

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELMA POSALARINDAN İKİNCİ NESİL BİYOETANOL ÜRETİMİ

Aybüke KUT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELMA POSALARINDAN İKİNCİ NESİL BİYOETANOL ÜRETİMİ

Aybüke KUT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Bu tez çalışmasında, yüksek şeker içeriğine sahip gıda ve meyve suyu endüstrisinin önemli bir atığı olan elma posasının enzimatik hidrolizinde çözünür soya unu proteininin kullanımının indirgen şeker ve biyoetanol üretimine etkisi araştırılmıştır. Fermentasyon deneylerinde *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kulyveromyces marxianus* mayaları kullanılmıştır. Fermentasyona etki eden önemli parametrelerden, başlangıç hammadde konsantrasyonu, optimum asit konsantrasyonu, besiyeri yıkamasının etkisi, farklı enzim konsantrasyonları ve çözünür soya unu proteini konsantrasyonu gibi önemli parametrelerin etkileri belirlenmiştir. Kullanılan her iki mayada da en yüksek etanol miktarı %20 elma posası varlığında bulunmuştur. Ek olarak hammadde olarak kullanılan elma posasının ön işlemi ile açığa çıkan indirgen şeker içeriği ile enzim hidrolizi ve biyoetanol miktarları belirlenmiştir. En yüksek biyoetanol konsantrasyonu 80 mg/g selüloz ile 60 FPU selülaz varlığında *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* için sırasıyla 53.18 ve 29.59 g/L olarak bulunmuştur. 80 mg/g selüloz çözünür soya unu proteini katkılanması sonucunda şeker miktarının %13.5, etanol miktarının ise *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* için sırasıyla %9.03 ve %20.92 arttığı saptanmıştır.

Haziran 2021, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Elma posası, biyoetanol, enzimatik hidroliz, çözünür soya unu proteini, fermentasyon, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*

ABSTRACT

Master Thesis

SECOND GENERATION BIOETHANOL PRODUCTION FROM APPLE POMACE

Aybüke KUT

Ankara University
Graduate School of Natural Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

In the current thesis study, effect of soluble soy protein on enzymatic hydrolysis of apple pomace which contains abundant sugar content and important by product of juice industry was investigated for reducing sugar and bioethanol production. *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* were used for bioethanol production. The effects of important parameters for fermentation such as initial biomass loading, optimum acid concentration, effect of biomass washing, different enzyme concentration and soluble soy protein amounts were determined. The highest ethanol contents were found in 20% apple pomace for both yeasts. Furthermore, reducing sugars that derived from pretreatment of apple pomace and bioethanol concentrations were determined. The highest bioethanol concentration was observed as 53.18 g/L and 29.59 g/L from *S. cerevisiae* and *K. marxianus*, respectively in the presence of 80 mg/g cellulose soluble soy protein and 60 FPU/g substrate enzyme loading. Moreover, it was detected that, addition of soluble soy protein increased reducing sugar amount by 13.5% and bioethanol concentrations 9.03% and 20.92% for the same yeasts.

June 2021, 69 pages

Key words: Apple pomace, bioethanol, enzymatic hydrolysis, soluble soy protein, fermentation, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*

TEŞEKKÜR

Gerçekleştirilen tez çalışmasının araştırılmasında bana öncülük eden, yardımlarını esirgemeyen ve desteğini her anımda yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmasının tüm aşamalarında beni yönlendiren bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve Öğr. Gör. Dr. Ekin Demiray'a (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu) desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi, Tübitak tarafından desteklenmiş olup, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Ankara Üniversitesi tarafından desteklenen "Elma Posalarından İkinci Nesil Biyoetanol Üretimi" konulu projem için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Değerli lisansüstü arkadaşlarım Nazlıhan TEKİN, Esra ERKOÇ, Danial NASSOUHI ve Dilara DİLBAZ'a manevi destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve desteğini her daim hissettiğim değerli arkadaşım Ahmet YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca yanımda olan, aldığım her kararda desteklerini esirgemeyip beni cesaretlendiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Sunay KUT'a, sevgili babam Coşkun KUT'a ve sevgili kardeşim Zeynep KUT'a sonsuz teşekkür ederim.

Aybüke KUT
Ankara, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGE DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Etanolün Özellikleri.....	4
2.2 Biyoetanol Üretimi	5
2.3 Türkiye ve Dünya’da Biyoetanol Üretimi ve Tarihçesi.....	9
2.4 Üretildiği Hammadde İçeriğine Göre Biyoetanol Nesilleri.....	10
2.5 Lignoselülozik Yapının Parçalanması İçin Uygulanan Ön-işlem Yöntemleri .	15
2.5.1 Fiziksel ve fizikokimyasal ön-işlemler	15
2.5.2 Kimyasal ön-işlem.....	17
2.5.3 Biyolojik ön-işlem	20
2.5.4 Fermentasyon stratejileri.....	22
2.6 Biyoetanol Üretiminde Başlıca Kullanılan Mikroorganizmalar.....	23
2.6.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.6.2 <i>Kluyveromyces cerevisiae</i>	24
2.6.3 <i>Pichia stipitis</i>	25
2.6.4 <i>Zymomonas mobilis</i>	26

2.6.5 Etanol üretimi yapan diğer mikroorganizmalar	26
2.7 Farklı Hammaddelerde Biyoetanol Üretimi ile İlgili Çalışmalar.....	27
2.7.1 Birince nesil hammaddelerden biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar	27
2.7.2 İkinci nesil hammaddelerde biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar	28
2.7.3 Üçüncü nesil hammaddelerde biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar	29
2.7.4 Dördüncü nesil hammaddelerde biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar	30
3. MATERYAL ve METOT	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmaların kaynağı.....	31
3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan hammadde kaynağı	31
3.2 Yöntem	31
3.2.1 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri	31
3.2.2 Ön-işlem için optimum asit konsantrasyonunun belirlenmesi	32
3.2.3 Optimum elma posası konsantrasyonunun belirlenmesi	32
3.2.4 Elma posası atıklarında enzimatik hidrolizin ve farklı besiyeri konsantrasyonlarının biyoetanol üretimine etkisi	32
3.2.5 Biyoetanol üretiminde farklı enzim konsantrasyonlarının etkisi	32
3.2.6 Çözünür soya proteinin hazırlanması	33
3.2.7 Fermentasyon deneyleri	33
3.3 Analitik Yöntemler	34
3.3.1 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi	34
3.3.2 Elma posasındaki indirgen şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi	34
3.3.3 Şeker tiplerinin ve konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	34
3.3.4 Selüloz aktivitesinin belirlenmesi	35
3.3.5 Selüloz tayini.....	35

3.3.6 Kinetik parametrelerde kullanılan denklemler	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1 Ön-işlem Yöntemlerinin Etanol Üretimi Üzerindeki Etkileri.....	37
4.2 Elma Posasının İçeriğindeki İndirgen Şeker Tiplerinin Belirlenmesi	38
4.3 Başlangıç Elma Posası Konsantrasyonunun Belirlenmesi	39
4.4 Farklı Besiyeri Kompozisyonlarının Ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi	41
4.5 Artan Enzim Konsantrasyonlarının İndirgen Şeker Ve Etanol Üretimine Etkisi.....	44
4.6 Çözünür Soya Unu Proteininin İndirgen Şeker Ve Etanol Üretimine Etkisi....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
5.1 Ön-İşlem Yöntemlerinin Etanol Üretimine Etkisi	52
5.2 Elma Posasının İçeriğindeki İndirgen Şeker Tiplerinin Belirlenmesi	52
5.3 Başlangıç Elma Posası Konsantrasyonunun Etanol Üretimine Etkisi.....	53
5.4 Farklı Besiyeri Kompozisyonlarının Ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi	54
5.5 Artan Enzim Konsantrasyonlarının İndirgen Şeker Ve Etanol Üretimine Etkisi.....	55
5.6 Çözünür Soya Unu Proteininin Etanol Üretimine Etkisi	56
5.7 Sonuç Ve Öneriler	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ATP	Adenozin trifosfat
°C	Santigrat derece
C ₂ H ₅ OH	Etanol
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CO ₂	Karbondioksit
cm	Santimetre
dH ₂ O	Distile su
g	Gram
h	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
L	Litre
mg	Miligram
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
NaCl	Sodyum klorür
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	Sodyum klorür
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat

nm	Nanometre
<i>p</i>	İstatiksel anlamlılık değeri
rpm	Dakikadaki devir
T	Sıcaklık
ZnSO ₄	Çinko sülfat
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

ADH	Alkol dehidrojenaz enzimi
CBP	İyileştirilmiş biyolojik işlem
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	Dinitrosalisilik asit
EROI	Yatırımın enerjiye dönüşüm oranı
FID	Alev iyonlaştırıcı dedektör
FPU	Filtre kağıdı birimi (filiter paperrase unit)
GC	Gaz kromatografisi
GPY	Glukoz pepton maya özütü
GRAS	Genellikle güvenli kabul edilen mikroorganizma
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IL	İyonik sıvılar
SHF	Ayrılmış hidroliz ve fermentasyon
SSF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon
SSCF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Etanolün biyoteknolojik üretimi	6
Şekil 2.2 <i>Pichia stipitis</i> 'te Pentoz Fosfat Yolağı ve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da Embden Meyerhoff Yolağı	7
Şekil 2.3 <i>Zymomonas mobilis</i> 'te Entner – Doudoroff Yolağı.....	8
Şekil 2.4 Lignoselülozun yapısı	15
Şekil 4.1 %20 elma posası varlığında ve farklı asit konsantrasyonlarında <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> 'da etanol üretimi	37
Şekil 4.2 <i>S.cerevisiae</i> 'de farklı konsantrasyonlardaki ilk elma posası yüklemelerinde başlangıç şeker miktarı ve biyoetanol miktarı.....	39
Şekil 4.3 <i>K. marxianus</i> 'ta farklı konsantrasyonlardaki ilk elma posası yüklemelerinde başlangıç şeker miktarı ve biyoetanol miktarı	40
Şekil 4.4 <i>S. cerevisiae</i> 'nin farklı besiyeri ortamlarında harcanan şeker ve etanol üretimi. (a) Yıkanmış katı fraksiyon, (b) Katı-sıvı tüm fraksiyon.....	42
Şekil 4.5 <i>K. marxianus</i> 'un farklı besiyeri ortamlarında harcanan şeker ve etanol üretimi. (a) Yıkanmış katı fraksiyon, (b) Katı-sıvı tüm fraksiyon.....	43
Şekil 4.6 <i>S. cerevisiae</i> 'ta farklı ÇSUP konsantrasyonlardaki etanol üretimi	49
Şekil 4.7 <i>S. cerevisiae</i> 'ta farklı ÇSUP konsantrasyonlardaki etanol üretimi	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Etanolün Kimyasal Özellikleri.....	5
Çizelge 2.2 Birinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve enerji verimleri	11
Çizelge 2.3 İkinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve enerji verimleri.....	13
Çizelge 2.4 Biyoetanol üretiminde kullanılan nesillerin avantajları ve dezavantajları...	14
Çizelge 4.1 Enzimatik hidroliz öncesi ve Enzimatik hidroliz sonrası elma posasındaki şeker yüzdeleri.....	38
Çizelge 4.2 %20 başlangıç elma posası konsantrasyonlarındaki kinetik parametre sonuçları	41
Çizelge 4.3 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunda 72 saat sonunda enzimatik hidroliz sonucunda ortama salınan indirgen şeker miktarları.....	44
Çizelge 4.4 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunda dört farklı enzim konsantrasyonunda üretilen en yüksek etanol miktarları (g/L).....	45
Çizelge 4.5 Farklı asit konsantrasyonlarında <i>S. cerevisiae</i> ve <i>K. marxianus</i> mayalarına ait kinetik parametre verileri	46
Çizelge 4.6 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunun artan çözünür soya unu konsantrasyonunda belirlenen indirgen şeker konsantrasyonları (g/L).....	47
Çizelge 4.7 %20 katı-sıvı elma posası ortamında ve artan çözünür soya unu proteini konsantrasyonunda üretilen en yüksek etanol miktarı	48
Çizelge 4.8 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunda <i>S. cerevisiae</i> ve <i>K. marxianus</i> mayalarına ait bazı kinetik parametreler	51

1. GİRİŞ

Son yıllarda insan nüfusundaki hızlı artış, hızlı sanayileşme ve fosil bazlı yakıtların kullanımı nedeniyle enerji krizi ve küresel ısınma gibi büyük problemlerle karşı karşıya kalınmıştır. Bu iki büyük nedenden dolayı yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynakları arayışı ve kullanımı hız kazanmıştır (Medipally vd. 2015). Uzun yıllardır fosil yakıtlara alternatif olabilecek rüzgâr, jeotermal, güneş, biyokütle gibi enerji kaynaklarının kullanılmasının yanında son dönemlerde biyokütle tabanlı enerji üretimi ile ilgili çalışmalar artmıştır (Srilatha vd. 2018). Tarımsal, endüstriyel ve evsel atıklar gibi biyolojik olarak parçalanabilen biyokütleler kullanılarak biyoyakıt (biyodizel, biyoetanol, bütanol, metanol gibi) üretimi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Mehani ve Boucekima 2018).

Biyoetanol, fosil yakıtlara göre içerdiği yüksek oksijen miktarı, düşük CO₂ ve CO emisyonundan dolayı çevre dostu bir yakıttır. Fosil yakıtlardan farklı olarak içerdiği oksijen nedeniyle yüksek yanma hızına sahiptir (Mehani ve Boucekima 2018). Biyoetanol, benzine kıyasla yüksek oktan sayısına sahip olmasından dolayı yüksek basınca dayanıklıdır ve yüksek buharlaşma ısısına sahip olması gibi önemli özellikleri sayesinde umut vaat eden bir yakıttır (Hanh-Hagerdal vd. 2006).

Biyoetanolün fosil yakıtlara göre bir diğer önemli avantajı ise düşük maliyete sahip olmasıdır. Bu durumun en temel sebebi ise biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerin ucuz olmasıdır (Zhang vd. 2010). Kullanılan hammaddelerin içeriğine göre biyoetanol üretimi farklı nesillere ayrılabilir. Birinci nesilde bulunan mısır, buğday, pirinç gibi hammaddeler gıda endüstrisinde de kullanılması, gıda krizine ve büyük tarım arazilerine ihtiyaç duyulması gibi nedenlerden dolayı çok fazla tercih edilmez. İkinci nesil biyoetanol üretiminde ise; lignoselülozik hammaddeler kullanılmaktadır. Lignoselülozik hammaddeler genellikle tarımsal, endüstriyel ve evsel atıklardan elde edildiği için birinci nesil etanol üretimine göre ucuz ve avantajlıdır çünkü gıda-yakıt sorununu ortadan kaldırmaktadır. Üçüncü nesil biyoetanol üretimi; algal biyokütle kullanılarak gerçekleştirilir. Fakat biyoetanol üretimi için yüksek miktarda biyokütleye ihtiyaç olması, uzun sürede algal biyokütlenin üremesi ve üretim maliyetinin artması gibi dezavantajlara sahiptir (Leong vd. 2018).

Son yıllarda yoğun olarak kullanılmaya başlanan dördüncü nesil biyoetanol üretimi metabolizma mühendisliği ile mikroorganizmaların genetiği değiştirilerek biyoetanol üretim verimi arttırılmaya başlanmıştır. Fakat ilk yatırım maliyetinin fazla olması, araştırma süresinin uzun olması gibi bir takım sorunlara neden olmaktadır (Dutta vd. 2014).

Son yıllarda ikinci nesil biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Tarımsal, endüstriyel ve orman atıkları gibi işlenmiş ve yoğun fermente edilebilir şeker bulunduran lignoselülozik hammaddelerin ucuz ve bol bulunmaları ikinci nesil üretim yönteminin tercih edilmesine yol açmaktadır. Lignoselülozun içeriğindeki selüloz ve hemiselülozun yapısında bulunan oligosakkarit yapıdaki şekerlerin monomerik şekerlere dönüştürülmesi ile biyoetanol üretimi gerçekleştirilir (Sluiter vd. 2010). Bu oligosakkarit yapıdaki şekerleri çeşitli ön işlem yöntemleriyle mikroorganizmaların kullanabileceği beş ve altı karbonlu şekerlere dönüştürülmesi üretim maliyetinin artmasına neden olmaktadır (Sanchez ve Cardona 2008). Bu problemleri ortadan kaldırmak için ikinci nesil biyoetanol üretimi ile ilgi daha fazla çalışma yapılmasını zorunlu kılmaktadır.

Elma (*Malus domestica*) Rosaceae ailesi üyesi, dünyanın ılıman iklimlere sahip bölgelerinde yetiştirilen bir meyvedir. Kafkas, Orta Asya, Himalaya, Hindistan, Pakistan'da uzun yıllardır yetiştirilmektedir. Dünyanın en büyük üreticileri arasında Çin, ABD, Türkiye ve Polonya bulunmaktadır. Türkiye'de farklı iklim bölgelerinde yaygın olarak elma üretimi gerçekleştirilir (Ertunç 2019; Öz vd.2020).

Elma üretimi son 10 yılda dünya çapında önemli ölçüde artmıştır. 2018 yılında dünyada yaklaşık olarak 85 milyon tondan fazla elma üretildiği tahmin edilmektedir. Ülkemizde ise 2018 yılında 3.625.960 ton elma üretilmiştir (Öz vd. 2020). Elma, meyve suyu endüstrisinde kullanılan önemli bir hammaddedir. Endüstride kullanılan elmaların %20 ile %40'ı posa olarak ayrılmaktadır (Floberg Karlsson ve Viita 2019). Bu nedenle 2018 yılında Türkiye'de yaklaşık olarak 725.192-1.450.384 ton elma posasının oluşacağı hesaplanabilir.

Elma posası içeriğinde yüksek miktarda şeker içerir ve bu durum mikroorganizma gelişimi için önemli bir avantaja sahiptir. Dünya çapında biyoetanol üretimi, bütanol üretimi, antioksidan, organik asit oluşumu, enzim oluşumu, mikrabiyal yağ ve mantar yetiştiriciliği gibi birçok biyoteknolojik alanda çalışmalar bulunmaktadır. Elmanın yapısında bulunan bileşiklerin çoğu; çözünmeyen karbonhidratlar (selüloz, hemiselüloz, lignin gibi), basit şekerler (fruktoz, glukoz, sükroz, ksiloz), mineral, vitamin ve az miktarda asit posada kalır (Jin vd. 2019; Cargnin ve Gnoatto 2017). Elma posasının içeriğinin zengin olması fermentasyon için uygun bir hammadde olduğunu göstermiş ve yapılan tez çalışması kapsamına alınmıştır.

Etanol üretimi için lignoselülozik yapının parçalanmasında ve monomerik ve oligomerik şekerlerin açığa çıkmasında enzimatik hidroliz önemli bir parametredir. Enzimatik hidroliz ile lignin ve hemiselülozik yapı çözünmesi sağlanarak, kristal yapıdaki selülozun çözünür hale gelmesi sağlanır (Littlewood vd. 2013). Enzim konsantrasyonunu azaltıp, etanol üretimini arttırmak için bazı yüzey aktif maddeler (Tween 80, PEG gibi) yardımıyla enzim ve lignin arasındaki verimsiz bağları bloke etmek için kullanılmaktadır (Seo vd. 2011).

Yüzey aktif maddelerin yüksek maliyetleri nedeniyle verimsiz bağları bloke edecek düşük maliyetli maddeler yoğunlukla araştırılmaktadır. Enzim maliyetini azaltarak etanol verimini arttırmak için soya unu proteini gelecek vadeden bir materyaldir. Bu nedenle yapılan tez çalışmasında, çözünür soya unu proteininin elma posasının enzimatik hidrolizine ve nihai son ürün olan etanol üretimine olan etkileri araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında yüksek fermente şekerlere sahip elma posası atığı kullanılarak iki farklı maya varlığında (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus*) biyoetanol üretim verimlerine bakılmıştır. Farklı ön işlem yöntemleri, farklı besiyeri ortamları, enzimatik hidroliz, fermentasyon gibi önemli parametreler kullanılarak biyoetanol verimine bakılmıştır. Çözünür soya unu proteininin katkılanması ile biyoetanol üretiminin arttırılabileceği ilk kez gösterilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Etanolün Özellikleri

Etanol, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ molekül formülüne ve 46.07 molekül ağırlığına sahip, renksiz, uçucu ve yanıcı özelliklere sahip bir alkoldür. İçerdiği hidroksil grubu sayesinde oksidasyon, dehidratasyon, ester oluşumu ve halojenasyon gibi endüstriyel açıdan önemli kimyasal reaksiyonlara kolayca girebilme özelliğine sahiptir (Küüt vd. 2019). Etanol, su, asetik asit, aseton, eter, etilen, glikol, toluen ve gliserol gibi birçok organik çözücü ile kolaylıkla karıştırılabilir (Baeyens vd. 2015).

Biyoetanol, 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında ortaya çıkan yakıt krizi nedeniyle fosil yakıtlara alternatif yakıt olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapısındaki oksijen sayesinde CO ve CO_2 emisyonunu, hava kirliliğine sebep olan yanmış hidroksil miktarını azaltır. Biyoetanolün buharlaşma ısısı benzine göre yüksek olması verimi ve enerji çıkışını artırır. Benzine kıyasla yüksek oktan sayısına sahip olması yüksek sıkıştırma oranına ve kısa sürede tutuşmasıyla yüksek enerji verimine de sahiptir(Wyman 2018). Benzine farklı oranlarda biyoetanol karıştırılarak oktan sayısının artmasıyla (etil tersiyer bütül eter (ETBE) ile toksik etkisi azaltılır) verimlilik sağlanmaktadır. Biyoetanol hacimce %5, %10 ve %85 (E5-E85) benzinle karıştırılabilir. E85 yalnızca esnek yakkıtlı taşıtlarda kullanılırken E5 ve E10 herhangi motorlu taşıtlarda kullanılabilir(Bušić vd. 2018).

Biyoetanolün yakıt olarak kullanılmasının avantajı gibi bazı sorunlara da neden olabilir. Higroskopik olma özelliğinden dolayı yakıt pompası veya enjektörde korozyon etkiye neden olur. Buharlaşma ısısının yüksek olması soğuk havalarda motorun çalışmasında probleme yol açar. Etanol su ile karıştırılabilir fakat yağ ile karışmadığı için motorda arızalara neden olan emülsiyon oluşumu için yüksek potansiyele sahiptir(Bušić vd. 2018). Etanole ait bazı özellikler çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Etanolün Kimyasal Özellikleri (Bušić vd. 2018)

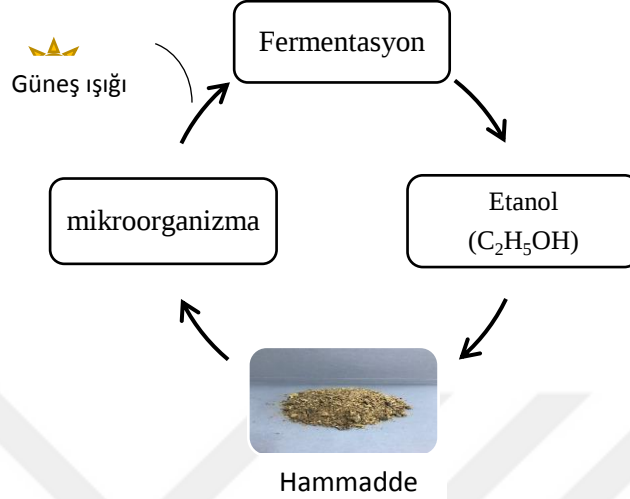
Özellikler	Benzin	Etanol
Kimyasal Formül	C_nH_{2n+2} (n=4-12)	C_2H_5OH
MolekülAğırlığı (g/mol)	100-105	46.07
Oktan Sayısı	88-100	108
Yoğunluk (kg/dm ³)	0.69-0.79	0.79
Kaynama Noktası/°C	27-225	78
Donma Noktası/°C	-22.2	-96.1
Parlama Noktası/°C	-43	13
Kendiliğinden Tutuşma Isısı/°C	272	440
Düşük Isınma Değeri*10 ³ /(kJ/kg)	30-33	21.1
Buharlaştırma Isısı/(kJ/kg)	289	854
Sudaki Çözünürlük	Çözünmez	Çözünür

2.2 Biyoetanol Üretimi

Etanol üretimi; petrokimyasal ve biyolojik olarak iki yolla üretilebilir. Petrokimyasal olarak üretilen etanol, etilenin hidrasyonu sonucu elde edilmektedir. Bu sentetik etanol üretiminde; etilen, hidroliz, fosforik asit veya seyreltik sülfürik asit gibi ön işlemlere maruz bırakılarak etanol elde edilir. Fakat bu yolla üretilen etanolün üretim miktarının düşük olması ve kullanılan hammaddelerin petrol bazlı olması gibi olumsuzluklardan dolayı yakıt üretimi için tercih edilmez (Küüt vd. 2019).

Biyolojik olarak etanol üretimi, yüksek şeker miktarına sahip bitkisel hammaddeler, endüstriyel atıklar, evsel atıklar ve zirai atıklar kullanılarak fermantatif mikroorganizma varlığında monosakkarit şekerlerin (beş ve altı karbonlu şekerler) etanol ve yan

ürünlere çeşitli metabolik yollar kullanılarak dönüştürülmesi ile meydana gelir (Phawan vd. 2018).



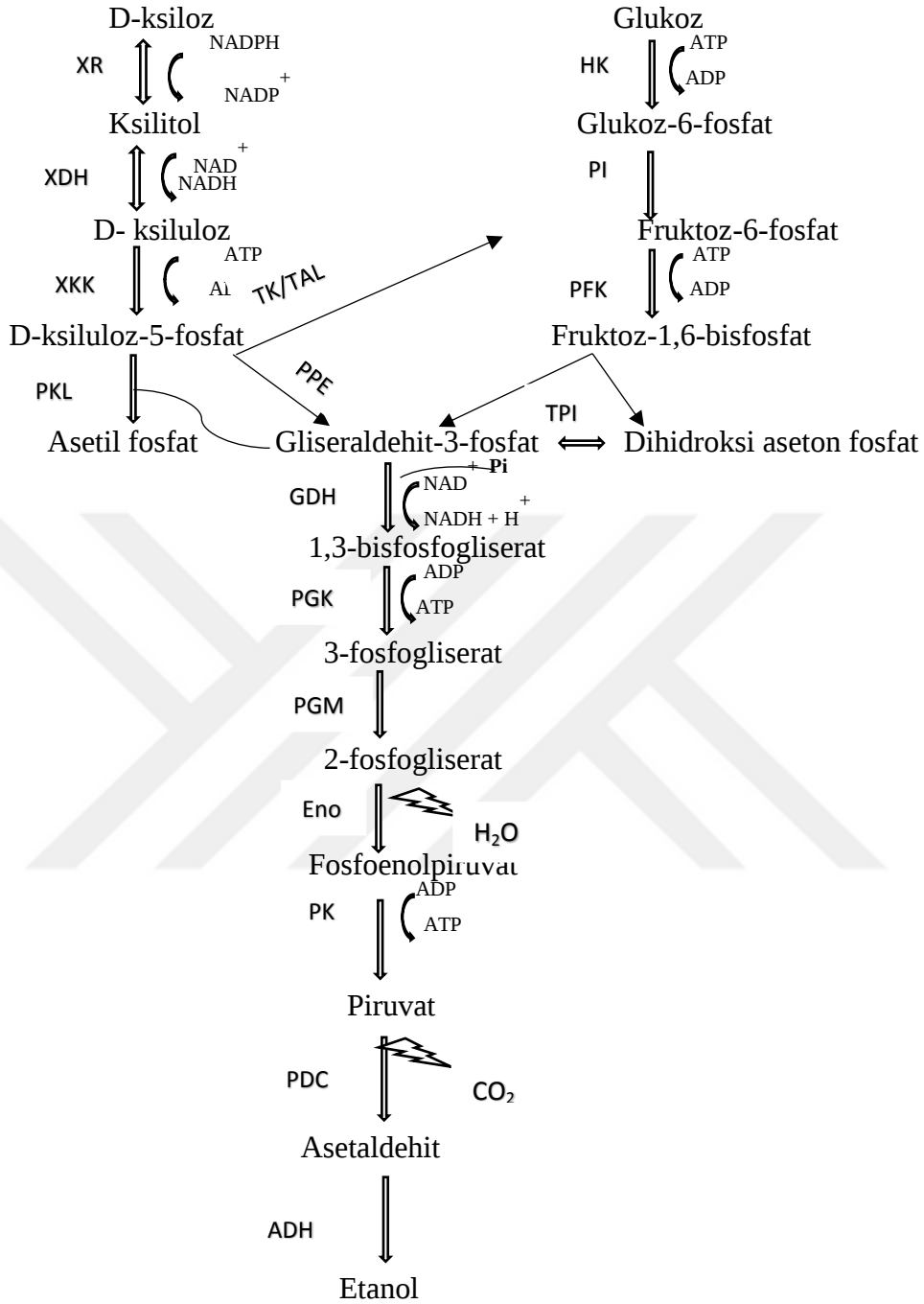
Şekil 2.1 Etanolün biyoteknolojik üretimi

Biyoetanol üretiminde, altı karbonlu şekerler (glukoz, fruktoz, galaktoz) Embden - Meyerhoff (EMP) metabolik yolağı kullanarak üretilir. Glukoz iki aşamalı olarak etanole dönüştürülür. İlk aşamada glukoz, ortak ara ürün olan glukoz-6-fosfat çevrilir ve ikinci aşamada ise glukoz-6-fosfat, son ürün pirüvata dönüştürülür (Şekil 2.1). Bu metabolik yolda son ürün mikroorganizmaya bağılı olarak değişir. Biyoetanol üretiminde önemli bir yere sahip olan *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* birçok maya bu yol ile son ürün olarak etanol ve CO₂ oluşturarak alkol fermantasyonu yaparlar (Azhar vd. 2016).

Beş karbonlu şekerlerden (ksiloz gibi) biyoetanol üretimi ise pentoz fosfat yolu (PPP) ile gerçekleştirilir. D-ksiloz, ksiloz kinaz (XK) enzimi ile D-ksiluloz-5-fosfata çevrilir. D-ksiloz-5-fosfat bazı enzimler (fosfopentoz epimeraz (PPE), transaldolaz (TAL) ve transketolaz (TK)) ile Embden - Meyerhoff (EMP) yolunda da kullanılan gliseraldehit-3-fosfata dönüştürülerek alkol fermantasyonu ile etanole dönüştürülür (Şekil 2.2). *Pichia stipitis*, *Candida shehate*, *Pachysolen tannophilus* gibi yalnızca beş karbonlu şekerleri metabolize edebilen mayalarda gözlemlenir (Rastogi ve Shrivastava 2017).

PPP

EMP

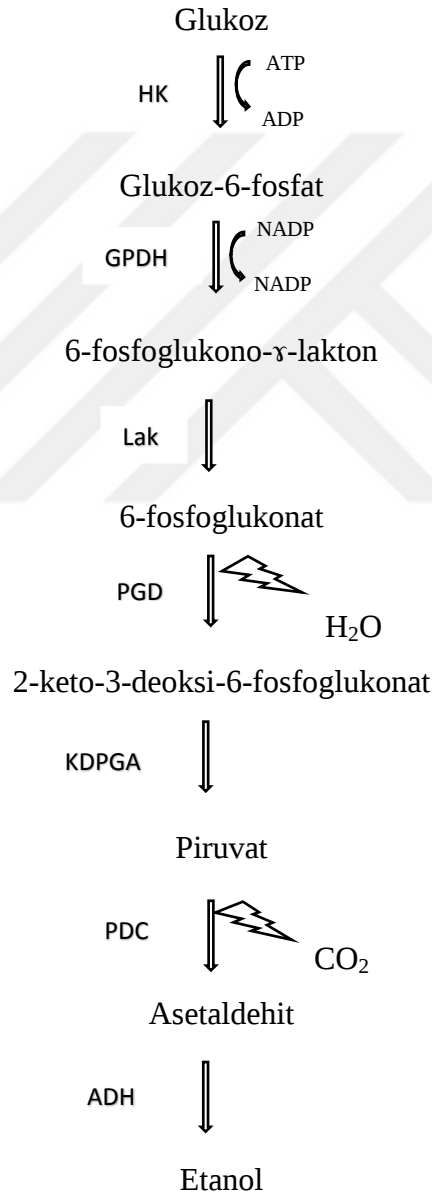


Şekil 2.2 *Pichia stipitis*'te Pentoz Fosfat Yolağı ve *Saccharomyces cerevisiae*'da Embden Meyerhoff Yolağı (Rastogi ve Shrivastava 2017)

*XR: ksiloz redüktaz, XDH: ksilitol dehidrogenaz, XKK: ksililokinaz, PKL: fosfoketolaz, TK: transketolaz, TAL: transaldolaz, PPE: fosfopentoz epimeraz, HK: glukokinaz PI: fosfoglukoz izomeraz, PFK: 6-fosfofrukto-1-kinaz, TPI: tri fosfat izomeraz GDH: gliseraldehit-3 fosfodehidrogenaz, PGK: fosfoglisarat kinaz PGM: fosfoglisarat mutaz Eno: enolaz, PDC: pirüvat dekarboksilaz, ADH: alkol dehidrognaz

Biyoetanol üretiminde kullanılan bir diğer metabolik yolak ise Entner – Doudoroff (EDP) yolağıdır. Bu metabolik yolağı, *Zymomonas mobilis* gibi biyoetanol üretiminde kullanılan gram negatif bakteriler glukozu etanole dönüştürürken kullanılır. Şekil 2.3 de gösterildiğı gibi glukoz, EDP yolunun önemli bir ara maddesi olan 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonata dönüştürülür. Daha sonra bu ara madde 2-keto-3deoksi-6-fosfoglukonat aldoz enzemi (KDPGA) ile pirüvata dönüşür. Pirüvat alkol dehidrogenaz (ADH) ile etanole dönüştürülür.

EDP



Şekil 2.3 *Zymomonas mobilis* 'te Entner – Doudoroff Yolağı (Xia vd. 2019)

*HK: glukokinaz, GPDH: glukoz-6-fosfoat dehidrogenaz, Lac: laktonaz, PGD: 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, KDPGA:2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat aldoz, PDC: piruvat dekarboksilaz

2.3 Türkiye ve Dünyada Biyoetanol Üretimi ve Tarihçesi

Birinci yüzyıl başlarında etanol yalnızca alkollü içeceklerin üretiminde kullanılmıştır. 1796 yılında Johann Tobias Lowitz tarafından aktif kömürden saf etanol üretilmiştir ve 1876 yılında Nicolaus Otto'nun içten yanmalı motorlarda yakıt olarak kullanılmaya başlanmıştır (Niphadkar vd. 2018). David Morris'e göre 1800'lerin sonunda Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 25 milyon galon etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. 1800'lerin sonunda patlak veren iç savaşlardan dolayı hükümet savaşı finanse edebilmek için etanole yüksek vergi uygulamış ve etanol endüstrisinin yok olmasına neden olmuştur (Jambo vd. 2016). 1900'lü yıllarda etanol ile tekrar çalışılmaya başlanmıştır ve Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın olarak kullanılmıştır. 1908 yılında Henry Ford tarafından geliştirilen Model – T arabalarında ilk olarak etanol ve benzini karıştırarak yakıt olarak kullanılmaya başlanmıştır. Birinci Dünya Savaşının patlak vermesiyle petrol bazlı yakıttan pahalı hale gelen etanole ilgi azalmıştır. 1927'den sonra Brezilya yakıt olarak etanol kullanımına başlamış ve 1930 yılına kadar sürmüştür. 1970 yılının sonlarında ortaya çıkan enerji krizine kadar biyoetanol kullanımı ihmal edilmiştir. (Mussatto vd. 2010, Azhar vd. 2017).

Brezilya'da 1975'te Ulusal Alkol Programı (ProAlcool) oluşturulmuş ve benzin yerine etanol kullanımı hedeflenmiştir. Brezilya hükümeti tarafından etanole olan arz ve talebi arttırmak için 1984'te yeni geliştirilen otomobillerin çoğu hidratlı etanol (%96 etanol, %4 su) ile çalışmaktaydı. 1999 yılında ise ProAlcool programı kademeli olarak yürürlükten kaldırıldı. Günümüzde Brezilya'da araçlar yakıt olarak benzine %25 etanol harmanlanarak kullanılmaktadır. İlk olarak Amerika Birleşik Devletleri tarafından uygulanmaya başlanan %10 etanol %90 benzin (E10) harmanı kullanılmaya başlanmış ve bu karışım "gasohol" olarak adlandırılmıştır. Esnek yakıtlı araçlarda ise bu oran benzine %85 etanol (E85) eklenerek kullanılmaya başlanmıştır (Solomon vd. 2007).

Günümüzde modern yakıt olarak kullanılan biyoetanol neredeyse tüm ülkelerde benzine farklı oranlarda karıştırılarak kullanılmaktadır. Avrupa'da %5 etanol (E5), Türkiye E3, ABD E10 veya E85, Kanada E10 veya E85, İsveç E5 ve E85, Hindistan E5, Avustralya E10, Tayland E10, Çin E10, Kolombiya E10, Peru E10, Paraguay E7, Brezilya E20 veya E25 olarak benzine etanolü karıştırarak yakıt olarak kullanılmaktadır. (Balat 2011)

Dünya genelinde 2016 yılında 26.504 milyon galon biyoetanol üretilmiştir. Dünya’da en büyük biyoetanol üreticileri 15.25 milyar galon (□ 57.7 milyar litre) ile A.B.D ve 7.3 milyar galon (□ 27.6 milyar galon) ile Brezilya’dır. A.B.D biyoetanol üretimi mısır ve buğday gibi nişastalı hammaddeler kullanmaktadır. Brezilya’da ise biyoetanol üretimi için şeker kamışı gibi şekerce zengin hammaddelerden üretilmektedir. Bu ülkeleri 845 milyon gallon (□3.2 milyar litre) ile Çin ve 436 milyon galon (□1.65 milyar galon) ile Kanada izlemektedir. Bu ülkeler biyoetanolü mısır, buğday, pirinç ve manyok gibi nişasta bakımından zengin hammaddelerden üretmektedir (Mohanty ve Swain 2019).

Türkiye’de aktif olarak biyoetanol üreten 12 tesis vardır. Bu tesislerden 3 tanesinde yakıt için biyoetanol üretimi yapılmaktadır. Yılda yaklaşık 171 milyon litre biyoetanol üretilmektedir. Türkiye’de biyoetanol üretimi için şeker pancarı, siyah kayış pekmezi gibi şekerce zengin hammaddeler ve mısır, buğday gibi nişastalı hammaddelerden üretilmektedir (Ozdingis ve Kocar 2018).

Yakın gelecekte fosil yakıtların tükenecek olması ve çevreye verdiği olumsuz etkiler nedeniyle alternatif, çevre dostu ve yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyokütle bazlı yakıtların araştırılmasına neden olmuştur. Yapılan araştırmalar sayesinde biyokütle bazlı yenilenebilir enerji kaynaklarından biyoetanol üretimi her yıl üstel olarak artış göstermektedir.

2.4 Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler

Fosil yakıtlarla kıyaslandığında, biyokütle tabanlı biyoetanol üretimi sürdürülebilir ve daha yaygındır. Dört farklı hammadde grupları kullanılarak biyoetanol üretimi yapılmaktadır. Birinci grup biyoetanol üretiminde en sık kullanılan hammaddeler arasında şeker kamışı, şeker pancarı, mısır, pirinç, buğday gibi gıda olarak da tüketilebilen materyaller bulunur (Jambo vd. 2016). Birinci nesil hammaddelerin içeriğine göre ikiye ayrılır. İlk grup nişasta içeriği bakımından zengin hammaddeler (buğday, mısır, pirinç, arpa, monyak vb.) ve ikinci grup ise şeker içeriği bakımından zengin hammaddelerdir (şeker kamışı, şeker pancarı, süpürge darısı gibi). Nişasta içeren hammaddelerden biyoetanol üretebilmek için sırasıyla öğütme, jelatinizasyon, hidroliz, fermentasyon ve damıtma adımları izlenerek gerçekleştirilir. şeren içeren

hammadelerden üretebilmek için ise jelatinizasyon ve hidroliz hariç adımlar izlenerek elde edilmektedir. Nişasta bazlı hammaddelere jelatinizasyon ve hidroliz uygulanmasının temel sebebi ise nişastadaki karbonhidrat zincirinin parçalanarak glukozla dönüştürmektir (Ayodele vd. 2020). Birinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerin gıda olarak ve hayvan yemi olarak kullanılmasından dolayı gıda ürünlerinin fiyatlarının artışına neden olmaktadır ve hammaddelerin üretimi sırasında fazla miktarlarda yetiştirilmeleri nedeniyle su kıtlığı ve toprakta bozulmalara yol açabilmektedir (Robak ve Balcarek 2018). Bu grup biyoetanol üretimi gıda sektörüyle rekabet içerisinde olduğu için üretim aşaması daha pahalıdır.

Çizelge 2.2 Birinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve enerji verimleri (Mat Aron vd. 2020)

Hammaddeler	Enerji Verimi (L/Kg)
Arpa	0.41
Mısır	0.4-0.46
Kassava	0.15-0.20
Yulaf	0.41
Pirinç	0.48
Sorgum	0.44
Buğday	0.40
Şeker kamışı	0.25-0.5

İkinci nesil biyoetanol, birinci neslin aksine gıda olarak kullanılmayan orman, tarım, belediye ve meyve suyu fabrikası atıkları gibi lignoselülozik hammaddeler kullanılarak üretilir (Veneses vd. 2017). Lignoselülozik hammaddeler birinci grup hammaddelere göre daha ucuzdur ve bol miktarda bulunur. Etanol üretiminde sıklıkla kullanılan lignoselülozik hammaddeler mısır koçanı, buğday, pirinç, arpa samanı, sorgum sapı

şeker kamışı küspesi gibi tarımsal atıklar ve gıda endüstri atıklarıdır. Tarımsal atıklar bol miktarda mevcuttur ve yılda yaklaşık 180 milyon tondan fazla biyokütle oluşmaktadır (Gupta vd. 2014). Lignoselülozik biyokütlenin yapısal bileşenleri selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektinden meydana gelmektedir.

Selüloz, bitki hücre duvarının ana yapısal bileşenidir. Yapısındaki glukoz moleküllerini birbirine bağlayan β -1,4 glukozit bağı içeren doğrusal polimerdir. Polimerler arasında bulunan hidrojen bağları nedeniyle kristal yapıda, lifli ve serttir. Selüloz suda çözünmez ve polimerizasyona karşı dirençli olmasının en temel sebebi kimyasal olarak kararlı ve mekanik olarak ise sağlam olmasıdır. Selüloz, lignin ve hemiselülozik yapılar ile bağlıdır. Selüloz dünyada en yaygın bulunan organik polimerdir ve lignoselülozik yapının %30-35'ini oluşturmaktadır. Lignoselülozik materyallerdeki yüksek selüloz içeriği biyoetanol üretimi için umut vaat eden bir koşuldur (Achinas ve Euverink 2016, Meneses vd. 2017).

Hemiselüloz, kısa, doğrusal ve dallanmış zincirlerden oluşan heteropolimerdir. Hemiselülozun içeriğinde bulunan ana monomerler arasında β -D-glukoz, α -D-galaktoz ve β -D-mannoz gibi heksoz şekerleri, β -D-ksiloz ve α -D-arabinoz gibi pentoz şekerlerinin yanısıra α -D-glukuronik asit, α -D-galakturonik asit ve α -D-4-O-metilgalakturonik asit gibi şeker asitlerinden oluşur. Hemiselülozik yapı çoğunlukla şekilsizdir. Hemiselülozik yapılar glukomannan, galaktoglukomannan ve ksilan gibi polisakkarit yapılar setil grupları ile bağlıdır. Hemiselülozun en yaygın tiplerinden D-ksilozun yaklaşık %90'ı ve D-arabinozun ise yaklaşık %10'u β -1,4 bağından oluşmaktadır (Zabet vd. 2016, Branco vd. 2019).

Lignoselülozik yapının bir diğer bileşeni olan pektin, bitkinin hücre duvarına sağlamlık katar. Ana bileşenleri galaktosilüronik asit, ramnoz, arabinoz ve galaktozdur. Pektin, hidrofilik özelliği sebebiyle yapışkan özelliğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde lignin ve polisakkaritler ile kovalent bağlarla çapraz bağlanan hücre duvarının yaklaşık %35'ini oluşturur (Saini vd. 2015).

Lignin, selülozdan sonra doğada en yaygın üçüncü polimerdir. Hemiselülozik ksilanlara kovalent bağlar ile bağlanmıştır ve bitki hücre duvarının asitliğinden ve sağlamlığından

sorumlu olan aromatik ve sert bir bileşiktir. Lignin temel olarak fenil-propionik alkol yani p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol monomerlerinden meydana gelir. Bitkilerdeki lignin oranı (Abo vd. 2019).

Ligninin parçalanmasından dolayı açığa çıkan fenolik gruplar selülotik enzimlerin hidrolizini engeller. Bununla birlikte, genetik mühendisliğiyle lignin modifikasyonu ile hücre duvarındaki lignin oluşumunu önemli ölçüde azaltması ve bu sayede etanol verimini arttırması sağlanmaktadır. Etanol üretimi için bu avantaj bitkilerin patojenlere ve böceklerle karşı geliştirdiği savunma mekanizmasını bozacağı için sorun teşkil edebilir (Kang vd. 2014).

Çizelge 2.3 İkinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve enerji verimleri (Mat Aron vd. 2020)

Hammaddeler	Enerji Verimleri
Mısır püskülü	5.85
Pirinç samanı	116.65
Arpa samanı	9.67
Saman	60-150
Hurma yağı atığı	109.600-172.100
Okaliptüs	0.612
Palmiye ağacı	0.0229

Üçüncü nesil biyoetanol üretiminde hammadde olarak fotosentetik organizmalar olarak mikro ve makro algler kullanılmaktadır. Mikroalgler yüksek lipid ve karbonhidrat içeriği, çeşitli sucul ortamlarda kolay yetiştirilebilme ve yüksek karbondioksit (CO₂) emisyonu nedenleriyle biyoetanol üretiminde alternatif olarak kullanılan bir hammaddedir. Kolay ve hızlı üremeleri, fotosentetik mikroorganizmaların çeşitli ortamlarda yaşamaları ve mikroalgler düşük lignin ve hemiselüloza sahip olmaları

biyoetanol üretiminde üçüncü nesil hammaddelerin avantajıdır (Jambo vd. 2016). Alg hücrelerinin ortamdaki toplanması için agregat maddelerinin kullanılması gerekebilir ve maliyetin artmasına neden olmaktadır. Bu durum üçüncü nesil biyoetanol üretimi için dezavantaja neden olmaktadır (Dutta vd. 2014).

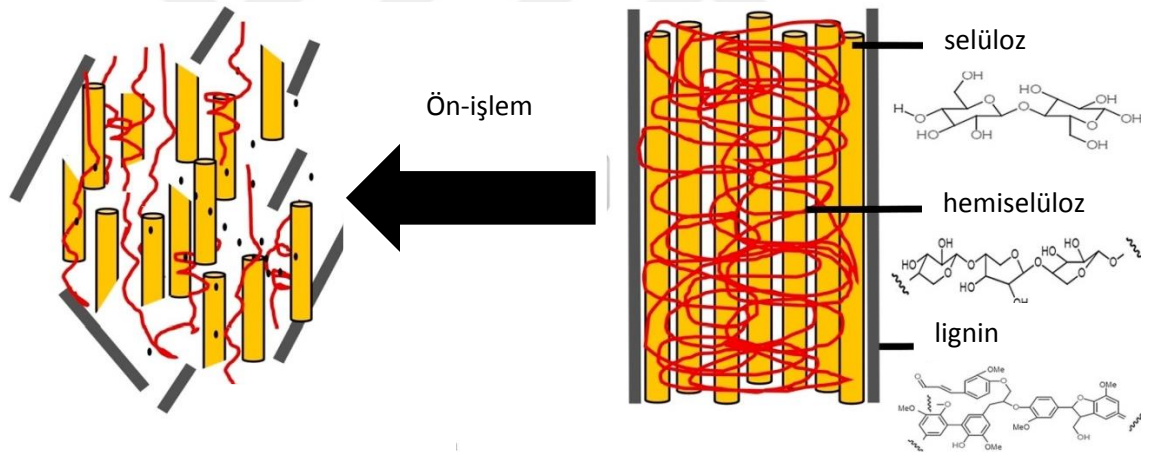
Dördüncü nesil biyoetanol üretimi diğer nesillere göre daha yeni uygulamadır. Bu grup fermentatif mikroorganizmaların genetik modifikasyonu ile biyoetanol üretimini arttırmak, üretimi hızlandırmak ve ucuza mal edilmesi hedeflenmiştir. Fermentatif mikroorganizmalar heksoz ve pentoz şekerlerini birlikte kullanamazlar ve bu yöntem ile her iki şeker grubunun tamamından etanol üretebilmesi, fermentasyon inhibitörlerine karşı direnç kazandırılması, etanol üretim hızlarının artırılması ve kullanılan hammaddelerde selüloz ile hemiselüloz oranlarını arttırıp lignin oranının azaltılması dördüncü nesil biyoetanol üretimine örnek verilebilir (Moravvej vd. 2019). Bu grup biyoetanol üretimi verimli ve ucuz olmasının yanı sıra biyoetanol üretiminde sonuç alınma süresinin uzun olması, üretimin ilk başlarında maliyetin yüksek olması ve kullanılan teknolojinin henüz yeni olması dördüncü nesil biyoetanol üretiminin dezavantajlarındandır (Jouzani ve Taherzadeh 2015).

Çizelge 2.4 Biyoetanol üretiminde kullanılan nesillerin avantajları ve dezavantajları (Dutta vd. 2014; Demiray 2019)

	Avantaj	Dezavantaj
1. Nesil	Yüksek verimli olması ve üretimin kolay olması	Direk gıda olarak tüketilmesi, Yüksek maliyet
2. Nesil	Ucuz ve bol bulunması, yüksek miktarda lignoselülozik yapı içermesi ve gıda olarak tüketilmemesi	Lignoselülozik yapının kolay parçalanamaması, ligninin ortamdaki kolay uzaklaştırılamaması, yapının parçalanabilmesi için enzimatik hidrolize ihtiyaç duyulması
3. Nesil	Fotosentetik mikroorganizmalardan üretilmesi, yüksek karbonhidrat ve protein içeriği	Yetiştirilmedeki zorluklar, agregat madde kullanımı
4. Nesil	Yüksek verimli ve etkili olması	Üretim süresinin uzun olması, maliyetin pahalı olması suşların elde edilmesinin zor olması

2.5 Lignoselülozik Yapının Parçalanması için Uygulanan Ön-İşlem Yöntemleri

Ön-işlem, lignoselülozun biyoetanole dönüştürülmesinde ekonomik açıdan önemli adımlardan biridir. Doğası gereği karmaşık yapısı nedeniyle lignoselülozik biyokütlenin biyoetanole dönüştürülmesi sırasında ön-işleme gereksinim duyulmaktadır. Biyokütle yüzey alanının genişletilmesi, hemiselüloz ve lignin yapılarının bozulması ve partikül boyutlarının azaltılması ön-işlem aşamasının en önemli hedefidir. İkinci nesil biyoetanol üretiminin %40'ını oluşturan bu aşama oldukça önemlidir. Ön-işlem yöntemleri temel olarak fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik olarak gruplara ayrılmaktadır. Bu gruplar içerisinde öğütme, sıkma, asidik ön-işlem, bazik ön-işlem, iyonik sıvılar (IL), organik solventler, buhar patlaması, enzimatik hidroliz yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Rezania vd. 2020). Bu yöntemler tek başlarına veya birlikte karıştırılarak da kullanılabilirler.



Şekil 2.4 Lignoselülozun yapısı (Koupai vd. 2020)

2.5.1 Fiziksel ve fizikokimyasal ön-işlem yöntemleri

Fiziksel ön işlemler öğütme, kırma, parçalama, dondurma ve mikrodalga radyasyonu ile muamele gibi yöntemler yer almaktadır. Bu ön işlem yöntemleri lignoselülozik biyokütlenin sindirilebilirliğini artırmak için çeşitli mekanik boyut küçültmek amacı ile kullanılmaktadır. Bu işlemler selüloz kristallliğini ve polimerizasyonunu azaltarak spesifik yüzey alanını artırır. Fiziksel ön işlem yöntemleri tek başlarına

kullanılabileceği gibi kimyasal ve biyolojik ön işlemler ile harmanlanarak da kullanılırlar (Tayyab vd. 2018).

Öğütme, ön işlemin ilk adımı olarak kabul görmektedir. Öğütme yönteminin çeşitli türleri vardır. Toplu değirmen, çekiçli değirmen, kolloid değirmen ve diskli değirmen yaygın olarak kullanılan çeşitleridir. Bu yöntem fiziksel kuvvet uygulanarak biyokütlenin boyutunu küçültmek için kullanılır. Öğütme, kırma, parçalama gibi ön işlemlerle biyokütlenin boyutu 10-30 mm ve 0.2-2 mm arasında parçacık elde edilir. Öğütme ön işlem yöntemi yüksek enerji gereksiniminden dolayı dezavantaja sahiptir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için ıslak disk değirmeni ile öğütme yöntemi kullanılmaktadır (Singh ve Satapathy 2018).

Mikroalga radyasyonu ön işlemi yüksek ısı verimliliği kullanılarak uygulanan kolay bir yöntemdir. Bu işlemde sulu ortamlarda mikroalgalar ile üretilen termal ve termal olmayan etkileri kullanılmaktadır. Termal yöntemde, sulu ortamdaki polar bağların titreşimi ile oluşan mikroalgalar sayesinde biyoküttelede iç ısı oluşturularak homojen olmayan hammadde içerisinde sıcak noktalar oluşturulur. Oluşan bu ısı sayesinde parçacıklar arasında patlama meydana gelerek lignoselülozik yapı bozularak parçalanmaktadır. Termal olmayan yöntemde ise polar bağlar arasında titreşim oluşturularak manyetik alanın hizalanması sağlanarak lignoselülozik yapıda bozulmaya yol açmaktadır (Sarkar vd. 2012).

Sıkma, hammaddelerde karıştırılarak, ısıtılarak ve kesilerek fiziksel ve kimyasal değişimlere yol açan terma-fiziksel bir ön işlemdir. Bu yöntem hızlı ve kısa işlem süresi, furfural ve 5-hidroksi-2-metil furfural gibi inhibitörlerin açığa çıkmaması, ölçeklendirmenin kolay olması, metodun kolay modifiye edilebilir olması gibi avantajlara sahiptir (Mood vd. 2013).

Buhar patlaması lignoselülozik maddelerin parçalanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem tek başına kullanıldığı gibi kimyasal veya biyolojik ön işlem yöntemleriyle birlikte de kullanılmaktadır. Buhar patlaması ön işleminde yüksek basınçlı buhar ile muamele edilir ardından basınç hızlı bir şekilde düşürülerek lignin liflerinin parçalanması sağlanır ve biyokütle polimerlerinin enzimler tarafından kolayca

parçalanması sağlanmaktadır. Yöntem 160-260°C'ta 30 saniye ile 20 dakika arasında değişiklik gösteren sürelerde uygulanır. Bu süre zarfında lignin yapısında parçalanma olur ve hemiselülozik yapı degrede olur ve selülozik yapı açığa çıkarak enzimlerin ulaşımı kolaylaşır. Bitmedi dezavantaj yaz. (Singh vd. 2018)

Karbondiyoksit (CO_2) patlaması, buhar patlaması ile benzer bir şekilde çalışan fiziko-kimyasal bir ön işlem yöntemidir. Bu işlemde CO_2 gazı lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasında çözücü olarak kullanılır. Yüksek sıcaklıkta CO_2 ile muamele edilen lignoselülozik materyalde hemiselüloz hidrolizine neden olur ve bu nedenle karbonik asit oluşur. CO_2 patlaması biyoetanol üretimi için düşük inhibitör oluşumuna neden olması ve lignini kolay ortamdan uzaklaştırması gibi avantajlarının yanı sıra yüksek enerji gereksinimi ve kullanılan ekipmanların pahalı olması nedeniyle çok fazla tercih edilmeyen bir yöntemdir (Tayyab vd. 2018).

2.5.2 Kimyasal ön-işlemler

Kimyasal ön-işlem, kimyasal maddeleri kullanarak lignoselülozik materyalin parçalanması sağlanan yöntemdir. Bu yöntem tek başına etkili olduğu gibi biyolojik ve fiziksel ön-işlemler ile harmanlanarak da kullanılmaktadır.

Alkali (bazik) ön-işlem, lignoselülozik biyokütlenin lignin içeriğine bağlı olarak farklı etkiler göstermektedir. Bu yöntem daha çok ligninin çözünmesinde etkili olup selüloz ve hemiselülozu parçalanmaz veya çok az miktarda parçalanır.

Alkali ön-işlem oda sıcaklığı ve değişkenlik gösteren zaman (dakikalar veya günler süren) aralığında gerçekleşmektedir. Sodyum, potasyum, kalsiyum ve amonyum hidroksitler bu ön-işlem yöntemi için kullanılmaktadır. Sodyum hidroksit (NaOH) lignoselülozik materyalde şişmeye neden olarak selülozun iç yüzeyini arttırarak lignin yapısında bozulmalara neden olur. Kireç olarak bilinen kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2) lignin gibi amorf katıları ortamdan uzaklaştırarak enzim hidrolizin etkin bir biçimde gerçekleşebilmesi için selülozik yapının ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte kireç, hemiselülozun içeriğindeki asetil gruplarını uzaklaştırarak selülozun

enzimatik parçalanmasını arttırmaktadır. Kireç ile gerçekleştirilen alkali ön-işlem NaOH muamelesine göre daha düşük maliyete sahiptir (Alvira vd. 2010).

Endüstriyel ve ticari düzeyde lignoselülozik hammaddelerden şekerlerin elde edilmesinde en sık kullanılan ön işlem yöntemi asitler ile muamele yöntemidir. Asit ile muamele yöntemi seyreltik ve konsantre asit ile ön-işlem olarak ikiye ayrılır. Asit ile muamelede asitler katalizör olarak kullanılmaktadır. Sülfürik asit, hidroklorik asit gibi inorganik asitler başta olmak üzere hidroflorik asit, fosforik asit ve nitrik asitler bu yöntem için en çok tercih edilen bileşiklerdir.

Konsantre asit ile ön muamelede düşük sıcaklıkta (100°C ve altı) ve yüksek asit konsantrasyonunda (%30 v/v ve üstü) lignoselülozik materyalden yüksek şeker verimi sağlanır. Konsantre asit yönteminde amorf yapıdaki hemiselülozun kristal yapıdaki selüloza göre parçalanması daha hızlıdır. Bununla birlikte konsantre asit için kullanılan ekipmanlarda korozyona neden olmakta ve yüksek oranda asit kullanımından dolayı çevreye saldıgı toksisite gibi dezavantajlardan dolayı çok fazla tercih edilmez (Rabemanolontsoa ve Saka 2016).

Seyreltik asit ön-işlemi, düşük maliyet ve yüksek verimliliği nedeniyle ticari boyutta kullanılan en yaygın yöntem olarak kabul edilir. Seyreltik asit ile lignoselülozik hammaddenin yalnızca amorf yapıdaki hemiselülozun neredeyse tamamının ve kristal yapıdaki selülozun kısmi olarak parçalanmasını sağlar. Selülozun tamamen parçalanabilmesi için ek olarak enzimatik hidrolize ihtiyaç vardır. Bu sayede %90 oranında şeker verimi sağlanabilir. Seyreltik asit ile muamelede yüksek ısı (120-125°C) ve düşük asit konsantrasyonları (%0 v/v-%5 v/v) kullanılır.

Her iki yöntemde de hemiselüloz ve selüloz hidrolizi sonucunda furfural, asetik asit, 5-hidroksimetil furfural ve fenolik bileşikler açığa çıkar bu bileşikler fermentasyon sırasında mikroorganizma gelişimini inhibe eden inhibitörlerdir (Solarte-Toro vd. 2019).

Ozonolizis, lignoselülozik hammadde de lignin içeriğinin azaltılması ve hemiselülozun kısmi olarak parçalanmasını sağlayan bir diğer ön-işlem yöntemidir. Düşük sıcaklıkta (20-30°C) ve ozon kullanılarak (%2-%7) gerçekleştirilir. Buğday samanı, pirinç samanı,

yer fıstığı, talaş gibi lignin içeriği fazla olan konjuge yapılarda ozon ile etkin bir parçalanma yapılabilir. Ozonolizis, diğer kimyasal ön-işlemlerin aksine toksik kalıntı oluşturmaması avantaj sağlarken lignin hidrolizi ile formik asit ve asetik asit gibi inhibitör asitlerin açığa çıkmasına ve yüksek miktarda ozona ihtiyaç duyulmasından dolayı pahalı olması gibi dezavantaja sahiptir (Xu ve Huang 2014).

Bir diğer kimyasal ön-işlem yöntemi olan oksidatif delignifikasyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve perasetik asit ($C_2H_4O_3$) varlığında peroksidaz enzimleri ile lignin yapısında bozulmalar sağlanır. Gerçekleştirilen bu degradasyon yöntemi ile ligninin yaklaşık %50'si ve hemiselülozun büyük bir kısmı parçalanır. Oluşan parçalanma sonrası açığa çıkan selülozik yapı enzimatik hidroliz için kolayca paraçalanabilir hale gelir. Oksidatif delignifikasyon pahalı ve inhibitör oluşumuna neden olduğu için ticari olarak kullanılmamaktadır (Maurya vd. 2015).

Son yıllarda hemiselülüz parçalanmasında sıklıkla organik solvent ön-işlem yöntemi kullanılmaktadır. Bu metotta hemiselüloz ve ligninin iç bağlarını kırmak için organik ve inorganik asitlerin, alkali veya metal tuz katalizörleri ile karıştırılmış metanol, etanol, aseton ve etilen glikol gibi organik çözücüler ile gerçekleştirilir. Organosolvent yöntemi yüksek ısıda ($100-250^{\circ}C$) ve yüksek basınçta gerçekleştirilir. Lignin ve hemiselülozda meydana gelen degradasyon sonucu selülozun enzimatik hidroliz ile parçalanması kolaylaştırılır. Bu ön-işlemden kullanılan asitlerin damıtma yoluyla geri kazanılması çevre kirliliği azaltılırken maliyeti arttıran bir yöntemdir (Rezania vd. 2020).

Son yıllarda en dikkat çeken bir diğer ön-işlem yöntemi ise iyonik sıvıların (IL) kullanımındır. İyonik sıvılar büyük organik katyonlar ve küçük inorganik anyonlardan oluşan organik tuzları olarak tanımlanır ve düşük sıcaklıklarda (oda sıcaklığı) sıvı halde bulunur. İyonik sıvılar ile lignoselülozik materyalin lignin ve karbonhidrat kısmı çözündürülür. Aynı zamanda klorür, format, asetat veya fosfonat gruplarına sahip IL'ler selülozun hidroksil grubunda bulunan hidrojen bağlarına bağlanarak karmaşık yapının dağılmasına ve selülozun çözünmesine yol açarlar. Büyük oranda selülozun parçalanmasına yol açtığı için umut vaat eden bir ön-işlem yöntemidir. Lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasında en sık kullanılan IL'ler arasında N-metilmorfolin-N-oksit monohidrat (NMMO), 1-alil-3-metylimidazolyum klorür ([AMIM]Cl), 1-metil-3-

metilimidazolyum-asetat ([EMIM]Ac), 1-bütül-3-metilimidazolyumklorit ([BMIM]Cl) ve 1-etil-3-metilimidazolyum dietil fosfat ([EMIM]DEP) gibi bileşikler kullanılmaktadır.

İyonik sıvılar yüksek oranda selülozu parçalamasına rağmen büyük oranda IL gereksinimi, geri kazanımda yoğun enerji ihtiyacı ve çözeltinin yüksek viskozitesinden dolayı ticari olarak kullanımı önünde büyük engel oluşturmaktadır (Kumari ve Singh 2018).

2.5.3 Biyolojik ön-işlemler

Biyolojik ön-işlemler lignoselülozun parçalanmasında tek başına kullanılabileceği gibi fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal ön işlem yöntemleriyle birlikte de kullanılabilirler. Bu sayede selüloz ve hemiselüloz monomerik şekerlere parçalanır. Biyolojik ön-işlem genellikle lignoselülozik yapıyı oluşturan lignin, hemiselüloz ve selülozu parçalayan yöntemler olarak 3 farklı bölmede incelenebilir.

Lignin parçalanmasında peroksidaz ve lakkaz enzimleri büyük rol oynar. Bu enzimler bazı mantarlar ve bakteriler tarafından üretilirler. Lignolitik enzim sisteminde lignin peroksidaz ve manganez peroksidaz en iyi bilinen iki peroksidaz enzimleridir. Bu iki enzim aktivasyon için hidrojen peroksit ihtiyacı duyarlar ve glikoprotein yapıdadırlar. Lignin peroksidaz fenolik yapıda olmayan ligninin bozunmasını sağlarken, manganez peroksidaz ise lipit peroksidason reaksiyonları ile fenolik ve fenolik olmayan lignin yapısını etkiler. Manganez peroksidaz Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'ya okside ederek fenol halkalarının ayrışmasına yol açan fenoksi radikallerinin oluşumuna yol açarak lignin yapısını parçalar. Doğada peroksidazlar *Ceriporia la cerata*, *Cyathus stercolerus*, *C. subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus* ve *Penicillium chrysosporium* gibi canlılar tarafından üretilir.

Lakkazlar ise lignin degradasyonun da rol oynayan bakır kofaktörü içeren enzimlerdir. Lakkazlar, lignin peroksidaz ve manganez peroksidazlar ile birlikte etki ederek ligninin tamamen bozulmasına neden olur. Lignin, fenolik bileşiklerde ve aromatik aminlerin oksidasyonunu katalize eder. Lakkaz enzimi redoks aracılıklı bileşikler (3-

hidroksiantranilik asit ve 3-etiltiyazolin-6-sülfonat) tarafından aktive edilir. Bu bileşiklerin ortamda bulunmaması lakkazların aktivitesini sınırlar (Sindhu vd. 2016).

Selüloz sakkarifikasyonu, selülaz adı verilen enzimler tarafından gerçekleştirilir. Selülazlar, monomerleri hidrolize etmek için selüloz un üzerinde sinerjik olarak hareket eden enzim ailesidir. Bu enzimler ikinci nesil biyoetanol üretiminde önemli bir yere sahiptir ve bu sayede indirgen şekerler selülaz enziminin ürünü olarak ortama salınır. Selülazlar, selülozdaki β -1,4-glikozidik bağlarını parçalar. Selülozun tamamen parçalanması üç ana selülaz kombinasyonu ile gerçekleştirilir. Bunlardan ilki endoglukonazlardır ve selülozun amorf yapıdaki kısımlarındaki glikosidik bağlar üzerine etki ederek serbest zincir sonlarına sahip oligosakkaritler üretir. İkinci olarak eksoglukanaz ortamdaki uzun zincirli oligosakkaritlere etki ederek kısa zincirli oligomerlere parçalarlar. Son olarak β -glukozidaz ise ortamdaki oligomerik yapıyı glukoz oluşumuna katalize eder. Selülaz enzimleri doğada *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* ve *Ruminococcus* gibi bakterilerden veya *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* gibi funguslar tarafından üretilir. Bu mikroorganizmalar arasında *Trichoderma viridea* ve *Aspergillus niger* üzerinde çok fazla çalışma yapılmıştır. Selülaz enzimleri son yıllarda araştırmaların odak noktası olmuştur ve laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır fakat ortamdaki lignin selülaz aktivitelerini bloke edebilir ve ortamda artan substrat miktarıda selülazın çalışmasını engelleyebilir. Bunlar enzimatik hidrolizde dezavantaja neden olan ve istenmeyen durumlardır (Ummalya vd.2019).

Hemiselüloz enerji açısından zengin glukoz ve şeker monomerlerine sahip bir polimerdir. Hemiselülozik enzimler bu yapıyı parçalamak ve yardımcı enzim olarak işlev görürler. Hemiselüloz yaygın olarak ksiloz gibi pentoz şekerlerinden oluşan ksilanlardır ve ksilanların yıkımı için endoksilanaz ve β -glukozidaz enzimleri kullanılır. Endoksilanazlar hemiselülozik yapıyı oligosakkaritlere parçalar. β -glukozidazlar ise oluşan oligosakkarit yapıdaki uzun zincirli şekerleri ksiloz monomerlerini serbest bırakır. Ksilanaz enzimleri ticari olarak *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesi*, *Bacillus* ve *Humicola* gibi mikroorganizmalardan üretilir (Sharma 2019).

Biyolojik ön-işlem yöntemlerinin çevre dostu olması, düşük enerji gereksinimi ve diğer ön-işlemler ile kolay kombine edilebilmesi gibi avantajlara sahip olmasının yanı sıra

lignoselülozik materyalin parçalanabilmesi için uzun süre gerektirmesi bu ön-işlemin dezavantajlı kısmıdır (Mishra vd. 2018).

2.5.4 Fermentasyon stratejileri

Biyoetanol üretimi sırasında biyokütle hidrolizatları çeşitli fermentasyon yöntemleri vardır bunlardan en çok bilinenleri SHF (ayrılmış hidroliz ve fermentasyon), SSF (eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon) ve SSCF (eşzamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon)'dur.

SHF (Ayrılmış Hidroliz ve Fermentasyon): Bu yöntemde enzimatik hidroliz ve fermentasyon ayrı ortamlarda gerçekleştirildiği bir işlemdir. İşlemin ilk kısmında biyokütle selülozlar ve hemiselülozlar ile monomerik şekerlere ayrılır daha sonra etanole fermente edilir. SHF yönteminin et temel avantajı her iki işleminde kendi optimal koşullarında gerçekleştirilebilmesidir. Bu durum oldukça önemlidir, çünkü selülozlar 45-50°C arasındaki sıcaklıklarda etkin olurken, etanol üreten pek çok mikroorganizmalar 30-37°C'lik optimum sıcaklıkta etkin bir performans gösterir. Bu sayede mikroorganizmalar fermentasyon sırasında sıcaklıktan etkilenmezler. Ortamda glukoz ve sellülobiyoz miktarının artmasıyla selüloz aktivitesi düşer ve bu durum enzimatik aktivitenin engellenmesine neden olur. Bir diğer dezavantajı ise ortamın enzimatik hidrolizin uzun süre zarfında gerçekleşirken kontaminasyona açık olmasıdır (Mohapatra vd. 2017).

SSF (Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Fermentasyon): Bu yöntemde enzimatik hidroliz ve fermentasyon tek bir ortamda belirlenen optimum koşullarında gerçekleşmektedir. Bu sayede enzimatik hidroliz ile ortamda oluşan şekerlerin mikroorganizmalar tarafından hızlı bir şekilde etanole dönüştürülür. Böylece ortamda birikmeyen glukoz ve sellülobiyoz şekerlerinden kaynaklı inhibisyonun önüne geçirilerek üretim maliyetlerinin azaltılması hedeflenmektedir. SSF yönteminde ısıya dirençli mikroorganizmalar kullanılarak enzimler için uygun sıcaklık olan 45-50°C'de etanol üretimi gerçekleştirilir. bu yöntemde genellikle *Kluyveromyces marxianus*, *Candida brassicae* ve *Saccaromyces uvarum* mayaları kullanılır. Bu mayalar termotolerant özelliğe sahiptir ve yüksek üreme oranı ile ortamda oluşan pentoz ve heksoz şekerlerini

(glukoz, arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz gibi) kullanabilme yeteneğine sahiptirler. Bunların yanı sıra enzimatik hidrolizin optimum sıcaklıkta gerçekleşmesi, termotolerant mikroorganizmaların etanol veriminin düşmesine ve ortamdaki yüksek biyokütle nedeniyle verimliliğin düşmesi gibi dezavantajlara sahiptir (Vohra vd. 2014).

SSCF (Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Birlikte Fermentasyon): Son yıllarda SSF işleminin heksoz ve pentoz şekerleri üzerinde eşzamanlı fermentasyonda avantajlı olduğu gözlemlenmiş ve bu durum için eşzamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon (SSCF) yöntemi avantajlıdır. Enzimatik hidroliz ile ortamı heksoz şekerlerinin serbest bırakılmasıyla glukoliz oranı arttırır ve bu sayede pentoz şekerleri daha hızlı ve daha verimli bir şekilde fermente edilir. Bu sayede etanol verimini artırır. SSCF yönteminde genellikle termotolerant mayalar kullanılabileceği gibi metabolizma mühendisliği ile genetiği değiştirilmiş suşlarda kullanılmaktadır (Buruiana vd. 2013).

2.6 Biyoetanol Üretiminde Başlıca Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyokütleden etanol elde edilmesinde ön-işlem, hidroliz, detoksifikasyon ve fermentasyon gibi genel dönüşüm adımlarında etkin bir şekilde rol oynayan çeşitli mikroorganizmalar kullanılır. İstenilen verim mikroorganizmaların grupları, suşları ve türleri arasında önemli ölçüde değişmektedir. Etanol üreten mikroorganizmalarda; basit ve ucuz ortamlarda büyüebilme, yüksek etanol verimi, yüksek etanol konsantrasyonlarındaki tolerans gösterme ve güvenilir olma gibi özelliklere sahip olması istenmektedir (Zabed vd. 2017). Biyoetanol üretim potansiyeline sahip mikroorganizmalarla ilgili birçok araştırmalar yapılmış ve bazı suşlar endüstriyel biyoetanol üretiminde hali hazırda kullanılmaktadır.

2.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae düşük maliyeti ve hızlı üreme yeteneği nedeniyle çeşitli biyokütlelerdeki indirgen şekerlerin fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır. Ayrıca alkollü içecek ve ekmek yapında da uzun yıllardır kullanılmaktadır.

S. cerevisiae geniş sıcaklık (11-38°C) ve belirli bir pH aralığında (4-6) gelişim gösterir. Düşük şeker ve oksijen varlığında da etanol üretebildiği için Crabtree pozitif bir mayadır ve yüksek etanol direncine sahiptir. Bu özellikleri sayesinde etanol üretimi için sıklıkla tercih edilir. *S. cerevisiae* fermentasyon sırasında glukoz, galaktoz ve mannoz gibi heksoz şekerlerini seçerek etanole çevirirken ksiloz ve arabinoz gibi pentoz şekerlerini kullanmayı tercih etmez (Nandy ve Srivastava 2018).

S. cerevisiae etanol üretimi için metabolik yolak olarak glikolizi (Embden-Meyerhof (EMD)) kullanır. Bu yolak ile 4 ATP molekülü üretilir, 2 ATP molekülü harcanır ve net kazanç 2 ATP'dir. Oluşan ATP molekülleri etanol üretimi, hücre büyümesi ve çoğalmasında önemli bir etkiye sahiptir. Fakat hücre içerisindeki ATP birikimi etanol üretimini inhibe eder. *S. cerevisiae* fermentasyon sırasında bazı yan ürünler de oluşturur. Bunlar gliserol, organik asitler ve yüksek alkollerdir. Gliserol yüksek ozmotik basınçta ve yüksek pH'lı ortamlarda mayanın direncini artırırken organik asitler ve yüksek alkol ise etanol üretim veriminin düşmesine neden olur. Endüstriyel biyoetanol üretim veriminde teorik verimin %90-93'üne kadar ulaşmaktadır (Bai vd. 2008). *S. cerevisiae* ksiloz gibi beş karbonlu şekerleri etanole dönüştürecek enzimler bulunmaz. Ksilozun izomeri olan d-ksilozu metabolize edebilir. Ksilozun bu şekilde gerçekleştirilen fermentasyon verimi glukozu göre verimi daha düşük olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle metabolizma mühendisliği ile ksiloz şekerinin etanole dönüştürülmesini sağlamak umut verici bir yöntem olabilir. *S. cerevisiae*'nın güçlü ve hızlı etanol üretimi, yüksek etanol direnci, strese karşı dirençli olması, ortamdaki oksijenden etkilenmemesi ve güvenilir (GRAS) olması biyoetanol üretimi için sıklıkla tercih edilmesine neden olmaktadır (Matsushika vd. 2009).

2.6.2 *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus ilk kez 1888 yılında E. C. Hansen tarafından üzümünden izole edilmiş ve *Saccharomyces marxianus* olarak adlandırılmıştır. Askus ve spor morfolojisindeki farklılıkların yanı sıra farklı şekerleri fermente edebilme özellikleri nedeniyle 1956 yılında Van Der Walt tarafından *Kluyveromyces marxianus* olarak adlandırılmıştır. *Kluyveromyces marxianus* süt yoğurt ve peynir gibi ürünlerin yanı sıra çürümüş meyvelerden izole edilebilir. *K. marxianus* karbon kaynağı olarak laktoza karşı

özel ilgi gösterir ve *S. cerevisiae*'nın aksine Crabtree negatif bir mayadır. Şekerleri etanole etkin bir şekilde fermente edemez. *S. cerevisiae* gibi *K. marxianus* da güvenli (GRAS) maya olarak sınıflandırılmıştır. Hızlı büyüme oranı, 52°C'ye kadar etanol üretebilmesi (termotolerant maya), inülinaz enzimi ve pektinaz enzimi salgılama gibi özelliklerinden dolayı biyoetanol üretimi için verimli bir mayadır (Fonseca vd. 2008; Lane vd. 2011).

Termotolerant özelliğinden dolayı *K. marxianus* SSF (eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon) yönteminde önemli ve sık kullanılan bir mayadır. Fermentasyon inhibitörlerine ve yüksek ısıya dayanıklı olmasına karşılık yüksek etanole karşı direnci düşüktür. Günümüzde biyoteknolojik ve çevresel alanlarda kullanılmak üzere direncinin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Karim vd. 2020).

2.6.3 *Pichia stipitis*

Pichia stipitis, çürüten ahşaptan ve odunlarda yaşayan böcek larvalarından izole edilmiş bir mayadır. Optimum gelişme sıcaklığı 25-33°C ve pH 4.5-5.5 aralığında gelişim gösterir. Odunsu yapılarda bulunan monomerik şekerleri kullanırlar. *P. stipitis* beş karbonlu şekerleri kullanarak etanol üretebilirler. Bununla birlikte β -glukozidaz enzimiyle selülobiyozu glukoza parçalayarak etanol üretiminde kullanır. Fakat glukozdan elde edilen etanol verimi beş karbonlu şekerlere göre daha düşüktür. *P. stipitis*, ortamda bulunan fazla şeker varlığında ve aerobik koşullar altında etanol üretimi yapamaz. Bu maya yüksek oksijen varlığında biyokütle artırımını yaparken, düşük oksijenli ortamlarda etanol üretimi yaparlar. Biyoetanol üretimi için glukoz ve ksilozun yanı sıra mannoz ve galaktoz kullanırken L-arabinozu biyokütle artırımını için kullanırlar (Agbogbo vd. 2008).

P. stipitis güvenli (GRAS) kabul edilen ve ksiloz fermentasyonu yapabilen nadir mikroorganizmalardan birisidir. Ksiloz dışındaki beş karbonlu ve altı karbonlu şekerlerden etanol üretim verimi oldukça düşüktür. Ortamda oluşan inhibitörlere karşı ve yüksek ozmotik basınca karşı direncinin düşük olmasından dolayı yüksek şekerli ortamlarda etanol üretimi yapamaz. Fakat ksilozu kullanarak etanol üretebildiği için son

yıllarda metabolizma mühendisliği ile etanol verimini artırmak ve dirençli bir maya olması yönüyle çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Song vd. 2019).

2.6.4 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis biyoetanol üretiminde kullanılan gram negatif anaerobik bir bakteridir ve alkollü içeceklerden izole edilmiştir. Tropik ülkelerde pulque ve palmiye şarabı üretiminde kullanılan bir bakteridir (Seo vd. 2005). Optimum gelişme sıcaklığı 25-31°C ve optimum pH 6-7 arasında gelişim gösterir. Bunun yanı sıra düşük pH'a sahip steril olmayan ortamlarda da gelişim gösterebilirler. *Z. mobilis* glukozu metabolize edebilmek için Entner-Doudoroff (ED) yolağını kullanır. Bu yolak ile 1 mol glukoz başına 1 mol ATP üretebilir. Aldolaz enzimini kullanarak 2-keto-3- deoksi-6-fosfoglukonatı piruvata dönüştür. Bu glukoz dönüşüm sırasında ATP harcandığı için önemli bir etanol üreticisi olan *S. cerevisiae*'nin aksine daha düşük biyokütle üretimi oluşurken etanol üretimi için gerekli yüksek karbon akışı sağlar. *Z. mobilis* metabolik yolağındaki yüksek glukoz varlığından dolayı yüksek teorik etanol verimi (%97) gerçekleşir. Bununla birlikte etanol üretiminde yalnızca glukoz, fruktoz ve sükrozu kullanabilmesinden dolayı substrat aralığı dar olması ve endüstriyel olarak sürekli etanol üretimi yapamaz. Bu nedenlerden dolayı endüstride etanol üretiminde kullanılmaz (Bai vd. 2008; Zhao vd. 2013).

2.6.5 Etanol üretimi yapan diğer mikroorganizmalar

Biyoetanol üretiminde sıklıkla kullanılan yukarıda açıklanmış olan dört mikroorganizma dışında *Aerobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Aeromonas* ve *Thermoanaerobacter* gibi bakteri cinslerinden ve *Candida sheate*, *Pachysolen tannophilus* mayaları ile *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Neurospora* ve *Monilia* gibi fungus cinslerinden de etanol üretilmektedir (Rastogi ve Shrivastava 2017). Bu mikroorganizmalar dışında etanol üretiminde en sık kullanılan bakteri *Escherichia coli*'dir. Genetik modifikasyonlara yatkın olması nedeniyle son yıllarda etanol üretiminde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Glukozun yanı sıra ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz gibi şekerleri etkin olarak kullanabilme yeteneğine sahiptir. *E. coli* yüksek etanol toleransına sahip bir bakteridir. Etanol üretimi sırasında organik

asitlerden yan ürün oluşumu gözlemlenir. Organik asitlerin (asetik asit ve sükkinik asit) en temel sebebi *E. coli*'nin etanol üretimi için kullandığı yolaktaki redoks dengesinin bozulması ile asetik asit ve sükkinik asit oluşumuna neden olur. Bazı suşlarının patojen olması ve güvenilir (GRAS) mikroorganizma olmama gibi nedenlerden dolayı endüstriyel etanol üretiminde kullanımı azdır (Hasunuma vd. 2013).

2.7 Farklı Hammaddelerden Biyoetanol Üretimi İle İlgili Çalışmalar

2.7.1 Birinci nesil biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar

Birinci nesil biyoetanol üretiminde gıda olarak tüketilen nişasta içerikli (buğday, pirinç, mısır gibi) ve şeker içeriği yüksek (şeker pancarı, şeker kamışı gibi) hammaddeler kullanılır. Bu durum ile ilgili biyoetanol üretimi ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır.

Mısır yüksek nişasta içeriği nedeniyle biyoetanol üretiminde sıklıkla tercih edilir. Mısır unundaki nişasta içeriği ile SSF (eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon) ile SHF (ayrılmış hidroliz ve fermentasyon)'nin etanol üretimi üzerine etkisine bakılmış bir çalışmada SSF işleminde yüksek etanol değeri 1.96 g/l ve teorik verimi %90.32 iken daha sonrasında eklenen mineral tuzları ve vitaminler ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.0 g/l; Ca-pantotenat, biyotin ve myoinositol) ile etanol verimi 2.13 g/l'ye ve teorik verim %98.08 olarak saptanmıştır. Çalışmada *S. cerevisiae* suşları kullanılmıştır (Nicolic vd. 2009).

Tatlı mısır yüksek şeker içeriğine sahip olması nedeniyle biyoetanol üretim ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada N_2 gazında 24 saat 90°C'de inkübe edilmiş ve 72 saat fermentasyonu sonunda 45.6 g/L etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda bütanol üretimine bakılmış ve maksimum etanol üretimi 257 saat sonunda 8.3 g/L elde edilmiştir. Biyoetanol üretimi ve bütanol üretimi için sırasıyla *S. cerevisiae* ve *Clostridium beijerinckii* kullanılmıştır (Gomez-Flores vd. 2018).

Şeker pancarı yüksek miktarda şeker içermesi etanol üretimi için sıklıkla kullanılmasına ve fazla sayıda literatür çalışması yapılmasına neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada

yüksek yerçekimi (VHG) koşulları altında *S. cerevisiae* mayası kullanılarak melas ve şeker pancarı suyu üzerindeki etkiye bakılmış. Elde edilen sonuç ise melastan 83.20 g/L etanol elde edilirken şeker pancarı suyundan 132.39 g/L etanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Razmovski ve & Vučurović 2012).

Pirinç samanı ise nişasta içeriği yüksek bir hammadde olması literatür çalışmaları için sıklıkla tercih edilmesine neden olmuştur. Bir çalışmada NaOH ile ön işleme tabi tutulmuş pirinç samanını SHF yöntemi kullanılarak *S. tanninophilus* mayası ile 9.45 g/L etanol üretildiği gösterilmiş ve %83.5'lik etanol verimi elde edilmiştir (Jin vd. 2020).

2.7.2 İkinci nesil biyoetanol üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar

İkinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler gıda olarak kullanılmayan genellikle orman, tarım, belediye ve meyve suyu fabrikası atıkları gibi lignoselülozik hammaddeler kullanılarak üretilir. Lignoselülozik hammaddelerin sıklıkla tercih edilmesinin bir diğer önemli sebebi ise ucuz ve bol bulunmaları ile birlikte zengin şeker içeriklerinden kaynaklanır. İkinci nesil hammaddelerden biyoetanol üretimiyle ilgili bazı literatür çalışmaları aşağıda bahsedilmiştir.

Muz kabuğu atıkları Malezya'da en büyük tarımsal atıklardan biridir. Bu nedenle Tan vd. (2019) yaptığı bir çalışmada hammadde olarak farklı muz kabuğu atığı konsantrasyonu, pH etkileri ve azot kaynaklarının etkilerini araştırmıştır. En yüksek etanol üretimi %80 muz kabuğu konsantrasyonunda pH 6.8'de 42.47 g/L bulmuş ve biyoreaktör kullanılarak bu üretim 45.75 g/L'ye çıktığını göstermiştir.

Buğday samanı kullanılarak etanol üretiminin gerçekleştirildiği başka bir çalışmada ise farklı organik solventlerin (etanol, metanol, bütanol, aseton ve dietilen glukoz) etkilerine bakılmıştır. Çözücü olarak bütanolün kullanıldığı deneyler, 180°C'de 40 dakika sonunda %89 maksimum selüloz dönüşümü sağlanmış ve teorik etanol verimi %67 olarak belirtilmiştir (Salapa vd. 2017).

Singh ve Kumar (2020) çalışmasında ise, %5 pirinç samanını %1.25 sodyum karbonat ile otoklavlama ön-işlemi sonrasında 728.45 mg/g substrat indirgen şeker tespit etmiş ve enzimatik hidroliz sonrası 18.07 g/L etanol elde etmiştir.

Pirinç samanının seyreltik asit ile muamele edildiği bir diğer çalışmada ise, 10 FPU enzim konsantrasyonunda ortama salınan glukoz 83.3 g/L ile ksiloz 31.9 g/L bulunmuş ve toplamda elde edilen 115.2 g/L indirgen şeker ile 50 g/L etanol üretilbileceği gösterilmiştir (Kapoor vd. 2017).

2.7.3 Üçüncü nesil biyoetanol üretimi ile yapılan çalışmalar

Üçüncü nesil biyoetanol üretiminde hammadde olarak mikroorganizmalar ve mikroalgler kullanılmaktadır. Fotosentetik mikroalgler dışarıdan herhangi bir katkı maddesine ihtiyaç duymadan gelişebildikleri için biyoetanol üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Üçüncü nesil biyoetanol üretimi ile ilgili bazı literatür çalışmaları aşağıda gösterilmiştir.

Euchema cottanii kırmızı mikroalgi kullanılarak farklı ön-işlem stratejileri (PSSF (ön-hidroliz ile eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon) ile PSSCF (ön-hidroliz ile eşzamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon) kullanılarak biyoetanol üretim kapasitesi araştırılmıştır. En yüksek biyoetanol verimi PSSF kullanılarak 11.7 g/L olarak bulunmuştur (Tan ve Lee 2016).

Lee vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada *Saccharina japonica* mikroalg biyokütlesine 170°C'de 15 dakika %0.06 H₂SO₄ ön-işlemi sonrası SSF yöntemi uygulanmıştır. SSF sonrası 13.01 g/L glukoz elde etmiş ve 6.65 g/L biyoetanol üretildiğini göstermiştir.

Gelidium amansii mikroalg biyokütlesi 121°C'de 60 dakika otoklavlama ön-işlemine tabi tutulduktan sonra SSF ve SHF stratejileri uygulanmıştır. SHF işleminde, 6. saat sonunda %74.7 teorik etanol verimi ile en yüksek 3.33 mg/mL etanol üretilirken SSF işleminde ise, 12. saat %84.9 teorik etanol verimi ile en yüksek 3.78 mg/mL etanol üretildiği gösterilmiştir (Kim vd. 2015).

Abou El- Souod vd. (2021) yaptıkları bir çalışmada *Chlorella vulgaris* biyokütlesi iki farklı kimyasal ön-işlem (%2 H₂SO₄ asiti ile muamele ve %5 NaOH alkali ile muamele) ve iki farklı fiziksel ön-işlem (mikrodalga ve ultrasonik ile muamele) yöntemleri kullanılarak etanol üretim verimleri incelemiştir. Çalışmaların sonunda en yüksek indirgen şeker ve etanol verimi %2 H₂SO₄ ortamında sırasıyla 24.77 g//100 g kuru biyokütle ile 16.08 g/100 g kuru biyokütle olarak tespit etmiştir.

2.7.4 Dördüncü nesil biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar

Dördüncü nesil biyoetanol üretimi için metabolizma mühendisliği kullanılarak etanol üretim veriminin artırılması hedeflenmektedir. Literatürde mikroorganizmalar veya hammaddelerin genetik ve metabolik yollarında iyileştirmeler yapılarak biyoetanol üretiminin artırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Dördüncü nesil biyoetanol üretimi ile ilgili bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Biyoetanol üretiminde kullanılan *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007 suşunun biyoetanol üretimini arttırmak amaçlanmış ve bu nedenle laktik asit üretimini bloke edebilmek için D-latat dehidrogenaz (IdhA) geni silinmiştir. Belirlenen optimal koşullarlarda (34°C, pH: 7.5, 72 saat) 34.54 g/L biyoetanol üretimi sağlanmıştır. Bu verim doğal suşun biyoetanol üretiminden 1.5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Thapo vd. 2015).

S. cerevisiae düşük miktarlarda selüloz ve ksilinaz enzimi salgılar ve bu nedenle dışarıdan selüloz ve ksilinaz enzim takviyesine ihtiyaç duyar. Bu sebeple, Yang vd (2016) *S. cerevisiae*'nin selüloz enzimi ekspresyon verimliliğini arttırarak düşük maliyetli yüksek etanol üretimi sağlamıştır. Biyoetanol üretimi bu iyileştirme ile 57.86 kat arttırıldığını göstermiştir.

Bir başka çalışmada ise, *S. cerevisiae*'ya CRISPR-Cas9 yaklaşımı ile selüloz seste genini mayanın genomuna entegre ederek lignoselülozik hammaddelerde biyoetanol üretim verimi arttırmak istenmiştir. Çalışmada, ezilmiş portakal kabuğu tozu kullanılmış ve gen entegrasyonu ile biyoetanol üretimi 37.7 kat arttığı gösterilmiştir (Yang vd. 2018).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar

Tez çalışmasında *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus* mayaları kullanılmıştır ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan hammadde kaynağı

Elma posası Göknur Meyve Suyu Ltd./Niğde'den temin edilmiştir. Hammaddeler etüvde (Nevü FN400) 70°C sıcaklıkta kurutulduktan sonra laboratuvar tipi değirmende (Miprolab) por çapı 0.20 mm olacak şekilde öğütülerek muhafaza edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri

Mayalar patates dekstroza agar (PDA/Merck) yatık besiyerinde stok kültüre alınmıştır ve 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Mayalar fermentasyon deneyleri öncesi glukoz (20 g/L/Merck), pepton (10 g/L/Merck), maya özütü (3 g/L/Scharlau) içeren GPY besiyerinde 30°C'de 100 rpm çalkalama hızında 24 saat boyunca çalkalamalı etüvde (Gerhardt Thermoshaker) geliştirilmiştir. Mayalar GPY besiyerine aseptik koşullarda bir öze dolusu olacak şekilde inoküle edilmiştir. GPY besiyerindeki ön-inkübasyon 250 mL Erlenmeyerlerde 100 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Seyreltik asit ön-işlemi için optimum asit konsantrasyonunun belirlenmesi

Optimum asit konsantrasyonunu belirlemek amacıyla dört farklı (%0.5, %1, %2 ve %5) asit konsantrasyonu, %20 kuru elma posası konsantrasyonunda, 15 dakika boyunca 121 °C’de otoklavda (ALP) ön-işleme tabi tutulmuştur.

3.2.3 Başlangıç elma posası konsantrasyonunun belirlenmesi

Elma posasında optimum başlangıç konsantrasyonun belirlenmesi için üç farklı (%5, %10 ve %20, w/v) elma posası konsantrasyonu ve %1 H₂SO₄ (v/v) ile muamele edilip otoklavda (ALP) 121°C’de 15 dakika boyunca otoklanmıştır. Ön-işlem sonrası hidrolizatlar Whatman No:1 kağıtları ile süzölmüş ve süzölen hidrolizatların sıvı kısımları sodyum hidroksit (NaOH/Merck) ile pH değeri 5’e ayarlanmıştır. Sterilizasyon için tekrar 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak fermentasyon deneyi için hazır hale getirilmiştir.

3.2.4 Elma posası atıklarında enzimatik hidrolizin ve besiyeri yıkanmasının biyoetanol üretimine etkisi

Farklı elma posası bileşenlerinin etanol üzerindeki etkisini araştırmak için iki farklı (katı-sıvı ve elma posasının yıkanmış katı kısmı) ortam hazırlanmıştır. Deneyler için hazırlanan ilk ortamda elma posasının katı ve sıvı kısmı ayrılmadan kullanılmıştır. İkinci ortam için ise ön-işlem sonrası hidrolizat Whatman No:1 kâğıdı kullanılarak süzölmüş ve katı kısım pH5 olana kadar su ile yıkanmıştır. Her iki ortamda 15 FPU/g substrat CellicCTec 2 (Sigma, 121 FPU/mL) ticari selölaz enzimi ile hidrolize edilmiştir.

3.2.5 Farklı enzim konsantrasyonlarının biyoetanol üretiminde etkisi

Belirlenen optimum elma posası varlığında, en yüksek şeker içeriğini belirlemek için dört farklı enzim konsantrasyonu (15, 30, 60 ve 120 FPU/g substrat) kullanılmıştır. Bu nedenle, ön-işlem sonrası besiyerinin pH’ı 50mM sitrat tamponu ile 4.8’e ayarlanmıştır. Enzimatik hidroliz 72 saat boyunca 50°C’de çalkalamalı inkübatörde (Gerhardt/Thermoshaker) gerçekleştirilmiştir (Chen vd. 2012). 72 saat sonunda

enzimatik aktiviteyi durdurmak için besiyerleri 95°C’de 10 dakika su banyosunda (Memmert) bekletilmiştir.

3.2.6 Çözünür soya unu proteinin hazırlanması

Çözünür soya proteinini elde etmek için, 100 g soya unu içerisine 50 mM sitrat tamponu eklenerek karışım 2 saat boyunca 50°C’de 150 rpm hızda çalkalanmıştır. Daha sonra ultrasonikatörde (ISOLAB) 300W’ta 30 dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen materyal 5 dakika 5000 rpm’de santrifüj (Hettich/Rotina 35R) edilmiştir. Ayrılan süpernatant kısmı 0.45 µm por çapındaki filtreden süzümüştür (Luo vd. 2019). Hazırlanan stok çözelti içerisindeki protein miktarı Lowry vd. (1951) metoduna göre belirlenmiştir. Belirlenen dört farklı çözünebilir soya proteini konsantrasyonu (20, 40, 80, 160 mg/g), 50 mM sitrat tamponu eklenerek enzimatik hidroliz ve fermentasyon deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.7 Fermentasyon deneyleri

Fermentasyon deneyleri 100 mL Erlenmeyer’de 50 mL çalışma hacminde 30°C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında çalkalamalı inkübatörde yapılmıştır. Fermentasyon deneylerinde kullanılan tüm besiyerlerinin pH’ı 4.8’e ayarlanmıştır. GPY besiyerinde 24 saat inkübe edilen mayalar fermentasyon besiyerlerine %5 (v/v) oranında inoküle edildikten sonra fermentasyon ortamlarından belirli aralıklarla (24, 48, 72 saat) etanol ve indirgen şeker miktarlarının belirlenmesi için 1.5 mL örnek 2 mL Ependorf tüplerine alınmış ve daha sonra 1000 rpm’de 10 dakika santrifüj (Rotina 35 R) edilerek süpernatant kısımları etanol ve indirgen şeker miktarlarına bakılmak üzere kullanılmıştır.

Fermentasyon deneylerinde organik azot ve mineral tuzları elma posası besiyerine eklenmiştir. Organik azot kaynağı olarak; pepton (5 g/L) ve maya özütü (3 g/L) kullanılmıştır. Mineral tuzları için ise; MgSO₄.7H₂O (0.5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), CaCl₂ (0.1 g/L) ve ZnSO₄ (0.05 g/L) ilave edilerek pH 4.8’de fermentasyon deneylerinde kullanılmıştır.

3.3 Analitik Yöntemler

3.3.1 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi

Biyoetanol miktarlarının belirlenmesinden önce besiyerlerinden farklı zamanlarda (24, 48, 72 saat) alınan 1.5 mL örnekler 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol konsantrasyonu Gaz Kromatografisi (GC- 2010/Shimadzu) cihazında belirlenmiştir. GC cihazında alev iyonlaştırıcı dedektör (FID) ve 0.25 mm çap ve 60 metre uzunluğunda RTX-Wax (RESTEK) kolonu ve taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmıştır. FID dedektöründe ise kuru hava ve hidrojenden yararlanılmıştır. Etanol ölçümlerinde 1 µL örnek 140°C sıcaklıktaki enjeksiyon portuna enjekte edilmiştir. FID dedektörünün sıcaklığı 160°C’ye ayarlanmış, kolonun başlangıç sıcaklığı ise 50°C’ye getirilerek 19 dakika içerisinde 150°C’ye çıkacak şekilde ayarlanmıştır. Kolon basıncı 200 kPa’ya getirilerek kolon akışı 1.86 mL/dakika, toplam akış ise 190.4 mL/dakikaya ayarlanmıştır (Wistara vd. 2016). Cihazda gözlemlenen pikler, daha önce yapılan etanol standartına göre GC cihazında bulunan yazılım ile hesaplanarak etanol miktarları g/L cinsinden elde edilmiştir.

3.3.2 Elma posasındaki indirgen şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi

Toplam indirgen şeker içeriği dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi (Miller vd. 1959) ile spektrofotometrede (Shimadzu) 540 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Deneyde kullanılan *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayaları için altı karbonlu şeker standardı (glukoz) kullanılmıştır.

3.3.3 Elma posasındaki şeker profillerinin belirlenmesi

Şeker tayininden önce besiyerlerinden alınan 1.5 mL örnekler 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elma posasının içeriğindeki şekerlerin tiplendirilmesinde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC/Shimadzu) cihazı kullanılmıştır. Şeker analizi öncesi örnekler seyreltilmiş ve HPLC viallerine 0.45 µm por çapındaki membran filtrelerden süzölmüştür. Yürütücü faz olarak 5 mM H₂SO₄ kullanılmıştır. Örneklerin okunması için Refractive Index Dedector (RID) ve BioRad Aminex HPX-87-P

kolondan yararlanılmıştır. Toplam akış hızı 0.6 mL/dakika ve sıcaklık 70 °C olarak ayarlanmış ve kullanılan yürütücü faz vakum pompasından geçirilerek steril edilmiştir.

3.3.4 Selüloz aktivitesinin belirlenmesi

Bu çalışmada selüloz enzimi olarak ticari enzim olan CellicCTec2 (Novozymes/Danimarka) kullanılmıştır. Enzimin filtre kağıdı birimi (filter paperase unit/FPU) ise Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarı (NREL/ABD) protokollerine göre belirlenmiştir (Adney ve Baker 2008). CellicCTec2 enziminin selüloz aktivitesi 121 FPU/mL olarak belirlenmiştir. Filtre kağıdı olarak Whatman No:1 filtre kağıdı kullanılmıştır. Filtre kağıtları 1x6 cm olacak şekilde kesilerek deney tüplerinde sitrat tamponu ile muamele edilmiştir. Bu karışımın üzerine belirli oranlarda seyreltilmiş selüloz enzimi konulmuş, ayrı olarak belirli oranda seyreltilmiş standart glukoz çözeltileri ile birlikte 50°C'deki su banyosunda (Memmert) bekletilmiştir. 1 saat inkübasyon süresinin sonunda örnekler 95°C'de su banyosunda kaynatılarak enzim aktivitenin durdurulmuştur. Bu işlemlerden sonra örnekler DNS ile filtre kağıdından ortama salınan indirgen şeker miktarları hesaplanmıştır. 1x6 cm ayarlanan filtre kağıdından 1 saat içerisinde ortama 2 mg glukoz salınımına neden olan enzim konsantrasyonu 1 FPU olarak belirlenmiştir.

3.3.5 Selüloz tayini

Selüloz analizleri için standart ISO protokolü (ISO 5498-1981) kullanılmıştır. Elma posasının içeriğindeki selüloz miktarının belirlenmesi hizmet alımı ile dış bir laboratuvarda (Düzen Norwest/Ankara) yapılmıştır.

3.3.6 Kinetik parametrelerde kullanılan denklemler

Maksimum teorik etanol verimi hesaplanırken aşağıdaki denklem kullanılmıştır. (Kim ve Lee 2007).

$$\text{Maksimum Teorik Verim (\%)} = \frac{\text{Etanol (g/L)}}{\text{Başlangıç şekeri (g/L)} \times 0.511} \times 100$$

Denklemdaki ‘Etanol (g/L)’ en ykek etanol üretim zamanının gözlendiği süre içerisindeki etanol konsantrasyonunu, ‘Başlangıç şekeri (g/L)’ fermentasyon öncesinde ortamda bulunan indirgen şeker miktarını göstermektedir. ‘0.511’ ise sabit değerdir.

Etanol retkenliđi (Q_p) ise aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Roca ve Olsson 2013)

$$\text{Etanol retkenliđi } (Q_p) = \frac{\text{Maksimum etanol (g/L)}}{t}$$

Denklemden ‘Maksimum Etanol (g/L)’ ifadesi belirli bir zamanda elde edilen maksimum etanol miktarını, ‘t’ ise zamanı ifade etmektedir.

Etanol verimliliği ($Y_{p/s}$) ise aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır. (Yücel ve Aksu 2015)

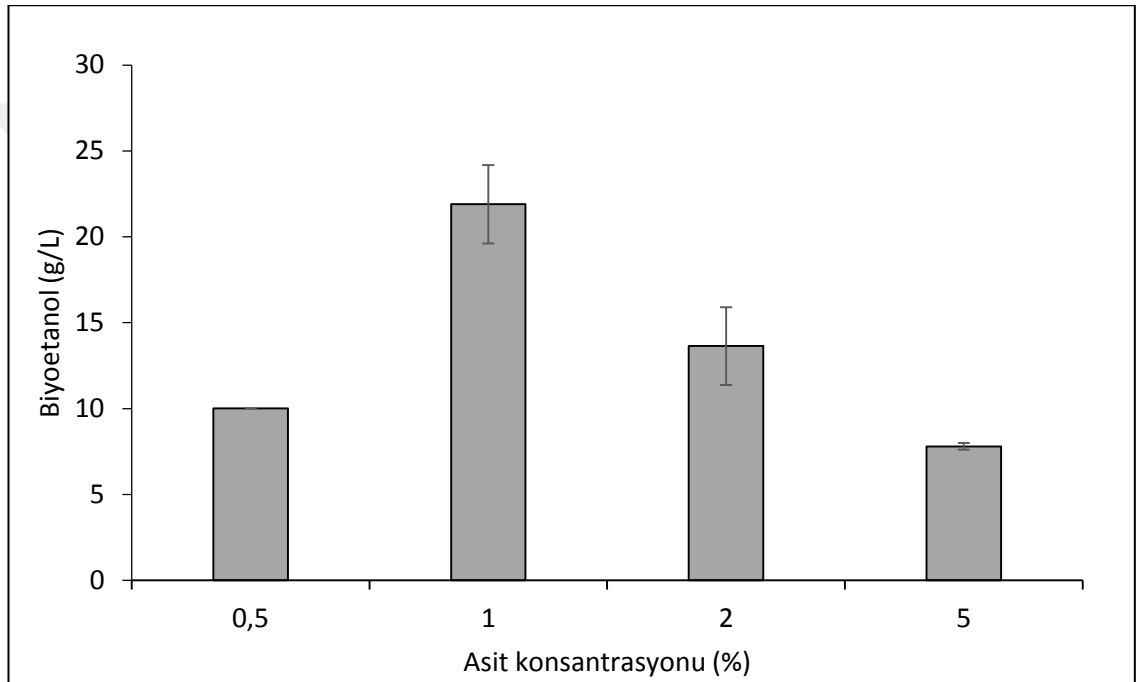
$$\text{Etanol Verimliliği } Y_{p/s} \text{ (g/g)} = \frac{\text{Maksimum Etanol (g/L)}}{\text{Harcanan indirgen şeker (g/L)}}$$

Bu denklemden ‘Maksimum Etanol (g/L)’ ifadesi belirli bir zamanda elde edilen maksimum etanol miktarını, ‘Harcanan indirgen şeker (g/L)’ ise en yüksek etanol miktarının saptandığı zaman dilimindeki harcanan şeker miktarını belirtmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Ön-İşlem Yöntemlerinin Etanol Üretimi Üzerine Etkileri

Yapılan tez çalışmasının bu bölümünde ilk olarak optimum asit konsantrasyonunun etanol üretimine etkisi belirlenmiştir. Bunun için %20 elma posası ve 4 farklı H_2SO_4 (%0.5, %1, %2 ve %5 v/v) konsantrasyonu ile *S. cerevisiae* kullanılarak etanol üretimi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 %20 elma posası varlığında ve farklı asit konsantrasyonlarında *S. cerevisiae*’da etanol üretimi

Ön-işlem koşulu: %1 H_2SO_4 ile 121°C’de 15 dakika otoklavlama fermentasyon koşulu: pH:4.8, 30°C sıcaklıkta çalkalama hızı: 100 rpm 48 saat

En yüksek etanol verimi %1 asit konsantrasyonunda 21.9 g/L etanol üretilirken, asit miktarı arttırıldığı zaman etanol üretimi ters yönde etkilenmiş ve asit konsantrasyonu %5’ e çıkarıldığında 7.8 g/L’ye düşmüştür.

4.2 Elma Posasının İçeriğindeki İndirgen Şeker Profillerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu kısmında, elma posasının selüloz içeriklerine bakılmıştır ve elma posasının selüloz içeriği % 27.5 (w/w) olarak saptanmıştır.

Enzimatik hidroliz öncesi %20 elma posası ön işleme tabi tutulduktan sonra, 15 FPU/g substrat enzim eklenerek hammaddenin içeriğindeki indirgen şeker tipleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz öncesi %20 elma posasında en bol bulunan indirgen şekerin %45.02 oranıyla arabinoz olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra glukoz, galaktoz, fruktoz ve ksiloz oranları sırasıyla %21.10, %9.07, %17.03 ve %7.74 olarak saptanmıştır. 15 FPU/g substrat enzim muamelesinden sonra ise en yüksek indirgen şeker yüzdesinin %74.14 oranıyla glukoz olduğu belirlenmiştir. Galaktoz, fruktoz, ksiloz ve arabinoz şekerleri ise sırasıyla %3.47, %6.02, %2.93 ve %13.44 oranında hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Enzimatik hidroliz öncesi ve Enzimatik hidroliz sonrası elma posasındaki şeker yüzdeleri

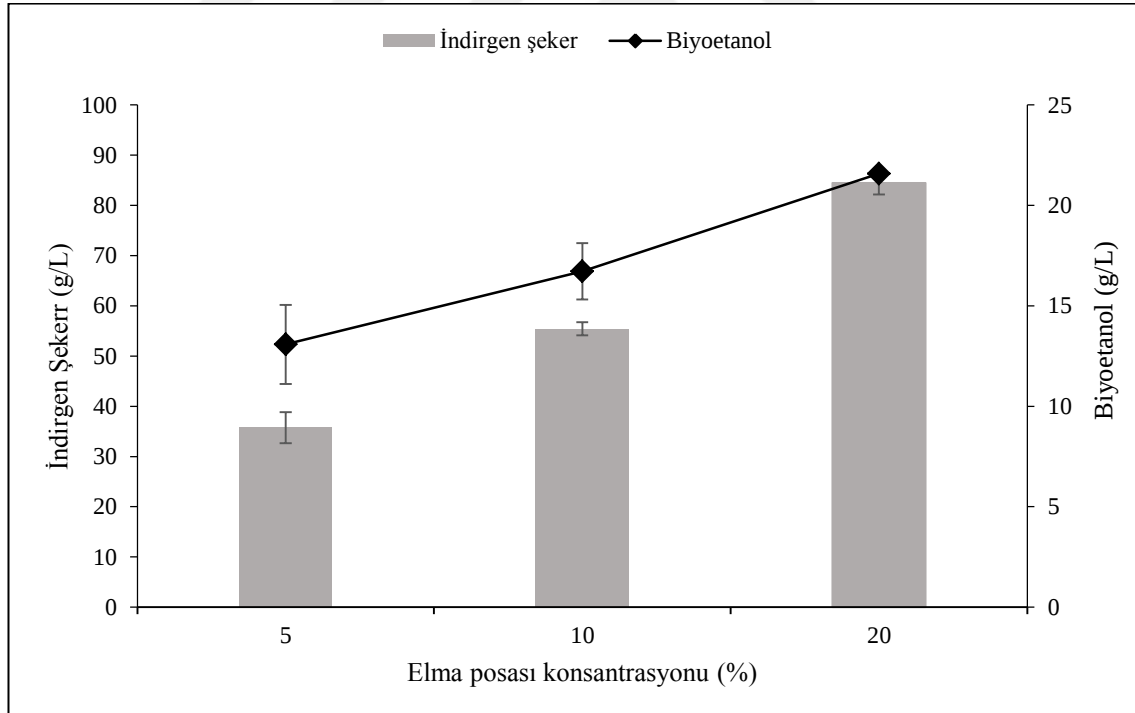
	Şeker Yüzdesi (%)				
	Glukoz	Galaktoz	Fruktoz	Ksiloz	Arabinoz
Enzimatik Hidroliz Öncesi	21.10	9.07	17.03	7.74	45.02
Enzimatik Hidroliz Sonrası	74.14	3.47	6.02	2.93	13.44

Ön-işlem koşulu: %1 H₂SO₄ ile 121°C’de 15 dakika otoklavlama fermentasyon koşulu: pH:4.8, 30°C sıcaklıkta çalkalama hızı: 100rpm 48 saat

4.3 Başlangıç Elma Posası Konsantrasyonunun Belirlenmesi

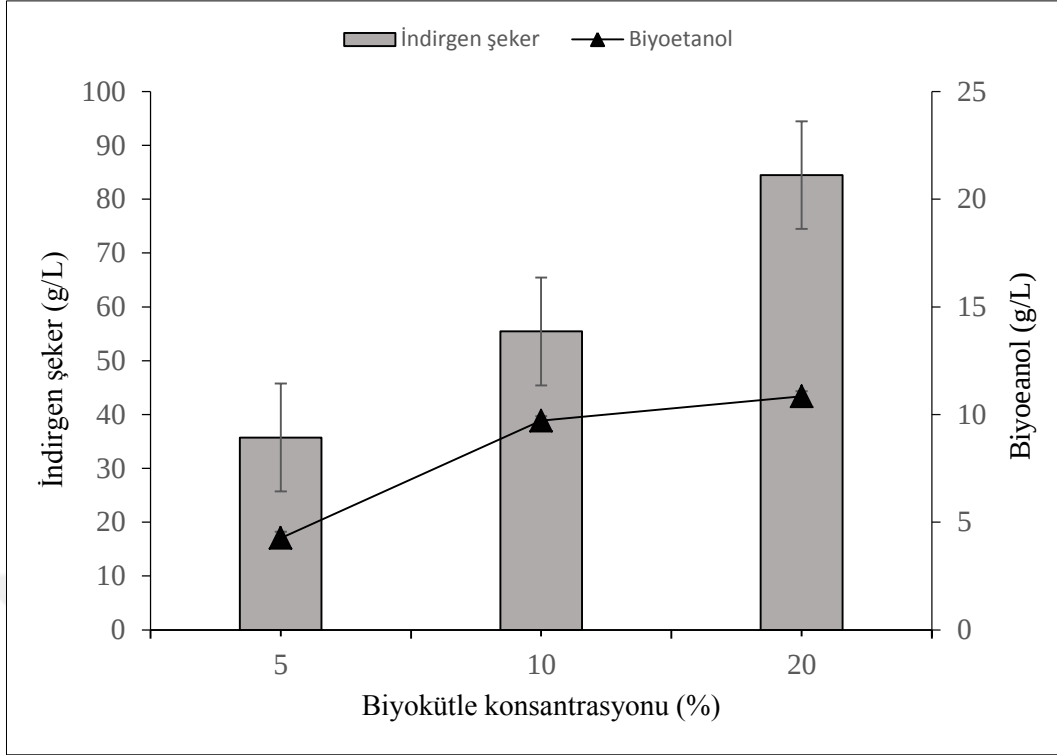
Çalışmalarının bu kısmında başlangıç elma posası konsantrasyonunun biyoetanol üretimine etkisi incelenmiştir. Elma posasının etanol üretim kapasitesinin yeterli olmasının görülmesi üzerine, deneylerin bu kısmından itibaren *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* mayaları kullanılmıştır.

Başlangıç için belirlenen üç farklı elma posası konsantrasyonunun (%5, %10, %20), mayaların etanol üretimlerine etkileri araştırılmıştır. Elma posasının %1 H₂SO₄ ile ön işleme sonucunda %5 biyokütle konsantrasyonunda 35.74 g/L, %10 biyokütle konsantrasyonunda 55.43 g/L ve %20 biyokütle konsantrasyonunda ise 84.47 g/L indirgen şeker içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu ile *S. cerevisiae* ve *K. marxianus*'un etanol üretimleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te belirtilmiştir.



Şekil 4.2 *S.cerevisiae*'de farklı konsantrasyonlardaki ilk elma posası yüklemelerinde başlangıç şeker miktarı ve biyoetanol miktarı

Ön-işlem koşulu: %1 H₂SO₄ ile 121°C'de 15 dakika otoklavlama fermentasyon koşulu: pH:5, 30°C sıcaklıkta çalkalama hızı: 100rpm 48 saat



Şekil 4.3 *K. marxianus*'ta farklı konsantrasyonlardaki ilk elma posası yüklemelerinde başlangıç şeker miktarı ve biyoetanol miktarı

Ön-işlem koşulu: %1 H_2SO_4 ile $121^\circ C$ 'de 15 dakika otoklavlama fermentasyon koşulu: pH:4.8, $30^\circ C$ sıcaklıkta çalkalama hızı: 100 rpm 48 saat

Farklı elma posası konsantrasyonlarının etanol üretimi üzerindeki etkilerine bakıldığı deneylerde, her iki maya için de en yüksek etanol miktarı %20 elma posası konsantrasyonunda, en düşük etanol üretimi ise %5 elma posası varlığında gözlenmiştir. *S. cerevisiae* ve *K. marxianus*'ta %20 biyokütle varlığında sırasıyla 21.9 g/L ve 10.84 g/L olarak etanol üretilmiştir. %5 elma posası konsantrasyonunda ise üretim miktarı sırasıyla aynı mayalar için 13.1 g/L ve 4.26 g/L olarak saptanmıştır. Bununla birlikte %10 elma posası varlığında ise *S. cerevisiae*'de 16.72 g/L ve *K. marxianus*'ta 9.71 g/L etanol üretimi gözlenmiştir. Deneylerde kullanılan farklı elma posası konsantrasyonlarının tümünde *S. cerevisiae* için en yüksek etanol miktarı 48. saat sonunda, *K. marxianus* için ise 24. saat sonunda saptanmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda en yüksek etanol konsantrasyonu %20 elma posası varlığında saptandığı için ilerleyen deneylerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.

Başlangıç elma posası etkileri bazı kinetik parametreler (teorik etanol verimi/%, volümetrik üretkenlik/ Q_p ve fermentasyon verimi/ $Y_{p/s}$) hesaplanmıştır. %20 elma posası konsantrasyonunda, *S. cerevisiae* ve *K. marxianus*'ta teorik etanol verimleri sırasıyla %50 ve %25.1 olarak hesaplanmıştır. Volümetrik üretkenlik (Q_p) *S. cerevisiae*'de 0.44 g/L.h ve *K. marxianus*'ta 0.45 g/L.h olarak saptanmıştır ve ek olarak aynı mayalarda fermentasyon verimi ($Y_{p/s}$) sırasıyla 0.44 g/g ve 0.21 g/g olarak belirlenmiştir. Kinetik parametreler ile oluşturulan sonuçların tamamı Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 %20 başlangıç elma posası konsantrasyonlarındaki kinetik parametre sonuçları

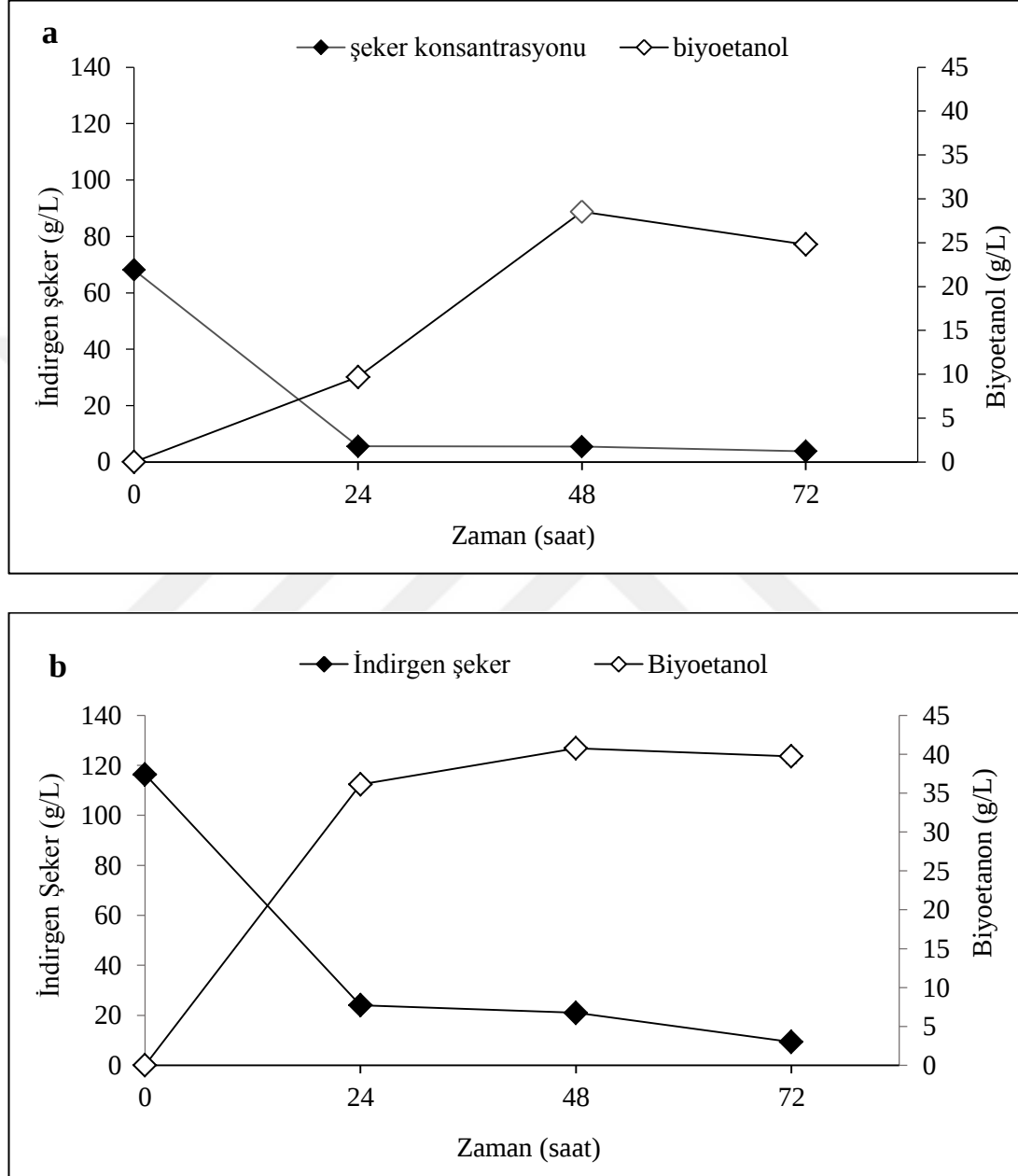
	Mikroorganizma	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>
Teorik etanol verimi (%)	50.0	25.1
Q_p (g/L.h)	0.44	0.45
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.44	0.21

Ön-işlem koşulları: 121°C'de 15 dakika %1 H_2SO_4 , fermentasyon koşulu: pH:4.8, 30°C'de 100 rpm çalkalama hızı

4.4 Besiyeri Yıkanmasının Ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi

Deneylerde ek olarak iki farklı büyüme ortamının (katı-sıvı tüm hidrolizat, yıkanmış katı hidrolizat) indirgen şeker ve etanol miktarına etkileri araştırılmıştır. Her bir büyüme ortamı, belirlenen optimum elma posası konsantrasyonunda (%20) 121°C'de, 15 dakika boyunca, %1 H_2SO_4 ve 15 FPU/g substrat enzim varlığına hidroliz edilerek yapılmıştır. Deney için uygulanan iki büyüme ortamında da *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayaları kullanılmıştır. Her iki maya için de en yüksek etanol miktarı katı-sıvı büyüme ortamında bulunmuştur. *S. cerevisiae* 48 saat fermentasyon sonunda en yüksek 40.7 g/L, *K. marxianus* ise 24 saat sonunda en yüksek 21.0 g/L etanol üretmiştir. Diğer taraftan yıkanmış katı fraksiyonu içeren büyüme ortamında ise, en yüksek etanol üretimi *S. cerevisiae* için 28.5 g/L ve *K. marxianus* için 15.0 g/L olarak bulunmuştur. Katı sıvı

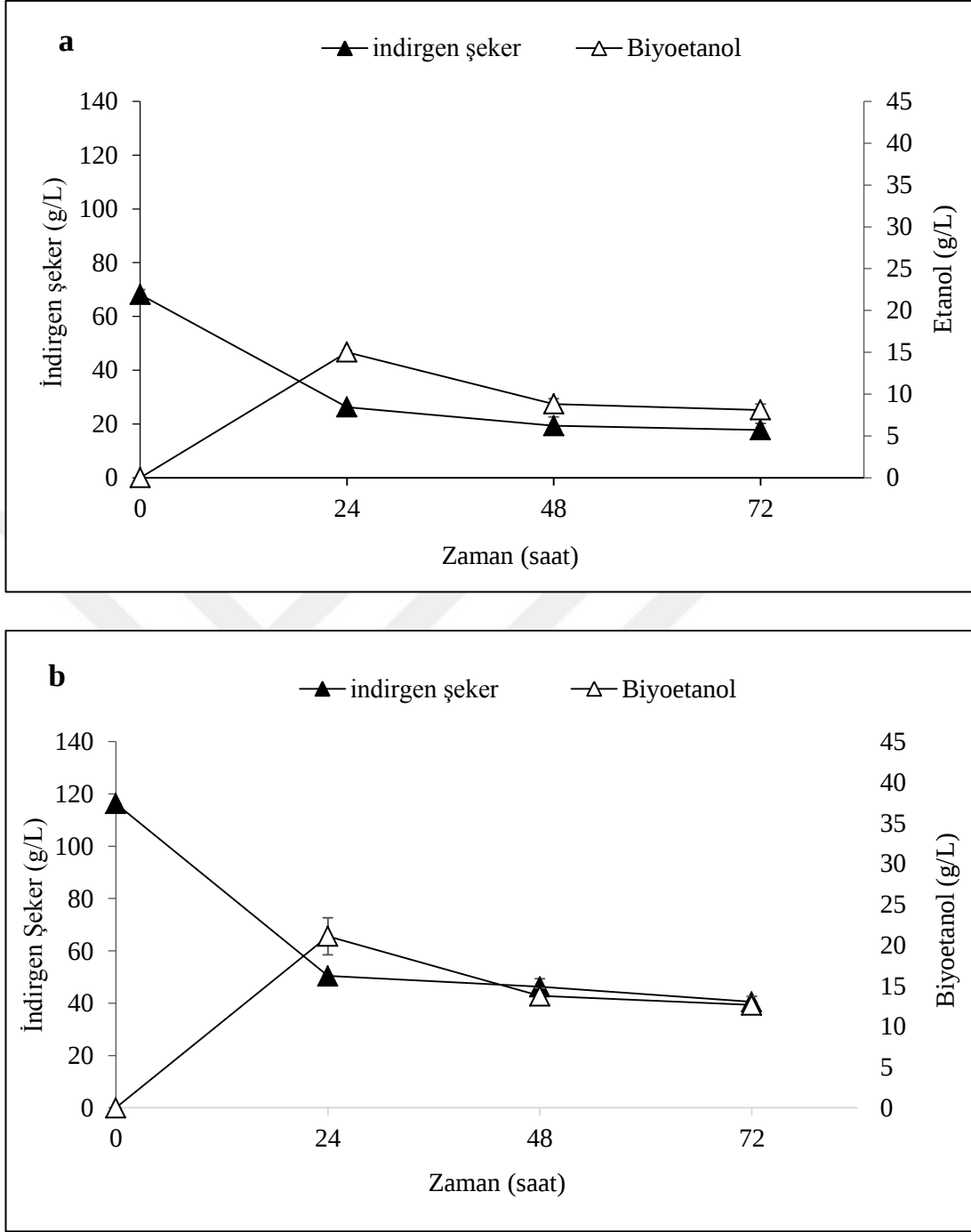
besiyerinin içeriğindeki yüksek indirgen şeker miktarı ve yüksek etanol üretiminden dolayı ilerleyen deneylerde büyüme ortamı olarak katı-sıvı tüm elma posası hidrolizatı kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.4 ve 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 *S. cerevisiae*'nin farklı besiyeri ortamlarında harcanan şeker ve etanol üretimi

(a) Yıkılmış katı fraksiyon, (b) Katı-sıvı tüm fraksiyon

Ön-işlem: 121°C’de 15 dakika %1 H₂SO₄ otoklavlama, Başlangıç biyokütle: %20, pH:4.8 Enzim konsantrasyonu: 15 FPU/g substrat, 30°C’de 100 rpm çalkalama hızı



Şekil 4.5 *K. marxianus*'un farklı besiyeri ortamlarında harcanan şeker ve etanol üretimi

(a) Yıkanmış katı fraksiyon, (b) Katı-sıvı tüm fraksiyon

Ön-işlem: 121°C'de 15 dakika %1 H_2SO_4 otoklavlama, Başlangıç biyokütle: %20, pH:4.8 Enzim konsantrasyonu: 15 FPU/g substrat, 30°C'de 100 rpm çalkalama hızı

4.5 Artan Enzim Konsantrasyonlarının İndirgen Şeker Ve Etanol Üretimine Etkisi

Tez çalışmasının bu kısmında, %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunun enzimatik hidrolizi ile ortama salınan indirgen şekerlerin konsantrasyonu ve etanol üretimine etkileri araştırılması için farklı enzim konsantrasyonları (15, 30, 60, 120 FPU/g substrat) kullanılarak test edilmiştir. Selüloz enzimi olarak CellicCTec2 (Novozymes/Danimarka) kullanılmıştır.

Elma posasının enzimatik hidrolizi 50 mM sitrat tamponu varlığında 72 saat boyunca, 50°C’de, 100 rpm çalkalama hızında yapılmıştır. Deneyde enzim konsantrasyonu arttıkça ortama salınan indirgen şeker miktarının da doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Enzimatik hidroliz sonrası ortama salınan şeker miktarları Çizelge 4.3’te gösterilmiştir. En yüksek indirgen şeker konsantrasyonu 72 saat sonunda 120 FPU/g substrat enzim varlığında 155 g/L olarak saptanmıştır. En düşük şeker konsantrasyonu ise 15 FPU/g substrat’ta 117 g/L olarak bulunurken 30 ve 60 FPU/g substrat’ta ise sırasıyla 121 g/L ve 141 g/L olarak görülmüştür.

Çizelge 4.3 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunda 72 saat sonunda enzimatik hidroliz sonucunda ortama salınan indirgen şeker miktarları

Enzim (FPU/g substrat)	İndirgen Şeker konsantrasyonu (g/L)
15	117 ±8.45
30	121 ±13.77
60	141 ±7.01
120	155 ±10.08

Ön-işlem koşulu: %1 H₂SO₄ ile 121°C’de 15 dakika otoklavlama fermentasyon koşulu: pH:4.8, 30°C sıcaklıkta çalkalama hızı: 100rpm 48 saat

Enzimatik hidroliz sonrasında etanol üretim miktarları, indirgen şeker konsantrasyonlarına benzer şekilde, enzim konsantrasyonları ile orantılı olarak etanol üretim miktarının da arttığı belirlenmiştir. *S. cerevisiae* için en yüksek etanol üretimi 120 FPU/g substrat enzim varlığında 52.4 g/L olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu

maya için en düşük etanol üretimi ise 15 FPU’da 40.7 g/L olarak bulunurken 30 ile 60 FPU/g substrat’ta ise sırasıyla 43.3 ve 48.7 g/L etanol üretildiği gösterilmiştir. *K. marxianus* mayası için ise en yüksek etanol miktarı 60 FPU/g substrat’ta 24.4 g/L gözlemlenmiştir. En düşük etanol üretimi ise 120 FPU/g substrat’ta 2.93 g/L olarak bulunurken 30 ve 15 FPU/g substrat’ta sırasıyla 21.3 ile 21.0 g/L olarak tespit edilmiştir. Enzimatik hidrolizin her iki maya için de etanol üretimi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunda dört farklı enzim konsantrasyonunda üretilen en yüksek etanol miktarları (g/L)

Mikroorganizmalar	Etanol Üretim Miktarı (g/L)			
	15 FPU	30 FPU	60 FPU	120 FPU
<i>S. cerevisiae</i>	40,77 ±3.04	43.32 ±0.00	48.7 ± 0.83	52.42 ± 2.43
<i>K. marxianus</i>	21.08 ± 0.73	21.37 ±1.16	24.47 ±0.70	2.93 ±0.43

Ön-işlem koşulu: 121°C’de 15 dakika %1 H₂SO₄, Fermentasyon koşulu: pH:4.8, 30°C’de 100 rpm. Çalkalama hızı

Ayrıca deneyin bu kısmında her iki mayanın da etanol ürettiği ve ortamda serbest halde bulunan indirgen şekerlerin tükendiği gözlenmiştir. Etanol konsantrasyonları ortamdaki indirgen şekerlerin kullanılmasıyla ilk önce artış göstermiş, daha sonra ortamdaki indirgen şeker miktarları düşünce doğru orantılı olarak etanol konsantrasyonlarının da düştüğü belirlenmiştir. *S. cerevisiae*’nin en yüksek etanol üretimine 48 saat sonunda ve *K. marxianus*’un ise 72 saat sonunda en yüksek etanol üretimine ulaştığı tespit edilmiştir. Etanol konsantrasyonları 72. saatten sonra *S. cerevisiae*’de 120 FPU’da 49.25 g/L’ye ve *K. marxianus*’ta 60 FPU’da ise 21.97 g/L’ye düşmüştür.

Yapılan çalışmada *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayaları için %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunun dört farklı enzim konsantrasyonunda ki kinetik parametreleri ayrıca hesaplanmıştır.

S. cerevisiae, 15 FPU/g substrat enzim varlığında, teorik verimin %68.5'ine, 30 FPU/g substratta %70.3'üne, 60 FPU/g substrat için % 60.8'ine ve 120 FPU/g substrat için ise %66.1'ine ulaşmıştır. Q_p değerleri ise 15 FPU, 30 FPU, 60 FPU ve 120 FPU enzim konsantrasyonları için sırasıyla 0.84 g/L.h, 0.90 g/L.h, 0.91 g/L.h ve 1.09 g/L.h olarak hesaplanmıştır ve $Y_{P/S}$ değerleri ise sırasıyla 0.46 g/g, 0.43 g/g, 0.42 g/g ve 0.42 g/g olarak saptanmıştır.

K. marxianus mayası için ise teorik verim 15 FPU/g substrat için %35.4'üne, 30 FPU/g substrat için %34.7'sine, 60 FPU/g substrat için %33.8'ine ve 120 FPU/g substrat için ise %3.7'sine ulaşmıştır. Q_p değeri ise 15 FPU, 30 FPU, 60 FPU ve 120 FPU enzim konsantrasyonları için sırasıyla 0.87 g/L.h, 0.89 g/L.h, 1.01 g/L.h ve 0.12 g/L.h olarak hesaplanmıştır. Ayrıca $Y_{P/S}$ değeri ise sırasıyla 0.31 g/g, 0.36 g/g, 0.37 g/g ve 0.02 olarak saptanmıştır. Her iki maya için de tüm kinetik parametre verileri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı asit konsantrasyonlarında *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayalarına ait kinetik parametre verileri

		Enzim Konsantrasyonu (FPU/g substrat)			
		15	30	60	120
Teorik Etanol Verimi (%)	<i>S. cerevisiae</i>	68.5	70.3	60.8	66.1
	<i>K. marxianus</i>	35.4	34.7	33.8	3.70
Q_p (g/L.h)	<i>S. cerevisiae</i>	0.84	0.90	0.91	1.09
	<i>K. marxianus</i>	0.87	0.89	1.01	0.12
$Y_{P/S}$ (g/g)	<i>S. cerevisiae</i>	0.46	0.43	0.42	0.42
	<i>K. marxianus</i>	0.31	0.36	0.37	0.02

Ön-işlem Koşulu: 120°C'de 15 dakika %1 H₂SO₄, Fermentasyon Koşulu: pH:4.8, 30°C Çalkalama Hızı: 100 rpm

4.6 Çözünür Soya Unu Proteininin İndirgen Şeker Ve Etanol Üretimine Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde ise enzimatik hidrolize çözünür soya unu proteininin (ÇSUP) katkılanması ile ortama salınan indirgen şeker konsantrasyonları ve etanol üretimine etkilerinin araştırılması için dört farklı çözünür soya unu konsantrasyonu (20, 40, 80, 160 mg/g substrat) denenmiştir. Deneyler 60FPU/g substrat enzim varlığında gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak ÇSUP içermeyen besiyeri ortamı kullanılmıştır. Enzimatik hidroliz sonrası, çözünür soya unu proteininin eklenmesi ile ortama salınan şeker miktarları Çizelge 4.6'de gösterilmiştir. En yüksek indirgen şeker miktarı 60 FPU enzim ve 80 mg/g selüloz ÇSUP ile takviye edildiğinde 176 g/L olarak bulunmuştur. En düşük indirgen şeker ise ÇSUP eklenmeyen ortamda 141.04 g/L olarak tespit edilirken, 20 mg/g selüloz ÇSUP içeren ortamda 148.28 g/L, 40 mg/g selüloz ÇSUP varlığında ise 169.30 g/L ve 160 mg/g selüloz'da ise 151.28 g/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.6 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunun artan ÇSUP konsantrasyonunda belirlenen indirgen şeker konsantrasyonları (g/L)

Çözünür Soya Unu proteini (mg/g selüloz)	İndirgen Şeker konsantrasyonu (g/L)
0	141.04 ±7.01
20	148.28 ±4.92
40	169.30 ±3.32
80	176.43 ±4.92
160	151.28 ±0.98

Ön-işlem Koşulu: 120°C'de 15 dakika %1 H₂SO₄, Fermentasyon Koşulu: pH:4.8, 30°C Çalkalama Hızı: 100 rpm

Çözünür soya unu proteinleri besiyeri ortamına eklendikten sonra etanol miktarlarına bakıldığında indirgen şeker konsantrasyonlarına benzer bir şekilde, ÇSUP konsantrasyonları arttığında etanol konsantrasyonlarının da arttığı belirlenmiştir. Her iki maya içinde 80 mg/g selüloz ÇSUP varlığında en yüksek etanol üretimi gözlenmiştir ve bu değerler, *S. cerevisiae* için 53.1 g/L ve *K. marxianus* için ise 29.5 g/L olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte *S. cerevisiae* mayası için ÇSUP içermeyen ortamda 43.9

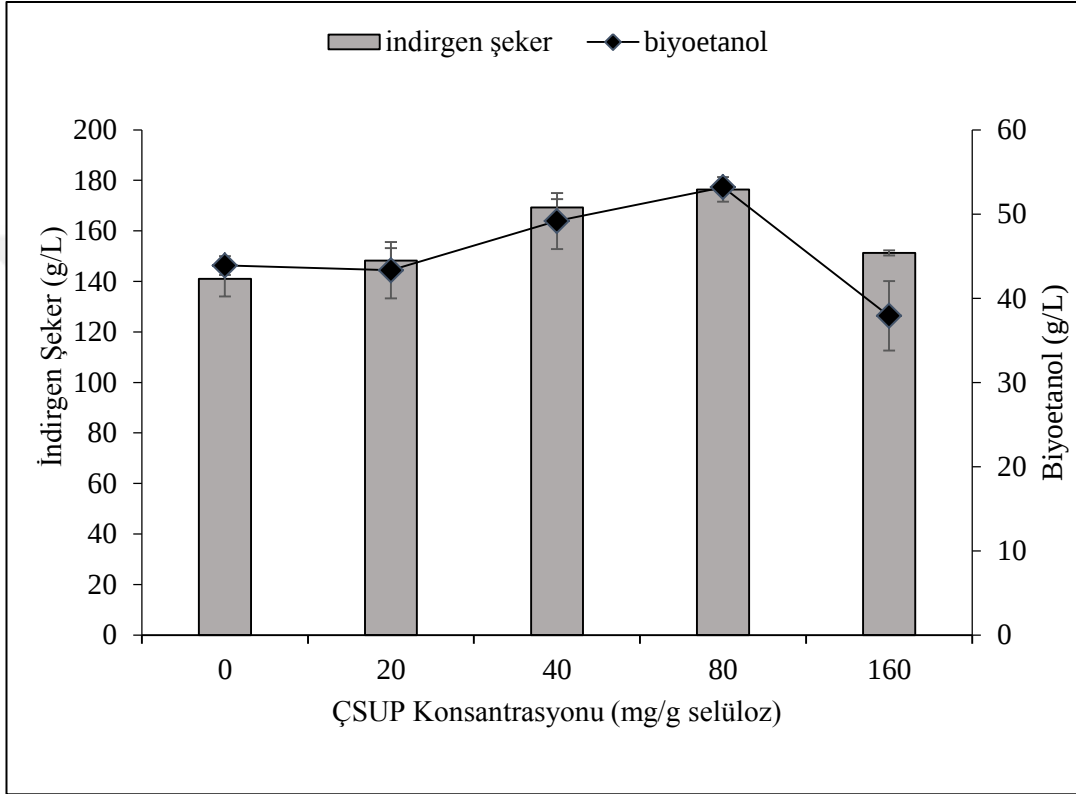
g/L, 20 mg/g selüloz'da 43.33 g/L, 40 mg/g selüloz'da 49.18 g/L ve 160 mg/g selüloz varlığında ise 37.91 g/L olarak hesaplanmıştır. *K. marxianus* mayasında ise bu miktarlar sırasıyla 24.47 g/L, 25.72 g/L, 27.37 g/L ve 21.47 g/L olarak tespit edilmiştir. Çözünür soya unu proteininin etanol üretimine etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 %20 katı-sıvı elma posası ortamında ve artan ÇSUP konsantrasyonunda üretilen en yüksek etanol miktarı

ÇSUP Konsantrasyonu (mg/g selüloz)	Mikroorganizma	Etanol Üretim Miktarı (g/L)
0	<i>S. cerevisiae</i>	43.9 ± 1.12
	<i>K. marxianus</i>	24.47 ± 1.69
20	<i>S. cerevisiae</i>	43.33 ± 3.33
	<i>K. marxianus</i>	25.72 ± 0.13
40	<i>S. cerevisiae</i>	49.18 ± 3.32
	<i>K. marxianus</i>	27.37 ± 37.37
80	<i>S. cerevisiae</i>	53.18 ± 0.04
	<i>K. marxianus</i>	29.59 ± 0.70
160	<i>S. cerevisiae</i>	37.91 ± 4.14
	<i>K. marxianus</i>	21.47 ± 0.49

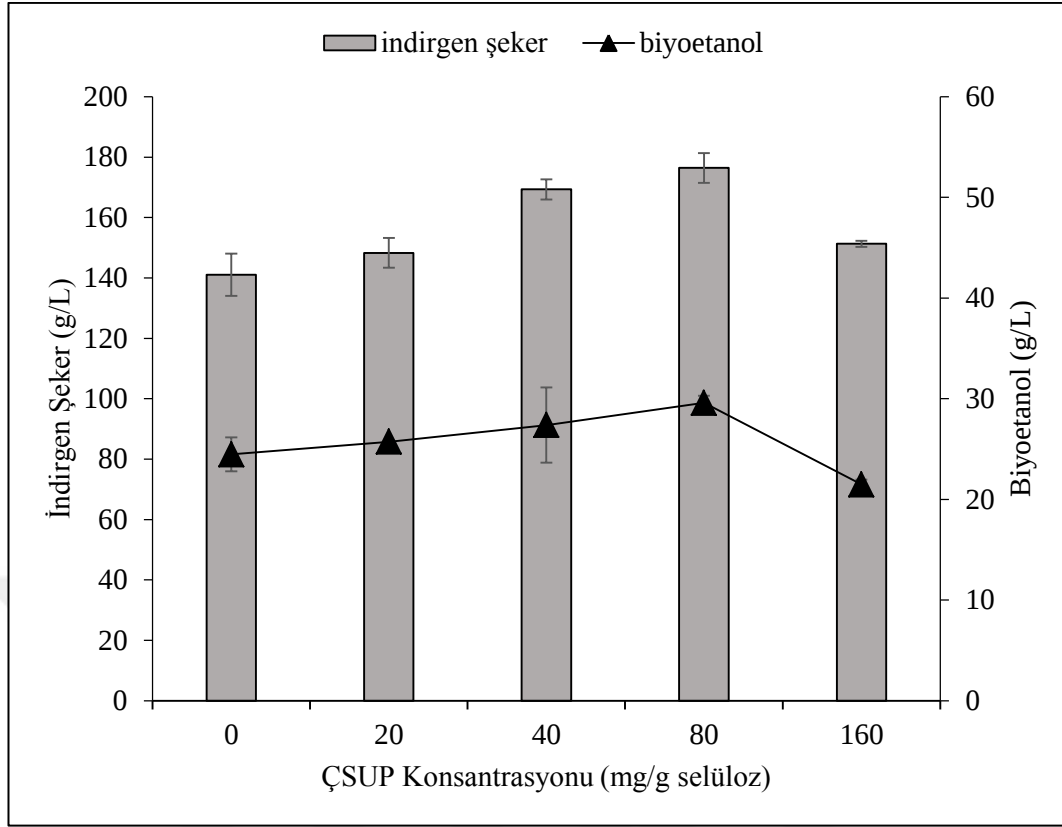
Ön-işlem Koşulu: 120°C'de 15 dakika %1 H₂SO₄, Fermentasyon Koşulu: pH:4.8, 30°C
Çalkalama Hızı: 100 rpm

Çalışmada ayrıca her iki mayanın %20 elma posası ortamında tükettiği şeker ve ürettiği etanol miktarları Şekil 4.6 ve 4.7’de gösterilmiştir. Daha önceki deneylere benzer bir şekilde etanol üretiminde ilk olarak artış gözlemlenmiş, daha sonra ise etanol miktarının düştüğü saptanmıştır. *S. cerevisiae*’da en yüksek etanol üretimi 48. saatte ve *K. marxianus* ’ta ise 72. saatte olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.6 *S. cerevisiae*’ta farklı ÇSUP konsantrasyonlardaki etanol üretimi

Ön-işlem Koşulu: 120°C’de 15 dakika %1 H₂SO₄, Fermentasyon Koşulu: pH:4.8, 30°C Çalkalama Hızı: 100 rpm, fermentasyon süresi 72 saat, 60 FPU/g substrat



Şekil 4.7 *K. marxianus*'ta farklı ÇSUP konsantrasyonlardaki etanol üretimi

Ön-işlem Koşulu: 120°C'de 15 dakika %1 H₂SO₄, Fermentasyon Koşulu: pH:4.8, 30°C Çalkalama Hızı: 100 rpm

Çalışmada *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayaları için kinetik parametreler ayrıca hesaplanmıştır. *S. cerevisiae* mayası için 60 FPU enzim konsantrasyonunda teorik etanol verimi ÇSUP içermeyen ortamda %60.8, 20 mg/g selüloz'da %57.1, 40 mg/g selülozda %56.8, 80 mg/g selülozda %58.9 ve 160 mg/g selülozda ise %49.0 olarak tespit edilmiştir. Q_p değeri ise sırasıyla 0.91 g/L.h, 0.90 g/L.h, 1.02 g/L.h, 1.10 g/L.h ve 0.78 g/L.h olarak hesaplanırken, $Y_{P/S}$ değerleri ise sırasıyla 0.42 g/g, 0.40 g/g, 0.46 g/g, 0.47 g/g ve 0.38 g/g olarak gözlenmiştir.

Aynı hesaplamalar, aynı koşullar altında *K. marxianus* mayası içinde yapılmıştır ve teorik etanol verimi ÇSUP içermeyen ortamda %33.8, 20 mg/g selüloz'da %33.9, 40 mg/g selülozda %31.6, 80 mg/g selüloz'da %32.8 ve 160 mg/g selülozda ise %27.7 olarak hesaplanmıştır. Q_p değerleri ise sırasıyla 1.01 g/L.h, 1.07 g/L.h, 1.14 g/L.h, 1.23 g/L.h ve 0.89 g/L.h olarak saptanırken, $Y_{P/S}$ değerleri ise sırasıyla 0.37 g/g, 0.34 g/g,

0.28 g/g, 0.29 g/g ve 0.28 g/g olarak tespit edilmiştir. Tüm kinetik parametre sonuçları Çizelge 4.8’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunda *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayalarına ait bazı kinetik parametreler

		ÇSÜP Konsantrasyonu (mg/g selüloz)				
		0	20	40	80	160
Teorik Etanol Verimi (%)	<i>S. cerevisiae</i>	60.8	57.1	56.8	58.9	49.0
	<i>K. marxianus</i>	33.8	33.9	31.6	32.8	27.7
Q_p (g/L.h)	<i>S. cerevisiae</i>	0.91	0.90	1.02	1.10	0.78
	<i>K. marxianus</i>	1.01	1.07	1.14	1.23	0.89
Y_{p/s} (g/g)	<i>S. cerevisiae</i>	0.42	0.40	0.46	0.47	0.38
	<i>K. marxianus</i>	0.37	0.34	0.28	0.29	0.28

Ön-işlem koşulu: %1 H₂SO₄ ile 120°C’de 15 dakika, Fermentasyon koşulu: ph:4.8, 30°C’de 100 rpm çalkalama hızı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yakın gelecekte fosil yakıtların tükenecek olması ve bu yakıtların neden olduğu enerji krizi ile çevresel sorunlardan dolayı alternatif yenilenebilir enerji kaynaklarının araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Yapılan tez çalışmasında elma posasının etanol üretimi kapasitesi ve enzimatik hidrolize çözünür soya unu proteininin etkileri araştırılmıştır.

5.1 Ön-İşlem Yöntemlerinin Etanol Üretimine Etkisi

Lignoselülozik materyalin fermentasyon deneyleri öncesinde ön-işlem görmesi, yapıda bulunan ligninin parçalanarak indirgen şekerlerin ortamda serbest halde bulunması için önem arz etmektedir. Lignoselülozik materyalin ön-işleminde, sıklıkla seyreltik asitler ile muamele kullanılmaktadır. Tez çalışmasında, %27.5 selüloz içeriğine sahip elma posası kullanılmıştır. Hammadde olarak elma posası kullanan Ucuncu vd. (2013) yaptığı bir çalışmada ise, kullanılan elma posasında %27.53 selüloz tespit etmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalar seyreltik asit/otoklav ön-işleminin son derece etkin bir metot olduğunu göstermektedir. Hsu vd. (2010) yaptığı bir çalışmada pirinç samanını iki farklı seyreltik asit konsantrasyonu (%0.5 ve %1) ile ön-işleme tabi tutmuş ve 100 g pirinç samanı besiyerinde en iyi sonucu 160°C'de %1 H₂SO₄'te 25 g glukoz olarak bulmuştur. Bir başka çalışmada ise farklı lignoselülozik hammaddeler (miscanthus, buğday samanı ve söğüt) kullanılarak farklı termokimyasal ön-işlem (%1 H₂SO₄, %5 NaOH) yöntemleri karşılaştırılmış ve en yüksek indirgen şeker verimi %1 H₂SO₄ ön-işlem yönteminde tespit edilmiştir (Wilkinson vd. 2016).

5.2 Elma Posasının İçeriğindeki İndirgen Şeker Profilleri

Elma posası, gıda ve meyve suyu endüstrisinin önemli bir atığıdır. Aynı zamanda ucuz ve yüksek fermente edilebilir şeker içeriğine sahiptir (Pathania vd 2017). Bu nedenlerden dolayı elma posasının içeriğindeki fermente edilebilir şeker miktarları literatürde sıklıkla araştırılmıştır.

Tez çalışmasında %20 katı-sıvı elma posasının içeriğindeki enzimatik hidroliz öncesi ve enzimatik hidroliz sonrası (15 FPU) indirgen şeker yüzdeleri ve tipleri Çizelge 4.2’te verilmiştir. Enzimatik hidroliz öncesi arabinoz (%45.2) diğer şeker konsantrasyonlarına göre yüksek bulunurken, enzimatik hidroliz sonrası ortamda glukoz (%74.14) baskın hale gelmiştir. Elma posası gıda ve meyve suyu sanayisinin önemli bir atığı olduğu için yüksek miktarda selüloz içerir. Tez çalışmasında elde edilen verilere benzer bir şekilde Ucuncu vd. (2013) enzimatik hidroliz olmadan elma posası besiyeri ortamında en yüksek indirgen şeker arabinoz olarak tespit etmiştir. Bir başka çalışmada ise elma posasının enzimatik hidroliz sonrası ortamdaki indirgen şekerlerden glukoz ve fruktozun yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Gullon vd. 2007). %20 elma posası ile yapılan bir çalışmada, elma posasının 34.0 g/L glukoz ve 33.7 g/L fruktoz içerdiği hesaplanmıştır. Daha sonra elma posası konsantrasyonu %30’a çıkartıldığında ise glukoz miktarının 57.5 g/L’ye, fruktoz miktarının ise 50.1 g/L’ye yükseldiği gösterilmiştir (Magyar vd. 2016).

5.3 Başlangıç Elma Posası Konsantrasyonunun Etanol Üretimine Etkisi

Biyokütle konsantrasyonu fermentasyon kısmı için önemli bir parametredir. Uygun biyokütle konsantrasyonu aşıldığı zaman ortama salınan yüksek şeker miktarı ozmotik strese ve fermentasyonu negatif yönde etkileyecek inhibitör maddelerin ortamda bulunmasına neden olabilmektedir. (Han vd. 2011). Uygun biyokütle konsantrasyonunun altındaki değerlerde ise ortama salınan düşük şeker miktarından dolayı etanol üretim verimi azalmaktadır. Bundan ötürü yapılan tez çalışmasında elma posasından biyoetanol üretimi için en uygun biyokütle konsantrasyonu araştırılmıştır. Tez çalışmasının bu bölümünde üç farklı konsantrasyonda (%5, %10, %20) elma posası içeren besiyeri hazırlanmıştır. Her iki maya (*S. cerevisiae* ve *K. marxianus*) için de %20 elma posası kullanımının, %5 ve %10 elma posası kullanımına oranla etanol üretimini arttırdığı gözlenmiştir. (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Literatürde tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla benzerlik gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Miscanthus biyokütlesi kullanılan bir çalışmada Han vd. (2011) en yüksek etanol üretimini %20 başlangıç biyokütle konsantrasyonu olarak belirtmiştir. Seyrelik asit (%2) ön-işlemi sonrası buğday samanı biyokütlesinden etanol üretilen başka bir çalışmada ise, en yüksek etanol veriminin %20 başlangıç buğday samanı konsantrasyonunda bulunduğu tespit edilmiştir

(Saini vd. 2015). Arpa samanından etanol üretildiği bir diğer çalışmada ise Han vd. (2013) optimum arpa samanı konsantrasyonunu %20 olarak saptamış ve elde edilen en yüksek etanol konsantrasyonu 46.00 g/L olarak belirtmiştir. Tez çalışmasının bu kısmında en yüksek etanol üretimi %20 elma posası konsantrasyonunda bulunduğu için, ilerleyen kısımlarda başlangıç biyokütle konsantrasyonu olarak %20 elma posası kullanılmıştır. Kullanılan hammaddenin homojen bir şekilde karıştırılması besiyeri konsantrasyonu arttıkça zorlaştığı için %20 elma posası konsantrasyonunun üzerindeki değerler çalışma kapsamına alınmamıştır.

%20 elma posası içeriğine sahip besiyeri ortamında bulunan her iki mayanın da ortamda serbest halde bulunan indirgen şekerleri harcamaya başladıkları görülmüştür.

İndirgen şeker ve etanol konsantrasyonlarına paralel olarak %20 biyokütle varlığında kinetik parametrelerde de artış saptanmıştır. Literatürde %10-20 arasındaki biyokütle kullanımının yüksek kinetik parametrelere sebep olduğu gösterilmiştir. Örneğin patates kabuğu atıklarından etanol üretilen bir çalışmada %12.25 optimum besiyeri konsantrasyonunda *S. cerevisiae*'de etanol konsantrasyonu 22.54 g/L ve $Y_{p/s}$ değeri ise 0.32 g/g olarak gözlenmiştir (Chohan vd. 2020).

5.4 Besiyeri Yıkanmasının Ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi

Lignoselülozik materyallerden etanol üretimi gerçekleştirilirken uygulanan seyreltik asit ön-işlemi, heteropolimer yapıda olan hemiselülozun çözünmesine neden olduğundan fermente edilebilir bazı indirgen şekerlerin sıvı hidrolizatta kalmasına neden olur. Ön-işlem sırasında bazı inhibitör moleküller de ortama salındığından bu sıvı kısmın enzimatik hidroliz öncesi besiyeri ortamından uzaklaştırılması indirgen şeker kaybına neden olur (Kumar vd. 2009; Taquero ve Bolado 2014). Bu nedenden dolayı katı-sıvı tüm fraksiyonun enzimatik hidroliz ve etanol üretimi için fermentasyon deneylerinde kullanılması ile fermente edilebilir şekerlerin tamamının ortamda kalması sağlanarak daha verimli bir fermentasyon gerçekleştirilebilir. Fakat katı-sıvı tüm fraksiyonun biyoetanol üretimi için fermentasyon deneylerinde kullanılması, kütle transfer limitasyonları, karıştırma zorlukları, biyokütlenin su tutma kapasitesinin aşılması, yüksek şeker ve inhibitör madde içeriğinden dolayı genellikle mümkün değildir

(Koppram vd. 2014). Bu nedenlerden dolayı katı-sıvı tüm fraksiyonun biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte ön-işlem sonrası katı fraksiyonun yıkanarak enzimatik hidroliz ve etanol üretimi için fermentasyona sokulduğu zaman, ortamdaki inhibitör maddeler uzaklaştırılır ve bu sayede etanol verimi artar fakat fermente edilebilir indirgen şekerlerin büyük bir kısmı kaybedildiği için etanol üretim miktarı da düşer. Yukarıda sayılan nedenlerden ötürü, tez çalışmasında, katı-sıvı elma posası fraksiyonu ile yıkanmış elma posası fraksiyonu indirgen şeker ve etanol üretimi açısından karşılaştırılmıştır.

Deneyler %20 başlangıç optimum elma posası konsantrasyonunda, otoklavda, 121°C'de 15 dakika boyunca %1 H₂SO₄ ve 15 FPU/g substrat enzim varlığında gerçekleştirilmiştir. %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonunun kullanıldığı ortamın, yıkanmış elma posası fraksiyonu ortamından yaklaşık iki katı kadar yüksek şeker (116.3 g/L) içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir. Literatürde, bu tez çalışmasına benzer sonuçların olduğu raporlar bulunmaktadır. Koppram ve Olsson (2014) yaptığı çalışmada, katı-sıvı ladin atığı içeren ortamda, yıkanmamış katı kısım fraksiyonuna oranla yüksek glukoz ve ksiloz şeker konsantrasyonu bulmuştur. Del Rio vd. (2020) yaptığı bir çalışmada ise SSF yöntemine tabi tutulmuş katı-sıvı mısır püskülü hidrolizatının, mısır püskülünün sıvı fraksiyonuna göre daha yüksek etanol verimi (41.9 g/L) elde edildiğini göstermiştir. Tomas-Pejo vd (2008), buğday samanının suda çözünmeyen katı kısmının glukoz miktarını 23.9 g/L olarak bulurken, katı-sıvı tüm buğday hidrolizatının glukoz miktarının ise 37.5 g/L'ye yükseldiğini göstermiştir.

Tez çalışmasının bu bölümünde en yüksek etanol miktarı ve katı-sıvı fraksiyonda gözlendiği için deneyin sonraki kısımlarında katı-sıvı hidrolizat kullanılmıştır.

5.5 Artan Enzim Konsantrasyonlarının İndirgen Şeker Ve Etanol Üretimine Etkisi

Tez çalışmasının bu bölümünde %20 katı-sıvı elma posası fraksiyonu enzimatik hidrolize tabi tutularak etanol miktarının artırılması hedeflenmiştir. Bu nedenle %20 Katı-Sıvı elma posası ile dört farklı enzim konsantrasyonu (15, 30, 60, 120 FPU/g substrat) kullanılmıştır.

Enzimatik hidroliz öncesi, %20 elma posasındaki indirgen şeker miktarı 84.47 g/L olarak bulunurken, 15 FPU/g substrat enzim varlığında bu değerin 117.0 g/L'ye yükseldiği gözlenmiştir. Bununla birlikte artan enzim konsantrasyonlarıyla (30, 60, 120 FPU/g substrat) beraber indirgen şeker miktarlarının belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Çizelge 4.5'te belirtildiği üzere en yüksek indirgen şeker miktarı 120 FPU/g substrat'ta bulunmuştur. Literatürde enzim miktarı arttıkça ortama salınan indirgen şeker miktarının da doğru orantılı bir şekilde arttığı birçok çalışma bulunmaktadır. Sindhu vd. (2012) %15 pirinç samanında 20 FPU ve 80 FPU enzim konsantrasyonu kullanarak şeker miktarlarındaki artış araştırmış ve 20 FPU varlığında indirgen şeker miktarı 0.45 g/g olarak bulurken, enzim konsantrasyonu 80 FPU'ya çıkartıldığında indirgen şeker miktarının 0.55 g/g'a yükseldiğini göstermiştir. Hammadde olarak şeker kamışının kullanıldığı bir diğer çalışmada ise üç farklı enzim miktarının (7.5, 15, 30 FPU/g) iki farklı ön-işlem üzerine etkileri araştırılmış ve kullanılan en yüksek enzim miktarı olan 30 FPU/g enzim konsantrasyonunun diğer konsantrasyonlara göre daha yüksek indirgen şeker açığa çıkarttığı gösterilmiştir (Berner-.Oviedo vd. 2018).

Enzimatik hidroliz sonrası gerçekleştirilen fermentasyon deneylerinde ise *S. cerevisiae* mayası en yüksek etanol üretimini 120 FPU/g substrat enzim varlığında gerçekleştirirken, *K. marxianus* mayası ise en yüksek etanol üretimini 60 FPU/g substrat enzim konsantrasyonunda gerçekleştirmiş, 120 FPU'da ise belirgin bir inhibisyon saptanmıştır. Bu durum, Zafar ve Owais (2006) yaptığı çalışmadaki gibi *K. marxianus*'un yüksek indirgen şekere sahip ortamlarda inhibisyona uğradığı sonucuyla örtüşmektedir. Ek olarak, buğday samanı kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise, enzim konsantrasyonunun 2.5- 3.5 FPU/mL'yi geçtiğinde *K. marxianus*'un büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Tomas-Pejo vd. 2009).

5.6 Çözünür Soya Unu Proteininin Etanol Üretimine Etkisi

Enzimatik hidroliz sırasında çeşitli kimyasallar (PEG, Tween 80 vb.) veya sığır serumu albümini gibi moleküller, enzim ile lignin arasındaki verimsiz bağları azaltmak için kullanılmaktadır (Seo vd. 2011). Bu moleküllerin yüksek maliyetleri nedeniyle verimsiz bağları azaltacak düşük maliyetli moleküller yoğunlukla araştırılmaktadır (Brondi vd.

2020). Soya unu proteininin lignin bloke edici aktivitesi daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Florencio vd. 2016). Soya ununun suda düşük çözünürlükte olması, enzimatik hidroliz için olumsuz bir durum oluşturmaktadır. Bu nedenle Luo vd. (2019) soya unundan, farklı konsantrasyonlarda çözünür soya unu proteinleri (ÇSUP) ekstrakte ederek, bu moleküllerin enzimatik hidrolizi arttırdığını göstermiştir fakat söz konusu çalışmada biyoetanol üretimine ilişkin herhangi bir veri sunulmamıştır. Bu sebepten dolayı, tez çalışmasının ana motivasyon kaynağı çözünür soya unu proteinlerinin (ÇSUP) etanol üretimine etkisinin araştırılması olmuştur. Deneyler 60 FPU/g substrat enzim varlığında yapılmıştır. 60 FPU'dan yüksek enzim konsantrasyonlarının kullanılması lignoselülozik hammaddelerin ticari amaçlı etanol üretiminde kullanılmasında ekonomik olarak önemli bir engel teşkil etmektedir (Volynets vd. 2017). Bu nedenden dolayı enzim maliyetini azaltmak ve verimi artırarak yüksek etanol elde etmek amacıyla, tez çalışmasında ÇSUP kullanımının etanol üretimi ve indirgen şeker üzerindeki etkileri 60 FPU enzim varlığında araştırılmıştır. Bu durumun en temel sebeplerinden biri ise soya unu proteininin 1.25/ kg protein dolar (yaklaşık 10 TL) gibi ucuz bir maliyete sahip olması ve bol bulunmasıdır (Florencio vd. 2016).

Çözünür soya unu proteininin enzimatik hidrolize etkilerinin araştırıldığı bu kısımda %20 Katı-sıvı elma posası fraksiyonunda dört farklı ÇSUP konsantrasyonu ve kontrol için ÇSUP içermeyen ortam (0, 20, 40, 60, 80 ve 160 mg/g selüloz) kullanılmıştır ve ortama salınan indirgen şeker miktarları Çizelge 4.7'de verilmiştir. ÇSUP kullanımının enzimatik hidrolizi olumlu etkilediği ve ortama salınan indirgen şeker miktarını belirgin bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Ek olarak, en yüksek indirgen şeker miktarının 80 mg/g selüloz ÇSUP eklenen ortamda 176 g/L olduğu bulunmuştur. Bu durum enzim miktarı yarıya indirildiğinde dahi besiyerine ÇSUP katılanması sonucunda şeker miktarının %13.5 arttığını göstermektedir. Bir çalışmada bambu, okaliptüs ve mason çamının enzimatik hidroliz sonrası substrat miktarları sırasıyla %57, %54 ve %45 mg/g glukoz olarak hesaplanmış ve daha sonra ortama 80 mg/g glukoz çözünür soya unu proteini eklendiğinde, substrat miktarlarının %87, %94 ve %86 mg/g glukoz'a yükseldiğini göstermiştir (Luo vd. 2019). Yapılan tez çalışmasında ise ÇSUP kullanımının biyoetanol üretimini arttırdığı gösterilmiştir. *S. cerevisiae* 120 FPU enzim varlığında 52.4 g/L etanol üretirken, enzim konsantrasyonu yarıya indirildiğinde (60

FPU) ve ortama 80 mg/g selüloz ÇSUP eklendiğinde 53.1 g/L biyoetanol ürettiği gösterilmiştir. Aynı koşullarda *K. marxianus*'un etanol üretimi 24.4 g/L'den 29.5 g/L'ye yükseldiği tespit edilmiştir. *S. cerevisiae*'ya soya unu eklenip, 60 FPU enzim varlığında etanol konsantrasyonunun %9.03 arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, 120 FPU ile karşılaştırıldığında ise soya unu eklenip enzim miktarı yarıya düşürüldüğünde dahi etanol miktarını %1.33 arttığı saptanmıştır. Aynı şekilde 60 FPU'da *K. marxianus*'un etanol miktarı %20.92 arttığı gözlenmiştir.

Yapılan çalışmada, enzimatik hidroliz ortamına çözünür soya unu proteini katkılanmasının enzim konsantrasyonunu azaltarak daha yüksek indirgen şeker ve biyoetanol konsantrasyonlarına neden olduğu bulunmuştur. Benzer bir çalışmada Sindhu vd. (2011), şeker kamışında enzimatik hidrolizi artırmak için yüzey aktif maddesi olarak Tween 80 kullanmış ve 0.68 g/g indirgen şeker ve 11.3 g/L etanol üretmiştir. Kleingesinds vd. (2018) ise %10 mısır koçanı besiyerinde kullanılan enzim miktarını Tween 80 katkılanması ile %41.6 oranında azaltmış ve bu koşullarda *S. stipitis* mayasından 26.6 g/L etanol elde etmiştir.

5.7 Sonuç Ve Öneriler

Yapılan tez çalışmasında, elma posası asidik ön-işlem ile parçalanmış, ayrıca elma posaları enzimatik hidrolize tabi tutularak indirgen şekerler elde edilmiş ve bu şekerlerden etanol üretilebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte fermentasyon deneyleri için önemli bazı parametreler optimize edilmiş ve ÇSUP kullanılarak enzim konsantrasyonu yarıya indirilmiş, buna karşın şeker miktarı %13.5, etanol miktarı ise %1.33 arttırılarak fermentasyon etkinliği belirgin bir şekilde iyileştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında çözünür soya unu proteininin (ÇSUP) enzimatik hidrolizin iyileştirmesi adına ekonomik bir materyal olduğu gösterilmiş ve bu sayede etanol üretiminin arttırılabileceği ilk kez ispatlanmıştır. Sonuç olarak tez çalışması, çözünür soya unu proteininin etanol üretimi için son derece umut vaat eden bir materyal olduğunu göstermektedir. İleride yapılacak metabolizma mühendisliği gibi çalışmalarla elma posasının etanol üretim verimliliğini arttırmak mümkündür.

KAYNAKLAR

- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., and Wang, Q. 2019. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on Environmental Health*, 34(1), 57-68.
- About El-Souod, G. W., Morsy, E. M., Hassan, L. H., and El-Sheekh, M. M. 2021. Efficient Saccharification of the Microalga *Chlorella vulgaris* and its Conversion into Ethanol by Fermentation. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45, 767-774.
- Agbogbo, F. K., and Coward-Kelly, G. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology letters*, 30(9), 1515-1524.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Negro, M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y., and Tan, T. 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60-88.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., and Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26(1), 89-105.
- Bernier-Oviedo, D. J., Rincón-Moreno, J. A., Solanilla-Duqué, J. F., Muñoz-Hernández, J. A., and Váquiro-Herrera, H. A. 2018. Comparison of two pretreatments methods to produce second-generation bioethanol resulting from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 122, 414-421.
- Branco, R. H., Serafim, L. S., and Xavier, A. M. 2019. Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. *Fermentation*, 5(1), 4.
- Brondi, M. G., Elias, A. M., Furlan, F. F., Giordano, R. C., and Farinas, C. S. 2020. Performance targets defined by retro-techno-economic analysis for the use of soybean protein as saccharification additive in an integrated biorefinery. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Buruiana, C. T., Garrote, G., and Vizireanu, C. 2013. Bioethanol production from residual lignocellulosic materials: a review—part 2. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI--Food Technology*, 37(1), 25-38.
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Šantek, M. I., and Šantek, B. 2018. Bioethanol production from renewable raw materials and its

- separation and purification: a review. *Food technology and Biotechnology*, 56(3), 289-311.
- Cargnin, S. T., and Gnoatto, S. B. 2017. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. *Food Chemistry*, 220, 477-489.
- Chohan, N. A., Aruwajoye, G. S., Sewsynker-Sukai, Y., and Kana, E. G. 2020. Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: process optimization and kinetic assessment. *Renewable Energy*, 146, 1031-1040.
- Choi, I. S., Lee, Y. G., Khanal, S. K., Park, B. J., and Bae, H. J. 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*, 140, 65-74.
- Dutta, K., Daverey, A., and Lin, J. G. 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114-122.
- Ertunç, F. 2019. Coat protein variability of Apple mosaic virus isolates from different plant hosts. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 3(2), 247-251.
- Evcan, E., and Tari, C. 2015. Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product. *Energy*, 88, 775-782.
- Floberg Karlsson, B., and Viitala, J. 2019. Application of Apple pomace for Fungal Cultivation.
- Florencio, C., Badino, A. C., and Farinas, C. S. 2006. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 221, 172-180.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., and Gombert, A. K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 339-354.
- G del Río, P., Gullón, P., Rebelo, F. R., Romaní, A., Garrote, G., and Gullón, B. 2020. A whole-slurry fermentation approach to high-solid loading for bioethanol production from corn stover. *Agronomy*, 10(11), 1790.
- Gomez-Flores, R., Thiruvengadathan, T. N., Nicol, R., Gilroyed, B., Morrison, M., Reid, L. M., and Margaritis, A. 2018. Bioethanol and biobutanol production from sugarcorn juice. *Biomass and Bioenergy*, 108, 455-463

- Gullón, B., Falqué, E., Alonso, J. L., and Parajó, J. C. 2007. Evaluation of apple pomace as a raw material for alternative applications in food industries. *Food Technology and Biotechnology*, 45(4), 426-433.
- Gupta, V. K., Potumarthi, R., O'Donovan, A., Kubicek, C. P., Sharma, G. D., and Tuohy, M. G. 2014. Bioenergy research: an overview on technological developments and bioresources. *Bioenergy Research: Advances and Applications*. 23-47.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., and Zacchi, G. 2012. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 114-122.
- Han, M., Kang, K. E., Kim, Y., and Choi, G. W. 2013. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochemistry*, 48(3), 488-495.
- Han, M., Kim, Y., Koo, B. C., and Choi, G. W. 2011. Bioethanol production by *Miscanthus* as a lignocellulosic biomass: Focus on high efficiency conversion to glucose and ethanol. *Bioresources*, 6(2), 1939-1953.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., and Kondo, A. 2013. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, 135, 513-522.
- Hsu, T. C., Guo, G. L., Chen, W. H., and Hwang, W. S. 2010. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 101(13), 4907-4913.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., and Ravindra, P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756-769.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., and Ravindra, P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756-769.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., and Ravindra, P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 756-769.
- Jin, Q., Qureshi, N., Wang, H., and Huang, H. 2019. Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by *Clostridium beijerinckii* P260. *Fuel*, 244, 536-544.

- Jin, X., Song, J., and Liu, G. Q. 2020. Bioethanol production from rice straw through an enzymatic route mediated by enzymes developed in-house from *Aspergillus fumigatus*. *Energy*, 190, 116395.
- Kang, Q., Appels, L., Tan, T., and Dewil, R. 2014. Bioethanol from lignocellulosic biomass: current findings determine research priorities. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Kapoor, M., Soam, S., Agrawal, R., Gupta, R. P., Tuli, D. K., and Kumar, R. 2017. Pilot scale dilute acid pretreatment of rice straw and fermentable sugar recovery at high solid loadings. *Bioresource Technology*, 224, 688-693.
- Karim, A., Gerliani, N., and Aider, M. 2020. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*. 108818.
- Kim, T. H., and Lee, Y. Y. 2007. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81-92. Humana Press.
- Kim, H. M., Oh, C. H., and Bae, H. J. 2017. Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 233, 44-50.
- Kim, H. M., Wi, S. G., Jung, S., Song, Y., and Bae, H. J. 2015. Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresource Technology*, 175, 128-134.
- Kleingesinds, E. K., José, Á. H., Brumano, L. P., Silva-Fernandes, T., Rodrigues Jr, D., and Rodrigues, R. C. 2018. Intensification of bioethanol production by using Tween 80 to enhance dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of corncob. *Industrial Crops and Products*, 124, 166-176.
- Koppram, R., and Olsson, L. 2014. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 1-9.
- Koupaie, E. H., Dahadha, S., Lakeh, A. B., Azizi, A., and Elbeshbishy, E. 2019. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of environmental management*, 233, 774-784.
- Kumari, D., and Singh, R. 2018. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 877-891.
- Küüt, A., Ritslaid, K., Küüt, K., Ilves, R., and Olt, J. 2019.). State of the art on the conventional processes for ethanol production. *Ethanol*, 61-101.

- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., and Morrissey, J. P. 2011. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(4), 507-519.
- Leong, W. H., Lim, J. W., Lam, M. K., Uemura, Y., and Ho, Y. C. 2018. Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 950-961.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Lu, X., Li, C., Zhang, S., Wang, X., Zhang, W., Wang, S., and Xia, T. 2009. Enzymatic sugar production from elephant grass and reed straw through pretreatments and hydrolysis with addition of thioredoxin-His-S. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1-11.
- Luo, X., Liu, J., Zheng, P., Li, M., Zhou, Y., Huang, L., Chen, L., and Shuai, L. 2019. Promoting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by inexpensive soy protein. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1-13.
- Magyar, M., da Costa Sousa, L., Jin, M., Sarks, C., and Balan, V. 2016. Conversion of apple pomace waste to ethanol at industrial relevant conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7349-7358.
- Mat Aron, N. S., Khoo, K. S., Chew, K. W., Show, P. L., Chen, W. H., and Nguyen, T. H. P. 2020. Sustainability of the four generations of biofuels—A review. *International Journal of Energy Research*, 44(12), 9266-9282.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., and Sawayama, S. 2009. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 37-53.
- Maurya, D. P., Singla, A., and Negi, S. 2015. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. 3 *Biotech*, 5(5), 597-609.
- Medipally, S.R., Yusoff, F.M., Banerjee, S., and Shariffi, M. 2015. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *BioMed Research International*, 2015, 1-13.
- Mehani, I., and Boucekima, B. 2018. Bioethanol production from renewable sources as alternative valorization of waste of starting dates in south Algeria. *AIP Conference Proceedings*, 1968(1), 030023.
- Mishra, S., Singh, P. K., Dash, S., and Pattnaik, R. 2018. Microbial pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethanation and waste management. 3 *Biotech*, 8(11), 1-12.

- Mohanty, S. K., and Swain, M. R. 2019. Bioethanol production from corn and wheat: food, fuel, and future. *Bioethanol Production From Food Crops*, 45-49.
- Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S. S., and Thatoi, H. 2017. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 1007-1032.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., and Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.
- Moravvej, Z., Makarem, M. A., and Rahimpour, M. R. 2019. The fourth generation of biofuel. *Second and Third Generation of Feedstocks*, 557-597.
- Nikolić, S., Mojović, L., Rakin, M., and Pejin, D. 2009. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*, 88(9), 1602-1607.
- Niphadkar, S., Bagade, P., and Ahmed, S. 2018. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229-238.
- Ozdingis, A. G. B., and Kocar, G. 2018. Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 2196-2203.
- Öz, M. H., Büyük, İ., Akpınar, A. E., Özmen, C. Y., Kazan, K., Vurgun, H., ... and Ergül, A. 2020. eastern Anatolian apples with a unique population structure are genetically different from Anatolian apples. *Gene*, 723, 144149.
- Pathania, S., Sharma, N., and Handa, S. 2017. Immobilization of co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* in sodium alginate for bioethanol production using hydrolysate of apple pomace under separate hydrolysis and fermentation. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(6), 450-459.
- Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng, E. P., and Show, P. L. 2018. Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 173, 81-94.
- Rabemanolontsoa, H., and Saka, S. 2016. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource technology*, 199, 83-91.
- Rastogi, M., and Shrivastava, S. 2017. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 330-340.

- Razmovski, R., and Vučurović, V. 2012.). Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel*, 92(1), 1-8.
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., and Mohammadi, A. A. 2020. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 117457.
- Roca, C., and Olsson, L. 2003. Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 560-563.
- Rocha-Meneses, L., Raud, M., Orupöld, K., and Kikas, T. 2017. Second-generation bioethanol production: A review of strategies for waste valorisation. *Agronomy Research*, 15(3), 830-847.
- Saini, J. K., Agrawal, R., Satlewal, A., Saini, R., Gupta, R., Mathur, A., and Tuli, D. 2015. Second generation bioethanol production at high gravity of pilot-scale pretreated wheat straw employing newly isolated thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBTIOC-35. *RSC Advances*, 5(47), 37485-37494.
- Saini, J. K., Saini, R., and Tewari, L. 2015.). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4) , 337-353.
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., and Sidiras, D. 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy*, 100,10-16.
- Salehi Jouzani, G., and Taherzadeh, M.J. 2015. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 152-195.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., and Aikat, K. 2012.). Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19-27.
- Seo, D. J., Fujita, H., and Sakoda, A. 2011. Structural changes of lignocelluloses by a nonionic surfactant, Tween 20, and their effects on cellulase adsorption and saccharification. *Bioresource Technology*, 102(20), 9605-9612.
- Seo, J. S., Chong, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Jung, C., Kim, J. J., ... and Kang, H. S. 2005. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature biotechnology*, 23(1), 63-68.
- Sert, B. Ş., İnan, B., and Özçimen, D. 2018. Effect of chemical pre-treatments on bioethanol production from *Chlorella minutissima*. *Acta Chimica Slovenica*, 65(1), 160-165.

- Sharma, H. K., Xu, C., and Qin, W. 2019. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235-251.
- Sindhu, R., Binod, P., and Pandey, A. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76-82.
- Sindhu, R., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., and Pandey, A. 2012. Organosolvent pretreatment and enzymatic hydrolysis of rice straw for the production of bioethanol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 473-483.
- Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., and Pandey, A. 2011. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(12), 10915-10921.
- Singh, B., and Kumar, A. 2020. Process development for sodium carbonate pretreatment and enzymatic saccharification of rice straw for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 138, 105574.
- Singh, Y. D., and Satapathy, K. B. 2018. Conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol: an overview with a focus on pretreatment. *International Journal of Engineering and Technologies*, 15, 17-43.
- Sluiter, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D., and Templeton, D. W. 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9043-9053.
- Solarte-Toro, J. C., Romero-García, J. M., Martínez-Patiño, J. C., Ruiz-Ramos, E., Castro-Galiano, E., and Cardona-Alzate, C. A. 2019. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 587-601.
- Song, Y., Cho, E. J., Park, C. S., Oh, C. H., Park, B. J., and Bae, H. J. 2019. A strategy for sequential fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* in bioethanol production from hardwoods. *Renewable Energy*, 139, 1287-1289.
- Spyridon, A., and Willem Euverink, G. J. 2016. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(5), 44-53.
- Srilatha, K., Bhagawan, D., and Himabindu, V. 2019. Pyrolysis of Garden Waste: Comparative Study of *Leucaena leucocephala* (Subabul Leaves) and *Azadirachta indica* (Neem Leaves) Wastes. *Waste Valorisation and Recycling* 293-306.

- Tan, I. S., and Lee, K. T. 2016. Comparison of different process strategies for bioethanol production from *Eucheuma cottonii*: An economic study. *Bioresource Technology*, 199, 336-346.
- Tan, J. S., Phapugrangkul, P., Lee, C. K., Lai, Z. W., Bakar, M. H. A., and Murugan, P. 2019. Banana frond juice as novel fermentation substrate for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101293.
- Tayyab, M., Noman, A., Islam, W., Waheed, S., Arafat, Y., Ali, F., Zaynab, M., Lin, S., Zhang, H., and Lin, W. 2018. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: a review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(1), 225-249.
- Thapa, L. P., Lee, S. J., Yang, X., Lee, J. H., Choi, H. S., Park, C., and Kim, S. W. 2015. proved bioethanol production from metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. *Process Biochemistry*, 50(12), 2051-2060.
- Toquero, C., and Bolado, S. 2014. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology*, 157, 68-76.
- Ucuncu, C., Tari, C., Demir, H., Buyukkileci, A. O., and Ozen, B. 2013. Dilute-acid hydrolysis of apple, orange, apricot and peach pomaces as potential candidates for bioethanol production. . *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 7(3), 376-389.
- Ummalyma, S. B., Supriya, R. D., Sindhu, R., Binod, P., Nair, R. B., Pandey, A., and Gnansounou, E. 2019. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—Current trends and future perspectives. *Second and Third Generation of Feedstocks*, 197-212.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., and Patil, S. 2014. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584.
- Volynets, B., Ein-Mozaffari, F., and Dahman, Y. 2017. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*, 6(1), 1-22.
- Wilkinson, S., Greetham, D., and Tucker, G. A. 2016. Evaluation of different lignocellulosic biomass pretreatments by phenotypic microarray-based metabolic analysis of fermenting yeast. *Biofuel Research Journal*, 3(1), 357.
- Wyman, C. E. 2018. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. *Handbook on Bioethanol*, 1-18.

- Xu, Z., and Huang, F. 2014. Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 43-62.
- Yang, P., Wu, Y., Zheng, Z., Cao, L., Zhu, X., Mu, D., Jiang, S. 2018. CRISPR-Cas9 approach constructing cellulase sesc-engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the production of orange peel ethanol. *Frontiers in microbiology*, 9, 2436.
- Yang, P., Zhang, H., and Jiang, S. 2016. Construction of recombinant sesc *Saccharomyces cerevisiae* for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol production by in situ fermentation. *3 Biotech*, 6(2), 1-11.
- Ye Lee, J., Li, P., Lee, J., Ryu, H. J., and Oh, K. K. 2013. Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, 127, 119-125.
- Yücel, H. G., and Aksu, Z. 2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. *Fuel*, 158, 793-799.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., and Faruq, G. 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 751-774.
- Zhao, N., Bai, Y., Liu, C. G., Zhao, X. Q., Xu, J. F., and Bai, F. W. 2014. Flocculating *Zymomonas mobilis* is a promising host to be engineered for fuel ethanol production from lignocellulosic biomass. *Bi*