

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ENDÜSTRİYEL SEBZE ATIKLARININ BİYOETANOL VE
ANTOSİYANİN ÜRETİMİNDE KULLANIMLARININ BELİRLENMESİ**

Ahzucan GERBAGA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDÜSTRİYEL SEBZE ATIKLARININ BİYOETANOL VE ANTOSİYANİN ÜRETİMİNDE KULLANIMLARININ BELİRLENMESİ

Ahzucan GERBAGA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanı: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Bu tez çalışması ile ülkemizde bol bulunan ve endüstriyel anlamda üretimi olan patlıcan kabuklarından (PK) biyoetanol ve antosiyaninin eş zamanlı üretimi araştırılmıştır. Fermentasyon deneyleri *Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus* mayaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyona etki eden önemli parametrelerden, ön-işlem yöntemleri enzimatik hidroliz, başlangıç hammadde konsantrasyonu ve zaman gibi parametrelerin etkisi belirlenmiştir. Bunun yanı sıra antosiyanin eldesinde en önemli parametre olan çözücünün etkisi araştırılmıştır. Antosiyanin için optimum çözücü %50 Etanol- %50 Su çözücüsü olarak belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin konsantrasyonu %50 Etanol- %50 Su çözücüsünde 60 dakika ultrasonikasyon sonrasında %20 PK konsantrasyonunda 2306.1 ± 3.5 mg/kg kuru madde olarak bulunmuştur. En yüksek biyoetanol konsantrasyonu seyreltik asit otoklav ön-işlemine takiben, 15 FPU (Filtre kağıdı birimi)/g kuru madde selüloz varlığında, 36 saat fermentasyon süresi sonucunda %15 PK ve *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* için sırasıyla 27.5 g/L ve 26.65 g/L olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra *S. cerevisiae*, *K. marxianus* teorik etanol verimi %89.6 ve %86.8 olarak hesaplanmıştır. Q_p değerleri aynı mikroorganizmalar için sırasıyla 0.76 ve 0.74 g/L.h şeklinde bulunurken, $Y_{p/s}$ değerleri her iki maya için 0.48 g/g olarak hesaplanmıştır.

Haziran 2022, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, antosiyanin, patlıcan kabuğu

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF THE USAGE POTENTIALS OF INDUSTRIAL VEGATABLE WASTES FOR BIOETHANOL AND ANTHOCYANINE PRODUCTION

Ahzucan GERBAGA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

In this thesis, the simultaneous production of bioethanol and anthocyanin from eggplant peels (EP), which are abundant by-products in Turkey and produced industrially, were investigated. Fermentation experiments were carried out using *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* yeasts. Some important parameters pretreatment methods, enzyme concentration, such as initial biomass loading and time which affect the initial sugar amount and fermentation efficiency were determined. In addition, the effect of the solvent, which is the most important parameter in the production of anthocyanin, was examined. The optimum solvent concentration for anthocyanin extraction was determined as 50% Ethanol / %50 water solvent. The highest amount of anthocyanin was found as 2306.1 mg/kg dry matter at 20% EP concentration. Moreover the reducing sugar content, enzyme hydrolysis and bioethanol amounts released by the pre-treatment of eggplant peel used as raw materials were determined. The maximum ethanol concentration were found, in the presence of dilute acid autoclave pretreatment, 15 FPU/g dry weight cellulase at 15% (w/v) EP in 36 hours fermentation as be 27.5 g/L and 26.65 g/L for *S. cerevisiae* and *K. marxianus*, respectively. In addition, the theoretical ethanol yields of *S. cerevisiae*, *K. marxianus* were calculated as 89.1% and 86.3%. Q_p values were determined as 0.76 and 0.74 g/L.h for the same yeasts, while $Y_{p/s}$ values were calculated as both of them 0.48 g/g, respectively.

June 2022, 80 pages

Key Words: Bioethanol, anthocyanin, eggplant peel

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ilham kaynağım, desteğini her daim yanımda hissettiğim, bütün zorluğu bilgisi ve tecrübesiyle kolaylaştıran değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) tez çalışmasında bilgisini ve tecrübesini yanımda hissettiğim Sayın hocamız Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında bana yol gösteren değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Ekin DEMİRAY'a (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu) desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli çalışma arkadaşım her konuda yanımda olan Eda AÇIKEL'e , güzel bir çalışma ortamı sağlayan değerli arkadaşlarım Aybüke KUT ve Nazlıhan TEKİN'e manevi destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında bana manevi destek sağlayan Sevgili dostlarım Ceren KARAGÖZ'e , Müge ORHAN'a ve İncimer ÇİÇEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında her daim yanımda olan , maddi manevi her desteği sağlayan annem Sayın Arzu GERBAGA'ya , sevgili kardeşim Cansucan GERBAGA'ya ve küçüğüm Özgecan GERBAGA'ya , Canım Arven'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca hakkını asla ödeyemeyeceğim sevgili babam Sayın Ahmet GERBAGA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahzucan GERBAGA
Ankara, Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Biyorafineri Kavramı ve Önemi	4
2.2 Biyorafineri Dönüşüm Teknolojileri	5
2.2.1 Mekanik dönüşüm teknolojileri.....	7
2.2.2 Kimyasal dönüşüm teknolojileri.....	7
2.2.3 Biyokimyasal dönüşüm teknolojileri	7
2.2.4 Termokimyasal dönüşüm teknolojileri	7
2.3 Biyorafineri Sınıflandırması	8
2.3.1 Fazlara göre biyorafineri sınıflandırması.....	8
2.3.2 Uluslararası enerji ajansı biyorafineri sınıflandırması	10
2.3.3 Nişasta biyorafinerisi	11
2.3.4 Lignoselülozik hammadde biyorafinerisi.....	11
2.3.5 Mikroalg biyorafinerisi.....	14
2.3.6 Syngas platform biyorafinerisi	14
2.3.7 Deniz biyorafinerisi.....	15
2.3.8 Oleokimyasal biyorafineri	15
2.3.9 Yeşil biyorafineri.....	16
2.4 Biyorafineri Teknolojilerinde Elde Edilen Katma Değerli Ürünler.....	16
2.4.1 Biyoyakıtlar	17
2.4.2 Biyoetanol	18
2.4.3 Biyoetanol Üretimi	20
2.4.4 Türkiye'de ve Dünyada biyoetanol üretimi ve kullanımı	21

2.5 Lignoselülozun Parçalanmasında Uygulanan Ön- İşlemler.....	22
2.5.1 Fiziksel ön işlem yöntemleri	23
2.5.2 Kimyasal ön-işlem yöntemleri.....	25
2.5.3 Biyolojik ön-işlem yöntemleri	28
2.6 Fermentasyon Stratejileri.....	29
2.7 Biyoaktif bileşikler	30
2.7.1 Antosiyaninler	32
2.7.2 Antosiyaninlerin ekstraksiyon yöntemleri.....	33
2.7.2.1 Ultrason destekli ekstraksiyon (BAE)	34
2.7.2.2 Geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonu	34
2.7.2.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	35
2.8 Biyorafineri Teknolojilerinde Kullanılan Mikroorganizmalar	35
2.8.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.8.2 <i>Pichia stipitis</i>	36
2.8.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	37
2.9 Biyorafineri ile İlgili Yapılan Çalışmalar	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1 Materyal	41
3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar.....	41
3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan hammadde kaynağı	41
3.2 Yöntem	41
3.2.1 Antosiyanin ekstraksiyonu	41
3.2.2 Toplam monomerik antosiyanin tayini	42
3.2.3 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri	42
3.2.4 Başlangıç patlıcan kabuğu konsantrasyonunun belirlenmesi.....	43
3.2.5 Patlıcan kabuklarının enzimatik hidrolizi ve farklı patlıcan kabuğu hidrolizatlarının hazırlanması.....	43
3.2.6 Fermentasyon deneyleri	43
3.3 Analitik Yöntemler	44
3.3.1 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi	44
3.3.2 Patlıcan kabuğundaki indirgen şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	44
3.3.3 Fermentasyon sonucu ortama salınan inhibitör maddelerin belirlenmesi.....	45

3.4 Kinetik parametrelerde kullanılan denklemler	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1 Çözücü Tipinin Antosiyanin ve İndirgen Şeker Konsantrasyonuna Etkisi.....	46
4.2 Başlangıç Patlıcan Kabuğu Konsantrasyonunun ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi.....	47
4.3 Fermentasyon İnhibitörlerinin Belirlenmesi	49
4.4 Fermentasyon Zamanının Etanol Üretimine ve Mikrobiyel Gelişmeye Etkisi .	50
4.5 Kinetik Parametreler	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
5.1 Çözücü Tipinin Antosiyanin Ekstraksiyonuna Etkisi	57
5.2 Ön-İşlemin Etanol Üretimine Etkisi.....	60
5.3 Başlangıç Patlıcan Kabuğu Konsantrasyonunun ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi.....	61
5.4 Fermentasyon Zamanının Etanol Üretimine ve Mikrobiyel Gelişmeye Etkisi .	64
5.5 Sonuçlar	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol
H_2SO_4	Sülfürik asit
kg	kilogram
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
L	Litre
mg	Miligram
MgSO_4	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	milimetre
nm	nanometre
p	İstatistiksel anlamlılık değeri
rpm	Dakikadaki devir
T	Sıcaklık
ZnSO_4	Çinko sülfat

Kısaltmalar

FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
NREL	Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarı
IEA	Uluslararası Enerji Ajansı
RFA	Yenilenebilir Yakıtlar Derneği
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü
PK	Patlıcan Kabuğu
Etanol	Etanol
Metanol	Metanol
DNS	Dinitrosalisilik asit
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
FID	Alev iyonlaştırıcı dedektör
FPU	Filtre kağıdı birimi (filter paperase unit)
GC	Gaz kromatografisi
GPY	Glukoz pepton maya özütü
GRAS	Genellikle güvenli kabul edilen mikroorganizma
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IL	İyonik sıvılar
SSF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon
SSCF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon
MPa	Mega Pascal
H ₂	Hidrojen
CO ₂	Karbondiyoksit
CO	Karbonmonoksit
CH ₄	Metan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Genel biyorafineri konsepti.....	5
Şekil 2.2 Uluslararası enerji ajansına göre biyorafineri sınıflandırması	10
Şekil 2.3 Lignoselülozik biyorafineri.....	13
Şekil 2.4 Lignoselülozik biyorafineri genel bakış	14
Şekil 2.5 Biyoyakıtlar	18
Şekil 2.6 Kullanılan Hammaddeye Göre Biyoetanol Grupları	19
Şekil 2.7 Lignoselülozun ön-işlem sonucu parçalanması	22
Şekil 4.1 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimi	50
Şekil 4.2 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>K. marxianus</i> 'un etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri	51
Şekil 4.3 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimi , ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri	52
Şekil 4.4 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>K. marxianus</i> 'un etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeler	52
Şekil 4.5 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri	53
Şekil 4.6 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>K. marxianus</i> 'un etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri	54
Şekil 4.7 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>S. cerevisiae</i> 'nin etanol üretimi ve ortamda bulunan indirgen şeker miktarları	55
Şekil 4.8 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde <i>K. marxianus</i> 'un etanol üretimi ve ortamda bulunan indirgen şeker miktarları	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Biyorafineri dönüşüm teknolojileri.....	6
Çizelge 2.2 Fazlara göre biyorafineri sınıflandırılması.....	9
Çizelge 2.3 Farklı tipteki lignoselülozik biyokütleler	12
Çizelge 2.4 Bazı gıda atıklarında biyoaktif kimyasallar	31
Çizelge 4.1 Farklı çözücü oranlarının PK'dan elde edilen antosiyanin ve şeker miktarlarına etkisi.....	48
Çizelge 4.2 Antosiyaninleri ekstrakte edilmiş ve ön-işleme tabi tutulmuş PK biyokütlesinde bulunan inhibitör miktarları.....	48
Çizelge 4.3 Farklı biyokütle miktarlarının antosiyanin, indirgen şeker ve etanol miktarlarına etkisi.....	49
Çizelge 4.4 Biyoetanol üretiminde <i>S. cerevisiae</i> ve <i>K. marxianus</i> mayalarına ait kinetik parametre verileri	6

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artması sonucu enerji tüketimi de paralel bir artış göstermiştir. Ayrıca, fosil yakıtlardan salınan gazlar asit yağmurları, iklim değişikliği, sera gazı emisyonunda artış gibi çevresel problemlere de sebep olmaktadır. Fosil yakıtların giderek tükenmesi ve bunun yanı sıra fosil yakıt tüketiminin yarattığı çevre kirliliği artan enerji talebiyle paralel olarak bir artış göstermiştir. Bundan dolayı, güneş, rüzgâr, biyokütle gibi yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi artmıştır (Adıgüzel 2013).

Fosil yakıtlar, dünyadaki enerji tüketiminin %80'ini oluşturur ve bu da atmosferde yüksek oranda karbondioksit artışına ve bunun sonucunda küresel ısınmaya sebep olur (Mercure vd. 2018, Raud vd. 2019).

Biyokütleyi yakıt kaynağı olarak kullanmanın potansiyel faydaları arasında sera gazı ve diğer hava kirleticilerin azaltılması ve enerji maliyetinde önemli ölçüdeki düşüşler yer alır. Buna ek olarak, biyokütle rüzgâr, güneş ve bazı durumlarda hidrojen gibi diğer birçok yenilenebilir enerji kaynağından daha kolay dağıtılabılır bir enerji seçeneğidir ve bu nedenle şebeke veya arz istikrarına katkıda bulunabilir (Walker vd. 2010).

Biyokütleden elde edilen biyoyakıtlar elektrik, rüzgâr ve güneş enerjisi depolama sistemlerinde kullanılabilir potansiyeldedir. Enerji depolama sistemlerinde biyoyakıt kullanımı sistemin karbon emisyonlarını azaltır ve sistemin yenilenebilir özelliğini artırır (Denholm 2006).

Biyoetanol içten patlamalı motorlarda kullanıldığı zaman benzine göre %90 daha az karbondioksit (CO₂) salınımına neden olur ve melas, saman, odun artıkları, posalar, meyve kabukları gibi ucuz ve bol bulunan biyokütle kaynaklarından elde edilebilir. Bu atıkların yenilenebilir özellikte olmaları ve direk gıda olarak kullanılmamaları nedeniyle son yıllarda bu atıklardan biyoetanol gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının üretimi

konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Moreno vd. 2016, Pathania vd. 2017, Xue vd. 2018, Farias vd. 2019).

Bitki ve tarım kalıntıları, Dünya üzerindeki kolayca bulunabilen doğal kaynaklardır ve biyoyakıt üretimi için potansiyel bir hammadde olabilir (Eisberg 2006).

Patlıcan kabukları gıda sanayisinin önemli bir yan ürünüdür. Türkiye’de üretim yapılan cam ve plastik seralardan her yıl kuru bazda yaklaşık 14 bin ton patlıcan atığı ortaya çıkmaktadır (Bilgin 2012). Bu atıklar herhangi bir alanda değerlendirilmemekte ve direk atık özelliği kazanmaktadır.

Patlıcan kabukları içeriklerinde bulunan antosiyanin vb. biyoaktif bileşikler bulundurmasının yanısıra ve selüloz ve hemiselüloz gibi fermente edilebilir şekerleri içeren polimerleri de barındırması nedeniyle biyoteknolojik çalışmalarda önem arz etmektedir (Sarabandi vd. 2020). Flavonoidler grubu açısından, patlıcan meyvesinin pigmentli kabuğunda önemli miktarlarda antosiyanin bildirilmiştir (Azuma vd. 2008, Mazza vd. 2004).

Antosiyaninler, meyve ve sebzelerde kırmızı, mavi, mor renk pigmentleridir. Temelde renkten sorumlu bu bileşiklerin kanser, nörodejeneratif hastalıklar, aterosklerozis gibi hastalıkların risk faktörünü azalttığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Zheng vd. 2013).

Patlıcan kabuğunda farklı türlerde birçok antosiyanin çıkarılmış ve tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, delphinidin-3- (p-coumaroylrutinoside) -5-glucoside (nasunin) patlıcan kabuğundaki başlıca antosiyanin olarak tanımlanmıştır Kabuk içeriğinde bulunan bir diğer önemli antosiyanin siyanidin-3-glukozit olarak belirlenmiştir (Pifferi ve Zamorani 1969, Matsuzoe vd. 1999).

Antosiyaninler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri iyi bilinen ve oldukça sık kullanılan flavonoid bileşikler grubudur. Nutrasötik, farmasötik ve kozmetik gibi endüstriler, antosiyaninleri doğal renklendiriciler olarak ve/veya biyolojik işlevleri için

kullanılmaktadır. Ayrıca, antosiyaninler, doğal koruyucular, lezzet tutucular olarak depolama ve nakliye sırasında gıda bileşenlerini çevresel streslere karşı korumak için kullanılmaktadır (Shipp ve Abdel-Aal 2010, Liu vd. 2018). Doğal renklendiriciler olarak antosiyaninlere olan talep, pazar gereksinimlerini büyük ölçüde artırmıştır.

Patlıcan kabuğunun zengin içeriği göz önünde bulundurularak tez çalışmasında hammadde olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında biyorafineri yaklaşımıyla iki farklı biyoteknolojik ürün eldesi gerçekleştirilmiştir.

Biyorafinerinin temel amacı, biyokütleyi hammadde olarak kullanarak biyoyakıtlar ve oleokimyasallar gibi biyolojik malzemeler üretmektir (Schakel vd. 2013).

Biyorafineri, biyokütlenin katma değerli ürünler (gıda, yem, malzemeler, kimyasallar) ve enerji (yakıtlar, güç, ısı) yelpazesine sürdürülebilir şekilde dönüştürülmesidir. (IEA Bioenergy- Task 42 2009). Biyo-rafineri sistemi altında lignoselülozik hammadde dönüşümü yoluyla biyoetanol üretimi , biyokimyasalların birlikte üretimini de içeren küresel iklim değişikliğini hafifletmede umut verici görünmektedir (González-García vd. 2012).

Bu tez çalışmasında patlıcan kabukları kullanılarak önce antosiyanin elde edilmiş daha sonra iki farklı maya kullanılarak (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces marxianus*) biyoetanol üretilmiştir. Farklı konsantrasyonlar, enzimatik hidroliz, fermentasyon gibi önemli parametreler kullanılarak biyoetanol verimine bakılmıştır. Farklı konsantrasyonlar ve farklı ortamlarda gerçekleştirilen antosiyanin ekstraksiyonunun verimi gösterilmiştir. Yapılan tez çalışması ile enerji kaynaklarından biri olan biyoetanolün ve önemli bir biyoteknolojik ürün olan antosiyaninin eş zamanlı üretimi ilk defa gösterilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

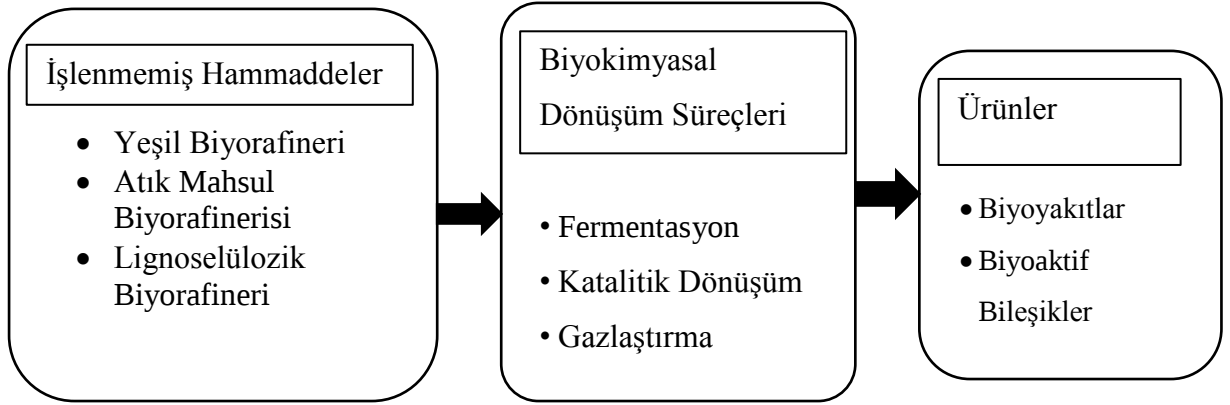
2.1 Biyorafineri Kavramı ve Önemi

Uluslararası Enerji Ajansının tanımına göre (IEA Task 42) biyorafineri çok sayıda ticari madde ve enerji üretilmesi için biyokütlenin sürdürülebilir bir şekilde işlenmesidir (Cherubini vd. 2009).

NREL'e (Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarı) göre, ulaşım biyoyakıtları, biyomalzemeler, biyokimyasallar, güç ve ısı üretmek için çeşitli ekipman ve biyokütle dönüştürme yöntemlerini içeren bir süreç biyorafineri olarak bilinir (Fernando vd. 2006). Tüm dünyada biyorafineriler, çeşitli boyutlarda, formlarda veya konfigürasyonlarda görünmektedir. Bunların geliştirilmesi, mevcut altyapıya, biyokütle hammaddesinin erişilebilirliğine, verilen ürünlerin gerekliliğine ve kamuoyu kabulü, ölçek büyütme tesisleri ve araştırmadaki harcama seviyesi gibi bazı politikaların değişime nasıl yardımcı olabileceği hakkında bilgi edinmeye dayanmaktadır (Wellisch vd. 2010). Biyokütle biyorafineride ticari olarak satılabilir ürünlere dönüştürülen yenilenebilir organik materyallerdir. Yenilenebilir karbon kaynakları dört farklı sektörden temin edilir:

1. Tarım (Özel üretim bitkileri ve artıkları)
2. Orman (Odun, ağaç, tomruk işleme atıkları)
3. Sanayi (Proses sonu atık ve artıkları)
4. Su Kültürü (Alg , deniz yosunu)

Farklı kaynaklardan gelen biyokütleyi biyorafineri yaklaşımı içinde ticari olarak satılabilir ürünlere dönüştürmek için bazı teknolojik uygulamalardan geçmesi gereklidir (Dayıoğlu 2013).



Şekil 2.1 Genel Biyorafineri Konsepti (Verma ve Kulia 2020)

Biyoyakıt ve biyokimyasalların geniş bir yelpazesinin ortak üretimiyle, biyorafineriler, umut verici bir yaklaşım olarak kabul edilir. Ayrıca, döngüsel biyoekonomi ilkelerine göre tasarlanan biyorafineriler, maksimum geri dönüşüm yoluyla atıkları en aza indirmeye (sıfırlamaya) odaklanır ve bu nedenle Birleşmiş Milletler'in Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri (SDG'ler) ile son derece uyumludur (Khounani vd. 2019).

Herhangi bir biyokütlenin her yönüyle katma değerli ürünlere dönüştürülmesi, "biyorafineri" olarak adlandırılan prosesle gerçekleştirilir. Bu proses; biyoenerji, biyoyakıtlar, kimyasallar ve yüksek katma değerli bileşikler dahil olmak üzere birden fazla ürün elde etmek için biyokütle bileşenlerinin entegre olarak işlendiği karmaşık sistemler olarak tanımlanmıştır. Biyorafinerilerde kullanılan teknolojiler temel olarak fiziksel, kimyasal, termokimyasal ve biyoteknolojik proseslerden oluşur.

Bu teknolojilerin her birinin biyokütleyi katma değerli ürünlere dönüştürme kapasitesi önem arz etmektedir. Bunun yanı sıra, bu teknolojiler birbirine ne kadar çok entegre edilerek biyokütlenin daha verimli kullanılması sağlanır (Moncada vd. 2016).

2.2 Biyorafineri Dönüşüm Teknolojileri

Biyorafinerilerde farklı dönüşüm teknolojileri kullanılarak oluşturulmak istenen son ürüne göre biyoyakıt, biyokimyasal, biyomateryal, gıda, yem gibi son ürünler elde edilir.

Doğru bir dönüştürme teknolojisinin seçilmesi önemlidir ve bir dönüştürme yönteminin seçimi, proses verimliliği, biyokütle hammaddelerinin niteliği ve erişilebilirliği, çevresel ve ekonomik ihtiyaçlar, gerekli ürünlerin türleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Dayıoğlu, 2013).

Biyokütlenin ısı verimliliğini arttırmak için genellikle dört dönüşüm prosesi uygulanır :

- 1.Mekanik
- 2.Kimyasal
- 3.Biyokimyasal
- 4.Termokimyasal

Çizelge 2.1 Biyorafineri Dönüşüm Teknolojileri

Dönüşüm Prosesleri	Dönüştürme Teknolojileri	Kaynak Tipleri	Kaynaklara Örnekler	Ürünler
Mekanik	Biyokütlenin Biriketlenmesi Torrofikasyon(200-320° C) Öğütme Damıtma(Sıvı-Sıvı ekstraksiyonu) Absorbsiyon	Sıvı ve katı biyokütle	Yağlı tohumlar, tarımsal atıklar, orman atıkları, diğer atık biyokütle materyalleri	Biyogaz Biyometanol, biyodizel
Kimyasal	Hidroliz Çözücüyle ekstraksiyon Polimerizasyon Süperkritik sıvı ekstraksiyonu Transesterifikasyon	Sıvı ve katı biyokütle	Atık yağlar, kolza tohumu ve soya fasulyesi	Sıvı yakıtlar Biyodizel Biyometanol
Biyokimyasal	Enzimatik hidroliz Anaerobik parçalanma Fermentasyon	Anaerobik parçalanma için katı biyokütle, sıvı biyokütle	Buğday, kolza ,patates, lağım atıkları ve şeker	Biyogaz ve sıvı yakıtlar
Termokimyasal	Piroliz Yakma Gazlaştırma Sıvılaştırma	Genellikle katı biyokütle	Tarım atıkları, tavuk atıkları, orman atıkları	Isı, gaz , Pirolitik yağ, biyokömür

Kaynak- E4Tech.com, http://www.e-sources.com/biomass_conversion.htm (30.06. 2012).

2.2.1 Mekanik dönüşüm teknolojileri

Biyokütlenin içeriğini değiştirmeden sadece boyutunu azaltmak ve parçalamak için yapılan mekanik işlemlerin tamamıdır. Biyokütlenin kolay taşınması için avantaj sağlar. Biyokütlenin parçacık boyutu ve hacmi azaltılır (Verma ve Kulia 2020).

2.2.2 Kimyasal dönüşüm teknolojileri

Biyokütleyle en çok uygulanan kimyasal işlemler hidroliz ve transesterifikasyondur. Hidroliz, biyokütledeki polisakkaritler ve proteinleri parçalamak için asit, baz ya da enzimler kullanılan yöntemdir.

Transesterifikasyon ise biyodizel üretiminde kullanılan yöntemdir bu tepkime sonucunda biyodizel (yağ asidi metil esteri (FAME)) ve gliserin ayrıştırılmış olur (Upadhyay 2020).

2.2.3 Biyokimyasal dönüşüm teknolojileri

Biyorafineri dönüşüm teknolojilerinde en çok kullanılan proseslerdir. Biyokimyasal işlemler için enzimatik hidroliz, fermentasyon ve anaerobik çözünme yöntemleri kullanılır. Şeker nişasta ve selülozdan oluşan biyokütlenin mikroorganizmalarla fermentasyonu sonucunda etanol üretilir.

Anaerobik çözünme ise 30-65 °C sıcaklık aralığında oksijensiz ortamda farklı organik maddelerin mikrobiyal bozunmasıyla gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda metan ve karbondioksitten oluşan biyogaz üretilir (Rosillo-Calle vd. 2007).

2.2.4 Termokimyasal dönüşüm teknolojileri

Biyokütleyi enerji ve kimyasal ürüne dönüştürmek için gazlaştırma ve piroliz yöntemleri yaygın olarak kullanılır.

Gazlaştırma yönteminde biyokütle az oksijenli ortamlarda yüksek sıcaklık seviyesinde ($>700^{\circ}\text{C}$) tutularak H_2 , CO_2 , CO ve CH_4 karışımından oluşan sentez gazı (syngas) üretilir.

Piroliz yönteminde ise biyokütle nispeten daha düşük sıcaklıklarda ($300-600^{\circ}\text{C}$) ve oksijensiz ortamda tutularak enerji değeri artırılır (Madavgane ve Kulkarni 2020).

2.3 Biyorafineri Sınıflandırması

Günümüzde, biyorafineri sınıflandırması kullanılan hammadde türlerine, teknolojik uygulama veya uygulanan ana dönüştürme teknolojisi türüne dayanmaktadır. Bütün bunlar göz önüne alındığında iki farklı sınıflandırma sistemi yapılmıştır.

2.3.1 Fazlara göre biyorafineri sınıflandırması

2008'den önce, biyorafinerilerin sınıflandırılabilceği belirli bir sınıflandırma sistemi yoktu. Bununla birlikte, biyorafineri sistemleri Kamm tarafından farklı açılardan aşağıdaki özelliklere göre kategorize edildi;

1. Kullanılan dönüştürme işlemine göre (termokimyasal biyorafineriler, biyolojik rafineriler)
2. Kullanılan hammadde biyokütlesine göre (Tahıl biyorafinerileri, yeşil biyorafineriler, vb.)
3. Kullanılan teknoloji türlerine göre (birinci nesil, ikinci nesil, geleneksel ve gelişmiş biyorafineriler).
4. Platforma göre (şeker platformu biyorafinerileri, sentez gazı platformu biyolojik rafineriler)

Van Dyne vd., Kamm ve Kamm ve Fernando vd., Faz I, II ve III biorefineri olarak bilinen üç tip biyorafineri tanımladılar (Van Dyne vd. 1999, Kamm ve Kamm, 2004, Fernando vd. 2006).

Faz I Biyorafineri: Bu tür biyorafineri sadece bir hammadde malzemesi kullanır, sabit işleme potansiyeline sahiptir ve bitkisel yağ, selüloz ve kağıt fabrikalarından biyodizel gibi örnekleri içeren tek bir birincil ürün üretir.

Faz II Biyorafineri: Bu tür biyorafineri yalnızca bir hammadde kullanır, ancak nişastadan çeşitli kimyasalların üretimini ve tahıl tanelerinden çok sayıda karbonhidrat türevi ve biyoetanol üretimini içeren çeşitli ürünler üretebilir.

Faz III Biyorafineri: Bunlar gelişmiş biyorafinerilerdir ve çeşitli hammadde türlerini, işleme teknolojilerini kullanabilir ve birden fazla ürün türü üretebilir.

Çizelge 2.2 Fazlara Göre Biyorafineri Sınıflandırması (Kamm ve Kamm 2004, Van Dyne vd. 2004)

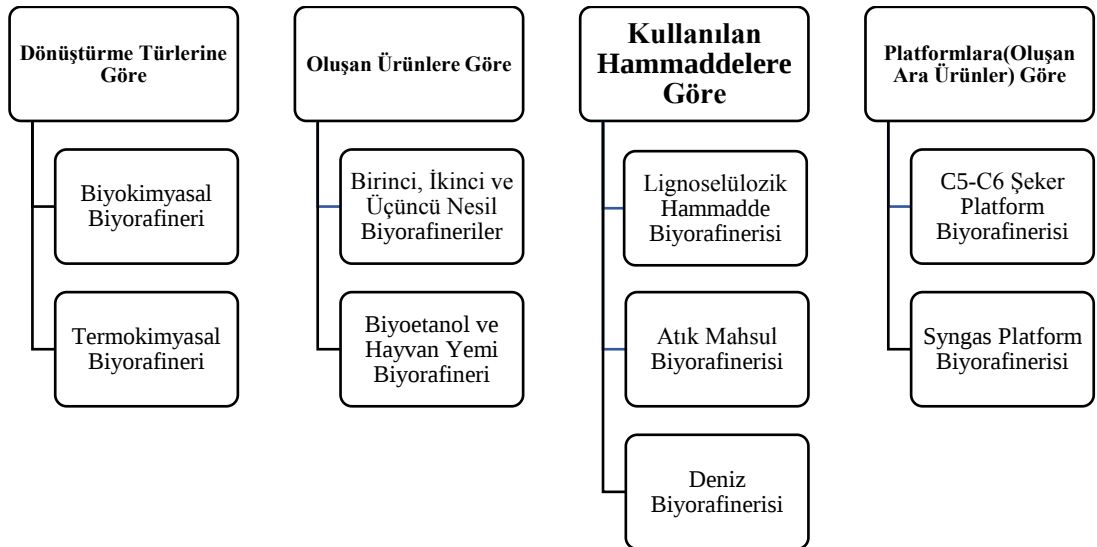
Faz	Hammadde	Proses	Ana Ürünler
I	Tek	Tek	Tek
	Kolza Tohumu	Transesterifikasyon	Biyodizel
II	Tek	Çoklu	Çoklu
	Tahıl Taneleri	- Ön-işlem - Enzimatik Hidroliz - Fermentasyon	- Polimerler - Vitaminler - Biyoyakıtlar
III	Çoklu	Çoklu	Çoklu
	- Tahıl samanları - Kağıt ve katı belediye atıkları - Lignoselülozik Hammaddeler - Orman Biyokütlesi (Odun)	- Ön-işlem - Enzimatik Hidroliz - Fermentasyon - Öğütme - Kimyasal Proses - Biyolojik Proses	- Şekerler(Ksiloz, Glukoz) - Yakıtlar(Etanol) - Organik Asitler(Laktik Asit) - Çözücüler(Aseton, Bütanol) - Furfural - Naylon - Doğal Tutucular (Stabilizatörler)

2.3.2 Uluslararası enerji ajansı biyorafineri sınıflandırması

2008 yılında, Uluslararası Enerji Ajansı tarafından Bioenergy Task 42 projesi çerçevesinde daha gerçekçi ve uygun bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sisteme göre, biyokütlenin başlangıcından faydalı son ürün üretimine kadar her adım şematik olarak gösterilebilir. Bu yeni sınıflandırma sistemi, ekonomik açıdan faydalı biyo-tabanlı yan ürünlerle birlikte uygun maliyetli ve verimli biyoyakıt üretimine yol açan gelecekteki biyorafineri endüstrilerinin gelişimini iyileştirebilir. Bu biyorafineri sınıflandırma sistemi, dört ana özelliğe bağlı olarak geliştirilmiştir.

1. Platformlar
2. Ürünler
3. Hammaddeler
4. Dönüştürme İşlemleri (De Jong vd. 2009)

Uluslararası Enerji Ajansı (IEA) sınıflandırmasına göre bazı biyorafineri çeşitleri tanımlanmıştır. Nişasta biyorafinerisi, lignoselülozik hammadde biyorafinerisi, mikroalg biyorafinerisi, atık su biyorafinerisi, singaz biyorafinerisi , deniz biyorafinerisi bunlardan bir kaçıdır (Diep vd. 2018, De Jong vd. 2015)



Şekil 2.2 Uluslararası Enerji Ajansına Göre Biyorafineri Sınıflandırması IEA, Bioenergy Task 42, 2008

2.3.3 Nişasta biyorafinerisi

Nişasta, geniş karbonhidratlardan elde edilebilen en bol depolama karbonhidratlarından biridir. Nişasta biyorafineri, tarımsal biyokütle ve ormancılık ürünlerinin kullanımına dayanan ilk nesil biyorefineri olarak kabul edilmektedir. Nişasta biyorafinerisinde en yaygın kullanılan substratlar manyok ve mısırdır. Nişasta biyorafinerisinde biyoyakıt ve kimyasalların üretimi ile ilgili ele alınan birkaç sınırlama ve sorun vardır. En çok bilinen sorunlar arasında nişastanın genellikle gıda olarak tüketimi ve nişasta mahsulü üretimi için toprağın kullanılması riskidir (Kassim vd. 2020).

2.3.4 Lignoselülozik hammadde biyorafinerisi

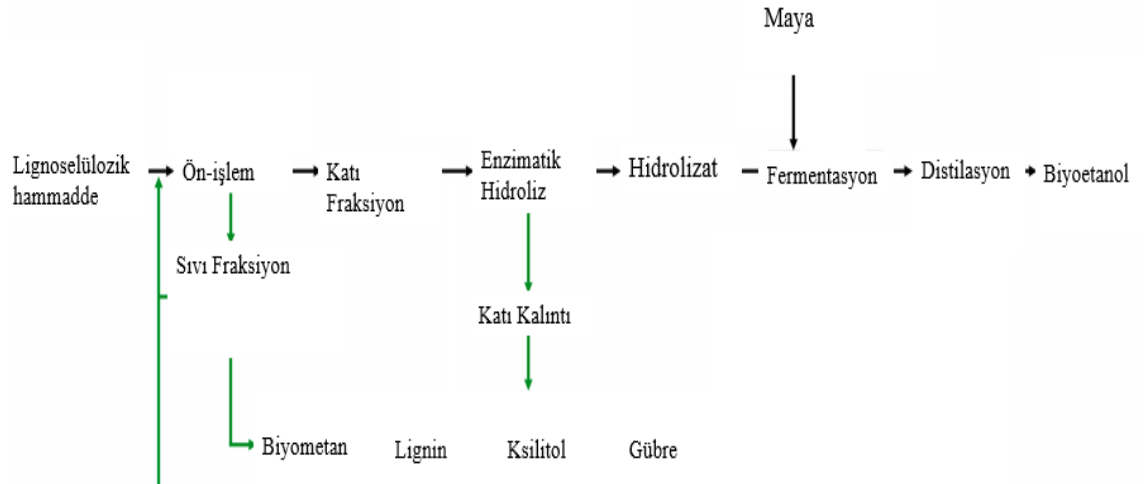
Lignoselülozik biyokütle, ağırlıklı olarak, selüloz, hemiselüloz ve ligninin, az miktarda protein, pektin ve mineral içeren üç ana kimyasal bileşim olduğu bitkilerin hücre duvarlarından türetilir. Her kimyasal bileşimin miktarı, mahsul, çimen ve odun (sert ağaç, yumuşak ağaç) gibi bitki türlerine ve bitki dokusunun yaşına bağlı olarak değişir (Izydorczyk 1995). Lignoselülozik biyokütle, çok çeşitli polimerik malzemelerin üretimi için en önemli kaynak olarak belirlenmiştir (Ebringerová 2005). Lignoselülozik hammadde biyo-rafineri (LFB) sistemi, hammadde olarak "doğal-kuru" ligno selülozik biyokütleyi kullanır. Hammadde esas olarak altı karbon glukoz polimeri, hemiselüloz (beş karbon şeker polimeri) ve lignin (fenol polimer) (Fernando 2006, Clark 2008) içeren küspe, odun, saman samanları, palmiye yağı biyokütlesi vb. olabilir. Bu üç ana kimyasal yapı, çeşitli ürünlere (yakıtlar, kimyasal ürünler, yapıştırıcılar, ksilitler, vb.) dönüştürülmek üzere biyorafineri teknolojilerinde kullanılır (Kamm ve Kamm, 2004). Sonuç olarak, lignoselülozik hammadde biyorafineri prosesinin biyomalzemeler, kimyasallar ve enerji / yakıtlar gibi çok çeşitli faydalı endüstriyel ürünler ürettiği başarılı bir şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Farklı Tipteki lignoselülozik biyokütleler

Lignoselülozik Biyokütle Tipi	Örnek
Odunsu	Testere Talaşı, orman atıkları
Odunsu Olmayanlar	Çeltik samanı, buğday samanı, şeker kamışı küspesi, hurma çekirdeği posası, pirinç kabuğu, mısır koçanı, tarım atıkları
Organik Atıklar	İnsan lağım atıkları, Çiftlik hayvanları atıkları

Biyorafineri, sürdürülebilir bir kaynak olarak lignoselülozik biyokütleyi kullanarak yakıt, elektrik, ısı ve katma değerli kimyasallar üretmek için biyolojik dönüşüm süreçlerini tesislerle birleştirir. Modern lignoselülozik biyorafineri, esas olarak lignin, selüloz ve hemiselüloz gibi sürdürülebilir biyopolimerlerden oluşan ham petrol rafinerilerine benzer şekilde çalışmayı amaçlar. Lignoselülozik biyokütle, sürdürülebilir kimyasal ve enerji talepleri oluşturmak için yenilenebilir kaynaklar arasında en kolay erişilebilir hammaddedir ve böylece fosil yakıtlara olan yüksek bağımlılığı azaltır. Lignoselülozik hammadde, türe bağlı olarak değişen bir nispi bileşim ile hemiselüloz ve lignin ile kaplanmış bir selüloz omurgası olan amorf bir üç boyutlu yapı içerir. Karbon emisyonlarını azalttığı, yenilenebilir ve kolay erişilebilir olduğu için petrol için karbon nötr bir alternatif olabilir (Srivastava vd. 2021).

Bu tür biyorafineri sistemleri, lignin, selüloz ve hemiselüloz gibi ara ürünler yoluyla biyo enerji elde etmek için odun gibi lignoselüloz biyokütlesini kullanır. Bu lignin ile bağlı selüloz ve hemiselüloz esas olarak beş veya altı karbon şekerli polimerlerden oluşur.

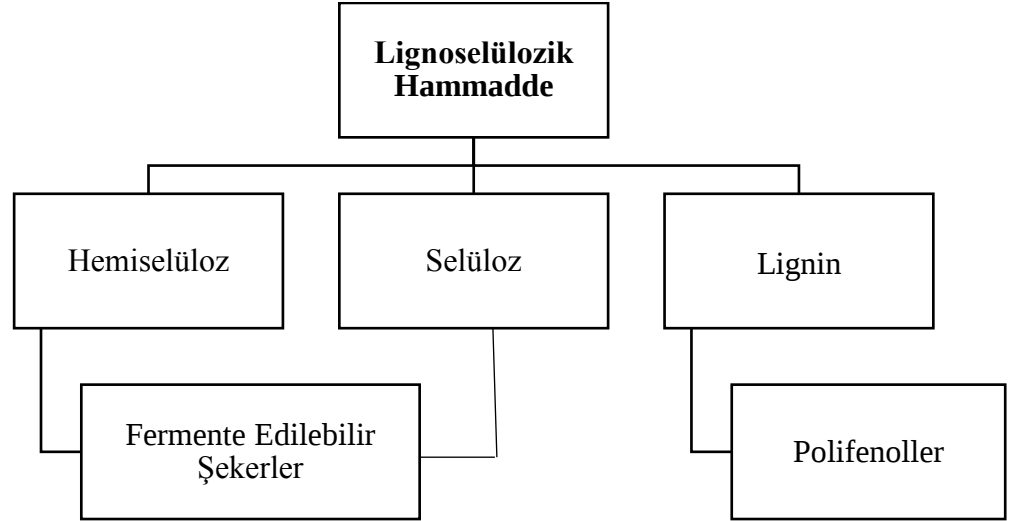


Şekil 2.3 Lignoselülozik Biyorafineri (Chen vd. 2021)

Bu tip biyorafineride, lignoselülozik biyokütle, asit veya alkali muamelesi ile selüloz ve hemiselüloza dönüştürülür. Ayrıca, bu ara ürünler, beş ve altı karbonlu şeker üretmek için enzimatik bozunmaya tabi tutulur (De Jong vd. 2014). Bu lignoselüloz bazlı biyorafineri, aynı anda kâğıt hamuru ve enerji üretimi için iyi bir kaynaktır (Chambost vd. 2007), hamura bağımlı biyorafineriler ise liginosülfonatlar, vanilin, reçine ve don yağı gibi ekonomik olarak faydalı ürünler sağlar (Mleziva vd. 2012).

Bu C₅ ve C₆ şekerleri aynı zamanda farklı fermantasyon proseslerinde biyoyakıt elde etmek için veya bazen katalitik dönüşüm için veya katma değerli son ürünler üretmek için hammadde olarak kullanılmaktadır (De Jong vd. 2014).

Bu tür biyorafineri, yakıt ve katma değerli kimyasallar üretebildiğinden, petrol bağımlılığını en aza indirerek, sera gazı emisyonunu azaltıp hava kalitesini iyileştirdiği için yüksek düzeyde ilgi görmektedir.



Şekil 2.4 Lignoselülozik biyorafineri genel bakış

2.3.5 Mikroalg biyorafinerisi

Mikroalg, atmosferdeki karbondioksiti (CO_2) kullanarak fotosentez yapabilen fotosentetik bir mikroorganizmadır. Fotosentezden üretilen biyokütle ayrıca biyoyakıt, biyoetanol gibi çeşitli değerli ürünlere ve diğer çok çeşitli kimyasallara dönüşebilmektedir.

Mikroalg, yenilenebilir bir malzeme olarak birkaç ilginç özellik sergiler:

- Kısa sürede ve kolay gelişirler
- Kolay kültüre edilebilirler ve
- Biyokütlede lipit, karbonhidrat, protein gibi farklı biyokimyasal bileşenleri yüksek oranda içerirler (Mata 2010).

2.3.6 Syngas platform biyorafinerisi

Sentez gazı veya sentez gazı biyorafinerisinin arkasındaki ana çalışma prensibi, ya aşırı ısı ya da ototrofik asetojenik bakterilerin uygulanması yoluyla, çok çeşitli karbonlu hammaddelerin bozunmaya maruz kalmasıdır. Syngas esas olarak CO ve H_2 'den oluşur

ve katma değerli kimyasallara ve biyoyakıtlara katılabilir (Huber vd. 2008). Bu biyorafineri sistemindeki ana engeller, teknolojinin karmaşıklığı ve üretim maliyetidir.

Ancak uygun biyokimyasal veya termokimyasal teknikler bu sisteme değer katabilir.

2.3.7 Deniz biyorafinerisi

Deniz biyorafinerisinde, temel olarak mikroalgler ve deniz yosunları başlangıç materyali veya hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu süreçteki ana avantajlar, mahsul veya gıda içeren üretim arazisi ve yüksek biyolojik büyüme oranı için rekabet olmamasıdır. Ayrıca mikroalgler ve deniz yosunları yüksek miktarda lipid, protein ve karbonhidrat içerdiğinden (Roesijadi vd. 2010). Biyoyakıt, biyoetanol ve biyogaz üretiminde kullanılabilirler (Laurens vd. 2017). Kahverengi algler, potansiyel içeriğinde sağlığa yararlı aktiviteleri olan fucooidanlar ve laminaran içerir (Maehre vd. 2014, Rioux vd. 2010). Tarımsal gıda, biyopolimer ve kozmetik endüstrileri gibi birkaç farklı endüstri, deniz yosunlarını hammadde olarak kullanır (Abenavoli vd. 2016, Davis vd. 2003). Ek olarak, bu tür biyorafineri su kültürü, atık su arıtma ve biyogaz tesisatı gibi diğer uygulamalara değer katabilir. Deniz suyunun dünya çapında erişilebilirliği nedeniyle, bu süreç petrol/yakıt nakliye maliyetini en aza indirebilir.

2.3.8 Oleokimyasal biyorafineri

Bitkisel ve hayvansal yağlar gibi kimyasal bileşikler topluca oleokimyasallar olarak adlandırılır. Bu olekimyasallar, yağ asitlerini, yağ esterlerini, gliserol, metil esterleri ve yağ aminlerini içerir (Rupilus ve Ahmad 2007). Bu tür biyo-tabanlı hammaddeler dünya çapında mevcuttur. Öte yandan, bu tür kimyasallar çok düşük üretim maliyeti ile kolaylıkla yetiştirilebilir. Bu avantajlara sahip olan oleokimyasallar, sürdürülebilir ve uygun maliyetli enerji kaynağı olarak dikkat çekmektedir (Fiorentino vd. 2017, Biermann vd. 2011). Genel olarak, mahsuller trigliserit üretmek için yüksek sıcaklığa maruz bırakılır. Bu trigliseritler ayrıca trans-esterifikasyon yoluyla gliserol ve yağ asitleri esterleri gibi temel bileşenlere dönüştürülür.

Bitkisel yağlardan üretilen biyodizel, daha az toksik, daha az yanıcı ve biyolojik olarak parçalanabilir olduğundan petro-dizelden daha güvenlidir (Tan ve Chow 2010, Kamm Kamm 2004). Transesterifikasyon reaksiyonu ile üretilen gliserol, fermentasyon ve anaerobik çürütme de kullanılabilir.

2.3.9 Yeşil biyorafineri

Yeşil biyorafineri, genellikle enerji ve kimyasalların üretimi için yeşil/otlak biyokütlesinin kullanımını birleştirmeye atıfta bulunur. Bu işlemde hammadde olarak silaj veya ot tercih edilir. Yeşil biyokütle, sıvı fraksiyonu ve katı fraksiyonu ayırmak için öncelikle kimyasal, fiziksel veya biyolojik işleme tabi tutulur. Katı kısım genellikle bitki biyokütlesinin (selüloz, hemiselülozlar, lignin) lifli materyallerini içerirken, sıvı kısım proteinleri, amino asitleri, organik asitleri, mineralleri ve şekerleri içerir.

Yeşil biyokütle biyoetanol üretimi (Martel vd. 2010) için ayrılmış taze meyve suyu veya bitki biyouyarıcı (Mora vd. 2010), gibi diğer katma değerli kimyasallar için hammadde olarak kullanılmaktadır.

Bir diğer biyorafineri çeşidi mahsul biyorafinerisi olup, adından da anlaşılacağı gibi, genel olarak buğday, çavdar, mısır ve tritikale dahil olmak üzere farklı tahıllar, genel olarak tam mahsul biyorafinerisinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu teknikte mısır ve samanı ayırmak için mekanik işlemde yararlanılır. İşlenmiş saman ayrıca lignoselüloz biyorafinerisinde kullanılabilir veya sentez gazı üretimi için hammadde olarak kullanılabilir (Naik vd. 2010).

2.4 Biyorafineri Teknolojilerinde Elde Edilen Katma Değerli Ürünler

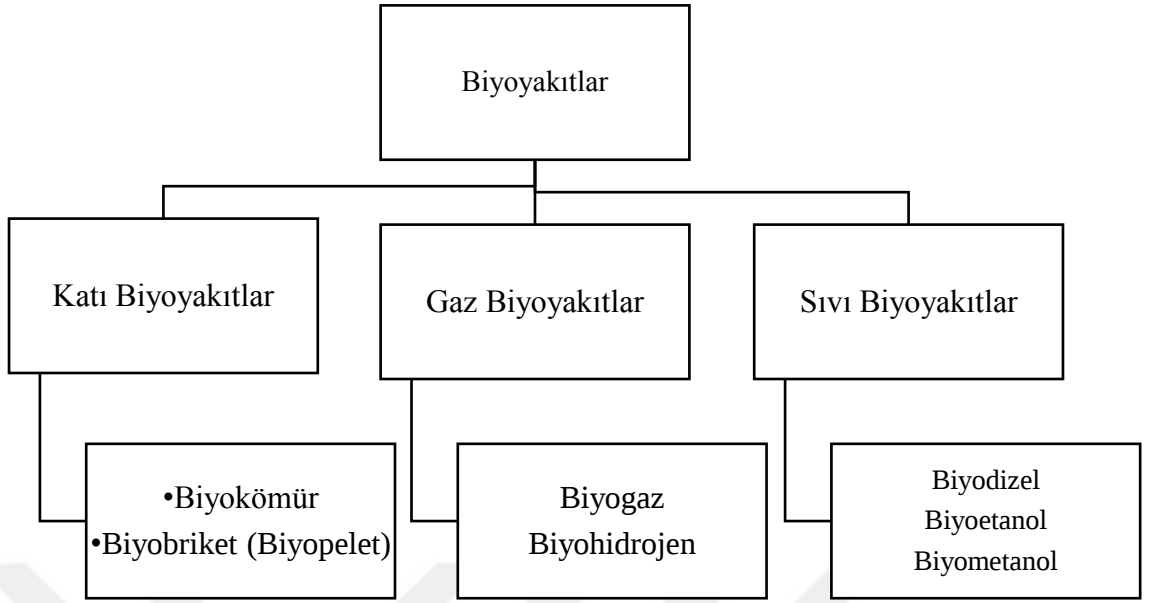
Biyorafinerinin geliştirilmesi, gıda, yem, kimyasallar, biyopolimer ve yakıt dahil olmak üzere daha geniş ürün yelpazesinin farklı türlerde hammadde kullanılarak üretilmesine imkân sağlamıştır. Şu anda, biyorafineri işleminden üretilen en yaygın ürünler

şunlardır: temel olarak biyoyakıt (biyoetanol, biyobütanol, biyodizel), biyopolimer ve atıklardan elde edilen farmasötik ürünlere odaklanmıştır.

2.4.1 Biyoyakıtlar

Fosil yakıtların yakın gelecekte tükenecek olması, bu yakıtların neden oldukları çevresel sorunlar ve zamanla giderek artan tüketimi, insanlığı yeni alternatif yakıt arayışına itmiştir. Bundan dolayı, güneş, rüzgâr, biyokütle gibi yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi artmıştır. Gelecek nesillerin yaşam kalitesini korumak ve enerji geri kazanımı için çevre dostu ve sürdürülebilir alternatifler geliştirmek gereklidir. Günümüzde enerji talebinin çoğu fosil yakıtlardan karşılanmaktadır fakat fosil yakıtların çevreye olan olumsuz etkileri, küresel ısınma gibi birçok ciddi sorunu doğurmaktadır. Bu etkiyi azaltabilmek amacıyla yenilenebilir özellikte olan biyoyakıtlar üzerine yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu biyoyakıtlar farklı biyokütle kaynakları kullanılarak üretilmektedir. Biyoetanol, biyobütanol, biyogaz, biyodizel bu yakıtlardan bir kaçıdır. Yukarıda bahsedilen biyoyakıtlar arasında, biyoetanol, en büyük küresel üretim kapasitesine sahip biyoyakıttır ve aynı zamanda, benzinle biyoyakıt karışımına ilişkin hükümet politikaları açısından en gelişmiş olanıdır (Niphadkar vd. 2018). Bu, biyoetanollü şu anda en çok talep edilen biyoyakıt haline getirmiştir (IEA 2019). Biyoetanol üretimi saman, odun artıkları, posalar, meyve kabukları gibi ucuz ve bol bulunan biyokütle kaynaklarından elde edilebilir.

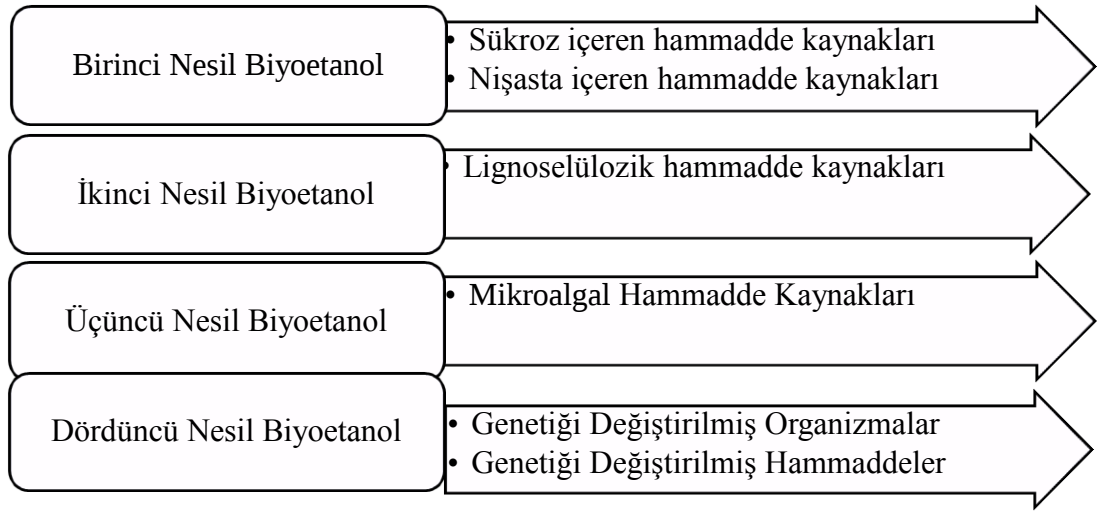


Şekil 2.5 Biyoyakıtlar

Biyo proses yoluyla hammadde olarak yenilenebilir kaynak kullanılarak biyoyakıt üretimi dünya çapında büyük ilgi görmüştür. Bunun nedeni, bu hammaddenin daha sürdürülebilir, çevre dostu ve ucuz fiyata bolca temin edilebilmesi gibi avantajlar sergilemesidir.

2.4.2 Biyoetanol

Biyobütanol, biyogaz, biyodizel gibi yakıtlar arasında biyoetanol, üzerine en fazla çalışma yapılanlardan bir tanesidir. Bununla beraber, biyoetanol, en büyük üretim kapasitesine sahip olan biyoyakıttır (Niphadkar vd. 2018). Bu durum, biyoetanolu en çok talep edilen biyoyakıt haline getirmiştir (Gallagher 2004). Biyoetanol araçlarda yakıt olarak kullanılabileceği gibi petrokimya, gıda, içecek, temizlik, kozmetik gibi çeşitli sanayi dallarında sıklıkla kullanılan bir maddedir. Biyoetanol içten patlamalı motorlarda kullanıldığı zaman benzine göre %90 daha az karbondioksit (CO₂) salınımına neden olur.



Şekil 2.6 Kullanılan Hammaddeye Göre Biyoetanol Grupları

Biyoetanol üretildiği hammaddenin tipine göre 4 farklı nesile ayrılabilir. Birinci nesilde buğday ve mısır gibi yiyecek amacıyla üretilen materyaller bulunur. Birinci nesil biyoetanol oldukça verimlidir fakat üretimi pahalıdır, dolayısıyla gıda fiyatlarının artmasına ve fiyat rekabetine ve gıda üretim zincirinin bozulmasına neden olmaktadır (Robak ve Balcarek 2018). Bu nedenle de günümüzde birinci nesil biyoetanol kullanımı tartışmalı bir konudur.

İkinci nesil biyoetanol ise gıda olarak tüketilmeyen tarımsal kaynaklardan ya da atıklardan elde edilir. İkinci nesil biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelere örnek olarak mobilyacılık atıkları, şeker pancarı küspesi, melas, meyve ve sebze kabukları verilebilir. İkinci nesil biyoetanolün kaynağı lignoselülozdur. Lignoselüloz yeryüzünde en bol bulunan biyokütledir. İkinci nesil biyoetanolün avantajı ucuz olması ve gıda maddeleriyle direk rekabete girmemesidir. Dezavantajı ise fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkartılması için özel ön-işlemlere gereksinim duyulmasıdır.

Üçüncü nesil biyoetanol üretimindeki hammaddeler ise siyanobakteri ve mikrolagler gibi fotosentetik mikroorganizmalardır. Özellikle mikro ve makro algler üçüncü nesil biyoetanol üretiminde kullanılmaktadır (Lee vd. 2019). Mikro ve makro alglerin uzun gelişim süresi ile bu canlılarda bulunan fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkartılması

için bazı ön-işlemlerin gerekmesi üçüncü gruptan elde edilen biyoetanol üretiminin dezavantajlı kısmıdır (Dragone vd. 2010, Phwan vd. 2018)

Dördüncü grup biyoetanol üretiminde genetik ve metabolizma mühendisliği sonucu herhangi bir özelliği değiştirilmiş hammaddeler kullanılmaktadır. Burada yapılan işlemlerden bazıları hammaddelerin lignin miktarlarının düşürülmesi, mikroorganizmalara selüloz gibi enzimlerin ifade ettirilmesini kapsamaktadır. Dördüncü grup biyoetanol üretimi görece yeni bir alandır ve oldukça etkili biyoetanol üretimine yol açar, bununla beraber ilk yatırım maliyetinin yüksek oluşu ve yatırımın geri dönmesinin uzun zaman alması dezavantajlı kısımlarıdır (Ko ve Lee 2018).

2.4.3 Biyoetanol üretimi

Biyolojik etanol üretimi fermentasyon yoluyla gerçekleştirilip, lignoselülozik hammaddeler gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilirler. Fermentasyon sırasında bir heksoz (glukoz, fruktoz vb.) ya da pentoz şekeri (ksiloz vb.) piruvata indirgenir ve bu işlem glikoliz ya da Embden Meyerhoff metabolik yolu olarak adlandırılır. *Saccharomyces cerevisiae* gibi heksoz fermente edebilen mayalar bu yolu kullanarak etanol üretmektedir.

Embden – Meyerhoff metabolik yolağında, altı karbonlu şekerler (glukoz, fruktoz, galaktoz) kullanarak etanol üretilir. Bu reaksiyonda glukoz iki aşamada etanole dönüştürülür. Birinci aşamada glukoz, ortak ara ürün olan glukoz-6-fosfat çevrilir ve ikinci aşamada ise glukoz-6-fosfat, son ürün piruvata çevrilir (Maris vd. 2006).

Bu metabolik yolda son ürün kullanılan mikroorganizmaya göre değişiklik gösterir. Biyoetanol üretiminde kullanılan iki maya *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* bu yolu kullanır. 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) kullanılarak gerçekleştirilir. *Pichia stipitis*, gibi yalnızca beş karbonlu şekerleri kullanabilen mayalarda bu yolak kullanılır (Rastogi ve Shrivastava 2017).

2.4.4 Türkiye’de ve Dünyada biyoetanol üretimi ve kullanımı

Dünya biyoetanol üretimi 2019' da 115 milyar L'ye ulaşmış (IEA 2020), bu da küresel benzin talebinin yaklaşık %7,7 'si olarak belirlenmiştir (OECD 2019). 2019 yılında dünya genelinde biyoetanolün % 84'ünü ABD ve Brezilya üretmiş, bunu Avrupa Birliği (%5), Çin (%3), Kanada (%2) ve Hindistan (%2) izlemiştir (RFA 2020). COVID-19 pandemisinden önce, küresel biyoetanol üretiminin 2024 yılına kadar 130 milyar L'ye çıkması bekleniyordu (IEA 2019). Pandemi nedeniyle biyoyakıtlar (biyoetanol ve biyodizel) için 2020'de %13 'lük bir daralma gerçekleşmesi beklenirken (IEA 2020), pandemi azaldığında yeniden artması beklenir.

Etanol, benzine kıyasla daha düşük maliyetli ve daha az kirletici bir yakıttır. Etanolün benzinle %20 oranında harmanlanması harmanlanması ülke ekonomisine yılda 4 milyar dolara kadar katkı sağlayabilir (Sarwal vd. 2021).

Ülkemizin fosil yakıtlar bakımından dışa bağımlılığı da düşünüldüğünde, enerji depolamayla sağlanacak enerji tasarrufunun ülke ekonomisine de ciddi katkılar sağlayacağı aşîkârdır. Enerji depolama konusundaki çalışmalar yalnızca ülkemiz gibi enerji ihtiyacında dışa bağımlı ülkelerde değil, çok sayıda gelişmiş ülkelerde de rağbet görmektedir (Sarı 2011).

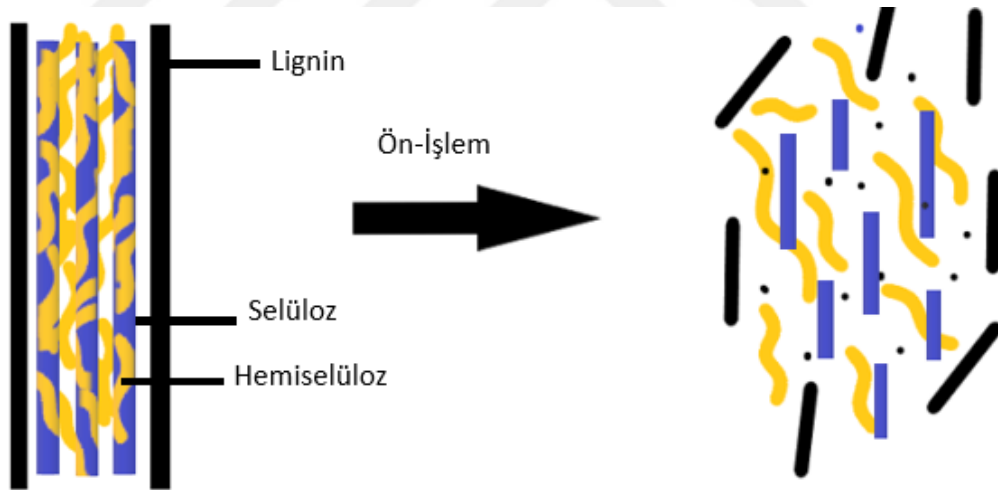
Türkiye, biyokütle üretimi bakımından elverişli güneş, tarımsal alanın kullanılabilirliği, su kaynakları ve iklim koşullarına sahip olup biyokütle enerjisi için bol miktarda kaynak sunabilecek yapıdadır (İlleez 2020).

Fosil yakıtların tükenerek olması ve bu yakıtların çevreye verdiği zarar biyokütle kaynaklı yenilenebilir yakıtlar üzerine yapılan araştırmaların artmasına ve fosil yakıtlara

alternatif, çevreci enerji kaynaklarının geliştirilmesine neden olmuştur. Bu sebeplerden ötürü yenilenebilir enerji kaynakları hakkındaki araştırmalar giderek artmıştır.

2.5 Lignoselülozun Parçalanmasında Uygulanan Ön-İşlemler

Lignoselülozik hammaddelerin ön işleme tabi tutulması önemli bir adımdır ve biyokütle kalıntılarının yapısını değiştirmek ve enzimatik hidroliz sırasında enzimlere kolay erişim için lignoselülozik fraksiyonları açığa çıkarmak ve indirgeyici şekerlerin oranını ve verimini arttırmak için gereklidir (Alvira vd. 2010). Lignoselülozik biyokütle üç ana bileşenden oluşur: selüloz (% 40-60), hemiselüloz (%20-40) ve lignin (%10-25) (Su vd. 2020). Lignoselülozik hammaddelerin bileşim ve nem açısından heterojenliği nedeniyle, tek tip dönüştürme yöntemlerini ve genel olarak optimal koşulları belirlemek zordur. Uygulamada, biyokütleyi biyoetanole dönüştürmek için çeşitli farklı dönüşüm yolları ve yükseltme yolları uygulanmıştır (Gaurav vd. 2017).



Şekil 2.7 Lignoselülozun ön-işlemler sonucu parçalanması (Koupai vd. 2020)

Ön işlem (ön hidroliz olarak da adlandırılır), hammaddenin enzimatik sindirilebilirliğini artırır. Ön işlem, hücre duvarı yapısını bozar, selüloz ve hemiselülozun (ksilan) ön hidrolizi yoluyla bazı lignin ve çözünür şekerleri (glukoz, arabinoz, ksiloz, galaktoz ve mannoz) serbest bırakır (Morales vd. 2021).

Ön hidroliz maddesi olarak kullanılan sülfürik asit ile seyreltik asit ön işlemi (Conde-Mejia vd. 2012), buhar patlaması gibi diğer ön arıtma yöntemlerine kıyasla hemiselüloz bozunma-çözünme oranını artırır ve reaksiyonu daha kısa zamanda gerçekleştirir (Conde-Mejia vd. 2012).

Lignoselülozik biyokütle ön arıtma yöntemleri genel olarak biyolojik olmayan ve biyolojik olmak üzere iki grupta incelenir. Biyolojik olmayan ön arıtma yöntemlerinde herhangi bir mikroorganizma kullanılmaz ve kabaca fiziksel, kimyasal ve fiziko-kimyasal yöntemler olmak üzere farklı kategorilere ayrılır (Kumar ve Sharma 2017).

2.5.1 Fiziksel ön işlem yöntemleri

Fiziksel ön işlemin amaçları, kurutma, ufalama, öğütme, kırma, yuvarlama ve parçalama yoluyla biyokütlenin boyutunu, su miktarını ve kristalliğini azaltmaktır (Zhu vd. 2010, West vd. 2019).

Lignoselülozik biyokütle ön işlemi için kullanılan en yaygın öğütme teknikleri, iki silindirli öğütme, çubuk öğütme, bilyalı öğütme, ıslak diskli öğütme, çekiçli öğütme, santrifüjlü öğütme ve kolloid öğütmedir (Sitotaw vd. 2021).

Bu öğütme cihazlarının seçimi yapılırken, biyokütlenin fiziksel ve kimyasal özellikleri, nem içeriği, partikül boyutu gibi faktörler göz önüne alınmalıdır (Zhu vd. 2020). Yüksek enerji tüketimi bu yöntemi ekonomik olarak verimsiz kılar (Rastogi ve Shrivastava 2017).

Mikrodalga ısıması, kolay çalıştırma, düşük enerji gereksinimi, kısa sürede yüksek ısıtma kapasitesi, minimum inhibitör üretimi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca, daha etkili parçalanma için hafif alkali reaktiflerin eklenmesi tercih edilir (Kumar ve Sharma 2017). Mikrodalga ön işlemi hızlıdır çünkü sıcaklıkla birlikte döndürme işlemi reaksiyon süresini kısaltır. Bu yöntem, yüzey alanını genişletmek ve hidroliz verimini arttırmak için kullanılır (Yan vd. 2021).

Ultrasonikasyon, lignoselülozik biyokütlenin ön işlemleri için daha az kullanılan bir yöntemdir. Bununla birlikte, laboratuardaki çalışmalar, sonikasyonun uygun bir ön işlem seçeneği olabileceğini göstermiştir. Ultrason dalgaları, lignoselülozik biyokütlenin yapısını bozan fiziksel ve kimyasal etkiler meydana getirdiğinden selüloz ve hemiselüloz fraksiyonlarını parçalayan küçük kaviteasyon kabarcıklarının oluşmasına yol açar, böylece daha basit indirgeyici şekerlere etkili bir şekilde parçalanmak için selüloz bozundurucu enzimlere erişilebilirliği artırır (Kumar ve Sharma 2017).

Buhar ile ön işlem yönteminde lignoselülozik hammaddeye yüksek sıcaklık (240 °C'ye kadar sıcaklıklar) ve basınç ile belirli bir süre buhar uygulanır. Daha sonra biyokütle hemen soğutulur. Buhar ön arıtmasının/buhar patlamasının amacı, selülozu enzimatik hidroliz için daha erişilebilir hale getirmek ve inhibitörlerin oluşumunu önlemek için hemiselülozu çözündürmektir (Yan vd. 2021). Yöntem sıklıkla amonyak ile beraber kullanılır ve amonyaklı buhar patlaması (AFEX) olarak adlandırılır. Bu yöntem, lignoselülozik materyalin yaklaşık 0.7-2.7 MPa basınç altında yüksek sıcaklıklarda sıvı amonyak ile parçalanması esasına dayanır. Bu yöntemde kullanılan amonyak , biyokütle yapısının şişmesine, yüzey alanının artmasına, hemiselülozun parçalanmasına ve lignin yapısının degrades olmasına olur (Jędrzejczyk vd. 2019). Hemiselüloz ve ligninin kısmi bozunması, asit ilavesi için ekstra ekipman gereksinimi, yüksek fiyat bu sistemin dezavantajlarıdır (Rastogi ve Shrivastava 2017).

Lignoselülozik hammaddenin ön arıtımı için çevresel olarak temiz teknolojiler göz önüne alındığında, süperkritik akışkanların bitkisel kaynakların lignoselülozik yapısını kırmak için iyi bir ön işlem yöntemi olduğu bildirilmiştir. Bir süper kritik akışkan, kritik sıcaklık ve basınç koşullarının üzerinde bir maddedir. Karbondioksit, düşük toksisitesi, düşük maliyeti ve kritik koşullarda (31.1 °C ve 7.36 MPa) dayanıklılığı nedeniyle en çok kullanılır. 35°C'de basınçlı karbon dioksit ile reaktörde bekletilen ve ardından hızlı basınçsızlaştırma uygulanan selülozik malzemeler, selülozik yapının bozulmasına neden olmuştur (Zheng vd. 1998). Kullanılan ön-işlem substratın yüzey alanını arttırmış ve enzimatik hidrolizi kolaylaştırmış ve selülozik materyalin parçalanmasını hızlandırmıştır. Bunun yanısıra glukoz verimini %50'ye kadar arttırdığı bildirilmiştir. Bu alternatif yöntem, düşük sıcaklıkta çalıştırıldığı ve şekerlerin

bozulmasına neden olmadığı için amonyak ve buhar patlamasına göre daha avantajlı ve daha ucuz olabilir (Putrino vd. 2020). Sayılan özelliklerinin yanında CO₂ patlaması genellikle enerji gereksinimi yüksek bir metottur ve ekipmanları pahalıdır bu nedenle endüstriyel üretimde fazla tercih edilmez (Agbor vd. 2011).

2.5.2 Kimyasal ön-işlem yöntemleri

Kimyasal ön işlemler kimyasal maddeler kullanılarak lignoselülozik hammaddenin parçalanmasını sağlayan yöntemler bütünüdür. Bu işlem tek başına etkili olduğu gibi fiziksel ve biyolojik ön işlem yöntemleriyle birlikte de uygulanabilmektedir.

Alkali ön işlem yöntemi sodyum, potasyum, kalsiyum ve amonyum hidroksitler gibi alkalilerle muamele, ester ve glukozidik yan zincirleri bozarak lignin yapısında değişikliğe, selüloz şişmesine ve bunun kısmen kristalleşmesine ve hemiselülozların kısmen çözünmesine neden olur. Tüm ligninlerin etkin şekilde uzaklaştırılması, hemiselüloz parçalayıcı enzimin artan erişilebilirliği, selülozun polimerizasyon ve kristallik derecesinde azalma gibi avantajları bulunmaktadır. Endüstriyel ölçek için verimli olmayışı ve işlem maliyetlerinin yüksekliği dezavantaj oluşturur (Rastogi ve Shrivastava 2017).

Lignoselülozların asitlerle ön muamelesi, hemiselülozları çözündürmenin ve selülozu daha kullanılabilir hale getirmenin en etkili yöntemlerinden biridir. Asit muamelesi sırasındaki ana reaksiyonlar, hemiselülozun parçalanması ve çözünmüş ligninin ayrıştırılmasıdır (Jędrzejczyk vd. 2019).

Asit katalizli ön işlemler, konsantre asitlerle veya seyreltilmiş asitlerle yapılan işlemler olarak ikiye ayrılır.

Etanol üretiminde konsantre asitlerle ön-işlem, daha yüksek inhibitör salınımına sebep olduğundan yaygın olarak kullanılmaz. Ayrıca konsantre asit ön işlemleri kullanıldığında ekipman korozyon sorunları ve asit geri kazanımı önemli

dezavantajlardır. Bu nedenle, seyreltilmiş asit ön muamelesi, endüstriyel uygulamalar için konsantre asit ön muamelesinden daha uygun bir yöntem olarak görünmektedir ve çok çeşitli lignoselülozik hammaddelerin ön muamelesi için kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Pejo vd. 2011).

Sülfürik asit ile seyreltik asidik ön-işlemi lignoselülozik materyallerin ön işleminde endüstriyel ölçekte başarıyla kullanılmaktadır. Seyreltik asit ön-işleminde çoğunlukla % 4 (w/v) ve altında sülfürik asit konsantrasyonuyla beraber yüksek ısı (120-125°C) kullanılır. Bu yöntem oldukça etkili ve maliyeti az olduğundan sıkça tercih edilir. Ticari ölçekte biyoetanol üretiminde halen kullanılmaktadır (Kumar 2010).

Asit ön işlemlerinin ana dezavantajları, reaksiyonların aşındırıcı ortamı ve daha ileri işlemlerde inhibitörlerin hidroksetilofurfural (HMF), furfural ve asetik asit olası oluşumudur (Jönsson ve Martín, 2016).

Bir diğer kimyasal ön-işlem olan ozonolizis, lignoselülozik hammaddede lignin miktarını azaltmayı ve hemiselülozu kısmen parçalamayı amaçlar. Ozon, yüksek delignifikasyon etkinliği gösteren güçlü bir moleküldür. Bu yöntem genellikle oda sıcaklığında ve normal basınçta gerçekleştirilir ve sonraki hidroliz fermentasyonu etkileyebilecek inhibitör bileşiklerin oluşumuna yol açmaz. Bununla birlikte, bu işlemin dezavantajı, süreci ekonomik yönden maliyetli hale getiren büyük miktarlarda ozon ihtiyacıdır (Refaat 2012).

Kimyasal ön işlemlerden biri de hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında peroksidaz enzimleri ile yapılabilir. Çeşitli hidrojen peroksit konsantrasyonlarının kimyasal bileşim üzerindeki etkisi araştırılmıştır. %8' lik bir hidrojen peroksit konsantrasyonuyla yapılan ön-işlem, lignini etkili bir şekilde uzaklaştırmış ve selülozun yapısal olarak bozunmasını sağlamıştır. Bu yöntem pahalı ve yüksek inhibitör düşük glukoz oluşumuna sebep olduğundan ticari ölçekli üretimde tercih edilmez (Shimizu vd. 2018).

Günümüzde organosolvent ön işlem yöntemi de kullanılmaktadır. Organosolv, hemiselülozu çözündürmek ve lignini çıkarmak için çeşitli organik veya sulu organik solvent karışımlarını kullanan bir biyokütle ön işlem yöntemidir. Metanol, etanol, aseton, etilen glikol, trietilen glikol ve tetrahidrofurfuril alkol gibi organik çözücüler proste en yaygın olarak kullanılırken, oksalik, salisilik ve asetilsalisilik asitler gibi organik asitler organosolvasyon prosesinin katalizörleridir. Organosolv ön işleminin avantajları: yüksek verim, kolay solvent geri kazanımı ve geri dönüşüm olasılığı ve biyokütle fraksiyonlarının nispeten yüksek saflığı ve bunların ayrılma olasılığının olmasıdır. Ek olarak, işlem bir ilk mekanik ön işlem gerektirmez. Dezavantajları ise çözücülerin yüksek maliyetleri ve geri kazanımı, aynı zamanda uçucu çözücülerin kullanımı nedeniyle kullanılan ekipmanın özel gereksinimleriyle ilgili bir işlemin maliyetleri olarak sıralanabilir (Jędrzejczyk vd. 2019).

Lignoselülozik biyokütlenin ön-muamelesi için çözücüler olarak iyonik sıvıların (IL) kullanımı, son on yılda çok dikkat çekmiştir. Polisakkaritlerdeki geniş hidrojen bağı ağını parçalayabilir ve çözünmesini teşvik edebilirler. IL'ler, genellikle oda sıcaklığında, nispeten düşük sıcaklıklarda sıvı olarak bulunan, tipik olarak büyük organik katyonlar ve küçük inorganik anyonlardan oluşan tuzlardır. IL'lerin dikkate değer özellikleri, termal ve kimyasal kararlılıkları, yanmazlıkları, geniş sıvı sıcaklık aralığı ve çeşitli malzeme türleri için iyi çözünme özellikleridir. Çözücü özellikleri, katyonun anyon ve alkil bileşenlerinin ayarlanmasıyla değiştirilebilir. Toksik veya patlayıcı gazlar oluşmadığından IL'lere “yeşil” solventler denir.

IL'lerin büyük ölçekli uygulaması için, IL'ler için enerji verimli geri dönüşüm yöntemlerinin ayrıntılı olarak geliştirilmesi bir ön koşuldur ve IL'lerin biyokütle ön işleminin için gerçek bir seçenek olarak kabul edilebilmesi için enzimler ve fermentatif mikroorganizmalar üzerindeki toksisite de araştırılmalıdır. Bu mevcut sınırlamalara rağmen, karbonhidratlardan IL'lerin potansiyel sentezi olarak ileri araştırmalar, maliyetlerini düşürmede rol oynayabilir. IL'lerin ön arıtmasının geliştirilmesi, gelecekteki lignoselüloz biyorafineri süreçleri için büyük bir potansiyel sunabilir (Pejo vd. 2011).

2.5.3 Biyolojik ön-işlem yöntemleri

Biyolojik ön-işlemler lignoselülozun parçalanmasında yalnız kullanılabileceği gibi fizikokimyasal, kimyasal, ve fiziksel, ön işlem yöntemleriyle harmanlanarak da kullanılabilirler. Biyolojik ön-işlem lignoselülozik yapıda bulunan, lignin, hemiselüloz ve selülozu parçalayan yöntemler olarak 3 farklı kategoride incelenebilir.

Biyolojik ön işlem, lignini parçalamak için temel olarak bazı bakteri ve mikroorganizmaları kullanır. Süreçte lignini parçalayan enzimler üretebilir. Bu nedenle, bu yöntem ligninin parçalanmasında etkilidir. Lignini parçalamak için sıklıkla kullanılan mantarlar, beyaz ve kahverengi çürükçül mantarlardır. Bunlar arasında beyaz çürükçül mantarlar lignin üzerinde en çok bozunma meydana getiren gruptur.

Yaklaşım, düşük enerji tüketimi ve kirliliğin olmaması gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, uzun proses süresi ve beyaz çürüklük mantarı, büyüme sürecinde selülozun ve hemiselülozun bir kısmını kullanması yöntemin dezavantajlarıdır. Ek olarak, lignini bozunduran mikroorganizmaların türleri daha azdır , yüksek bozunma koşulları gerektirir ve ligninolitik enzimlerin aktivitesi düşüktür. Tüm bu nedenler büyük ölçekli endüstriyel uygulamalarda kullanım zorluğuna yol açar. Buğday samanının yüksek lignin parçalayıcı ve düşük selüloz parçalayıcı mantarları ile biyolojik ön işlemini için kullanılan asit miktarını azaltırken , fermente edilebilir şekerlerin salınımında bir artış ve fermentasyon inhibitörlerinin konsantrasyonunun da azaldığını göstermiştir (Chen vd. 2017).

Selülazlar ve hemiselülaz (esas olarak ksilanaz), selüloz ve hemiselülozun (ksilan) hidrolizini katalize eden karbo-hidrolazlardır. Selülaz, selülozu hidrolize eden ve glukozu serbest bırakan ekzoselülaz, endoselülaz ve β -glukosidaz için ortak bir isimdir (Zhao vd. 2019).

Lignoselülozik biyokütlede bulunan diğer bir ana bileşen, ksilan içeren hemiselülozlardır. Bunlar bir pentoz şekeri olan ksilozdan yapılmış polisakkaritlerdir.

Ksilanın hidrolizi, ksilanaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus* ve *Humicola insolens* ticari ksilanazların endüstriyel kaynaklarından bazılarıdır ve optimum sıcaklıkları 40 ila 60 °C arasındadır (Binod vd. 2011).

Biyolojik ön işlemler çevre açısından güvenlidir ve düşük enerjili işlemlere sahiptir. Bununla birlikte, düşük verim ve bol hidroliz nedeniyle, biyolojik arıtmaların genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar ve kontrollü koşullar ile daha verimli prosesler geliştirmesi gerekmektedir. Biyolojik ön işlem, yüksek sakkarifikasyon oranı (verimliliği) ile etkili çevre dostudur. Ancak reaksiyon süresinin uzun olması bu yöntemin temel eksikliğidir. Mikroorganizma aktivitesinin biyolojik ön işlem verimliliğinin iyileştirilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyacı vardır (Khan vd. 2021).

2.6 Fermentasyon Stratejileri

Biyoetanol üretiminde çeşitli fermentasyon uygulamaları mevcuttur. Bunların en sık kullanılanları SHF (ayrılmış hidroliz ve fermentasyon), SSF (eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon) ve SSCF (eşzamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon)'dur.

SHF (Ayrılmış Hidroliz ve Fermentasyon), fermente edilebilir şekerleri etanole dönüştüren fermentatif mikroorganizma ile fermentasyon işlemi ile besiyerinin sürekli olarak monosakkaritlere indirgenmesi için hidrolizin ayrılmasına dayanan bir fermentasyon işlemidir. Bu işlemin avantajları düşük maliyetli olması, kısa zamanda gerçekleşmesi ve kompleks ekipmanlara ihtiyaç duyulmamasıdır. SHF, bağımsız olarak optimum sıcaklıkta etanol üretebilir, ancak hidroliz sırasında glukoz ve selobiyoz birikimi, son ürün inhibisyonunun oluşmasına ve ayrıca önlenemez kontaminasyon olasılığının yüksek olmasına neden olan engelleyici etkilere sahiptir. Ayrıca, hidroliz sırasında glukoz tarafından selüloz ve β -glukozidaz enziminin inhibisyonu, verim elde etmek için daha düşük biyokütle konsantrasyonlarında kullanımına ve daha yüksek enzim miktarı gereksinimine yol açmıştır. Hidroliz işlemi sırasında istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu önlemek için ek nötrleştirme ve saflaştırma adımları yapılmalıdır.

Bu nedenle SHF'nin dezavantajı eşzamanlı şekerleme ve fermentasyon (SSF) sürecinin gelişmesine neden olur (Phwan vd. 2018).

SHF'nin aksine, SSF (Eş-zamanlı Sakkarifikasyon ve Fermentasyon), tek bir reaktörde tek adımda hem hidroliz hem de fermentasyonu aynı anda yürütülmesine dayanır. Hammaddeler, enzim ve maya, fermente olabilen şekerleri hızlı bir şekilde ortaya çıkarmak ve bunları biyoetanole dönüştürmek için düzenli bir şekilde birlikte eklenmiştir. Bu işlem, seyreltik asit veya yüksek sıcaklıkta su ön işlemi ile birleştirildiğinde etkili olduğu gösterilmiştir. SSF'de karbonhidrat polimerleri, selülozlar ve ksilanazlar tarafından fermente edilebilir şekerlere dönüştürülür. SSF prosesi, benzer pH, sıcaklık ve optimum substrat konsantrasyonu ile uyumlu bir koşul gerektirir. Birçok çalışma, maliyeti düşürme (sadece az miktarda enzim gerektiren), işlem süresi, daha az kontaminasyon, düşük inhibitör etkileri ve yüksek etanol üretim hızı nedeniyle SSF'nin SHF'den daha fazla tercih edildiğini belirtmiştir (Azhar vd. 2016).

SSCF (Eşzamanlı Sakkarifikasyon ve Birlikte Fermentasyon), hidroliz ve fermentasyonun aynı anda tek bir reaktörde gerçekleştiği hemiselüloz şekerler (pentoz) ve selüloz şekerler (heksoz) için işlemleri içeren prosestir. Bu işlem, hidrolizden sonra C₅ şekerlerinin (pentozlar) ortamda önemli ölçüde bulunduğunda önerilmiştir. SSCF, glukoz ve pentozları aynı reaktörde fermente edebilirken, SSF'nin fermentasyonu pentozlardan ayrılır, ancak her iki işlem de kısa bir genel enzimatik hidroliz işlemine, düşük maliyete ve SHF'den daha yüksek etanol verimine sahiptir (Phwan vd. 2018).

2.7 Biyoaktif Bileşikler

İlaç, gıda ve beslenmenin bazı alanlarının birbiriyle örtüşen birçok ilgi alanına sahip olduğu iyi bilinmektedir. Biyoaktif bileşikler, önemli fonksiyonel gıdalar, nutrasötik ve gıda katkı maddelerinin formülasyonundaki bileşenler olarak adlandırılırlar (Joana Gil-Chávez vd. 2013).

Spesifik olarak, meyveler, sebze atıkları ve bunlarla ilişkili yan ürünler, birçok biyoaktif ve terapötik bileşik açısından zengin olan en bol kaynaklar arasındadır. Bu atıkların kabuklar ve tohumlar gibi bazı bileşenlerinin, antioksidan aktivite sergilediği ve belirli kanser türlerini geliştirme riskini azalttığı gösterilen polifenoller, flavonoidler ve karotenoidler dahil olmak üzere çeşitli bitkisel kimyasallar içerdiği bildirilmiştir (Day vd. 2009). Bu atık yan ürünlerden çıkarılan biyoaktif fitokimyasallar, önemli miktarda antioksidan aktivite sergilediği gösterilmiştir.

Bu geri kazanılan bileşikler, fonksiyonel gıdalardaki ana bileşenler olarak daha fazla kullanılabilir veya lipid peroksidasyonunu önleyerek ve oksidasyon hasarından koruyarak raf ömürlerini uzatmak için gıda katkı maddeleri olarak hizmet edebileceği belirlenmiştir (Kalogeropoulos vd. 2012).

Çizelge 2.4 Bazı Gıda Atıklarında Biyoaktif Kimyasallar (Kassim vd. 2020)

Bazı Gıda Atıklarında Bulunan Biyoaktif Fitokimyasallar		
Hammadde	Atık	Ana Fitokimyasallar
Domates	Kabuk ve Çekirdek	Steroller, karotenler, terpenler, Polifenoller ve likopen
Üzüm	Kabuk ve Çekirdek	Polifenoller, polimerik antosiyaninler
Narenciye	Kabuk	Fenoller, flavonoidler, antosiyaninler
Mango	Çekirdek ve tohumlar	Polifenoller, antosiyaninler, karotenoidler
Kahve	İşlenmiş Atıklar	Polifenoller, taninler, gallik asit
Avokado	Kabuk	Polifenoller
Elma	Posa	Polifenoller
Limon	Kabuk	Fenol, eriocitrin
Patlıcan	Kabuk	Polifenoller, antosiyanin
Çay	İşlenmiş Atıklar	Taninler, kafein, matein, gallik asit

Antioksidanlar (örneğin, flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, C vitamini, E vitamini), anti-inflamatuar ve anti-kanserojen etkiler gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir,

koroner hastalıkların insidansını azaltır ve bağırsakların korunmasına katkıda bulunur. Antioksidan aktiviteye sahip ana bileşik sınıfları şunlardır: vitaminler (C vitamini ve E vitamini), karotenoidler (karotenler ve ksantofiller) ve polifenoller (flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar ve stilbenler).

Flavonoidler, yüksek antioksidan etkiye sahip olduklarından antibakteriyel, antiviral, antikanserojenik özellik gösterirler (Oroian ve Escriche 2015).

Karotenoidlerin kanser ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli sağlık bozukluklarına karşı korunmada etkin olduğu gösterilmiştir. Portakal, maydanoz, nane, kereviz ve kişniş gibi sebzelerde bol miktarda bulunur (Jomova ve Valko 2013).

Son zamanlarda, hastalıkların tedavisinde potansiyel sağlık yararları nedeniyle flavonoidler gibi biyoaktif bileşiklerin kullanımı bir diğer seçenek olarak gösterilmiştir. Bu maddeler sebze ve meyvelerde bulunabilir ve ayrıca tarımsal gıda atıkları gibi ikincil hammaddelerden de geri kazanılabilir (Montenegro vd. 2021). Polifenollerin, özellikle flavonoidlerin, koronavirüs giriş ve replikasyon aşamalarının çeşitli aşamalarında tatmin edici bir şekilde rol aldığı vurgulanmaktadır (Russo vd. 2020).

Polifenoller ; fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere 4 grupta incelenir. Flavonoidler ise bu gruplar içerisinde en geniş ve en çok çalışılan gruptur. (Saurina ve Sentellas 2015).

Flavonoidler doğada bol miktarda bulunur ve birkaç alt sınıfa ayrılabilir, bunlar: flavanoller, antosiyanidinler ve izoflavonlardır (Hideg vd. 2014).

2.7.1 Antosiyaninler

Antosiyaninler meyvelerde, çiçeklerde, bitkilerde vb. bulunan kırmızı, mor veya mavi pigmentlerdir (Oroian ve Escriche 2015).

Antosiyanin molekülleri oldukça kararsızdır ve sıcaklık, pH, ışık, oksijen, çözücüler, metalik iyonlar ve enzimler tarafından kolayca parçalanır (Reque vd. 2014).

Antosiyaninler insanlar üzerinde faydalı etkiler gösterir ; antioksidan ve antikanserojenik aktivite sergilerler (Hui vd. 2010). Bitkilerde bulunan fenolikler arasında antosiyaninler çok amaçlı bileşikler olarak kabul edilmiştir. Meyve, sebze ve çiçeklerde bol miktarda bulunurlar ve esas olarak kırmızı, mor ve mavi renkleri oluştururlar ve ayrıca bitki bazlı gıdalara sağlığa yararlı rol oynadığı gösterilmiştir. Antosiyaninlerin inflamasyon, diyabet, obezite vb. dahil olmak üzere farklı kronik hastalıkları tedavi ettiği bildirilmiştir. Toksik olmayan ve biyolojik sistemlere oldukça uyumlu olan antosiyaninler , gıda endüstrilerinde artan bir talep görmektedir (Farooq vd. 2020).

Antosiyaninlerin 4 hafta süreyle uygulanmasının miyop, diyabet ve obezite semptomlarını azalttığı kanıtlanmıştır (Tsuda 2012).

Mevcut araştırma odağı, daha yüksek antosiyanin değerlerinin elde edilebileceği yeni gıda, bitki kaynakları ve yeni ekstraksiyon teknikleri bulmaya yöneliktir. Antosiyaninlerin verimli bir şekilde ekstrakte edilebileceği yeni kaynaklardan biri de patlıcan kabuklarıdır (Dranka ve Oroian 2016).

Antosiyaninler iyonik moleküler yapıları nedeniyle baskın pH'a göre renk ve yapılarını değiştirirler. pH 1'de flavilyum katyonu olarak bulunurlar ve kırmızı mor renk gözlemlenir. pH 4.5' te (karbinol), renksiz formda bulunurlar (Koop vd. 2022).

2.7.2 Antosiyaninlerin Ekstraksiyon Yöntemleri

Antosiyaninlerin polar moleküllerdir bu nedenle metanol, su ve alkol gibi polar çözücülerin kullanımı ekstraksiyon işlemini kolaylaştırır. Antosiyanin ekstraksiyonunda en verimli yöntem %60-80 konsantrasyonda polar çözücülerin kullanılması olarak belirlenmiştir (Farooq vd. 2020).

2.7.2.1 Ultrason destekli ekstraksiyon (BAE)

Antosiyanin ekstraksiyonunda ; Ultrason Destekli Ekstraksiyon (BAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon ve geleneksel katı-sıvı ekstraksiyon gibi birçok farklı yöntem mevcuttur (Vega vd. 2017).

BAE, daha düşük çalışma sıcaklıkları, daha düşük maliyetli olması, daha hızlı ekstraksiyon, az miktarda çözücü gerektirmesi ve verimliliğini arttırması nedeniyle en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Ayrıca, çalışmalar BAE'nin antosiyanin ekstraksiyon verimini arttırdığını da göstermiştir (Hu vd. 2019).

Ultrason Destekli Ekstraksiyon (BAE), ultrasonların uygulanmasından kaynaklanan kavitasyon olgusunun neden olduğu mekanik etkiden yararlanan bir tekniktir (Liu vd. 2021).

Bu yöntem, numuneden çözücüye kütle transferini kolaylaştırır ve dolayısıyla bileşiklerin düşük sıcaklıkta ve daha kısa ekstraksiyon sürelerinde ekstraksiyonunu arttırır, böylece antosiyaninlerin bozulmasını önler (Chen vd. 2021). Ayrıca BAE, herhangi bir karmaşık bakım veya uzmanlık gerektirmediği için uygulanması kolay bir yöntemdir. Ayrıca diğer geleneksel tekniklerden daha az çözücü kullanır, bu da onu daha az maliyetli hale getirmiştir (Sherine ve Farag 2021). Ayrıca, bu teknikle elde edilen verimler, diğer geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilenlerden oldukça yüksektir ve ekstraktlarda elde edilen bileşik miktarını iki katına bile çıkarabilir (Majid ve Silva 2021).

2.7.2.2 Geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonu

Geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonunda, soxhlet ekstraksiyon tekniği, doğal kaynaklardan antosiyaninler de dahil olmak üzere antioksidan bileşikleri çıkarmak için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu yöntemde numune bir yüksük içine yerleştirilir ve içinde çözünen maddenin şişede kaldığı ve çözücünün hareket etmeye devam ettiği uygun organik

çözücü içeren soxhlet aparatına yerleştirilir. Yüksek geri kazanımı elde etmek için, aynı çözünen, ekstraksiyon tamamlanana kadar yeni çözücü ile şişede kalır. Geleneksel ekstraksiyon zaman alıcı bir işlemdir ve çok miktarda solvent gerektirir bu iki durum yöntemin dezavantajlarını oluşturur ve antosiyanin ekstraksiyonunda yeni tekniklerin bulunmasını gerektirir (Celli ve Brooks 2017).

2.7.2.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), mikrodalgaların enerjisini kullanarak moleküler hareketi etkiler ve sıvılarda kalıcı dipol oluşmasına neden olarak çözücü ve numunenin hızlı ısınmasına neden olur. Bu yöntem, ekstraksiyon süresini ve solvent tüketimini azaltırken verimliliği artırmıştır. Bunun yanısıra sıcaklığı da arttırdığı için ekstraksiyon süresi uzadıkça antosiyaninlerin bozunmasına sebep olabilir (Buldini 2002).

2.8 Biyorafineri Teknolojilerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyoetanol üretiminde verimi arttırmak için kullanılacak olan mikroorganizmanın bazı özelliklere sahip olması istenir. Bunlar fermentasyon anında hızlı çoğalabilme, üretilen yüksek etanol konsantrasyonlarına dayanıklı olma, mevcut substratı kullanabilme, üretilen inhibitörlere karşı tolerans gösterebilme, stres oluşturabilecek etkenlere karşı dirençli olma ve yüksek fermentasyon hızıyla maksimum etanol verimi gibi özelliklerdir (Sathendra vd. 2022).

2.8.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Etanol üretiminde diğer mikroorganizma türleri ile karşılaştırıldığında mayalar, özellikle *S. cerevisiae* , yüksek etanol verimliliği, yüksek etanol toleransı ve düşük maliyeti nedeniyle etanol üretiminde yaygın olarak kullanılır. Ancak *S. cerevisiae* , kullanımının en büyük dezavantajı ksilozu fermente edememesidir. Bu nedenle, pentozların fermentasyonu hakkındaki bilgiler hala oldukça sınırlıdır.

Ancak, şeker kamışı ve bazı diğer tahıllardan biyoetanol üretimi için endüstriyel tesislerde en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma *S. cerevisiae* olduğundan, yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu bu mikroorganizma kullanılarak yürütülmekte ve pentozları fermente edebilmesi için genetik düzenleme çalışmaları yapılmaktadır (Komesu vd. 2020).

S. cerevisiae , genetik olarak C₆ şekerlerini (örn., glukoz) glikolitik yol aracılığıyla üç karbonlu ara maddeye (piruvat) katabolize etme yeteneğine sahip olduğundan ve bunu biyodönüşümle karbon dioksit (CO₂) ve NAD⁺ (nikotinamid adenin dinükleotit) kullanılarak son ürün olan biyoetanol (C₂H₅OH) çevirir. Bu maya suşu, "Crabtree-pozitif" olarak kategorize edilir çünkü mikroorganizma oksijenli ortamda veya düşük şeker konsantrasyonlarında bile etanol üretebilmektedir (Imura vd. 2020).

2.8.2 *Pichia stipitis*

Pichia stipitis, odunlarda yaşayan böcek larvalarından ve çürüyen ahşaptan izole edilen mayadır. Odunsu yapılarda bulunan monomerik şekerleri kullanırlar. *P. stipitis* pentozları kullanarak etanol üretebilirler. Optimum gelişme sıcaklığı 25-33°C ve pH 4.5-5.5 aralığında değişim gösterir. Bununla birlikte β- glukozidaz enzimini kullanarak selülobiyozu glukoz parçalar etanol üretimi gerçekleştirir.

P. stipitis, ortamda bulunan yüksek indirgen şeker konsantrasyonunda etanol üretemezken düşük oksijenli ortamlarda etanol üretimi yaparlar. Bu maya için glukozdan elde edilen etanol verimi beş karbonlu şekerlere göre daha azdır. Biyoetanol üretimi için glukoz ve ksilozun yanı sıra mannoz ve galaktoz kullanırken L-arabinozu biyokütle artırımı için kullanırlar (Agbogbo vd. 2008).

P. stipitis güvenli (GRAS) olarak kabul gören ve ksiloz fermentasyonu yapabilen ender mikroorganizmalardan biridir. Bu maya ksilozu kullanarak etanol üretebildiği için son yıllarda yapılan çalışmalarda *P. stipitis*'in ksiloz fermentasyonunda etanol üretimi için

kullanılması daha yüksek verimlilik gerçekleştirmesine ve dolayısıyla maliyeti düşürmesine izin veren umut verici bir teknoloji olduğunu göstermiştir (Lin vd. 2016).

2.8.3 *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus süt yoğurt ve peynir gibi ürünlerden izole edilebilen Crabtree negatif bir mayadır. *Kluyveromyces marxianus* , genellikle fermente edilmiş geleneksel süt ürünleri, kefir, şeker endüstrilerinden gelen atık sular, sisal yaprakları ve bitkiler gibi çok çeşitli doğal habitatlardan izole edilen bir mayadır. *Kluyveromyces* cinsinin türlerinin birçok endüstriyel uygulama için potansiyele sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, *K. marxianus* , sırasıyla Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri'nde Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) statüsünü elde etmiştir, bu da onu özellikle farmasötik ve gıda sınıfı enzimler ve proteinler üretmeyi uygun kılmaktadır (Karim ve Aider 2022).

Kluyveromyces marxianus diğer mayalardan farklı olarak birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar temel olarak, laktoz ve inülin dahil olmak üzere geniş bir şeker yelpazesini kullanma yeteneği, litik enzimlerin salgılanması, diğer ökaryotlardan daha yüksek büyüme oranı ve fermantasyon yoluyla yakıt etanolünün üretilmesidir (Varela vd. 201).

K.marxianus mayasının *S. cerevisiae*'ye göre bazı avantajları mevcuttur. Bunlardan biri daha yüksek büyüme hızına sahip olmasıdır. Bir diğeri ise ortamda bulunan ksilozu metabolize edebilmesidir. Biyorafineri teknolojilerinde *K. marxianus* mayasının kullanılması, yüksek sıcaklıkta gelişebildiğinden ve fermantasyon yeteneği şeker akışlarını, sonuç olarak proses değerini arttırdığından kontaminasyon olasılığını en aza indirmiştir. Yüksek termotolerans nedeniyle, *K. marxianus* , çeşitli lignoselülozik biyokütle kaynaklarından etanol üretimi üzerinde umut verici sonuçlar göstermiştir. Çünkü bu mikroorganizma, hem sakkarifikasyon hem de fermentasyon işlemlerinin aynı anda gerçekleştiği eşzamanlı şekerleme ve fermantasyon (SSF) işleminde başarıyla kullanılmıştır.

Tüm bu özellikleri nedeniyle, *K. marxianus* biyorafineride önemli bir maya olarak ortaya çıkmıştır ve bu mayayla ilgili toplam yayın sayısının %50'den fazlasının son 7 yılda geldiğini gösteren bir bibliyometrik araştırmada oldukça belirgindir. (aynı dönemde *S. cerevisiae* için bu oran sadece %25 idi) (Leonel vd. 2021).

K. marxianus'un biyoteknoloji, gıda ve çevre alanındaki birçok uygulaması günümüzde yeni yeni ortaya çıkmaya başlamıştır, bunun üzerine araştırmalar halen devam etmektedir (Karim ve Aider 2022).

2.9 Biyorafineri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Hashemi ve ark. (2020) tarafından yapılan bu çalışmada aspir fabrikasında biyoetanol, biyodizel ve biyogazın biyorafineri konseptiyle eş zamanlı üretimi araştırılmıştır. Aspir yağlı tohumlarından biyodizel üretimi, kalan tohum küspesinden biyogaz üretimi ve aspir samanından biyoetanol üretimi ile verimli bir biyorafineri yapısı geliştirilmiştir. Toplamda 0.168 L biyoyakıt üretilmiştir.

Tran ve ark. (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada verimli lignoselülozik biyorefineri için *Saccharomyces cerevisiae* tarafından geliştirilmiş eş zamanlı glukoz ve ksiloz fermantasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada, genetik modifiye edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* 39.6 g/L glukoz ve 23.1 g/L ksilozdan oluşan lignoselülozik hidrolizatların 24 saat içinde 30.1 g/L etanol üretmiştir. Geliştirilmiş ksiloz katabolizmasına sahip yeni tasarlanmış suşun performansı, fermantasyon sıcaklığının yükseltilmesiyle daha da artırıldı ve böylece birlikte fermantasyon süresini yarı yarıya önemli ölçüde azaltmıştır.

Bir başka çalışmada biyokömürde hücre immobilizasyonu yoluyla *Saccharomyces cerevisiae*' de biyo üretim ve ısı toleransının artırılması yoluyla narenciye kabuğu atık biyorefinerisinde uygulama gerçekleştirilmiştir. Kullanılan teknoloji *S. cerevisiae* 'ye ısı toleransı sağlamış, yüksek sıcaklıkların mayalar üzerindeki olumsuz etkisini azaltarak biyoetanol üretimini arttırmıştır. Sentetik bir narenciye kabuğu hidrolizatı üzerinde

yetiştirilen antep fıstığı biyokömürü üzerinde immobilize *S. cerevisiae* , 63 g /L etanol konsantrasyonu ve 7,9 g/L sa⁻¹ üretkenliği sergileyerek önceki kültürlerle kıyasla önemli ölçüde biyosistem performansını artırmıştır (Kyriakou vd. 2020).

Morales ve diğerlerinin 2018'de yaptığı başka bir çalışmada kestane kabuklarından biyopolimer lignin ve biyoetanolün birlikte üretimi için alkali ön işlemin optimizasyonu araştırılmıştır.

Saccharomyces cerevisiae kullanılarak eşzamanlı şekere dönüştürme ve fermantasyona tabi tutulmuştur. 14.6 g/L'lik bir etanol üretimine ulaşılmıştır (% 97'lik etanol dönüşümü). Biyokütleden ligninin uzaklaştırılması hammaddenin enzimatik sindirilebilirliğini etkilemiştir. Genel olarak, çeşitlendirilmiş ürünler üreten entegre bir biyorafineri prosesi, kestane kabuklarının sürdürülebilir değerlendirilmesi için büyük bir potansiyel sunmaktadır.

Unrean ve Ketsub tarafından 2018'de yapılan bir çalışmada şeker kamışı küspesinden etanol ve ksilitolün birlikte üretimi için entegre lignoselülozik biyoproses geliştirilmiştir. Beş karbonlu bir şeker alkolü olan ksilitol diyet, gıda ve ilaç endüstrilerinde şeker yerine olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Glukoz tükenmesinden sonra, hem hücre büyümesi hem de ksilitol biyosentezi için ksiloz tüketilmiştir. *C. tropicalis* 48 saat içinde ksilozu tamamen kullanmış 6.8 ± 0.5 g/L maksimum ksilitol üretimi gerçekleştirmiştir. Son olarak, sırasıyla *S. cerevisiae* tarafından maksimum 56.1 g/L etanol ve *C. tropicalis* tarafından maksimum 6.8 ksilitol g/L üretimi SSF (Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon) stratejisi ile gerçekleştirilmiştir.

Huet vd. 2020'de yaptığı bir çalışmada entegre bir böcek biyorefinerisi önerilmiştir. *Bombyx eri* larva kitini, % 32.5 maksimum teorik verime karşılık geldiği bulunmuştur. Bu değerler ticari kitine kıyasla daha düşüktür (% 44.7) ancak etanol içindeki kabuklu deniz hayvanlarından veya böceklerden çıkarılan kitinin değerlendirilme sürecinin uygulanabilirliğini açık bir şekilde göstermektedir. Bu çalışma, kitin türevleri üzerinde

etanol üreten doğal bir maya suşunun ilk çalışmasıdır ve bu substratın büyük potansiyellerini vurgulamaktadır.

Kuglarz vd. 2018’de yaptığı çalışmada seyreltik asit ön işleminden sonra kolza sapından selülozik biyoetanol ve süksinik asitin entegre üretimi araştırılmıştır. % 20 (w/v) konsantrasyonunda kolza tohumu ön muamelesi ve ardından enzimatik hidroliz, yüksek glukoz verimi (% 80) ve etanol üretimi ile sonuçlanmıştır. Ön işlemde elde edilen sıvı fermantasyonundan daha yüksek miktarlarda % 60 verimle süksinik asit üretilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kolza sapının selülozik biyoetanol ve süksinik asit üretimi için biyorefineri yaklaşımında kullanılabileceğini açıkça göstermiştir.

Talekar vd. tarafından 2018’ de yapılan başka bir çalışmada atık nar kabuklarından biyoetanol üretimi ile birlikte pektin ve polifenollerin eşzamanlı olarak geri kazanılmasına yönelik entegre bir yeşil biyorefineri yaklaşımı geliştirilmiştir. Nar kabuğu içeriğindeki indirgen şeker konsantrasyonu 33.5-34.1 g/L olarak bulunmuştur. 48 saatlik fermantasyondan sonra 15.2-15.6 g/L etanol elde edilmiştir. Ön-işlem olarak hidrotermal proses tercih edilmiştir. Optimize edilmiş hidrotermal proses, yüksek metoksil gıda kalitesinde pektin (% 18.8–20.9) punikalajin açısından zengin fenolikler (%10.6–11.8) ve gelişmiş enzimatik sindirilebilirliğe sahip biyokütle elde edilmiştir. Birden fazla ürünün eşzamanlı olarak geri kazanımı, işlemin genel maliyetini en aza indirmiştir ve atık nar kabuklarının sürdürülebilir kullanımına imkân sağlamıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar

Yapılan 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

Patlıcan kabukları Yurt Konserve Ltd./İstanbul'dan temin edilmiştir. Hammaddeler etüvde (Nevü FN400) 70°C sıcaklıkta kurutulduktan sonra laboratuvar tipi değirmende (Miprolab) por çapı 0.20 mm olacak şekilde öğütülmüştür.

3.2 Yöntem

3.2.1 Antosiyanin ekstraksiyonu

Antosiyanin ekstraksiyonu ,ultrasonik banyoda (ISOLAB) 250mL hacimli erlen içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonda çözücü olarak %50 Et-OH çözücüsü kullanılmıştır. Ultrasonikasyonda 35 °C sıcaklıkta 60 dakika sonikasyona tabii tutuldu. Ekstraksiyon sonunda örnekler filtre edilmiş, TMA (Toplam Monomerik Antosiyanin) tayini yapılmıştır.

3.2.2 Toplam monomerik antosiyanin tayini

Toplam monomerik antosiyanin miktarının belirlenmesinde Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından geliştirilen pH diferansiyel yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem hammaddede bulunan antosiyaninlerin pH'ya bağlı olarak geçirdiği renk değişimine dayanmaktadır. Spektrofotometre (Shimadzu) 530 nm ve 700 nm'de örneklerin absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. pH 1.0 için ölçülen absorbans değeri ile pH 4.5 için ölçülen absorbans değerinin farkı alınarak örneğin gerçek absorbans değeri (A) bulunmuştur (Eşitlik 3.1).

$$Absorbans(A) = (A_{530} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH4.5} \quad (3.1)$$

Toplam monomerik antosiyanin konsantrasyonu (Eşitlik 3.2)'ye göre hesaplanmıştır. Eşitlikte, (DF) seyreltme faktörünü, (m) kullanılan numunenin g cinsinden değerini belirtirken (V) mililitre cinsinden hacmi ifade etmektedir. Patlıcan kabuğu için literatür çalışmaları dikkate alınarak, örneklerde molekül ağırlığı (MW) 449.2, molar absorbansı (E) 26 900 olan siyanidin-3-glukozit üzerinden hesaplama yapılmıştır (Dranka ve Oroian 2016). Yapılan hesaplamalar mg/kg kuru ağırlık cinsinden verilmiştir.

$$Toplam\ Monomerik\ Antosiyanin\left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{(A)(MW)(DF)(V)}{(E)(m)} \quad (3.2)$$

3.2.3 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri

Mayalar patates dekstroz agar (PDA/Merck) yatık besiyerinde stok kültüre alınmış ve deneye kadar 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 100 mL çalışma hacminde 250 mL Erlenmeyerlerde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Başlangıç patlıcan kabuğu konsantrasyonunun belirlenmesi

Optimum başlangıç patlıcan kabuğu konsantrasyonunun belirlenmesi için dört farklı konsantrasyonda (%5, %10, %15, %20 (w/v)) patlıcan kabuğu, %1 H₂ SO₄ (v/v) varlığında hidroliz edilmiştir. Patlıcan kabukları sülfürik asit ile muamele edilmiş ardından otoklavda (ALP) 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Daha sonra hidrolizat süzülerek süzülen hidrolizatların sıvı kısımlarının pH değerleri sodyum hidroksit (NaOH/Merck) ile 5'e ayarlanmış ve sterilizasyon için tekrar otoklavlanarak fermentasyona hazırlanmıştır.

3.2.5 Patlıcan kabuklarının enzimatik hidrolizi ve farklı patlıcan kabuğu hidrolizatlarının hazırlanması

Belirlenen optimum patlıcan kabuğu konsantrasyonunda (%15), en yüksek şeker içeriğini belirlemek için 15 FPU/g substrat enzim kullanılmıştır. Bu sebeple, ön-işlem sonrası 50mM sitrat tamponu ile besiyerinin pH'ı 4.8'e ayarlanmıştır. Enzimatik hidroliz deneyi 72 saat süresince 50°C'de çalkalamalı inkübatörde (Gerhardt/Thermoshaker) gerçekleştirilmiştir (Chen vd. 2012). Patlıcan kabuklarının enzimatik hidrolizinde CellicCTec2 (Novozymes/Danimarka) selüloz enzimi kullanılmıştır. 72 saat sonunda enzimatik aktiviteyi durdurmak için besiyerleri 95°C'de 10 dakika su banyosunda (Memmert) bekletilmiştir. Hazırlanan besiyeri 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlanarak fermentasyon deneylerinde kullanılmıştır (Chen vd. 2012).

3.2.6 Fermentasyon deneyleri

Fermentasyon deneyleri 100 mL Erlenmeyerlerde 50 mL çalışma hacminde çalkalamalı inkübatörde 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon deneylerinde tüm besiyerlerinin pH değeri 4.8'e ayarlanmıştır. GPY besiyerinde 24 saat ön-kültüre alınan mayalar fermentasyon besiyerlerine %5 (v/v) hacminde inoküle edildikten sonra fermentasyon ortamlarından belirli saat aralıklarında (12, 24, 36, 48, 72) etanol, indirgen şeker ve mikrobiyal büyüme miktarlarının ölçümü için 3 mL örnek 15 mL hacmindeki Falcon tüplerine alınmış daha sonra bu örnekler

10000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Rotina 35 R) edilerek süpernatant kısımları şeker ve etanol ölçümlerinde kullanılmak üzere, pellet kısımları ise mikrobiyal gelişme ölçümlerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Fermentasyon deneylerinde organik azot ve mineral tuzları patlıcan kabuğu besiyerine eklenmiştir. Organik azot kaynağı olarak; pepton (5 g/L) ve maya özütü (3 g/L) eklenmiştir. Mineral tuzları için ise; $MgSO_4$, H_2O (0.5 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $CaCl_2$ (0.1 g/L) ve $ZnSO_4$ (0.05 g/L) eklenerek pH 4.8'de fermentasyon deneyleri için hazırlanmıştır.

3.3 Analitik Yöntemler

3.3.1 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi

Biyoetanol miktarlarının belirlenmesinden önce besiyerlerinden farklı zaman aralıklarında (12, 24, 36, 48, 72 saat) alınan 3 mL örnekler 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerdeki etanol konsantrasyonu Gaz Kromatografisi (GC-2010/Shimadzu) cihazı kullanılarak saptanmıştır. 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 μ L örnek 140°C sıcaklıktaki enjeksiyon portuna verilmiştir. 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).

3.3.2 Patlıcan kabuğundaki indirgen şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi

Toplam indirgen şeker içeriği dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi (Miller vd. 1959) ile spektrofotometrede (Shimadzu) 540 nm dalga boyunda saptanmıştır.

3.3.3 Fermentasyon sonucu ortama salınan inhibitör maddelerin belirlenmesi

Şeker tayininden önce besiyerlerinden alınan 3 mL örnekler 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Patlıcan kabuğunda bulunan şekerlerin analizinde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC/Shimadzu) cihazı kullanılmıştır. Şeker analizi öncesi örnekler seyreltilmiş ve HPLC viallerine 0.45 µm por çapındaki membran filtrelerden süzölmüştür. 5 mM H₂ SO₄ yürütücü faz olarak kullanılmıştır. Örneklerin okunması için Refractive Index Dedector (RID) ve Aminex HPX-87-P 35 kolondan faydalanılmıştır. Toplam akış hızı 0.6 mL/dakika ve sıcaklık 70 °C olarak ayarlanmış ve kullanılan yürütücü faz vakum pompasından geçirilerek steril hale getirilmiştir.

3.4 Kinetik parametrelerde kullanılan denklemler

Etanol üretkenliği (Q_p) Roca ve Olsson (2013)’e göre aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Etanol Üretkenliği (Qp)} = \frac{\text{Maksimum Etanol(g/L)}}{t}$$

Verilen denklemde —Maksimum Etanol (g/L) ifadesi belirli bir zamanda elde edilen maksimum etanol miktarını, —t ise zamanı ifade etmektedir.

Etanol verimi (Y_{p/s}) ise aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir (Wang vd. 2004).

$$\text{Etanol Verimi (Y}_{p/s}\text{)g/g} = \frac{\text{Maksimum Etanol(g/L)}}{\text{Kullanılan İndirgen Şeker (g/L)}}$$

Kinetik parametrelerde kullanılan denklemler Maksimum teorik etanol verimi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Kim ve Lee 2007).

$$\text{Maksimum Teorik Etanol Verimi} = \frac{\text{Etanol (g/L)}}{\text{Başlangıç Şekeri (g/L)} \times 0.511} \times 100$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Çözücü Tipinin Antosiyanin ve İndirgen Şeker Konsantrasyonuna Etkisi

Antosiyanin ekstraksiyonunda kullanılan çözücü ekstraksiyon veriminde önemli bir rol oynar. Bu nedenle tez çalışmasının başlangıcında en iyi çözücünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda %20 PK konsantrasyonu ve 4 farklı çözücü içinde (%100 Etanol, %100 Metanol , %50 Etanol-Su, %50 Metanol-Su) patlıcan kabuklarından antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca patlıcan kabuklarının indirgen şeker miktarları da belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı çözücü oranlarının PK’dan elde edilen antosiyanin ve şeker miktarlarına etkisi

Biyokütle miktarı (%,w/v kuru biyokütle)	Çözücü	Antosiyanin (mg/kg kuru madde)	İndirgen şeker (g/L)	
			Ön-işlem öncesi (Antosiyanin Fazındaki Şeker)	Ön-işlem sonrası
20	Etanol (100%)	2002.1 ±0.6	3.22 ±0.3	28.09 ±2.1
	Metanol (100%)	1598.2 ±1.2	4.88 ±0.1	32.54 ±2.4
	Etanol-Su (50%)	2306.1 ±3.5	5.81 ±0.1	29.1 ±2.9
	Metanol-Su (50%)	2103.8 ±0.7	4.21 ±0.1	29.08 ±2.2

(Ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C’de 15 dk otolavlama, ekstraksiyon: 60 dakika ultrasonikasyon , Biyokütle: %20).

Tüm çözücüler içinde en yüksek antosiyanin konsantrasyonu %50 Etanol-Su çözücüsünde 2306.1 mg/kg kuru madde olarak belirlenmiştir. En düşük antosiyanin miktarı ise 1598.2 mg/kg olarak %100 Metanol çözücüsünde bulunmuştur. Saf çözücülerdeki (%100 Etanol ve %100 Metanol) antosiyanin miktarlarının %50 Etanol –

Su ve %50 Metanol-Su çözücülerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. En yüksek antosiyanin miktarı %50 Etanol-Su çözücüsünde bulunduğu için ilerleyen deneyler bu çözücüde gerçekleştirilmiştir.

Deneylerin bu aşamasında antosiyanin ekstraksiyonu için kullanılan ultrasonikasyon yöntemi hammaddenin hücre duvar yapısına etki ederek bir miktar indirgen şekerin de salınımına sebep olmuştur (Suresh vd. 2020).

Antosiyanin fazına geçen indirgen şeker miktarı en yüksek 5.81 g/L olarak %50 Etanol çözücüsünde gözlemlenmiştir. En düşük şeker ise 3.22 g/L olarak %100 Etanol çözücüsünde bulunmuştur.

Tez çalışmasında lignoselülozik hammadde ligninin parçalanarak indirgen şekerlerin açığa çıkarılması için ön-işleme tabi tutulmuştur. Kullanılan ön-işlem koşulları %1 H₂SO₄ ile 121 °C’de 15 dakika otoklavlama olarak belirlenmiştir. Ön-işlem sonucunda %20 PK konsantrasyonunda bulunan indirgen şeker miktarlarının arttığı saptanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1. ‘de gösterilmiştir.

4.2 Başlangıç Patlıcan Kabuğu Konsantrasyonunun ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi

Tez çalışmasının bu kısmında başlangıç hammadde konsantrasyonunun biyoetanol ve antosiyanin üretimine etkisi incelenmiştir. Patlıcan kabuklarının indirgen şeker ihtiva ettiğinin belirlenmesi üzerine optimum başlangıç PK konsantrasyonunun bulunması amaçlanmıştır.

Başlangıç hammadde konsantrasyonu olarak belirlenen 4 farklı patlıcan kabuğu (%5, %10, %15, %20, w/v kuru madde) %1 H₂SO₄ (v/v) ile 121 °C sıcaklıkta , 15 dakika otoklavlama ön-işlemine tabi tutulmuştur. Patlıcan kabuğunun ön işleme sonucunda %5 biyokütle konsantrasyonunda 9.22 g/L, %10 patlıcan kabuğu konsantrasyonunda 18.31 g/L, %15 biyokütle konsantrasyonunda 24.17 g/L, %20 patlıcan kabuğu

konsantrasyonunda ise 29.1 g/L indirgen şeker miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.2).

Patlıcan kabuklarının içeriğindeki indirgen şeker miktarlarının artırılması adına hammaddeler enzimatik hidrolize tabi tutulmuştur. 15 FPU CellicCTec2 (Novozymes/Danimarka) kullanılmıştır. Enzimatik hidroliz sonrası dört farklı patlıcan kabuğu konsantrasyonundan ortama salınan indirgen şeker miktarları Çizelge 4.2 'de gösterilmiştir.

Enzimatik hidroliz sonrasında ortama salınan indirgen şeker miktarının arttığı belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz öncesi %20 biyokütle konsantrasyonunda bulunan indirgen şeker miktarı 29.1 g/L iken enzimatik hidroliz sonrası bu değer 65.48 g/L 'ye yükselmiştir. Yapılan bu deneyde patlıcan kabuğu konsantrasyonu arttıkça ortama salınan şeker miktarının da arttığı saptanmıştır. En yüksek şeker miktarı %20 PK konsantrasyonunda bulunmuştur. En düşük indirgen şeker miktarı ise %5 PK konsantrasyonunda 13.30 g/L bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Farklı biyokütle miktarlarının antosiyanin, indirgen şeker ve etanol miktarlarına etkisi

Biyokütle Konsantrasyonu (%, w/v kuru biyokütle)	Antosiyanin (mg/kg)	İndirgen şeker (g/L)			Etanol (g/L) (Enzim +)	
		Ön-işlem öncesi (Antosiyanin Fazındaki Şeker)	Ön-işlem sonrası			
		Enzim -	Enzim -	Enzim +	S. <i>cerevisiae</i>	K. <i>marxianus</i>
5	697.9 ±1.1	1.81 ±0.1	9.22 ±0.6	13.30 ±0.8	5.1 ±0.5	5.67 ±1.1
10	1107.5 ±4.2	3.17 ±0.2	18.31 ±2.9	52.62 ±2.9	14.72 ±1.3	13.1 ±1.7
15	1835.8 ±1.4	4.89 ±0.3	24.17 ±0.3	60.04 ±4.2	22.75 ±1.4	22.13 ±2.1
20	2306.1 ±3.5	5.81 ±0.1	29.1 ±2.9	65.48 ±2.8	21.25 ±0.2	20.15 ±1.6

(Ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, ekstraksiyon: %50etanol/%50 su ile 60 dakika ultrasonikasyon, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle

Fermentasyon Zamanı : %5 (w/v) 24. saat, %10(w/v) 48. saat, %15(w/v) 48.saat, %20 (w/v) 48.saat)

Çizelge 4.2’ de artan biyokütle konsantrasyonlarında *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* üretilen etanol konsantrasyonları gösterilmiştir.

Bu deney sonucunda ayrıca, PK konsantrasyonu arttıkça antosiyanin miktarının da artış gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin miktarı %20 PK’ da 2306.1 mg/kg kuru madde olarak bulunmuştur. Buna karşılık en düşük antosiyanin %5 PK’ da 697.9 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Çalışmada en yüksek biyoetanol konsantrasyonu %15 PK varlığında elde edilmiştir.

4.3 Fermentasyon İnhibitörlerinin Belirlenmesi

Çalışmada %15 patlıcan kabuğu konsantrasyonunda belirlenen inhibitör konsantrasyonları Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

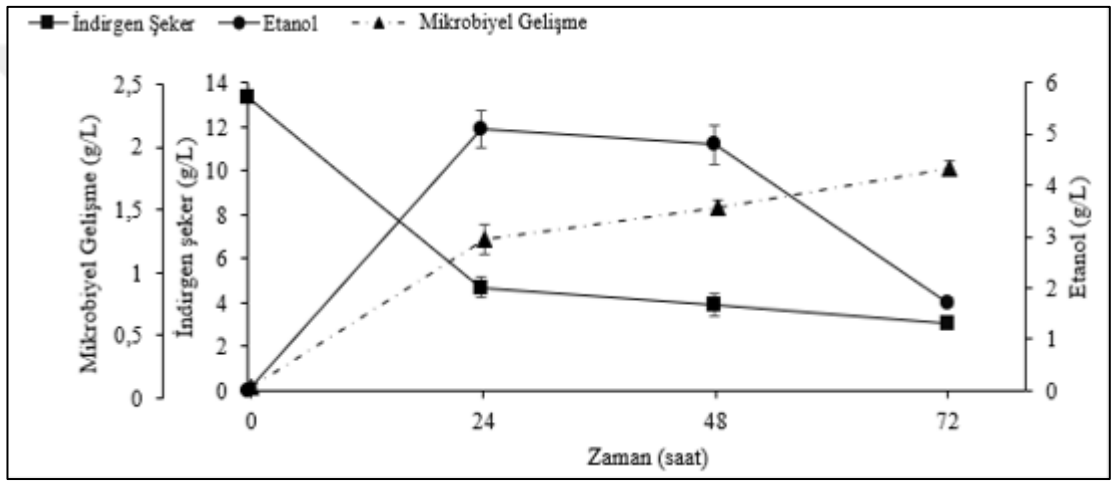
Çizelge 4.3 Antosiyaninleri ekstrakte edilmiş ve ön-işleme tabi tutulmuş PK biyokütlesinde bulunan inhibitör miktarları

İnhibitörler	(g/L)
Asetik asit	0.556 ±0.1
Formik asit	0.031 ±0.0
5-HMF(5- Hidroksimetil-Furfural)	0.177 ±0.0

Fermentasyon sonucu %15 PK konsantrasyonunda 0.556 g/L asetik asit bulunmuştur. Bunun yanı sıra 0.031 g/L formik asit ve 0.177 g/L, 5-HMF (5- hidroksimetil-furfural) belirlenen diğer inhibitör maddelerdir.

4.4 Fermentasyon Zamanının Etanol Üretimine ve Mikrobiyel Gelişmeye Etkisi

Fermentasyon zamanının etanol üretimine ve mikrobiyel gelişmeye etkisinin belirlenmesi için iki maya üç farklı PK'da (%5, %10, %15 (w/v kuru biyokütle)) 72 saat boyunca gözlemlenmiştir. Enzimatik hidrolize tabi tutulan %5 PK varlığında başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu , *S. cerevisiae* etanol üretimi ve mikrobiyel gelişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

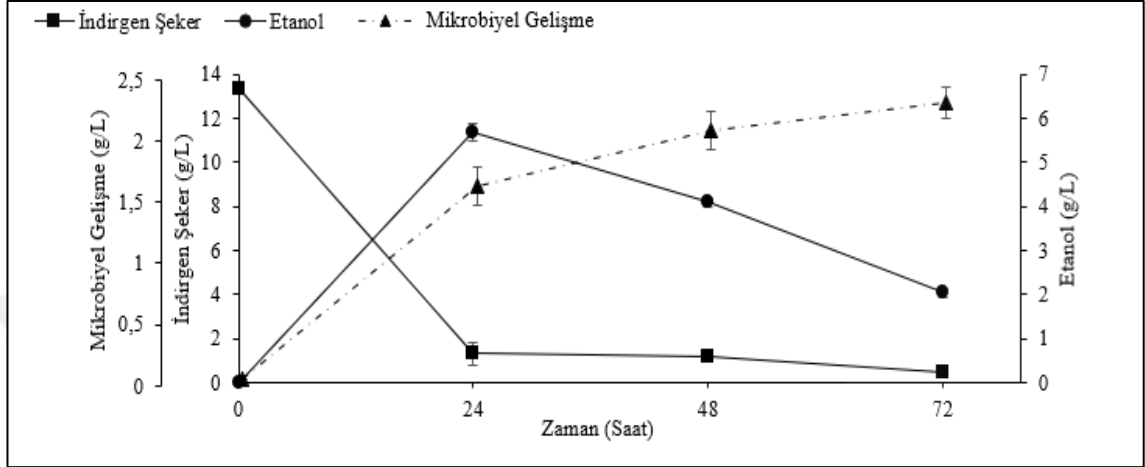


Şekil 4.1 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişme

(Başlangıç PK miktarı: %5, w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle).

Enzimatik hidrolize tabi tutulan %5 biyokütle konsantrasyonunda *S. cerevisiae* mayasında en yüksek etanol üretimi 24.saatte 5.1 g/L olarak gözlemlenmiştir. Bu maya için en düşük etanol üretimi ise 72.saatte 1.72 g/L olarak bulunmuştur. Başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu %5 PK' da 13.3 g/L olurken 72.saat sonunda bu değer 3.01 g/L olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* mayası için mikrobiyel gelişme en yüksek 72.saat sonunda 1.7 g/L olarak bulunmuştur.

Tez çalışmasında kullanılan bir diğer maya olan *K. marxianus*'un %5 patlıcan kabuğu konsantrasyonunda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu, etanol üretimleri ve mikrobiyel gelişmeleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *K. marxianus*'un etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri

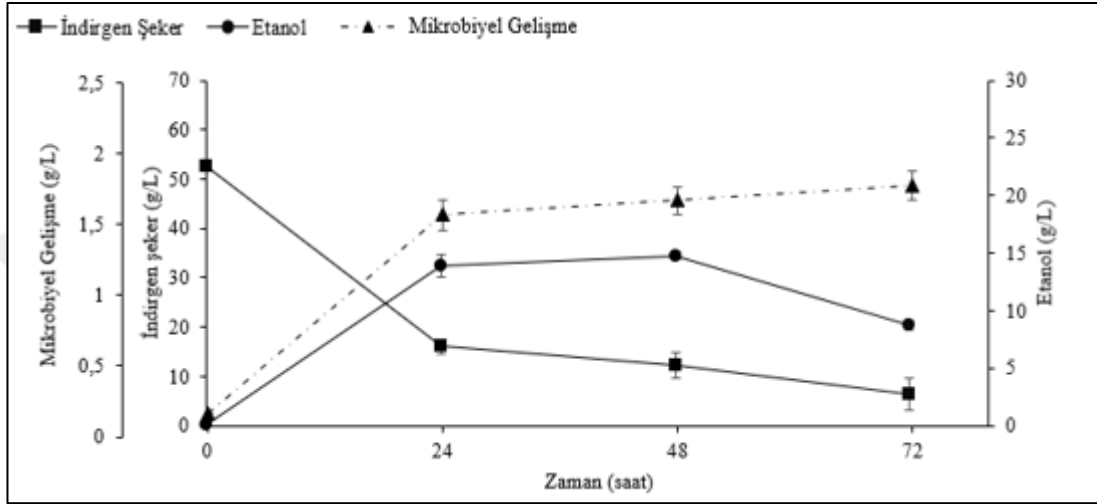
(Başlangıç PK miktarı: %5, w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-ışıllem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle)

Enzimatik hidrolize tabi tutulan %5 biyokütle konsantrasyonunda *K. marxianus*'un en yüksek etanol üretimi 24.saatte 5.67 g/L olarak bulunmuştur. Bu maya için en düşük etanol üretimi ise 72.saatte 2.04 g/L olarak belirlenmiştir. Başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu %5 PK' da 13.3 g/L olurken 72.saat sonunda bu değeri 0.5 g/L olarak hesaplanmıştır. Her iki maya için de etanol üretimi arttıkça indirgen şeker miktarının azaldığı gözlemlenmiştir.

K. marxianus için mikrobiyel gelişme en yüksek 72.saat sonunda 2.2 g/L olarak bulunmuştur. Bu bağlamda her iki maya için fermentasyon süresi uzadıkça mikrobiyel gelişmenin arttığı belirlenmiştir. Her iki maya için de %5 PK konsantrasyonunda en yüksek etanol üretim miktarı 24.saat sonunda belirlenmiştir.

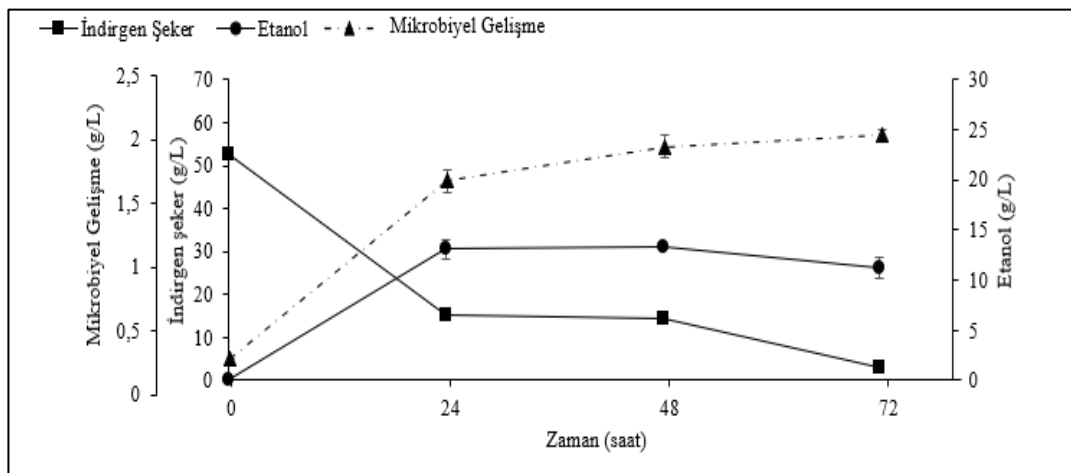
Yapılan deneylerde kullanılan bir diğer konsantrasyon olan %10 patlıcan kabuğundaki şeker, etanol , mikrobiyal büyüme verileri sırasıyla *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* için

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. %10 PK konsantrasyonunda ön-işlem ve enzimatik hidroliz sonrası en yüksek indirgen şeker miktarı 52.62 g/L olarak bulunmuştur. *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* için etanol üretimleri sırasıyla 14.72 g/L ve 13.1 g/L olarak belirlenmiştir. Her iki maya için de en yüksek etanol üretimi 48. saatin sonunda saptanmıştır.



Şekil 4.3 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi , ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri

(Başlangıç PK miktarı: %10 , w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle).

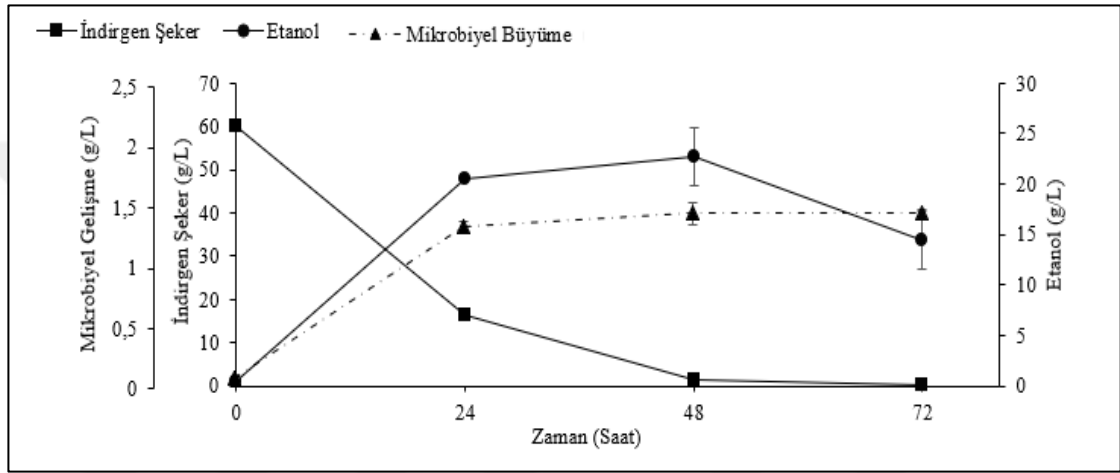


Şekil 4.4 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *K. marxianus*'un etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeler

(Başlangıç PK miktarı: %10, w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle)

Kullanılan her iki mayanın da ortamda bulunan indirgen şekerleri tükettiği gözlemlenmiştir. En düşük indirgen şeker miktarı *S. cerevisiae* için 6.3 g/L, *K. marxianus* için ise 3.06 g/L olarak 72. saat sonunda belirlenmiştir.

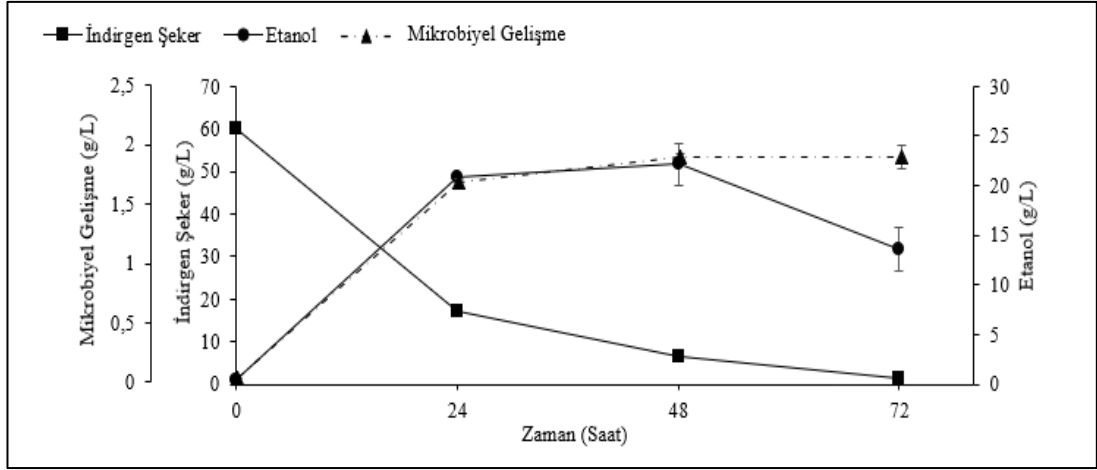
En yüksek mikrobiyal gelişme *K. marxianus* mayasında 2.01 g/L olarak bulunurken *S. cerevisiae* için bu değer 1.6 g/L olarak belirlenmiştir. Kullanılan her iki maya için de en yüksek mikrobiyal gelişme 72. saat sonunda gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyal gelişmeleri

(Başlangıç PK miktarı: 15%, w/v, , ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle)

%15 PK konsantrasyonunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. %15 biyokütlerde başlangıç indirgen şeker miktarı 60.04 g/L olarak belirlenmiştir. Bu indirgen şeker miktarının 72. saat sonunda 0.23 g/L ' ye kadar düştüğü saptanmıştır. Bu mayada en yüksek etanol miktarı 48.saat sonunda 22.75 g/L olarak hesaplanmıştır. *S. cerevisiae* mayasında mikrobiyal gelişme en yüksek 72.saatte 1.3 g/L olarak saptanmıştır.

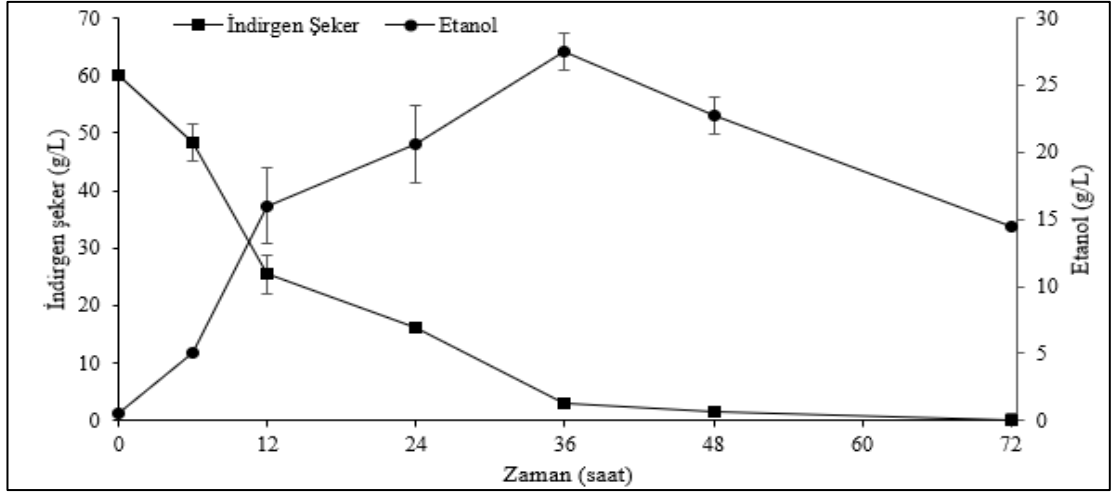


Şekil 4.6 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *K. marxianus*'un etanol üretimi, ortamda bulunan indirgen şeker miktarları ve mikrobiyel gelişmeleri

(Başlangıç PK miktarı: 15%, w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-işlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle)

Deneyde kullanılan bir diğer maya olan *K. marxianus* için en yüksek etanol üretimi 48.saat sonunda 22.13 g/L olarak bulunmuştur. En düşük etanol üretimi ise 72.saat sonunda 13.56 olarak bulunmuştur. Bu maya için mikrobiyel gelişim en yüksek 72.saat sonunda 1.8 g/L olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.6.'da verilmiştir.

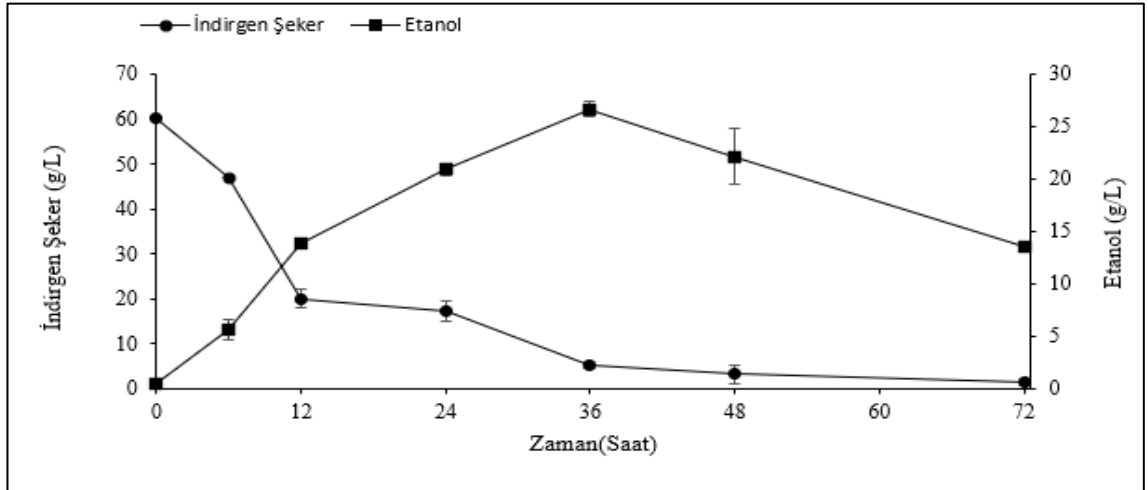
Biyoetanol üretiminde optimum fermentasyon zamanının belirlenmesi için gerçekleştirilen deneyde en yüksek biyoetanol konsantrasyonunun elde edildiği, başlangıç hammadde konsantrasyonu olarak seçilen %15 PK' da her iki mayanın fermentasyonu 6 saat aralıklarla 72 saat boyunca takip edilmiştir. Bu deneylere ait sonuçlar Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi ve ortamda bulunan indirgen şeker miktarları

(Başlangıç PK miktarı: 15%, w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-ışlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama), enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle

Deneyin bu aşamasında *S. cerevisiae* mayasında %15 biyokütle konsantrasyonunda 60.04 g/L indirgen şeker varlığında en yüksek etanol miktarı 36.saat sonunda 27.5 g/L olarak belirlenmiştir. Bu maya için en düşük etanol üretimi ise 6.saat sonunda 5.04 g/L bulunmuştur. Fermentasyon zamanına bağlı olarak ortamdaki indirgen şeker miktarının azaldığı saptanmıştır. Üretilen etanol miktarı ise buna bağlı olarak önce artmış daha sonra azalmıştır.



Şekil 4.8 Enzimatik hidrolize tabi tutulan PK biyokütlesinde *K. marxianus*'un etanol üretimi ve ortamda bulunan indirgen şeker miktarları

(Başlangıç PK miktarı: 15%, w/v, ekstraksiyon: %50 su/%50 etanol ile 60 dakika ultrasonikasyon, ön-ışlem: %1 H₂SO₄ ile 121 °C'de 15 dk otolavlama, enzim miktarı: 15 FPU/g kuru biyokütle)

Deneyde kullanılan bir diğer maya olan *K. marxianus* için ise en yüksek etanol üretimi 36. saat sonunda 26.65 g/L olarak belirlenmiştir. En düşük etanol üretimi 6. saat sonunda bulunmuş olup 5.6 g/L 'dir.

Kullanılan her iki maya için de % 15 PK varlığında en yüksek etanol üretimi 36.saatte gerçekleştirilmiştir.

4.5 Kinetik Parametreler

Çizelge 4.4 Biyoetanol üretiminde *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayalarına ait kinetik parametre verileri

Kinetik Parametreler		(g/L)
$Y_{P/S}$ (g/g)	<i>S. cerevisiae</i>	0.48
	<i>K. marxianus</i>	0.48
Q_p (g/L.h)	<i>S. cerevisiae</i>	0.76
	<i>K. marxianus</i>	0.74
Teorik Etanol Verimi (%)	<i>S. cerevisiae</i>	89.6
	<i>K. marxianus</i>	86.8

Yapılan tez çalışmasında *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayaları için kinetik parametreler ayrıca hesaplanmıştır. Hesaplamalar %15 PK konsantrasyonunda 36.saat etanol verileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Q_p (Etanol Üretkenliği) değeri *S. cerevisiae* için 0.76 g/L.h, *K. marxianus* için 0.74 g/L.h olarak hesaplanırken, $Y_{P/S}$ (Etanol Verimi) değerleri ise sırasıyla aynı mayalar için 0.48 g/g, 0.48 g/g olarak gözlenmiştir. Teorik etanol verimini *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* mayaları için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu değerler sırasıyla 89.6 ve 86.8 olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, enerjinin büyük bir bölümü petrol, kömür ve doğal gaz gibi fosil yakıtlardan elde edilmektedir. Fakat dünya nüfusu ve ihtiyaçlarına paralel olarak artan enerji tüketiminden dolayı fosil yakıt miktarı giderek azalmaktadır. Bütün bu durumlardan ötürü alternatif yenilenebilir enerji kaynaklarının araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Yapılan tez çalışmasında patlıcan kabuklarının etanol üretimi kapasitesi ve antosiyanin eldesinde kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

Biyoetanol yenilenebilir ve çevreci bir biyoyakıttır. Bunun yanı sıra koronavirüs pandemisi sonrası dezenfektanlara olan aşırı talep dezenfektanların hammaddesi olan etanole olan talebi paralel şekilde arttırmıştır.

Antosiyanin gıda boyası, ilaç vb. farklı sanayilerde kullanılan önemli bir biyoteknolojik üründür. Nutrasötik, farmasötik ve kozmetik gibi endüstriler, antosiyaninleri doğal renklendiriciler olarak ve/veya biyolojik işlevleri için kullanmaktadır. Doğal renklendiriciler olarak antosiyaninlere olan talep, pazar gereksinimlerini büyük ölçüde artırmıştır.

Biyorafineri teknolojisi, biyokütleyi katma değerli ürünlere dönüştürmenin yöntemlerini araştıran bir süreçtir (Cherubini 2010). Bu süreç sonunda üretilen biyoteknolojik ürünler, birçok alanda kullanılabilir ve çevre korunmasına katkı sağlar (Fiorentino vd. 2017). Biyorafineri konseptiyle hem maliyet düşürülecek hem de zamandan tasarruf edilerek önemli biyoteknolojik ürünler eş zamanlı elde edilmiştir.

5.1 Çözücü Tipinin Antosiyanin Ekstraksiyonuna Etkisi

Doğru çözücü seçimi, hedef bileşiğin ayrışmasını etkileyen en önemli faktördür. Çünkü hedef bileşiğin çözünürlüğü, çözücü türüne bağlıdır (Yeşilören Akal, 2019). Bu nedenle antosiyanin ekstraksiyonunda çözücü seçimi önemli bir parametredir. Yapılan tez çalışmasının hedeflerinden biri patlıcan kabuklarından antosiyanin ekstraksiyonu için

uygun çözücünün seçilmesidir. Literatürde etanol, metanol ve aseton gibi polar karakterli çözücülerin antosiyanin ekstraksiyonunda en iyi çözücüler oldukları saptanmıştır (Kähkönen vd. 2001).

Literatürde patlıcanda bulunan fenolik bileşiklerin ve antosiyaninlerin ekstraksiyonu için ultrasonikasyon kullanımına odaklanan bazı yayınlar bulunmaktadır .

Philippi ve arkadaşlarının 2018’de yaptığı çalışmada patlıcan kabuklarından antosiyanin ve diğer fenolik bileşiklerin geri kazanımında en verimli yöntemin ultrasonikasyon olduğu gösterilmiştir .

Ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonun, işlem süresini azaltabileceği ve fenoliklerin, antioksidanların ve antosiyaninlerin ekstraksiyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (Chen vd. 2015).

Bu nedenlerden ötürü yapılan tez çalışmasında ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak patlıcan kabuğundaki antosiyaninlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Çözücü seçimi için yapılan deneyde 4 farklı çözücüde (%100 Etanol, %100 Metanol, %50 Etanol ve %50 Metanol) antosiyanin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Saf çözücülerdeki (%100 Etanol ve %100 Metanol) antosiyanin miktarlarının %50 Etanol– Su ve %50 Metanol-Su çözücülerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Patlıcan kabuklarında en yüksek antosiyanin %50 Etanol-Su çözücüsünde 2306.1 mg/kg olarak bulunmuştur. Bu bulgular literatürdeki çalışmaları destekler niteliktedir.

Ferarsa ve arkadaşlarının 2018’de yaptığı çalışmada antosiyaninler ve diğer fenolik bileşikler , taze mor patlıcandan ekstrakte edilmiştir. Bu çalışmada ekstraksiyon verimi, etanol içindeki su içeriği %50'ye kadar arttıkça artmıştır. Ayrıca sulu etanol

ekstraktlarının verimlerinin saf etanol (%100) ve saf sudan daha yüksek olduğu göstermişlerdir.

Çözücü olarak saf su veya saf etanol kullanılması, patlıcan kabuklarından antosiyanin eldesinin veriminde bir artış göstermemiştir. Bu durum, organik çözücüye su eklenmesinin ekstraksiyon verimini arttırdığını göstermiştir. Etanol-su çözücüsünün polaritesi tek çözücü sistemlerinden daha yüksek olduğu için ekstraksiyon verimini arttırmıştır (Ferarsa vd. 2018).

Dranka ve Oroian 2016'da yaptıkları çalışmada %10 biyokütle konsantrasyonunda patlıcan kabuklarından antosiyanin eldesinde %54,4 Metanol-Su çözücüsünde, 55.1 °C ve 44.8 dk ekstraksiyon süresi uygulayarak ultrasonikasyon yöntemini kullanmış ve en yüksek antosiyanin içeriğini 1190.4 mg/kg olarak bulmuştur.

Literatürde yapılan bir diğer çalışmada siyah havuç posasından ultrases destekli antosiyanin ekstraksiyonunda en yüksek antosiyanin miktarı çözücü olarak etanollü su kullanımında tespit edilmiştir. %50 Etanol-Su çözücüsünde ekstraksiyon verimi % 78 oranında artmıştır (Yeşilören Akal , 2019).

Kurambhatti vd. (2021) mor mısır koçanı kullanılarak etanol ve antosiyaninin eş zamanlı üretim sürecinin teknik ve ekonomik fizibilitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. SuperPro tasarımcısında (Intelligen, Inc. Scotch Plains, NJ, ABD) süreç modelleri geliştirilerek selülozik etanol üretimi ve antosiyanin ve etanol ortak üretimi için modifiye edilen süreçlerin tekno-ekonomik analizleri yapılmıştır. İşleme kapasitesi ve tesis işletme süresi sırasıyla 2000 kuru MT hammadde/gün ve 350 gün/yıl olarak kabul edilmiştir. Antosiyanin yüksek piyasa değeri (72\$/kg antosiyanin) nedeniyle, entegre proseslerde yan ürün oluşumunun %90'ından fazlasına katkıda bulunmuştur.

Antosiyanin ekstraktından elde edilen yüksek gelir nedeniyle, asit bazlı antosiyanin ekstraksiyonu kullanan entegre proses için etanol üretim maliyetinin (0,36\$/L), geleneksel etanol üretiminden (0,55\$/L) %34.5 daha düşük olduğu saptanmıştır.

Genel olarak, tekno-ekonomik analiz, mor mısır koçanı kullanılarak etanol ve antosiyanin ortak üretiminin selülozik etanol üretiminin süreç ekonomisini iyileştirebileceğini ve gıda endüstrisine antosiyanin kazandırabileceğini göstermektedir.

5.2 Ön-İşlemin Etanol Üretimine Etkisi

Ön-işlem temel olarak lignoselülozun işlenebilirliğini artırır ve etanol üretimini geliştirmek için kullanılır (Taymaz ve Uslu 2019). Bu bağlamda tez çalışmasının bu kısmında patlıcan kabukları indirgen şekerlerin elde edilmesini sağladığı için ön-işleme tabi tutulmuştur.

Lignoselülozik biyokütlenin ön işlem en yaygın olarak kullanılan endüstriyel yöntemlerden biri, yüksek sıcaklık koşulları altında seyreltik asitlerin kullanılmasıdır. Bu yöntem nispeten ucuzdur ve çeşitli inorganik asitler (sülfürik, hidroklorik, nitrik) kullanılmasına imkân sağlar (Kapoor vd. 2017).

Etanol üretiminde, seyreltik asit ön işlemi en umut verici yöntem olarak kabul edilir ve sülfürik asit , kolay bulunabilirliği ve ucuzluğu nedeniyle ön işleminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Qi vd. 2019).

Yapılan tez çalışmasında da sülfürik asit ön işleminin şekerleri etkili bir şekilde ortaya çıkardığı saptanmıştır. Ön- işlem yöntemi olarak %1 H₂SO₄ (Sülfürik asit) ön işlemi kullanılmıştır.

Chamorro vd. 2020’de yaptığı çalışmada malt atıklarının biyoetanol üretiminde kullanımında H₂SO₄ (sülfürik asit) ön işleminin optimizasyonu amaçlamışlardır. Optimize edilmiş koşullar 130 °C, %1 sülfürik asit, 25 dakika olarak belirlenmiştir.Ön işlem sonrası toplam nişasta ve hemiselülozik şekerlerin %94’ü ve ön işleme tabi tutulmuş biyokütlerde %90 selüloz geri kazanımı sağlanmıştır .

Zhu vd. 2015' te yaptığı çalışmada pirinç samanından etanol üretiminin maliyetinin azaltılması için ön işlem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Üç farklı asit konsantrasyonunda (% 0.5 , %1 , %1,5 (%w/v)) H₂SO₄ ön işlemi gerçekleştirilmiştir. Ön-işlem için optimal koşullar, 100°C , %1.0 (%wt) sülfürik asit, %10 (a/h) biyokütle konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Pirinç samanının (100 g/L) 72 saat boyunca eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyonu sonucunda 40.6 g/L etanol üretilmiştir.

5.3 Başlangıç Patlıcan Kabuğu Konsantrasyonunun ve Enzimatik Hidrolizin Etanol Üretimine Etkisi

Başlangıç biyokütle konsantrasyonu etanol üretiminde büyük önem arz etmektedir. Biyokütle konsantrasyonunun en uygun miktardan az olması fermentasyon ortamına salınan indirgen şeker miktarlarının azalmasına yol açabileceği gibi, başlangıç biyokütlenin en uygun miktardan fazla olması da ortama salınan inhibitör madde miktarının artışına sebep olabilir (Han vd. 2011).

Bu amaçla tez çalışmasında başlangıç için optimal biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. %15 patlıcan kabuğu içeren besiyeri ortamında bulunan her iki mayanın da ortamda serbest halde bulunan indirgen şekerleri tükettikleri görülmüştür.

Bu bağlamda 4 farklı konsantrasyonda (%5, %10, %15 , %20) patlıcan kabuğu bulunan besiyeri hazırlanmıştır. Her iki maya (*S. cerevisiae* ve *K. marxianus*) için de %15 patlıcan kabuğu konsantrasyonunun %5, %10 ve %20 biyokütle konsantrasyonuna göre etanol üretimini arttırdığı belirlenmiştir.

Bu deney sonucunda en yüksek etanol üretimi %15 patlıcan kabuğu konsantrasyonunda 27.5 g/L olarak bulunmuştur. Hammadde miktarı arttıkça karıştırma zorlukları ve kütle transfer limitasyonları gözlenmiştir. Bu sebeple %20 PK konsantrasyonunda daha yüksek şeker bulunmasına karşın %15 PK kullanımına kıyasla daha düşük etanol miktarlarının saptanması şaşırtıcı değildir.

Literatürde tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla benzerlik gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.

Jin ve arkadaşlarının 2021’de yaptığı çalışmada %10 ile %30 arasındaki biyokütle konsantrasyonunda enzimatik hidrolize tabi tutulan pirinç samanından elde edilen etanol miktarları belirlenmiştir. Biyokütle miktarının artmasıyla etanol konsantrasyonu %25 pirinç samanı konsantrasyonuna kadar artış göstermiştir. En yüksek indirgen şeker miktarı %30 biyokütlede elde edilmiş olmasına rağmen, en yüksek etanol konsantrasyonu %25 konsantrasyonda elde edilmiştir. Bunun sebebi, %30 gibi çok yüksek bir biyokütle yükünün, enzimatik hidroliz ve fermentasyona elverişli olmayan kütle transfer direnci ve viskozitede bir artışa yol açtığı durumdur.

Narra ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada termotolerant yeni izole edilen *Kluyveromyces* sp. kullanılarak eş zamanlı sakarifikasyon ve fermentasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. % 5, %10, %15 (w/v) biyokütle konsantrasyonlarında etanol üretimi yapılmıştır. Bunun sonucunda en yüksek indirgen şeker miktarı %15 pirinç samanında bulunmasına rağmen en yüksek etanol miktarı etanol %10 biyokütle konsantrasyonunda saptanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında enzimatik hidrolizin etanol üretimine etkisi kullanılan bir diğer parametredir. Enzimatik hidroliz ile patlıcan kabuğunda bulunan fermente edilebilir şeker miktarının arttırılması hedeflenmiştir. Enzimatik hidroliz öncesi %20 biyokütlede bulunan indirgen şeker miktarı 29.1 g/L iken enzimatik hidroliz sonrası bu değer 65.48 g/L ‘ye yükselmiştir. Enzimatik hidroliz 15 FPU/g kuru biyokütle enzim kullanılarak 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen veriler enzimatik hidroliz sonucunda ortama salınan indirgen şeker miktarının arttığını göstermiştir. Literatür çalışmaları bu bulguları destekler niteliktedir.

Littlewood vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada lignoselülozik hammaddenin ticari ölçekte biyoyakıt üretimi için ekonomik olarak uygulanabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hammadde olarak bambu kullanılmıştır. Deneyler 5 farklı enzim miktarı seçilerek Cellic Ctec2 (Novozymes A/S) (10, 30, 60, 100 ve 140 FPU/g) modellenmiştir. En düşük enzim miktarı en az miktarda biyoetanol vermesine rağmen, tekno-ekonomik değerlendirme, litre başına 0.484 \$ üretim maliyetiyle ekonomik olarak en uygun senaryonun 10 ile 60 FPU arasında enzim kullanımı olduğunu göstermiştir.

Bu nedenle, bu koşullar arasında 60 FPU/g glukan enzim miktarı, biyoetanolün benzinle rekabet etmesi için eşik seviye kabul edilebilir.

Du ve arkadaşlarının 2020'de yaptığı çalışmada mısır koçanı posası kullanılarak 3 farklı enzim miktarında fermentasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde 20 FPU/g , 10 FPU/g ve 15 FPU/g kuru biyokütle miktarında enzimler kullanılmıştır. Üretilen etanol miktarları sırasıyla 13.47 g/L, 13.58 g/L ve 13.51 g/L ve etanol verimleri 0.41 g/g-0.42 g/g (glukozdan teorik etanol veriminin %82'si) olarak bulunmuştur. Bu deneyler sonucunda etanol üretimi 20 FPU/g selüloz altında 10 FPU/g ve 15 FPU/g'dan daha hızlı olmasına rağmen üretilen maksimum etanol konsantrasyonları birbirine çok yakın saptanmıştır. Bununla birlikte, daha yüksek selüloz miktarı, glukozun hidroliz hızını arttırmasına rağmen, üç enzim miktarında etanolün nihai konsantrasyonu çok yakın belirlenmiştir.

Tan ve arkadaşlarının 2013'te yaptığı çalışmada mısır atıkları kullanılarak biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada enzim miktarının etanol üretimine etkisi araştırılmış ve üç farklı dozda enzim (5 FPU, 10 FPU, 15 FPU) kullanılmıştır. %15 başlangıç biyokütle konsantrasyonunda gerçekleştirilen çalışmada en yüksek etanol verimi %88.2 olarak 15 FPU enzim dozunda bulunmuştur.

5.4 Fermentasyon Zamanının Etanol Üretimine ve Mikrobiyel Gelişmeye Etkisi

De Klark ve arkadaşlarının 2018’de yaptığı çalışmada *S. cerevisiae* mayasının inhibitör üretimine tepkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, mayalar biyoetanol üretimi sırasında gerçek fermentasyon ortamında hissettirmek için için farklı inhibitör kombinasyonları (asetik asit, formik asit ve vanilin) seçilmiştir. Deneyde 48 saat boyunca etanol verimi ve hücre canlılığına aynı anda bakılmıştır. Deney sonucunda kullanılan üç inhibitör için vanilin ve formik asit en güçlü inhibitör etkiyi gösterirken, asetik asit düşük konsantrasyonlarda hücre büyümesi için bir katalizör görevi görmüştür.

5.5 Sonuçlar

Yapılan tez çalışmasında patlıcan kabuklarından biyoetanol ve antosiyaninin eş zamanlı üretimi ve üretim sırasında belirli bazı adımların optimize edilmiştir. Çalışmada önce patlıcan kabuklarından antosiyaninlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada etanol ve metanol gibi farklı çözücüler içerisinde hammaddelerden antosiyaninler ekstrakte edilmiş, daha sonra ise patlıcan kabukları ön-işleme tabi tutularak fermente edilebilir şekerler açığa çıkartılarak, yerel izolat mayalar kullanılarak, yerli ve ucuz bir atıktan biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Patlıcan kabuklarından biyoetanol ve antosiyaninlerin eş-zamanlı üretimi ilk kez gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hem ülkemizde bol bulunan bir tarımsal atık biyoteknolojik açıdan değerlendirilmiş hem de biyoetanol ve antosiyanin gibi maddeler bol bulunan ucuz hammaddelerden biyorafineri yaklaşımıyla elde edilmiştir. Bu sebeple yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular literatüre katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abenavoli, L.M., Cuzzupoli, F., Chiaravalloti, V., Proto, A.R. 2016. Traceability system of olive oil: a case study based on the performance of a new software cloud. *Agronomy Research*, 14(4), 1247-1256.
- Adıgüzel, A.O. 2013. Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.
- 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.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Andersen, M., Kiel, P. 1999. Method for treating organic waste materials: Europe. WO 00/56912.
- Armylisas, A. N., Hazirah, M. S., Yeong, S. K., Hazimah, A. H. 2017. Modification of olefinic double bonds of unsaturated fatty acids and other vegetable oil derivatives via epoxidation: A review. *Grasas y Aceites*, 68(1), e174-e174.
- Assabjeu, A. C., Noubissié, E., Desobgo, S. C. Z., Ali, A. 2020. Optimization of the enzymatic hydrolysis of cellulose of triplochiton scleroxylon sawdust in view of the production of bioethanol. *Scientific African*, 8, 00438.
- Azhar, S., Jambo, S.A., Abdulla, R. H. M., Marbawi, H., Gansau, J.A., Ravindra, P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, 65, 756-769.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and biophysics reports*, 10, 52-61.
- Azuma K., Ohyama, A., Ippoushi K., Ichiyanagi T., Takeuchi A., Saito T. Fukuoka, H. 2008. 'Structures and antioxidant activities of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species', *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56 pp. 10154-10159
- Banat, I. M., Nigam, P., Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant fermentative yeast capable of growth at 52° C and ethanol production at 45° C and 50° C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 259-263.

- Batidzirai, B., Mignot, A. P. R., Schakel, W. B., Junginger, H. M., Faaij, A. P. C. 2013. Biomass torrefaction technology: Techno-economic status and future prospects. *Energy*, 62, 196-214.
- Biermann, U., Bornscheuer, U., Meier, M. A., Metzger, J. O., Schäfer, H. J. 2011. Oils and fats as renewable raw materials in chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(17), 3854-3871.
- Bilgin, S., Ertekin, C., Kürklü, A. 2012. Türkiye’deki sera bitkisel biyokütle atık miktarının belirlenmesi. 27. *Tarımsal Mekanizasyon Ulusal Kongresi, Bildiri Kitabı*, 5-7.
- Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., Pandey, A. 2011. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In *Biofuels* (pp. 229-250). Academic Press.
- Bonekamp, F. J., Oosterom, J. 1994. On the safety of *Kluyveromyces lactis*—a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 41(1), 1-3.
- Buldini, P. L., Ricci, L., Sharma, J. L. 2002. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 47-70.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.
- Celli, G. B., Brooks, M. S. L. 2017. Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins, A current review. *Food Research International*, 100, 501-509.
- Chambost, V., Eamer, B., Stuart, P. 2007. Forest biorefinery: Getting on with the Job. *Pulp and Paper Canada*, 108.
- Chen H. , Liu J. , Chang X. , Chen,D., Xue Y. , Liu P., Lin H. , Han S., 2017. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology* (160), 196-206.
- Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., Lü, X. 2021. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111370.
- Chen, Z. L., Wang, C., Ma, H., Ma, Y., Yan, J. K. 2021. Physicochemical and functional characteristics of polysaccharides from okra extracted by using ultrasound at different frequencies. *Food Chemistry*, 361, 130138.
- Cherubini, F. 2010. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy conversion and management*, 51(7), 1412-1421.
- Conde-Mejia, C., Jimenez-Gutierrez, A., El-Halwagi, M. 2012. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*, 90(3), 189-202.
- Damar, İ. 2010. Vişne suyunun antosiyanin profili ve antioksidan kapasitesi. Ankara Üniversitesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü Sayfa Sayısı*, 81.

- Davis, T. A., Volesky, B., Mucci, A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research*, 37(18), 4311-4330.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., Lundin, L. 2009. Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 388-395.
- Dayıoğlu M. A. 2013. Biyokütleden Sürdürülebilir Biyoyakıt Üretimi: Biyorafineri Yaklaşımı. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 9(4), 313-320.
- De Jong, E., Gosselink, R. J. 2014. Lignocellulose-based chemical products. In *Bioenergy research: advances and applications* (pp. 277-313). Elsevier.
- De Jong, E., Jungmeier, G. 2015. Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 3-33). Elsevier.
- De Jong, E., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M. 2012. Bio-based chemicals value added products from biorefineries. *IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery*, 34.
- De Klerk, C., Fosso-Kankeu, E., Du Plessis, L., Marx, S. 2018. Assessment of the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in response to synergetic inhibition during bioethanol production. *Current science*, 115(6), 1124-1132.
- Denholm, P. 2006. Improving the technical, environmental and social performance of wind energy systems using biomass-based energy storage. *Renewable Energy*, 31(9), 1355-1370.
- Diep, N. Q., Sakanishi, K., Nakagoshi, N., Fujimoto, S., Minowa, T., Tran, X. D. 2012. Biorefinery: concepts, current status, and development trends. *International Journal of Biomass and Renewables*, 1(2), 1-8.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. 2010. Third generation biofuels from microalgae.
- Dranca, F., Oroian, M. 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 637-646.
- Du, C., Li, Y., Zong, H., Yuan, T., Yuan, W., Jiang, Y. 2020. Production of bioethanol and xylitol from non-detoxified corn cob via a two-stage fermentation strategy. *Bioresource Technology*, 310, 123427.
- Ebringerová, A. 2005. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In *Macromolecular symposia* 232(1) , (1-12). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Eisberg N., 2006. Harvesting energy, *Chem. Ind.*, 172 , pp. 4-5
- El-Shamy, S., Farag, M. A. 2021. Novel trends in extraction and optimization methods of bioactives recovery from pomegranate fruit biowastes: Valorization purposes for industrial applications. *Food chemistry*, 365, 130465.

- Enhancing Climate Change Mitigation through Agriculture, OECD Publishing, Paris
- Farias, D., Maugeri Filho, F. 2019. Co-culture strategy for improved 2G bioethanol production using a mixture of sugarcane molasses and bagasse hydrolysate as substrate. *Biochemical engineering journal*, 147, 29-38.
- Farooq, S., Shah, M. A., Siddiqui, M. W., Dar, B. N., Mir, S. A., Ali, A. 2020. Recent trends in extraction techniques of anthocyanins from plant materials. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3508-3519.
- Farooq, S., Shah, M. A., Siddiqui, M. W., Dar, B. N., Mir, S. A., Ali, A. 2020. Recent trends in extraction techniques of anthocyanins from plant materials. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3508-3519.
- Ferarsa, S., Zhang, W., Moulai-Mostefa, N., Ding, L., Jaffrin, M. Y., Grimi, N. 2018. Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplant peels and pulps using ultrasonic-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 19-28.
- Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N. 2006. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energy & Fuels*, 20(4), 1727-1737.
- Fiorentino, G., Ripa, M., Ulgiati, S. 2017. Chemicals from biomass: technological versus environmental feasibility. A review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11(1), 195-214.
- Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G. S., Ninawe, A., Selvin, J. 2017. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, 205-214.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.
- González-García, S., Iribarren, D., Susmozas, A., Dufour, J., Murphy, R. J. 2012. Life cycle assessment of two alternative bioenergy systems involving *Salix* spp. biomass: Bioethanol production and power generation. *Applied Energy*, 95, 111-122.
- 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.
- Hashemi, S. S., Mirmohamadsadeghi, S., Karimi, K. 2020. Biorefinery development based on whole safflower plant. *Renewable Energy*, 152, 399-408.
- Hoang Nguyen Tran, P., Ko, J. K., Gong, G., Um, Y., Lee, S. M. 2020. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-14.

- Hu, W., Gong, H., Li, L., Chen, S., Ye, X. 2019. Ultrasound treatment on stability of total and individual anthocyanin extraction from blueberry pomace: optimization and comparison. *Molecules*, 24(14), 2621.
- Huet, G., Hadad, C., Husson, E., Laclef, S., Lambertyn, V., Farias, M. A., Van Nhien, A. N. 2020. Straightforward extraction and selective bioconversion of high purity chitin from *Bombyx eri* larva: Toward an integrated insect biorefinery. *Carbohydrate polymers*, 228, 115382.
- Hui, C., Bin, Y., Xiaoping, Y., Long, Y., Chunye, C., Mantian, M., Wenhua, L. 2010. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutrition and cancer*, 62(8), 1128-1136.
- IEA. 2019. Renewables 2019: Analysis and forecast to 2024.
- IEA. 2020. Renewable Energy Market Update: Outlook for 2020 and 2021. Son Erişim Tarihi : 11.04.2022 <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-products>
- Imura, M., Nitta, K., Iwakiri, R., Matsuda, F., Shimizu, H., Fukusaki, E. 2020. Comparison of metabolic profiles of yeasts based on the difference of the Crabtree positive and negative. *Journal of bioscience and bioengineering*, 129(1), 52-58.
- İlleez, B. 2020. Türkiye’de Biyokütle Enerjisi. *Türkiye’nin Enerji Görünümü*, 317-344.
- Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A. M., Grams, J. 2019. Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Second and third generation of feedstocks* (pp. 143-196). Elsevier.
- Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A. M., Grams, J. 2019. Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Second and third generation of feedstocks* (pp. 143-196). Elsevier.
- Jin, X., Ma, J., Song, J., Liu, G. Q. 2021. Promoted bioethanol production through fed-batch semisimultaneous saccharification and fermentation at a high biomass load of sodium carbonate-pretreated rice straw. *Energy*, 226, 120353.
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., González-Aguilar, G. A. 2013. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.
- Jomova, K., Valko, M. 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European journal of medicinal chemistry*, 70, 102-110.
- Jönsson, L. J., Martín, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103-112.

- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4076-4082.
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Pyriochou, V., Peristeraki, A., Karathanos, V. T. 2012. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 213-216.
- Kamm, B., & Kamm, M. J. A. M. 2004. Principles of biorefineries. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(2), 137-145.
- Kang, H. J., Ko, M. J., Chung, M. S. 2021. Anthocyanin structure and pH dependent extraction characteristics from blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in Subcritical Water State. *Foods*, 10(3), 527.
- Kapoor, M., Soam, S., Agrawal, R., Gupta, R. P., Tuli, D. K., 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., Aider, M. 2022. Bioconversion of electro-activated lactose, whey and whey permeate to produce single cell protein, ethanol, aroma volatiles, organic acids and fat by *Kluyveromyces marxianus*. *International Dairy Journal*, 129, 105334.
- Kassim, M. A., Meng, T. K., Serri, N. A., Yusoff, S. B., Shahrin, N. A. M., Seng, K. Y., Keong, L. C. 2020. Sustainable biorefinery concept for industrial bioprocessing. *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy*, 15-53.
- Kassim, M. A., Meng, T. K., Serri, N. A., Yusoff, S. B., Shahrin, N. A. M., Seng, K. Y., Keong, L. C. 2020. Sustainable biorefinery concept for industrial bioprocessing. *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy*, 15-53.
- Khan, M. F. S., Akbar, M., Xu, Z., Wang, H. 2021. A review on the role of pretreatment technologies in the hydrolysis of lignocellulosic biomass of corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 155, 106276.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., Lim, S. M. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61(1), 1361779.
- Kim, T. H., Lee, Y. Y. 2007. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (pp. 81-92). Humana Press.
- Ko, J. K., Lee, S. M. 2018. Advances in cellulosic conversion to fuels: engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. *Current opinion in biotechnology*, 50, 72-80.
- Komesu, A., Oliveira, J., Neto, J. M., Penteado, E. D., Diniz, A. A. R., da Silva Martins, L. H. 2020. Xylose fermentation to bioethanol production using genetic engineering microorganisms. In *Genetic and Metabolic Engineering for*

Improved Biofuel Production from Lignocellulosic Biomass (pp. 143-154). Elsevier.

- Koop, B. L., da Silva, M. N., da Silva, F. D., dos Santos Lima, K. T., Soares, L. S., de Andrade, C. J., Monteiro, A. R. 2022. Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. *Food Research International*, 110929.
- Koupaie, E. H., Dahadha, S., Lakeh, A. B., Azizi, A., Elbeshbishy, E. 2019. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production- A review. *Journal of environmental management*, 233, 774-784.
- Kuglarz, M., Alvarado-Morales, M., Karakashev, D., Angelidaki, I. 2016. Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from industrial hemp in a biorefinery concept. *Bioresource technology*, 200, 639-647.
- Kumar, A. K., Sharma, S. 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and bioprocessing*, 4(1), 1-19.
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., Adhikari, D. K. 2011. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels*, 2(1), 1-6.
- Kurambhatti, C., Kumar, D., Singh, V. 2021. Technical and economic feasibility of an integrated ethanol and anthocyanin coproduction process using purple corn stover. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(3), 719-735.
- Kyriakou, M., Patsalou, M., Xiaris, N., Tsevis, A., Koutsokeras, L., Constantinides, G., Koutinas, M. 2020. Enhancing bioproduction and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* via cell immobilization on biochar: Application in a citrus peel waste biorefinery. *Renewable Energy*, 155, 53-64.
- Laurens, L. M. 2017. State of technology review—algae bioenergy. *Golden: IEA Bioenergy*.
- Lee, J. H., Lee, H. U., Lee, J. H., Lee, S. K., Yoo, H. Y., Park, C., Kim, S. W. 2019. Continuous production of bioethanol using microalgal sugars extracted from *Nannochloropsis gaditana*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36(1), 71-76.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., Collaborators: Eisele T Giusti MM Hach J Hofsommer H Koswig S Krueger DA Kupina, S Martin SK, Martinsen BK Miller TC Paquette F Ryabkova A Skrede G Trenn U Wightman JD. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.
- Leonel, L. V., Arruda, P. V., Chandel, A. K., Felipe, M. G. A., Sene, L. 2021. *Kluyveromyces marxianus*: A potential biocatalyst of renewable chemicals

- and lignocellulosic ethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(8), 1131-1152.
- Li, Q., He, Y. C., Xian, M., Jun, G., Xu, X., Yang, J. M., Li, L. Z. 2009. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. *Bioresource technology*, 100(14), 3570-3575.
- Limayem, A., Ricke, S. C. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 449-467.
- Lin, C. S., Luque, R., Clark, J. H., Webb, C., Du, C. 2011. A seawater-based biorefining strategy for fermentative production and chemical transformations of succinic acid. *Energy & Environmental Science*, 4(4), 1471-1479.
- Lin, T. H., Guo, G. L., Hwang, W. S., Huang, S. L. 2016. The addition of hydrolyzed rice straw in xylose fermentation by *Pichia stipitis* to increase bioethanol production at the pilot-scale. *Biomass and bioenergy*, 91, 204-209.
- Liu, Y. Y., Sun, W. H., Li, B. Z., Shang, N., Wang, Y., Lv, W. Q., Wang, L. J. 2021. Value-added application of *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. roots (PGR) by ultrasound-assisted extraction (UAE) process to improve physicochemical quality, structural characteristics and functional properties. *Food Chemistry*, 363, 130354.
- Littlewood, J., Wang, L., Turnbull, C., Murphy, R. J. 2013. Techno-economic potential of bioethanol from bamboo in China. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-13.
- Mæhre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K. E., Elvevoll, E. O. 2014. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3281-3290.
- Majer, P., Neugart, S., Krumbein, A., Schreiner, M., Hideg, É. 2014. Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 1-9.
- Majid, H., Silva, F. V. 2021. Kanuka bush leaves for Alzheimer's disease: Improved inhibition of β -secretase enzyme, antioxidant capacity and yield of extracts by ultrasound assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 128, 109-120.
- Mandavgane, S. A., Kulkarni, B. D. 2020. Wheat Straw Valorization: Material Balance and Biorefinery Approach. *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy*, 369-382.
- Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., and Pronk, J.T. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(4); 391-418.
- Martel, C. M., Warrilow, A. G. S., Jackson, C. J., Mullins, J. G. L., Togawa, R. C., Parker, J. E., Kelly, S. L. 2010. Expression, purification and use of the

- soluble domain of *Lactobacillus paracasei* β -fructosidase to optimise production of bioethanol from grass fructans. *Bioresource technology*, 101(12), 4395-4402.
- Martínez, P. M., Bakker, R., Harmsen, P., Gruppen, H., Kabel, M. 2015. Importance of acid or alkali concentration on the removal of xylan and lignin for enzymatic cellulose hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 64, 88-96.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Matsuzoe, N., Yamaguchi, M., Kawanobu, S., Watanabe, Y., Higashi, H., Sakata, Y. 1999. Effect of dark treatment of the eggplant on fruit skin color and its anthocyanin component. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 68(1), 138-145.
- Mazza, G., Cacace, J. E., Kay, C. D. 2004. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC international*, 87(1), 129-145.
- Mercure, J. F., Pollitt, H., Viñuales, J. E., Edwards, N. R., Holden, P. B., Chewpreecha, U., Knobloch, F. 2018. Macroeconomic impact of stranded fossil fuel assets. *Nature Climate Change*, 8(7), 588-593.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Moncada, J., Aristizábal, V. 2016. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 122-134.
- Montenegro-Landívar, M. F., Tapia-Quirós, P., Vecino, X., Reig, M., Valderrama, C., Granados, M., Saurina, J. 2021. Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Science of the Total Environment*, 801, 149719.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreno, A. M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., García-Mina, J. M. 2010. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of plant physiology*, 167(8), 633-642.
- Morales, A., Gullon, B., Davila, I., Eibes, G., Labidi, J., Gullon, P. 2018. Optimization of alkaline pretreatment for the co-production of biopolymer lignin and bioethanol from chestnut shells following a biorefinery approach. *Industrial crops and products*, 124, 582-592.
- Morales, M., Arvesen, A., Cherubini, F. 2021. Integrated process simulation for bioethanol production: Effects of varying lignocellulosic feedstocks on technical performance. *Bioresource Technology*, 328, 124833.
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. 2016. Exploring laccase and mediators behavior during saccharification and fermentation of steam-exploded wheat straw for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(6), 1816-1825.

- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., Dalai, A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 578-597.
- Narra, M., James, J. P., Balasubramanian, V. 2015. Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. for ethanol production. *Bioresource technology*, 179, 331-338.
- Neureiter, M., Danner, H., Frühauf, S., Kromus, S., Thomasser, C., Braun, R., Narodoslawsky, M. 2004. Dilute acid hydrolysis of presscakes from silage and grass to recover hemicellulose-derived sugars. *Bioresource technology*, 92(1), 21-29.
- Niphadkar, S., Bagade, P., Ahmed, S. 2018. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229-238.
- Nonato, R., Mantelatto, P., Rossell, C. 2001. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1), 1-5.
- OECD Global mitigation potential of biofuels in the transport sector. 2019.
- Oroian, M., Escriche, I. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Panesar, P. S., Marwaha, S. S., Kennedy, J. F. 2006. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(4), 623-635.
- Pathania, S., Sharma, N., 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.
- Paul, A., Ghosh, S., Konar, S., Ray, A. 2020. Biorefinery: A Future Key of Potential Energy. *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy*, 77-87.
- Philippi, K., Tsamandouras, N., Grigorakis, S., Makris, D. P. 2016. Ultrasound-assisted green extraction of eggplant peel (*Solanum melongena*) polyphenols using aqueous mixtures of glycerol and ethanol: Optimisation and kinetics. *Environmental Processes*, 3(2), 369-386.
- Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng, E. P., Show, P. L. 2018. Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 173, 81-94.
- Pifferi, P. G., Zamorani, A. 1969. Natural pigments VI. Anthocyanins of *Solanum melongena*. *Industria Agraria*, 7, 51-56.
- Pilot scale dilute acid pretreatment of rice straw and fermentable sugar recovery at high solid loadings. *Bioresource Technology*. (224) 688-693.

- Putrino, F. M., Tedesco, M., Bodini, R. B., de Oliveira, A. L. 2020. Study of supercritical carbon dioxide pretreatment processes on green coconut fiber to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, 309, 123387.
- Qi, W., Liu, G., He, C., Liu, S., Lu, S., Yue, J., Hu, J. 2019. An efficient magnetic carbon-based solid acid treatment for corncob saccharification with high selectivity for xylose and enhanced enzymatic digestibility. *Green Chemistry*, 21(6), 1292-1304.
- Qin, Y., Zhu, X., Su, Q., Anumah, A., Gao, B., Lyu, W., Wang, B. 2020. Enhanced removal of ammonium from water by ball-milled biochar. *Environmental geochemistry and health*, 42(6), 1579-1587.
- Qiu, J., Ma, L., Shen, F., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S., Hu, Y. 2017. Pretreating wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide for enzymatic saccharification and ethanol production at high solid loading. *Bioresource technology*, 238, 174-181.
- Qiu, J., Tian, D., Shen, F., Hu, J., Zeng, Y., Yang, G., Zhang, J. 2018. Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings. *Bioresource technology*, 268, 355-362.
- Rastogi, M., 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.
- Raud, M., Kikas, T., Sippula, O., Shurpali, N. J. 2019. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 111, 44-56.
- Refaat, A. A. 2012. Biofuels from waste materials. *Comprehensive renewable energy*, 5, 217-262.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. D. O., de Jong, E. V. 2014. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 111-116.
- RFA Annual Fuel Ethanol Production Renewable Fuels Association 2020.
- Rioux, L. E., Turgeon, S. L., Beaulieu, M. 2010. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry*, 71(13), 1586-1595.
- Rojas-Chamorro, J. A., Romero, I., López-Linares, J. C., Castro, E. 2020. Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment. *Renewable Energy*, 148, 81-90.
- Robak, K., Balcerek, M. 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 174.

- Roca, C., Olsson, L. 2003. Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 560-563.
- Roesijadi, G., Jones, S. B., Snowden-Swan, L. J., Zhu, Y. 2010. *Macroalgae as a biomass feedstock: a preliminary analysis* (No. PNNL-19944). Pacific Northwest National Lab.(PNNL), Richland, WA (United States).
- Rosillo-Calle, F., De Groot, P., Hemstock, S. L., Woods, J. (Eds.). 2015. *The biomass assessment handbook: energy for a sustainable environment*. Routledge.
- Rupilius, W., Ahmad, S. 2007. Palm oil and palm kernel oil as raw materials for basic oleochemicals and biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(4), 433-439.
- Russo, M., Moccia, S., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Russo, G. L. 2020. Roles of flavonoids against coronavirus infection. *Chemico-biological interactions*, 328, 109211.
- Samakshi Verma and Arindam Kuila 2020. Principles of Sustainable Biorefinery. In book: *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy* (pp.3-15)
- Santos, E. O., Kabeya, L. M., Figueiredo-Rinhel, A. S., Marchi, L. F., Andrade, M. F., Piatosi, F., Lucisano-Valim, Y. M. 2014. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. *International immunopharmacology*, 21(1), 102-111.
- Sarabandi, K., Gharehbeglou, P., Jafari, S. M. 2020. Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. *Drying Technology*, 38(5-6), 577-595.
- Sarı, A. 2011. Faz Değişimi Yoluyla Isıl Enerjinin Depolanması ve Bu Alanda Yapılan Çalışmalar. *Kimya Lisans Öğrencileri Araştırma Projesi Çalıştayı*, 20-28.
- Sarwal, R., Kumar, S., Mehta, A., Varadan, A., Singh, S. K., Ramakumar, S. S. V., Mathai, R. 2021. ROADMAP FOR ETHANOL BLENDING IN INDIA 2020-25: Report of the Expert Committee.
- Sathendra, E. R., Praveenkumar, R., Gurunathan, B., Chozhavendhan, S., Jayakumar, M. 2022. Refining lignocellulose of second-generation biomass waste for bioethanol production. In *Biofuels and Bioenergy* (pp. 87-110). Elsevier.
- Saurina, J., Sentellas, S. 2015. Determination of phenolic compounds in food matrices: Application to characterization and authentication. In *Fast Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis* (pp. 517-547).
- Sharma, H. S. S., Carmichael, E., Muhamad, M., McCall, D., Andrews, F., Lyons, G., Hornsby, P. R. 2012. Biorefining of perennial ryegrass for the production of nanofibrillated cellulose. *RSC advances*, 2(16), 6424-6437.

- Shimizu, F. L., Monteiro, P. Q., Ghiraldi, P. H. C., Melati, R. B., Pagnocca, F. C., de Souza, W., Brienzo, M. 2018. Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. *Industrial crops and products*, 115, 62-68.
- Shipp, J., Abdel-Aal, E. S. M. 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The open food science journal*, 4(1).
- Sitotaw, Y. W., Habtu, N. G., Gebreyohannes, A. Y., Nunes, S. P., Van Gerven, T. 2021. Ball milling as an important pretreatment technique in lignocellulose biorefineries: a review (Aug, 10.1007/s13399-021-01800-7, 2021). *Biomass Conversion And Biorefinery*.
- Sonnenberg, A., Baars, J., Hendrickx, P. 2007. IEA bioenergy task 42 biorefinery. *Avantium, Biomass Research and Wageningen University and Research Centre: Wageningen, The Netherlands*.
- Sousa, C. C. D., Gonçalves, G. T. I., Falleiros, L. N. S. S. 2018. Ethanol production using agroindustrial residues as fermentation substrates by *Kluyveromyces marxianus*. *Industrial Biotechnology*, 14(6), 308-314.
- Srivastava, R. K., Shetti, N. P., Reddy, K. R., Kwon, E. E., Nadagouda, M. N., Aminabhavi, T. M. 2021. Biomass utilization and production of biofuels from carbon neutral materials. *Environmental Pollution*, 276, 116731.
- Su, T., Zhao, D., Khodadadi, M., Len, C. 2020. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 24, 56-60.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Suresh, T., Sivarajasekar, N., Balasubramani, K., Ahamad, T., Alam, M., Naushad, M. 2020. Process intensification and comparison of bioethanol production from food industry waste (potatoes) by ultrasonic assisted acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis: Statistical modelling and optimization. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105752.
- Talekar, S., Patti, A. F., Vijayraghavan, R., Arora, A. 2018. An integrated green biorefinery approach towards simultaneous recovery of pectin and polyphenols coupled with bioethanol production from waste pomegranate peels. *Bioresource technology*, 266, 322-334.
- Tan, L., Tang, Y. Q., Nishimura, H., Takei, S., Morimura, S., Kida, K. 2013. Efficient production of bioethanol from corn stover by pretreatment with a combination of sulfuric acid and sodium hydroxide. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(7), 682-695.
- Tan, S. G., Chow, W. S. 2010. Biobased epoxidized vegetable oils and its greener epoxy blends: A review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 49(15), 1581-1590.

- Taymaz, E. R., Uslu, M. E. 2019. Lignoselülozik Biyokütlenin Ön Muamele Yöntemleri. *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 2(29), 23-31.
- Thomsen, M. H., Bech, D., Kiel, P. 2004. Manufacturing of stabilised Brown juice for L-lysine production from university lab scale over pilot scale to industrial production. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 18(1), 37-46.
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M. J. 2011. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In *Biofuels* (pp. 149-176). Academic press.
- Tsafrakidou, P., Manthos, G., Zagklis, D., Mema, J., Kornaros, M. 2022. Assessment of substrate load and process pH for bioethanol production–Development of a kinetic model. *Fuel*, 313, 123007.
- Tsuda, T. 2012. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular nutrition & food research*, 56(1), 159-170.
- Unrean, P., Ketsub, N. 2018. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial crops and products*, 123, 238-246.
- Upadhyay V. 2020. Biomass Resources for Biorefinery Application October 2020 In book: *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy* (pp.55-66)
- Van Dyne, D. L., Blase, M. G., Clements, L. D. 1999. A strategy for returning agriculture and rural America to long-term full employment using biomass refineries. *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, Va, 114-123.
- Varela, J. A., Gethins, L., Stanton, C., Ross, P., Morrissey, J. P. 2017. Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. In *Yeast diversity in human welfare* (pp. 439-453). Springer, Singapore.
- Vega, A. J. D., Hector, R. E., Jose, L. G. J., Paola, H. C., Raúl, Á. S., Enrique, O. V. C. 2017. Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas peel. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(5), 456-465.
- Vispute, T. P., Huber, G. W. 2008. Breaking the chemical and engineering barriers to lignocellulosic biofuels. *International sugar journal*, 110(1311), 138-149.
- Walker, T., Cardellichio, P., Colnes, A., Gunn, J., Kittler, B., Perschel, B., N. C. 2010. Biomass sustainability and carbon policy study. *Manomet Center for Conservation Sciences*.
- Wang, D., Xu, Y., Hu, J., Zhao, G. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(4), 340-346.

- Wellisch, M., Jungmeier, G., Karbowski, A., Patel, M. K., Rogulska, M. 2010. Biorefinery systems—potential contributors to sustainable innovation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 4(3), 275-286.
- West, C., McTaggart, R., Letcher, T., Raynie, D., Roy, R. 2019. Effects of gamma irradiation upon the mechanical and chemical properties of 3D-printed samples of polylactic acid. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 141(4).
- Xue, T., Liu, K., Chen, D., Yuan, X., Fang, J., Yan, H., He, W. 2018. Improved bioethanol production using CRISPR/Cas9 to disrupt the ADH2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 34(10), 1-12.
- Xue, T., Liu, K., Chen, D., Yuan, X., Fang, J., Yan, H., He, W. 2018. Improved bioethanol production using CRISPR/Cas9 to disrupt the ADH2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 34(10), 1-12.
- Yan, D., Ji, Q., Yu, X., Li, M., Fakayode, O. A., Yagoub, A. E. A., Zhou, C. 2021. Multimode-ultrasound and microwave assisted natural ternary deep eutectic solvent sequential pretreatments for corn straw biomass deconstruction under mild conditions. *Ultrasonics sonochemistry*, 72, 105414.
- Yeşilören Akal G. 2019. Siyah Havuç Posasından Antosiyanin Ekstraksiyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zaky, A. S., Tucker, G. A., Daw, Z. Y., Du, C. 2014. Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS yeast research*, 14(6), 813-825.
- Zhao, W., Zhao, F., Zhang, S., Gong, Q., Chen, G. 2019. Ethanol production by simultaneous saccharification and cofermentation of pretreated corn stalk. *Journal of basic microbiology*, 59(7), 744-753.
- Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., Liu, H. 2013. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology*, 104, 17-25.
- Zheng, Y., Lin, H. M., Tsao, G. T. 1998. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology progress*, 14(6), 890-896.
- Zhu, J. Y., Pan, X., Zalesny, R. S. 2010. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 847-857.
- Zhu, S., Huang, W., Huang, W., Wang, K., Chen, Q., Wu, Y. 2015. Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. *Applied Energy*, 154, 190-196.