T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖL KAMIŞINDAN (*Phragmites australis)* BİYOLOJİK VE KİMYASAL ÖN MUAMELE SONRASI BİYOETANOL ÜRETİMİ

HAKAN FİDAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. AYHAN TOZLUOĞLU

DÜZCE, 2017

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖL KAMIŞINDAN (*Phragmites australis*) BİYOLOJİK VE KİMYASAL ÖN MUAMELE SONRASI BİYOETANOL ÜRETİMİ

Hakan FİDAN tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Ayhan TOZLUOĞLU

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Ayhan TOZLUOĞLU
Düzce Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ümit BÜYÜKSARI
Düzce Üniversitesi _____

Doç. Dr. Sezgin Koray GÜLSOY
Bartın Üniversitesi _____

Tez Savunma Tarihi: 19/07/2017

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

19 Temmuz 2017

Hakan Fidan

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayhan Tozluoğlu'na en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yine öğrenimim ve çalışmalarım süresince benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ümit Büyüksarı'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen aileme, çalışma arkadaşlarıma, sevgili Recai Arslan'a ve Ayşegül Ocak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi "BAP - 2016.02.03.478" numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

Temmuz 2017 **Hakan Fidan**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ III

ÇİZELGE LİSTESİ IV

KISALTMALAR V

SİMGELER VI

ÖZET VIII

ABSTRACT IX

1. GİRİŞ 1

1.1. BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILAN HAMMADDELER 2

1.1.1. Sakkaroz İçeren Hammaddeler 3

1.1.2. Nişastalı Materyaller 4

1.1.3. Lignoselülozik Biyokütle 5

1.2. BİYOETANOL ÜRETİM İŞLEMLERİ 6

1.2.1. Ön İşlemler 6

1.2.2. Buhar Patlatılması (Otohidroliz) 7

1.2.3. Asit Ön Muamelesi 9

1.2.4. Alkali Ön Muamelesi 10

1.2.5. Biyolojik Ön Muamele 10

1.3. HİDROLİZ 11

1.3.1. Asit Hidrolizi 11

1.3.2. Seyreltik Asit Hidrolizi 12

1.3.3. Konsantre Asit Hidrolizi 12

1.3.4. Enzimatik Hidroliz 13

1.4. FERMANTASYON 15

1.5. ETANOL ELDESİ 18

2. MATERYAL VE YÖNTEM 19

2.1. HAMMADDE 19

2.2. ÖN MUAMELE 19

2.2.1. Kimyasal Ön Muamele 19

2.2.2. Biyolojik Ön Muamele 19

2.3. HİDROLİZ **20**
2.4. FERMANTASYON **21**
2.5. ANALİTİK METOTLAR **21**
3. BULGULAR VE TARTIŞMA **22**
3.1. GÖL KAMIŞININ KİMYASAL BİLEŞİMİ **22**
3.2. ÖN İŞLEMLER **23**
3.2.1. *C. subvermispora* Mantarı Ön Muamelesinin Göl Kamışının Kimyasal Yapısı Üzerine Etkileri **23**
3.2.2. Kimyasal Ön Muamelenin Göl Kamışının Kimyasal Yapısı Üzerine Etkileri…… **26**
3.2.2.1. Kimyasal ön muamelenin glukan içeriği üzerine etkileri *26*
3.2.2.2. Kimyasal ön muamelenin ksilan içeriği üzerine etkileri *28*
3.2.2.3. Kimyasal ön muamelenin lignin içeriği üzerine etkileri *29*
3.3. ENZİMATİK HİDROLİZ **31**
3.3.1. Hidrolizatların Fermantasyonu **33**
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **35**
5. KAYNAKLAR **36**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Biyokütleden biyoetanol üretiminde kullanılan prosesler 7
Şekil 1.2. Buhar patlatılması ön muamelesinde oluşan adımların şematik gösterimi. 9
Şekil 3.1. Enzimatik hidroliz sonrası glukan dönüşümleri. 32
Şekil 3.2. Enzimatik hidroliz sonrası ksilan dönüşümleri 33
Şekil 3.3. Etanol verimi (teorik ve g/100 g hammadde) 34

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Biyoetanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri 3
Çizelge 1.2. Ön muamele yöntemleri (lignin uzaklaştırıcı ve hemiselülozları hidrolize edici) 8
Çizelge 1.3. Optimize edilmiş asit katalizörlü buhar ön muamelesi koşulları 9
Çizelge 1.4. Heteroarabinoksilanların hidrolizini kapsayan enzimler 15
Çizelge 1.5. Ksilozu fermante etme kapasitesine doğal olarak sahip olan ve üzerinde çalışılan bakteri türleri 17
Çizelge 3.1. Göl kamışının kimyasal bileşenleri (*Phragmites australis*), buğday sapı sapı, tütün sapı, ayçiçeği sapı ve yapraklı/iğne yapraklı ağaç 22
Çizelge 3.2. *C. subvermispora* ile muamele edilmiş göl kamışının kimyasal yapısı 24
Çizelge 3.3. Kimyasal ön muamele edilmiş göl kamışının bileşenleri 29
Çizelge 3.4. Muamele edilmemiş ve ön muamele görmüş göl kamışının *S. cerevisiae* ile fermantesi sırasındaki glikoz, ksiloz ve etanol konsantrasyonları 34

KISALTMALAR

AR-GE	Araştırma Geliştirme
BGL	β-glukosidaz
CBH	Sellobio hidrolaz
DNS	3,5- dinitrosalicylic asit
EG	Endo-1,4-β-glukanaz
EU	Avrupa Birliği
FPU	Floating-point
HBA	Asetat hidroksibenzaldehit
HMF	5-hidroksimetil furfural
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
SGA	Siringaldedid

SİMGELER

α	Alfa
(C*)	Amorf selüloz
β	Beta
(G)	Glikoz
©	Kristalin
atm	Atmosferik basınç
B	Bor
B_2O_3	Bor oksit
Ca	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
CaOH	Kalsiyum oksit
Cl	Klor
CO	Karbon monoksit
CO_2	Karbon dioksit
Cu	Bakır
$CuSO_4$	Bakır sülfat
dak	Dakika
Fe	Demir
g	Gram
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_2SO_4	Sülfürik Asit
K	Kelvin
K	Potasyum
Kg	Kilogram
kGy	Kilogray
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
kPA	Kilopaskal
Mg	Magnezyum
$MgSO_4$	Magnezyum fosfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
MnCl	Manganez klorür
Mo	Molibden
N	Azot
$NaBH_4$	Sodyum borhidrür
NaOH	Sodyum hidroksit
NH_3	Amonyak
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
Ni	Nikel
nkat	Nanokatal
O_2	Oksijen
P	Fosfor
p-	para-
pH	Potantial of hydrogen

ppm	Parts per million
psi	İnçkareye etki eden basınç
S	Kükürt
sa	Saat
SO_2	Kükürt dioksit
U	Unit
v/v	Volume per volume
wt%	Weight percent
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
Zn	Çinko
$ZnSO_4$	Çinko sülfat

ÖZET

GÖL KAMIŞINDAN (*Phragmites australis)* BİYOLOJİK VE KİMYASAL ÖN MUAMELE SONRASI BİYOETANOL ÜRETİMİ

Hakan FİDAN
Düzce Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayhan TOZLUOĞLU
Temmuz 2017, 45 sayfa

Bu çalışma, göl kamışının biyolojik ve kimyasal ön muamele sonucu biyoetanol üretimi için uygunluğunu belirlemeyi amaçlamıştır. Göl kamışının etanole dönüşümünde, sodyum hidroksit (NaOH), hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum borhidrür ($NaBH_4$), boron oksit (B_2O_3) ve sülfürik asit (H_2SO_4)'in etkileri kimyasal ön muamele ile saptanmıştır. Glukan dönüşüm oranlarında en yüksek verim (%79.7) NaOH muamelesinde, sonrasında sırasıyla $NaBH_4$ (%74.1), H_2O_2 (%71.9), mantar ön muamelesi (%69.4), B_2O_3 (%65.5) ve H_2SO_4 (%46.1) muamelelerinden alınmıştır. Muamele edilmemiş göl kamışından elde edilen en yüksek etanol verimi (13.2 g/100 g) ve hesaplanmış en yüksek teorik verim (%85.3) NaOH ile ön muamele edilmiş örneklerde gözlemlenmiştir. Mantar ve $NaBH_4$ ile ön muamele edilmiş örnekler sırasıyla 10.6 ve 12.3 g/100 g etanol eldesi vermişlerdir (muamele edilmemiş göl kamışına kıyasla). Bu çalışmanın sonuçları ekonomik uygunluk ve çevresel avantajlarından dolayı mantar ön muamelesinin göl kamışından biyoetanol üretimi için oldukça uygun olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, Fermantasyon, Göl kamışı, Hidroliz, Ön muamele.

ABSTRACT

BIOETHANOL PRODUCTION FROM COMMON REED (*Phragmites australis*) via BIOLOGICAL AND CHEMICAL PRETREATMENTS

Hakan FİDAN
Duzce University
Graduate School of Natural and Applied Sciences, Departmant of Forest Product Engineering
Master of Science Thesis
Supervisor: Asist. Prof. Ayhan TOZLUOĞLU
July 2017, 45 pages

The present study was aimed at examining the feasibility of using common reed for the production of bioethanol by means of biological and chemical pretreatments. The effectiveness of sodium hydroxide (NaOH), hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium borohydrate ($NaBH_4$), boron oxide (B_2O_3) and sulfuric acid (H_2SO_4) for conversion of common reed to ethanol was investigated via chemical pretreatments. The results showed that the NaOH treatment had the highest glucan conversion rates (79.7%), followed by the $NaBH_4$ (74.1%), H_2O_2 (71.9%), fungal pretreatment (69.4%), B_2O_3 (65.5%) and H_2SO_4 (46.1%). The highest ethanol yield (13.2 g/100 g) and the calculated highest theoretical yield (85.3%) from untreated common reed were observed for the NaOH-pretreated samples. The fungal- and $NaBH_4$-pretreated samples yielded 10.6 and 12.3 g/100 g of ethanol (based on untreated common reed), respectively. The results of this study indicated that, because of its economic feasibility and environmental advantages, the fungal pretreatment was more suitable for common reed bioethanol production.

Keywords: Bioethanol, Common reed, Fermentation, Hydrolysis, Pretreatment.

1. GİRİŞ

Günden güne artan dünya nüfusu enerji ihtiyacı sorununu da beraberinde getirmiştir. Yakın gelecekte fosil kökenli kömür, doğalgaz, petrol gibi yenilenemeyen enerji kaynakları aşırı ve kontrolsüz kullanım sonucu tükenmekle karşı karşıya kalacaktır. Buna ek olarak gelişmekte olan sanayi ve teknoloji her geçen gün daha fazla enerjiye ihtiyaç duymakta ve endüstriyel faaliyetlerin enerji gereksinimi artmaktadır. Bu enerji ihtiyacı insanoğlunu yeni enerji kaynakları arayışına yönlendirmiş ve üretilen ve tüketilen enerji arasındaki açığı kapatmak amacıyla yürütülen çalışmalar yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırmıştır.

Fosil kökenli yakıt kaynakları yıllardır dünyanın her yerinde enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ham petrolün, dünya enerji kaynaklarının %38'ini, kömürün %25'ini ve doğalgazın da %22'sini oluşturmasıyla, dünya enerji gereksiniminin %85'i fosil kökenli yakıt kaynaklarından sağlanmaktadır. Dünya petrolünün ise yaklaşık olarak %75'i Orta Doğu ülkelerinde bulunmakta olup, ülkemiz gibi petrol fakiri ülkeler yakıt teminindeki aksamalardan ve fiyat artışlarının neden olduğu ekonomik ve stratejik aksaklıklardan oldukça etkilenmektedirler [1]. Bu nedenle de 1970'li yıllarda yaşanan petrol krizinden sonra ülkeler kendi kaynaklarını kullanarak dışa bağımlılıklarını azaltabilmek adına yeni alternatif enerji kaynakları bulma ve değerlendirme zorunluluğunun farkına varmışlardır.

Son yıllarda çeşitli ülkelerde biyokütleden enerji eldesi programları uygulanmakta olup, bu programlar genellikle petrol ürünleri yerine alternatif taşıt yakıtları üretmeyi amaçlamakta ve yapılan çalışmaların çoğu yenilenebilir tarım bitkilerinden etanol ve biyodizel üretimi üzerine olmaktadır. Özellikle son zamanlarda odun hammaddesi yerine yıllık bitki ve tarımsal atıkların bu amaç için kullanılmaya başlanması enerji üretimi adına ormanlara olan talebin azaltılmasını amaçlanmakla beraber yıllardır var olan ve değerlendirilmeyen büyük bir potansiyel ile orman endüstrisinde ve enerji üretimi amaçlı kullanım alanlarında bir boşluğu doldurması amaçlanmaktadır [2].

Kullanılan enerji kaynaklarının yenilenebilir olması kadar çevreye duyarlı olmaları ve çevresel faktörler üzerine olumsuz etkileri olmaması da oldukça önemli bir kriterdir.

Odun esaslı hammaddelerden elde edilen ürünler, kullanım ve enerji üretimi sonrası kalan atıklarının petrol bazlı ürünlere kıyasla çok kısa sürede biyodegrade olabilmesiyle çevreye zarar vermemektedir. Bunun aksine petrol ürünlerinin işlenmesinden arta kalan atıklar uzun süreler boyunca bozunmadan kalarak çevreye zarar verebilmektedir. Petrol ürünlerinin yakıt olarak kullanılması bile başlı başına çevresel bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadır. Öyle ki fosil yakıtlarının enerji amaçlı kullanımı, atmosferdeki CO_2 emisyon miktarını 150 yılda %30 oranında artırarak 280 ppm'den 365 ppm'e çıkarmıştır [3].

Daha temiz bir çevre ve daha yaşanılabilir bir dünya için tarım arazilerinin ve üretim şartlarının verdiği imkanlar dahilinde enerji üretimi için biyokütlenin değerlendirilmesi gittikçe önem kazanmaktadır. Bu bağlamda, yenilenebilir doğal kaynaklardan kimyasal ve biyolojik yolla elde edilen yakıt değeri yüksek etanolün kullanılması birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir [1]. Ayrıca etanolün yanması sonucu, petrol ürünlerine kıyasla çok daha düşük oranlarda CO, CO_2 ile yanıcı olmayan hidrokarbonlar, azot oksitler ve uçucu organik bileşiklerin oluşması bu konunun önemini daha da çok artırmaktadır [3].

Biyoetanol özellikle polisakkarit ve disakkarit bileşimine sahip mısır, buğday sapı, sebze atıkları, şeker kamışı, patates gibi biyokütleden üretilen bir üründür. Buhar ve etilenin kimyasal reaksiyonu sonucu üretilmesine rağmen genellikle şekerin fermantasyonu ile üretilir [4], [5]. Etanol veya başka bir deyişle etil alkol temiz renksiz bir sıvı olup, biyolojik olarak bozunur ve çevre açısından bir tehdit oluşturmaz. Benzin ile kullanıldığında ise oktan sayısını artırır, CO ve hidrokarbonlar gibi zararlı gazların emisyonlarını azaltarak tam yanma sağlar. Yaygın olarak karıştırılan kullanma oranları %10 etanol ve %90 petrol şeklindedir [6].

1.1. BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILAN HAMMADDELER

Biyoetanol bitki yağları, şeker pancarı, tahıllar, organik atıklar ve işlenmiş biyokütleler gibi çok geniş bir hammadde yelpazesinden elde edilebilir. Biyoetanol üretiminde kullanılacak hammaddenin yeteri miktarda etanole dönüşebilen selüloz veya nişasta içermesi en önemli unsurlardan biridir [7]. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler üç başlık altında sınıflandırılabilir. Bunlar; sakkaroz içeren hammaddeler, nişastalı materyaller ve lignoselülozik biyokütledir. Biyoetanol üretiminde

değerlendirilebilen çeşitli hammadde kaynakları ve bu kaynakların biyoetanol verimleri Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Biyoetanol üretiminde karşılaşılan en önemli problem üretimde kullanılacak hammaddenin tedariğidi ve sürekliliğidir. Kullanılacak hammaddenin üretim mevsimi ve coğrafik konumu biyoetanol üretimindeki önemli etkenlerdir. Diğer yandan hammadde maliyetlerindeki dalgalanmaların da biyoetanol üretim maliyetlerine etkisi büyüktür [8]. Kullanılan hammaddenin kimyasal yapısı elde edilen etanol verimini etkileyen en temel faktörlerin başında gelir.

1.1.1. Sakkaroz İçeren Hammaddeler

Sakkaroz içeren hammaddeler sadece disakkarit yapıda olduklarından dolayı üretimde en çok tercih edilen hammadde türüdür. Bunun sebebi disakkarit yapıların nişastalı ve lignoselülozik materyale nazaran biyoetanole dönüşümünün daha kolay olmasıdır ve ön hidroliz gerekmeksizin sadece maya hücreleri tarafından degradasyona uğratılabilirler [9].

Biyoetanol üretimi yüksek sakkaroz içeriklerinden dolayı genellikle şeker pancarı ve şeker kamışı kullanılarak gerçekleştirilir [8]. Bu hammaddeler coğrafik olarak farklı bölgelerde yetiştirilmektedir. Şeker kamışı tropik ve subtropik iklim koşullarının hakim olduğu ülkelerde daha çok yetişirken, şeker pancarı daha çok sıcak iklim koşullarının sürdüğü ülkelerde yetiştirilmektedir.

Çizelge 1.1. Biyoetanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri [10].

Hammadde	Biyoetanol üretim potansiyeli (l/ton)
Şeker kamışı	70
Şeker pancarı	110
Tatlı patates	125
Patates	110
Kassava	180
Mısır	360
Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340
Sorgum	60
Bagasse	280

Brezilya günümüzde en büyük şeker kamışı üreticisi olup dünya üretiminin yaklaşık

olarak %27'sine sahiptir [11]. Bu durum Brezilya'da şeker kamışından biyoetanol üretiminin oldukça ekonomik bir şekilde gerçekleştirilmesinin ana sebebidir. Brezilya biyoetanol endüstrisine destek vermek amacıyla ülke genelinde şeker kamışı fiyatlarını hükümet destekli olarak düşürmektedir. Bu durum şeker kamışı fiyatlarını düşürerek biyoetanol fiyatlarını ciddi bir şekilde etkilemiştir [12]. Asya'da ise sınırlı sayılabilecek alanlarda çiftçiler tarafından şeker kamışı üretimi gerçekleştirilmektedir. Örneğin Hindistan'da yaklaşık 7 milyon çiftçi sadece birkaç km^2'lik bir alanda şeker kamışı üretimi gerçekleştirmektedir [13].

Avrupa Birliği ülkelerinde ise biyoetanol üretimi için sakkaroz içerikli materyal olarak şeker kamışı değil pancar melasları kullanılmaktadır [9]. Şeker pancarı ürünleri çoğu EU-25 ülkelerinde yetiştirilmekte olup, hektar başına buğdaya nazaran daha çok biyoetanol verimi sağlamaktadır [14]. Şeker pancarı kullanımının başlıca avantajları ise üretimde toprağın nadas süresinin kısa oluşu, daha yüksek biyoetanol verimi sağlanması, iklim değişikliklerine olan toleransı, üretimde daha az su ve gübre gerektirmesidir.

Türkiye'de ise etil alkol, şeker üretimi sonrası şeker pancarından arta kalan atıkların (melas) fermante edilmesiyle üretilmektedir. Öte yandan sorgum kuraklığa dayanıklılığı ile bilinen önemli tarım ürünlerden birisidir ve enerji üretimi açısından potansiyel vaad etmektedir.

1.1.2. Nişastalı Materyaller

Biyoyakıt eldesi için kullanılabilen bir diğer hammadde kaynağı ise nişasta içeriğine sahip materyallerdir [15]. Nişasta bir biyopolimer olup, sadece tek bir monomerden (D-glikoz) meydana gelmektedir [16].

Nişasta uzun zincirli glikoz moleküllerinden oluşmakta ve bu yapının fermante edilebilir şekerlere dönüşümü için çeşitli hidroliz teknikleri uygulanabilmektedir. Nişastanın fermante edilebilir şekerlere dönüşümü, nişastanın suyla reaksiyonunu kapsayan hidroliz işleminden geçmektedir [15]. Enzimatik ve asit hidroliz işlemleri uygulanarak da hidroliz işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Nişastanın yüksek sıcaklıklarda amilaz enzimiyle hidrolizi endüstriyel olarak sıvılaştırma adıyla bilinmektedir. Bu noktada nişastanın hidrolizini etkileyen faktörler substrat, enzim aktivitesi ve reaksiyon koşulları (sıcaklık ve pH gibi diğer parametreler) olarak ortaya çıkmaktadır. Nişasta bazlı biyoetanol endüstrisi 30 yıldır varlığını sürdürmekte olup,

bilimsel çalışmalar ve teknolojik gelişmeler sonucunda enzim verimliliğinde sağlanan iyileşmelere ek olarak maliyetlerin düşürülmesi ve işlem süresinin kısaltılması biyoetanol eldesindeki verimliliği artırmıştır [17]. Nişastalı materyallerden biyoetanol eldesinde maliyeti artıran en önemli etkilerden biri *Saccharomyces cerevisiae* mayasının nişastalı materyallerde tek başına etkin olamaması ve bu etkinliği artırmak adına amilolitik enzimler (glukoamilaz, amilaz) kullanım zorunluluğu; diğeri ise nişastalı materyallerin daha yüksek biyoetanol verimi için pişirmede yüksek sıcaklıklar gerektirmesidir (413-453 K) [18]. Yakın bir zamanda Mojoviç ve arkadaşları [19] mısır unundaki iki kademeli enzimatik hidroliz (α-amilaz ve glukoamilaz) ardından oluşan hidrolizatlarını *Saccharomyces cerevisiae* mayasıyla fermante ederek biyoetanol elde etmişler ve daha düşük sıcaklıklarda (305 K) 4 saatlik reaksiyon sonucunda biyoetanol veriminin %80'den fazla olduğu gözlemlemişlerdir.

1.1.3. Lignoselülozik Biyokütle

Bütün lignoselülozik biyokütleler üç ana polimerden meydana gelmektedir [20], [21]. Selüloz $(C_6H_{10}O_5)_n$, hemiselüloz $(C_5H_8O_4)_n$ ve lignin $[C_9H_{10}O_3)\ (OCH_3)_{0,9\text{-}1,7}]_n$.

Selüloz lignoselülozik biyokütlenin en temel bileşeni olup hücrelerin direnç değerinden sorumludur ve odunun yaklaşık % 40-50'sini meydana getirmektedir [22]. Glikoz birimlerinin β-1,4 bağı ile birbirine bağlanmasıyla selüloz yapısı meydana gelir. Binlerce glikoz biriminin bir araya gelerek oluşturdukları polimer yapıya selüloz zincirleri denir. Selüloz zincirleri yapısında bulunan hidroksil gruplarının hidrojen bağları oluşturup bir araya gelmesiyle de selüloz fibrilleri oluşmaktadır [20]. Bitkilerin selüloz miktarları temel olarak hücre çeper yapısına bağlı olup türler arasında farklılık göstermekle birlikte bitkinin yaşı ve kısımları gibi faktörler de bitkilerin selüloz içeriklerini etkilemektedir.

Hemiselülozlar, 5-karbonlu, 6-karbonlu şekerler ve üronik asitlerinden meydana gelen polimerlerdir. Bitkilerin hemiselüloz yapılarını bitkilerin türü ve dokusu belirler. Ksilanlar selülozik olmayan polisakkaritlerdir ve en fazla yapraklı ağaç odunlarında bulunurlar. Ksilan zincirlerinin yaklaşık %80'i ksilozdan meydana gelmekte olup ana zincire bağlı arabinoz, ksiloz ve galaktoz yan dallarıyla da karşılaşmak mümkündür [23]. Bu durumun aksine hiçbir dallanmış yapı bulundurmayan lineer ksilanlar da bulunmaktadır [24]. Glukomannanlar ve galactoglukomannanlar ise iğne yapraklı ağaçlarda ana hemiselüloz bileşenleri olarak bulunmaktadırlar, ayrıca iğne yapraklı

ağaçlar az miktarda ksilan da bulundurmaktadırlar. Selülozdan sonra ikinci en önemli odun polisakkkaritleri olan hemiselülozlar lignoselülozik biyokütlenin yaklaşık %30'unu meydana getirirler [25]. Odun dışı bitkilerde bu durum farklılık gösterebilmekte ve hemiselüloz oranı selüloza nazaran daha yüksek olabilmektedir. Öyle ki hemiselüloz içeriği buğday sapı, mısır sapı, mısır koçanı, pirinç sapı ve şeker kamışı gibi tarımsal artıklarda %40'lara ulaşabilmektedir [26]. Odunsu bitkilerde arabinoz toplam pentozun sadece %2-4'ünü meydana getirirken, bu oran otsu bitkilerde %10-20'lere ulaşabilmektedir. Mısır liflerinde bu oranın %30-40'lara ulaşabileceği saptanmıştır.

Lignin, lignoselülozik materyal içerisinde holoselülozlardan sonra hücre çeper yapısında en fazla bulunan bileşendir. Dallanmış fenolik bir yapıda olan lignin tüm vaskular bitkilerin hücre içi duvarında bulunmaktadır. Yapraklı ve iğne yapraklı ağaç odunlarının lignin içerikleri %20-40 oranları arasında iken bu oran otsu bitkilerde %10-20 arasında sınırlanmaktadır [27]. Lignin polimerinin yapıtaşları koniferil alkol, p-kumaril alkol ve sinapil alkol olarak adlandırılan birimlerden oluşmaktadır. Bu birimler kendi aralarında birçok tipte bağlantı yaparak lignin polimerini meydana getirmektedir. Ligninin yapısı ve miktarındaki belirgin farklar bitki tür ve grupları arasındaki farklılıktan oluşturmakta olup bitkinin yaş ve kısımlarına göre de farklılık gösterebilmektedir. Otsu bitkilerde lignin içeriği %15-26 arasında değişmektedir. Lignin hücre çeperinde bulunan diğer bileşenlerle de bağ oluşturabilmektedir. Polisakkaritler ve proteinler ile kurduğu bağlar karmaşık üç boyutlu ağlar oluşturmakta ve karbonhidratlar ve fenolik bileşikler arasındaki oluşan bu bağlar direnç artırarak liflerin bireysel hale getirilmelerini güçleştirmektedir.

1.2. BİYOETANOL ÜRETİM İŞLEMLERİ

Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol eldesi dört kademeden meydana gelmektedir: ön muamele, hidroliz, fermantasyon ve ürünlerin ayrılması/distilasyon. (Şekil 1.1).

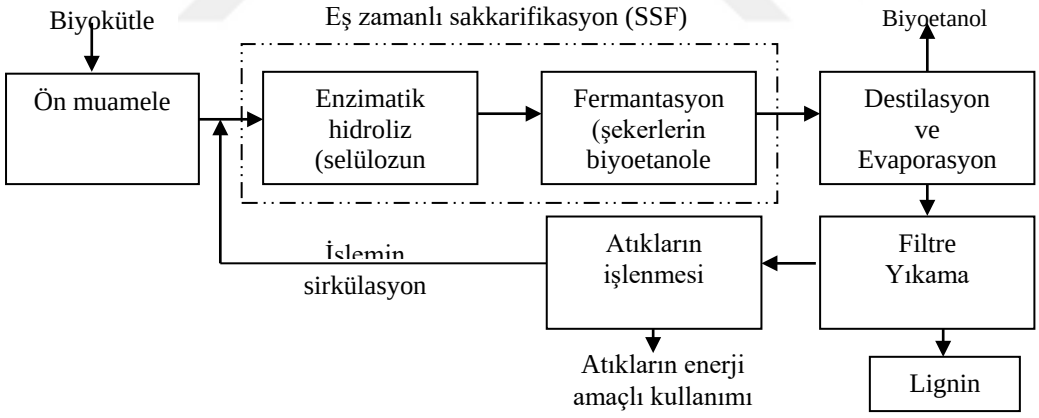
1.2.1. Ön İşlemler

Biyoetanol üretiminde ilk adım boyutlandırma ve ön işlemdir [28]. Ön işlem, selülozik biyokütlenin fiziksel ve kimyasal yapısını değiştirerek enzimler açısından daha kolay ulaşılabilir bir yapıya dönüştürmesi ve karbonhidratların fermante edilebilir şekerlere ve selülaz üretici mikroorganizmalara dönüşümünü kolaylaştırması sebebiyle selülozun

dönüşümünde en önemli adım olarak kabul edilir [29], [30]. Ön işlemin başarılı olabilmesi için: şekerlerin formasyonu artırılmalı veya şekerler bir sonraki hidroliz adımı daha için uygun bir yapıya dönüştürülebilmeli, karbonhidratların degradasyonu ve kaybı önlenmeli, hidroliz ve fermantasyon aşamalarında yan ürün inhibitörlerinin oluşumu önlenmeli ve maliyet olumsuz etkilenmemelidir.

Ön işlemin en temel amacı asit veya enzim katalizörlü hidroliz uygulamalarının etkisini artırmak ve lignoselülozik yapının fiziksel bozulmasına katkı sağlamaktır. Ön işlem sonraki basamakların etkinliği üzerinde etkili olmanın yanı sıra yöntemin ekonomikliğini de kayda değer bir şekilde etkilemektedir [17]. Karbonhidratların biyoetanole dönüşüm sürecinde maliyet ve süreç açısından en belirleyici faktörün ön muamele işlemleri olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Biyoetanol üretim sürecinde etkili olan faktörler ve bu faktörlerin geliştirilmesi üzerine yürütülen çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmıştır [31].

Ön işlemler; mekanik [32], buhar patlatılması [33], [34], amonyak lif patlatılması [35], [36], süperkritik CO_2 muamelesi [37], alkali veya asit ön işlemi [38], [39], ozon ön işlemi [36] ve biyolojik ön muamele [30] işlemlerini kapsamaktadır.



Şekil 1.1. Biyokütleden biyoetanol üretiminde kullanılan prosesler [11]

Çizelge 1.2'de çeşitli ön muamele işlemleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Aşağıda ön muamele işlemlerinden bazıları hakkında detaylı bilgi verilecektir.

1.2.2. Buhar Patlatılması (Otohidroliz)

Biyokütlenin boyut küçültülmesinde uygulanan işlemlerden biri buhar patlatılmasıdır. Yöntem buhar patlaması, sulu ayırma ve sıcak su sistemlerini kapsamaktadır. Buhar patlatılması Kanada'daki Stake Teknoloji Ltd. tarafından geliştirilmiş olup, yüksek

sıcaklık ve basınçta biyokütlenin ekstrüzyon işlemini kapsamaktadır.

Çizelge 1.2. Ön muamele yöntemleri (lignin uzaklaştırıcı ve hemiselülozları hidrolize edici) [40].

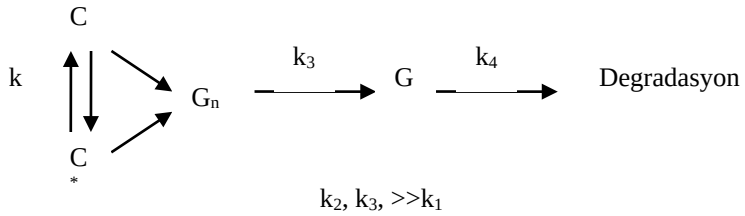
Ön muamele metodu	Kimyasallar	Sıcaklık/ basınç	Reaksiyon süresi (dak.)	Ksiloz verimi (%)	Aşağı yönde enzimatik etki	Maliyet
Seyreltik asit hidrolizi	Asit	433 K	2-10	75-90	<%8	+
Alkali hidrolizi	Baz			60-75	%55	++
Katalizlenmemiş buhar patlatılması	-	433-533 K	2	45-65	%90	-
Asit katalizörlü buhar patlatılması	Asit	433-493 K			%88 (2 adım)	-
Amonyak lif patlatılması	Amonyak	363 K	30		%50-90 (2 adım)	
CO_2 patlatılması	CO_2	5.2 bar			%75 (2 adım)	

Buhar patlatılmasıyla, hemiselülozun degradasyonu ve çözülebilirliği kısa reaksiyon süresi, yüksek sıcaklık (270°C, 1 dk.) ya da uzun reaksiyon süresi, düşük sıcaklık (190°C, 10 dk.) işlemleriyle yapılabilir [41]. Uygulama bitiminde serbest bırakılan basınç materyalde fazla kayıp yaratmadan lifleri bireysel hale dönüştürebilmektedir. Uygulamada sıcak su buharı lignoselülozik yapı içerisine nüfuz etmekte ve hemiselüloz hidrolizine katkıda bulunarak asitlerin hemiselülozdan ayrılmasını sağlamaktadır [17].

Buhar patlatılması ön muamelesi boyunca reaksiyonlarda oluşan asetik asit ve diğer asitlerin hidrolize katkı sağladıkları varsayılmaktadır. Buhar patlatılması Şekil 1.2'de gösterildiği gibi ard arda meydana gelen reaksiyonları ve bu reaksiyonların sonucunda oluşan kimyasal etkileri kapsamaktadır.

Bunun yanısıra, daha yüksek şeker verimi elde etmek amacıyla buhar ön mumalesine ek olarak H_2SO_4 ve SO_2 gibi katalizörlerin de kullanıldığı modifiye yöntemler de bulunmaktadır. Ön muamele aşamasında kullanılan asit katalizörü hemiselüloz şekerlerinin kazanımını olumlu yönde etkilemekte ve katı fraksiyonun enzimatik hidrolizini artırmaktadır. Asit katalizörlü buhar ön muamelesi ve asit hamur üretimi birbirlerine benzeseler de asit katalizörlü buhar ön muamelesinin sıvı içeriği nispeten daha düşüktür [42]. H_2SO_2'nin buhar ön muamelesinde katalizör olarak kullanımı

hemiselüloz bazlı şekerlerin geri kazanımını artırmakta buna ek olarak selülozun enzimatik hidroliz öncesi istenilen geçirgenliğini oluşturabilmektedir [43]. Ön muamele işlemleri sadece tek adımda değil kademeli olarak da gerçekleştirilebilmektedir. Optimize edilmiş asit katalizörlü buhar ön muamelesi koşulları Çizelge 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Buhar patlatılması ön muamelesinde oluşan adımların şematik gösterimi.

"Kristalin © ve amorf selüloz (C^*) arasındaki dönüşüm tersinirdir. Her ikisi de oligosakkaritlere ve devamında glukoza dönüşebilir. Glikoz (G) degradasyonunu daha sonrasında fermantasyon inhibitörlerini oluşturmak için meydana gelebilir. K denge sabiti ve k ise oransal sabittir [29]."

Çizelge 1.3. Optimize edilmiş asit katalizörlü buhar ön muamelesi koşulları [12].

2-KADEMELİ ÖN MUAMELE		TEK ADIMLI ÖN MUAMELE
1. adım	2. adım	-
453 K, 10 dak., H_2SO_4 (%0.5)	473 K, 2 dak., H_2SO_4 (%2)	498 K, 5 dak., H_2SO_4 (%3.5)
463 K, 2 dak., SO_2, (%3)	493 K, 5 dak., SO_2, (%3)	483 K, 5.5 dak., SO_2, (%3.5)

Lignoselülozik hammaddeler üzerine buhar patlatılmasının etkileri özetlenecek olursa [44]: selülozun amorf kısımlarını kristalleştirerek, selülozun kristalinitesini arttırır, hemiselülozların hidrolize edilebilirliğini artırır ve delignifikasyonu artırır. Buhar patlatılmasının en önemli avantajı ise mekanik liflendirme ile kıyaslandığında nispeten daha düşük enerji tüketimi gerektirmesine ek olarak geri dönüşümsel ve çevresel anlamda ortaya çıkabilecek maliyetleri azaltması olarak gösterilebilir. Bu yöntem yapraklı ağaç odunları ve tarımsal atıklar üzerine maliyet bakımından etkili olabilir; fakat iğne yapraklı ağaç odunları için aynı durum geçerli değildir [12].

1.2.3. Asit Ön Muamelesi

Asit ön muamelesi lignoselülozik materyalden yüksek verimlerde şeker üretimini amaçlamaktadır [45]. Asit ön muamelesinin sülfürik asit [46], hidroklorik asit [47], perasetik asit [48], nitrik asit [49] ve fosforik asit [50] gibi varyasyonları bulunmaktadır. Asit ön muamelesinde selülozu hidrolize etmek için seyreltik veya konsantre asitler

kullanılabilir [45]. Bütün ön muamele metotları arasında en çok kullanılan metot seyreltik asit ön muamelesidir [51]–[53].

Seyreltik asit ön muamelesi genellikle iki şekilde uygulanır. Bunlar: düşük katı madde oranı (%5-10 w/w) ve yüksek sıcaklıktaki (T>433 K) sürekli sistemler ve yüksek katı madde oranı (%10-40 w/w) ve düşük sıcaklıktaki (T<433 K) kesintili sistemlerdir. Bu iki sistem kıyaslandığında yüksek sıcaklık ve reaksiyon süresi ile uygulamada çözülebilir ksilozların miktarının ve selülozların enzimatik yoldan sindirilebilirliğinin arttığı belirlenmiştir [53]. Örnek bir uygulamada, mısır hammaddesi için daha ortalama sıcaklık derecelerinde seyreltik asit ile ön muamelenin ardından enzimatik olarak fermante edilebilir şekerlere dönüşümün %85-100 verimle gerçekleştiği belirlenmiştir [55].

Hemiselülozun hidrolizi veya selülozun enzimatik hidrolizi amacıyla son yıllarda çoğunlukla tercih edilen uygulama ise seyreltik sülfürik asit ön muamelesidir [29].

1.2.4. Alkali Ön Muamelesi

Alkali ön muamelesi, diğer ön muamele metotlarına nazaran çok daha düşük sıcaklık ve basınç değerlerine gereksinim duymaktadır. Alkali ön muamelesinin en büyük avantajı çevre koşullarında uygulanabilirlik olarak gösterilebilir fakat ön muamele süresi diğer metotların aksine saat ve günler olarak belirtilmektedir. Alkali ön muamelerde bazı alkalilerin ön muamele esnasında biyokütle içerisinde tuz olarak yerleşmeleri veya geri dönüşümü olmayan tuzlara dönüşmeleri yöntemin uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır [54]. Alkali ön muamelesinin en önemli özelliği kullanılan alkalinin diğer bileşenler üzerinde büyük etkiler oluşturmadan lignini uzaklaştırabilme yeteneğine sahip olmasıdır [25]. Alkali ön muamelesinde çoğunlukla seyreltik NaOH tercih edilmektedir [45]. NaOH muamelesi lignoselülozik biyokütlenin şişmesine, iç yüzey alanının artmasına, kristallik derecesinin düşüp lignin yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Seyreltik NaOH muamelesi ekonomik ve çevresel faktörler hesaba katıldığında konsantre NaOH muamelesine kıyasla daha uygundur. Seyreltik NaOH muamelesi diğer ön muamele işlemleri ile birleştirildiğinde verimin çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

1.2.5. Biyolojik Ön Muamele

Biyolojik ön muamele işlemi, lignoselülozik biyokütlenin lignin içeriğini azaltmak amacıyla mantarların kullanılmasını kapsar. Biyodelignifikasyon olarak da adlandırılan

bu metotda, biyokütle içerisindeki ligninin mikroorganizmalar tarafından biyolojik degradasyonu ifade edilmektedir. Bu yöntem 1980'li yıllarda ortaya atıldığında maliyet gereksinimlerinin yüksek oluşu, muamele süresinin çok uzun olması, bazı yönleriyle yetersiz olması ve mikroorganizmaların lignin türevlerince zehirlenebilir yapıda olması gibi nedenlerle yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamakla beraber gelecekte daha etkin bir yöntem olabileceği düşünülmektedir [40]. Bu ön muamele metodu kolay olmasının aksine elde edilen verim düşük ve delignifikasyon oranı oldukça yavaştır.

1.3. HİDROLİZ

Hidroliz biyokütleden biyoetanol eldesinde gerekli olan ikinci adımdır. Ön muamele işleminin hemen sonrasında uygulanan bu yöntem su molekülünün selüloz ile reaksiyona girip glikoz birimlerinin bireysel hale gelmesi ile tanımlanabilir [11].

$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$ reaksiyonunda görüldüğü üzere seyreltik asit, konsantre asit veya enzim (selülaz) aracılığıyla selüloz katalizlenir. Son yıllarda selülozun hidrolizi üzerine yapılan çalışmalar günden güne artmıştır. Geliştirilen yöntemler çoğunlukla laboratuvar ortamlarında gen haritalarıyla oynanmış selülolitik enzimleri veya sülfürik asit konsantrasyonlarının farklı varyasyonlarını hidroliz amacıyla kullanmaktadır. Bu uygulamalar kıyaslanacak olursa: enzim kullanımı yüksek yatırım maliyeti ve süre gerektirmekte buna karşılık sülfürik asit kullanımı nispeten daha ucuz ve kısa olmasına karşın uygulamada yüksek sıcaklık derecelerine gereksinim duymaktadır. Bu durum sülfürik asit kullanımında en önemli dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır [56].

Buna ek olarak, lignoselülozik biyokütlenin gama ışını, elektron ışın radyasyonu veya mikrodalga radyasyonu yoluyla da hidroliz edilebildiği yöntemler mevcuttur [57], [58]. Lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi saf selüloza oranla oldukça karmaşıktır. Bunun sebebi lignin ve hemiselüloz gibi glukan harici yapılar bulundurmasıdır [59].

1.3.1. Asit Hidrolizi

Asit hidrolizi, selülozun hidrolizi için katalizör olarak asitin kullanıldığı karmaşık ve heterojen bir reaksiyon zinciridir. Asit hidrolizinde monosakkaritlerin yoğun degradasyonu hidroliz sırasında arzu edilmeyen kimyasalların oluşumuna sebebiyet verebilmektedir. Uygulanan asidin biyokütleye nüfuzu muamele sırasında meydana

gelmesi mümkün olan yan reaksiyonların sayısını önemli bir biçimde etkilemektedir. Lignoselülozik biyokütlenin asit ile hidrolizinde lignin ve selüloz yapılarının değişmeden kalmasına karşın ksilanın ksiloza dönüştürüldüğü belirtilmektedir. Bu durum ksilanın selüloza oranla daha fazla amorf yapıda olması ve bu dallanmış yapının asit muamelesine daha dayanıksız olması ile açıklanabilir [60]. Asit hidrolizi, seyreltik ve konsantre asit hidrolizi olmak üzere yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.3.2. Seyreltik Asit Hidrolizi

Selüloz biyokütlesini biyoetanole dönüştürmede bilinen en eski yöntem seyreltik asit hidrolizidir [28]. Seyreltik asit hidrolizinde hemiselülozlar, selüloz fraksiyonlarına oranla çok daha düşük sıcaklıklarda depolimerize olmaktadır. Bu yöntemde hemiselülozdan ksiloz veya diğer şekerleri elde etmek amacıyla seyreltik asitle biyokütle muamele edilmektedir [31]. Seyreltik asit uygulamaları kesintisiz kazanlar kullanılarak yüksek sıcaklıklarda (yaklaşık 488 K) %1 sülfürik asit konsantrasyonunda gerçekleştirilmektedir [28]. Seyreltik asit uygulamalarında elde edilen şeker verimleri yaklaşık %50 ile sınırlı kalmaktadır [61]. Yüksek oranlarda seyreltik asit kullanımının selülozun kristalin bölgelerini azalttığı ve glikozu degrade ettiği gözlemlenmiştir [45]. Seyreltik asit hidrolizi kademeli olarak iki aşamada uygulanmaktadır. Bunun sebebi selüloz ve hemiselüloz yapıları arasındaki farklılıklardır. Birinci aşamada düşük sıcaklıklarda hemiselülozun hidrolizini amaçlanırken, ikinci aşamada yüksek sıcaklıklarda biyokütlenin selüloz kısmının hidrolizi gerçekleştirilir [62], [63]. Seyreltik asit yönteminin hızlı reaksiyon oranı ve kesintisiz işlemin mümkün olması en önemli avantajı olmakla birlikte düşük şeker verimleri ile sonuçlanması en büyük dezavantajı olarak kabul edilebilir. Ayrıca kesintisiz yöntemlerde biyokütleye daha iyi asit nufüzu için hammaddenin boyutlarının istenilen düzeyde küçültülmesi önemlidir [61].

1.3.3. Konsantre Asit Hidrolizi

Konsantre asit yönteminde, selüloz ve hemiselülozların hızlı bir şekilde monomerlerine ayrılması amaçlanmaktadır. Şeker veriminin optimizasyonu ve uygulama sonrası asit geri kazanımının en etkin biçimde gerçekleştirilebilmesi yöntemin ekonomik açıdan uygulanabilirliğini sağlamak ve uygulama maliyetlerini düşürmek amacıyla gerekli olan başlıca faktörlerdir [57], [63]. Konsantre asit yönteminde uygulanan sıcaklık seyreltik asit yöntemine oranla daha düşük aksine reaksiyon süresi daha uzundur [28]. Bu

yöntemde biyokütle reaktör içerisinde %70'lik sülfürik asitle 313-323 K arası sıcaklık derecelerinde 2-4 saat arası muamele edilmektedir. Hidroliz işlemi sonrası şekerlerin ayrılması materyalin yıkanmasıyla sağlanmaktadır. Sonraki aşamada ise yıkama sonrasında kalan kısımdan su uzaklaştırılmasının ardından %30-40 sülfürik asit ile 373 K sıcaklıkta 50 dakika boyunca ıslatılarak selüloz fraksiyonlarının depolimerize olması amaçlanır [31].

1.3.4. Enzimatik Hidroliz

Uygulanan bir başka hidroliz metodu ise enzimatik hidrolizdir. Enzimatik hidroliz işleminin temel prensibi, kullanılan enzimlerin bitki proteinlerinde kimyasal reaksiyonlara sebep olması ve bu reaksiyonlar sonucu hidrolizat eldesidir. Lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizi hammaddenin yapısı ile doğrudan alakalıdır. Enzimatik hidroliz yoluyla lignoselülozların glukan içeriğinin sadece %20'si (wt) çözülebilir hale getirilebilirken, ön muamele işlemleri sayesinde enzimatik etkinin artırılabileceği belirtilmiştir. Optimum şartlarda gerçekleştirilen ön işlemlerde selülozun neredeyse tamamı korunmakta ve bu durum enzimatik hidrolizin verimini kayda değer bir oranda artırmaktadır [59]. Selülaz enzimlerinin kullanım sonrası geri kazanımını ve tekrar kullanımını gerçekleştirebilmek şu an sahip olduğumuz bilgi birikimi ve teknoloji ile zordur. Günümüzde selülaz aktiviteleri ve adsorbsiyonları adına elimizde olan veriler eksik ve yetersizdir.

Selülozun enzimatik hidrolizinde kullanılan enzimler endo-glukonazlar ya da endo-1,4-β-glukanazlar (EG), ekzoglukanazlar ya da sellobio hidrolazlar (CBH) ve β-glukosidazlardır (BGL) [64], [65]. Yukarıda bahsi geçen bu enzim türleri içinde en etkin tür EG enzimleridir, bu enzim selüloz zincirini indirgenebilir uçtan başlayarak değil de her yerinden düzensiz koparak degradasyon etkisini artırır [66]. EG selüloz zincirinde duyarlı olan intra moleküler β-1,4 glikozidik bağları hidrolizlerken, ekzo-glukonazlar çözülebilir sellobioz veya glikoz kısımlarını serbest bırakmak amacıyla selüloz zincirlerini uç noktalarından koparırlar. BGL ise sellobioz inhibisyonunu engelleyip sellobiozun glikoza hidrolizini katalizleyerek hidroliz işlemini tamamlar [64], [67]. Lignoselülozik materyallerin hidrolizi için kullanılan selülaz enzimi bakteriler ve mantarlar tarafından üretilebilmektedir. Bu mikroorganizmalar aerobik ya da aneorobik, mezofilik ya da termofilik olabilirler. *Erwinia, Bacteriodes, Cellulomonas, Clostridium, Acetovibrio, Bacillus, Ruminococcus, Streptomyces, Thermomonospora,* ve

Microbispora sınıfına ait bakteriler selülaz üretebilmektedirler [68].

Selülaz ve hemiselülaz enzimleri temel olarak filamentli mantarlar tarafından üretilmektedir. Yapılan çalışmalarda dayanıklı olan kristalin selülozunu degrade etme yeteneği en yüksek türlerin *Trichoderma sp*. ve ailesi (*T. reesei, T. viride, T. logibrachiatum*) olduğu saptanmıştır [69]. Ksilan degradasyonunu kapsayan enzimler ve etki mekanizmaları Çizelge 1.4'de gösterilmektedir. Ksilanların ana zincirinde endo-ksilanaz etkili olmakta iken ksilooligosakkaritlerin ksiloza hidrolizinde β-ksilosidaz enzimi etkili olmaktadır. Ksilan ana zincirinden arabinozu α-L-arabinofuranosidaz, 4-O-metil glukouronik asit yan dallarını ise α-glukouronidaz enzimi uzaklaştırmaktadır.

Kademeli ksilan degradasyonunun yanında ksilanı tamamen parçalayan enzim sistemleri de mevcuttur ve *Talaromyces emersoni* ve *Penicillium capsulatum* gibi birçok tür bu enzimlere sahiptir [70].

Ksilanaz enzimlerinin çoğu dallanmış ksiloz üniteleri arasındaki glikosidik bağları koparmada etkisizdir. Ksilan ana zincirinin hidrolizinden önce yan dalların yapıdan koparılması gerekmektedir [71]. Öte yandan ksilooligosakkaritlerden yan zincirleri koparabilen sadece birkaç enzim türü mevcuttur. Bu enzimlerin etkili olabilmesi için yan dalların koparılmasından önce ksilan ana zincirinin kısmi hidrolizine ihtiyaç duyulmaktadır [72]. Selüloza oranla daha karmaşık bir yapıda olan ksilanın hidrolizi daha komplex olmasına rağmen, selüloz gibi kristal ve uzun polimerize bir yapı göstermediğinden dolayı enzimatik hidroliz için daha uygundur [73].

Mısır lifleri yapılarında %15 selüloz ve %35 hemiselüloza ek olarak %20 nişasta bulundururlar [75]. Yapılan çalışmalar sonucunda edinilen veriler mısır liflerinden elde edilen hemiselülozları monomerik şekerlere verimli bir şekilde dönüştürebilen hiçbir ticari hemiselülaz enziminin olmadığını göstermiştir. Fakat nişasta ve hemiselülozun seyreltik asit ön muamelesinden arta kalan selüloz herhangi bir enzim ile glikoza dönüştürülebilir. Bu metot mısır liflerinin seyreltik asit ile ön muamelesini (%15 katı madde w/v, %0.5 H_2SO_4 v/v, 121 ^{0}C, 1 sa., pH 5.0) ve sonrasında ön muamele görmüş liflerin ticari selülaz ve β-glukosidaz enzimleriyle sakkarifikasyonunu kapsamakta olup, elde edilen şeker verimi %85-100 arasında değişmektedir. Uygulanan bu yöntemde fermantasyonu sağlayan mikroorganizmaları inhibe edici olarak kabul edilen furfural ve HMF gibi yan ürünler oluşmaz. Bu sebeple seyreltik asit ön muamelesi enzimatik sakkarifikasyon sırasında selülozun fermante olabilen şekerlere daha iyi bir şekilde

dönüşümüne katkıda bulunmak ve enzimatik hidroliz esnasında inhibitör bileşiklerinin oluşumunu engellemek adına nispeten düşük sıcaklıklarda uygulanır.

Çizelge 1.4. Heteroarabinoksilanların hidrolizini kapsayan enzimler [74].

ENZİM	ETKİ
Endo-ksilanaz	Özellikle ksilan ana zincirinde iç kısımlardaki β-1,4-ksiloz bağlarını hidrolize eder
Ekzo-ksilanaz	Ksilobioz'u serbest bırakarak β-1-4-ksilozu hidrolize eder
β-ksilosidaz	Ksilobiozdan ve kısa zincirli ksilooligosakkaritlerden ksilozu serbest bırakır
α-arabinofuranosidaz	Arabinoksilanlardan indirgen olmayan terminal α-arabinofuronozları hidrolize eder
α-glukouronidaz	Glukouronoksilanlardan glukouronik asitleri uzaklaştırır
Asetil ksilan esteraz	Asetil ksilanlardaki asetil ester bağlarını hidrolize eder
Ferulik asit esteraz	Ksilanlardaki ferulolik ester bağlarını hidrolize eder
p-kumarik asit esteraz	Ksilanlardaki p-kumarik ester bağlarını hidrolize eder

Enzimatik işlem asit veya alkali hidroliz işlemleriyle kıyaslandığında daha ılımlı koşullar altında (pH 4.8 ve sıcaklık 318-323 K) gerçekleştirilir ve muamele işlemi gerçekleştirilen ekipmanda korozyon gibi sorunlara yol açmaz [68]. Asit katalizörlü hidroliz işlemlerine kıyasla daha çok verim sağlaması nedeniyle enzimatik hidroliz işlemi daha fazla tercih edilmektedir [76].

1.4. FERMANTASYON

Yukarıda bahsi geçen ön muamele işlemleriyle elde edilmiş (çoğunlukla asit ön muamelesi) ve hidrolize olmuş hidrolizatlar çoğunlukla maya gibi mikroorganizmalar ile fermante edilirler. Glikoz haricinde ksiloz, arabinoz, galaktoz, mannoz ve oligosakkaritleri de içermekte olan bu lignoselüloz hidrolizatları fermante etmek için kullanılacak mayaların tüm bu şeker gruplarını verimli olarak fermante edebilmesi gerekmektedir [77]. Aşağıda belirtilen tepkime denklemlerine bağlı olarak glikoz ve ksilozdan kilogram başına elde edilebilen maksimum teorik verim 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg CO_2'dir [11], [40].

$$3C_5H_{10}O_5 \rightarrow 5C_2H_5OH + 5CO_2$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Fermantasyon prosesinde kullanılan bazı organizmalar fermante edilebilir şeker

gruplarını besin kaynağı olarak görmekte, bunun sonucunda etil alkole ek olarak bazı yan ürünler meydana gelebilmektedir. Bu mikroorganizmalar temel olarak glikoz gibi 6-karbonlu şekerleri tüketme eğilimindedirler. Bu sebeple glikoz içeriği yüksek olan selülozik materyallerin biyoetanole dönüşümü nispeten daha kolaydır. Bunun yanısıra biyokütleden elde edilen şekerlerin çok az bir miktarını biyoetanole dönüştürebilen ve etanolojenler olarak adlandırılan mikroorganizmalar da belirlenmiştir. Bu durumun aksine önemli miktarlarda biyoetanol üretimine imkan tanıyan mikroorganizmalar da (%1 w/v'den fazla) bulunmaktadır [78].

Yakın gelecekte fermantasyon amacıyla daha fazla öneme sahip olacağı düşünülen etanolojenik bakteriler ise, *Klebsiella oxytoca, Escherichia coli* ve *Zymomonas mobilis* türleridir [79]. *Z. mobilis* bakteri türlerinin glikoz bazlı hammaddelerden hızlı ve etkin bir şekilde biyoetanol üretme kapasitesine sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirtilmiştir. *Z. mobilis* glikoz fermantasyonunda %97'den fazla biyoetanol verimi ve %12 (w/v)'den fazla biyoetanol konsantrasyonu sağlamaktadır [80]. Glikoz ve fruktoz gibi heksoz şekerlerden etkili bir şekilde biyoetanol üretebilen *Z. mobilis* pentoz şekerleri üzerinde aynı etkiye sahip değildir. Ayrıca *Z. mobilis* üzerine yürütülen güncel çalışmalarda ise gen haritalarıyla oynanarak bakterinin şeker çevirim kapasitesinin artırılması dolayısıyla elde edilen etanol veriminin artırılması amaçlanmaktadır. Mayalar, filamentli mantarlar ve bakteriler arasında ksiloz fermante edici mikroorganizmalar da mevcuttur [42]. Doğal ve genetik olarak oluşmuş olan bu ksiloz fermante edici bakteriler eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon yapabilmektedirler (Çizelge 1.5) [81]

Ksiloz fermante edici bir bakteri türü olan *E .coli* ise son yıllarda fermante amaçlı tercih sebebidir [42]. Glikoz, fruktoz ve sakkarozdan biyoetanol eldesi sağlayabilen *Z. mobilis* bazı avantajlarına rağmen istenilen düzeyde yeterli olamamaktadır. Fakat son yıllarda NRRL (Enerji Departmanı, USA)'de yürütülen bazı çalışmalar ksiloz ve arabinoz fermante edici türlerin varlığını ortaya koymuştur [79]. Etanolojenik türler olan *K. oxytoca ve E. coli* ise arabinozu hiçbir modifiye sisteme ihtiyaç duymadan doğal bir şekilde metabolize edebilen bakteriler olup tüm lignoselüloz bazlı şekerleri fermante edebilmekle beraber [42] *Z. mobilis*'e oranla daha fazla şeker substratı üzerinde etkili olmaktadırlar [79].

Bakterilerle etanol fermantasyonunun sınırlı düzeyde gerçekleşmesi sebebiyle, özellikle 5-karbonlu şekerlerin fermante edilebilme özelliklerinin artırılmaya çalışılması

amacıyla son yıllarda bakteriler üzerine yapılan genetik çalışmalar hız kazanmıştır.

Çizelge 1.5. Ksilozu fermante etme kapasitesine doğal olarak sahip olan ve üzerinde çalışılan bakteri türleri [81].

TÜRLER	ÖZELLİKLERİ
Clostridium acetobutilicum	Ksilozun aseton ve bütanole fermantasyonunda başarılıdır, biyoetanol verimi düşüktür.
Clostridium thermocellum	Selülozu direkt olarak etanole ve asetik asite dönüştürme kapasitesine sahip, biyoetanol konsantrasyonları genellikle 5 g/l'den daha azdır.
Escherichia coli	Ksilozu doğal olarak biyoetanol, sukkinik ve asetik asite fermante etme kapasitesine sahip ancak etanol toleransı düşüktür, genetik olarak çalışılmış türleri genel olarak biyoetanol üretmektedir.
Klebsiella oxytoca	Ksiloz ve sellobiozu doğal olarak hızlı bir şekilde fermante edebilirler, selülozun fermantasyonu ve biyoetanol üretimi geniş bir şekilde çalışılmaktadır.
Lactobacillus pentoaceticus	Ksiloz ve arabinozu tüketir, glikoz ve sellobiozu yavaş yavaş kullanır, asetik asit ve laktik asit 1/1 oranında üretilir.
Lactobacillus casei	Laktozu çok iyi bir şekilde fermante edebilir.
Lactobacillus xylosus	Besin kaynağı gerekli olduğu durumda sellobiozu kullanır: n-glikoz, D-ksiloz ve L-arabinozu kullanmaktadır.
Lactobacillus pentosus	Homokatalitik fermantasyon sağlar, bazı alt türleri sülfit atık çözeltisinden laktik asit üretebilir.
Lactobacillus plantarum	Sellobiozu glikoz, ksiloz ve arabinozdan daha hızlı bir şekilde tüketir, pektinleri depolimerize etmiş gibi görünür, tarımsal atıklardan laktik asit üretir.
Zymomonus mobilis	Normal olarak glikoz ve fruktozu fermante eder, ksiloz fermantasyonu üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Fermantasyon işleminde yaygın bir biçimde kullanılan mikroorganizmalardan biri de mayalardır. *Saccharomyces cerevisiae*, 6-karbonlu şekerlerden biyoetanol üretiminde kullanılan en etkili maya türüdür; fakat bu maya 5-karbonlu şekerler olan ksiloz ve arabinozları etanole fermante etmede başarılı değildir. Ksilozu doğal yollarla fermante edebilen maya türleri de mevcuttur (*Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis ve Candida shehate*) [82]–[84]. Bu duruma ek olarak izomeraz enzimleri kullanılması suretiyle ksilozlardan ksiluloz elde edilip ksilulozda etanole dönüştürülebilirler [85], [86]; fakat bu yöntem yüksek maliyet gereksinimlerinden dolayı tercih edilmemektedir. Bir diğer 5-karbonlu şeker grubu olan arabinozlar ise hemiselüloz hidrolizatlarında hammaddeye bağlı olarak var olmaktadırlar ve sadece birkaç maya türü arabinozu etanole fermante etme yeteneğine sahiptir [87], [88]. Anlaşıldığı üzere hiçbir maya türü doğal olarak yapıdaki bütün şekerleri etanole fermante etme yeteneğine sahip değildir.

Fermantasyon işlemi üç sistemle yapılabilmektedir; kesintili, kesintisiz ve fed-batch. Optimum yöntemin belirlenmesi ise lignoselülozik hidrolizatın tipi, mikroorganizmaların kinetik özellikleri ve yöntemin ekonomikliği ile doğrudan bağlantılıdır. “Fed-batch” (besin ilavesi yapılan kesintili sistemler) fermantasyon reaktörleri kesintili ve kesintisiz yöntemlere oranla daha optimum sonuçlar verdiği için ticari ve endüstriyel anlamda kullanım alanı bulmuştur [89]. Fed-batch sistemi biyo-reaktörde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmak için uygulanır. Besin solüsyonu biyoreaktörün dilüsyonunu engellemek amacıyla genellikle konsantre halde uygulanır ve kontrollü olarak ilave edilen besin, kültür gelişimine direk olarak katkı sağlar. Kültürün gelişimini sınırlandıran genellikle glikoz olmakla birlikte, konsantre halde kültüre glikoz şurubu eklenmektedir (600-850 g/l). Kesintili sisteme oranla fed-batch sisteminin en büyük avantajı kültürün yaşam süresini ve hücre konsantrasyonunu artırmasının yanında yüksek konsantrasyonlara ulaşmak için ürünlerin kümelenmesine izin vermesidir [90].

1.5. ETANOL ELDESİ

Fermantasyon sonucunda elde edilen ürünlerin toplanması en az biyokütlenin hidrolizi ve fermantasyonu üzerine yapılan teknolojik gelişmeler ve ticari uygulanabilirlik çalışmaları kadar önemlidir. Fermantasyon sonucu oluşan ve çoğunlukla sudan daha uçucu olan ürünleri içeren süspansiyon halindeki materyalden etanol eldesi ticari olarak geliştirilmiş distilasyon teknolojisi ile yapılmakta ve oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [91]. Distilasyon sistemi, sıvı içerisinde bulunan biyoetanolün sudan ayrılmasına imkan tanımaktadır. İşlem görmemiş biyoetanol genel olarak %80’den fazla su içermektedir ve etanolü %95 üzeri konsantrasyonlara ulaştırmak gerekir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. HAMMADDE

Bu çalışmada hammadde olarak kullanılacak olan göl kamışları (*Phragmites australis*) Bolu ilinde bulunan Yeniçağa Gölü çevresinden temin edildi. Rutubet miktarları belirlenen örneklerden planlanan her bir uygulama için 500 gramlık (fırın kurusu) numuneler paketlendi. Kullanılacak olan *Saccharomyces cerevisiae* mayası Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Celluclast (50 FPU/ml) ve Novozym 188 (6360 nkat/ml) enzim karışımı ise AYS Laboratuvar Ürünleri Kimya ve Makine Ltd. Şti'den temin edilmiştir. *C. subvermispora* FP-90031-sp beyaz çürüklük mantarı ise USDA Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin'den temin edilmiştir.

2.2. ÖN MUAMELE

Ön muamele işlemi bu çalışmada biyolojik ve kimyasal işlemler olmak üzere gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. Kimyasal Ön Muamele

%1 (w/v) konsantrasyonlarında NaOH, H_2O_2, $NaBH_4$, B_2O_3 ve H_2SO_4 solüsyonları hazırlandıktan sonra 10g (fırın kurusu) ağırlığındaki numuneler %10 (w/v) katı madde oranı dahilinde hazırlanan kimyasallarla muamele edildi. İşlem 121 °C ve 15 psi (103.4 kPA) basınç altında 60 dakika süreyle otoklav içerisinde gerçekleştirildi. Ön muamele işlemlerinden sonra örnekler 750 ml sıcak deiyonize su ile yıkanarak filtre edildi. Kalan katı madde numunelerinde asitte çözünmeyen lignin ve şeker oranları enzimatik hidroliz işlemi öncesi belirlenmiştir. Numuneler daha sonra 55 °C'de 24 saat süreyle hava akımlı etüvde bekletildi ve sonrasında plastik torbalar içerisinde 4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2. Biyolojik Ön Muamele

İnokülasyonda alınması gereken yaş misel ağırlığını tespit etmek için inokülasyon ön denemeleri yapıldı. Bu denemelerde, beyaz çürüklük mantarı *Ceriporiopsis subvermispora*'nın çoğaltılması ve göl kamışına aşılanmasında Bajpai ve arkadaşları

[92] tarafından yapılan çalışmada belirtilen yöntem kullanıldı.

Bu yönteme göre, 36 g potato dextrose broth ve 10.91 g yeast extract 1500 ml steril su içinde çözündürüldükten sonra elde edilen çözeltiden 100 ml alınarak 1lt'lik erlene konuldu. Bu çözeltiye +4 ^{o}C'de muhafaza edilen *C. subvermispora* mantar miselinden aşılama yapıldı. Erlen içindeki çözelti karıştırılmaksızın 27 ^{o}C ve %70-90 nispi rutubetteki inkübatöre konularak miseller gelişmeye bırakıldı. Mantar misellerinin besi ortamı üzerinde keçe oluşturduğu tespit edildikten sonra oluşan keçe ortamdan alınarak steril Buchner hunisinde steril su ile yıkandı. Mantar keçesi etüvde tam kuru hale getirildikten sonra 10 gün içerisinde ağırlık olarak ne kadar misel oluştuğu ve bu misellerin ortalama rutubetleri belirlendi.

Elde edilen mantar keçesi erlenden alındıktan sonra steril Buchner hunisinde steril su ile yıkandı. Tam 325 g kamış için gerekli olan 1.625 mg mantar keçesi (1 ton tam kuru kamışa 5 g tam kuru mantar) steril cımbız ile Waring blender'e alınıp üzerine 50 ml steril su ilave edilerek 15 saniye karıştırıldı. Bu işlemin ardından tam kuru kamış ağırlığına oranla %0.5 oranında Corn Steep Liqour (CSL) mantar süspansiyonuna ilave edildi. Böylece sıvı inoculum kamışlara inoküle etmek için hazır hale getirildi. 10 adet tam kuru ağırlığındaki 325 g olan kamış ısıya dayanıklı otoklav poşetine konuldu. Poşetler otoklavda 121 ^{o}C sıcaklıkta 1 saat süreyle steril edildi. Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan sıvı inoculum kamışlara sprey halinde püskürtülerek inoküle edildi. İnokülasyon sonrası poşet içindeki kamış rutubetinin %75 olması için yeterince steril su ilave edilerek iklimlendirme dolabına yerleştirildi. Dolap içindeki sıcaklık 27 ^{o}C, bağıl nem %75'e ayarlanarak inkübasyon süresi başlatıldı. 2, 4, 6, 8 ve 10 haftalık inkübasyon süreleri sonunda alınan numuneler mantar muamelesini sonlandırmak amacıyla ılık suyla yıkandı ve böylelikle mantar misellerinden temizlendi.

2.3. HİDROLİZ

Hidrolitik deneylerde ön işlem görmüş olan materyaller Celluclast (50 FPU/ml) ve Novozym 188 (6360 nkat/ml) enzim karışımı ile muamele edildi. Bu doğrultuda substrat+enzim+buffer karışımı 50°C ve 50 mM, pH 5.0'de 72 saat süreyle biyoreaktörlerde muamele edildi. Karışımlardan periyodik aralıklarla (0, 6, 24, 48 ve 72 saat) örnekler alınarak DNS analizi ile karbonhidrat miktarları belirlendi.

2.4. FERMANTASYON

Enzimatik hidroliz işlemi sonrası elde edilen hidrolizatlar (pH 5) $(NH_4)_2SO_4$ (6 g/l), KH_2PO_4 (7.5 g/l), K_2HPO_4 (2.4 g/l), $MgSO_4$. $7H_2O$ (0.6 g/l), $CaCl_2$ (0.001 g/l), $CuSO_4$. $5(H_2O)$ (0.001 g/l), MnCl (0.001 g/l), $ZnSO_4$ (0.001 g/l) ve Na_2MoO_4 (0.001 g/l) mineral besinleriyle muamele edildi ve oluşan sıvı media sterilize edilerek Erlenmayere aktarıldı (1 L flaskte 450 ml sıvı media olacak şekilde) daha sonra flask içerisindeki sıvı materyaller *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile 30 °C'de 48 saat süreyle fermantasyona tabi tutuldu. Daha sonra flaskler içinde indirgenen şekerler ve alkol konsantrasyonu tespit edildi.

2.5. ANALİTİK METOTLAR

İşlem sonrasında yapılan tüm şeker analizleri ve fermantasyon sonrası elde edilen numunelerde etanol analizi HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. İşlemlerin gerçekleştirilmesinde Herna´ndez-Salas ve arkadaşları [93] tarafından belirtilen metodoloji uygulandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. GÖL KAMIŞININ KİMYASAL BİLEŞİMİ

Göl kamışının belirlenen kimyasal bileşenleri Çizelge 3.1'de listelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen göl kamışının kimyasal bileşenleri literatürdeki eski bulgularla karşılaştırıldığında, şeker oranının diğer araştırmacıların bulgularına benzer olduğu görülebilir [94]. HPLC analiz sonuçlarında göl kamışının kuru kütledeki şeker miktarı %51.8 olarak saptanmıştır. Kütle içerisinde, hücre çeperi ana bileşeni olan glukan %33.6, temel hemiselüloz bileşeni xylan %16.5 ve arabinan ve galaktan ise sırasıyla %1.45 ve %0.21 bulunmuştur. Bu çalışmada mannan saptanmamıştır. Göl kamışının, yüksek şeker içeriğinden dolayı biyo-etanol için uygun bir lignoselülozik materyal olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.1. Göl kamışının kimyasal bileşenleri (*Phragmites australis*), buğday sapı [95], tütün sapı [96], ayçiçeği sapı [97] ve yapraklı/iğne yapraklı ağaç [98].

İçerik, %[a]		**Göl kamışı**[b]	**Göl kamışı**[c]	**Buğday sapı**	**Tütün sapı**	**Ayçiçeği sapı**	**Yapraklı ağaç**	**İğne yapraklı ağaç**
Ekstraktifler[d]		7.25±0.18[e]	5.80	3.66	-	9.03	2-6	2-8
Glukan		33.6±0.28	37.3	36.6	33.0	27.1	-	-
α-selüloz		37.2±1.13	-	-	-	45.7	38-50	29-47
Hemiselülozlar[f]		18.2	16.4	23.3	21.8	-	-	-
	Ksilan	16.5±1.34	14.0	19.7	21.0	7.69	-	-
	Galaktan	0.21±0.08	0.5	-	-	-	-	-
	Arabinan	1.45±0.56	1.9	3.63	0.77	-	-	-
	Mannan	nd[g]	-	-	-	-	-	-
Holoselüloz		58.5±0.26	-	-	-	-	70-78	63-70
Lignin		26.2	24.8	35.2	24.5	21.9	30-35	25-35
	Asitte çözünmeyen lignin	22.9±0.57	20.7	34.0	23.0	-	-	-
	Asitte çözünen lignin	3.34±0.31	4.10	1.22	1.50	-	-	-
Kül		2.99±0.01	3.90	10.1	6.40	10.7	0.35	0.35
1% NaOH çözünürlük		37.8±0.55	-	45.5	-	-	14-20	9-16
Sıcak su çözünürlüğü		14.4±0.56	-	13.0	-	-	2-7	3-6
Soğuk su çözünürlüğü		7.54±0.15	-	9.30	-	-	4-6	2-3

[a] Kuru kütledeki bileşim yüzdeleri.
[b] Göl kamışının kimyasal bileşimi (*Phragmites australis*) (bu çalışmada saptanan)
[c] Göl kamışının kimyasal bileşimi (*Phragmites australis*) (Jung ve arkadaşları 2015)
[d] Alkol benzen çözünürlüğü
[e] Üç örnekte standart sapmaları alınmış örneklerin ortalama değerleri
[f] Hemiselüloz: ksiloz+galaktoz+arabinoz+mannoz
[g] nd: Not detected (belirsiz)

Bu çalışmada gözlemlenen lignin miktarı (asitte çözülen+çözülmeyen) literatürde göl kamışı için belirtilen lignin miktarına oranla bir miktar yüksek bulunmuştur (%26.2)

[94]. Bu durum, büyüme coğrafyası, hasat edildiğindeki olgunluğu, hasat zamanı, hasat edilen parçalar vb. farklılıklarla açıklanabilir. Başka bir deyişle, göl kamışının lignin miktarı genel olarak diğer otsu bitkiler ve tarımsal atıklarla kıyaslanabilir. Holoselüloz miktarı, Wise metodu [99] kullanılarak toplam kütlede %58.5 olarak belirlenmiştir. HPLC ile berlirlenen toplam şeker miktarı ve Wise yöntemiyle belirlenen toplam holoselüloz miktarı arasındaki farkın muhtelemen HPLC prosedürü sırasında uygulanan yoğun sülfürik asit hidrolizi sonucu oluşan şeker degradasyonundan dolayı olduğu da belirtilmelidir [61]. Göl kamışı diğer tarımsal atıklar ve odun türleriyle karşılaştırıldığında, holoselüloz ve α-selüloz miktarının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Karbonhidrat miktarı da tarımsal atıklar ve odun türlerinden nispeten daha azdır. Ancak, bu çalışmada göl kamışı için elde edilen çözünebilirlik değerleri referans gözlemlerine eşdeğer bulunmuştur [94].

3.2. ÖN İŞLEMLER

3.2.1. *C. subvermispora* Mantarı Ön Muamelesinin Göl Kamışının Kimyasal Yapısı Üzerine Etkileri

Göl kamışının *C. subvermispora* mantarı ile ön muamelesinde 2-10 hafta arasında oluşan ağırlık ve bileşen kayıpları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Mantar ön mualemesi sonrası 2 haftada oluşan kütle kaybı %0.60, 10 hafta sonunda oluşan kayıp ise %5.40'dır. 2. haftadan 10. haftaya kadar olan kütle kaybı, verilerin güven aralığı göz önüne alınarak istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bu sonuçlar loblolly çamının *C. subvermispora* ile muamelesinde gözlemlenen ve sırasıyla 2 ve 8 haftalık ön muamele sonunda bulunan %2 ve %9 ağırlık kaybıyla kıyaslanabilir. Bu ağırlık kayıpları ağırlıklı olarak yüksek derecede besin içeriğine sahip öz ışınlarının degrade olmasından dolayı kaynaklanıyor olabilir [100].

Mantar ön muamelesin sonucunda elde edilen karbonhidrat içeriği (glukan ve ksilan) Çizelge 3.2'de verilmiştir. İstatistiksel analizden anlaşıldığı üzere mantar ön muamelesi glukan üzerine belirli bir etki göstermiş ($p < 0.01$), fakat ksilan üzerine göstermemiştir ($p>0.05$). Göl kamışının glukan ve ksilan kayıpları 10 haftalık inkübasyon sonunda sırasıyla %11.3 ve %14'dür. Göl kamışının *C. subvermispora* ile degrade edilmesinden elde edilen lignin ve karbonhidrat verilerinin karşılaştırılması, ilk iki haftada %0.22 lignin kaybı yaşandığını ve bu sürede gerçekleşen glukan kaybının %0.60 olduğunu

göstermiştir. İki haftalık inkübasyon sonrasında lignin kaybı karbonhidrat kaybını geçmiştir. Sonuç olarak, mantar atağının başlarında bazı selüloz degrade edici enzimlerin karbonhidrat kaybına sebebiyet verdiği söylenebilir. Uzun vadede (10 hafta), lignin karbonhidratlardan çok daha büyük ölçüde degrade edilmiştir. Genel olarak, organizma tarafından sebep olunan çürüme belirginliği (% lignin kaybı / % karbonhidrat kaybı) ağırlık kaybının %20 ve 40'ı arasında maksimuma ulaşıp sonra iniş göstermiştir [100]. Düşük ağırlık kayıplarındaki yüksek seçicilik başlangıçta uzaklaştırılan ligninin daha erişilebilir olduğu izlemini uyandırmıştır. Göl kamışının iki haftalık inkübasyonu sonunda 0.18 olarak saptanan belirginlik değeri, öncelikli bir lignin degradasyonu olmadığına işaret etmiştir. Dördüncü haftada 1.31 olan belirginlik değeri, *C. subvermispora* tarafından gerçekleştirilen çürümenin ileriki safhalarında ligninin karbonhidratlardan daha öncelikli olarak uzaklaştırıldığını göstermektedir. Bu oran uzatılan inkübasyon periyotlarında 0.18'den 1.34'e yükselmekte fakat 4 ve 10 haftalık inkübasyon aralığında belirgin hiçbir fark bulunmamaktadır. Bu sebepten dolayı, ileri safha analizlerinde *C. subvermispora* ile 4 hafta boyunca muamele edilmiş örnekler optimum numuneler olarak belirlenmiştir. Bu bilgi, Villalba [100] tarafından biyo-degrade edilen loblolly çamı çalışmasıyla örtüşmektedir.

Çizelge 3.2. *C. subvermispora* ile muamele edilen göl kamışının kimyasal yapısı.

Aşamalar	Muamele edilmemiş	Biyo işlem görmüş					p[y]
		2 hafta	4 hafta	6 hafta	8 hafta	10 hafta	
Ağırlık, g	100±0.00[a]	99.4±0.02[a]	95.6±0.08[b]	95.1±0.01[cb]	94.7±0.03[cb]	94.6±0.01[c]	*
Glukan, %	33.6±0.28[a]	33.6±0.45[a]	31.9±0.17[b]	31.6±0.53[b]	31.6±0.19[b]	31.5±0.40[b]	**
Ksilan, %	16.5±1.34[a]	16.5±0.40[a]	15.3±0.14[a]	15.3±0.45[a]	15.2±0.04[a]	15.0±0.06[a]	NS
Lignin, %	26.2±0.88[a]	26.3±0.40[a]	20.0±0.77[b]	19.3±0.31[cb]	18.9±0.10[cb]	18.3±0.23[c]	*
Extraktifler, %	7.25±0.18[a]	5.27±0.69[b]	4.73±0.37[cb]	4.28±0.07[c]	4.28±0.23[c]	4.02±0.04[c]	**
α-selüloz, %	37.2±1.13[a]	37.2±0.60[a]	37.1±0.64[a]	37.1±0.07[a]	37.0±0.16[a]	36.9±0.11[a]	NS
1% NaOH çözünürlüğü, %	37.8±0.55[a]	46.2±0.64[b]	52.3±0.80[c]	53.3±0.67[cd]	54.6±0.62[de]	55.8±0.40[e]	*
Ağırlık kaybı, %	-	0.60	4.40	4.90	5.30	5.40	-
Glukan kaybı, %	-	0.60	9.24	10.6	10.9	11.3	-
Ksilan kaybı, %	-	0.60	11.4	11.8	12.8	14.0	-
Lignin kaybı %	-	0.22	27.0	29.9	31.7	33.9	-
Extraktif kaybı, %	-	27.7	38.0	43.6	43.8	47.8	-
α-selüloz kaybı, %	-	0.60	4.66	5.16	5.81	6.16	-
1% NaOH çözeltisindeki artış, %	-	14.9	32.3	34.1	36.8	39.6	-
Belirginlik (% lignin loss/% glucan+xylan loss)	-	0.18	**1.31**	1.34	1.34	1.34	-

[y] Önem düzeyi
[*] ANOVA için 0.001 değerinde anlamlı
[**] ANOVA için 0.01 değerinde anlamlı
NS: ANOVA için anlamsız
[a,b,c,d,e] Aynı harfe sahip değerler anlamlı ölçüde farklı değildir (Duncan test).

Göl kamışının lignin içeriği ön muamele için oldukça elverişlidir, ilk iki haftalık

inkübasyon süresinde muamele edilmemiş örneklerle arasında hiçbir istatiki farklılık olmamasına rağmen, ön muamelenin ilerleyen sürelerinde lignin içeriğindeki belirgin fark çok açık bir şekilde görülebilir. İstatistiki analizler mantar ön muamelesinin lignin içeriği üzerine kayda değer bir etkisi ($p < 0.001$) olduğunu göstermektedir. 10 haftalık inkübasyon süresi sonunda göl kamışında lignin kaybı %33.9 olarak gözlemlenmiştir. Mendonca ve arkadaşları [101] *C. subvermispora*'nın, loblolly çamının lignin içeriğini 2, 4 ve 8. haftalarda sırasıyla %9.16, %10.7, ve %16.6 indirgediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmadaki yüksek lignin indirgenmesi, göl kamışının düşük lignin içeriğinin yapıyı mantar aktivitesine daha açık hale getirmesiyle açıklanabilir. Lignin miktarındaki azalma yapı içindeki β-O-aril eter bağlarının mantar tarafından parçalanmasına bağlanabilir [102], [103].

Mantar ön muamele süresinin bir fonksiyonu olan alkol benzen ekstaktifleri Çizelge 3.2'de listelenmiştir. Kontrol (muamele edilmemiş) ve sonrasındaki ön muamele süreleri arasındaki fark %95 güven düzeyinde istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0.01$). En yüksek ekstraktif madde indirgenmesi mantar ön muamelesinin ilk iki haftasında görülmüştür. Göl kamışı ekstraktif içeriğinin %27.7'sini 2. haftanın sonunda kaybetmiştir, 10. haftada bu oran %47.8'e ulaşmıştır. Yakın zamanda *C. subvermispora* ile yapılan yapraklı ve iğne yapraklı ağaç biyo-degradasyon çalışmaları da [92], [101], [104] benzer sonuçları bildirmişlerdir. Ekstraktif miktarındaki azalma, mantarın ekstraktif maddeleri besin kaynağı olarak değerlendirmesinin sonucudur [105].

Göl kamışının α-selüloz miktarı mantar ön muamelesi ile azalmıştır. En yüksek α-selüloz kaybı 10. haftanın sonunda %6.16 olarak bulunmuştur. Gülsoy ve Eroğlu [103] karaçamın *C.subvermispora* ile muamelesinde 100 günlük inkübasyon süresinin sonunda α-selüloz kaybını %5.45 olarak belirtmişlerdir. İstatistiki analizler mantar ön muamelesinin α-selüloz kaybı üzerinde hiçbir belirgin etkisi olmadığını göstermiştir ($p > 0.05$). Son zamanlarda *Eucalyptus grandis* [106] ve *Pinus taeda* [107] üzerine yapılan *C. subvermispora* ile biyo-degradasyon çalışmaları, α-selüloz miktarındaki azalmanın, uzatılan biyo muamele sürelerinin sebep olduğu selüloz depolimerizasyonundan dolayı olduğunu belirtmişlerdir.

Ön muamele sonrasında göl kamışı içerisindeki materyallerin alkali çözünürlüklerindeki artış Çizelge 3.2'de verilmiştir. İstatistiki analizler mantar ön muamelesinin alkali çözünürlük üzerine belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). 10 haftaya kadar uzatılan inkübasyon sürelerinde, %39'a varan devamlı bir çözünme ve daha fazla

çözünebilen madde gözlemlenmiştir. Çözünürlükteki artış, yapıda bulunan düşük molekül ağırlıklı karbonhidratların, sıcak alkali solüsyon ekstraksiyonundan dolayı olabilmektedir (başlıca hemiselüloz ve çözünmüş selüloz) [108]. Ayrıca bu durum, hücre çeper tabakasının mantar tarafından açıldığının ve böylece %1 NaOH çözeltisinin yapı içerisine girmesine büyük olanak sağladığının belirtisi olabilir. Villalba [100] *C. subvermispora* mantarının, loblolly çamının alkali çözünürlüğünü 2 ve 4. haftalarda sırasıyla %29 ve %63 artırdığını belirtmiştir. Bu çalışmadaki düşük alkali çözünürlüğü göl kamışının düşük karbonhidrat degradasyonuyla açıklanabilir.

Kimyasal içerik analizindeki bulgular, göl kamışının mantar ile ön muamele edilmesinin biyoetanol üretimi için lignin depolimerizasyonu ve ekstraktif uzaklaştırması da dahil olmak üzere kesinlikle faydalı olduğunu göstermiştir. Fakat, selüloz depolimerizasyonu biyoetanol üretimi için bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

3.2.2. Kimyasal Ön Muamelenin Göl Kamışının Kimyasal Yapısı Üzerine Etkileri

Kimyasal ön muamele sonrasında katı geri kazanım detayları Çizelge 3.3'te verilmiştir. Ön muamele sonrasındaki düşük verimler başlıca lignin, hemiselüloz ve diğer çözünebilir maddelerin yapıdan uzaklaşmasına bağlanabilir. NaOH ile muamele edilmiş örnekler en düşük geri kazanımı (%62.3) gösterirken, B_2O_3 muamele edilmiş örnekler en yüksek geri kazanımı göstermiştir. İstatistiki analizler kimyasal ön muamelenin glukan ($p < 0.001$), ksilan ($p < 0.001$) ve lignin ($p < 0.01$) üzerine belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir.

3.2.2.1. Kimyasal ön muamelenin glukan içeriği üzerine etkileri

Ön muamele kimyasalı olarak NaOH kullanımı selüloz ve hemiselülozların hidrojen bağlarını ve lignin ve ksilan arasında bulunan ester bağlarını koparabilmektedir [109]. Bu nedenle, şişmede gözlemlenen bu sonuçlar hemiselüloz ve lignin çözünmesine sebep olabilir [110]. NaOH ön muamelesi uygulanmış göl kamışının glukan içeriği %49.8'dir. Bir diğer yandan çözünmüş glukan %7.66 olarak saptanmıştır. Wang ve arkadaşları [111] %0.5-3 NaOH (121 ºC/ 15-90 dak.) ile ön muamele edilmiş Bermuda grass'ın çözünürlüğünü %2.03-9.77 olarak gözlemlemişlerdir. Bunların aksine, Silverstein ve arkadaşları [38] pamuk saplarının %2 NaOH (121 °C/ 60 dak.) ile muamelesinde neredeyse %21 glukan çözünürlüğü gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, glukan çözünürlüğünün hem hammaddeden hem de ön muamele koşullarından etkilendiğinin bir göstergesidir.

Alkali H_2O_2 kağıt endüstrisinde çok iyi bilinen bir ağartma kimyasalıdır. En büyük avantajı ise uygulamadan sonra oksijen ve suya dönüşerek geride hiçbir kalıntı bırakmamasıdır [112]. H_2O_2 uygulaması sonucu ön muamele edilmiş katı kütle içerisinde kalan glukan miktarı %36.7'dir. Glukan çözünürlüğü ortalama %12.2 saptanmıştır. Silverstein ve arkadaşları [38] pamuk saplarının glukan çözünürlüğünü örneklerin %2 H_2O_2 ile 121 ºC sıcaklıkta 30 dakika muamelesinden sonra %29.1 olarak belirlemişlerdir.

Kraft metodunda pişirme seçiciliğini arttırmak için kullanılan pişirme katkısı $NaBH_4$ kağıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Kimyasal katalizör olarak tepkimelere katılır ve bunun sonucunda seçici lignin uzaklaştırması elde edilir [113]. Karbonhidrat yıkımını durdurarak hamur verimini arttırır [95]. Fakat, biyoetanol üretimi için kimyasal ön muamelede $NaBH_4$ kullanımı hakkında çok az çalışma vardır. Buğday sapı, mısır sapı ve fındık kabuğu üzerine $NaBH_4$ kimyasal ön muamelesinin etkileri çalışılmış [95], [114], [115] ve kimyasal ön muamele için NaOH kullanımı kadar etkili olduğu görülmüştür. $NaBH_4$ uygulanmış örneklerde glukan miktarı %42.9 ve glukan çözünürlüğü %4.50 olarak belirlenmiştir. Çöpür ve arkadaşları [95], [115] buğday sapı ve fındık kabuğunun %2 ve %4 $NaBH_4$ ile 121 °C ve 30 dakika muamelesinde glukan çözünürlüğünü sırasıyla %7.27 ve %31.6 olarak belirtmişlerdir.

Boronun bir oksit çeşidi olan B_2O_3, biyoetanol üretimi için bir ön muamele kimyasalı olarak yakın zamanda araştırmacıların dikkatini cezbetmeye başlamıştır. Yakın bir çalışmada B_2O_3 ile ön muamele edilmiş örneklerin glukan miktarı %34.1 ve glukan çözünürlüğü %15.7 olarak belirtilmiştir. Ancak, Tozluoğlu ve Çöpür [116] tarafından yapılan bir çalışmada ayçiçeği saplarının %2 B_2O_3 (121 °C/ 90 dak.) ile muamelesinde glukan çözünürlüğü %28.5 olarak saptanmıştır.

Seyreltik asitlerle yüksek derecelerde yapılan ön muamele işlemlerinde hemiselülozlar hidrolize olur. Bu süreç, monomerik şekerler ve çözünebilir oligomerler hücre çeper yapısından hidrolizat içine salındığında sonuçlanır. Bu nedenle lignoselülozik biyomateryal için belirlenmiş en etkili metot asit ön muamelesidir. Yapıdaki hemiselülozlar uzaklaştırıldığı zaman yapının porozitesi artar böylece enzimatik faaliyetler artış gösterir. Literatürdeki çalışmalar da [117] tüm hemiselülozların yapıdan uzaklaşmasının enzimatik faaliyetlerin maksimuma ulaşmasına olanak sağladığını belirtmiştir. H_2SO_4 ile muamele edilmiş göl kamışının glukan miktarı %35.9 olarak saptanmıştır. H_2SO_4 ön muamelesindeki glukan çözünürlüğü %15.0'dir. Ön muamele

sırasında kütle içerisinde bulunan selülozun uygulamadan etkilenmemesi önemlidir. Pamuk saplarının asit ön muamelesinde bir miktar fazla glukan indirgenmesi belirlenmiştir [118]. Bunun sebebi selülozca zengin pamuk liflerinin lignin ve hemiselüloza gömülü olmamasıdır. Sonuç olarak ön muamele sırasında asit direk olarak selüloza ulaşmış ve diğer hammaddelerdeki alışılmışın aksine glukan üzerinde daha fazla degradasyon göstermiştir.

3.2.2.2. Kimyasal ön muamelenin ksilan içeriği üzerine etkileri

NaOH uygulaması yapılmış kütlenin ksilan içeriği %19.5 olarak saptanmıştır, buna karşılık çözünmüş ksilan içeriği %26.4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki ksilan çözünürlüğü Chen ve Sharma-Shivappa'nın [110] arpa sapı, tritikale sapı ve buğday sapı üzerine 2% NaOH (121 ºC/ 60 dak.) uygulayarak sırasıyla %40, 35 ve 35 ksilan içeriği buldukları çalışmanın sonuçları ile benzer sonuçlar vermiştir. Bunların aksine, Wang ve arkadaşları [111] tarafından Bermuda grass üzerine yapılan bir çalışmada (%3 NaOH/ 121 ºC/ 90 dak.) ksilan çözünürlüğü %60.5 gibi çok yüksek bir değer bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar NaOH ön muamelesinin glukandan çok ksilan uzaklaştırdığını göstermektedir; bu durum hemiselülozların kimyasallara karşı dayanıksız olmasından dolayı olabilir [119]. NaOH ön muamelesinde elde edilen ksilan çözünürlüğünün H_2SO_4 ön muamelesinde elde edilen çözünürlükten daha düşük olmasına rağmen, ksilan çözünürlüğünün mevcut lignin uzaklaştırılmasıyla birlikte enzimatik hidrolizi geliştirmesi ümit edilmiştir (Çizelge 3.3).

Muamele edilmiş katı materyaldeki ksilan miktarı %16.8, H_2O_2 ön muamelesi sonucu elde edilen ksilan çözünürlüğü %18.1 olarak saptanmıştır. Silverstein ve arkadaşları [38] pamuk sapı örneklerinin %2 H_2O_2 (121 ºC/ 30 dak.) ile muamelesi sonucu ksilan çözünürlüğünü %30.6 olarak gözlemlemişlerdir.

$NaBH_4$ ön muamelesi incelendiğinde, muamele edilmiş göl kamışının ksilan uzaklaşması %17.9 olmasına karşın, ksilan içeriğinin %18.1 olduğu görülebilir. Çöpür ve arkadaşları [95], [115] buğday sapı ve fındık kabuklarını %4 $NaBH_4$ (121 °C/ 90 dak. ve 30 dak., sırasıyla) ile muamele ettiklerinde ksilan çözünürlüklerini %58.2 ve %66.2 olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmadaki düşük ksilan çözünürlüğü hammaddenin farklı karakteristik özellikleriyle açıklanabilir.

B_2O_3 ön muamelesi yapılmış örneklerin ksilan içerikleri %15.4, ksilan çözünürlükleri %22.4 olarak bulunmuştur, bunun aksine Tozluoğlu ve Çöpür [116] ayçiçeği saplarının

%2 B_2O_3 ile (121 °C/ 90 dak.) muamelesinde ksilan çözünürlüğünü %16.8 olarak gözlemlemişlerdir.

Çizelge 3.3. Kimyasal ön muamele edilmiş göl kamışının bileşenleri.

İşlemler	Muamele edilmemiş	Mantar ön muamelesi	Kimyasal ön muameleler					p[y]
			NaOH	H_2O_2	$NaBH_4$	B_2O_3	H_2SO_4	
Ağırlık, g	100±0.00[a]	95.6±0.08[b]	62.3±0.42[c]	80.4±0.99[d]	74.8±1.41[e]	83.1±0.57[f]	79.6±0.28[d]	*
Glukan, %	33.6±0.28[ab]	31.9±0.17[a]	49.8±1.77[c]	36.7±1.53[b]	42.9±1.60[d]	34.1±1.12[ab]	35.9±2.08[b]	*
Ksilan, %	16.5±1.34[ab]	15.3±0.14[a]	19.5±1.43[c]	16.8±1.34[ab]	18.1±0.93[bc]	15.4±1.10[ab]	7.53±0.48[d]	*
Lignin, %	26.2±0.88[ab]	20.0±0.77[cd]	18.6±1.61[c]	24.7±1.81[ab]	16.8±1.13[c]	23.1±0.91[ad]	28.1±2.66[b]	**
Ağırlık kaybı, %	-	4.40	37.7	19.6	25.2	16.9	20.4	-
Glukan kaybı, %	-	9.24	7.66	12.2	4.50	15.7	15.0	-
Ksilan kaybı, %	-	11.4	26.4	18.1	17.9	22.4	63.7	-
Lignin kaybı %	-	27.0	55.8	24.2	52.0	26.7	14.6	-
Belirginlik (% lignin kaybı/% glukan+ksilan kaybı)	-	1.31	1.64	0.80	2.32	0.70	0.19	-

[y] Önem düzeyi
[*] ANOVA için 0.001 değerinde anlamlı
[**] ANOVA için 0.01 değerinde anlamlı
[a,b,c,d,e] Aynı harfe sahip değerler anlamlı ölçüde farklı değildir (Duncan test).

H_2SO_4 ile ön muamele edilmiş örneklerin ksilan içeriği %7.53 olarak belirlenmiştir. Bulgular H_2SO_4 kimyasalının ksilan indirgenmesi üzerine belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir. H_2SO_4 ön muamelesi ile birlikte mevcut ksilanın %63.7'si göl kamışının yapısından çözünerek uzaklaşmıştır. Heterojen ve kristal olmayan yapısından dolayı ksilan kararsızdır [117]. Bu bilgi, glukan ile karşılaştırıldığında ksilanın çok daha yüksek çözünürlüğe sahip olmasının sebebi olabilir. Bu çalışmaya benzer olarak, Schell ve arkadaşları [120] %1.35 asit (190 ºC/ 60 dak.) ile muamele edilmiş mısır koçanındaki ksilan uzaklaşmasını %77 olarak belirtmiş, Grohmann ve arkadaşları [121] ise seyreltik H_2SO_4 (140 ºC/ 1 saat) ile muamele edilmiş buğday sapının ksilan uzaklaşmasını %80 gibi bir değerden daha fazla bulmuşlardır.

3.2.2.3. Kimyasal ön muamelenin lignin içeriği üzerine etkileri

Lignin, odun biyokütlesi içerisinde karbonhidratları çevreleyen (selüloz ve hemiselüloz), üç boyutlu, kompleks bir aromatik polimerdir. Fakat, lignin hidrolitik enzimlerin karbonhidratlara ulaşabilirliğini kısıtlar, bu yüzden lignin uzaklaştırılması, enzimatik parçalanabilirlik için önemli bir rol oynar. NaOH ön muamelesinin biyokütle üzerine en büyük etkisi, lignin ve ksilan arasındaki çapraz bağlanmış ester bağlarını

kopararak, delignifikasyon sonucu biyokütlenin porozitesini artırmasıdır [122]. NaOH ön muamelesi sonrası yapıda kalan lignin miktarı %18.6 ve yapıdan uzaklaşan lignin miktarı %55.8 olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, delignifikasyon ve ksilan degradasyonunun göl kamışının NaOH ile ön mualemesi sırasında oluşan fazla kütle kaybının sebebi olduğunu göstermiştir. Karşılaştırılabilir lignin uzaklaştırılması Antonopoulu ve arkadaşları [123] tarafından ayçiçeği saplarının %2 NaOH (80 °C/ 24 saat) ile ön muamelesi sırasında gözlemlenmiştir. Gaspar ve arkadaşları [124] ve Wang ve arkadaşları [111] sırasıyla mısır lifleri için %95 lignin uzaklaştırması (%2.5 kons./ 121 °C/ 60 dak.) ve Bermuda grass için %86 lignin uzaklaştırmasını (%3 kons./ 121 °C/ 90 dak.) kaydetmişlerdir. Bu çalışmada, NaOH konsantrasyonu sadece %1 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar lignin uzaklaştırılmasının ön muamele koşullarına ve hammaddenin karakteristik özelliklerine bağlı olduğunu göstermiştir.

H_2O_2 ön muamelesinde oksidatif delignifikasyon lignini parçalamak, çözmek ve lignoselülozik matrisi zayıflatıp enzim aktivitesini sonuçlandırmak için kullanılır [125]. H_2O_2 ile ön muamele edilmiş örneklerin lignin miktarı %24.7 ve lignin indirgenmesi ise %24.4 olarak saptanmıştır. Azzam [126] ve Sun ve arkadaşları [127] şeker kamışı küspesinin %2 alkali H_2O_2 (30 ºC/ 8 saat) muamelesinde lignin indirgenmesini %50, ve buğday sapının %2 H_2O_2 (50 ºC/ 5 saat) ile muamelesinde lignin indirgenmesinin %80'den fazla olduğunu belirtmişlerdir. Selig ve arkadaşları [128] mısır koçanı örneklerinin %30 H_2O_2 (65 ºC/ 3 saat) ile muamelesinde %78.6 lignin indirgenmesi bulmuşlardır. Bu çalışmada görülen nispeten düşük seviyelerdeki lignin indirgenmesi oksidatif delignifikasyonu kısıtlayan daha kısa muamele süresinin bir sonucu olabilir.

$NaBH_4$ ile muamele edilmiş örneklerin lignin miktarı %16.8 ve lignin uzaklaştırması %52 olarak bulunmuştur. Çöpür ve arkadaşları [95], [115] buğday sapı ve fındık kabukları için sırasıyla %58.4 ve %49.1 delignifikasyon kaydetmişlerdir (%4 $NaBH_4$/ 121 °C/ 90 dak). $NaBH_4$ ile muamele edilmiş göl kamışından ksilana kıyasla daha fazla miktarda lignin uzaklaştırılmıştır. Lignin uzaklaştırmasının enzimatik parçalanabilirlik için oldukça önemli olduğu bilinmektedir.

Tozluoğlu ve Çöpür [116] %2 B_2O_3 (121 °C/ 90 dak.) ile muamele edilmiş ayçiçeği saplarının lignin indirgenmesini %19.8 olarak gözlemlerken, bu çalışmada B_2O_3 ile muamele edilmiş örneklerin lignin miktarı %23.1 ve lignin indirgenmesi %26.7 olarak bulunmuştur.

Lignoselülozik biyokütle için en etkili ön muamele seyreltik asit ön muamelesidir,

çünkü ağırlıklı olarak hemiselülozlara ve az miktarda da lignin dagredasyonuna etki eder. H_2SO_4 ile muamele edilmiş örnekler, hiçbir uygulanmaya tabi tutulmamış örneklerle karşılaştırıldığında, karbonhidratların yapıdan uzaklaşmasından dolayı madde içerisindeki lignin miktarında artış sergilemiştir. Örneklerin lignin miktarı %28.1 olmasına karşın çözünen lignin miktarı %14.6 olarak saptanmıştır. Bu bilgiler Silverstein ve arkadaşları'nın [38] %2 H_2SO_4 (121 ºC/ 90 dak.) ile muamele edilmiş pamuk sapları için belirlediği %24.2 lignin indirgenmesiyle aynı seviyededir. Buna ek olarak, Chen ve Sharma-Shivappa [110] %2 H_2SO_4 (121 ºC/ 60 dak.) ile muamele edilmiş arpa sapı, tritikale sapı ve buğday sapı için %20 oranında lignin indirgenmesi belirlemişlerdir.

3.3. ENZİMATİK HİDROLİZ

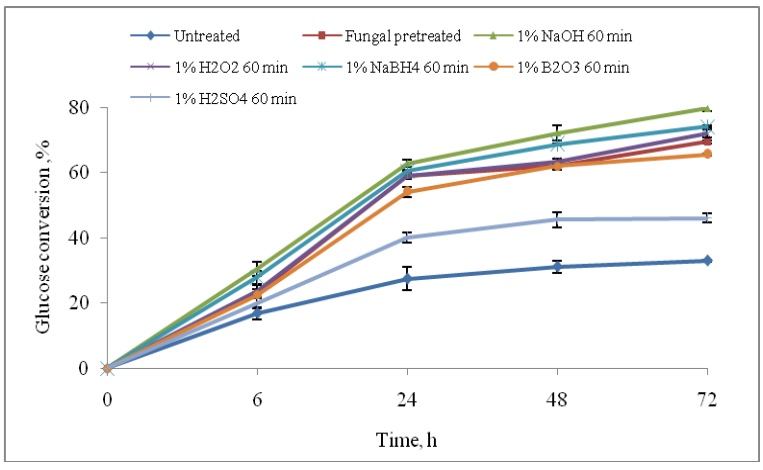
Bu çalışmada, biyolojik ve kimyasal ön muameleler sonrası numuneler enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. Sonuçlara göre, hidrolizat içerisinde temel monosakkaritler olan glikoz ve ksiloz bulunmuştur, bu durum, hidroliz boyunca selüloz ve hemiselülozların aynı anda degrade edildiğine işaret etmektedir.

Göl kamışı hidrolizinin inkübasyon süreleri ve enzimatik hidrolizin etkileri incelenmiş ve sonuçlar Şekil. 3.1 ve Şekil 3.2'de sunulmuştur. Sakkarifikasyon oranı 24 saate kadar yüksek, sonrasında devam eden 72 saate kadar yavaştır. Bu durum sakkarifikasyon sırasında enzim absorpsiyonunun azalmasından dolayı, selüloz yapısının daha az tüketilebilir bir forma dönüşmesi ve enzimatik hidroliz sırasında oluşan inhibe ürünlerden dolayı kaynaklanıyor olabilir [129]. Sakkarifikasyon oranının 72 saatten sonra yavaşlaması önceki çalışmalarda da gözlemlenmiştir [130].

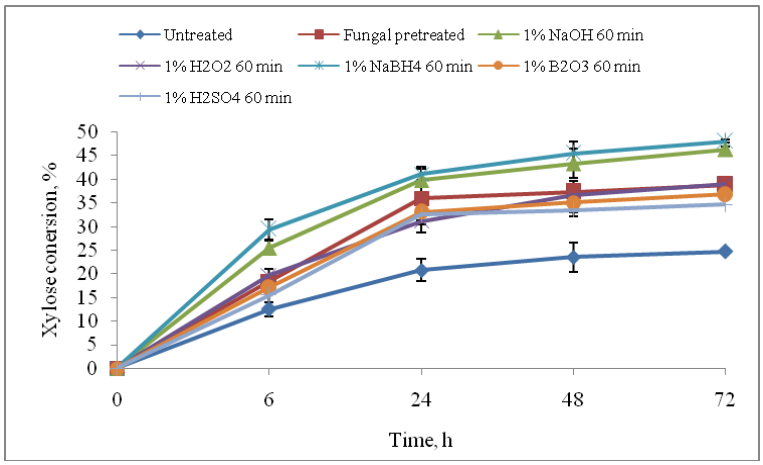
Muamele edilmemiş örnekler 72 saat boyunca enzimatik muameleye tabi tutulduklarında %33.1 glukan dönüşümü göstermişlerdir. Bu değer, Jung ve arkadaşları [94] tarafından göl kamışı için gözlemlenen ve neredeyse %45 olan (selülaz+β-glukosidaz) oran ile kıyaslandığında düşüktür. Her bir hidroliz muamelesi için glukan dönüşümü Şekil. 3.1'de gösterilmiştir. NaOH muamelesi en yüksek glukan dönüşümüne sahiptir (%79.7), bunu takiben $NaBH_4$ (%74.1), H_2O_2 (%71.9), mantar ön muamelesi (%69.4), B_2O_3 (%65.5) ve H_2SO_4 (%46.1). Bütün ön muamele örnekleri için, ortalama glukan dönüşüm oranları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Jung ve arkadaşları [94] göl kamışının %1 NaOH (121 ºC/ 90 dak.) ile ön muamele

edilip selülaz+β-glukosidaz ile hidroliz edildiğinde glukan dönüşüm oranının %80'e kadar yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Yüksek bir glukan dönüşüm oranı olan %91.7 ise Wang ve arkadaşları [111] tarafından Bermuda grass'ın %3 NaOH (121 ºC/ 15 dak.) ile muamele edilip, ardından selülaz (NS50013 cellulase complex) ve sellobiaz (NS50010 β-glucosidase) ile hidrolizinde bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen düşük glukan dönüşüm oranı kullanılan göl kamışının karakteristik özelliklerine dayandırılabilir.

Örneklerin lignin ve ksilan miktarları enzimatik hidrolizi etkileyen başlıca faktörler olarak düşünülebilir. H_2SO_4 ile ön muamele edilmiş örnekler en yüksek lignin miktarına sahipken (%28.1), NaOH ile ön muamele edilmiş örnekler en düşük lignin oranına sahiptir (%18.6). Sonuç olarak, H_2SO_4 ile ön muamele edilmiş örnekler NaOH ile ön muamele edilmiş örneklere kıyasla 1.93 kat daha fazla lignin içeriğine sahiptir. Bu nedenle, H_2SO_4 ile muamele edilmiş örneklerin glukan dönüşüm oranı NaOH ile ön muamele edilmiş örneklerle karşılaştırıldığında 1.73 kat daha düşüktür. Bunun aksine, mantar ön muamelesine tabi tutulmuş örnekler en yüksek ksilan içeriğine (%15.3) ve NaOH ile ön muamele edilmiş örnekler en düşük (%19.5) ksilan içeriğine sahiptir. NaOH ile ön muamele edilmiş örneklerle kıyaslandığında, mantar ile ön muamele edilmiş örnekler yapıda 1.20 kat daha fazla ksilan içeriğine ve 1.15 kat daha az glukan dönüşüm oranına sahiptirler. Bu durum, lignin ve ksilanın uzaklaştırılmasının, göl kamışının enzimatik parçalanabilirliğini belirgin bir şekilde etkilediğini akla getirmektedir. Ayrıca, Yang ve Wyman [131] sulu çözeltilerde ligninin protein absorpsiyonu sonucu hidrolizin lignin tarafından etkilendiğini belirtmişlerdir.



Şekil 3.1. Enzimatik hidroliz sonrası glukan dönüşümleri.



Şekil 3.2. Enzimatik hidroliz sonrası ksilan dönüşümleri.

Bu çalışmada enzim kombinasyonlarına ksilanaz eklenmediği halde hidrolizat içerisinde kayda değer miktarda ksiloz saptanmıştır (Şekil. 3.2). Duarte ve arkadaşları [132] Celluclast 1.5 L enziminin β-ksilanaz ve β-ksilosidaz aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Ek olarak, Chen ve Sharma-Shivappa da [110] Celluclast 1.5 L ve Cellobiase'ın sırasıyla 905 ve 605 U/ml ksilanaz aktivitesi gösterdiğini gözlemlemiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada göl kamışı yapısındaki ksilan miktarı enzim kombinasyonları kullanılarak indirgenmiştir. Muamele edilmemiş örnekler en düşük ksilan dönüşümünü (%24.8) gösterirken, $NaBH_4$ ile muamele edilmiş örnekler en yüksek dönüşüm değerini (%48.1) vermiştir. İstatistiki veriler, tüm ön muamele türleri için ortalama ksilan dönüşümlerindeki farkların istatistiki olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Wang ve arkadaşları da [111] Bermuda grass'ın %3 NaOH (121 ºC/ 15 dak.) ile muamelesinde daha düşük (%37.6) ksilan dönüşümü belirlenmiştir.

3.3.1. Hidrolizatların Fermantasyonu

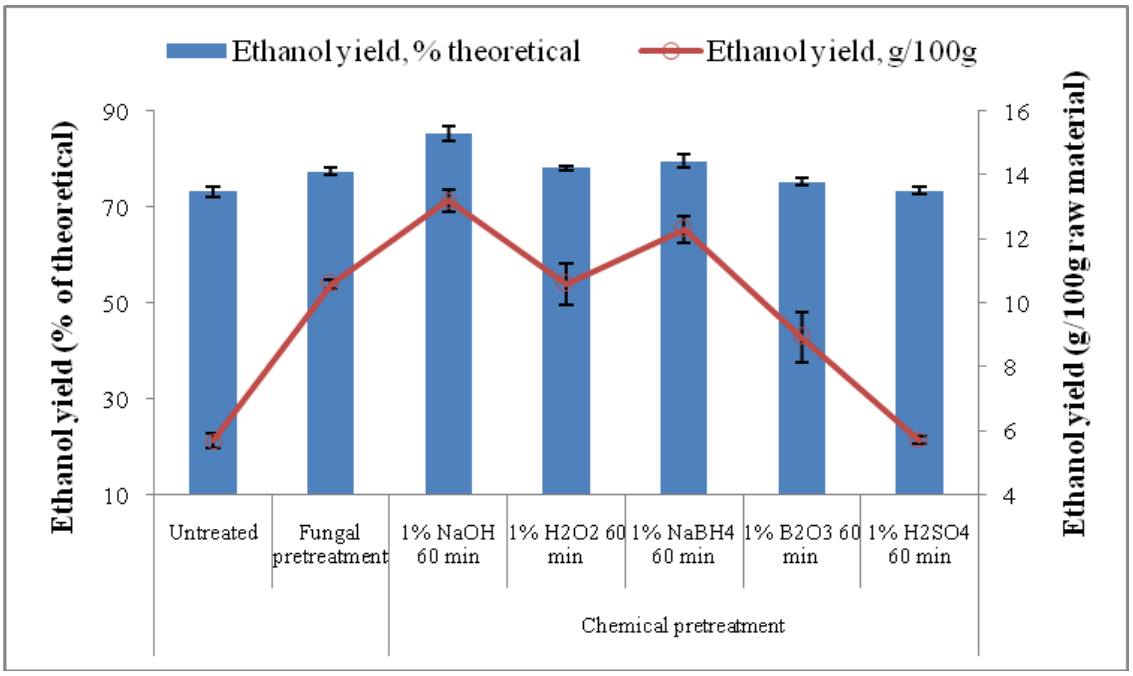
Ön muamele edilmiş hidrolizatta *S. cerevisiae* fermantasyon verimi Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, göl kamışının hidrolizden önce ön muamele edilmesinin, hidrolizatların daha iyi fermante edilebilirlikle sonuçlandığını göstermiştir. Muamele edilmemiş göl kamışı baz alındığında, en yüksek etanol konsantrasyonu (%10.6 g/L) ve en yüksek etanol verimi NaOH ile ön muamele edilmiş örneklerden alınmıştır. Ayrıca teorik olarak en yüksek verim bu örneklerde hesaplanmıştır (Şekil 3.3). Diğer yandan, mantar ve $NaBH_4$ ön muameleli örnekler, sırasıyla 10.6 ve 12.3 g/100 gram etanol verimi ile sonuçlanmıştır (muamele edilmemiş göl kamışına oranla). Jung ve arkadaşları [94] %1 H_2O_2 (121 ºC/ 90 dak.) ile ön muamele edilmiş göl kamışı üzerine yaptıkları çalışmada etanol verimini 5.6 g/100 gram olarak kaydetmişlerdir

(muamele edilmemiş göl kamışına oranla). Kaydedilen etanol verimlerindeki farklılık, mayalanma türü ve muamele türünün yanı sıra kullanılan hammaddenin yetiştiği coğrafik konumu, çeşidi ve hasat zamanındaki farklılıklara da atfedilebilir. Düşük etanol verimi, mayanın şekeri fermante etmesini engelleyen furfural, HMF ve fenolik grupları kapsayan yan ürün oluşumlarının bir sonucu olabilir. Bu çalışmada, enzimatik hidroliz sırasında mikrobiyal kirlilikten korunmak için çok düşük miktarda sodyum asit kullanımı bile maya aktivitesini düşürecek şekilde sonuçlanmış olabilir.

Bu çalışmanın bulguları, kimyasal ön muamelelerle kıyaslandığında mantar ön muamelesinin etkileyici oranlarda verimle sonuçlandığını göstermiştir (Çizelge 3.4, Şekil 3.3). Ancak, $NaBH_4$'ün fermantasyon sürecinin iyileştirilmesi için etkili bir ön muamele kimyasalı potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, gelecek çalışmalar en uygun süreç koşulları altında fermante edilebilirliği iyileştirme amacıyla yürütülmelidir.

Çizelge 3.4. Muamele edilmemiş ve ön muamele görmüş göl kamışının *S. cerevisiae* ile fermantesi sırasındaki glikoz, ksiloz ve etanol konsantrasyonları.

İşlem		Glikoz, g/l	Ksiloz, g/l	Etanol, g/l
Muamele edilmemiş		5.56±0.30	2.04±0.11	2.84±0.14
Mantar ön muamelesi		11.1±0.40	2.97±0.18	5.54±0.23
Kimyasal ön muamele	1% NaOH 60 dak	19.8±1.00	4.51±0.54	10.6±0.56
	1% H_2O_2 60 dak	13.2±1.15	3.27±0.29	6.57±0.12
	1% $NaBH_4$ 60 dak	15.9±0.30	4.35±0.36	8.21±0.74
	1% B_2O_3 60 dak	11.2±0.61	2.83±0.44	5.38±0.62
	1% H_2SO_4 60 dak	8.27±1.31	1.31±0.06	3.58±0.84



Şekil 3.3. Etanol verimi (teorik ve g/100 g hammadde).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Göl kamışı, biyolojik ön muamele olarak beyaz çürüklük mantarıyla muamele edilmiştir. Sonuçları kıyaslayabilmek adına ayrıca NaOH, H_2O_2, $NaBH_4$, B_2O_3 ve H_2SO_4 kimyasalları kimyasal ön muamele aşamasında incelenmiştir. H_2SO_4 ön muamelesi başlıca yapıdaki ksilanı çözmesine karşın mantar, H_2O_2, $NaBH_4$ ve B_2O_3 ön muameleleri büyük oranda lignin indirgenmesiyle sonuçlanmıştır. En yüksek glukan dönüşüm oranı NaOH muamelesinde elde edilirken (%79.7) bunu $NaBH_4$ (%74.1), H_2O_2 (%71.9), mantar ön muamelesi (%69.4), B_2O_3 (%65.5) ve H_2SO_4 (%46.1) izlemiştir. Muamele edilmemiş göl kamışından en yüksek verim NaOH ile ön muamele edilmiş örneklerde elde edilmiştir (13.2 g/100 g) ve ayrıca teorik olarak da en yüksek verim yine bu örneklerde hesaplanmıştır (%85.3). Mantar ve $NaBH_4$ ile muamele edilmiş örnekler sırasıyla 10.6 ve 12.3 g/100 g etanol verim vermişlerdir (muamele edilmemiş göl kamışına oranla). Bu çalışmanın sonuçları, ekonomik fizibilite ve çevresel avantajlarından dolayı, göl kamışı için mantar ön muamelesinin biyo-etanol üretimi için oldukça uygun olduğunu göstermiştir. Fakat, düşük verim, karbonhidrat kaybı, uzun işlem süresi, yer ihtiyaçları ve mantar gelişim koşullarının titizlikle izlenmesi ihtiyacı gibi dezavantajlar uygulamayı kısıtlayabilir.

5. KAYNAKLAR

[1] J. I. Zerbe, "Energy properties of wood," in *Fuelwood Management and Utilization Seminar*, East Lansing, Miami, US, 1983, pp. 6-13.

[2] C. Güler ve M. Akgül, "Enerji üretiminde odun ve tarımsal artıkların değerlendirilmesi," *Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu ve Sergisi Bildiriler Kitabı*, Türkiye, pp. 12-13.

[3] M. Galbe and G. Zacchi, "A review of the production of ethanol from softwood," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, no. 6, pp. 618-628, 2002.

[4] Anonim, (27 Aralık 2008). [Online]. Erişim: http://www.abengoabioenergy.com/bioethanol/index.cfm?page=0&lang=1.

[5] Anonim, (27 Aralık 2008). [Online]. Erişim: http://www.esru.strath.ac.uk/EandE/Web_sites/0203/biofuels/what_bioethanol.htm#bio_production.

[6] I. Ballesteros, M. Ballesteros, A. Cabanas, J. Carrasco, C. Martin, M. J. Negro, F. Saez, and R. Saez, "Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 28-29, no. 1, pp. 307-315, 1991.

[7] J. Malça and F. Freire, "Renewability and life-cycle energy efficiency of bioethanol and bio-ethyl tertiary butyl ether (bioETBE): Assessing the implications of allocation," *Energy*, vol. 31, no. 15, pp. 3362-3380, 2006.

[8] A. Zarzyycki and W. Polska, "Bioethanol production from sugar beet-European and Polish perspective," in *The First TOSSIE Workshop on Technology Improvement Opportunities in The European Sugar Industry,* Ferrara, Italy, 2007, pp. 25-26.

[9] C. A. Cardona and O. J. Sánchez, "Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 12, pp. 2415-2457, 2007.

[10] K. N. V. Linoj, P. Dhavala, A. Goswami, and S. Maithel, "Liquid biofuels in South Asia: Resources and technologies," *Asian Biotechnol. Dev. Rev.*, vol. 8, no. 2, pp. 31-49, 2006.

[11] M. Balat, H. Balat, and C. Öz, "Progress in bioethanol processing," *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 551-573, 2008.

[12] S. Zarrilli, "The emerging biofuels market: regulatory, trade and development implications," in *UNCTAD—United Nations Conference on Trade and Development*, Geneva, Switzerland, 2006.

[13] Anonim, (27 Haziran 2008). [Online]. Erişim: www.swilion.nl/documenten/DSD Rapport.

[14] Anonim, (27 Haziran 2008). [Online]. Erişim: www.eubia.org.

[15] S. Yoosin and C. Sorapipatana, “A study of ethanol production cost for gasoline substitution in Thailand and its competitiveness,” *Thammasat Int. J. Sci. Technol.*, vol. 12, pp. 69-80, 2007.

[16] R. Pongsawatmanit, T. Temsiripong, and T. Suwonsichon, “Thermal and rheological properties of tapioca starch and xyloglucan mixtures in the presence of sucrose,” *Food Res. Int.*, vol. 40, no. 2, pp. 239-248, 2007.

[17] W. E. Mabee, D. J. Gregg, C. Arato, A. Berlin, R. Bura, N. Gilkes, O. Mirochnik, X. Pan, E. K. Pye, and J. N. Saddler, “Updates on softwood-to-ethanol process development,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 129, no. 1, pp. 55-70, 2006.

[18] H. Shigechi, J. Koh, Y. Fujita, T. Matsumoto, Y. Bito, M. Ueda, E. Satoh, H. Fukuda, and A. Kondo, “Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and alpha-amylase,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 8, pp. 5037-5040, 2004.

[19] L. Mojovic´, S. Nikolic´, M. Rakin, and M. Vukasinovic´, “Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates,” *Fuel*, vol. 85, no. 12-13, pp. 1750-1755, 2006.

[20] T. Granström, H. Ojamo, and M. Leisola, “Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 55, no. 1, pp. 36-42, 2001.

[21] H. Gruppen, R. J. Hamer, and A. G. J. Voragen, “Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans,” *J. Cereal Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 53-67, 1992.

[22] P. V. Gurgel, I. M. Mancilha, R. P. Peçanha, and J. F. M. Siqueira, “Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolyzate,” *Bioresour. Technol.*, vol. 52, no. 3, pp. 219-223, 1995.

[23] L. Saulnier and J. F. Thibault, “Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 79, no. 3, pp. 396-402, 1999.

[24] S. Eda, A. Ohnishi, and K. Katö, “Xylan isolated from the stalk of *Nicotiana tabacum*,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 40, no. 2, pp. 359-364, 1976.

[25] J. D. McMillan, M. E. Himmel, J. O. Baker, and R. P. Overend, “Pretreatment of lignocellulosic biomass,” in *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Washington, US: American Chemical Society, 1994, pp. 292-324

[26] F. J. M. Kormelink and A. G. J. Voragen, “Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, no. 5, pp. 688-695, 1993.

[27] S. Yaman, “Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 45, no. 5, pp. 651-671, 2004.

[28] Anonim, (22 Haziran 2008). [Online]. Erişim: www.ethanol-gec.org/information/briefing/20a.

[29] M. Ladisch, N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, and L. Y. Y. M.

Holtzapple, “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass,” *Bioresour. Technol.*, vol. 96, no. 6, pp. 673-686, 2005.

[30] S. J. Patel, R. Onkarappa, and K. S. Shobha, “Fungal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production.,” *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, vol. 6, no. 4, pp. 1921-1926, 2007.

[31] A. K. Chandel, C. Es, R. Rudravaram, M. L. Narasu, V. Rao, and P. Ravindra, “Economics and environmental impact of bioethanol production technologies : An appraisal,” *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 2, no. 1, pp. 14-32, 2007.

[32] D. B. Rivers and G. H. Emert, “Lignocellulose pretreatment: A comparison of wet and dry ball attrition,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 365-368, 1987.

[33] H. H. Brownell and J. N. Saddler, “Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 29, no. 2, pp. 228-235, 1987.

[34] L. Zhang, T. Wang, S. Jiao, C. Hao, and Z. Mao, “Effect of steam-explosion on biodegradation of lignin in wheat straw,” *2007 ASAE Annual Meeting*, Michigan, US, 2007.

[35] H. Alizadeh, F. Teymouri, T. I. Gilbert, and B. E. Dale, “Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX),” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 124, no. 1-3, pp. 1133-1142, 2005.

[36] I. Indacoechea, S. Bolado, M. T. Garcia-Cubero, and R. Diez, “Pretreatment processes of lignocellulosic material for bioethanol conversion: ozonolysis,” in *17th International congress of chemical and process engineering*, Chisa, Prague, 2006.

[37] K. H. Kim and J. Hong, “Supercritical CO2 pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis,” *Bioresour. Technol.*, vol. 77, no. 2, pp. 139-144, 2001.

[38] R. A. Silverstein, Y. Chen, R. R. Sharma-Shivappa, M. D. Boyette, and J. Osborne, “A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks,” *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 16, pp. 3000-3011, 2007.

[39] P. Champagne, “Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 50, no. 3, pp. 211-230, 2007.

[40] C. N. Hamelinck, G. van Hooijdonk, and A. P. C. Faaij, “Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses,” Utrecht University, Copernicus Institute, Science Technology Society, US, Rep. NWS-E-2003-55, 2003.

[41] S. J. B. Duff and W. D. Murray, “Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review,” *Bioresour. Technol.*, vol. 55, no. 1, pp. 1-33, 1996.

[42] B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, and G. Zacchi, “Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today,” *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 12, pp. 549-556, 2006.

[43] H. H. Brownell and J. N. Saddler, “Steam-explosion pretreatment for enzymatic

hydrolysis," in *Biotechnology and Bioenineering. Symposium*, 1984, pp. 55-68.

[44] T. Jeoh, "Steam explosion pretreatment of cotton gin waste for fuel ethanol production," M.S. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, US, 1998.

[45] Y. J. Lee, "Oxidation of sugarcane bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide," M.S. Thesis, Department of Food Science, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, US, 2005.

[46] J. C. Parajó, D. Vázquez, J. L. Alonso, V. Santos, and H. Dominguez, "Prehydrolysis of eucalyptus wood with dilute sulphuric acid: Operation at atmospheric pressure," *Holz als Roh- und Werkst.*, vol. 51, no. 5, pp. 357-363, 1993.

[47] M. Kurakake, K. Ouchi, W. Kisaka, and T. Komaki, "Production of L-arabinose and xylose from corn hull and bagasse," *J. Appl. Glycosci.*, vol. 52, no. 3, pp. 281-285, 2005.

[48] L. C. Teixeira, J. C. Linden, and H. A. Schroeder, "Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel," *Renew. Energy*, vol. 16, no. 1-4, pp. 1070-1073, 1999.

[49] D. L. Brink, "Method of treating biomass material," US. 5221357, Jun, 22, 1993.

[50] M. Z. Hussein, M. B. Abdul Rahman, A. H. Yahaya, Y. H. Taufiq-Yap, and N. Ahmad, "Oil palm trunk as a raw material for activated carbon production," *J. Porous Mater.*, vol. 8, no. 4, pp. 327-334, 2001.

[51] M. C. Dale and M. Moelhman, "Enzymatic simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass to ethanol in a pilot 130 l multistage continuous reactor separator," in *9th Biennial Bioenergy Conference*, 2001, pp. 15-19.

[52] K. Karimi, G. Emtiazi, and M. J. Taherzadeh, "Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 1, pp. 138-144, 2006.

[53] M. P. Tucker, K. H. Kim, M. M. Newman, and Q. A. Nguyen, "Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 105-108, pp. 165-178, 2003.

[54] R. A. Silverstein, "A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol," M.S. Thesis, Department of Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University, North Carolina, US, 2004.

[55] B. C. Saha and M. A. Cotta, "Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw," *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 2, pp. 449-453, 2006.

[56] N. S. Mosier, C. M. Ladisch, and M. R. Ladisch, "Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 79, no. 6, pp. 610-618, 2002.

[57] A. Demirbaş, “Ethanol from cellulosic biomass resources,” *Int. J. Green Energy*, vol. 1, no. 1, pp. 79-87, 2004.

[58] A. Demirbaş, “Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass,” *Energy Sources*, vol. 27, no. 4, pp. 327-337, 2005.

[59] Y. H. P. Zhang and L. R. Lynd, “Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non-complexed cellulase systems,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 88, no. 7, pp. 797-824, 2004.

[60] S. H. A. Rahman, J. P. Choudhury, A. L. Ahmad, and A. H. Kamaruddin, “Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose,” *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 3, pp. 554-559, 2007.

[61] P. Badger, “Ethanol from cellulose: A general review,” in *Trends in New Crops and New Uses*, Alexandria, VA, 2002, pp. 17-21.

[62] A. Demirbaş, “Global biofuel strategies,” *Energy Educ. Sci. Technol.*, vol. 17, no. 1/2, p. 27, 2006.

[63] A. Demirbaş, “Progress and recent trends in biofuels,” *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 1-18, 2007.

[64] Y. H. P. Zhang, M. E. Himmel, and J. R. Mielenz, “Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 5, pp. 452-481, 2006.

[65] R. L. Howard, E. Abotsi, van R. E. L. Jansen, and S. Howard, “Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production,” *African J. Biotechnol.*, vol. 2, no. 12, pp. 602-619, 2003.

[66] O. O. Oyekola, “The enzymology of sludge solubilisation under biosulphidogenic conditions: Isolation, characterisation and partial purification of endoglucanases.” M.S. thesis, Department of Biochemistry, Rhodes University, Grahamstown, SA, 2003.

[67] L. Heilinheimo, “*Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton,” in ESPOO 2002, Finland, 2002

[68] Y. Sun, “Enzymatic hydrolysis of rye straw and bermudagrass for ethanol production,” Ph.D dissertation, Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University, North Carolina, US, 2002.

[69] A. V. Gusakov, A. P. Sinitsyn, T. N. Salanovich, F. E. Bukhtojarov, A. V. Markov, B. B. Ustinov, C. van Zeijl, P. Punt, and R. Burlingame, “Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of Chrysosporium lucknowense,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 36, no. 1, pp. 57–69, 2005.

[70] E. X. F. Filho, M. G. Tuohy, J. Puls, and M. P. Coughlan, “The xylan-degrading enzyme systems of Penicillium capsulatum and *Talaromyces emersonii*,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 19, pp. 25, 1991.

[71] S. F. Lee and C. W. Forsberg, “Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 33, no. 11, pp. 1011-1016, 1987.

[72] K. Poutanen, M. Tenkanen, H. Korte, and J. Puls, “Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans,” in *Enzymes in Biomass Conversion*, Washington,

US: American Chemical Society, 1991, pp. 33-426.

[73] J. Gilbert and P. Hazlewood, “Review article bacterial cellulases and xylanases,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 139, pp. 187-194, 1993.

[74] B. C. Saha and R. J. Bothast, “Production of xylitol by *Candida peltata*,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 22, no. 6, pp. 633-636, 1999.

[75] B. C. Saha, B. S. Dien, and R. J. Bothast, “Fuel ethanol production from corn fiber current status and technical prospects,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 70, no. 1, pp. 115-125, 1998.

[76] X. Pan, C. Arato, N. Gilkes, D. Gregg, W. Mabee, K. Pye, Z. Xiao, X. Zhang, and J. Saddler, “Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 90, no. 4, pp. 473-481, 2005.

[77] S. Katahira, A. Mizuike, H. Fukuda, and A. Kondo, “Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1136-1143, 2006.

[78] G. G. Stewart and I. Russell, “Biochemistry and genetics of carbohydrate utilization by industrial yeast strains,” *Pure and Appl. Chem.*, vol. 59. pp. 1493-1500, 1987.

[79] B. S. Dien, M. A. Cotta, and T. W. Jeffries, “Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 63, no. 3, pp. 258-266, 2003.

[80] A. Mohagheghi, K. Evans, Y. C. Chou, and M. Zhang, “Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101.,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 98-100, pp. 885-898, 2002.

[81] T. W. Jeffries and Y. S. Jin, “Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts,” *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 47, pp. 221-268, 2000.

[82] R. J. Bothast and B. C. Saha, “Ethanol production from agricultural biomass substrates,” *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 44, pp. 261-286, 1997.

[83] H. Schneider, P. Y. Wang, Y. K. Chan, and R. Maleszka, “Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 3, no. 2, pp. 89-92, 1981.

[84] P. Y. Wang, C. Shopsis, and H. Schneider, “Fermentation of a pentose by yeasts,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 94, no. 1, pp. 248-254, 1980.

[85] C. S. Gong, L. F. Chen, M. C. Flickinger, L. C. Chiang, and G. T. Tsao, “Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 41, no. 2, pp. 430-436, 1981.

[86] B. Hahn-Hägerdal, S. Berner, and K. Skoog, “Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* using the respiratory inhibitor azide,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 4, pp. 287-293, 1986.

[87] B. S. Dien, C. P. Kurtzman, B. C. Saha, and R. J. Bothast, “Screening for L-arabinose fermenting yeasts,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 57, no. 1, pp.

233-242, 1996.

[88] L. F. Chen and C. S. Gong, “Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate to xylitol by a hydrolyzate-acclimatized yeast,” *J. Food Sci.*, vol. 50, no. 1, pp. 226-228, 1985.

[89] U. Saarela, K. Leiviskä, and E. Juuso, “Modelling of a fed-batch fermentation process,” University of Oulu, Oulu, Finland, Rep. 21, 2003.

[90] A. Frison, K. Memmert, and A. N. Pharma, “Fed-batch process development for monoclonal antibody production with cellferm-pro,” *Genet. Eng. Biotechnol. News*, vol. 22, pp. 66-67, 2002.

[91] P. W. Madson and D. B. Lococo, “Recovery of volatile products from dilute high-fouling process streams,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 84, pp. 1049-1061, 2000.

[92] P. Bajpai, P. K. Bajpai, M. Akhtar, and M. B. Jauhari, “Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi,” *J. Pulp Pap. Sci.*, vol. 27, no. 7, pp. 235-239, 2001.

[93] J. M. Hernández-Salas, M. S. Villa-Ramírez, J. S. Veloz-Rendón, K. N. Rivera-Hernández, R. A. González-César, M. A. Plascencia-Espinosa, and S. R. Trejo-Estrada, “Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 3, pp. 1238-1245, 2009.

[94] J. Y. Jung, J. S. Kim, S. Y. Ha, J. B. Nam, M. S. Choi, and J. K. Yang, “Evaluation of chemical treatment for glucose production from steam exploded reed (Phragmites australis),” in *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, San Diego, CA, 2015, pp. 112-113.

[95] Y. Çöpür, A. Tozluoglu, and Ö. Özyürek, “Sodium borohydrate ($NaBH_4$) pretreatment for efficient enzymatic saccharification of wheat straw,” *Bioresour. Technol.*, vol. 107, pp. 258-266, 2012.

[96] O. Akpinar, O. Levent, S. Sabanci, R. S. Uysal, and B. Sapci, “Optimization and comparison of dilute acid pretreatment of selected agricultural residues for recovery of xylose,” *BioRes.*, vol. 6, no. 4, pp. 4103-4116, 2011.

[97] P. Vaithanomsat, S. Chuichulcherm, and W. Apiwatanapiwat, “Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment,” *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, vol. 49, no. 1, pp. 140-143, 2009.

[98] D. Fengel and G. Wegener, *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, Berlin, Germany: Walter de Gruyter & Co., 1984.

[99] L. E. Wise and E. C. John, *Wood Chemistry*, vol. 1-2, New York, US: Reinhold Publ. Co, 1952.

[100] L. L. Villalba, “Biological modification of loblolly pine chips with *Ceriporiopsis subvermispora* prior to kraft pulping,” Ph.D dissertation, College of Environmental Science and Forestry, State University of New York, New York, US, 2003.

[101] R. Mendonça, A. Guerra, and A. Ferraz, “Delignification of Pinus taeda wood chips treated with Ceriporiopsis subvermispora for preparing high-yield kraft pulps,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 77, no. 4, pp. 411-418, 2002.

[102] E. Srebotnik, K. A. Jensen, S. Kawai, and K. E. Hammel, "Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structures by a one electron-oxidation-mechanism," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 11, pp. 4435-4440, 1997.

[103] S. K. Gulsoy and H. Eroglu, "Biokraft pulping of European black pine with *Ceriporiopsis subvermispora*," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 65, no. 4, pp. 644-648, 2011.

[104] L. Mardones, J. L. Gomide, J. Freer, A. Ferraz, and J. Rodríguez, "Kraft pulping of *Eucalyptus nitens* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 4, pp. 608-613, 2006.

[105] L. L. Villalba, G. M. Scott, and L. R. Schroeder, "An update on bio-kraft pulping," ESPRI, Berlin, Germany, Rep. 113, 2000.

[106] A. Ferraz, A. M. Córdova, and A. Machuca, "Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 32, no. 1, pp. 59-65, 2003.

[107] A. Guerra, R. Mendonça, and A. Ferraz, "Molecular weight distribution of wood components extracted from Pinus taeda biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 33, no. 1, pp. 12-18, 2003.

[108] R. M. Shrestha and N. Budhathoki, "The chemical compositions of *Rhododendron arboreum*, 'Laligunras," *J. Nepal Chem. Soc.*, vol. 30, pp. 97-106, 2012.

[109] X. F. Sun, F. Xu, R. C. Sun, P. Fowler, and M. S. Baird, "Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw," *Carbohydr. Res.*, vol. 340, no. 1, pp. 97-106, 2005.

[110] Y. Chen, R. R. Sharma-Shivappa, D. Keshwani, and C. Chen, "Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 142, no. 3, pp. 276-290, 2007.

[111] Z. Wang, D. R. Keshwani, A. P. Redding, and J. J. Cheng, "Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 10, pp. 3583-3585, 2010.

[112] S. C. Rabelo, N. A. A. Fonseca, R. R. Andrade, R. M. Filho, and A. C. Costa, "Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide," *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 7, pp. 2600-2607, 2011.

[113] Y. Çöpür and A. Tozluoğlu, "The effect of AQ and NaBH4 on bio-kraft delignification (*Ceriporiopsis subvermispora*) of brutia pine chips," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 60, no. 2, pp. 126-131, 2007.

[114] Y. Çöpür, A. Tozluoglu, and M. B. Uçar, "$NaBH_4$ pretreatment in bioethanol production of corn stalks," *J. Wood Chem. Technol.*, vol. 33, no. 2, pp. 125-143, 2013.

[115] Y. Çöpür, A. Tozluoglu, and M. Özkan, "Evaluating pretreatment techniques for converting hazelnut husks to bioethanol," *Bioresour. Technol.*, vol. 129, pp. 182-190, 2013.

[116] A. Tozluoglu, "The effects of boron derivatives as pretreatment chemicals for

biodegradation of sunflower stalks," *Maderas. Cienc. y Tecnol.*, In press.

[117] J. D. McMillan, "Bioethanol production: Status and prospects," *Renew. Energy*, vol. 10, no. 2-3, pp. 295-302, 1997.

[118] S. B. Kim, B. H. Um, and S. C. Park, "Effect of pretreatment reagent and hydrogen peroxide on enzymatic hydrolysis of oak in percolation process," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 91, no. 1, pp. 81-94, 2001.

[119] A. S. Schmidt and A. B. Thomsen, "Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw," *Bioresour. Technol.*, vol. 64, no. 2, pp. 139-151, 1998.

[120] D. J. Schell, J. Farmer, M. Newman, and J. D. McMillan, "Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor- investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 105-108, pp. 69-85, 2003.

[121] K. Grohmann, R. Torget, and M. Himmel, "Optimization of dilute acid pretreatment of biomass," in *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 1986, pp. 59-80.

[122] L. T. Fan, M. M. Gharpuray, and Y. H. Lee, *Cellulose hydrolysis. Biotechnology monographs. Volume 3*, Berlin, Germany: Springer-Verlag, New York, US, 1987.

[123] G. Antonopoulou, G. Dimitrellos, A. S. Beobide, D. Vayenas, and G. Lyberatos, "Chemical pretreatment of sunflower straw biomass: The effect on chemical composition and structural changes," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 6, no. 5, pp. 733-746, 2015.

[124] M. Gáspár, T. Juhász, Z. Szengyel, and K. Réczey, "Fractionation and utilisation of corn fibre carbohydrates," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 3-4, pp. 1183-1188, 2005.

[125] P. Martel and J. M. Gould, "Cellulose stability and delignification after alkaline hydrogen peroxide treatment of straw," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 707-714, 1990.

[126] A. M. Azzam, "Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation," *J. Environ. Sci. Heal. Part B*, vol. 24, no. 4, pp. 421-433, 1989.

[127] Y. Sun and J. J. Cheng, "Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production," *Bioresour. Technol.*, vol. 96, no. 14, pp. 1599-1606, 2005.

[128] M. J. Selig, T. B. Vinzant, M. E. Himmel, and S. R. Decker, "The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 155, no. 1, pp. 94-103, 2009.

[129] Y. H. Lee and L. T. Fan, "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Analysis of the initial rates," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 24, no. 11, pp. 2383-2406, 1982.

[130] H. K. Sreenath, R. G. Koegel, A. B. Moldes, T. W. Jeffries, and R. J. Straub, "Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment," *Process Biochem.*, vol. 35, no. 1-2, pp. 33-41, 1999.

[131] B. Yang and C. E. Wyman, “Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 86, no. 1, pp. 88-98, 2004.

[132] L. C. Duarte, F. Carvalheiro, S. Lopes, S. Marques, J. C. Parajó, and F. M. Gírio, “Comparison of two posthydrolysis processes of Brewery’s spent grain autohydrolysis liquor to produce a pentose-containing culture medium,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 113, pp. 1041-1058, 2004.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hakan Fidan

Doğum Tarihi ve Yeri : 07/08/1991 - Çanakkale

Yabancı Dili : İngilizce (YDS 72.5)

E-posta : hakanfidan17@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Orman Endüstri Müh. A.B.D.	Düzce Üniversitesi	2017
Lisans	Orman Endüstri Müh.	Düzce Üniversitesi	2015
Lise	Fen Bilimleri	Bayramiç Atatürk Lisesi	2009