

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kouame Fulbert OUSSOU

**ROSEAU (MISCANTHUS GIGANTEUS) VE MANYOK
(MANIHOT ESCULENTA) KABUKLARINDAN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE KULLANARAK
BİYOETANOL ÜRETİMİ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ROSEAU (MISCANTHUS GIGANTEUS) VE MANYOK (MANIHOT ESCULENTA) KABUKLARINDAN SACCHAROMYCES CEREVISIAE KULLANARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ

Kouame Fulbert OUSSOU
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
Yıl: 2019, Sayfa: 113
Jüri : Prof. Dr.M. Ümit ÜNAL
: Prof. Dr. Serkan SELLİ
: Doç. Dr. Aysun ŞENER

Bu çalışmada, *Miscanthus giganteus* ve manyok kabuklarından biyoetanol üretimi araştırılmıştır. Hemiselülozik materyalin fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilmesi için piroliz aşamasında NaOH ve H₂SO₄ iki farklı konsantrasyonda (0.5 ve % 1 (a/h)) 2 farklı sıcaklıkta (120 ve 180°C) ve sürelerde (10 ve 90 dk) yüksek basınçlı Parr reaktöründe ön muameleye tabi tutulmuştur. Selülozik enzimler (Cellic CTec2) ve amilolitik enzimler hidrolize edilerek elde edilen hidrolizatlar *Saccharomyces cerevisiae* ile fermente edilmiştir. Manyok kabuğunun nişasta içeriğinin hidrolizi için ise α amilaz ve glikoamilaz kullanılmıştır. Fermantasyonda sıcaklık (25 ve 30°C) ve azot ilavesinin (pepton ilaveli (4g.L⁻¹) ve pepton ilavesiz) etkisi de araştırılmıştır. Fermantasyonlarda pH 5.5'e ayarlanmıştır.

Miscanthus örneklerinde piroliz ve enzimatik hidroliz sonrasında en yüksek fermente edilebilir şeker miktarı 32.78g/L ile 120°C, % 0.5 (a/h) NaOH konsantrasyonu ve 90 dak. ön muamele; manyok kabuğu örneklerinde ise 30.12g/L ile 120°C, %1 (h/h) H₂SO₄ konsantrasyonu ve 10 dak. ön muamele koşullarında edilmiştir. *Miscanthus* ve manyok hidrolizatlarının fermantasyonu sonucu en yüksek etanol miktarı sırasıyla 12.59 $\pm$ 0.03 g/L ve 14.07 $\pm$ 0.63 g/L ile 30°C'de ve pepton ilavesi koşullarında elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Miscanthus*, Cassava kabukları, Biyoetanol, Piroliz, Enzimatik hidroliz, fermentasyon, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

MSc THESIS

**A STUDY ON BIOETHANOL PRODUCTION FROM ROSEAU
(*MISCANTHUS GIGANTEUS*) AND CASSAVA PEELS (*MANIHOT
ESCULENTA*) BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Kouame Fulbert OUSSOU

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING**

Supervisor : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
Year 2019, page: 113
Jury : Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL
: Prof. Dr. Serkan SELLİ
: Assoc. Prof. Dr. Aysun ŞENER

In this study, bioethanol production from *Miscanthus giganteus* and cassava peel feedstocks was investigated. In order to convert hemicellulosic content to fermentable sugars miscanthus and cassava peels were treated at two different temperatures (120 and 180°C) for 10 and 90 min using NaOH ve H₂SO₄ at two different concentrations (0.5 ve % 1 (w/v)). The hydrolysates obtained after enzymatic hydrolysis with cellulases (Cellic CTec2) and amylolytic enzymes were fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. Starch content of cassava peels was hydrolysed using α -amylase and glucoamylase. Effect of temperature (25 and 30°C) and nitrogen supplementation (with pepton additon (4g.L⁻¹) and without) on fermentation was also investigated. The pH of the medium was adjusted to 5.5.

The maximum fermentable sugar obtained in the pyrolysis of miscanthus samples was 32.78g/L at 120°C for 90 min using % 0.5 (w/v) NaOH, whereas that for cassava peel was 30.12g/L at 120°C for 10 min using %1 (v/v) H₂SO₄. The maximum ethanol obtained during fermentration of miscanthus and cassaava peel hydrolysates were 12.59 $\pm$ 0.03 g/L ve 14.07 $\pm$ 0.63 g/L, respectively at 30°C with peptone supplementation.

Keywords: *Miscanthus giganteus*, Cassava peels, Bioethanol, Pyrolysis, Enzymatic hydrolysis, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

CO₂ emisyonundaki artış, enerji güvenliği endişeleri ve alternatif enerji kaynaklarına olan ilgiyi petrol esaslı olmayan enerji kaynaklarının önemini artırmıştır. Biyokütle, kısa vadede biyoetanol veya biyodizel gibi alternatif ulaşım yakıtları sağlayabilen tek uygun ve yenilenebilir birincil enerji kaynağıdır. Günümüzde biyoetanol üretimi nişasta ve şekerlerden üretilen etanole dayanır, ancak bu kaynaklardan etanol üretiminin sürdürülebilirliği konusunda önemli tartışmalar olmuştur. Şeker ve nişasta içeren hammaddelerden biyoetanol üretiminin artması, gıda fiyatları üzerinde büyük bir etkiye sahiptir, çünkü bu hammaddeler insan ve hayvan için yenilebilir yiyeceklerdir. Bu bağlamda, lignoselülozik biyokütleden üretilen biyoetanol, lignoselülozik hammaddeler gıda mahsulleri ile rekabet etmediğinden ve ayrıca geleneksel tarımsal hammaddelerden daha ucuz olduğu için ilginç bir alternatiftir.

Lignoselülozik materyaller atık veya reddedilen yiyeceklerden biyoetanol üretimi bu konuda sürdürülebilir bir çözüm olabilir. Bu çalışmada *miscanthus giganteus* ve manyok kabuğundan biyoetanol üretimi araştırılmıştır. Bu amaçla lignoselülozik hammadde NaOH seyreltik H₂SO₄ farklı konsantrasyon (% 0.5 ve % 1 (a/h)), sıcaklık (120 ve 180°C) ve sürelerde (10 ve 90 dak.) ön muameleye tabii tutulmuştur. Fermantasyon aşamasında azot ilavesinin biyoetanol verimine etkisi de incelenmiştir. Fermantasyonda *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) kullanılmıştır.

Her iki piroliz yönteminden elde edilen örnekler enzimatik hidrolize uğratıldıktan sonra toplam fermente olabilir şeker miktarları bakımından karşılaştırılmıştır.

Miscanthus giganteus piroliz optimizasyonunda, Sodyum hidroksit ve seyreltilmiş sülfürik asit ile piroliz yöntemlerinden elde edilen maksimum şeker

miktarları sırası ile 32.78 g/L (% 0.5 (a/h) NaOH, 120°C ve 90 dak.) ve 26.03 g/L (% 1 (h/h) H₂SO₄, 120°C ve 10dak.) olarak belirlenmiştir.

Manyok kabuğu piroliz optimizasyonunda seyreltilmiş sülfürik asit ve sodyum hidroksit ile elde edilen maksimum şeker miktarları sırası ile 30.12 g/L (% 1 (h/h) H₂SO₄, 120°C ve 10 dak.) ve 21.16 g/L (% 1 (a/h) NaOH, 120°C ve 90 dak.) olarak saptanmıştır. Ön muamele için optimum koşul olarak 120°C, % 1 (h/h) H₂SO₄ ve 10 dak. olarak belirlenmiştir.

Miscanthus ve manyok kabuğu hidrolizatları belirlenen optimum koşullarda pirolize edildikten sonra alkol fermentasyonu optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, bir inkübatörde 150 rpm devir karıştırma hızında, iki farklı sıcaklık 'ta 25°C ve 30°C, pH 5.5'te, azot ilaveli olarak (peptonlu ve peptonsuz) ve inokulum olarak aktif kuru maya *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Optimum fermentasyon koşulu 30°C'de gerçekleştirilen pepton ilaveli deneme olarak belirlenmiştir. Miscanthus hidrolizatı azot ilaveli, 30°C'de maksimum etanol konsantrasyonu 12.59 ± 0.03 g/L, etanol verimi % 38.40 (a/h) ve maksimum teorik etanol verimi % 75.01 (a/h) bulunmuştur. Buna karşılık azot ilavesiz denemelerde maksimum etanol konsantrasyonu 10.89 ± 0.09 g/L, etanol verimi % 33.22 (a/h) ve maksimum teorik etanol verimi % 64.88 (a/h) hesaplanmıştır.

Manyok kabuğu hidrolizatının 30°C'de azot ilaveli denemelerinde, maksimum etanol konsantrasyonu 14.07 ± 0.36 g/L, etanol verimi % 46.71 (a/h) ve maksimum teorik etanol verimi % 91.23 (a/h) bulunmuştur. Buna karşılık azot ilavesiz denemelerde maksimum etanol konsantrasyonu 12.14 ± 0.48 g/L, etanol verimi % 40.30 (a/h) ve maksimum teorik etanol verimi % 78.72 (a/h) elde edilmiştir.

Her durumda, azotlu ve azotsuz ilaveli 25°C'de fermentasyon, 30°C'de fermentasyona kıyasla daha az etanol verilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bana çalışma olanağı sağlayan, araştırmalarım ve tezimin yazımı süresince yol gösteren ve destekleyen danışmanım Prof. Dr. M. Ümit ÜNAL'a teşekkür ederim ve aynı zamanda tez çalışmam süresince her zaman destek olan Doç. Aysun ŞENER ve laboratuvar ekibimize beni destekledikleri için teşekkürlerimi sunarım. Yurt Dışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı (YTB)'na sağladığı burs ve Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi (BAP)'ne tezime sağladığı finansal destek için teşekkürlerimi sunarım. Büyük fedakarlıklar yaparak benim bu noktaya gelmemi sağlayan bütün aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER Sayfa.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler	9
2.1.1. Nişasta.....	9
2.1.2. Sükroz	10
2.1.3. Lignoselülozik Hammadde	10
2.2. Biyoetanol	15
2.3. Mevcut biyoetanol üretim durumu.....	16
2.4. Manyok bitkisinin etli kısım ve kabuklarının değerlendirilmesi.....	17
2.5. Nişasta yapısı ve hidrolizi	22
2.5.1. Nişastadan biyoetanol üretimi.....	23
2.6. Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi.....	25
2.6.1. Lignoselülozik materyalin Pirolizi.....	26
2.7. Lignoselülozik hidrolizat inhibitörleri ve fermantasyon sırasında inhibisyon mekanizması.....	37
2.7.1. Furanlar	39
2.7.2. Fenolik bileşikler.....	39
2.7.3. Organik asitler.....	40
2.7.4. Etanol ve şeker konsantrasyonu	41

2.7.5. İnorganik iyonlar.....	41
2.7.6. Sıcaklık	42
2.7.7. pH (hidrojen potansiyeli)	42
2.7.8. İnokulum yaşı ve miktarı	43
2.7.9. Fermentation süresi	43
2.8. Lignoselülozik materyallerinin enzimatik hidrolizi	44
2.9. Alkolik fermantasyon ve fermantasyon sırasında kullanılan mikroorganizmalar	45
2.9.1. Alkolik fermantasyon.....	45
2.9.2. Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalar.....	48
3. MATERYAL VE METOT	53
3.1. Materyal	53
3.1.1. Hammaddeler	53
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Mikroorganizmalar	53
3.1.3. Araç ve Cihazlar.....	53
3.2. METOT	54
3.2.1. Örneklerin toplanması ve hazırlanması.....	54
3.2.2. Manyok kabukları ve miscanthus bazı kimyasal bileşimi analizi ...	56
3.2.3. Piroliz optimizasyonu	57
3.2.4. Enzimatik hidroliz.....	58
3.2.5. İnokulum hazırlanması.....	60
3.2.6. Alkolik fermantasyonun koşulları.....	60
3.2.7. HPLC ile şeker ve alkol analizi.....	61
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	65
4.1. Manyok kabuğu ve miscanthus'nun bileşimleri.....	65
4.2. Miscanthus Piroliz Optimizasyonu ve Enzimatik hiroliz.....	65
4.2.1. Miscanthus NaOH ile piroliz ve enzim hidrolizi	66
4.2.2. Miscanthus H ₂ SO ₄ ile piroliz ve enzim hidrolizi	70
4.3. Manyok kabuğu piroliz optimizasyonu ve enzimatik hidroliz.....	73

4.3.1. Manyok kabuğundan nişasta enzimatik hidrolizin optimizasyonu.....	74
4.3.2. Manyok kabuğu NaOH ile piroliz ve enzim hidrolizi.....	76
4.3.3. Manyok kabuğu H ₂ SO ₄ ile piroliz ve enzim hidrolizi.....	78
4.3.4. Miscanthus hidrolizatın fermentasyonun Optimisasyonu	81
4.3.5. Manyok kabuğu hidrolizatının fermentasyon optimisasyonu	86
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	91
Kaynakça	93
ÖZGEÇMİŞ	113



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1: Ülkelerin 2011 Yılı Biyoyakıt Üretim Miktarları.....	2
Çizelge 1.2: Maniyok kabukları kimyasal bileşimi	5
Çizelge 1.3: Maniyok kabukları kimyasal bileşimi	6
Çizelge 2.1: Biyokütle yapısı ve biyokütlenin enzimatik ulaşılabilirliği arasındaki ilişki.....	15
Çizelge 4.1: NaOH pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan toplam fermene olabilir şeker miktarları	68
Çizelge 4.2: H ₂ SO ₄ pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan indirgen şeker miktarları	71
Çizelge 4.3: NaOH pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan fermente olabilir şeker miktarları	77
Çizelge 4.4: H ₂ SO ₄ pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan toplam şeker miktarları	79
Çizelge 4.5: Miscanthus hidrolizatı Fermantasyon optimizasyonu sonuçları	83
Çizelge 4.6: Manyok kabuğunun hidrolizatı Fermantasyon optimizasyonu sonuçları	87



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1:	Selülozun moleküler yapısı (n : polimerizasyon derecesi).....	12
Şekil 2.2:	Hemiselülozun molekül yapısı	13
Şekil 2.3:	Ligninin moleküler yapısı: guaiasilpropan (A); p- hidroksifenilpropan (B); Şıringailpropan (C).....	14
Şekil 2.4:	Dünya manyok üretimi 1993-2014.....	18
Şekil 2.5:	Manyok (<i>Manihot esculenta</i>) yumrular ve kabukları	20
Şekil 2.6:	<i>Miscanthus giganteus</i> (Taze ve kuru).....	22
Şekil 2.7:	Niştasta (amiloz ve amilopektin) yapısı ve amilolitik enzimlerle hidrolizi	23
Şekil 2.8:	Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol dönüştürülmesi işlemi	26
Şekil 2.9:	Lignoselülozik hammadden in ön muamelesi.	28
Şekil 2.10:	Lignoselülozun ön muamelesinden kaynaklanan inhibitörler	38
Şekil 2.11:	Ön muamele edilmiş malzemenin enzimler tarafından monomer şekerlere hidrolizi.	45
Şekil 2.12:	Kesikli kültüründe mayalar geliştirmesinin çevrimi	47
Şekil 2.13:	Glikoliz yolu ve <i>S.cerevisiae</i> tarafından alkolik fermentasyon	49
Şekil 3.1:	Manyok kabuğu örneğin hazırlanması yıkama (A), kesme (B), kurutma (C) ve öğütme (D) işlemleri.	55
Şekil 3.2:	Roseau (<i>Miscanthus giganteus</i>) örneğin hazırlanması yıkama (E), kesme (E), kurutma (F) ve öğütme (I) işlemleri.	55
Şekil 3.3:	Pirolizin gerçekleştirildiği yüksek basınç Parr 4848 reaktörü kontrol sistemi ile donatılmış Parr 4590 mikro tezgah üstü reaktör ...	57
Şekil 3.4:	Enzimatik hidroliz ve fermentasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği çalkalamalı inkübatör	59
Şekil 3.5:	HPLC, RIM 20A kırılma indeksi detektörü ile donatılmış SHIMAZDU Prominence i LC 2030C modeli	62

Şekil 3.6:	HPLC ile elde edilen şeker ve alkol bir kromatogram görüntüsü	63
Şekil 4.1:	NaOH ve H ₂ SO ₄ ön muamele edilmiş miscanthus örnekleri.....	65
Şekil 4.2:	Üç günde gerçekleştirilen miscanthus enzimatik hidroliz örneği.....	66
Şekil 4.3:	Miscanthus örneğinin ön muamele sırasında zamana göre şeker miktarındaki değişim (% 0.5 NaOH, 120°C ve 90dak.).....	70
Şekil 4.4:	NaOH ve H ₂ SO ₄ ön muamele edilmiş manyok kabuğun örneği	75
Şekil 4.5:	Üç günde gerçekleştirilen manyok kabuğunun enzimatik hidroliz örneği.....	75
Şekil 4.5:	Üç günde gerçekleştirilen manyok kabuğunun enzimatik hidroliz örneği.....	76
Şekil 4.7:	Piroliz ve enzimatik hidroliz (amilolitik ve selülitik enzimlerle) sırasında manyok kabuğunun şeker profili.....	80
Şekil 4.8:	Üç gün süre ile gerçekleştirilen miscanthus hidrolizatının fermantasyonu	82
Şekil 4.9:	30°C'de pepton ilavesiz gerçekleştirilen miscanthus hidrolizatı fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu	83
Şekil 4.10:	30°C'de pepton ilaveli gerçekleştirilen miscanthus hidrolizatı fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu	84
Şekil 4.11:	3 gün'de gerçekleştirilen manyok kabuğun hidrolizatının fermantasyonu.....	86
Şekil 4.12:	30°C'de gerçekleştirilen kabuğun hidrolizatı fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu.....	88
Şekil 4.13:	30°C'de azot ilaveli gerçekleştirilen kabuğun hidrolizatı fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu profili	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

T.Ş.	: Toplam şeker
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
°C	: Santigrat derece
dak.	: Dakika
g	: Gram
NaOH	: Sodyum hidroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
KaOH	: Potasyum hidroksit
<i>S. cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E	: Enzim
a/h	: Ağırlık/hacim
a/a	: Ağırlık/ağırlık
h/h	: Hacim/ hacim
FPU	: Filter Paper Unit
CBU	: Cellobiaz Unit
IU	: International Unit
M	: Molar
N	: Normal
mL	: Mililitre
L	: Litre
Mt	: Milyon ton



1. GİRİŞ

Dünya nüfusu, sanayileşme ve kentleşmenin dünyadaki birçok ülkede artması nedeniyle küresel enerji kullanımı ve tüketimi son yüzyılda hızla artmıştır. Bu nedenle fosil yakıtlar ve yenilenemeyen enerji (kömür, ham petrol, doğal gazlar) gibi doğal enerji kaynakların tükenmesi söz konusudur. Fosil yakıtlar tüm enerji taleplerini karşılamak için yeryüzündeki birincil enerji kaynakları olarak kabul edilmiştir. Bu enerji kaynakları, birçok faydalı ürünler (elektrik, yakıt, plastik) ve diğer birçok ürünlerin üretiminde kullanılmıştır (Uihlein ve ark., 2009). Ancak, abartılı üretimler ve bu doğal enerji kaynakların kontrolsüz tüketimi, son yıllarda atmosferde sera gazlarının (CO_2 , N_2O , CH_4 , CF_4 , vb) artmasına neden olmuştur.

Ulaşım sektörü büyük oranda fosil yakıtlarına bağımlıdır. Bu oran dünya yakıt tüketiminin % 60'ına denk gelmektedir. Ulaşım sektörü, küresel karbon monoksit emisyonunun % 70'inden fazlası ve küresel karbondioksit emisyonunun % 19'undan sorumludur. Ayrıca, insan nüfusu ve faaliyetlerinin artmasıyla birlikte, küresel enerji kullanımı fosil yakıtların yetersizliğine neden olacak şekilde oldukça artmıştır (Ray ve ark., 2011).

Bilim insanlarının tahminlerine göre fosil yakıt rezervleri yakın gelecekte tamamen tükenebilecektir. Yıllık ham petrol üretimi düşmekte ve 2050'de 5 milyar varil olacağı değerlendirilmektedir (Bajpai, 2013). Doğal enerji kaynaklarının tükenmesi ve sera gazlarının emisyonundaki artış sadece dünya üretim ekonomisini değil, aynı zamanda ekolojik ve çevresel düzeyde de ciddi sonuçlar doğurabilir (Aditiya ve ark., 2016). Bu nedenle, bu endişeyle yüzleşmek için başka alternatif enerji kaynakları aramak çok önemli ve vazgeçilmezdir.

Yukarıda belirtilen sorunlar çözmek için, yeni alternatif enerji kaynaklarının araştırılması ve kullanılmasıyla ilgili araştırmaları hızlandırmıştır (Zakpaa ve ark., 2009). Birçok ülke biyoyakıt enerji kaynaklarını geliştirmeye ve değerlendirmeye başlamıştır (Aditiya ve ark., 2016). Yenilenebilir enerjiler (rüzgar,

su, güneş, jeotermal ve biyokütle) yalnızca çevre dostu değil, aynı zamanda büyük enerji talebine cevap vermek ve fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak bakımından büyük ilgi görmüştür.

Bu bakımdan, belirtilen sorunları cevaplayabilen en iyi aday biyokütledir. Biyokütle enerji kaynakları (biyoetanol, biyogaz, biyodizel, biyohidrojen, vb), tarımsal ürünler (mısır, pirinç, buğday, şeker kamışı ve pancar, patates, manyok, vb), tarımsal atıklar, ağaç atıkları ve diğer lignoselülozik materyaller gibi, sükröz, selüloz ve nişastadan oluşan biyolojik malzemelerden elde edilen alternatif yenilenebilir enerji olarak tanımlanmaktadır. Bu tarımsal ürünler arasında, şeker kamışı, Brezilya ve Hindistan gibi tropikal ve subtropikal ülkelerde biyoetanol üretmek için kullanılan temel hammadde (Raghavi ve ark., 2016). Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da biyoetanol üretiminde çoğunlukla mısır, arpa ve diğer tahıllar kullanılır (Li ve ark., 2010). En fazla biyoetanol üretimi gerçekleştiren ülkeler ABD, Brezilya, Çin, Kanada olurken; en fazla biyodizel üretimi gerçekleştiren ülkeler Almanya, ABD, Arjantin, Brezilya, Fransa'dır (Çizelge 1.1) (Şenel ve ark., 2004).

Çizelge 1.1: Ülkelerin 2011 Yılı Biyoyakıt Üretim Miktarları (milyar litre) (Şenel ve ark., 2004)

Ülkeler	Biyoetanol	Biyodizel	Toplam
ABD	54.2	3.2	57.4
Brezilya	21.0	2.7	23.7
Almanya	0.8	3.2	3.9
Arjantin	0.2	2.8	3.0
Fransa	1.1	1.6	2.7
Çin	2.1	0.2	2.3
Kanada	1.8	0.2	2.0
Endonezya	0.0	1.4	1.4
İspanya	0.5	0.7	1.2
Dünya	86.1	21.4	107

En umut verici yenilenebilir sıvı yakıt enerji olan ve düşük çevresel etkiye sahip biyoetanol fosil enerjiye alternatif bir enerji olarak kabul edilmiştir (Bajpai, 2013). Benzer şekilde etanol, fosil enerji ve çevre kirliliği problemlerinde küresel krizle mücadele ve çözme açısından da uygun enerjidir (Adams ve ark., 2009). Yapılan bir araştırmada, dünya çapında biyoetanol üretiminin 2001 yılında 31 milyar litre olarak tahmin edildiği bildirildi (Berg, 2001). Bu üretim 2011 yılında 100 milyar litrenin üzerine çıktı ve 2012- 2015 yıllarında % 3-7 artması beklenmektedir (Publishing, 2011). Biyoetanolün avantajları aşağıda sıralanmıştır (Domínguez-Bocanegra ve ark., 2015):

- Kükürt emisyonunda büyük oranda azalma sağlar,
- Fosil yakıt kaynaklarına olan bağımlılığı azaltır,
- Tarım kesimi için yeni iş olanakları yaratır
- Daha yüksek yanma verimi sağlar ve çevreye olan olumsuz etkiyi azaltır,
- Doğaya zarar vermeden çözünür,
- Egzoz emisyonlarını azaltır,
- Hidrokarbon emisyonunu azaltır

Biyoetanol, genellikle yüksek miktarda şeker ve nişasta içeren ve işlenmesi kolay olan tarımsal hammaddelerden (şeker kamışı, manyok, sorgum, tatlı patates vb) üretilmiştir. Ancak, bu tarımsal malzemeleri biyoetanol üretiminde kullanmak için, gıda değerleri nedeniyle mümkün olamazdır. Bu nedenle, biyoetanol üretiminde artışla birlikte, tarımsal kökenli hammaddelerin biyoetanol üretimi için birinci nesil olarak adlandırılan substrat olarak kullanılması, gıda ürünleri fiyatlarının etkilenmesine yol açabilir (Mosier ve ark., 2005). Ekonomik açıdan sürdürülebilir ve fosil enerjiyle rekabet edebilen biyoetanol üretiminde ya yenilenebilir olmayan gıda ürünleri ya da insan gıdasıyla rekabet etmeyen düşük maliyetli tarımsal hammaddelerden üretilmelidir. Gıda-biyoetanol çatışmasını ortadan kaldırmak için lignoselülozik malzemeler, orman kalıntıları, tarımsal

sanayi atıkları, hızlı büyüyen ağaçlar, kısa rotasyonel ve otlar gibi ürünlerden oluşan ikinci nesil malzemeler ön plana çıkmaktadır (Faraco, 2013).

Manyok (*Manihot esculenta*) işleyen şirketler, biyoetanol üretiminde kullanılabilecek çok fazla atık üretmektedir. Mayok tropik ve subtropikal ülkelerde yetişen ve yüksek oranda şeker ve nişasta içeren bir bitkidir. Düşük verimli topraklarda yetişebilir ve büyümesi için herhangi bir sulama sistemi gerekmez (Kamau ve ark., 2010). Bugüne kadar farklı faaliyet alanlarında ondan fazla farklı manyok ürünü kullanılmaktadır (Adekunle ve ark., 2016). Manyok üretimi 60 ton/hektar olarak tahmin edilmektedir. Dünyada toplam mayok üretimi 230 milyon tondur ve bu üretimin % 57'si Afrika'da gerçekleştirilmektedir, (Hillocks, 2002).

Manyok türevleri üretimi (manyok unu, nişasta, gari, attieké, placali, abatcha) ve başka ürünlere işleme sırasında, yılda büyük miktarda manyok kabuğu ve atık su üretilir (Aro ve ark., 2010). Toplam manyok ağırlığının % 20-35'ini oluşturan manyok kabuğu, nişasta, selüloz, hemiselüloz ve lignin içeren yüksek miktarda biyokütle ile karakterize edilir (Aderemi ve ark., 2007). Manyok türevlerine dönüştürülen her ton manyok için, 0.47 ton atık üretilir ve yılda 14 milyon ton toplam manyok atığı üretildiği tahmin edilmektedir (Adekunle, 2017).

Afrika'da, özellikle Fildişi Sahili'de, manyok işleme şirketleri tarafından üretilen manyok atığının yarısı, bazı fabrikalar tarafından büyükbaş hayvan ve kümes hayvanı beslemesi için kullanılır ve çoğunlukla kabuklar ve sudan oluşan atıkların geri kalanı, herhangi bir uygun işleme tabi tutulmadan atılır. Bu ise ciddi hava ve su yolu kirliliğine ve sağlık sorunlarına neden olur (Edama ve ark., 2014). Bu nedenle, manyok kabuklarının biyoetanol üretiminde kullanılması çevre sorunlarının giderilmesinin yanında katma değeri yüksek bir ürün eldesine olanak verir (Adekunle, 2017).

Çizelge 1.2: Maniyok kabukları kimyasal bileşimi (%) (a/a) (Adekunle ve ark., 2016; Bayitse ve ark., 2015; Nanssou ve ark., 2016)

Bileşen	Ağırlık % kuru ağırlık bakımından
Kuru madde	30.50
Selüloz	14.00
Hemiselüloz	27.00
Toplam lignin	16.89
Kül	3.70
Ham lif	13.34
Karbonhidrat içeriği	9.77
Ham protein	3.70
Nişasta	47.16
Lipid	1.70
Glikoz	83.41
Ksiloz	2.31
Arabinoz	2.35

Hızlı büyüyen ağaçlar, tarımsal sanayi artıkları ve tarımsal artıklar ağırlıklı olarak, selüloz, hemiselüloz ve lignin içermektedir (Han ve ark, 2011). Bu lignoselülozik materyaller son yıllarda ikinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılmaktadırlar (Hahn-Hägerdal ve ark., 2006).

Yenilenebilir enerji için potansiyle sahip *Miscanthus giganteus*, % 40-50 selüloz, % 25-30 hemiselüloz ve % 15-20 lignin çok yıllık bir C₄ bitkisidir. Bu bitki, üç metreden daha fazla büyüyebilir ve hektara verimin 20-25 ton kuru madde olduğu tahmin edilmektedir (Ping ve ark., 2011). *Miscanthus giganteus*, yüksek verim, düşük su ve besin gereksinimi ve düşük nem içeriğine sahiptir. Ayrıca, hem bataklık topraklarda hem de marjinal arazilerde yetişebilir. Çevresel yararları ve çok amaçlı kullanım esnekliği nedeniyle ümit vaat etmektedir.

Miscanthus giganteus'in üretimi için sulama sistemi ve büyük bir toprak kullanmak gerekmez. *Miscanthus*, bazı ülkeler tarafından enerji kaynağı olarak kullanılan kömürün yerine kullanılır (Stampfl ve ark., 2007). *Miscanthus* türleri, ABD Enerji Bakanlığı tarafından enerji olarak kullanılabilecek bir model ot olarak kabul edilmiştir. *Miscanthus* karbondioksit emisyonunu azaltır ve karbon tutarak toprak kalitesini artırır.

Çizelge 1.3: Maniyok kabukları kimyasal bileşimi (%) (a/a) (Hodgson ve ark., 2011; Stavrínides ve ark., 2010)

Bileşen	Ağırlık % kuru ağırlık üzerinden
Selüloz	47.8
Hemiselüloz	25.1
Toplam lignin	21.1
Glikoz	37.7
Ksiloz	33.8
Arabinoz	2.8
Galaktoz	0.6
Kül	4.62
Ekstraktifler	2.8
Ham protein	3.1

Batı Afrika'da, özellikle Fildişi Sahili'de, pirinç ve diğer gıda bitkileri yetiştirme mevsiminde *miscanthus* bataklıklarda doğal olarak yetişir. Bu lignoselülozik materyaller değerlemeleri için herhangi bir sistem olmadan imha edilir ve yakılır (Anonymous, 2016). *Miscanthus giganteus*'un yüksek miktardaki selüloz ve hemiselüloz içeriği basit şekere parçalanıp biyoetanol üretiminde rahatlıkla kullanılabilir (Mosier ve ark., 2005).

Asya ve Amerika ülkelerinde manyok kabuğu ve *Miscanthus*'ten biyoetanol üretimi için potansiyel substrat olarak kullanıldığı bazı çalışmalar

yapılmış olmasına rağmen, biyoetanol üretiminin optimizasyonu konusunda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı manyok kabukları ve *Miscanthus giganteus*'ten *Saccharomyces cerevisiae* ile biyoetanol üretiminin optimizasyonudur.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler

Biyoetanol üretimi dört farklı nesil hammadde grubuna ayrılmıştır: Birincil nesil biyoetanol, glikoz veya nişasta içeren şeker bitkileri (şeker pancarı ve şeker kamışı), tahıl (mısır, pirinç, sorgum vb.), yumru köklerinden (manyok, patates, taro vb) üretilir. Bu birinci nesil hammaddeler, ayrıca insan ve hayvan yemi olarak da kullanılır. İkinci nesil biyoetanol, lignoselüloz ve tarımsal atıklardan üretilir. Üçüncü nesil biyoetanol, makro ve mikro alg biyokütlesinden üretilen biyoyakıt anlamına gelir. Son olarak, dördüncü nesil biyoetanol genetiği değiştirilmiş siyanobakterileri kullanarak bir fotofermentasyon işlemi ile üretilir (Farias Silva ve ark., 2016; Hillocks, 2002).

2.1.1. Nişasta

Bir bitkinin enerji rezervi olan nişasta, botanik kaynaklara bağlı olarak iki polimer amiloz (% 15-30) ve amilopektin (% 70-85) içerir (Anonymous, 2017). Bu α -glikoz polimeri, tahıl bitkilerinde (buğday, mısır, pirinç vb) ve yumru köklerinde (patates, manyok, yam vb) depolanır. Glikoz polimerinin fermente edilebilir şekere (glikoz ve dekstrinler) ve sonra etanol dönüştürülmesi için, bazı ön-muamele (kuru ve ıslak öğütme) uygulanır ve ardından bakteri ve mantar amilolitik enzimleri (α -amilaz ve glukoamilaz) kullanılarak hidrolize edilir. Hidrolize edilmiş nişasta daha sonra mayalar veya bakteriler tarafından fermente edilir. (Dziedzic ve ark., 1995; Gnansounou ve ark., 2005).

Biyoetanol üretim endüstrilerinde nişasta temel olarak tahıllardan (mısır, arpa veya buğday) elde edilir. Mısır ve buğday sırasıyla % 61 ve % 65 nişasta içerir. ABD, mısır/buğdayı hammadde olarak kullanan en büyük biyoetanol üreticisidir. Toplamda, mısır/buğdaydan 40 milyar litre biyoetanol üretilir (Anonymous, 2012).

2.1.2. Sükroz

Şeker pancarı (*Beta vulgaris L.*) ve şeker kamışı (*Saccharum sp.*) veya esas olarak sükrozdan oluşan tatlı sorgum, şeker ve alkol üretimi için birincil nesil olarak yetiştirilir. Basit şeker, glikoz ve früktozdan oluşan bir disakarit olan sükroz, mayada bulunan invertaz adı verilen bir enzim ile früktoz ve glikoza dönüştürülür. Böylece, glikoz ve früktoz, ticari bir ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* ile herhangi bir ön muamele yapmadan etanol ve karbon dioksit fermente edilebilir. Sükroza dayalı hammaddelerin etanole dönüştürülmesi, diğer hammaddelerle karşılaştırıldığında en kolay ve en verimli işlemdir ve enerji girdisi nispeten düşüktür (Walker, 2010).

Teorik olarak, en iyi koşullarda 1g heksozdan (glikoz ve früktoz), 0.511 g etanol üretilir. Bununla birlikte, fermantasyonlardaki verimin yaklaşık % 92'sine ulaşılabilir. Şeker kamışı, biyoetanol tedarikinin % 60'ı biyoetanol üretimi için kullanılan sükroz içeren hammaddedir. Brezilya, şeker kamışı ve yan ürünleri (melas) kullanan en büyük biyoetanol üreticisidir. Kabaca, 9 milyon dönümlük arazi şeker kamışı yetiştirmek için kullanılır. Bir üretimde 658.4 Mt şeker kamışı üretebilir ve bu şeker kamışından 25 milyar litre biyoetanol üretebilir (Gnansounou ve ark., 2005; Tolmasquim, 2007).

2.1.3. Lignoselülozik Hammadde

Lignoselülozik biyokütle dünyadaki en zengin yenilenebilir kaynaklardan biridir ve kesinlikle en ucuzlardan biridir. Biyoetanol için kullanılan lignoselülozik biyokütle çok çeşitlidir. Bunlar ot substratlarıdır, odun substratları (ahşap ve yumuşak ağaç), tarımsal yan ürünler (saman) ve endüstriyel atıklar ve atık mahsullerdir.

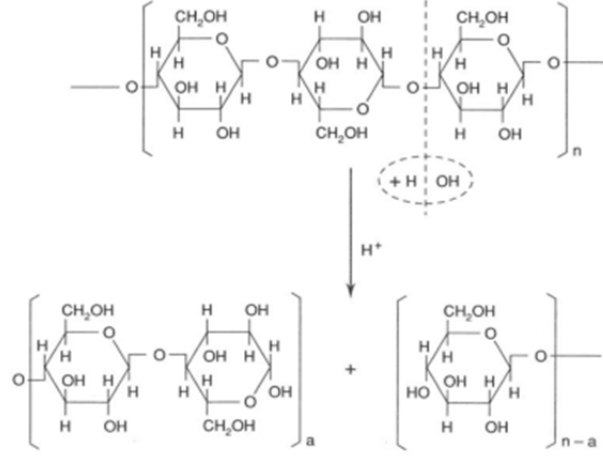
Lignoselülozik biyokütle, üç temel fraksiyondan oluşur; % 35-50 selüloz, % 20-30 hemiselüloz, ve % 15-25 lignin. Selüloz bir glikoz polimeri, hemiselüloz pentozlardan (ksiloz ve arabinoz dahil) meydana gelen bir polisakkarit ve lignin ise ligninifer gruplarına dayalı yapısal polimer kompleksidir.

Lignoselülozik hammaddenin biyoetanole dönüştürülmesi farklı aşamalardan oluşur. İlk olarak lignini parçalamak ve selülozik enzimlerin (selülazlar ve hemiselülazlar), selüloz ve hemiselülozu hidrolize etmesini kolaylaştırmak için piroliz olarak adlandırılan bazı ön muamele (fiziksel, mekanik, termal, kimyasal ve biyolojik) işlemleri gereklidir. Selüloz ve hemiselüloz selülotik enzimlerce fermente edilebilir şekerlere hidrolize edildikten sonraalkol fermantasyonu gerçekleştirilir (Wertz ve ark., 2017). 442 milyar litre biyoetanölün lignoselülozik malzemelerden üretilebileceği gösterilmiştir.

2.1.3.1. Selüloz

Selüloz, bütün bitki türlerinde yaygın olarak bulunan lineer bir homopolimerdir. Biyolojik hammaddenin botanik kökenine bağlı olarak % 30-50 oranında bulunabilmektedir. Selüloz lifleri çoğunlukla β -1,4 glikozidik bağları ile birbirine bağlanmış iki glikoz molekülünden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Selüloz, iki glikoz ünitesinden meydana gelen bir dimer olan sellobiyozdur. Ayrıca, aynı molekül içerisinde hidrojen bağları da oluşabilir. Selülozun kimyasal formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ 'dir ve (n) polimerizasyon derecesini temsil eder. Herhangi bir muamele önceki bu polimerizasyon derecesi bitkiden bitkiye veya herhangi bir tarımsal kalıntı veya atıktan değişebilir. Genellikle susuz glikoz üniteleri ile 10.000 ila 15000 arasındadır.

Selülozun uçlarından biri inert, diğeri ise aldehitten oluşan indirgeyicidir. Selüloz zincirleri, mikro lifler oluşturacak şekilde hidrojen bağları ile birbirine bağlanır. Mikro lifler içerisinde, kristalin bölge ve amorf bölge, kristalin bölge hafif bir baskınlık göstererek değişir. Bu kristal bölgeler, kimyasal muameleye karşı bir koruma sağlar ve enzimatik hidroliz için engel oluşturur (Fengel ve ark., 2011).



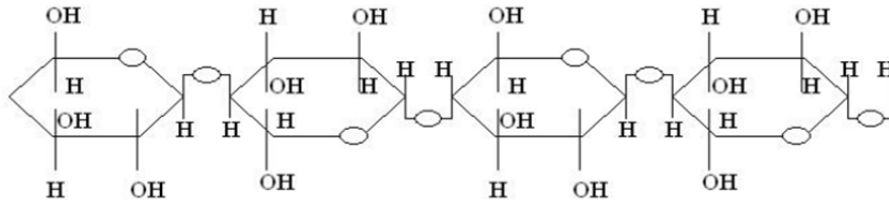
Şekil 2.1: Selülozun moleküler yapısı (n : polimerizasyon derecesi)

2.1.3.2. Hemiselüloz

Selülozdan sonra, miktar olarak lignoselülozik materyalde yeryüzünde en çok bulunan ikinci lignoselülozik bileşik hemiselülozdur. Biyolojik hammaddenin botanik kökenine bağlı olarak % 20-30 oranında bulunabilmektedir (Rooni ve ark., 2017). Genellikle, hemiselülozlar dallı olabilen heteropolimerler olan kısa bir zincirden (50-200 ünite) oluşur. Hemiselüloz amorf bir biyopolimerdir. Bu heteropolimer lifler, ksiloz ve arabinoz gibi beş karbonlu şekerler ve az miktarlarda galaktoz ve mannoz gibi altı karbonlu şekerler ve üronik asitten oluşur. Hemiselüloz, genel olarak, glikomannan ve ksilan olmak üzere iki temel tiptir. Ksilan, sert odunlarda diğer biyokütlelerde O-asetil 4-O metilglukuronoksilan şeklinde baskın hemiselülozdur. Ahşabın toplam bileşimine % 15-30 oranında bulunur (Özertan, 2007). Bu polimerin ana zinciri, β -1,4 glikosidik bağları ile birbirine bağlanmış ksiloz ünitelerinden oluşur. Glikomannan ise, reçinede bulunan ana hemiselülozlar, kütlelerinin %15-25'inin oluşturur.

Miscanthus giganteus arabinoksilan ve glikomannan olmak üzere başlıca iki tip hemiselüloz içerir. β -1,4 bağlarıyla D-ksiloz ünitelerine arabinoz yan zincirleriyle sıkı bir şekilde bağlanan arabinoksilan, hemiselüloz yapısının birincil

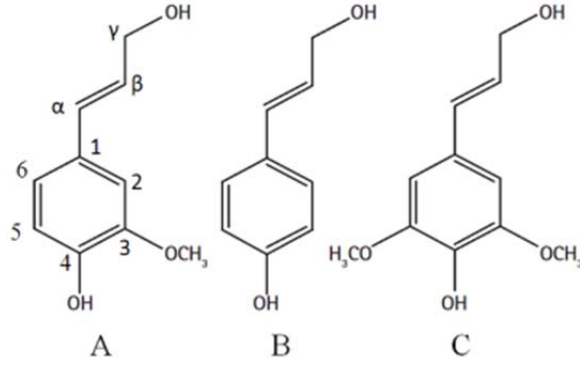
bileşenidir. Bunlar, β -1,4 glikozit bağları ile bağlanmış mannoz ve glikoz birimlerinden oluşan bir ana zincire sahip dallanmış kopolimerlerdir (Şekil 2.2). Galaktoz birimleri bazen α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanırlar (Ahmad ve ark., 2018). Glikomannan, hemiselülozun ikincil bileşenidir ve aralıklı dallanması zayıf kristallenmeye katkıda bulunur (Fengel ve ark., 2011).



Şekil 2.2: Hemiselülozun molekül yapısı

2.1.3.3. Lignin

Lignin, yüksek moleküller ağırlık biyokütle (bitkiler, otlar ve otlar kalıntıları vb.) bileşenidir. Lignin kararlı, fenilpropan ünitelerinden (*p*-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol) oluşur (Şekil 2.3). Bu üniteler monolignoller olarak adlandırılır. Lignin oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir ve temel yapı birimleri olarak açıklamak zordur. Lignin bitkisel, mikrobiyal saldırı ve enzimatik hidrolize karşı bir koruyucudur. 100 fenolik ünite civarında polimerizasyon derecesine sahip, amorf ve düzensiz bir fenolik polimerdir. Bu bileşenlerin oranları lignoselülozik malzemenin türüne bağlı olarak değişiklik gösterir. Kompleks bir lignin yapısı dimerler, trimerler ve tetramerlerin rastgele bağlanmaları sonucu oluşur. Ligninin spesifik bir yapı yoktur, ancak üç temel birim, guaiasilpropan, *p*-hidroksifenilpropan ve şiringailpropan şeklinde tanımlanabilir. Lignin bileşimindeki farklılıklar, türlere bağlı olarak, bu üç ünite arasındaki oranlarda farklılıklara neden olur.



Şekil 2.3: Ligninin moleküler yapısı: guaiasilpropan (A); p-hidroksifenilpropan (B); Şıngailpropan (C).

Lignoselülozik biyokütlenin ön muamelesi için birçok yöntem vardır. Ön muamele yöntemi düşük sermaye ve işletme maliyeti ile uygulanabilir olmalıdır. Ön muamele öncesi boyut küçültme gibi hazırlık, işleme veya ön koşullanma gibi ihtiyaçlar en aza indirilmelidir. Bu aşamada şeker üretimi ya çok düşük miktarda tutulmalı ya da tamamen önlenmelidir. Ligninin parçalanma ürünleri fermantatif mikroorganizmaları ya da hidrolitik enzimlerin faaliyetlerini inhibe edebilir (Dhamdere, 2012).

Lignin bitkinin kimyasal ya da enzimatik parçalanmasına direnç gösteren bir bariyerdir ve selüloz ve hemiselülozdan daha hidrofobiktir. Herhangi bir kimyasal dönüşüme olan direnci yüzünden, ligninin uzaklaştırılması biyokütlenin şekere dönüştürülmesinin en önemli basamağıdır.

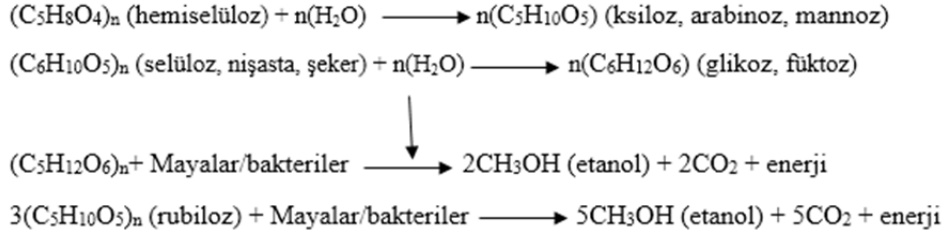
Ligninin (özellikle yumuşak odun lignini), fiziksel bir bariyer olması ve verimli olmayan absorpsiyonu ile enzimatik hidroliz üzerinde olumsuz bir etkisi vardır. Enzimlerle daha güçlü etkileşimi olan yumuşak odun ligninin daha yüksek derecelerdeki kondensasyonu sert odunlardan daha inatçı bir yapıya sahip olmasının sebebi olarak görülmektedir (Du ve ark., 2012).

Çizelge 2.1: Biyokütle yapısı ve biyokütlenin enzimatik ulaşılabilirliği arasındaki ilişki

Biyokütle yapısı	Yapı ulaşılabilirlik arasındaki ilişki
Selüloz kristallliği	Negatif ya da etkisiz
Polimerizasyon derecesi	Negatif ya da etkisiz
Yüzey alanı	Pozitif
Lignin tarafından selülozun kaplanması	Negatif
Hemiselülozla kaplanma	Negatif
Hemiselülozun asetilasyon derecesi	Negatif ya da etkisiz

2.2. Biyoetanol

Etil alkol olarak da bilinen biyoetanol, tarımdan elde edilen bir alkoldür. Bir enerji vektörüdür ve yenilenebilir enerji ailesine bağlıdır. Biyoetanol, molekül ağırlığı 46.069g/mol'dür. Bir karakteristik kokuya sahip renksiz bir sıvıdır, yoğunluğu 7894kg/m³, kaynama noktası 78.4°C'dir ve -117°C'de katılaşır, erime noktası -114°C'dir, parlama noktası 17°C. Biyoetanol, mikroorganizmaların, mayaların (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Pichia subtili*) ve bakterilerin (*Zymomonas mobilis*, *Clostridium ljungdahlii*) varlığında, fermantasyon yoluyla tahıllar, selülozlar ve hemiselüloz, meyveler, şeker kamışları ve basit şeker içeren yumrular gibi biyokütleden üretilir. Daha sonra damıtma ve dehidrasyon yapılır (Kim ve ark., 2008). Biyoetanolden farklı olarak, sentetik etanol, aynı özellik ve kimyasal formüle sahip olmasına rağmen, petrokimyasal kaynaklardan (kömür, yakıt, doğal gaz) etilen ile çatlatılarak üretilir. Biyokütleden biyoetanol üretimi aşağıdaki gibi özetlenebilir:



Fosil yakıtlar biyoetanol ile karıştırılabilir, E isimlendirmesine göre ve ardından maksimum biyoetanolün hacimsel yüzdesi olarak belirlenir. Bugün benzinli araçların çoğu E10 kullanabilecek şekilde tasarlanmaktadır. Genel olarak, etanolün benzine dahil edilmesi, ozon oluşumundan sorumlu moleküllerden biri olan belirli parçacıkların ve karbon monoksitin (CO) emisyonu üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Whitten ve ark., 2004). Bazı sera gazları ve diğer moleküllerin emisyonlarının azaltılmasına olumlu katkıda bulunmaktadır. (Ballerini, 2006). Buna ek olarak, yapılan araştırmalar biyoetanolün düşük karbon/yakıt oranına sahip olduğunu ve bunun sonucunda CO₂ emisyonlarını etkili bir şekilde azalttığını ve yüksek oktan içeriğine sahip olduğunu göstermiştir (Budzianowski, 2012).

2.3. Mevcut biyoetanol üretim durumu

Biyoetanol üreten ülkelerin çoğunluğu sükroz (şeker kamışı, pancar, sorgum) ve nişasta (tahıllar ve yumrular) gibi birincil nesil hammaddeleri kullanırlar. Toplam biyoetanol üretimi 1990 yılında 4,5 milyar litreden 2001 yılında 31 milyar litreye çıkmıştır (Berg, 2001). Bu küresel üretim hızla artarak 2006'da 39 milyar litreye çıkmış ve 2011'de 84,6 milyar litreye yükselmiştir (Fulton ve ark., 2004; Sarkar ve ark., 2012). Dünya çapında biyoetanol üretiminin 2015-2017 yıllarında 100 milyar litre olduğu tahmin edilmektedir (Taherzadeh ve ark., 2007). Dünyada biyoetanol üretiminde ABD ve Brezilya lider ülkeler olup dünya biyoetanol üretiminin neredeyse % 85'ini üretmektedirler (de Souza Abud ve ark., 2019).

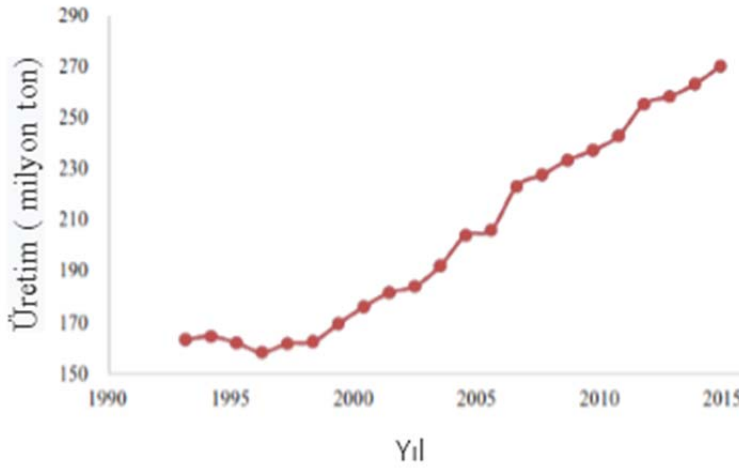
Amerika Birleşik Devletleri yaklaşık 59.5 milyar litre olan biyoetanolünü nişasta içeren hammaddelerden sağlarken Brezilya 27.8 milyar litre biyoetanol üretimini şeker kamışından üretmektedir (Anonymous, 2017). İkinci nesil biyoetanol üretimi artmakta ve 442 milyar litre biyoetanolün lignoselülozik hammaddelerden üretilebileceği tahmin edilmektedir (Kim ve ark., 2005).

2.4. Manyok bitkisinin etli kısım ve kabuklarının değerlendirilmesi

Manyok (*Manihot esculenta*) Latin Amerika kökenli çok yıllık tropikal bir bitkidir (Şekil 2.4). Euphobiaceae ailesinin bir üyesidir ve tropikal Afrika ve Güneydoğu Asya'da yaygın olarak yetiştirilmektedir . Mısır ve pirinçten sonra dünyada insan tüketimi için en büyük üçüncü gıda karbonhidrat kaynağı olarak kabul edilir (Adesanya ve ark., 2008). Manyok (*Manihot esculenta*) çoğunlukla kökleri ve yaprakları için yetiştirilir. Manyok kökleri ve yaprakları 500 milyondan fazla insanın temel besinidir ve özellikle Afrika, Güneydoğu Asya ve Güney Amerika gibi tropikal ve subtropikal ülkelerde yetiştirilir (Hermiati ve ark., 2011; Sivamani ve ark., 2015). Tek bir manyok bitki ağırlığı 100 g ile 3kg arasında olan 5-6 kg'lık yumrular üretebilir. Düşük verimli topraklarda yetişebilir ve herhangi bir sulama sistemi gerektirmez (Githunguri ve ark.). Bugüne kadar 300'den fazla çeşidi tanımlanmıştır ve verim, kök çapı, birçok hastalık ve zararlılara karşı direnç ve uzunlukları değişkenlik gösterebilir. Manyok yumrularından elde edilen 10'dan farklı ürün üretilmektedir. Bunlar geleneksel fermente edilmiş ve fermente edilmemiş gıda (Tapioca, attieké, abatcha, placali, gari vb.) ve nişasta, glikoz şurubu, kabartma unu gibi gıdalardır. Ayrıca, tutkal yapıştırıcısı olarak tekstil ürünlerinde, farmasötik, kimyasal ve biyoetanol endüstrisinde kullanılmaktadır (Adekunle, 2017; Hermiati ve ark., 2011).

Manyok kökü (kabuk ve kütse), yaprak ve saplardan oluşur. Manyok kökünün temel kısmı manyok küspesi, önemli miktarda karbonhidrat (şekerler ve nişasta) ile lif ve mineraller içerir (Hermiati ve ark., 2011). Manyok yaklaşık % 73 oranında karbonhidrat, %7 ham lif, % 6 protein, % 3 yağ ve % 7 külden oluşan

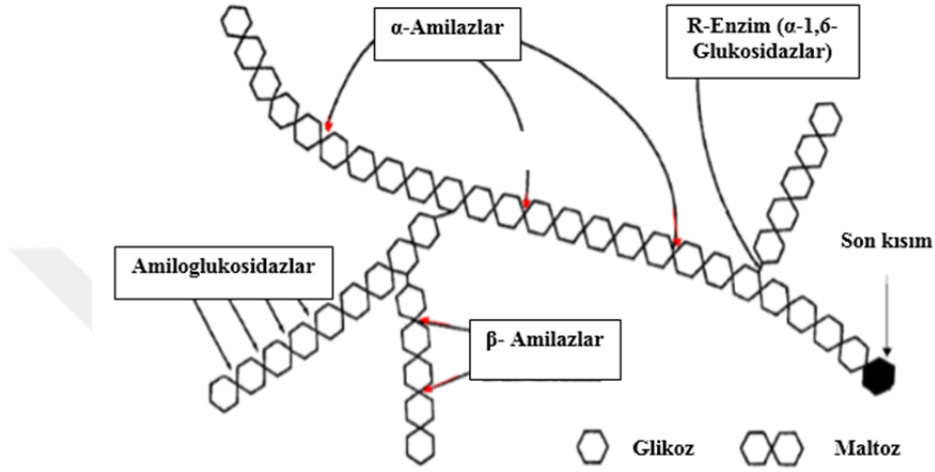
kuru madde içerir (Adekunle, 2017). Manyok'nun önemli nişasta içeriği (% 80.6) glikoz üretimi için önemli bir hammaddedir ve aynı zamanda biyoetanol üretimi için de kullanılabilir. Yıllık bir bitkidir ve üretiminin hektar başına 40-60 ton olduğu tahmin edilmektedir. Dünya üretimi, 2013 yılında yıllık 230 milyon ton olarak tahmin edilmiştir (Adekunle, 2017). Bu üretimin % 57'si Afrika, % 30'u Asya, % 11.4'ü Latin Amerika ve % 1.6'sı diğer ülkelerde gerçekleştirilmektedir (Zakpaa ve ark., 2009). En büyük üç manyok üreticisi, sırasıyla 53 milyon tondan fazla Nijerya, Brezilya ve Tayland'dır (Adekunle, 2017). Dünyada yıllara göre manyok üretimindeki değişim Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4: Dünya manyok üretimi 1993-2014

Manyokun farklı ürünlere dönüştürülmesi sırasında ortaya çıkan en büyük atıklardan biri olan manyokun kabuklarında önemli miktarda karbonhidrat bulunmaktadır (Manilal ve ark., 1991). Tek hücreli protein, biyogaz ve biyoetanol üretimi gibi katma değerli ürünler üretmek için birçok biyoteknolojik ve kimyasal

farklı kaynaklardan elde edilen amilolitik enzimler kullanılır (Ramachandran ve ark., 2014)



Şekil 2.7: Nişasta (amiloz ve amilopektin) yapısı ve amilolitik enzimlerle hidrolizi

2.5.1. Nişastadan biyoetanol üretimi

Nişastadan bioetanol üretiminde, nişasta amilolitik enzimler kullanılarak çirşlendirme, sıvılaştırma, sakkarifikasyon ile hidrolize edildikten sonra fermantayona tabii tutulur.

2.5.1.1. Çirşlendirme

Çirşlendirme, sulu ortamda ısı muamele sırasında nişasta granüllerin kristallliği ve boyut dahil olmak üzere birçok parametrenin geri dönüşümsüz modifikasyonu ile karakterize edilir (Atwell ve ark., 1983). Makroskopik bakış açısından, nişastanın viskozitenin ve dokusunun modifikasyonu ile sonuçlanır (Mabit ve ark., 2004; Lu ve ark., 2009). Nişasta yüksek sıcaklıklarda jelleşir. Ortamda önemli miktarda su varlığını gerektirir ve % 60 sudan stabilize olması için aktivasyon enerjisi artan su içeriği ile azalır (Spigno ve ark., 2004). Çirşlendirme

işlemi başlangıçta nişastanın granüler yapısını hidrolize eder ve α -amilaz enzimlerine daha kolay erişim sağlar. Çirişlendirme işleminde, yüksek sıcaklıkta su içeren bir ortamda, nişasta granülleri şişer, esnek hale gelir; bazıları patlar. Nişasta daha sonra jel ile dolu büyük torbalar haline gelinceye kadar kristal yapısını kaybeder. Bu torbalar mevcut tüm boşluğu doldurma eğilimindedir karıştırma ile ayrışır (Mali ve ark., 2002).

2.5.1.2. Sıvılaşma

Nişastanın sıvılaşması, çirişlendirmeden hemen sonra meydana gelir. Çirişlendirilmiş nişasta, kullanılan α -amilaz enzimin etkisi ile tarafından maltoz, oligosakarit ve küçük dekstrinlere kısmi hidrolize uğrar ve vizkozite düşer (Sharma ve ark., 2007). Sıvılaşma aşamasında kullanılan α -amilaz (EC 3.2.1.1), α -(1,4) amiloz ve amilopektin zincirlerine rastgele saldıran çeşitli mikrobiyal kaynaklardan elde edilen bir endoamilazdır ve α -(1,6) bağlarını hidrolize edemez. Nişastanın α -amilaz enzimleri tarafından hidrolizi Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Bakteri kökenli α -amilaz enzimleri 70-95°C'lik bir termo stabilite sıcaklığa sahip olup ve optimum pH'sı 4.5-7 arasındadır. Fungal kökenli amilazların optimum sıcaklığı kökenlerine göre değişir (30-40°C), bu optimum sıcaklıkların ötesinde α -enzimleri denatüre olurlar (Park ve ark., 2004).

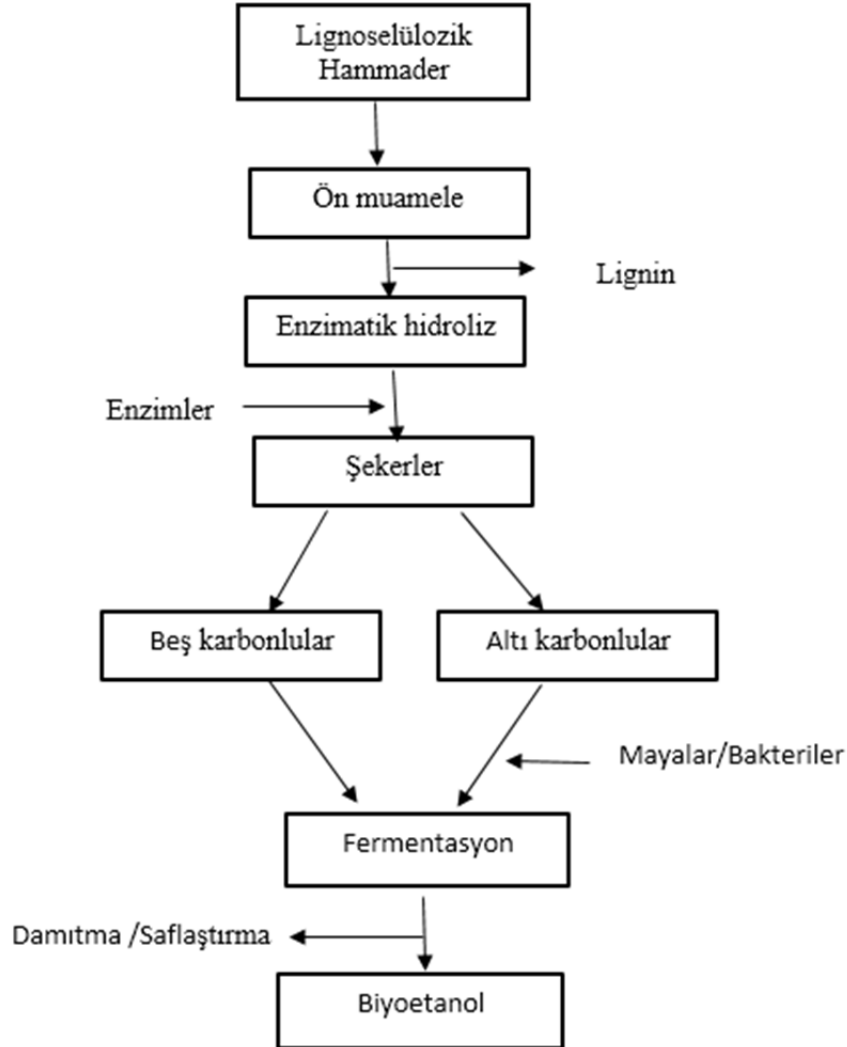
Çirişlendirme sırasında nişasta bulamacı 100-110°C'ye ısıtılır. Bu sıcaklıkta bir süre tutulduktan sonra ilave edilen α -amilazın çalışması ve sıvılaştırma işlemini gerçekleştirebilmesi için sıcaklık 80-90°C arasına düşürülür (Gomes ve ark., 2008). Bu nedenle, α -amilaz için toleranslı bir sıcaklığın seçimi çok önemlidir. Nişastanın hidrolizi, genellikle endüstriyel seviyede *B. amiloliquefaciens* ve *B. licheniformis* amilazlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilir (van der Veen ve ark., 2000). Yüksek miktarda α -amilaz kullanılması ve uzun süreli bir muamele, bazı amilolitik enzimler tarafından hidrolize karşı çok dayanıklı olan maltuloz oluşumuna yol açabilir (Kumar, 2010).

2.5.1.3. Sakarifikasyon

Sakarifikasyon, oligosakaritlerin, maltozların, maltotrioz ve sıvılaştırmadan kaynaklanan dekstrinlerin tamamlayıcı ve enzimatik hidrolizinin son aşamasıdır. Fermente edilebilir şeker verimleri (glukoz ve früktoz şurubu) glikoamilazın etkisiyle artar (Blennow ve ark., 2002). Aynı zamanda amiloglukozidaz olarak da bilinen glikoamilaz (EC 3.2.1.3), indirgeyici olmayan uçlarda α -glukanın hidrolizini katalize eden bir ekzoamilazdır. Öncelikle α -(1,4) glukozidik bağlarını ve daha az olarak da α -(1,6) glikozidik bağlarını parçalar. Bu da β -D-glikozun salınmasına neden olur (Pandey ve ark., 2000). Glikoamilaz enzimleri mantarlardan türetilir ve en çok bilinen ve kullanılan *Aspergillus niger* ve *Rhizopus sp.* glikoamilazlar, % 88-100 çözünür nişastayı hidrolize edebilirler ve tercihen daha yüksek bir moleküler ağırlığa sahip olan polisakaritler üzerinde etkilidirler (Horváthová ve ark., 2004). Fungi ailesinden gelen enzimler en çok 40-60°C arasında değişen optimum sıcaklıklarda aktiftir ve optimum pH'ları genellikle 4.0 ile 4.5 arasındadır (Ball ve ark., 1996). Sakarifikasyondan sonrası oluşan glukoz ve diğer şekerler etil alkol fermentasyonunda kullanılır.

2.6. Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi

Enzimatik hidrolizde hemiselüloz ve selülozdan oluşan lignoselüloz, in hedeflenir. Enzimler, hemiselüloz ve selüloza doğrudan erişemezler. Bu nedenle, enzimatik hidroliz adımlarına fermente edilebilir şekerler ve olası bir fermentasyon işlemine geçmeden önce lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi ön muamelesi (piroliz) esastır (Şekil 2.8) (Keshwani ve ark., 2009).



Şekil 2.8: Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol dönüştürülmesi işlemi (Keshwani ve ark., 2009)

2.6.1. Lignoselülozik materyalin Pirolizi

Biyoyakıt üretiminde en önemli işleme zorluğu, biyokütlenin ön muameleden geçirilmesidir. Lignoselülozik biyokütle, hemiselüloz, lignin ve selüloz olmak üzere üç temel bileşenden oluşur. Lignoselülozik kompleks,

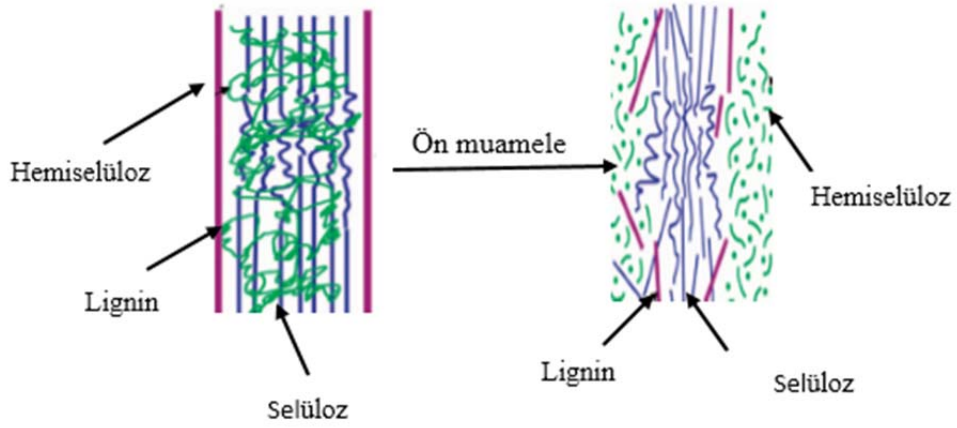
hemiselüloz zincirleriyle bağlanmış bir selüloz ve lignin matrisinden oluşur (Demirbaş, 2005).

Pirolizin amaçları, lignoselülozik hammaddenin fiziksel ve fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek biyokütle liflerinin gözenekliliğini arttırmak, yüzey alanını arttırmak, selülozun kristalliliğini azaltmak ve böylece selüloz ve hemiselüloza ulaşılabilirliği arttırmak, lignin ve hemiselülozu uzaklaştırmaktır. Piroliz, öncelikle ligninin parçalanmasını sağlar ve selülozun kristalliliğinin azalmasına yol açar. Selüloz ve hemiselülozun artışı ve kullanılabilirliğini artırır. Piroliz sırasında, selüloz ve hemiselülozun imhasını önlemek, hidroliz aşamalarını ve fermentasyonları inhibe edebilen olası yan ürünler oluşumundan kaçınmak önemlidir. Hemiselülozların hidrolizi, ön muamele sırasında kullanılan işlem koşullarına bağlıdır: yüksek sıcaklıklar hemiselülozların çözünme kinetiğini artırır. Şekil 2.9, pirolizin lignoselülozik malzemeler üzerindeki etkisini açıkça göstermektedir. Ön muamele uygulanmış hammaddenin engelleri ortadan kalkmaktave olası enzimatik hidrolizler için daha uygun hale gelmekte iken, ön muamele uygulanmamış hammadde enzimatik hidroliz için katıdır ve bu nedenle neredeyse enzimatik hidroliz imkansızdır (Balat, 2011). İdeal bir ön muamelede (Tenlep, 2009):

- ✓ Çok az veya hiç şeker üretimi ve parçalanma ürünü olmalı
- ✓ Tüm karbonhidratları yüksek oranda geri kazanmalı,
- ✓ Selüloz ve hemiselüloz yıkımına sebep olmamalı,
- ✓ Tüm karbonhidratları yüksek oranda geri kazanmalı,
- ✓ İşletme maliyetleri, özellikle buhar tüketimi, elektrik ve kimyasal reaktifler açısından mümkün olduğunca düşük olmalı,
- ✓ Hidroliz ve fermentasyon aşamalarını inhibe edici yan ürün oluşturmamalıdır,
- ✓ Ön muamele uygulanmış sıvı, detoksifikasyon olmaksızın fermente olmalı

- ✓ Önerilen ön muamele yüksek substrat konsantrasyonlarında hızlı ve etkili olmalı ve hammaddekayıpları minimum düzeyde olmalıdır.

Şekil 2.9'de lignoselülozik hammaddenin ön muamele uygulanmış ve uygulanmamış halleri gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi ön muamele uygulanmamış olan dallı darı dirençli yapıya sahipken, ön muamele sonrası bu dirençli yapı kırılmış ve ulaşılabilirlik arttırılmıştır (Balat, 2011).



Şekil 2.9: Lignoselülozik hammadden in ön muamelesi (Balat, 2011).

Ön muamele selülozik biyokütlenin fermente edilebilir şekere dönüşümünde uygulanan en pahalı işlemlerden biridir. Ön muamelenin geliştirilmesi bitkinin hücre duvarının kimyasal yapısının ve ön muamele boyunca meydana gelecek kimyasal reaksiyonların daha iyi anlaşılabilmesi ile mümkündür. Bu amaçla kullanılan piroliz dört temel aşamada gruplandırılabilir: fiziksel, fiziko-kimyasal, kimyasal ve biyolojik ön muamelelerdir.

2.6.1.1. Mekanik veya fiziksel ön muamele

Mekanik veya fiziksel ön uygulama, lignoselüloz biyokütleler kullanılarak biyoetanol üretiminde ilk adımdır ve amacı, lignoselüloz biyokütlelerinin polimerizasyonun derecesini azaltmak için enzimlerin erişebileceği yüzeyleri arttırmaktır. Öğütme genellikle ön muamelenin ilk adımı olarak düşünülür. Öğütme, fiziksel boyut küçültme için geleneksel cihazlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Öğütmenin en önemli dezavantajı yüksek enerji gereksinimine ihtiyaç duymasıdır. Bu sorunun çözümü için, çeşitli öğütme vardır. bunlar roll öğütme , ıslak diskle öğütme, bilyeli öğütme , titreşimli öğütme , çekiçli öğütme ve sıkıştırılmalı öğütmedir (Sarkar ve ark., 2012; Talebnia ve ark., 2010). En çok ve yaygın kullanılan öğütme, ıslak diskle öğütmedir. Ancak enzimatik hidrolizden sonra glikoz ve ksiloz verimleri bilyeli öğütmede ıslak diskle öğütmeye nazaran daha yüksek bulunmuştur. Şiddetli fiziksel ön muamele, selülozun enzimatik sindirilebilirliğini artırır.

2.6.1.2. Fiziko-kimyasal ön muamele**2.6.1.2.1. Karbon dioksit patlatması**

Karbondioksit ön muamelesinin prensibi, esas olarak Afex muamelesi ile benzerlik bir şekilde göstermektedir, bu da amonyak yerine karbon dioksit (CO_2) kullanılır. Lignoselülozun etkili bir ön muamelesi için geliştirilmiştir. Yüksek basınç altında (kritik basınç 73 atm), karbon dioksit süper kritik durumunda tutulur. CO_2 molekülleri, büyüklük bakımından su ve amonyak ile kıyaslanabilir ve biyokütlenin küçük gözeneklerine girebilir. Karbon dioksit basıncı hızla kaldırıldığında biyokütle patlar ve selüloz ulaşılabilirliği için daha fazla yüzey alanı oluşur. Aynı zamanda hammaddenin hemiselüloz yapısını önemli ölçüde çözüp uzaklaştırdığı da belirtilmiştir.

Teymouri ve ark. (2005) yılında bu tekniği kabayonca (alfalfa) üzerinde bir deneme yapılmıştır (5.58 MPa basınçta ve 4 g CO_2 /g fiber varlığında). 24 saat

enzimatik hidrolizden sonra teorik verimin % 75'ine ulaşılmıştır. Bununla birlikte, bu teknik zamanla hiç bir gelişme göstermemiştir (Ogier ve ark., 1999).

2.6.1.2.2. Buhar patlatması

Buharla ön uygulama sırasında, bitki (biyokütle) basınç altında buhar enjeksiyonu ile hızlı bir şekilde yüksek sıcaklığa (180-240°C) ve yüksek basınçta (0.69-4.86 MPa) ısıtılır. Yüksek basıncın amacı patlamaya açık bir durum oluşturmaktır (Kabel ve ark., 2007). Buhar patlatması ön muamele sırasında, hemiselülozun (asetil gruplarının salınımına bağlı otohroliz) lignin füzyonuna kısmi hidrolizine ve bitki (biyokütle) duvarının yoğun yıkımına neden olarak, enzimler için erişilebilir yüzeyleri artırır (Kabel ve ark., 2007). Polimerizasyon derecesinde bir düşüşle beraber, aynı zamanda selülozun kristallik endeksinde de bir artış olur (Puls ve ark., 1985). Ön muamelenin etkinliği büyük ölçüde kullanılan sıcaklığa bağlıdır.

Sassner ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, selülozun enzimatik dönüşüm oranı 180 ve 240°C'de sırasıyla % 54 ve % 88 olarak bulmuşlardır. Buhar patlaması genellikle, lignoselülozik biyokütlenin parçalanması ve ön uygulamaya yönelik en etkili yöntemlerden biri olarak tanımlanmaktadır (Eklund ve ark., 1990; Quintero ve ark., 2011). Yüksek sıcaklıklarda çalışan buhar patlaması, selülozun piroliz reaksiyonlarına ve inhibe edici bileşiklerin oluşumuna yol açar (Keshwani ve ark., 2009). Bu proseste 90 atm basınç ardından atmosferik koşullara maruz bırakılacak şekilde uygulanmış ve böylece ligninin ve hemiselülozun uzaklaştırılması sağlanmış olup selüloza hidroliz sonucu ulaşılabilirlik artırılmıştır (Keshwani ve ark., 2009).

2.6.1.2.3. Sıcak Su ile ön muamele

Bu yöntem, yüksek basınç altında lignoselülozik biyokütle su ile bir pişirmedir ve bu nedenle işlem basit bir otoklav olarak çalışır. Bu ön uygulama hemiselülozların tamamen çözünmesine ve ligninin önemli ölçüde çözünmesine

yol açacaktır ve selülozu enzimatik hidroliz için ulaşılabilir bir hale getirmek amacıyla 160-240°C arasında değişen sıcaklıkta ve yüksek basınçta bir uygulama yapılır (Van Walsum ve ark., 1996). İnhibitör oluşumunu en düşük seviyede tutmak için pH 4 ile 7 arasında tutulur. Sonuç olarak çözünen hemiselüloz öncelikli olarak ilave enzime gereksinim duyan ksiloza dönüşür (Limayem ve ark., 2012). Bu teknik başlangıçta Avusturya'daki Bobleter (1994) tarafından ve daha sonra Bouchard ve ark. (1989) ve Walch ve ark. (1992) tarafından geliştirilmiştir.

Kontrol edilen pH'da, suyun doyma buhar basıncının üstünde seçilen bir basınçta ve belirli bir sıcaklıkta biyokütlenin yapısı suyla beraber hidroliz olurken basınçlı sıcak su kullanımı oligosakkaritlerin hidrolizini minimize eder. Sıcak su uygulamasının amacı; ön muamelelerin sert koşullarında aldehitlere dönüşebilecek monomer şekerlerin oluşumunu engellemek ve enzimatik hidrolizi selüloz ve çözünebilir oligosakkaritlerin fermente edilebilir şekerlere dönüşümünde kullanmaktır. Sıcak su uygulamasının avantajı düşük reaktör maliyetidir.

Laser ve ark. (2002) yılında, bu ön muamele yöntemiyle (200-230°C'de 15 dakika) 10 farklı hammadde (odunsu ve otsu) üzerinde bir denemiştir. Yaptıkları çalışmada, selülozlar ve hemiselülozlar tamamen çözünmüş ve enzimatik hidroliz, % 95 oranında monomerik şeker verimleri ile sonuçlanmıştır.

Kohlmann ve ark. (1995) tarafından, pH kontrolü ile termohidrolize yeni bir yaklaşım önerilmiştir. Bu koşulların, gözenek boyutunu artırarak ve kristallik indeksini azaltarak selülozun enzimatik hidrolizini teşvik etmesi amaçlanmıştır. Van Walsum ve ark. (1996) ekibi 1994 yılında, çeşitli substratlarla bir sıcak Su ile ön muamele (termohidroliz) tekniği geliştirmiştir. Yaptıkları çalışmada, pentozların geri kazanma oranı % 80'den fazla olmuştur.

Bir diğer çalışma, Perez-Verdin ve ark. (2009) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, buğday samanını sıcak su yöntemi ile piroliz etmişlerdir. Sonuçta % 80 ksiloz ve % 91 glikoz verimi elde etmişlerdir (Mood ve ark., 2013). Bu nedenle, termohidroliz ilave kimyasalların bulunmamasından dolayı özellikle çekici bir ön muamele tekniğidir,. Ayrıca, yüksek pentoz geri kazanma oranları, ön muamele

edilmiş selülozun iyi enzimatik sindirilebilirliği, yüksek konsantrasyonlarda lignoselülozik biyokütle kullanımı ($> 100\text{g/l}$), inhibe edici ürünlerin bulunmaması ve ön uygulamadan kaynaklanan atıkların en aza azalması gibi avantajları da vardır.

2.6.1.2.4. Amonyak fiber patlatması (AFEX)

AFEX, linyoselülozik materyalleri yüksek sıcaklık ve basınç ön muamelesi ve ardından hızlı basınç tahliyesi ile ortaya çıkaran bir alkali termal ön muameledir. Bu yöntem, lignoselülozik malzemenin orta basınçlı sıvı amonyak (yaklaşık 15 bar) ile muamele edilmesinden ve ardından amonyağın buharlaştırılması ve substratın patlatılması için ani bir dekompresyon işleminden oluşur. Bu teknik, buhar patlamasının bir çeşididir, ancak amonyak kullanımı sayesinde çok daha düşük sıcaklık koşullarında gerçekleşmektedir. Reaktördeki ortalama sıcaklık 50 ila 80 °C arasında olduğu için inhibe edici bileşiklerin oluşumu minimumda tutulur (Weil ve ark., 1998).

Bu yöntemde biyokütle örnekleri (1-2 kg/kg biyokütle) amonyakla beraber 90°C 30 dakikada basınç altında tutulur. AFEX yönteminde lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılmaz. Fakat yapısında meydana gelen değişiklikler sayesinde biyokütlenin yüzey alanını arttırmaktadır ve hemiselüloza daha fazla ulaşılabilirlik sağlamaktadır. Genel olarak, AFEX asit ve buhar patlatması yöntemlerine kıyasla daha ılımlı bir uygulamadır (Xu ve ark., 2014). Artık amonyak, substratı fermente edebilen mikroorganizmalar tarafından bir besin kaynağı olarak kullanılabilir.

Bu yöntemle muamele edilmiş lignoselülozik malzemeler esas olarak tarımsal substratlardır: buğday samanı, arpa samanı, küspe, pirinç samanı vb (Mosier ve ark., 2005). Selülozun enzimatik hidroliz verimleri teorik verimin % 80 ila 90'ı arasındadır (Alvira ve ark., 2010; Kim ve ark., 2005) . Optimal koşullarda, % 90 selüloz ve hemiselüloz dönüşümleri sağlanmıştır. AFEX muamelesinde, diğer ön muamele yöntemlerine kıyasla düşük enzim yüklemesi sağlar (Kim ve ark., 2005).

2.6.1.2.5. Mikrodalga fırın ve elektron kiriş ışınlama ile ön muamele

Bir mikrodalga fırında lignoselülozik biyokütlenin ön muamelesi de uygulanabilir bir yöntemdir. Mikrodalga fırının yüksek ısıtma verimliliğinden faydalanılır. Mikrodalga ön uygulamada, termal olan ve olmayan etkiler içerdiğinden fiziko-kimyasal bir işlem olarak da düşünülebilir. Mikrodalga uygulamasının, pirinç kabukları, buğday sapları, kağıt hamuru ve miscanthus gibi tarımsal atıkları ve biyokütle atıklarının hidrolizinin geliştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Mikrodalga ön uygulamalarının hemiselüloz ve çözülebilir lignini ortadan kaldırması beklenir. Ek olarak, ısıtmadan termal ve termal olmayan etkileri, lignoselülozik biyokütlenin gözeneklerini artırabilir ve selülozik enzimlerin mevcudiyetini artırabilir. Ancak, mikrodalga dayalı ön işlemlerin asit ve alkali gibi bazı kimyasal uygulamalarda daha etkili olacağı bulunmuştur (Lu ve ark., 2009). Yüksek enerjili radyasyon, spesifik yüzey alanı artışı dahil olmak üzere selülozik biyokütlede daha fazla değişiklik ile sonuçlanmıştır. Lu ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, toplam indirgen şekerde bir artış olduğunu görülmüş ve mikrodalga ışınlı pirinç samanı ve küspe sırasıyla 1.6 ve 3.2 faktörü ile üretim bildirmiştir. Intanakul ve ark. (2003) pirinç samanının, buğday sapları ve küspe mikrodalga ön muamelesinin ardından lignin ekstraksiyonunun % 43-55'lik bir indirgen şeker verimi elde ettiği bildirmiştir.

2.6.1.3. Kimyasal ön muamele

Bu işlemde kullanılan kimyasal maddeler, lignoselüloz biyokütle engellerini enzimatik hidroliz sırasında enzimler için daha erişilebilir bir formda yumuşatmayı amaçlar. Ekonomik seviyeden, kimyasal maddelere daha erişilebilir, elde edilmesi ve manipüle edilmesi daha kolay, daha ucuzdur. Kimyasal ön muamelede kullanılan yöntemler asitler (Seyreltik ve konsantre asit) ve alkalidir. Seyreltilmiş asit ile ön muamele en ikna edici ve en etkili yöntemdir ve, bugüne kadar kimyasal ön muamele için daha iyi bir yöntem yoktur. (Mutripah ve ark., 2014). Bu yöntemin kullanımı kolaydır ve kısa sürede iyi dönüşüm verimi sağlar.

2.6.1.3.1. Asit ile ön muamele

Asit ön muamelesi en önemli yöntemlerden biridir ve lignoselüloz biyokütlelerden yüksek miktarda şeker elde etmeyi hedeflemektedir. Genellikle konsantre veya seyreltilmiş asitler (genellikle % 0.2 ila % 2.5 arasında h/h) 130°C ila 210°C arasında sıcaklıklarda ile gerçekleştirilir. Seyreltik asit uygulaması biyopolimerden hemiselülozun uzaklaştırılmasında kullanılırken, konsantre asit uygulaması selülozun dönüştürülmesinde kullanılır. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen konsantre asit uygulaması şeker oluşumunda oldukça etkin olmasına rağmen şekerlerin parçalanma ürünlerine dönüşmesine de sebep olabilmektedir. Sülfürik asit, asit ön muamelesinde yaygın olarak çeşitli asit türleri (hidroklorik asit, nitrik asit ve fosforik asit) kullanılır (Quintero ve ark., 2011).

Asitle ön muamele lignoselülozik materyalin dönüştürülmesinde en yaygın ve etkili yöntemlerden biridir. Genellikle asit hidrolizi konsantre asit ve seyreltik asit hidrolizi olmak üzere iki gruba ayrılır. Konsantre asit hidrolizinin düşük sıcaklık ve yüksek şeker verimi gibi avantajları vardır. Konsantre asidin dezavantajı ise büyük miktarda asit tüketimi, ekipman korozyonu, önemli miktarda enerji gerektiren asit geri kazanımı ve daha uzun reaksiyon zamanıdır. Seyreltik asit hidrolizinde ise aksine daha az asit kullanımı ve nispeten daha kısa reaksiyon süresine ihtiyaç duyulur. Ancak daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulur. Daha düşük şeker verimi, daha az ekipman korozyonu ve arzulanmayan yan ürün oluşumu gözlemlenmektedir (Rhenals, 2013). Bununla birlikte, asit ön uygulaması, asetik asit, furfural ve 5 hidroksimetilfurfural gibi çeşitli inhibitörlerin üretilmesine neden olur. Bu ürünler mikroorganizmaların gelişmesi için inhibitörleridir (Sarkar ve ark., 2012). Bu ön muamele selülozun enzimatik sindirilebilirliğini önemli ölçüde artırır (Stavrinides ve ark., 2010).

Mabee ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada seyreltilmiş sülfürik asit ile ön muameleden geçirilmiş birçok ürünün selülozunun enzimatik hidroliz verimlerinin % 90'dan yüksek bulmuşlardır. % 1 asit konsantrasyonunda, sıcaklık 220°C'den

180°C'ye düşürüldüğünde selülozun hidroliz verimi, % 98'den % 45'e düşmüştür (Swana ve ark., 2011; Weil ve ark., 1998).

2.6.1.3.2. Alkali ile ön muamele

Alkali ön uygulaması, kağıt işlemlerine daha uygundur ve çoğu zaman kağıt endüstrisi pilotları ile birlikte geliştirmektedir. Lignoselülozik biyokütlenin alkali ön muamelesi, lignin matrisini sindirir ve selüloz ve hemiselülozu enzimatik hidroliz için uygun hale getirir. Lignoselülozun alkali muamelesi, hemiselülozlar, lignin ve silisi eriterek, üronik ve asetik esterleri hidrolize ederek ve selülozu şişirerek hücre duvarı parçalanır. Lignoselülozik biyokütlenin pirolizinde sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit ve amonyak en çok kullanılan reaktiflerdir. Bunlar arasında ligninin uzaklaştırılmasında en başarılı olan baz ise sodyum hidroksittir (Xu ve ark., 2014; Yeh ve ark., 2016).

Alkali ön muamelede diğer ön muameleler teknolojilerinden daha düşük sıcaklık ve basınçlarda kullanır. Bu yöntem ligninin biyopolimerden uzaklaştırılmasında, selüloz ve hemiselülozun ulaşılabilirliğini artırılmasında ve hidrolizle monomerik şekerlere dönüştürülmesinde oldukça etkindir. Alkali ile hidroliz biyokütlenin sabunlaşma mekanizmasına dayanır. Alkali katalizörler hemiselüloz ve lignin-karbonhidrat bağlarındaki ester bağlarını parçalamaktadır. Bu da asidik işlemlerde olduğu gibi enzimlerin hücre duvarına ulaşılabilirliğini artırır. Alkali ön muameleleri önemli miktarda hemiselülozu çözmektedir.

Selülozun enzimatik hidrolizde etkin bir şekilde parçalanması, ön muamele sırasında kullanılan sodyum hidroksit konsantrasyonuna göre değişir. %2-4 arasında sodyum hidroksit konsantrasyonu ile pirolizin ardından uygulanan enzimatik hidrolizde sakkarifikasyon oranı % 30'dan az iken, % 10'luk bir uygulamadan sonra %80-90 arasındadır. Sun ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada buğday samanında hemiselüloz uygulanan farklı alkalinin çözümlerini analiz etmişler ve optimum işlem koşulunun 20°C'de 144 saat boyunca % 1.5 NaOH kullanılması olduğunu bildirmişlerdir. Saha ve ark. (2006) yılında yaptıkları

çalışmada, şeker verimini geliştirmek amacıyla değişik konsantrasyonlarda baz uygulamalarının yanında geleneksel ısıtma yöntemi ve mikrodalga ile ısıtmayı kıyaslamış ve optimum koşulun 0.1g alkali/g biyokütle, 20°C’de 2 saat bekletilip ardından mikrodalga uygulamasının (190°C, 50 gL-1 katı içerik, 30dak..) olduğu belirtmişlerdir. Enzimatik hidroliz pH 4.8’ de 50°C 160 rpm devirde selülag (12 FPU/g) ve sellobiyaz (21CBU/g) enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve şeker verimi 58.7 g şeker/100 g biyokütle olarak belirtilmiştir.

2.6.1.3.3. Organosolv ön muamele

Kağıt endüstrisinden gelen bir teknik olan Organosolv ilkesi, lignin fraksiyonunu eritmek ve uzaklaştırmak için ön işlem sürecinde katalitik ajan olarak hareket eden HCl ve H₂SO₄ gibi bir inorganik asit ile bir organik çözücünün karıştırılmasını içerir. Genel olarak bu işlemde kullanılan ana organik çözücüler etanol, metanol, fenol, trietilen glikol, etilen glikol, asetonur (Zhao ve ark., 2011). Bu ön muamele yöntemi, ligninin ve hemiselülozik fraksiyonun çözünmesine neden olur ve esas olarak selülozdan oluşan katı bir artık oluşumuna yol açar. Genel olarak, Organosolv işlemi, şekerlerin iyi geri kazanım verimlerinin elde edilmesini mümkün kılar. Bu işlemin temel sorunu, çözücülerin yüksek maliyetidir.

2.6.1.4. Biyolojik ön muamele

Biyolojik ön işlemlerde, *Phanerochaete chrysosporium* veya bazı durumlarda *Pleurotus florida*, *Coriolopsis caperata* RCK2011 ve *Ganoderma sp* gibi mikroorganizmalar kullanılarak ligninin bozunması hedeflenir. Beyaz çürükçül mantarlar eş zamanlı olarak hem ligninin hem de hücre duvarı karbonhidratlarını paraçalayabilseler de bazı türler selüloza dokunmadan lignini uzaklaştırmaktadır (Alvira ve ark., 2010). Lignoselülozların biyolojik ön muameleleri ısıtma ve diğer kimyasal giderleri bakımından yüksek enerji gereksiniminden kaçınmalarına rağmen düşük reaksiyon hızları nedeniyle diğer fiziksel ve kimyasal ön muameleler kadar geniş çaplı olarak incelenmemişlerdir. Selülag içermeyen mutant suşlar elde

edilmiş ve lignoselülozların biyolojik olarak parçalanması için önerilmiştir (McMillan, 1997). Bu metot kimyasal maddelere ihtiyaç duymaz ve daha az enerji kullanır (McMillan, 1997). Ancak, işlemin yavaşlığı ve çalışma koşullarının kontrol edilmesindeki zorluklar, bu tür işlemlerin kullanımını pek mümkün kılmaz. Çalışmaların çoğu laboratuvar ölçeğinde yapılmıştır. (Eriksson ve ark., 2002; Kohlmann ve ark., 1995; Pandey ve ark., 2000).

2.7. Lignoselülozik hidrolizat inhibitörleri ve fermantasyon sırasında inhibisyon mekanizması

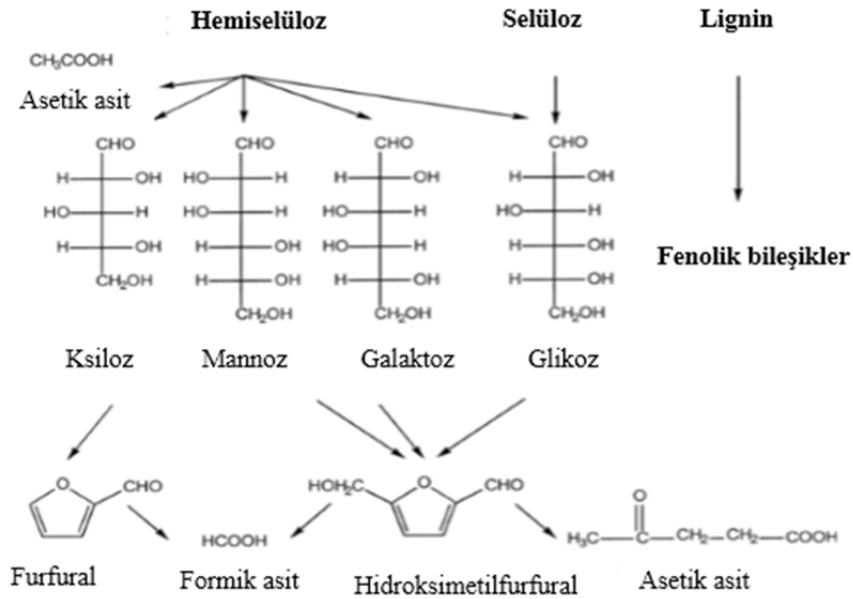
Biyokütlenin etanol gibi yakıtlara dönüştürülmesi, spesifik mikroorganizmaların kullanımınıyla şekerlerin fermantasyonunu içerir. *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* ve *Escherichia coli*'nin eserleri gibi mikroorganizmalar maruz kaldıkları streslerle doğrudan ilişkilidir. Bu stresler çevreden (pH, sıcaklık, oksijenin varlığı) ve ayrıca fermantasyon ortamında bulunan kimyasal türlerden de gelebilir. Bu son nokta, birincil ve ikinci nesil biyoetanol üretimi arasındaki temel farklardan birini işaret eder.

Birincil nesilde (sükroz ve nişasta), şekerler doğrudan veya enzimatik hidroliz veya düşük bir jelatinleşme sıcaklığına sahip asit uygulaması ile elde edilir. Bu nedenle şekerler ve üretilen etanol dışında, fermantasyonu engelleyebilecek hiçbir yan ürün yoktur. Biyokütlenin etanol gibi yakıtlara dönüştürülmesi, spesifik mikroorganizmaların kullanımınıyla şekerlerin fermantasyonunu içerir. Ön muamele olarak pirolizi kullanan ikinci nesil için, lignoselülozik malzemeler hidrolizdan sonra, fermantasyonuolumsuz etkileyebilenyan ürünler oluşturur (Şekil 2.10).

Lignoselülozik biyokütle ön muamele sırasında fermantasyonu inhibe eden bileşikler oluşur. Bunlar organik asitler (asetik asit, formik asit ve levulinik asit), furanlar (Furfural, HMF) ve fenolik bileşiklerdir (Şekil 2.10). Bu inhibe edici bileşenlerin konsantrasyonları 1-2g/L'den daha fazla olduğu zaman fermantasyonu gerçekleştiren mikroorganizmaların büyümesini etkilemektedir (Hanif ve ark.,

2017). İnhibitör maddelerin uzaklaştırılması membranla ayırma, aktif kömür ve iyon değişim reçineleriyle sağlanabilmektedir (Yasarla, 2014). Serbest kalan bu bileşenler çoğunlukla çözünür olup bir kısmı 100-400 nm arasında değişen büyüklükteki çözünmeyen kolloidal parçacıklardır. Partiküllerin büyüklüğü ön muamelenin sertliği ve koşullara bağlı olarak değişmektedir. Çözünmeyen bileşenler lignin ve daha düşük moleküler ağırlığına sahip lignin türevleridir.

Ligninin parçalanmasıyla oluşan fenolik bileşenler enzimatik hidroliz ve fermentasyonda kilit rol oynamaktadır. Vanilin, siringaldehit, trans-sinamik asit ve hidroksi benzoik asit gibi fenollerin selüloz ve hemiselülozun hidrolizini ve fermentasyonu inhibe ettiği belirtilmiştir. İnhibisyonlar uzun bir gecikme süresi, bir verimlilik (g/L/s), daha düşük verim veya hatta fermentasyonun durmasıyla sonuçlanır.



Şekil 2.10: Lignoselülozun ön muamelesinden kaynaklanan inhibitörler (Palmqvist ve ark., 1996)

2.7.1. Furanlar

Furanlar, çoğunlukla furfural ($C_5H_4O_2$) ve HMF (5-hidroksimetilfurfural)'den ($C_6H_6O_3$) oluşmaktadır. Şekerler (pentozlar ve heksozlar) dehidrasyonundan, hemiselülozun hidrolizi sırasında meydana gelen reaksiyondan (şekil 2.10) elde edilen ürünlerdir. Bu iki bileşiğin alkolik fermantasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir ve bir aldehit grubuna sahip olduklarında, genel olarak mikroorganizmalar için zararlıdır. Örneğin furfural, maya DNA'sına zarar verebilir veya etanol üretimi için gereken bazı enzimleri inhibe edebilir (Almeida ve ark., 2008). *S.cerevisiae*, anaerobik koşullar altında furfuralı furfuril alkol ve HMF'yi 2,5-di-hidroksimetilfurana, daha az inhibe edici türe dönüştürür (M. Taherzadeh ve ark., 2008; Palmqvist ve ark., 1996).

HMF (5-hidroksimetilfurfural), lignoselülozik biyokütlenin ön muamelelerinde çok yüksek sıcaklıklarda ve asit konsantrasyonunda oluşur. Etanol fermantasyonunun reaksiyonu inhibe etmekte veya uzun bir lag fazına ve etanol verimliliğinde bir azaltmaya neden olmaktadır. Bu etkiler furan konsantrasyonuna ve kullanılan maya türüne bağlıdır. HMF ve furanın daha az inhibe edici olan alkol formlarına dönüşümü, her bir bileşiğin 2 gL^{-1} oranında *S.cerevisiae*'nin bulunduğu anaerobik kültüre ilavesiyle incelenmiştir. HMF ve furfural'ın kültürde bulunduğu süre boyunca, hiçbir gelişmenin olmadığı görülmüştür. Bileşiklerden sadece birinin 4 gL^{-1} oranında ilave edildiğinde, HMF ve furfuralın spesifik hız oranlarının düştüğü açıkça gözlenmiştir (Sehnm ve ark., 2013).

2.7.2. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşiklerin çoğu ön muamele sırasında hidrolize lignin fragmanlarından gelir, ancak aynı zamanda odun ekstraktlarından veya sakaritlerden de gelebilir (katekol pentoz veya heksenuronik asit (Jönsson ve ark., 2016; Larsson ve ark., 2001)). İnhibisyonlarının kökeninin mekanizması bugüne kadar iyi bilinmemektedir. Fenolikler büyük oranda asit hidrolizinde ligninin ve karbonhidratların parçalanmasıyla oluşurlar. Fenolik bileşiklerin miktarı ve çeşidi

biyokütlenin kaynağına bağlıdır ve bu bileşikler organik membranlara girerek bariyer etkilerini azaltabilir (Palmqvist ve ark., 1996). Lignoselülozik biyokütleden gelen çok sayıda fenolik bileşik vardır. Şimdiye kadar, her birinin engelleyici karakterinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmemiştir. Bazı fenolik bileşikler, *S. cerevisiae* ile 0.02 ile 1 g.L⁻¹ arasındaki konsantrasyonlar için incelenmiştir (Larsson ve ark., 2001). Bileşenlerin her biri, düşük konsantrasyonda bile, mikroorganizma büyümesinin azalmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, sadece dört bileşik etanol verimi üzerinde gerçek bir etkiye sahiptir. O-vanilin, tüm fermantasyonları 0.2 g.L⁻¹ konsantrasyonda inhibe ederken p-benzokinon, 0.02g.L⁻¹ konsantrasyonda bile, tüm etanol üretimini inhibe eder. 1g.⁻¹L'deki verimi etkileyen diğer iki bileşikler, sinamik asit ve 3,4-dimetoksi-sinnamik asittir (Palmqvist ve ark., 1996).

2.7.3. Organik asitler

Organik asitlerin mikroorganizmaların gelişimini sınırladığı bilinmektedir. *S. cerevisiae*, fermantasyon ortamında organik asitlerin varlığına karşı çok duyarlıdır. Bunların varlığı hemiselülozun hidrolizinin asetik asit oluşumuna neden olduğunu, formik ve levulinik asidin furfural ve HMF'den elde edilebileceğini bilmek kaçınılmazdır. Asetik, formik ve levulinik asit lignoselülozların hidrolizatlarında en çok bulunan zayıf asitlerdir. Formik asit yüksek sıcaklıklarda ve asidik koşullarda da oluşabilmektedir (Jensen ve ark., 2011). Asitlerin ayrılmış formu, maya membrana içine girmektedir. İki mekanizma inhibisyonu açıklayabilir; maya protonları boşaltmak ve pH'ı nötr tutmak için enerji (ATP) kullanır ve protonların boşaltılmasından sonra, hücrelerde kalan anyonlar maya için toksik olacaktır (Palmqvist ve ark., 1996). Bu organik asitlerin varlığı, ön uygulamalar sırasında ekstraksiyonların ciddiyetini sınırlayarak önlenebilir.

2.7.4. Etanol ve şeker konsantrasyonu

Bazı fermentasyonlar, 280g.L⁻¹ başlangıç glikoz konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Bu şeker konsantrasyonunun fermentasyon ve mikroorganizma verimleri üzerinde her zaman doğrudan etkileri olmuştur. Fermentasyonun verimi, genellikle ortamdaki şekerlerin oranı ile orantılıdır, yani fermentasyonun verimi, şekerin miktarı ile artar. Aşırı miktarda şeker konsantrasyonu, sabit bir fermentasyon hızının kaynağı gibi görünmekte ve böylece mikroorganizmalar tarafından şeker tüketiminde yetersizlik yaratmaktadır (Zabed ve ark., 2014). Yığın fermentasyonda yüksek etanol seviyesinde optimal koşullar altında yüksek bir şeker konsantrasyonu gerçekleştirilebilir (Deesuth ve ark., 2015).

Alkolik fermentasyondan gelen etanolün mayalar ve genel olarak *S. cerevisiae* üzerinde olumsuz etkisi vardır. Hızlı bir fermentasyonda mikroorganizmaların hücrelerinde etanol birikimi canlılıklarını azaltır. Canlılıktaki bu kayıp, mikroorganizmalardaki yüksek etanol konsantrasyonundan dolayı alkol dehidrojenazın aktivitesinde bir azalmaya yol açmaktadır (Nagodawithana ve ark., 1976; Pagliardini, 2010). Etanolün bazı maya enzimleri üzerinde birçok inhibe edici etkisi vardır, örneğin enerji transferinde yer alan bir enzim olan ATPaz'ın aktivitesini azaltır, membrandaki değişimleri azaltır ve mikroorganizmaların besin tüketimini etkiler (Bai ve ark., 2008).

2.7.5. İnorganik iyonlar

Hidrolizat'ta bulunan inorganik iyonlar, lignoselülozik biyokütlenin kendisinden, ayrıca pH ayarlaması için selüloz ve hemiselülozların ekstraksiyonlarında kullanılan kimyasallardan da gelebilir. Varlıkları maya zarında ozmotik basınca neden olur ve etkinliklerini azaltabilir. İnhibisyon mekanizmaları organik asitlerinkilere benzer. Maya, enerjisinin bir kısmını iyonları tahliye ederek ozmotik basıncı dengelemek için tahsis eder. Düşük konsantrasyonlarda, etki pozitifdir, biyokütle üretimi için etanol üretimi tercih edilir, ancak yüksek konsantrasyonda verimin düşmesi gözlenir (Bai ve ark., 2008).

2.7.6. Sıcaklık

Sıcaklık, fermantasyonda çok önemli bir faktördür. Ekstrem sıcaklar mikroorganizmaların gelişmesini ve aktivitesini önemli ölçüde etkilemiş ve etanol veriminin düşmesine neden olmuştur. Bir alkolik fermantasyon sırasındaki etanol konsantrasyonu, sıcaklık arttıkça artar, optimum sıcaklık seviyesinde sabit hale gelir ve daha sonra düşer. Sivamani ve ark. (2015) sıcaklığın fermantasyon üzerindeki etkisini araştırmışlar, sıcaklık 27° C'den 37°C'ye yükseldiğinde etanol konsantrasyonunun arttığını ve sıcaklık 47°C'ye ulaştığında etanol konsantrasyonunun düştüğünü gözlemlemişlerdir.

Neredeyse tüm endüstriyel fermantasyonlarda kullanılan mayaların optimal gelişme sıcaklığı 30-35°C arasındadır. Fermantasyon, yüksek sıcaklıklara duyarlı farklı enzim türlerini içeren mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir (Benjaphokee ve ark., 2012). Bu nedenle, daha iyi etanol verimi için fermantasyon sırasında kullanılan mikroorganizmaların optimum geliştirme sıcaklığının belirlenmesi çok önemlidir. Günümüzde biyoetanol endüstrilerinde en yaygın kullanılan maya olan *S.cerevisiae*'nin optimum sıcaklığı 25-35°C arasındadır (Alvira ve ark., 2010; Bai ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2011).

2.7.7. pH (hidrojen potansiyeli)

Sıcaklık gibi, pH da fermantasyon sırasında dikkate alınması gereken önemli bir parametredir. Fermantasyon sırasında mikroorganizmaların aktivitesi üzerinde etkilidir, etanol verimini düşürebilir. Yüksek bir etanol verimi, optimum fermantasyon pH değeri ile bağıntılıdır ve genellikle 4 ila 6 arasındadır. Optimum pH, lag fazını azaltır ve mayanın optimal gelişimini etkiler (Larsson ve ark., 2001). *S. cerevisiae*'nin optimum pH'sı 4.0-5.5'tir ve 3.5'in altında, *S.cerevisiae*'nin besiyerinde inaktif kaldığı durumlarda kritik öneme sahiptir (Liu ve ark., 2008).

Sivamani ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarda, fermantasyon sırasında pH'ın incelemişler, en yüksek etanol veriminin pH 4.5'te elde edildiğini ve pH 3.5 ve 5.5'te daha düşük bir etanol konsantrasyonu gözlemlediğini bildirmişlerdir.

2.7.8. İnokulum yaşı ve miktarı

İnokulum yaşı ve miktarı, alkolik fermantasyonda çok önemli faktörlerdir. Şeker tüketimin verimi ve etanol verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Taouda ve ark., 2017). Bunlar ayrıca fermantatif mikroorganizmaların geliştirmesini ve metabolizmasını da etkiler (Cheng ve ark., 2007). Bu mekanizma, inokulumun miktarı ve fizyolojik durumuyla doğrudan ilişkili olan lag fazının süresi, mikroorganizmaların geliştirme hızı ve verimi, son ürünün verimi ve kalitesi ile karakterize edilir (Sen ve ark., 2004).

Zabed ve ark. (2014), farklı inokulum konsantrasyonlarda inokulum kullandıkları çalışmalarında inokulum konsantrasyonu 10^6 'dan 10^7 hücre/ml'ye yükseltildiğinde etanol veriminin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, etanol konsantrasyonu, 10^7 ila 10^8 hücre/ml başlangıç konsantrasyonuyla hidrolizatı aşıladıklarında, etanol verimi sabit kalmıştır. Yüksek bir etanol verimi için, daha az yaşlanmış bir inokulum konsantrasyonu % 10-15 arasındadır (Anonymous, 2004).

2.7.9. Fermentation süresi

Fermantasyon süresi, alkolik fermantasyonda önemli bir rol oynar. Daha kısa bir fermantasyon, çok düşük bir etanol verimi ile sonuçlanan mikroorganizmaların yeterince gelişememelerine neden olur. Daha uzun bir fermantasyon süresi, yüksek etanol konsantrasyonundan dolayı mikroorganizmalar için istenmeyen koşullar yaratır. Fermantasyon süresi genellikle sıcaklıkla bağlıdır. Düşük bir fermantasyon sıcaklığı, uzun bir fermantasyon süresi gerektirir ve düşük bir etanol verimi ile sonuçlanır (Zabed ve ark., 2014). Optimum mikroorganizma geliştirmesi ve yüksek etanol verimi için fermantasyon süresi 3-5 gün arasındadır (Sivamani ve ark., 2015).

2.8. Lignoselülozik materyallerinin enzimatik hidrolizi

Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizi (şekil 2.11), ılımlı sıcaklık koşulları altında (50-60°C) gerçekleştirilen spesifik bir yöntemdir. Kimyasal veya diğer ön muamelelerden elde edilenlerden daha yüksek hidroliz verimi sağlar. Bu nedenle enzimatik hidroliz, son 10 yılda enzim üretimini ve verimliliğini optimize etmek ve ön muamele aşamalarını iyileştirmek amacıyla birçok araştırmaya konu olmuştur.

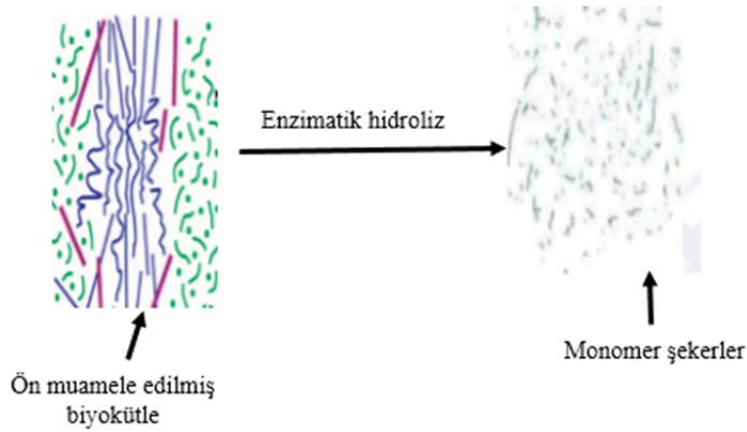
Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizi, selüloz ve hemiselüloz enzimleri tarafından biyokütle polisakkaritlerinin parçalanmasını sağlayan hidrolitik bir reaksiyondur. Hidrolitik reaksiyon suda gerçekleşir ve polimerlerin parçalanmasıyla daha küçük zincirli oligomerlerin oluşması ile sonuçlanır. Sonunda selüloz ve hemiselüloz monosakkaritlere ve disakkaritlere kadar depolimerize olur ve bu moleküller bir sonraki aşama olan fermantasyon prosesinde karbon kaynağı olarak kullanılırlar. Selülozlar selüloz zincirinin amorf bölgelerindeki (1→4)-β-D-glikozidik bağlarını kırar, daha kısa zincirli selüloz ve selo-oligomerler oluşturur. Sellobiyazlar sellobiyozu ve diğer selo-dekstrinleri hidrolize eder ve β-D glikozun oluşmasını sağlar (Obnamia, 2014).

Endüstriyel bir enzimatik hidroliz ölçeğinde uygulama, hem dengeli bir enzim hazırlığı hem de bu enzimlerin uygulanması için iyi bir teknoloji gerektirir. Piyasada mevcut olan selülozların miktarı halen etanol üretim işlemlerinde kullanılamayacak kadar sınırlıdır. Esas olarak selüloz ve hemiselülozdan oluşan lignoselülozik biyokütle, tek bir enzim tarafından tamamen hidrolize edilemez, birkaç enzimin karıştırılmasını gerektirir. Bu enzimlerin rolü, uzun polisakkarit zincirini daha kısa zincire küçültmektir (şekil 2.11) β-(1,4) glikozidik bağ ile bağlanan selülozun enzimatik hidrolizi, üç tip enzimin sinerjik etkisinden kaynaklanır.

Selülozların aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir: Endo 1,4 β-glukanazlar (EC3.2.1.4) genellikle selülozun amorf bölgelerinde bulunan ve iç kısımdaki glikozidik bağları kırar; ekzo 1,4 β-glukanazlar (EC3.2.1.91) selüloz hidroliz

ederek, glikoz zincirinin sonundaki glikozidik zincirleri sellobiyozu (iki glikoz ünite), sello-dekstrinler olarak serbest bırakır ve ilerleyici endoselülazlar, selülozun hem amorf hem de kristal bölgelerine etki eder (Sills ve ark., 2012).

Hemiselüloz, esas olarak ksilandan (1,4- β -D-ksilan) oluşan karmaşık bir yapıdır. Selüloz yapısından farklı olarak enzimatik hidroliz için daha basit özelliklere sahiptir. Ksilan, tek ünite olarak ksilozdan oluşan bir polisakarittir. Ksilanın hidrolizinde kullanılan iki temel enzim vardır, uzun ksilan zincirini daha kısa zincire (oli-gosakarit) hidrolize eden endo- β -1,4-ksilanazlar (EC3.2.1.8) ve daha sonra β -1,4-ksilosidaz (EC3.2.1.37) bu oligosakaritleri ksilo-piranoza dönüştürür (Aditiya ve ark., 2015)



Şekil 2.11: Ön muamele edilmiş malzemenin enzimler tarafından monomer şekerlere hidrolizi (Aditiya ve ark., 2015).

2.9. Alkolik fermantasyon ve fermantasyon sırasında kullanılan mikroorganizmalar

2.9.1. Alkolik fermantasyon

Fermantasyon, şekerler kullanılarak çok sayıda mikroorganizma tarafından gerçekleştirilen bir işlemdir. Fermantasyonun amacı, hidroliz sonucu oluşan şekerleri mikroorganizmalar yardımıyla etanol dönüştürmektir. Genellikle aerobik

veya anaerobik koşullar altında gerçekleşir ve glikoz karbon kaynağı olarak kullanılır. Alkolik fermantasyonda, oluşan temel ürünler etanol ve CO₂'tir. Etanol mikroorganizmalar için hücrenin enerji elde etme yolundaki bir yan üründür. Beş ve altı karbonlu şekerler lignoselülozik biyokütlenin hidrolizinden oluşmaktadır (Ballerini, 2006; Lv ve ark., 2013).

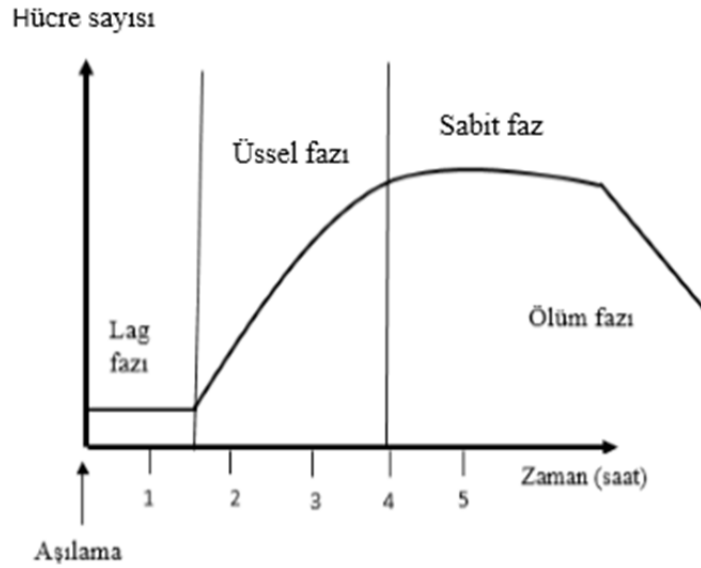
Enzimatik hidrolizden elde edilen süpernatant eğer selüloz ve hemiselüloz hidroliz edilmiş ise hem heksoz hem de pentoz şekerler içerir. Lignoselülozik kaynağa bağlı olarak, hidrolizat genellikle glikoz, ksiloz, arabinoz, galaktoz, mannoz, früktoz ve ramnoz içerir. Glikoz ve ksiloz bu karışımındaki baskın şekerlerdir. Anaerobik fermantasyonun Gay Lussac tarafından tepkimeleri, burada stoikiometrik bakış açısıyla hesaplanan verimler (teorik verim) 100 g şeker başına 51.1g'dır (Jeffries ve ark., 2004). Heksozlarla ilgili olarak, Louis Pasteur, 100 g şeker başına 48.4 g maksimum etanol verimi belirlemiştir (Ballerini, 2006). Ayrıca, şekerin yaklaşık % 3'ünün gliserol, % 0.5'in süksinik asit ve % 0.5-0.8'in fuzel alcole dönüştürüldüğünü gözlemledi. Nişasta ve sellobiyozdan (2 birim glikoz) lignoselülozik biyokütleden elde edilen şekerler, maya *S. cerevisiae* tarafından kolayca etanol dönüştürülür.

Rekombinant *Zymomonas mobilis*, pentozları (ksiloz, arabinoz vb.) fermente etme yeteneğine sahiptir ve etanol verimi ile 0.44 g/g şeker (teorik verimi)'dir. Oysa *S. cerevisiae* pentozların fermantasyonunda etkisiz kalmaktadır. Ksilozun etanole fermente edilememesine rağmen, *S. cerevisiae*, ksilozun izomerizasyonu ile elde edilen ksilulozun fermente edilmesine yönelik özelliklere sahiptir (McMillan, 1997).

Palmqvist ve ark. (1996) ksilozu fermente eden mayaların ticari kullanımlarıyla ilgili zorluklara dikkat çekmiştir. Bu mayalar; düşük etanol toleransı, fermantasyon parametrelerinin optimizasyonundaki zorluklar ve düşük fermantasyon hızına sahiptirler. Bu duruma alternatif bir yaklaşım olarak ksilozun izomeri olan ksiluloza dönüştürüldükten sonra geleneksel mayalarla fermente edilmesidir.

Fermantasyon sırasında mayaların çoğalması farklı evrelerden geçer (Şekil 2.12). Lag fazı, mikroorganizmanın yeni ortamına alıştığı bir aşamadır. Bu, ortamın neden olduğu strese bağlı olarak daha uzun veya daha kısa olabilir. Ardından bir üstel gelişim aşaması gelir ve besinler (karbon kaynağı, azot) azalmaya başladığında durağan faz, başlar. Etanol konsantrasyonu maksimum seviyeye ulaşır. Sonra mikroorganizmaların ölmeye başladığı ve başkalarının kendilerini spor formunda bir direnç formuna sokmaya başladıkları bir ölüm aşaması başlar.

Alkolik fermantasyon, üç temel tür işlem kullanır: Batch, fed-batch ve continous fermantasyon. Devamlı (continous) fermantasyonlar sırasında önemli verimlilik ve kirlenme riskinin azaldığı gözlenmiştir (Ballerini, 2006; Sun ve ark., 2011).



Şekil 2.12: Kesikli kültüründe mayalar geliştirmesinin çevrimi (Stanbury ve ark., 2013)

2.9.2. Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalar

Birçok mikroorganizma, şekerlerden etanol üretme yeteneğine sahiptir. Biyoetanol üretiminde *Saccharomyces cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* yaygın olarak kullanılır. Bir mikroorganizmanın seçimi yalnızca etanol (verim, verimlilik, substrat tipi) üretme yeteneğine değil, aynı zamanda kullanım kolaylığına (patojenik olmayan organizma, sağlamlık, geri dönüşüm olasılığı) ve çalışma koşullarına da bağlıdır.

2.9.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

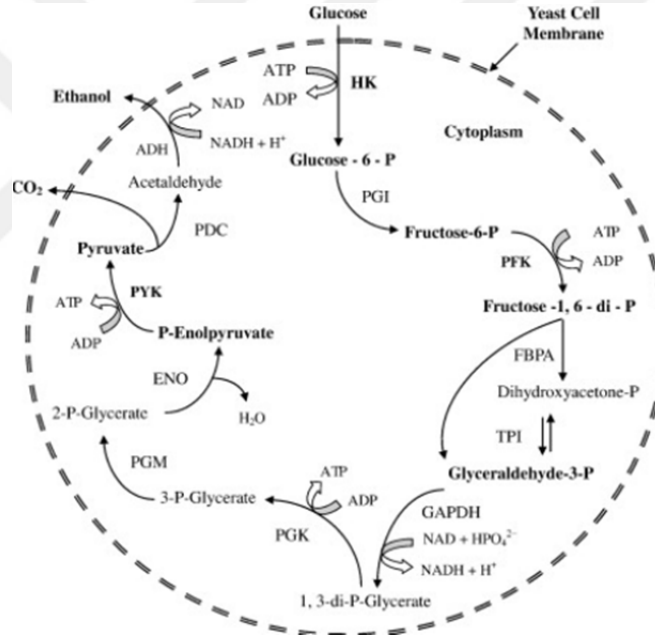
Saccharomyces cerevisiae ya da Latin kökenli diğer adıyla “şeker mayası”, alkollü içecekler (bira, şarap) ve ekmek üretiminde gibi bazı gıda ürünlerinin üretiminde binlerce yıldır insanlar tarafından yoğun olarak kullanılan bir mayadır. Antik çağlarda üzüm kabuklarında keşfedilmesinden beri hamuru kabartmak ve alkollü içkilerin üretiminde kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* biyoetanolün endüstriyel üretiminde en çok kullanılan mikroorganizma birisidir. Bu maya, birincil nesil hammaddelerin (şekerli ve nişastalı) fermantasyonu için en çok kullanılan ve etkili bir mikroorganizmadır. *S. cerevisiae* temel substrat olarak sadece glikoz ve früktoz gibi 6 karbonlu şekerleri (heksoz) kullanır.

S. cerevisiae mantarların ailesinde sınıflandırılmıştır. Çünkü kitinden yapılmış hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarında peptidoglikon yoktur ve yağları ester bağlarıyla bağlanmıştır. Aynı zamanda protein sentezi için örnek bir DNA kullanır ve diğer mikroorganizmalardan daha büyük ribozoma sahiptir. Maya olarak adlandırılmasına rağmen diğer mayalar gibi meyve gövdeleri oluşturamayan tek hücreli yapısıyla diğer mayalardan ayrılır (Stanbury ve ark., 2013).

Glikoz veya mannozun fermantasyonu için Embden-Meyerhof-parnas yolu adı verilen metabolik yolu enerji üretmek kullanır (Şekil 2.13). Temel substratın glikozun olduğu ve 10 aşamadan meydana gelen glikolizde son ürün olarak piruvat oluşur. Bu Embden-Meyerhoff-Parnas metabolik yoluyla *Saccharomyces cerevisiae*, 1 mol glikozdan, 2 mol piruvat, 2 mol NADH, H^+ , 2 mol adenozin

trifosfat (ATP) üretir. Piruvat daha sonra, piruvat dekarboksilaz ile dekarboksilasyon işlemi ile değişen oranlarda etanola indirgenir ve oluşan ürün etanal, glikoliz tarafından kullanılan NAD^+ üretmek amacıyla etanolü üretmek üzere bir alkol dehidrojenaz enzimi ile dehidrojenasyona uğrar (Stanbury ve ark., 2013).

Saccharomyces cerevisiae hem aerobik solunum hem de anaerobik fermantasyon yapabilir. Böylece önemli bir süre için oksijenin olmadığı bir ortamda yaşayabilir. *S.cerevisiae* kullanılarak anaerobik ortamlarda fermantasyon daha etkilidir.



Şekil 2.13: Glikoliz yolu ve *S.cerevisiae* tarafından alkolik fermantasyon (Bauer ve ark., 2000)

2.9.2.2. *Zymomonas mobilis* and recombined *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis, pentozları fermente edemeyen ancak bir asimilasyon yolu (Entner Doudoroff yolu) ile glikozun etanol fermantasyonunda çok etkili olan

bir mezofilik bakteridir. Glikoz tüketimi için bu metabolik yol 1 mol glikozdansa sadece yarım mol ATP üretir. Bu ise, *S. cerevisiae*'den daha az yol açar ve özellikle glikoz daha yüksek oranda etanol üretimine substrat tahsis edilir (Y. Lin ve S. Tanaka, 2006). *S. cerevisiae* gibi, *Zymomonas mobilis* de nispeten yüksek konsantrasyonlarda substrat ve etanol (120g/L) dayanır. Tüm bu avantajlara rağmen, *Z. mobilis* endüstriyel olarak önem kazanmamıştır, çünkü etanol üretmek için sadece bir substrat (glikoz) kullanmaktadır (Bai ve ark., 2008).

Rekombinant *Zymomonas mobilis* pentozları yüksek oranlarda fermente edebilen bir bakteridir (teorik verimin %97). Bu performans, *Z. mobilis* 4 *E. coli* genlerini, ksiloz izomeraz, ksilülokinaz, transketolaz ve transaldolazı kodlayan bir NREL araştırma ekibi tarafından elde edilmiştir. Rekombinant suş, 0.44 g/g etanol verimi ile tek karbon kaynağı olarak ksiloz üzerinden fermentatif bir performansa sahiptir. Etanol ve inhibitörlere toleransı, yüksek glikoz performansı, yüksek substrat konsantrasyonlarında (şekerler) gelişmesi, *Zymomonas mobilis* pentolardan biyoetanol üretimi için en umut verici mikroorganizmalardan biri haline getirmektedir.

2.9.2.3. karışık kültür

Bu yaklaşım, glikoz ve ksilozu etanole fermente edilen iki mikroorganizmanın bir araya getirilmesinden oluşmaktadır. Birlikte kültürlemede ksiloz ve glikozun fermentasyonu aynı reaktörde yapılır. Bu da yatırım maliyetlerini düşürür. Çalışmaların çoğunda iki maya içeren kültür kullanılmıştır: *S. cerevisiae* ve *P. stipitis*, glikoz ve ksilozu sırasıyla fermente etmek için kullanılırlar. Ancak, bu tür bir işleminin uygulanmasındaki engeller çoktur: ksilozun fermentasyonu glikozun fermentasyonundan her zaman daha yavaştır. Ksilozu fermente eden mikroorganizmanın etanol inhibisyonu sorunu vardır, Ksilozun kullanımında glikoz tarafından uygulanan katabolik bir baskı vardır. *S. cerevisiae* ve maya fermente edilen ksiloz arasında oksijen tüketimi konusunda bir rekabet vardır.

Bu rekabeti önlemek için, Laplace ve ark. (2001) yaptıkları çalışmalarda, oksijen kullanamayan *Saccharomyces* solunum mutantını geliştirmişler ve ortamda bulunan, % 88 substrat dönüşüm oranı ile 0.43g etanol /g şeker ve 2 g/ l/s verimi elde edilmişlerdir. Bir glikoz (41g/ L) ve ksiloz (9 g/L) kaynağı olarak bir toplam kavak ağacı hidrolizatının kullanılmasıyla, % 96 substrat dönüşüm oranı ile 0.45 g etanol/g şeker verimi elde edilmiştir.





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hammaddeler

Bu çalışmada Fildişi Sahili'den toplanan iki tür hammadde kullanılmıştır. Bunlar, Abidjan'daki manyok işleme şirketinden toplanan manyok kabukları (*Manihot esculenta*) ve Fildişi Sahili'nin orta kesimindeki bataklıktan toplanan *Miscanthus giganteus* bitkisidir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan analitik dereceli kimyasal maddeler Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya), Sigma (Sigma kimya şirketi, MO, ABD) tarafından sağlanmıştır. Gerekli enzimler (Cellic® CTech2, termostabil α -amilaz termamil®, amyloglucosidase) Novenzyme (Danimarka) firmalarından temin edilmiştir. Bu çalışmada, fermantasyon sırasında kullanılan maya, aktif kuru maya *Saccharomyces cerevisiae*, Fermivin®'den Oenobrand (Fransa) tarafından temin edilmiştir.

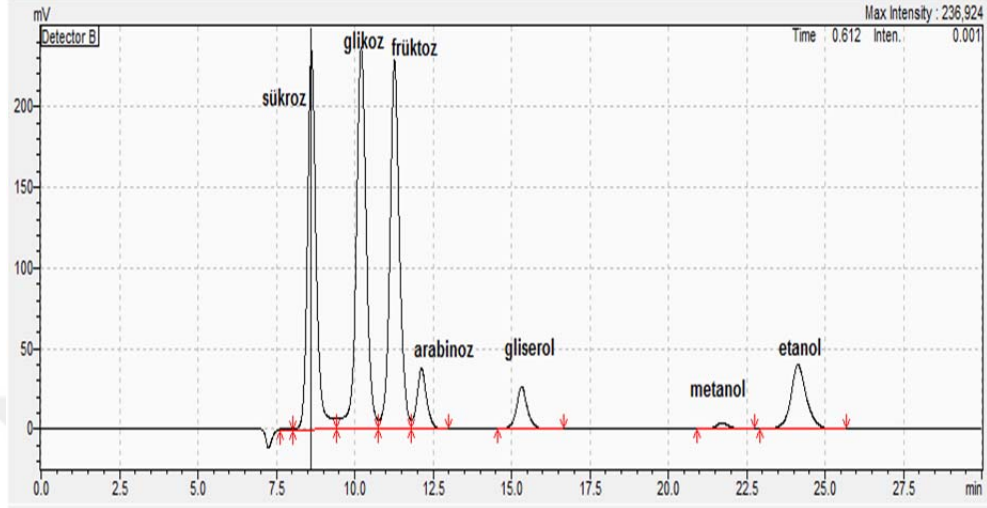
3.1.3. Araç ve Cihazlar

Hammadde pirolizi için yüksek basınçlı reaktörü kullanılmıştır. Örneklerin kurutulması ve kuru maddelerinin belirlenebilmesi için Memmert (UNB 400, Almanya) marka etüv kullanılmıştır. Örneklerinin toz halinde elde etmek için laboratuvar öğütücü, pH ölçümlerinde cam elektrodlu “Thermo Orion (ABD)” marka pH-metre, Enzimatik hidroliz ve fermantasyon için Thermo Thermo MaxQ 5000 (ABD)” çalkalamalı (Almanya) inkübatörü kullanılmıştır. Hidrolizatların ve cam malzemelerin sterilizasyonu için “hırayama ha-3mıv (Japonya)” marka otoklav, inokulum işleminde kullanılmak üzere “Legrand” steril kabin, KUBOTA 7780 (Japonya) marka santrifüj kullanılmıştır. Örneklerin şeker ve alkol

konsantrasyonu belirlemek için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) (Shimadzu LC-2030 C model ve RID 20A refraktif indeks dedektörlü (JAPONYA) SPD-20A UV) yapılmış ve kolon olarak Bio-Rad HPX-87H (300 mm x 7.8 mm) ve LCsolution yazılım paketi kullanılmıştır.

3.2. METOT**3.2.1. Örneklerin toplanması ve hazırlanması**

Manyok kabukları Fildişi sahili'nde manyok işleme tesisinden elde edilmiştir. *Miscanthus giganteus* ise Fildişi sahili'nde bulunan bir bataklıktan Eylül 2017'de toplanmıştır. Örnekler tüm kirlerden arındırarak amacıyla musluk suyuyla yıkanmıştır. Manyok kabukları (Şekil 3.1) doğranmış, *Miscanthus* (Şekil 3.2) ise küçük küpler halinde kesilmiş ve daha sonra 3 gün süresince 50°C'de (nem düzeyi %10'un) altında olacak şekilde etüvde kurutulmuştur (Ebrahimi ve ark., 2008). Kurutulmuş örnekler daha sonra laboratuvar öğütücü kullanılarak öğütülmüştür ve öğütülmüş örnekler 0.4 mm'lik bir elekten geçirilmiştir (Han ve ark., 2011). Örnekler hazırlandıktan sonra hava geçirmez kaplarda (Nemli geçirmez plastik torbası) saklanmıştır ve kullanılana kadar oda sıcaklığında depolanmış ve Çukurova Üniversitesi-Gıda Mühendisliği Bölümüne getirilmiştir.



Şekil 3.6: HPLC ile elde edilen şeker ve alkol bir kromatogram

Lineer bir regresyon analizi kullanılarak şeker ve alkol konsantrasyonu dahil elde edilen tüm sonuçlar LCsolution yazılım paket programı kullanılarak aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır (Suilter ve ark., 2008).

$$Y = 58910.9X - 15829.3; R^2 = 0.999$$

X=konsantrasyon (gL^{-1})

Y= pik alanı (cm^2)



deęiřimi řekil 4.3'te verilmiřtir Piroliz ve enzimatik hidroliz sonrası oluřan fermente olabilir řeker miktarı, sıcaklık ve konsantrasyondaki artıřla belirli bir noktaya kadar řeker miktarını arttırsa da belirli bir noktadan sonra oluřan řeker miktarı dūřmektedir. Bu duruma sebep olarak řiddetli kořulların (yūkses sıcaklık, yūkses konsantrasyonlarda kimyasal madde kullanımı ve/veya uzun iřlem sūresi) řekerlerin parçalanmasına sebep olması gōsterilmektedir (Yeh ve ark., 2016).



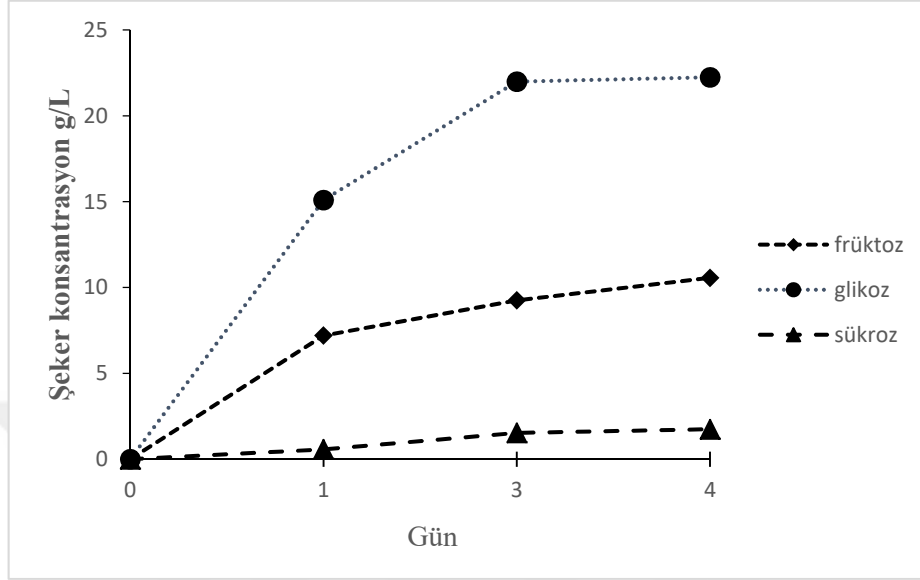
Çizelge 4.1: NaOH pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan toplam fermene olabilir şeker miktarları (g/L)

Piroliz koşulları			Enzimatik hidroliz				
Sıcaklık (°C)	% NaOH (a/h)	Süre dak.	Gün	Früktoz	Glikoz	Sükroz	T. Şeker
120	0.5	10	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	5.47±0.38	10.90±0.00	0.19±0.00	16.57
			3	7.01±0.01	14.49±0.53	0.28±0.00	21.79
		90	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	7.20±0.01	15.09±0.95	0.57±0.01	22.86
			3	9.25±0.05	21.99±0.80	1.53±0.40	32.78
	1	10	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	5.32±0.42	12.12±0.14	0.14±0.05	17.58
			3	6.72±0.55	13.55±1.05	0.35±0.01	20.63
		90	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	4.99±0.09	11.43±0.56	0.17±0.01	16.60

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Kouame Fulbert OUSSOU

			3	5.03±0.4	12.28±0.9	0.27±0.00	
			6	6			17.60
180	0.5	10	0	0.00±0.0	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	4.92±0.0	11.64±0.5	0.20±0.00	16.77
			3	5.13±0.0	16.33±0.5	0.48±0.01	21.94
		90	0	0.00±0.0	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	4.23±0.0	12.24±0.4	0.10±0.00	16.57
			3	7.60±0.3	15.43±0.4	0.46±0.00	23.49
	1	10	0	0.00±0.0	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	6.89±0.0	10.65±0.4	0.75±0.12	18.30
			3	6.34±0.0	14.01±0.0	1.26±0.00	21.62
		90	0	0.00±0.0	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	6.45±0.6	12.66±0.0	0.09±0.01	19.21
			3	7.06±0.5	15.75±0.9	0.12±0.00	22.94



Şekil 4.3: Miscanthus örneğinin ön muamele sırasında zamana göre şeker miktarındaki değişim (% 0.5 NaOH, 120°C ve 90dak.)

4.2.2. Miscanthus H₂SO₄ ile piroliz ve enzim hidrolizi

Miscanthus örneği sülfürik asit (H₂SO₄) ile piroliz optimizasyonda iki farklı H₂SO₄ konsantrasyonu (% 0.5 ve %1), iki farklı sıcaklık (120 ve 180°C) ve iki farklı süre (10 ve 90 dak.) uygulanmış ve sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Enzimatik hidroliz 0.09 mL Cellic® CTec2/g miscanthus oranında enzim kullanarak pH 5.0, 50°C, 150 rpm devirde, 3 gün süreile enzimatik hidroliz yapılmıştır. En yüksek fermente olabilir şeker miktarı 26.03 g/L olarak bulunmuş ve bu değere % 1 (h/h) H₂SO₄ konsantrasyonunda, 120°C’de ve 10 dak.’da ulaşılmıştır.

Çizelge 4.2: Miscanthus örneğinde H₂SO₄ pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan toplam fermente olabilir şeker miktarları (g/L)

Piroliz koşulları			Enzimatik hidroliz				
Sıcaklık (°C)	%H ₂ SO ₄ (h/h)	Süre dak.	Gün	Früktoz	Glikoz	Sükroz	T. Şeker
120	0.5	10	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	3.91±0.01	6.80±0.05	0.08±0.01	10.80
			3	4.61±0.09	10.15±0.08	0.10±0.00	14.87
		90	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	5.53±0.13	10.55±0.42	0.23±0.04	16.32
			3	8.07±0.09	12.46±0.10	0.20±0.04	20.73
	1	10	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	5.45±0.38	12.77±0.59	0.10±0.00	18.34
			3	8.11±0.44	17.75±0.91	0.16±0.00	26.03
		90	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
			1	7.56±0.60	12.51±1.45	0.12±0.00	20.20

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Kouame Fulbert OUSSOU

			3	7.78±0.08	14.61± 0.38	0.13±0.0 0	22.52
180	0.5	10	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.0 0	-
			1	3.48±0.39	10.34±0.0 4	0.10±0.0 0	13.93
			3	4.85±0.61	11.63±0.5 8	0.14±0.0 0	16.63
		90	0	0.00± 0.00	0.00±0.00	0.00±0.0 0	-
			1	4.30 ±0.42	9.57±0.42	0.15±0.0 0	14.03
			3	5.13±1.04	12.40±0.4 4	0.14±0.0	17.68
	1	10	0	0.00± 0.00	0.00±0.00	0.00±0.0 0	-
			1	4.59 ±0.01	11.88±0.0 0	0.10±0.0 0	16.58
			3	5.29 ±0.00	13.78±0.4 8	0.13±0.0 0	19.21
		90	0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.0 0	-
			1	4.91±0.02	9.95±0.01	0.38±0.0 0	15.25
			3	7.35±0.34	13.24±0.0 1	0.51±0.0 1	21.11

Świątek ve ark. (2014) miscanthusun pirolizini 0.1g/g miscanthus NaOH konsantrasyonunda, 121°C’de, 1 saatte gerçekleştirmişlerdir. Ön muamele edilmiş örneği 50°C’de iki farklı Cellulast ve cellobiaz enzim dozajında 200 rpm’de 72 saatte hidrolize etmişlerdir. Toplam fermente olabilir şeker miktarı 54.45 g/L olarak bulunmuştur. Bu şeker miktarı, bu çalışmada elde edilmiş toplam fermente olabilir şeker miktarından daha yüksektir.

Haque ve ark. (2013)’nin yapmış oldukları bir çalışmada miscanthus üç farklı NaOH konsantrasyonunda (% 1.5, % 2 ve % 2.5) 120°C ve 30 dak koşullarında pirolize etmişlerdir. Enzimatik hidroliz, Sellülaz (15 FPU/g miscanthus) ve β-glikosidaz (30 UI/g miscanthus), 50°C, 150 rpm, 72 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Uyguladıkları piroliz ve enzimatik hidroliz sonucunda elde ettikleri maksimum şeker miktarını % 44 olarak bildirmişlerdir.

Cha ve ark. (2015) yılında miscanthus üzerine yaptıkları çalışmada, NaOH ile pirolizin şeker oluşumuna etkisini 1.5 M NaOH konsantrasyon, 150°C ve 30 dak. süre koşullarında çalışmışlardır. Enzimatik hidroliz koşulları 20 FPU sellülaz/g sellüloz, 50°C’de ve 48 saat olmuştur. Enzimatik hidroliz sonucu şeker miktarını 30.7g/L olarak belirtmişlerdir. Elde ettikleri bu sonuç çalışmamıza yakın bulunmuştur.

4.3. Manyok kabuğu piroliz optimizasyonu ve enzimatik hidroliz

Manyok kabuğu nişasta yanında, önemli miktarlarda selüloz, hemiselüloz ve lignin de içerir. Selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşan lignoselülozik biyokütleler karmaşık ve dirençli bir yapı sahiptir. Bu karmaşık ve dirençli lignoselülozik biyokütle yapısını kırmak ve selüloz ve hemiselüloza selülotik enzimlerin ulaşmasını kolaylaştırmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla manyok kabuğu örneği sodyum hidroksit ve sülfürik asit kullanarak farklı konsantrasyon, sıcaklık ve sürelerde pirolize tabii tutulmuştur. Daha sonra, optimum enzim dozajını belirlemek için üç farklı enzim dozajı kullanılmıştır.

4.3.1. Manyok kabuğundan nişasta enzimatik hidrolizin optimizasyonu

Manyok kabuğu içeren nişasta, nişasta yapısını parçalamak ve fermente edilebilir şekerleri serbest bırakmak için amilolitik enzimler (alfa amilaz ve glikoamilaz) kullanılır. Maksimum fermente edilebilir şekerleri oluşturan en uygun enzim konsantrasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonda α -amilaz ve glikoamilaz kullanılmıştır. Bu amaçla, manyok kabuğu sıcak su ile 85°C'de 20 dak. süre ısıtılmış ve α -amilaz eklenerek pH'sı 4.8'e ayarlanmıştır. Bu koşullarda üç saat süre ile hidrolize bırakılmıştır. Daha sonra, glikoamilaz eklenmiş ve pH'se 5.0'a ayarlandıktan sonra 60°C'de 6 saat süre ile sakkarifikasyona bırakılmıştır. Denemlerde E1, E2 ve E3 ile kodlanan üç farklı enzim konsantrasyonu kullanılmıştır.

Enzimatik hidroliz sonucu elde edilen fermente edilebilir şeker miktarları sırasıyla, 31.63g/L (E3), 28.34.g/L (E2) ve 21.79g/L (E1) şeklinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.). Enzim konsantrasyonu arttıkça oluşan fermente edilebilir şeker miktarı önemli bir oranda artmıştır. Ancak, E2 ve E3 enzim uygulamaları sonucu elde edilen şeker miktarı birbirine yakındır. Bu nedenle, enzim maliyeti de düşünülerek en uygun enzim konsantrasyonu 0.2 mL enzim/100 mL manyok kabuğun hidrolizatı (E2), hidroliz süresi ise 3 gün olarak belirlenmiştir. E2 enzim konsantrasyon ile enzimatik hidroliz Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: NaOH pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan fermente olabilir şeker miktarları (g/L)

Piroliz koşulları			Enzimatik hidroliz				
Sıcaklık (°C)	%NaOH (a/h)	Süre dak.	Gün	Früktöz	Glikoz	Sükroz	T. Şeker
120	0.5	10	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.16±0.02	6.79±1.10	0.30±0.04	7.25
			3	0.33±0.05	11.31±0.44	0.77±0.00	12.42
		90	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.42±0.87	12.68±0.79	0.73±0.05	13.84
			3	0.98±0.11	16.03±0.2	1.8±0.19	18.81
	1	10	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.76±0.01	11.85±0.89	2.24±0.34	14.86
			3	1.97±0.09	15.23±0.33	2.98±0.10	20.19
		90	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.77±0.00	9.71±0.07	1.44±0.00	11.92
			3	1.77±0.10	16.66±1.07	2.71±0.03	21.16
180	0.5	10	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.83±0.03	12.01±0.67	2.02±0.06	14.88
			3	1.14±0.10	16.26±0.52	2.63±0.23	20.06
		90	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.60±0.13	10.81±1.02	0.75±0.05	12.17
			3	1.41±0.37	16.37±0.57	1.23±0.10	19.01
	1	10	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	0.51±0.05	8.24±0.70	1.80±0.00	10.56
			3	0.94±0.07	14.22±0.74	2.11±0.01	17.27
		90	0	0.00± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	-
			1	1.11±0.09	8.10±0.20	2.82±0.00	12.05
			3	1.80±0.04	13.87±1.00	4.16±0.5	19.84

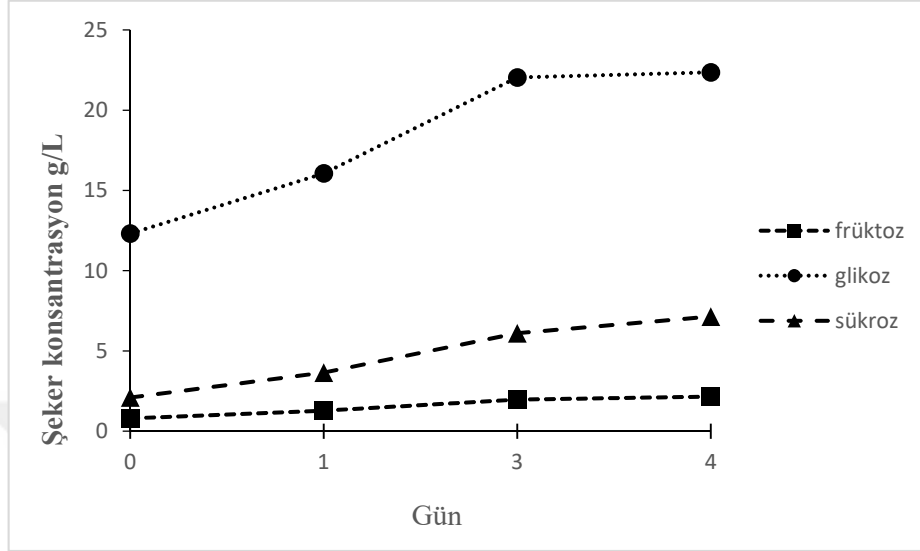
4.3.3. Manyok kabuğu H₂SO₄ ile piroliz ve enzim hidrolizi

Manyok kabuğu örneğinin piroliz optimizasyonunda iki farklı sülfürik asit konsantrasyonunda 120 ve 180°C’de 10 ve 90 dak.sürelerde denenmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.4’te verilmiştir. Manyok kabuğunun nişasta içeriği 1.3.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 0.09 mL Cellic® CTec2/g manyok kabuğu oranlarında enzim eklenerek pH 5.0, 50°C, 150 rpm devirde, 3 gün enzimatik hidroliz yapılmıştır.

Örneklerin şeker analizlerin sonuçları Çizelge 4.4.’te göstermiştir. En yüksek fermente olabilir şeker miktarı 120°C’de 10 dak.’da elde edilmiş ve çizelgeden de görüldüğü gibi maksimum verim 30.12g/L olarak bulunmuştur. %1 H₂SO₄ konsantrasyonunda 120°C ve 10 dak. ön uygulamadan elde edilen hidrolizatın enzimatik hidrolizi sırasında şeker profili Şekil 4.7 gösterilmiştir.

Çizelge 4.4: H₂SO₄ pirolizi ve enzimatik hidroliz sonrası oluşan toplam şeker miktarları (g/L)

Piroliz koşulları			Enzimatik hidroliz				
Sıcaklık (°C)	%H ₂ SO ₄ (h/h)	Süre dak.	Gün	Früktoz	Glikoz	Sükroz	T. Şeker
120	0.5	10	0	0.38±0.00	9.04±0.70	0.54±0.08	9.97
			1	0.68±0.05	10.82±0.07	0.96±0.09	12.47
			3	0.96±0.09	16.20±0.5	1.64±0.00	18.81
		90	0	0.96±0.07	12.69±1.05	1.88±0.09	15.54
			1	1.62±0.42	15.83±0.74	3.45±1.30	20.94
			3	2.17±0.07	20.48±1.26	5.26±0.36	27.91
	1	10	0	0.80±0.07	12.31±0.13	2.10±0.60	15.22
			1	1.28±0.25	16.01±0.04	2.65±0.23	19.96
			3	1.97±0.08	22.04±0.76	6.10±0.74	30.12
		90	0	1.84±0.11	10.80±0.94	1.56±0.32	14.21
			1	1.43±0.45	12.81±0.92	2.20±0.14	16.46
			3	2.16±0.07	17.17±0.70	4.97±0.91	24.31
180	0.5	10	0	0.14±0.02	6.90±0.5	0.26±0.02	7.30
			1	0.31±0.05	10.44±1.30	0.42±0.03	11.17
			3	0.45±0.02	14.10±0.68	0.81±0.03	15.07
		90	0	0.08±0.00	6.69±0.2	0.22±0.04	6.99
			1	1.23±0.08	10.62±1.16	0.41±0.03	12.27
			3	0.11±0.02	17.06±0.58	0.56±0.02	17.74
	1	10	0	0.40±0.03	8.86±0.49	0.84±0.10	10.11
			1	0.82±0.00	12.82±0.06	1.13±0.09	14.78
			3	1.19±0.06	16.24±0.50	1.94±0.20	19.37
		90	0	0.76±0.11	7.96±0.4	1.39±0.00	10.12
			1	1.06±0.06	10.90±0.15	1.81±0.06	13.78
			3	1.10±0.18	15.62±0.63	2.00±0.04	18.73



Şekil 4.7: Piroliz ve enzimatik hidroliz (amilolitik ve selülitik enzimlerle) sırasında manyok kabuğunun şeker profili

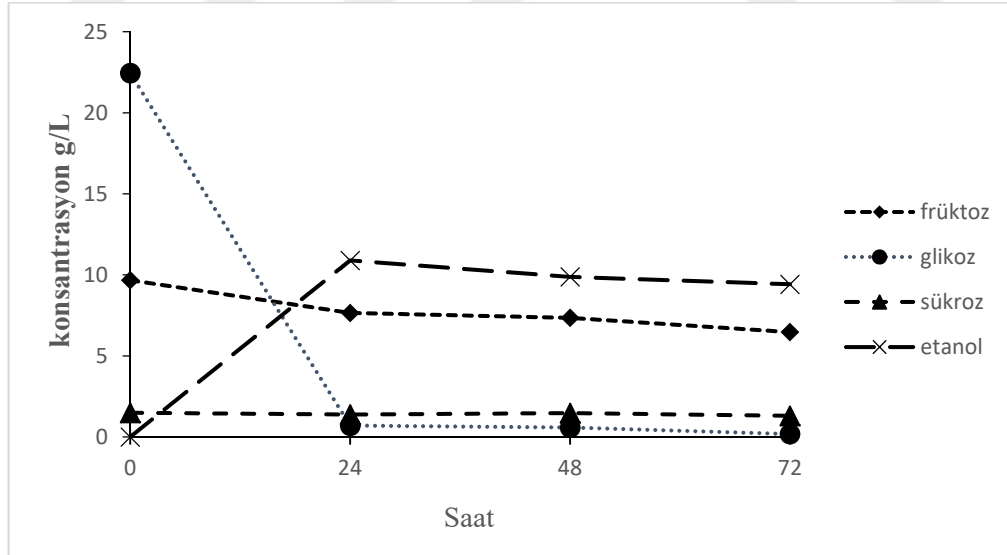
Agu ve ark. (1997) yılında yaptıkları bir çalışmada manyok kabuğu, farklı sülfürik asit konsantrasyonunda (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2 ve 3M), farklı sürelerde (30, 60 ve 90 dak.) ve 120°C’de bir ön muamele edilmişlerdir. Enzimatik hidroliz’den sonra en yüksek fermente olabilir şeker miktarı 18.5g/L olarak, 3M H₂SO₄ konsantrasyon, 30 dak., 120°C koşullarda elde edilmişlerdir. Bu değer bizim çalışmamızda elde edilen değerden azdır.

Virunanon ve ark. (2013)’nın yapmış oldukları çalışmada, mayok kabuğu 0.6 M sülfürik asit konsantrasyonu, 120°C ve 60 dak. koşullarda piroliz yapılmışlardır. Enzimatik hidroliz sırasında, ön muamele edilmiş örneği 50°C’de pH 4.5’te, dört farklı enzim dosaj (Liquozim, Spirizim), α amilaz pH 5.5’te, 100°C’de, 2 saat’te ve glukoamilaz 60°C’de, 24 saat’te koşullarda uygulanmışlardır. Enzimatik hidroliz sonunda, en yüksek fermente olabilir şeker miktarı 31.8 g/L olarak belirtmişlerdi. Bu değer bizim çalışmamızda elde edilen değerden yakındır.

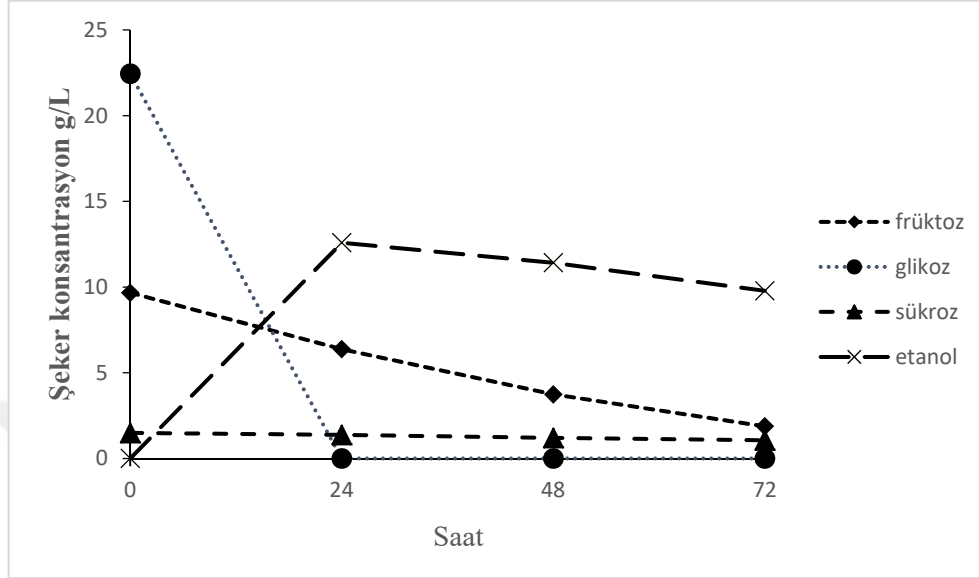
Fermantasyonun gidişi şekerlerdeki azalma ve etanol oluşumu izlenmiş ve sonuçlar şekil 4.9 ve 4.10'da sunulmuştur. Her iki sıcaklık ve azot ilaveli ve ilavesiz koşullarda, hemen tüm fermente olabilir şekerler 24 saat'te *Saccharomyces cerevisiae* tarafından kullanılmıştır. 30°C ve 4 gL⁻¹ pepton eklenmiş denemede en yüksek etanol konsantrasyonuna 24 saatte ulaşılmıştır (Şekil 4.9). Bu koşullardaki etanol verimi %38.40 (a/a) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5: Miscanthus hidrolizatı Fermantasyon optimizasyonu sonuçları

Fermantasyon koşulları				
Verim	25°C	25°C+ Azot	30°C	30°C+Azot
Etanol konsantrasyonu (g etanol/ L)	7.27± 0.20	9.92± 0.53	10.89± 0.09	12.59± 0.03
% Etanol verimi	22.17	30.26	33.22	38.40



Şekil 4.9: 30°C'de pepton ilavesiz gerçekleştirilen miscanthus hidrolizatı fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu



Şekil 4.10: 30°C'de pepton ilaveli gerçekleştirilen miscanthus hidrolizati fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu

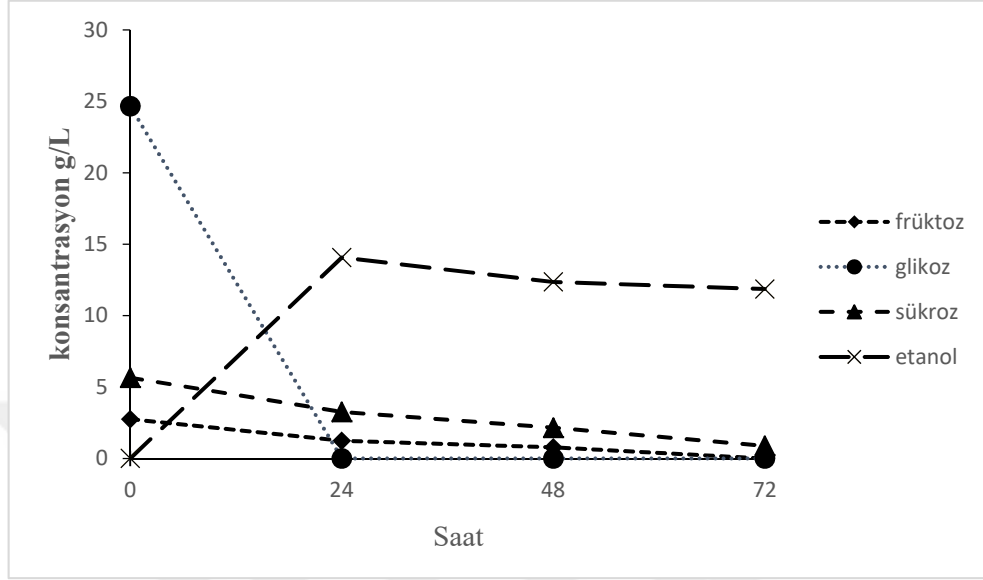
Tüm denemelerde fermantasyonun başlaması ile beraber glikoz 24-72 saat içerisinde tamamen tüketilmiş, buna karşın früktoz mayalarca tamamen kullanılamamıştır. Bunun nedeninin fermantasyon ortamındaki früktoz miktarının glikoz miktarından fazla olup mayanın glikozu kolaylıkla etanol dönüştürebilmesi ve ardından fermantasyonun durağan faza geçip früktozun etkili bir şekilde fermente edilememesi olduğu düşünülmektedir (Berthels ve ark., 2004; Tronchoni ve ark., 2009). Sükroz miktarında bir değişiklik gözlenmemiştir. Etanol oluşumu tüm denemelerde fermantasyonun 30°C ve 25°C'de 24 saat'te en yüksek değerine ulaşmış ve 30°C'de pepton ilavesiz gerçekleştirilen denemede 72 saat boyunca biraz sabit kalmış, pepton ilaveli denemelerde ise 48 saat'ten sonra azalmaya başlamıştır. Etanol miktarındaki bu azalmanın nedeni olarak, oluşan karbondioksitin etanolü beraberinde uzaklaştırdığı düşünülmektedir (Jackson ve ark., 2003). Önceki çalışmalarda da en yüksek etanol verimine 24 saat sonucunda ulaşılmıştır (Yücel ve ark., 2015). Mayalar fermantasyon sırasında önemli miktarda

Fermantasyondan sonra ortalama % etanol verimi hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'te sunulmuştur. 30°C'de pepton ilaveli denemelerde elde edilen ortalama etanol miktarı ve teorik etanol verimi sırası ile % 46.71 (a/a) ve % 91.23 iken azot ilavesiz denemelerde % 40.30 (a/a) ve % 78.72 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık, 25°C'de fermantasyon ortalama etanol verimi, azot ilaveli sonuçları sırası ile % 38.31 (a/a) ve maksimum teorik etanol verimi % 74.83 bulunmuştur. Ancak, ortalama etanol verimi, azot ilavesiz, 25°C'de sonucu % 35.52 (a/a) ve maksimum teorik etanol verimi % 69.38 bulunmuştur.

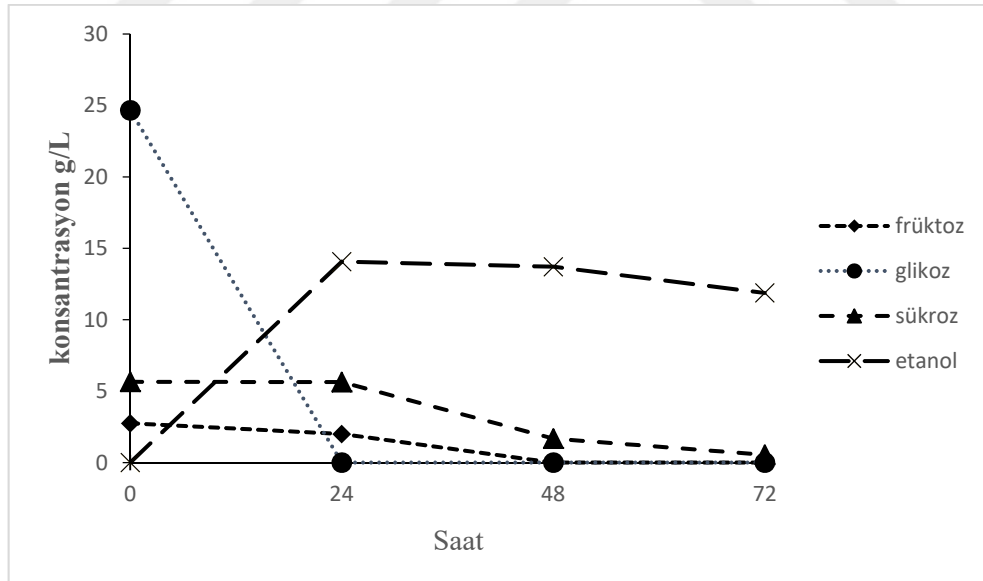
Manyok kabuğun hidrolizatın fermantasyonun profili (fermente olabilen şekerlerdeki azalma (sükroz, glikoz, früktoz), oluşan etanol 30°C'de azot ilavesiz ve ilaveli Şekil 4.12 ve 4.13'te göstermiştir. Her iki sıcaklık ve azot ilaveli ve ilavesiz koşullarda, neredeyse tüm fermente olabilir şekerler 24 saat'te *Saccharomyces cerevisiae* tarafından kullanılmıştır ve en yüksek etanol verimi 24 saat sonucunda 30°C ve 4 gL⁻¹ pepton eklenmiş denemede etanol konsantrasyonu 14.07 ± 0.63 g/L ve etanol verimi % 46.71 olarak Çizelge 4.6'da bulunmuştur. Manyok kabuğun fermantasyonun sırasında en yüksek oluşan gliserol ve metanol miktarı sırası ile 0.658-1.72 g/L ve 0.126-0.53g/L arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.6: Manyok kabuğun hidrolizatı Fermantasyon optimizasyonu sonuçları

Fermantasyon koşulları				
Verim	25°C	25°C+ Azot	30°C	30°C+Azot
Etanol konsantrasyonu (g etanol/ L)	10.70± 0.05	11.54± 0.28	12.14± 0.48	14.07± 0.63
% Etanol verimi	35.52	38.31	40.30	46.71



Şekil 4.12: 30°C'de gerçekleştirilen kabuğunun hidrolizati fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu



Şekil 4.13: 30°C'de azot ilaveli gerçekleştirilen kabuğunun hidrolizati fermantasyon sırasında şeker kullanımı ve etanol oluşumu profili

Virunanon ve ark. (2013)'nın yapmış oldukları çalışmada, mayok kabuğu 0.6M sülfürik asit konsantrasyonu, 120°C ve 60 dak. koşullarda piroliz yapılmışlardır. Enzimatik hidroliz sırasında, ön muamele edilmiş örneği 50°C'de pH 4.5'te, dört farklı enzim dosaj (Liquozim, Spirizim), α amilaz pH 5.5'te, 100°C'de, 2 saat'te ve glukoamilaz 60°C'de, 24 saat'te koşullarda uygulanmışlardır. Manyok kabuğunun hidrolizati *Saccharomyces cerevisiae* eklenerek, 37°C'de, 116 saat'te bir fermentasyon yapılmışlardır. Fermentasyon sonucu etanol verimini 8.76-12.92 g/L arasında bulunmuşlardır.

Kongkiattikajorn ve ark. (2011) yılında yaptıkları bir çalışmada manyok kabuğu, 0.1M sülfürik asit (H₂SO₄) konsantrasyonunda, 130°C'de, 30dak.'da bir piroliz yapılmışlardır. Enzimatik hidroliz sırasında, ön muamele edilmiş örneği 50°C'de pH 4.5'te, üç farklı enzim dosaj (pektinaz, sellülaz ve xyllanaz) kullanılmışlardır. Manyok kabuğunun hidrolizati *Saccharomyces cerevisiae* eklenerek, 30°C'de, 50 rpm, 48 saat'te fermentasyon yapılmışlardır. Sonuç olarak, etanol konsantrasyonu 28.07g/L elde edilmişlerdir.

Sivamani ve ark. (2018)'nin yapmış oldukları çalışmada, mayok kabuğu, 0.1M sülfürik asit konsantrasyonunda ile uygulanmışlardır ve enzimatik hidroliz aşamasında, sellülaz ve pektinaz enzimler 28°C'de, 1 saat'te, α amilaz 100°C'de, 2 saat'te ve glukoamilaz 60°C'de 4 saat'te hidroliz yapılmışlardır. Manyok kabuğunun hidrolizati *Saccharomyces cerevisiae* eklenerek, 37°C, 126 saat ve 150rpm koşullarda fermentasyon edilmişlerdir. Fermentasyon sonucu etanol verimini 17.8 g/L olarak bulunmuşlardır.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, miscanthus ve manyok kabukları biyoetanol üretimi için potansiyel hammadde olarak incelenmiştir. Miscanthus ve manyok kabukları ilk önce farklı koşullar altında (farklı sıcaklık, süre ve farklı konsantrasyonlarda alkali ve asit çözeltisi) ön muamele edilmiştir. Ön muamele uygulanmış örneklerle enzimatik hidroliz (pH 5.0, 50°C, 150 rpm, 3 gün) uygulanmıştır. Miscanthus örneğinde enzimatik hidrolizden sonra en yüksek toplam fermente olabilir şeker miktarı % 0.5 (a/h) NaOH, 120°C, 90 dak. koşullarında elde edilmiştir. Manyok kabuğunda ise en yüksek toplam fermente olabilir şeker miktarı % 1 (h/h) H₂SO₄, 120°C, 10 dak. koşullarında elde edilmiştir.

Elde edilen hidrolizatlar pH 5.5 ile 25 ve 30°C'de ve azot ilavesi ve ilavesiz ile 72 saat süre ile *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak fermente edilmiştir. Miscanthus hidrolizatının 30°C'de azot ilaveli fermentasyonunda maksimum etanol konsantrasyonu ve verimi sırasıyla 12.59 ± 0.09g/L ve % 38.40 olarak bulunmuştur. Manyok kabuğun hidrolizatı fermantasyonda da maksimum etanol konsantrasyonu ve verimi 30°C azot ilaveli koşullarda elde edilmiş ve bu değerler sırasıyla 14.07 ± 0.63 g/L ve % 46.71 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın sonuçlarına göre miscanthus ve manyok kabukları, gıda fiyatları üzerinde zararlı bir etkisi olmayan biyoetanol üretimi için çok uygun hammaddelerdir.

Bu hammaddelerin, özellikle manyok kabukları kullanımı atık yöntemi sorunlarına ilişkin bir çözüm getirebilir. Atıklar ve lignoselülozik malzemelerden enerji üretimi, enerji eksikliği, iklim değişikliği ve çevre sorunu ile ilgili olarak sürdürülebilir bir çözüm getirebilir.



KAYNAKÇA

- Adams, J. M., Gallagher, J. A., & Donnison, I. S. (2009). Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of applied phycology*, 21(5), 569.
- Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2016). Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 518-530.
- Adekunle, A. F. (2017). *Assessment of the Adoption of Automated Technologies in Poultry Production in Southwestern Nigeria*.
- Aderemi, F., & Nworgu, F. (2007). Nutritional status of cassava peels and root sieviate biodegraded with *Aspergillus niger*. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 2(3), 308-311.
- Adesanya, O., Oluyemi, K., Josiah, S., Adesanya, R., Shittu, L., Ofusori, D., . . . Babalola, G. (2008). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from cassava peel hydrolysate. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(1), 25-35.
- Aditiya, H., Chong, W., Mahlia, T., Sebayang, A., Berawi, M. A., & Nur, H. (2016). Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. *Waste Management*, 47, 46-61.
- Aditiya, H., Sing, K., Hanif, M., & Mahlia, T. (2015). Effect of acid pretreatment on enzymatic hydrolysis in bioethanol production from rice straw. *International Journal of Technology*, 6(1), 3-10.
- Agu, R., Amadife, A., Ude, C., Onyia, A., Ogu, E., Okafor, M., & Ezejiofor, E. (1997). Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production. *Waste Management*, 17(1), 91-96.

- Ahmad, F., Silva, E. L., & Varesche, M. B. A. (2018). Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 98, 108-124.
- Almeida, J. R., Röder, A., Modig, T., Laadan, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2008). NADH-vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(6), 939-945.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Archibong, E., Obika, I. E., Okafor, O., Okafor, U., Ezewuzie, C., Ezemba, C., . . . Anakwenze, V. (2016). Ethanol production from cassava wastes (pulp and peel) using alcohol tolerant yeast isolated from palm wine. *American journal of life science researches*, 4(3).
- Aro, S., Aletor, V., Tewe, O., & Agbede, J. (2010). Nutritional potentials of cassava tuber wastes: A case study of a cassava starch processing factory in south-western Nigeria. *Livestock Research for Rural Development*, 22(11), Article# 213.
- Atwell, W., Patrick, B., Johnson, L., & Glass, R. (1983). Characterization of quinoa starch. *Cereal Chem*, 60(1), 9-11.
- Bai, F., Anderson, W., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26(1), 89-105.
- Bajpai, P. (2013). *Advances in bioethanol*: Springer.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*, 52(2), 858-875.

- Ball, S., Guan, H.-P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., . . . Preiss, J. (1996). From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell*, 86(3), 349-352.
- Ballerini, D. (2006). *Biocarburants (Les)*: Editions OPHRYS.
- Bauer, F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 27-51.
- Bayitse, R., Hou, X., Bjerre, A.-B., & Saalia, F. K. (2015). Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars. *AMB express*, 5(1), 60.
- Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., . . . Harashima, S. (2012). Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New biotechnology*, 29(3), 379-386.
- Berg, C. (2001). World bioethanol production, the distillery and bioethanol network. *linea*: <http://www.distill.com/worldethanolproduction>. *ht m* (Mayo 2012).
- Berthels, N., Cordero Otero, R., Bauer, F., Thevelein, J., & Pretorius, I. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS yeast research*, 4(7), 683-689.
- Blennow, A., Nielsen, T. H., Baunsgaard, L., Mikkelsen, R., & Engelsen, S. B. (2002). Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends in plant science*, 7(10), 445-450.
- Boakye-Boaten, N. A., Xiu, S., Shahbazi, A., & Fabish, J. (2015). Liquid hot water pretreatment of *Miscanthus x giganteus* for the sustainable production of bioethanol. *BioResources*, 10(3), 5890-5905.

- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in polymer science*, 19(5), 797-841.
- Bouchard, J., Abatzoglou, N., Chornet, E., & Overend, R. (1989). Characterization of depolymerized cellulosic residues. *Wood science and technology*, 23(4), 343-355.
- Budzianowski, W. M. (2012). Sustainable biogas energy in Poland: Prospects and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 342-349.
- Cha, Y.-L., An, G. H., Park, Y., Yang, J., An, J.-W., Moon, Y.-H., . . . Choi, I.-H. (2014). Partial simultaneous saccharification and fermentation at high solids loadings of alkaline-pretreated miscanthus for bioethanol production. *BioResources*, 9(4), 6899-6913.
- Cha, Y.-L., An, G. H., Yang, J., Moon, Y.-H., Yu, G.-D., & Ahn, J.-W. (2015). Bioethanol production from Miscanthus using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* mbc 2 isolated from the respiration-deficient mutants. *Renewable energy*, 80, 259-265.
- Chemists, A. o. O. A. (1990). *Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement* (Vol. 15): Association of Official Analytical Chemists.
- Cheng, K.-K., Ge, J.-P., Zhang, J.-A., Ling, H.-Z., Zhou, Y.-J., Yang, M.-D., & Xu, J.-M. (2007). Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology letters*, 29(7), 1051-1055.
- Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I., & François, J. M. (2007). A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. *Metabolic engineering*, 9(4), 364-378.
- de Farias Silva, C. E., & Bertucco, A. (2016). Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. *Process Biochemistry*, 51(11), 1833-1842.

- de Souza Abud, A. K., & de Farias Silva, C. E. (2019). Bioethanol in Brazil: status, challenges and perspectives to improve the production *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 417-443): Elsevier.
- Deesuth, O., Laopaiboon, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, L. (2015). Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. *Industrial Crops and Products*, 74, 95-102.
- DEMİRBAŞ, A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy sources*, 27(4), 327-337.
- Dhamdere, R. T. (2012). Optimization of a Dynamic Hot Water Pretreatment of Switchgrass using Catalysis by Carbonation to Maximize Carbochemical Yields.
- Domínguez-Bocanegra, A. R., Torres-Muñoz, J. A., & López, R. A. (2015). Production of bioethanol from agro-industrial wastes. *Fuel*, 149, 85-89.
- Du, C., Li, H., Zhang, L., Wang, J., Huang, D., Xiao, M., . . . Xiong, Y. (2012). Hydrogen production by steam-oxidative reforming of bio-ethanol assisted by Laval nozzle arc discharge. *international journal of hydrogen energy*, 37(10), 8318-8329.
- Dziedzic, S., & Kearsley, M. (1995). The technology of starch production *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives* (pp. 1-25): Springer.
- Ebrahimi, F., Khanahmadi, M., Roodpeyma, S., & Taherzadeh, M. J. (2008). Ethanol production from bread residues. *Biomass and Bioenergy*, 32(4), 333-337.
- Edama, N. A., Sulaiman, A., & Rahim, S. N. A. (2014). Enzymatic saccharification of Tapioca processing wastes into biosugars through immobilization technology (Mini Review). *Biofuel Research Journal*, 1(1), 2-6.

- Eklund, R., Galbe, M., & Zacchi, G. (1990). Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme and microbial technology*, 12(3), 225-228.
- Elemike, E. E., Oseghale, O. C., & Okoye, A. C. (2015). Utilization of cellulosic cassava waste for bio-ethanol production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(4), 2797-2800.
- Eriksson, T., Börjesson, J., & Tjerneld, F. (2002). Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 353-364.
- Faraco, V. (2013). Lignocellulose conversion. *Enzym Microbial Tools Bioethanol Prod.*
- Fengel, D., & Wegener, G. (2011). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*: Walter de Gruyter.
- Fulton, L., Howes, T., & Hardy, J. (2004). Biofuels for Transport: an International Perspective. International Energy Agency, Paris, France.
- Ge, L., Wang, P., & Mou, H. (2011). Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renewable energy*, 36(1), 84-89.
- Ghiasi, K., Varriano-Marston, E., & Hoskeney, R. (1982). Gelatinization of wheat starch. II. Starch-surfactant interaction. *Cereal Chemistry*, 59(2), 86-88.
- Githunguri, C., Gatheru, M., & Ragwa, S. STATUS OF CASSAVA PROCESSING AND CHALLENGES IN THE COASTAL, EASTERN AND WESTERN REGIONS OF KENYA. *HANDBOOK ON CASSAVA*, 217.
- Gnansounou, E., & Dauriat, A. (2005). Ethanol fuel from biomass: A review.

- Gomes, M. E., Azevedo, H. S., Moreira, A., Ellä, V., Kellomäki, M., & Reis, R. (2008). Starch–poly (ϵ -caprolactone) and starch–poly (lactic acid) fibre-mesh scaffolds for bone tissue engineering applications: structure, mechanical properties and degradation behaviour. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(5), 243-252.
- Gupta, M., Velayutham, P., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Khafipour, E., Derakhshani, H., . . . Nakhla, G. (2014). Co-fermentation of glucose, starch, and cellulose for mesophilic biohydrogen production. *international journal of hydrogen energy*, 39(36), 20958-20967.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.-F., Lidén, G., & Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology*, 24(12), 549-556.
- Han, M., Kim, Y., Koo, B.-c., & Choi, G.-W. (2011). Bioethanol production by *Miscanthus* as a lignocellulosic biomass: Focus on high efficiency conversion to glucose and ethanol. *BioResources*, 6(2), 1939-1953.
- Hanif, M., Mahlia, T., Aditiya, H., & Bakar, A. (2017). Energy and environmental assessments of bioethanol production from Sri Kanji 1 cassava in Malaysia. *Biofuel Research Journal*, 4(1), 537-544.
- Haque, M. A., Barman, D. N., Kang, T. H., Kim, M. K., Kim, J., Kim, H., & Yun, H. D. (2013). Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time. *Biosystems engineering*, 114(3), 294-305.
- Hermiati, E., Azuma, J.-i., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T. C., Suparno, O., & Prasetya, B. (2011). Hydrolysis of carbohydrates in cassava pulp and tapioca flour under microwave irradiation. *Indonesian Journal of Chemistry*, 11(3), 238-245.
- Hillocks, R. J. (2002). Cassava in Africa. *Cassava: Biology, production and utilization*, 41-54.

- Hodgson, E., Nowakowski, D., Shield, I., Riche, A., Bridgwater, A., Clifton-Brown, J., & Donnison, I. S. (2011). Variation in *Miscanthus* chemical composition and implications for conversion by pyrolysis and thermochemical bio-refining for fuels and chemicals. *Bioresource technology*, 102(3), 3411-3418.
- Horváthová, V., Slajsová, K., & Sturdik, E. (2004). Evaluation of the glucoamylase Gln from *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 in hydrolysing the corn starch. *BIOLOGIA-BRATISLAVA*, 59(3), 361-366.
- Intanakul, P., Krairiksh, M., & Kitchaiya, P. (2003). Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric pressure. *Journal of wood chemistry and technology*, 23(2), 217-225.
- Jackson, M. A., Cliquet, S., & Iten, L. B. (2003). Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*, 13(1), 23-33.
- Jeffries, T., & Jin, Y.-S. (2004). Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(5), 495-509.
- Jenkins, B., Baxter, L., Miles Jr, T., & Miles, T. (1998). Combustion properties of biomass. *Fuel processing technology*, 54(1-3), 17-46.
- Jensen, J. W., Felby, C., & Jørgensen, H. (2011). Cellulase hydrolysis of unsorted MSW. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(7-8), 1799-1811.
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103-112.

- Kabel, M. A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A. G., & Schols, H. A. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource technology*, 98(10), 2034-2042.
- Kamau, J., Melis, R., Laing, M., Derera, J., Shanahan, P., & Ngugi, E. (2010). Combining the yield ability and secondary traits of selected cassava genotypes in the semi-arid areas of Eastern Kenya.
- Keshwani, D. R., & Cheng, J. J. (2009). Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. *Bioresource technology*, 100(4), 1515-1523.
- Kim, S., & Dale, B. E. (2005). Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and biodiesel. *Biomass and Bioenergy*, 29(6), 426-439.
- Kim, T. H., Taylor, F., & Hicks, K. B. (2008). Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource technology*, 99(13), 5694-5702.
- Kohlmann, K., Sarikaya, A., Westgate, P., Weil, J., Velayudhan, A., Hendrickson, R., & Ladisch, M. (1995). Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates: ACS Publications.
- Kongkiattikajorn, J., & Sornvoraweat, B. (2011). Comparative study of bioethanol production from cassava peels by monoculture and co-culture of yeast. *Kasetsart J (Nat Sci)*, 274, 268-274.
- Kumar, M. (2010). Native grain amylases in enzyme combinations for granular starch hydrolysis: Google Patents.
- Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource technology*, 100(18), 4176-4182.

- Laplace, J., Jacquet, A., Travers, I., Simon, J., & Auffray, Y. (2001). Incidence of land and physicochemical composition of apples on the qualitative and quantitative development of microbial flora during cider fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(4), 227-234.
- Larsson, S., Cassland, P., & Jönsson, L. J. (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3), 1163-1170.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal Jr, M. J., & Lynd, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource technology*, 81(1), 33-44.
- Lewandowska, M., Szymańska, K., Kordala, N., Dąbrowska, A., Bednarski, W., & Juszczuk, A. (2016). Evaluation of *Mucor indicus* and *Saccharomyces cerevisiae* capability to ferment hydrolysates of rape straw and *Miscanthus giganteus* as affected by the pretreatment method. *Bioresource technology*, 212, 262-270.
- Li, M.-F., Fan, Y.-M., Xu, F., Sun, R.-C., & Zhang, X.-L. (2010). Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 551-559.
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 449-467.
- Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource technology*, 99(4), 847-854.
- Lu, D., Xiao, C., & Xu, S. (2009). Starch-based completely biodegradable polymer materials. *Express polymer letters*, 3(6), 366-375.

- Lu, X., Xi, B., Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2011). Microwave pretreatment of rape straw for bioethanol production: focus on energy efficiency. *Bioresource technology*, 102(17), 7937-7940.
- Lujan-Rhenals, D. E. (2013). Production of Bioethanol by Fermentation of Sugars Released by Dilute-acid and Enzymatic Hydrolysis of Soybean Meal.
- Lv, X.-C., Huang, X.-L., Zhang, W., Rao, P.-F., & Ni, L. (2013). Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Control*, 34(1), 183-190.
- Mabee, W., & Saddler, J. (2010). Bioethanol from lignocellulosics: status and perspectives in Canada. *Bioresource technology*, 101(13), 4806-4813.
- Mabit, J., Loisel, C., Fayolle, F., & Legrand, J. (2004). Relation between mechanical treatment of starch and flow conditions in a scraped surface heat exchanger. *Food research international*, 37(5), 505-515.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 379-386.
- Manilal, V., Narayanan, C., & Balagopalan, C. (1991). Cassava starch effluent treatment with concomitant SCP production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(2), 185-190.
- McMillan, J. D. (1997). Bioethanol production: status and prospects. *Renewable energy*, 10(2-3), 295-302.
- Mohammed, I., Abarshi, M., Muli, B., Hillocks, R., & Maruthi, M. (2012). The symptom and genetic diversity of cassava brown streak viruses infecting cassava in East Africa. *Advances in virology*, 2012.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.
- Mutripah, S., Meinita, M. D. N., Kang, J.-Y., Jeong, G.-T., Susanto, A., Prabowo, R. E., & Hong, Y.-K. (2014). Bioethanol production from the hydrolysate of *Palmaria palmata* using sulfuric acid and fermentation with brewer's yeast. *Journal of applied phycology*, 26(1), 687-693.
- Nagodawithana, T. W., & Steinkraus, K. H. (1976). Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(2), 158-162.
- Nanssou, P. A. K., Nono, Y. J., & Kapseu, C. (2016). Pretreatment of cassava stems and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. *Renewable energy*, 97, 252-265.
- Obnamia, J. A. (2014). *Modeling the Reaction Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass*.
- Ogier, J., Leygue, J., Ballerini, D., Pourquie, J., & Rigal, L. (1999). Production d'ethanol a partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology*, 54(1), 67-94.
- Özertan, G. (2007). Biyoyakıtlar Türkiye için ne ifade ediyor? *Boğaziçi Üniversitesi, AraştırmaRaporu* http://www.econ.boun.edu.tr/public_html/RePEc/pdf/200723.pdf.
- Pagliardini, J. (2010). *Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez Saccharomyces cerevisiae par minimisation de la synthèse du glycérol: approche intégrée de génie métabolique et microbiologique*. Toulouse, INSA.

- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Larsson, M., Stenberg, K., Szengyel, Z., . . . Zacchi, G. (1996). Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. *Bioresource technology*, 58(2), 171-179.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31, 135-152.
- Park, S., Chung, M. G., & Yoo, B. (2004). Effect of octenylsuccinylation on rheological properties of corn starch pastes. *Starch-Stärke*, 56(9), 399-406.
- Perez-Verdin, G., Grebner, D. L., Sun, C., Munn, I. A., Schultz, E. B., & Matney, T. G. (2009). Woody biomass availability for bioethanol conversion in Mississippi. *Biomass and Bioenergy*, 33(3), 492-503.
- Ping, L., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2011). Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial crops and products*, 33(1), 200-204.
- Pooja, N., & Padmaja, G. (2014). Pretreatment techniques to enhance the enzymatic degradability of agricultural and processing residues of cassava. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 4(1), 57-67.
- Pooja, N., & Padmaja, G. (2015). Enhancing the enzymatic saccharification of agricultural and processing residues of cassava through pretreatment techniques. *Waste and Biomass Valorization*, 6(3), 303-315.
- Pooja, N., Sajeev, M., Jeeva, M., & Padmaja, G. (2018). Bioethanol production from microwave-assisted acid or alkali-pretreated agricultural residues of cassava using separate hydrolysis and fermentation (SHF). *3 Biotech*, 8(1), 69.
- Puls, J., Poutanen, K., Körner, H.-U., & Viikari, L. (1985). Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 416-423.
- Quintero, J. A., Rincón, L. E., & Cardona, C. A. (2011). Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks *Biofuels* (pp. 251-285): Elsevier.

- Raghavi, S., Sindhu, R., Binod, P., Gnansounou, E., & Pandey, A. (2016). Development of a novel sequential pretreatment strategy for the production of bioethanol from sugarcane trash. *Bioresource technology*, 199, 202-210.
- Ramachandran, V., Pujari, N., Matey, T., & Kulkarni, S. (2014). Enzymatic Hydrolysis of Cassava using wheat seedlings. *International Journal of Science, Engineering and Technology Research*, 3(5), 1216-1219.
- Ray, R. C., & Swain, M. R. (2011). Bio-ethanol, bioplastics and other fermented industrial products from cassava starch and flour. *Cassava: farming, uses and economic impacts*. Nova, Hauppauge, NY, 1-32.
- Rooni, V., Raud, M., & Kikas, T. (2017). Technical solutions used in different pretreatments of lignocellulosic biomass: a review. *Agron Res*, 15(3), 848-858.
- Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2006). Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology Progress*, 22(2), 449-453.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable energy*, 37(1), 19-27.
- Sassner, P., Mårtensson, C.-G., Galbe, M., & Zacchi, G. (2008). Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated Salix for the production of bioethanol. *Bioresource technology*, 99(1), 137-145.
- Sehnem, N. T., da Silva Machado, A., Leite, F. C. B., de Barros Pita, W., de Moraes Jr, M. A., & Ayub, M. A. Z. (2013). 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. *Bioresource technology*, 133, 190-196.
- Sen, R., & Swaminathan, T. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21(2), 141-148.

- Şenel, S., & McClure, S. J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 56(10), 1467-1480.
- Sharma, V., Rausch, K. D., Tumbleson, M. E., & Singh, V. (2007). Comparison between granular starch hydrolyzing enzyme and conventional enzymes for ethanol production from maize starch with different amylose: amylopectin ratios. *Starch-Stärke*, 59(11), 549-556.
- Sills, D. L., & Gossett, J. M. (2012). Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. *Biotechnology and bioengineering*, 109(2), 353-362.
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., & Shrivastava, A. (2008). Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 667-673.
- Sivamani, S., & Baskar, R. (2015). Optimization of bioethanol production from cassava peel using statistical experimental design. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(2), 567-574.
- Sivamani, S., Chandrasekaran, A. P., Balajii, M., Shanmugaparakash, M., Hosseini-Bandegharaei, A., & Baskar, R. (2018). Evaluation of the potential of cassava-based residues for biofuels production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 17(3), 553-570.
- Smith, A. M. (2008). Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant Journal*, 54(4), 546-558.
- Sørensen, A., Teller, P. J., Hilstrøm, T., & Ahring, B. K. (2008). Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresource technology*, 99(14), 6602-6607.

- Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2004). Gelatinization kinetics of rice starch studied by non-isothermal calorimetric technique: influence of extraction method, water concentration and heating rate. *Journal of Food Engineering*, 62(4), 337-344.
- Stampfl, P. F., CLIFTON-BROWN, J. C., & Jones, M. B. (2007). European-wide GIS-based modelling system for quantifying the feedstock from *Miscanthus* and the potential contribution to renewable energy targets. *Global Change Biology*, 13(11), 2283-2295.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). *Principles of fermentation technology*: Elsevier.
- Stavrinides, A., Phipps, D., & Al-Shamma'a, A. (2010). *REVIEW; CURRENT AND DEVELOPING LIGNO-CELLULOSIC PRETREATMENT METHODS FOR BIOETHANOL PRODUCTION*. Paper presented at the 5th Annual Conference Liverpool "BEAN" 18th-19th May 2010.
- Sun, F., & Chen, H. (2007). Evaluation of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by atmospheric glycerol autocatalysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(11), 1039-1044.
- Sun, Z.-Y., Tang, Y.-Q., Iwanaga, T., Sho, T., & Kida, K. (2011). Production of fuel ethanol from bamboo by concentrated sulfuric acid hydrolysis followed by continuous ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 102(23), 10929-10935.
- Swana, J., Yang, Y., Behnam, M., & Thompson, R. (2011). An analysis of net energy production and feedstock availability for biobutanol and bioethanol. *Bioresource technology*, 102(2), 2112-2117.
- Świątek, K., Lewandowska, M., Świątek, M., Bednarski, W., & Brzozowski, B. (2014). The improvement of enzymatic hydrolysis efficiency of rape straw and *Miscanthus giganteus* polysaccharides. *Bioresource technology*, 151, 323-331.

- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9(9), 1621-1651.
- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2(3), 472-499.
- Talebnia, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource technology*, 101(13), 4744-4753.
- Taouda, H., Chabir, R., Aarab, L., Miyah, Y., & Errachich, F. (2017). Biomass and bioethanol production from date extract. *J. Mater. Environ. Sci*, 8(9).
- Tenlep, L. N. (2009). *Pretreatment strategies for cellulosic ethanol*: South Dakota State University.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. II. Waxy rice starches. *Cereal Chem*, 67(6), 558-563.
- Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource technology*, 96(18), 2014-2018.
- Tolmasquim, M. T. (2007). *Bioenergy for the future*. Paper presented at the Conference on Biofuels: an option for a less carbon-intensive economy.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., & Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International journal of food microbiology*, 134(3), 237-243.
- Uihlein, A., & Schebek, L. (2009). Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: an assessment. *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 793-802.

- van der Veen, B. A., Uitdehaag, J. C., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543(336), 360.
- Van Walsum, G. P., Allen, S. G., Spencer, M. J., Laser, M. S., Antal, M. J., & Lynd, L. R. (1996). *Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol*. Paper presented at the Seventeenth symposium on biotechnology for fuels and chemicals.
- Virunanon, C., Ouephanit, C., Burapatana, V., & Chulalaksananukul, W. (2013). Cassava pulp enzymatic hydrolysis process as a preliminary step in bio-alcohols production from waste starchy resources. *Journal of Cleaner Production*, 39, 273-279.
- Walch, E., Zemmann, A., Schinner, F., Bonn, G., & Bobleter, O. (1992). Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally pretreated sugar cane bagasse and beech bark. *Bioresource technology*, 39(2), 173-177.
- Walker, G. (2010). *Bioethanol: Science and Technology of Fuel Alcohol*, Graeme M. Walker and Ventus Publishing ApS, 8-34.
- Weerasai, K., Suriyachai, N., Poonsrisawat, A., Arnthong, J., Unrean, P., Laosiripojana, N., & Champreda, V. (2014). Sequential acid and alkaline pretreatment of rice straw for bioethanol fermentation. *BioResources*, 9(4), 5988-6001.
- Weil, J. R., Sarikaya, A., Rau, S.-L., Goetz, J., Ladisch, C. M., Brewer, M., . . . Ladisch, M. R. (1998). Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 73(1), 1-17.
- Wertz, J.-L., Deleu, M., Coppée, S., & Richel, A. (2017). *Hemicelluloses and lignin in biorefineries*: CRC Press.
- Whitten, G. Z., & Reyes, S. (2004). *Air quality and ethanol in gasoline*. Paper presented at the 9th Annual National Ethanol Conference: Policy & Marketing.

- Xu, Z., & Huang, F. (2014). Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 43-62.
- Yasarla, L. R. (2014). *Separation of lignocellulosic hydrolyzates by polymer induced flocculation and tangential flow microfiltration*: State University of New York College of Environmental Science and Forestry.
- Yeh, R.-H., Lin, Y.-S., Wang, T.-H., Kuan, W.-C., & Lee, W.-C. (2016). Bioethanol production from pretreated *Miscanthus floridulus* biomass by simultaneous saccharification and fermentation. *Biomass and bioenergy*, 94, 110-116.
- Yücel, Y., & Göycincik, S. (2015). Optimization of ethanol production from spent tea waste by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 5(3), 247-255.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Zakpaa, H., Mak-Mensah, E., & Johnson, F. (2009). Production of bio-ethanol from corncobs using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation. *African journal of biotechnology*, 8(13).
- Zhao, X.-Q., Zi, L.-H., Bai, F.-W., Lin, H.-L., Hao, X.-M., Yue, G.-J., & Ho, N. W. (2011). Bioethanol from lignocellulosic biomass *Biotechnology in China III: Biofuels and bioenergy* (pp. 25-51): Springer.



ÖZGEÇMİŞ

Kouame Fulbert OUSSOU 1989 yılında Abidjan, Fildişi sahili’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Brobo’da, lise öğrenimini başkent (Abidjan)’da tamamladı. 2011 yılında (Fildişi sahili) Yamoussoukro ulusal polyteknik enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünü kazandı ve 2014 yılında bu bölümden lisans mezun oldu. 2014-2016 yılında bir gıda firma’da çalıştı ve 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2019 yılında tamamladı.