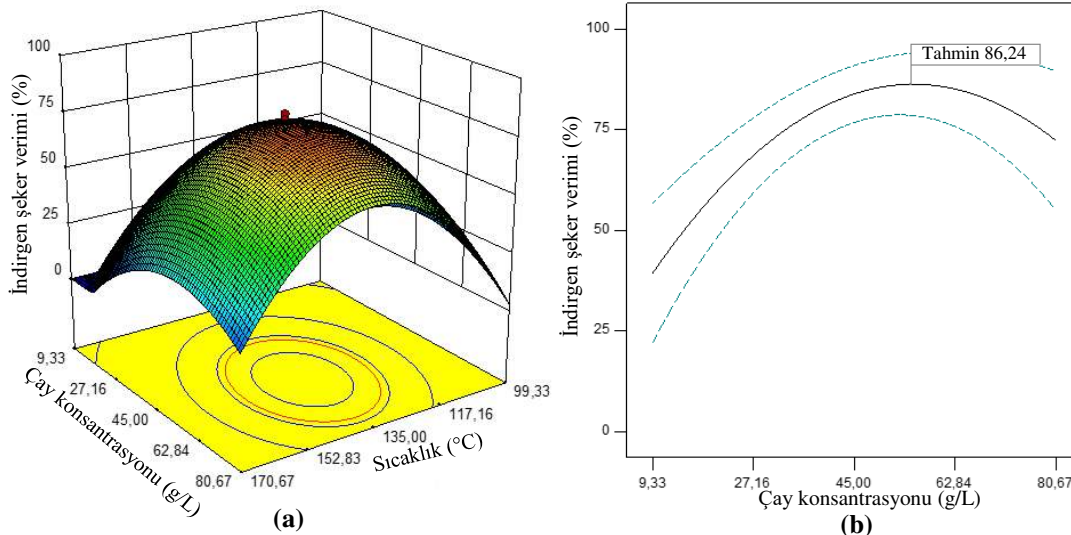


Şekil 4.3. a) Optimum deney şartlarında süre ve çay miktarı etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., **b)** Optimum deney şartlarında süre ve asit konsantrasyonu etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., **c)** Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla sürenin hidroliz verimine tek başına etkisi.

4.2.2.3. Çay Konsantrasyonunun Etkisi

Şekil 4.4’de bağımlı değişken olan hidroliz verimine katı (çay) konsantrasyonunun etkisini gösteren grafikler verilmiştir. Şekil 4.4 (a)’da çay miktarı ve sıcaklık etkileşiminin hidroliz verimi üzerine etkisinin görüldüğü üç boyutlu cevap yüzey grafiği verilmiştir. Buna göre sıcaklık ve çay miktarının her ikisinin ayrı ayrı yüksek veya düşük olduğu noktalarda hidroliz verimi azalmaktadır. Ancak çay miktarının yüksek olduğu noktalarda sıcaklığı artırmanın bir noktaya kadar verimi artırdığı görülmektedir. En yüksek hidroliz verimine (% 86,24 g İŞ/g çay) yaklaşık 50 g/L çay konsantrasyonu ve 135 °C sıcaklık uygulandığında ulaşılmaktadır. Ancak çay miktarı ve sıcaklığın ikili etkileşiminin hidroliz verimi üzerine etkisinin önemli (Prob>F değeri 0,4614) olduğunu söylemek mümkün değildir.

Şekil 4.6 (b) katı miktarının hidroliz verimine etkisini göstermekte olup diğer bağımsız değişkenler optimum koşullarda değerlendirilmiştir. Buna göre çay miktarı düşük (<40 g/L) tutulduğunda hidroliz verimi düşük elde edilirken yüksek tutulduğunda verim yükselmektedir. Ancak belli bir noktadan (~60 g/L) sonra verimde azalma gözlemlenmiştir. Bu duruma sebep olarak çayın su tutma kapasitesinin yüksek (higroskopik) bir materyal olması düşünülmüştür (Kacar, 2010). Zira çay miktarının fazla tutulduğu durumlarda elde edilen hidrolizat, göreceli olarak daha az olmakla birlikte suyun büyük bir kısmı tutulduğu için asit konsantrasyonu optimum noktanın üzerine çıkarak indirgen şekerlerin de bozunmasına neden olmaktadır (Lenihan ve ark., 2010).



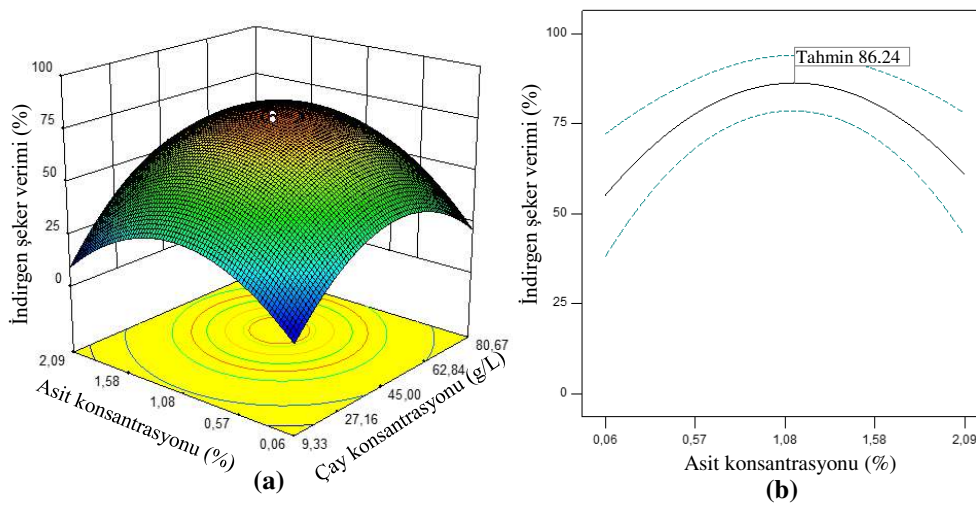
Şekil 4.4 a) Optimum deney şartlarında çay miktarı ve sıcaklık etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla katı miktarının hidroliz verimine tek başına etkisi.

4.2.2.4. Asit Konsantrasyonunun Etkisi

Bağımlı değişken olan hidroliz veriminin süre ve asit konsantrasyonu (BD) ile değişimini açıklayan grafik Şekil 4.3 (b)'de verilmiştir. Buna göre hidroliz süresinin kısa tutulduğu durumda asit konsantrasyonu artırılırsa hidroliz verimi önemli oranda artmaktadır. Diğer taraftan asit konsantrasyonunun yaklaşık % 1 civarında tutulduğu durumda sıcaklığın artırılmasıyla hidroliz veriminin arttığı tespit edilmiştir. Modele ait ANOVA tablosu incelendiğinde BD kaynağına ait Prob>F değerinin 0,0120 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer 0,05'den küçük olup istatistiksel olarak bu değişkenin etkisinin önemli olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.5. (a)'da ise hidroliz veriminin asit konsantrasyonu ve çay konsantrasyonunun ikili etkileşimi ile değişimini gösteren cevap yüzey grafiği verilmiştir. Buna göre en yüksek hidroliz verimine (% 86,24 g İŞ/g çay) yaklaşık % 1,1 (v/v) asit konsantrasyonu ve 45-62 g/L çay konsantrasyonu kullanıldığı koşullarda ulaşılmaktadır. CD kaynağına ait Prob>F değeri ise (0,0120) asit ve çay konsantrasyonları arasındaki ikili etkileşimin önemli olmadığını ifade etmektedir.

Şekil 4.5. (b)'de verilen grafikte ise asit konsantrasyonunun hidroliz verimine tek başına etkisi görülmektedir. Hidroliz verimini etkileyen diğer bağımsız değişkenler optimum noktalarda tutulduğu durumda asit konsantrasyonu bir optimum değere ulaşmaktadır. Buna göre asit konsantrasyonunun düşük (< % 0,5) ve yüksek (> % 1,5) olduğu noktalarda hidroliz verimi önemli oranda azalmaktadır. Bu sonuç literatürde pirinç samanı ile yapılan bir optimizasyon çalışmasıyla uyum içerisindedir (Baek ve Kwon, 2007).



Şekil 4.5. a) Optimum deney şartlarında asit konsantrasyonu ve çay konsantrasyonu etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., **b)** Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla asit konsantrasyonunun hidroliz verimine tek başına etkisi.

4.2.2.5. Partikül Boyutunun Etkisi

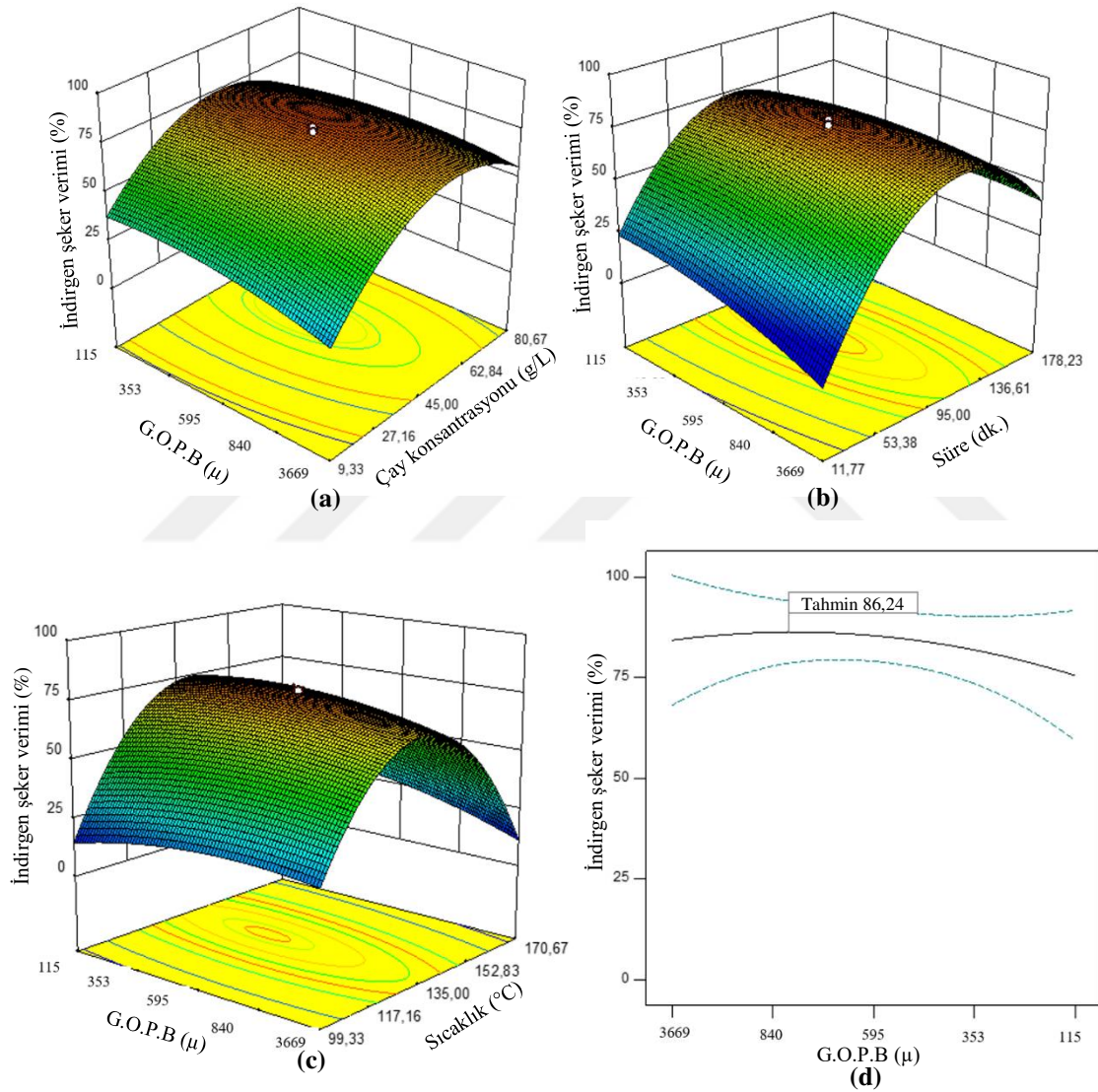
Şekil 4.6'da geometrik ortalama partikül büyüklüğüne (G.O.P.B) bağlı olarak hidroliz veriminde meydana gelen değişimleri gösteren cevap yüzey grafikleri verilmiştir. Şekil 4.6. (a)'da bağımlı değişken olan hidroliz verimine çay konsantrasyonu ve partikül boyutunun (CE) eşzamanlı etkisi görülmektedir. G.O.P.B sabit tutularak çay konsantrasyonunun 62 g/L civarına kadar artırılması durumunda hidroliz veriminin arttığı görülmektedir. Çay konsantrasyonunun sabit tutularak G.O.P.B'nin değişmesi durumunda ise hidroliz veriminde önemli bir değişiklik gözlenmemektedir. Grafikte belirlenen konturlar göz önüne alındığında yaklaşık 595 G.O.P.B ve 45-62 g/L çay konsantrasyonu aralığında optimum nokta belirlemektedir.

Bağımlı değişken olan hidroliz verimi üzerine süre ve partikül boyutunun (BE) ikili etkileşiminin gösterildiği cevap yüzey grafiği Şekil 4.6 (b)'de verilmiştir. ANOVA tablosu göz önüne alındığında BE kaynağına ait Prob>F değerinin 0,2809 olarak elde edildiği görülmektedir. Bu değer iki parametrenin değişiminin hidroliz verimi üzerine etkisinin önemli olmadığını ifade etmektedir. Buna göre incelenen aralıktaki tüm partikül noktalarında sürenin artırılmasıyla birlikte hidroliz verimi 130. dakikalara kadar artmaktadır. Diğer taraftan süre sabit tutularak farklı boyutlara bakıldığında partikül boyutunda artma yada azalmanın hidroliz verimine etkisinin kayda değer miktarda olmadığı anlaşılmaktadır.

Bağımsız değişkenlerden sıcaklık ve partikül boyutunun (AE) ikili etkileşimini gösteren cevap yüzey grafiği Şekil 4.6 (c) verilmiştir. ANOVA tablosunda Prob>F değeri 0,3619 olarak elde edilen AE etkileşimi önemli olmayıp grafikte oluşan konturlar göz önüne alındığında ise partikül boyutu değişiminde oluşan konturların sıcaklık değişiminde gözlenen konturlara göre daha uzun olduğu görülmektedir. Partikül boyutunun sabit tutularak sıcaklığın artırılması durumunda hidroliz veriminin yaklaşık 130-135 °C aralığına kadar arttığı görülmektedir. Bu değer üzerine çıkıldığında ise hidroliz verimi azalamaya başlamaktadır. Diğer taraftan sıcaklığın sabit tutularak partikül boyunun değiştirilmesi durumunda hidroliz veriminde kayda değer bir değişiklik gözlenmemektedir.

Şekil 4.6. (d)'de ise diğer parametreler optimum noktalarda tutulmak suretiyle partikül boyutunun hidroliz verimi üzerine tek başına etkisi görülmektedir. Bu grafik göz önüne alındığında ise partikülü daha küçük hale getirmenin kısmen de olsa hidroliz verimini azalttığı görülmektedir. Ayrıca partikül boyutunu küçültmek bazen de kümelenme ve tekrar birleşme gibi negatif etkilere neden olmaktadır (da Silva ve ark., 2010; Talebnia, Karakashev, ve Angelidaki, 2010).

Buğday örnekleriyle yapılan bir çalışmaya göre; numuneleri 3200 μm 'ye kadar öğütmek için gerekli enerji 11,4 kWh iken, 800 μm 'ye kadar öğütmek için gerekli enerjinin 51,6 kWh olduğu gösterilmiştir (Sarkar ve ark., 2012). Öğütülmeyen çay atıklarının ortalama partikül büyüklüğü 956 μm (~18 mesh) olup bu değer incelenen aralıkta kalmaktadır (bkz. EK 3). Bu durumda elde edilen deneysel verilere göre, kullanım sonrası açığa çıkan çay atıklarının öğütülmesinin hidroliz verimine katkısı düşük olacağı gibi maliyeti de artıracaktır.



Şekil 4.6 a) Optimum deney şartlarında partikül boyutu ve çay konsantrasyonu etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., b) Optimum deney şartlarında partikül boyutu ve süre etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., c) Optimum deney şartlarında partikül boyutu ve sıcaklık etkileşiminin hidroliz verimine etkisi., d) Diğer parametreler optimum noktalarda olmak şartıyla partikül boyutunun hidroliz verimine tek başına etkisi.

4.2.2.6 Seyreltik H₂SO₄ ile Optimizasyon ve Doğrulama Deneyi Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen koşullar Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: Hidroliz veriminin bağımsız değişkenlere göre oluşturulmuş optimizasyon sonuçları.

Sayı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Çay kons. (g/L)	Asit kons. (% v/v)	G.O.P.B (μ)	Verim (%)
18	120	130	55	1,13	840	86,24

Elde edilen sonuçların güvenilirliğinin belirlenmesi amacıyla istatistiksel değerlendirmeler sonucunda ulaşılan optimum değerlerin doğrulama deneyi yapılmıştır. Doğrulama deneyi, optimizasyonda önerilen ön işlem koşullarında deneylerin tekrar yapılması olarak tanımlanmaktadır. Doğrulama deneylerinin yapılmasında optimizasyon çalışmasının çözüm önerileri ile doğrulama deneyinden elde edilen gerçek değerlerin karşılaştırılması hedeflenir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen beş paralel deneme sonucunda elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu ve hidroliz verimi Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Uygulanan doğrulama deneyinde asit konsantrasyonu % 1,15, G.O.B.P. 840 μ ve diğer parametreler optimizasyon tablosunda verildiği gibi alınarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Doğrulama deneyi sonucunda 55 g/L çay içeren hidrolizat ortamında 20,74 g/L konsantrasyonunda indirgen şeker saptanmıştır. Bu durumda elde edilen verim değeri % 84,7 olup modelin tahmin ettiği değere yakın olduğu görülmüştür. Holoselüloz miktarı % 44,5 (w/w) olan atık çayın optimum koşullarda hidroliz edilmesiyle toplam şekerlerin % 85'inin dönüştüğünü söylemek mümkündür.

Sonuç olarak bağımlı değişken hidroliz veriminin, model tarafından tahmin edilen ve doğrulama deneyi sonunda elde edilen deneysel değerleri arasındaki hata yüzdesinin % 2'nin altında olduğu görülmektedir. Bağımlı değişken üzerine etkisi araştırılan beş bağımsız değişkeni içeren deneysel tasarımın kullanılabilir özellikte olduğunu söylemek mümkündür.

Tablo 4.6: Doğrulama deneyi sonuçları.

Çay atığı	Çay konsant. (g/L)	İndirgen şeker (g/L)	Verim (%)	Optimum verim (%)	Optimuma göre ulaşılan verim (%)
Evsel	55	20.74	84.7	86.24	98.21

4.2.3. Farklı Çay Örneklerinin Seyreltik H₂SO₄ ile Hidrolizi

Deneyisel çalışmalarda kullanılan evsel atık çay, yeşil çay ve fabrika atığı çay numunelerinin evsel atık çay için saptanan optimum koşullarda asidik hidroliziyle elde edilen indirgen şeker konsantrasyonları Tablo 4.7’de verilmiştir. Bu verilere göre demlenmiş çay posası, yeşil çay ve çay fabrikası atığına göre daha fazla miktarda indirgen şeker içermektedir. Asidik hidroliz basamağında deneyisel tasarımı evsel çay atığı için yapıldığından için en yüksek verim (% 86,24) burada elde edilmiştir. Elde edilebilecek en yüksek verimin % 44,5 olduğu göz önüne alındığında tüm şekerlerin % 85’inin dönüştüğünü söylemek mümkündür.

Asidik ön işleme elde edilen diğer verim değerleri göz önüne alındığında en düşük verim (% 66) fabrika atığı çayda görülmüştür. Fabrika atığı çayın pirolizi üzerine yapılan bir çalışmada atığın holoselüloz miktarı % 51,6 olarak bulunmuştur (Tiftik, 2006). Seyreltik asidik hidroliz metodunun kullanıldığı deneme de ise bu şekerlerin % 34’ü hidrolizat ortamına alınabilmiştir. Çay fabrikası atığı için ise verimi % 66 olarak elde edilmiştir.

Kullanılmamış paket çay örnekleri ise çayın demlenme sırasında şeker kaybına neden olup olmadığını incelemek amacıyla kullanılmıştır. Buna göre çayın içecek amacıyla demlenmesi sırasında önemli bir miktarda şeker kaybı olmamaktadır. Demlenmenin de bir ön işlem olduğu kabul edilirse paket çay numuneleri bu ön işlem aşamasından geçirilmediği için verim değerinin % 36 olarak elde edildiği düşünülebilir. Dönüşüm yüzdesine bakıldığında ise atık çaya yakın % 80 olarak elde edilmiştir.

Yeşil çay yaprağı kuru madde bazında yaklaşık % 64,4 holoselüloz içermektedir (Chen ve ark., 2009). Optimum koşullarda gerçekleştirilen seyreltik asidik hidroliz işlemiyle yeşil çay örneklerinde bulunan holoselüloz yapıdan şekerlerin % 57’si hidrolizat ortamına alınabilmiştir. Diğer çay örneklerine kıyasla en düşük verim değerine sahip yeşil çay örnekleri, hidrolizat ortamında bulunan indirgen şeker konsantrasyonu bakımından göre en yüksek değere sahiptir.

Tablo 4.7: Farklı çay örneklerinin belirlenen optimum koşullarda asidik hidrolizi sonucu elde edilen indirgen şeker miktarları.

Materyal	Kullanılan miktar (g)	Elde edilen indirgen şeker (g)	Verim (%)
Evsel çay atığı	13,75	5,19	84,7
Fabrika atığı	13,75	4,63	66
Yeşil çay	13,75	5,20	57
Paket çay	13,75	5,01	81

4.2.4. Farklı Çay Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi

Asidik ön işlem uygulanan farklı çay örnekleri filtre ile süzildükten sonra yıkama işlemi yapılmadan enzimatik hidroliz işlemine tabi tutulmuştur. Optimum koşullarda uygulanan asidik hidroliz sonrası uygulanan enzimatik hidroliz işlemi sonunda elde edilen İŞ ve verim değerleri Tablo 4.8’de verilmiştir. Optimizasyonun evsel çay atığı için yapıldığı göz önüne alındığında elde edilen verimin maksimum % 84,7 olduğu bulunmuştur (Tablo 4.7). Analitik yöntemle holoselüloz miktarı % 44,5 (w/w) olarak bulunan evsel çay atığından elde edilen toplam hidroliz verimi ise % 107 olarak elde edilmiştir. Demirbaş yapmış olduğu bir çalışmada atık çayın holoselüloz miktarını % 47,7 (w/w) olarak elde etmiştir (Demirbaş., 1999). Bu veriler göz önüne alındığında çay atığında bulunan şekerlerin tamamına yakınının hidrolizat ortamına alındığını söylemek mümkündür. Toplam hidroliz veriminin (% 107) beklenen değerlerden yüksek çıkmasına posanın yıkanmadan hidrolize alınmasının sebep olduğu düşünülmüştür.

Yeşil çay örneklerinde ise 13,75 g numuneden yaklaşık 8 g şeker elde edilmiştir. Yeşil çay yaprağında holoselüloz miktarının (% 64,4) işlenmiş çaya göre yüksek olması beklenen bir sonuçtur (Chen ve ark., 2009). Yeşil çayın işlenme prosesiyle siyah çaya dönüştürülmesinde kuru madde bazında şeker kaybetmesi söz konusudur. Asidik ve enzimatik hidroliz sonucunda yeşil çayın toplam hidroliz verimi % 90 olarak elde edilmiştir. Seyreltik asit hidrolizi işleminde fabrika atığı çaydan indirgen şeker verimi % 66 olarak bulunmuştur (Tablo 4.7). Asidik hidroliz sonrasında ticari enzim karışımının kullanıldığı enzimatik hidrolizde ise yaklaşık 3,4 g daha indirgen şeker sıvı ortama geçmiştir. Böylece enzimatik hidroliz ile beraber yapıdaki şekerlerin yaklaşık % 84’ü toplam hidrolizat ortamına alınmıştır

Paket çayın asidik hidroliz verimi ise % 81 olarak elde edilmişti (Tablo 4.7). Enzimatik hidrolizle birlikte toplam hidrolizatta elde edilen indirgen şeker miktarı ise 5,88 g olup yaklaşık % 96 verimle hidroliz işlemleri gerçekleşmiştir (Tablo 4.8). Paket çay örneklerinin bir ön işlem olarak düşünülmesi gereken demlenme aşamasından geçmemesi, verimin atık çaya göre düşük olmasının etkenlerinden biri olarak düşünülebilir.

Tablo 4.8: Asidik hidroliz sonrası yıkanmamış örneklerin enzimatik hidrolizi sonrası elde edilen toplam hidrolizatın indirgen şeker miktarları.

Materyal	Kullanılan miktar (g)	Elde edilen indirgen şeker (g)	Verim (%)
Evsel çay atığı	13,75	6,66	107
Fabrika atığı	13,75	5,90	84
Yeşil çay	13,75	8,03	90
Paket çay	13,75	5,88	96

4.2.5. Kimyasal Detoksifikasyon

Kimyasal detoksifikasyon işlemi atık, yeşil ve paket çay örnekleri için gerçekleştirilmiş olup farklı asit konsantrasyonu ve sürede hidroliz edilen örneklerin Martinez ve arkadaşlarının metoduna göre iki farklı dalga boyunda spektrofotometrik absorbanları okunmuştur (Martinez ve ark., 2000). Detoksifikasyon sonunda örneklerin bu iki dalga boyunda absorbanı tekrar okunarak ppm cinsinden furan (HMF+Furfural) konsantrasyonu elde edilmiştir. Ön işlem uygulanan tüm çay örneklerinin detoksifikasyondan öncesi ve sonrası için toplam furan (+furfural) miktarları Ek 2’de verilmiştir.

Tablo 4.9’da atık çay örneğinin farklı asit konsantrasyonlarında 10 dk. hidroliz edilmesi sonucunda oluşan ve giderilen furan miktarları özetlenmiştir. Verilen sonuçlara göre genel olarak asit konsantrasyonunun artırılmasıyla oluşan furan miktarının arttığını söylemek mümkündür. Atık çay örneklerinin asidik hidrolizinde 26 ppm ile en fazla furfuralın oluştuğu koşul % 3 (v/v) H₂SO₄ ve 30 dk. süreyle gerçekleştirilen işlemde gözlenmiştir. Yapılan detoksifikasyon işlemiyle hidrolizatta bulunan furfural konsantrasyonu 9,8 ppm değerine düşürülmüş olup yaklaşık 16,2 ppm furfural nötralize edilmiştir (bkz. Tablo E2.1). Atık çay örneklerinin detoksifikasyon verimine bakıldığında ise furfural gideriminin en az olduğu koşulda % 21 verimle furfural konsantrasyonu 2,1 ppm den 1,6 ppm değerine azalmıştır.

Yeşil çay örneklerinin asidik hidrolizinde ise en fazla furan oluşumu 33,9 ppm olup bu sonuç % 3 (v/v) H₂SO₄ ve 60 dk. hidroliz süresinin uygulandığı koşulda görülmüştür (bkz. Tablo E2.2). Detoksifikasyon verim değerlerinin farklı olmasını asit konsantrasyonu ve sürenin etkisinin önemli olduğunu söylemek mümkündür. Kullanılan çayın türü, asit konsantrasyonu ve hidroliz süresine göre detoksifikasyon metodunun optimizasyonunun gerekliliği görülmektedir.

Tablo 4.9: Atık çay örneğinin farklı konsantrasyondaki asit çözeltilerinde hidroliz edilmesi sonucunda elde edilen detoksifikasyon değerleri.

Atık çay	Hidroliz zamanı (dk.)	Kullanılan asit % (v/v)	Detoksifikasyon öncesi (ppm)	Detoksifikasyon sonrası (ppm)	Giderim yüzdesi (%)
A0	10	0	2,1	1,6	24
A0.5	10	0,5	2,6	0,0	100
A1	10	1	4,2	0,6	85
A2	10	2	0,1	0,0	100
A3	10	3	4,2	1,1	74
A4	10	4	2,2	1,4	32

4.3. Fermantasyonla Biyoetanol Üretim Deneyleri

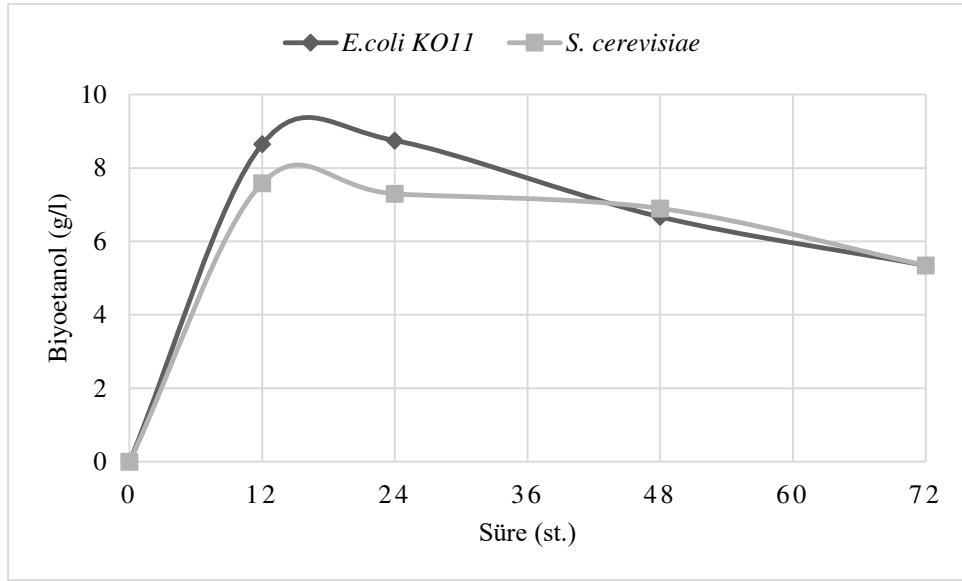
4.3.1. Farklı Mikroorganizmaların Biyoetanol Üretim Performansı

Atık çaydan elde edilen hidrolizatlarda biyoetanol üretim deneylerine geçilmeden önce mikroorganizmalar kendi yapay besi ortamlarında fermantasyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla *E.coli* KO11 için modifiye LB besi ortamı ve *S. cerevisiae* ise YPD sıvı besi ortamları kullanılmıştır. 72 saat süren fermantasyon süresince farklı zaman aralıklarında ortamdan örnekler alınarak indirgen şeker ve biyoetanol analizleri yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.10'da özetlenmiştir. Tablo 4.10'de verilen sonuçlar göz önüne alındığında rekombinant *E.coli* KO11 glikoz içeren ortamda 12 saat sonunda ortamda substratın büyük bir kısmını tüketerek 8,65 g/L biyoetanol üretmiştir. Tüketilen glikoz *E.coli* KO11 için yaklaşık 20 g/L olup stokiometrik denkleme göre (teorik) 10,2 g/L biyoetanol üretmesi beklenirken maksimum 8,75 g/L biyoetanol üretebilmiştir. Bu değer ile *E.coli* KO11 teorik olarak ulaşabileceği değerin yaklaşık % 86'sına ulaşabilmiştir. Biyoetanol üretme verimini karıştırma hızı, sıcaklık ve inokülasyon miktarı gibi fiziksel parametrelerin de etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *E.coli* KO11 kullanarak yapılan bir çalışmada 72 saat süren fermantasyonun ilk 8 saatinin aerobik olarak gerçekleştirilmesi durumunda verim değeri inokülasyondan itibaren anaerobik gerçekleştirilen duruma göre % 50 daha verimli olduğu sonucu elde edilmiştir (Deniz, 2011).

Şekil 4.7 göz önüne alındığında *E.coli* KO11'in maksimum biyoetanol konsantrasyonuna 12-24 saat aralığında ulaştığı görülmektedir. Yapılan çalışmada ise *E.coli* KO11 ile ulaşılan verim değeri 0,43 g etanol / g substrat olarak elde edilmiştir. Bu değer teorik olarak ulaşabileceği verim değeri ile karşılaştırıldığında ise (0,43/0,51) teorik verim değerinin yaklaşık % 85'ine ulaşabildiğini söylemek mümkündür. Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroorganizmaların 5 ve 6 karbonlu şekerleri kullanarak ulaşabileceği teorik verim değeri 0,51 g etanol/ g substrat'tır.

Tablo 4.10: Mikroorganizmaların kendi besi ortamlarında fermantasyon sonucu elde edilen İŞ ve alkol değerleri.

Mikroorganizma	Besi ortamı	Parametre	Zaman (saat)				
			0	12	24	48	72
<i>E.coli</i> KO11	LB	İndirgen Şeker (g/L)	21,1	1,12	1,11	1,10	1,10
		Biyoetanol (g/L)	0	8,65	8,75	6,67	5,35
<i>S. cerevisiae</i>	YPD	İndirgen Şeker (g/L)	20,2	1,12	1,10	1,10	1,10
		Biyoetanol (g/L)	0	7,59	7,30	6,90	5,35



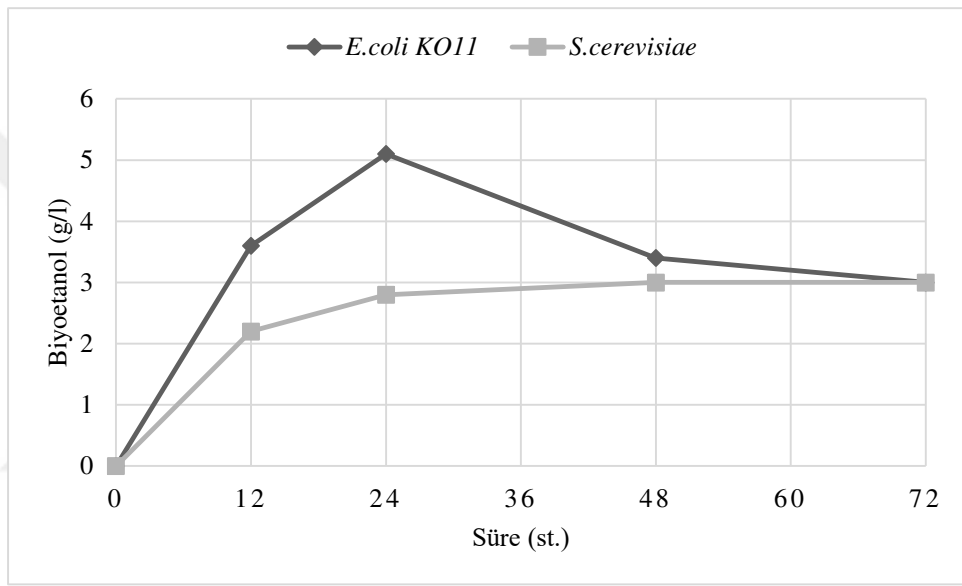
Şekil 4.7: Mikroorganizmaların yapay besi ortamında ürettiği biyoetanol konsantrasyonunun zamanla dağılımı.

Yapılan diğer bir çalışma olan çay atıklarının optimum koşullarda asidik hidrolizi sonunda elde edilen hidrolizatta biyoetanol üretim denemelerinin sonuçları ise Tablo 4.11’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre mikroorganizmalar hidrolizat ortamında normal besi ortamına göre substratı daha yavaş tüketmektedir. Hidrolizat ortamında 5 ve 6 karbonlu şekerlerin yanı sıra bazı hidroliz yan ürünleri bulunmaktadır. Bu bileşenler mikroorganizmaları ortama daha uzun sürede adapte olmalarına neden olarak mikrobiyal aktivitenin düşük seviyede ilerlemesine neden olabilmektedir (Modig, Liden, ve Taherzadeh, 2002; Taherzadeh ve ark., 2000).

Tablo 4.11: Mikroorganizmaların atık çay hidrolizat (A.H.) ortamlarında fermantasyon sonucu elde edilen İŞ ve alkol değerleri.

Mikroorganizma	Besi ortamı	Parametre	Zaman (saat)				
			0	12	24	48	72
<i>E.coli</i> KO11	Hidrolizat	İndirgen Şeker (g/L)	19,3	11,3	7,2	5,4	3,4
		Biyoetanol (g/L)	0	3,6	5,1	3,4	3
<i>S. cerevisiae</i>	Hidrolizat	İndirgen Şeker (g/L)	24,3	16,4	11,6	11,5	10,5
		Biyoetanol (g/L)	0	2,20	2,80	3,0	3,0

Hidrolizat ortamında yapılan fermantasyon işlemi de Tablo 4.12’de verilen koşullarda 72 saat boyunca takip edilmiştir. Buna göre *E.coli* KO11 suşu maksimum etanol konsantrasyonuna 24. saatin sonunda ulaşmış olup 5,1 g/L biyoetanol üretmiştir. *S. cerevisiae* ise 48. Saat sonunda 3 g/L konsantrasyonunda biyoetanol üretebilmiştir. Mikroorganizmaların hidrolizat ortamında biyoetanol üretim verimleri karşılaştırıldığında ise *E.coli* KO11 0,32 g etanol/ g substrat olarak elde edilirken *S. cerevisiae* ise 0,12 g etanol/ g substrat olmuştur (Şekil 4.8). Maya hücrelerinin metabolik hızı yavaş olmakla birlikte ortamda bulunan 5 karbonlu şekerleri tüketememesinden dolayı substrat dan etanol üretim verimi bakteri hücresine kıyasla daha düşük olmuştur.



Şekil 4.8: Mikroorganizmaların hidrolizat ortamında ürettiği biyoetanol konsantrasyonunun zamanla değişimi.

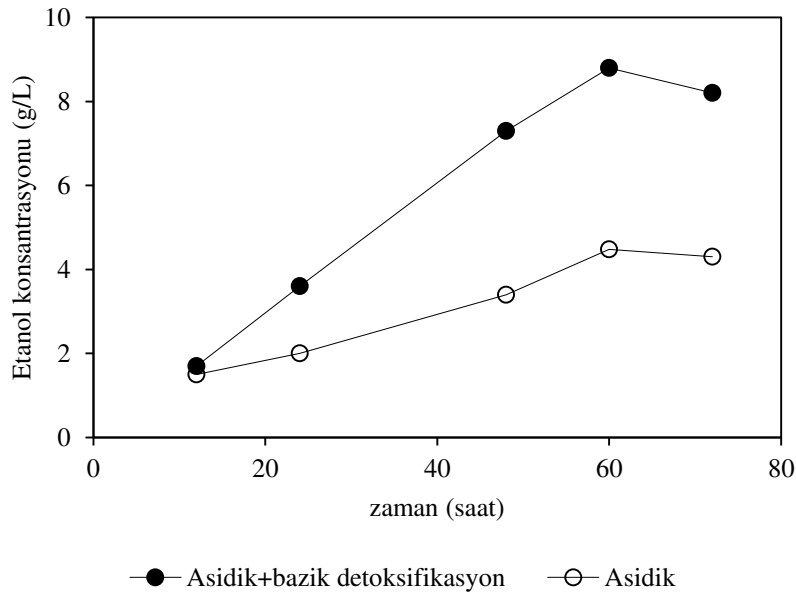
Tablo 4.12: *E.coli* KO11 ile optimum koşullarda fermantasyon için parametreler ve oranları.

Optimizasyon	Parametreler	<i>E.coli</i> KO11
Ön İşlem Koşulları	Sıcaklık (°C)	120
	Zaman (dk.)	130
	Katı konst. (g/L)	55
	Asit konst. (%v/v)	1,15
	G.O.P.B (µ)	595
Üretim Ortamı	Maya ekstraktı (g/L)	5
	Pepton (g/L)	10
	NaCl (g/L)	5
Fiziksel Koşullar	Sıcaklık (°C)	35
	Karıştırma hızı (rpm)	150
	İnokülasyon hacmi (%v/v)	10

4.3.2. Detoksifiye Hidrolizatta *S. cerevisiae* ile Fermantasyon

Detoksifikasyon etkisinin araştırıldığı bu çalışma yalnızca *S. cerevisiae* için gerçekleştirildi. Detoksifikasyon etkisinin gözlemlenebilmesi için ön işlem sonucu elde edilen hidrolizat ikiye ayrıldıktan sonra, birine detoksifikasyon işlemi yapılarak, her ikisinde de fermantasyon gerçekleştirildi. Şekil 4.9'dan görüldüğü gibi gerçekleştirilen her iki ön işlem için de zamanla üretilen biyoetanol miktarı artmakta ve yaklaşık olarak 60. saatte maksimum değere ulaşmaktadır. Asidik ön işlem sonrası detoksifikasyon uygulaması ile elde edilen biyoetanol miktarının (maksimum 8.8 g/L) yalnızca asidik ön işlem uygulaması sonucu elde edilen biyoetanol miktarından (maksimum 4.48 g/L) daha yüksek olduğu Şekil 4.9'da görülmektedir.

Burada, t_{max} en fazla biyoetanol miktarının elde edildiği süredir. Tablo 4.13'de görüldüğü gibi yalnızca asidik ön işlem yapılan örnekler için şekerden biyoetanol konsantrasyonu 0,448 g/L ve üretim verimi ($Y_{p/s}$) 0,106, asidik işlem sonrası detoksifikasyon yapılan örnekler için ise konsantrasyon 0,88 g/L ve üretim verimi ($Y_{p/s}$) 0,208 olarak hesaplanmıştır. Bu durum çay atığından maya hücreleriyle biyoetanol üretim verimliliği açısından asidik ön işlem sonrasında bazik detoksifikasyon uygulamasının verimi artırdığını göstermektedir. Ayrıca bazik detoksifikasyon da yapılarak gerçekleştirilen ulaşılan biyoetanol üretim hızının yalnızca asidik ön işlem uygulamasına göre daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9: Biyoetanol konsantrasyonunun zamanla değişimi

Tablo 4.13: Fermantasyon sonu bazı üretim verimliliği parametreleri

Parametre	Asidik ön işlem	Bazik detoksifikasyon
Maksimum biyoetanol üretim süresi (saat)	60	60
İnokülasyon miktarı (%v/v)	10	10
Biyoetanol Konsantrasyonu % (w/v)	0,448	0,88
Biyoetanol verimi, $Y_{p/s}$ (g/g)	0,106	0,208
Biyoetanol üretim hızı (g/L.saat)	0,075	0,146

Literatürde belirtildiği gibi hemiselüloz hidrolizi sonrasında ortamda furan bileşikleri olan furfural ve HMF oluşmaktadır (Martinez ve ark., 2000). Sadece asidik ön işlem uygulanan örneklerde biyoetanol veriminin düşük olmasının nedeni furfural ve HMF gibi furan bileşiklerinin maya aktivitesini inhibe edici etki göstermesi olarak düşünülebilir. Maya hücrelerinin furan bileşiklerine olan toleransı yüksek olmadığı ve maksimum biyoetanol konsantrasyonuna 60.saatte ulaştığı göz önüne alınırsa yüksek verimli biyoetanol üretimi için iki metot tercih edilebilir. Bunlarda biri asidik ön işlemle elde edilen hidrolizat detoksifikasyon işlemine tabi tutmak, diğeri ise bahsedilen furan bileşiklerine dayanıklı mikroorganizmalar kullanmak. Bunlara ek olarak, HMF toleransının artırılması amacıyla bazı maya türlerinde genetik modifikasyonlar yaparak furan bileşiklerinin parçalanmasını sağlayacak enzimlerin üretebilmesi üzerine çalışmalar da yapılmıştır (Liu ve ark., 2004; Petersson ve ark., 2006). Mayaların nispeten düşük verim ve çoğalma hızlarından dolayı bu bileşiklere dayanıklı, doğal ya da rekombine bakteri türleri ile çalışmak daha iyi bir seçenek olarak düşünülebilir. *E.coli* KO11 suşu endüstriyel biyoetanol üretimi için geliştirilen suşlardan birisidir ve yüksek verimle biyoetanol üretilmesi için metabolik yolağında bazı değişiklikler yapılmak suretiyle diğer ürünlerin sentezlenmesi baskılanarak engellenmiştir (Ingram ve ark., 1998; Ohta ve ark., 1991; Deniz, 2011). Bu gibi avantajlarından dolayı atık çay örneklerinden biyoetanol üretmek için bu mikroorganizmanın da denenmesi bu tez çalışmasının hedeflerinden biri olmuştur.

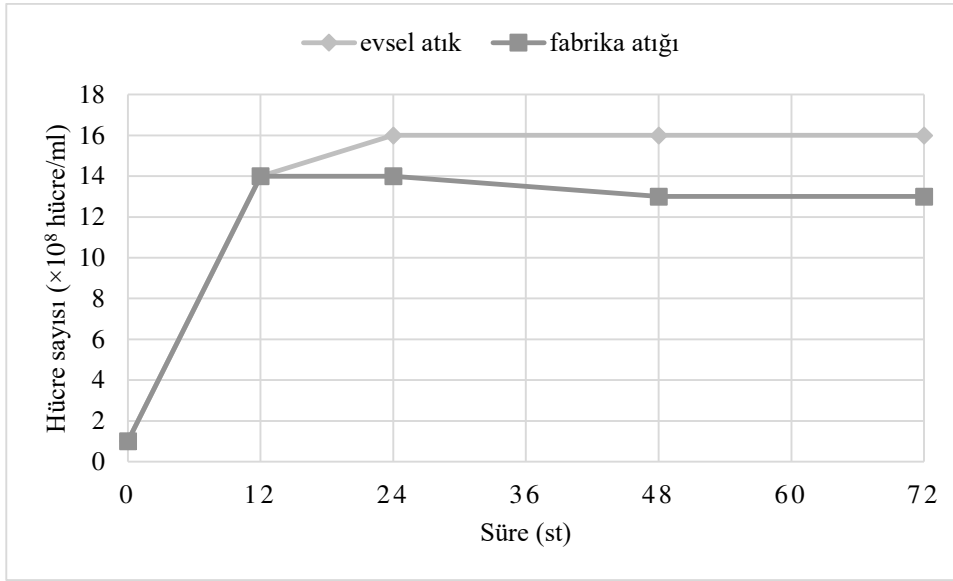
4.3.3. Asidik+Enzimatik Hidroliz Sonrası *E.coli* KO11 ile Fermantasyon

Koşulların optimize edildiği şartlarda asidik ve enzimatik hidroliz sonucu elde edilen toplam hidrolizat (T.H.) ortamında biyoetanol verimi yüksek olan rekombinant *E.coli* KO11 ile fermantasyon denemeleri yapılmış olup sonuçlar Tablo 4.14’de verilmiştir. Fabrika atığı ve evsel atık çaylar kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon işleminde farklı zaman aralıklarında alınan numunelerde mikroorganizma sayısı, indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonu analizleri yapılmıştır. Yapılan çalışmada biyoetanol konsantrasyonlarına göz önüne alındığında ise evsel çay atığında maksimum 5,1 g/L ve fabrika atığında 3,4 g/L’ye ulaşılmıştır. Evsel çay atığında maksimum biyoetanol konsantrasyonuna 24. saatte ulaşılırken deneyin ilerleyen saatlerinde biyoetanol konsantrasyonunda azalmalar gözlenmiştir.

Şekil 4.10 göz önüne alındığında inokülasyon sonu mikroorganizma sayısının 10^8 hücre/mL iken ilk 12 saat içinde belirgin bir şekilde artarak 10^9 hücre/mL seviyelerine çıktığı görülmektedir. 24. saate kadar evsel atıkta mikroorganizma sayısının artarak, fabrika atığında ise sabit kalarak logaritmik faza ulaştığı grafikte görülmektedir. Her iki denemede de mikrobiyal fermantasyonunun logaritmik fazda gerçekleştiğini söylemek mümkündür.

Tablo 4.14: *E.coli* KO11 ile evsel ve fabrika atığı ortamlarında fermantasyon sonucu elde edilen İŞ ve alkol ve mikroorganizma sayısı değerleri.

Atık	Parametre	Zaman (saat)				
		0	12	24	48	72
Evsel	İndirgen Şeker (g/L)	18,7	2,72	1,71	0,62	0
	Biyoetanol (g/L)	0	5,10	4,12	3,40	3,20
	M.o sayısı (hücre/mL)	$1,0 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$
Fabrika	İndirgen Şeker (g/L)	17,95	0	0	0	0
	Biyoetanol (g/L)	0	3,40	3,40	3,30	3,20
	M.o sayısı (hücre/mL)	$1,0 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$



Şekil 4.10: Evsel ve fabrika atığı çayda mL'ye düşen *E.coli* KO11 konsantrasyonları.

Tablo 4.15'de evsel ve fabrika atığı çay hidrolizatlarının fermentasyon boyunca alınan numunelerine ait veriler özetlenmiştir. Tablo 4.10'da verilen maya hücrelerine ait verilerle kıyaslandığında bakteri hücrelerinin metabolizma hızının yüksek olduğu görülmektedir. Maya hücreleri 72. saatin sonuna kadar fermentasyona devam ederken bakteri hücrelerinin substratın büyük bir kısmını 12 saatte tükettiği gözlenmiştir. Evsel ve fabrika atığı çay hidrolizatlarında 12. Saatte maksimum etanol konsantrasyonuna ulaşılırken deneyin devam eden süreleri boyunca etanol konsantrasyonunda kısmi azalmalar gözlenmiştir. Buna sebep olarak örnek alma sırasında fermentasyon ortamına oksijen girerek mikroorganizmanın ürünü tüketmeye başlaması ve/veya analizler sırasında yapılan seyrelme hataları düşünülmüştür. *E.coli* KO11 ile yapılan bir çalışmada substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu durumda (>60 g/L) maksimum etanol konsantrasyonu yaklaşık 60. saatte gözlenmiştir (Deniz, 2011). Tez çalışmasında düşük substrat konsantrasyonlarında çalışıldığı için maksimum etanole daha erken saatte ulaşılmıştır.

Deneyisel çalışmalar sonucunda elde edilen fermentasyon verimleri Tablo 4.15'de özetlenmiştir. Tablo 4.15'de verilen değerler göz önüne alındığında *S. cerevisiae* maya hücrelerinin rekombinant *E.coli* KO11 bakterisine göre daha düşük verimle biyoetanol ürettiği görülmektedir. Fermentasyon ortamının kompozisyonu, hemiselüloz ve selüloz fraksiyonlarından indirgenen 5 ve 6 C'lu şekerlerden oluşmaktadır. Maya hücrelerinin 5 C'lu şekerleri metabolize edemeyip sadece 6 karbonlu şekerleri tüketmesi ve fermentasyon ortamında (hidrolizat) bulunan HMF ve furfural gibi bazı fenolik bileşenlere karşı dayanıksız olması verim değerlerinin düşük olmasına neden olmuştur.

Deneyisel çalışmaların tümünde teorik verim değeri olan 0.51'e en yakın sonuç (0.43) *E.coli* KO11 ile yapay LB besi ortamında gerçekleştirilen fermantasyonda elde edilmiştir. *S. cerevisiae* hücreleriyle yapay YPD besi ortamında gerçekleştirilen fermantasyonda ise verim 0.40 olarak elde edilmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında mikroorganizmaların özellikle hidrolizat ortamında teorik verim değerlerine ulaşması pek mümkün olmamaktadır. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde *E.coli* KO11'in % 90 civarında verim değerlerine ulaştığı görülmektedir. Deneyisel verim değerinin teorik değere oranlanmasıyla elde edilen bu verim değeri, tez çalışmalarında LB ortamı için % 84, asidik hidrolizat için % 63 ve toplam hidrolizat için % 53 olarak elde edilmiştir.

Mikroorganizmanın logaritmik faza ulaşması için belirli bir süre ve substrat gerekmektedir. Logaritmik faza ulaşan hücreler substratı ürün üretmeye kullanırlar. Tablo 4.16'da glikoz konsantrasyonunun artırıldığı durumda deneyisel verim değerinde de artma olduğu görülmektedir. Bu veriler göz önüne alındığında *E.coli* KO11'in teorik verim değerlerine yakın verimle biyoetanol üretebilmesi için substrat konsantrasyonunun inhibisyon noktasına kadar artırılması çözüm olabilir.

Evsel çay atığının biyoetanol üretim potansiyeli 0.224 kg biyoetanol/ kg atık olarak bulunmuştur. Deneyisel çalışmalarla ise asidik hidrolizat ortamı için elde edilen verim 0.12 kg biyoetanol/ kg atık olarak elde edilirken toplam hidrolizat ortamı için 0.16 kg biyoetanol / kg atık olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre optimizasyonu yapılan asidik hidroliz ve fermantasyon sonucunda teorik olarak ulaşılabilir verimin % 55'ine ulaşılabilmiştir. Asidik hidrolizi takiben yapılan enzimatik hidrolizde ise hidrolize olmayan şekerlerde indirgenerek teorik verimin % 72'sine ulaşılabilmiştir.

Tablo 4.15: Farklı mikroorganizmaların farklı besi ortamlarında fermantasyonu sonucunda elde edilen verim değerleri.

Mikroorganizma	Besi ortamı	Substrat konsantrasyonu (g/L)	Deneyisel verim Y _{P/S}
<i>E.coli</i> KO11	LB	20	0,43
<i>E.coli</i> KO11	A.H.	20	0,32
<i>E.coli</i> KO11	T.H.	18	0,27
<i>S. cerevisiae</i>	YPD	20	0,40
<i>S. cerevisiae</i>	A.H	24	0,11
<i>S. cerevisiae</i>	A.H. detoks	20	0,21

Tablo 4.16: *E.coli* KO11 ile biyoetanol üretimi yapılan bazı çalışmalar.

Hammadde	Ş.konsantrasyonu (g/L)	Deneysel verim ($Y_{p/s}$)	Kaynak
Glikoz	40	0,20	(Deniz, 2011)
Glikoz	50	0,28	(Deniz, 2011)
Glikoz	60	0,30	(Deniz, 2011)
Sükroz	40	0,41	(Deniz, 2011)
Fruktoz	60	0,29	(Deniz, 2011)
Ökalyptus	51	0,24	(Castro ve ark., 2014)
Evsel odun atığı	72	0,40	(Okuda ve ark., 2008)
Su sümbülü	33	0,43	(Mishima ve ark., 2008)
Su marulu	36	0,41	(Mishima ve ark., 2008)
Çay	~20	0,32	Tez çalışması

Tablo 4.17’de bazı lignoselülozik atıkların içerdiği holoselüloz miktarları, teorik biyoetanol üretim potansiyelleri ve bu atıklarla yapılan deneysel çalışmaların verim değerleri özetlenmiştir. Tablo 4.17’de yer alan atıklar içerisinde kuru madde bazında en az miktarda holoselüloz içeren biyokütlenin çay atığı olduğu görülmektedir. Diğer taraftan yapılan deneysel çalışmaların birçoğunda teorik verimin % 70-85’i arasında bir değere ulaşılabilir. Çay atıklarının kullanıldığı tez çalışmasında ise kuru madde bazında holoselüloz miktarı % 44-50 arası değişen çay atıkları ile ulaşılacak teorik verim (0.51 g etanol/ g şeker) 0.22 kg etanol / kg çay atığı olarak elde edilmektedir. Deneysel çalışmalar ile teorik olarak hesaplanan verimin % 73’üne ulaşılabilmiştir.

Tablo 4.17:Bazı hammaddelerin kimyasal bileşimi ile teorik ve deneysel verim değerleri (Chan ve ark., 2007).

Hammadde	Holoselüloz (%)	Teorik verim ($Y_{p/s}$)	Deneysel verim ($Y_{p/s}$)	Kaynak
Şeker kamışı küspesi	66	0,33	0,28	(Kuhad ve Singh, 1993)
Buğday samanı	54	0,27	0,24	(Kuhad ve Singh, 1993)
Yulaf samanı	57	0,29	0,25	(Kuhad ve Singh, 1993)
Mısır koçanı	81	0,41	0,36	(Kuhad ve Singh, 1993)
Talaş	69	0,35	0,30	(Olsson ve Hahn-Hägerdal, 1996)
Çam	70	0,36	0,31	(Olsson ve Hahn-Hägerdal, 1996)
Yunca sapı	55	0,28	0,21	(Shleser, 1994)
Çay Atığı	44	0,22	0,16	Tez çalışması

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı mikroorganizmalar kullanılarak çay atıklarından biyoetanol üretiminin araştırıldığı bu tez çalışması sonucunda elde edilen sonuç ve öneriler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Çöp olarak bertaraf edilen çay atığı kayda değer miktarda holoselüloz içermektedir.
- Tez çalışmaları sonucunda elde edilen optimum koşullarda ön işlem gerçekleştirildiğinde çayın yapısındaki şekerlerin büyük bir kısmını (% 85) hidrolizat ortamına almak mümkündür.
- 5 ve 6C'lu şekerleri metabolize edebilmesinden dolayı *E.coli* KO11 çay atıklarında daha yüksek verimle biyoetanol üretmektedir.
- *E.coli* KO11 çeşitli inhibitörleri de içeren hidrolizat ortamında *S. cerevisiae* göre daha fazla biyoetanol üretebilmektedir. Hidrolizat ortamı detoksifikasyon işlemine tabi tutulması durumunda maya hücrelerinin etanol üretim verimi artmaktadır.
- Farklı substrat konsantrasyonlarında *E.coli* KO11'in biyoetanol üretim performansı değiştiğinden çay atıklarında yüksek substrat konsantrasyonlarında çalışılarak verim artırılabilir.
- Sürekli, yarı kesikli veya belirli bir süre oksijenli sonra oksijensiz solunum gibi farklı fermantasyon teknikleri denenerek verim değeri artırılabilir.
- Fermantasyon ortamının kimyasal (N, C, tuz vs) ve fiziksel parametreleri (sıcaklık, pH, rpm) optimize edilerek verim değerinde artış sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Abbi, M, RC Kuhad, and A Singh. 1996. 'Fermentation of xylose and rice straw hydrolysate to ethanol by *Candida shehatae* NCL-3501', *Journal of industrial microbiology*, 17: 20-23.
- Adıgüzel, A. O. 2011. "Lignoselülozik Atıklardan Biyoetanol Üretimi." In *Lignoselülozik Atıklardan Biyoetanol Üretimi.*, 72. Fen Bilimleri Enstitüsü. Mersin, Mersin Üniversitesi.
- Adıgüzel, Ali Osman. 2013. 'Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammadde Kaynakları', *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2.
- Agilent. 2016. 'E. coli Cell Culture Concentration from OD600 Calculator', Accessed 22.04.2016. <http://www.genomics.agilent.com/biocalculators/calcODBacterial.jsp>.
- Amarasinghe, BMWPK, and RA Williams. 2007. 'Tea waste as a low cost adsorbent for the removal of Cu and Pb from wastewater', *Chemical Engineering Journal*, 132: 299-309.
- Amore, Antonella, and Vincenza Faraco. 2012. 'Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16: 3286-301.
- Arcak, Sevinç, A Cihat Kütük, Koray Haktanır, and Gökhan Çaycı. 2011. 'ÇAY ATIKLARININ TOPRAKTA ENZİM AKTİVİTESİ VE NİTRİFİKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ', *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 3.
- Armstead, H Christopher H. 1978. 'Geothermal energy: its past, present and future contributions to the energy needs of man'.
- Ayla, C, and HH Nimz. 1984. 'Application of waste lignin for wood composites production', *Holz als Roh-und Werkstoff*, 42: 415-19.
- Baek, Seoung-Chul, and Yun-Joong Kwon. 2007. 'Optimization of the pretreatment of rice straw hemicellulosic hydrolyzates for microbial production of xylitol', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12: 404-09.
- Balat, Mustafa, Havva Balat, and Cahide Öz. 2008. 'Progress in bioethanol processing', *Progress in energy and combustion science*, 34: 551-73.
- Bengisu, Gülşah. 2014. 'Alternatif Yakıt Kaynağı Olarak Biyoetanol/Bioethanol as an Alternative Fuel Source', *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 27: 43-52.
- Brink, David L. 1994. "Method of treating biomass material." In.: Google Patents.
- Britannica, Temel. 1992. "Ana Yayıncılık AŞ." In.: İstanbul.
- Buaban, Benchaporn, Hiroyuki Inoue, Shinichi Yano, Sutipa Tanapongpipat, Vasimon Ruanglek, Verawat Champreda, Rath Pichyangkura, Sirirat Rengpipat, and Lily

- Eurwilaichitr. 2010. 'Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*', *Journal of bioscience and bioengineering*, 110: 18-25.
- Cao, Guangli, Nanqi Ren, Aijie Wang, Duu-Jong Lee, Wanqian Guo, Bingfeng Liu, Yujie Feng, and Qingliang Zhao. 2009. 'Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16', *international journal of hydrogen energy*, 34: 7182-88.
- Cardona, Carlos A, and Óscar J Sánchez. 2007. 'Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities', *Bioresource technology*, 98: 2415-57.
- Carvalho, Florbela, Luís C Duarte, and Francisco M Gírio. 2008. 'Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments', *Journal of Scientific & Industrial Research*: 849-64.
- Castro, Eulogio, Ismael U Nieves, Mike T Mullinnix, William J Sagues, Ralph W Hoffman, Marco T Fernández-Sandoval, Zhuoli Tian, Donald L Rockwood, Bijay Tamang, and Lonnie O Ingram. 2014. 'Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production', *Applied Energy*, 125: 76-83.
- Chan, ES, Ravinder Rudravaram, M Lakshmi Narasu, L Venkateswar Rao, and Pogaku Ravindra. 2007. 'Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal', *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2: 14-32.
- Chen, Haixia, Zhishuang Qu, Lingling Fu, Peng Dong, and Xin Zhang. 2009. 'Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3 polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea', *Journal of Food Science*, 74: C469-C74.
- Chiaramonti, David, Matteo Prussi, Simone Ferrero, Luis Oriani, Piero Ottonello, Paolo Torre, and Francesco Cherchi. 2012. 'Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method', *Biomass and bioenergy*, 46: 25-35.
- ÇAYKUR. 2015. "Çaykur Veriler." In, edited by Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü.
- da Silva, Ayla Sant'Ana, Hiroyuki Inoue, Takashi Endo, Shinichi Yano, and Elba PS Bon. 2010. 'Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation', *Bioresource technology*, 101: 7402-09.
- Das, Piyali, Anuradda Ganesh, and Pramod Wangikar. 2004. 'Influence of pretreatment for deashing of sugarcane bagasse on pyrolysis products', *Biomass and bioenergy*, 27: 445-57.

- Dawson, Letha, and Raj Boopathy. 2007. 'Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production', *Bioresource technology*, 98: 1695-99.
- Demirbas, Ayhan. 1999. 'Evaluation of biomass materials as energy sources: Upgrading of tea waste by briquetting process', *Energy Sources*, 21: 215-20.
- Deniz, İrem. 2011. 'Rekombinant E.coli KO11 ile Biyoetanol Üretimi ve Ölçek Büyütme', Master Thesis, Ege Üniversitesi.
- Ersoy, S. Küçük, H. 2007. 'Endüstriyel Çay Yaprak Lifi Atık Materyallerinin Ses Absorbsiyon Özelliklerinin İncelenmesi', Marmara Üniversitesi, Makine Mühendisliği Mekatronik Bölümü. .
- Fengel, Dietrich, and Gerd Wegener. 1984. 'Wood: chemistry, ultrastructure, reactions', *Walter de Gruyter*, 613: 1960-82.
- Financie, Revie, Muhammad Moniruzzaman, and Yoshimitsu Uemura. 2016. 'Enhanced enzymatic delignification of oil palm biomass with ionic liquid pretreatment', *Biochemical Engineering Journal*, 110: 1-7.
- Fridleifsson, Ingvar B. 2001. 'Geothermal energy for the benefit of the people', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 5: 299-312.
- Gaykawad, Sushil S, Ying Zha, Peter J Punt, Johan W van Groenestijn, Luuk AM van der Wielen, and Adrie JJ Straathof. 2013. 'Pervaporation of ethanol from lignocellulosic fermentation broth', *Bioresource technology*, 129: 469-76.
- Germec, Mustafa, Kübra Tarhan, Ercan Yatmaz, Nedim Tetik, Mustafa Karhan, Ali Demirci, and Irfan Turhan. 2016. 'Ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis of tea processing waste for production of fermentable sugar', *Biotechnology progress*.
- Gürgün, Velittin, and A Kadir Halkman. 2005. "Mikroskobik Sayım Yöntemleri." In.
- Hamelinck, Carlo N, Geertje Van Hooijdonk, and Andre PC Faaij. 2005. 'Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term', *Biomass and bioenergy*, 28: 384-410.
- Heinberg, Richard. 2005. *The party's over: oil, war and the fate of industrial societies* (Clairview books).
- IEA. 2015. *Key world energy statistics* (International Energy Agency).
- Imamoglu, Esra, and Fazilet Vardar Sukan. 2013. 'Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production', *Bioresource technology*, 144: 311-20.
- . 2014. 'The effects of single and combined cellulosic agrowaste substrates on bioethanol production', *Fuel*, 134: 477-84.

- Ingram, LO, PF Gomez, X Lai, M Moniruzzaman, BE Wood, LP Yomano, and SW York. 1998. 'Metabolic engineering of bacteria for ethanol production', *Biotechnology and Bioengineering*, 58: 204-14.
- Johansson, Thomas B. 1993. *Renewable energy: sources for fuels and electricity* (Island press).
- Junginger, Martin, Chun Sheng Goh, and André Faaij. 2013. *International Bioenergy Trade: History, status & outlook on securing sustainable bioenergy supply, demand and markets* (Springer Science & Business Media).
- Kacar, B, E Przemek, A Ozgumus, C Turan, AV Katkat, and I Kayikcioglu. 1979. 'A study on the microelement necessity of tea plants and soils', *Tubitak, TOAG-321, Ankara*: 1-67.
- Kacar, B., Taban, S. ve Kütük, A.C. 1991. 'Türk ve yabancı çayların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri yönünden karşılaştırılması', *DOĞA, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 15(2): 328-51.
- Kacar, Burhan. 2010. *Çay bitkisi, biyokimyası, gübrelenmesi ve işleme teknolojisi* (Nobel).
- Kheshgi, Haroon S, Roger C Prince, and Gregg Marland. 2000. 'The potential of biomass fuels in the context of global climate change: focus on transportation fuels 1', *Annual Review of Energy and the Environment*, 25: 199-244.
- Kim, Seungdo, and Bruce E Dale. 2004. 'Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues', *Biomass and bioenergy*, 26: 361-75.
- Kizilkaya, Ridvan, and Imanverdi Ekberli. 2008. 'Determination of the effects of hazelnut husk and tea waste treatments on urease enzyme activity and its kinetics in soil', *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32: 299-310.
- Konwar, Bizendra K, and Prafulla C Das. 2006. 'Tea Waste—A New Livestock and Poultry Feed'.
- Kuhad, Ramesh Chander, and Ajay Singh. 1993. 'Lignocellulose biotechnology: current and future prospects', *Critical Reviews in Biotechnology*, 13: 151-72.
- Kurakake, Masahiro, Kazuya Ouchi, Wataru Kisaka, and Toshiaki Komaki. 2005. 'Production of L-arabinose and xylose from corn hull and bagasse', *Journal of Applied Glycoscience (Japan)*.
- Larousse, Büyük. 1986. 'Büyük larousse sözlük ve ansiklopedisi', *İstanbul: Gelişim Yayınları AŞ*.
- Larsson, Simona, Anders Reimann, Nils-Olof Nilvebrant, and Leif J Jönsson. 1999. 'Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77: 91-103.

- Lenihan, P., A. Orozco, E. O'Neill, M. N. M. Ahmad, D. W. Rooney, and G. M. Walker. 2010. 'Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass', *Chemical Engineering Journal*, 156: 395-403.
- Li, Shiguang, Shaoping Xu, Shuqin Liu, Chen Yang, and Qinghua Lu. 2004. 'Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas', *Fuel Processing Technology*, 85: 1201-11.
- Li, Y, Roger Ruan, Paul L Chen, Z Liu, X Pan, X Lin, Y Liu, CK Mok, and T Yang. 2004. 'Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization', *Transactions of the ASAE*, 47: 821.
- Limayem, Alya, and Steven C Ricke. 2012. 'Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects', *Progress in energy and combustion science*, 38: 449-67.
- Linoj, KNV, Prabha Dhavala, Anandajit Goswami, Sameer Maithel, and KV Raju. 2006. 'Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies', *Asian Biotechnology and Development Review*, 8: 31-49.
- Liu, ZL, PJ Slininger, BS Dien, MA Berhow, CP Kurtzman, and SW Gorsich. 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.
- Ma, Hongzhi, Qunhui Wang, Dayi Qian, Lijuan Gong, and Wenyu Zhang. 2009. 'The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage', *Renewable Energy*, 34: 1466-70.
- Martinez, Alfredo, Maria E Rodriguez, Sean W York, James F Preston, and Lonnie O Ingram. 2000. 'Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass', *Biotechnology progress*, 16: 637-41.
- McIntosh, Paul. 2016. 'What is Lignocellulose'.
<https://lignofuel.wordpress.com/2010/09/15/lignocellulose/#respond>.
- Melikoğlu, Mehmet, and Ayhan Albostan. 2011. 'Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli', *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26.
- Meral, Raciye, and Gülşah Saydan. 2012. 'Tahıllardan etanol üretimi', *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2.
- Miller, Gail Lorenz. 1959. 'Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar', *Analytical chemistry*, 31: 426-28.

- Mishima, D, M Kuniki, K Sei, S Soda, M Ike, and M Fujita. 2008. 'Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.)', *Bioresource technology*, 99: 2495-500.
- Modig, Tobias, Gunnar Liden, and Mohammad J Taherzadeh. 2002. 'Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase', *Biochemical Journal*, 363: 769-76.
- Mohanty, Sujit Kumar, Shuvasis Behera, Manas Ranjan Swain, and Ramesh Chandra Ray. 2009. 'Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation', *Applied Energy*, 86: 640-44.
- Nigam, JN. 2001. 'Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*', *Journal of biotechnology*, 87: 17-27.
- Ohta, Kazuyoshi, DS Beall, JP Mejia, KT Shanmugam, and LO Ingram. 1991. 'Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II', *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 893-900.
- Okuda, Naoyuki, Kazuaki Ninomiya, Yoshio Katakura, and Suteaki Shioya. 2008. 'Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: inoculum size increase and coculture with *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of bioscience and bioengineering*, 105: 90-96.
- Olsson, Lisbeth, and Bärbel Hahn-Hägerdal. 1996. 'Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production', *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 312-31.
- Ozmak, Meryem, Işıl Gürtenb, Emine YAĞMUR, and Zeki AKTAŞ. 2010. 'Çay Atıklarından Aktif Karbon Üretimi ve Adsorpsiyon Proseslerinde Kullanımı'.
- Palmqvist, Eva, and Bärbel Hahn-Hägerdal. 2000. 'Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition', *Bioresource technology*, 74: 25-33.
- Pattra, Sakchai, Suksaman Sangyoka, Mallika Boonmee, and Alissara Reungsang. 2008. 'Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*', *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 5256-65.
- Petersson, Anneli, João RM Almeida, Tobias Modig, Kaisa Karhumaa, Bärbel Hahn-Hägerdal, Marie F Gorwa-Grauslund, and Gunnar Lidén. 2006. 'A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance', *Yeast*, 23: 455-64.

- Plessas, S, A Bekatorou, AA Koutinas, M Soupioni, IM Banat, and R Marchant. 2007. 'Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation', *Bioresource technology*, 98: 860-65.
- Prasad, S, Anoop Singh, and HC Joshi. 2007. 'Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues', *Resources, Conservation and Recycling*, 50: 1-39.
- RFA. 2016. 'World Fuel Ethanol Production', Renewable Fuels Association, Accessed 09.05.2016. <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>.
- RTB. 2015. "Türk Çay Sektörü Güncel Durum Raporu." In.
- Saha, Badal C, Loren B Iten, Michael A Cotta, and Y Victor Wu. 2005. 'Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol', *Process Biochemistry*, 40: 3693-700.
- Sarkar, Nibedita, Sumanta Kumar Ghosh, Satarupa Bannerjee, and Kaustav Aikat. 2012. 'Bioethanol production from agricultural wastes: An overview', *Renewable Energy*, 37: 19-27.
- Schirmer-Michel, Ângela Cristina, Simone Hickmann Flôres, Plinho Francisco Hertz, Gilvane Souza Matos, and Marco Antonio Záchia Ayub. 2008. 'Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075', *Bioresource technology*, 99: 2898-904.
- Schweizer, TF, and P Wüsch. 1991. 'The physiological and nutritional importance of dietary fibre', *Experientia*, 47: 181-86.
- Sezonov, Guennadi, Danièle Joseleau-Petit, and Richard D'Ari. 2007. 'Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth', *Journal of bacteriology*, 189: 8746-49.
- Shleser, Robert. 1994. *Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks, and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii: Final Report* (Hawaii State Department of Business, Economic Development & Tourism, Energy Division).
- Socol, Carlos Ricardo, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, Susan Grace Karp, Marcos Buckeridge, Luiz Pereira Ramos, Ana Paula Pitarello, Viridiana Ferreira-Leitão, Leda Maria Fortes Gottschalk, and Maria Antonieta Ferrara. 2010. 'Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil', *Bioresource technology*, 101: 4820-25.

- Songstad, DD, Prakash Lakshmanan, John Chen, William Gibbons, Stephen Hughes, and R Nelson. 2009. 'Historical perspective of biofuels: learning from the past to rediscover the future', *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45: 189-92.
- Sun, Ye, and Jay J Cheng. 2005. 'Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production', *Bioresource technology*, 96: 1599-606.
- Sun, Ye, and Jiayang Cheng. 2002. 'Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review', *Bioresource technology*, 83: 1-11.
- Taban, Süleyman, Yeşim Okay, and Burak Kunter. 2001. 'Klon ve tohumdan üretilen çay bitkisinin genç ve yaşlı yapraklarının ekstrakt, polifenol, kül ve bazı mineral madde içerikleri', *Gıda Dergisi*, 26.
- Taherzadeh, MJ, L Gustafsson, C Niklasson, and G Lidén. 2000. 'Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*', *Applied microbiology and biotechnology*, 53: 701-08.
- Taherzadeh, Mohammad J, and Keikhosro Karimi. 2008. 'Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review', *International journal of molecular sciences*, 9: 1621-51.
- Talebniya, Farid, Dimitar Karakashev, and Irini Angelidaki. 2010. 'Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation', *Bioresource technology*, 101: 4744-53.
- Tiftik, BE. 2006. 'Çay Fabrikası Atığının Pirolyz ve Pirolyz Ürünlerinin İncelenmesi', *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye*.
- Torres-Jimenez, Eloisa, Marta Svoljšak Jerman, Andreja Gregorc, Irenca Lisec, M Pilar Dorado, and Breda Kegl. 2011. 'Physical and chemical properties of ethanol–diesel fuel blends', *Fuel*, 90: 795-802.
- Tsuey, Liew Shiau, Arbakariya Bin Ariff, Rosfarizan Mohamad, and Raha Abdul Rahim. 2006. 'Improvements of GC and HPLC analyses in solvent (acetone-butanol-ethanol) fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* using a mixture of starch and glycerol as carbon source', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11: 293-98.
- Twidell, John, and Tony Weir. 2015. *Renewable energy resources* (Routledge).
- Uddin, Md Tamez, Md Akhtarul Islam, Shaheen Mahmud, and Md Rukanuzzaman. 2009. 'Adsorptive removal of methylene blue by tea waste', *Journal of hazardous materials*, 164: 53-60.
- Widdel, Friedrich. 2007. 'Theory and measurement of bacterial growth', *Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4.

- Yagmur, Emine, Meryem Ozmak, and Zeki Aktas. 2008. 'A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy', *Fuel*, 87: 3278-85.
- Yalınkılıç, MK, L Altun, and HZ Kalay. 1996. 'Çay fabrikaları çay yaprağı artıklarının kompostlaştırılarak orman fidanlıklarında organik gübre olarak kullanılması', *Ekoloji Çevre Dergisi*: 28-32.
- Yasuda, Masahide, Akiteru Miura, Tsutomu Shiragami, Jin Matsumoto, Ichiro Kamei, Yasuyuki Ishii, and Kazuyoshi Ohta. 2012. 'Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with Escherichia coli KO11', *Journal of bioscience and bioengineering*, 114: 188-92.
- Yücel, Yasin, and Sezer Göycincik. 2015. 'Optimization of ethanol production from spent tea waste by Saccharomyces cerevisiae using statistical experimental designs', *Biomass Conversion and Biorefinery*, 5: 247-55.
- Zhang, Y-H Percival. 2008. 'Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries', *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35: 367-75.
- Zhang, Yi-Heng Percival, Shi-You Ding, Jonathan R Mielenz, Jing-Biao Cui, Richard T Elander, Mark Laser, Michael E Himmel, James R McMillan, and Lee R Lynd. 2007. 'Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions', *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 214-23.

EKLER

EK 1: Design Expert® 8.0 programı tarafından önerilen cevap yüzey tasarımı deney setleri

Tablo E1: Design Expert® 8.0 programı tarafından önerilen cevap yüzey tasarımı deney setleri

Std	Run	Sıcaklık (°C)	Süre (dk.)	Katı Kons (g/L)	Asit Kons (% , v/v)	G.O.P.B. (µ)	Şeker (g/L)	Verim (%)
1	22	120	60	30	0,65	840	3,00	22,47
2	12	150	60	30	0,65	840	6,99	52,40
3	20	120	130	30	0,65	840	9,48	71,00
4	15	150	130	30	0,65	840	4,50	33,70
5	39	120	60	60	0,65	840	7,50	28,00
6	2	150	60	60	0,65	840	15,00	56,10
7	6	120	130	60	0,65	840	18,96	71,00
8	41	150	130	60	0,65	840	14,50	54,30
9	26	120	60	30	1,50	840	3,50	26,20
10	28	150	60	30	1,50	840	7,50	25,00
11	36	120	130	30	1,50	840	9,99	56,20
12	38	150	130	30	1,50	840	3,00	22,47
13	31	120	60	60	1,50	840	7,50	28,00
14	43	150	60	60	1,50	840	19,50	73,00
15	49	120	130	60	1,50	840	22,50	84,26
16	14	150	130	60	1,50	840	9,50	35,57
17	13	120	60	30	0,65	353	3,00	22,47
18	45	150	60	30	0,65	353	8,50	63,66
19	17	120	130	30	0,65	353	9,48	71,00
20	29	150	130	30	0,65	353	5,00	37,43
21	42	120	60	60	0,65	353	6,00	22,47
22	11	150	60	60	0,65	353	16,00	59,91
23	3	120	130	60	0,65	353	20,46	76,62
24	4	150	130	60	0,65	353	13,50	50,56
25	10	120	60	30	1,50	353	3,99	29,88
26	27	150	60	30	1,50	353	9,99	74,83
27	47	120	130	30	1,50	353	8,49	64,00
28	34	150	130	30	1,50	353	3,00	22,47
29	32	120	60	60	1,50	353	8,50	31,82
30	48	150	60	60	1,50	353	20,50	76,76
31	7	120	130	60	1,50	353	22,50	84,26
32	18	150	130	60	1,50	353	9,00	33,70
33	21	99,32	95	45	1,08	595	2,97	14,83
34	33	170,68	95	45	1,08	595	5,49	27,40
35	30	135	11,76	45	1,08	595	2,50	12,47
36	8	135	178,24	45	1,08	595	8,00	39,93
37	24	135	95	9,32	1,08	595	1,00	24,15

38	1	135	95	80,68	1,08	595	23,55	65,59
39	16	135	95	45	0,06	595	0,99	4,94
40	25	135	95	45	2,09	595	12,50	62,40
41	19	135	95	45	1,08	3669	12,50	62,40
42	9	135	95	45	1,08	115	14,49	72,35
43	50	135	95	45	1,08	595	15,35	76,62
44	46	135	95	45	1,08	595	13,50	67,41
45	40	135	95	45	1,08	595	15,30	76,40
46	23	135	95	45	1,08	595	14,90	74,38
47	5	135	95	45	1,08	595	15,98	79,77
48	37	135	95	45	1,08	595	15,98	79,77
49	44	135	95	45	1,08	595	15,98	79,77
50	35	135	95	45	1,08	595	15,48	77,30



EK 2: Çay örneklerinin kimyasal detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.

Tablo E2.1: Atık çay örneklerinin detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.

Atık çay	Hidroliz zamanı (dk.)	Kullanılan asit % (v/v)	Detoksifikasyon öncesi (ppm)	Detoksifikasyon sonrası (ppm)	Giderim yüzdesi (%)
A ₀	10	0	2,1	1,6	24
A _{0.5}	10	0,5	2,6	0,0	100
A ₁	10	1	4,2	0,6	85
A ₂	10	2	0,1	0,0	100
A ₃	10	3	4,2	1,1	74
A ₄	10	4	2,2	1,4	32
A ₀	30	0	10,0	0,6	94
A _{0.5}	30	0,5	18,5	5,5	70
A ₁	30	1	19,6	13,3	33
A ₂	30	2	16,2	10,1	38
A ₃	30	3	26,0	9,8	62
A ₄	30	4	15,0	9,0	40
A ₀	60	0	13,3	0,9	93
A _{0.5}	60	0,5	9,6	4,4	54
A ₁	60	1	4,0	0,0	100
A ₂	60	2	11,1	1,9	82
A ₃	60	3	3,7	0,7	78
A ₄	60	4	10,7	0,0	100

Tablo E2.2: Yeşil çay örneklerinin detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.

Yeşil çay	Hidroliz zamanı (dk.)	Kullanılan asit % (v/v)	Detoksifikasyon öncesi (ppm)	Detoksifikasyon sonrası (ppm)	Giderim yüzdesi (%)
Y ₀	10	0	8,2	6,0	27
Y _{0.5}	10	0,5	12,6	4,9	60
Y ₁	10	1	10,7	3,1	71
Y ₂	10	2	13,3	9,6	29
Y ₃	10	3	19,5	11,4	42
Y ₄	10	4	23,7	15,0	37
Y ₀	30	0	5,0	0,2	96
Y _{0.5}	30	0,5	5,2	0,0	100
Y ₁	30	1	3,3	2,0	39
Y ₂	30	2	4,9	3,2	35
Y ₃	30	3	4,9	0,0	100
Y ₄	30	4	3,5	2,2	37
Y ₀	60	0	24,8	7,0	72
Y _{0.5}	60	0,5	18,7	9,1	51
Y ₁	60	1	27,7	18,0	35
Y ₂	60	2	25,5	8,1	69
Y ₃	60	3	33,9	17,0	50
Y ₄	60	4	16,2	3,2	80

Tablo E2.3: Paket çay örneklerinin detoksifikasyonu ile elde edilen deneysel veriler.

Paket çay	Hidroliz zamanı (dk.)	Kullanılan asit % (v/v)	Detoksifikasyon öncesi (ppm)	Detoksifikasyon sonrası (ppm)	Giderim yüzdesi (%)
P ₀	10	0	9,9	6,9	30
P _{0.5}	10	0,5	7,0	3,1	55
P ₁	10	1	13,2	8,8	33
P ₂	10	2	12,2	5,6	54
P ₃	10	3	10,4	3,1	70
P ₄	10	4	12,6	4,5	65
P ₀	30	0	16,7	8,9	47
P _{0.5}	30	0,5	7,9	1,0	87
P ₁	30	1	16,3	8,8	47
P ₂	30	2	16,1	4,5	72
P ₃	30	3	14,1	9,3	34
P ₄	30	4	11,6	2,1	82
P ₀	60	0	28,8	9,8	66
P _{0.5}	60	0,5	15,0	0,0	100
P ₁	60	1	16,2	8,4	48
P ₂	60	2	13,4	6,9	49
P ₃	60	3	17,9	9,2	49
P ₄	60	4	10,9	7,0	36

EK 3: Çay örneklerinin asidik ve enzimatik olarak hidroliz edilmesi sonucu elde edilen deneysel veriler.

Tablo E3.1: Farklı çay örneklerinin evsel atık için belirlenen optimum koşullarda uygulanan Asidik Hidroliz (A.H.) işlemi sonucu elde edilen veriler.

Çay örneği	Kullanılan miktar (g)	Asidik Hidrolizat (g/l)	Asidik Hidrolizat (ml)	Elde edilen indirgen şeker (g)	Asidik hidroliz verimi (%)
Evsel atık	13,75	20,34	250	5,19	38
Fabrika atığı	13,75	18,52	250	4,63	34
Yeşil	13,75	20,8	250	5,20	37
Paket	13,75	20,0	250	5,01	36

Tablo E3.2: Farklı çay örneklerinin A.H. sonrası yıkanmadan uygulanan Enzimatik Hidroliz (E.H.) işlemi sonucu elde edilen veriler.

Çay örneği	Kullanılan miktar (g)	Enzimatik Hidrolizat (g/l)	Enzimatik Hidrolizat (ml)	Elde edilen indirgen şeker (g)	Enzimatik Hidroliz verimi (%)
Evsel atık	13,75	10,6	250	2,65	19
Fabrika atığı	13,75	6,1	250	1,52	11
Yeşil	13,75	9,8	250	2,45	18
Paket	13,75	9,6	250	2,40	17

Tablo E3.3: Farklı çay örneklerinin asidik ve enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen Toplam Hidrolizat (T.H.) verileri.

Çay örneği	Kullanılan miktar (g)	Toplam Hidrolizat (g/l)	Toplam Hidrolizat (ml)	Elde edilen indirgen şeker (g)	Toplam Hidroliz verimi (%)
Evsel atık	13,75	14,8	450	6,66	48
Fabrika atığı	13,75	13,1	450	5,89	42
Yeşil	13,75	15,0	450	6,75	49
Paket	13,75	14,7	450	6,61	48

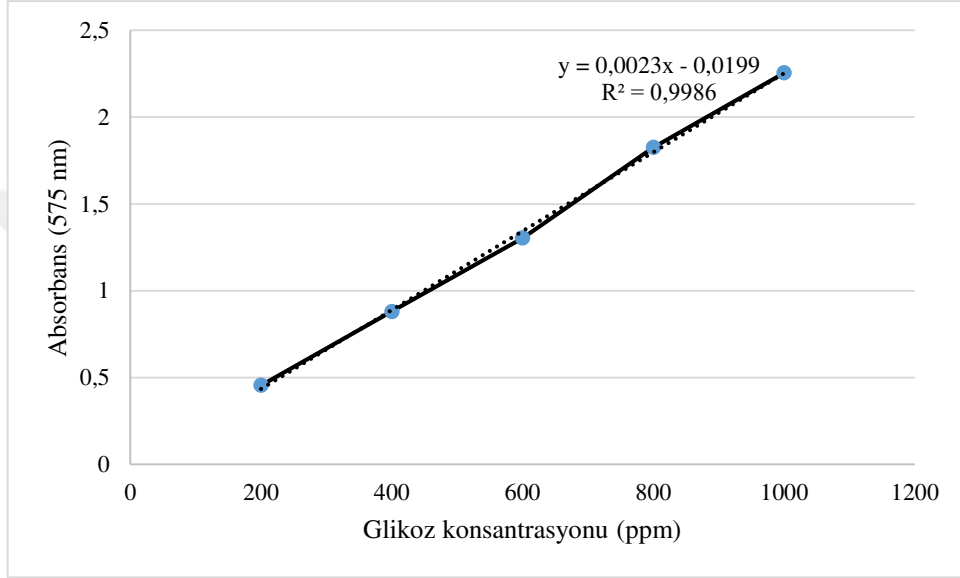
Tablo E3.4: Farklı çay örneklerinin T.H. sonunda filtre kâğıdına konularak kurutulması sonucu elde edilen ağırlık verileri.

Çay örneği	Kullanılan miktar (g)	T.H. sonrası tartım (g)	Filtre ağırlığı (g)	Kurutma sonrası ağırlık (g)	Fark (ekstrakte olan çay) (g)
Evsel atık	13,75	8,4982	2,0630	6,4352	7,3148
Fabrika atığı	13,75	9,5280	2,0950	7,4330	6,3170
Yeşil	13,75	6,2913	2,0990	4,1923	7,4587
Paket	13,75	6,7046	0,9944	5,7102	8,0398

EK 4: İndirgen şeker analizinde kullanılan standartlara ait veriler.

Tablo E.4.17: İndirgen şeker konsantrasyonunu analiz etmede kullanılan glikoz standartları ve absorbanları.

Standart (ppm)	Absorbans (575 nm)
200	0,455
400	0,88
600	1,303
800	1,825
1000	2,255

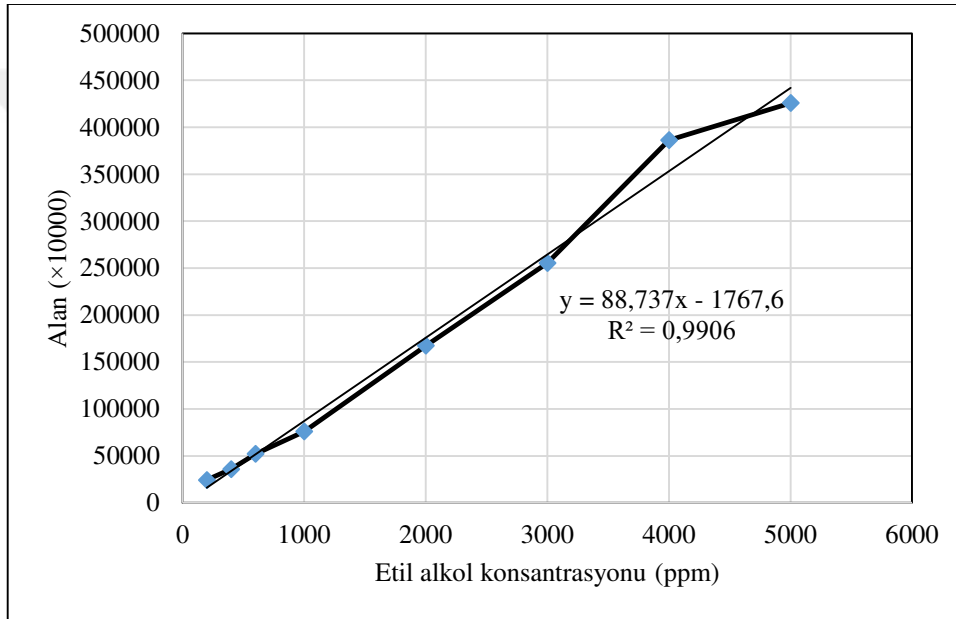


Şekil E.4.1.6: İndirgen şeker konsantrasyonu hesaplamada kullanılan kalibrasyon grafiği ve eğrinin denklemi.

EK 5: Biyoetanol analizinde kullanılan standartlara ait veriler.

Tablo E.5.18: Biyoetanol konsantrasyonunu analiz etmede kullanılan standartlar ve pik alanları.

Standart (ppm)	Pik alanı
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.5.1.7: Biyoetanol konsantrasyonu analizinde kullanılan kalibrasyon grafiği ve eğrinin denklemi.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet YAZICIOĞLU

Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
23200 ELAZIĞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri: Kahramanmaraş
Doğum Tarihi: 12.03.1990
Medeni Durum: Bekâr
Yabancı Dil: İngilizce
Elektronik posta: ahmetyazicioglu.46@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2013-2016: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı
2009-2013: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
2004-2008: Kadriye Çalık Anadolu Lisesi, Sayısal Bilimler

İŞ TECRÜBESİ

Araştırma Görevlisi, F.Ü. Mühendislik Fak., Biyomühendislik Bölümü (2014 – devam ediyor)
Staj, Aba Ankara Biyoteknoloji (Abiyotek), 2012
Staj, Burç Genetik Tanı Merkezi, 2011

YAYINLAR

Yazıcıoğlu A., Kalender M., Tanyıldızı M.Ş., Elçiçek S., Altundoğan H.S. (2015). Optimization of fermentable sugar production from tea wastes by using acidic hydrolysis pre-treatment. 7nd International Bioengineering Congress (BEC 2015), Ege University (Özet bildirisi)

Yazıcıoğlu, A., Elçiçek, S., Kalender, M., Tanyıldızı, M. Ş., Altundoğan, H.S., Evsel çay atıklarından biyoetanol üretimi, On birinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-11), BTp03, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, ESKİŞEHİR, Eylül, 2014.

PROJELER

Farklı Mikroorganizmalar Kullanılarak Çay Atıklarından Biyoetanol Üretiminin İncelenmesi,
Proje No: MF.14.35, Araştırmacı, 2014-2016